

调节性 B 细胞和调节性 T 细胞与英夫利昔单抗治疗克罗恩病临床疗效的关系

林芊如 夏宣平 蔡小鸟 胡定元 邵晓晓 夏盛隆 蒋益

温州医科大学附属第二医院 育英儿童医院消化内科,温州 325000

通信作者:蒋益,Email:wzjiangyi@yeah.net

【摘要】目的 探讨外周血调节性 B 细胞(Breg 细胞)和调节性 T 细胞(Treg 细胞)与英夫利昔单抗治疗克罗恩病临床疗效的关系。**方法** 2017 年 1 月至 2019 年 6 月期间,在温州医科大学附属第二医院收集 32 例活动期克罗恩病患者和 33 名性别、年龄相匹配的健康对照者。取空腹静脉血 5 ml,分离外周血单个核细胞(PBMCs),经多色流式细胞术检测 PBMCs 中 Breg 细胞(CD3⁺CD19⁺IL-10⁺B 细胞)占 B 细胞的比例,以及 Treg 细胞(CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 细胞)占 CD4⁺T 细胞的比例。克罗恩病患者于第 0、2、6 周静脉注射英夫利昔单抗(5 mg/kg)诱导缓解,其后每隔 8 周给予相同剂量的英夫利昔单抗维持治疗。于第 14 周再次检测 PBMCs 中 Breg 细胞比例和 Treg 细胞比例,并与第 0 周进行比较。同时,克罗恩病患者分别于第 0 周和第 14 周检测 C 反应蛋白(CRP)、白细胞计数、血小板计数、血细胞沉降率辅助评估英夫利昔单抗疗效。**结果** 英夫利昔单抗治疗前,克罗恩病组与健康对照组之间整体比较,PBMCs 中 Breg 细胞比例较高[(3.15±1.17)%比(2.64±0.38)%, $P=0.024$],Treg 细胞比例较低[(2.15±0.49)%比(4.25±0.41)%, $P<0.001$]。英夫利昔单抗治疗前和治疗第 14 周,克罗恩病组中 Breg 细胞比例和 Treg 细胞比例均呈独立正相关($r=0.628$, $P<0.001$; $r=0.749$, $P<0.001$)。治疗第 14 周,根据症状、克罗恩病活动指数(CDAI)、内镜下黏膜愈合进行评估。CDAI<150 且内镜下黏膜愈合者定义为缓解组(R 组),CDAI≥150 或内镜下黏膜未愈合者为未缓解组(N 组)。治疗第 14 周与治疗前比较,R 组中 Breg 细胞比例和 Treg 细胞比例均显著增高[(5.89±2.60)%比(3.19±1.27)%, $P<0.001$;(4.59±0.72)%比(2.08±0.47)%, $P<0.001$],CDAI 和 CRP 均显著降低[CDAI:(63.19±14.69)比(195.62±58.13), $P<0.001$;CRP:(3.65±2.23) mg/L 比(29.80±30.06) mg/L, $P<0.001$]。治疗前和第 14 周,克罗恩病患者中 Breg 细胞比例和 Treg 细胞比例与 CRP($r=-0.279$, $P=0.026$; $r=-0.406$, $P=0.001$)和 CDAI($r=-0.409$, $P=0.001$; $r=-0.708$, $P<0.001$)始终呈独立负相关。治疗第 14 周,ROC 曲线分析显示“Breg 细胞比例+Treg 细胞比例”对英夫利昔单抗疗效的预测价值高于其他参数(曲线下面积:0.782,截断值:0.895 5, $P=0.034$)。**结论** Breg 细胞和 Treg 细胞不仅与克罗恩病疾病活动密切相关,而且在活动期克罗恩病患者中,联合检测这两类免疫细胞对英夫利昔单抗疗效的预测价值更高。

【关键词】 Crohn 病; 调节性 B 细胞; 调节性 T 细胞; 英夫利昔单抗

基金项目:浙江省自然科学基金(LY16H160055, LY17H030011);温州市科技计划项目(Y20150029, Y20160102, Y20170062, Y20170637)

临床试验注册:美国临床试验注册中心, NCT04272788

DOI: 10.3760/cma.j.cn112137-20200215-00298

Association of Breg cells and Treg cells with the clinical effects of Infliximab in the treatment of Chinese patients with Crohn's disease

Lin Qianru, Xia Xuanping, Cai Xiaoniao, Hu Dingyuan, Shao Xiaoxiao, Xia Shenglong, Jiang Yi

Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China

Corresponding author: Jiang Yi, Email: wzjiangyi@yeah.net

【Abstract】 Objective To explore the associations of regulatory B cells (Breg cells) and regulatory T cells (Treg cells) with the clinical effect of Infliximab in the treatment of Chinese patients with Crohn's disease (CD). **Methods** From January 2017 to June 2019, a total of 32 CD patients at active stage and 33 age and gender-matched healthy controls were collected from the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University in this study. Approximate 5 ml of peripheral fasting venous blood was

obtained from every subject. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from whole blood. Then multi-color flow cytometry was applied to determine the proportion of Breg (CD3⁻CD19⁺IL-10⁺B cells) in B cells and the proportion of Treg (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T cells) in CD4⁺T cells. Infliximab (5 mg/kg) was given intravenously at week 0, 2 and 6 to induce CD remission, and then maintained with the same dose of Infliximab every 8 weeks. And the proportions of Breg and Treg were examined at week 14 of Infliximab treatment, then compared with those of week 0. Simultaneously, C-reactive protein (CRP), leucocyte count, platelet count, erythrocyte sedimentation rate were detected in CD patients to assess the clinical effect at week 0 and 14 of Infliximab treatment. **Results** Before infliximab treatment, compared with healthy controls, the proportion of Breg in B cells was significantly increased [(3.15±1.17)% vs (2.64±0.38)%, $P=0.024$], and the proportion of Treg in CD4⁺T cells was significantly decreased [(2.15±0.49)% vs (4.25±0.41)%, $P<0.001$] in CD patients. And the proportion of Breg was positively related with the proportion of Treg in CD patients either at week 0 or week 14 of Infliximab treatment ($r=0.628, P<0.001$; $r=0.749, P<0.001$). At week 14 of Infliximab treatment, according to symptoms, Crohn's disease activity index (CDAI) and endoscopic mucosal healing, CD patients were classified as remission group (CDAI<150 and endoscopic mucosal healing, R group) and non-remission group (CDAI≥150 or mucosal non-healing group, N group). Compared with CD patients at week 0 of Infliximab treatment, both the proportion of Breg and Treg were significantly enhanced [(5.89±2.60)% vs (3.19±1.27)%, $P<0.001$; (4.59±0.72)% vs (2.08±0.47)%, $P<0.001$], whereas CDAI and CRP was significantly reduced [CDAI: (63.19±14.69) vs (195.62±58.13), $P<0.001$; CRP: (3.65±2.23) mg/L vs (29.80±30.06) mg/L, $P<0.001$] in R group at week 14 of Infliximab treatment. The proportions of Breg and Treg were negatively related with the CRP ($r=-0.279, P=0.026$; $r=-0.406, P=0.001$) and CDAI ($r=-0.409, P=0.001$; $r=-0.708, P<0.001$) in CD patients at week 0 and 14 of Infliximab treatment. At week 14 of Infliximab treatment, ROC curve analysis showed that the predictive value of "Breg+Treg" for the effect of Infliximab was higher than the other parameters (area under ROC: 0.782, cutoff value: 0.895 5, $P=0.034$). **Conclusions** Breg cells and Treg cells are not only significantly correlated with CD disease activity, but the combined detection of the two types of immune cells has higher clinical value for predicting the effect of Infliximab in CD patients at active stage.

【Key words】 Crohn disease; Regulatory B cell; Regulatory T cell; Infliximab

Fund program: Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (LY16H160055, LY17H030011); The Project of Wenzhou Municipal Science and Technology Plan (Y20150029, Y20160102, Y20170062, Y20170637)

Trial Registration: American Clinical Trial Registry, NCT04272788

DOI: 10.3760/cma.j.cn112137-20200215-00298

调节性B细胞(regulatory B cell, Breg细胞)是一类特殊的B细胞亚群,通过分泌白细胞介素(IL)-10对T细胞、B细胞、抗原提呈细胞(APC)和自然杀伤(NK)细胞等产生免疫抑制效应,从而在自身免疫、感染、肿瘤等疾病中发挥重要的调节作用。调节性T细胞(regulatory T cell, Treg细胞)是具有免疫抑制功能的CD4⁺T细胞亚群,其数目和(或)功能异常与克罗恩病密切相关。

英夫利西单抗是一种能特异性阻断肿瘤坏死因子(TNF)- α 的人鼠嵌合型单克隆抗体,主要用于传统药物治疗不佳或中重度克罗恩病,能促进大多数克罗恩病患者的肠道炎症愈合和瘘管闭合,诱导并维持活动期克罗恩病缓解,减少复发。但仍有1/3的克罗恩病患者对英夫利西单抗治疗无应答,推测原因可能是英夫利西单抗会引起免疫细胞的数目和功能发生改变,以及除TNF- α 外,IL-6、IL-17等炎性因子也在促进克罗恩病炎症级联反应中发挥重要作用。本研究通过分析活动期克罗恩病患者接

受英夫利西单抗治疗前后,其外周血中Breg细胞比例和Treg细胞比例的变化与英夫利西单抗疗效的关系,旨在评估这两类免疫细胞对预测英夫利西单抗疗效的临床价值,为进一步诠释英夫利西单抗治疗克罗恩病的潜在机制提供线索。

对象与方法

一、研究对象

通过前瞻性队列研究,收集2017年1月至2019年6月于温州医科大学附属第二医院消化内科住院的克罗恩病患者32例(男20例、女12例),年龄(32±14)岁,其中2例有吸烟史。疾病部位:回肠末端型17例,结肠型6例,回结肠型9例,上消化道型0例。疾病行为:非狭窄非穿透型16例,狭窄型12例,穿透型4例,合并肛周疾病6例。依据2016年欧洲克罗恩病和结肠炎组织(ECCO)颁布的克罗恩病诊治指南^[1],经临床、消化内镜、实验

室、影像学及病理组织学等综合确立克罗恩病诊断。纳入前排除糖尿病、类风湿性关节炎(RA)、系统性红斑狼疮(SLE)、肠结核、缺血性肠炎、放射性肠炎和肿瘤等疾病。32例克罗恩病患者均为初发型活动期[克罗恩病活动指数(CDAI) ≥ 150],未经糖皮质激素、免疫抑制剂及生物制剂治疗,长期随访。统一采用英夫利昔单抗(5 mg/kg)于第0、2、6周静脉注射治疗诱导缓解,随后每隔8周给予相同剂量维持治疗。每次英夫利昔单抗治疗前静脉推注地塞米松针5 mg预防过敏反应。首次注射后随访14周,依据症状、CDAI及内镜下黏膜愈合进行评估。CDAI < 150 且内镜下黏膜愈合者归为缓解组(remission, R组),CDAI ≥ 150 或内镜下黏膜未愈合者为未缓解组(non-remission, N组)^[2]。每例患者分别于治疗0和14周检测C反应蛋白(CRP)、白细胞计数(WBC)、血小板计数(PLT)、血细胞沉降率(ESR)炎症指标以辅助评估英夫利昔单抗的临床疗效。同期在温州医科大学附属第二医院体检中心收集33名健康体检者作为健康对照组(男23名,女10名),年龄(33 \pm 12)岁。纳入前排除糖尿病、RA、SLE、肠结核、缺血性肠炎、放射性肠炎和肿瘤等疾病。克罗恩病组与健康对照组比较,平均年龄和性别构成比的差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。所有研究对象均签署知情同意书。本研究获得温州医科大学附属第二医院伦理委员会审核批准(2016科研课题第42号)。

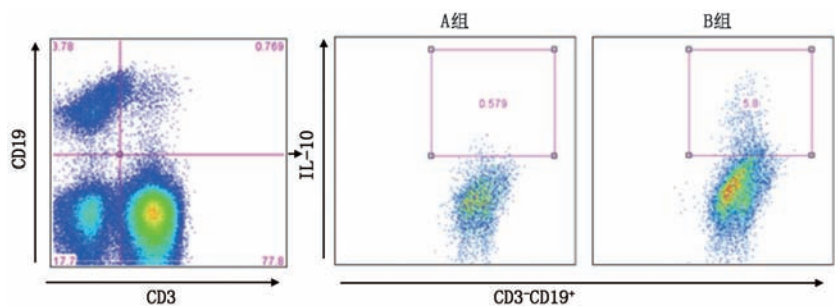
二、方法

1. 提取外周血单核细胞(PBMCs):每例克罗恩病患者(于英夫利昔单抗治疗第0周和第14周)及健康对照者取外周空腹静脉血5 ml,采用人外周血淋巴细胞分离液(中国Solarbio公司)提取PBMCs。

2. Breg细胞流式检测:采用含10%胎牛血清(中国达科为公司)和1%青霉素/链霉素(美国Sciencell公司)的RPMI 1640培养基(美国Gibco公司)重悬PBMCs,分A、B两组接种于96孔细胞培养板中:A组在5% CO₂、37℃培养箱中培养48 h,于培养结束前5 h加入布雷非德菌素A(Brefeldin A,中国联科生物公司);B组加入脂多糖(LPS,美国Sigma公司)(1 mg/ml)刺激PBMCs,置于5% CO₂、37℃培养箱中培养48 h,在培养结束前5 h加入佛波酯/离子霉素(PMA /

Ionomycin,中国联科生物公司)及Brefeldin A。采用Live/Dead细胞活性检测试剂盒(美国Invitrogen公司)对刺激培养的PBMCs进行细胞活性检测,加入FITC anti-human CD3(美国Biolegend公司)、APC anti-human CD19(美国Biolegend公司),4℃避光孵育30 min;加入Fix&Perm(美国Biolegend公司),4℃避光孵育15 min;加入PE anti-human IL-10(美国Biolegend公司),4℃避光孵育2 h;流式染色缓冲液重悬细胞后,上流式细胞仪(FACS Aria II,美国BD公司)检测。采用Flowjo9.3.2软件分析Breg细胞(CD3⁻CD19⁺IL-10⁺B细胞)占B细胞的比例。首先根据侧向散射光(SSC)、前向散射光(FSC)以及Live/Dead标记,排除淋巴细胞中的死细胞,然后在流式细胞点图中标记CD3⁻CD19⁺B细胞。最后,通过IL-10标记出CD3⁻CD19⁺B淋巴细胞中CD3⁻CD19⁺IL-10⁺B细胞。将仅在最后5 h添加Brefeldin A(A组)培养,再采用流式细胞仪检测,获得的CD3⁻CD19⁺IL-10⁺细胞作为IL-10染色的阴性对照。经LPS、PMA/Ionomycin和Brefeldin A(B组)刺激培养,再采用流式细胞仪检测,所获得CD3⁻CD19⁺IL-10⁺细胞代表Breg细胞(图1)。

3. Treg细胞流式检测:PBMCs中加入FITC anti-human CD4(美国ebioscience公司)、APC anti-human CD25(美国ebioscience公司),4℃避光孵育30 min;加入固定缓冲液,4℃避光孵育过夜;加入PE anti-human FoxP3(美国ebioscience公司),4℃避光孵育2 h;流式染色缓冲液重悬细胞后,上流式细胞仪(Cytoflex,美国贝克曼库尔特公司)检测。采用CytExpert软件分析Treg细胞(CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T细胞)占CD4⁺T细胞的比例。根据SSC、FSC、CD4标记CD4⁺T细胞,再通过Foxp3标记出CD4⁺T细胞中CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T细胞。CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T细胞的设门策略如图2所示。



注:IL-10为白细胞介素10

图1 克罗恩病患者外周血CD3⁻CD19⁺IL-10⁺B细胞流式细胞仪检测设门策略及代表图

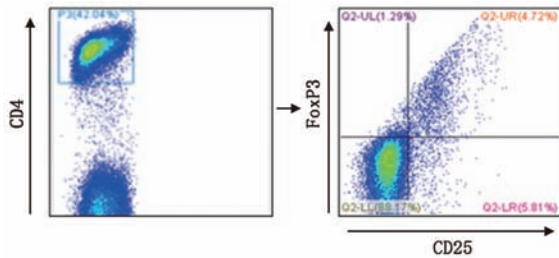


图2 克罗恩病患者外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T细胞流式细胞仪检测的设门策略及代表图

三、统计学处理

应用SPSS 25.0 软件对数据进行分析。首先对原始数据进行正态检验分析发现,所获实验数据均呈正态或轻微偏态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示。各组间采用两独立样本 *t* 检验比较 Breg 细胞比例和 Treg 细胞比例的差异。采用 Pearson 相关分析法分析 Breg 细胞和 Treg 细胞之间的相关性,并分析这两类免疫细胞与 CRP、CDAI 评分之间的相关性。采用配对样本 *t* 检验法对同一克罗恩病患者接受英夫利昔单抗治疗前后的指标变化进行比较,包括 Breg 细胞比例、Treg 细胞比例、CDAI 评分、CRP、PLT、ESR 和 WBC 的差异。将英夫利昔单抗治疗第 0 周克罗恩病患者中检测的 CRP、PLT、ESR、WBC、Breg 细胞比例、Treg 细胞比例及“Breg 细胞比例+Treg 细胞比例”作为参数,采用受试者工作特征(ROC)曲线分析这些参数对预测英夫利昔单抗疗效的临床价值。双侧检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

结 果

1. 克罗恩病患者中 Breg 细胞和 Treg 细胞与英夫利昔单抗临床疗效的关系:英夫利昔单抗治疗前,将克罗恩病组与健康对照组做整体比较发现,前者的 PBMCs 中 Breg 细胞比例较高 [(3.15±1.17)%比(2.64±0.38)% , $P=0.024$], 而 Treg 细胞比例较低 [(2.15±0.49)%比(4.25±0.41)% , $P<0.001$]。

英夫利昔单抗治疗第 14 周,32 例活动期克罗恩病患者中 26 例获得临床缓解(R 组),6 例未获得临床缓解(N 组),治疗有效率为 81.25% (26/32)。英夫利昔单抗治疗前,R 组与 N 组比较,Breg 细胞比例和 Treg 细胞比例的差异均无统计学意义 [(3.19±1.27)%比(2.99±0.63)% , $P=0.711$; (2.08±0.47)%比(2.46±0.52)% , $P=0.092$]。治疗第 14 周,R 组与 N 组比较,两类免疫细胞比例均较高 [(5.89±2.60)%比(3.09±0.54)% , $P=0.015$; (4.59±0.72)%比

(2.43±0.41)% , $P<0.001$]。R 组的克罗恩病患者治疗第 14 周与治疗前比较,Breg 细胞比例和 Treg 细胞比例均显著增高 [(5.89±2.60)%比(3.19±1.27)% , $P<0.001$; (4.59±0.72)%比(2.08±0.47)% , $P<0.001$]。而 N 组的克罗恩病患者治疗前后比较,两类免疫细胞的比例差异均无统计学意义 [(2.99±0.63)%比(3.09±0.54)% , $P=0.502$; (2.46±0.52)%比(2.43±0.41)% , $P=0.844$]。

2. 克罗恩病患者中 Breg 细胞、Treg 细胞、CDAI、炎症指标之间的关系: R 组克罗恩病患者治疗第 14 周与治疗前比较,CDAI 和 CRP 显著降低 [CDAI: (63.19±14.69)比(195.62±58.13) , $P<0.001$; CRP: (3.65±2.23) mg/L 比(29.80±30.06) mg/L , $P<0.001$]; 而 WBC、ESR 和 PLT 的差异均无统计学意义 [WBC: (7.15±1.43)×10⁹/L 比(6.35±1.36)×10⁹/L , $P=0.072$; ESR: (19.73±13.69) mm/1 h 比(11.92±17.85) mm/1 h , $P=0.120$; PLT: (262.92±98.68)×10⁹/L 比(250.31±87.79)×10⁹/L , $P=0.664$]。N 组的克罗恩病患者治疗前后比较,CDAI、CRP、WBC、ESR 和 PLT 的差异均无统计学意义 [CDAI: (201.83±38.17)比(218.67±63.78) , $P=0.322$; CRP: (25.57±9.99) mg/L 比(27.13±21.68) mg/L , $P=0.810$; WBC: (6.00±0.89)×10⁹/L 比(6.72±1.68)×10⁹/L , $P=0.367$; ESR: (11.00±13.55) mm/1 h 比(22.00±15.74) mm/1 h , $P=0.061$; PLT: (292.67±59.06)×10⁹/L 比(275.00±38.16)×10⁹/L , $P=0.520$]。

虽然健康对照组中 Breg 细胞比例和 Treg 细胞比例之间无明显相关性 ($r=0.125$, $P=0.489$), 但克罗恩病患者接受英夫利昔单抗治疗第 0 周和第 14 周, 其 PBMCs 中 Breg 细胞比例与 Treg 细胞比例之间始终呈独立正相关 ($r=0.628$, $P<0.001$; $r=0.749$, $P<0.001$)。

于英夫利昔单抗治疗第 0 周和第 14 周,对克罗恩病患者中 Breg 细胞比例、Treg 细胞比例与 CDAI、CRP 的相关性进行分析发现,Breg 细胞比例与 CRP 和 CDAI 呈独立负相关 ($r=-0.279$, $P=0.026$; $r=-0.409$, $P=0.001$), Treg 细胞比例与 CRP 和 CDAI 亦呈独立负相关 ($r=-0.406$, $P=0.001$; $r=-0.708$, $P<0.001$)。

3. 评估联合检测 Breg 细胞和 Treg 细胞对预测英夫利昔单抗临床疗效的价值:采用 ROC 曲线分析克罗恩病患者治疗第 0 周检测的 CRP、ESR、PLT、WBC、Treg 细胞比例、Breg 细胞比例及“Treg 细胞比例+Breg 细胞比例”对预测第 14 周英夫利昔单

抗疗效的价值。结果如图 3 所示: CRP (AUC: 0.439, 截断值: 71.0, $P=0.646$), ESR (AUC: 0.285, 截断值: 47.5, $P=0.106$), PLT (AUC: 0.340, 截断值: 329.5, $P=0.227$), WBC (AUC: 0.417, 截断值: 5.235, $P=0.530$), Treg 细胞比例 (AUC: 0.256, 截断值: 2.97, $P=0.067$), Breg 细胞比例 (AUC: 0.449, 截断值: 4.09, $P=0.699$), “Treg 细胞比例+Breg 细胞比例” (AUC: 0.782, 截断值: 0.895 5, $P=0.034$)。

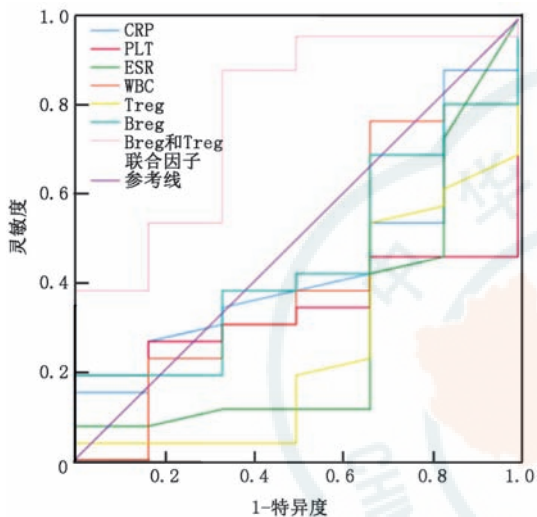


图 3 ROC 曲线分析各指标对英夫利昔单抗临床疗效的预测价值

讨 论

目前已经证实 Breg 细胞对多种自身免疫性疾病和肿瘤具有重要的免疫调节功能。在诱导 SLE 模型中发现, CD19 基因敲除 (CD19^{-/-}) 小鼠的病情较野生型小鼠更为严重, 原因是 CD19^{-/-} 小鼠体内缺乏 Breg 细胞。若将野生型小鼠脾脏的 CD1d^{hi}CD5⁺Breg 细胞过继转移至 CD19^{-/-} 小鼠中, 后者的病情会明显缓解, 存活时间延长, 提示 Breg 细胞对 SLE 具有保护作用。美国一项临床研究发现, 一些自身免疫性疾病 (RA、SLE、原发性干燥综合征、自身免疫性囊泡性皮肤病及多发性硬化症) 患者外周血 B 细胞中 CD19⁺IL-10⁺Breg 细胞所占比例的平均值明显高于健康对照组。德国 SLE 患者与健康对照组比较, 虽然外周血中 CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B 细胞的比例差异无统计学意义, 但前者 CD19⁺IL-10⁺Breg 细胞占 B 细胞的比例却低于后者^[3]。汉族原发性血小板减少性紫癜 (ITP) 患者与健康对照组比较, 外周血中 CD19⁺IL-10⁺Breg 细胞占 CD19⁺B 细胞的比例较高^[4]。

本研究首先将英夫利昔单抗治疗前的克罗恩病患者与健康对照组进行整体比较发现, 前者的 PBMCs 中 Treg 细胞比例低于后者, 这与过去的类似研究结论基本一致, 而克罗恩病患者中 Breg 细胞比例高于健康对照组。国内曾有一项关于儿童克罗恩病的临床研究报告, 克罗恩病患儿外周血中 CD19⁺IL-10⁺Breg 细胞的比例显著高于健康儿童对照^[5]。来自日本成人克罗恩病的研究数据显示, 活动期克罗恩病患者外周血中 CD19^{hi}CD1d^{hi}Breg 细胞的比例显著低于健康对照组^[6]。造成上述研究结果迥异的主要原因可能与研究对象的遗传背景、年龄构成以及样本量大小和检测的 Breg 细胞表型不同等有关。

本研究中, 32 例活动期克罗恩病患者接受英夫利昔单抗治疗 14 周, 有效率为 81.25% (26/32), 这与来自比利时和澳大利亚的研究报道基本相符^[2,7]。虽然英夫利昔单抗治疗前 R 组与 N 组比较, Breg 细胞比例和 Treg 细胞比例的差异均无统计学意义, 但治疗第 14 周发现, R 组中这两类细胞的比例均显著高于 N 组。在 R 组中, 对同一克罗恩病患者英夫利昔单抗治疗前后的情况进行自身比较发现, 第 14 周 Breg 细胞比例和 Treg 细胞比例均显著增高, 而 CDAI 和 CRP 显著降低。进一步采用 Pearson 相关分析发现, 克罗恩病患者中 Breg 细胞比例和 Treg 细胞比例与 CDAI 和 CRP 均呈独立负相关。上述结果提示活动期克罗恩病患者中 Breg 细胞和 Treg 细胞的变化与疾病活动及英夫利昔单抗的疗效密切相关。迄今为止, 多项研究表明, Breg 细胞和 Treg 细胞是反映自身免疫性疾病活动度的重要参数。在汉族 SLE 患者中研究发现, 外周血 CD19⁺CD5⁺CD1d⁺IL-10⁺Breg 细胞比例增高或数目增多与 SLE 疾病活动度呈负相关^[8]。研究发现, 在汉族 RA 患者中外周血 Breg 细胞和 Treg 细胞的数目变化与 RA 疾病活动度呈负相关^[9]。另据国内最近研究报告, 缓解期溃疡性结肠炎 (UC) 患者的外周血中 CD24^{hi}CD27⁺CD38^{hi}IL-10⁺Breg 细胞占 B 细胞的比例明显高于非缓解期 UC 患者^[10]。

目前认为 Breg 细胞和 Treg 细胞并非各自独立地行使免疫功能, 而是彼此联系、相互影响。在 B 细胞缺陷小鼠诱导的实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) 模型中研究发现, B 细胞表面的 B7 分子与 Treg 细胞上 CD28 分子结合后, 能促进 Treg 细胞的增殖、分化, 进而抑制 EAE 小鼠的炎症反应。此外, 在汉族 ITP 的临床研究中发现, Breg 细胞通过

上调 Treg 细胞表面的 Foxp3 表达水平,促进 Treg 细胞增殖^[4]。基于以上陈述,本研究决定在克罗恩病组和健康对照组中,对 Breg 细胞和 Treg 细胞之间的相关性进行分析。虽然健康对照组中未发现这两类细胞之间存在统计学关联,但在克罗恩病组中,不管是英夫利昔单抗治疗第 0 周,还是治疗第 14 周,Breg 细胞与 Treg 细胞之间始终呈显著正相关。有趣的是,此前在荷兰抗中性粒细胞胞质抗体(ANCA)相关性血管炎患者^[11]和汉族 ITP 患者^[4]的两项研究中有类似发现。

至今研究表明,克罗恩病患者的年龄、吸烟史、肠道手术史、疾病部位、是否合用免疫抑制剂、CRP 及 Treg 细胞数目等是影响英夫利昔单抗疗效的重要因素。然后,目前仍缺乏统一认可的、可特异性用于评估和预测英夫利昔单抗临床疗效的指标。并且通过文献检索发现,目前罕见针对 Breg 细胞与英夫利昔单抗疗效相关性的临床研究。因此,本研究将治疗前克罗恩病患者外周血中 Treg 细胞比例及 CRP、ESR、PLT、WBC 等炎症指标作为参数,再创新性地纳入 Breg 细胞比例,尤其是将“Breg 细胞比例+Treg 细胞比例”视为一个独立指标,采用 ROC 曲线评估这些指标对预测英夫利昔单抗疗效的临床价值。结果提示 Treg 细胞比例、Breg 细胞比例、CRP、ESR、WBC 和 PLT 单独预测英夫利昔单抗临床疗效的价值都较低,而联合检测 Breg 细胞比例和 Treg 细胞比例能更加有效地预测英夫利昔单抗的疗效。之前国外曾有一项研究提示,接受英夫利昔单抗治疗前,克罗恩病患者外周血 CRP 浓度高是预测英夫利昔单抗疗效的参数。这与本研究结果有所不同,推测其原因可能是纳入克罗恩病患者的样本量、种族遗传背景以及疾病部位和疾病行为的构成比例等不同所致。

综上所述,本研究表明,Breg 细胞和 Treg 细胞不仅与克罗恩病疾病活动密切相关,而且在活动期克罗恩病患者接受英夫利昔单抗治疗前,联合检测“Treg 细胞比例+Breg 细胞比例”对英夫利昔单抗治疗第 14 周的临床疗效具有更高的预测价值,有望成为评估英夫利昔单抗疗效的新指标。但应该指出的是,本研究还无法解释克罗恩病患者中 Breg 细胞和 Treg 细胞影响英夫利昔单抗疗效的详细机制。尤其是本研究纳入的克罗恩病患者数量偏少,仍需

在后续研究中扩大样本量,进一步核实上述结论。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Gomollón F, Dignass A, Annesse V, et al. 3rd European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease 2016: Part 1: diagnosis and medical management[J]. *J Crohns Colitis*, 2017, 11(1): 3-25. DOI: 10.1093/ecco-jcc/jjw168.
- [2] Li Z, Vermeire S, Bullens D, et al. Restoration of Foxp3 + regulatory T-cell subsets and Foxp3-Type 1 regulatory-like T Cells in inflammatory bowel diseases during anti-tumor necrosis factor therapy[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2015, 21(10): 2418-2428. DOI: 10.1097/MIB.0000000000000509.
- [3] Heinemann K, Wilde B, Hoerning A, et al. Decreased IL-10 (+) regulatory B cells (Bregs) in lupus nephritis patients[J]. *Scand J Rheumatol*, 2016, 45(4): 312-316. DOI: 10.3109/03009742.2015.1126346.
- [4] Hua F, Ji L, Zhan Y, et al. Aberrant frequency of IL-10-producing B cells and its association with Treg/Th17 in adult primary immune thrombocytopenia patients[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014:571302. DOI: 10.1155/2014/571302.
- [5] 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.
- [6] Oka A, Ishihara S, Mishima Y, et al. Role of regulatory B cells in chronic intestinal inflammation: association with pathogenesis of Crohn's disease[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2014, 20(2):315-328. DOI: 10.1097/01.MIB.0000437983.14544.d5.
- [7] Gibson DJ, Elliott L, McDermott E, et al. Heightened expression of CD39 by regulatory T lymphocytes is associated with therapeutic remission in inflammatory bowel disease[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2015, 21(12): 2806-2814. DOI: 10.1097/MIB.0000000000000566.
- [8] Wang L, Zhao P, Ma L, et al. Increased interleukin 21 and follicular helper T-like cells and reduced interleukin 10 + B cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus [J]. *J Rheumatol*, 2014, 41(9): 1781-1792. DOI: 10.3899/jrheum.131025.
- [9] Ma L, Liu B, Jiang Z, et al. Reduced numbers of regulatory B cells are negatively correlated with disease activity in patients with new-onset rheumatoid arthritis[J]. *Clin Rheumatol*, 2014, 33(2):187-195. DOI: 10.1007/s10067-013-2359-3.
- [10] Bing X, Linlang L, Keyan C. Decreased Breg / Th17 ratio improved the prognosis of patients with ulcerative colitis[J]. *Can J Gastroenterol Hepatol*, 2018, 2018: 5760849. DOI: 10.1155/2018/5760849.
- [11] Wilde B, Thewissen M, Damoiseaux J, et al. Regulatory B cells in ANCA-associated vasculitis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2013, 72(8):1416-1419. DOI: 10.1136/annrheumdis-2012-202986.

(收稿日期:2020-02-15)

(本文编辑:周阳)