

系统性红斑狼疮患者外周血 T 细胞 CTLA-4 表达及其临床意义

徐安琪¹, 杨晓帆², 王慧娟², 张缪佳³, 季晓辉^{2*}

(¹南京红十字血液中心研究室, 江苏 南京 210003; ²南京医科大学基础医学院免疫学系, 江苏 南京 211166; ³南京医科大学第一附属医院风湿病科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 研究系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE) T 细胞中 CTLA-4 的表达及临床意义。方法: 分离正常人和 SLE 患者的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs), 以抗-CD3、抗-CD28 刺激培养 48 h, 刺激培养前后收取细胞, 以流式细胞术(FCM)检测 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞中 CTLA-4⁺细胞比例, 并分析其与 SLE 疾病活动性指数(SLEDAI)和肾损害的关系。再以 ELISA 法检测培养上清中游离的 CTLA-4 水平。结果: SLE 患者刺激前的 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞且主要是 CD25⁺T 细胞中 CTLA-4⁺细胞的比例较正常人显著增高, 与 SLEDAI 呈正相关; 而其 CD8⁺CD28⁻T 细胞中 CTLA-4⁺细胞比例也显著高于正常人, 但与 SLEDAI 之间无显著相关性; 经抗-CD3、抗-CD28 抗体刺激后, 其 CD4⁺CD25⁺T 细胞、CD8⁺CD25⁺T 细胞或 CD8⁺CD28⁻T 细胞中 CTLA-4⁺细胞的比例却显著低于正常人, 但与 SLEDAI 之间无显著相关性, 仅在活动性 SLE 患者中有肾损组的 CD8⁺CD28⁻T 细胞中 CTLA-4⁺细胞的比例显著低于非肾损组; 而且经刺激培养后 SLE 患者 PBMC 上清中游离的 CTLA-4 水平也显著低于正常人。结论: SLE 患者新鲜分离的 T 细胞(CD4⁺及 CD8⁺)中 CTLA-4 表达异常增高, 反映 T 细胞异常活化和疾病活动; 另一方面, SLE 患者 T 细胞又存在 CTLA-4 诱导性表达障碍, 可能与 SLE T 细胞体外再活化能力减弱有关。

[关键词] 系统性红斑狼疮; T 细胞; CTLA-4

[中图分类号] R593.24

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)01-0062-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20170113

Expression of CTLA-4 in T cells from peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus and its clinical significance

Xu Anqi¹, Yang Xiaofan², Wang Huijuan², Zhang Miaojia³, Ji Xiaohui^{2*}

(¹Department of Research, Nanjing Red Cross Blood Center, Nanjing 210003; ²Department of Microbiology and Immunology, NJMU, Nanjing 211166; ³Department of Rheumatology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate CTLA-4 expression in T cells from peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and its significance in clinic. **Methods:** Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from SLE patients and healthy donors were isolated and then cultured with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 48 hours. Before and after culture, the cells were detected for the percentages of CTLA-4⁺ cells in CD4⁺ and CD8⁺ T subsets by flow cytometry (FCM). Based on these data, the correlation between CTLA-4 expression in CD4⁺ or CD8⁺ T subsets of SLE patients and SLE disease activity index (SLEDAI) and kidney damage were analyzed. Cell culture supernatants were also collected for the determination of free CTLA-4 level by ELISA. **Results:** In fresh PBMC, CTLA-4⁺ cell percentages of CD4⁺CD25⁺ and CD8⁺CD25⁺ T subsets in SLE patients, were significantly higher than those in controls, and were positively correlated with SLEDAI; CTLA-4⁺ cell percentage of CD8⁺CD28⁻ T subset was also significantly higher in SLE than that in controls, but was not correlated with SLEDAI. After stimulation with anti-CD3 and anti-CD28, CTLA-4⁺ percentages of CD4⁺CD25⁺, CD8⁺CD25⁺ and CD8⁺CD28⁻ T subsets were significantly lower in SLE than those in controls, but was not correlated with SLEDAI. While in active SLE, CTLA-4⁺ cell percentage of CD8⁺CD28⁻ T subsets was significantly lower in patients with kidney damage than that in patients without kidney damage; CTLA-4 level of the culture supernatant was lower in SLE patients than that in controls. **Conclusion:** The abnormally increased expression of CTLA-4 in T (CD4⁺ and CD8⁺) cells fresh isolated from SLE patients T cells might indicate disease development with T cell activation. On the other hand, T cells of SLE patients are deficient in induced expression of CTLA-4, which might be related with the deficient ability of reactivation of SLE T cells *in vitro*.

[Key words] systemic lupus erythematosus; T cells; CTLA-4

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(01):0062-0068]

[基金项目] 南京医科大学科技发展基金项目资助(NY020609)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: jixiaohui@njmu.edu.cn

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种慢性自身免疫性疾病,其发病机制仍不明确。目前认为 SLE 发生的机制主要在于患者丧失对自身组分的免疫耐受,导致体内自身反应性 T 细胞和 B 细胞的异常激活,进而产生自身抗体,激活补体反应,这些细胞及抗体扩散到机体的各个系统,最终形成疾病的损伤表现。自身耐受机制涉及中枢耐受和外周耐受。外周耐受被打破是发生自身免疫性疾病的重要原因。外周耐受的机制复杂多样,其中包括发挥抑制作用的调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)和负性信号分子。而 SLE 的病理机制就涉及 Treg 和负性信号分子的异常^[1-4]。

细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4) 是 T 细胞上的一种转导负性信号的跨膜受体分子,与 CD28 共同享有 B7 分子配体,但与 B7 分子结合后诱导 T 细胞无反应性,参与免疫反应的负性调控。调节性 T 细胞(Treg)是一类具有抑制作用的 T 细胞,可以进一步分很多不同亚群,如 CD25⁺Foxp3⁺的 CD4⁺nTreg、CD4⁺iTreg 以及 CD8⁺的调节性 T 细胞;CD8⁺的调节性 T 细胞亚型更为复杂、争议较多,如有 CD8⁺CD25⁺D69⁺CTLA-4⁺Foxp3⁺T 细胞、CD8⁺CD25⁺CTLA-4⁺Foxp3⁺GITR⁺T 细胞和机制未明的天然型 CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞^[5],以及 CD8⁺CD28⁻的调节性 T 细胞^[6]。CTLA-4 在 Treg 的抑制功能中发挥重要作用。研究表明 CTLA-4 基因敲除小鼠的 Treg 无法发挥正常的免疫抑制功能^[7]。已有研究表明 SLE 患者体内存在 Treg 的数量和功能的缺陷^[4]。本研究主要聚焦于 T 细胞的 CTLA-4 表达,SLE T 细胞是否存在 CTLA-4 表达缺陷?如果有,是否与 T 细胞功能异常及 SLE 发病有关?为了寻找答案,本文研究了 SLE 患者体内 CD4⁺T 细胞 (CD4⁺CD25⁺与 CD4⁺CD25⁻亚群)、CD8⁺T 细胞 (CD8⁺CD25⁺与 CD8⁺CD25⁻亚群及 CD8⁺CD28⁻与 CD8⁺CD28⁺亚群)中 CTLA-4 的表达情况,并对其与 SLE 病情活动性、肾损害的相关性进行了评估。

1 对象和方法

1.1 对象

选择 2010 年 6 月—2012 年 3 月期间南京医科大学第一附属医院风湿病科和南京第一医院风湿病科住院 SLE 患者 40 例。所有患者符合美国风湿病学会 1997 年修订的 SLE 分类诊断标准,排除合并其他免疫系统疾病或肿瘤,其中女 38 例,男 2 例,年龄 21~66 岁,平均 38 岁。SLE 疾病活动度根据

加拿大 Toronto 大学制定的 SLE 疾病活动性指数 (SLE disease activity index, SLEDAI) 进行评分, SLEDAI 0~4 分的为无活动性, ≥5 分的为活动性 SLE 患者。将 SLE 患者按活动性分为非活动性、活动性组;对活动性 SLE 患者再按有无肾脏损害分为肾损组(尿中存在有诊断意义的管型、尿蛋白>0.5 g/d 或+++)和非肾损组。正常对照组 12 例,来自南京医科大学健康志愿献血者和南京市江宁区妇幼保健院正常体检人员,性别和年龄与 SLE 组基本匹配,否认自身免疫性疾病、肿瘤病史,近期无感染病史。

1.2 方法

1.2.1 外周血单个核细胞分离和培养

无菌采集正常对照和 SLE 患者外周静脉血 5 mL,置于肝素钠抗凝管中混匀;采用聚蔗糖-泛葡胺分层密度梯度离心法分离人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs), Ficoll 人淋巴细胞分离液购自天津 TBD 生物技术的发展中心;将上述分离的 PBMCs 细胞用含 15%胎牛血清(FBS)的 RPMI1640 培养基(Invitrogen 公司,美国)调整细胞浓度为 1×10^6 个/孔,接种于已用抗 CD3 单抗($10 \mu\text{g}/\text{mL} \times 200 \mu\text{L}$)包被(4℃过夜)的培养板,同时加入抗 CD28 单抗($2 \mu\text{g}/\text{mL}$),终体积为每孔 1 mL。另设不加抗 CD3、CD28 抗体的对照孔。抗人 CD3、CD28 功能抗体购自美国 eBioscience 生物制剂公司。5%CO₂、37℃培养 48 h 后分别收取细胞和培养上清。细胞用于流式细胞术检测 CTLA-4 的表达,培养上清于-20℃冰箱保存用于 ELISA 法检测 CTLA-4 水平,Human soluble CTLA-4 ELISA kit 购自美国 Biologend 生物公司。

1.2.2 流式细胞术(flow cytometer, FCM)检测 T 细胞表型

收集培养 48 h 后的细胞,调整细胞浓度为 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个/mL,吸取 100 μL 到每个流式检测管中;加入 CD4-FITC 或 CD8-FITC、CD25-APC、CD28-PerCP-Cy5.5 荧光抗体或其同型对照各 20 μL ,4℃避光孵育 30 min;加入 2 mL 染色缓冲液离心洗涤 2 次;加入 1 mL 新鲜配制的固定-破膜剂工作液,4℃避光孵育 60 min;加入缓冲液离心洗涤 2 次;在大约 100 μL 的细胞沉淀中加入 2 μL 正常大鼠血清,室温避光封闭 15 min;加入 CTLA-4-PE 荧光抗体或同型对照 20 μL ,4℃避光孵育 30 min;缓冲液离心洗涤 2 次;加入 300 μL FACS 缓冲液重悬细胞,上流式细胞仪(FACSCalibur, BD 公司,美国)检测,所得数据采用 FCS express V3 软件进行分析。CD4-FITC、CD25-APC、CD8-FITC、CD28-PerCP-Cy5.5、CTLA-4 (CD152)-

PE 鼠抗人单克隆荧光抗体, 固定-破膜剂(fixation/permeabilization) 和 permeabilization 缓冲液均购自美国 eBioscience 生物制剂公司。

1.2.3 培养上清中游离 CTLA-4 水平的 ELISA 检测

将所收集的上述培养上清用 ELISA 法检测游离的 CTLA-4 水平。按说明书操作, 步骤简述如下: 加样, 加入生物素标记的抗体, 孵育, 洗涤, 加亲和素-HRP, 孵育, 洗涤, 加 TMB 显色, 加终止液, 在酶标仪上读取样本吸光度, 根据标准曲线, 换算得到待测血清中细胞因子的浓度。

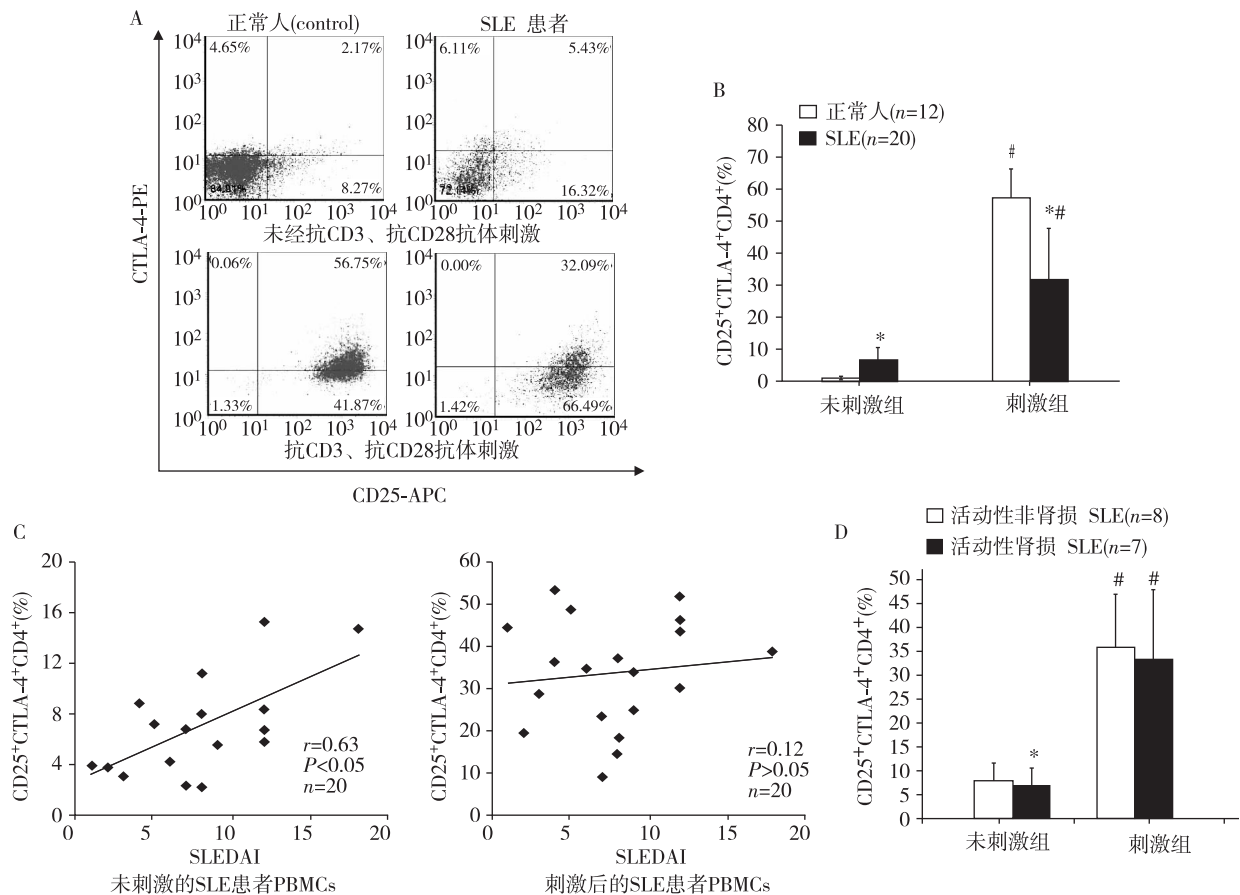
1.3 统计学方法

采用 SPSS16.0 进行统计学分析, 以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间比较采用两独立样本 *t* 检验, 统一样本刺激前后的比较采用配对 *t* 检验, 各亚群细胞百分率与其 SLEDAI 评分的相关性采用线性 Pearson 分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SLE 患者新鲜分离的 CD4⁺CD25⁺T 细胞中 CTLA-4⁺细胞比例显著增高, 且与 SLEDAI 呈正相关; 而对抗 CD3、抗 CD28 抗体刺激的 CTLA-4 表达应答显著降低, 但与 SLEDAI 及肾损害的相关性并不显著

流式细胞术检测时首先以 CD4⁺T 细胞设门, 圈出 CD4⁺T 细胞, 进而分析其 CD25 和 CTLA-4 的表达。结果显示, 在新鲜分离的 PBMC 中, 正常人几乎检测不出 CD25⁺CTLA-4⁺的 CD4⁺细胞, CD25⁻CTLA-4⁺的 CD4⁺细胞比例也只有 (5.95±2.74)%; 而 SLE 患者未经刺激的 PBMC 即可检测出 CD25⁺CTLA-4⁺的 CD4⁺T 细胞, 其比例显著高于正常人(图 1A、B), 且与 SLEDAI 呈正相关(图 1C), 而与肾损害无显著相关性(图 1D)。



A: 外周血 CD4⁺T 细胞刺激前后各亚群表达 CTLA-4 的代表性流式细胞术检测结果; B: SLE 患者 PBMC 刺激前后 CD25⁺CTLA-4⁺CD4⁺比例的变化与正常人对照组比较, * $P < 0.05$; 与未刺激组比较, # $P < 0.05$; C: SLE 患者 PBMC 刺激培养后的 CD25⁺CTLA-4⁺CD4⁺比例与 SLEDAI 的相关性分析; D: 活动性 SLE 肾损组与非肾损组患者 CD25⁺CTLA-4⁺CD4⁺比例的比较, 与活动性非肾损组比较, * $P < 0.05$; 与未刺激组比较, # $P < 0.05$ 。

图 1 SLE 患者 PBMCs 中 CD25⁺CTLA-4⁺CD4⁺比例及其与疾病活动性、肾损害的关系

Figure 1 Ratios of CD25⁺CTLA-4⁺CD4⁺T in PBMCs from SLE patients and their relationships with disease activity and with kidney damage

正常人与 SLE 患者的 PBMCs 经抗 CD3、抗 CD28 抗体刺激培养 48 h 后,较未刺激组相比 CD25⁺CTLA-4⁺的 CD4⁺T 细胞比例显著增高;而与正常人比较,SLE 患者 CD4⁺T 细胞中 CD25⁺CTLA-4⁺细胞比例明显偏低(图 1A、B),但其比值与 SLEDAI 没有显著相关性(图 1C),也与肾损害无显著相关性(图 1D)。

2.2 SLE 患者新鲜分离的 CD8⁺T 细胞中 CD25⁺CTLA-4⁺比例显著高于正常人,而经抗 CD3、抗 CD28 刺激培养后 CD25⁺CTLA-4⁺比例又显著低于正常人,但均与 SLEDAI 及肾损害无显著相关性

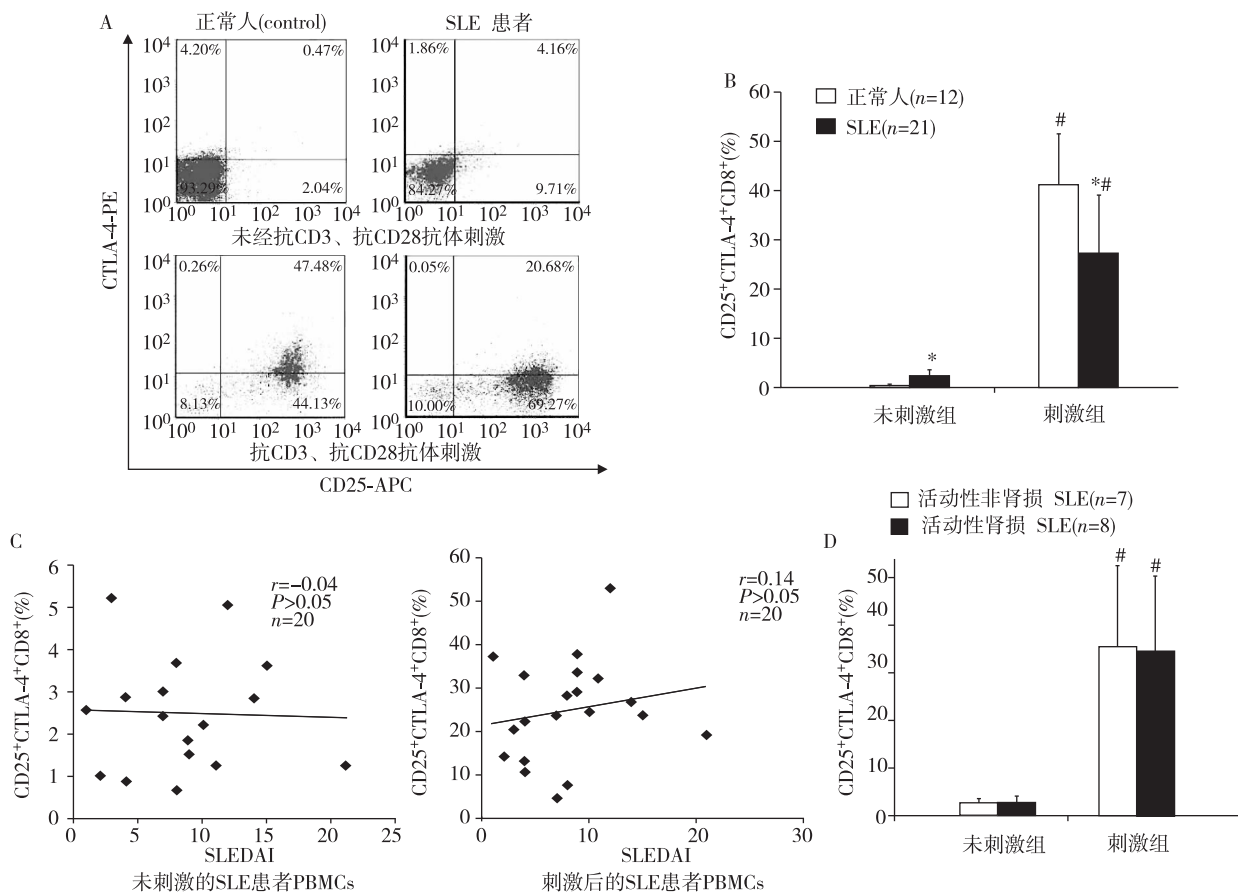
在流式细胞术检测时首先以 CD8⁺T 细胞设门,圈出 CD8⁺T 细胞,进而分析其 CD25 和 CTLA-4 的表达。结果显示,在新鲜分离的 PBMCs,正常人几乎检测不出 CD25⁺CTLA-4⁺的 CD8⁺细胞,CD25⁺CTLA-4⁺的 CD8⁺T 细胞比例也只有(4.45±1.85)%;而 SLE 患者未经刺激的 PBMCs 即可检测出 CD25⁺CTLA-4⁺

的 CD8⁺T 细胞,其 CD25⁺CTLA-4⁺CD8⁺比例显著高于正常人(图 2A、B),但与 SLEDAI 并无显著相关性(图 2C),且其 CD25⁺CTLA-4⁺的 CD8⁺T 细胞比例与正常人相似(图 2A)。

而经抗 CD3、抗 CD28 抗体刺激后,正常人 CD25⁺CTLA-4⁺的 CD8⁺T 细胞比例显著增高,SLE 患者 CD25⁺CTLA-4⁺的 CD8⁺T 细胞比例也增高,但却显著低于正常人(图 2A、B),且与 SLEDAI、肾损害没有显著相关性(图 2C、D)。

2.3 SLE 患者新鲜分离的 PBMCs 中 CD8⁺CD28⁻T 细胞亚群的 CTLA-4 表达较正常人有所增高,经抗 CD3、抗 CD28 刺激培养后 CTLA-4 表达又显著低于正常人,但均与 SLEDAI 无相关性;但在活动性患者中,无论刺激前后,有肾损的患者 CD8⁺CD28⁻细胞亚群的 CTLA-4 表达均显著低于无肾损患者

在流式细胞术检测时首先以 CD8⁺T 细胞设门,圈出 CD8⁺T 细胞,进而分析 CD8⁺CD28⁻T 细胞的



A: 外周血 CD8⁺T 细胞刺激前后各亚群表达 CTLA-4 的代表性流式细胞术检测结果;B:SLE 患者 PBMCs 刺激前后 CD25⁺CTLA-4⁺CD8⁺比例的变化,与正常人对照组比较,* $P<0.05$;与未刺激组比较,# $P<0.05$;C:SLE 患者 PBMCs 刺激培养后的 CD25⁺CTLA-4⁺CD8⁺比例与 SLEDAI 的相关性分析;D:活动性 SLE 肾损组与非肾损组患者 CD25⁺CTLA-4⁺CD8⁺比例的比较,与未刺激组比较,* $P<0.05$ 。

图 2 SLE 患者 PBMCs 中 CD25⁺CTLA-4⁺CD8⁺比例及其与疾病活动性、肾损害的关系

Figure 2 Ratios of CD25⁺CTLA-4⁺CD8⁺T in PBMCs from SLE patients and their relationships with disease activity and with kidney damage

CTLA-4 的表达。结果显示:正常人的 PBMC 未经刺激时 CD8⁺CD28⁻T 细胞中几乎检测不出 CTLA-4 的表达,而非活动性和活动性 SLE 患者的 PBMC 不刺激条件下即可检测出 CTLA-4 的表达,表现为 CD28⁻CTLA-4⁺CD8⁺比例显著高于正常人(图 3A、B),但活动性与非活动性 SLE 患者之间无显著差异,与 SLEDAI 间也未呈现相关性(图 3C、D)。

经抗 CD3、抗 CD28 刺激培养后,正常人 CD8⁺CD28⁻T 细胞高表达 CTLA-4,表现为 CD28⁻CTLA-4⁺CD8⁺比例显著增高,而 SLE 患者比例均显著低于正常人(图 3A、B),活动性与非活动性患者之间没有显著差异、与疾病活动度评分之间亦无显著相关性(图 3B、C)。但在活性患者中,无论刺激前后,有肾损 SLE 的 CD28⁻CTLA-4⁺CD8⁺比例均显著低于无肾

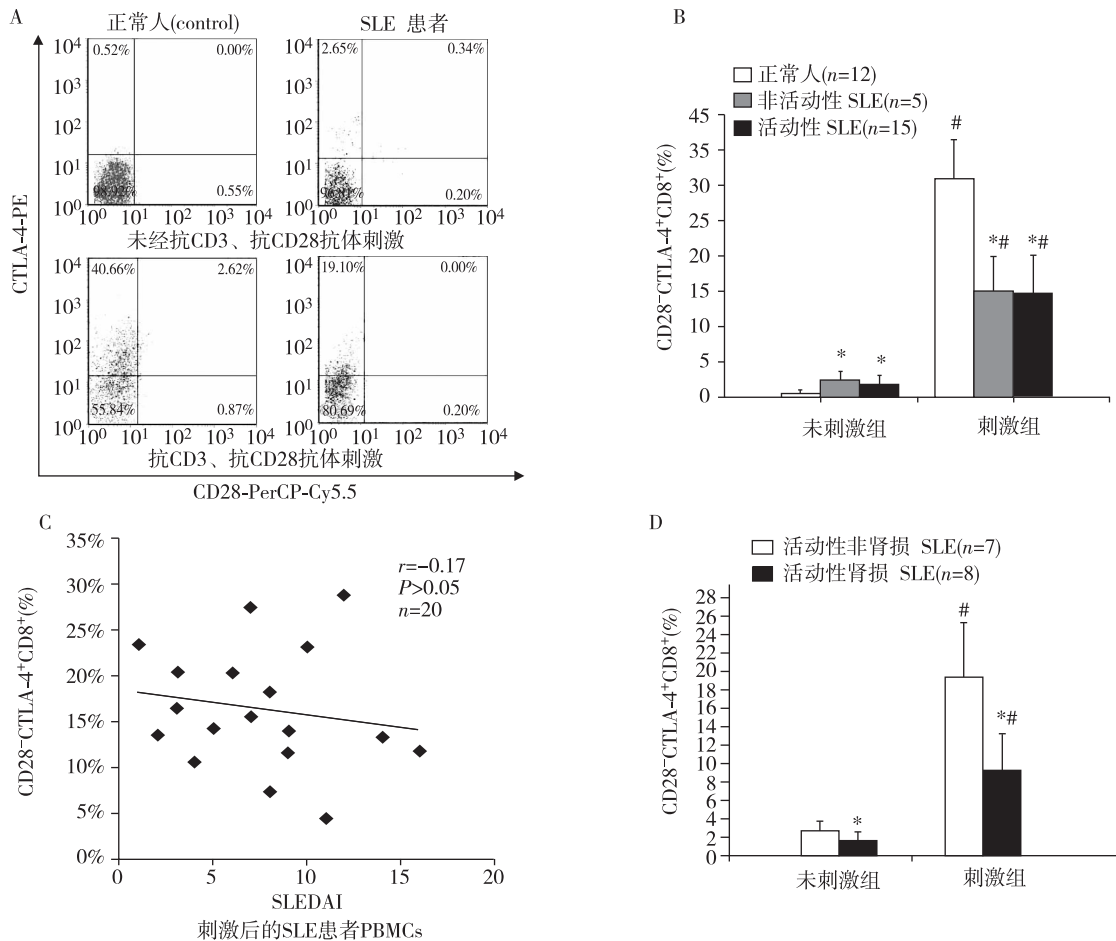
损患者(图 3D)。

2.4 SLE 患者 PBMCs 经抗 CD3、抗 CD28 刺激培养后上清中游离型 CTLA-4 水平显著低于正常人

将正常人及活动性 SLE 患者的 PBMCs 在含抗 CD3、抗 CD28 抗体的培养基中培养 48 h 的上清以 ELISA 法检测游离 CTLA-4 水平。结果显示,SLE 患者培养上清中基本检测不到 CTLA-4,正常人上清中则能检测到一定水平的 CTLA-4,两者间有显著性差异(图 4)。

3 讨论

SLE 的发病机制至今尚不明确,可能涉及 Treg 和负性信号分子的异常^[1-4]。有许多研究表明 B7-CD28 共刺激信号在 SLE 发病中具有重要作用^[8]。CTLA-4



A: PBMCs 刺激前后 CD8⁺CD28⁺及 CD8⁺CD28⁻T 细胞表达 CTLA-4 的代表性流式细胞术检测结果;B:SLE 患者 PBMCs 刺激前后 CD28⁻CTLA-4⁺CD8⁺比例的变化,与正常人对照组比较,* $P < 0.05$;与未刺激组比较,* $P < 0.05$;C:SLE 患者 PBMCs 刺激培养后的 CD28⁻CTLA-4⁺CD8⁺比例与 SLEDAI 的相关性分析;D:活动性 SLE 肾损组与非肾损组患者 CD28⁻CTLA-4⁺CD8⁺比例的比较,与非肾损组比较,* $P < 0.05$;与未刺激组比较,* $P < 0.05$ 。

图 3 SLE 患者 PBMCs 中 CD28-CTLA-4⁺CD8⁺比例及其与疾病活动性、肾损害的关系

Figure 3 Ratios of CD28-CTLA-4⁺/CD8⁺T in PBMCs from SLE patients and their relationships with disease activity and with kidney damage

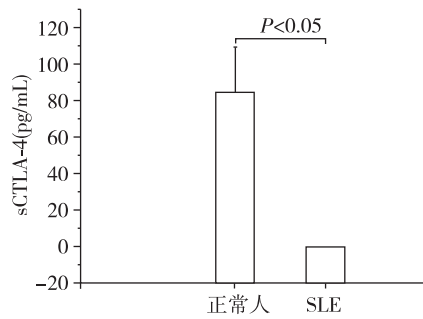


图 4 抗 CD3、抗 CD28 刺激培养的 PBMCs 上清中游离 CTLA-4 浓度 (ELISA 法)

Figure 4 Levels of free CTLA-4 determined by ELISA in supernatants of PBMCs cultured with anti-CD3 and anti-CD28

是一类负性调控因子,可与 CD28 竞争 B7 分子,将活化信号逆转为抑制信号。有人发现 CTLA-4 可介导 T 细胞耐受,阻断 CTLA-4 可防止耐受的发生^[9]。还有研究发现用抗 CTLA-4 抗体阻断 CTLA-4-B7 间相互作用可导致 Th1 细胞介导的自身免疫病的发生^[10]。因此认为,CTLA-4 在介导自身耐受、防止自身免疫病、防止移植排斥反应等方面发挥重要作用^[11-12]。应用 CTLA-4Ig 竞争性抑制 CD28 与 B7 的结合,从而达到阻止共刺激信号传递、诱导免疫耐受形成,这在器官移植、类风湿性关节炎等自身免疫性疾病动物模型的治疗上已取得成功^[13-14]。另一方面,CTLA-4 还在 Treg 的抑制功能中发挥重要作用。为此,本研究主要关注 SLE 患者外周血 T 细胞,包括 CD4⁺CD25⁺、CD4⁺CD25⁻、CD8⁺CD25⁺、CD8⁺CD25⁻及 CD8⁺CD28⁻ 5 种 T 细胞亚群的 CTLA-4 表达。由于 CTLA-4 具有合成后聚集在细胞内、而在细胞膜上仅呈瞬间表达的特点,我们采用破膜固定技术,检测了细胞内的 CTLA-4,同时对 SLE 患者 T 细胞的 CTLA-4 表达与 SLE 病情的相关性进行了初步研究。

本研究结果显示,在正常人新鲜分离、未经刺激培养的 PBMCs 中,无论 CD4⁺或 CD8⁺T 细胞,CTLA-4 的表达水平极低;而当采用抗 CD3、抗 CD28 功能抗体激活 T 细胞以后 CTLA-4 才呈现表达的显著上调,且主要出现在 CD25⁺的细胞亚群。这提示在大多数 T 细胞中,CTLA-4 的表达属于诱导性表达。但在少数 T 细胞上也有一定程度的组成性表达,例如未经刺激的 CD4⁺CD25⁺ T 细胞亚群中 CTLA-4⁺细胞达到 20% 以上,提示 CD4⁺nTreg 细胞上存在 CTLA-4 组成性表达。这种情况也出现在天然型 CD8⁺CD25⁺调节性 T 细胞。而 CD8⁺CD28⁻调节性 T 细胞则是受到刺激后 CTLA-4 才有显著表达,即诱

导性表达的特点。在 SLE 患者,新鲜分离未经刺激的 PBMCs 即可检测出 CTLA-4 的表达,其 CD25⁺CTLA-4⁺CD4⁺比例及 CD25⁻CTLA-4⁺CD4⁺比例均显著高于正常人,提示其体内相当一部分 T 细胞处于活化状态,此类 CTLA-4 属诱导性表达,而不应视为天然 Treg 的组成性 CTLA-4 表达升高;且 CD25⁺CTLA-4⁺CD4⁺比例显著增高与 SLEDAI 相关,活动性患者比例显著高于非活动性患者和正常人,反映了 CTLA-4 表达与病情活动、患者 T 细胞异常活化有关。在未受刺激状态下,SLE 患者 CD25⁺CTLA-4⁺CD8⁺比例显著高于正常人,这可能同样是因为 SLE 患者 T 细胞的异常活化、包括 CD8⁺T 细胞的活化所致。为何 SLE 患者 CD25⁺CTLA-4⁺CD8⁺比例显著增高却与病情活动性无相关性,而与 CD4⁺T 细胞不同?这可能可以用异常活化的 CD4⁺T 细胞、而不是 CD8⁺T 细胞在 SLE 发病中起重要作用来解释。由于受方法的限制,本研究未能同时标记 Foxp3,也就未能区分评价 SLE 患者体内 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞中异常活化的效应性 T 细胞和 Treg 细胞的 CTLA-4 表达,因此尚不能提示 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 和 CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 的 CTLA-4 表达状态。然而,在刺激状态下,SLE 患者 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞的 CTLA-4 都不能像正常人那样显著高表达,CD25⁺CTLA-4⁺CD4⁺、CD25⁻CTLA-4⁺CD8⁺比例均显著低于正常人,显示其对刺激的 CTLA-4 表达应答存在缺陷,即存在 T 细胞 CTLA-4 诱导性表达障碍。ELISA 结果显示,PBMCs 刺激培养 48 h 后,正常人培养上清中可以检测到少量游离的 CTLA-4,而 SLE 患者的上清中基本检测不到;体现了 CTLA-4 发挥其作用主要是通过细胞与细胞间直接接触而很少释放到细胞外,同时也表明 SLE 患者在应对刺激、增强 CTLA-4 表达方面是有缺陷的。这与流式细胞术检测细胞内 CTLA-4 表达的结果是一致的。我们在先前的研究中证实 SLE 存在异常增高的 T 细胞、主要是 CD4⁺T 细胞凋亡,其机制是 Fas-FasL 介导的活化诱导的细胞死亡(AICD)^[15]。由此推测,CTLA-4 诱导性表达缺陷可能因为不能对 T 细胞活化、增殖实施有效的反馈抑制而参与了 SLE T 细胞的过度活化和 AICD。由于没有发现这种 T 细胞诱导性 CTLA-4 表达缺陷与疾病活动性及肾损害有相关性,因此推测这种缺陷可能是继发性的下游事件。

尽管本研究未能就 CD4⁺或 CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 的 CTLA-4 表达状态提供认识线索,却对认识 CD8⁺CD28⁻调节性 T 细胞的 CTLA-4 表达状态提供

初步线索。在未刺激情况下 SLE 患者 CD28⁻CTLA-4⁺CD8⁺比例较正常人有所增高,但与 SLEDAI 无相关性、活动性和非活动性患者之间没有显著差异。这可能反映了 SLE 患者 CD8⁺T 细胞的异常活化 CTLA-4 的诱导性表达与 CD8⁺CD28⁻调节性 T 细胞功能相关。而 SLE 患者刺激后 CD8⁺CD28⁻T 细胞的 CTLA-4 诱导性表达显著低于正常人,尽管这一改变与活动性无关,但在活动性 SLE 患者,伴有肾损的患者较无肾损的患者减低更为显著。事实上,伴有肾损的活动性 SLE 患者未经刺激的 PBMCs 中 CD28⁻CTLA-4⁺CD8⁺比例亦显著低于无肾损的患者。SLE 是个多因素疾病,由于 SLE 活动性评分的局限性,而且肾损害虽然是 SLE 的主要脏器损害,但并非特异的损害,因此结合我们的实验结果,不能排除 CD8⁺CD28⁻T 细胞 CTLA-4 的诱导性表达缺陷与疾病发生发展的相关性,CD8⁺CD28⁻调节性 T 细胞 CTLA-4 诱导性表达缺陷的病理意义还需要进一步扩大样本例数和完善细胞标记手段加以深入研究。

总之,SLE 患者 CD4⁺T 细胞在体内处于活化状态,所以 CTLA-4 表达增高;而体外再活化能力减弱,同时伴随有 T 细胞亚群的 CTLA-4 诱导性表达缺陷。效应性 T 细胞的 CTLA-4 诱导性表达的缺陷并不与 SLEDAI、肾损害相关,提示可能不是在上游起重要作用的因素,更可能是免疫调节异常的继发性事件,即这一变化可能是 SLE 疾病活动性导致,但更有可能是机体的负反馈调控机制缺陷所致。至于各种亚型的 Treg 细胞是否也存在 CTLA-4 诱导表达缺陷及其病理意义还需要进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Tenbrock K, Juang YT, Kyttaris VC, et al. Altered signal transduction in SLE T cells[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2007, 46(10):1525-1530
- [2] Kassi E, Moutsatsou P. Estrogen receptor signaling and its relationship to cytokines in systemic lupus erythematosus[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 2010:317452
- [3] 杨晓帆,徐安琪,王慧娟,等. 系统性红斑狼疮患者外周血中调节性 T 细胞相关分子 TGF- β 表达缺陷的研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(11): 1333-1338
- [4] Bonelli M, Savitskaya A, Von Dalwigk K, et al. Quantitative and qualitative deficiencies of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus (SLE)[J]. *Int Immunol*, 2008, 20(7):861-868
- [5] Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺T cells expressing the FoxP3 transcription factor[J]. *Immunity*, 2009, 30(6):899-911
- [6] Arosa FA. CD8⁺CD28⁻T cells: certainties and uncertainties of a prevalent human T-cell subset[J]. *Immunol Cell Biol*, 2002, 80(1):1-13
- [7] Kato T, Nariuchi H. Polarization of naive CD4⁺T cells toward the Th1 subset by CTLA-4 costimulation[J]. *J Immunol*, 2000, 164(7):3554-3562
- [8] Sabahi R, Anolik JH. B-Cell-Targeted therapy for systemic lupus erythematosus [J]. *Drugs*, 2006, 66 (15): 1933-1948
- [9] Greenwald RJ, Boussiotis VA, Lorschach RB, et al. CTLA-4 regulates induction of anergy *in vivo* [J]. *Immunity*, 2001, 14(2):145-155
- [10] Hurwitz AA, Sullivan TJ, Krummel MF, et al. Specific blockade of CTLA-4/B7 interactions results in exacerbated clinical and histologic disease in an actively-induced model of experimental allergic encephalomyelitis [J]. *J Neuroimmunol*, 1997, 73(1/2):57-62
- [11] Azab NA, Bassyouni IH, Emad Y, et al. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (TREG) in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: the possible influence of treatment with corticosteroids [J]. *Clin Immunol*, 2008, 127 (2): 151-157
- [12] Walker LS, Sansom DM. The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses[J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(12): 852-863
- [13] 夏婷,方建培. 细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原-4Ig 和 anti-CD154 单抗在移植中的研究进展[J]. *国际免疫学杂志*, 2012, 35(4):245-248
- [14] 赵雪云,张力,刘胜春. CTLA-4Ig 在诱导器官移植免疫耐受中的研究新进展 [J]. *中华内分泌外科杂志*, 2012, 6(1):57-58
- [15] Wang H, Xu J, Ji X, et al. The abnormal apoptosis of T cell subsets and possible involvement of IL-10 in systemic lupus erythematosus [J]. *Cell Immunol*, 2005, 235 (2):117-121

[收稿日期] 2016-07-03