

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.21.001

系统性红斑狼疮患儿外周血滤泡辅助性 T 细胞相关细胞因子及受体表达水平研究*

赵 洁,曾 莉,陈 元,刘来成,陈大鹏[△]
(重庆医科大学附属儿童医院检验科 400014)

摘 要:**目的** 研究系统性红斑狼疮(SLE)患儿外周血滤泡辅助性 T 细胞相关细胞因子及受体表达水平。**方法** 用 ELISA 检测 22 例 SLE 患儿和 20 例年龄、性别匹配的健康儿童(对照组)血清中的滤泡辅助性 T 细胞相关细胞因子(CXCL13、IL-21)的水平,采用流式细胞仪检测滤泡辅助性 T 细胞相关受体(CXCR5、IL-21R)在两组儿童外周血 CD19⁺ B 细胞中的表达。**结果** SLE 患儿血清中 CXCL13、IL-21 的水平显著高于对照组($P<0.01$)。CXCR5 在 SLE 患儿外周血 B 细胞上的表达显著低于对照组($P<0.05$),IL-21R 在两组对象中差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** SLE 患儿血清中 CXCL13、IL-21 的水平升高提示滤泡辅助性 T 细胞在 SLE 患儿体内活性增高,对自身反应性 B 细胞可以产生过强的辅助信号,滤泡辅助性 T 细胞在 SLE 患儿的发病机制中起着重要的作用。

关键词: 红斑狼疮,系统性;儿童;白细胞介素 21;趋化因子 CXCL13;滤泡辅助性 T 细胞
中图分类号: R593.24 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-8348(2014)21-2689-02

Study of follicular helper T lymphocytes related cytokines and receptors in children with systemic lupus erythematosus*
Zhao Jie, Zeng Li, Chen Yuan, Liu Laicheng, Chen Dapeng[△]
(*Department of Clinical Laboratory, Children's Hospital Affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China*)

Abstract:**Objective** To study the change of the plasma concentrations of follicular helper T lymphocytes(TFH cells) related cytokines and receptors in children with systemic lupus erythematosus(SLE). **Methods** The plasma concentrations of TFH-cells-related cytokine IL-21 and CXCL13, and cell surface expression of TFH-related receptor CXCR5 and IL-21R on CD19⁺ B cells in 22 SLE children and 20 sex- and age matched control subjects were measured by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry, respectively. **Results** Plasma CXCL13 and IL-21 concentrations were significantly higher in SLE children than controls(all $P<0.01$). Cell surface expression of CXCR5 on B cells was significantly lower in SLE children than controls($P<0.05$). However, the cell surface expression of IL-21R had no significant changes between SLE children and controls($P>0.05$). **Conclusion** The elevated production of CXCL13 and IL-21 may be associated with the function of TFH for the immunopathogenesis in SLE children.

Key words: lupus erythematosus, systemic; child; interleukin-21; chemokine CXCL13; follicular helper T lymphocytes

儿童系统性红斑狼疮(SLE)是一种以免疫系统(包括 T 细胞、B 细胞、单核巨噬细胞)的高度异常为特征,以自身抗体的产生和免疫复合物的沉积为特点的慢性炎症性疾病,是小儿较为常见的自身免疫性疾病之一。因其发病率高,临床症状较成人 SLE 严重,发展迅速,愈后差,成为极为关注的疾病^[1]。滤泡辅助性 T 细胞是一种位于淋巴滤泡,表型 CXCR5⁺CD40L⁺ICOS⁺的 T 细胞亚群,在外周淋巴器官生发中心中辅助 B 细胞产生对 T 细胞依赖抗原应答中扮演着主要角色^[2-3]。滤泡辅助性 T 细胞如果对自身反应性 B 细胞产生过强的辅助信号,能引起抗体介导的 SLE 等自身免疫性疾病^[4]。本研究测定 22 例 SLE 患儿及 20 例健康儿童外周血中滤泡辅助性 T 细胞相关细胞因子和受体变化,探讨滤泡辅助性 T 细胞在 SLE 患儿发病过程中的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2011 年 7 月至 2013 年 1 月本院收治的 SLE 患儿 22 例,男 1 例,女 21 例,年龄 4~16 岁,均符合美国风湿病协会(ACR)1997 年修订的 SLE 诊断标准^[5],且排除伴有其他自身免疫性结缔组织疾病、严重感染及其他继发性疾病者。同期选择本院体检健康儿童 20 例纳入对照组,女 19 例,男 1 例,年龄 5~17 岁。两组年龄分布、性别构成比较,差异无

统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 仪器与试剂 FACSCalibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司),酶联免疫吸附法 CXCL13、IL-21 检测试剂盒、别藻蓝蛋白(APC)标记的抗 CD19 抗体、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗鼠二抗、FITC 标记的鼠抗人 CXCR5 单克隆抗体、非标记的鼠抗人 IL-21R 抗体(深圳达科为生物技术有限公司)。

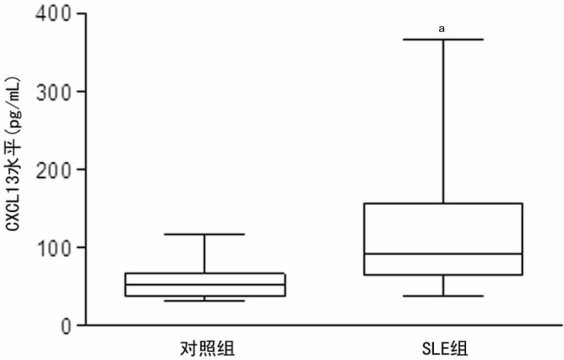
1.2.2 检测方法 采集所有受试对象未抗凝静脉血和乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝静脉血各 3~4 mL。未抗凝静脉血标本常规离心后分离血清标本,按试剂盒说明书要求进行 CXCL13、IL-21 检测。采用 Ficoll 密度梯度离心法收集 EDTA 抗凝静脉血单个核细胞(PBMC),用 APC 标记的抗 CD19 抗体标记 PBMC 中的 B 淋巴细胞,再将 FITC 标记的鼠抗人 CXCR5 单克隆抗体和非标记的鼠抗人 IL-21R 抗体(需加 FITC 标记的羊抗鼠二抗)分别加入 PBMC 中孵育 30 min,洗涤后采用流式细胞仪分析 CD19⁺ B 细胞 CXCR5、IL-21R 表达水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件进行数据分析,检测结果以中位数(最小值~最大值)表示,组间比较采用曼-怀氏等级和检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

* 基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81300006);重庆市科委资助项目(cstc2013jcyjA1027)。 作者简介:赵洁(1981—),检验师,本科,主要从事自身免疫性疾病的实验室诊断研究。 [△] 通讯作者, E-mail:15478172@qq.com。

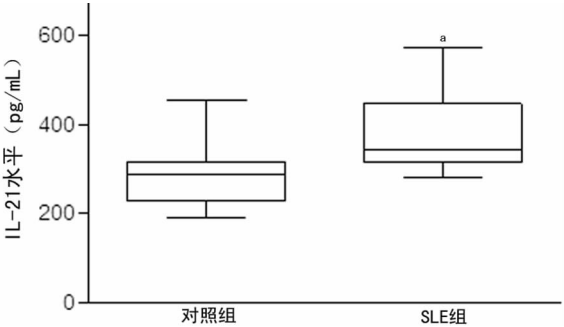
2 结 果

2.1 两组对象 CXCL13、IL-21 水平比较 SLE 患儿血清中 CXCL13 水平 92.4 pg/mL(37.9~367.7 pg/mL)显著高于对照组的 52.1 pg/mL(32.2~117.5 pg/mL),见图 1;IL-21 水平 344.4 pg/mL(280.8~570.7 pg/mL)显著高于对照组的 285.5 pg/mL(191.0~453.4 pg/mL),见图 2。



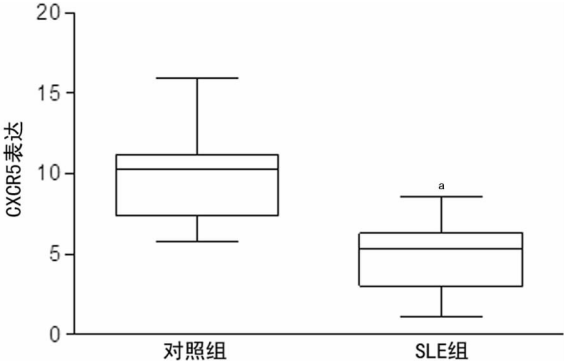
a: $P < 0.01$, 与对照组比较。

图 1 两组血清中 CXCL13 水平比较



a: $P < 0.01$, 与对照组比较。

图 2 两组血清中 IL-21 水平比较



a: $P < 0.05$, 与对照组比较。

图 3 两组 CXCR5 的表达比较

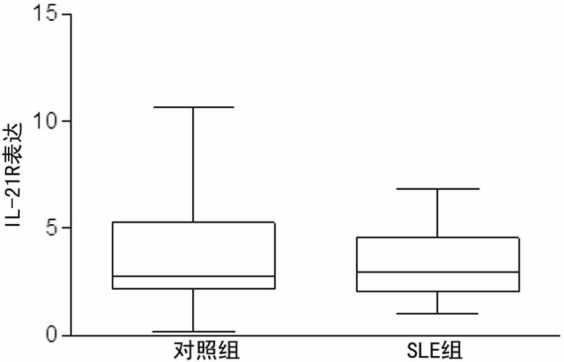


图 4 两组 IL-21R 的表达比较

2.2 两组 CXCR5、IL-21R 表达比较 CXCR5 作为 CXCL13 的特异性受体在 SLE 患儿外周血 CD19⁺ B 细胞上的表达为 5.30(1.11~8.60),显著低于对照组 10.27(5.78~15.91),见图 3。IL-21R 作为 IL-21 的特异性受体在 SLE 患儿外周血 CD19⁺ B 细胞上的表达为 2.98(1.05~6.85),与对照组 2.79(0.19~10.62)比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 4。

3 讨 论

儿童 SLE 在临床表现、免疫学等方面与成人 SLE 相似,并且诊断标准也相同^[5]。但儿童往往起病较成人更严重、累及各个脏器的概率更高、发病过程较成人更凶险。SLE 患者血清中出现的大量自身抗体说明了自身反应性 B 细胞的存在和活化,B 细胞的活化和存活有赖于 T 细胞的调节^[1]。近期研究发现,存在一种特殊的辅助性 T 细胞——滤泡辅助性 T 细胞定位于淋巴滤泡,主要功能为辅助 B 细胞参与体液免疫^[6]。在 SLE 患者或小鼠狼疮模型中,阻止 CD40/CD40L 相互作用可预防生发中心形成和自身抗体的产生,而且外周血出现大量的生发中心样 B 细胞和浆母细胞^[7-8]。SLE 患者外周血或狼疮小鼠脾脏中 ICOS⁺ CD4⁺ T 细胞百分率增加。有研究发现,滤泡辅助性 T 细胞如果对自身反应性 B 细胞产生过强的辅助信号,能引起抗体介导的 SLE 等自身免疫性疾病。但滤泡辅助性 T 细胞在儿童 SLE 发病机制中的相关研究还很少报道。

作者发现 SLE 患儿血清中 CXCL13 和 IL-21 的水平显著高于对照组($P < 0.01$)。研究发现滤泡辅助性 T 细胞能表达 CXCR5,CXCR5 作为滤泡归巢趋化因子 CXCL13 的特异性受体,使滤泡辅助性 T 细胞在 CXCL13 的趋化下,从外周淋巴器官 T 细胞区迁移到淋巴滤泡中心,并与 B 细胞共定位和相互作用。因此,CXCR5 成为滤泡辅助性 T 细胞迁移、定位的重要转运分子,也是滤泡辅助性 T 细胞重要的表面标志物^[9-10]。SLE 患儿血清中 CXCL13 水平升高,可以使更多的滤泡辅助性 T 细胞迁移到淋巴滤泡中心,对 B 细胞产生过强的刺激信号,引发 B 细胞产生大量自身抗体到患儿血清。IL-21 可使活化 B 细胞分泌 IgG1 和 IgG3,还可诱导所有 B 细胞亚群分化为 Ig 分泌细胞而产生大量 IgM、IgG 和 IgA^[11-14],由滤泡辅助性 T 细胞产生的 IL-21 在 B 细胞对 T 细胞依赖抗原的初始免疫应答、再次免疫应答及体液免疫长期地维持中都发挥了主要作用^[11]。Terrier 等^[15]研究发现,SLE 患者血清 IL-21 的水平相对于健康对照组有明显的升高,这与本研究结果一致,该研究还指出 IL-21 与外周血中 T 细胞和 B 细胞亚型的改变有密切关系,以 IL-21 作为靶点对 SLE 患者具有一定的治疗前景。由此可见滤泡辅助性 T 细胞相关细胞因子 CXCL13 和 IL-21 在 SLE 患儿血清中的显著升高,提示滤泡性辅助性 T 细胞在儿童 SLE 的发病机制中起着至关重要的作用。

本研究显示,CXCR5 的表达显著低于对照组($P < 0.05$),IL-21R 的表达与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。SLE 患儿外周血 CD19⁺ B 细胞上 CXCR5 的表达降低可能与大量高表达 CXCR5 B 细胞在 CXCL13 趋化作用下从 T 细胞区迁移到 B 细胞滤泡定居,以及外周循环中大部分为低表达 CXCR5 B 细胞有关。

因此,滤泡辅助性 T 细胞依据其表达 CXCR5 在 CXCL13 的趋化作用下迁移并定位于淋巴滤泡,通过产生 IL-21 等细胞因子刺激 B 细胞引起异常的体液免疫反应。儿童 SLE 外周血血清中滤泡辅助性 T 细胞相关细胞因子 CXCL13 和 IL-21 表达异常参与了 SLE 的发病机制,可能成为治疗儿童 SLE 的靶分子。通过滤泡辅助性 T 细胞相关细胞因子的研究也将为儿童 SLE 的治疗开辟一条新途径。 (下转第 2694 页)

flow[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 1999, 19(5): 553-573.

- [5] Ozkaya O, Söylemezoğlu O, Gönen S, et al. Renin-angiotensin system gene polymorphisms; association with susceptibility to Henoch-Schönlein purpura and renal involvement[J]. *Clin Rheumatol*, 2006, 25(6): 861-865.
- [6] Abdollahi MR, Gaunt TR, Syddall HE, et al. Angiotensin II type I receptor gene polymorphism: anthropometric and metabolic syndrome traits[J]. *Med Genet*, 2005, 42(5): 396-401.
- [7] Yamani MH, Cook DJ, Tuzcu EM, et al. Systemic up-regulation of angiotensin II type 1 receptor in cardiac donors with spontaneous intracerebral hemorrhage[J]. *Am J Transplant*, 2004, 4(7): 1097-1102.
- [8] Sinn DI, Lee ST, Chu K, et al. Combined neuroprotective effects of celecoxib and memantine in experimental intracerebral hemorrhage[J]. *Neurosci Lett*, 2007, 41(3): 238-242.
- [9] 纪艳, 强卫国. 缬沙坦对巨噬细胞增殖、炎症因子表达及活性氧生成的抑制作用[J]. *上海交通大学学报: 医学版*, 2010, 30(3): 292-295.
- [10] Tsai CY, Chan JY, Hsu KS, et al. Brain-derived neurotrophic factor ameliorates brain stem cardiovascular dysregulation during experimental temporal lobe status epilepticus[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e33527.
- [11] Wang JL, Xue L, Hao PP, et al. Angiotensin II type 1 receptor gene A1166C polymorphism and essential hyper-

tension in Chinese; a meta-analysis[J]. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2010, 6(11): 127-135.

- [12] Mollsten A, Stegmayr B, Wiklund PG. Genetic polymorphisms in the renin-angiotensin system confer increased risk of stroke independently of blood pressure; a nested case-control study[J]. *Hypertens*, 2008, 26(7): 1367-1372.
- [13] Healey JS, Morillo CA, Connolly SJ. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in atrial fibrillation and cardiac remodeling[J]. *Curr Opin Cardiol*, 2005, 20(1): 31-37.
- [14] Timaru-Kast R, Wyszkon S, Luh C, et al. Delayed inhibition of angiotensin II receptor type 1 reduces secondary brain damage and improves functional recovery after experimental brain trauma[J]. *Crit Care Med*, 2012, 40(3): 935-944.
- [15] 周昌龙, 孙晓川, 贺学农. 血管紧张素 II-1 型受体拮抗剂影响自发性脑出血大鼠脑组织中 VEGF 浓度表达的相关研究[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2012, 17(10): 627-629.
- [16] Devi N, Lakshmi V, Padhy K. Association of ACE, AGT and AT1R gene polymorphisms with severity of coronary artery disease[J]. *J Dent Med Sci*, 2012, 2(4): 11-18.

(收稿日期: 2014-02-28 修回日期: 2014-04-27)

(上接第 2690 页)

参考文献:

- [1] 赵高阳. 儿童系统性红斑狼疮外周血淋巴细胞亚群变化的临床意义[J]. *中国中西医结合儿科学*, 2011, 3(2): 179-180.
- [2] Schaerli P, Willmann K, Lang AB, et al. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function[J]. *J Exp Med*, 2000, 192(11): 1553-1562.
- [3] Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, et al. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, Localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production[J]. *J Exp Med*, 2000, 192(11): 1545-1551.
- [4] 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.
- [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] Fazilleau N, Mark L, McHeyzer-Williams LJ, et al. Follicular helper T cells: lineage and location[J]. *Immunity*, 2009, 30(3): 324-335.
- [7] Luzina IG, Atamas SP, Storrer CE, et al. Spontaneous formation of germinal centers in autoimmune mice[J]. *J Leukoc Biol*, 2001, 70(4): 578-584.
- [8] Grammer AC, Slota R, Fisher R, et al. Abnormal germinal center reactions in systemic lupus erythematosus demonstrated by blockade of CD154-CD40 interactions[J]. *J Clin*

Invest, 2003, 112(10): 1506-1520.

- [9] Kim CH, Rott LS, Clark LI, et al. Subspecialization of CXCR5⁺ T cells; B helper activity is focused in a germinal center localized subset of CXCR5⁺ T cells[J]. *J Exp Med*, 2001, 193(12): 1373-1381.
- [10] 冯俊燕. 滤泡辅助性 T 细胞(Tfh)的研究进展[J]. *中国免疫学杂志*, 2010, 26(8): 754-757.
- [11] Bryant VL, Ma CS, Avery DT, et al. Cytokine mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells; predominant role of IL-21 produced by CXCR5⁺ T follicular helper cells[J]. *J Immunol*, 2007, 179(12): 8180-8190.
- [12] Terrier B, Costedoat-Chalumeau N, Garrido M, et al. IL-21 Interleukin 21 correlates with T cell and B cell subset alterations in systemic lupus erythematosus[J]. *J Rheumatol*, 2012, 39(9): 1819-1828.
- [13] Pene J, Gauchat JF, Lecart S, et al. Cutting edge; IL-21 is a switch factor for the production of IgG1 and IgG3 by human B cells[J]. *J Immunol*, 2004, 172(9): 5154-5157.
- [14] Hodge LS, Ziesmer SC, Yang ZZ, et al. IL-21 in the bone marrow microenvironment contributes to IgM secretion and proliferation of malignant cells in Waldenström macroglobulinemia[J]. *Blood*, 2012, 120(18): 3774-3782.
- [15] Terrier B, Costedoat-Chalumeau N, Garrido M, et al. Interleukin 21 correlates with T cell and B cell subset alterations in systemic lupus erythematosus[J]. *J Rheumatol*, 2012, 39(9): 1819-1828.

(收稿日期: 2014-01-28 修回日期: 2014-03-21)