

系统性红斑狼疮患者外周血 CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 水平与 Th1/Th2 细胞表达的相关性*

高娟¹ 邢燕² 张利军³

(1. 重庆市九龙坡区中医院检验科, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学附属第一医院输血科, 重庆 400016;

3. 重庆医科大学附属第二医院检验科, 重庆 400010)

【摘要】 目的 探讨系统性红斑狼疮(SLE)患者外周血 CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 水平与相关机制的关系。方法 选取 2019 年 8 月~2020 年 12 月重庆市九龙坡区中医院收治的 112 例 SLE 患者(SLE 组),按 SLEDAI 评分分为非活动期 72 例,活动期 40 例,另选取同期健康自愿者 50 例(健康组)。采集受试者血采用流式细胞技术测定 CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 水平,采用酶联免疫法测定血清中相关细胞因子,分析各指标与病情的相关性。**结果** SLE 组外周血 CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 细胞计数及占比均较健康组明显减小,差异有统计学意义($P < 0.05$);SLE 活动期组外周血 CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 细胞计数及占比、IFN- γ 、IFN- γ /IL-4 明显低于非活动期组,SLEDAI 评分、24 h UPQ、IL-4 明显高于非活动期组,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$);Pearson 相关分析结果显示,CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 细胞与 SLE 患者 SLEDAI 评分、24 hUPQ 及 IL-4 呈负相关($r = -0.573, -0.682, -0.374, P < 0.05$),而与 IFN- γ 无显著相关性($r = 0.016, P > 0.05$)。**结论** CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 细胞参与了 SLE 免疫调节过程,其表达水平与患者 SLEDAI 评分呈显著负相关,CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 细胞可能通过分泌 Th1/Th2 细胞相关因子发挥 SLE 免疫调节作用,值得临床借鉴。

【关键词】 系统性红斑狼疮;CD₃⁺CD₅₆⁺NKT;疾病活动指数;Th1/Th2 细胞

【中图分类号】 R593.24⁺1 **【文献标志码】** A **DOI:**10.3969/j.issn.1672-3511.2022.03.030

Correlation study of peripheral blood CD₃⁺CD₅₆⁺NKT level and Th1/Th2 cell expression in patients with systemic lupus erythematosus

GAO Juan¹, XING Yan², ZHANG Lijun³

(1. Laboratory Department, Jiulongpo Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400016, China;

2. Department of Blood Transfusion, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

3. Laboratory Department, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

【Abstract】 **Objective** To explore the peripheral blood CD₃⁺CD₅₆⁺NKT levels and related mechanisms in patients with systemic lupus erythematosus(SLE). **Methods** A total of 112 SLE patients(SLE group) admitted to Jiulongpo hospital of traditional chinese medicine from August 2019 to December 2020 were selected, and they were divided into non-active stage(72 cases) and active stage(40 cases) according to SLEDAI score, and 50 healthy volunteers(healthy group) during the same period. Blood samples were taken from the participants and CD₃⁺CD₅₆⁺NKT levels were determined using flow cytometry. Serum related cytokines were determined using ELISA to analyze the correlation between each index and the disease. **Results** The peripheral blood CD₃⁺CD₅₆⁺NKT cell count and proportion in the SLE group were significantly lower than those in the healthy group, and the difference was statistically significant($P < 0.05$); the peripheral blood CD₃⁺CD₅₆⁺NKT cell count and proportion in the SLE group Compared with the healthy group, the difference was statistically significant($P < 0.05$). The results of Pearson correlation analysis showed that CD₃⁺CD₅₆⁺NKT cells were negatively correlated with SLEDAI score, 24hUPQ and IL-4 in SLE patients($r = -0.573, -0.682, -0.374, P < 0.05$), but not significantly related to IFN- γ Correlation($r = 0.016, P > 0.05$). **Conclusion** CD₃⁺CD₅₆⁺

基金项目:重庆市科技计划项目(2019016)

引用本文:高娟,邢燕,张利军.系统性红斑狼疮患者外周血 CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 水平与 Th1/Th2 细胞表达的相关性[J].西部医学,2022,34(3):

NKT cells are involved in the immune regulation process of SLE, and their expression level is significantly negatively correlated with the patient's SLEDAI score. CD₃⁺CD₅₆⁺NKT cells may exert SLE immunoregulation by secreting Th1/Th2 cell-related factors, which is worthy of clinical reference.

[Key words] Systemic lupus erythematosus; CD₃⁺CD₅₆⁺NKT; Disease activity index; Th1/Th2 cells

系统性红斑狼疮(Systemic lupus erythematosus, SLE)为常见慢性自身免疫性疾病,其发病机制复杂,迄今仍未完全明确。较多学者认为免疫功能紊乱贯穿于 SLE 的病理过程^[1-2]。自然杀伤 T(NKT)细胞为异质性 T 淋巴细胞,同时具有 NK 细胞与 T 淋巴细胞的部分特性^[3]。CD₃⁺CD₅₆⁺淋巴细胞为 NKT 细胞中的一员,其参与了类风湿性关节炎^[4]、Graves 病^[5]等自身免疫性疾病的发病与进展,而在 SLE 中的研究报道较少,且在 SLE 中的作用存在较大争议。本研究选取 112 例 SLE 患者,采用流式细胞仪测定 CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 细胞的表达情况,旨在探讨外周血 CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 细胞表达与相关机制的关系,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2019 年 8 月~2020 年 12 月重庆市九龙坡区中医院收治的 112 例 SLE 患者为 SLE 组。纳入标准:①符合美国风湿病学会制定的 SLE 诊断标准^[6]。②近半年内未接受过免疫抑制剂、类固醇激素治疗。③未合并其它自身免疫系统疾病。④自愿参与本研究且对研究内容充分知情。排除标准:①合并急慢性感染、严重肝肾功能不全及恶性肿瘤者。②非 SLE 所致精神病。③妊娠期和哺乳期妇女。另选取同期我院体检科健康自愿者 50 例为健康组。本研究经医院伦理委员会审核批准。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂与仪器 流式细胞仪(美国 BD 公司, FACScalibur 型),酶标仪(美国 BIO-RAD 公司, 3550UV 型),小鼠抗人单克隆抗体 CD3FITC、CD56-PE 均由美国 BD 公司生产,二抗均购自美天旎生物科技有限公司,IFN-γ、IL-2、IL-6、IL-10 酶联免疫法(ELISA)试剂盒购自美国 R&D 公司,淋巴细胞分离液由加拿大 Norgen Biotek 生产,乙二胺四乙酸(EDTA)、聚丁二酸丁二醇酯(PBS)缓冲液由北京索莱宝科技有限公司生产,试验操作均按试剂说明书执行。

1.2.2 外周血 CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 测定 采集受试者空腹静脉血 3 mL, EDTA 抗凝,取 5μL 加入流式管,加入单抗 CD3FITC、CD56-PE,室温避光孵育 20 min,再经 PBS 缓冲液洗涤 2 次,1200 r/min 离心(离心半径:10 cm)10 min 后收集细胞,上流式细胞仪检测,使用 Cellquest 软件获取并进行数据分析。

1.2.3 外周血相关细胞因子测定 取上述血液 2 mL,2000 r/min 离心(离心半径:10 cm)10 min 后取血清层,采用酶联免疫法测定血清中 IFN-γ、IL-4 浓度,并在酶标仪 450 nm 处测定吸光度值,通过绘制标准曲线计算出相应指标的浓度。

1.2.4 资料收集 收集患者 SLE 疾病活动指数(SLEDAI)评分、24 h 尿蛋白定量(24 hUPQ)等其他临床参数。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 22.0 进行分析,计量资料以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验;计数资料以率(%)表示,采用 χ^2 检验,采用 Pearson 相关分析方法分析 CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 与 SLE 其他临床参数的关系,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料比较 SLE 组:男 34 例,女 78 例;年龄 21~63 岁,平均(28.41±6.37)岁;体质指数 21~25 kg/m²,平均(23.05±3.28)kg/m²;病程 0.5~15 年,平均(5.37±1.20)年,按 SLEDAI^[7]评分分为非活动期(SLEDAI<5 分)72 例,活动期(SLEDAI≥5 分)40 例。健康组:男 16 例,女 34 例;年龄 20~62 岁,平均(28.26±6.51)岁;体质指数 21~24 kg/m²,平均(23.12±3.31)kg/m²。两组受试对象上述临床资料比较,差异均无统计学意义(*P*>0.05)。

2.2 两组 CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 细胞水平比较 SLE 组外周血 CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 细胞计数及占比均较健康组明显减小,差异有统计学意义(*P*<0.05),见表 1。

表 1 健康组与 SLE 组外周血 CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 细胞水平比较($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of CD3+CD56+NKT cell levels in peripheral blood between healthy group and SLE group

组别	<i>n</i>	CD ₃ ⁺ CD ₅₆ ⁺ NKT 细胞计数(×10 ⁹ /L)	CD ₃ ⁺ CD ₅₆ ⁺ NKT 细胞百分比(%)
健康组	50	6.35±1.35	14.38±3.09
SLE 组	112	3.76±1.02	8.24±2.81
<i>t</i>		7.134	5.237
<i>P</i>		<0.001	0.024

2.3 SLE 不同疾病活动度 CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 细胞水平及其他参数比较 SLE 活动期组 CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 细胞水平及其占比、IFN-γ、IFN-γ/IL-4 均明显低于非活动期组(*P*<0.05),而 SLEDAI 评分、24 hUPQ、IL-4 明显高于非活动期组,差异有统计学意义(*P*<0.05),见表 2。

表 2 不同疾病活动度 SLE 患者 CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 细胞水平及其他参数比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of CD3+CD56+NKT cell levels and other parameters in SLE patients with different disease activity levels

组别	n	CD ₃ ⁺ CD ₅₆ ⁺ NKT 细胞计数($\times 10^9/L$)	CD ₃ ⁺ CD ₅₆ ⁺ NKT 细胞百分比(%)	SLEDAI 评分(分)	24 h UPQ (g/d)	IFN- γ (ng/L)	IL-4 (ng/mL)	IFN- γ /IL-4
非活动期	72	4.47 \pm 1.10	8.94 \pm 1.35	3.17 \pm 1.13	0.51 \pm 0.10	24.35 \pm 5.93	46.52 \pm 10.23	0.51 \pm 0.13
活动期	40	2.93 \pm 0.94	7.61 \pm 0.95	7.05 \pm 1.62	1.4 \pm 0.25	19.11 \pm 4.21	54.67 \pm 11.03	0.23 \pm 0.05
t		7.134	5.237	5.726	5.471	4.218	4.509	4.067
P		<0.001	0.024	0.016	0.014	0.037	0.021	0.048

2.4 CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 与 SLE 临床参数的相关性分析 Pearson 相关分析结果显示,CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 细胞与 SLE 患者 SLEDAI 评分、24hUPQ 及 IL-4 呈负相关($r = -0.573, -0.682, -0.374, P < 0.05$),而与 IFN- γ 无显著相关性($r = 0.016, P > 0.05$),见表 3。

表 3 CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 与 SLE 临床参数的相关性分析

Table 3 Correlation analysis of CD3+CD56+NKT and clinical parameters of SLE

参数	CD ₃ ⁺ CD ₅₆ ⁺ NKT 细胞	
	r	P
SLEDAI 评分	-0.573	<0.001
24hUPQ	-0.682	0.014
IFN- γ	0.016	0.357
IL-4	-0.374	0.020

3 讨论

SLE 是一种好发于青壮年的自身免疫性疾病,我国 SLE 年新发约 70~100/10 万例,呈逐年增长趋势,其中女性患病率约为男性的 10 倍^[8-10]。免疫系统紊乱为 SLE 的重要病理机制,病情未得到控制常累及血液、关节、皮肤等多器官系统,严重危害机体健康。目前 SLE 的诊断主要依据临床症状、自身抗体指标、免疫学指标及影像学检查等,但易与类风湿关节炎、系统性血管炎等病症混淆,造成漏诊或误诊^[11-13]。随着近年来对 SLE 免疫机制研究的不断深入,学者发现 NKT 细胞与 SLE 的发病关系密切,有望成为 SLE 诊断和病情严重程度评估的新指标^[14-15]。

本研究结果显示,SLE 组外周血 CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 细胞计数及占比均明显小于健康组,且 SLE 活动期 CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 细胞水平及其占比明显低于非活动期组,同时 Pearson 相关分析发现,CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 细胞与 SLE 患者 SLEDAI 评分呈显著负相关,提示 CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 细胞参与了 SLE 的发病过程,SLE 患者机体存在外周血 CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 细胞数量及占比降低,且活动期其表达水平更低,与王锡携^[16]报道结果一致。NKT 细胞广泛分布在胸腺、骨髓及肝脏等多个组织器官中,在外周血中的水平较低,其可同时表达 T 细胞的表明标志(CD3、T 细胞受体等)和 NK 细胞的表明标志(CD16、CD56 等),兼有

T 细胞与 NK 细胞的生物功能,并可连接固有免疫与适应性免疫,参与机体免疫应答过程,调节自身防御网络^[17-19]。邹原方等^[20-21]研究发现,SLE 患者存在 CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 细胞数量减少和细胞功能缺陷,并认为其原因可能与机体分泌干扰素诱导 NKT 细胞凋亡有关。本研究分析认为,SLE 活动期患者机体存在的大量抗体与免疫复合物可能诱导 NK 细胞减少和 NK 细胞功能抑制,导致 SLE 患者适应性免疫与固有免疫调节失衡,造成机体免疫系统紊乱;同时,CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 细胞可能在杀伤靶细胞作用时与其功能凋亡,在 SLE 进展过程中,CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 细胞数量较少,SLEDAI 增加,病情越重,免疫紊乱程度愈加严重。值得注意的是,SLE 活动期 24 h 尿蛋白定量高于非活动期,CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 细胞与 SLE 患者 24 hUPQ 呈负相关,表明 SLE 活动期肾功能损害更严重,CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 细胞可能成为 SLE 早期肾损伤的诊断标志物,有待进一步探讨。

Th1/Th2 细胞平衡向 Th2 细胞漂移是 SLE 发病重要病理机制^[22],在 NKT 细胞发挥免疫过程中可分泌 IL-4 促进 Th2 细胞功能增强,使 SLE 活动度增加^[23]。并有研究证实^[24-25],CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 细胞可通过分泌 IL-2、IL-6、IL-10 等相关因子参与 Th0 转化为 Th1/Th2 细胞的过程。本次研究中测定的外周血 IFN- γ 、IL-4,其分别由 Th1 细胞、Th2 细胞分泌,SLE 活动期 IFN- γ 、IFN- γ /IL-4 均明显低于非活动期组,而 IL-4 明显高于非活动期组,且 Pearson 相关分析结果显示,CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 细胞与 SLE 患者 IL-4 均呈显著负相关,而与 IFN- γ 无显著相关性,提示 CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 细胞可能参与了 Th1/Th2 平衡调节。原因分析,CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 细胞受刺激活化后,通过分泌 IL-4 等细胞因子,引发 Th2 型免疫反应,Th2 细胞功能亢进并释放特异性细胞因子的功能,抑制 T 细胞成熟和分化,导致机体免疫调节机制破坏,自身反应细胞过表达,出现自身免疫反应损伤,加重病情。

4 结论

CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 细胞参与了 SLE 免疫调节过程,其水平与患者 SLEDAI 评分呈显著负相关,CD₃⁺CD₅₆⁺NKT 细胞可能通过分泌 Th1/Th2 细胞相关因

子发挥 SLE 免疫调节作用,值得临床借鉴。

【参考文献】

- [1] 郭娜,张葵,吕明华,等. 系统性红斑狼疮患者免疫细胞表面 CD305 表达及与发病的关系[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2019, 35(5):452-458.
- [2] HAMILTON J A, HSU H C, MOUNTZ J D. Role of production of type I interferons by B cells in the mechanisms and pathogenesis of systemic lupus erythematosus[J]. *Discov Med*, 2018, 25(135): 21-29.
- [3] ZAHARAN A M, ABDEL-RAHIM M H, ELSAYH K I, *et al.* Natural Killer and Natural Killer T Cells in Juvenile Systemic Lupus Erythematosus: Relation to Disease Activity and Progression[J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2019, 67(3): 161-169.
- [4] 尤海燕,芮金兵,焦志军,等. 类风湿性关节炎患者外周血 CD3+CD(16,56)+NK T 细胞百分率的变化及意义[J]. 检验医学, 2012, 27(2):138-140.
- [5] 周芳宇,王欣,谭贵琴,等. Graves 病细胞免疫学机制的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(3):98-102,128.
- [6] HOCHBERG M C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus[J]. *Arthritis Rheum*, 1997, 40(9):1725.
- [7] VITALI C, BENCIVELLI W, MOSCA M, *et al.* Development of a clinical chart to compute different disease activity indices for systemic lupus erythematosus[J]. *J Rheum*, 1999, 26(2): 498-501.
- [8] 董光富,叶任高,张晓,等. 系统性红斑狼疮并发感染的流行病学研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2004, 14(7):755-758.
- [9] RILLO O L, D B ROSIO, GUSIS S. Systemic lupus erythematosus[J]. *Current Opinion in Rheumatology*, 2020, 18(2): 449-450.
- [10] ZHANG S, LI M, ZHANG L, *et al.* Clinical Features and Outcomes of Neuropsychiatric Systemic Lupus Erythematosus in China[J]. *J Immunol Res*, 2021: 1349042.
- [11] 廖秋燕,汤冬娥,赵鑫,等. 系统性红斑狼疮的诊断新方法 with 临床验证[J]. 检验医学与临床, 2020, 17(6):721-723,727.
- [12] 劳小霞,马巧蓉,杨志革,等. 自身抗体检测在壮族人群系统性红斑狼疮诊断及病情发展中的意义[J]. 中国卫生检验杂志, 2020, 30(4):388-391,395.
- [13] 周海舟,关秀茹. 补体系统在系统性红斑狼疮诊疗中的价值[J]. 中华检验医学杂志, 2019, 42(12):1002-1006.
- [14] 张铭明,夏丹,唐婷婷,等. 系统性红斑狼疮患者外周血 CD3+CD56+自然杀伤样 T 细胞体外活化特性研究[J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(4):365-369.
- [15] LIN S J, KUO M L, HSIAO H S, *et al.* Cytotoxic Function and Cytokine Production of Natural Killer Cells and Natural Killer T-Like Cells in Systemic Lupus Erythematosus Regulation with Interleukin-15[J]. *Mediators Inflamm*, 2019: 4236562.
- [16] 王锡携. 系统性红斑狼疮患者外周血 CD3-CD16+CD56+NK 细胞水平变化的临床意义[J]. 中南医学科学杂志, 2020, 48(3): 288-291+296.
- [17] 龚英,李子涛,付笑迎,等. 人外周血 CD3+CD56+NKT 与 V α 24+iNKT、V β 11+iNKT 细胞的关系及 NKT 亚群和细胞因子分泌的研究[J]. 免疫学杂志, 2013, 29(2):137-141.
- [18] YANG Y, DAY J, SOUZA-FONSECA GUIMARAES F, *et al.* Natural killer cells in inflammatory autoimmune diseases[J]. *Clin Transl Immunology*, 2021, 10(2): e1250.
- [19] LU Z, LI J, JI J, GU Z, *et al.* Altered peripheral lymphocyte subsets in untreated systemic lupus erythematosus patients with infections[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2019, 52(4):e8131.
- [20] 邹原方,罗婉莹,郭少卿,等. 系统性红斑狼疮患者外周血 CD3+CD56+自然杀伤 T 细胞的表达及临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(8):967-968.
- [21] PARK Y, LIM J, KIM S Y, *et al.* Changes of frequency and expression level of CD161 in CD8+ T cells and natural killer T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Microbiol Immunol*, 2020, 64(7): 532-539.
- [22] 李焱,崔鹤仙,索晓慧. 系统性红斑狼疮患者 Th1/Th2 细胞因子的研究[J]. 中国现代医学杂志, 2007, 17(22):2748-2750.
- [23] SNYDER-CAPPIONE J E, TINCATI C, ECCLES-JAMES I G, *et al.* A Comprehensive Ex Vivo Functional Analysis of Human NKT Cells Reveals Production of MIP1- α and MIP1- β , a Lack of IL-17, and a Th1-Bias in Males[J]. *Plos One*, 2010, 5(11): e15412.
- [24] 李丽,王鹏远,池莲祥,等. Graves 病患者 CD3+CD56+自然杀伤 T 细胞及其分泌的细胞因子表达研究[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2017, 31(1):54-56.
- [25] PAREDES J L, FERNANDEZ-RUIZ R, NIEWOLD T B. T Cells in Systemic Lupus Erythematosus[J]. *Rheum Dis Clin North Am*, 2021, 47(3): 379-393.

(收稿日期:2021-07-27;修回日期:2022-04-28;编辑:刘灵敏)