

【引文格式】张君, 黄涛, 陈文韬, 等. 梅毒患者外周血 B 淋巴细胞亚群的变化及意义[J]. 皮肤性病诊疗学杂志, 2019, 26(3): 129-132. DOI:10.3969/j.issn.1674-8468.2019.03.001.

· 论著 ·

梅毒患者外周血 B 淋巴细胞亚群的变化及意义

张君, 黄涛, 陈文韬, 万筱丽, 杨洁仪, 薛耀华, 柯吴坚, 张晓辉, 王柳苑, 郑和平

(南方医科大学皮肤病医院, 广东 广州 510091)

【摘要】 **目的:**检测梅毒患者外周血中 B 淋巴细胞亚群的比例, 探讨其与疾病活动性的关系。 **方法:**采用流式细胞术检测 18 例未治疗梅毒患者、14 例血清固定者、19 例血清转阴者及 16 例健康正常人外周血中 CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi} 调节性 B 细胞及 CD19⁺ CD24^{int} CD38^{int} 成熟型 B 细胞的比例, 并对结果进行统计分析。 **结果:**未治疗梅毒组、血清固定组及血清转阴组外周血中 CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi} 调节性 B 细胞较正常对照组明显降低, 差异具有统计学意义(t 值分别为 2.10、4.04、2.43, P 值均 < 0.05)。与正常对照组相比, 未治疗梅毒患者及血清固定患者 CD19⁺ CD24^{int} CD38^{int} 成熟型 B 细胞比例均减少, 差异有统计学意义(t 值分别为 3.04、4.44, P 值均 < 0.01), 而血清转阴组成熟型 B 细胞无明显差别($t = 1.03, P > 0.05$)。 **结论:**梅毒患者外周血 CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi} 调节性 B 细胞及 CD19⁺ CD24^{int} CD38^{int} 成熟型 B 细胞与健康正常人相比存在差异, 经过治疗后血清固定组 CD19⁺ CD24^{int} CD38^{int} 成熟型 B 细胞比例异常, 可能与血清固定的形成有关。

【关键词】 梅毒; 调节性 B 细胞; 成熟型 B 细胞; 血清固定

【中图分类号】 R759.1 【文献标识码】 A DOI:10.3969/j.issn.1674-8468.2019.03.001

Significance of B cell subsets in peripheral blood of syphilis patients

ZHANG Jun, HUANG Tao, CHEN Wen-tao, WAN Xiao-li, YANG Jie-yi, XUE Yao-hua, KE Wu-jian, ZHANG Xiao-hui, WANG Liu-yuan, ZHENG He-ping

(Dermatology Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510091, China)

Corresponding author: ZHENG He-ping, E-mail: zhhepf@hotmail.com

【Abstract】 **Objective:** To determine the subpopulations of B cells in peripheral blood of syphilis patients, and its association with syphilis status. **Methods:** Peripheral blood was taken from untreated patients with syphilis (18 cases), syphilitic serofast patients (14 cases), serological cure patients (19 cases) and normal controls (16 cases). Mature and regulatory B cells were detected by flow cytometry. **Results:** Compared with normal controls, the proportions of CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi} regulatory B cells were significantly lower in syphilis patients (versus normal controls, untreated: $t = 2.10, P < 0.05$; serofast: $t = 4.04, P < 0.05$; serological cure: $t = 2.43, P < 0.05$). Moreover, the frequencies of mature CD19⁺ CD24^{int} CD38^{int} B cells were significantly lower in both untreated and serofast patients than in normal controls ($t = 3.04, P < 0.01$ for untreated; $t =$

通信作者: 郑和平, E-mail: zhhepf@hotmail.com

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金 (编号: A2016239、A2016269)

4.44, $P < 0.01$ for serofast). In contrast, proportions of mature $CD19^{+} CD24^{int} CD38^{int}$ B cells in peripheral blood were comparable between serological cure and normal controls ($t = 1.03$, $P > 0.05$). **Conclusions:** The ratio of B cell subsets is different between syphilis patient and normal controls. Proportion of mature B cells in serofast patients is abnormal, possibly due to serofast.

[**Keywords**] syphilis; regulatory B cells; mature B cells; serofast

梅毒是由苍白密螺旋体 (*Treponema pallidum* subsp. *Pallidum*, TP) 感染引起的一种慢性性传播疾病, 发病率呈上升趋势, 成为严重危害人类健康的全球性公共卫生问题。目前, 梅毒的发病机制尚不明确。感染螺旋体后, 患者体内会产生抗梅毒螺旋体的特异性抗体^[1], 提示体液免疫在抵抗螺旋体感染中必不可少。B 淋巴细胞是体液免疫的主要成员, 不仅能分泌免疫球蛋白抗体, 还能作为抗原提呈细胞激活 T 细胞的增殖及分化^[2], 使体液免疫与细胞免疫相互联系, 同时 B 细胞也具有免疫调节作用^[3], 以维持机体免疫系统的稳态。然而 B 细胞亚群在梅毒中的作用却鲜有研究报道。鉴于此, 本文探讨了治疗前后梅毒患者外周血中 $CD19^{+} CD24^{hi} CD38^{hi}$ 调节性 B 细胞及 $CD19^{+} CD24^{int} CD38^{int}$ 成熟型 B 细胞的变化, 为了解梅毒的免疫机制提供一定基础。

1 对象与方法

1.1 研究对象

招募 2016 年 8 月至 2017 年 6 月本院门诊诊断为梅毒的患者 (包括未经治疗患者及梅毒血清固定者) 及同期经正规治疗后血清转阴者、健康志愿者。未治疗梅毒患者诊断条件: TPPA 滴度阳性, TRUST 滴度阳性, 未经过青霉素等药物治疗。梅毒血清固定诊断需满足以下条件之一: ①早期梅毒治疗 6 个月, 晚期梅毒治疗 12 个月后 TRUST 滴度无有效下降 (即下降小于 2 个滴度); ②梅毒治疗后 TRUST 滴度出现有效下降, 但是治疗 12~24 个月后仍然阳性 (低滴度)^[4-6]。所有研究对象均无其他疾病, 未进行抗炎及激素治疗。研究对象均签署知情同意书。实验方案经本院伦理委员会审批通过。

1.2 主要仪器与试剂

FACSCalibur 型流式细胞仪为美国 BD 公司产品。异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的鼠抗人 CD19 抗体、藻红蛋白 (PE) 标记的鼠抗人 CD24、

别藻蓝蛋白 (APC) 标记的鼠抗人 CD38, 红细胞裂解液均为美国 BD 公司产品。

1.3 标本采集及流式细胞仪测定 Breg 亚群

抽取研究对象静脉血, 置 EDTA 抗凝管中, 自采血完毕后 3 h 内进行流式细胞仪检测。采用全血直接染色法: 取全血 100 μ L, 加入下列荧光团标记的抗体: CD19-FITC、CD24-PE、CD38-APC, 各 10 μ L, 与全血充分混合, 室温避光染色 30 min; 加入 3 mL 红细胞裂解工作液, 混匀, 室温避光放置 15 min; 1 500 r/min 离心 3 min; 弃上清, 加入 2 mL PBS 溶液洗涤; 1 500 r/min 离心 3 min; 弃上清, 加入 500 μ L PBS 溶液重悬细胞, 充分混匀, 采用流式细胞仪进行检测, 同时设置对照, 结果由 Flowjo 软件分析生成。根据前向散射及侧向散射特性选择淋巴细胞群, CD19 阳性群为总 B 淋巴细胞, B 细胞上中度表达 CD24、CD38 为 $CD19^{+} CD24^{int} CD38^{int}$ 成熟型 B 细胞; B 细胞上高表达 CD24、CD38 为 $CD19^{+} CD24^{hi} CD38^{hi}$ 调节性 B 细胞^[7-8]。

1.4 统计学分析

应用 GraphPad Prism 5.0 统计软件分析。数据以均数 \pm 标准差表示, 两组间淋巴细胞亚群水平的比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

共招募未治疗梅毒患者 18 例, 其中男 10 例, 女 8 例, 年龄 20~58 岁, 平均 (35.11 ± 2.81) 岁; 血清固定患者 14 例, 其中男 4 例, 女 10 例, 年龄 18~55 岁, 平均 (34.00 ± 2.98) 岁; 正规治疗后血清转阴者 19 例, 其中男 13 例, 女 6 例, 年龄 20~58 岁, 平均 (41.26 ± 2.28) 岁; 正常对照组 16 例, 其中男 9 例, 女 7 例, 年龄 23~65 岁, 平均 (33.75 ± 3.57) 岁。三组间性别 ($\chi^2 = 5.28$, $P = 0.153$)、年龄 ($F = 1.59$, $P = 0.527$) 差异无统计学意义。

2.2 未治疗梅毒患者 B 细胞亚群的分析

检测结果显示,未治疗梅毒患者 CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi}调节性 B 细胞的比例与正常对照组相比明显降低($t=2.10, P=0.044$)。该类患者的 CD19⁺ CD24^{int} CD38^{int}成熟型 B 细胞的比例与对照组比较,数量也明显减少($t=3.04, P=0.005$),差异具有统计学意义,详见表 1。

2.3 梅毒患者治疗后 B 细胞亚群的分析

结果显示,血清固定组 CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi}调节性 B 细胞占总 B 细胞的(1.05 ± 0.16)%,血

清转阴组为(1.62 ± 0.35)%,二者比较无明显差异($t=1.28, P>0.05$),但与正常对照组(2.92 ± 0.41)%比较均明显减少,差异有统计学意义(t 值分别为4.04,2.43, P 值均 <0.05)。此外,血清固定组 CD19⁺ CD24^{int} CD38^{int}成熟型 B 细胞为(31.44 ± 2.88)%,较正常对照组(46.64 ± 1.98)%及血清转阴组(42.36 ± 3.44)%明显减少,差异有统计学意义(t 值分别为 4.44、2.32, P 值均 <0.05)。而正常对照组与血清转阴组相比,差异无统计学意义($t=1.03, P>0.05$)。详见表 1。

表 1 各组 CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi}及 CD19⁺ CD24^{int} CD38^{int}亚群的比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Comparison of the percentage of CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi} and CD19⁺ CD24^{int} CD38^{int} subpopulation among untreated patients, serofast, serological cure and normal controls (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD38 ^{hi}	t 值	P 值	CD19 ⁺ CD24 ^{int} CD38 ^{int}	t 值	P 值
		调节性 B 细胞			成熟型 B 细胞		
未治疗梅毒组	18	1.78 \pm 0.36	2.10	0.044	35.57 \pm 2.94	3.04	0.005
血清固定组	14	1.05 \pm 0.16	4.04	<0.05	31.44 \pm 2.88	4.44	<0.05
血清转阴组	19	1.62 \pm 0.35	2.43	<0.05	42.36 \pm 3.44	1.03	>0.05
正常对照组	16	2.92 \pm 0.41	—	—	46.64 \pm 1.98	—	—

注: t 值、 P 值均为与正常对照组比较结果。

3 讨论

既往研究报道显示,CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi}调节性 B 细胞缺陷会导致炎症及自身免疫紊乱,而调节性 B 细胞过多则造成免疫抑制^[9]。自身免疫性疾病,如系统性红斑狼疮^[7]、类风湿性关节炎^[8, 10]及重症肌无力^[11],该类患者均出现 CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi}调节性 B 细胞数量及功能缺陷,导致 IL-10 分泌减少而无法抑制 Th1、Th17 免疫反应及诱导调节性 T 细胞分化。与此相反,在 HIV 及 HBV 感染中,CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi}调节性 B 细胞数量增加,与病毒载量成正相关,能够抑制效应 T 细胞而诱导调节性 T 细胞分化^[12-13]。本研究结果表明,梅毒患者总 B 细胞与正常对照组相比无差异,但患者体内 B 细胞亚群已发生变化。CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi}调节性 B 细胞在治疗前梅毒患者、血清固定者及血清转阴者体内的数量均减少。提示 TP 感染可能引起患者出现自身免疫反应,而不同于 HIV 及 HBV 感染性疾病。

梅毒患者经过正规治疗后,会出现两种群体:血清固定和血清转阴者。前者的非梅毒螺旋体抗

体滴度长期保持在低水平,后者则为阴性。血清固定发生的原因尚不明确,其机制研究主要集中于三个方面。一是血清固定患者的细胞免疫异常,出现严重的 Th1/Th2 免疫失衡及细胞免疫抑制,导致清除梅毒螺旋体的能力减弱^[14];二是梅毒螺旋体能够逃避机体免疫反应,造成慢性感染^[15];三是血清固定的判断依赖于非梅毒螺旋体抗体(即抗心磷脂抗体),该抗体可能是针对受损组织释放的心磷脂而产生的,同样见于系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎等自身免疫性疾病^[16-17],所以梅毒螺旋体感染可能诱发自身免疫反应。本研究发现,CD19⁺ CD24^{int} CD38^{int}成熟型 B 细胞在治疗前梅毒患者及血清固定者体内的比例降低,而在血清转阴者中无明显变化,且在血清固定组及血清转阴组间具有明显差异(P 值均 <0.05)。推测血清固定患者 B 细胞分化异常,成熟型 B 细胞减少而记忆性 B 细胞增多,可能与持续分泌非梅毒螺旋体抗体有关。但本文未深入研究记忆性 B 细胞与不同病期梅毒患者的相关性,以及 B 细胞亚群在梅毒血清转归发展中的作用机制,有待下一步研究。

综上,本文对梅毒患者外周血 B 细胞亚群进行了初步探讨,发现未治疗梅毒患者 CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi} 调节性 B 细胞及 CD19⁺ CD24^{int} CD38^{int} 成熟型 B 细胞数量受损,经过治疗后血清转阴者 CD19⁺ CD24^{int} CD38^{int} 成熟型 B 细胞比例得以恢复,而血清固定者仍然缺乏成熟型 B 细胞。但该表型与梅毒转归的机制及 B 细胞亚群功能的探讨,仍有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] SUN R, LAI D H, REN R X, et al. Treponema pallidum-specific antibody expression for the diagnosis of different stages of syphilis [J]. Chin Med J, 2013, 126 (2):206-210.
- [2] CRAWFORD A, MACLEOD M, SCHUMACHER T, et al. Primary T cell expansion and differentiation in vivo requires antigen presentation by B cells[J]. J Immunol, 2006, 176 (6):3498-3506.
- [3] DING T, YAN F, CAO S, et al. Regulatory B cell: new member of immunosuppressive cell club[J]. Hum Immunol, 2015, 76 (9):615-621.
- [4] SENA A C, ZHANG X H, LI T, et al. A systematic review of syphilis serological treatment outcomes in HIV-infected and HIV-uninfected persons: rethinking the significance of serological non-responsiveness and the serofast state after therapy[J]. BMC Infect Dis, 2015, 15:479.
- [5] 柯吴坚,杨斌,译. 2015 美国疾病预防控制中心性传播疾病(梅毒)治疗指南[J]. 皮肤性病诊疗学杂志, 2015, 22(4):343-344.
- [6] 杨立刚. 梅毒治疗后的血清学变化[J]. 皮肤性病诊疗学杂志, 2013, 20(1):60-61,65.
- [7] BLAIR P A, NORENA L Y, FLORES-BORJA F, et al. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients[J]. Immunity, 2010, 32 (1):129-140.
- [8] FLORES-BORJA F, BOSMA A, NG D, et al. CD19⁺ CD24^{hi}CD38^{hi} B cells maintain regulatory T cells while

limiting TH1 and TH17 differentiation [J]. Sci Transl Med, 2013, 5 (173):173ra23.

- [9] MAURI C, MENON M. The expanding family of regulatory B cells[J]. Int Immunol, 2015, 27 (10):479-486.
- [10] CHEN M, ZHANG L, REN Y, et al. Defective function of CD24(+) CD38(+) regulatory B cells in ankylosing spondylitis[J]. DNA Cell Biol, 2016, 35 (2):88-95.
- [11] SHENG J R, REZANIA K, SOLIVEN B. Impaired regulatory B cells in myasthenia gravis[J]. J Neuroimmunol, 2016, 297:38-45.
- [12] LIU Y, CHENG L S, WU S D, et al. IL-10-producing regulatory B-cells suppressed effector T-cells but enhanced regulatory T-cells in chronic HBV infection[J]. Clin Sci (Lond), 2016, 130 (11):907-919.
- [13] SIEWE B, STAPLETON J T, MARTINSON J, et al. Regulatory B cell frequency correlates with markers of HIV disease progression and attenuates anti-HIV CD8⁺ T cell function in vitro[J]. J Leukoc Biol, 2013, 93 (5):811-818.
- [14] PODWINSKA J, LUSIAK M, ZABA R, et al. The pattern and level of cytokines secreted by Th1 and Th2 lymphocytes of syphilitic patients correlate to the progression of the disease [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2000, 28 (1):1-14.
- [15] GIACANI L, MOLINI B J, KIM E Y, et al. Antigenic variation in Treponema pallidum: TprK sequence diversity accumulates in response to immune pressure during experimental syphilis [J]. J Immunol, 2010, 184 (7):3822-3829.
- [16] BARUTCU A, AKSU F, OZCELIK F, et al. Evaluation of early cardiac dysfunction in patients with systemic lupus erythematosus with or without anticardiolipin antibodies[J]. Lupus, 2015, 24 (10):1019-1028.
- [17] SHERER Y, GERLI R, GILBURD B, et al. Thickened carotid artery intima-media in rheumatoid arthritis is associated with elevated anticardiolipin antibodies [J]. Lupus, 2007, 16 (4):259-264.

[收稿日期] 2019-03-19

[修回日期] 2019-05-21