

类风湿关节炎患者外周血滤泡辅助性 T 淋巴细胞百分率的变化及意义*

邹晓月,熊御云[△],张龙锋,王蓓,徐静
(江苏大学附属医院检验科,江苏镇江 212001)

[摘要] **目的** 探讨滤泡辅助性 T 淋巴细胞(Tfh)百分率在类风湿关节炎(RA)患者外周血中的变化及意义。**方法** 选取该院 2016 年 9—11 月收治的 RA 患者,分为 RA 活动组与 RA 稳定组,各 35 例。另选取同期行健康体检者 35 例作为健康对照组。用流式细胞术检测受试者外周血 CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺ Tfh 细胞的百分率,分析 RA 患者外周血 Tfh 细胞百分率与 28 个关节疾病活动度评分(DAS28)、抗环瓜氨酸肽(CCP)抗体及类风湿因子(RF)水平的相关性。**结果** RA 活动组外周血 Tfh 细胞百分率[(0.84±0.16)%]明显高于 RA 稳定组[(0.64±0.15)%]与健康对照组[(0.56±0.14)%],差异均有统计学意义($P<0.01$);且 RA 稳定组亦高于健康对照组($P<0.05$)。RA 患者外周血 Tfh 细胞百分率与 DAS28 及抗 CCP 抗体水平均呈明显正相关($r=0.355,0.324,P<0.01$),与 RF 水平无明显相关性($r=0.205,P>0.05$)。**结论** 外周血中 Tfh 细胞百分率的增加可能与 RA 的发生、发展有关。

[关键词] 滤泡辅助性 T 淋巴细胞;关节炎;类风湿;流式细胞术

[中图分类号] R593.22

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)35-4920-03

Change and significance of peripheral blood follicular helper T lymphocytes percentage in patients with rheumatoid arthritis*

Zou Xiaoyue, Xiong Yuyun[△], Zhang Longfeng, Wang Bei, Xu Jing

(Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the change and significance of follicular helper T cells (Tfh) percentage in the peripheral blood of the patients with rheumatoid arthritis (RA). **Methods** The RA patients treated in this hospital from September to November 2016 were selected and divided into the RA active group and RA stable group, 35 cases in each group. Contemporaneous 35 individuals undergoing physical examination were selected as the healthy control group. The percentage of peripheral blood CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺ Tfh cells was detected by flow cytometry. The correlations between the percentage of peripheral blood Tfh cells in RA patients with the RA disease activity score 28 (DAS28), anti-CCP antibody and rheumatoid factor (RF) levels were analyzed. **Results** The percentage of peripheral blood Tfh cells in the RA active group was (0.84±0.16)%, which was significantly higher than (0.64±0.15)% in the RA stable group and (0.56±0.14)% in the healthy control group, the difference was statistically significant ($P<0.01$); moreover the percentage of peripheral blood Tfh cells in the RA stable group was also higher than that in the healthy control group ($P<0.05$). The percentage of peripheral blood Tfh cells in RA patients had significantly positive correlation with DAS28 score and anti-CCP antibody level ($r=0.355,0.324;P<0.01$), and had no correlation with the RF level ($r=0.205, P>0.05$). **Conclusion** The percentage increase of peripheral blood Tfh cells in the patients with RA might be related with the pathogenesis and development of RA.

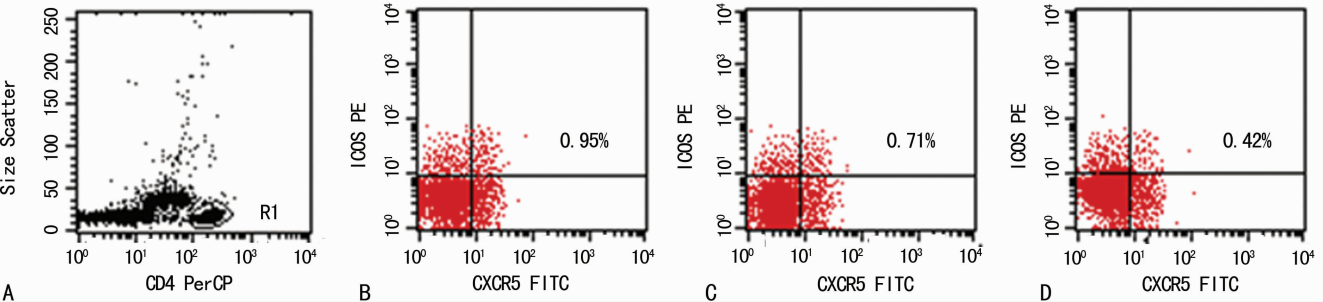
[Key words] follicular helper T lymphocytes; arthritis, rheumatoid; flow cytometry

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是以对称性外周多关节病变为主要表现的慢性自身免疫病,自身抗体引发慢性炎症是 RA 的重要特征^[1]。目前认为患者体内淋巴细胞的高度活化及 T、B 淋巴细胞之间相互作用导致致病性自身抗体的产生是 RA 发病的重要因素^[2]。B 淋巴细胞产生抗体需要 T 淋巴细胞的辅助,近年有学者认为辅助 B 淋巴细胞产生抗体的最主要 T 淋巴细胞亚群是滤泡辅助性 T 细胞(follicular helper cells, Tfh)^[3]。Tfh 细胞分布异常或数量增多或功能亢进均可导致自身抗体的产生,引发自身免疫病^[4]。鉴于 CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺为 Tfh 细胞为较合适的表面标志^[5],本研究用流式细胞术检测了 RA 患者外周血 CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺ Tfh 细胞百分率,分析外周血 Tfh 细胞百分率与 28 个关节疾病活动度评分(DAS28)、抗环瓜氨酸肽(CCP)抗体及类风湿因子(RF)水平之间的相关性,初步探讨 Tfh 细胞分布、数量的变化与 RA 之间的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 70 例 RA 患者为本院 2016 年 9—11 月的门诊及住院患者,RA 诊断符合美国风湿病学会/欧洲抗风湿联盟(ACR/EULAR)2010 年修订的最新分类标准^[6]。按照 DAS28 将患者分为 RA 活动组(DAS28 大于或等于 2.6 分)与 RA 稳定组(DAS28 小于 2.6 分)。RA 活动组患者 35 例,男 2 例、女 33 例,年龄 20~61 岁,平均(42±13)岁;RA 稳定组患者 35 例,男 3 例、女 32 例,年龄 21~63 岁,平均(43±12)岁;所有患者无其他自身免疫病。另选取 35 例性别与年龄相匹配的于本院做健康体检者为健康对照组,排除所有自身免疫病。

1.2 主要仪器与试剂 异硫氰酸(FITC)标记的鼠抗人 CXC 型趋化因子受体 5(CXCR5)抗体、多甲藻叶绿素蛋白(PerCP)标记的鼠抗人 CD4 抗体、藻红蛋白(PE)标记的鼠抗人诱导性协同刺激分子(ICOS)抗体及相应的同型对照 IgG1-PE(美国 BD 公司),淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品科技有限公司),抗



A:设门于CD4⁺淋巴细胞;B:RA活动组;C:RA稳定组;D:健康对照组

图1 流式细胞术检测外周血CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺Tfh细胞

CCP 抗体酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒(上海科新生物科技股份有限公司),RF 免疫比浊法检测试剂盒(美国 Beckman Coulter 公司)。FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司);DRAGON MK3 酶标仪(芬兰 Denley 公司);IMMAGE 800 型特种蛋白分析仪(美国 Beckman Coulter 公司)。

1.3 方法

1.3.1 外周血单个核细胞(PBMC)的分离 于清晨抽取受试者空腹静脉血 4.0 mL,以肝素抗凝。用淋巴细胞分离液分离出 PBMC,再以磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次后,将细胞数调成 1×10⁸ cells/mL 备用。

1.3.2 细胞染色 在流式专用试管中加入上述 PBMC 悬液 200 μL、CD4-PerCP 10 μL、CXCR5-FITC 10 μL、ICOS-PE 10 μL 后混匀(同时设同型对照管),室温避光静置 20 min,加入 2 mL PBS 洗涤 1 次后以 300 μL PBS 重悬细胞待测。

1.3.3 流式细胞术检测 用 Cellquest 软件获取并分析 3×10⁶ 个细胞数据。在 CD4-SSC 点图上设门于 CD4⁺ 淋巴细胞,测定其中 CXCR5⁺ ICOS⁺ 细胞的百分率。

1.3.4 抗 CCP 抗体及 RF 检测 抗 CCP 抗体检测按试剂盒说明书进行,RF 按试剂盒说明书及特种蛋白分析仪操作规程进行测定。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,以 Pearson 相关进行相关性分析,以 *P* <

0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 RA 患者外周血 CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺Tfh 细胞百分率 RA 活动组外周血 Tfh 细胞百分率[(0.84±0.16)%]明显高于 RA 稳定组[(0.64±0.15)%]及健康对照组[(0.56±0.14)%],差异均有统计学意义(*P* < 0.01);RA 稳定组亦高于健康对照组,差异有统计学意义(*P* < 0.05),见图 1、2。

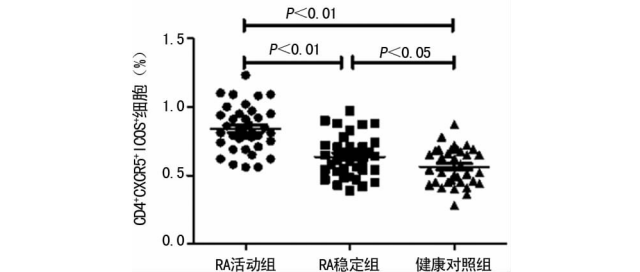
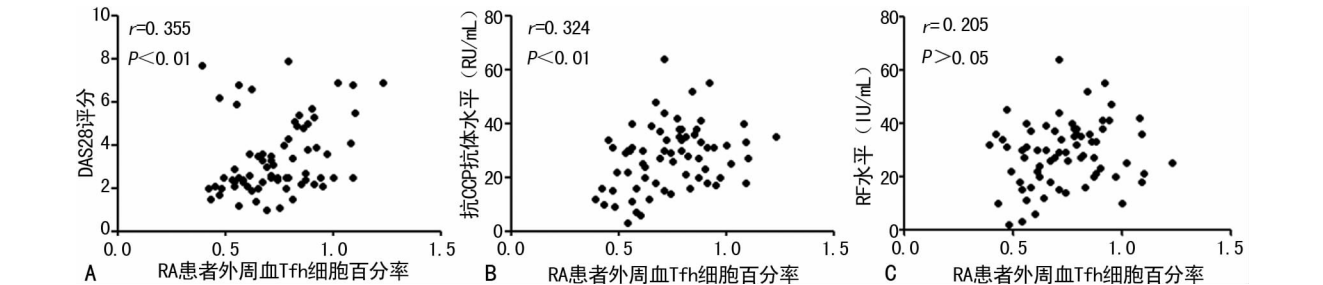


图2 RA 患者外周血 Tfh 细胞的百分率

2.2 RA 患者外周血 Tfh 细胞百分率与 DAS28、抗 CCP 抗体及 RF 水平的相关性 相关性分析显示,RA 患者外周血 Tfh 细胞百分率与 DAS28 呈明显正相关(*r* = 0.355, *P* < 0.01),与抗 CCP 抗体水平呈明显正相关(*r* = 0.324, *P* < 0.01),与 RF 水平之间无明显相关性(*r* = 0.205, *P* > 0.05),见图 3。



A:外周血 Tfh 细胞百分率与 DAS28 相关性;B:外周血 Tfh 细胞百分率与抗 CCP 抗体水平相关性;C:外周血 Tfh 细胞百分率与 RF 水平相关性

图3 A 患者外周血 Tfh 细胞百分率与 DAS28、抗 CCP 抗体及 RF 水平的相关性

3 讨 论

自身抗体导致骨质破坏是 RA 的重要特征,而自身抗体的产生与 T、B 淋巴细胞的高度活化及相互作用密切相关^[2]。Tfh 细胞是新近发现的辅助 B 淋巴细胞产生抗体的 T 淋巴细胞亚群,正常情况下该细胞存在于 B 淋巴滤泡中,当机体发生自身免疫时,会出现在淋巴组织之外^[7]。

滤泡归巢受体 CXCR5⁺、ICOS⁺ 和 CD40 配体(CD40L) + 是 Tfh 细胞重要的表面特征^[5]。CXCR5 是滤泡归巢 CXC 型趋化因子配体 13(CXCL13)的受体,CXCR5 同时也表达于 B

淋巴细胞表面。存在于 B 淋巴滤泡中的滤泡树突状细胞产生 CXCL13 继而趋化 Tfh 细胞与 B 淋巴细胞一起到 B 淋巴滤泡中,Tfh 细胞与 B 淋巴细胞相互作用后增殖分化形成生发中心(GC)^[8]。在 GC 中,B 淋巴细胞上的诱导性协同刺激分子配体(ICOSL)和 CD40 分别与 Tfh 细胞上的 ICOS 和 CD40L 结合,诱导 Tfh 细胞产生多种细胞因子。Tfh 细胞主要的效应因子是其分泌的白细胞介素-21(IL-21),而 B 淋巴细胞上有 IL-21 受体,Tfh 分泌的 IL-21 与该受体结合会引发 B 淋巴细胞增殖,诱导各种 B 淋巴细胞亚群(记忆 B 淋巴细胞、生发中心 B

淋巴细胞、过渡型 B 淋巴细胞、初始 B 淋巴细胞、新生 B 淋巴细胞) 分化成免疫球蛋白形成细胞并分泌大量的抗体^[9], IL-21 还可促使 IgG 与 IgA 之间的型别转换^[10]。

本研究发现 RA 活动组外周血 Tfh 细胞百分率显著高于 RA 稳定组, RA 稳定组亦高于健康对照组, 此结果提示 RA 患者体内存在异位且增多的 Tfh 细胞, 且该细胞数量随疾病活动度的增强而增加。Liu 等^[9] 发现, RA 患者除外周血中出现 Tfh 细胞数量增多外, 其血清中的 IL-21 水平也出现异常升高, 且血清 IL-21 水平与 DAS28、抗 CCP 抗体水平呈显著正相关。本研究虽未检测 RA 患者 IL-21 水平与疾病的相关性, 但患者外周血 Tfh 细胞百分率与 DAS28、抗 CCP 抗体水平的相关性可表明, RA 患者外周血 Tfh 细胞数量的增多与病情活动度及 RA 特异性自身抗体有关。除 RA 中出现了 Tfh 细胞异常外, 在自身免疫性甲状腺疾病、系统性红斑狼疮等其他自身免疫病中, Tfh 细胞数量变化的趋势与本研究相似, 且与疾病特异性自身抗体呈显著正相关^[11-12]。

由于 Th17 细胞也分泌 IL-21^[13], 故血清 IL-21 水平与 RA 的相关性并不能代表 Tfh 细胞与 RA 的相关性。在后续工作中, 笔者将用流式细胞仪无菌分选出 Tfh 细胞进行培养, 用培养物上清液中的 IL-21 水平验证 Tfh 细胞分泌 IL-21 的能力, 并观察 IL-21 与 B 淋巴细胞功能之间的关系。

综上所述, RA 患者机体内的 Tfh 细胞可能出现了异位, 异位的 Tfh 细胞可能发生扩增, 而扩增的 Tfh 细胞可能引发 B 淋巴细胞的过度活化, 从而导致 B 淋巴细胞分泌大量的致病性自身抗体, 引起 RA 患者的免疫损伤。今后, 除数量外, 笔者将对 RA 患者 Tfh 细胞的功能进行研究, 以进一步明确 Tfh 细胞在 RA 发病机制中的确切作用。

参考文献

- [1] Conigliaro P, Chimenti MS, Triggianese P, et al. Autoantibodies in inflammatory arthritis [J]. *Autoimmunity Reviews*, 2016, 15: 673-683.
- [2] Wang J, Shan Y, Jiang Z, et al. High frequencies of activated B cells and T follicular helper cells are correlated with disease activity in patients with new-onset rheumatoid arthritis [J]. *Clin Exp Immunol*, 2013, 174(2): 212-220.
- [3] Vinuesa G, Linterman A, Yu Di, et al. Follicular helper T cells [J]. *Annu Rev Immunol*, 2016, 34: 335-368.
- [4] Scherm G, Ott B, Daniel Carolin. Follicular helper T cells in autoimmunity [J]. *Curr Diab Rep*, 2016, 16(8): 75.
- [5] Zhang X, Lindwall E, Gauthier C, et al. Circulating CXCR5⁺ CD4⁺ helper T cells in systemic lupus erythematosus patients share phenotypic properties with germinal center follicular helper T cells and promote antibody production [J]. *Lupus*, 2015, 24(9): 909-917.
- [6] Mueller B, Schiff M, Kaegi T, et al. The new 2010 ACR/EULAR criteria as predictor of clinical and radiographic response in patients with early arthritis [J]. *Clin Rheumatol*, 2015, 34(1): 51-59.
- [7] Mesquita D Jr, Cruvinel WM, Resende LS, et al. Follicular helper T cell in immunity and autoimmunity [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2016, 49(5): e5209.
- [8] Dan M, Lindestam Arlehamn CS, Weiskopf D, et al. A Cytokine-Independent approach to identify Antigen-Specific human germinal center T follicular helper cells and rare Antigen-Specific CD4⁺ T cells in blood [J]. *J Immunol*, 2016, 197(3): 983-993.
- [9] Liu R, Wu Q, Su DL, et al. A regulatory effect of IL-21 on T follicular helper-like cell and B cell in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2012, 14(6): R255.
- [10] Avery T, Bryant L, Ma S, et al. IL-21-induced isotype switching to IgG and IgA by human naive B cells is differentially regulated by IL-4 [J]. *J Immunol*, 2008, 181(3): 1767-1779.
- [11] Zhu C, Ma J, Liu Y, et al. Increased frequency of follicular helper T cells in patients with autoimmune thyroid disease [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97(3): 943-950.
- [12] Blanco P, Ueno H, Schmitt N. T follicular helper (Tfh) cells in lupus: Activation and involvement in SLE pathogenesis [J]. *Eur J Immunol*, 2016, 46(2): 281-290.
- [13] Raveney J, Oki S, Yamamura T. Nuclear receptor NR4A2 orchestrates Th17 cell-mediated autoimmune inflammation via IL-21 signalling [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e65695.

(收稿日期: 2017-07-15 修回日期: 2017-09-15)

(上接第 4919 页)

- [5] 范昊宁, 佟丽, 范钦. 姜黄素对肿瘤的抑制和放射增敏作用研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(3): 333-335.
- [6] Zada G, Lopes MBS, Mukundan S, et al. Nasopharyngeal carcinoma and squamous cell carcinoma of the paranasal sinuses [M] // Zada G, Lopes M, Mukundan Jr S, et al. *Atlas of Sellar and Parasellar Lesions*. Springer International Publishing, 2016: 359-365.
- [7] Blanchard P, Lee A, Marguet S, et al. Chemotherapy and radiotherapy in nasopharyngeal carcinoma: an update of the MAC-NPC meta-analysis [J]. *Lancet Oncol*, 2015, 16(6): 645-655.
- [8] 向鑫, 袁继超, 陈飞, 等. 姜黄素诱导内源性神经干细胞促进大鼠脊髓损伤后功能修复 [J]. *第三军医大学学报*, 2014, 36(9): 883-887.
- [9] 汪丛丛, 庄静, 冯福彬, 等. 姜黄素抑制肺癌细胞血管拟态形成机制探讨 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2015, 22(4): 243-246.
- [10] Yadav VR, Prasad S, Kannappan R, et al. Cyclodextrin-

complexed curcumin exhibits anti-inflammatory and anti-proliferative activities superior to those of curcumin through higher cellular uptake [J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 80(7): 1021-1032.

- [11] 姚庆华, 林妙, 汪玉琪, 等. 氧化应激在姜黄素诱导肺癌细胞凋亡中的作用及机制研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(2): 614-618.
- [12] 刘斌, 邓辰亮, 杨松林, 等. 姜黄素对人黑色素瘤细胞凋亡机制探讨 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2014, 21(14): 1059-1062.
- [13] 郭立达, 焦振霞, 宋瑛, 等. 姜黄素诱导结肠癌 LoVo 细胞凋亡的作用及机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(13): 2191-2196.
- [14] 李会宣, 杨虹, 张红兵, 等. 姜黄素通过 MAPK 信号通路诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡 [J]. *天然产物研究与开发*, 2014, 26(3): 329-334.

(收稿日期: 2017-07-21 修回日期: 2017-10-02)