

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.05.019

SLE 患者外周血滤泡辅助性 T 细胞的检测及其临床意义

赵珊,俞娟,张虹[△]

(云南省第一人民医院风湿免疫科,云南昆明 650032)

[摘要] **目的** 探讨滤泡辅助性 T 细胞(Tfh)在系统性红斑狼疮(SLE)患者外周血的比例及其临床意义。**方法** 收集 60 例 SLE 患者(SLE 组)及 60 例健康体检者(对照组)外周血,采用流式细胞术方法检测 CXCR5⁺ICOS⁺的 CD4⁺T 细胞(即 Tfh 细胞)的比例,并分析 Tfh 细胞比例与患者疾病活动度及自身抗体的相关性。**结果** SLE 组患者外周血 Tfh 细胞比例明显高于对照组($t=5.830, P<0.01$),且 SLE 活动组明显高于 SLE 稳定组($t=7.313, P<0.01$),但狼疮肾炎组患者 Tfh 比例与无肾炎狼疮组比较,差异无统计学意义($t=0.986, P=0.328$)。SLE 患者外周血 Tfh 细胞比例与疾病活动度、血清总 IgG、抗核抗体滴度及抗 ds-DNA 均呈正相关($P<0.05$)。**结论** SLE 患者外周血 Tfh 细胞的比例升高可能与患者疾病的发生及发展有关。

[关键词] 红斑狼疮,系统性;滤泡辅助性 T 细胞;自身抗体

[中图分类号] R392.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)05-0636-03

Detection and clinical significance of peripheral blood follicular helper T cells in SLE patients

Zhao Shan, Yu Juan, Zhang Hong[△]

(Department of Rheumatology, the First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the percentage of peripheral blood follicular helper T (Tfh) cells and its clinical significance in the patients with systemic lupus erythematosus (SLE). **Methods** 60 patients with SLE(SLE group) and 60 individuals undergoing the healthy physical examination (control group) were collected and detected the percentage of CXCR5⁺ICOS⁺CD4⁺T cells by using the flow cytometry. The correlation between Tfh cells with the disease activity of SLE and auto-antibodies was also analyzed. **Results** The percentage of peripheral blood Tfh cells in SLE patients was significantly higher than that in the control group ($t=5.830, P<0.01$), moreover the active SLE group was significantly higher than the stable SLE group ($t=7.313, P<0.01$); but the percentage of Tfh cells had no statistical difference between the lupus nephritis group and the non-lupus nephritis group ($t=0.986, P=0.328$). The percentage of peripheral blood Tfh cells had significantly positive correlation with the disease activity index (DAI) of SLE, serum total IgG, anti-nuclear antibody (ANA) titer and anti-ds-DNA. **Conclusion** Increase of peripheral blood Tfh cells percentage in the SLE patients might contribute to the occurrence and development of SLE.

[Key words] lupus erythematosus, systemic; follicular helper T cells; autoantibodies

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种累及多个器官的慢性系统性自身免疫病,其发病机制极其复杂。B 细胞的异常活化及大量自身抗体的产生是其一个重要的病理特征^[1],但 B 细胞的活化、分化及抗体的产生都离不开 CD4⁺T 细胞的辅助。滤泡辅助性 T 细胞(follicular helper T cells, Tfh)是近年来新发现的一群细胞,高表达趋化因子 CXCR5,定位于淋巴器官的淋巴滤泡,是真正辅助 B 细胞产生抗体的 CD4⁺T 细胞^[2-3]。动物实验已证明 Tfh 细胞的数量和功能异常增强能导致小鼠淋巴生发中心增多,自身抗体水平增加,并表现为系统性自身免疫病的症状^[4]。本文通过检测 SLE 患者外周血中 Tfh 细胞的比例,并分析其与疾病活动度及自身抗体水平的相关性,探索 Tfh 细胞在人 SLE 疾病发生、发展中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2009 年 6 月至 2014 年 8 月来本院风湿科就诊的 SLE 患者 60 例(SLE 组),其中男 5 例,女 55 例;年龄 21~58 岁,平均(37.62±9.81)岁。SLE 的诊断均按照 1997 年美国风湿病学会制定的诊断标准^[5]。采用 SLE 疾病活动度(SLE disease activity index, SLEDAI)对 SLE 患者进行评

分, SLEDAI≥8 分为 SLE 活动组, SLEDAI<8 分为 SLE 稳定组^[6];另外,根据患者是否合并肾炎将 SLE 患者分为狼疮肾炎组(平均 SLEDAI 为 8.43 分)和无肾炎狼疮组(平均 SLEDAI 为 8.25 分)。选择同时期来本院进行健康体检者 60 例(对照组),男 7 例,女 53 例;年龄 20~61 岁,平均(38.43±9.76)岁,排除各种自身免疫病及肝肾功能不全等疾病。

1.2 方法

1.2.1 流式细胞术检测 Tfh 细胞 无菌采取抗凝外周血 5 mL,加 5 mL 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)混匀后,轻轻叠加至 10 mL 淋巴细胞分离液 Ficoll(Sigma 公司)上,2 000 r/min 离心 20 min 后吸取中间白色单个核细胞层;以 PBS 洗涤 2 次后加入抗体组合 CD3-Percp, CD4-APC, CXCR5-FITC, ICOS-PE 各 1 μL,室温孵育 30 min;加 PBS 洗涤 2 遍,重悬于 200 μL PBS 中上机检测。将 CXCR5⁺ICOS⁺的 CD4⁺T 细胞定义为 Tfh 细胞^[7]。

1.2.2 血清自身抗体检测 血清总 IgG 及抗核抗体(anti-nuclear antibody, ANA)的测定采用间接免疫荧光法,试剂盒购自 Bio-Rad 公司;血清抗 ds-DNA 抗体测定采用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA),试剂盒购自

作者简介:赵珊(1972—),副主任医师,硕士研究生,主要从事结缔组织病合并肺间质纤维化、肺动脉高压、感染、冠心病的临床诊治研究。

[△] 通讯作者, Tel: 13577008899; E-mail: 0428zhanghong@sina.com。

Seraamun Diadnostic GmbH 诊断公司。操作均严格按照试剂盒的要求进行。

1.3 统计学处理 采用 SPSS14.0 进行统计分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用非配对 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

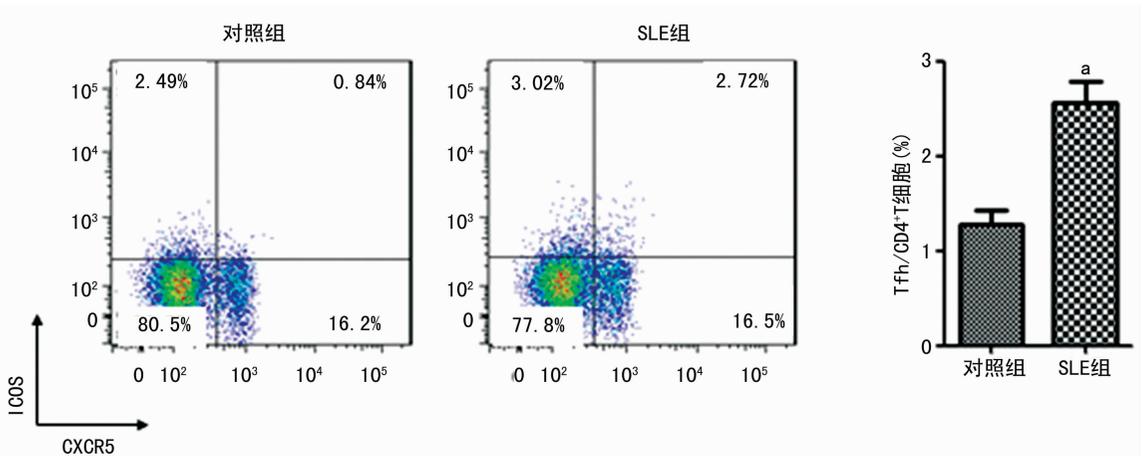
2 结果

2.1 两组对象外周血 Tfh 细胞百分比比较 对照组外周血 Tfh 细胞在 CD4⁺ T 细胞所占的比例为 (1.28 ± 0.94)%, SLE 组患者外周血 Tfh 细胞的比例为 (2.57 ± 1.44)%, 两组比较差异有统计学意义 ($t = 5.830, P < 0.01$), 见图 1。

2.2 SLE 组患者各亚组间 Tfh 细胞百分比比较 SLE 活动

组外周血 Tfh 细胞为 (3.43 ± 1.05)%, 显著高于 SLE 稳定组 (1.55 ± 0.86)% 及对照组 (1.28 ± 0.94)%, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), SLE 稳定组 Tfh 细胞比例略高于对照组, 但差异无统计学意义 ($t = 1.493, P = 0.139$); 狼疮肾炎组患者外周血 Tfh 细胞为 (2.74 ± 1.19)% 略高于无肾炎狼疮组 (2.45 ± 1.10)%, 但差异无统计学意义 ($t = 0.986, P = 0.328$)。

2.3 SLE 患者 Tfh 细胞百分比与 SLEDAI 及自身抗体的相关性 Tfh 细胞的比例与 SLEDAI 呈正相关 ($r = 0.533, P = 0.000$); Tfh 细胞的比例与血清总 IgG 及抗 ds-DNA 呈正相关 (均 $P < 0.01$), 与 ANA 的滴度也有微弱相关性 ($r = 0.340, P = 0.032$), 见图 2。



^a: $P < 0.01$, 与对照组比较。

图 1 两组对象外周血 Tfh 细胞百分比比较

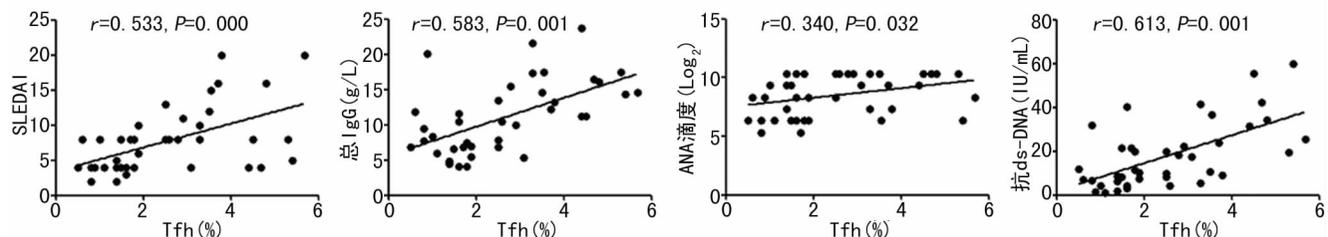


图 2 SLE 患者外周血 Tfh 细胞百分比与 SLEDAI 及自身抗体的相关性分析

3 讨论

Tfh 是近年来新发现的一类区别于 Th1、Th2、Th17、Treg 的新型 CD4⁺ T 细胞亚群。Tfh 细胞定位于淋巴器官的滤泡区, 表面高表达趋化因子受体 CXCR5 及共刺激分子 ICOS^[7]; Bcl-6 是 Tfh 细胞的关键转录因子, 控制 CD4⁺ T 细胞朝 Tfh 细胞定向分化^[8]; IL-21 是 Tfh 细胞重要功能性细胞因子, 可促进 B 细胞的增殖、分化及浆细胞的发育、成熟和抗体的分泌^[9]。Tfh 细胞在生发中心的形成过程中扮演重要角色, Tfh 细胞敲除的小鼠生发中心形成缺陷, B 细胞发育障碍, 抗体产生降低^[10]。相反, 一些自身免疫疾病小鼠 Tfh 细胞水平升高, 造成生发中心过度增生, 甚至出现异位生发中心的形成^[11], 并诱导 B 细胞的过度活化及自身抗体的过度分泌^[12-13]。上述动物实验证实 Tfh 细胞与自身免疫病及自身抗体的密切关系, 本研究在此基础上探讨 Tfh 细胞在人 SLE 疾病发生、发展过程中的作用, 为 SLE 的病理机制研究及免疫干预策略提供实验依据。

通过流式细胞术检测 CD4⁺ T 细胞表面 CXCR5 及 ICOS

的表达情况, 将 CXCR5⁺ ICOS⁺ 的 CD4⁺ T 细胞定义为 Tfh 细胞, 本研究发现 SLE 患者外周血的 Tfh 细胞在 CD4⁺ T 细胞中的比例明显高于对照组。该结果与已有的文献报道一致^[14], 说明 SLE 患者存在 Tfh 细胞的过度增殖。另外通过比较活动期和稳定期 SLE 患者的 Tfh 差异, 发现活动期 SLE 患者的 Tfh 细胞比例明显高于稳定期患者, 说明 Tfh 细胞在 SLE 患者疾病活动过程中扮演角色, 可能参与介导 SLE 疾病的发病。但是根据患者是否合并肾炎将 SLE 患者分为狼疮肾炎组和无肾炎狼疮组, 两组患者的 Tfh 细胞比例比较差异无统计学意义 ($t = 0.986, P = 0.328$), 考虑到两组患者 SLEDAI 评分比较差异无统计学意义 (8.43 vs. 8.25, $P > 0.05$), 说明 Tfh 细胞与 SLE 患者的合并症无关, 仅反映疾病的活动状态。

大量自身抗体的产生是 SLE 疾病的重要发病机制之一, 鉴于 Tfh 细胞在辅助 B 细胞分化发育过程中的重要作用^[15], 推测 Tfh 细胞可能通过介导 B 细胞的过度活化及自身抗体的大量产生参与 SLE 的发病机制。分析 Tfh 细胞比例与 SLE 疾病活动度的相关性发现 Tfh 细胞比例与 SLE 疾病活动度成显

著正相关,说明 Tfh 细胞是 SLE 疾病出现活动性的重要因素之一。另外,分析 Tfh 细胞比例与血清总抗体水平及自身抗体 ANA 滴度及抗 ds-DNA 水平的相关性,发现 Tfh 细胞与这些抗体水平均呈正相关,说明 Tfh 细胞是诱导自身抗体产生及总抗体水平升高的重要机制之一。

总之,本文通过检测 SLE 患者外周血的 Tfh 细胞比例,并分析其与疾病活动度及自身抗体水平的相关性,揭示 Tfh 细胞通过介导自身抗体的过量产生诱发 SLE 疾病活动度升高,为针对 Tfh 细胞的免疫治疗提供理论依据。

参考文献

- [1] 许小玲,俞焯华,李忆农. 系统性红斑狼疮中 B 细胞活化因子、干扰素 α 的表达及临床意义[J]. 临床荟萃, 2013, 28(5):522-524.
- [2] 辛宁,张勇,沈霞. 滤泡辅助性 T 细胞与自身免疫性疾病的研究进展[J]. 首都医科大学学报, 2014, 35(4):20-24.
- [3] 赵令,马宁,刘涛,等. 系统性红斑狼疮患者外周血辅助性 T 细胞亚型和细胞因子的检测及其临床意义[J]. 吉林大学学报:医学版, 2014, 40(2):399-403.
- [4] Linterman MA, Rigby RJ, Wong RK, et al. Follicular helper T cells are required for systemic autoimmunity[J]. J Exp Med, 2009, 206(3):561-576.
- [5] Hochberg MC. Updating the American college of rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus [J]. Arthritis Rheum, 1997, 40(9):1725.
- [6] 周丽萍,陈华波,宋卫青. 多项目联合检测在系统性红斑狼疮患者病情监测中的应用研究[C]//中华医学会第七次全国检验医学学术会议资料汇编, 2008.
- [7] Schmitt N, Ueno H. Blood Tfh cells come with colors[J]. Immunity, 2013, 39(4):629-630.
- [8] Choi YS, Eto D, Yang JA, et al. STAT1 is required for IL-6 mediated Bcl6 induction for early Tfh differentiation [J]. J Immunol, 2013, 190(3):3049-3053.
- [9] Li Q, Liu Z, Dang E, et al. Follicular helper T cells (Tfh) and IL-21 involvement in the pathogenesis of bullous pemphigoid[J]. PLoS One, 2013, 8(7):57.
- [10] 王瑜,王波,梁松,等. ICOSL 敲基因小鼠日本血吸虫病模型的免疫应答及其免疫病理(英文)[J]. 中国人兽共患病学报, 2012, 28(8):769-775.
- [11] 张春梅,张圆,张赞,等. 人滤泡辅助性 T 细胞 (Tfh) 上 CD226 分子的表达格局[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(8):925-926.
- [12] 谭潇,张晶,田伟. 滤泡辅助性 T 细胞及其与自身免疫性疾病关系的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2014, 30(3):324-328.
- [13] 董大群,王忠永,李海英,等. 系统性红斑狼疮患者外周血滤泡辅助性 T 细胞水平的检测[J]. 中国皮肤性病杂志, 2014, 28(10):1007-1011.
- [14] 尤海燕,马红,焦志军,等. 外周血滤泡辅助性 T 细胞百分率的变化与系统性红斑狼疮疾病相关性的初步研究[J]. 中华风湿病学杂志, 2013, 17(6):396-399.
- [15] 金伯泉. T-B 细胞协作研究的重大突破——滤泡辅助性 T 细胞的发现,一个新的 CD4+ 效应 T 细胞亚群[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2009, 25(1):1-5.

(收稿日期:2015-07-24 修回日期:2015-10-22)

(上接第 635 页)

- [3] Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, et al. Epileptic seizures and Epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE)[J]. Epilepsia, 2005, 46(4):470-472.
- [4] 张秀玲,李寄平,秦明镜,等. Gesell 发展诊断量表 3.5~6 岁北京修订本的制定[J]. 中国临床心理学杂志, 1994, 2(3):148-150.
- [5] 易招师,吴华平,虞雄鹰,等. 大剂量泼尼松治疗婴儿痉挛的 13 例疗效观察[J]. 重庆医学, 2013, 42(19):2266-2268.
- [6] 姜慧轶,刘仕成,杜琳. 首选多药联合治疗新诊断婴儿痉挛的临床疗效及随访研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2010, 28(9):830-833.
- [7] Lagae L, Ceulemans VB, Meirleir LD, et al. Treatment and long term outcome in West syndrome: the clinical reality[J]. Seizure, 2010, 19(3):159-164.
- [8] 陈国洪. 婴儿痉挛症临床下发作时血清 NSE 水平研究[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2010, 13(2):7-9.
- [9] Douma TN, Millan MJ, Verdouw PM, et al. Valproate improves prepulse inhibition deficits induced by corticotropin-releasing factor independent of GABA(A) and GABA(B) receptor activation[J]. Neuropharmacol, 2014, 79(1):66-74.
- [10] 秦炯,刘智胜,孙若鹏,等. 儿童癫痫长程管理专家共识[J]. 中华儿科杂志, 2013, 51(9):699-703.
- [11] Demirci S, Kutluhan S, Naziroglu M. Effects of selenium and topiramate on cytosolic Ca^{2+} influx and oxidative stress in neuronal PC12 cells[J]. Neurochem Res, 2013, 38(1):90-97.
- [12] Lyseng-Williamson K, Yang L. Topiramate: a review of its use in the treatment of epilepsy[J]. Drugs, 2007, 67(15):2231-2256.
- [13] Mula M. Topiramate and cognitive impairment: evidence and clinical implications[J]. Ther Adv Drug Saf, 2012, 3(6):279-289.
- [14] Harada S, Tanaka S, Takahashi Y. Inhibition of Ca^{2+} -regulated exocytosis by levetiracetam, a ligand for SV2A, in antral mucous cells of guinea pigs[J]. Eur Pharmacol, 2013, 721(1/2/3):185-192.
- [15] Terada K, Inoue Y. Clinical application of newer anti-epileptic drugs[J]. Rinsho Shinkeigaku, 2012, 52(11):1088-1090.

(收稿日期:2015-07-27 修回日期:2015-10-13)