

外周血辅助性 T 细胞 17、调节性 T 细胞水平及其比值变化可评估急性脑出血患者外周炎性反应程度

刘洁 黄婧 尚海延 许康*

长江航运总医院神经内科,湖北武汉 430000

摘要 目的:观察急性脑出血(ICH)患者外周血辅助性 T 细胞 17(Th17)和调节性 T 细胞(Treg)的表达及 Th17/Treg 比值的动态变化过程,并探讨其临床意义。方法:选取 40 例急性 ICH 患者为实验组,选取 40 例同期健康体检者为对照组。入院后行美国国立卫生研究院卒中量表(NIHSS)评分,依据头部 CT 影像估算血肿体积并按出血部位分为脑叶组 18 例和基底节组 22 例,于住院第 1、4、7 天分别检测外周血中 Th17 及 Treg 占 CD4⁺T 细胞的比例,并计算 Th17/Treg 比值,分析其在 ICH 后的动态演变过程,并探讨 Th17、Treg 及 Th17/Treg 与疾病严重程度、病灶出血位置的关系。结果:ICH 组第 1、4 天外周血 Th17 比例逐渐降低,且高于对照组($P < 0.05$),第 7 天与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。外周血 Treg 比例在第 1 天明显低于对照组($P < 0.05$),第 4 天 Treg 比例恢复至对照组水平($P > 0.05$);第 7 天 Treg 比例虽有持续增长之势,但与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。外周血 Th17/Treg 比值在第 1、4 天高于对照组($P < 0.05$),第 7 天恢复至对照组水平($P > 0.05$)。第 1 天外周血 Th17 比例及 Th17/Treg 分别与入院 NIHSS 评分呈正相关($r = 0.496, 0.581, P < 0.05$),与出血体积也呈正相关($r = 0.378, 0.500, P < 0.05$),Treg 比例与 NIHSS 评分、出血体积呈负相关($r = -0.377, -0.357, P < 0.05$)。在不同病灶出血位置分组(脑叶出血组和基底节出血组)之间 Th17、Treg 比例及 Th17/Treg 均没有明显统计学差异($P > 0.05$)。结论:外周血 Th17、Treg 比例和 Th17/Treg 的演变可以用于评估 ICH 后外周炎性反应;且其与出血体积和神经功能缺损密切相关,可能与出血位置无关。

关键词 脑出血; 辅助性 T 细胞 17; 调节性 T 细胞; 辅助性 T 细胞 17/调节性 T 细胞

中图分类号 R743.34 文献标识码 A DOI 10.11768/nkjwzzz20230110

Variation of peripheral blood T helper cell 17, regulatory T cells and their ratio can be used to evaluate peripheral inflammatory response on patients with acute intracranial hemorrhage LIU Jie, HUANG Jing, SHANG Hai-yan, XU Kang*.

Department of Neurology, General Hospital of the Yangtze River Shipping, Hubei Wuhan 430000, China

Corresponding author: XU Kang, E-mail: 1143296785@qq.com

Abstract Objective: To explore dynamic variation and significance of peripheral blood T helper cell 17 (Th17), regulatory T cells (Treg) and the ratio of Th17/Treg in patients with acute intracranial hemorrhage (ICH). Methods: A total of 40 patients with ICH were assigned as the case group, and 40 physical examinees at the same time were selected as the control group. National Institute of Health stroke scale (NIHSS) scores were evaluated on admission. Based on hematoma volume and its locus through CT images, 40 patients were divided into lobar hemorrhage group ($n = 18$) and basal ganglia hemorrhage group ($n = 22$). On the 1st, 4th, and 7th day after hospitalization, the proportions of Th17 and Treg in CD4⁺T cells in peripheral blood were detected and their ratios were calculated. The dynamic variation was investigated. In addition, The correlations between Th17, Treg and Th17/Treg and severity of ICH and locus of hemorrhage were analyzed, respectively. Results: On the 1st and 4th day, the proportion of Th17 in ICH group gradually decreased but was still higher than that in control group ($P < 0.05$). On the 7th day, there was no statistically significant difference between ICH group and control group ($P > 0.05$). The proportion of Treg in ICH group was significantly lower than that in the control group on day 1 ($P < 0.05$). There was no significant difference in the proportion of Treg between two group groups on the day 4 and 7 ($P > 0.05$). The Th17/Treg ratio on the 1st and 4th day in ICH group was significantly higher than in control group ($P < 0.05$), and it went down to control group ($P > 0.05$) on the day 7. The expression of Th17 and Th17/Treg ratio on the day 1 in case group were positively correlated with the NIHSS score ($r = 0.496, 0.581, P < 0.05$), and also positively correlated with the hematoma volume ($r = 0.378, 0.500, P < 0.05$). The proportion of Treg was negatively correlated with NIHSS score and hematoma volume ($r = 0.377, 0.357, P < 0.05$). There was no significant difference in Th17, Treg and Th17/Treg between lobar hemorrhage group and basal ganglia hemorrhage group ($P > 0.05$). Conclusion: Variation of Th17, Treg and Th17/Treg ratio in peripheral blood can be used to evaluate peripheral inflammatory response after ICH, which may be closely related to hematoma volume and neurological deficit, and is less likely to associate with locus of hemorrhage.

Key word Intracranial hemorrhage; T helper cell 17; Regulatory T cell; T helper cell17/regulatory T cell

* 通信作者:许康,E-mail:1143296785@qq.com,湖北省武汉市江岸区惠济路5号

脑出血(intracranial hemorrhage, ICH)是一种发病率和死亡率极高的脑卒中类型,30d 死亡率为 40%,并且大多数幸存者在 ICH 后遗留有严重的神经功能障碍,影响其日常生活^[1]。目前研究认为,除了血肿形成的原发性脑损伤外,ICH 后的继发性炎性损伤与疾病的进展和严重程度密切相关^[2]。辅助性 T 细胞 17(T helper cell 17, Th17)和调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)是重要的 CD4⁺ T 淋巴细胞亚型,它们的作用相互关联又彼此抑制,两者的平衡状态侧面反映了炎性反应损伤的进展状态^[3,4]。本研究动态监测 ICH 患者初期外周血 Th17、Treg 占 CD4⁺ T 细胞的比例及 Th17/Treg 比值变化,探讨它们在病程进展中的临床意义。

资料与方法

一般资料 纳入 2020 年 1 月-2020 年 8 月长江航运总医院住院治疗的自发性 ICH 患者 40 例(男 25,女 15);年龄 35~77 岁,平均(56.9±10.6)岁。纳入标准:①符合《中国脑出血诊治指南 2014》^[5]诊断标准,并经头部 CT 明确诊断;②发病 12 h 内入院;③首次发病。排除标准:①脑室、脑干、小脑出血;②出血量>30 mL 或行外科手术干预;③合并心肌梗死、严重肝肾疾病、肿瘤、血液系统及自身免疫性疾病;④4 周内存在骨折、手术,或服用抗炎药物或免疫抑制剂。对照组为同期健康体检者,共 40 例(男 22,女 18);年龄 33~73 岁,平均(55.9±8.9)岁,均排除心脑血管疾病、肿瘤、内分泌疾病及免疫系统疾病,近 4 周内无感染、骨折外伤、手术,未服用抗生素及免疫抑制剂。2 组在性别和年龄方面比较,差异无统计学意义(P 均>0.05)。本研究经医院伦理委员会批准,患者均知情并签署同意书。

方法 ICH 患者入院后根据美国国立卫生研究院卒中量表(National Institute of Health stroke scale, NIHSS)进行神经功能缺损评分,并依据头部 CT 影像的出血部位分为脑叶组 18 例和基底节组 22 例,进一步采用多田公式^[6](长×宽×CT 扫描阳性层数/2)计算出血体积。所有患者给予常规治疗,于住院后第 1、4、7 天清晨空腹采用 EDTA 抗凝真空管收取外周肘静脉血 4 mL,在 6 h 内分别进行流式细胞术检测 Th17、Treg 细胞比例,并计算其比值 Th17/Treg。

主要试剂和设备 白细胞刺激阻断剂(含有离子霉素、佛波醇酯、蛋白转运抑制剂)、Anti-IL-17A-PE 抗体、Anti-CD127-PE-Cy7 抗体、破膜固定试剂盒

均来自美国 BD 公司。Anti-CD4-FITC 及 Anti-CD25-PE 抗体来自美国 Biolegend 公司。Epics-XL 流式细胞仪、OptiLyse C 溶血素均购自美国 Beckman Coulter 公司。

Th17 的检测 从真空采血管中取新鲜抗凝全血 200 μ L 与 200 μ L PRMI 1 640 培养液混匀,加入白细胞刺激阻断剂 1 μ L 置于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中刺激培养 5 h^[7];加入 Anti-CD4-FITC 5 μ L,室温避光孵育 20 min;加入免洗溶血素,室温避光孵育 10 min 后;加入 1 mL PBS,混匀继续静置 5 min,以 1 500 转/min 离心 5 min,去除上清液;加入破膜固定剂 500 μ L 后避光 20 min,离心去上清液。加入缓冲液 Wash buffer 2 mL,室温避光静置 10 min,再离心去上清液。加 Wash buffer 100 μ L,加 Anti-IL17A-PE 20 μ L,室温避光孵育 30 min。加 Wash buffer 2 mL,洗涤离心去上清液,加入 0.5 mL PBS 重悬细胞,应用流式细胞仪,以淋巴细胞群设门,圈出的 CD4⁺ IL-17A⁺ 细胞为 Th17 细胞。

Treg 的检测 在流式管中加入 Anti-CD4-FITC、Anti-CD25-PE 及 Anti-CD127-PE-Cy7 各 5 μ L;再加入新鲜全血 100 μ L,混匀后避光孵育 20 min;加入 OptiLyse C 溶血素 0.5 mL,混匀,避光孵育 10 min;再加入 1 mL PBS,避光静置 5 min,以 1 500 转/min 离心 5 min 后倒掉上清液,加入 0.5 mL PBS 重悬细胞,采用流式细胞仪分选,首先对淋巴细胞群设门,再进一步圈出 CD4⁺ CD25⁺ CD127 low T 细胞代表 Treg 细胞^[8]。

统计学分析 采用 SPSS 21.0 统计学软件,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验,用 Pearson 进行相关性分析(相关系数用 r 表示)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

ICH 组早期外周血 Th17、Treg 的表达及 Th17/Treg 比值动态变化 ICH 组第 1、4 天外周血 Th17 比例逐渐降低,且高于对照组($P < 0.05$);到第 7 天患者外周血 Th17 比例与对照组比较,差异无统计学意义($P = 0.097$)。外周血 Treg 比例在第 1 天明显低于对照组($P < 0.05$),第 4 天恢复至对照组水平($P = 0.633$);第 7 天虽有持续增长之势,但与对照组比较,差异无统计学意义($P = 0.09$)。ICH 患者外周 Th17/Treg 比值在第 1、4 天高于对照组(P 均<0.05),第 7 天 Th17/Treg 恢复至对照组水平($P = 0.588$),见表 1。

表 1 ICH 组外周血 Th17、Treg 水平及 Th17/Treg 比值变化($\bar{x} \pm s$)

组别	例	时间	Th17(%)	Treg(%)	Th17/Treg
ICH 组	40	第 1 天	8.86 ± 3.56 *	2.66 ± 1.02 *	3.52 ± 1.59 *
		第 2 天	7.54 ± 2.80 *	3.10 ± 1.02	2.63 ± 1.08 *
		第 3 天	5.14 ± 0.96	3.69 ± 1.14	1.43 ± 0.39
对照组	40		4.64 ± 1.60	3.22 ± 1.28	1.50 ± 0.67

注:与对照组比较,* $P < 0.05$

ICH 组外周血 Th17、Treg 水平及 Th17/Treg 比值与 NIHSS 评分、出血体积的相关性分析 ICH 患者发病第 1 天外周血 Th17 比例及 Th17/Treg 分别与入院 NIHSS 评分呈正相关($r = 0.496, 0.581, P$ 均 < 0.05),Treg 比例与 NIHSS 评分呈负相关($r = -0.377$,均 < 0.05);外周血 Th17、Th17/Treg 与出血体积呈正相关($r = 0.378, 0.500, P$ 均 < 0.05),Treg 比例与出血体积呈负相关($r = -0.357, P$ 均 < 0.05),见图 1。

ICH 脑叶组和基底节组发病第 1 天外周血 Th17、Treg 细胞水平及 Th17/Treg 比值的比较 ICH 患者发病第 1 天外周血 Th17、Treg 水平及 Th17/Treg 比值在不同病灶出血位置(脑叶出血组和基底

节出血组)之间没有明显差异(P 均 > 0.05),见表 2。

讨 论

ICH 引发的脑损伤病理机制包括脑实质的出血压迫、血肿毒性反应、兴奋性氨基酸毒性作用、氧化应激以及炎症反应等,其中炎症反应是造成 ICH 继发性脑损伤的重要决定因素^[9]。血肿刺激外周免疫细胞失衡,并使其分泌大量炎性细胞因子,进一步渗透到病灶处诱导脑水肿发生,最终导致大量神经细胞死亡^[10]。

Th17 是 CD4⁺ T 淋巴细胞亚群,可以促进外周炎症细胞向中枢神经系统浸润,并高表达炎性因子

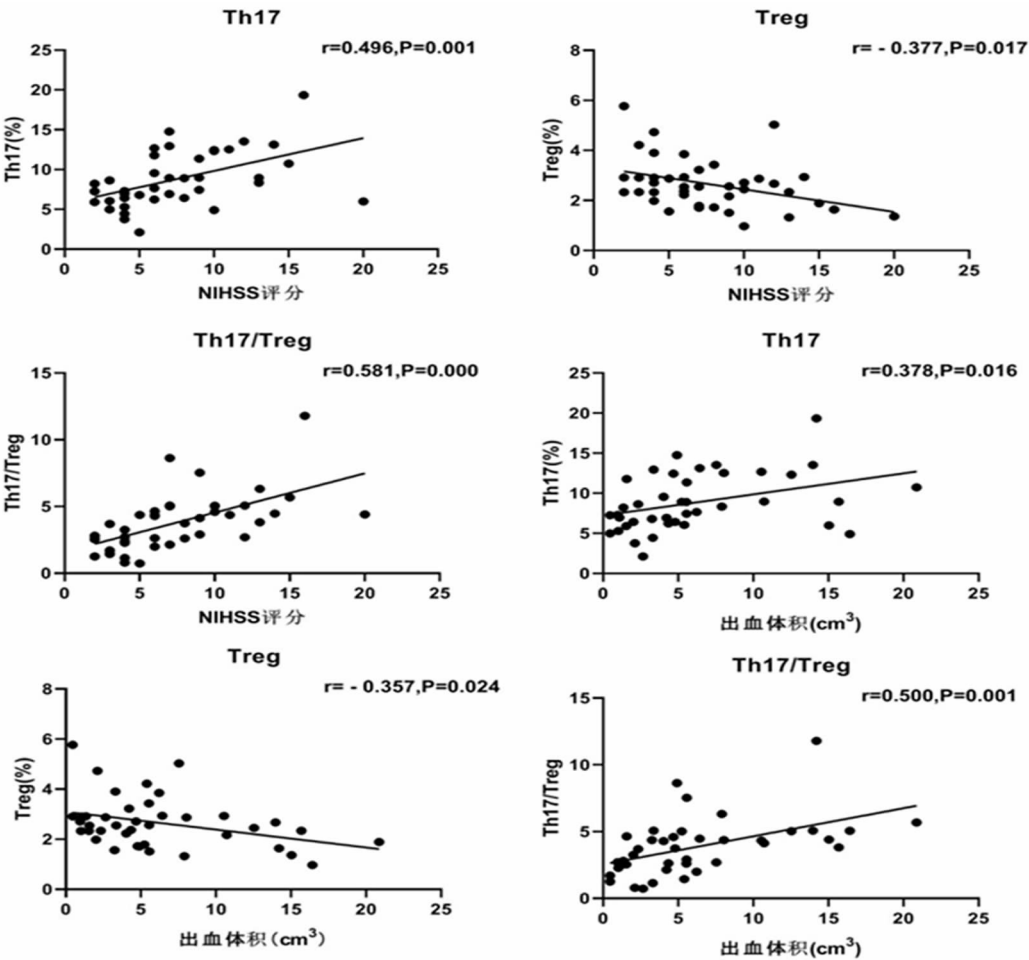


图 1 ICH 组发病第 1 天外周血 Th17、Treg 水平及 Th17/Treg 比值分别与 NIHSS 评分、出血体积的相关性分析

表 2 脑叶出血组和基底节出血组发病第 1 天外周血 Th17、Treg 细胞水平及 Th17/Treg 比值的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例	Th17(%)	Treg(%)	Th17/Treg
脑叶出血组	18	7.75 ± 3.26	2.89 ± 1.33	3.21 ± 1.73
基底节出血组	22	9.39 ± 2.94	2.43 ± 0.52	3.83 ± 1.41
t 值		1.651	1.433	1.213
P 值		0.107	0.165	0.233

粒酶 B、白介素 (IL)-17 等,破坏血脑屏障,加重神经元损伤^[11]。本研究发现,ICH 后的第 1 天 Th17 细胞比例表达最高,并与出血体积和神经功能缺损呈正相关,此后第 4 天有所下降,第 7 天持续降至对照组水平。而徐瑞等^[12,13]研究显示外周血中的 Th17 细胞在 ICH 第 7 天仍能保持相对高的比例,造成结果差异的原因可能是 ICH 出血体积影响了炎性水肿的峰值及其演变的时间过程。本实验保留了出血量小的轻症 ICH 患者,总体炎症反应相对弱,Th17 达峰值后,1 周内迅速恢复。

与 Th17 相反,Treg 可以直接抑制 T 细胞活化或释放免疫抑制性细胞因子,如:转化生长因子-β (transforming growth factor-β,TGF-β)、IL-10,从而抑制炎症反应并维持免疫稳态^[14]。研究发现小鼠静脉注射 Treg 后,可以显著改善 ICH 后的神经功能缺陷和血脑屏障通透性,并能减小血肿体积^[15]。本研究显示,外周血中 Treg 细胞比例在 ICH 后第 1 天最低,并与神经功能缺损评分和出血体积呈负相关,第 4 天 Treg 恢复到对照组水平,第 7 天有继续增长的趋势。因此,推测 ICH 患者起病初期外周 Treg 细胞可能受到抑制,但后期逐渐开始发挥抗炎调节作用,Treg 细胞比例的逐渐增加可能减弱 ICH 后炎症反应,对改善神经功能缺损和促进血肿吸收有利^[16]。

Th17 和 Treg 细胞的表达具有可塑性,在特定环境下,两者可以相互适应和转化,TGF-β 可以诱导幼稚 Th17 向 Treg 细胞的分化,反之,TGF-β 与 IL-6 或 IL-21 共同作用 Treg 转化成 Th17 细胞^[17]。因此,Th17/Treg 比值可以反映 ICH 后全身炎症调节的程度。Th17/Treg 在 ICH 和脑缺血中发挥相似的功能,Th17/Treg 的平衡在发病时被打破,早期反应以促炎反应为主,免疫保护功能降低^[18]。本研究显示 Th17/Treg 比值在 ICH 急性期逐渐下降,意味着 ICH 后整体的炎症反应逐渐减轻,Th17/Treg 平衡向着损伤修复的方向调节,这可视为是机体的自我保护反应^[19]。另外,有关 ICH 病灶位置与外周 Th17、Treg 的关系目前尚不确定。基底节、脑叶是 ICH 的常见部位,尽管有研究认为急性期脑叶病灶周围炎性水肿反应比基底节区更为明显^[20],但是本研究结

果显示急性期外周 Th17/Treg 比值与脑出血部位无关,与出血体积和神经功能损害程度呈正相关,这与 Volbers 等^[21]的观点一致。

参考文献

- 1 Carlsson M,Wilsgaard T,Johnsen SH,et al. Temporal trends in incidence and case fatality of intracerebral hemorrhage:the tromsø study 1995-2012[J]. Cerebrovasc Dis Extra,2016,6(2):40-49.
- 2 Wilkinson DA,Pandey AS,Thompson BG,et al. Injury mechanisms in acute intracerebral hemorrhage[J]. Neuropharmacology,2018,134(Pt B):240-248.
- 3 Liu C,Yang H,Shi W,et al. MicroRNA-mediated regulation of T helper type 17/regulatory T-cell balance in autoimmune disease[J]. Immunology,2018,155(4):427-434.
- 4 姚寿林,徐建华,唐茜,等. 类风湿关节炎患者 Th17/Treg 相关细胞因子水平变化及其临床意义的研究[J]. 内科急危重症杂志,2010,16(6):295-297.
- 5 张苏明,许予明,朱遂强. 中国脑出血诊治指南(2014)[J]. 中华神经科杂志,2015,48(6):435-444.
- 6 Kothari RU,Brott J,Broderick JP,et al. The abcs of measuring intracerebral hemorrhage volumes[J]. Stroke,1996,27(8):1304-1305.
- 7 许昕,李庆山,许艳丽,等. 利妥昔单抗对弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者外周血 Th17 细胞的作用[J]. 内科急危重症杂志,2012,18(3):159-160,178.
- 8 吴彩云,吴金如,姚香萍,等. 结缔组织病相关间质性肺病患者血清 25-羟维生素 D3 水平与调节性 T 细胞相关[J]. 内科急危重症杂志,2022,28(2):113-116.
- 9 Lan X,Han X,Liu X,et al. Inflammatory responses after intracerebral hemorrhage: from cellular function to therapeutic targets[J]. J Cereb Blood Flow Metab,2018,39(1):184-186.
- 10 Javidi E,Magnus T. Autoimmunity after ischemic stroke and brain injury[J]. Front Immunol,2019,10:686.
- 11 Kebir H,Kreymborg K,Ifergan I,et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation[J]. Nat Med,2007,13(10):1173-1175.
- 12 Sprigle MI,Kuramatsu JB,Volbers B,et al. Perihemorrhagic edema: revisiting hematoma volume, location, and surface [J]. Neurology,2019,93(12):e1159-e1170.
- 13 徐瑞. 丘脑和基底节出血患者外周血 CD4⁺T 细胞亚群的变化[D]. 吉林大学. 2019.
- 14 Yang Z,Yu A,Liu Y,et al. Regulatory T cells inhibit microglia activation and protect against inflammatory injury in intracerebral hemorrhage[J]. Int Immunopharmacol,2014,22(2):522-525.
- 15 Mao LL,Yuan H,Wang WW,et al. Adoptive regulatory T-cell therapy attenuates perihematomal inflammation in a mouse model of experimental intracerebral hemorrhage [J]. Cell Mol Neurobiol,2017,37(5):919-929.
- 16 Gao L,Lu Q,Huang L J,et al. Transplanted neural stem cells modulate regulatory T,gammadelta T cells and corresponding cytokines after intracerebral hemorrhage in rats[J]. Int J Mol Sci,2014,15(3):4431-4441.
- 17 Tschoe C,Bushnell CD,Duncan PW,et al. Neuroinflammation after intracerebral hemorrhage and potential therapeutic Targets [J]. J Stroke,2020,22(1):29-46.
- 18 刘洁,胡小辉,龚道悦. 急性脑梗死患者外周血 Th17、Treg、Th17/Treg 及炎症因子的动态变化过程研究[J]. 临床神经病学杂志,2020,33(2):102-105.
- 19 Han R,Luo J,Shi Y,et al. PD-L1 (Programmed Death Ligand 1) Protects against experimental intracerebral hemorrhage-induced brain injury[J]. Stroke,2017,48(8):2255-2262.
- 20 Murthy SB,Moradiya Y,Dawson J,et al. Perihematomal edema and functional outcomes in intracerebral hemorrhage: influence of hematoma volume and location[J]. Stroke,2015,46(11):3088-3092.
- 21 Volbers B,Fischer U,Huttner H B. Inflammation edema hematoma and etiology - a rectangular relationship? [J]. Eur J Neurol,2019,26(1):e11.