

## 桥本氏甲状腺炎患者滤泡辅助性 T 细胞的检测及临床意义

姜俊<sup>1\*</sup>, 陈宜刚<sup>1</sup>, 叶军<sup>2</sup>, 冯蕾<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>泰州职业技术学院医学系, 江苏 泰州 225300; <sup>2</sup>泰州市人民医院检验中心, 江苏 泰州 225300)

**[摘要]** 目的:检测桥本氏甲状腺炎(HT)患者外周血 CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> T 细胞的表达情况及临床意义。方法:荧光抗体 CD4-FITC、PD-1-PE、CXCR5-AF 标记外周血细胞,流式细胞术测定 49 例 HT 患者、22 例正常对照人群 CD4<sup>+</sup> T 细胞表面 CDXCR5、PD-1 的表达情况。结果:①与正常对照组比较,HT 患者 CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T 显著升高,两者比较有统计学差异( $t = 11.158, P < 0.001$ );CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T 亦显著高于正常对照,两者比较亦有统计学差异( $t = 4.657, P < 0.001$ );②HT 患者 CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T 细胞与 A-TG、A-TPO 均呈正相关( $r = 0.288, P = 0.045; r = 0.396, P = 0.005$ ),CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T 细胞与 A-TG、A-TPO 均呈正相关( $r = 0.415, P = 0.003; r = 0.355, P = 0.013$ )。结论:外周血滤泡辅助性 T 细胞频率升高可能在桥本氏甲状腺炎发病机制中起重要作用。

**[关键词]** 桥本氏甲状腺炎;滤泡辅助性 T 细胞;流式细胞术

**[中图分类号]** R581.4

**[文献标志码]** B

**[文章编号]** 1007-4368(2013)12-1719-03

**doi:**10.7655/NYDXBNS20131217

自身免疫性甲状腺病(autoimmune thyroid disease, AITD)是人类常见的器官特异性自身免疫性疾病,在人群中发病率约为 1.5%,多见于女性。桥本氏甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis, HT)是临床上较为常见的一种 AITD。在 HT 的发病过程中,免疫系统对甲状腺组织成分的自身免疫耐受被打破,导致免疫细胞被甲状腺组织中的器官特异性抗原激活,产生抗甲状腺组织抗原的抗体,如抗甲状腺过氧化物酶抗体(A-TPO)和抗甲状腺球蛋白抗体(A-TG)。近来研究表明滤泡辅助性 T 细胞(T follicular helper cell, Tfh)在促进 B 细胞产生抗体的过程中起重要作用。本研究通过检测 HT 患者外周血滤泡辅助性 T 细胞频率变化,以探讨其在 HT 发病中的作用。

### 1 对象和方法

#### 1.1 对象

HT 组:泰州市人民医院内分泌科 2012 年 8 月~2013 年 8 月门诊 49 例 HT 患者,其中男 14 例,女 35 例,年龄( $45.8 \pm 15.3$ )岁。诊断参照第 7 版《内科学》所列诊断标准判定。排除其他原因引起的甲状腺功能异常和其他自身免疫性疾病。对照组:本院体检中心健康体检正常者 22 例,其中男 7 例,女 15

例,平均年龄( $45.4 \pm 18.3$ )岁。

Anti human CD4-FITC (Clone:OKT4)、Anti human PD-1-PE (Clone:24-31)及其同型对照 Mouse IgG1κIso Control-PE(Clon: P3.6.8.1)(eBioscience 公司,美国);Alexa Fluor<sup>®</sup>R647 Rat Anti Human CXCR5(CXCR5-AF)(Clone:RF8B2)和同型对照 Alexa Fluor<sup>®</sup> R647 Rat IgG2b,κIsotype Control (Clone: 557691)(BD Pharmingen 公司,美国)。

FACSCalibur 流式细胞仪(BD 公司,美国),用美国 BD 公司 CELLQuest 软件获取和分析实验数据。鞘液用美国 Systemex 公司的 Cellpack 血细胞稀释液。

#### 1.2 方法

所有受试者均于清晨空腹状态下抽取外周静脉血 EDTA-K2 抗凝 2 ml,标本在 6 h 之内测定。将试管分为两组,测定管加入 CD4-FITC 和 PD-1-PE 各 5 μl、CXCR5-AF 20 μl,对照管加入 CD4-FITC 和 Mouse IgG1-PE 各 5 μl、Rat IgG1b-AF 20 μl;将标本充分混匀,分别加 50 μl EDTA-K2 抗凝血于上述两组试管中,震荡器上充分混匀,避光放置 15 min;加入溶血素 2 ml,充分震荡,避光放置 10 min。1 500 r/min,离心 5 min 弃上清,加入生理盐水 2 ml 震荡,1 500 r/min,离心 5 min 弃上清,加入生理盐水 100 μl,充分震荡混匀,待测。

用 FACSComp 调整仪器 FSC、SSC、FL1、FL2、FL4 的电压及补偿。用 CELLQuest 软件获取 20 000

**[基金项目]** 江苏省卫生职业技术教育研究科研课题(J201109)

\*通信作者(Corresponding author),E-mail:2625370017@qq.com

个淋巴细胞进行分析。选取 CD4<sup>+</sup> T 细胞进行分析, 分别以同型对照管调整 mark 的位置。在同样的实验条件下, 用以分析测定管中 CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> T 细胞占 CD4<sup>+</sup> T 细胞的比例。另开一个窗选择 CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> T 细胞分析 CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> T 细胞占 CD4<sup>+</sup> T 细胞的比例。

### 1.3 统计学方法

采用 SigmaStat3.1 软件进行统计分析, 文中正态分布数据以均数 + 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组样本如正态分布采用 *t* 检验进行分析。相关性分析采用 Pearson 相关分析, 以  $P \leq 0.05$  作为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HT 组甲状腺功能相关指标检测结果

检测显示游离三碘甲状腺原氨酸(FT3)为(4.61 ± 2.12)pmol/L, 游离甲状腺素(FT4)为(15.01 ± 5.25)pmol/L, 促甲状腺素(TSH)为(5.95 ± 11.35)mIU/, 抗甲状腺球蛋白抗体(A-TG)为(444.14 ± 936.54)IU/ml, 抗甲状腺过氧化物酶抗体(A-TPO)为(314.08 ± 217.83)IU/ml。

### 2.2 两组外周血 CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T 细胞比较

结果显示, 与正常对照组比较, HT 患者 CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> 显著升高, 两者比较有统计学差异 ( $t = 11.158, P < 0.001$ ); CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> 亦显著高于正常对照, 两者比较有统计学差异 ( $t = 4.657, P < 0.001$ ) (表 1)。

表 1 两组外周血 CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T 细胞比较

	<i>n</i>	CD4 <sup>+</sup> CXCR5 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CXCR5 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup>
正常对照	22	23.95 ± 14.05	12.07 ± 4.04
HT 组	49	60.05 ± 11.92	18.80 ± 6.20
<i>t</i> 值		11.158	4.657
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

### 2.3 HT 组外周血 CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T 细胞与其它实验室指标相关性分析显示

HT 组患者 CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T 细胞与 A-TG、A-TPO 均呈正相关 ( $r = 0.288, P = 0.045; r = 0.396, P = 0.005$ ), 但与 FT3、FT4、TSH 均无相关性 ( $r = -0.026, P = 0.895; r = -0.018, P = 0.902; r = -0.051, P = 0.731$ ); CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T 细胞与 A-TG、A-TPO 均呈正相关 ( $r = 0.415, P = 0.003; r = 0.355,$

$P = 0.013$ ), 但与 FT3、FT4、TSH 亦均无相关性 ( $r = 0.248, P = 0.085; r = 0.242, P = 0.095; r = -0.130, P = 0.378$ )。HT 患者 CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T 细胞与 CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T 细胞呈相关性 ( $r = 0.422, P = 0.003$ )。

## 3 讨论

最近研究证实, 另一种效应性细胞亚群 Tfh 在 B 细胞辅助免疫应答中起重要作用, 其迁移定位于淋巴滤泡<sup>[1-2]</sup>, 已证实为辅助性 T 细胞的另一种亚群, 专职辅助生发中心的 B 细胞<sup>[3]</sup>, 其迁移至 B 细胞滤泡, 与特异性配体 CXCL13 结合。Tfh 可以分泌细胞因子 IL-4、IL-10 和 T 细胞表达趋化因子受体 IL-21, 这些细胞因子能促进 B 细胞的生长、增殖、分化和免疫球蛋白转换<sup>[4]</sup>。

Tfh 细胞表达趋化因子受体 CXCR5, 其在 Tfh 迁移至外周淋巴器官 B 细胞区发挥关键作用。Tfh 细胞还表达一些分子发挥辅助功能, 如 CD40 配体 (CD40L)、共刺激分子 (ICOS)、PD-1 和 IL-21, 它们为 Tfh 细胞的鉴别提供极好的标志<sup>[2,5]</sup>。一些研究显示, CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> T 细胞与 Tfh 相关。而人体外周血 CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> T 细胞与 Tfh 有极为相似的功能。初始的 CD4<sup>+</sup> T 细胞不能诱导初始的 B 细胞产生免疫球蛋白, 记忆性的 CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> T 细胞诱导初始的 B 细胞产生极少量的 IgM, 不产生 IgG 或 IgA。相反 CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> T 细胞能有效的诱导初始的 B 细胞产生较多量的 IgM、IgG 和 IgA。而 CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> T 细胞诱导记忆性 B 细胞产生抗体的能力比 CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> T 细胞更强。提示 CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> T 细胞表现出 Tfh 的功能。

许多自身免疫性疾病的发病与自身抗体的产生有关, 这些自身抗体是由 B 细胞转化为浆细胞而产生, 在其产生过程中, 依赖于 Tfh 细胞的辅助作用。有文献报道 Tfh 对器官特异性自身抗原的识别在器官特异性自身免疫性疾病发病过程中起重要的作用, Tfh 与 B 细胞相互作用影响感染性和自身免疫性疾病, Tfh 过表达与 SLE 的疾病进展相关<sup>[6]</sup>, 自身免疫性疾病 (如 SLE、RA) 患者血清中出现高亲和力的抗体与 Tfh 细胞有关<sup>[7]</sup>, 在狼疮患者外周血 CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> T 细胞表达 ICOS 频率升高<sup>[8]</sup>。

临床上有关 HT 的诊断是基于 TG-Ab 和 TPO-Ab 的阳性, 病理检测淋巴结浸润常常出现 GC 的形成是 HT 典型特征, 提示 Th2 免疫应答在 HT 的发病中非常重要。先前的研究证实 Th17 在 HT 患者外

周血中升高,而 Th17 与细胞免疫应答相关,说明 HT 的发病也与细胞免疫相关。但 Figueroa-Vega 等<sup>[9]</sup>同时研究发现 CXCR5<sup>+</sup>Th17 细胞可促进 IgG 特别是 IgA 的分泌,而 CXCR5<sup>+</sup>Th17 细胞不能诱导原始的 B 细胞分泌免疫球蛋白,很好解释了 HT 患者体内 Th17 升高的原因,可能还是与 CXCR5<sup>+</sup>Th17 细胞升高相关。本研究显示,CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>显著高于正常对照人群,与相关报道<sup>[10]</sup>一致,且与 A-TG、A-TPO 均呈显著正相关。可能是因为 Tfh 的升高辅助了 B 细胞产生大量的 A-TG、A-TPO 抗体,而这些抗体的升高导致了 HT 的发病。提示 HT 的发病与体液免疫相关,而 Tfh 在 HT 的体液免疫应答的发病中可能起重要作用。

PD-1 分子在 T-B 细胞相互作用中起重要作用。PD-1 分子可抑制生发中心 Tfh 细胞信号,防止 CD4<sup>+</sup> T 细胞的过度增殖。PD-1 缺失与 Tfh 表型改变有关,如降低 IL-21。本研究显示,CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>与 CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>细胞相关,证实 CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>细胞与 Tfh 细胞相似。但选择哪种表型作为检测外周血循环 Tfh 的检测更为合理及是否可以通过干预 Tfh 的途径来治疗 HT 尚有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] Pelletier N, McHeyzer-Williams LJ, Wong KA, et al. Plasma cells negatively regulate the follicular helper T cell program[J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(12): 1110-1118
- [2] Laurent C, Fazilleau N, Brousset P, et al. A novel subset of T-helper cells: follicular T-helper cells and their markers[J]. *Haematologica*, 2010, 95(3): 356-358
- [3] 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
- [4] Nurieva RI, Chung Y. Understanding the development and function of T follicular helper cells[J]. *Cell Mol Immunol*, 2010, 7(3): 190-197
- [5] Linterman MA, Vinuesa CG. Signals that influence T follicular helper cell differentiation and function [J]. *Semin Immunopathol*, 2010, 32(2): 183-196
- [6] 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
- [7] Poholek AC, Hansen K, Hernandez SG, et al. In vivo regulation of Bcl6 and T follicular helper cell development [J]. *J Immunol*, 2010, 185(1): 313-326
- [8] 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
- [9] Figueroa-Vega N, Alfonso-Perez M, Benedicto I, et al. Increased circulating proinflammatory cytokines and Th17 lymphocytes in Hashimoto's thyroiditis [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95: 953-962
- [10] Chenlu Zhu, Jie Ma, Yingzhao Liu, 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

[收稿日期] 2013-05-17