

类风湿关节炎患者外周血 CD8⁺CD25⁺T 细胞的变化及临床意义

王柳青¹ 王燕¹ 王润¹ 赵睿骁¹ 孟洋¹ 任丽丽¹ 曹迪¹ 孙晓麟² 张学武²

¹郑州大学第五附属医院风湿免疫科, 郑州 450002; ²北京大学人民医院风湿免疫科, 北京 100044

通信作者: 王燕, Email: wangyanh_1963@163.com; 张学武, Email: xuewulore@163.com

【摘要】 目的 探讨类风湿关节炎(RA)患者外周血中 CD8⁺CD25⁺T 细胞的比例变化及其临床意义。方法 收集 2018 年 5—10 月在北京大学人民医院住院的 RA 患者外周血 38 例和健康人外周血 20 名, 并记录 RA 患者的各项临床表现和实验室指标[红细胞沉降率(ESR)、C 反应蛋白(CRP)、环瓜氨酸抗体(CCP)], 分离提取外周血中的淋巴细胞, 利用流式细胞技术检测外周血中 CD8⁺CD25⁺T 细胞亚群的百分比, 运用软件 SPSS 22.0 和 GraphPadPrism 6 分析其与实验室指标的相关关系及临床意义。结果 RA 患者外周血 CD8⁺CD25⁺T 细胞表达明显高于健康对照组($P<0.05$); RA 患者外周血 CD8⁺CD25⁺T 细胞与 ESR($r=0.352, P=0.030$)、CCP($r=0.312, P=0.047$)、DAS28($r=0.330, P=0.043$)呈现明显正相关($P<0.05$), 和 C3($r=-0.354, P=0.046$)、C4($r=-0.440, P=0.010$)呈明显负相关($P<0.05$), 和其他实验室指标无明显相关; 在 RA 患者中 CD8⁺CD25⁺T 细胞在低疾病活动组和高疾病活动组之间差异有统计学意义($P<0.05$), 在低疾病活动组和中疾病活动组之间、中疾病活动组和高疾病活动组之间差异均无统计学意义。结论 RA 患者外周血中 CD8⁺CD25⁺T 细胞升高, 与实验室指标和疾病活动度明显相关, 其可能在类风湿关节炎的发病过程中起重要作用。

【关键词】 类风湿关节炎; CD8⁺CD25⁺T 细胞; 相关性分析; 临床意义

基金项目: 国家自然科学基金(81771678)

DOI:10.3760/cma.j.cn112137-20190829-01920

Changes and clinical significance of peripheral blood CD8⁺CD25⁺T cells in rheumatoid arthritis patients

Wang Liuqing¹, Wang Yan¹, Wang Run¹, Zhao Ruixiao¹, Meng Yang¹, Ren Lili¹, Cao Di¹, Sun Xiaolin², Zhang Xuewu²

¹Department of Rheumatology and Immunology, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450002, China; ²Department of Rheumatology and Immunology, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China

Corresponding authors: Wang Yan, Email: wangyanh_1963@163.com; Zhang Xuewu, Email: xuewulore@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression of CD8⁺CD25⁺T cells in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis (RA) and its correlation with clinical indicators of rheumatoid arthritis. **Methods** Peripheral blood was collected from 38 patients with RA, and 20 healthy control subjects, RA patients admitted to Peking University people's hospital from May to October 2018, and record the RA patients with the clinical manifestations and laboratory indexes, extraction in the peripheral blood lymphocytes, using flow cytometry to analyse the percentage of CD8⁺CD25⁺T cells in peripheral blood, by using the software SPASS20 and Prism6 to analyze its correlation with clinical and laboratory indices. **Results** The expression of CD8⁺CD25⁺T cells in peripheral blood of RA patients was significantly increased, which was statistically different from that of healthy patients ($P<0.05$). CD8⁺CD25⁺T cells in peripheral blood of RA patients showed significant positive correlation with ESR($r=0.352, P=0.030$), CCP($r=0.312, P=0.047$) and DAS28($r=0.330, P=0.043$), and negatively correlated with C3 ($r=-0.354, P=0.046$) and C4($r=-0.440, P=0.010$). No significant correlation was found in other indicators. In RA patients, there were statistically significant differences in CD8⁺CD25⁺T cells between the low-disease active group and the

high-disease active group ($P < 0.05$), but $CD8^+ CD25^+$ T cells between the low-disease active group and the moderate-disease active group, or between the moderate-disease active group and the high-disease active group had no significant statistical difference. **Conclusion** $CD8^+ CD25^+$ T cells in peripheral blood of patients with RA are significantly increased, and are significantly correlated with laboratory and clinical indicators, which may play an important role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.

【Key words】 Rheumatoid arthritis; $CD8^+ CD25^+$ T cells; Correlation analysis; Clinical significance

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81771678)

DOI:10.3760/cma.j.cn112137-20190829-01920

类风湿关节炎(RA)是一种以滑膜炎症和关节结构破坏为特征的慢性炎症性疾病。绝大多数未规范治疗的RA患者可出现全身多关节骨质破坏及功能丧失,在女性致残者中,关节病是首要的致残疾病,且79.4%为RA致残^[1]。因此给我国家庭和社会带来巨大负担^[2],提高RA诊疗水平,最大限度降低患者致残率,仍是一个有待解决的重大难题。

一直以来, $CD4^+$ T细胞被认为是介导RA发病的主要免疫细胞之一,其中Th1和Th17产生了诸如肿瘤坏死因子(TNF)- α 、 γ 干扰素(IFN- γ)、白细胞介素(IL)-17等细胞因子,引发RA的炎症状态^[3]。有研究发现, $CD8^+$ T细胞可能参与了类风湿关节炎的免疫病理过程^[4],且 $CD8^+ CD25^+$ T细胞在幼年型类风湿关节炎患者血液及滑膜液中明显升高^[5]。这些数据均表明 $CD8^+ CD25^+$ T细胞可能参与了RA的自身免疫调节过程。 $CD8^+ PD-1^+$ T细胞和 $CD8^+ CXCR5^+$ T细胞是 $CD8^+$ T细胞的主要亚群,其在感染性疾病和肿瘤免疫机制中的研究颇多^[6-7],但其在RA中的作用尚不清楚。本研究运用流式细胞技术测定RA患者外周血中上述 $CD8^+$ T细胞亚群的百分比,分析 $CD8^+ CD25^+$ T细胞与RA实验室指标及疾病活动度之间的关系,并探讨其在RA发病中的临床意义。

对象与方法

1. 标本来源:收集2018年5至10月北京大学人民医院病房的RA患者38例,入组时均有不同程度的病情活动,均稳定用过传统DMARDs药,如甲氨蝶呤、来氟米特等,且近3个月内未用过生物制剂或激素。入选患者均符合2010年美国风湿病学会(ACR)的“类风湿关节炎”诊断标准^[8-9]。其中男10例,女28例,年龄45~73(61.59 ± 10.77)岁。同时纳入20名年龄、性别匹配的健康人作为对照研究。本研究获得北京大学人民医院伦理委员会审查批

准,所有参与研究的患者均签署知情同意书。

2. 仪器与试剂:(1)流式抗体:Alexa Fluor 647Rat-Anti-Human CXCR5(BD Biosciences),PE抗人CD25(BioLegend, San Diego, CA, 美国),抗人PD-1(eBioscience Biotin),Brilliant Violet421抗人CD197(CCR7, BioLegend),PerCp抗人CD8(BioLegend),PE-CF594鼠-抗人CD161(BD, Biosciences, San Diego, CA, 美国),Brilliant Violet605抗人CD127(BioLegend),AlexaFluor700抗人CD3(BioLegend),FITC抗人CD4(BioLegend),Brilliant Violet510抗人CD45RA(BioLegend)。(2)仪器:FACS Arial II流式细胞仪(美国BD公司FACScan),奥林巴斯倒置显微镜(上海生物科技发展有限公司),Thermo微量低温离心机(北京医用离心机厂),白洋低速大容量离心机(朗博卡科学仪器有限公司),磷酸盐缓冲液PBS(北京中杉金桥生物技术有限公司)等。

3. 实验方法:(1)分离外周血单个核细胞(PBMC):采集乙二胺四乙酸二钠(EDTA- Na_2)抗凝静脉血3 ml,使用淋巴细胞分离液分离外周血淋巴细胞,使用PBS或生理盐水稀释细胞成 1×10^6 /ml浓度。(2)细胞染色:先将外周血淋巴细胞用PBS洗涤2次,然后使用荧光素标记的单抗染色,于4℃避光作用30 min,再用PBS洗涤2次去除未结合的抗体,使用0.5 ml 3%多聚甲醛固定细胞,最后使用流式细胞仪(美国BD公司FACScan)检测 $CD8^+ PD-1^+$ T细胞、 $CD8^+ CD25^+$ T细胞、 $CD8^+ CXCR5^+$ T细胞等细胞亚群的表达水平、利用FlowJo软件分析样本中各细胞群的阳性表达。

4. 统计学处理:应用SPSS 22.0进行统计分析,应用GraphPadPrism 6作图。计量资料以均值 \pm 标准差的形式表示。两组间比较采用配对t检验,多组间比较采用方差分析; $CD8^+ CD25^+$ T细胞和临床指标的相关性采用Spearman等级相关系数分析; $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义。

结 果

1.RA 患者临床特征:本次试验纳入 38 例 RA 患者和 20 名年龄、性别都与之匹配的健康对照组。以下实验室及临床指标被应用于该研究中。

如表 1 所示是 RA 患者和健康对照组的临床和实验室特征。年龄、性别差异无统计学意义。RA 患者的平均病程是从 1.42 至 21.05 年之间。DAS28 评分是从 2.59 至 6.25 之间。

表 1 RA 患者和健康人的临床和实验室特征

临床指标	RA	HC	P 值
年龄(岁)	61.59±10.77	58.25±2.02	0.177
男/女	28:10	14:6	0.638
病程(年)	11.23±9.82	NA	
关节肿胀(例)	8.65±9.17	NA	
关节疼痛(例)	10.85±10.97	NA	
RF-IgG(+)(%)	7/38(18.4)	NA	
Anti-CCP(%)	34/38(89.5)	NA	
ESR(%)	32/38(84.2)	NA	
CRP(%)	31/38(81.6)	NA	
DAS28	4.42±1.83	NA	
GPI(+)(%)	11/38(30.4)	NA	
C3(%)	17/38(44.7)	NA	
C4(%)	10/38(26.3)	NA	
RF(+)(%)	36/38(94.7)	NA	

注:RA:类风湿关节炎;DAS28 评分:是评估 RA 患者疾病活动度的常用方法;RF-IgG:隐性类风湿因子;Anti-CCP:抗环瓜氨酸抗体;ESR:红细胞沉降率;CRP:C 反应蛋白;GPI:6 磷酸葡萄糖异构酶;RF:类风湿因子;NA:不适用。以上数据均是通过 t 检验或 χ^2 检验所求得,以均值±标准差形式表示

2.RA 患者外周血 CD8⁺CD25⁺T 细胞亚群比例显著升高:通过对 RA 患者和健康对照组的 CD8⁺T 细胞不同亚群进行了分析比较,结果如图 1 所示。CD8⁺CD25⁺T 细胞群在 RA 患者测定值为(4.06±2.67),在健康对照组测定值为(1.52±0.57),CD8⁺CD25⁺T 细胞群在 RA 患者中明显高于健康对照组

(图 1A),差异有统计学意义($P<0.01$)。而 CD8⁺PD-1⁺T、CD8⁺CXCR5⁺T 细胞亚群在 RA 患者和健康对照中差异无统计学意义($P>0.05$)(图 1B~C)。

3.CD8⁺CD25⁺T 细胞与 RA 患者实验室指标的相关性分析:如图 1 看出,CD8⁺CD25⁺T 细胞在 RA 患者中明显升高,为了解 CD8⁺CD25⁺T 细胞的升高与实验室指标有无关系,下面对 CD8⁺CD25⁺T 细胞做实验室指标的相关性分析。

如表 2 所示 ESR($r=0.352, P=0.030$)、CCP($r=0.3121, P=0.047$)、DAS28($r=0.330, P=0.043$)和 CD8⁺CD25⁺T 呈现正相关($P<0.05$);C3($r=-0.354, P=0.046$)、C4($r=-0.440, P=0.010$)和 CD8⁺CD25⁺T 细胞呈现负相关($P<0.05$);其他实验室指标和 CD8⁺CD25⁺T 细胞无明显相关。

4.外周血 CD8⁺CD25⁺T 细胞在不同疾病活动度中的表达:根据 DAS28 评分将 38 例 RA 患者样本分

表 2 CD8⁺CD25⁺细胞群和实验室指标的相关性

实验室指标	CD8 ⁺ CD25 ⁺ T(%)	
	r	P 值
ESR(mm/h)	0.352	0.030
CRP(mg/L)	0.197	0.236
CCP(U/ml)	0.312	0.047
RF-IgG(U/ml)	0.184	0.282
RF(U/ml)	0.040	0.818
C3(g/L)	-0.354	0.046
C4(g/L)	-0.440	0.010
IgG(g/L)	0.133	0.452
IgA(g/L)	-0.174	0.325
IgM(g/L)	-0.424	0.798
DAS28	0.330	0.043
ASO(U/ml)	0.238	0.134
D-dimer(mg/L)	0.018	0.913
WBC($\times 10^9/L$)	0.201	0.240

注:ESR:红细胞沉降率;CRP:C 反应蛋白;CCP:抗环瓜氨酸抗体;RF-IgG:隐性类风湿因子;RF:类风湿因子;DAS28 评分:是评估 RA 患者疾病活动度的常用方法;ASO:抗链球菌;D-dimer:D-二聚体。CD8⁺CD25⁺T 细胞和临床指标的相关性分析采用 Spearman 等级相关系数分析

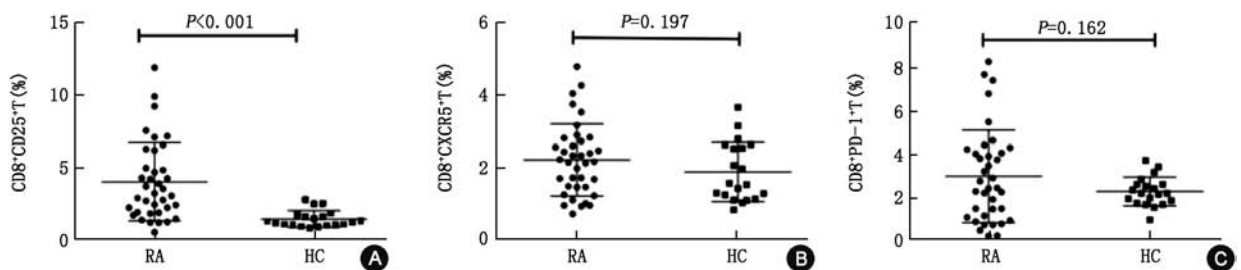
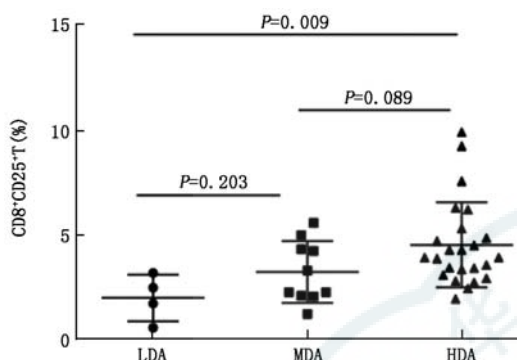


图 1 RA 患者外周血中 CD8⁺CD25⁺T、CD8⁺CXCR5⁺T、CD8⁺PD-1⁺T 细胞亚群比例分析

为 3 组(本研究所纳入的 RA 患者的 DAS28 评分的区间是 0~9.6,其所表达的临床意义是: DAS28<2.6 为疾病临床缓解, 2.6≤DAS28<3.2 为低疾病活动组, 3.2≤DAS28<5.1 为中疾病活动组, DAS28>5.1 为高疾病活动组, 图 2)。



注: LDA, 低疾病活动组; MDA, 中疾病活动组; HDA, 高疾病活动组

图 2 CD8⁺CD25⁺T 细胞在不同疾病活动度中的表达

图 2 是分析比较低、中、高 3 组疾病活动组之间的 CD8⁺CD25⁺T 细胞表达有无差异。可以看出 CD8⁺CD25⁺T 细胞的表达在低疾病活动组和高疾病活动组之间差异有统计学意义 ($P<0.05$), 在低疾病活动组和中疾病活动组之间、中疾病活动组和高疾病活动组之间差异无统计学意义。

讨 论

RA 是一种以慢性破坏性关节炎为主要特征的自身免疫疾病,其发病和机体免疫功能紊乱相关。一直以来, T 细胞过度活化被认为是 RA 发病的根本原因, RA 患者体内常存在着异常活化的 T 细胞和(或) T 细胞亚群数量的改变^[10-11], 因此, 临床上用于治疗 RA 的甲氨蝶呤、来氟米特等一线抗风湿药物多基于这一作用机制: 抑制 T 细胞活化, 恢复 T 细胞亚群的比例^[12]。研究 RA 患者体内细胞亚群的比例变化及其临床意义为进一步深入了解 RA 的发病机制提供线索。

研究发现 RA 患者外周血中 CD8⁺CD25⁺T 细胞亚群的比例较正常对照组显著升高, 而且随着病情活动度的增高, CD8⁺CD25⁺T 细胞亚群的增高有愈加显著的趋势; 且 CD8⁺CD25⁺T 细胞亚群与实验室指标 ESR、CCP、DAS28 呈现明显正相关 ($P<0.05$), 与补体 C3、C4 呈明显负相关 ($P<0.05$), 和其他实验室指标无明显相关, 说明 CD8⁺CD25⁺T 细胞很可能

参与了 RA 的发病过程, 该研究的发现再次为 RA 患者体内淋巴细胞活化机制假说^[13] 提供了证据。有研究发现 RA 患者滑膜中 CD8⁺T 细胞明显升高, 且其可能在 RA 的发病过程中起关键作用^[4]。也有研究发现 CD8⁺CD25⁺T 细胞在幼年型 RA 患者的外周血和滑膜中明显升高, 经过一段有效抗风湿治疗后, 两者中 CD25 的表达水平明显下降^[5], 进一步说明 CD8⁺CD25⁺T 细胞可能是 RA 发病中的一个重要致病细胞。RA 患者外周血 CD8⁺CD25⁺T 细胞升高可能是由于 T、B 淋巴细胞的大量激活, 这些炎细胞表面表达大量的免疫激活物和信号辅助分子, 受到抗原的刺激分泌大量细胞因子 (Th1、Th17、TNF- α 、IFN- γ 、IL-17 等) 及趋化因子 (IL-8、CCR5 等)^[14-15], 进而通过不同的信号传导通路, 刺激 CD8⁺T 细胞 CD25 的表达, T 细胞表面具有非特异性识别关节滑膜组织的 Toll 样受体, 诱导关节组织的免疫反应, 造成关节破坏。T 细胞还分泌大量致炎因子, 进一步促进炎症反应, 这些免疫反应很大程度上促进了外周血和关节液中 CD25 的表达, 这和之前报道的外周血和关节液中 CD25 升高相符合^[16]。CD8⁺T 细胞在 RA 发病过程中的作用也逐渐引起大家的关注, 其具体的致病机制还有待进一步研究。我们或许可以通过检测关节液中的 CD8⁺CD25⁺T 细胞亚群来鉴别免疫性关节炎。

有关 RA 的发病机制非常复杂, 受多基因、多因子、多因素共同调控的结果。本研究存在局限性, 尽管研究得出有意义的结果, 但目前的研究仅仅是对 CD8⁺CD25⁺T 细胞和 ESR、CRP 等实验室及临床指标做了横断面单次检测, 并且所采用的实验组和对照组样本例数较少, 研究结果可能会出现偏移。在后续的研究中, 将增加样本例数, 密切观察 CD8⁺CD25⁺T 细胞群在 RA 的疾病发展及治疗过程中的变化, 进一步探索该细胞群在 RA 的疾病发展中可能的治病机制, 以明确 CD8⁺CD25⁺T 细胞群在 RA 发病中的重要作用, 它可以为临床治疗类风湿关节炎提供部分理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Minnock P, FitzGerald O, Bresnihan B, et al. Women with established rheumatoid arthritis perceive pain as the predominant impairment of health status[J]. Rheumatol (Oxford), 2003, 42(8): 995-1000. DOI: 10.1093/rheumatology/keg281.

- [2] Li R, Sun J, Ren LM, et al. Epidemiology of eight common rheumatic diseases in China: a large-scale cross-sectional survey in Beijing[J]. *Rheumatol (Oxford)*, 2012, 51(4): 721-729. DOI: 10.1093/rheumatology/ker370.
- [3] Bader L, Gullaksen S, Blaser N, et al. Candidate markers for stratification and classification in rheumatoid arthritis[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1488. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01488.eCollection 2019.
- [4] Zhang F, Wei K, Slowikowski K, et al. Defining inflammatory cell states in rheumatoid arthritis joint synovial tissues by integrating Single-cell transcriptomics and mass cytometry[J]. *Nature Immunol*, 2019, 20(7): 928-942. DOI: 10.1038/s41590-019-0378-1.
- [5] 廉水清, 毋小玉, 张瑛, 等. 幼年型类风湿关节炎患者外周血和滑液 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞 CD25 表达及意义[J]. *中外医疗*, 2009, 28(16): 1-2. DOI: 10.16662/j.cnki.1674-0742.2009.16.092.
- [6] Jifu E, Yan F, Kang Z, et al. CD8⁺ CXCR5⁺ T cells in tumor-draining lymph nodes are highly activated and predict better prognosis in colorectal cancer [J]. *Human Immunology*, 2018, 79(6):446-452. DOI: 10.1016/j.humimm.2018.03.003.
- [7] Kotsakis A, Kallergi G, Aggouraki D, et al. CD8⁺PD-1⁺T-cells and PD-L1⁺ circulating tumor cells in chemotherapy-naïve nonsmall cell lung cancer: towards their clinical relevance[J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2019, 11: 1758835919853193. DOI: 10.1177/1758835919853193.
- [8] Arroyo-Villa I, Bautista-Caro MB, Balsa A, et al. Constitutively altered frequencies of circulating follicular helper T cell counterparts and their subsets in Rheumatoid Arthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2014, 16(6): 500. DOI: 10.1186/s13075-014-0500-6.
- [9] Rao DA, Gurish MF, Marshall JL, et al. Pathologically expanded peripheral T helper cell subset drives B cells in rheumatoid arthritis[J]. *Nature*, 2017, 542(7639): 110-114. DOI: 10.1038/nature20810.
- [10] Cabrera R, Ararat M, Xu Y, et al. Immune modulation of effector CD4⁺ and regulatory T cell function by sorafenib in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2013, 62(4): 737-746. DOI: 10.1007/s00262-012-1380-8. Epub 2012 Dec 7.
- [11] Skapenko A, Leipe J, Lipsky PE, et al. The role of the T cell in autoimmune inflammation[J]. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7 (Suppl 2):S4-S14. DOI:10.1186/ar1703.
- [12] Genestier L, Paillot R, Fournel S, et al. Immunosuppressive properties of methotrexate: apoptosis and clonal deletion of activated peripheral T cells[J]. *J Clin Invest*, 1998, 102(2): 322-328. DOI:10.1172/JCI2676.
- [13] Tak PP, Bresnahan B. The pathogenesis and prevention of joint damage in rheumatoid arthritis: advances from synovial biopsy and tissue analysis[J]. *Arthritis Rheum*, 2000, 43(12): 2619-2633. DOI: 10.1002/1529-0131(200012)43:12<2619::AID-ANR1>3.0.CO;2-V.
- [14] Skapenko A, Lipsky PE, Schulze-Koops H, et al. T cell activation as starter and motor of rheumatic inflammation[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006, 305:195-211.
- [15] Lu DR, McDavid AN, Kongpachith S, et al. T Cell-Dependent affinity maturation and innate immune pathways differentially drive autoreactive B cell responses in rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2018, 70(11): 1732-1744. DOI: 10.1002/art.40578.
- [16] Weyand CM, Goronzy JJ. Immunometabolism in early and stages of rheumatoid arthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2017, 13(5):291-301. DOI: 10.1038/nrrheum.2017.49.

(收稿日期:2019-08-29)

(本文编辑:陈新石)

更正

《中华医学杂志》2009年第89卷23期1645-1649页刊出的文章《正中神经不同节段损伤修复过程中再生放大规律的实验研究》，作者王艳华、张殿英、张培训，等。因作者校对失误，原文章图5有错误，现申请更正如下。

