

# 支气管哮喘患者外周血 CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> 滤泡辅助性 T 细胞样细胞的变化及其意义

龚芳<sup>1\*</sup>, 苏强<sup>2</sup>, 申卫红<sup>1</sup>, 潘宇红<sup>1</sup>, 黄璇<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 无锡市第三人民医院检验科, <sup>2</sup> 呼吸科, 江苏 无锡 214041)

**[摘要]** 目的:探讨 CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>T 细胞在支气管哮喘患者外周血中的数量变化及其临床意义。方法:选取 23 例急性发作期、17 例缓解期哮喘患者及 20 例健康对照作为研究对象。采用流式细胞术检测外周血中 CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>T 细胞占 CD4<sup>+</sup>T 细胞的百分率,并进行肺功能检查,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清总 IgE、白细胞介素(interleukin, IL)-4 和 IL-21 水平。结果:①急性发作组哮喘患者外周血 CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>T 细胞占 CD4<sup>+</sup>T 细胞的比例高于健康对照组[(12.6 ± 0.5)% vs (9.5 ± 1.7)%, *P* < 0.05]。而缓解组和健康对照组之间差异无统计学意义[(10.2 ± 0.4)% vs (9.5 ± 1.7)%, *P* > 0.05];② CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>T 细胞比例与患者的第 1 秒用力呼气容积占预计值的百分比呈负相关(*P* < 0.05),与总 IgE 水平呈正相关(*P* < 0.05);③急性发作组血清 IL-4、IL-21 含量均高于缓解组 and 对照组,且差异有统计学意义(*P* < 0.05)。缓解组血清 IL-4 水平高于对照组 (*P* < 0.05),而血清 IL-21 水平在缓解组与对照组间差异无统计学意义(*P* > 0.05)。结论:外周血 CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> 滤泡辅助性 T 细胞样细胞的异常可能参与哮喘的发病,IL-4 和 IL-21 细胞因子微环境改变可能与滤泡辅助性 T 细胞异常有关。

**[关键词]** 哮喘;滤泡辅助性 T 细胞;CXCR5

**[中图分类号]** R562.25

**[文献标志码]** B

**[文章编号]** 1007-4368(2013)01-102-03

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20130122

支气管哮喘是一种由多种炎症细胞和炎症介质参与的慢性气道炎症性疾病。支气管哮喘表现为可逆性气流受阻、气道高反应性及气道炎性细胞浸润<sup>[1]</sup>。哮喘的发病机制迄今尚不完全明了,研究发现免疫功能异常是重要的致病因素<sup>[2]</sup>。滤泡辅助性 T 细胞(T follicular helper cells, Tfh)是一种新的辅助性 T 细胞亚群,在促进 B 细胞增殖、分化以及免疫球蛋白的类别转换中起着十分重要的作用<sup>[3-4]</sup>。因此本研究应用流式细胞检测,对哮喘患者外周血中 Tfh 细胞分布进行分析,以期对哮喘的发病机制研究提供新的思路。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

40 例哮喘患者均来自 2011 年 3 月~2012 年 3 月无锡市第三人民医院呼吸科门诊和住院患者。哮喘诊断标准参照 2008 年中华医学会呼吸病学分会哮喘学组制定的《支气管哮喘防治指南》<sup>[5]</sup>。按患者症

状分为急性发作组(23 例)和缓解组(17 例)。选择年龄和性别相匹配的 20 例健康献血员为健康对照组。对所有研究对象进行肺功能检查,记录第 1 秒用力呼气容积(forced expiratory volume in 1 second, FEV1)占预计值的百分比(FEV1%)。所有研究对象在入选前 1 周内未应用糖皮质激素或其他免疫抑制剂,1 周内无急性感染,无其他慢性病史。标本的采集均获得患者的知情同意,且本实验获南通大学医学伦理委员会的批准。

PE-Cy5 标记的抗人 CD3、FITC 标记的抗人 CD4、PE 标记的抗人 CXCR5 抗体以及相应同型对照抗体(美国 eBioscience 公司),淋巴细胞分离液(上海试剂二厂)。血清总 IgE ELISA 检测试剂盒(上海生工公司)、人 IL-4 ELISA 检测试剂盒(美国 Bio-legend 公司)、IL-21 ELISA 检测试剂盒(美国 R&D 公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞分离及处理

抽取哮喘患者及健康对照组静脉血,肝素抗凝,采用淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),以 PBS 洗涤后重悬备用。

#### 1.2.2 细胞表面分子染色及流式细胞仪检测

取细胞悬液 100 μl,加 10 μl CD4-FITC、CXCR5-

**[基金项目]** 无锡市医院管理中心医学技术重大扶持项目(YGZF1101)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: gongfang2004@yahoo.com.cn

PE 及 CD3-PE-Cy5 抗体(同时设同型对照反应管), 4°C 避光孵育 30 min 后洗涤, 以 400 μl 冷 PBS 重悬, 进行流式细胞仪测定。在 BD FACS Calibur 流式细胞仪上进行检测, 结果分析应用 FlowJo 软件。在 FSC-SSC 点图上选定淋巴细胞群, 然后以 CD3 和 SSC 设门分析这群细胞中 CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> T 细胞的比例。

### 1.2.3 血清总 IgE、IL-4、IL-21 水平测定

ELISA 法检测血清总 IgE、IL-4 和 IL-21 水平, 严格按试剂盒说明书进行操作。

### 1.3 统计学方法

所有资料处理均用 SPSS13.0 软件进行分析, 数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。经方差齐性检验后, 组间比较采用单因素方差分析, 外周血 CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>T 细胞比例与哮喘患者的 FEV1%、血清总 IgE 水平采用 Pearson 相关性分析。以  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组外周血 CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>T 细胞百分率的比较

急性发作组外周血中 CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>T 细胞占 CD4<sup>+</sup>T 细胞的百分率高于健康对照组和缓解组( $P$  均  $< 0.05$ )。而缓解组与健康对照组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 1 各组外周血 CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>T 细胞的百分率 (%)

组别	CXCR5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup>
急性发作组( $n = 23$ )	12.6 ± 0.5 <sup>**</sup>
缓解组( $n = 17$ )	10.2 ± 0.4
健康对照组( $n = 20$ )	9.5 ± 1.7

与健康对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与缓解组比较, # $P < 0.05$ 。

### 2.2 CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>T 细胞与实验室指标的关系

对 40 例哮喘患者 CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>T 细胞的百分率与患者的 FEV1%、血清总 IgE 水平的相关性进行统计学分析。结果显示该群细胞的表达水平与患者的 FEV1% 呈负相关( $r = -0.48, P < 0.05$ ), 与总 IgE 水平呈正相关( $r = 0.52, P < 0.05$ )。

### 2.3 各组血清 IL-4、IL-21 表达水平的比较

急性发作组血清 IL-4、IL-21 含量均高于缓解组 and 对照组, 且差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。缓解组血清 IL-4 水平高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 而缓解组与对照组比较, 血清 IL-21 水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ , 表 2)。

## 3 讨论

支气管哮喘是一种慢性气道炎症性疾病, 有多

表 2 各组血清 IL-4、IL-21 的表达水平 (ng/L)

组别	IL-4	IL-21
急性发作组( $n = 23$ )	188.3 ± 24.1 <sup>**</sup>	23.5 ± 2.8 <sup>**</sup>
缓解组( $n = 17$ )	126.5 ± 15.3 <sup>*</sup>	15.9 ± 2.2
健康对照组( $n = 20$ )	55.4 ± 7.2	15.4 ± 1.3

与健康对照组比较, \* $P < 0.05$ , 与缓解组比较, # $P < 0.05$ 。

种炎症细胞和炎症介质参与其过程。主要表现为 IgE 介导的 I 型变态反应, 当机体再次接触过敏原时, IgE 交联导致肥大细胞和嗜酸性粒细胞脱颗粒释放炎性介质引起气道的高反应性, 导致支气管哮喘的发作<sup>[1-2]</sup>。IgE 的增高与哮喘的触发有关, 也与哮喘的严重程度相关<sup>[6]</sup>。近年来世界各地哮喘的发病率、病死率有逐渐增高的趋势。哮喘不仅严重危害人类身体健康, 且难以根治易反复发作, 给患者带来了经济负担和精神压力。为了寻求特异性干预哮喘的方法, 人们对其发病机制进行了深入研究。目前认为免疫功能紊乱是哮喘的重要发病机制之一<sup>[2]</sup>。

Tfh 细胞是新近发现的辅助性 T 细胞(Th)中的一种, 在转录因子 B 细胞淋巴瘤因子-6 (B-cell lymphokine-6, Bcl-6) 的调控下, 活化后的 Th 细胞分化为 Tfh 细胞, 该细胞的关键特征是细胞膜表面持续表达 CXCR5, 并以自分泌的方式分泌 IL-21。在 CXCR5、IL-21 分别与滤泡基质细胞分泌的 CXCL13 及 T、B 细胞表达的 IL-21 受体的相互作用下, Tfh 细胞迁移至次级淋巴滤泡形成生发中心, 促进 B 细胞增殖、分化以及免疫球蛋白的类别转换<sup>[3-4]</sup>。Tfh 细胞比例或功能失调与多种疾病的发生有关: 来自狼疮小鼠的动物实验证明大量 Tfh 细胞的产生会导致生发中心过度形成, 并且可以促进高滴度自身抗体产生, 进而出现终末期器官损害<sup>[7-8]</sup>; Tfh 细胞在人自身免疫性疾病中的作用也已逐渐被认识, 已有研究证实系统性红斑狼疮患者 Tfh 细胞异常增多<sup>[9-10]</sup>, 而且这种增高与自身抗体及靶器官损伤的严重程度相关<sup>[9]</sup>。Tfh 细胞比例或功能失调还和其他自身免疫性疾病如类风湿关节炎<sup>[11]</sup>、自身免疫性甲状腺炎<sup>[12]</sup>的发病过程相关。而目前尚无哮喘中 Tfh 细胞的作用及机制方面的研究报道。

本研究发现急性发作组哮喘患者外周血中 CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>T 细胞占 CD4<sup>+</sup>T 细胞的百分率高于健康对照组, 而缓解期患者与健康者无区别。CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>T 细胞的百分率与 FEV1% 呈负相关, 提示外周血 CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>T 细胞的比率可能与疾病的活动性相关。CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>T 细胞的百分率与血清总 IgE 呈正相关, 但是相关系数不是很高, 可以解释为

体内有十分复杂的调节网络,多种细胞及其产生的细胞因子都参与了IgE水平调控,哮喘患者IgE水平升高可能是多种因素共同作用的结果。因为近年来的研究表明,多种细胞因子参与调节IgE的合成。细胞因子微环境失衡则可能是导致哮喘患者体内IgE增高的关键。IL-4调节CD4<sup>+</sup>T细胞向Th2分化,它能促进B细胞分化,并使免疫球蛋白向IgE转化<sup>[13]</sup>。而IL-21也与体内IgE水平高低有密切关系,这可能与它能诱导B细胞活化为免疫球蛋白分泌细胞有关<sup>[14]</sup>。本研究也发现急性发作组血清IL-4、IL-21含量均高于缓解组和对照组,且差异有统计学意义。缓解组血清IL-4水平高于对照组,而血清IL-21水平在缓解组与对照组之间差异无统计学意义。

以往认为,Th2是辅助B细胞的主要辅助性T细胞<sup>[15]</sup>,但近年来的研究已证实,存在于淋巴滤泡中的Tfh细胞才是辅助B细胞在该部位发生增殖活化、体细胞高频突变、免疫球蛋白类别转换等一系列功能变化的重要T细胞亚群。鉴于以前的研究一般认为Th2细胞在哮喘发生、发展中起关键性作用,本研究对同一批哮喘患者也检测了外周血分泌IL-4的T细胞(Th2细胞)比例,结果发现哮喘患者同样存在异常增多的Th2细胞。目前已明确哮喘时免疫应答向Th2偏移,然而在这种慢性炎症疾病中,Tfh和Th2细胞大量并存所产生的是相互拮抗还是协同作用,还有待于进一步的研究证明。

真正意义上的Tfh细胞定位于淋巴滤泡,在淋巴组织中发挥作用,本研究中的对象是循环中的CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>T细胞。虽然Morita等<sup>[16]</sup>提出外周循环中CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>T细胞就是淋巴滤泡中Tfh细胞的功能对应物,但是对于外周循环中CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>T细胞与淋巴滤泡中Tfh细胞的关系目前尚未得到一致意见。因而本研究中把循环中的CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>T细胞称之为Tfh样细胞。

总之,我们的研究发现急性哮喘患者外周血中CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>T细胞存在分布异常,为进一步研究其功能提供了基础。本研究为探讨哮喘的发病机制及防治策略提供了新思路。

#### [参考文献]

- [1] Boyce JA, Bochner B, Finkelman FD, et al. Advances in mechanisms of asthma, allergy, and immunology in 2011 [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2012, 129(2): 335-341
- [2] Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma [J]. *Nat Med*, 2012, 18(5): 673-683
- [3] Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, et al. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages [J]. *Immunity*, 2008, 29(1): 138-149
- [4] Nurieva RI, Chung Y, Martinez GJ, et al. Bel6 mediates the development of T follicular helper cells [J]. *Science*, 2009, 325(5943): 1001-1005
- [5] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2008, 3(31): 177-185
- [6] Kuhl K, Hanania NA. Targeting IgE in asthma [J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2012, 18(1): 1-5
- [7] 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
- [8] 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
- [9] Simpson N, Gatenby PA, Wilson A, et al. Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(1): 234-244
- [10] 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
- [11] Ma J, Zhu C, Ma B, et al. Increased frequency of circulating follicular helper T cells in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Clin Dev Immunol*, 2012, 2012: 827480
- [12] 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
- [13] Basehore MJ, Howard TD, Lange LA, et al. A comprehensive valuation of IL-4 variants in ethnically diverse population: association of total serum IgE levels and asthma in white subject [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2004, 114(1): 80-87
- [14] 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<sup>+</sup> T follicular helper cells [J]. *J Immunol*, 2007, 179(12): 8180-8190
- [15] McGee HS, Agrawal DK. TH2 cells in the pathogenesis of airway remodeling: regulatory T cells a plausible panacea for asthma [J]. *Immunol Res*, 2006, 35(3): 219-232
- [16] Morita R, Schmitt N, Bentebibel SE, et al. Human blood CXCR5(+) CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion [J]. *Immunity*, 2011, 34(1): 108-121

[收稿日期] 2012-08-20