

· 论著 ·

老年类风湿性关节炎患者外周循环中Th17/Treg免疫失衡与疾病活动的相关性

赵 双*

黄河三门峡医院检验科 (河南 三门峡 472100)

【摘要】目的 探究老年类风湿性关节炎(elderly onset rheumatoid arthritis, EORA)患者外周循环中Th17/Treg与疾病活动的相关性。方法 回顾性分析2019年5月至2022年5月我院风湿免疫科收治的70例EORA患者的临床资料,另选取同期于我院接受体检且身体健康者40例纳入健康对照组。采用流式细胞术检测并计算所有研究对象外周循环中的Th17、Treg占比和Th17/Treg,分析三者与EORA疾病活动评分之间的关系。结果 各组间的血清Th17占比、Treg占比和Th17/Treg相比,差异均有统计学意义($P<0.05$);与健康对照组相比,EORA各组血清Th17占比、Th17/Treg均更高,血清Treg占比更低,差异有统计学意义($P<0.05$);在RA患者中随着疾病活动评分升高,血清Th17占比、Th17/Treg均升高,血清Treg占比则降低,且组间两两比较的差异均有统计学意义($P<0.05$)。相关性分析结果显示,血清Th17占比和血清Th17/Treg与疾病活动评分成正相关($r=0.731, 0.853, P<0.05$),血清Treg占比则与疾病活动评分成负相关($r=-0.484, P<0.05$)。结论 EORA患者外周循环中Th17占比迅速升高,Treg占比明显降低,过高的Th17/Treg与更严重的疾病活动评分密切相关。

【关键词】类风湿性关节炎; Th17; Treg; 疾病活动评分

【中图分类号】R593.22

【文献标识码】A

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2023.07.035

Correlation between Th17/Treg Immune Imbalance in Peripheral Circulation and Disease Activity in Elderly Patients with Rheumatoid Arthritis

ZHAO Shuang*

Department of Clinical Laboratory, Yellow River Sanmenxia Hospital, Sanmenxia 472100, Henan Province, China

Abstract: *Objective* To investigate the relationship between Th17/Treg in peripheral circulation and disease activity in Elderly patients with rheumatoid arthritis (EORA). *Methods* The clinical data of 70 patients with EORA admitted to the Rheumatology and Immunology Department of our hospital from May 2019 to May 2022 were retrospectively analyzed. Another 40 healthy people who underwent physical examination in our hospital during the same period were selected as healthy control group. Flow cytometry was used to detect and calculate the proportion of Th17, Treg and Th17/Treg in peripheral circulation of all subjects, and the relationship between the three and EORA disease activity score was analyzed. *Results* There were significant differences in serum Th17 ratio, Treg ratio and Th17/Treg ratio among groups ($P<0.05$). Compared with the healthy control group, the proportion of serum Th17 and Th17/Treg in EORA groups were higher, and the proportion of serum Treg was lower, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). In RA patients, with the increase of disease activity score, the proportion of serum Th17 and Th17/Treg increased, while the proportion of serum Treg decreased, and the differences between the two groups were statistically significant ($P<0.05$). The results of correlation analysis showed that the proportion of serum Th17 and serum Th17/Treg were positively correlated with disease activity score ($r=0.731, 0.853, P<0.05$), while the proportion of serum Treg was negatively correlated with disease activity score ($r=-0.484, P<0.05$). *Conclusion* The proportion of Th17 in peripheral circulation of patients with EORA increases rapidly, while the proportion of Treg decreases significantly. High Th17/Treg ratio is closely related to more severe disease activity score.

Keywords: Rheumatoid Arthritis; Th17; Treg; Disease Activity Score

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是高发于老年人群的一种免疫系统疾病,其中发病年龄 ≥ 60 岁的又被称为老年类风湿性关节炎(elderly onset rheumatoid arthritis, EORA),在全部类风湿性关节炎中占比高达33%^[1]。EORA在临床上通常表现为关节疼痛、僵硬甚至畸形,其发病机制至今仍未阐明,但近年来许多文献显示,机体自身免疫耐受的失调特别是CD4⁺T细胞亚群间的比例失衡在EORA的发生与进展过程中扮演了重要角色^[2]。CD4⁺T细胞是指表面存在CD4抗原的辅助T细胞,它能够被外源性抗原肽所激活,并在各种细胞因子的作用下活化形成具有不同功能的辅助性T细胞(T helper cell, Th)^[3]。Th17是CD4⁺T细胞分化后的亚型之一,主要通过释放多种类型的细胞因子参与炎症反应、固有免疫应答等生物学过程,在机体中发挥介导免疫排斥、促炎作用^[4]。与Th17的功能相反,CD4⁺细胞的另一个亚型调节性T细胞(regulatory cell, Treg)则主要介导免疫耐受和抗炎过程,这两者在正常状况下处于动态平衡,而一旦平衡被打破就会诱导各种自身免疫系统疾病、肿瘤等的出现^[5]。本次研究针对外周循环中Th17/Treg比例与EORA疾病活动性之间的相关性进行了探究,以期EORA的早期诊断和治疗靶点的选择提供帮助。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 本研究采用回顾性分析方法,收集2019年5月至

2022年5月我院风湿免疫科收治的70例EORA患者的临床资料,并将之纳入EORA组,患者年龄62~76岁,平均年龄(69.3 $\pm$ 6.2)岁;男性22例,女性48例;疾病活动评分:轻度22例,中度28例,重度20例。另选取同期于我院接受体检且身体健康者40例纳入健康对照组,年龄60~77岁,平均年龄(68.5 $\pm$ 5.9)岁,男性14例,女性26例。所有研究对象均对本研究的目的、内容知情,并签署同意书。本研究经我院伦理委员会商议并批准可行。

纳入标准:年龄 ≥ 60 岁;符合美国风湿病学会和欧洲抗风湿病联盟共同提出的《类风湿性关节炎分类标准(2010)》中关于类风湿性关节炎的诊断标准^[6];接受骨关节疾病活动评分^[7]: <3.2 分为轻度,3.2~5.1分为中度, >5.1 分为重度;临床资料完整。排除标准:年龄 <60 岁;合并严重肝肾功能障碍、凝血功能障碍或罹患恶性肿瘤等疾病;合并其他自身免疫系统疾病;入院前2个月内有免疫调节治疗史;处在孕产期、哺乳期;存在精神疾病或拒绝依从。

1.2 方法**1.2.1 采样方法** 所有研究对象均于清晨采集隔夜空腹外周血,并置于EDTA抗凝EP管中,3000rpm离心15min后,提取上清液置于新EP管,并在-80℃冰箱中贮存。**1.2.2 检测方法** 采用流式细胞术检测外周血中的Th17和Treg比例。Th17检测方法:取500 μ l血液样本加入离心管,每管加入等体积(1:1)1640培养基(10% FBS),而后加入PMA工作液(50ng/

【第一作者】赵 双,女,职称:主管检验师。主要研究方向:免疫。E-mail: zszyrk@163.com

【通讯作者】赵 双

mL)5 μ l, 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中放置20min, 而后加入BFA工作液(10 μ g/mL)10 μ l, 相同条件在培养箱中放置5h。培养结束后, 用移液枪将管中液体转移至两支流式细胞专用管, 其中A管设为空白对照管, B管设为阳性样本管, 两管均1500rpm离心10min, 而后弃去上清。在B管中加入CD4 FITC 5 μ l后避光室温孵育20min, 而后用1mL PBS缓冲液吹打混匀重悬细胞, 1500rpm离心5min, PBS缓冲液重复清洗、离心后, 弃去上清。A管仅用PBS缓冲液清洗、离心2次, 弃去上清。在两管中各加入1 $\times$ 红细胞裂解液5mL, 吹打混匀后避光室温下裂解30min, 1500rpm离心5min, PBS缓冲液2次重复清洗、离心后, 弃去上清。在管中加入500 μ l固定液, 4 $^{\circ}$ C避光固定20min, 2500rpm离心5min并弃去上清, 加入500 μ l破膜液4 $^{\circ}$ C避光破膜40min, 2500rpm离心5min, 弃去上清, PBS缓冲液2次重复清洗、离心后, 弃去上清, 而后用少量PBS缓冲液重悬细胞。在B管中避光加入5 μ l PE-IL-17A 5 μ l, 4 $^{\circ}$ C避光孵育30min, PBS缓冲液2次重复清洗、离心后, 弃去上清。再次加入500 μ l PBS缓冲液并吹打混匀, 立刻上机检测。

Treg检测方法: 分别取100 μ l血样样本加入两支流式细胞专用管, 其中A管为空白对照管, B管设为阳性样本管。B管中依次加入2.5 μ l CD4 FIFC和2.5 μ l CD25 APC, 避光室温孵育30min, 1500rpm离心10min, 弃去上清, 加入PBS溶液进行2次重复清洗、离心后, 弃去上清。在两管中各加入1 $\times$ 红细胞裂解液5mL, 吹打混匀后避光室温下裂解30min, 1500rpm离心5min, PBS缓冲液2次重复清洗、离心后, 弃去上清。在两管中分别加入500 μ l Foxp3破核工作液, 4 $^{\circ}$ C避光静置30min, 2500rpm离心5min并弃去上清, 加入500 μ l破膜液4 $^{\circ}$ C避光破膜10min, 2500rpm离心5min并弃去上清, 使用500 μ l破膜液清洗、离心后, 弃去上清, 并用少量破膜液重悬细胞。在B管中避光加入2.5 μ l PE-Foxp3, 4 $^{\circ}$ C避光孵育30min, PBS缓冲液2次重复清洗、离心后, 弃去上清。再次加入500 μ l PBS缓冲液并吹打混匀, 立刻上机检测。

1.3 统计学方法 采用SPSS 24.0统计学软件对研究所获数据进行分析, 正态分布的定量资料用($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用两独立样本t检验, 多组间比较采用方差分析, 多组间两两比较采用LSD-t检验, 两指标间相关性检验采用Pearson相关分析。设置检验水准 $\alpha=0.05$, 若 $P<0.05$ 则表明差异具有统计学意义。上述所有检测实验均重复至少三次。

2 结果

2.1 各组临床资料比较 各组的年龄、性别等临床资料相比, 差异均不具有统计学意义, 可行组间比较($P>0.05$)。详见表1。

表1 各组临床资料比较

组别	例数	年龄		性别
		男	女	
轻度组	22	69.1 $\pm$ 6.0	7	15
中度组	28	68.6 $\pm$ 6.1	9	19
重度组	20	69.7 $\pm$ 6.3	6	14
健康对照组	40	68.5 $\pm$ 5.9	14	26
t/ χ^2	-	0.256		0.174
P	-	0.489		0.982

2.2 各组血清Th17、Treg占比比较 各组间的血清Th17占比、Treg占比和Th17/Treg相比, 差异均有统计学意义($P<0.05$); 与健康对照组相比, EORA各组血清Th17占比、Th17/Treg均更高, 血清Treg占比更低, 差异有统计学意义($P<0.05$); 在EORA患者中随着疾病活动评分升高, 血清Th17占比、Th17/Treg均升高, 血清Treg占比则降低, 且组间两两比较的差异均有统计学意义($P<0.05$)。详见表2。

2.3 EORA患者血清Th17、Treg与疾病活动评分的相关性 相关性分析结果显示, 血清Th17占比和血清Th17/Treg与疾病活动评分成正相关($r=0.731$ 、 0.853 , $P<0.05$), 血清Treg占比则与疾病活动评分成负相关($r=-0.484$, $P<0.05$)。详见表3。

表2 各组血清Th17、Treg占比比较

组别	例数	Th17(%)	Treg(%)	Th17/Treg
轻度组	22	2.46 $\pm$ 1.69 ^a	5.21 $\pm$ 2.45 ^a	0.46 $\pm$ 0.19 ^a
中度组	28	4.92 $\pm$ 2.08a ^b	3.79 $\pm$ 2.14 ^{ab}	1.23 $\pm$ 0.74 ^{ab}
重度组	20	7.65 $\pm$ 2.81 ^{abc}	2.49 $\pm$ 1.28 ^{abc}	3.51 $\pm$ 1.39 ^{abc}
健康对照组	40	1.21 $\pm$ 0.63	7.02 $\pm$ 2.84	0.32 $\pm$ 0.16
t/ χ^2	-	9.661	8.454	14.561
P	-	0.001	0.001	0.001

注: 与健康对照组相比, ^a $P<0.05$; 与轻度组相比, ^b $P<0.05$; 与中度组相比, ^c $P<0.05$ 。

表3 EORA患者血清Th17、Treg与疾病活动评分的相关性

项目	r	P
血清Th17占比与疾病活动评分	0.731	0.001
血清Treg占比与疾病活动评分	-0.484	0.001
血清Th17/Treg与疾病活动评分	0.853	0.001

3 讨论

EORA是老年人常见的一种自身免疫性疾病, 约60%的患者在罹患该病后两年内会出现骨关节破坏, 严重者甚至会完全丧失劳动能力, 给患者家庭和社会均造成了巨大的经济和医疗负担^[8]。因此, 明确EORA潜在病因及发病机制对于该病的诊断及预后预测均有重要意义。目前的研究显示, 以CD4⁺T细胞亚群失衡为主要表现的机体免疫系统紊乱在EORA的发生及发展中发挥了关键作用^[9]。初始的CD4⁺T细胞也被称为Th0, 外源性抗原在进入机体后首先会被巨噬细胞吞噬, 而后Th0会增加释放IFN- γ 并促进巨噬细胞内MHC II类分子表达, 巨噬细胞则利用MHC II类分子与抗原吞噬后形成的抗原肽片段结合成复合物, 并将抗原肽复合物呈递给Th0, 从而激活Th0并使其分化形成Th17、Treg、Th22、Th9等亚型^[10]。这些不同类型的细胞亚群在功能上存在密切联系, 有些相互促进, 有些则相互抑制, 它们通过分泌不同的细胞因子共同参与了机体的免疫系统网络的调控^[11]。

Th17和Treg是典型的在功能上相互制约的两种Th细胞亚型, 二者的分化数量受到机体内炎症因子的严密调控, 其中TGF- β 的单独作用会诱导Th0向Treg分化, 而TGF- β 和IL-6的联合作用则会诱导Th0向Th17分化, 当自身免疫功能发生改变时, Th17和Treg的比例就会出现失衡^[12-13]。EORA是以关节滑膜炎为表现的自身免疫性疾病, 在其发生及发展过程中由于存在免疫系统损伤和炎症, Th17/Treg极易出现失衡。在本研究中, 与健康对照组相比, EORA各组血清Th17占比、Th17/Treg均更高, 血清Treg占比更低, 差异有统计学意义。结果表明, 在EORA发生后外循环中的Th17/Treg显著升高, 其中Th17的含量增加, Treg的含量则降低。Th17在机体中主要通过分泌IL-17、THF- α 等炎症因子促进炎症反应, 在EORA发生过程中由于Th17的分化及增殖增加, 大量IL-17会在IL-23的作用下经Th17释放入血, 并在骨关节处抑制软骨细胞形成、促进破骨细胞形成, 从而造成骨关节破坏^[14]。Treg则能够通过释放IL-10、TGF- β 等细胞因子抑制炎症反应, 最近的研究还显示, Treg可以直接抑制Th17的IL-17分泌活性, 从而发挥抗炎和免疫耐受的作用^[15]。而在不同疾病活动评分的EORA患者中, 疾病活动更严重的患者, 其血清Th17占比、Th17/Treg更高, 血清Treg占比则更低, 且组间两两比较的差异均有统计学意义; 进一步的相关性分析也显示, 血清Th17占比和血清Th17/Treg与疾病活动评分成正相关($r=0.731$ 、 0.853), 血清Treg占比则与疾病活动评分成负相关($r=-0.484$), 这表明更高的Th17/Treg往往提示更严重的EORA。在EORA的进展过程中, Th17数量过多会导致外循环和局部骨关节中IL-17含量激增, 从而诱导局部关节细胞内RANKL表达量增加, 过量表达的RANKL将进一步活化破骨细胞加重骨侵蚀^[16]。Treg则能够抑制RANKL通路, 同时通过释放IL-10增加骨保护素的表达并抑制粒细

胞-巨噬细胞集落刺激因子,达到阻止骨关节破坏的作用^[17]。有研究还显示,在类风湿性关节炎模型小鼠中使用CXCR3拮抗剂后,小鼠膝关节中的IL-17A、IL-22等Th17分泌的因子显著下调,而Treg的正向转录因子Foxp3和IL-10的表达水平则明显升高,并且外周循环Th17/Treg的失衡状态被有效纠正,提示Th17/Treg可以作为EORA的潜在治疗靶点^[18]。

综上所述,EORA患者外周循环Th17/Treg会出现异常升高,Th17/Tre失衡会导致疾病活动增强。需要注意的是,机体免疫系统网络的调控涉及到大量的细胞因子,并且始终处在动态变化过程中,因此有关Th17/Treg免疫失衡促进EORA进展的机制及其作为治疗靶点的临床价值仍有待更大样本量、多中心的研究予以明确。

参考文献

- [1]Serhal L,Lwin MN,Holroyd C,et al.Rheumatoid arthritis in the elderly: Characteristics and treatment considerations.Autoimmun Rev. 2020; 19(6):102528.
- [2]胡小丽,刘婵,谢瑾等.早期类风湿关节炎高频超声、X线及MRI诊断效能研究[J].中国CT和MRI杂志,2021,19(06):150-152.
- [3]Penatti A,Facciotti F,De Matteis R,et al.Differences in serum and synovial CD4⁺ T cells and cytokine profiles to stratify patients with inflammatory osteoarthritis and rheumatoid arthritis.Arthritis Res Ther. 2017; 19(1): 103.
- [4]Lee GR.The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity.Int J Mol Sci. 2018; 19(3): 730. Published 2018 Mar 3.
- [5]徐学巧.血流灌注治疗系统性红斑狼疮的效果及对CD4⁺、CD8⁺细胞因子水平的影响[J].罕少疾病杂志,2022,29(12): 97-98.
- [6]Aletaha D,Neogi T,Silman AJ,et al.2010 Rheumatoid arthritis classification criteria:an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative.Arthritis Rheum. 2010; 62(9): 2569-2581.
- [7]Zohaib A,Rasheed A,Mahmud TE,et al.Correlation of Hypothyroidism With Disease Activity Score-28 in Patients of Rheumatoid Arthritis. Cureus. 2022; 14(6): e26382. Published 2022 Jun 27.

- [8]刘元君.动态增强MRI和肌骨超声对类风湿关节炎活动性的诊断价值比较[J].中国CT和MRI杂志,2021,19(05):173-176.
- [9]Yanagisawa K,Ogawa Y,Hosogai M,et al.Cytomegalovirus retinitis followed by immune recovery uveitis in an elderly patient with rheumatoid arthritis undergoing administration of methotrexate and tofacitinib combination therapy.J Infect Chemother. 2017; 23(8): 572-575.
- [10]Jiang X,Wang S,Zhou C,et al.Comprehensive TCR repertoire analysis of CD4⁺ T-cell subsets in rheumatoid arthritis.J Autoimmun. 2020; 109: 102432.
- [11]Luckheeram RV,Zhou R,Verma AD,et al.CD4⁺ T cells: differentiation and functions.Clin Dev Immunol. 2012; 2012: 925135.
- [12]张静.孟鲁司特联合噻托溴铵治疗老年支气管哮喘患者效果观察[J].罕少疾病杂志,2022,29(11): 30-31.
- [13]Kimura A,Kishimoto T.IL-6: regulator of Treg/Th17 balance.Eur J Immunol. 2010; 40(7): 1830-1835.
- [14]Yang P,Qian FY,Zhang MF,et al.Th17 cell pathogenicity and plasticity in rheumatoid arthritis.J Leukoc Biol. 2019; 106(6): 1233-1240.
- [15]Scheinecker C,Göschl L,Bonelli M.Treg cells in health and autoimmune diseases: New insights from single cell analysis.J Autoimmun. 2020; 110: 102376.
- [16]Ilchovska DD,Barrow DM.An Overview of the NF-κB mechanism of pathophysiology in rheumatoid arthritis,investigation of the NF-κB ligand RANKL and related nutritional interventions.Autoimmun Rev. 2021; 20(2): 102741.
- [17]Francisconi CF,Vieira AE,Azevedo MCS,et al.RANKL Triggers Treg-Mediated Immunoregulation in Inflammatory Osteolysis.J Dent Res. 2018; 97(8): 917-927.
- [18]Bakheet SA,Ansari MA,Nadeem A,et al.CXCR3 antagonist AMG487 suppresses rheumatoid arthritis pathogenesis and progression by shifting the Th17/Treg cell balance. Cell Signal. 2019; 64: 109395.

(收稿日期: 2022-11-03)

(校对编辑: 朱丹丹)

(上接第79页)

本次的前瞻性研究中得出,Achillon微创修复术下的患者并无明显并发症情况,而行传统手术的患者共有5例的术后并发症状,其中浅表的感染有3例,切口的愈合迟缓有2例,总并发症率达到了12.20%,两组的对比有统计学的意义。

综上所述,Achillon微创修复术干预急性情况的闭合性跟腱断裂可以收获明显的疗效,对患者带来的创伤轻微,益于踝关节的功能康复以及生活能力的提升,为一种新型且高效的术式,优于传统的手术收效,建议推广运用。

参考文献

- [1]张昊,梁东星,刘涛,等.改良经皮微创修复术治疗急性闭合性跟腱断裂的疗效[J].实用临床医药杂志,2021,25(20): 4.
- [2]Yang Y,Jia H,Zhang W,et al.Intraoperative Ultrasonography assistance for minimally invasive repair of the acute Achilles Tendon Rupture[J].2020.
- [3]庞晖,崔健,李建军,等.传统与微创缝合急性闭合性跟腱断裂的比较[J].中国矫形外科杂志,2022,30(4): 4.
- [4]Park C H,Na H D,Chang M C.Clinical Outcomes of Minimally Invasive Repair Using Ring Forceps for Acute Achilles Tendon Rupture[J].The Journal of Foot and Ankle Surgery,2020.
- [5]Haiqiao X U,Lin S,Zhang W.Clinical application of minimally invasive accessory pathway for Achilles tendon rupture in repair of achilles tendon fracture[J].Acta Medicinæ Sinica,2019.
- [6]黎章枝.闭合性跟腱断裂手术治疗常见并发症及原因分析[D].广西医科大学,2019.
- [7]Maffulli N,D'Addona A,Maffulli G D,et al.Delayed (14-30 Days)

Percutaneous Repair of Achilles Tendon Ruptures Offers Equally Good Results As Compared With Acute Repair[J].The American Journal of Sports Medicine, 2020, 48(2): 036354652090859.

- [8]Wang B,Yan K,Ming A N,et al.Clinical study of therapeutic effect of acute closed rupture of achilles tendon with modifiled mini-invasive percutaneous suture surgical technique[J].Journal of Traumatic Surgery, 2019.
- [9]Kord M C,Ebrahimpour A,Sadighi M,et al.Minimally Invasive Repair of Acute Achilles Tendon Rupture Using Gift Box Technique[J].Archives of Bone and Joint Surgery, 2019, 7(5).
- [10]Maffulli G,Buono A D,Richards P,et al.Conservative,minimally invasive and open surgical repair for management of acute ruptures of the Achilles tendon:a clinical and functional retrospective study[J].2019.
- [11]郭伟峰,银春景,苏杰鹏,等.应用跟腱吻合器微创修复治疗急性闭合性跟腱断裂的效果[J].黑龙江医药,2021,34(1): 3.
- [12]Gatz M,Driessen A,Eschweiler J,et al.Open versus minimally-invasive surgery for Achilles tendon rupture:a meta-analysis study[J].Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery, 2020(10).
- [13]Lee J K,Kang C,Hwang D S,et al.A comparative study of innovative percutaneous repair and open repair for acute Achilles tendon rupture: Innovative usage of intraoperative ultrasonography[J].2020.
- [14]银春景,陈泽群,郭丽芳.微创治疗急性闭合性跟腱断裂的中远期临床疗效观察[J].中国实用医药,2019,6(13): 3.
- [15]张昊,梁东星,刘涛,等.早期康复应用于微创治疗闭合性跟腱断裂术后的效果研究[J].河北医科大学学报,2022,43(5): 4.

(收稿日期: 2022-08-05)

(校对编辑: 朱丹丹)