

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.10.022

特应性皮炎患者外周血滤泡性辅助性 T 细胞的特征

刘芳¹, 陈端^{2△}

(1. 湖北省黄石市结核病防治院 435000; 2. 湖北省黄石市临床检验中心 435000)

摘要:目的 探讨特应性皮炎(AD)患者外周血滤泡性辅助性 T(Tfh)细胞的表达特征,分析其在特应性皮炎发病机制中的作用。方法 选择该院 20 例 AD 患者(AD 组),运用欧洲特应性皮炎评分系统(SCORAD)评估病情严重程度。采用中药汤剂口服和他克莫司软膏外用治疗,治疗时间 1 个月。使用流式细胞技术检测患者治疗前、治疗 1 个月后和 12 例健康对照者(健康对照组)外周血 Tfh 细胞的频率及其表面程序性死亡受体 1(PD-1)、诱导性共刺激分子(ICOS)的表达水平,并分析其与 AD 严重程度的相关性。结果 与健康对照组比较,AD 组外周血 Tfh 细胞频率明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Tfh 细胞 PD-1、ICOS 表达水平在 AD 组患者显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Tfh 细胞频率与 AD 严重程度呈正相关关系($P < 0.05$)。Tfh 细胞 PD-1、ICOS 表达水平仅 SCORAD 评分升高而升高,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。经 1 个月治疗,患者皮疹好转、瘙痒减轻,外周血 Tfh 细胞频率及其表面 PD-1、ICOS 表达水平较治疗前明显降低($P < 0.05$)。结论 Tfh 细胞频率和功能在 AD 患者外周血均发生改变,该细胞可能在 AD 的免疫学发病机制中具有重要的临床作用。

关键词:特应性皮炎; 滤泡性辅助性 T 细胞; 程序性死亡受体-1; 诱导性共刺激分子

中图分类号:R446

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)10-1445-03

Characteristics of follicular helper T cells in peripheral blood of patients with atopic dermatitisLIU Fang¹, CHEN Duan^{2△}

(1. the Tuberculosis Control Hospital of Huangshi City, Huangshi, Hubei 435000, China;

2. Clinical Testing Center of Huangshi City, Huangshi, Hubei 435000, China)

Abstract: Objective To investigate the characteristics of follicular helper T (Tfh) cells in peripheral blood of patients with atopic dermatitis (AD), and to assess their roles in the immune pathogenesis of atopic dermatitis. **Methods** A total of 20 patients with atopic dermatitis and 12 health controls were enrolled in our study. The severity of atopic dermatitis was assessed by Scoring Atopic Dermatitis Index (SCORAD). All the patients were treated by Chinese traditional medicine and tacrolimus ointment. The Tfh cells frequency and expressions of programmed death 1 (PD-1), inducible costimulatory molecule (IOCS) on Tfh cells in peripheral blood of healthy normals, AD patients before and after 1-month treatment were measured by flow cytometry. The frequency of Tfh cells and expressions of PD-1, IOCS on Tfh cells between patients and health controls were analyzed, and the changes of those detective markers in AD patients before and after 1-month treatment were investigated as well. **Results** Compared with health controls, the frequency of Tfh cells in AD patients was significantly increased ($P < 0.05$). In addition, the expressions of PD-1 and IOCS on Tfh cells were significantly higher than them in health individuals as well ($P < 0.05$). The frequency of Tfh cells in AD patients was positively correlated with SCORAD score ($P < 0.05$), while the expressions of PD-1 and IOCS on Tfh cells did not correlated with SCORAD score. Furthermore, the Tfh cells frequency and the expressions of PD-1 and IOCS on Tfh cells were dramatically decreased after 1-month treatment ($P < 0.05$). **Conclusion** The frequency and function of Tfh cells were changed in AD patients, and Tfh cells may play important roles in the immune mechanism of atopic dermatitis.

Key words: atopic dermatitis; follicular helper T cells; PD-1; ICOS

特应性皮炎(AD)是一种常见的慢性炎性疾病,与遗传过敏体质有关,以皮肤干燥、脱屑、瘙痒为主要表现,易诊难治,反复发作,严重影响患者的生活质

量。该病病因复杂,发病机制尚不清楚。目前认为 AD 的发生与免疫调节紊乱密切相关,其中 $CD4^+$ T 淋巴细胞在其发病机制中备受关注。有研究报道 AD

患者皮损中浸润的大量炎症细胞主要为 CD4⁺T 淋巴细胞^[1]。滤泡性辅助性 T (Tfh) 细胞是一种新型 CD4⁺T 淋巴细胞亚群,与其他 T 淋巴细胞亚群功能不同,主要为促进和诱导 B 细胞的成熟和分化^[2]。该细胞具有其独特的免疫表型,可高表达 CXC 趋化因子受体 5(CXCR5)、诱导性共刺激分子(ICOS)、程序性死亡受体-1(PD-1)、B 细胞淋巴瘤-6(Bcl-6)、白细胞介素-21(IL-21),其中 ICOS、PD-1 的表达对 Tfh 细胞的功能具有重要的作用^[3]。但 Tfh 细胞在 AD 患者中的特征及意义尚不清楚。现探讨 AD 患者外周血 Tfh 细胞的表达特征,为阐明 AD 的发病机制提供实验室依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 20 例 AD 患者全部来自 2015 年 6 月至 2016 年 7 月该院门诊的就诊患者(AD 组),符合 Williams 诊断标准,男 12 例,女 8 例,年龄 12~31 岁,平均年龄(20.13±5.01)岁;病程 11~30 年,平均病程(17.46±7.78)年。所有患者入组前 1 个月内未系统使用糖皮质激素及免疫抑制剂治疗,近 1 周内未口服抗组胺药及外用糖皮质激素,均未合并肿瘤及其他严重的系统性疾病。采用欧洲特应性皮炎评分系统(SCORAD)评估病情严重程度。进行为期 1 个月随访,随访期间所有患者均采用中药汤剂口服和他克莫司软膏外用治疗。健康对照者(健康对照组)为 12 例健康志愿者,男 7 例,女 5 例,年龄 14~30 岁,平均年龄(22.52±4.75)岁。2 组研究对象的年龄、性别等一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂 小鼠抗人 CD4-Percp 抗体、小鼠抗人 CXCR5-FITC 抗体、小鼠抗人 ICOS-PE 抗体、小鼠抗人 PD-1-APC 抗体, FACSCalibura 流式细胞仪、溶血素均购自美国 BD 公司。

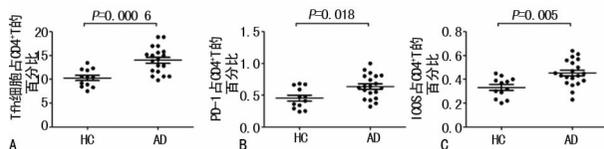
1.3 方法 2 组研究对象治疗前和治疗 1 个月后均于清晨空腹采取外周静脉血 3 mL,肝素锂抗凝。取全血 200 μL 依次加入抗体:Percp-anti-CD4 6 μL, FITC-anti-CXCR5 4 μL, APC-anti-PD-1 5 μL, PE-anti-ICOS 5 μL, 4 °C 避光孵育 30 min, 然后加入溶血素 2 mL, 震荡混匀, 室温避光 5 min, 离心去上清液后再加入 2 mL PBS 洗涤 1 次, 最后加入 150 μL 4% 多聚甲醛固定, 4 °C 保存。标本于 24 h 内完成检测。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 Mann-Whitney 非参数 U 检验分析 2 组数据间差异性, 相关性分析采用 Spearman 检验, 采用 Wilcoxon 配对检验比较组内患者治疗前后差异; 运用 χ^2 检验判定临床数据的差异。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AD 组患者外周血 Tfh 细胞特征 AD 组患者外周血 Tfh 细胞频率明显高于健康对照组[(10.29±

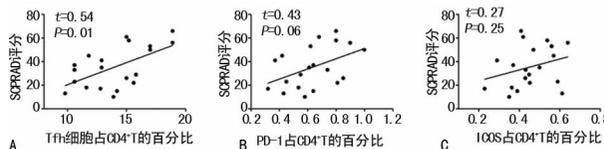
1.87)% vs. (14.01±2.73)% , $P<0.01$]。与健康对照组比较, AD 组患者外周血 Tfh 细胞表面 PD-1 和 ICOS 的表达也明显升高[(0.45±0.16)% vs. (0.64±0.17)% , $P<0.05$; (0.33±0.08)% vs. (0.45±0.11)% , $P<0.01$]。见图 1。



注: A 表示外周血 Tfh 细胞频率; B 表示外周血 Tfh 细胞表面 PD-1 表达; C 表示 Tfh 细胞表面 ICOS 表达

图 1 AD 组患者外周血 Tfh 细胞特征

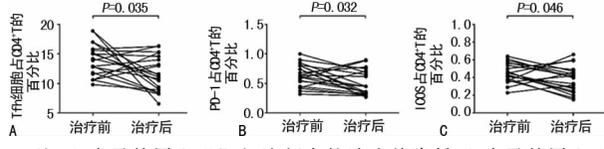
2.2 AD 组患者 Tfh 细胞与疾病严重程度的相关性 AD 组患者外周血 Tfh 细胞频率与 SCORAD 评分呈明显的正相关关系($r=0.54, P=0.01$); Tfh 细胞表面 PD-1 和 ICOS 表达水平与 SCORAD 评分具有正相关趋势, 但差异无统计学意义($r=0.43, P=0.06$; $r=0.27, P=0.25$)。见图 2。



注: A 表示外周血 Tfh 细胞频率与 SCORAD 评分呈正相关关系; B 表示 PD-1 表达水平与 SCORAD 评分具有正相关趋势; C 表示 ICOS 表达水平与 SCORAD 评分具有正相关趋势

图 2 AD 组患者 Tfh 细胞与疾病严重程度的相关性

2.3 AD 组患者治疗前后 Tfh 细胞频率及功能的变化 AD 组患者采用中药汤剂口服和他克莫司软膏外用治疗, 时间为 1 个月。治疗后皮疹及瘙痒减轻, 且外周血 Tfh 细胞频率较治疗前明显降低[(14.01±2.73)% vs. (11.61±2.98)% , $P<0.05$]。与治疗前比较, AD 患者外周血 Tfh 细胞 PD-1 和 ICOS 表达也明显降低[(0.63±0.17)% vs. (0.51±0.21)% , $P<0.05$; (0.45±0.11)% vs. (0.38±0.15)% , $P<0.05$]。见图 3。



注: A 表示外周血 Tfh 细胞频率较治疗前降低; B 表示外周血 Tfh 细胞 PD-1 表达降低; C 表示外周血 Tfh 细胞 ICOS 表达降低

图 3 AD 组患者治疗前后 Tfh 细胞频率及功能的变化

3 讨论

AD 是一种常见的慢性瘙痒性皮肤病, 在发展中国家约为 10%~20% 儿童患有 AD, 是最常见的皮肤病。AD 发病机制复杂, 目前认为该病是由环境和基因等多种因素相互作用, 导致机体免疫功能紊乱和皮肤屏障受损而引起的变态反应性皮肤病。既往研究表明, AD 患者皮损中 Th2 细胞及其相关细胞因子均

明显升高,因此认为 AD 主要是由 Th2 细胞介导的炎性疾病^[4]。随着新型 CD4⁺ T 细胞亚群的不断出现及对 AD 免疫发病机制研究的不断深入,近期研究报道 Th17、Th22、调节性 T 细胞等细胞亚群在 AD 的发病机制中均具有重要作用^[5-7]。Tfh 细胞是一种新型 CD4⁺ T 细胞亚群,起重要的免疫作用,参与多种免疫相关性疾病的发生、发展。

Tfh 细胞最初发现于淋巴生发中心,主要功能为促进生发中心的成熟、诱导 B 细胞分化及促进抗体的产生^[2]。近年来研究发现,外周血同样存在 Tfh 细胞,其与存在于生发中心的 Tfh 细胞具有相似的免疫表型及功能^[8]。目前常用 CXCR5⁺ CD4⁺ T 细胞定义外周血 Tfh 细胞。许多研究显示,多种免疫相关性疾病中存在 Tfh 细胞含量的改变和功能的紊乱,如 Henoch-Schnlein 紫癜、类风湿关节炎、强直性脊柱炎等^[9-11]。本研究结果表明,AD 组患者外周血 Tfh 细胞频率较健康对照组显著升高,提示 Tfh 细胞在 AD 的发病机制中起一定的作用。Tfh 细胞表面分子 ICOS 的表达对 Tfh 细胞产生重要作用,可调节 Tfh 细胞的分化和功能^[12]。PD-1 是 Tfh 细胞另一个重要的表面分子,对 Tfh 细胞的活化具有重要的作用^[13]。本研究结果显示,AD 组患者 Tfh 细胞表面 PD-1、ICOS 表达水平明显升高,说明 AD 患者 Tfh 细胞不仅含量升高功能也处于活化状态。本研究结果显示,Tfh 细胞频率与 SCORAD 评分呈明显的正相关关系,而 Tfh 细胞表面 PD-1 和 ICOS 表达水平与 SCORAD 评分具有正相关趋势,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$),可能与患者标本数较少有关,因此需大样本量进一步验证 Tfh 细胞表面 PD-1 和 ICOS 的表达水平与 SCORAD 评分的相关性。治疗 1 个月后,AD 患者皮疹好转,瘙痒减轻,外周血 Tfh 细胞频率降低,且功能性分子 PD-1、ICOS 表达水平也显著降低,说明 Tfh 细胞可能与疾病严重程度密切相关。

综上所述,AD 患者 Tfh 细胞不仅频率升高且功能处于活化状态,治疗后疾病减轻,外周血 Tfh 细胞频率也降低,功能性分子 PD-1、ICOS 的表达水平也降低。本研究结果提示 Tfh 细胞在 AD 发病机制中可能具有重要作用,为阐明 AD 发病机制提供新的思路,为治疗 AD 提供新型的生物靶点。

参考文献

[1] WEIDINGER S,NOVAK N. Atopic dermatitis[J]. *Lancet*,2016,387(23):1109-1122.
 [2] QI H,CHEN X,CHU C, et al. Tfh cell differentiation and

their function in promoting B-cell responses[J]. *Adv Exp Med Biol*,2014,841(21):153-180.
 [3] SUH W K. Life of T follicular helper cells[J]. *Mol Cells*, 2015,38(3):195-201.
 [4] WERFEL T, ALLAM J P, BIEDERMANN T, et al. Cellular and molecular immunologic mechanisms in patients with atopic dermatitis[J]. *J Allergy Clin Immunol*,2016, 138(2):336-349.
 [5] NODA S,SUAREZ-FARINAS M, UNGAR B, et al. The Asian atopic dermatitis phenotype combines features of atopic dermatitis and psoriasis with increased TH17 polarization[J]. *J Allergy Clin Immunol*,2015,136(5):1254-1264.
 [6] FURUE M,CHIBA T,TSUJI G, et al. Atopic dermatitis: immune deviation, barrier dysfunction, IgE autoreactivity and new therapies[J]. *Allergol Int*, 2017, 87(12): 234-238.
 [7] LEE N,SHIN J U, JIN S, et al. Upregulation of CD47 in regulatory T cells in atopic dermatitis[J]. *Yonsei Med J*, 2016,57(6):1435-1445.
 [8] MORITA R, SCHMITT N, BENYRNIBEL S E, 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.
 [9] ZHANG Z,ZHAO S,ZHANG L, et al. A higher frequency of CD4(+)CXCR5(+) T follicular helper cells in patients with newly diagnosed Henoch-Schonlein purpura nephritis[J]. *Int Immunopharmacol*,2016,32(10):8-15.
 [10] WANG J,SHAN Y,JIANG Z, et al. High frequencies of activated B cells and T follicular helper cells are correlated with disease activity in patients with new-onset rheumatoid arthritis[J]. *Clin Exp Immunol*, 2013, 174(2): 212-220.
 [11] WU S,YANG T,PAN F, et al. Increased frequency of circulating follicular helper T cells in patients with ankylosing spondylitis[J]. *Mod Rheumatol*,2015,25(1):110-115.
 [12] WEBER J P, FUHRMANN F, FEIST R K, et al. ICOS maintains the T follicular helper cell phenotype by down-regulating Kruppel-like factor 2[J]. *J Exp Med*,2015,212(2):217-233.
 [13] CUBAS R A, MUDD J C, SAVOYE A L, et al. Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection[J]. *Nat Med*,2013,19(4):494-499.

(收稿日期:2017-12-04 修回日期:2018-01-21)