

·论著·

急性缺血性卒中早期外周血 Th17/Treg 失衡情况 及与预后的关系

刘洁, 胡小辉, 龚道恺

作者单位
长江大学第二临床
医学院神经内科
湖北 荆州 434020
基金项目
荆州市科技发展计
划项目(No. 20170
31)
收稿日期
2019-12-19
通讯作者
龚道恺
daokaigong@
hotmail.com

摘要 目的:探讨急性缺血性卒中(AIS)早期外周血辅助性T细胞17(Th17)和调节性T细胞(Treg)比值及其与发病90 d预后的关系。**方法:**AIS患者64例纳入AIS组,健康体检者40例纳入对照组。采用流式细胞仪测定并比较外周血Th17、Treg细胞水平和Th17/Treg比值。根据90 d后改良Rankin量表(mRS)评分,将患者分为预后良好37例及预后不良组27例。比较不同预后组患者的临床资料;*Spearman*分析Th17/Treg与病情严重程度的相关性;多因素*Logistics*回归分析AIS患者90 d预后不良发生的影响因素;受试者工作特征曲线评价入院时Th17/Treg水平对AIS患者进行预后的评估效率。**结果:**AIS组外周血Th17比例增高,Treg比例降低,Th17/Treg明显高于对照组(均 $P<0.05$)。预后不良组入院时外周血Th17/Treg、白细胞介素(interleukin, IL)-6水平、梗死灶体积和NIHSS评分均高于预后良好组(均 $P<0.01$)。IL-6、NIHSS及梗死体积与Th17/Treg正相关($P<0.001$)。梗死灶体积和Th17/Treg是AIS患者90 d预后不良发生的独立影响因素($P<0.05$)。Th17/Treg预测AIS患者预后的ROC曲线下面积为0.898(95%CI: 0.828 ~ 0.971, $P=0.000$)。Th17/Treg最有效的截断值为3.775,此时预测敏感性为66.7%,特异性为97.3%。**结论:**AIS患者早期外周血Th17/Treg增加,并对不良预后有一定的预测价值。

关键词 急性缺血性卒中;辅助性T细胞17;调节性T细胞;Th17/Treg;预后

中图分类号 R741;R741.02;R743 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.2020.04.002

刘洁, 胡小辉, 龚道恺. 急性缺血性卒中早期外周血Th17/Treg失衡情况及与预后的关系[J]. 神经损伤与功能重建, 2020, 15(4): 190-193.

Imbalance of Th17/Treg in Peripheral Blood of Acute Ischemic Stroke Patients and Its Relationship with Prognosis LIU Jie, HU Xiao-hui, GONG Dao-kai. Department of Neurology, the Second Clinical Medical College of Yangtze University, Jingzhou 434020, China

Abstract **Objective:** To investigate the early-stage Th17/Treg ratio in the peripheral blood of acute ischemic stroke (AIS) patients and its relationship with 90-day prognosis. **Methods:** We assigned 64 patients with AIS and 40 healthy controls to the AIS group and control group, respectively. The levels of Th17 and Treg cells and the ratio of Th17/Treg in the peripheral blood of all participants were detected by flow cytometry. Patients were divided into the good prognosis group (n=37) and poor prognosis group (n=27) according to the mRS score after 90 days. The clinical data of the two groups were compared. Spearman analysis was used to assess the relationship between Th17/Treg and severity of condition. Multivariate logistic regression analysis was used to examine the influencing factors of a poor 90-day prognosis. The receiver operating characteristic curve (ROC) was used to evaluate the predictive effect of the Th17/Treg ratio at time of admission. **Results:** The peripheral blood Th17 level was increased, Treg level decreased, and Th17/Treg ratio significantly increased in AIS group patients compared to control group patients (all $P<0.05$). The poor prognosis group showed significantly higher peripheral blood Th17/Treg, IL-6 level, infarct volume, and NIHSS score compared to the good prognosis group (all $P<0.01$). IL-6, NIHSS, and infarct volume were positively correlated with Th17/Treg ($P<0.001$). Infarct volume and Th17/Treg were independent risk factors for a poor 90-day prognosis. The area under the ROC curve for Th17/Treg in predicting AIS prognosis was 0.898 (95%CI: 0.828 ~ 0.971, $P=0.000$). The optimal cutoff value of Th17/Treg was 3.775 with a sensitivity of 66.7% and a specificity of 97.3%. **Conclusion:** The early-stage Th17/Treg ratio in peripheral blood increased in patients with AIS and offered a certain predictive value for 90-day poor prognosis.

Key words acute ischemic stroke; helper T cells 17; regulatory T cells; Th17/Treg; prognosis

研究显示,急性缺血性卒中(acute ischemic stroke, AIS)损伤部位的继发炎症反应是影响患者预后的重要因素^[1,2]。外周T淋巴细胞在AIS后的损伤和修复过程中发挥着关键作用^[3]。辅助性T细胞17(helper T cells 17, Th17)为促炎T细胞亚群,调节性T细胞(regulatory T cells, Treg)具有拮抗作用;Th17和Treg细胞平衡被打

破,可加剧疾病的发展,影响预后^[4]。本研究旨在通过分析 AIS 患者早期外周血 Th17/Treg 表达情况,探讨其对患者预后的评估价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择 2019 年 1 月至 2019 年 6 月我科收治的动脉粥样硬化性 AIS 患者 64 例为 AIS 组,其中男 43 例,女 21 例;年龄为 46 ~ 81 岁,平均(64.34±9.67)岁。纳入标准:符合《中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2014》诊断标准,并经头部 CT 和(或)MRI 证实;发病 48 h 内入院;首次发病。排除标准:存在心源性脑栓塞、脑血管动脉瘤、静脉窦血栓、动静脉畸形、动脉夹层、动脉炎及烟雾病;合并急性心肌梗死、严重肝肾疾病、恶性肿瘤、内分泌疾病、血液循环系统及自身免疫性疾病;近期 4 周内存在感染、外伤、手术及服用抗炎药物、免疫抑制剂。

选择同期健康体检者 40 例为对照组,其中男 20 例,女 20 例;年龄为 30 ~ 78 岁,平均(60.45±10.21)岁,均排除脑血管病、心肌梗死、糖尿病、恶性肿瘤、内分泌病及自身免疫性疾病,近期 4 周内无感染、外伤、手术,未服用抗炎药物及免疫抑制剂。2 组一般资料差异均无统计学意义($P>0.05$)。本研究获得患者知情同意并经医院伦理委员会批准通过。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂和设备 鼠抗人单克隆抗体 CD127-PE-Cy7、IL-17A-PE、细胞刺激阻断剂、破膜固定试剂盒购自于美国 BD 公司。鼠抗人单克隆抗体 CD25-PE、CD4-FITC 购自于美国 Biolegend 公司。OptiLyse C 溶血素、Epics-XL 流式细胞仪均购于美国 Beckman Coulter 公司。

1.2.2 患者治疗及资料收集 所有脑梗死患者于住院后次日清晨,取空腹外周静脉血 5 mL,在 6 h 内行流式细胞术检测 Th17、Treg 比例,Th17/Treg 比值。患者于入院当天临床资料和实验室数据收集。完成美国国立卫生院脑卒中量表(National Institutes of Health Stroke Scale,NIHSS)评分;依据 Pullicino 公式计算梗死灶体积,并分为小梗死灶($<5\text{ cm}^3$)、中梗死灶($5\sim10\text{ cm}^3$)和大梗死灶($>10\text{ cm}^3$)。所有患者给予脑梗死常规治疗。在发病后 90 d 通过门诊、电话等方式进行随访,完成改良 Rankin 量表(modified Rankin Scale,mRS)评分。mRS 评分 0 ~ 2 分定义为良好预后,3 ~ 6 分定义为预后不良。

1.3 统计学处理

应用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。计量资料中正态分布的资料以($\bar{x}\pm s$)表示,采用 t 检验;非正态分布资料以中位数(四分位数间距)[M(Q)]表示,采用独立样本 Mann-Whitney U 检验;计数资料以率表示,采用 χ^2 检验或 Fisher 精确检验。Spearman 分析连续变量间的相关性;多因素 logistic 回归分析与预后相关的影响因素;采用工作特征曲线(ROC)曲线得出 Th17/Treg 比值最佳截点,计算敏感度及特异度,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AIS 组与对照组外周血 Th17、Treg 及 Th17/Treg 的表达情况

AIS 组外周血 Th17 比例增高,Treg 比例降低,Th17/Treg 明显高于对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),见表 1。

表 1 AIS 组与对照组外周血 Th17 和 Treg 比较[M(Q)]				
组别	例数	Th17/%	Treg/%	Th17/Treg
对照组	40	4.66(3.80)	3.56(1.42)	1.29(0.85)
AIS 组	64	7.98(5.35)	2.88(1.15)	2.69(2.32)
Z 值		-5.289	-2.76	-6.097
P 值		0.000	0.006	0.000

2.2 预后良好组与预后不良组外周 Th17/Treg 比值及一般资料的比较

本组 AIS 患者根据预后情况分为预后良好组 37 例和预后不良组 27 例。预后不良组入院时外周血 Th17/Treg、白细胞介素(interleukin,IL)-6 水平、梗死灶体积和 NIHSS 评分均高于预后良好组,差异有统计学意义(均 $P<0.01$)。2 组年龄、性别及脑血管病危险因素差异无统计学意义(均 $P>0.05$),见表 2。

2.3 AIS 患者 Th17/Treg 与 IL-6、NIHSS 及梗死体积的相关性分析

Spearman 相关分析发现,IL-6、NIHSS 及梗死体积与 Th17/Treg 正相关($\rho=0.436,P<0.001$; $\rho=0.611,P<0.001$; $\rho=0.645,P<0.001$),见图 1

2.4 预后不良的多因素回归分析

以脑梗死是否发生预后不良为因变量,以单变量分析中 $P<0.1$ 的因素为自变量,行 logistic 回归分析显示,梗死灶体积和 Th17/Treg 是 AIS 患者 90 d 预后不良发生的独立影响因素($OR=3.268,95\% CI: 1.042\sim10.243,P=0.042$),见表 3。

2.5 ROC 曲线分析 Th17/Treg 对不良预后的预测价值

以曲线下面积 0.5 为参考界值, Th17/Treg 预测 AIS 患者预后的曲线下面积为 0.898 (95%CI: 0.828 ~ 0.971, $P=0.000$)。Th17/Treg 最有效的截断值为 3.775, 此时预测敏感性为 66.7%, 特异性为 97.3%, 见图 2。

3 讨论

脑血管的突然闭塞会导致急性缺血性损伤, 迅速激活梗死灶局部免疫细胞, 并诱导外周 T 淋巴细胞及其亚群的炎症反应, 进而继发脑组织二次损伤^[5]。

Th17 细胞主要发挥促炎效应, 并分泌 IL-17、IL-6 等细胞炎性因子, 加重神经元损伤; Treg 细胞则通过调节效应 T 细胞的活性来协调总体免疫反应, 维持外周免疫耐受, 发挥神经保护作用^[6]。本研究发现, 与对照组相比, AIS 患者早期外周 Th17 比例明显增多, Treg 减少, 导致 Th17/Treg 比例严重失调。

外周 Th17/Treg 比值间接反映了中枢神经系统局部炎症的状态, Th17/Treg 平衡与 AIS 的发展与预后密切相关^[7]。动物实验表明, 通过抑制初始 CD4 淋巴细胞的分化维持 Th17/Treg 平衡, 或诱导 Th17/Treg 的

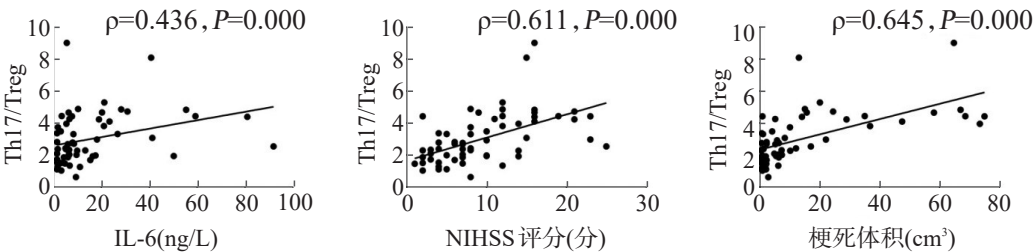
表2 预后良好组与预后不良组外周临床数据比较

分组	例数	年龄/(岁, $\bar{x}\pm s$)	男/女	高血压/[例(%)]	糖尿病/[例(%)]	高脂血症/[例(%)]	吸烟/[例(%)]
预后良好组	37	64.95±9.95	22/15	22(59.5)	12(32.4)	9(24.3)	14(37.8)
预后不良组	27	63.52±9.40	21/6	15(55.6)	5(18.5)	2(7.4)	14(51.9)
检验值		0.580	2.376	0.098	1.549	—	1.246
P值		0.564 ^a	0.123 ^b	0.755 ^b	0.213 ^b	0.100 ^c	0.264 ^b

分组	Th17/Treg/[M(Q)]	IL-6/[ng/L, M(Q)]	血糖/[mmol/L, M(Q)]	肌酐/[μmol/L, M(Q)]	尿酸/[μmol/L, $\bar{x}\pm s$]
预后良好组	1.99(1.27)	6.05(7.36)	6.42(2.94)	72.65(21.93)	326.00±79.31
预后不良组	3.81(2.08)	18.60(26.80)	5.93(1.98)	72.90(34.30)	343.67±104.69
检验值	—5.050	—3.945	—0.007	70.327	—0.744
P值	0.000 ^d	0.000 ^d	0.994 ^d	0.744 ^d	0.460 ^a

分组	LDL/	Hcy/	梗死灶体积[(例(%))]			NIHSS/[分, M(Q)]
	[mmol/L, M(Q)]	[μmol/L, M(Q)]	小梗死灶	中梗死灶	大梗死灶	
预后良好组	2.65(1.39)	12.80(4.20)	29(78.4)	8(21.6)	0	5(4)
预后不良组	2.73(1.02)	13.70(6.08)	1(3.7)	8(29.6)	18(66.7)	14(6)
检验值	—1.093	—1.172		43.636		—6.070
P值	0.274 ^d	0.241 ^d		0.000 ^b		0.000 ^d

注: ^a为 t 检验; ^b为 χ^2 检验; ^c为 Fisher 精确检验; ^d为非参数检验; LDL: 值低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein); Hcy: 同型半胱氨酸 (homocysteine)



注: ρ 为相关系数
图 1 脑梗死患者 Th17/Treg 与 IL-6、NIHSS 及梗死体积的相关性分析

表3 多因素 logistic 回归分析不良预后的影响因素

项目	OR 值	95%CI	P 值
单因素分析			
IL-6	1.068	1.017 ~ 1.122	0.009
Th17/Treg	5.174	2.428 ~ 11.024	0.000
NIHSS 评分	1.628	1.289 ~ 2.056	0.000
梗死灶体积	49.354	6.610 ~ 368.494	0.000
多因素分析			
Th17/Treg	3.268	1.042 ~ 10.243	0.042
梗死灶体积	29.176	3.406 ~ 249.952	0.002

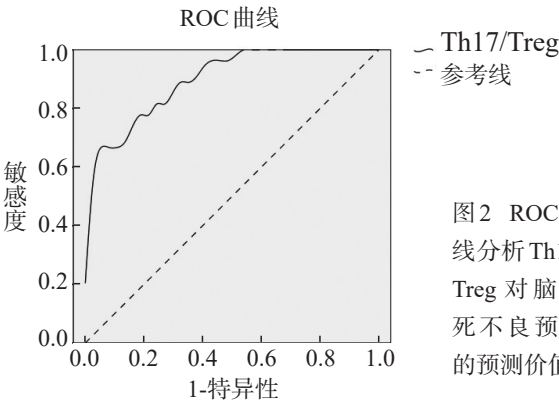


图 2 ROC 曲线分析 Th17/Treg 对脑梗死不良预后的预测价值

平衡偏向 Treg 细胞,能改善大脑中动脉闭塞小鼠的预后^[8,9]。研究报道,卒中后疲劳患者外周 Th17/Treg 比值增加,并与疾病严重程度密切相关^[10]。Guoping P 等^[11]也发现虽然 Th17/Treg 比值不是血管性痴呆发生的独立危险因素,但是 Th17/Treg 失衡参与了 AIS 患者后期认知功能障碍的发展^[11]。本研究排除年龄、性别和各种脑血管病危险因素的影响,证实 Th17/Treg 比值是 AIS 患者 90 d 预后不良的独立危险因素之一,并且最佳截断值为 3.775,其特异性高达 97.3%。由此推测, Th17/Treg 比值在 AIS 早期可辅助评估患者预后。其机制可能是脑细胞损伤和细胞死亡导致危险信号释放,激活全身免疫系统,使初始 CD4 淋巴细胞偏向 Th17 细胞分化^[12]。Treg 细胞甚至能在 IL-6 刺激下,转化成 Th17 细胞,透过血脑屏障在缺血核心蓄积,加剧脑水肿或直接促进半暗带脑细胞的死亡^[13]。因此,大部分研究认为外周 Th17/Treg 的失衡扩大了梗死灶,不利于神经功能的恢复^[8,9]。本研究发现尽管 NIHSS 评分、IL-6 和梗死体积均与 Th17/Treg 比率呈显著正相关,但 Spearman 的相关系数在 Th17/Treg 比率与梗死体积之间是最高的,这更适合定义 Th17/Treg 失衡与神经元损伤之间的关系。除了急性期的损伤,细胞免疫稳态机制还参与了 AIS 慢性炎症反应^[14]。这与梗死体积大小无关,而是通过增加梗死周围区域神经变性,或干扰神经干细胞增值修复等,来影响 AIS 神经功能的恢复^[15,16]。

综上所述,本研究发现 AIS 患者早期外周血 Th17 比例增加, Treg 比例降低, Th17 和 Treg 细胞免疫平衡的打破提示 AIS 的发生。初步证明 Th17/Treg 是 90 d 预后的独立危险因素之一,对 AIS 患者预后评估有一定的价值;后续将扩大样本量,进一步深入研究。

参考文献

- [1] Burke JF, Feng C, Skolarus LE. Divergent poststroke outcomes for black patients: Lower mortality, but greater disability[J]. Neurology, 2019, 93: 1-11.
- [2] Gu L, Jian Z, Sary C, et al. T Cells and Cerebral Ischemic Stroke[J]. Neurochem Res, 2015, 40: 1786-1791.
- [3] Ito M, Komai K, Mise-Omata S, et al. Brain regulatory T cells suppress astrogliosis and potentiate neurological recovery[J]. Nature, 2019, 565: 246-250.
- [4] 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: 427-434.
- [5] Javidi E, Magnus T. Autoimmunity After Ischemic Stroke and Brain Injury[J]. Front Immunol, 2019, 10: 686.
- [6] Wang X, Xuan W, Zhu ZY, et al. The evolving role of neuro-immune interaction in brain repair after cerebral ischemic stroke[J]. CNS Neurosci Ther, 2018, 24: 1100-1114.
- [7] Hu Y, Zheng Y, Wu Y, et al. Imbalance between IL-17A-producing cells and regulatory T cells during ischemic stroke[J]. Mediators Inflamm, 2014, 2014: 813045.
- [8] Wang X, Zhou Y, Tang D, et al. ACC1 (Acetyl Coenzyme A Carboxylase 1) Is a Potential Immune Modulatory Target of Cerebral Ischemic Stroke[J]. Stroke, 2019, 50: 1869-1878.
- [9] Zhao H, Wan L, Chen Y, et al. FasL incapacitation alleviates CD4(+) T cells-induced brain injury through remodeling of microglia polarization in mouse ischemic stroke[J]. J Neuroimmunol, 2018, 318: 36-44.
- [10] Liu X, Kenkare K, Li S, et al. Increased Th17/Treg Ratio in Poststroke Fatigue[J]. Mediators Inflamm, 2015, 2015: 931398.
- [11] Guoping P, Wei W, Xiaoyan L, et al. Characteristics of the peripheral T cell immune response of patients at different stages of vascular cognitive impairment[J]. Immunol Lett, 2015, 168: 120-135.
- [12] Shimada K, Porritt RA, Markman JL, et al. T-Cell-Intrinsic Receptor Interacting Protein 2 Regulates Pathogenic T Helper 17 Cell Differentiation [J]. Immunity, 2018, 49: 873-885 .
- [13] Li Q, Wang Y, Yu F, et al. Peripheral Th17/Treg imbalance in patients with atherosclerotic cerebral infarction[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013, 6: 1015-1027.
- [14] Gill D, Veltkamp R. Dynamics of T cell responses after stroke[J]. Curr Opin Pharmacol, 2016, 26: 26-32.
- [15] Jones KA, Maltby S, Plank MW, et al. Peripheral immune cells infiltrate into sites of secondary neurodegeneration after ischemic stroke [J]. Brain Behav Immun, 2018, 67: 299-307.
- [16] Wang J, Xie L, Yang C, et al. Activated regulatory T cell regulates neural stem cell proliferation in the subventricular zone of normal and ischemic mouse brain through interleukin 10[J]. Front Cell Neurosci, 2015, 9: 361.

(本文编辑:唐颖馨)