

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2023.04.015

论著·临床

# 系统性红斑狼疮患者外周血 Th17/Treg 细胞和尿单核细胞趋化蛋白-1 的检测及意义

郑雪娜, 杨华强, 李博君, 覃骏

基金项目: 湖北省教育厅科学研究重点计划(D20142104)

作者单位: 442000 湖北十堰, 湖北医药学院附属人民医院/十堰市人民医院血液科

通信作者: 覃骏, E-mail: qinjun9801@126.com

**【摘要】目的** 检测系统性红斑狼疮(SLE)患者外周血辅助性 T 细胞 17(Th17 细胞)/调节性 T 细胞(Treg 细胞)比率及尿液单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)水平及临床意义。**方法** 选取 2018 年 7 月—2020 年 9 月十堰市人民医院收治 SLE 患者 68 例,根据 SLE 患者有无肾脏受累分为非狼疮肾炎组 28 例(non-LN 组)和狼疮肾炎组 40 例(LN 组),同期医院健康体检者 35 例为健康对照组。收集受试者临床资料,采用流式细胞术检测外周血单个核细胞(PBMC)中 Th17 细胞和 Treg 细胞比率,采用 RT-PCR 技术检测 Th17 细胞和 Treg 细胞相应的转录因子维甲酸相关孤核受体(ROR- $\gamma$ t)和叉头螺旋翼状转录因子 3(Foxp3)mRNA 表达量,采用 ELISA 法检测尿液 MCP-1 水平。采用 Spearman 相关分析 Th17/Treg 细胞比率与尿液 MCP-1 的关系及其与临床指标的相关性,采用受试者工作特征曲线(ROC)分析 Th17/Treg 细胞比率和尿液 MCP-1 水平诊断 SLE 患者合并 LN 效能。**结果** LN 组和 non-LN 组 Th17 细胞比例均高于健康对照组( $F=12.345, P=0.015$ ),Treg 细胞比例比较, LN 组 < non-LN 组 < 健康对照组( $F=22.388, P<0.001$ ), Th17/Treg 细胞比率比较, LN 组 > non-LN 组 > 健康对照组( $F=26.674, P<0.001$ ); ROR- $\gamma$ t mRNA 表达水平比较, LN 组 > non-LN 组 > 健康对照组( $F=20.578, P<0.001$ ), LN 组和 non-LN 组 Foxp3 mRNA 表达水平均低于健康对照组( $F=7.782, P=0.003$ );尿液 MCP-1 水平比较, LN 组 > non-LN 组 > 健康对照组( $F=51.231, P<0.001$ )。Spearman 相关分析显示, SLE 患者 Th17/Treg 细胞比率与尿液 MCP-1 水平呈正相关( $r=0.604, P=0.017$ ), SLE 患者 Th17/Treg 细胞比率与 SLEDAI 评分呈正相关( $r=0.534, P=0.021$ ),尿液 MCP-1 水平与 SLEDAI 评分和 24 h 尿蛋白定量呈正相关( $r/P=0.342/<0.001, 0.412/0.023$ )。ROC 曲线显示, Th17/Treg 细胞比率、尿液 MCP-1 预测 SLE 患者合并 LN 的曲线下面积(AUC)为 0.718、0.769,敏感度为 0.782、0.993,特异度为 0.736、0.569。**结论** SLE 合并 LN 患者体内存在 Th17/Treg 细胞比例失衡及尿液 MCP-1 水平的增加,二者联合检测可作为判断 SLE 患者疾病活动的指标,有助于评估 LN 进展情况。

**【关键词】** 系统性红斑狼疮;狼疮肾炎;辅助性 T 细胞 17;调节性 T 细胞;单核细胞趋化蛋白-1**【中图分类号】** R593.24<sup>+</sup>1 **【文献标识码】** A**Detection and significance of peripheral blood Th17/Treg cells and urinary monocyte chemoattractant protein-1 in patients with systemic lupus erythematosus** Zheng Xuena, Yang Huaqiang, Li Bojun, Qin Jun. Department of Hematology, Renmin Hospital, Hubei University of Medicine, Hubei Province, Shiyan 442000, China

Corresponding author: Qin Jun, E-mail: qinjun9801@126.com

Funding program: Key Scientific Research Program in Department of Education, Hubei Provincial (D20142104)

**【Abstract】 Objective** To investigate the ratio of peripheral blood helper T cells 17 (Th17 cells) to regulatory T cells (Treg cells) and the level of urinary monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). **Methods** A total of 68 patients with SLE admitted to Shiyan People's Hospital from July 2018 to September 2020 were selected and divided into a non lupus nephritis group of 28 patients (non-LN group) and a lupus nephritis group of 40 patients (LN group) based on whether or not the SLE patients had renal involvement. During the same period, 35 healthy physical examinees from the hospital were included in the healthy control group. Collect clinical data of subjects, use flow cytometry to detect the ratio of Th17 cells to Treg cells in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), and use RT-PCR technology to detect the corresponding transcription factor retinoic acid related solitary nuclear receptor (ROR- $\gamma$ t) of Th17 cells and Treg cells), and the expression of forked helical wing like transcription factor 3 (Foxp3) mRNA. Urine MCP-

IL-17 水平使用 ELISA 检测。Spearman 相关性分析用于分析 Th17/Treg 细胞比值和尿 MCP-1 水平及其与临床指标的关联。受试者工作特征曲线 (ROC) 用于分析 Th17/Treg 细胞比值和尿 MCP-1 水平在 SLE 患者 LN 诊断中的价值。**结果** Th17 细胞在 LN 组和非 LN 组中的比值高于健康对照组 ( $F=12.345, P=0.015$ )。Treg 细胞在 LN 组 < 非 LN 组 < 健康对照组 ( $F=22.388, P<0.001$ )，且 LN 组 > 非 LN 组 > 健康对照组 ( $F=26.674, P<0.001$ )；ROR- $\gamma$ t mRNA 表达水平在 LN 组 > 非 LN 组 > 健康对照组 ( $F=20.578, P<0.001$ )。Foxp3 mRNA 在 LN 组和非 LN 组中的表达水平低于健康对照组 ( $F=7.782, P=0.003$ )；尿 MCP-1 水平在 LN 组 > 非 LN 组 > 健康对照组 ( $F=51.231, P<0.001$ )。Spearman 相关性分析显示，Th17/Treg 细胞比值与尿 MCP-1 水平在 SLE 患者中呈正相关 ( $r=0.604, P=0.017$ )，Th17/Treg 细胞比值与 SLEDAI 评分在 SLE 患者中呈正相关 ( $r=0.534, P=0.021$ )，尿 MCP-1 水平与 SLEDAI 评分及 24 小时尿蛋白含量呈正相关 ( $r/P=0.342/ <0.001, 0.412/0.023$ )。ROC 曲线显示，Th17/Treg 细胞比值和尿 MCP-1 水平在预测 SLE 患者 LN 中的 AUC 分别为 0.718 和 0.769，敏感性分别为 0.782 和 0.993，特异性分别为 0.736 和 0.569。**结论** 在 SLE 患者 LN 中，Th17/Treg 细胞比值失衡且尿 MCP-1 水平升高。联合检测二者可作为 SLE 患者疾病活动性的指标，有助于评估 LN 的进展。

**【关键词】** 系统性红斑狼疮；狼疮肾炎；T 辅助细胞 17；T 调节细胞；单核细胞趋化蛋白-1

系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 是一个累及全身多系统、多脏器的结缔组织疾病。回顾性临床研究结果表明，狼疮肾炎 (lupus nephritis, LN) 是系统性红斑狼疮患者最常见的并发症，机体免疫系统紊乱、T 细胞亚群分布异常、B 淋巴细胞高度活化和细胞因子网络失衡是 LN 发生、发展的关键环节<sup>[1]</sup>。辅助性 T 细胞 17 (T help cell 17, Th17) 主要分泌多种炎性细胞因子，介导机体炎症反应及自身免疫反应，维甲酸相关核受体 (retinoid-related orphan receptor- $\gamma$ t, ROR- $\gamma$ t) 是初始 T 细胞向 Th17 细胞分化非常关键的转录因子<sup>[2]</sup>。调节性 T 细胞 (T regulation cell, Treg) 归属于 CD4<sup>+</sup> 效应性 T 细胞亚群，胞内高特异性表达叉头翼状螺旋转录因子 P3 (forkhead box P3, Foxp3)，Treg 细胞起到抑制过度免疫反应和维持免疫耐受的作用<sup>[3]</sup>。Th17/Treg 细胞平衡对维持正常免疫应答、防止自身免疫性疾病具有重要意义<sup>[4]</sup>。单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1) 主要生理学作用表现为对单核细胞的趋化和激活作用，可加速 LN 的发生及进展。现分析 LN 患者外周血 Th17 细胞、Treg 细胞比率及尿液 MCP-1 水平及其与 LN 疾病活动的关系，探讨其在 LN 中可能的病理生理学机制，报道如下。

## 1 资料与方法

1.1 临床资料 选取 2018 年 7 月—2020 年 9 月十堰市人民医院血液内科与风湿科收治的 SLE 患者 68 例，未出现肾脏受累或经治疗后肾损害缓解 28 例作为

非狼疮肾炎组 (non-LN 组)，患者合并 LN 40 例作为狼疮肾炎组 (LN 组)；排除合并高血压、糖尿病、冠心病、慢性阻塞性肺疾病、肿瘤等基础疾病患者。另选取同期医院健康体检者 35 例为健康对照组，男 5 例，女 30 例，年龄 21~47 (31.2 ± 13.3) 岁，血常规、肝肾功能、心电图、胸部 X 线片、尿常规均正常；排除结缔组织疾病、高血压、糖尿病、冠心病、慢性肾炎、合并肿瘤和精神疾病者。本研究经医院伦理委员会批准 (20180916-07)，受试者及家属知情同意并签署知情同意书。

1.2 病例选择标准 (1) 纳入标准：参照 2019 年欧洲风湿病联盟/美国风湿病学会 (EULAR/ACR) 制定的 SLE 分类标准<sup>[5]</sup>：①经肾活检组织检查证实，按 2003 年国际肾脏病学会 (ISN) 和肾脏病理学会 (RPS) 制定的 LN 病理组织学标准判定<sup>[6]</sup>；②尿蛋白 ≥ 0.5 g/24 h 或尿残渣检测提示蛋白 (++)；③出现管型尿：红细胞、血红蛋白、颗粒或混合管型或镜下血尿。上述 3 条件满足其一，即可归类 LN 组。(2) 排除标准：可能危及生命的中、重度活动性狼疮；目前正在使用大剂量糖皮质激素或免疫抑制剂诱导缓解的 SLE 患者；慢性肾脏病 (CKD) 4 期以上的 LN 患者；合并其他原发性或继发性肾脏疾病者；严重心、肝、脑功能障碍；合并感染性疾病、内分泌疾病等基础疾病者；妊娠期及哺乳期女性；合并精神病患者；吸烟、酗酒及合并家族遗传病患者。

## 1.3 观测指标与方法

1.3.1 SLEDAI 及实验室相关指标检查：记录纳入

SLE 患者病程,参照文献[5]计算 SLE 患者 SLE 疾病活动指数(SLE disease activity index, SLEDAI),主要评分症状及体征如下:抽搐、精神疾病、视觉障碍、颅神经损害、狼疮性头痛、脑血管意外、血管炎、关节炎、肌炎、狼疮皮疹、脱发、复发性口腔溃疡、胸腔积液、心包积液、发热、低补体血症、抗双链 DNA 抗体(ds-DNA)增高、血小板降低、管型尿、血尿、蛋白尿和脓尿。采集 SLE 患者清晨空腹静脉全血 3 ml,经血液细胞仪检测血常规;采用魏氏法测定红细胞沉降率(ESR);留取血清 5 ml,采用免疫荧光法检测抗 dsDNA 抗体浓度;采用免疫比浊法测定高敏 C 反应蛋白(hs-CRP)、24 h 尿蛋白定量及血清补体 C3、C4 浓度。

1.3.2 Th17 和 Treg 细胞检测:抽取研究对象清晨空腹肘静脉血 4 ml,枸橼酸钠抗凝,加入人淋巴细胞分离液,经 Ficoll 密度梯度离心法分离提取单个核细胞(PBMCs),以 PBS 冲洗及 10% 胎牛血清的 RPM1640 培养基重悬单个核细胞并稀释,调整细胞密度为  $(2 \sim 5) \times 10^6$  个/ml。将每份 PBMCs 样本分成 2 管,分别用于检测 Th17 细胞和 Treg 细胞。Th17 测定管加入佛波醇乙酯  $2.5 \mu\text{g}/10^6$  细胞和离子霉素  $2 \mu\text{l}$ (终浓度  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ),置于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中孵育 3 h。孵育完成后,用 PBS 洗涤 2 次,各加入 FITC 标记的 CD3 单克隆抗体、PE 标记的 CD4 单克隆抗体和 PE 标记的 Cy5-CD8 单克隆荧光抗体各  $5 \mu\text{l}$ ,以  $\text{CD}3^+ \text{CD}8^-$  T 细胞代表  $\text{CD}4^+$  T 细胞,  $4^\circ\text{C}$  避光孵育 1 h。加入 PE 标记的 IL-17A 单克隆抗体,室温避光 1 h, PBS 洗涤 2 次后,加入固定液  $400 \mu\text{l}$ ,规定时间内上流式细胞仪(美国 BD 公司, Calibur 型)检测,以  $\text{CD}3^+ \text{CD}4^+ \text{IL-17A}^+$  表示为 Th17 细胞。Treg 细胞测定管避光加入 CD4 单克隆抗体(CD4-PerCP)  $5 \mu\text{l}$ , CD25 - 藻红蛋白  $5 \mu\text{l}$ , CD127 - 多甲藻叶绿素蛋白 - Cy5  $5 \mu\text{l}$ 。避光孵育 1 h, PBS 洗涤 2 次后加入固定液,规定时间内上流式细胞仪检测,采用  $\text{CD}4^+ \text{CD}25^+ \text{CD}127^{\text{low}}$  细胞表示 Treg 细胞。FITC 标记的 CD3 单克隆抗体、PE 标记的 Cy5-CD8 单克隆荧光抗体、PE 标记的 IL-17A 单克隆抗体、CD4-PerCP、CD25 - 藻红蛋白和 CD127 - 多甲藻叶绿素蛋白 - Cy5 购自美国 eBioscience 公司;淋巴细胞分离液、佛波酯、离子霉素、细胞固定剂和打孔剂均由德国 Sigma 公司提供。新生牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司。用 Flowjo 7.6 软件系统分析流式细胞学结果。

1.3.3 ROR- $\gamma\text{T}$  和 Foxp3 mRNA 检测:采用 RT-PCR 法检测 ROR- $\gamma\text{T}$  和 Foxp3 mRNA 在 PBMCs 中的表达量。以上述 Ficoll 密度梯度离心法分离提取 PBMCs,外周

血采用 Trizol 法提取 RNA 后,反转录合成 cDNA,用 SYBR 染色法在 ABI 7900HT system 上进行 PCR 反应。淋巴细胞分离液、cDNA 反转录试剂盒、SYBR 染色试剂盒均由德国 Sigma 公司提供。相关基因引物由 Primer Premier 5.0 程序设计,内参为  $\beta$  肌动蛋白( $\beta$ -actin),引物合成由上海生物工程技术有限公司完成,见表 1。Foxp3 和 ROR- $\gamma\text{T}$  mRNA 结果以与内参照的 CT 校正值表示。

表 1 ROR- $\gamma\text{T}$ 、Foxp3 和内参基因引物序列

Tab. 1 ROR- $\gamma\text{T}$ , Foxp3, and internal reference gene primer sequences

| 基因                    | 引物序列  |
|-----------------------|---|
| ROR- $\gamma\text{T}$ | 上游引物:5'-CCGAGATGCTGTCAAGTTC-3'<br>下游引物:5'-TTCTGTGCTGCTGTTGTC-3'   |
| Foxp3                 | 上游引物:5'-TTCGAAGAGCCAGAGACTT-3'<br>下游引物:5'-ATGGCACTCAGCTTCTCCTT-3' |
| $\beta$ -actin        | 上游引物:5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'<br>下游引物:5'-TACCACCTGTGCTGTA-3'    |

注:ROR- $\gamma\text{T}$ . 维甲酸相关孤儿核受体;Foxp3. 叉头翼状螺旋转录因子 P3; $\beta$ -actin.  $\beta$ -肌动蛋白。

1.3.4 尿液 MCP-1 浓度检测:分别取 SLE 患者及健康对照者清晨清洁中段尿 5 ml,离心提取上清液,采用 ELISA 双抗夹心法测定上清液 MCP-1 浓度,酶标仪由 Benchmark 公司生产,型号 HM-560,试剂盒由浙江夸克生物技术有限公司提供,操作按试剂盒说明书步骤进行。

1.4 统计学方法 利用 SPSS 20.0 软件进行数据处理。计数资料以频数或率(%)表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验;符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用  $t$  检验和单因素方差分析;计量指标间的相关性研究采用 Spearman 相关性分析;采用受试者工作特征曲线(ROC)分析 Th17/Treg 细胞比率和尿液 MCP-1 水平诊断 SLE 患者合并 LN 的效能。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 2 组 SLE 患者临床资料比较 2 组 SLE 患者性别、年龄、病程、抗 dsDNA 浓度、补体 C3、补体 C4 比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );LN 组 SLEDAI 评分、尿蛋白定量(24 h)、ESR、hs-CRP 水平均高于 non-LN 组,而白细胞计数(WBC)、血小板计数(PLT)均低于 non-LN 组( $P < 0.05$ ),见表 2。

2.2 各组外周血 Th17 细胞、Treg 细胞及 Th17/Treg 细胞比率比较 LN 组和 non-LN 组患者外周血 Th17 细胞比例高于健康对照组( $P < 0.05$ ),而 LN 组与 non-LN 组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );Treg 细胞

表 2 LN 组与 non-LN 组临床资料比较

Tab. 2 Comparison of Clinical Data between LN Group and Non LN Group

| 项 目                                      | non-LN 组<br>(n=28) | LN 组<br>(n=40) | $\chi^2/t$ 值 | P 值   |
|--|--------------------|----------------|--------------|-------|
| 性别(男/女,例)                                | 2/26               | 5/35           | 0.096        | 0.755 |
| 年龄( $\bar{x} \pm s$ , 岁)                 | 32.1 ± 10.4        | 30.2 ± 14.5    | 1.45         | 0.435 |
| 病程( $\bar{x} \pm s$ )                    | 5.9 ± 3.1          | 6.4 ± 3.1      | 1.09         | 0.312 |
| SLEDAI 评分( $\bar{x} \pm s$ , 分)          | 7.4 ± 3.1          | 11.3 ± 5.6     | 2.13         | 0.011 |
| 尿蛋白定量( $\bar{x} \pm s$ , g/24h)          | 0.34 ± 0.14        | 2.32 ± 1.12    | 2.84         | 0.001 |
| 抗 ds-DNA( $\bar{x} \pm s$ , IU/ml)       | 199.4 ± 77.8       | 243.5 ± 74.3   | 1.12         | 0.233 |
| 补体 C3( $\bar{x} \pm s$ , g/L)            | 0.72 ± 0.29        | 0.63 ± 0.33    | 1.31         | 0.405 |
| 补体 C4( $\bar{x} \pm s$ , g/L)            | 0.52 ± 0.21        | 0.42 ± 0.17    | 1.14         | 0.221 |
| WBC( $\bar{x} \pm s$ , $\times 10^9/L$ ) | 4.42 ± 0.69        | 3.12 ± 0.39    | 2.28         | 0.031 |
| PLT( $\bar{x} \pm s$ , $\times 10^9/L$ ) | 123.2 ± 72.6       | 89.2 ± 22.5    | 2.54         | 0.043 |
| ESR( $\bar{x} \pm s$ , mm/h)             | 19.3 ± 8.7         | 32.2 ± 11.3    | 3.34         | 0.001 |
| hs-CRP( $\bar{x} \pm s$ , mg/L)          | 13.2 ± 5.3         | 22.4 ± 6.8     | 3.93         | 0.001 |

比例比较, LN 组 < non-LN 组 < 健康对照组 ( $P < 0.01$ ); Th17/Treg 细胞比率比较, LN 组 > non-LN 组 > 健康对照组 ( $P < 0.01$ ), 见表 3。

2.3 各组 ROR- $\gamma$ t 和 Foxp3 mRNA 在 PBMCs 中的表达比较 ROR- $\gamma$ t mRNA 表达水平比较, LN 组 > non-LN 组 > 健康对照组 ( $P < 0.01$ ); LN 组和 non-LN 组患者 Foxp3 mRNA 表达水平低于健康对照组 ( $P < 0.01$ ), LN 组与 non-LN 组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 3。

2.4 各组尿液 MCP-1 浓度比较 LN 组患者尿液 MCP-1 浓度为 (367.7 ± 76.8) pg/ $\mu$ mol, non-LN 组为 (217.6 ± 89.9) pg/ $\mu$ mol, 健康对照组为 (102.6 ± 43.5) pg/ $\mu$ mol。尿液 MCP-1 浓度比较, LN 组 > non-LN 组 > 健康对照组, 差异均有统计学意义 ( $F = 51.231, P < 0.001$ )。

2.5 Th17/Treg 细胞比率与尿液 MCP-1 的关系及其与临床指标的相关性分析 Spearman 相关性分析表明, SLE 患者 Th17/Treg 细胞比率与尿液 MCP-1 水平呈正相关 ( $r = 0.604, P = 0.017$ ); 尿液 MCP-1 与 Foxp3、ROR- $\gamma$ t mRNA 表达量无相关性 ( $P > 0.05$ )。SLE 患者外周血 Th17/Treg 细胞比率与 SLEDAI 评分

呈正相关 ( $P < 0.05$ ); 尿液 MCP-1 浓度与 SLEDAI 评分、24 h 尿蛋白定量均呈正相关 ( $P < 0.05$ ), 见表 4。

表 4 外周血 Th17/Treg 细胞比率、尿液 MCP-1 浓度与临床指标的相关性

Tab. 4 Correlation between peripheral blood Th17/Treg cell ratio, urine MCP-1 concentration, and clinical indicators

| 项 目        | Th17/Treg 细胞比率 |       | 尿液 MCP-1 浓度 |       |
|------------|----------------|-------|-------------|-------|
|            | r 值            | P 值   | r 值         | P 值   |
| SLEDAI 评分  | 0.534          | 0.021 | 0.342       | 0.001 |
| WBC        | 0.045          | 0.235 | 0.056       | 0.065 |
| PLT        | 0.004          | 0.332 | 0.061       | 0.443 |
| 24 h 尿蛋白定量 | 0.081          | 0.421 | 0.412       | 0.023 |
| 抗 ds-DNA   | 0.027          | 0.313 | 0.024       | 0.096 |
| ESR        | 0.032          | 0.596 | 0.033       | 0.102 |
| hs-CRP     | 0.002          | 0.120 | 0.042       | 0.233 |
| 补体 C3      | 0.020          | 0.072 | -0.012      | 0.412 |
| 补体 C4      | 0.017          | 0.063 | -0.023      | 0.238 |

2.6 Th17/Treg 细胞比率及尿液 MCP-1 水平诊断 SLE 合并 LN 活动的效能 ROC 曲线分析结果显示, Th17/Treg 细胞比率、尿液 MCP-1 水平诊断 SLE 患者合并 LN 的曲线下面积 (AUC) 为 0.718、0.769, 见表 5、图 1。

表 5 外周血 Th17/Treg 细胞比率及尿液 MCP-1 水平预测 LN 疾病活动的效能比较

Tab. 5 Comparison of Effectiveness of Peripheral Blood Th17/Treg Cell Ratio and Urine MCP-1 Levels in Predicting LN Disease Activity

| 变 量            | Cut-off 值            | AUC   | 敏感度   | 特异度   | Youden 指数 |
|----------------|----------------------|-------|-------|-------|-----------|
| Th17/Treg 细胞比率 | 0.643                | 0.718 | 0.782 | 0.736 | 0.518     |
| 尿液 MCP-1 浓度    | 401.19 pg/ $\mu$ mol | 0.769 | 0.993 | 0.569 | 0.562     |

### 3 讨 论

效应性 T 细胞的活化及 B 淋巴细胞功能亢进与 SLE 的发生关系最为密切, T 淋巴细胞功能的稳定在 SLE 自身免疫调节中发挥关键作用, 并贯穿整个发病过程<sup>[6]</sup>。既往将 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞主要划分成 Th1 细

表 3 3 组外周血 Th17、Treg 细胞、Th17/Treg 细胞比例及 ROR- $\gamma$ t、Foxp3 mRNA 表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 3 Ratio of Th17, Treg Cells, Th17/Treg Cells, and ROR in Peripheral Blood of Group 3- $\gamma$  Comparison of t, Foxp3 mRNA Expression

| 组 别      | 例数 | Th17 细胞 (%)              | Treg 细胞 (%)               | Th17/Treg 细胞比率            | ROR- $\gamma$ t mRNA       | Foxp3 mRNA               |
|----------|----|--------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|
| 健康对照组    | 40 | 1.23 ± 0.35              | 5.44 ± 1.72               | 0.33 ± 0.14               | 4.34 ± 1.67                | 3.85 ± 1.62              |
| non-LN 组 | 28 | 3.13 ± 0.83 <sup>a</sup> | 4.62 ± 0.89 <sup>a</sup>  | 0.59 ± 0.26 <sup>a</sup>  | 8.42 ± 3.89 <sup>a</sup>   | 2.66 ± 1.28 <sup>a</sup> |
| LN 亚组    | 40 | 3.82 ± 1.29 <sup>a</sup> | 3.42 ± 0.75 <sup>ab</sup> | 0.78 ± 0.41 <sup>ab</sup> | 12.23 ± 4.84 <sup>ab</sup> | 2.35 ± 0.84 <sup>a</sup> |
| F 值      |    | 12.345                   | 22.388                    | 26.674                    | 20.578                     | 7.782                    |
| P 值      |    | 0.015                    | <0.001                    | <0.001                    | <0.001                     | 0.003                    |

注: 与健康对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 non-LN 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。ROR- $\gamma$ t. 维甲酸相关核受体; Foxp3. 叉头翼状螺旋转录因子 P3。

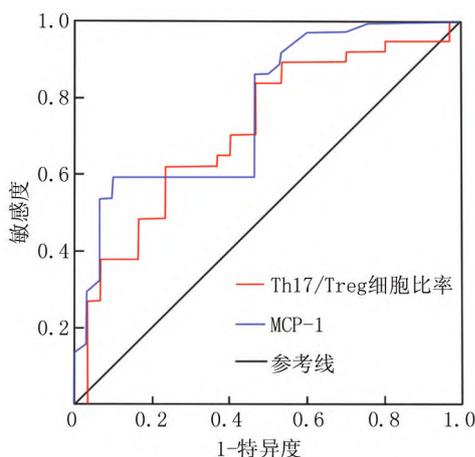


图 1 Th17/Treg 细胞比率及尿液 MCP-1 水平诊断 SLE 合并 LN 活动 ROC 曲线

Fig. 1 Th17/Treg cell ratio and urine MCP-1 level diagnosis SLE combined with LN activity ROC curve

胞和 Th2 细胞 2 个亚群,各分泌其特定的细胞因子,组成免疫细胞及细胞因子网络,通过多种不同生物学途径,发挥免疫学效应,Th1/Th2 比例及功能失衡在 SLE 发病机制中的作用已获得充分认可<sup>[7]</sup>。Th17 细胞和 Treg 细胞是近年来发现的两类不同于传统 Th1 细胞和 Th2 细胞的 CD4<sup>+</sup>T 细胞亚群,二者与自身免疫病的关系是近年的研究热点。

Th17 细胞在核转录因子 ROR- $\gamma$ t 的调控下,特异地分泌 IL-17,后者作为一种强效的前炎性细胞因子,可促进单核巨噬细胞、内皮细胞和间质细胞的募集、增殖与分化,并分泌 IL-6、IL-8 等多种炎性因子或趋化蛋白,使炎症反应级联效应放大,造成组织、器官免疫损伤,进而参与多种自身免疫性疾病的发生、发展。Treg 细胞亚群胞内特异性表达内源性转录因子 Foxp3,其细胞抑制表型和调节功能的发挥与 Foxp3 表达水平密切相关,Treg 细胞可控制前炎性 CD4<sup>+</sup>T 细胞的稳态增殖,增加 TGF- $\beta$ 、IL-4 和 IL-10 等具有抑炎作用细胞因子的分泌,对自身反应 T 细胞活化和增殖起负调控作用,故认为 Treg 细胞稳态的改变参与 SLE 的发病<sup>[8]</sup>。本结果表明,SLE 患者外周血 Th17 细胞、Treg 细胞的变化特点与国内外报道基本一致<sup>[9-10]</sup>。提示 SLE 患者 Treg 细胞免疫耐受功能减低,其抑制反应能力减弱,伴随 Th17 细胞数目增加及其炎症反应效应的增强。Schaier 等<sup>[11]</sup>研究表明,与健康对照组和非活动性 SLE 患者比较,处于病情活动期的 SLE 患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞的免疫抑制功能明显下降,且 Foxp3 mRNA 表达水平降低,后续体外研究表明,伴

随 Foxp3 mRNA 表达水平的下降,Treg 细胞对 CD4<sup>+</sup>效应 T 细胞的增殖和分泌功能的抑制效应明显减弱。本研究中 SLE 患者外周血 ROR- $\gamma$ t mRNA 表达量明显升高,伴随 Foxp3 mRNA 表达水平的降低,提示二者分别作为 Th17 细胞与 Treg 细胞分化必不可少的转录因子,其表达量的变化可能是 SLE 发病过程中炎症反应启动和发展的重要促进因素。进一步行相关性分析发现,SLE 患者外周血 Th17/Treg 细胞比率与 SLEDAI 评分呈正相关,提示检测患者 Th17 细胞及 Treg 细胞比例,可能对判定 SLE 病情活动具有提示意义。

LN 是 SLE 严重的并发症之一,肾脏病理学特点主要表现为免疫复合物沉积和炎性细胞浸润,回顾性临床研究提示<sup>[12-14]</sup>,几乎所有的 SLE 患者在病程不同阶段均表现出不同程度的肾脏损害。本研究总体结果显示,LN 患者 Treg 细胞比例的下降及 Th17/Treg 细胞比例的失衡程度较未合并肾损害的 SLE 患者更加明显。Wu 等<sup>[15]</sup>研究证实,Treg 细胞能有效抑制 BWF1 狼疮模型小鼠 B 细胞功能的活性,同时可减少抗 ds-DNA 抗体的产生,继而延缓狼疮性肾炎的发病。结合本研究结果推测,LN 患者体内 Treg 细胞比例的下降,可能诱导 PBMC 中 ROR- $\gamma$ t 调控功能增强,增加 Th17 细胞炎症反应效应及其对下游炎性细胞因子网络的调控作用。本研究中 LN 患者 Treg 细胞比例同 Foxp3 mRNA 表达水平,以及 Th17 细胞比例同 ROR- $\gamma$ t mRNA 表达水平并未表现出完全一致的变化,提示 Th17/Treg 细胞及其细胞因子网络在 LN 中作用的复杂性,本研究纳入病例数有限,且作为横断面研究,可能难以完全反映 Th17/Treg 细胞在 LN 发病机制中的作用。

MCP-1 是趋化因子 CC 亚家族的一员,主要由单核细胞、巨噬细胞和内皮细胞分泌。基础研究表明,MCP-1 可诱导黏附分子过度表达,使多种炎性细胞尤其是单核细胞、巨噬细胞在 LN 病变部位聚集,在 LN 肾脏炎症反应中发挥始动作用<sup>[16-17]</sup>。临床研究提示,SLE 患者血清 MCP-1 水平较正常对照人群显著增加,且与疾病活动度密切相关<sup>[18]</sup>。本研究结果表明,SLE 患者 MCP-1 水平较健康对照组明显增高,且在合并 LN 患者中增高更加明显,相关性分析提示 SLE 患者尿液 MCP-1 浓度与 SLEDAI 评分和 24 h 尿蛋白定量均呈正相关,提示其在 SLE 尤其是 LN 发病机制中的潜在促进作用。国内有研究发现,儿童 SLE 患者血清 MCP-1 表达水平不仅与总 SLEDAI 评分密切相关,可反映 SLE 患者的疾病活动状况,还能作为狼疮患儿早期肾损伤有效的预测指标<sup>[19]</sup>。本研究 ROC 曲线分析结果显示,Th17/Treg 细胞比率诊断 SLE 患者合并 LN

活动的 AUC 为 0.718, 尿液 MCP-1 水平对 SLE 合并 LN 活动诊断的 AUC 为 0.769, 二者均展现出较好的诊断价值, 提示 Th17/Treg 细胞比率和尿液 MCP-1 浓度监测, 可能作为 SLE 患者除 24 h 尿蛋白定量检测外便捷、有效的肾脏损害评估方式。此外, 本项研究表明, LN 患者 Th17/Treg 细胞比率与尿 MCP-1 呈正相关, 推测 SLE 患者体内 Th17/Treg 细胞比例失衡, 可能引起包括 MCP-1 在内的下游炎症细胞因子网络紊乱, 导致 LN 肾脏损害加重, 尚需更多的基础与临床研究证实。

总之, SLE 的发生是一个原因复杂、多因素共同参与的结果, 本研究提示 Th17/Treg 细胞比例失衡和尿液 MCP-1 水平的增加均可能参与 SLE 的发病, 并且与疾病整体活动度及 LN 的发生、发展关系密切, 患者尿液 MCP-1, 体内 Th17 细胞、Treg 细胞比例的测定有可能作为 SLE 病情监测的重要指标。

**利益冲突:**所有作者声明无利益冲突

**作者贡献声明**

郑雪娜:设计研究方案, 实施研究过程; 杨华强:资料搜集整理; 李博君:统计学分析; 章骏:提出研究思路

**参考文献**

[1] Hsieh SC, Tsai CY, Yu CL. Potential serum and urine biomarkers in patients with lupus nephritis and the unsolved problems [J]. *Open Access Rheumatol*, 2016, 19 (8): 81-91. DOI: 10.2147/OARRR.S112829.

[2] Osborne LM, Brar A, Klein SL. The role of Th17 cells in the pathophysiology of pregnancy and perinatal mood and anxiety disorders [J]. *Brain Behav Immun*, 2019, 76(1): 7-16. DOI: 10.1016/j.bbi.2018.11.015.

[3] Sharabi A, Tsokos GC. T cell metabolism: New insights in systemic lupus erythematosus pathogenesis and therapy [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2020, 16(2): 100-112. DOI: 10.1038/s41584-019-0356-x.

[4] Zhang W, Liu X, Zhu Y, et al. Transcriptional and posttranslational regulation of Th17/Treg balance in health and disease [J]. *Eur J Immunol*, 2021, 51(9): 2137-2150. DOI: 10.1002/eji.202048794.

[5] Fava A, Petri M. Systemic lupus erythematosus: Diagnosis and clinical management [J]. *J Autoimmun*, 2019, 96: 1-13. DOI: 10.1016/j.jaut.2018.11.001.

[6] Yang F, Lin J, Chen W. Post-translational modifications in T cells in systemic erythematosus lupus [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2021, 60(6): 2502-2516. DOI: 10.1093/rheumatology/keab095.

[7] Talaat RM, Mohamed SF, Bassyouni IH, et al. Th1/Th2/Th17/Treg cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: Correlation with disease activity [J]. *Cytokine*, 2015, 72(2): 146-153. DOI: 10.1016/j.cyt.2014.12.027.

[8] Tower C, Crocker I, Chirico D, et al. SLE and pregnancy: the potential role for regulatory T cells [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2011, 7(2): 124-128. DOI: 10.1038/nrrheum.2010.124.

[9] Yazdani MR, Aflaki E, Gholijani N. Inflammatory and T helper 17/regulatory T cells related cytokines balance in cutaneous lupus ery-

thematosus (CLE) [J]. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2020, 19(1): 9-17. DOI: 10.18502/ijaai.v19i1.2411.

[10] 宋广浩, 沈瀚, 宁明哲. IL-35 Th17/Treg 失衡在系统性红斑狼疮中的表达与意义 [J]. *安徽医学*, 2020, 41(12): 1440-1443. DOI: 10.3969/j.issn.1000-0399.2020.12.018.

[11] Schaier M, Gottschalk C, Kalble F, et al. The onset of active disease in systemic lupus erythematosus patients is characterised by excessive regulatory CD4<sup>+</sup>-T-cell differentiation [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2021, 39(2): 279-288. DOI: 10.55563/clinexprheumatol/cg29xj.

[12] 李浙萌. 细胞因子在系统性红斑狼疮中的研究进展 [J]. *疑难病杂志*, 2020, 19(11): 1174-1178. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.11.023.

Li ZM. Research progress of cytokines in systemic lupus erythematosus [J]. *Chin J Diffic and Compl Cas*, 2020, 19(11): 1174-1178. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.11.023.

[13] 李晓英, 杨丹丹, 黄辉, 等. 双重血浆置换治疗重症狼疮性肾炎合并急性肾损伤的效果及安全性研究 [J]. *疑难病杂志*, 2023, 22(1): 67-72. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2023.01.012.

Li XY, Yang DD, Huang H, et al. The efficacy and safety of double plasma exchange in the treatment of severe lupus nephritis with acute renal injury [J]. *Chin J Diffic and Compl Cas*, 2023, 22(1): 67-72. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2023.01.012.

[14] Morell M, Pérez-Cózar F, Marañón C. Immune-related urine biomarkers for the diagnosis of lupus nephritis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(13): 7143. DOI: 10.3390/ijms22137143.

[15] Wu D, Dong D, Bi X, et al. Cucurbitacin II b improved active chromatin-induced systemic lupus erythematosus via balancing the percentage of Th17 and Treg cells [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2021, 48(3): 329-336. DOI: 10.1111/1440-1681.13434.

[16] 张绍君, 李俊巧, 张永刚, 等. 系统性红斑狼疮患者血清 PS-PLA1、CCL19 水平与疾病活动度及免疫功能的相关性分析 [J]. *疑难病杂志*, 2020, 19(11): 1143-1146, 1156. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.11.014.

Zhang SJ, Li JQ, Zhang YG, et al. Correlation analysis of serum PS-PLA1 and CCL19 levels with disease activity and immune function in patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Chin J Diffic and Compl Cas*, 2020, 19(11): 1143-1146, 1156. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.11.014.

[17] Urrego-Callejas T, Alvarez SS, Arias LF, et al. Urinary levels of ceruloplasmin and monocyte chemoattractant protein-1 correlate with extra-capillary proliferation and chronic damage in patients with lupus nephritis [J]. *Clin Rheumatol*, 2021, 40(5): 1853-1859. DOI: 10.1007/s10067-020-05454-0.

[18] Moloi MW, Rusch JA, Omar F, et al. Urinary MCP-1 and TWEAK as non-invasive markers of disease activity and treatment response in patients with lupus nephritis in South Africa [J]. *Int Urol Nephrol*, 2021, 53(9): 1865-1873. DOI: 10.1007/s11255-020-02780-9.

[19] 王文芳, 庞春玉, 王绪松, 等. 系统性红斑狼疮患儿血清 IL-18、IL-23 及 MCP-1 水平变化及其临床意义 [J]. *国际检验医学杂志*, 2021, 42(1): 108-111. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2021.01.025.

(收稿日期: 2022-11-13)