

论著·临床研究

滤泡辅助性 T 细胞和滤泡调节性 T 细胞在 儿童过敏性紫癜发病中的作用

王春美 罗源 王颖超 盛光耀

(郑州大学第一附属医院儿科, 河南 郑州 450000)

[摘要] **目的** 探讨外周血滤泡辅助性 T 细胞 (T_{fh} 细胞) 和滤泡调节性 T 细胞 (T_{fr} 细胞) 表达的变化在儿童过敏性紫癜 (HSP) 发病中的意义。**方法** 采用流式细胞术检测 40 例 HSP 患儿及 25 例对照组儿童外周血 T_{fh} 和 T_{fr} 细胞的表达水平; 实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测外周血中相关调控因子 Bcl-6、c-MAF、Blimp-1、PD-1 mRNA 的表达。**结果** 与对照组儿童相比, HSP 患儿外周血 T_{fh} 细胞比例显著升高 ($P<0.05$), T_{fr} 细胞比例显著下降 ($P<0.05$), T_{fh}/T_{fr} 比值显著升高 ($P<0.05$)。与对照组相比, HSP 患儿 CD4⁺T 细胞 Bcl-6、c-MAF mRNA 的表达水平显著升高 ($P<0.05$); Blimp-1 mRNA 表达水平显著下降 ($P<0.05$)。CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞 PD-1 mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.05$); Blimp-1 mRNA 表达水平显著下降 ($P<0.05$)。**结论** T_{fh} 及 T_{fr} 细胞的异常表达可能参与了儿童 HSP 的发病过程; Bcl-6、c-MAF 和 PD-1 的过表达及 Blimp-1 的抑制表达可能是导致 T_{fh} 及 T_{fr} 细胞异常表达的重要原因。 [中国当代儿科杂志, 2015, 17(10): 1084-1087]

[关键词] 过敏性紫癜; 滤泡辅助性 T 细胞; 滤泡调节性 T 细胞; 儿童

Roles of follicular helper T cells and follicular regulatory T cells in pathogenesis of Henoch-Schönlein purpura in children

WANG Chun-Mei, LUO Yuan, WANG Ying-Chao, SHENG Guang-Yao. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China (Email: meichun123@126.com)

Abstract: Objective To study the roles of follicular helper T (T_{fh}) cells and follicular regulatory T (T_{fr}) cells in the pathogenesis of Henoch-Schönlein purpura (HSP) in children. **Methods** Peripheral blood samples were collected from 40 HSP children and 25 healthy controls. The percentages of T_{fh} and T_{fr} cells were measured by flow cytometry; the mRNA expression levels of Bcl-6, c-MAF, Blimp-1, and PD-1 in peripheral blood were measured by real-time polymerase chain reaction. **Results** Compared with the controls, the children with HSP had significantly increased percentage of T_{fh} cells and T_{fh}/T_{fr} ratio but a significantly reduced percentage of T_{fr} cells in the peripheral blood ($P<0.05$). Compared with the controls, the children with HSP had significantly increased mRNA expression of Bcl-6 and c-MAF but significantly reduced mRNA expression of Blimp-1 in CD4⁺T cells ($P<0.05$), and had significantly increased mRNA expression of PD-1 but significantly reduced mRNA expression of Blimp-1 in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells ($P<0.05$). **Conclusions** Abnormal percentages of T_{fh} and T_{fr} cells may be involved in the pathogenesis of HSP in children, and over-expression of Bcl-6, c-MAF, and PD-1 mRNA and inhibited expression of Blimp-1 mRNA may be considered as important reasons for abnormal percentages of T_{fh} and T_{fr} cells.

[Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(10): 1084-1087]

Key words: Henoch-Schönlein purpura; Follicular helper T cell; Follicular regulatory T cell; Child

过敏性紫癜 (Henoch-Schönlein purpura, HSP) 是儿童最常见的一种自身免疫性血管炎性疾病, 好发于学龄儿童, 可累及皮肤、胃肠道、关节、肾脏等多个系统^[1]。研究表明, 免疫功能

紊乱是 HSP 发病的主要因素^[2]。其中滤泡辅助性 T 细胞 (follicular helper T cells, T_{fh} 细胞) 是新近发现的效应性 CD4⁺T 细胞亚群, 主要辅助 B 细胞的分化并促进抗体类别转换^[3]; 滤泡调节性 T 细

[收稿日期] 2015-06-17; [接受日期] 2015-07-17

[作者简介] 王春美, 女, 博士, 主治医师。

胞 (follicular regulatory T cells, Tfr 细胞) 是源于 Foxp3⁺ 调节性 T 细胞 (Treg 细胞) 的细胞, 主要参与负性调控 Tfh 细胞及抑制生发中心 B 细胞分化^[4]。Tfh 细胞及 Tfr 细胞的异常表达参与了多种自身免疫性疾病的发病过程^[5-10], 但其在儿童 HSP 发病中的作用尚未明确。本研究通过检测 HSP 患儿外周血 Tfh 细胞、Tfr 细胞及相关调控因子表达的变化, 旨在探讨其在 HSP 发病中的作用及可能机制。

1 资料与方法

1.1 研究对象

研究对象为我院 2013 年 1 月至 2014 年 10 月收治的新发 HSP 患儿 40 例, 均符合中华医学会儿科学分会免疫学组制定的 HSP 诊断标准^[11], 其中男 24 例, 女 16 例, 年龄 6~14 岁, 中位年龄 9.6 岁, 所有患儿均未接受肾上腺皮质激素及免疫抑制剂的治疗。对照组 25 例, 其中男 14 例, 女 11 例, 年龄 6~14 岁, 中位年龄 9.8 岁, 为我院同期体检的健康儿童, 既往无肾脏疾病、变态反应性疾病史, 近期无明确感染征象。两组受试儿童性别、年龄的差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

本研究获得我院学术伦理委员批准, 所有受试对象的法定监护人均签署知情同意书。

1.2 外周血 Tfh 细胞及 Tfr 细胞表达的检测

HSP 患儿于治疗前留取外周静脉血 4 mL, 对照组儿童随机留取外周静脉血 4 mL, EDTA 抗凝, Ficoll 密度梯度离心法分离外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。取两管分离好的 PBMC 悬液, 分别加入 10 μ L 的 CD4-FITC、CXCR5-APC 和 ICOS-PECy5 单克隆抗体 (美国 eBioscience 公司产品), 避光孵育 30 min, 加入 500 μ L 的红细胞裂解液, 其中 1 管 PBMC 悬液于 PBS 洗涤后进行流式细胞仪检测; 另 1 管于 PBS 洗涤离心后加入 Foxp3-PE (美国 eBioscience 公司产品), 避光孵育 15 min, PBS 洗涤后进行流式细胞仪检测, 分析 Tfh (CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺) 细胞和 Tfr (CD4⁺Foxp3⁺CXCR5⁺ICOS⁺) 细胞的表达。

1.3 外周血 B 细胞淋巴瘤 -6、c-MAF、B 淋巴细胞诱导成熟蛋白 -1 及程序性死亡分子 -1 mRNA 表达的检测

采用 RT-PCR 法进行检测。根据 GenBank 靶基因序列设计引物, 以 GAPDH 为内参, 具体见表 1, 均由上海生工生物工程技术有限公司合成。采用免疫磁珠法分离 PBMC 中的 CD4⁺ T 细胞和 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞, 提取细胞总 RNA, 并反转成 cDNA 第一链, 取 1 μ L cDNA 进行 PCR 扩增 30~40 个循环, 取 5 μ L 的 B 细胞淋巴瘤 -6 (B cell lymphoma 6, Bcl-6)、c-MAF、B 淋巴细胞诱导成熟蛋白 -1 (B lymphocyte induced maturation protein 1, Blimp-1)、程序性死亡分子 -1 (programmed death-1, PD-1) 及 GAPDH 扩增产物, 2% 琼脂凝胶电泳 30 min, 回收纯化后送检测序, 结果与 GenBank 中靶基因 mRNA 序列一致。然后采用 SYBR-Green 试剂盒, 罗氏 480 实时荧光定量 PCR 仪分别检测 CD4⁺ T 细胞 Bcl-6、c-MAF、Blimp-1、PD-1 mRNA 以及 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞 Blimp-1、PD-1 mRNA 表达, 采用 Relative Quantification 模式进行数据分析。

表 1 RT-PCR 引物序列表

基因名称	引物序列	复性温度 (°C)	扩增产物 (bp)
Bcl-6	F 5'-ATGAGGAGTTTCGGGATGTC-3'	56	177
	R 5'-CCTCTTCTGGGATGTTTCC-3'		
c-MAF	F 5'-ACTGGCAATGAGCAACTCCG-3'	57	121
	R 5'-GCTGATGATCGGTCGGTCT-3'		
Blimp-1	F 5'-CGCTACAAGACCCTTCCCTAC-3'	57	132
	R 5'-TCAGGTGGACCTTCAGATTGG-3'		
PD-1	F 5'-GACAACGCCACCTTCACCT-3'	58	126
	R 5'-GCTTGTCCTCTGGTTGCT-3'		
GADPH	F 5'-GAGCTACGAGCTGCCCTGACG-3'	60	120
	R 5'-GTAGTTTCCTGGATGCCACAG-3'		

1.4 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组间均数的比较采用成组 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组外周血 Tfh 和 Tfr 细胞表达的比较

HSP 患儿外周血 Tfh 细胞比例较对照组显著升高 ($P<0.05$)，Tfr 细胞比例较对照组显著下降 ($P<0.05$)，Tfh/Tfr 比值显著升高 ($P<0.05$)，见表 2。

2.2 两组相关调控因子 Bcl-6、c-MAF、Blimp-1、PD-1 mRNA 表达的比较

与对照组相比，外周血 CD4⁺T 细胞 Bcl-6、c-MAF mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.05$)；Blimp-1 mRNA 表达水平显著下降 ($P<0.05$)；

CD4⁺CD25⁺Treg 的 PD-1 mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.05$)，Blimp-1 mRNA 表达水平显著下降 ($P<0.05$)，见表 3。

表 2 HSP 组和对照组外周血 Tfh 和 Tfr 细胞比例及其比值的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Tfh 细胞 (%)	Tfr 细胞 (%)	Tfh/Tfr
对照组	25	2.0 ± 0.9	6.3 ± 2.0	0.46 ± 0.23
HSP 组	40	3.8 ± 1.3	2.8 ± 1.3	1.34 ± 0.81
<i>t</i> 值		4.143	-6.334	3.597
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	0.001

表 3 HSP 组和对照组外周血 Bcl-6、c-MAF、Blimp-1、PD-1 mRNA 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CD4 ⁺ T 细胞				CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg	
		Bcl-6	c-MAF	Blimp-1	PD-1	Blimp-1	PD-1
对照组	25	1.3 ± 0.8	1.3 ± 0.6	2.7 ± 1.1	2.7 ± 1.0	4.2 ± 1.9	3.6 ± 1.6
HSP 组	40	2.8 ± 1.4	3.0 ± 1.4	1.3 ± 0.8	2.8 ± 1.2	2.2 ± 0.7	6.0 ± 2.3
<i>t</i> 值		5.232	5.333	-4.972	8.202	-4.129	2.228
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	0.419	0.001	0.021

3 讨论

HSP 是由免疫复合物介导的系统性血管炎症疾病，其发病涉及体液免疫紊乱、T 细胞亚群功能失调及细胞因子异常分泌等多种免疫失调，具体机制仍尚未完全明确。目前认为 HSP 患儿体内自身反应性 B 细胞过度活化导致 IgA 抗体过度产生是其发病的核心机制^[12]，但导致自身反应性 B 细胞过度活化的机制至今尚未阐明。

近年来学者们发现了一种新的 CD4⁺T 细胞亚群，定位于淋巴滤泡，其表型为 CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺，可辅助 B 细胞增殖、分化、产生免疫球蛋白并参与抗体类别转换，称之为 Tfh 细胞。Tfr 细胞源于 Foxp3⁺Treg，免疫表型为 CD4⁺Foxp3⁺CXCR5⁺ICOS⁺，主要参与负性调控 Tfh 细胞诱导生发中心 B 细胞的促生发中心反应，减少或抑制自身抗的生成。既往研究发现，多种自身免疫性疾病如免疫性血小板减少症、系统性红斑狼疮、Graves 病、支气管哮喘、银屑病、强制性脊柱炎、干燥综合征等存在着 Tfh 和 Tfr 细胞的异常表达。新近研究发现，HSP 患儿外周血中 Tfh 细胞比例升高^[13]，可能是导致 HSP 免疫功能紊乱

的主要原因，但迄今尚无有关 Tfr 细胞在 HSP 发病中的作用研究。本研究发现，HSP 患儿外周血 Tfh 细胞比例显著升高，与既往研究报道一致^[13]。同时本研究亦发现，HSP 患儿外周血 Tfr 细胞比例显著下降，Tfh/Tfr 比值显著升高，提示 Tfh 及 Tfr 细胞异常表达可能参与了儿童 HSP 的发病过程。

本研究亦探讨了 Tfh 及 Tfr 细胞异常表达的可能机制，即检测了其相关调控因子 Bcl-6、c-MAF、Blimp-1、PD-1 mRNA 表达的变化。其中 Bcl-6 是决定 Tfh 细胞分化的转录调控因子，表达于生发中心 B 细胞和 CD4⁺T 细胞中，并介导调控二者的分化，其表达缺失可影响生发中心的形成以及 B 细胞对 T 细胞依赖抗原的应答；c-MAF 具有诱导 IL-21 表达的能力，同时也可诱导 CXCR5 的表达，Bcl-6 和 c-MAF 的共同表达可共同诱导 CXCR4、PD-1 及 ICOS，进而促进 Tfh 发育和功能分化^[14-15]。Blimp-1 作为 Bcl-6 的拮抗因子，是抑制 Tfh 的分化与发育的主要因素，Blimp-1 能直接抑制 B 细胞和 T 细胞 Bcl-6 的表达，其活性也可被 Bcl-6 抑制；同时 Blimp-1 亦可促进 Tfr 细胞的免疫抑制功能^[16]。PD-1 是抑制 Tfh 的分化与发育的主要转录因子，同时 PD-1 的过度表达可抑制 Tfr 细胞的产生^[17]。

本研究结果提示 HSP 患儿外周血 CD4⁺T 细胞 Bcl-6、c-MAF mRNA 表达水平较对照组儿童显著升高, Blimp-1 mRNA 表达水平较对照组儿童显著下降; CD4⁺CD25⁺Treg 细胞的 PD-1 mRNA 表达水平较对照组显著升高, Blimp-1 mRNA 表达水平较对照组儿童显著下降。推测上述因子的异常表达可能是导致 Tfh 细胞过表达及 Tfr 细胞抑制表达的重要原因。

总之, 本研究显示 Tfh 细胞、Tfr 细胞及其相关调控因子的异常表达参与了儿童 HSP 的发病过程, 对其检测有助于进一步完善 HSP 的免疫学发病机制, 并为该类疾病的治疗拓展新的思路, 同时亦为其他自身免疫性疾病的机制探讨提供了方向。

[参 考 文 献]

- [1] Chen O, Zhu XB, Ren P, et al. Henoch-Schönlein purpura in children: clinical analysis of 120 cases[J]. *Afr Health Sci*, 2013, 13(1): 94-99.
- [2] Trnka P. Henoch-Schönlein purpura in children[J]. *J Paediatr Child Health*, 2013, 49(12): 995-1003.
- [3] Ueno H, Banchereau J, Vinuesa CG. Pathophysiology of T follicular helper cells in humans and mice[J]. *Nat Immunol*, 2015, 16(2): 142-152.
- [4] Chung Y, Tanaka S, Chu F, et al. Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions[J]. *Nat Med*, 2011, 17(8): 983-988.
- [5] 崔亚杰, 管玉洁, 刘炜, 等. 儿童原发免疫性血小板减少症患者外周血滤泡调节性和辅助性 T 细胞的变化 [J]. *中华血液学杂志*, 2014, 35(11): 980-984.
- [6] Zhang X, Lindwall E, Gauthier C, et al. Circulating CXCR5⁺CD4⁺ helper T cells in systemic lupus erythematosus patients share phenotypic properties with germinal center follicular helper T cells and promote antibody production[J]. *Lupus*, 2015. pii: 0961203314567750. [Epub ahead of print].
- [7] Shan Y, Qi C, Zhao J, et al. Higher frequency of peripheral blood follicular regulatory T cells in patients with new onset ankylosing spondylitis[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2015, 42(2): 154-161.
- [8] Zhang J, Ren M, Zeng H, et al. Elevated follicular helper T cells and expression of IL-21 in thyroid tissues are involved in the pathogenesis of Graves' disease[J]. *Immunol Res*, 2015, 62(2): 163-174.
- [9] Niu J, Song Z, Yang X, et al. Increased circulating follicular helper T cells and activated B cells correlate with disease severity in patients with psoriasis[J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2015. doi: 10.1111/jdv.13027. [Epub ahead of print].
- [10] Szabo K, Papp G, Dezsó B, et al. The histopathology of labial salivary glands in primary Sjögren's syndrome: focusing on follicular helper T cells in the inflammatory infiltrates[J]. *Mediators Inflamm*, 2014, doi: 10.1155/2014/631787. [Epub ahead of print].
- [11] 中华医学会儿科学分会免疫学组, 《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童过敏性紫癜循证诊疗建议 [J]. *中华儿科杂志*, 2013, 51(5): 502-507.
- [12] Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, et al. 2012 revised international Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides[J]. *Arthritis Rheum*, 2013, 65(1): 1-11.
- [13] 孔凡贞. 急性期过敏性紫癜患儿 Tfh 细胞改变及意义初探 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2012.
- [14] Johnston RJ, Poholek AC, DiToro D, et al. Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation[J]. *Science*, 2009, 325(5943): 1006-1010.
- [15] Kroenke MA, Eto D, Locci M, et al. Bcl6 and Maf cooperate to instruct human follicular helper CD4 T cell differentiation[J]. *J Immunol*, 2012, 188(8): 3734-3744.
- [16] Cretney E, Xin A, Shi W, et al. The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells[J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(4): 304-311.
- [17] Sage PT, Francisco LM, Carman CV, et al. The receptor PD-1 controls follicular regulatory T cells in the lymph nodes and blood[J]. *Nat Immunol*, 2013, 14(2): 152-161.

(本文编辑: 邓芳明)