

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2018.11.1202

· 论 著 ·

CCR7^{lo}PD-1^{hi} 滤泡辅助性 T 细胞在系统性红斑狼疮患者外周血中的比例及临床意义

康子健[△], 刘亚群[△], 张志国, 刘耀阳, 徐沪济*

海军军医大学(第二军医大学)长征医院风湿免疫科, 上海 200003

[摘要] **目的** 检测系统性红斑狼疮(SLE)患者外周血中 CCR7^{lo}PD-1^{hi} 滤泡辅助性 T 细胞(Tfh)的比例,并探讨其临床意义。**方法** 收集 31 例 SLE 患者、29 例类风湿关节炎(RA)患者、12 例干燥综合征(SS)患者和 37 名健康对照的外周血样本。采用流式细胞术检测 Tfh 表面 C-X-C 趋化因子受体 3(CXCR3)、诱导型共刺激分子(ICOS)和信号淋巴细胞激活分子家族成员 5(SLAMF5)的表达水平,以及外周血中 CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh 和 CCR7^{hi}PD-1^{lo} Tfh 的比例。分析 SLE 患者外周血中 CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh 的比例与临床指标、成浆细胞比例的相关性。**结果** 相比 CCR7^{hi}PD-1^{lo} Tfh, CCR7^{lo}PD-1^{hi} 表面 CXCR3、ICOS 和 SLAMF5 的表达水平较高($t=3.73$ 、 5.06 、 8.27 , P 均 <0.01)。SLE 和 RA 患者外周血中 CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh 的比例分别为 5.79% (2.97%, 8.95%) 和 4.57% (2.51%, 7.60%), 均高于健康对照组 [2.93% (1.63%, 5.21%)], $U=314.5$ 、 332.5 , P 均 <0.01], 而 SS 患者外周血中 CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh 的比例与健康对照相比差异无统计学意义 ($U=183.0$, $P>0.05$)。SLE 患者外周血中 CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh 的比例与系统性红斑狼疮疾病活动指数(SLEDAI)、抗双链 DNA 抗体滴度、成浆细胞比例均呈正相关 ($r=0.4471$ 、 0.5174 、 0.4669 , P 均 <0.05)。**结论** SLE 患者外周血中 CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh 比例增加与 SLEDAI 升高和成浆细胞比例的增加相关,检测患者外周血 Tfh 亚群可间接反映生发中心及 B 淋巴细胞的功能状态,对 SLE 的诊断、监测和预后有重要意义。

[关键词] 系统性红斑狼疮; 滤泡辅助性 T 细胞; CCR7 受体; 程序性死亡蛋白 1; 类风湿关节炎; 干燥综合征
[中图分类号] R 593.241 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2018)11-1202-07

Proportion of CCR7^{lo}PD-1^{hi} follicular helper T cell in peripheral blood of systemic lupus erythematosus patients and its clinical role

KANG Zi-jian[△], LIU Ya-qun[△], ZHANG Zhi-guo, LIU Yao-yang, XU Hu-ji*

Department of Rheumatology and Immunology, Changzheng Hospital, Navy Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To explore the proportion of CCR7^{lo}PD-1^{hi} follicular helper T cell (Tfh) in peripheral blood of the patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and its clinical role. **Methods** Peripheral blood samples were collected from 31 SLE patients, 29 rheumatoid arthritis (RA) patients, 12 Sjögren's syndrome (SS) patients and 37 healthy controls. Flow cytometry was used to detect the expression levels of C-X-C chemokine receptor 3 (CXCR3), inducible costimulator (ICOS) and signaling lymphocytic activation molecule family member 5 (SLAMF5) on surface of Tfh, and the frequencies of CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh and CCR7^{hi}PD-1^{lo} Tfh in peripheral blood. The correlation between the proportion of CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh in peripheral blood of SLE patients and clinical indicators and the proportion of plasmablasts was analyzed. **Results** The expression levels of CXCR3, ICOS and SLAMF5 were significantly higher on the surface of the CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh compared with those of the CCR7^{hi}PD-1^{lo} Tfh ($t=3.73$, 5.06 and 8.27 ; all $P<0.01$). The frequencies of CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh in the peripheral blood of the SLE and RA patients were 5.79% (2.97%, 8.95%) and 4.57% (2.51%, 7.60%), respectively, which were both significantly higher than that of the healthy controls (2.93% [1.63%, 5.21%], $U=314.5$ and 332.5 , both $P<0.01$). There was no difference in the frequency of CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh in peripheral blood between SS patients and healthy controls ($U=183.0$, $P>0.05$). The proportion of CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh in peripheral blood of the SLE patients was positively

[收稿日期] 2018-07-24 [接受日期] 2018-10-09

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(81302578)。Supported by Young Science Fund of National Natural Science Foundation of China (81302578)。

[作者简介] 康子健, 硕士生。E-mail: kangzijian1992@163.com; 刘亚群, 博士生。E-mail: liuyaqun@smmu.edu.cn

[△]共同第一作者(Co-first authors)。

*通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-81871920, E-mail: xuhuji@smmu.edu.cn

correlated with systemic lupus erythematosus disease activity index (SLEDAI), serum anti-double-stranded DNA (dsDNA) titers and the proportion of plasmablasts ($r=0.447$ 1, 0.517 4 and 0.466 9; all $P<0.05$). **Conclusion** Increased proportion of CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh in peripheral blood of the SLE patients is associated with increased SLEDAI and increased proportion of plasmablasts; and detecting the Tfh subsets can indirectly reflect the functional status of germinal center and B lymphocytes, which is of great significance for diagnosis, monitoring and prognosis of SLE.

[Key words] systemic lupus erythematosus; follicular helper T cells; CCR7 receptors; programmed death 1; rheumatoid arthritis; Sjögren's syndrome

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2018, 39(11): 1202-1208]

系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 是一种累及多器官、多系统的慢性自身免疫性疾病, 其病理特点为自身抗体大量产生, 并与体内相应的自身抗原形成免疫复合物, 沉积于组织和器官, 从而导致损伤^[1]。SLE 的发病机制尚不清楚, 但目前认为其主要与 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞功能紊乱导致的免疫稳态失衡有关^[1]。

滤泡辅助性 T 细胞 (follicular helper T cell, Tfh) 是 CD4⁺ T 淋巴细胞的一个亚群, 在二级淋巴器官生发中心为 B 淋巴细胞提供活化信号, 促进体细胞高频突变及抗体类型转换^[2]。Tfh 通过表达转录因子 B 细胞淋巴瘤 6 (B cell lymphoma 6, BCL-6)、C-X-C 趋化因子受体 (C-X-C chemokine receptor, CXCR) 5、诱导型共刺激分子 (inducible costimulator, ICOS) 及程序性死亡蛋白 1 (programmed death 1, PD-1) 等分子调节生发中心的 B 淋巴细胞的发育、增殖、分化, 促进抗体分泌细胞形成^[3-4]。Tfh 还可以通过分泌白细胞介素 (interleukin, IL) 21 (IL-21) 促进生发中心形成、B 淋巴细胞增殖和分化以及大量抗体的产生^[5]。

Tfh 不仅存在于生发中心, 亦存在于外周血中。外周血 Tfh 亚群紊乱与多种自身免疫性疾病有关, 但其表型特征、临床意义以及在自身免疫性疾病发病中的作用仍然不清楚。研究发现, 在小鼠和人体内可根据 C-C 趋化因子受体 7 (C-C chemokine receptor 7, CCR7) 和 PD-1 的表达量, 将 Tfh 分为 2 种功能状态: CCR7^{hi}PD-1^{lo} (CCR7 高表达、PD-1 低表达) 静息型 Tfh 和 CCR7^{lo}PD-1^{hi} (CCR7 低表达、PD-1 高表达) 效应型 Tfh, 其中 CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh 的比例增加提示 Tfh 活化^[6]。本研究通过检测 SLE 患者外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 中 CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh 的比例, 分析其与临床指标和成

浆细胞的相关性, 从而揭示其在 SLE 发病机制中的作用。

1 资料和方法

1.1 研究对象 纳入 2018 年 2 月至 2018 年 7 月在我院风湿免疫科就诊的 31 例 SLE 患者, 均符合 1997 年美国风湿病协会 (American College of Rheumatology, ACR) 的 SLE 诊断标准^[7], 且均行系统性红斑狼疮疾病活动指数 (systemic lupus erythematosus disease activity index, SLEDAI) 测评。纳入同期在我院风湿免疫科就诊的类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 患者 29 例 (均符合 1987 年 ACR 的 RA 诊断标准^[8])、干燥综合征 (Sjögren's syndrome, SS) 患者 12 例 (均符合 2002 年 ACR 的 SS 诊断标准^[9]), 以及在我院体检中心行健康体检的健康对照 37 名。本研究经我院医学伦理委员会审批, 所有受试者均签署知情同意书。

1.2 主要试剂与仪器 活细胞染料、别藻蓝蛋白-花青素 7 (allophycocyanin-cyanine 7, APC-cy7) 标记的抗 CD4、异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的抗 CD45RA、AlexFlour 647 标记的抗 CXCR5、Brilliant Violet™ 421 标记的抗 CCR7、多甲藻黄素叶绿素蛋白-花青素 5.5 (peridinin chlorophyll protein-cyanine 5.5, PerCP-cy5.5) 标记的抗 PD-1、藻红蛋白 (phycoerythrin, PE) 标记的抗信号淋巴细胞激活分子家族成员 5 (signaling lymphocytic activation molecule family member 5, SLAMF5)、PE-CF™594 标记的抗 CXCR3、藻红蛋白-花青素 7 (phycoerythrin-cyanine 7, PE-cy7) 标记的抗 ICOS、别藻蓝蛋白 (allophycocyanin, APC) 标记的抗 CD19、PerCP-cy5.5 标记的抗 CD27、PE-cy7 标记的抗 CD38 和 PE 标记的抗免疫球蛋白

(immunoglobulin, Ig) D (IgD) 抗体均购自美国 Biolegend 公司。人淋巴细胞分离液购自美国 Sigma 公司。使用美国 BD 公司 LSRFortessa 型流式细胞仪进行检测。

1.3 实验方法

1.3.1 PBMC 的制备 用乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) 抗凝管采集所有研究对象外周静脉血各 5 mL, 加入 5 mL 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 稀释、混匀, 然后加至含 5 mL 人淋巴细胞分离液的离心管中, 1 100×g 离心 23 min。吸取中间白膜层, PBS 洗涤 2 次, 加入含 0.5% 胎牛血清的 1 mL 流式染色缓冲液重悬细胞, 即得 PBMC 悬液。

1.3.2 细胞表面染色 调整 PBMC 悬液细胞密度为 1×10⁷/mL, 取 100 μL (1×10⁶ 个细胞) 细胞悬液于流式管中, 分别加入活细胞染料和抗 CD4、抗 CD45RA、抗 CXCR5、抗 CXCR3、抗 CCR7、抗 ICOS、抗 PD-1、抗 SLAMF5 抗体。另取 1×10⁶ 个细胞, 分别加入活细胞染料和抗 CD19、抗 CD27、抗 IgD、抗 CD38 抗体。4 ℃ 孵育 30 min, PBS 洗涤 2 次, 加入 300 μL 流式染色缓冲液重悬后使用流式细胞仪进行检测, 并采用 FlowJo 软件进行数据分析。

1.4 统计学处理 应用 GraphPad Prism 7.0 软件进行统计学分析。呈正态分布且方差齐性的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验或方差分析;

偏态分布的计量资料以中位数 (下四分位数, 上四分位数) 表示, 两组间比较采用 Mann-Whitney *U* 检验; 计数资料以例数和百分数表示, 组间比较采用 χ^2 检验; 相关性分析采用 Spearman 相关分析。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 各组的基线资料 见表 1。健康对照 37 名, 男 4 名、女 33 名, 年龄 (42.49±11.29) 岁; SLE 患者 31 例, 男 3 例、女 28 例, 年龄为 (40.29±13.06) 岁; RA 患者 29 例, 男 3 例、女 26 例, 年龄 (63.10±10.95) 岁; SS 患者 12 例, 男 1 例、女 11 例, 年龄 (50.75±11.80) 岁。各组间的性别构成差异无统计学意义 ($\chi^2=0.07, P>0.05$); SLE、SS 患者年龄与健康对照差异均无统计学意义 ($t=-0.77、2.12, P$ 均 >0.05), 而 RA 患者年龄大于健康对照, 差异有统计学意义 ($t=7.09, P<0.01$)。RA 患者 C3、C4、IgM 和 IgE 水平均高于 SLE 患者 ($t=5.12、4.66, U=207.00、198.50; P$ 均 <0.01)。SS 患者红细胞沉降率 (erythrocyte sedimentation rate, ESR)、C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP)、C4、IgA 水平低于 RA 患者 ($U=78.50、73.50, t=-2.53, U=68.50; P<0.05, P<0.01$)。各组间病程、白细胞计数、淋巴细胞计数、IgG 水平差异均无统计学意义 ($H=4.04、F=0.04、F=0.50、H=3.07, P$ 均 >0.05)。

表 1 各组临床资料比较

Tab 1 Comparison of clinical characteristics among different groups

Characteristic	HC N=37	SLE N=31	RA N=29	SS N=12
Age (year), $\bar{x} \pm s$	42.49 ± 11.29	40.29 ± 13.06	63.10 ± 10.95** $\Delta\Delta$	50.75 ± 11.80 Δ
Female/male n/n	33/4	28/3	26/3	11/1
Disease duration t/month, M(Q _L , Q _U)		48 (12, 84)	84 (31, 162)	72 (15, 141)
ESR (mm · 1 h ⁻¹), M(Q _L , Q _U)		22.00 (6.00, 44.00)	34.00 (9.50, 54.50)	12.00 (6.25, 18.75) $\Delta\Delta$
CRP ρ_B /(mg · L ⁻¹), M(Q _L , Q _U)		4.02 (1.68, 10.10)	10.00 (4.49, 22.75)	3.18 (2.10, 5.37) $\Delta\Delta$
WBC count (L ⁻¹ × 10 ⁹), $\bar{x} \pm s$		6.14 ± 2.78	6.31 ± 2.02	6.18 ± 2.57
Lymphocyte count (L ⁻¹ × 10 ⁹), $\bar{x} \pm s$		1.57 ± 0.94	1.71 ± 0.68	1.82 ± 0.76
C3 ρ_B /(g · L ⁻¹), $\bar{x} \pm s$		0.60 ± 0.19	0.89 ± 0.23 $\Delta\Delta$	0.73 ± 0.19
C4 ρ_B /(g · L ⁻¹), $\bar{x} \pm s$		0.12 ± 0.06	0.21 ± 0.07 $\Delta\Delta$	0.14 ± 0.06 Δ
IgG ρ_B /(g · L ⁻¹), M(Q _L , Q _U)		10.80 (8.79, 15.40)	12.70 (11.00, 19.30)	11.60 (9.33, 16.96)
IgM ρ_B /(g · L ⁻¹), M(Q _L , Q _U)		0.94 (0.71, 1.13)	1.20 (1.03, 1.88) $\Delta\Delta$	0.87 (0.59, 1.21)
IgA ρ_B /(g · L ⁻¹), M(Q _L , Q _U)		2.47 (1.64, 3.74)	2.66 (1.76, 3.38)	1.48 (0.94, 2.66) Δ
IgE ρ_B /(U · mL ⁻¹), M(Q _L , Q _U)		14.50 (5.00, 58.48)	47.50 (35.10, 144.00) $\Delta\Delta$	8.22 (5.12, 24.80)

HC: Healthy control; SLE: Systemic lupus erythematosus; RA: Rheumatoid arthritis; SS: Sjögren's syndrome; ESR: Erythrocyte sedimentation rate; CRP: C-reactive protein; WBC: White blood cell; C3: Complement 3; C4: Complement 4; Ig: Immunoglobulin; M (Q_L, Q_U): Median (lower quartile, upper quartile). ** $P<0.01$ vs HC group; $\Delta P<0.05, \Delta\Delta P<0.01$ vs SLE group; $\Delta P<0.05, \Delta\Delta P<0.01$ vs RA group

2.2 CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh 与 CCR7^{hi}PD-1^{lo} Tfh 表面分子的表达情况 根据 CCR7 和 PD-1 的表达情况, 可将健康对照外周血 CD4⁺CD45RA⁻CXCR5⁺ Tfh 分为 CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh 和 CCR7^{hi}PD-1^{lo} Tfh

(图 1A)。相比 CCR7^{hi}PD-1^{lo} Tfh, CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh 表面 CXCR3、ICOS 和 SLAMF5 表达水平较高 ($t=3.73$ 、 5.06 、 8.27 , P 均 <0.01 ; 图 1B)。

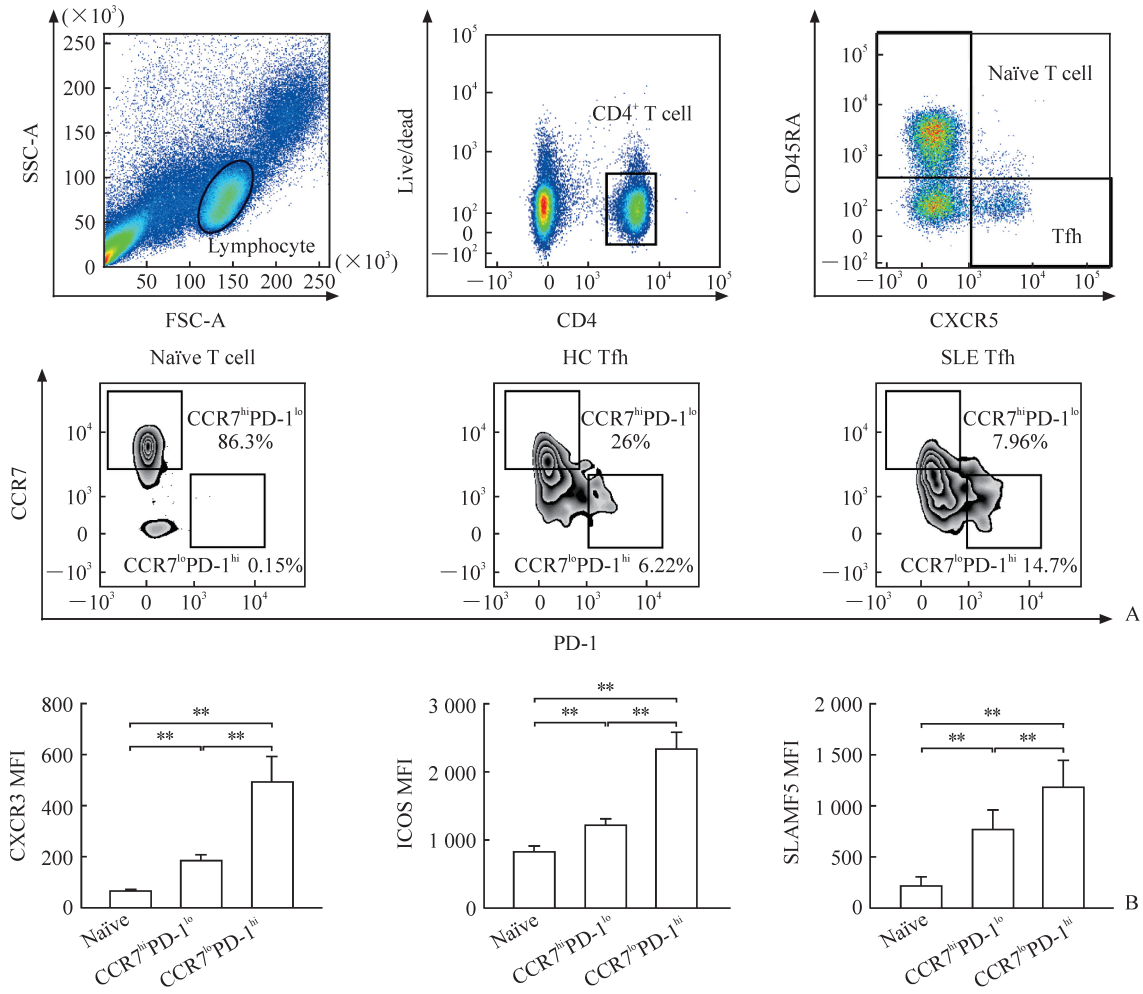


图 1 CCR7^{hi}PD-1^{lo} Tfh 与 CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh 设门方法及表面分子表达差异

Fig 1 Gate strategy and distinct phenotypes of CCR7^{hi}PD-1^{lo} Tfh and CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh subsets

A: Gate strategy to identify CCR7^{hi}PD-1^{lo} Tfh and CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh subsets in Tfh; B: MFI of CXCR3, ICOS and SLAMF5 expression levels on CCR7^{hi}PD-1^{lo} Tfh and CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh subsets. Tfh: Follicular helper T cell; CCR7: C-C chemokine receptor 7; PD-1: Programmed death 1; hi: High expression; lo: Low expression; HC: Healthy control; SLE: Systemic lupus erythematosus; CXCR: C-X-C chemokine receptor; ICOS: Inducible costimulatory; SLAMF5: Signaling lymphocytic activation molecule family member 5; MFI: Mean fluorescence intensity. ** $P<0.01$. $n=12$, $\bar{x}\pm s$

2.3 SLE、RA 和 SS 患者外周血中 CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh 和 CCR7^{hi}PD-1^{lo} Tfh 的比例 SLE、RA 和 SS 患者外周血中 CD4⁺CD45RA⁻CXCR5⁺ Tfh 的比例与健康对照相比差异均无统计学意义 (P 均 >0.05 , 图 2A)。与健康对照相比, SLE 患者外周血中 CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh 的比例增多 [5.79% (2.97%, 8.95%) vs 2.93% (1.63%, 5.21%)], $U=314.5$, $P<0.01$; 图 2B], CCR7^{hi}PD-1^{lo} Tfh 的比例降低 [17.00% (10.50%, 27.60%) vs 25.20%

(16.55%, 44.90%)], $U=341.5$, $P<0.01$; 图 2C]。RA 患者 CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh 的比例与健康对照相比亦增加 [4.57% (2.51%, 7.60%) vs 2.93% (1.63%, 5.21%)], $U=332.5$, $P<0.01$; 图 2B], 而 CCR7^{hi}PD-1^{lo} Tfh 的比例与健康对照相比差异无统计学意义 ($U=413.5$, $P>0.05$; 图 2C)。SS 患者 CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh 和 CCR7^{hi}PD-1^{lo} Tfh 的比例与健康对照相比差异均无统计学意义 ($U=183.0$ 、 208.0 , P 均 >0.05 ; 图 2B、2C)。

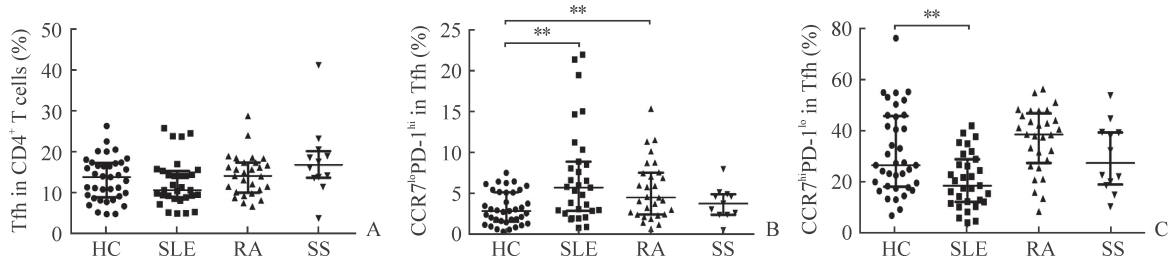


图 2 Tfh (A)、CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh (B) 和 CCR7^{hi}PD-1^{lo} Tfh (C) 在 HCs 和 SLE、RA、SS 患者外周血中的比例
Fig 2 Proportions of Tfh (A), CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh (B) and CCR7^{hi}PD-1^{lo} Tfh (C) in peripheral blood of SLE, RA and SS patients and HCs

Tfh: Follicular helper T cell; CCR7: C-C chemokine receptor 7; PD-1: Programmed death 1; lo: Low expression; hi: High expression; HC: Healthy control ($n=37$); SLE: Systemic lupus erythematosus ($n=31$); RA: Rheumatoid arthritis ($n=29$); SS: Sjögren's syndrome ($n=12$). ** $P<0.01$

2.4 SLE 患者外周血中 CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh 比例与临床指标及成浆细胞比例的相关性 SLE 患者外周血中 CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh 的比例与患者年龄、病程无明显相关性 ($r=-0.0412$ 、 0.1233 , P 均 >

0.05), 而与 SLEDAI、抗双链 DNA (double-stranded DNA, dsDNA) 抗体滴度以及成浆细胞 ($CD19^+IgD^-CD38^{++}$) 比例呈正相关 ($r=0.4471$ 、 0.5174 、 0.4669 , P 均 <0.05)。见图 3。

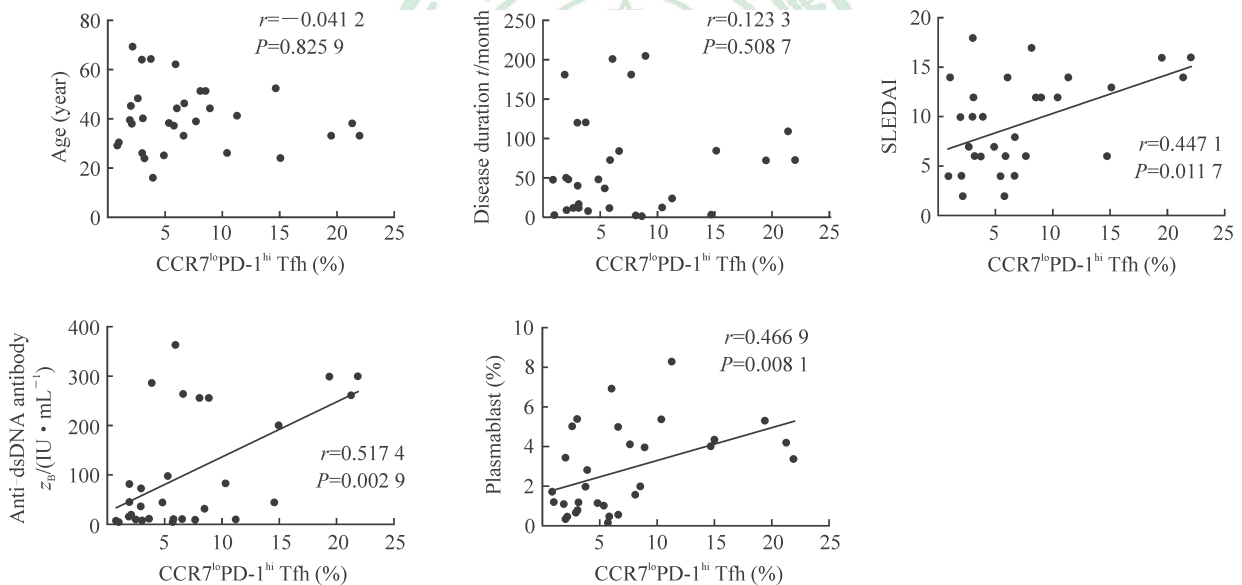


图 3 SLE 患者外周血中 CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh 比例与临床指标及成浆细胞比例的相关性

Fig 3 Correlation analysis between clinical data, frequency of plasmablasts and percentage of CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh subset in peripheral blood of SLE patients

SLE: Systemic lupus erythematosus; CCR7: C-C chemokine receptor 7; PD-1: Programmed death 1; lo: Low expression; hi: High expression; Tfh: Follicular helper T cell; SLEDAI: Systemic lupus erythematosus activity index; dsDNA: Double-stranded DNA

3 讨论

Tfh 的主要功能是辅助 B 淋巴细胞增殖、分化并促进抗体生成, 调节体液免疫。因此, Tfh 比例及功能失调与诸多自身免疫性疾病的发生、发展有关。SLE 是一种以大量自身抗体产生为特征的自身免疫性疾病, 患者机体内生发中心反应亢

进, 自身反应性 B 淋巴细胞显著增加, 这种病理改变与 Tfh 异常密切相关^[10]。Odegard 等^[11]利用狼疮小鼠模型进行研究, 发现 Tfh 增加可以促进小鼠生发中心 B 淋巴细胞 IgG 分泌增多, 导致狼疮病情进展, 而清除体内 Tfh 病情则改善。Tfh 不仅可在生发中心与 B 淋巴细胞相互作用调节体液免疫, 亦可在外周血及 SLE 患者的肾组织中发挥作

用^[12-13]。由于人淋巴组织样本采集受限, 分析患者外周血 Tfh 成为一种具有重要临床意义的替代策略。外周血 Tfh 与生发中心 Tfh 具有相似的表型和 B 淋巴细胞辅助功能^[14]。利用不同的表面标志, Tfh 可被细分为多种亚群, 不同亚群的功能存在差异。Choi 等^[15]发现 CXCR5^{hi}ICOS^{hi}PD-1^{hi} (CXCR5、ICOS、PD-1 均高表达) Tfh 在 SLE 患者体内增加, 与 SLEDAI 和抗 dsDNA 抗体滴度相关。Le Coz 等^[16]根据 CXCR3 和 CCR6 将 Tfh 分成 Tfh1、Tfh2 和 Tfh3, 其中 Tfh2 扩增与 SLE 病情相关。但是, 既往研究均缺乏对不同自身免疫性疾病中 Tfh 的对比以及 Tfh 与 B 淋巴细胞亚群的相关性分析。

本研究结果示, 根据 CCR7 和 PD-1 的表达情况, Tfh 可被细分为 CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh 和 CCR7^{hi}PD-1^{lo} Tfh; 相比 CCR7^{hi}PD-1^{lo} Tfh, CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh 表面 CXCR3、ICOS 和 SLAMF5 的表达水平较高, 说明 CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh 具有更强的 B 淋巴细胞辅助能力。CXCR3 是一种趋化因子受体, 与相应趋化因子结合后可介导 Tfh 迁移至多种外周炎性组织, 特别是肾组织^[17]。ICOS 和 SLAMF5 与 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞之间相互作用密切相关。ICOS 通过与 B 淋巴细胞表面 ICOS 配体结合促进 B 淋巴细胞活化, SLAMF5 可增加 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞之间的黏附从而产生有效的免疫反应^[18]。阻断 ICOS 和 SLAMF5 均可抑制 B 淋巴细胞分化和抗体产生, 下调体液免疫的强度^[19-20]。Choi 等^[15]也证实 CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh 具有更强的分泌 IL-21 的能力。为了进一步探究 CCR7^{lo}PD-1^{hi} 在自身免疫性疾病中的作用, 本研究对不同亚群 Tfh 进行分析, 结果显示 CD4⁺CD45RA⁻CXCR5⁺ Tfh 的比例在 SLE、RA、SS 患者和健康对照之间差异均无统计学意义 (P 均 >0.05), 但 SLE 患者外周血中 CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh 的比例较健康对照增加 ($P<0.01$), CCR7^{hi}PD-1^{lo} Tfh 比例降低 ($P<0.01$); RA 患者外周血中 CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh 的比例与健康对照相比亦增加 ($P<0.01$), 而 CCR7^{hi}PD-1^{lo} Tfh 比例差异无统计学意义 ($P>0.05$); SS 患者外周血中 2 个亚群 Tfh 的比例较健康对照差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。研究发现与 RA 和 SS 患者相比, SLE 患者中自身反应性抗体的种类更加多样^[21], Tfh 亚群的紊乱可能是 SLE 自身抗体多

样的重要原因。本研究通过相关性分析发现, CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh 比例与 SLE 患者的 SLEDAI、抗 dsDNA 抗体滴度以及 CD19⁺IgD⁻CD38⁺⁺成浆细胞比例呈正相关 ($r=0.447\ 1$ 、 $0.517\ 4$ 、 $0.466\ 9$, P 均 <0.05), 提示 CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh 是一种效应型 Tfh 亚群, 可通过辅助 B 淋巴细胞产生自身抗体促进疾病的发生和发展。

PD-1 是含有 288 个氨基酸的 I 型跨膜蛋白, 细胞外含 IgV 样结构, 细胞内含免疫受体酪氨酸依赖抑制基序 (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif, ITIM) 和免疫受体酪氨酸依赖转换基序 (immunoreceptor tyrosine-based switch motif, ITSM)。PD-1 与程序性死亡蛋白配体 1 (programmed death-ligand 1, PD-L1) 结合后, ITIM、ITSM 可发生磷酸化, 招募蛋白酪氨酸酶, 从而使下游分子去磷酸化, 转导负向信号, 降低 T 淋巴细胞活化程度及炎症反应^[22]。PD-1 曾被认为是发挥免疫耐受作用, 敲除 *PD-1* 可以使小鼠产生自身免疫反应, 上调 *PD-1* 可以改善自身免疫症状^[23]。但是多项研究表明, PD-1/PD-L1 在自身免疫性疾病患者中表达水平升高, 且 PD-1^{hi} Tfh 具有更强的激活 B 淋巴细胞能力^[15,24]。这些研究结论并不一致, 提示 PD-1 信号在生发中心对 Tfh 起着精细的调节作用。上调 *PD-1* 虽然可以减少 Tfh 的数量, 但是其具有更强的分泌 IL-4 和 IL-21 的能力, 从而促进生发中心 B 淋巴细胞的生长以及高亲和性抗体分泌细胞的形成^[4]。

综上所述, 本研究表明 SLE 患者外周血中 CCR7^{lo}PD-1^{hi} Tfh 比例增加与 SLEDAI 升高、成浆细胞比例的增加相关, 检测患者外周血 Tfh 亚群可间接反映生发中心及 B 淋巴细胞的功能状态, 对于疾病诊断、监测和预后有重要意义, 针对该群细胞进行干预可能成为治疗 SLE 的潜在策略。

[参 考 文 献]

- [1] LISNEVSKAIA L, MURPHY G, ISENBERG D. Systemic lupus erythematosus[J]. Lancet, 2014, 384: 1878-1888.
- [2] BRINK R, PHAN T G. Self-reactive B cells in the germinal center reaction[J]. Annu Rev Immunol, 2018, 36: 339-357.
- [3] CRAFT J E. Follicular helper T cells in immunity and

- systemic autoimmunity[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2012, 8: 337-347.
- [4] GOOD-JACOBSON K L, SZUMILAS C G, CHEN L, SHARPE A H, TOMAYKO M M, SHLOMCHIL M J. PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells[J]. *Nat Immunol*, 2010, 11: 535-542.
- [5] LINTERMAN M A, BEATON L, YU D, RAMISCAL R R, SRIVASTAVA M, HOGAN J J, et al. IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses[J]. *J Exp Med*, 2010, 207: 353-363.
- [6] HE J, TSAI L M, LEONG Y A, HU X, MA C S, CHEVALIER N, et al. Circulating precursor CCR7^{lo}PD-1^{hi} CXCR5⁺ CD4⁺ T cells indicate Tfh cell activity and promote antibody responses upon antigen reexposure[J]. *Immunity*, 2013, 39: 770-781.
- [7] HOHBERG M C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus[J/OL]. *Arthritis Rheum*, 1997, 40: 1725. doi: 10.1002/1529-0131(199709)40:9<1725::AID-ART29>3.0.CO;2-Y.
- [8] ARNETT F C, EDWORTHY S M, BLOCH D A, MCSHANE D J, FRIES J F, COOPER N S, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 1987, 31: 315-324.
- [9] VITALI C, BOMBARDIERI S, JONSSON R, MOUTSOPOULOS H M, ALEXANDER E L, CARSONS S E, et al. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group[J]. *Ann Rheum Dis*, 2002, 61: 554-558.
- [10] 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: 281-290.
- [11] ODEGARD J M, MARKS B R, DIPLACIDO L D, POHOLEK A C, KONO D H, DONG C, et al. ICOS-dependent extrafollicular helper T cells elicit IgG production via IL-21 in systemic autoimmunity[J]. *J Exp Med*, 2008, 205: 2873-2886.
- [12] UENO H, BANCHEREAU J, VINUESA C G. Pathophysiology of T follicular helper cells in humans and mice[J]. *Nat Immunol*, 2015, 16: 142-152.
- [13] CHANG A, HENDERSON S G, BRANDT D, LIU N, GUTTIKONDA R, HSIEH C, et al. *In situ* B cell-mediated immune responses and tubulointerstitial inflammation in human lupus nephritis[J]. *J Immunol*, 2011, 186: 1849-1860.
- [14] ZHANG X, LINDWALL E, GAUTHIER C, LYMAN J, SPENCER N, ALARAKHIA A, 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: 909-917.
- [15] CHOI J Y, HO J H, PASOTO S G, BUNIN V, KIM S T, CARRASCO S, et al. Circulating follicular helper-like T cells in systemic lupus erythematosus association with disease activity[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2015, 67: 988-999.
- [16] LE COZ C, JOUBLIN A, PASQUALI J L, KORGANOW A S, DUMORTIER H, MONNEAUX F. Circulating TFH subset distribution is strongly affected in lupus patients with an active disease[J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8: e75319. doi: 10.1371/journal.pone.0075319.
- [17] LACOTTE S, DECOSSAS M, LE COZ C, BRUN S, MULLER S, DUMORTIER H, et al. Early differentiated CD138^{high}MHC II⁺IgG⁺ plasma cells express CXCR3 and localize into inflamed kidneys of lupus mice[J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8: e58140. doi: 10.1371/journal.pone.0058140.
- [18] CANNONS J L, QI H, LU K T, DUTTA M, GOMEZ-RODRIGUEZ J, CHENG J, et al. Optimal germinal center responses require a multistage T cell: B cell adhesion process involving integrins, SLAM-associated protein, and CD84[J]. *Immunity*, 2010, 32: 253-265.
- [19] WEINSTEIN J S, BERTINO S A, HERNANDEZ S G, POHOLEK A C, TEPLITZKY T B, NOWYHED H N, et al. B Cells in T follicular helper cell development and function: separable roles in delivery of ICOS ligand and antigen[J]. *J Immunol*, 2014, 192: 3166-3179.
- [20] RAO D A, GURISH M F, MARSHALL J L, SLOWIKOWSKI K, FONSEKA C Y, LIU Y, et al. Pathologically expanded peripheral T helper cell subset drives B cells in rheumatoid arthritis[J]. *Nature*, 2017, 542: 110-114.
- [21] TIPTON C M, HOM J R, FUCILE C F, ROSENBERG A F, SANZ L. Understanding B-cell activation and autoantibody repertoire selection in systemic lupus erythematosus: a B-cell immunomics approach[J]. *Immunol Rev*, 2018, 284: 120-131.
- [22] KEIR M E, BUTTE M J, FREEMAN G J, SHARPE A H. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity[J]. *Annu Rev Immunol*, 2008, 26: 677-704.
- [23] NISHIMURA H, NOSE M, HIAI H, MINATO N, HONJO T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the *PD-1* gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor[J]. *Immunity*, 1999, 11: 141-151.
- [24] LEI H, XUE Y, YIYUN Y, WEIGUO W, LING L, ZOU H. Associations of circulating CXCR3⁻PD-1⁺CD4⁺ T cells with disease activity of systemic lupus erythematosus[J]. *Mod Rheumatol*, 2018, 25: 1-20.