

CD177⁺ 中性粒细胞在溃疡性结肠炎患者外周血中的表达及临床意义

张艳婷 郭玉峰 杨芝红* 杨少奇*

(宁夏医科大学总医院 银川 750001)

摘要 目的:通过对比 CD177⁺ 中性粒细胞在溃疡性结肠炎(UC)患者与正常对照者外周血中的表达差异,分析 CD177⁺ 中性粒细胞在溃疡性结肠炎发生发展中的临床意义。方法:收集 30 例 UC 患者及 20 例正常对照者外周血,采用流式细胞术检测中性粒细胞 CD177⁺ 中性粒细胞表达情况,对比两组 CD177 表达差异。结果:UC 患者外周血中 CD177⁺ 中性粒细胞表达明显高于正常对照组($P < 0.01$),中度活动 UC 外周血 CD177⁺ 中性粒细胞表达较轻度者明显增高($P < 0.05$),UC 患者外周血 CD177⁺ 中性粒细胞%与 Mayo 评分呈显著正相关($r = 0.384, P = 0.036$)。结论:CD177⁺ 中性粒细胞在 UC 患者外周血表达明显增高,且与疾病活动程度密切相关,能够反映 UC 患者临床疾病活动程度。

关键词 CD177⁺ 中性粒细胞 溃疡性结肠炎 外周血

中图分类号 Q291

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种发生在结直肠的慢性非特异性炎症,其发病机制尚不明确,目前认为可能与自身免疫、肠道菌群、遗传、环境等因素有关。近期研究发现,中性粒细胞在炎症性肠病中发挥重要的免疫功能。CD177 是中性粒细胞特异性表面抗原,特异性表达在中性粒细胞膜表面^[1]。本研究通过检测 UC 患者外周血 CD177⁺ 中性粒细胞表达情况,明确其在 UC 中的作用及临床意义。

1 材料与方法

1.1 病例资料

收集宁夏医科大学总医院消化内科 2018 年 5 月 ~ 2019 年 8 月期间明确诊断为溃疡性结肠炎的住院患者 30 例,收集患者病历资料。入组患者均符合 2018 年中国炎症性肠病诊断及治疗共识诊断标准,排除合并肿瘤、感染者。UC 疾病严重程度评价采用 Mayo 评分,Mayo 评分总分之和 ≤ 2 且单项评分不超过 1 分为症状缓解,3 ~ 5 分为轻度活动,6 ~ 10 分为中度活动,11 ~ 12

分为重度活动。纳入的 30 例 UC 患者均处于疾病活动期,其中轻度活动者 14 例,中度活动者 16 例。同期纳入健康正常对照者 20 例对照组。所有 UC 患者及正常对照组均签署知情同意书,采集外周血 2 ~ 3ml, EDTA 抗凝,进行 CD177⁺ 中性粒细胞及免疫淋巴细胞检测。

1.2 CD177 中性粒细胞及免疫淋巴细胞检测方法

1.2.1 仪器与试剂 为美国 BD 公司 FACSCantoII 流式细胞仪,淋巴细胞亚群检测试剂盒(BD MultitestTM IMK Kit)、FITC-CD177、FITC-IgG1 单抗试剂、CST 荧光微球、7color 标准荧光设置微球和溶血素等相关试剂均购自 BD 公司。

1.2.2 标本采集 采集患者及正常对照组外周血 2 ~ 3ml, EDTA 抗凝,于采血后 6 小时内进行染色处理和测定。

1.2.3 仪器校准 采用 CST 荧光微球、7 color 标准荧光设置微球校准仪器,使用 Diva 软件设置获取条件。

1.2.4 外周血 CD177 荧光标记染色与检测分析 采用直接免疫荧光标记法,将 FITC-CD177 抗体 5 μ l 加入流式细胞仪专用试管,同时设定同型对照管 FITC-IgG1,于每管加入抗凝外周血 100 μ l,混匀、室温避光孵育 20min,加溶血素 2ml,裂解红细胞 10min,1 500r/min

收稿日期:2019-08-30 修回日期:2019-09-03

* 通讯作者,电子信箱:zhangpac@163.com; shaoqiynh@163.com

离心 5min、弃上清,加入 PBS 洗涤液 2ml,混匀离心、弃上清,加入 PBS300μl,上机检测。每管获取细胞数 20 000个,以 FSC/SSC、CD177/SSC 双参数二维散点图设门方法分析中性粒细胞膜表面 CD177 抗原的平均荧光强度。

1.2.5 外周血淋巴细胞免疫分析荧光标记染色与检测分析 采用直接免疫荧光标记法,将 CD3FITC/CD8PE/CD45PerCP/CD4APC、CD3 FITC/CD16 + 56PE/CD45 PerCP/CD19APC 抗体 15μl 分别加入流式细胞仪专用试管,于每管加入抗凝外周血 100μl,混匀、室温避光孵育 20min,加溶血素 2ml,裂解红细胞 10min,1500r/min 离心 5min、弃上清,加入 PBS 洗涤液 2ml,混匀离心、弃上清,加入 PBS300μl,上机检测。每管获取细胞数 20 000 个,以 SSC/CD45、SSC/CD3 双参数二维散点

图设门方法分析外周血中淋巴细胞亚群的百分比。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件处理数据,计量资料采用均数 ± 标准差表示,行单因素 t 检验及 Pearson 相关性分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CD177⁺中性粒细胞在 UC 患者及正常对照组外周血表达情况

流式细胞术检测 CD177⁺中性粒细胞在 UC 患者及正常对照组外周血的表达(图 1)。

CD177⁺中性粒细胞在 UC 患者外周血中的表达明显高于正常对照组($P<0.01$),详见表 1。

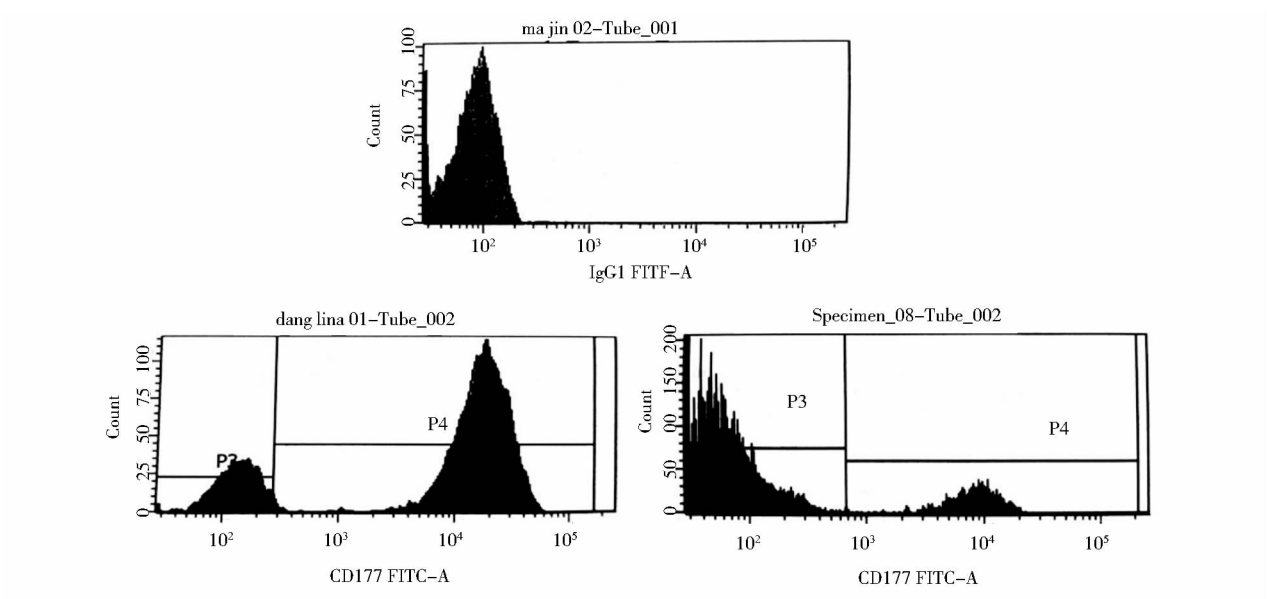


图 1 流式细胞术检测 CD177⁺中性粒细胞

Fig.1 CD177⁺ neutrophils were detected by Flow cytometry

表 1 UC 患者及对照组外周血 CD177 ⁺ 中性粒细胞表达情况				
Table 1 The expression of CD177 ⁺ neutrophils in UC patients and control group				
分组	n	CD177 ⁺ 中性粒细胞%	T 值	P 值
UC 组	30	58.45 ± 20.9 *	9.032	0.000
对照组	20	20.95 ± 7.32		

* Compared with control group, $P<0.01$

2.2 不同严重程度 UC 患者外周血 CD177⁺中性粒细胞表达情况

将 30 例 UC 患者依据 Mayo 评分,分为轻度活动和中度活动。中度活动 UC 外周血 CD177⁺中性粒细胞表达较轻度者明显增高($P<0.05$)(表 2)。

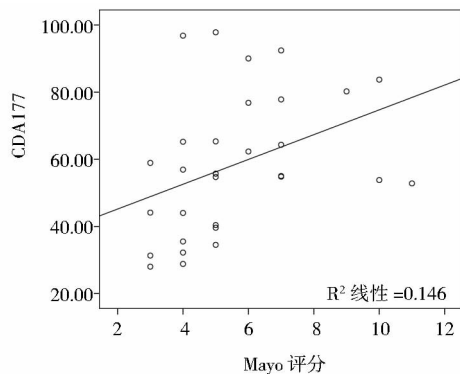
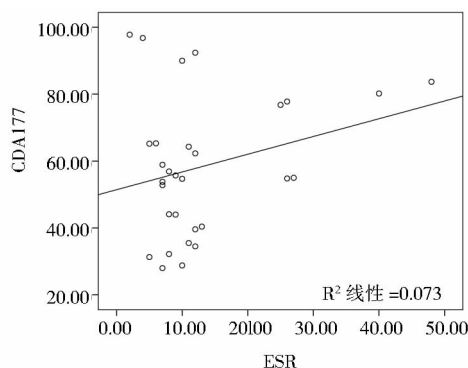
UC 患者外周血 CD177⁺中性粒细胞%与 Mayo 评分呈显著正相关($r=0.384,P=0.036$),见图 2。UC 患者外周血中 CD177⁺中性粒细胞%与红细胞沉降率(ESR)呈显著正相关($r=0.492,P=0.006$),见图 3。UC 患者外周血中 CD177⁺中性粒细胞%与 CD8⁺T 淋巴细胞呈显著正相关($r=0.385,P=0.036$)见图 4。

表 2 不同严重程度 UC 患者外周血 CD177⁺

中性粒细胞表达情况

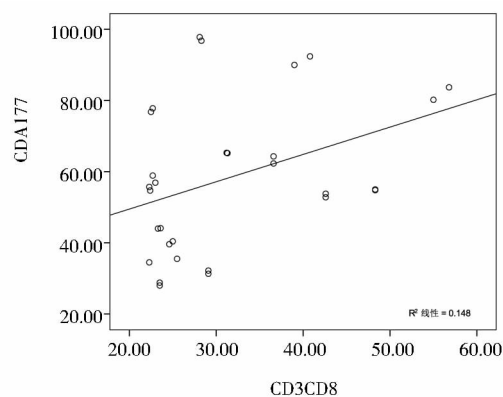
Table 2 The expression of CD177⁺ neutrophils in UC patients with different severity

分组	n	CD177 ⁺ 中性粒细胞%	T 值	P 值
轻度 UC	14	43.2 ± 13.2 *	-5.11	0.000
中度 UC	16	71.8 ± 16.9		

* Compared with control group, $P < 0.01$ 图 2 UC 患者外周血中 CD177⁺ 中性粒细胞%与 Mayo 评分相关性Fig. 2 The correlation between CD177⁺ neutrophils% and Mayo score in UC patients图 3 UC 患者外周血中 CD177⁺ 中性粒细胞%与 ESR 相关性Fig. 3 The correlation between CD177⁺ neutrophils% and ESR in UC patients

3 讨论

炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 是一类多病因引起的、异常免疫介导的肠道慢性及复发性炎症,有终身复发倾向,UC 是炎症性肠病中最常见的

图 4 UC 患者外周血中 CD177⁺ 中性粒细胞%与 CD8⁺ T 淋巴细胞相关性Fig. 4 The correlation between CD177⁺ neutrophils% and CD8⁺ T lymphocytes in UC patients

一种疾病类型。在肠黏膜组织炎症部位,中性粒细胞穿透肠上皮细胞向肠黏膜浸润,引起急性隐窝炎症。CD177 是一种中性粒细胞表面分子,与细胞膜表面的蛋白酶 3 形成复合体,在个体中 CD177⁺ 中性粒细胞的表达率为 0% ~ 100%,其具体的生理作用仍在研究中^[2]。

有研究发现,CD177⁺ 中性粒细胞可能作为中性粒细胞效应细胞的一个重要的亚群,在肠道炎症损伤的免疫病理过程中发挥作用^[3]。有文献报道 CD177⁺ 中性粒细胞与重度 UC 皮质醇激素治疗的临床反应相关^[4],然而 CD177⁺ 中性粒细胞在炎症性肠病中的作用尚不清楚。本研究课题检测了 UC 患者外周血 CD177⁺ 中性粒细胞表达情况,发现 UC 患者外周血 CD177⁺ 中性粒细胞表达较正常人明显增高,提示 CD177⁺ 中性粒细胞与溃疡性结肠炎密切相关,表明 CD177⁺ 中性粒细胞可能在溃疡性结肠炎患者非特异性炎症反应过程发挥作用。进一步分析发现,CD177⁺ 中性粒细胞的表达与 Mayo 评分呈显著正相关,提示 CD177⁺ 中性粒细胞表达可一定程度反映溃疡性结肠炎严重程度。分析 UC 患者外周血 CD177⁺ 中性粒细胞与临床相关指标的关系发现,其与红细胞沉降率 (ESR) 呈显著正相关,表明 CD177⁺ 中性粒细胞表达可考虑作为临床上评估溃疡性结肠炎病情的一项指标。

新近研究发现,T 淋巴细胞功能失调也是炎症性肠病患者持续慢性炎症的重要原因^[5]。IBD 患者的肠道炎症可能主要归因于 CD4⁺ T 细胞亚群,加重炎症反应^[6]。自身反应性 CD8⁺ T 细胞可破坏肠上皮细胞,且

CD8⁺T 细胞的转录特征与 IBD 患者的复发频率存在相关性^[7]。本研究中,分析 UC 患者外周血中 CD177⁺中性粒细胞与淋巴细胞表达关系发现,CD177⁺中性粒细胞与 CD8⁺T 淋巴细胞呈显著正相关,提示 CD177⁺中性粒细胞可能参与 T 淋巴细胞介导的炎症反映,具体机制仍需进一步研究。

综上,CD177⁺中性粒细胞在 UC 患者外周血表达明显增高,且与疾病活动程度密切相关,能够一定程度反映 UC 患者临床疾病活动程度。

致谢: 本研究受到宁夏医科大学校级项目(XY2017179)资助

参考文献

- [1] Beyrau M, Bodkin J V, Nourshargh S, et al. Neutrophil heterogeneity in health and disease: a revitalized avenue in inflammation and immunity. *Open Biol*, 2012,2(11):120134-120134.
- [2] Deng H, Hu N, Wang C, et al. Interaction between CD177 and platelet endothelial cell adhesion molecule-1 downregulates membrane-bound proteinase-3 (PR3) expression on neutrophils and attenuates neutrophil activation induced by PR3-ANCA. *Arthritis Research & Therapy*, 2018, 20(1):213-218.
- [3] 宋洋,杨文静,周广玺等. 中华消化内镜杂志, 2016,3(33):178-182.
- Song Y, Yang W J, Zhou G X, et al. CD177⁺ neutrophils and its correlation with mucosal impairment in patients with inflammatory bowel disease. *Chinese Journal of Digestive Endoscopy*, 2016,3(33):178-182.
- [4] Kabakchiev B, Turner D, Hyams J, et al. Gene expression changes associated with resistance to intravenous corticosteroid therapy in children with severe ulcerative colitis. *PLoS One*, 2010,5(9),e13085.
- [5] Talabur Horje C S, Middendorp S, van Koolwijk E, et al. Naive T cells in the gut of newly diagnosed, untreated adult patients with inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Disease*, 2014, 20(11):1902-1909.
- [6] Carolijn S C, Talabur Horje C S, Drylewicz J, et al. Intestinal T cell profiling in inflammatory bowel disease: linking T cell subsets to disease activity and disease course. *Journal of Crohn's and Colitis*, 2018,12(4):465-475.
- [7] Lee J C, Lyons P A, McKinney E F, et al. Gene expression profiling of CD8⁺T cells predicts prognosis in patients with Crohn disease and ulcerative colitis. *Clinical Investigation*, 2011,121(10):4170-4179.

The Expression and Clinical Significance of CD177⁺ Neutrophils in Patients with Ulcerative Colitis

ZHANG Yan-ting GUO Yu-feng YANG Zhi-hong YANG Shao-qi

Abstract Objective: To analyze the clinical significance of CD177⁺ neutrophils in ulcerative colitis (UC) by comparing the expression differences of CD177⁺ neutrophils in peripheral blood of UC patients with normal controls. Methods: Peripheral blood of 30 UC patients and 20 normal controls were collected, and the expression of neutrophils CD177⁺ was detected by flow cytometry, and compare the expression difference of CD177 in the two groups. Results: The expression of CD177⁺ neutrophils in peripheral blood of UC patients was significantly higher than the normal control group ($P < 0.01$), the expression of CD177⁺ neutrophils in peripheral blood of UC patients was significantly higher than that of the mild UC patients ($P < 0.05$), and the count of CD177⁺ neutrophils in peripheral blood of UC patients was correlated with Mayo score ($r = 0.384, P = 0.036$). Conclusion: The expression of CD177⁺ neutrophils in UC patients was significantly increased and closely related to the activity of the disease, which may reflect the clinical activity of UC.

Key words CD177⁺ Neutrophils Ulcerative colitis Peripheral blood