doi:10.11659/jjssx.01E019004

·临床研究·

Tc17 细胞在炎症性肠病患者外周血中的检测及临床意义

陈 静[1],刘东擘[2],鲁 欣[1] (1.陆军军医大学第一附属医院消化内科,重庆 400038;2.陆军军医大学基础医学院生物化学教研室,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 检测炎症性肠病患者外周血中 Tc17 细胞的变化并分析其临床意义。**方法** 收集 20 例克罗恩病(CD)患者及 20 例溃疡性结肠炎(UC)患者的外周血,采用流式细胞术检测 Tc17 细胞的水平,另以 20 例健康人外周血作为正常对照。**结果** 与正常对照相比,CD 及 UC 患者外周血中 Tc17 细胞的比例均显著增加,差异具有统计学意义($P<0.05$),而 CD 组与 UC 组 Tc17 细胞水平比较差异无统计学意义($P>0.05$);CD 及 UC 患者活动期的 Tc17 细胞比例显著高于缓解期($P<0.05$),但 CD 组与 UC 组在活动期或缓解期的 Tc17 细胞水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 炎症性肠病患者外周血中 Tc17 细胞的比例显著增加,且与疾病的进展密切相关,监测其外周血 Tc17 细胞的水平有助于对疾病的活动度进行判断。

[关键词] 炎症性肠病;Tc17 细胞;外周血;溃疡性结肠炎;克罗恩病

[中图分类号] R574.4 [文献标识码] A [收稿日期] 2019-01-01

Detection and clinical significance of Tc17 cells in patients with inflammatory bowel disease

CHEN Jing[1],LIU Dong-bo[2],LU Xin[1] (1.Department of Gastroenterology,First Hospital Affiliated to Army Medical University,Chongqing 400038,China;2.Department of Biochemistry,School of Basic Medical Sciences,Army Medical University,Chongqing 400038,China)

Abstract: Objective To explore the frequencies of Tc17 cells level in the peripheral blood of patients with inflammatory bowel disease (IBD) and their clinical significance. **Methods** The peripheral blood of 20 Crohn's disease (CD) patients and 20 ulcerative colitis (UC) patients were collected in this study. The frequencies of Tc17 cells were analyzed by flow cytometry. The peripheral blood of 20 healthy donors was obtained as the control. **Results** Compared with healthy donors,the frequencies of Tc17 cells in CD and UC patients were significantly increased,the differences were significant($P<0.05$),but no statistical difference was observed between CD and UC group ($P>0.05$). Furthermore,the frequencies of Tc17 cells in active stage of CD and UC patients were also higher than those in remission stage ($P<0.05$),but there was no statistical difference between CD active stage and UC active stage or CD remission stage and UC remission stage ($P>0.05$). **Conclusion** The proportion of circulating Tc17 cells were increased in the IBD patients,which is closely related to the progression of IBD,monitoring Tc17 cells in the peripheral blood of IBD patients may aid the judgment of disease activity.

Keywords: inflammatory bowel disease; Tc17 cells; peripheral blood; ulcerative colitis; Crohn's disease

炎症性肠病(inflammatory bowel disease,IBD)是临床上一组以肠道炎症表现为主要特征的慢性炎症性疾病,其病因复杂,具体的发病机制仍未完全阐明[1]。已有的证据表明,基因、环境、免疫等多种因素共同参与 IBD 的发病[2-3],其中免疫因素,特别是 $CD4^+$ 辅助性 T 细胞(Th)介导的获得性免疫应答在 IBD 的发生发展中起着重要作用。早期研究认为 Th1/Th2 细胞应答失衡是 IBD 发病的重要环节[4],而后续的研究证实 Th17 细胞应答异常才是导致 IBD 发病的关键因素[5]。除了 Th17 细胞,研究发现一群 $CD8^+$ 细胞毒性 T 细胞亦可表达 IL-17,并被研究者命名为 Tc17 细胞,这群细胞在慢性鼻窦炎、自身免疫性疾病患者的炎症部位大量聚集,并与患者的疾病进展密切相关,提示 Tc17 细胞很可能参与炎症性疾病的病理性免疫应答[6-7]。然而,Tc17细胞是否参与了IBD的系统性免疫应答未见文献报道。因此,为了阐明 Tc17 细胞在 IBD 患者外周血中的应答及其临床意义,本研究收集 IBD 患者的外周血,分析 Tc17 细胞的水平并评价其与患者疾病活动度的关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集 2018 年 1 月到 2018 年 12 月于我院消化内科门诊和住院治疗的 40 例 IBD 患者外周血,患者的诊断参考 2012 年中华医学会消化病学分会制定的 IBD 诊断标准[8]。疾病的活动度评估采用 CD 活动指数(CD activity index,CDAI)和临床活动度指数(clinical activity index,CAI),其中 CD 患者 CDAI≥150 分为活动期,UC 患者 CDAI≥5 分为活动期。所有患者在采血前 1 个月未使用水杨酸制剂、糖皮质激素或免疫抑制剂进行治疗,同时收集 20 例体检健康人的外周血作为正常对照,各组受试者均对研究方案知情同意且性

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(B1402268)

别、年龄经 Fisher 概率检验法分析差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

表 1 各组受试者的临床资料

组别	n	男/女(例)	年龄(岁)
CD 活动期	11	5/6	41.2(21~68)
CD 缓解期	9	5/4	39.6(19~65)
UC 活动期	10	5/5	42.3(21~70)
UC 缓解期	10	4/6	40.8(18~63)
正常对照组	20	10/10	41.1(20~66)

1.2 材料

RPMI 1640 培养基购自美国 Hyclone 公司、胎牛血清购自美国 Gibco 公司,淋巴细胞分离液购自美国 GE Healthcare公司,0.01M 的 PBS 购自北京中杉金桥生物技术有限公司,APC-Cy7 标记的抗人 CD3 抗体和淋巴细胞刺激剂购自美国 BD Bioscience 公司,FITC 标记的抗人 CD8 抗体、PE 标记的抗人 IL-17 抗体和PE-Cy7标记的抗人 IFN-γ 抗体购自美国 Biolegend 公司,细胞固定通透剂购自美国 eBioscience 公司。实验所用仪器:流式细胞仪 BD Canto II 购自美国 BD Bioscience公司。

1.3 方法

采集患者和体检健康人的外周血 2 mL 到肝素抗凝管中并尽快运回实验室,全血细胞用 PBS 稀释后经淋巴细胞分离液进行密度梯度离心,收集中间白膜层细胞,然后按照每孔 5×10^5 个细胞铺于 96 孔板中,加入淋巴细胞刺激剂刺激 5 h,随后收集细胞加入 CD3 抗体和 CD8 抗体避光染色 30 min,PBS 清洗 2 次后加入固定通透剂孵育 20 min,离心后加入 IL-17 和 IFN-γ 抗体继续染色 30 min,PBS 洗涤后上机进行检测。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 16.0 软件进行数据处理和统计学分析,数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,2 组之间的比较采用独立样本 t 检验,多组内的比较采用单因素方差分析,$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

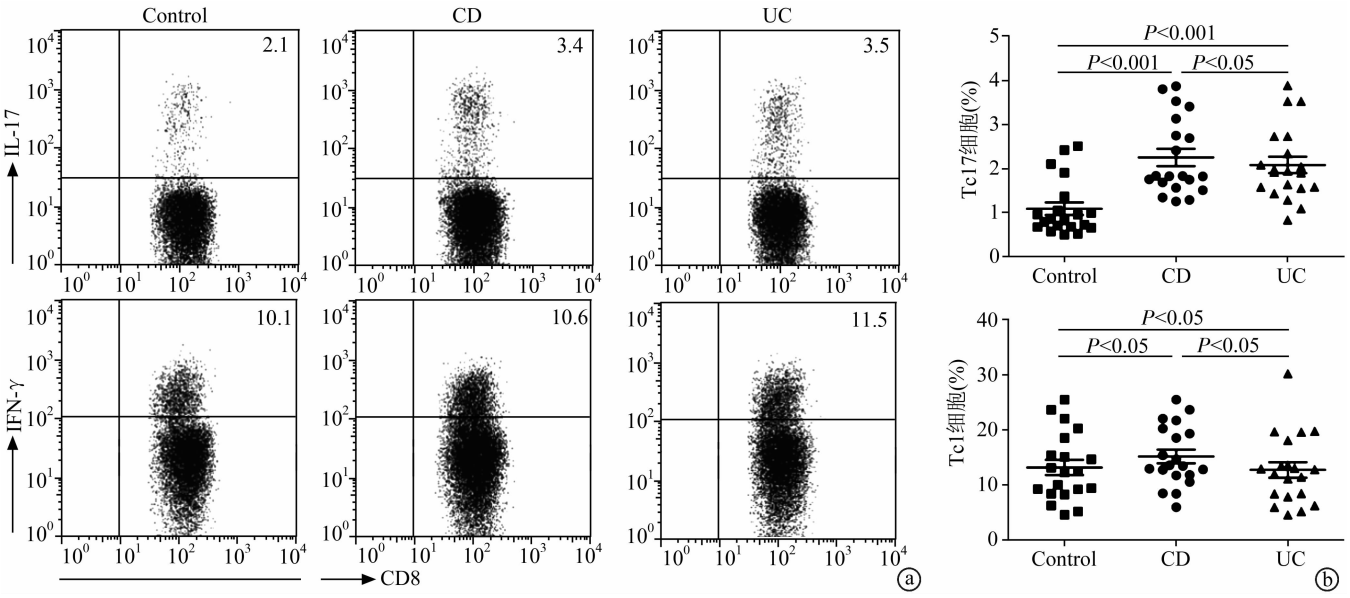
2 结果

2.1 IBD 患者和健康人外周血 Tc17 细胞的比较

流式细胞术检测结果显示:与正常对照相比,CD 及UC 患者外周血中 Tc17 细胞的比例显著增加(CD *vs.* Control,$t=4.695$;UC *vs.* Control,$t=4.007$,$P<0.001$)差异有统计学意义,而 Tc1 细胞的比例则差异无统计学意义(CD *vs.* Control,$t=1.055$;UC *vs.* Control,$t=-0.240$;$P>0.05$),见图 1;进一步利用细胞圈门分析 IL-17 与 IFN-γ 在 $CD8^+$T 细胞的共表达情况,结果显示 $CD8^+IL\text{-}17^+IFN\text{-}\gamma^-$ T 细胞在 CD 及 UC 患者外周血中的比例均显著高于正常人(CD *vs.* Control,$t=5.441$;UC *vs.* Control,$t=4.600$;$P<0.001$);而 $CD8^+IL\text{-}17^+IFN\text{-}\gamma^+$(CD *vs.* Control,$t=1.260$;UC *vs.* Control,$t=0.800$)以及 $CD8^+IL\text{-}17^-IFN\text{-}\gamma^+$(CD *vs.* Control,$t=1.238$;UC *vs.* Control,$t=0.828$)T 细胞的比例差异无统计学意义($P>0.05$),见图 2。此外,所有的细胞亚群在 CD 组与 UC 组之间比较差异均无统计学意义(Tc17,$t=0.688$;Tc1,$t=1.295$;$CD8^+IL\text{-}17^+IFN\text{-}\gamma^-$,$t=0.841$;$CD8^+IL\text{-}17^+IFN\text{-}\gamma^+$,$t=0.460$;$CD8^+IL\text{-}17^-IFN\text{-}\gamma^+$,$t=0.410$;$P>0.05$)。

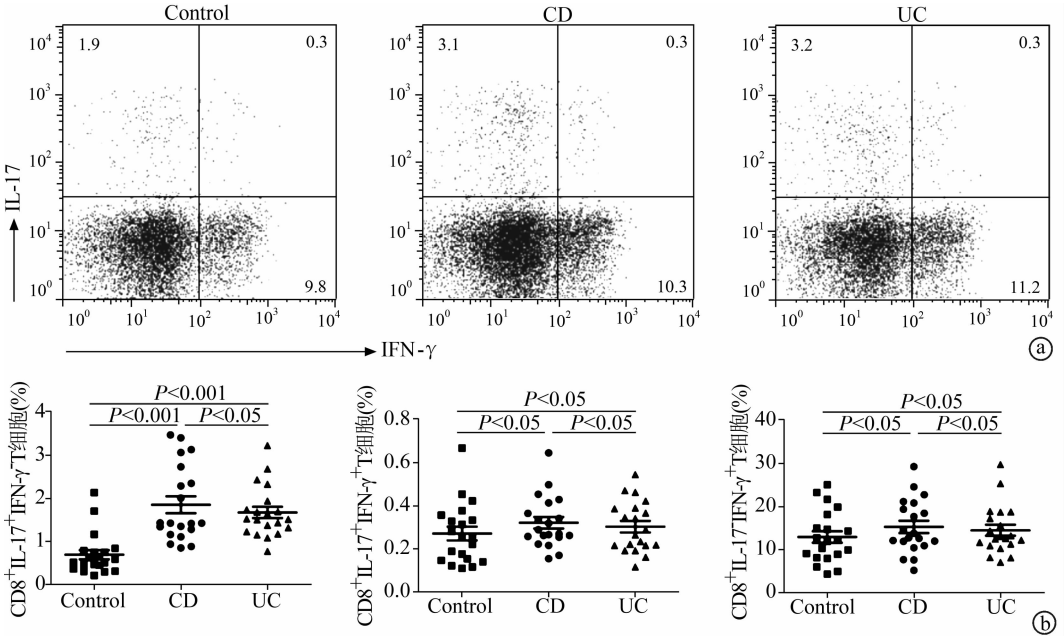
2.2 IBD 患者外周血中 Tc17 细胞水平与疾病活动度

根据 IBD 患者的疾病活动度评分,将 IBD 患者分为活动期和缓解期,然后比较不同分期患者间的 Tc17 细胞水平差异。结果显示:CD 及 UC 活动期患者外周



a:健康人(Control)、CD 患者及 UC 患者外周血中 $CD8^+$T 细胞表达 IL-17 及 IFN-γ 的流式染色代表图;b:统计学分析

图 1 IBD 患者与健康人外周血中 Tc17 细胞以及 Tc1 细胞的比较



a:流式细胞术检测外周血 $CD8^+$ T 细胞中 IL-17 与 IFN-γ 的共表达;b:健康人(Control)、CD 及 UC 患者及外周血中 $CD8^+IL\text{-}17^+IFN\text{-}\gamma^-$、$CD8^+IL\text{-}17^+IFN\text{-}\gamma^+$ 及 $CD8^+$ $IL\text{-}17^-IFN\text{-}\gamma^+$ 细胞的统计学分析

图 2 IBD 患者及健康人外周血中 Tc17 细胞及 Tc1 细胞亚群的分析比较

血中 Tc17 细胞的水平均显著高于 CD、UC 缓解期患者[(CD 活动期 *vs.* CD 缓解期,$t=4.705$; UC 活动期 *vs.* UC 缓解期,$t=4.659$,差异有统计学意义($P<0.05$)];而 Tc1 细胞的水平在活动期与缓解期的比较差异无统计学意义[(CD 活动期 *vs.* CD 缓解期,$t=1.093$;UC 活动期 *vs.* UC 缓解期,$t=0.828$;$P>0.05$)];此外,CD 活动期与 UC 活动期($t=0.445$)、CD 缓解期与 UC 缓解期($t=-0.501$)之间的 Tc17 细胞水平比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

表 2 各组外周血中 Tc17 及 Tc1 细胞的水平比较($\bar{x}\pm s$,%)

组别	n	Tc17 细胞	Tc1 细胞
CD 活动期	11	3.1±0.2*	14.8±1.2
CD 缓解期	9	1.5±0.1	13.1±1.6
UC 活动期	10	2.7±0.3*	14.2±1.1
UC 缓解期	10	1.6±0.2	12.7±1.9

*:与缓解期比较,$P<0.05$

3 讨 论

IBD 作为肠道的慢性炎症性疾病,在我国乃至全球范围引起广泛关注和重视。尽管目前 IBD 的治疗手段多样,但疗效仍不理想[9]。国内外研究已经证实 T 细胞介导的炎症免疫应答在 IBD 的发病过程中起着至关重要的作用,因此,深入探讨 IBD 的免疫学调控机制可为其临床的免疫学干预和治疗奠定理论基础。

已有的研究显示,Th17 细胞亚群及其产生的细胞因子 IL-17 在 IBD 患者的炎性部位及外周血中大量增加,同时小鼠模型证实 IL-17 缺失或抗体阻断能够有效减缓 IBD 的进程,表明 Th17 细胞来源的 IL-17 参与调控了 IBD 的发生发展[10-11]。随着研究的深入,发现除了 Th17 细胞,$CD8^+$ T 细胞也可大量产生 IL-17,由此,研究者将其命名为 Tc17 细胞。近年来,Tc17 细胞作为一个独立的 $CD8^+$ T 细胞亚群,在感染性疾病、自身免疫性疾病以及慢性炎症等疾病中发挥重要作用[12]。有文献报道在 IBD 患者的黏膜组织,Tc17 细胞的比例显著高于健康人,提示 Tc17 细胞亦参与介导了 IBD 组织局部的病理性免疫应答[13]。本研究进一步分析 Tc17 细胞在 IBD 患者外周血中的应答水平,发现 Tc17 细胞在 CD 和 UC 患者中的比例显著高于正常人,且 CD 和 UC 患者活动期 Tc17 细胞的水平明显高于缓解期,由此提示 Tc17 细胞不仅在 IBD 肠组织局部参与致病,而且介导了患者的系统性免疫应答,并与其疾病的活动程度有关。

除了 Tc17 细胞,本研究还发现 CD 和 UC 患者外周血中的 Tc1 细胞比例并无明显改变,且其在疾病活动期的水平也与缓解期相当;然而,文献报道 Tc1 细胞在患者炎性肠组织中的水平却显著增加[14],由此提示 Tc1 细胞主要介导 IBD 患者局部组织的炎性反应,并未参与调控其系统性免疫应答。研究表明,Tc1 及 Tc17 细胞的水平改变受到细胞因子微环境调控的影响;IL-1β、IL-6 以及 IL-23 可单独或者联合诱导 $CD8^+$ T 细胞分化为 Tc17 细胞,而 IL-12 则促进 Tc1 细胞的分化[15]。在 IBD 患者外周血及炎性肠组织中,已有研究证实这 4 个细胞因子的水平均显著增加,提示 IBD

患者外周血微环境可同时启动 Tc17 和 Tc1 细胞的分化,但由于 IL-1β、IL-6 及 IL-23 的协同效应远高于 IL-12 的单独作用,从而促使更多的 $CD8^+$ T 细胞分化为 Tc17 细胞,而 Tc1 细胞的水平则保持相对稳定[16-17]。

目前,外周血 Tc17 细胞介导 IBD 发生发展的具体机制尚不清楚。文献报道 Tc17 细胞可高表达趋化因子受体 CCR6,而研究发现 IBD 患者肠组织中上皮细胞表达趋化因子 CCL20 的水平显著上调,基于 CCL20 作为 CCR6 的配体介导 CCR6 阳性免疫细胞的趋化,提示 IBD 患者外周血中的 Tc17 细胞有可能经 CCL20/CCR6 轴趋化至炎性组织局部,进而通过分泌效应因子 IL-17 引起肠组织的病理性炎症应答,最终导致患者发病[18-21]。此外,IL-17 还具有反馈性诱导包括 CCL20 等趋化因子释放的能力,可进一步趋化外周的 Tc17 细胞进入肠组织,从而促使 IBD 患者疾病的慢性持续化进程[22-24]。

综上,Tc17 细胞在 IBD 患者外周血中的水平显著增加,并与疾病的活动程度密切相关,进一步阐明外周 Tc17 细胞介导 IBD 患者的病理性免疫应答机制,将为临床设计 IBD 的免疫治疗方案提供新的实验证据。

[参考文献]

[1] Gecse KB, Vermeire S. Differential diagnosis of inflammatory bowel disease: imitations and complications [J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2018, 3(9): 644 - 653. doi: 10.1016/S2468 - 1253(18)30159 - 6.

[2] Ananthakrishnan AN, Bernstein CN, Iliopoulos D, et al. Environmental triggers in IBD: a review of progress and evidence [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2018, 15(1): 39 - 49. doi: 10.1038/nrgastro.2017.136.

[3] Kelsen JR, Baldassano RN, Artis D, et al. Maintaining intestinal health: the genetics and immunology of very early onset inflammatory bowel disease[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2015, 1(5): 462 - 476. doi: 10.1016/j.jcmgh.2015.06.010.

[4] Li J, Ueno A, Fort Gasia M, et al. Profiles of lamina propria T helper cell subsets discriminate between ulcerative colitis and Crohn′s disease [J]. Inflamm Bowel Dis, 2016, 22(8): 1779 - 1792. doi: 10.1097/MIB.0000000000000811.

[5] Ueno A, Jeffery L, Kobayashi T, et al. Th17 plasticity and its relevance to inflammatory bowel disease [J]. J Autoimmun, 2018, 87: 38 - 49. doi: 10.1016/j.jaut.2017.12.004.

[6] Ma J, Shi LL, Deng YK, et al. CD8(+) T cells with distinct cytokine-producing features and low cytotoxic activity in eosinophilic and non-eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps [J]. Clin Exp Allergy, 2016, 46(9): 1162 - 1175. doi: 10.1111/cea.12758.

[7] Srenathan U, Steel K, Taams LS. IL-17+ $CD8^+$ T cells: Differentiation, phenotype and role in inflammatory disease [J]. Immunol Lett, 2016, 178: 20 - 26. doi: 10.1016/j.imlet.2016.05.001.

[8] 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]. 中华内科杂志, 2012, 51(10): 818 - 831. doi: 10.3760/cma.j.issn.0578 - 1426.2012.10.024

[9] Weisshof R, El Jurdi K, Zmeter N, et al. Emerging therapies for inflammatory bowel disease [J]. Adv Ther, 2018, 35(11): 1746 - 1762. doi: 10.1007/s12325 - 018 - 0795 - 9.

[10] Hohenberger M, Cardwell LA, Oussedik E, et al. Interleukin-17 inhibition: role in psoriasis and inflammatory bowel disease [J]. J Dermatolog Treat, 2018, 29(1): 13 - 18. doi: 10.1080/09546634.2017.1329511.

[11] Yamamoto-Furusho JK. Inflammatory bowel disease therapy: blockade of cytokines and cytokine signaling pathways [J]. Curr Opin Gastroenterol, 2018, 34(4): 187 - 193. doi: 10.1097/MOG.0000000000000444.

[12] Liang Y, Pan HF, Ye DQ. Tc17 cells in immunity and systemic autoimmunity [J]. Int Rev Immunol, 2015, 34(4): 318 - 331. doi: 10.3109/08830185.2014.954698.

[13] Tom MR, Li J, Ueno A, et al. Novel $CD8^+$ T-Cell subsets demonstrating plasticity in patients with inflammatory bowel disease [J]. Inflamm Bowel Dis, 2016, 22(7): 1596 - 1608. doi: 10.1097/MIB.0000000000000848.

[14] Li J, Yan Y, Meng Z, et al. Microscopic colitis evolved into inflammatory bowel diseases is characterized by increased Th1/Tc1 cells in colonic mucosal lamina propria [J]. Dig Dis Sci, 2017, 62(10): 2755 - 2767. doi: 10.1007/s10620 - 017 - 4636 - 5.

[15] Mittrücker HW, Visekruna A, Huber M. Heterogeneity in the differentiation and function of $CD8^+$ T cells [J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2014, 62(6): 449 - 458. doi: 10.1007/s00005 - 014 - 0293 - y.

[16] Guan Q, Zhang J. Recent advances: the imbalance of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease [J]. Mediators Inflamm, 2017, 2017: 4810258. doi: 10.1155/2017/4810258.

[17] Moschen AR, Tilg H, Raine T. IL-12, IL-23 and IL-17 in IBD: immunobiology and therapeutic targeting [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 16(3): 185 - 196. doi: 10.1038/s41575 - 018 - 0084 - 8.

[18] Gartlan KH, Markey KA, Varelias A, et al. Tc17 cells are a proinflammatory, plastic lineage of pathogenic $CD8^+$ T cells that induce GVHD without antileukemic effects [J]. Blood, 2015, 126(13): 1609 - 1620. doi: 10.1182/blood - 2015 - 01 - 622662.

[19] Skovdahl HK, Granlund Av, Østvik AE, et al. Expression of CCL20 and its corresponding receptor CCR6 is enhanced in active inflammatory bowel disease, and TLR3 Mediates CCL20 expression in colonic epithelial cells [J]. PLoS One, 2015, 10(11): e0141710. doi: 10.1371/journal.pone.0141710.

[20] Shi T, He Y, Sun W, et al. Respiratory syncytial virus infection compromises asthma tolerance by recruiting interleukin-17A-producing cells via CCR6-CCL20 signaling [J]. Mol Immunol, 2017, 88: 45 - 57. doi: 10.1016/j.molimm.2017.05.017.

[21] Cremonesi E, Governa V, Garzon JFG, et al. Gut microbiota modulate T cell trafficking into human colorectal cancer [J]. Gut, 2018, 67(11): 1984 - 1994. doi: 10.1136/gutjnl-2016 - 313498.

[22] 胡 英, 黄 英, 杨永红. IL-17A 诱导非小细胞肺癌 A549 细胞分泌 CXCL12 的机制研究[J]. 局解手术学杂志, 2017, 26(1): 9 - 12. doi: 10.11659/jjssx.09E016017.

[23] Wu NL, Huang DY, Tsou HN, et al. Syk mediates IL-17-induced CCL20 expression by targeting Act1-dependent K63-linked ubiquitination of TRAF6 [J]. J Invest Dermatol, 2015, 135(2): 490 - 498. doi: 10.1038/jid.2014.383.

[24] Shinjo T, Iwashita M, Yamashita A, et al. IL-17A synergistically enhances TNFα-induced IL-6 and CCL20 production in 3T3-L1 adipocytes [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 477(2): 241 - 246. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.06.049.

(编辑:魏 源)