

• 论 著 •

滤泡辅助性 T 细胞在类风湿关节炎发病中的临床意义*

李云春¹, 方忠俊^{1,2#}, 钟立^{3#}, 王悦¹, 阳帆¹, 稽晓赞¹

(1. 上海市光华中西医结合医院检验科, 上海 200052; 2. 上海市复旦大学生命科学院, 上海 200052; 3. 宁夏医科大附院医学实验中心, 宁夏银川 750004)

摘要:目的 通过检测类风湿关节炎(RA)患者外周血滤泡辅助性 T 淋巴细胞(Tfh)和白细胞介素-21(IL-21)等的表达, 探讨其在 RA 发病过程中可能的免疫学发病机制。方法 根据病情活动度不同将病例组分为轻、中、重度活动组(各 30 例), 健康对照组 30 例; 流式细胞仪检测 RA 和健康对照组外周血单个核细胞(PBMCs)中 CD4⁺ 异硫氰酸荧光素(FITC)、CXCR5-藻红蛋白(PE)、ICOS-别藻蓝蛋白(APC)标记的 CD3⁺CD4⁺CXCR⁺、CD3⁺CD4⁺ICOS⁺ 及 CD3⁺CD4⁺CXCR⁺ICOS⁺ Tfh 百分率; 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 IL-21、类风湿因子(RF-IgM)、抗环瓜氨酸肽(CCP)抗体(CCP-IgG)及红细胞沉降率(ESR)、C 反应蛋白(CRP), 分析其与 Tfh 的相关性。结果 RA 轻、中、重度活动组患者外周血中 Tfh 百分率明显高于健康对照组($P<0.05$); Tfh 百分率随着 RA 活动度的增加呈上升趋势, 组间差异有统计学意义($P<0.05$); Tfh 细胞百分率与 RA 患者 ESR、CRP、RF 及抗 CCP 抗体滴度呈正相关, 差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 RA 患者外周血 Tfh、IL-21、CRP、ESR、RF 及 CCP 水平明显升高, 与疾病活动度等有明显相关性, 提示 Tfh 细胞可能在 RA 发病中起着一定的作用。

关键词: 类风湿性关节炎; 滤泡辅助性 T 细胞; 白细胞介素

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.16.014

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)16-2324-03

Clinical significance of T follicular helper cells in rheumatoid arthritis

Li Yunchun¹, Fang Zhongjun^{1,2#}, Zhong Li^{3#}, Wang Yue¹, Yang Fan¹, Ji Xiaoyun¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Guanghua Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai 200052, China; 2. College of Life Science, Fudan University, Shanghai 200052, China;

3. Medical Experimental Center, the Affiliated Hospital of Ningxia Medical College, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

Abstract: Objective To investigate the percentages of T follicular helper cells (Tfh) and interleukin-21 (IL-21) in the plasma of patients with rheumatoid arthritis, and the immunological mechanism of Tfh cells in the development of rheumatoid arthritis. **Methods** According to ACR and DAS28, patients with rheumatoid arthritis were divided into low, moderate and high activity group. The percentages of CD3⁺CD4⁺CXCR⁺, CD3⁺CD4⁺ICOS⁺ and CD3⁺CD4⁺CXCR⁺ICOS⁺ Tfh cells were detected by Flow Cytometry. While the levels of IL-21, RF-IgM and anti-CCP in plasma were measured by ELISA test. The analysis was performed by t-test and Spearman's correlation analysis. **Results** The expression of CD3⁺CD4⁺CXCR⁺ICOS⁺ Tfh cells in PBMCs of rheumatoid arthritis was significantly higher than that in the normal controls ($P<0.05$). Meanwhile the results of the three rheumatoid arthritis groups (low, moderate and high activity groups) showed that the expression of Tfh increased accordingly ($P<0.05$). The expression of Tfh in rheumatoid arthritis was positively related with the levels of IL-21, ESR, CRP, RF and anti-CCP respectively. **Conclusion** The expression of Tfh and IL-21 increases significantly and is closely related to the disease activity in rheumatoid arthritis. The results indicate that the abnormality of Tfh may play an important role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.

Key words: rheumatoid arthritis; T follicular helper cells; interleukin

类风湿关节炎(RA)是以抗原驱动、T 淋巴细胞介导, 且与遗传相关的慢性破坏性、多关节炎为主要表现的全身性自身免疫病。这种疾病是多因子参与、多阶段发展以局部表现为主的极其复杂的全身性病理过程。RA 发病机制尚不十分明确, 目前认为 RA 的发生与 T、B 淋巴细胞的高度活化、免疫球蛋白增多等机体异常免疫反应有关。在 T、B 淋巴细胞的相互作用中, 滤泡辅助性 T 淋巴细胞(Tfh)是主要的辅助 B 淋巴细胞的 T 淋巴细胞亚群^[1]。对 Tfh 细胞在 RA 发病中的变化及其调控机制的研究有助于从新角度认识 RA 的发病机制, 为寻找新的治疗靶点提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选自 2013 年 9 月至 2014 年 8 月上海光华中西医结合医院的 90 例 RA 患者, 诊断均符合美国风湿病学会(ACR)分类诊断标准, 其中男 9 例, 女 81 例, 平均(57±16)岁,

病程 0.6~23 年。根据欧洲抗风湿病联盟(EULAR)推荐的 RA 疾病活动指数(DAS28)评分将患者分为轻度活动组(DAS28 2.6~3.2)、中度活动组(3.2<DAS28≤5.1)和重度活动组(DAS28>5.1)各 30 例。根据双手 X 射线片定义, 大于 3 级为有严重骨质破坏, 小于或等于 2 级则为无或轻度骨质破坏, 其中有严重骨质破坏 57 例, 无或轻度骨质破坏 33 例。健康对照组 30 例, 来自医院门诊体检的健康志愿者, 其中男 8 名, 女 43 名, 平均(46±12)岁。

1.2 方法 早晨空腹采集乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝血及非抗凝血, 非抗凝血离心留取血清, -80℃ 冰箱冻存, 血清学指标检测严格按照酶联免疫吸附试验(ELISA)说明书操作。流式细胞术检测: 抗凝外周血 10 mL, 分别加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗 cxcR5, 藻红蛋白(PE)标记的抗 CD3⁺, PercP 标记的抗 CD4⁺, PE-cy7 标记的抗 Icos 抗体, FITC 标记的

* 基金项目: 上海市卫计委项目(201440317), 上海市长宁区卫生局项目(20124Q03001)。 作者简介: 李云春, 女, 主任技师, 从事临床免疫学检验工作。 # 同为第一作者。

CD3⁺, PE 标记的 CD8⁺ 和多甲藻黄素叶绿素蛋白(PerCP) 标记的 CD4⁺ 抗体各 20 μL, 按规程操作。获得外周血 CD3⁺ CD4⁺ CXCR⁺, CD3⁺ CD4⁺ ICOS⁺, 和 CD3⁺ CD4⁺ ICOS⁺ CXCR5⁺ 百分率, 定义 CD3⁺ CD4⁺ CXCR5⁺ ICOS⁺ 为外周血 Tfh 细胞。检测结果以 CD3⁺ CD4⁺ CXCR⁺ /CD4⁺ T 淋巴细胞和 CD3⁺ CD4⁺ ICOS⁺ /CD4⁺ T 淋巴细胞及 CD3⁺ CD4⁺ ICOS⁺ CXCR5⁺ Tfh/CD4⁺ T 淋巴细胞百分率表示。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件包进行统计分析, 对于正态分布及接近正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数的比较采用 *t* 检验, 相关性分析采用 Spearman 相关分析, 以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 RA 患者外周血中 CD3⁺ CD4⁺ ICOS⁺ CXCR5⁺ /CD4⁺ T Tfh 的百分率的比较 90 例 RA 患者外周血中 Tfh 的百分率明显高于健康对照组, 组间比较差异有统计学意义 (*P* <

0.05); RA 患者轻、中、重度活动组外周血 Tfh 百分率呈增加趋势, 组间差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。结果见表 1。

表 1 RA 患者外周血中 Tfh 百分率的比较 (%)				
组别	<i>n</i>	CD3 ⁺ CD4 ⁺ ICOS ⁺ CXCR-	CD3 ⁺ CD4 ⁺ ICOS-CXCR+	CD3 ⁺ CD4 ⁺ ICOS ⁺ CXCR+
轻度活动组	30	1.62±0.3	17.91±0.2	1.81±0.3*△
中度活动组	30	1.89±0.7	16.33±0.3	2.16±0.5*△
重度活动组	30	1.81±0.6	18.01±0.4	5.37±0.9*
健康对照	30	1.79±0.7	16.16±0.9	1.21±0.3

* : *P* < 0.05, 与健康对照组比较; △: *P* < 0.05, 与重度活动组比较。

2.2 RA 患者外周血 Tfh 百分率与其他相关指标的关联性 RA 患者轻、中、重度活动组外周血白细胞介素-21(IL-21)、类风湿因子(RF)、红细胞沉降率(ESR)、抗环瓜氨酸肽(CCP)及 C 反应蛋白(CRP)等随着病情的加重呈逐渐增加趋势, 结果见表 2。

表 2 RA 患者外周血 Tfh 百分率及其他指标比较

组别	<i>n</i>	Tfh (%)	IL-21(μg/L)	CRP(mg/L)	CCP-IgG(U/mL)	RF-IgM(IU/mL)	ESR(mm/h)
轻度活动组	30	1.61±0.3*	1.31±0.6*	26.00±3.0*	61.00±27.0*	22.00±9.0*	26.00±9.0*
中度活动组	30	2.16±0.5*	2.20±0.8*	67.00±11.0	150.00±113.0*	37.00±16.0*	46.00±6.0
重度活动组	30	5.37±0.9	4.60±1.2	79.00±12.0	230.00±123.0	52.00±23.0	50.00±17.0

* : *P* < 0.05, 与重度活动组比较。

2.3 影响 RA 患者 Tfh 表达率的独立因素 通过多元线性相关分析得出抗 CCP 抗体、RF 及 ESR 对 Tfh 的表达率影响较大; RA 患者 Tfh 细胞百分率与 IL-21、ESR、CCP 和 RF 呈正相关, *r* 分别为 0.57、0.49、0.63、0.71, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。

3 讨 论

2000 年 Schaerli 和 Breitfeld 同时报道了一个定位于淋巴滤泡、具有辅助 B 淋巴细胞功能、表型为 CXCR5⁺ CD4⁺ ICOS⁺ 的 T 细胞亚群, 称为 Tfh [2-4]。越来越多的证据表明, Tfh 是主要的辅助 B 淋巴细胞的 T 淋巴细胞亚群。在正常情况下 Tfh 定位于淋巴组织 B 淋巴细胞滤泡中, 其调控 B 淋巴细胞增殖和浆细胞分化的作用也主要在淋巴滤泡中完成。但在自身免疫病理情况下, Tfh 细胞可迁移到非淋巴组织, 并形成含有异位 GC 的淋巴样组织。Tfh 细胞的表面标记物有 CXCR5、PD-1、ICOS、IL-21 等, 有研究发现它们对 Tfh 细胞的迁移、定位、分化、发育起重要的辅助作用 [5-6]。本研究结合临床通过流式细胞术检测 RA 患者和健康对照组外周血 CD4⁺ 细胞 Tfh 样细胞比率 (CD4⁺ CXCR5⁺ ICOS⁺、CD4⁺ CXCR5⁺、CD4⁺ ICOS⁺), 研究发现 RA 患者外周血 Tfh(CD4⁺ CXCR5⁺ ICOS⁺) 百分率高于健康对照组, 且与病情活动度、IL-21、ESR、CRP 及 CCP 等 RA 相关指标呈正相关。RA 患者存在细胞/体液免疫功能的紊乱, 活化 Tfh 细胞释放的细胞因子如 IL-2 等可以促进 CD8⁺ Tc 细胞的增殖, 使临床 RA 患者外周血中 CD3⁺ CD4⁺ /CD3⁺ CD8⁺ T 淋巴细胞比例失衡, 从而导致炎症反应 [7-8]。另外, 由于 Tc 细胞的比例增加, 可促进 IL-21 的产生, 并刺激 B 淋巴细胞活化, 可能导致了机体分泌病理性自身抗体, 从而诱发炎症反应 [9-10]。Hu 等 [11] 研究 CIA 模型, 发现其外周血中 CD4⁺ CXCR5⁺ T 淋巴细胞及 GC 是增多的, 而通过使用阻断 ICOS 抗体的途径治疗后上述细胞明显下降, 并且可以不同程度地缓解疾病活动度。Hutloff 等 [12] 发现系统性红斑狼疮(SLE)患者及狼疮小鼠模型外周血中 CD4⁺ ICOS⁺ 也明显增高。国外亦有研究发现 SLE 患者疾病的活动度与 Tfh 的表达率、CXCL13 及 IL-21 的水平呈正比 [3, 7]。对 RA 患者体内 T 细胞亚群的失调及相关细胞因子参与免疫调节功能的机

制还有待进一步研究, 对 Tfh 样细胞参与 RA 发病及治疗机制的探讨可为将来 Tfh 细胞作为 RA 治疗的新靶点提供可靠的依据和更多的预后判定指标奠定基础。

参考文献

[1] Ma CS, Deenick EK, Batten M, et al. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells[J]. J Exp Med, 2012, 209 (7): 1241-1253.

[2] 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): 1545-1552.

[3] Moser B, Schaerli P, Loetscher P. CXCR5 (+) T cells; follicular homing takes center stage in T-helper-cell responses[J]. Trends Immunol, 2002, 23(5): 250-254.

[4] Maeda S, Fujimoto M, Matsushita T, et al. Inducible costimulator (ICOS) and ICOS ligand signaling has pivotal roles in skinwound healing via cytokine production[J]. Am J Pathol, 2011, 179(5): 2360-2369.

[5] Xu H, Li X, Liu D, et al. Follicular T-helper cell recruitment governed by bystander B cells and ICOS-driven motility[J]. Nature, 2013, 496(7446): 523-527.

[6] Errier B, Costedoat-Chalumeau N, Garrido M, et al. Interleukin 21 correlates with Tcell and B cell subset alterations in systemic lupus erythematosus[J]. J Rheumatol, 2012, 39(9): 202-203.

[7] Karnell JL, Ettinger R. The inter play of IL-21 and BAFF in the formation and maintenance of human B cell memory[J]. Front Immunol, 2012, 9(1): 301-302.

[8] Shekhar S, Yang X. The darker side of follicular helper T cells: from autoimmunity to immunodeficiency[J]. Cell Mol Immunol, 2012, 9(5): 380-385.

[9] 周萌, 陈陆俊, 褚阳, 等. 滤泡辅助性 T 细胞在类风湿性关节炎滑膜中鉴定的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2014, 31(7): 1608.

[10] Kitano M, Moriyama S, Ando Y, et al. Bcl6 protein expression shapes pre-germinal center B cell dynamics (下转第 2328 页)

2.7 主诉 CO 中毒与非主诉 CO 中毒分布 在所有确诊 CO 中毒的 54 例患者中,主诉 CO 中毒病例数 8 例,占 14.81%,非主诉 CO 中毒病例数 92 例,占 85.19%。

3 讨论

CO 是无色、无味的气体^[3],吸入较高浓度时会造成 CO 中毒,死亡率、致残率较高^[4-7]。20 世纪 80 年代 Persaud 等提出了关于 CO 报警设备的理念,由于灵敏的家庭用 CO 报警装置尚未普及,因此在 CO 中毒高发的冬春季节,急救医护人员在第一时间对于室内 CO 浓度的监测对 CO 中毒引发的慢性疾病的急性加重的早发现、早诊断及早治疗显得越发重要。

3.1 室内 CO 浓度与 APACHE II 评分、COHB 的关系 血液中 COHB 的浓度常常作为判断急性 CO 中毒严重程度的诊断指标之一^[8]。化验的结果受到如血标本采集时机、脱离中毒环境时间长短、肺泡通气、血容量、氧疗等影响,COHB 值的动态演变则更有利于准确地判断病情演变规律^[9-10]。

目前对于急性 CO 中毒患者的病情严重程度及改善状况评估仅根据临床医护人员的经验来判断,主观性强,缺乏全面临床状况评价,不易对死亡风险做出客观判断。APACHE II 评分系统现在已经成为世界上应用最广泛的危重患者病情的评分方法。本文通过在第一时间,患者室内环境未破坏情况下测得的室内 CO 浓度与患者入院时的 APACHE II 评分值进行相关性分析,发现 CO 浓度越高,APACHE II 评分越高,预示患者病情危重程度越高,预后越差,为病情及预后的直接判断提供了依据。

3.2 COPD 患者在 CO 中毒病情好转后 CAT 评分的变化 COPD 患者呼出气流受限,当吸入大量的 CO 时,CO 排出困难,体内 CO 浓度持续升高,进而使 COHB 浓度逐步升高,缺氧进行性加重。因此室内的高 CO 浓度会诱发 COPD 的急性发作并加重病情。对 CO 中毒的 COPD 患者应用 CO 浓度监测指导患者出院后生活质量的改善具有重要意义。

3.3 CO 中毒与心衰患者 机体吸入含高浓度 CO 的空气时,CO 会对心肌造成黄嘌呤氧化酶形成增多、中性粒细胞呼吸爆发^[11]、线粒体单电子还原增多及儿茶酚胺自氧化增强从而导致氧自由基生成增多。对于有潜在心脏病变,特别是有冠状动脉硬化性心脏病的患者,会在 CO 中毒时存在心肌梗死和心律失常的高风险^[12]。本文对确诊 CO 中毒的心力衰竭患者,经过治疗及改善室内高 CO 浓度的诱发因素后,心肌指标明显下降,证实早期的室内高 CO 浓度是诱发心衰发作的重要因素之一,而早期 CO 浓度测定能够提早预防心衰出现,并且能够改善心衰患者日常生活状态。

3.4 脑梗死患者合并 CO 中毒在中毒好转后 NIHSS 评分的变化 CO 中毒继发脑梗死的病死率高出脑梗死急性期病死率的 10%^[13],考虑主要与 CO 中毒后脑组织缺血缺氧及氧的利用障碍有关。通过对确诊 CO 中毒的脑梗死或短暂性脑缺血发作(TIA)患者,经过治疗及改善室内高 CO 浓度的诱发因素后,前后对比 NIHSS 的分值变化及分析,证明早期的室内高 CO 浓度作为脑梗死或 TIA 患者的诱发原因应引起高度重视,促使去除早期原因,降低病情的严重程度。

3.5 CO 中毒的确诊率、误诊率 CO 中毒的特点具有普遍性

和隐蔽性,容易误诊,仅少部分患者或家属在第一时间意识到 CO 中毒的诊断可能。室内 CO 浓度直接影响机体的缺氧症状及病情的严重程度,能够提示 CO 中毒患者的预后。对于室内 CO 浓度进行测定,可以对一些隐匿性 CO 暴露做到早期识别,提高医护人员及患者、患者家属对 CO 中毒环境的认识,及时采取措施预防或终止 CO 暴露,减少因轻中度 CO 中毒所诱发的慢性心肺脑等疾病急性发作及降低病情严重程度。

参考文献

[1] Raub JA, Mathieu-Nolf M, Hampson NB, et al. Carbon monoxide poisoning-a public health perspective[J]. *Toxicology*, 2000, 145 (1):1-14.

[2] Goldstein M. Carbon monoxide poisoning[J]. *J Emerg Nurs*, 2008, 34(6):538-542.

[3] 尤荣开. 神经科危重症监测治疗学[M]. 北京:人民军医出版社, 2004:485.

[4] 陈灏珠. 实用内科学[M]. 11 版. 北京:人民卫生出版社, 2002: 767.

[5] Vestbo J, Hurd SS, Agustí AG, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease Gold executive summary[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013, 187(4):347-365.

[6] 阮海林, 杨春旭, 冯小梅, 等. 综合性医院急诊科急性中毒患者流行病学研究[J]. *中国全科医学*, 2006, 9(2):141-143.

[7] 张畔, 刘剑虹, 虎盘林, 等. 急性一氧化碳中毒大鼠急性肺损伤的实验研究[J]. *中华急诊医学杂志*, 2007, 16(5):455-459.

[8] Lane TR, Williamson WJ, Brostoff JM. Carbon monoxide poisoning in a patient with Carbon dioxide retention; a therapeutic challenge[J]. *Cases J*, 2008, 1(1):102.

[9] Piantadosi CA, Zhang J, Levin ED, et al. Apoptosis and delayed neuronal damage after Carbon monoxide poisoning in the rat[J]. *Exp Neurol*, 1997, 147(1):103-114.

[10] Thom SR. Carbon monoxide pathophysiology and treatment. In: Neuman TS, Thom SR, eds. *Physiology and medicine of hyperbaric Oxygen therapy* [J]. Philadelphia Saunders Elsevier, 2008, 5 (2):321-347.

[11] Anderson RF, Allensworth DC, Degroot WJ. Myocardial toxicity from Carbon monoxide poisoning[J]. *Ann Intern Med*, 1967, 67 (1):1172-1182.

[12] Mannaioni PF, Vannacci A, Masini E. Carbon monoxide: the bad and the good side of the coin, from neuronal death to antiinflammatory activity[J]. *Inflamm Res*, 2006, 55(6):261-273.

[13] Yelken B, Tanrıverdi B, Cetinbas F, memis D, Süt N [J]. The assessment of QT intervals in acute carbon monoxide poisoning. *Anadolu Kardiyol Derg*, 2009, 9(2):397-400.

(收稿日期:2015-05-20)



(上接第 2325 页)

and follicular helper T cell heterogeneity[J]. *Immunity*, 2011, 34 (6):961-972.

[11] Hu YL, Metz DP, Chung J, et al. B7RP-1 blockade ameliorates autoimmunity through regulation of follicular helper T cells[J]. *J Immunol*, 2009, 182(3):1421-1428.

[12] Hutloff A, Buchner K, Reiter K, et al. Involvement of inducible co-stimulator in the exaggerated memory B cell and plasma cell Generation in systemic lupus erythematosus[J]. *Arthritis Rheum*, 2004, 50(10):3211-3220.

(收稿日期:2015-04-02)