

外周血 Treg 细胞与 Th17 细胞在寻常型银屑病中的表达及临床意义

李燕, 曾兰瑶, 王艺淳

眉山市人民医院皮肤科, 四川 眉山 620010

摘要: **目的** 探讨寻常型银屑病患者外周血调节性 T 细胞 (Treg) 与辅助性 T 细胞 17 (Th17) 的表达及临床意义。 **方法** 选择 2014 年 5 月-2016 年 5 月眉山市人民医院收治的 54 例寻常型银屑病患者作为研究组,另选择同期于该院进行体检的 54 例健康受检者作为对照组。应用流式细胞技术检测两组外周血 Treg 细胞、Th17 细胞比例,应用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测两组转化生长因子- β (TGF- β)、白细胞介素-23 (IL-23)、白细胞介素-17 (IL-17),并分析上述指标与寻常型银屑病患者皮损面积和严重程度评分 (PASI) 相关性。 **结果** 研究组 Th17 细胞、Th17/Treg、IL-23、IL-17、IL-17/TGF- β 水平分别为 (4.60 \pm 1.58)%、(1.75 \pm 0.57)、(155.20 \pm 25.52) ng/L、(70.18 \pm 20.52) ng/L、(0.16 \pm 0.06) 显著高于对照组的 (0.82 \pm 0.35)%、(0.17 \pm 0.08)、(63.20 \pm 12.52) ng/L、(19.55 \pm 6.50) ng/L、(0.04 \pm 0.01),差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。研究组 Treg 细胞、TGF- β 水平分别为 (2.82 \pm 0.85)%、(475.52 \pm 45.85) ng/L 显著低于对照组的 (5.30 \pm 1.70)%、(652.52 \pm 58.65) ng/L,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。寻常型银屑病患者 PASI 评分与 Th17、IL-17、IL-23、IL-17/TGF- β 及 Th17/Treg 呈正相关 ($P < 0.01$);TGF- β 、Treg 细胞百分比与 PASI 呈负相关 ($r = -0.523, 0.842$, 均 $P < 0.01$)。 **结论** 寻常型银屑病患者 Treg 细胞异常降低, Th17 细胞异常升高,其发病与 Treg 增殖不足及 Th17 异常活化有关。

关键词: 外周血; Treg 细胞; Th17 细胞; 寻常型银屑病; 表达; 临床意义

中图分类号: R758.63 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2018)01-0093-03 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2018.01.027

寻常型银屑病又称为牛皮癣,是一种具有特征性皮损的慢性皮肤病。患者通常表现为皮肤多发性白色鳞屑、发亮薄膜和点状出血等,上述症状反复发作,严重影响患者生活质量。银屑病的发病率与种族、地理位置等有明显关系。近年来随着我国社会的发展,银屑病的发病率明显增高,最近流行病学调查显示,目前我国银屑病发病率为 0.47%^[1]。研究发现,T 细胞及其相关细胞因子是诱发银屑病的重要环节。辅助性 T 细胞 17 (Th17) 属于新型 T 细胞亚型,它通过分泌 IL-22、IL-7 及 IL-17 等因子来介入炎症反应,是银屑病发病的主要机制之一^[2]。调节性 T 细胞 (Treg) 属于 T

细胞亚群中的重要成员,具有免疫调节功能,是保证机体免疫应答稳定与耐受的重要因子。有研究指出,Treg 与 Th17 细胞与慢性炎症性、免疫性疾病的发病、进展具有密切的相关性^[3]。为了进一步探讨寻常型银屑病患者外周血 Treg 细胞与 Th17 细胞的表达,笔者进行了相关研究,分析外周血 Treg 细胞与 Th17 细胞在寻常型银屑病中的表达及临床意义,现报道如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选择 2014 年 5 月-2016 年 5 月眉山市人民医院收治的 54 例寻常型银屑病患者作为研究组,纳入标准:(1)符合《临床皮肤病学》^[4]中的诊断标准,且经组织病理学检查证实;(2)1 个月内未应用过任

作者简介: 李燕 (1983-),女,四川眉山人,本科学历,主治医师,主要从事银屑病基础与临床方面的研究工作。

[5] 郝元涛,方积乾. 世界卫生组织生存质量测定量表中文版介绍及其使用说明[J]. 现代康复,2000,4(8):1127-1129.

[6] 张明园. 精神科评定量表手册[M]. 第3版. 长沙:湖南科学技术出版社,2005:163.

[7] Ramon S, Williams JE. Mental health at the crossroads: the promise of the psychosocial approach [M]. England: Ashgate Publishing Limited, 2005:138-154.

[8] Anthony WA. Recovery from mental illness: the guiding vision of mental health service system in the 1990s [J]. Psychosoc Rehabil J, 1993, 16(1):11-23.

[9] Ramsey AT, Montgomery K. Technology-based interventions in social work practice: a systematic review of mental health interventions [J]. Soc Work Health Care, 2014, 53(9):883-889.

[10] 刘俊,武艳红,苏献红,等. 社会小组工作对改善精神病患者孤独感的效果[J]. 中国健康心理学杂志, 2013, 21(10):1524-1525.

[11] 余潇. 精神分裂症康复期患者社会功能提高小组的介入研究[D]. 上海:华东理工大学,2012.

[12] 李燕平. 促进精神病患者社会融合的社工介入[J]. 中国社会工作, 2012, 23(1):38.

何免疫抑制剂或皮质类固醇激素。排除标准:(1)合并严重脏器功能障碍者;(2)资料不全者。其中男 30 例,女 24 例;年龄 22~75 岁,平均年龄(40.5±7.5)岁;病程 2~10 年,平均病程(5.3±2.5)年;另选择同期于该院进行体验的 54 例健康受检者作为对照组,其中男 29 例,女 25 例;年龄 22~76 岁,平均年龄(40.5±6.2)岁;本组受检者中均无银屑病病史、系统性疾病、免疫性疾病及其他皮肤病。两组在性别、年龄比较中,差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究经医院伦理委员会同意,患者对研究知情同意。

1.2 方法 两组受检者均接受外周血 Treg 细胞、Th17 细胞及转化生长因子- β (TGF- β)、白细胞介素-23(IL-23)、白细胞介素-17(IL-17)检测,具体方法如下:(1)Treg 细胞与 Th17 细胞检测:取外周静脉血 3 ml,抗凝管内抗凝,以密度梯度离心法将外周血单个核细胞(PBMC)分离,之后将分离出的 PBMC 加入 CD4 与 CD3 荧光标记抗体进行温育(时间为 30 min),用于标记 Th17 细胞表面,温育后样本通过培养液 RPMI-1640 洗涤,加入特殊培养液内(链霉素 100 $\mu\text{g/ml}$ 、青霉素 100 IU/ml、10%新生牛血清、莫能霉素 3 mmol/L、离子霉素 1 $\mu\text{g/ml}$ 、PMA50 mg/ml),放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱内存放 18~20 h。根据说明书中的操作方法将培养后的细胞给予固定破膜,加入对照抗体与荧光标记抗体 IL-17,温育 30 min。选择 200 μl 外周全血,加入 CD25 与 CD4 荧光标记抗体进行温育(时间为 20 min),之后以磷酸盐缓冲液将样本洗涤后给予固定破膜,最后加入对照抗体与单克隆抗体,温育 30 min。通过流式细胞检测设备测定标记两种细胞的荧光强度,其中 CD17⁺CD4⁺CD3⁺为 Th17 细胞,而 Foxp3⁺CD25^{high}CD4⁺为 Treg 细胞。(2)TGF- β 、IL-23、IL-17 检测:取肘静脉血 5 ml,以 1 000 r/min 的速度离心 15 min,取上层血清,并放于-70 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱内待检。通过酶联免疫吸附法(ELISA)测定 TGF- β 、IL-23、IL-17 水平,试剂盒购自深圳晶美生物有限公司,具体操作步骤严格按照说明书执行。

1.3 观察指标 (1)观察对比两组受检者 Treg 细胞、Th17 细胞及 Th17/Treg 水平。(2)对比两组受检者相关细胞因子的水平,即 TGF- β 、IL-23、IL-17、IL-17/TGF- β 。(3)分析 Th17/Treg 细胞及相关因子与寻常型银屑病患者 PASI 评分的相关性。PASI 评分标准^[5]:(1)皮肤特征:包括红斑、浸润、鳞屑等,无症状=0 分,轻度=1 分,中度=2 分,重度=3 分;(2)各部位皮损占面积:无=0 分,1%~9%=1 分,10%~29%=2 分,30%~49%=3 分,50%~69%=4 分,70%~89%=5 分,90%~

100%=6 分。两部分累计后乘以各部分权重系数重得出总分,头部 0.1,上肢 0.2,躯干 0.3,下肢 0.4。

1.4 统计学处理 通过 SPSS 17.0 软件处理,计量资料采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间对比采用 t 检验,采用 Pearson 进行相关性分析 Th17/Treg 细胞及相关因子与寻常型银屑病患者 PASI 评分的相关性, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组受检者 Treg 细胞、Th17 细胞及 Th17/Treg 水平对比 研究组 Th17 细胞及 Th17/Treg 水平均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$)。研究组 Treg 细胞水平低于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表 1。

表 1 两组受检者 Treg 细胞、Th17 细胞及 Th17/Treg 水平对比($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	Treg(%)	Th17(%)	Th17/Treg
研究组	54	2.82±0.85	4.60±1.58	1.75±0.57
对照组	54	5.30±1.70	0.82±0.35	0.17±0.08
t 值		9.588	17.164	20.172
P 值		0.000	0.000	0.000

2.2 两组受检者相关细胞因子的水平对比 研究组 TGF- β 水平低于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$);研究组 IL-23、IL-17、IL-17/TGF- β 水平高于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表 2。

表 2 两组受检者相关细胞因子的水平对比($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	TGF- β (ng/L)	IL-23(ng/L)	IL-17(ng/L)	IL-17/TGF- β
研究组	54	475.52±45.85	155.20±25.52	70.18±20.52	0.16±0.06
对照组	54	652.52±58.65	63.20±12.52	19.55±6.50	0.04±0.01
t 值		17.472	127.189	17.285	14.495
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

2.3 Th17/Treg 细胞及相关因子与寻常型银屑病患者 PASI 评分的相关性分析 研究组患者 PASI 评分为(17.52±7.20)分,患者 PASI 评分与 Th17、IL-17、IL-23、IL-17/TGF- β 及 Th17/Treg 比例呈正相关($r=0.523$ 、 0.620 、 0.590 、 0.842 、 0.752 , $P=0.012$ 、 0.007 、 0.008 、 0.000 、 0.000);TGF- β 、Treg 细胞水平与 PASI 评分呈负相关($r=-0.523$ 、 -0.842 , $P=0.006$ 、 0.000)。

3 讨论

寻常型银屑病是一种临床常见的慢性炎症性皮肤病,也是皮肤科的顽固性疾病。目前该病的发病机制仍未完全明确。研究发现,银屑病患者 T 淋巴细胞亚群及其相关因子失调、分泌异常有关^[6]。Treg 与 Th17 细胞是 T 细胞在不同条件下生成的两种新 T 细

胞亚群,二者在正常情况下互为平衡状态,其中 Treg 是具有免疫抑制与免疫调节双重作用的 $CD4^+T$ 细胞,它可以调控免疫应答反应,减少机体损伤程度。Th17 则是通过生成的 IL-17 等因子来募集与活化中性粒细胞,继而介导炎症反应。有研究指出,介导炎症的 Th17 与介导免疫作用的 Treg 细胞互相拮抗,其功能与数量的稳定性对机体免疫稳态具有直接的影响^[7]。若 Th17 与 Treg 的稳定性被破坏,可诱发免疫应答异常或障碍,引发慢性炎症性或免疫性疾病^[8-9]。

近年来,有学者通过对银屑病患者外周血 IL-17 与 Th17 进行比较发现,银屑病患者外周血 IL-17 与 Th17 水平显著高于健康人群,并认为 IL-17 与 Th17 在银屑病起病与疾病进展中具有重要的作用^[10-11]。本研究对 54 例患者外周血 Treg 细胞与 Th17 细胞进行检测,结果发现,研究组 Th17 细胞及 IL-23、IL-17 水平明显高于对照组,Treg 细胞水平低于对照组,证实寻常型银屑病患者确实存在外周血 Treg 细胞与 Th17 细胞的失衡。笔者认为,寻常型银屑病患者机体内 Treg 细胞与 Th17 细胞失衡状态,这可能是其参与疾病发病与进展的重要环节,并进一步诱发免疫应答异常或障碍,导致疾病发展。本研究还对两组患者相关细胞因子的水平进行了比较,结果研究组 TGF- β 水平低于对照组,IL-23、IL-17、IL-17/TGF- β 水平高于对照组,Treg 细胞与 Th17 细胞失衡可以进一步导致细胞因子异常。头螺旋转录因子是调控 Treg 与 Th17 分化的主要转录因子,在细胞功能与细胞发育中发挥着直接的作用^[12-13]。当机体环境稳定且无炎症表达时,免疫系统中的 TGF- β 水平升高,继而上调 Foxp3,介导 Treg 分泌,保证体内免疫耐受与应答。然而,当机体感染时,可产生大量 IL-6 炎症因子,并与低浓度 TGF- β 产生 ROR γ_t ,促使 Th17 分化,进一步诱发前炎症作用^[14]。此外,TGF- β 具有抑炎与促炎双重功效,不仅可以上调 IL-23R 来促使 Th17 发育提高炎症反应,同时也能够调整 T 细胞 Foxp3 水平来发挥抑炎作用^[15]。本研究结果发现,研究组 TGF- β 与 Treg 水平明显低于对照组,并与 PASI 评分呈负相关。可见,寻常型银屑病患者 Treg 免疫抑制作用可能与 TGF- β 降低有关,或因 Treg 抑制功能或细胞数量降低而无法有效对抗 Th17 促炎因子。

综上所述,寻常型银屑病患者外周血内 Th17 呈高表达,而调节性 Treg 细胞明显缺失,TGF- β 、IL-23、IL-17 等相关因子异常可能是诱导两群细胞功能异常及比例失调的重要原因。寻常型银屑病患者发病与

Treg 增殖不足及 Th17 异常活化有关,分析二者的相互关系,有望开辟新的治疗靶点。

参考文献

- [1] 王忠永,邱会芬,马蕾,等. 寻常型银屑病患者外周血 Th17/Treg 细胞免疫失衡的研究[J]. 中华临床医师杂志(电子版),2013,7(14): 6339-6343.
- [2] 廖楚舒,邓中华,乐杨桦,等. Th17 相关炎症因子与原发性肝癌关系的研究[J]. 实用预防医学,2016,23(5):554-556.
- [3] Zhang L, Li Y, Yang X, et al. Characterization of Th17 and FoxP3(+) Treg cells in paediatric psoriasis patients[J]. Scand J Immunol, 2016, 83(3):174-180.
- [4] 陈晋广,赖维,姜昱. 寻常性银屑病患者外周血 Th17/Treg 平衡偏移的研究[J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志,2013,12(6):353-355.
- [5] De Jesus MM, Santiago JS, Trinidad CV, et al. Autologous adipose-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of psoriasis vulgaris and psoriatic arthritis: a case report[J]. Cell Transplant, 2016, 25(11): 2063-2069.
- [6] Behera B, Kumari R, Gochhait D, et al. Low dose methotrexate induced asymptomatic keratinocyte dystrophy in a patient of psoriasis vulgaris[J]. J Cutan Pathol, 2016, 43(12):1238-1241.
- [7] 尹翠红,车雅敏. $CD4^+CD25^+$ 调节性 T 细胞的一般特性及其在银屑病发病中的作用[J]. 中华临床医师杂志(电子版),2015,20(10): 1926-1930.
- [8] Karczewski J, Dobrowolska A, Rychlewska-Hańciewska A, et al. New insights into the role of T cells in pathogenesis of psoriasis and psoriatic arthritis[J]. Autoimmunity, 2016, 49(7):435-450.
- [9] Zhao J, Di T, Wang Y, et al. Multi-glycoside of *Tripterygium wilfordii* hook. f. ameliorates imiquimod-induced skin lesions through a STAT3-dependent mechanism involving the inhibition of Th17-mediated inflammatory responses[J]. Int J Mol Med, 2016, 38(3):747-757.
- [10] Baumbach P, Weiss T, Giermann C, et al. Standardized quantitative sensory testing in patients with psoriasis vulgaris: evidence for altered large and small fibre functioning[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2016, 30(11):e137-e140.
- [11] 赵京霞,底婷婷,王燕,等. IL-23/IL-17 炎症轴在咪喹莫特诱导的小鼠银屑病样皮肤损害中的作用[J]. 中国病理生理杂志,2013,29(6):1086-1094.
- [12] 张力文,李艳嫦,刘冬先. 寻常性银屑病患者皮损组织中 ROR γ_t , IL-17, Foxp3 和 IL-10 的检测[J]. 中国皮肤性病学杂志,2014,28(7):681-683,689.
- [13] 陆家晴,丁杨峰,于宁,等. 308nm 准分子激光治疗前后对寻常型银屑病患者外周血 Th17/Treg 细胞免疫失衡的研究[J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志,2016,42(2):69-73.
- [14] 王英,王丽丽,韩朔,等. $CD4^+T$ 淋巴细胞亚群与银屑病关系的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2016,32(6):834-836.
- [15] Wang Y, Wang LL, Yang HY, et al. Interleukin-21 is associated with the severity of psoriasis vulgaris through promoting $CD4^+$ T cells to differentiate into Th17 cells[J]. Am J Transl Res, 2016, 8(7):3188-3196.

收稿日期:2017-04-19