

· 中医药 · 中西医结合 ·

中西医结合疗法对 Graves 病 NKT 细胞及其分泌的细胞因子水平的影响

李小景, 荣秀花, 欧宇苹, 曹敏
东莞东华医院内分泌科, 广东 东莞 523000

摘要: **目的** 观察分析中西医结合疗法对 Graves 病(GD)患者自然杀伤 T 细胞(NKT)及其分泌的细胞因子表达水平的影响。**方法** 选取 2013 年 7 月至 2014 年 6 月 GD 患者 30 例为研究对象,采用清肝解郁方加减结合西药治疗 6 个月,治疗前后抽取静脉血 10 ml,采用放射免疫分析法(RIA)及流式细胞仪检测,观察比较患者治疗前后血清游离三碘甲状腺原氨酸(FT_3)、血清游离甲状腺素(FT_4)、促甲状腺素(TSH)、抗甲状腺过氧化物酶抗体(TPOAb)、甲状腺球蛋白抗体(TgAb)、白细胞介素(IL)-2、IL-6、IL-10、IL-12、肿瘤坏死因子(TNF)- α 及外周血 $CD3^+CD56^+$ 自然杀伤 T 细胞(NKT)数量。**结果** 治疗后患者 FT_3 、 FT_4 及 TPOAb、TgAb 抗体水平明显低于治疗前(P 均 < 0.01),TSH 明显高于治疗前($P < 0.01$);治疗前 $CD3^+CD56^+$ NKT 样细胞占淋巴细胞百分比为 $(1.37 \pm 0.43)\%$,治疗后为 $(2.47 \pm 0.39)\%$,治疗前后比较差异有统计学意义($t = 9.187, P < 0.01$);治疗后患者 IL-2 水平高于治疗前,IL-6、IL-10、IL-12、TNF- α 水平均低于治疗前,差异均有统计学意义(P 均 < 0.01)。**结论** 采用中西医结合治疗 GD,能够调节患者免疫功能紊乱情况及免疫调节细胞失衡情况,对 GD 患者特异性免疫干预治疗效果显著。

关键词: Graves 病; 自然杀伤 T 细胞; 中西医结合

中图分类号: R 581.1 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2015)06-0801-03

Graves 病(GD),又称毒性弥漫性甲状腺肿,是甲状腺机能亢进症(甲亢)的最常见病因,约占全部甲亢的 80%~85%^[1],是一种病因尚不完全明确的自身免疫性甲状腺疾病,自然杀伤 T 细胞(CD1d-dependent natural killer-like T cells, NKT)是一类特殊类型的淋巴细胞, NKT 细胞在不同的微环境下分泌不同的细胞因子,介导 Th0 向 Th1/Th2 的分化,导致甲状腺抗体的产生,从而参与 GD 的发病过程^[2], NKT 细胞及其分泌的细胞因子表达水平对患者免疫功能紊乱情况及免疫调节细胞失衡情况有一定的指导意义,而 $CD3^+CD56^+$ NKT 细胞则为近年来新鉴定的免疫抑制细胞之一,属于具有细胞毒性的效应细胞。本文观察分析 30 例 GD 患者采用中西医结合治疗方法治疗前后 $CD3^+CD56^+$ NKT 细胞及其分泌的细胞因子体内的表达变化情况。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 7 月至 2014 年 6 月在我院初诊确诊,未经治疗的 GD 患者 30 例为观察对象,所有患者均符合第七版内科学关于 GD 诊断标

准^[3],排除 2 周内存在感染性疾病、合并其他自身免疫疾病及合并恶性肿瘤的患者。其中男性 5 例,女性 25 例;年龄 19~53 (34.2 ± 6.2)岁;病程 2 个月~7 年,平均 (2.4 ± 1.9) 年;甲状腺肿大 I 度 8 例, II 度 19 例, III 度 3 例。

1.2 治疗方法 本组患者入选后给予清肝解郁方加减治疗,药物组成包括丹皮、川楝子、郁金、香附、赤芍、浙贝各 10 g,虎杖、玄参、夏枯草各 15 g,煅牡蛎、半枝莲各 30 g,甘草 6 g,水煎服每日 1 剂,分 2 次服用,同时给予甲硫咪唑片 10 mg/次,每日 3 次口服治疗,待甲状腺激素水平接近正常后减至 2.5 mg/d 维持治疗,连续治疗 6 个月。

1.3 仪器及试剂 甲状腺激素检测采用罗氏 E170 电化学发光仪及相应配套试剂包括三联吡啶标记的抗血清游离三碘甲状腺原氨酸(FT_3)、血清游离甲状腺素(FT_4)、促甲状腺素(TSH)、抗甲状腺过氧化物酶抗体(TPOAb)、甲状腺球蛋白抗体(TgAb)试剂等, $CD3^+CD56^+$ NKT 细胞检测采用贝克曼公司生产的贝克曼库尔特 FC500MCL 流式细胞仪及单克隆抗体 CD45-FITC、CD3-PC5、CD56-PE、RBC 裂解液,细胞因子检测采用 BPC-1000 化学发光仪及 BC 公司提供配套的试剂盒。

1.4 观察指标及检测方法 治疗前及治疗 6 个月

DOI: 10.13429/j.cnki.cjcr.2015.06.040

基金项目:广东省东莞市科技计划医药卫生类科研项目(201310515000153)

管存取 3 ml 给予甲状腺激素及抗体检测,离心取上清,TSH 使用夹心免疫放射分析法(tRIA)检测,FT₃、FT₄、TPOAb、TgAb 指标均采用放射免疫分析法(RIA)检测。使用外周血促凝管存取 3 ml 给予细胞因子检测,离心取上清,RIA 检测血清中白细胞介素(IL)-2、IL-6、IL-10、IL-12、肿瘤坏死因子(TNF)-α 含量,CD3⁺CD56⁺NKT 细胞检测先制备血液标本,在同一流式专用试管中,加入上述单克隆抗体(CD45-FITC、CD3-PC5、CD56-PE)各 5 μl,同时加入 EDTA 抗凝全血 50 μl,混匀,避光孵育 20 min,加入 RBC 裂解液 500 μl 裂解 20 min,加入 PBS 500 μl,上机检测,用 CD45/SS 设门圈定淋巴细胞群,在十字门图中分析 CD3⁺与 CD56⁺双阳性区域细胞百分比,即为 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞百分比。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件包处理数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,治疗前后的比较采用配对 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清甲状腺激素及抗体变化 治疗后患者

表 1 GD 患者治疗前后血清甲状腺激素及抗体检测结果比较 ($n = 30, \bar{x} \pm s$)

时段	FT ₃ (pmol/L)	FT ₄ (pmol/L)	TSH (mIU/L)	TPOAb (IU/ml)	TgAb (IU/ml)
治疗前	23.76 ± 5.51	88.29 ± 31.35	0.009 ± 0.001	293.58 ± 141.32	380.58 ± 215.31
治疗后	5.79 ± 0.59	19.84 ± 3.15	1.680 ± 1.010	20.06 ± 4.85	31.48 ± 22.68
<i>t</i> 值	15.115	16.841	20.581	15.941	7.851
<i>P</i> 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

表 2 GD 患者治疗前后血清细胞因子检测结果比较 ($n = 30, \bar{x} \pm s$)

时段	IL-2 (pg/ml)	IL-6 (ng/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-12 (pg/ml)	TNF-α (ng/ml)
治疗前	1.26 ± 0.43	2.51 ± 0.31	43.79 ± 21.54	1306.14 ± 514.39	4.38 ± 0.66
治疗后	4.81 ± 0.71	1.01 ± 0.20	27.68 ± 5.41	584.34 ± 214.57	2.41 ± 0.81
<i>t</i> 值	7.215	5.141	7.015	9.351	6.814
<i>P</i> 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

3 讨论

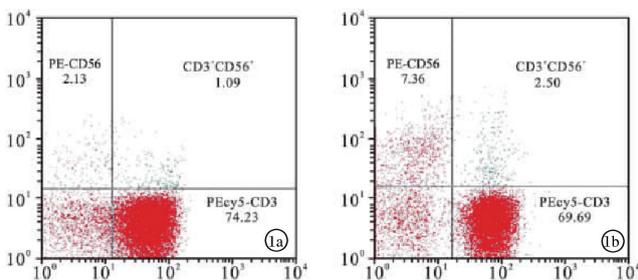
NKT 细胞是一类特殊类型的淋巴细胞,兼有 NK 细胞和 T 细胞两方面特性,因其表型和功能与 T 细胞、B 细胞及 NK 细胞等免疫细胞不同,NKT 细胞表达保守的限制性的 TCR 谱(T 细胞受体谱),其 αβTCR 结构单一,识别由 CD1d 分子呈递的特异性的糖脂类分子抗原,并迅速分泌大量的细胞因子,参与机体先天性免疫及获得性免疫^[4-5],NKT 细胞识别由细胞表面 CD1d 分子提呈的脂类、蛋白质抗原,在这些抗原刺激下迅速产生 IL-4、IFN-γ、IL-10、IL-13 等细胞因子,从而在抗感染、抗肿瘤以及抑制自身免疫疾病方面发挥重要作用,GD 为器官特异性自身免疫性疾病,发病机制与免疫、遗传、感染、精神等因素有

关,目前大多认为本病是由抑制性 T 细胞(T_s)功能缺陷降低了对辅助性 T 细胞(Th)的抑制,Th 细胞协助 B 细胞产生大量 TSH 受体刺激性抗体(TSAb),是导致 GD 的主要原因^[6-7],因此认为 GD 发病的免疫应答是与 Th2 型反应(体液免疫)有关,但近年也有一些研究结果表明 Th1 型反应(细胞免疫)在 GD 的发病机制中起重要作用,在 Th0 向 Th1/Th2 极化过程中,受到细胞因子、抗原、共刺激信号、转录因子、催乳素等的影响^[8-9]。

FT₃、FT₄ 及 TPOAb、TgAb 抗体水平明显低于治疗前,TSH 水平明显高于治疗前,差异有统计学意义(P 均 < 0.01)。见表 1。

2.2 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞检测结果 治疗前后 CD3⁺CD56⁺NKT 样细胞表达流式图见图 1。治疗前 CD3⁺CD56⁺NKT 样细胞占淋巴细胞百分比为 (1.37 ± 0.43)%,治疗后为 (2.47 ± 0.39)%,治疗后明显高于治疗前($t = 9.187, P < 0.01$)。

2.3 细胞因子检测结果 治疗后患者 IL-2 水平高于治疗前,IL-6、IL-10、IL-12、TNF-α 水平均低于治疗前,差异均有统计学意义(P 均 < 0.01)。见表 2。



注:1a:治疗前;1b:治疗后。

图 1 治疗前后 CD3⁺CD56⁺NKT 样细胞表达流式图

关,目前大多认为本病是由抑制性 T 细胞(T_s)功能缺陷降低了对辅助性 T 细胞(Th)的抑制,Th 细胞协助 B 细胞产生大量 TSH 受体刺激性抗体(TSAb),是导致 GD 的主要原因^[6-7],因此认为 GD 发病的免疫应答是与 Th2 型反应(体液免疫)有关,但近年也有一些研究结果表明 Th1 型反应(细胞免疫)在 GD 的发病机制中起重要作用,在 Th0 向 Th1/Th2 极化过程中,受到细胞因子、抗原、共刺激信号、转录因子、催乳素等的影响^[8-9]。

GD 相当于中医“癭病”、“肝火”、“中消”、“怔忡”等范畴^[10-11],病因病机多为长期情志抑郁或紧张,或突遭剧烈的精神创伤,导致肝失疏泄,气机郁滞,津液不能正常输布,停聚为痰,气滞痰凝,郁久化火而致变端丛生,因此治疗以清肝泻火、化痰散结为

主,本文所选清肝解郁方,方中丹皮能清血分实热,并善于清透阴分伏热;夏枯草清肝泻火,化痰软坚,消瘤散结,川楝子苦寒降泄,能清肝炎,泄郁热,行气等,制香附具有疏肝解郁、调理气机之效,郁金味辛苦,性凉,辛而发散,苦而善泄,性寒而善降,具有行气解郁、凉血安神之效,牡砺、浙贝、玄参有清热滋阴、化痰散结之效。以上诸药,既清又散,使热除痰化结散。现代研究表明夏枯草对特异性免疫机能有较强的抑制作用,其能参与肾上腺皮质中的糖皮质激素结合和分泌,对免疫器官有一定的影响^[12-13],郁金和半枝莲所含的黄酮类化合物具有免疫调节作用,能够有效的清除体内自由基,抑制细胞凋亡^[14-15]。本文结果显示, GD 患者在采用中西医结合治疗后 CD3⁺CD56⁺NKT 样细胞占淋巴细胞百分比明显上升,表明 GD 患者可能存在着 NKT 细胞数目的缺陷及 Th1、Th2 细胞的失衡, NKT 细胞能够通过细胞间接触或分泌转化生长因子 β 及 IL-10 等细胞因子,而治疗后这种变化得到有效抑制,这在治疗后患者 IL-6、IL-10、IL-12、TNF- α 含量均低于治疗前的结果中得到印证, Th1 细胞可分泌 NTF- α 、IL-2、IFN- γ 等细胞因子,促进细胞介导的免疫应答和产生 IgG2a、IgG2b 等抗体,而 IL-12 是由 Th1 细胞产生的能够增强 NKT 细胞毒性的细胞因子,激发迟发性超敏反应,主要介导细胞免疫应答; Th2 细胞可分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 等细胞因子,介导体液免疫,其中 IL-10 主要能促进 IgG1、IgA、IgE 等抗体产生,介导体液免疫应答,这些细胞因子水平的变化明显反映了 Th1/Th2 失衡在 GD 患者中的情况,本研究显示, GD 患者治疗后 IL-2 水平显著高于治疗前,表明治疗前 IL-2 的缺乏抑制性 T 细胞分化、成熟和增殖,使体内免疫自稳机制不能有效发挥作用,治疗后此情况有所改善。

综上所述,采用中西医结合治疗 GD,能够调节患者免疫功能紊乱情况及免疫调节细胞失衡情况,对 GD 患者特异性免疫干预效果显著。

参考文献

[1] 何珂,胡蕴,毛晓明. 免疫抑制剂对 Graves 病患者免疫调节细胞

的体内外作用研究[J]. 免疫学杂志,2014,30(8):685-690.

- [2] 孙中文,冯彩云,易丽娟,等. Graves 病患者外周血共刺激分子 CD28 的表达及意义[J]. 临床检验杂志,2014,32(8):576-579.
- [3] 王玫,任安,孔艳华,等. Graves 病患者外周血 Th17 细胞的变化及意义[J]. 安徽医科大学学报,2013,48(6):682-684.
- [4] 何珂,胡蕴,毛晓明. Graves 病患者外周血免疫调节细胞及其亚群比例异常[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2014,30(11):1190-1193,1197.
- [5] 唐恭顺. 人促甲状腺激素受体 HEK293T 细胞稳定表达株的构建[J]. 四川大学学报(医学版),2014,45(1):10-14.
- [6] 高腾飞,古彦铮,徐俊驰,等. CD40 信号联合细胞因子体外制备过继免疫治疗细胞的实验研究[J]. 中国免疫学杂志,2014,30(7):933-936,941.
- [7] 查兵兵,刘军,查英,等. Graves 病患者¹³¹I 治疗前后 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞的变化[J]. 中国免疫学杂志,2012,28(11):1032-1035.
- [8] 龚英,李子涛,付笑迎,等. 人外周血 CD3⁺CD56⁺NKT 与 V α 24⁺iNKT、V β 11⁺iNKT 细胞的关系及 NKT 亚群和细胞因子分泌的研究[J]. 免疫学杂志,2013,29(2):137-141.
- [9] Déchamps S, Wengelnik K, Berry-Sterkers L, et al. The Kennedy phospholipid biosynthesis pathways are refractory to genetic disruption in Plasmodium berghei and therefore appear essential in blood stages[J]. Mol Biochem Parasitol,2010,173(2):69-80.
- [10] 姚春艳,姜丽娜,邱晓静,等. CD3⁺CD56⁺NKT 细胞与 V α 24⁺iNKT 细胞的检测及其表型特点分析[J]. 现代免疫学,2011,31(6):490-494.
- [11] 马智鸿,包建东,陈永伟,等. Graves 病患者外周血滤泡辅助性 T 细胞和活化 B 细胞水平及意义[J]. 临床检验杂志,2014,32(8):606-609.
- [12] Gumeniuk R, Kvashnina KO, Schnelle W, et al. Physical properties and valence state of cerium in the filled skutterudite CePt₄Ge₁₂[J]. J Phys Condens Matter,2011,23(46):45601.
- [13] 宋丽萍,李跃萍,邱曙东,等. NT4-p53(N15)-Ant 重组慢病毒的构建及其对肝癌细胞的杀伤效应[J]. 中华肿瘤杂志,2010,32(1):10-16.
- [14] 薛海波,马蕾,王秀云,等. 桥本甲状腺炎患者外周血调节性 T 细胞/Th17 细胞平衡动态变化的研究[J]. 中华临床医师杂志(电子版),2012,6(8):2075-2079.
- [15] 柳迎昭,朱晨露,田洁,等. 桥本甲状腺炎患者 Th17 细胞比例升高[J]. 中华内分泌代谢杂志,2012,28(8):638-640.

收稿日期:2015-01-17 修回日期:2015-02-15 编辑:王娜娜