

退白颗粒联合 NB-UVB 对白癜风患者外周血 T 细胞亚群的影响

赵婧, 盛国荣, 严霞*, 谢勇

(南通市疾病预防控制中心皮肤病性病防治所, 江苏 南通 226007)

摘要:**目的** 检测白癜风患者外周血 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞及 $CD4^+CD25^+$ 调节性 T 细胞 (Treg) 的水平, 同时对退白颗粒联合 NB-UVB 治疗后两者的水平进行检测, 探讨两者与该病的关系。**方法** 采用流式细胞仪对 120 例白癜风患者及 30 例健康对照组外周血 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞及 $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞水平进行检测, 同时 120 例患者分为 3 组, 各 40 例。联合治疗组采用退白颗粒联合 NB-UVB 治疗、对照 I 组采用单独 NB-UVB 治疗, 对照 II 组采用退白颗粒治疗, 疗程为 3 月, 对 3 组患者治疗前后 $CD4^+/CD8^+$ 比值及 $CD4^+CD25^+$ Treg 水平与健康对照组进行比较。**结果** 白癜风患者外周血 $CD4^+$ T 淋巴细胞明显降低, 而 $CD8^+$ T 淋巴细胞则明显升高, 与健康对照组比较均有统计学差异 ($P < 0.01$); 进展期患者 $CD4^+/CD8^+$ 比值明显低于稳定期 ($P < 0.01$), 稳定期与健康对照组比较无统计学差异 ($P > 0.05$); 白癜风患者 $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞百分率明显低于健康对照组 ($P < 0.01$), 且进展期患者 $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞比稳定期下降更明显 ($P < 0.01$)。采用退白颗粒联合 NB-UVB 治疗后 $CD4^+/CD8^+$ 比值及 $CD4^+CD25^+$ Treg 明显上调, 与单独 NB-UVB 和单独退白颗粒治疗比较, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。**结论** $CD4^+/CD8^+$ 比值的失衡与 $CD4^+CD25^+$ Treg 数量的异常可能参与了白癜风的发病, 退白颗粒联合 NB-UVB 可能通过调节两者的水平对该病发挥治疗作用。

关键词: 白癜风; NB-UVB; $CD4^+/CD8^+$ T 细胞比值; $CD4^+CD25^+$ Treg

中图分类号: R275 文献标志码: A 文章编号: 1672-0482(2016)01-0017-04

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2016.0017

Effects of NB-UVB Combined with Tuibai Granule on $CD4^+/CD8^+$ Tlymphocyte Ratio and $CD4^+CD25^+$ Treg in the Peripheral Blood of Vitiligo Patients

ZHAO Jing, SHENG Guo-rong, YAN Xia*, XIE Yong

(Skin and Venereal Disease Prevention and Treatment Institute, Nantong Center for Disease Control and Prevention, Nantong, 226007, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To detect the expression levels of $CD4^+$, $CD8^+$ Tlymphocytes and $CD4^+CD25^+$ Treg in the peripheral blood of patients with vitiligo after the treatment of NB-UVB combined with Tuibai Granule, and then explore the relationship between vitiligo pathogenesis and the levels of $CD4^+$, $CD8^+$ Tlymphocytes as well as $CD4^+CD25^+$ Treg. **METHODS**

The expression levels of $CD4^+$, $CD8^+$ Tlymphocytes and $CD4^+CD25^+$ Treg were detected by FlowCytometry among 120 cases of vitiligo patients and 30 cases of healthy control group. Then the 120 cases were further divided into three groups, with 40 cases in each group. Patients in the treatment group were treated with NB-UVB combined with Tuibai Granule; Patients in the control group I were only given NB-UVB, while those in the control group II only took Tuibai Granule. After 3 months treatment, the changes of the $CD4^+/CD8^+$ ratio and the expression levels of $CD4^+CD25^+$ Treg were once again tested and the comparison was made among the four groups. **RESULTS** The $CD4^+$ Tlymphocytes level in the peripheral blood decreased significantly, while the $CD8^+$ Tlymphocytes level increased evidently. There were significant statistical differences when compared with the healthy control group ($P < 0.01$); The $CD4^+/CD8^+$ ratio of the progressive stage was much lower than that of the stable stage ($P < 0.01$); the $CD4^+/CD8^+$ ratio of the stable stage had no statistical difference when compared to that of the healthy control group ($P > 0.05$). The frequency of $CD4^+$, $CD25^+$ Treg of vitiligo patients was significantly lower than that of healthy control group ($P < 0.01$), and the frequency of $CD4^+$, $CD25^+$ Treg of the progressive stage was also lower than that of the stable stage ($P < 0.01$). After treatment with NB-UVB combined with Tuibai Granule, the $CD4^+/CD8^+$ ratio and the frequency of $CD4^+$, $CD25^+$ Treg were significantly up-regulated compared with either the control group I or the control group II ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **CONCLUSION** These findings suggest that the abnormal level of $CD4^+/CD8^+$ ratio and the frequency of $CD4^+$, $CD25^+$ Treg might be involved in the vitiligo pathogenesis. NB-UVB combined with Tuibai Granule can prevent viti-

收稿日期: 2015-10-10; 修稿日期: 2015-11-21

基金项目: 南通市市级科技计划项目 (HS149131); 南通市卫生局青年医学人才科研基金 (WQ2015074)

作者简介: 赵婧 (1980-), 女, 山西长治人, 南通市疾病预防控制中心主治医师。* 通信作者: ntsgr@126.com

ligo by regulating the $CD4^+/CD8^+$ ratio and the frequency of $CD4^+$, $CD25^+$ Treg.

KEY WORDS: vitiligo; NB-UVB; $CD4^+/CD8^+$ T lymphocyte ratio; $CD4^+$, $CD25^+$ Treg

白癜风是获得性的以色素脱失为特征的常见皮肤科疾病,该病的确切发病机制目前尚不清楚,但是自身免疫机制已经被证实在该病的发生中有着重要的作用。目前一些研究结果对于白癜风患者外周血 $CD4^+/CD8^+$ 比值及 Treg 水平的变化仍存在争议,因此,本实验的目的首先对白癜风患者与健康对照组外周血 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞及 $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞水平进行比较,其次比较采用退白颗粒联合 NB-UVB 治疗后两者的变化情况,分析白癜风的发生发展与这些 T 细胞亚群的关系。

1 临床资料

1.1 一般资料

120 例白癜风患者均为我中心皮防所门诊 2012 年 3 月—2015 年 6 月临床诊断明确的白癜风患者,其中男 64 例,女 56 例,年龄 13~68 岁,平均 (29.3 ± 9.4) 岁,病程 3 月至 18 a,平均 (4.8 ± 2.7) a。治疗前均进行临床分型、分期^[1],其中局限型 47 例,节段型 11 例,肢端型 25 例,散发型 37 例;皮损面积 5~250 cm^2 ,平均 $(68.4 \pm 17.9) cm^2$;面颈部皮损 97 片,躯干部 212 片,四肢 84 片,肢端关节 55 片。进展期 68 例,稳定期 52 例。

治疗分组采用随机数字表抽样分为 3 组,各 40 例,3 组患者年龄、性别、皮损面积、病程、病期等均无显著性差异 ($P > 0.05$),具有可比性。30 例健康对照者均来自我中心体检门诊,男 16 例,女 14 例,年龄 16~62 岁,与白癜风组性别、年龄比较,无统计学差异 ($P > 0.05$)。本研究通过我中心医学伦理委员会批准,患者及健康对照者均签署知情同意书。

1.2 排除标准

①1 a 内进行过系统治疗,半月内进行过 NB-UVB 照射治疗及其他局部治疗者;②对退白颗粒组方中中药成分过敏者;③伴有其他自身免疫性疾病或严重系统疾病者;④妊娠期、哺乳期妇女。

1.3 主要仪器和试剂

流式细胞仪为 BD 公司 FACS Calibur 流式细胞仪,主要试剂异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记抗人 CD4 抗体,藻红蛋白 (CD8-PE) 标记抗人 CD8 抗体,藻红蛋白 (CD25-PE) 标记抗人 CD25 抗体,小鼠免疫球蛋白 G (IgG) 同型对照及 PE 标记小鼠同型对照的抗体等均购自美国 BD Biosciences 公司。

2 方法

2.1 治疗方法

联合治疗组给予 NB-UVB (德国 Waldmann 公司,型号:UV100L) 照射患处,每周 2 次,NB-UVB 峰值为 311 nm。初始剂量为 $0.6 J/cm^2$,每次剂量增加 10%~20%,患者出现红斑反应后按照该剂量维持治疗,照射时需对眼睛、外生殖器及正常的皮肤进行必要防护;同时给予我所研制的退白颗粒 (目前药物剂型为江阴天江药业生产的无糖型颗粒剂) 1 剂 (相当于原药材当归 10 g,丹参 10 g,白蒺藜 30 g,炙黄芪 10 g,鸡血藤 15 g,何首乌 15 g,补骨脂 10 g,红花 10 g,陈皮 10 g,乌梢蛇 10 g,白芷 15 g,菟丝子 15 g,黑豆衣 10 g) 内服,服用方法:加水 200 mL 冲服,早晚各 100 mL,疗程为 3 月;对照 I 组单独给予 NB-UVB 照射治疗,对照 II 组单独给予退白颗粒治疗,方法和疗程同联合治疗组。

2.2 外周血 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞及 $CD4^+CD25^+$ Treg 水平的测定

采集 120 例白癜风患者治疗前后和 30 例健康对照者空腹静脉肝素抗凝血 5 mL,摇匀后 6 h 内检测,吸取抗凝全血 100 μL ,加抗 CD3-FITC、抗 CD4-PE 抗体各 10 μL ,严格按照试剂盒操作步骤上流式细胞仪检测 $CD3^+CD4^+$ T 淋巴细胞,同理用 CD3-FITC、抗 CD8-PE 抗体检测 $CD3^+CD8^+$ T 细胞,用 CD4-FITC、抗 CD25-PE 抗体检测 $CD4^+CD25^+$ Treg,并利用功能软件得到 $CD4^+/CD8^+$ 比值和 $CD4^+CD25^+$ Treg 亚群占淋巴细胞总数的百分比。

2.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析, $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞、 $CD4^+/CD8^+$ T 细胞比值及 $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞百分率表达参数均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料 2 组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 白癜风患者与健康对照组外周血 T 淋巴细胞亚群的检测结果

白癜风患者 $CD4^+$ T 淋巴细胞较健康对照组明显降低,而 $CD8^+$ T 淋巴细胞则明显升高,与健康对照组比较均有统计学差异 ($P < 0.01$),白癜风患者 $CD4^+/CD8^+$ T 细胞比值和 $CD4^+CD25^+$ Treg 水平

均明显低于健康对照组($P<0.01$),见表 1。

表 1 白癜风患者与健康对照组外周血 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞、CD4⁺/CD8⁺ 比值及 CD4⁺CD25⁺ Treg 水平检测结果比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	CD4 ⁺ /%	CD8 ⁺ /%	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs/%
白癜风患者	120	35.26±4.21 ^{* *}	30.15±4.27 ^{* *}	1.12±0.28 ^{* *}	10.61±2.29 ^{* *}
健康对照组	30	40.15±5.65	25.87±3.89	1.55±0.40	17.85±3.32

注:2 组间比较, * * $P<0.01$ 。

3.2 不同分期白癜风患者外周血 CD4⁺/CD8⁺ 比值及 CD4⁺CD25⁺ Treg 水平比较

进展期白癜风患者 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比值和 CD4⁺CD25⁺ Treg 水平均明显低于稳定期,差异有统计学意义($P<0.01$);稳定期患者 CD4⁺/CD8⁺ 与健康对照组比较无显著性差异($P>0.05$),而 CD4⁺CD25⁺ Treg 水平明显低于健康对照组($P<0.05$)。见表 2。

表 2 不同分期白癜风患者与健康对照组外周血 CD4⁺/CD8⁺ 比值及 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞检测结果比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg/%
进展期	68	0.97±0.19 ^{* *}	8.75±1.86 ^{* *}
稳定期	52	1.38±1.16	12.79±2.54 [#]
健康对照组	30	1.55±0.40	17.85±3.32

注:与稳定期比较, * * $P<0.01$;与健康对照组比较, # $P<0.05$, # # $P<0.01$ 。

3.3 3 组患者治疗前后与健康对照组外周血 CD4⁺/CD8⁺ 比值及 CD4⁺CD25⁺ Tregs 水平比较

治疗后,联合治疗组 CD4⁺/CD8⁺ 明显高于 NB-UVB 组和退白颗粒组($P<0.01$),联合治疗组与健康对照组比较未见统计学差异($P>0.05$);联合治疗组 CD4⁺CD25⁺ Tregs 水平明显高于 NB-UVB 组和退白颗粒组($P<0.05\sim 0.01$),但仍显著低于健康对照组($P<0.01$),见表 3。

表 3 3 组白癜风患者治疗前后与健康对照组外周血 CD4⁺/CD8⁺ 比值及 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞检测结果比较($\bar{x}\pm s$)

组别	时间	例数	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs/%
联合治疗组	治疗前	40	1.05±0.20	9.26±2.43
	治疗后	40	1.42±0.37 ^{* *}	14.67±3.01 ^{* *}
对照 I 组	治疗前	40	1.13±0.25	10.15±3.31
	治疗后	40	1.18±0.29 [#]	12.52±2.89 [#]
对照 II 组	治疗前	40	1.06±0.19	9.97±2.67
	治疗后	40	1.10±0.32 [#]	13.10±3.41 [#]
健康对照组		30	1.55±0.40	17.85±3.32 [#]

注:与治疗前比较, * * $P<0.01$,与联合治疗组比较, # $P<0.05$, # # $P<0.01$ 。

4 讨论

目前较多的证据表明白癜风的发病与自身免疫密切相关^[2-3],尤其是与 T 淋巴细胞关系密切,成熟阶段的 T 淋巴细胞以表达 CD4⁺ 和 CD8⁺ 分子为其特点。近年来,国内外较多学者^[4-5] 认识到白癜风患者体内存在 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞比例的失调,认为 CD4⁺/CD8⁺ 比值的降低,导致了体内细胞免疫的紊乱的状态,其中细胞毒性 T 淋巴细胞(CD8⁺ T)表达的增强可直接杀伤黑素细胞,或者通过间接分泌 IL-17、IFN- γ 、TNF- α 等炎性细胞因子诱导黑素细胞的凋亡,在白癜风发病中发挥作用。调节性 T 细胞(Treg)是由初始 CD4⁺ T 细胞分化而来的一种具

有免疫抑制及免疫无能双重作用的 T 细胞亚群,可抑制 CD4⁺ 及 CD8⁺ T 细胞的免疫应答,进而维持机体免疫平衡,且 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞无论是数量减少或功能异常都可能导致自身免疫反应性疾病的发生^[6-7]。有学者研究表明^[8],进展期白癜风患者外周血存在 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞数量降低,推测当机体产生足够量的 CD4⁺CD25⁺ Treg 来对抗自身免疫性 T 细胞时,病情可稳定或缓解。本实验结果显示白癜风患者存在着外周血 CD4⁺/CD8⁺ 比值和 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞百分率的降低,且和病情明显相关,稳定期 CD4⁺/CD8⁺ 比值未见明显的降低,进展期患者 CD4⁺/CD8⁺ 比值明显下降,CD4⁺

CD25⁺Treg 细胞百分率在稳定期患者也检测出与健康对照组比较明显的下调,结果均提示白癜风与 T 淋巴细胞介导的免疫紊乱关系密切。

我所采用退白颗粒联合 NB-UVB 照射治疗在前期的临床研究中已证实对寻常型白癜风患者有很好的临床疗效,疗效明显优于单独退白颗粒或 NB-UVB 治疗^[9]。NB-UVB 可能通过刺激促黑激素(MSH)产生、促细胞因子分泌、促黑素细胞增殖及黑素生成以及对移行和增殖的黑素细胞发挥保护作用等对白癜风发挥治疗作用^[10];退白颗粒组方中的当归、白蒺藜、丹参为君,养血润肤祛风;炙黄芪、鸡血藤、补骨脂、何首乌、红花、陈皮为臣,滋养肝肾、理气活血;乌梢蛇、白芷、菟丝子为佐,祛风发散通络;黑豆衣为使,补肾养血、祛风调气。全方配伍治疗白癜风,具有养血益肤、祛风通络之功;且组方中补骨脂、白蒺藜等能够提高皮肤对于 NB-UVB 照射的敏感性,加速黑素的生物合成;当归、丹参等能明显改善局部微循环,促进黑素运转和弥散,促进皮损部位黑素的再生;退白颗粒与 NB-UVB 联合既减少了 NB-UVB 照射剂量,降低了 NB-UVB 照射可使机体罹患肿瘤的风险,又克服了单用退白颗粒治疗白癜风起效较慢,周期长等缺点。动物实验表明:退白颗粒对小鼠的体液免疫及 T 细胞介导的免疫反应有一定的调节作用^[11],且长期服用无毒性反应,安全有效。NB-UVB 联合退白颗粒治疗白癜风,疗效明显增强,考虑两者作用机制存在一定的协同作用,但其具体的机制尚不明确,本实验进一步研究联合疗法对白癜风患者外周血 CD4⁺/CD8⁺ 比值及 CD4⁺CD25⁺Tregs 水平的影响,结果表明联合治疗可明显上调外周血 CD4⁺/CD8⁺ 比值及 CD4⁺CD25⁺Tregs 水平,且上调作用明显优于单独退白颗粒或 NB-UVB 治疗,尤其是 CD4⁺CD25⁺Tregs 水平,治疗后与健康对照组无显著性差异,证实了两者联合可以调节机体免疫紊乱的状态,结合笔者前期研究结果退白颗粒对于白癜风患者外周血的 IL-17、IL-22、IL-6、TGF- β 等细胞因子有明显的调节作用^[12-13],由此可见,退白颗粒联合 NB-UVB 可能通过对外周血免疫细胞平衡的调节作用,进而影响到细胞因子的表达水平,促使机体的免疫功能达到新的动态平衡,发挥对白癜风较好的治疗作用。

参考文献:

[1] 中国中西医结合学会皮肤病专业委员会色素病学组.黄褐斑和白癜风的诊断标准(2010 年版)[J].中华皮肤科杂志,2010,43

(6):373.

- [2] Abu Tahir M, Pramod K, Ansari SH, et al. Current remedies for vitiligo[J]. Autoimmun Rev, 2010, 9(7): 516-520.
- [3] Guerra L, Dellambra E, Brescia S, et al. Vitiligo: pathogenetic hypotheses and targets for current therapies[J]. Curr Drug Metab, 2010, 11(5): 451-467.
- [4] Pichler R, Sfetos K, Badics B, et al. Lymphocyte imbalance in vitiligo patients indicated by elevated CD4⁺/CD8⁺ T-cell ratio[J]. Wien Med Wochenschr, 2009, 159: 337-341.
- [5] 姜昱,雷立清,叶楠,等.白癜风患者外周血 CD4⁺、CD8⁺ 检测及免疫调节剂对其影响[J].中国皮肤性病学杂志,2009,23(5): 287-288.
Jiang Y, Lei LQ, Ye N, et al. Exploration of CD4⁺ and CD8⁺ in the peripheral blood of patients with vitiligo and immunomodulator effects on CD4⁺ and CD8⁺[J]. Chin J Dermatovenereol, 2009, 23(5): 287-288.
- [6] Jiang S, Lechler RI. CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell therapy for allergy, autoimmune disease and transplant rejection[J]. Inflamm Allergy Drug Targets, 2006; 239-242.
- [7] Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. The deviated balance between regulatory T cell and Th17 in autoimmunity[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2012, 34(5): 727-739.
- [8] 白明辉,王竞,涂彩霞,等.白癜风患者外周血 CD4⁺CD25⁺调节 T 细胞的检测[J].中华皮肤科杂志,2009,42(7): 460-462.
Bai MH, Wang J, Xu CX, et al. Exploration of CD4⁺CD25⁺ Treg in the peripheral blood of patients with vitiligo[J]. Chin J Dermatovenereol, 2009, 42(7): 460-462.
- [9] 王健,谢勇,盛国荣. NB-UVB 联合退白汤治疗白癜风的临床研究[J].中药药理与临床,2013,29(2): 187-189.
Wang J, Xie Y, Sheng GR, et al. Clinical research on NB-UVB combined with tuibai decoction in treating patients with vitiligo[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2013, 29(2): 187-189.
- [10] 陈鹏,蒋献.窄谱中波紫外线治疗皮肤病的作用机制[J].国际皮肤性病学杂志,2007,33(1): 33-35.
Chen P, Jiang X. Functional mechanism of narrow spectrum uvb rays on dermatosis[J]. Intern J Dermatovenereol, 2007, 33(1): 33-35.
- [11] 盛国荣,谢勇.退白汤对小鼠免疫功能的调节作用[J].中药药理与临床,2012,28(1): 160-162.
Sheng GR, Xie Y. Immunological regulation of tuibai decoction on rats[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2012, 28(1): 160-162.
- [12] 盛国荣,谢勇,严霞,等. NB-UVB 联合退白汤治疗寻常型白癜风的疗效及对 Th17 相关因子的调节作用[J].中国皮肤性病学杂志,2015,29(5): 517-520.
Sheng GR, Xie Y, Yan X, et al. Effects of NB-UVB combined with tuibai decoction in treating ordinary type of vitiligo and its regulation of Th17 and relevant factors[J]. Chin J Dermatovenereol, 2015, 29(5): 517-520.
- [13] 盛国荣,丁晓云,刘海琴,等.退白汤联合 NB-UVB 对寻常型白癜风患者 IL-6 和 TGF- β 表达水平的影响[J].中药药理与临床,2015,31(4): 207-211.
Sheng GR, Ding XY, Liu HQ, et al. Influence of NB-UVB combined with tuibai decoction on IL-6 and TGF- β expression in patients with ordinary type of vitiligo[J]. Pharm Clin Chin Mater Med, 2015, 31(4): 207-211.

(编辑:周建英)