

结缔组织病相关间质性肺疾病患者血清 25-羟维生素 D3 水平与调节性 T 细胞相关*

吴彩云 吴金如 姚香萍 郭娥 曾宪升*

湖北文理学院附属医院 襄阳市中心医院呼吸内科,湖北襄阳 441000

摘要 目的:探讨结缔组织病相关间质性肺疾病(CTD-ILD)患者血清 25-羟维生素 D3 与调节性 T 细胞(Treg)的相关性。方法:选取 2018 年 6 月至 2019 年 12 月襄阳市中心医院呼吸内科住院的 30 例确诊的 CTD-ILD 患者为研究组,另选取同期健康志愿者 30 例作为对照组。采用 ELISA 法检测受试者外周血 25-羟维生素 D3 及血清中白细胞介素-10(IL-10)、转化生长因子- β (TGF- β)水平,流式细胞术检测外周血 Treg 水平。比较 2 组检测结果,并对患者 25-羟维生素 D3 与血 Treg、IL-10、TGF- β 水平的相关性进行分析。结果:研究组患者的血清 25-羟维生素 D3、血 Treg、TGF- β 、IL-10 水平明显低于对照组(P 均 <0.05);CTD-ILD 患者血清 25-羟维生素 D3 水平与血 Treg、IL-10、TGF- β 水平呈正相关(P 均 <0.05)。结论:CTD-ILD 患者血清 25-羟维生素 D3 水平显著低于健康者,25-羟维生素 D3 可能通过调控 TGF- β 水平影响 Treg 的分化及功能维持。

关键词 结缔组织病相关间质性肺疾病;血清 25-羟维生素 D3;Treg 细胞;白细胞介素-10;转化生长因子- β
中图分类号 R563 文献标识码 A DOI 10.11768/nkjwzzzz20220206

Correlation between serum 25-hydroxyvitamin D3 and regulatory T cells in patients with connective tissue disease-associated interstitial lung disease WU Cai-yun, WU Jin-ru, YAO Xiang-ping, GUO E, ZENG Xian-sheng*. Department of Respiratory Medicine, Xiangyang Central Hospital, Affiliated Hospital of Hubei University of Arts and Sciences, Hubei Xiangyang 441000, China

Corresponding author: ZENG Xian-sheng, E-mail: 310355055@qq.com

Abstract Objective: To Investigate the relationship between serum 25-hydroxyvitamin D3 and regulatory T cells (Treg) in patients with connective tissue-associated interstitial lung disease (CTD-ILD). Methods: A total of 30 CTD-ILD patients in the Respiratory Department of Xiangyang Central Hospital from June 2018 to December 2019 were selected as the observation group and 30 healthy subjects served as the control group. ELISA was used to detect the levels of serum 25-hydroxyvitamin D3, interleukin-10 (IL-10) and transforming growth factor- β (TGF- β) in serum, and flow cytometry was used to detect the Treg in peripheral blood. The results of two groups were compared and the correlation between serum 25-hydroxyvitamin D3 and Treg, IL-10, TGF- β was analyzed. Results: The serum 25-hydroxyvitamin D3 level, Treg, IL-10 and TGF- β levels in the CTD-ILD group were significantly lower than those in the control group ($P < 0.05$). The correlation analysis showed that serum 25-hydroxyvitamin D3 was positively correlated with Treg, IL-10 and TGF- β ($P < 0.05$). Conclusion: The levels of serum 25-hydroxyvitamin D3 in CTD-ILD were significantly low, which may be involved in the occurrence and development of CTD-ILD through regulating the level of TGF- β which influences the differentiation and function of Treg cells.

Key words Connective tissue-associated interstitial lung disease; Serum 25-hydroxyvitamin D3; Regulatory T cells; Interleukin-10; Transforming growth factor- β

结缔组织病相关间质性肺疾病(connective tissue disease-associated interstitial lung disease, CTD-ILD)患者常常死于间质性肺炎、肺纤维化的进展,研究表明调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)功能缺陷可能参与了 CTD-ILD 疾病发生、发展,表现为其功能性细胞因子转化生长因子- β (transforming

growth factor- β , TGF- β)、白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)水平的异常^[1-4]。维生素 D 不仅可调节钙的代谢,还具有一定的免疫调节功能^[5], 25-羟维生素 D3 是维生素 D 的中间代谢产物及活性形式,在循环系统中水平稳定,本研究通过检测患者外周血 25-羟维生素 D3、Treg 细胞及细胞因子 TGF- β 、

* 基金项目:湖北省卫生健康委员会 2019~2020 年度指导性项目(No:WJ2019F088)

* 通信作者:曾宪升, E-mail: 310355055@qq.com, 湖北省襄阳市襄城区荆州街 136 号

IL-10 水平,分析 25-羟维生素 D3 与 Treg 的相关性,探讨维生素 D 在 CTD-ILD 发病中的免疫调节作用。

资料与方法

一般资料 收集 2018 年 6 月至 2019 年 12 月襄阳市中心医院呼吸内科住院的 30 例 CTD-ILD 患者的临床资料,其中男性 12 例,女性 18 例,年龄 33 ~ 80 岁,平均(52.1 ± 9.6)岁;年龄 ≥ 50 岁 19 例, < 50 岁 11 例。既往吸烟史 8 例(26.7%);平均体重指数(body mass index, BMI) (21.5 ± 2.9) kg/m²。胸部高分辨率 CT 表现为网格状影 11 例(36.7%),磨玻璃影 16 例(53.3%),实变影 8 例(26.7%),结节影 6 例(20%),见表 1。其中多发性肌炎/皮肌炎相关间质性肺疾病 (polymyositis/dermatomyositis-associated ILD, PM/DM-ILD) 13 例、类风湿性关节炎相关间质性肺疾病 (rheumatoid arthritis-associated ILD, RA-ILD) 8 例、系统性红斑狼疮相关间质性肺疾病 (systemic lupus erythematosus-associated ILD, SLE-ILD) 3 例、未分化结缔组织病相关间质性肺疾病 (undifferentiated connective tissue disease-associated ILD, UCTD-ILD) 6 例。所有入选患者均符合各种结缔组织病的分类诊断标准及 ILD 的诊断标准^[6-10]。排除职业、环境、遗传、药物、感染、恶性肿瘤等引起的肺间质性病变,其他器脏的严重疾病,精神病及恶性肿瘤,所有患者近 4 周内无糖皮质激素、免疫调节剂及维生素 D 制剂使用史。同时选取 30 例无基础肺疾病的健康志愿者作为对照组,其中男性 16 例,女性 14 例,年龄 27 ~ 78 岁,年龄 ≥ 50 岁 17 例, < 50 岁 13 例。CTD-ILD 组与健康对照组年龄、性别比较,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,所有研究对象均知情并签署同意书。

方法 采集 2 组受试者空腹静脉血 3 mL, 1 800 转/min 离心 10 min 后获取血清,采用 ELISA

法检测血清 25-羟维生素 D3 水平,25-羟维生素 D3 检测试剂盒购自美国 GE 公司,严格按照试剂说明书进行操作。

采用美国 Beckman-Coulter 流式细胞仪检测 Treg 细胞(CD4 + CD25 + CD127low/-T 细胞),试剂盒购自 Beckman-Coulter USA 公司;采用 ELISA 法检测血清中 IL-10、TGF-β 细胞因子的表达,试剂盒购自 R&D USA 公司。

统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计学软件进行分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用两独立样本 t 检验,外周血 25-羟维生素 D3 与 Treg 细胞、细胞因子的相关性采用 Pearson 相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

血清 25-羟维生素 D3 水平 CTD-ILD 组血清 25-羟维生素 D3 水平明显低于对照组,见表 2。

免疫指标 CTD-ILD 组患者的 CD4 + CD25 + CD127low/-T 细胞、功能性细胞因子 IL-10、TGF-β 水平明显低于对照组(P 均 < 0.05),见图 1,表 2。

相关性分析 CTD-ILD 组血清 25-羟维生素 D3 水平与外周血 Treg 细胞的水平呈正相关($r = 0.55$, $P < 0.05$),与细胞因子 IL-10、TGF-β 水平亦呈正相关(分别为 $r = 0.43$, $P < 0.05$ 及 $r = 0.58$, $P < 0.05$),见图 2。

讨 论

结缔组织病是临床上导致间质性肺疾病最主要的原因之一,不同的结缔组织病导致间质性肺疾病发生率差异较大,本次研究显示 30 例常见 CTD-ILD 中以 PM/DM 最多见(43.3%),其次分别为 RA (26.7%)、UCTD(20%)、SLE(10%)。CTD 患者发生 ILD 机制不明,现有研究表明,Treg 数量及功能异常与肺纤维化发生有密切关系^[1~4],而 IL-10、

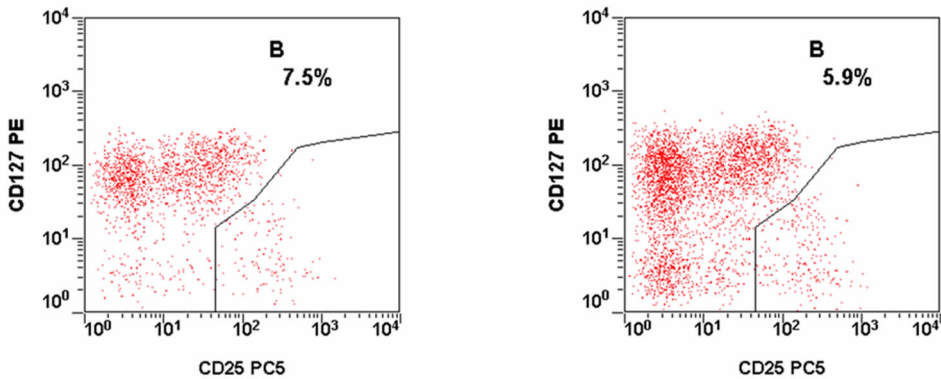
表 1 30 例 CTD-ILD 患者的临床资料

项目	RA-ILD($n = 8$)	PM/DM-ILD($n = 13$)	SLE-ILD($n = 3$)	UCTD-ILD($n = 6$)	合计($n = 30$)
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	57.6 ± 11.9	49.0 ± 9.4	37.6 ± 7.8	58.7 ± 9.2	52.1 ± 9.6
性别(男/女)	4/4	5/8	1/2	2/4	12/18
吸烟史[例(%)]	3(37.5)	4(30.8)	0	1(16.7)	8(26.7)
网格影[例(%)]	5(62.5)	3(23.1)	1(33.3)	2(33.3)	11(36.7)
磨玻璃影[例(%)]	2(25)	8(61.5)	2(66.7)	4(66.7)	16(53.3)
实变影[例(%)]	1(12.5)	4(30.8)	1(33.3)	2(33.3)	8(26.7)
结节影[例(%)]	3(37.5)	2(15.4)	0	1(16.7)	6(20)
BMI(kg/m ² , $\bar{x} \pm s$)	22.2 ± 4.1	20.8 ± 2.6	20.3 ± 1.3	22.7 ± 3.3	21.5 ± 2.9

表 2 2 组血清 25-羟维生素 D3、Treg、IL-10、TGF-β 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例	25-羟维生素 D3 (ng/mL)	Treg(%)	IL-10 (pg/mL)	TGF-β (pg/mL)
对照组	30	32.7 ± 6.3	5.6 ± 1.2	100.7 ± 56.3	549.3 ± 337.8
CTD-ILD 组	30	21.8 ± 5.9 *	3.9 ± 1.4 *	71.4 ± 25.5 *	359.0 ± 247.1 *

注:与对照组比较, * $P < 0.05$



注:选取其中 2 个受试者为代表的流式图进行淋巴细胞亚群观察,左侧为健康对照者 Treg,右侧为 CTD-ILD 患者 Treg, CD25 + CD127low/Treg 以 CD4 设门

图 1 CD4 + CD25 + CD127low/-Treg 细胞流式图

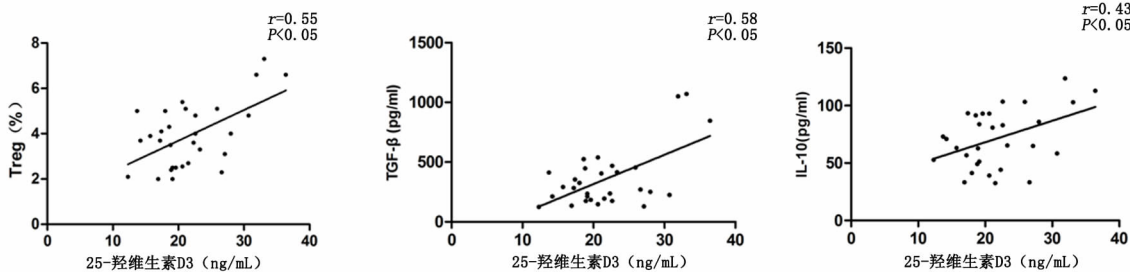


图 2 25-羟维生素 D3 与 Treg 细胞、IL-10、TGF-β 的相关性分析

TGF-β是 Treg 发挥免疫调节的重要效应分子,同时 TGF-β 通过 Smad 信号通路促进 CD25、CTLA-4、GITR 等 Treg 分子标记的表达,在 Treg 分化和增殖过程中发挥关键作用,而分化成熟的 Treg 通过分泌 TGF-β 发挥抗炎作用,同时有助 Treg 的进一步分化和功能的维持^[11,12]。CD127 低表达是 Treg 的一个固有特性^[13],本研究采用 CD4 + CD25 + CD127low/-T 细胞作为 Treg 的特异性标志对其进行鉴别,结果显示:在 CTD-ILD 患者体内 Treg 及其功能性因子 IL-10、TGF-β 水平明显低于对照组,CTD-ILD 患者体内存在 Treg 细胞水平低下及其功能障碍,这与 Kotsianidis 等^[4] 研究结果相似,提示 Treg 可能与 CTD-ILD 发生有关。进一步相关性分析发现,Treg 减少同时伴随 25-羟维生素 D3 水平降低,两者呈正相关关系,提示 CTD-ILD 患者中 Treg 数量的减少可能与 25-羟维生素 D3 有关,25-羟维生素 D3 可通过某种机制影响 Treg 细胞的分化及功能维持。

25-羟维生素 D3 不仅调节钙磷及骨矿化代谢^[14],还具有调控 Treg 的免疫功能^[5,15],CD4 + CD25 + T 淋巴细胞在 25-羟维生素 D3 及 TGF-β 的刺激作用下分化为 CD4 + CD25 + Foxp3 + 调节 T 细胞明显增多^[16]。在类风湿关节炎、系统性红斑狼疮、系统性硬化症等患者体内均存在 25-羟维生素 D3 水平下降,并影响患者的病情及预后^[17,18],补充治疗可升高患者体内 Treg 的水平,促进 TGF-β 分泌增加^[19]。25-羟维生素 D3 在呼吸系统疾病中的研究主要集中于慢性阻塞性肺疾病、哮喘、肺炎、肺结核^[20],而在 CTD-ILD 中的研究较少。本研究发现,CTD-ILD 组患者血清 25-羟维生素 D3 明显低于对照组,提示 25-羟维生素 D3 水平的下降在 CTD-ILD 的发病中可能发挥作用。

相关性分析结果显示 CTD-ILD 患者血清 25-羟维生素 D3 水平与 Treg 及其功能性细胞因子 IL-10 呈正相关,即 25-羟维生素 D3 缺乏将导致 Treg 水平

降低,引起 IL-10 分泌的减少,25-羟维生素 D3 可通过影响患者 Treg 细胞分化及功能维持从而影响机体免疫平衡。本研究发现 25-羟维生素 D3 缺乏还将导致 TGF- β 分泌的减少,使 TGF- β 抑制 Th1 细胞、细胞毒性 T 细胞、自然杀伤 T 淋巴细胞等免疫杀伤细胞的功能减弱,同时使具体抗炎抗纤维化的 Treg 分化成熟受限,据此我们认为 25-羟维生素 D3 可能通过调控 TGF- β 水平影响 Treg 的分化及功能维持参与 CTD-ILD 发病,25-羟维生素 D3 缺乏参与 CTD-ILD 发病的重要原因是其水平的下降可导致免疫系统调节功能紊乱。

参考文献

- Liu M,Zeng SH,Wang JL,et al. Immunomodulation by mesenchymal stem cells in treating human autoimmune disease-associated lung fibrosis[J]. Stem Cell Res Ther, 2016,7(1):63.
- Kolahian S,Fernandez IE,Eickelberg O,et al. Immune mechanisms in pulmonary fibrosis[J]. Am J Respir Cell Mol Biol,2016,55(3):309-322.
- Chakraborty K,Chatterjee S,Bhattacharyya A. Impact of treg on other T cell subsets in progression of fibrosis in experimental lung fibrosis [J]. Tissue Cell,2018,53:87-92.
- Kotsianidis I,Nakou E,Bouchliou I,et al. Global Impairment of CD4 + CD25 + FOXP3 + Regulatory T Cells in Idiopathic Pulmonary Fibrosis[J]. Am J Respir Crit Care Med,2009,179(12):1121-1130.
- Fisher SA,Rahimzadeh M,Brierley C,et al. The role of vitamin D in increasing circulating T regulatory cell numbers and modulating T regulatory cell phenotypes in patients with inflammatory disease or in healthy volunteers: A systematic review[J]. PLoS One,2019,14(9):e0222313.
- American Thoracic Society, European Respiratory Society. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001 [J]. Am J Respir Crit Care Med,2002,165(2):277-304.
- Aletaha D,Neogi T,Silman AJ,et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative [J]. Arthritis Rheum,2010,62(9):2569-2581.
- Bohan A,Peter JB. Polymyositis and Dermatomyositis[J]. New Engl J Med,1975,292(8):403-407.
- Aringer M,Costenbader K,Daikh D,et al. 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus[J]. Arthritis Rheumatol, 2019,71(9):1400-1412.
- Wolters PJ,Elicker B,Jones KD,et al. Idiopathic nonspecific interstitial pneumonia: lung manifestation of undifferentiated connective tissue disease? [J]. Am J Respir Crit Care Med,2007,176(7):691-697.
- Marie JC,Letterio JJ,Gavin M,et al. TGF- β 1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4 + CD25 + regulatory T cells [J]. J Exp Med,2005,201(7):1061-1067.
- Chen W,Konkel JE. Development of thymic Foxp3(+) regulatory T cells: TGF- β matters[J]. Eur J Immunol,2015,45(4):958-965.
- Seddiki N,Santner-Nanan B,Martinson J,et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells [J]. Exp Med,2006,203(7):1693-1700.
- 董坤,余学锋. 维生素 D 抵抗与代谢性骨病[J]. 内科急危重症杂志,2021,27(4):265-267.
- Tahe YA,van Esch BC,Hofman GA,et al. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 potentiates the beneficial effects of allergen immunotherapy in a mouse model of allergic asthma: role for IL-10 and TGF- β [J]. J Immunol,2008,180(8):5211-5221.
- Chambers ES,Suwannasaen D,Mann EH,et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 in combination with transforming growth factor- β increases the frequency of Foxp3 + regulatory T cells through preferential expansion and usage of interleukin-2 [J] Immunology,2014,143(1):52-60.
- Gheita TA,Sayed S,Gheita HA,et al. Vitamin D status in rheumatoid arthritis patients: relation to clinical manifestations, disease activity, quality of life and fibromyalgia syndrome [J] Int J Rheum Dis, 2016,19(3):294-299.
- Arnson Y,Amital H,Agmon-Levin N,et al. Serum 25-OH vitamin D concentrations are linked with various clinical aspects in patients with systemic sclerosis: A retrospective cohort study and review of the literature[J]. Autoimmun Rev,2011,10(8):490-494.
- Handono K,Marisa D,Kalim H. Association between the low levels of vitamin D and Treg function in systemic lupus erythematosus patients [J]. Acta Med Indones,2013,45(1):26-31.
- 吴雷. 慢性阻塞性肺疾病患者血清 25-羟基维生素 D3 水平的变化及其临床意义[J]. 内科急危重症杂志,2018,24(2):135-137.

(2020-10-29 收稿 2021-03-04 修回)