

儿童系统性红斑狼疮外周血淋巴细胞表面 CTLA-4 的表达及意义

王一冰, 崔广梅, 封东宁, 孙莉莉, 孙清

青岛大学附属妇女儿童医院肾脏免疫科, 山东 青岛 266034

摘要: **目的** 探讨外周血淋巴细胞表面 CTLA-4 在儿童系统性红斑狼疮(SLE)中的表达及意义。 **方法** 随机选取 2012 年 1 月-2015 年 9 月在青岛市妇女儿童医院肾脏免疫科住院治疗的 SLE 患儿 30 例为 SLE 组, 其中活动期 16 例, 静止期 14 例。选择同期健康儿童 30 例为对照组。应用流式细胞仪技术测定两组外周血 T 淋巴细胞表面 CD28、CTLA-4 的表达水平。 **结果** SLE 组患儿的外周血 CD3⁺、CD4⁺ 及 CD8⁺T 细胞上 CD28 的表达量与对照组比较, 差异无统计学意义 (均 $P>0.05$)。SLE 组患儿的外周血 CD3⁺、CD4⁺ 及 CD8⁺T 细胞上 CTLA-4 表达均呈低水平, 分别为 (0.92 ± 0.53) 、 (0.55 ± 0.41) 、 (0.57 ± 0.29) 。其中 SLE 组患儿外周血 CD3⁺、CD4⁺ T 细胞上 CTLA-4 分子的表达明显低于对照组 ($t=3.06, 3.11, P<0.05$), CD8⁺T 细胞上 CTLA-4 分子的表达亦低于对照组水平, 但差异无统计学意义 ($t=0.84, P>0.05$)。活动期 SLE 组患儿外周血 CD3⁺、CD4⁺T 细胞上 CTLA-4 分子的表达 (分别为: $0.74\pm0.47, 0.41\pm0.24$) 明显低于对照组 ($t=3.40, 4.48$, 均 $P<0.05$), CD8⁺T 细胞上 CTLA-4 分子 (0.47 ± 0.29) 的表达亦低于对照组水平 (0.65 ± 0.43), 但差异无统计学意义 ($t=1.50, P>0.05$)。静止期 SLE 组患儿外周血 CD3⁺、CD4⁺ 及 CD8⁺T 细胞上 CTLA-4 的表达量均较活动期 SLE 组患儿升高, 且与对照组比较差异无统计学意义 (均 $P>0.05$)。 **结论** SLE 患儿外周血 T 细胞中存在 CTLA-4 分子表达的缺陷, 参与了 SLE 的发病过程; 在 SLE 发病进展的过程中, CTLA-4 表达明显降低, 使得免疫反应相对激进, 促使疾病的进一步发展。

关键词: 系统性红斑狼疮; 儿童; CTLA-4; 淋巴细胞

中图分类号: R593.24⁺1 文献标识码: B 文章编号: 1006-3110(2016)11-1381-04 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2016.11.030

Expression and significance of CTLA-4 in peripheral blood lymphocytes of children with systematic lupus erythematosus

WANG Yi-bing, CUI Guang-mei, FENG Dong-ning, SUN Li-li, SUN Qing

Department of Pediatric Nephrology, Qingdao Women and Children's Hospital Affiliated to Qingdao University, Qingdao, Shandong 266034, China

Corresponding author: SUN Qing, E-mail: clg_lyh@163.com

Abstract: **Objective** To explore the expression and value of CTLA-4 in peripheral blood lymphocytes of children with systematic lupus erythematosus (SLE). **Methods** Thirty children with SLE hospitalized in Department of Pediatric Nephrology, Qingdao Women and Children's Hospital from January 2012 to September 2015 were randomly selected as SLE group, including 16 cases of active SLE and 14 cases of stationary SLE. 30 healthy children were simultaneously selected as the control group. The expression levels of CD28 and CTLA-4 in peripheral blood T lymphocytes of the 2 groups were tested by flow cytometry. **Results**

No statistically significant difference was found in the expression of CD28 in peripheral blood CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ T cells between SLE group and the control group (all $P>0.05$). The expression levels of CTLA-4 in peripheral blood CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ T cells of SLE group were all low ((0.92 ± 0.53) , (0.55 ± 0.41) , (0.57 ± 0.29)). The expression of CTLA-4 molecule in peripheral blood CD3⁺ and CD4⁺ T cells of SLE group was significantly lower than that of the control group ($t=3.06, t=3.11, P<0.05$), and the expression of CTLA-4 molecule in CD8⁺ T cells was also lower than that of the control group, but no statistically significant difference was found ($t=0.84, P>0.05$). The expression of CTLA-4 molecule in peripheral blood CD3⁺ and CD4⁺ T cells of active SLE group ((0.74 ± 0.47) , (0.41 ± 0.24)) was significantly lower than that of the control group ($t=3.40, t=4.48$, both $P<0.05$), and the expression of CTLA-4 molecule in CD8⁺ T cells (0.47 ± 0.29) was also lower than that of the control

基金项目: 青岛市 2013 年度医药科研指导计划 (2013-WSZD083)

作者简介: 王一冰 (1971-), 男, 研究生学历, 副主任医师, 研究方向: 儿童肾脏免疫。

通讯作者: 孙清, E-mail: clg_lyh@163.com。

group (0.65 ± 0.43), but there was no statistically significant difference ($t=1.50, P>0.05$). The expression levels of CTLA-4 in peripheral blood CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ T cells of stationary SLE group were all higher than those of active SLE group, but there was no statistically significant difference compared with the control group (all $P>0.05$). **Conclusions** There exists a defective expression of CTLA-4 molecule in the peripheral blood T cells from children with SLE; moreover, it is involved in the pathogenesis of SLE. The expression of CTLA-4 is significantly decreased in the pathogenesis and progress of SLE, which induces an active immune response and further development of the disease.

Key words: Systemic lupus erythematosus; Children; CTLA-4; Lymphocyte

目前系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)的病因和发病机制仍不完全明确,但多认为以各种免疫异常为特征,包括 T 和 B 细胞活化失调及循环中 B 细胞的多克隆活化,并产生大量自身反应性抗体和大量免疫复合物是导致 SLE 发病和病程进展的主要原因^[1-2]。T 淋巴细胞的增殖活化需要双信号,除 T 淋巴细胞受体(TCR)识别由抗原提呈细胞(antigen presenting cells, APC)提呈的抗原肽-MHC 复合物作为的第一信号外,还必须有 B7-CD28 通路构成的协同刺激信号即第二信号才能使 T 淋巴细胞活化。B7-CD28 通路构成的协同刺激信号使 T 淋巴细胞活化受机体多种因素调节,从而保持机体免疫平衡的稳定性。细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原-4 (cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4, CTLA-4)即为这类影响因子,CTLA-4 与 CD28 竞争性的与 B7 结合,从而阻止了 T 细胞的进一步活化,维持自身免疫耐受,防止自身免疫病的发生^[3-4]。本研究检测了 SLE 患儿外周血 T 淋巴细胞表面 CD28/CTLA-4 的表达,以探索 CTLA-4 在儿童 SLE 发病机制中的作用,为认识 SLE 的发病机制提供试验依据,从而为进一步治疗提供理论依据。

1 对象与方法

1.1 对象

1.1.1 SLE 组 随机选取 2012 年 1 月-2015 年 9 月青岛市妇女儿童医院肾脏免疫科住院治疗的 SLE 患儿 30 例,诊断均符合 2009 年 SLE 国际临床合作中心(SLICC)、ACR、美国风湿病医师协会(ARHP)在费城年会上提出的新诊断标准。其中男 8 例,女 22 例;发病年龄 6~16 岁,平均(10.85 ± 4.3)岁;病程 4 周~21 个月,平均病程(6.25 ± 1.3)个月。病情活动采用文献^[5] SLE 疾病活动性指标(SLEDAI)评分标准,将总分<10 分视为病情静止,总分≥10 分视为病情活动,根据此标准将 SLE 组分为活动期组 16 例,静止期组 14 例。

1.1.2 对照组 选择同年龄组无过敏性疾病及肿瘤疾病家族史的健康儿童 30 例为对照组,其中男 7 例,女 13 例;年龄 5~16 岁,平均年龄(11.42 ± 5.1)岁。性

别、年龄构成与 SLE 组患儿匹配,差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。

1.2 研究方法 两组被选对象均于清晨空腹肘静脉采血 10 ml,用乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝,上流式仪检测。血标本用等量磷酸盐缓冲液(PBS)稀释后,采用 Ficoll 分离液分离淋巴细胞,获得单个细胞层后,用 PBS 缓冲液洗涤,离心去上清后用 PBS 缓冲液调细胞浓度为 5×10^6 个/ml 左右。分别取 100 μl 上述样品放入 2 支实验管和 3 支调机器用管。实验管和对照管分别加入荧光素标记的小鼠抗人 CD3、CD4、CD8、CD28、CTLA-4 单克隆抗体或小鼠 IgG 对照球蛋白。室温避光反应 20 min 后,1 500 rpm 离心 5 min,弃上清。加入 1×PBS 洗液 2 ml,重悬混匀。1 500 rpm 离心 5 min,弃上清。加入 200 μl 流式细胞洗液重悬细胞,上机检测。采用 BD 公司流式细胞仪进行检测及分析。EXP032 分析软件分析结果。

1.3 统计学分析 数据分析均由 SPSS19.0 统计软件处理,两组间比较采用 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SLE 组与健康对照组外周血 T 淋巴细胞 CD28、CTLA-4 的表达 SLE 组患儿的外周血 CD3⁺、CD4⁺及 CD8⁺T 细胞上 CD28 的表达量与对照组比较,差异无统计学意义(均 $P>0.05$),见表 1。SLE 组患儿的外周血 CD3⁺、CD4⁺及 CD8⁺T 细胞上 CTLA-4 表达均呈低水平,其中 SLE 组患儿外周血 CD3⁺、CD4⁺T 细胞上 CTLA-4 分子的表达明显低于对照组($t=3.06、3.11, P<0.05$),CD8⁺T 细胞上 CTLA-4 分子的表达亦低于对照组水平,但差异无统计学意义($t=0.84, P>0.05$),见表 2。

表 1 SLE 组与健康对照组外周血 T 淋巴细胞 CD28 的表达(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	CD3 ⁺ CD28 ⁺	CD4 ⁺ CD28 ⁺	CD8 ⁺ CD28 ⁺
SLE 组	30	53.79±7.45	33.99±7.84	12.42±2.09

续表 1

组别	n	CD3 ⁺ CD28 ⁺	CD4 ⁺ CD28 ⁺	CD8 ⁺ CD28 ⁺
对照组	30	55.28±9.12	36.95±5.76	12.29±2.43
t 值		0.69	1.67	0.22
P 值		>0.05	>0.05	>0.05

表 2 SLE 组与健康对照组外周血 T 淋巴细胞 CTLA-4 的表达(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	CD3 ⁺ CTLA-4 ⁺	CD4 ⁺ CTLA-4 ⁺	CD8 ⁺ CTLA-4 ⁺
SLE 组	30	0.92±0.53 ^a	0.55±0.41 ^a	0.57±0.29
对照组	30	1.42±0.72	0.86±0.36	0.65±0.43
t 值		3.06	3.11	0.84
P 值		<0.05	<0.05	>0.05

注:与对照组比较,a $P<0.05$ 。

2.2 SLE 组活动期、静止期与健康对照组外周血 T 淋巴细胞 CTLA-4 的表达 活动期 SLE 组患儿外周血 CD3⁺、CD4⁺T 细胞上 CTLA-4 分子的表达明显低于对照组($t=3.40,4.48,P<0.05$),CD8⁺T 细胞上 CTLA-4 分子的表达亦低于对照组水平,但差异无统计学意义

($t=1.50,P>0.05$)。静止期 SLE 组患儿外周血 CD3⁺、CD4⁺及 CD8⁺T 细胞上 CTLA-4 的表达量均较活动期 SLE 组患儿升高,其中 CD3⁺、CD4⁺T 细胞上 CTLA-4 分子的表达差异有统计学意义($t=2.87、2.60,P<0.05$),而 CD8⁺T 细胞上 CTLA-4 分子的表达差异无统计学意义($t=1.21,P>0.05$),且静止期与对照组比较各指标差异均无统计学意义($t=0.64、1.06、0.22,P>0.05$),见表 3 和图 1、图 2。

表 3 SLE 组活动期、静止期与健康对照组外周血 T 淋巴细胞 CTLA-4 的表达(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	CD3 ⁺ CTLA-4 ⁺	CD4 ⁺ CTLA-4 ⁺	CD8 ⁺ CTLA-4 ⁺
活动期	16	0.74±0.47 ^{ab}	0.41±0.24 ^{ab}	0.47±0.29
静止期	14	1.28±0.56 ^a	0.73±0.42 ^a	0.62±0.39
对照组	30	1.42±0.72	0.86±0.36	0.65±0.43

注:与对照组比较,a $P<0.05$;与静止期 SLE 组比较,b $P<0.05$ 。

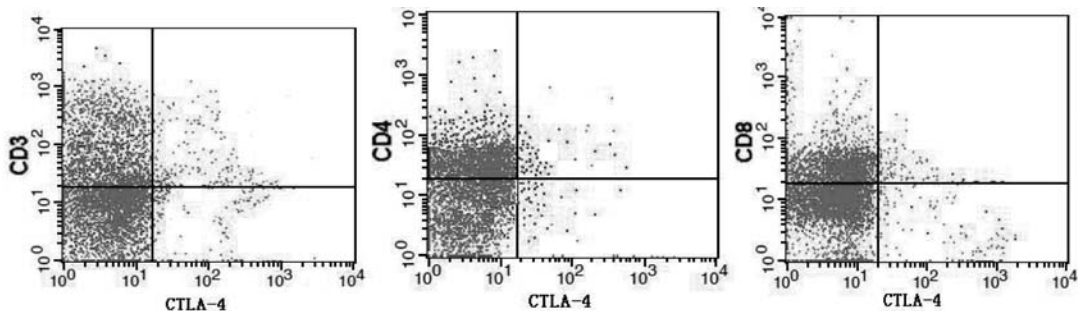


图 1 SLE 组活动期外周血 T 淋巴细胞 CTLA-4 的表达

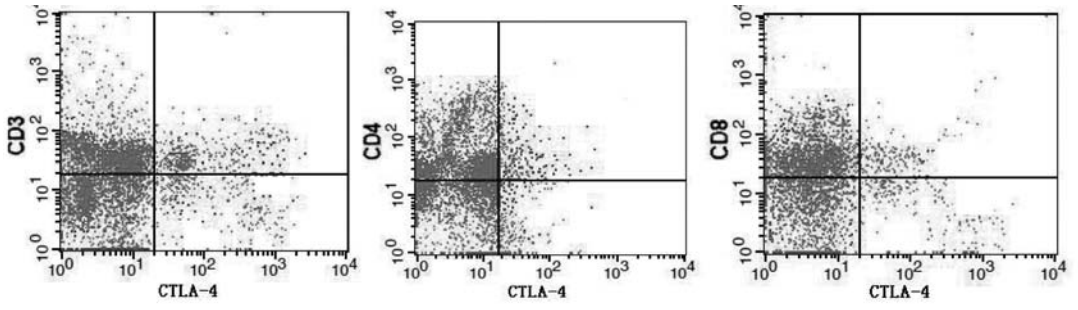


图 2 SLE 组静止期外周血 T 淋巴细胞 CTLA-4 的表达

3 讨论

SLE 是一种严重危害人类健康的最常见的系统性自身免疫性疾病,其病因及发病机制尚不完全明确,但多认为可能与机体丧失了正常的免疫耐受平衡、T 细胞内信号转导的异常及 B 细胞多克隆活化有关,导致产生大量自身反应性抗体和大量免疫复合物,从而造成机体组织、器官的损害而发病^[6-7]。产生自身抗体的 B 细胞活化需要 T 细胞表达的细胞因子和共刺激分

子的辅助,而 T 细胞的活化需要双信号刺激。研究表明,T 细胞活化需两个信号参与:TCR 识别由 APC 提呈的抗原肽复合物而传递的信号是第一信号;T 细胞上的共刺激受体与 T 细胞表面多个黏附分子相互作用时产生的辅助信号则是第二信号,其中表达于 T 细胞表面的 CD28 与表达于 APC 上的 B7 分子形成的共刺激通路是起主要作用的共刺激信号之一。目前,越来越多的研究证实 T 淋巴细胞活化的第二信号系统的异

常参与许多自身免疫疾病和肿瘤性疾病的发病过程^[8]。

CTLA-4 属于免疫球蛋白超家族成员,在氨基酸水平与 CD28 有 31% 的同源性,皆带有两个胞外结构域,但与 CD28 分子的功能却是相反的,可与 CD28 竞争性结合 B7 分子而干扰 B7 与 CD28 介导的共刺激,产生负性调节信号,从而抑制 T 细胞的活化、增殖和分化^[9]。如果缺少这种抑制,T 细胞呈持续活化状态,可导致机体发生一些免疫性疾病。研究表明 SLE、RA 等自身免疫性疾病的 T 细胞表面 CD28、CTLA-4 的表达发生改变,而动物实验中发现敲除 CTLA-4 基因后的实验小鼠会发生自身免疫性疾病,推测 CTLA-4 的异常表达在免疫异常启动、自身免疫耐受的丧失过程中起到了关键性的作用,可导致自身免疫疾病的发生^[10-11],但涉及 SLE 的报道较少,且报道结果也不尽一致。

本研究应用流式细胞仪检测了 CD28、CTLA-4 在 SLE 患儿外周血 T 淋巴细胞上的表达,并分析其表达与 SLE 患儿疾病进展的相关性,以深入地探寻机体的免疫状况与 SLE 发生、发展的关系,从而提高对 SLE 发病因素和免疫状态的认识水平。本研究结果显示,与对照组相比,SLE 患儿外周血 T 淋巴细胞上 CD28 分子的表达无明显差异,而起负性调节作用的 CTLA-4 的表达与对照组相比,SLE 组患儿的外周血 CD3⁺、CD4⁺及 CD8⁺T 细胞上 CTLA-4 表达均呈低水平,且 CD3⁺、CD4⁺T 细胞上 CTLA-4 分子的表达明显降低($P < 0.05$),而 CD8⁺T 细胞上 CTLA-4 分子的表达亦低于对照组水平,但差异无统计学意义($P > 0.05$),说明 SLE 患儿外周血 T 细胞中不存在 CD28 分子的表达缺陷,却存在 CTLA-4 分子表达的缺陷。推测 CTLA-4 出现表达下降,可能使其维持淋巴细胞稳态和控制抗自身免疫性反应的作用无法正常发挥,致使机体出现 T 细胞的过度活化,进而引发一系列的细胞免疫和体液免疫反应,导致组织、器官损害,从而促进 SLE 的发生^[12]。

本研究还观察了外周血 T 淋巴细胞上 CTLA-4 与 SLE 患儿疾病发展的相关性,结果发现活动期和静止期 SLE 组患儿的外周血 T 细胞上 CTLA-4 表达均呈低水平,其中活动期 SLE 组患儿外周血 CD3⁺、CD4⁺T 细胞上 CTLA-4 分子的表达明显低于对照组($P < 0.05$),CD8⁺T 细胞上 CTLA-4 分子的表达亦低于对照组水平,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。静止期 SLE 组患儿外周血 CD3⁺、CD4⁺及 CD8⁺T 细胞上 CTLA-4 的表

达量均较活动期 SLE 组患儿升高,且与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。表明在 SLE 发病进展的过程中,CTLA-4 出现表达明显降低,以致免疫反应的抑制作用减弱,体内过激的免疫反应未得到有效调节,免疫反应相对激进,促使疾病的进一步发展;而经过临床免疫治疗后,部分患儿进入静止期,外周血 T 细胞上的 CTLA-4 表达相应出现上调,与 CD28 的表达可能会比较一致,维持了淋巴细胞的稳态,使疾病不致于再进一步的发展。但有关 CTLA-4 分子的表达缺陷及其影响 SLE 的发病和病情进展的具体作用机制仍不完全清楚,需进一步研究。

参考文献

- [1] Feng JB, Ni JD, Yao X, et al. Gender and age influence on clinical and laboratory features in Chinese patients with systemic lupus erythematosus: 1790 cases[J]. Rheumatol Int, 2010, 30(8): 1017-1023.
- [2] Kamphuis S, Silverman ED. Prevalence and burden of pediatric-onset systemic lupus erythematosus[J]. Nat Rev Rheumatol, 2010, 6(9): 538-546.
- [3] Chen Z, Zhou F, Huang S, et al. Association of cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 gene (rs60872763) polymorphism with Crohn's disease and high levels of serum sCTLA-4 in Crohn's disease[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2011, 26(5): 924-930.
- [4] Erfani N, Razmkhah M, Ghaderi A. Circulating soluble CTLA4 (sCTLA4) is elevated in patients with breast cancer[J]. Cancer Invest, 2010, 28(8): 828-832.
- [5] Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, et al. Derivation of the SLEDAI: a disease activity index for lupus patients[J]. Arthritis Reum, 1992, 35(4): 630-640.
- [6] 于清,薛海燕,曹兰芳. 104 例儿童系统性红斑狼疮临床分析[J]. 临床儿科杂志, 2011, 29(10): 942-947.
- [7] 郭雨凡,孙凌云,邹耀红,等. 1958 例系统性红斑狼疮住院患者首发表现和起病特点的分析[J]. 中华风湿病学杂志, 2011, 15(2): 105-107.
- [8] Tang Y, Chen Y, Ni B, et al. Up-regulation of the expression of costimulatory molecule CD40 in hepatocytes by hepatitis B virus X antigen[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 384(1): 12-17.
- [9] 王淑琼,罗玮,姚勇利. 青海汉族 Graves 病甲状腺肿大与 CTLA-4 基因多态性相关性研究[J]. 实用预防医学, 2015, 10(9): 1136-1138.
- [10] 周树录,李幼姬,叶任高. SLE 患者 Th1/Th2 平衡状态及与外周血淋巴细胞 CD28 及 CTLA-4 分子表达的关系[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(8): 1610-1615.
- [11] 章圣辉,毕来喜,韩义香,等. CD28/CTLA-4:B7 在特发性血小板减少性紫癜患者外周血淋巴细胞中的表达及意义[J]. 临床血液学杂志, 2010, 23(1): 77-79.
- [12] da Silva AE, dos Reis-Neto ET, da Silva NP, et al. The effect of acute physical exercise on cytokine levels in patients with systemic lupus erythematosus[J]. Lupus, 2013, 22(14): 1479-1483.