

克罗恩病患者外周血 Th17/Treg 细胞比例、血清炎性活动指标改变及其临床意义

赵小静,马晶晶,朱云娟,马海芹,张 怡,张红杰*

(南京医科大学第一附属医院消化科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:检测克罗恩病(Crohn's disease, CD)患者外周血调节性 T 细胞(Treg)和辅助性 T 细胞 17(Th17)细胞比例及血清炎性活动生物学指标血沉(ESR)、血清 C-反应蛋白(CRP)水平、血小板(PLT)计数、平均血小板体积(MPV)、血小板分布宽度(PDW)的改变,并探讨其与 CD 疾病活动的关系及临床意义。方法:纳入 CD 患者 46 例,其中缓解期 CD 31 例,活动期 15 例。纳入同期病房收治的 8 例消化道息肉治疗后复查者作为对照组。采用克罗恩病疾病活动指数(CDAI)评估 CD 患者疾病活动严重程度。流式细胞仪检测 CD 患者外周血 Treg、Th17 细胞比例;血细胞仪检测 PLT 计数、MPV 和 PDW;魏氏法检测 ESR;免疫比浊法检测 CRP 水平。结果:轻度和中度活动期 CD 患者外周血 Treg 细胞占 CD4⁺细胞比例较缓解期 CD 患者及对照组显著降低($P < 0.05$);活动期 CD 患者外周血 Th17 细胞比例高于缓解期 CD($P < 0.05$);CD 患者外周血中 Treg 细胞比例与 ESR、血清 CRP 水平、CDAI 评分呈负相关,而与患者 MPV 呈正相关(均 $P < 0.05$)。结论:外周血 Th17 细胞和 Treg 细胞比例改变异常以及 Treg 细胞比例减低与反映 CD 疾病活动的炎性指标 ESR、血清 CRP 水平呈负相关,提示 Th17/Treg 细胞失衡与 CD 肠道炎症形成有关。

[关键词] 克罗恩病; Th17/Treg 细胞;血清炎性活动生物学指标

[中图分类号] R574

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)08-1000-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20170816

Alterations of Th17/Treg cells in peripheral blood and serum inflammatory biomarkers in patients with Crohn's disease and its clinical significance

Zhao Xiaojing, Ma Jingjing, Zhu Yunjuan, Ma Haiqin, Zhang Yi, Zhang Hongjie*

(Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** The aim of our study is to investigate the alterations in frequency of regulatory T cells (Treg cells) and Thelper 17 (Th17) cells in peripheral blood in patients with Crohn's disease (CD) and the relationship between the proportion of Treg cells and clinical features of CD. **Methods:** Forty-six patients with CD (31 quiescent and 15 active CD patients) were enrolled in our study. Eight cases who had gastrointestinal polyps treated and will have gastrointestinal endoscopy to check as normal controls. The disease activity of CD was evaluated by Crohn's disease activity index (CDAI). Concurrently, blood platelet (PLT), mean platelet volume (MPV), platelet distribution width (PDW), erythrocyte sedimentation rate (ESR) and serum C-reactive protein (CRP) level were measured. The percentage of Treg and Th17 cells in peripheral blood from CD patients and control group were detected by flow cytometry. We also analyzed the relationship between the proportion of Treg cells and these inflammatory biomarkers. **Results:** In peripheral blood, the proportion of Treg cells in active CD patients was significantly decreased compared with patients in remission and control group ($P < 0.05$). Compared with quiescent CD patients, active CD patients had higher percentage of Th17 cells in peripheral blood ($P < 0.05$). ESR and serum CRP levels increased and MPV obviously decreased in active CD patients compared to quiescent patients. Negative correlation was found between proportion of Treg cells and ESR, serum CRP levels as well as CDAI ($P < 0.05$). In addition, there was a positive correlation between the proportion of Treg cells and MPV ($P < 0.05$). **Conclusion:** The change of proportion of Treg and Th17 cells in peripheral blood and the relationship between the proportion of peripheral Treg and serum inflammatory biomarkers reflecting CD activities (e.g., CRP, ESR and MPV) indicate that the differentiation imbalance of Th17/Treg may be involved in the pathogenesis of CD.

[Key words] Crohn's disease; Th17/Treg cells; serum inflammatory biomarkers

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(08): 1000-1004]

[基金项目] 国家自然科学基金(81470827)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: hjzhang06@163.com

克罗恩病(Crohn's disease, CD)是一种肠道慢性肉芽肿性炎,为炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的主要临床表型之一,该病发病机制尚不完全明确。国内外研究表明调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)是一种具有抑制效应性 T 细胞增殖和活化功能的细胞亚群^[1],能够减轻 IBD 患者的肠道炎症^[2]。辅助性 T 细胞 17(T helper cell 17, Th17)在 IBD 中的作用仍存在争议,有研究显示 Th17 细胞通过释放炎症因子介导肠道炎症,也有研究提示 Th17 细胞对肠黏膜有一定的保护作用^[3]。目前认为遗传、环境、微生物和免疫因素的共同作用参与 CD 的发生与发展^[4-5],尤其免疫因素在 CD 的发病中起关键性作用^[6],其中 Th17/Treg 细胞失衡学说成为近年研究热点^[7-8]。本研究通过检测不同临床分期 CD 患者外周血中 Treg 细胞及 Th17 细胞占 CD4⁺ 细胞比例,及外周血 Treg 细胞比例变化与炎症指标间的相关性,初步探讨 Th17/Treg 细胞失衡与 CD 疾病活动间的关系。

1 对象和方法

1.1 对象

纳入 2016 年 2—8 月南京医科大学第一附属医院消化科收治的 CD 患者 46 例,其中缓解期 31 例,其中男 16 例,女 15 例,平均年龄(33.0±13.0)岁(17~67 岁),活动期 15 例,其中男 9 例,女 6 例,平均年龄(36.3±19.9)岁(18~79 岁)。CD 的诊断标准参照中华医学会消化病学分会炎症性肠病学组制订的“炎症性肠病诊断与治疗的共识意见(2012 年,广州)”^[9]。46 例均进行 Treg 细胞比例检测,其中 19 例检测 Treg 的同时检测 Th17 细胞。同期病房收治的 8 例消化道息肉治疗后复查者作为正常对照,其中男 4 例,女 4 例,平均年龄(48.0±11.5 岁)(28~59 岁),该 8 例对照者既往无自身免疫性疾病史,均排除 IBD 以及相关疾病家族史。8 例对照者均进行 Treg 细胞比例检测,其中 2 例同时检测 Th17 细胞。疾病活动度评估:CD 活动度的评估采用克罗恩病疾病活动指数(CDAI),根据患者 1 周内的 8 项指标分别计分,按照不同的权重计算总和^[9],总分<150 分为缓解期($n=27$),≥150 分为活动期($n=14$),其中 150~220 分为轻度($n=6$),221~450 分为中度($n=8$),>450 分为重度($n=0$)。

Anti-human CD4-FITC、anti-human CD25-APC、anti-human FOXP3-PE、Anti-human CD8a-FITC、

anti-human CD3-APC、anti-human IL-17A-PE (eBioscience 公司,美国),刺激阻断剂、固定破膜液、流式染色缓冲液(eBioscience 公司,美国)。Calibur 流式细胞分析仪(BD 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 刺激 Th17 细胞胞内因子分泌

取 250 μ L 肝素钠抗凝全血,加入 250 μ L RPMI1640 培养基,加入 1 μ L 刺激阻断剂,其中 PMA 40.5 μ mol/mL、Ionomycin 670 μ mol/mL、Brefeldin A 5.3 mmol/mL、Monensin 1 mmol/mL。置于 5% CO₂ 恒温培养箱培养 5 h。

1.2.2 流式细胞仪检测外周血 Treg、Th17 细胞比例

采集 IBD 患者清晨空腹外周血 2 mL,肝素钠抗凝 6 h 内进行流式检测,Treg 细胞检测:100 μ L 全血表面标记 anti-human CD4-FITC、anti-human CD25-APC 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,无需洗涤,加入 1 mL 红细胞裂解液室温 10 min,流式染色缓冲液清洗 1 次,1 \times 固定破膜液 4 $^{\circ}$ C 避光 60 min,1 \times 破膜缓冲液清洗 2 次,加入 anti-human FOXP3-PE 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,流式染色缓冲液清洗 2 次;Th17 细胞检测:取刺激后 100 μ L 全血表面标记 anti-human CD8a-FITC、anti-human CD3-APC 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,无需洗涤,加入 100 μ L MEDIUM A 液,室温孵育 15 min,流式染色缓冲液清洗 1 次,加入 100 μ L MEDIUM B 液和 anti-human IL-17A-PE 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,流式染色缓冲液清洗 1 次。采用 FACS Calibur 每管获取 30 000 个细胞,所有结果采用 Flowjo7.6 软件分析。

1.2.3 血清炎症活动指标检测

血细胞仪检测血小板计数(PLT)、平均血小板体积(MPV)和血小板分布宽度(PDW);魏氏法检测红细胞沉降率(ESR);免疫比浊法检测血清 C-反应蛋白(CRP)水平。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件分析,正态分布的数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组资料均数间的比较采用两独立样本 t 检验,多组资料均数间的比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法。非正态分布的定量资料采用中位数(四分位数间距)[$M(P_{25}\sim P_{75})$]表示,两组数据间的比较采用 Mann-Whitney U 检验。根据两组数据是否服从正态分布,相关性分析采用 Pearson 或 Spearman 相关分析法。 $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清炎性活动生物学标志物在活动期及缓解期 CD 患者的改变

与缓解期 CD 患者相比, 中度活动期 CD 患者血清 ESR 水平明显升高($P<0.05$, 表 1), 轻度活动期 CD 患者血清 ESR 水平虽升高, 但差异无统计学意义。

轻、中度活动期 CD 患者血清 CRP 水平较缓解期均明显升高($P<0.05$, 表 1)。轻度活动期 CD 患者的 PLT 计数较缓解期明显升高($P<0.05$)。进一步分析轻、中度活动期 CD 患者的 MPV 发现, MPV 较缓解期及对照组降低($P<0.05$), 轻、中度活动期 CD 患者的血小板指数中的 PDW 较对照组降低, 但差异无统计学意义。

表 1 CD 活动期及缓解期血清炎性活动生物学指标比较

Table 1 The comparison of quiescent and active CD patients in serum inflammatory biomarkers

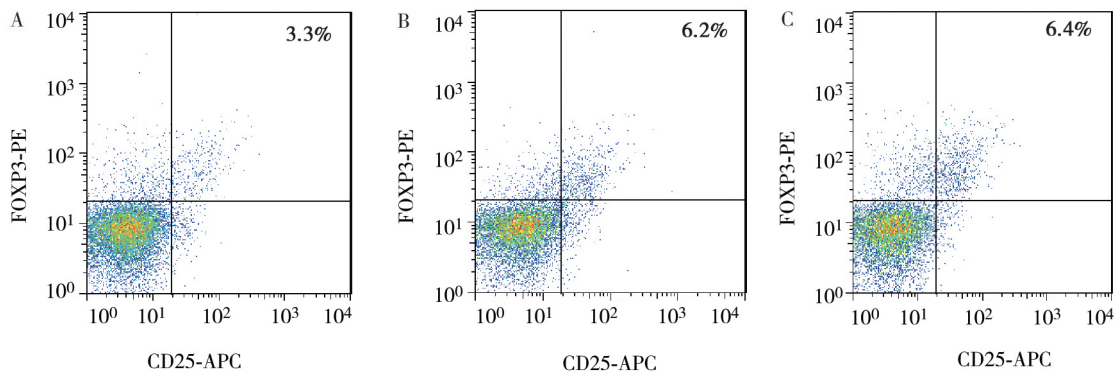
组别	例数	ESR(mm/h)	CRP(mg/L)	PLT($\times 10^9/L$)	MPV(fL)	PDW(%)
活动期	14	26.4 \pm 26.3*	18.0(4.8~63.6)*	311 \pm 103 [#]	9.3 \pm 1.2 [#]	13.3 \pm 2.9
轻度	6	19.1 \pm 11.0	11.0(4.8~31.9)*	349 \pm 87 [#]	9.0 \pm 1.5 [#]	13.7 \pm 3.5
中度	8	33.6 \pm 30.5*	37.1(6.6~83.0)*	282 \pm 110	9.5 \pm 1.1*	13.4 \pm 2.3
缓解期	27	10.8 \pm 10.3	3.16(3.2~4.4)	243 \pm 85	10.4 \pm 1.3	13.1 \pm 2.6
对照组	12			171 \pm 50	11.5 \pm 1.6	15.3 \pm 3.0

与 CD 缓解期比较, * $P<0.05$; 与对照组比较, [#] $P<0.05$ 。

2.2 活动期及缓解期 CD 患者外周血 Treg 细胞的变化

采用流式细胞技术对纳入研究的轻度和中度活动期 CD、缓解期 CD 患者及对照组外周血 Treg

细胞进行测定, 发现轻度和中度活动期 CD 患者外周血 Treg 细胞占 CD4⁺细胞比例 [(3.5 \pm 0.7)% 和 (3.3 \pm 1.2)%] 较 CD 缓解期 [(6.0 \pm 1.7)%] 及对照组 [(6.7 \pm 2.5)%] 显著降低($P<0.05$, 图 1)。



A:活动期; B:缓解期%; C:对照组

图 1 不同临床分期 CD 患者外周血 Treg 细胞比例改变

Figure 1 Percentages of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺Treg cells in peripheral blood of CD patients and control group

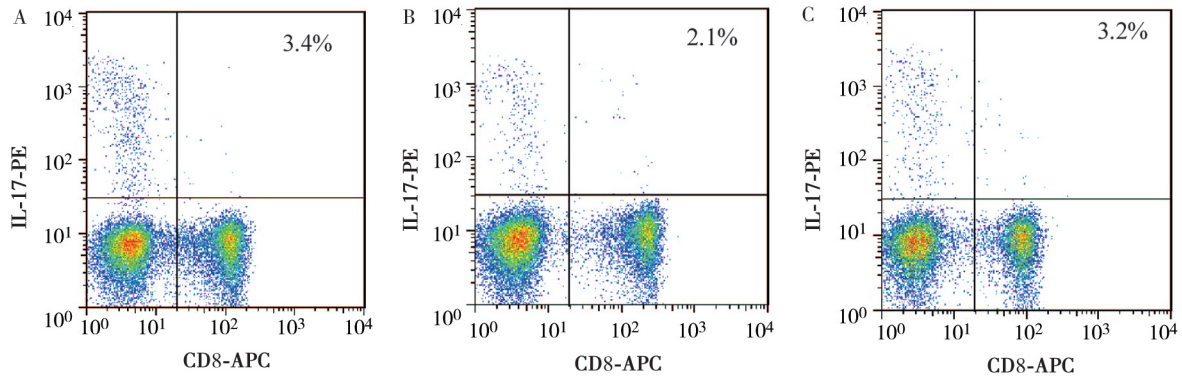
2.3 活动期及缓解期 CD 患者外周血 Th17 细胞的变化

应用流式细胞技术对纳入的 46 例 CD 患者中的 19 例其中活动期 6 例、缓解期 13 例同时检测 Treg 和 Th17 细胞, 发现活动期 CD 患者外周血 Th17 细胞比例高于缓解期 CD [(3.2 \pm 0.9)% vs. (2.1 \pm 0.9)%], $P<0.05$, 图 2)。

2.4 外周血 Treg 细胞变化与血清炎性标记物及 CDAI 间相关性分析

采用 Pearson 相关性分析对 CD 患者外周血中

Treg 细胞比例与 CDAI 和 MPV 进行分析, 结果显示 CD 患者外周血中 Treg 细胞比例与 CDAI 评分呈负相关, 而与患者 MPV 呈正相关 (CDAI: $r=-0.449$, $P=0.002$; MPV: $r=0.302$, $P=0.044$)。采用 Spearman 相关性分析对 CD 患者外周血中 Treg 细胞比例与 ESR 及血清 CRP 水平进行分析, 结果显示 CD 患者外周血中 Treg 细胞比例与 ESR 及血清 CRP 水平呈负相关 (ESR: $r=-0.322$, $P=0.043$; CRP: $r=-0.386$, $P=0.013$)。



A: 活动期; B: 缓解期; C: 对照组。

图 2 不同临床分期 CD 患者外周血 Th17 细胞比例改变

Figure 2 Flow cytometric analysis of CD3⁺CD8⁻IL17⁺Th17 cells in peripheral blood of CD patients and control group

3 讨论

免疫因素在 CD 发病中作用一直是 CD 发病机制的研究的热点^[4]。有研究表明 Treg 和 Th17 细胞在 CD 肠道炎症发生发展中起到重要作用^[10-11]。Treg 细胞是一种具有免疫负调控作用的 T 淋巴细胞^[12], Maul 等^[13]研究表明活动期 IBD 患者外周血 Treg 细胞比例下降,缓解期升高,提示 Treg 细胞在 IBD 患者肠道炎症形成中具有免疫炎性保护作用。相反有研究表明 Th17 细胞可介导慢性炎症和自身免疫性疾病的发生,且与 Treg 细胞之间存在相互转化的关系^[14],Th17/Treg 细胞平衡是维持肠道免疫稳态的重要因素,这可能是导致人类 IBD 的原因之一。

本研究发现活动期 CD 患者外周血中 Treg 细胞占 CD4⁺细胞比例显著低于对照组和缓解期患者,同时活动期 CD 患者外周血中 Th17 细胞较缓解期患者升高,该结果与 Zhu 等^[15]的研究结果一致。提示 Th17/Treg 细胞失衡可能与 CD 肠道炎症形成有关。CDAI 评分^[16]是临床常用于评估 CD 患者疾病活动程度的指标之一,结果显示 CD 患者外周血 Treg 细胞占 CD4⁺细胞比例与 CDAI 评分呈负相关,提示 CD 患者外周血中 Treg 细胞比例与 CD 疾病活动程度有关。血清 CRP 水平与类风湿性关节炎、心肌梗死、伴有冠状动脉病变的糖尿病等多种疾病有关^[17-19],能较好地反映疾病炎性活动。本研究发现 CD 患者外周血中 Treg 细胞占 CD4⁺细胞比例与血清 CRP 水平呈负相关,而大部分研究结果显示血清 CRP 水平与 CD 的疾病活动度呈正相关,能反映 CD 炎性活动^[20-22],提示外周血 Treg 细胞比例减低与 CD 疾病活动有关。

关于 MPV 和 PDW 与疾病炎症活动间关系, Kapsoritakis 等^[23]研究表明,活动期 CD 患者 MPV 较缓解期患者及对照组明显下降,提示其可作为反映 CD 疾病活动度的指标之一。同样 Öztürk 等^[24]研究显示活动期 CD 患者 MPV 和 PDW 较健康对照组显著下降,提示 MPV 和 PDW 可作为判断 CD 疾病活动度的指标。本研究结果发现中度活动期 CD 患者 MPV、PDW 较缓解期及对照组降低,该结果与国外的研究结果相一致^[23-24]。相关性分析发现 CD 患者外周血中 Treg 细胞占总 CD4⁺细胞比例与 MPV 呈正相关,提示外周血 Treg 细胞比例减低与 CD 疾病活动有关。

综上所述,外周血 Th17 细胞比例升高,Treg 细胞比例减低,且其与 CD 疾病活动炎性指标 ESR、血清 CRP 水平呈负相关,与 MPV 呈正相关,提示 Th17/Treg 细胞失衡与 CD 肠道炎症形成有关。本研究仅初步探讨了 CD 患者外周血中 Treg 和 Th17 细胞比例变化与不同临床分期 CD 患者间关系,有待扩大样本量及进一步探讨 Treg 和 Th17 细胞在 CD 炎症形成中的作用。

[参考文献]

- [1] Fehérvari Z, Sakaguchi S. CD4⁺ Tregs and immune control[J]. J Clin Invest, 2004, 114(9):1209-1217
- [2] Suri-Payer E, Cantor H. Differential cytokine requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ T cells [J]. J Autoimmun, 2001, 16(2): 115-123
- [3] Fujino S, Andoh A, Bamba S, et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease[J]. Gut,

- 2003, 52(1):65-70
- [4] Lawrance IC, Fiocchi C, Chakravarti S. Ulcerative colitis and Crohn's disease: distinctive gene expression Profiles and novel susceptibility candidate genes[J]. *Hum Mol Genet*, 2001, 10(5):445-456
- [5] Danese S, Sans M, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors[J]. *Autoimmun Rev*, 2004, 3(5):394-400
- [6] Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory bowel disease[J]. *Annu Rev Immunol*, 2010, 28:573-621
- [7] Ueno A, Jijon H, Chan R, et al. Increased prevalence of circulating novel IL-17 secreting Foxp3 expressing CD4+ T cells and defective suppressive function of circulating Foxp3+ regulatory cells support plasticity between Th17 and regulatory T cells in inflammatory bowel disease patients[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2013, 19(12):2522-2534
- [8] Takahashi M, Nakamura K, Honda K, et al. An inverse correlation of human peripheral blood regulatory T cell frequency with the disease activity of ulcerative colitis [J]. *Dig Dis Sci*, 2006, 51(4):677-686
- [9] 中华医学会消化病学分会炎症性肠病学组. 炎症性肠病诊断与治疗的共识意见(2012年, 广州) [J]. *中华消化杂志*, 2012, 32(12):796-813
- [10] Liu Z, Cao AT, Cong Y. Microbiota regulation of inflammatory bowel disease and colorectal cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 2013, 23(6 Pt B):543-552
- [11] D'Ambrosio A, Cossu A, Amendola A, et al. Lamina propria CD4⁺LAP⁺ regulatory T cells are increased in active ulcerative colitis but show increased IL-17 expression and reduced suppressor activity[J]. *J Crohns Colitis*, 2016, 10(3):346-353
- [12] Lochner M, Wang Z, Sparwasser T. The special relationship in the development and function of T helper 17 and regulatory T cells[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2015, 136:99-129
- [13] Maul J, Loddenkemper C, Mundt P, et al. Peripheral and intestinal regulatory CD4⁺ CD25 (high) T cells in inflammatory bowel disease[J]. *Gastroenterology*, 2005, 128(7):1868-1878
- [14] Chao K, Zhang S, Yao J, et al. Imbalances of CD4 (+) T-cell subgroups in Crohn's disease and their relationship with disease activity and prognosis[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2014, 29(10):1808-1814
- [15] Zhu XM, Huang YM, Fan JF, et al. Aberrant frequency of IL-10-producing B cells and its association with the balance of Treg/Th17 in children with inflammatory bowel disease[J]. *Pharmazie*, 2015, 70(10):656-660
- [16] Sandborn WJ, Feagan BG, Hanauer SB, et al. A review of activity indices and efficacy endpoints for clinical trials of medical therapy in adults with Crohn's disease [J]. *Gastroenterology*, 2002, 122(2):512-530
- [17] Siemons L, Ten Klooster PM, Vonkeman HE, et al. How age and sex affect the erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in early rheumatoid arthritis[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2014, 15:368
- [18] Sakkinen P, Abbott RD, Curb JD, et al. C-reactive protein and myocardial infarction[J]. *J Clin Epidemiol*, 2002, 55(5):445-451
- [19] Lee HJ, Her SH, Im YS, et al. Significance of inflammatory markers in diabetic patients with stable coronary artery disease[J]. *Korean J Intern Med*, 2009, 24(3):212-219
- [20] Alper A, Zhang L, Pashankar DS. Correlation of erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein with pediatric inflammatory bowel disease activity[J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2017, 65(2):e25-27
- [21] Solem CA, Loftus EV Jr, Tremaine WJ, et al. Correlation of C-reactive protein with clinical, endoscopic, histologic, and radiographic activity in inflammatory bowel disease [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2005, 11(8):707-712
- [22] Henriksen M, Jahnsen J, Lygren I, et al. C-reactive protein: a predictive factor and marker of inflammation in inflammatory bowel disease. Results from a prospective population-based study[J]. *Gut*, 2008, 57(11):1518-1523
- [23] Kapsoritakis AN, Koukourakis MI, Sfridakis A, et al. Mean Platelet volume: a useful marker of inflammatory bowel disease activity [J]. *Am J Gastroenterol*, 2001, 96(3):776-781
- [24] Öztürk ZA, Dag MS, Kuyumcu ME, et al. Could platelet indices be new biomarkers for inflammatory bowel diseases[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2013, 17(3):334-341

[收稿日期] 2016-12-13