

网络出版时间:2023-04-23 08:54:31 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20230420.1541.031.html

◇临床医学研究◇

类风湿关节炎患者外周血 TFH 细胞 TIGIT 和 PD1 表达及意义

黄自坤,张露,李雪,罗清

摘要 **目的** 探讨含 T 细胞免疫球蛋白和酪氨酸免疫抑制受体结构域蛋白(TIGIT)和程序性死亡分子(PD1)在类风湿关节炎(RA)患者外周血滤泡辅助性 T(TFH)细胞上的表达及其临床意义。**方法** 应用流式细胞仪检测 79 例 RA 患者(RA 组)和 45 例对照者(HC 组)外周血 TFH 细胞 TIGIT 和 PD1 阳性的百分率和平均荧光强度(MFI),并进行比较,分析其与 RA 实验室检查指标的相关性。**结果** ①与 HC 组相比,RA 组仅 PD1⁺TFH 细胞百分率和 PD1 表达 MFI 增高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。②RA 组 TIGIT⁺PD1⁻TFH 细胞百分率低于 HC 组($P < 0.01$);RA 组 TIGIT⁺PD1⁺TFH 细胞百分率、PD1 表达 MFI 和 TIGIT⁻PD1⁺TFH 细胞百分率、PD1 表达 MFI 高于 HC 组($P < 0.05$)。③RA 组外周血 TIGIT⁺PD1⁺TFH 细胞 PD1 表达 MFI 与类风湿因子(RF)呈正相关($P < 0.05$),TIGIT⁻PD1⁺TFH 细胞百分率、TIGIT⁻PD1⁺TFH 细胞和 TIGIT⁺PD1⁺TFH 细胞 PD1 表达 MFI 均与阳性的 RF 呈正相关($P < 0.05$)。④RA 组外周血 TIGIT⁺PD1⁻TFH 细胞百分率与血沉(ESR)呈负相关($P < 0.05$),TIGIT⁻PD1⁺TFH 细胞百分率与 ESR 呈正相关($P < 0.05$),TIGIT⁺PD1⁺TFH 细胞百分率与淋巴细胞数量(Lym)呈负相关($P < 0.05$),TIGIT⁺PD1⁺TFH 细胞 PD1 表达 MFI 与淋巴细胞百分比(Lym%)呈负相关、与中性粒细胞数量(Net)、中性粒细胞百分比(Net%)、中性粒细胞与淋巴细胞比值(NLR)、系统性免疫炎症指数(SII)、衍生中性粒细胞与淋巴细胞比值(dNLR)、ESR、C-反应蛋白(CRP)呈正相关($P < 0.05$),TIGIT⁻PD1⁺TFH 细胞 PD1 表达 MFI 与 Net、ESR、CRP 呈正相关($P < 0.05$)。⑤RA 组外周血 TIGIT⁺PD1⁻TFH 细胞百分率与疾病活动性评分(DAS28)-ESR 呈负相关($P < 0.05$),TIGIT⁺PD1⁺TFH 细胞 PD1 表达 MFI 和 TIGIT⁻PD1⁺TFH 细胞 PD1 表达 MFI 均与 DAS28-ESR、DAS28-CRP、关节压痛数(PJC)、关节肿痛数(SJC)、视觉模拟评分(VAS)呈正相关($P < 0.05$)。⑥TIGIT⁺PD1⁻TFH 细胞百分

率降低和 TIGIT⁺PD1⁺TFH 细胞百分率升高为 RA 发病的危险因素。**结论** RA 患者外周血 TIGIT⁺PD1⁻TFH 细胞百分率降低、TIGIT⁺PD1⁺TFH 和 TIGIT⁻PD1⁺TFH 细胞百分率升高,且与该疾病的抗体产生、炎症程度及活动性有关。

关键词 类风湿关节炎;TFH 细胞;PD1;T 细胞免疫球蛋白和酪氨酸免疫抑制受体结构域蛋白

中图分类号 R 593.22

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)05-0838-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.05.022

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性炎症性自身免疫病,其主要特点是不可逆的骨关节炎炎症和破坏,其病因比较复杂,与遗传、环境和感染等多种因素有关^[1]。虽然 RA 致病机制还不是很明确,但研究表明滤泡辅助性 T 细胞(follicular helper T, TFH)在 RA 致病性自身抗体的产生、病情缓解及进展中发挥重要作用^[2],尤其是程序性死亡分子(programmed cell death 1, PD1)⁺TFH^[3-4]。近年来,含 T 细胞免疫球蛋白和酪氨酸免疫抑制受体结构域蛋白(T-cell immunoglobulin and immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif domain, TIGIT)在 TFH 上的表达受到极大的关注^[5-6]。研究显示 RA 患者 TFH 细胞也可检测到 TIGIT 的表达^[3],但 TIGIT⁺TFH 细胞在 RA 中的具体作用还不清楚。作为两种主要的负性共刺激分子,TIGIT 和 PD1 在 RA 患者免疫细胞中共表达模式所呈现的作用还不清楚。而近期,有研究表明共表达 PD1 和 TIGIT 的 CD8⁺T 细胞与其功能调控^[7]和抗 PD1 免疫治疗反应^[8]有关。且有研究证实在外周血中存在一群共表达的 TIGIT 和 PD1 的 TFH 细胞^[6]。然而,关于 RA 患者 TFH 细胞上 TIGIT 和 PD1 的共表达情况,以及相关的临床意义还鲜为报道。该研究通过检测 RA 患者和健康对照者外周血 TFH 细胞 TIGIT 和 PD1 的表达情况,系统性分析 TIGIT⁺PD1⁻TFH、TIGIT⁺PD1⁺TFH、TIGIT⁻PD1⁺TFH 细胞水平与疾病炎症程度、活动性以及自身抗体的关系,以期探讨不同共刺激分子表达的 TFH 在 RA 发病中的作用。

2023-02-27 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82160307);江西省重点研发计划项目(编号:20181BBG70013);江西省卫生健康委科技计划(编号:202130158);江西省自然科学基金(编号:20171BAB205113)

作者单位:南昌大学第一附属医院检验科,南昌 330006

作者简介:黄自坤,男,硕士,主任技师;

罗清,女,副主任技师,硕士生导师,责任作者,E-mail: lxc042@163.com

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2017 年 10 月—2019 年 9 月于南昌大学第一附属医院风湿免疫科就诊的 RA 患者 79 例(RA 组),其中女性 55 例,男性 24 例,年龄 17~81(57.8 ± 12.3)岁。所有患者 RA 都符合美国风湿病学会(ACR)制定的 RA 诊断标准^[9],并排除其他严重疾病。选取对照者 45 例(HC 组),为年龄和性别相匹配的健康体检者,其中女性 27 例,男性 18 例,年龄 29~82(53.7 ± 14.3)岁。详细收集 RA 患者临床资料及相关实验室检查结果,进行 RA 疾病活动性评分(disease activity score 28, DAS28)^[10]。本实验经过医院伦理委员会批准[编号:(2022)CDYFYYLK(06-004)],参加者均知情同意。

1.2 仪器与试剂 流式细胞抗体藻红蛋白标记的 TIGIT 抗体(phycoerythrin-TIGIT, PE-TIGIT)、异硫氰酸荧光素标记的 PD1 抗体(fluorescein isothiocyanate-PD1, FITC-PD1)、PC7 标记的 CXCR5 抗体(PC7-CXCR5)购自美国 eBioscience 公司;藻红蛋白-得克萨斯红标记的 CD4 抗体(phycoerythrin-texas red, ECD-CD4)及相应的同型对照 PE-IgG1 和 FITC-IgG1 均购自美国 Beckman Coulter 公司。Cytomics FC 500 流式细胞仪为美国 Beckman Coulter 公司产品,分析软件为仪器自带的 CXP 分析系统;外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)Ficoll-Paque 分离液购自美国 Sigma 公司。

1.3 PBMC 提取 肘前静脉采集 EDTA 抗凝外周血 5 ml,6 h 内送检。采用 PBMC Ficoll-Paque 分离液提取 RA 患者和对照者的 PBMC。

1.4 流式细胞术检测单核细胞表面分子 各取受试者 100 μ l 生理盐水重悬的 PBMC 加入 2 个试管中,按以下组合加入单克隆抗体各 10 μ l:ECD-CD4、PC7-CXCR5、PE-IgG1、FITC-IgG1; ECD-CD4、PC7-CXCR5、PE-TIGIT、FITC-PD1。4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,如有红细胞,则用红细胞裂解液处理后,生理盐水洗涤,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,重悬后用 Cytomics FC 500 流式细胞仪检测分析,使用 CXP 分析软件分析 CXCR5⁺CD4⁺TFH 细胞 TIGIT 和 PD1 的表达。

1.5 RA 的其他实验室指标检测 血沉(erythrocyte sedimentation rate, ESR)采用动态血沉仪法(北京普利生公司);类风湿因子(rheumatoid factor, RF)和 C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)采用速率散

色比浊法(美国 Beckman Coulter 公司);抗环瓜氨酸多肽抗体(anti-citrullinated protein antibodies, AC-PA)采用酶联免疫吸附法(上海科新生物技术股份有限公司);血常规采用 XN-10 型仪器(日本 Sysmex 公司)进行检测。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行分析,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,先进行方差齐性检验,若方差齐则组间比较采用 t 检验,否则采用 Mann-Whitney U 检验。Shapiro-Wilk test 检验正态分布,正态分布数据,线性相关性分析采用 Pearson 相关分析,否则采用 spearman 相关分析。取双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 RA 组和 HC 组外周血 TFH 细胞 TIGIT 和 PD1 表达水平的比较 RA 组 TIGIT⁺TFH 细胞百分率、TIGIT⁺TFH 细胞 TIGIT 表达平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)与 HC 组比较差异无统计学意义。RA 组 PD1⁺TFH 细胞百分率($U = 1196$, $P = 0.0025$)、PD1⁺TFH 细胞 PD1 表达 MFI($U = 1134$, $P = 0.0008$)高于 HC 组,差异有统计学意义。见图 1。

2.2 RA 组与 HC 组外周血 TIGIT⁺PD1⁻TFH、TIGIT⁺PD1⁺TFH 和 TIGIT⁻PD1⁺TFH 细胞水平的比较 TFH 细胞可根据 TIGIT 和 PD1 的表达分为三群:TIGIT⁺PD1⁻TFH、TIGIT⁺PD1⁺TFH 和 TIGIT⁻PD1⁺TFH 细胞。RA 组 TIGIT⁺PD1⁻TFH 细胞百分率($U = 1112$, $P = 0.0005$)低于 HC 组,TIGIT⁺PD1⁺TFH 细胞百分率($U = 1319$, $P = 0.0173$)和 TIGIT⁻PD1⁺TFH 细胞百分率($U = 1354$, $P = 0.0270$)均高于 HC 组;RA 组 TIGIT⁺PD1⁻TFH 细胞 TIGIT 表达 MFI($t = 0.594$, $P = 0.5536$)、TIGIT⁺PD1⁺TFH 细胞 TIGIT 表达 MFI($t = 0.146$, $P = 0.8840$)与 HC 组差异无统计学意义,而 RA 组 TIGIT⁻PD1⁺TFH 细胞 PD1 表达 MFI($U = 920$, $P < 0.0001$)、TIGIT⁻PD1⁺TFH 细胞 PD1 表达 MFI($U = 1177$, $P = 0.0018$)均高于 HC 组。此外,RA 组($U = 744$, $P < 0.0001$)和 HC 组($U = 181$, $P < 0.0001$)中 TIGIT⁺PD1⁺TFH 细胞 TIGIT 表达 MFI 均高于 TIGIT⁺PD1⁻TFH 细胞,RA 组($t = 3.990$, $P = 0.0001$)和 HC 组($U = 399$, $P = 0.0001$)中 TIGIT⁻PD1⁺TFH 细胞 PD1 表达 MFI 均高于 TIGIT⁻PD1⁺TFH 细胞。见图 2。

2.3 RA 组外周血 TIGIT⁺PD1⁻TFH、TIGIT⁺PD1⁺

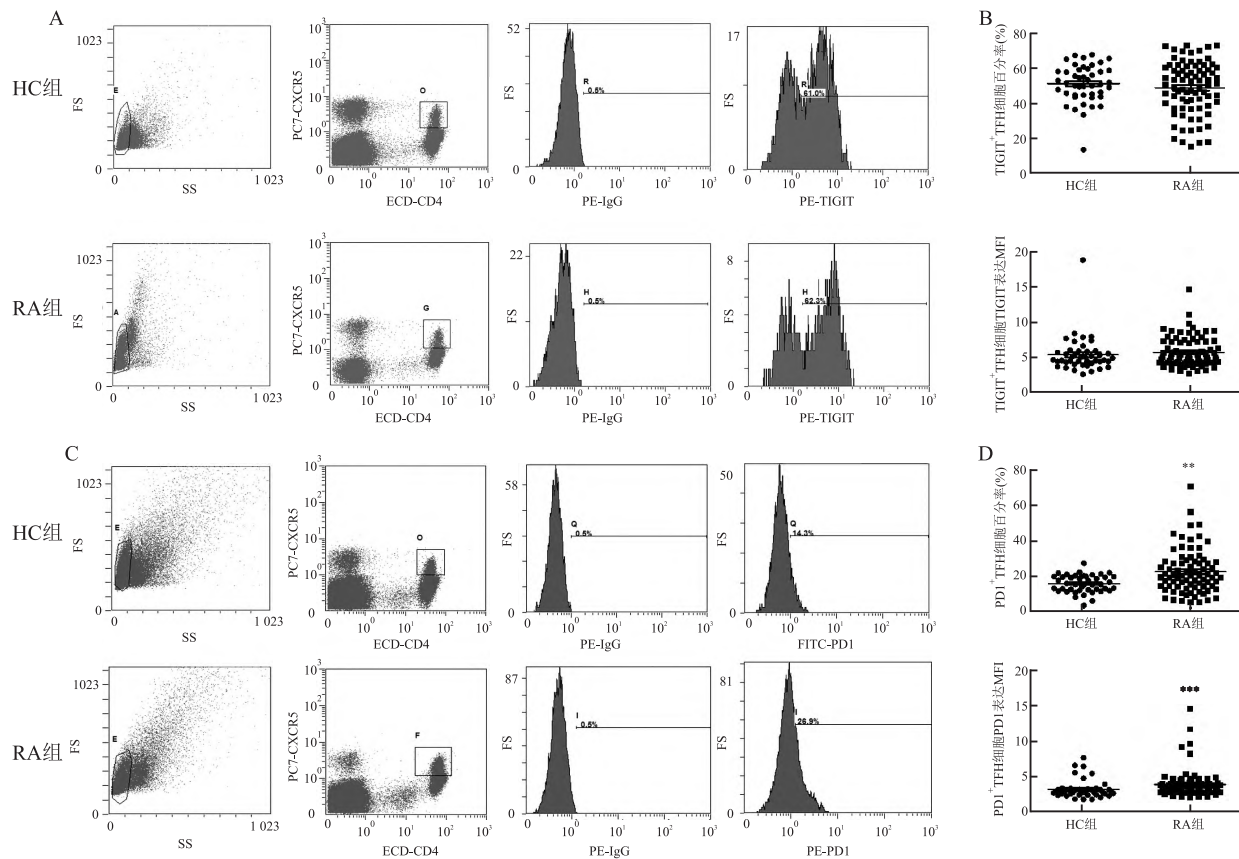


图1 RA组与HC组外周血TFH细胞TIGIT和PD1表达水平

A:TFH细胞TIGIT表达流式图;B:两组TIGIT⁺TFH细胞百分率、TIGIT⁺TFH细胞TIGIT表达MFI比较;C:TFH细胞PD1表达流式图;D:两组PD1⁺TFH细胞百分率、PD1⁺TFH细胞PD1表达MFI比较;FS:前向散色光;SS:侧向散色光;与HC组比较: ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

TFH、TIGIT⁺PD1⁺TFH细胞水平与自身抗体的关系 RA患者血清中可以出现特异性的RF、ACPA等自身抗体,将其与TIGIT⁺PD1⁺TFH、TIGIT⁺PD1⁺TFH和TIGIT⁺PD1⁺TFH细胞水平进行相关性分析。结果显示,RA患者外周血TIGIT⁺PD1⁺TFH细胞PD1表达MFI与RF呈正相关($r_s=0.3176$, $P=0.0074$);TIGIT⁺PD1⁺TFH细胞百分率、TIGIT⁺PD1⁺TFH细胞PD1表达MFI、TIGIT⁺PD1⁺TFH细胞PD1表达MFI与阳性的RF($r_s=0.3110$, $P=0.0197$; $r_s=0.2788$, $P=0.0374$; $r_s=0.4615$, $P=0.0003$)呈正相关,TIGIT⁺PD1⁺TFH与RF不存在相关性。此外,本文也显示TIGIT⁺PD1⁺TFH、TIGIT⁺PD1⁺TFH和TIGIT⁺PD1⁺TFH细胞与ACPA抗体不存在相关性。

2.4 RA患者外周血TIGIT⁺PD1⁺TFH、TIGIT⁺PD1⁺TFH、TIGIT⁺PD1⁺TFH细胞与炎症指标的关系 反映RA炎症程度的相关指标包括白细胞数量(white blood cell count, WBC)、淋巴细胞数量(lymphocyte count, Lym)、淋巴细胞比例(lymphocyte

percentage, Lym%)、单核细胞数量、单核细胞比例、中性粒细胞数量(neutrophil count, Net)、中性粒细胞百分比(neutrophil percentage, Net%)、淋巴细胞与单核细胞比值、中性粒细胞与淋巴细胞比值(neutrophil-to-lymphocyte ratio, NLR)、血小板与淋巴细胞比值、系统性炎症指数(systemic immune inflammation, SII)、衍生中性粒细胞与淋巴细胞比值(derived Neutrophil to lymphocyte ratio, dNLR)、ESR、CRP,将这些相关指标与外周血TIGIT⁺PD1⁺TFH、TIGIT⁺PD1⁺TFH、TIGIT⁺PD1⁺TFH细胞进行相关性分析。结果显示,RA患者外周血TIGIT⁺PD1⁺TFH细胞百分率与ESR($r_s=-0.2593$, $P=0.0219$)呈负相关,TIGIT⁺PD1⁺TFH细胞百分率与ESR($r_s=0.2396$, $P=0.0346$)呈正相关,TIGIT⁺PD1⁺TFH细胞百分率与Lym($r_s=-0.2659$, $P=0.0185$)呈负相关,但并未显示TIGIT⁺PD1⁺TFH、TIGIT⁺PD1⁺TFH、TIGIT⁺PD1⁺TFH细胞百分率与其他炎症指标存在明显相关性。进一步分析RA患者外周血TIGIT⁺PD1⁺TFH、TIGIT⁺PD1⁺TFH细胞PD1表达MFI

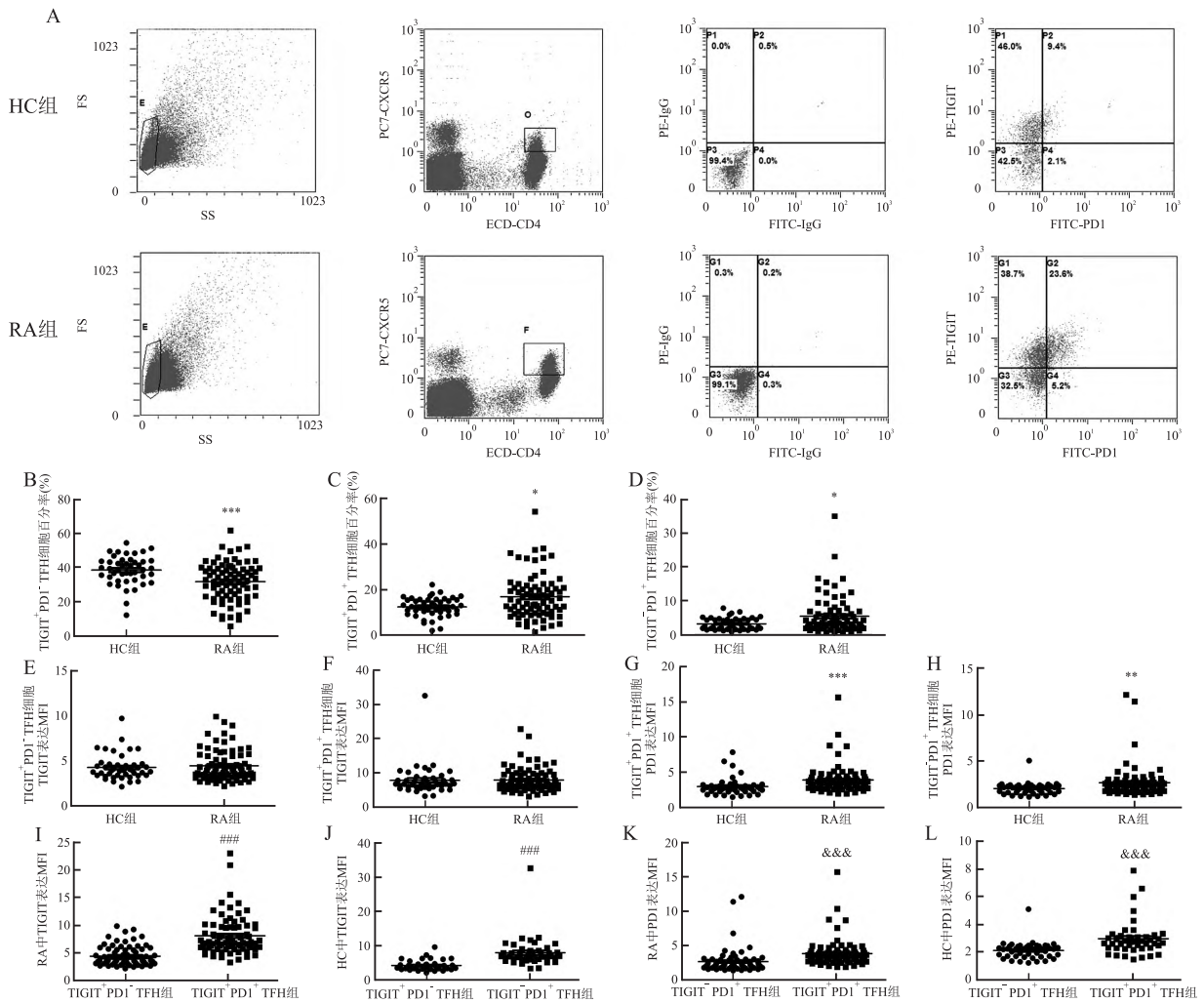


图2 RA组和HC组外周血TIGIT⁺PD1⁻TFH、TIGIT⁺PD1⁺TFH和TIGIT⁻PD1⁺TFH细胞水平

A: TFH细胞TIGIT和PD1的表达流式图; B~D: TIGIT⁺PD1⁻TFH、TIGIT⁺PD1⁺TFH、TIGIT⁻PD1⁺TFH细胞百分率; E、F: TIGIT⁺PD1⁻TFH、TIGIT⁺PD1⁺TFH细胞TIGIT表达MFI; G、H: TIGIT⁺PD1⁺TFH、TIGIT⁻PD1⁺TFH细胞PD1表达MFI; I、J: TIGIT⁺PD1⁺TFH、TIGIT⁻PD1⁺TFH细胞TIGIT表达MFI; K、L: TIGIT⁻PD1⁺TFH、TIGIT⁺PD1⁺TFH细胞PD1表达MFI; 与HC组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与TIGIT⁺PD1⁻TFH细胞比较: ### $P < 0.001$; 与TIGIT⁻PD1⁺TFH细胞比较: &&& $P < 0.001$

与炎症指标关系,结果显示,TIGIT⁺PD1⁺TFH细胞PD1表达MFI与Lym% ($r_s = -0.2918$, $P = 0.0091$)呈负相关,与Net ($r_s = 0.2455$, $P = 0.0303$)、Net% ($r_s = 0.2853$, $P = 0.0108$)、NLR ($r_s = 0.3009$, $P = 0.0074$)、SII ($r_s = 0.2959$, $P = 0.0085$)、dNLR ($r_s = 0.2687$, $P = 0.0174$)、ESR ($r_s = 0.3741$, $P = 0.0007$)、CRP ($r_s = 0.4047$, $P = 0.0002$)呈正相关,RA患者外周血TIGIT⁻PD1⁺TFH细胞PD1表达MFI与N ($r_s = 0.2269$, $P = 0.0458$)、ESR ($r_s = 0.2956$, $P = 0.0086$)、CRP ($r_s = 0.3683$, $P = 0.0009$)呈正相关。

2.5 RA患者外周血TIGIT⁺PD1⁻TFH、TIGIT⁺

PD1⁺TFH、TIGIT⁻PD1⁺TFH细胞与疾病活动性的关系 分析RA患者外周血TIGIT⁺PD1⁻TFH、TIGIT⁺PD1⁺TFH、TIGIT⁻PD1⁺TFH与RA患者DAS28-ESR、DAS28-CRP、关节疼痛数(pain joint count, PJC)、关节肿胀数(swollen joint count, SJC)、视觉模拟评分(visual analogue scale, VAS)等疾病活动性指标的关系,结果显示:RA患者外周血TIGIT⁺PD1⁻TFH细胞百分率与DAS-ESR ($r_s = -0.2845$, $P = 0.0206$)呈负相关,并未发现与其他疾病活动性指标相关;RA患者外周血TIGIT⁺PD1⁺TFH细胞PD1表达MFI与DAS28-ESR ($r_s = 0.4550$, $P = 0.0001$)、DAS28-CRP ($r_s = 0.3880$, $P = 0.0013$)、

PJC($r_s=0.3311$, $P=0.0066$)、SJC($r_s=0.3372$, $P=0.0056$)、VAS($r_s=0.3538$, $P=0.0033$)呈正相关;RA患者外周血 TIGIT⁺PD1⁺TFH 细胞 PD1 表达 MFI 与 DAS28-ESR($r_s=0.3692$, $P=0.0023$)、DAS28-CRP($r_s=0.3657$, $P=0.0025$)、PJC($r_s=0.3546$, $P=0.0035$)、SJC($r_s=0.2996$, $P=0.0145$)、VAS($r_s=0.2661$, $P=0.0295$)呈正相关。

2.6 RA 患者外周血 TIGIT⁺PD1⁺TFH、TIGIT⁺PD1⁺TFH 细胞水平与 RA 危险因素关系 采用单因素和多因素(强迫引入法)分析 TIGIT⁺PD1⁺TFH、TIGIT⁺PD1⁺TFH、TIGIT⁺PD1⁺TFH 是否为 RA 的危险因素,结果显示降低的 TIGIT⁺PD1⁺TFH 细胞百分率和升高的 TIGIT⁺PD1⁺TFH 细胞百分率为 RA 发病危险因素。见表 1。

3 讨论

TFH 是近年来发现的一种特殊类型、具有促进 B 细胞成熟、转化为浆细胞以及诱导抗体产生能力的 CD4⁺T 细胞亚群。Piantoni et al^[11]研究发现 RA 患者 TFH 细胞上表达高水平的诱导 T 细胞共刺激因子(ICOS)。有研究^[12]表明 CD28 等共刺激分子也可表达于 RA 患者的 TFH 细胞中。此外,Cao et al^[13]和 Aldridge et al^[4]发现 RA 患者 TFH 细胞 PD1 表达升高,升高的 PD1⁺TFH 细胞与 RA 患者的炎症水平和致病性抗体相关,且可作为预测疾病治疗后是否缓解的指标,这与本研究检测到的 RA 患者外周血中总 PD1⁺TFH 细胞水平明显高于对照者是相一致的。

近年来,TIGIT 分子在对固有免疫细胞以及适应性免疫细胞的调节方面受到了重视。现有数据表明 TIGIT 可表达于 TFH 细胞中,并可调控 TFH 细胞功能,如 Godefroy et al^[6]发现 TIGIT⁺TFH 细胞在调控镰刀性贫血患者发生输血免疫反应中起着关键作

用,虽然总的 TIGIT⁺TFH 细胞水平在疾病组与对照组间无差异;Akiyama et al^[14]研究表明 IgG4 相关性疾病患者外周血的 TIGIT⁺TFH 细胞水平明显升高,且与 IgG4 相关性疾病的活动性及治疗疗效密切相关。近期的研究^[3]结果显示 RA 患者 PD1⁺TFH 细胞上也可检测到 TIGIT 分子表达,提示 TIGIT 可能参与 RA 的发病过程,但其具体作用尚不明确。本研究采用流式细胞术检测 79 例 RA 患者和 45 例对照组外周血 TFH 细胞中 TIGIT 表达水平,结果显示两组总的 TIGIT⁺TFH 细胞百分率和 TFH 细胞的 TIGIT 表达 MFI 无差异,这些研究结果与其他人员关于 TIGIT⁺TFH 细胞水平在系统性红斑狼疮^[15]、镰刀性贫血患者^[6]与对照组中无差异的研究结果是相一致,但是不同于 Akiyama et al^[14]关于 TIGIT⁺TFH 细胞在 IgG4 相关性疾病患者中的分布。这些研究表明 TIGIT⁺TFH 细胞在不同免疫疾病中的含量及所执行的功能可能有所不同。

免疫细胞上 TIGIT 和 PD1 的共表达受到越来越多的关注^[6-8],这些研究结果显示 TIGIT 和 PD1 在 T 细胞上的共表达与疾病临床结果和细胞功能调控有关。本研究结果表明 TIGIT⁺PD1⁺TFH 细胞、TIGIT⁺PD1⁺TFH 细胞水平与疾病严重程度成正相关,患者疾病越严重,TIGIT⁺PD1⁺TFH 细胞、TIGIT⁺PD1⁺TFH 细胞水平越高。且 TIGIT⁺PD1⁺TFH 细胞、TIGIT⁺PD1⁺TFH 细胞水平与自身抗体 RF 水平呈正相关。这些与近期对其他免疫相关性疾病的研究结果一致^[14]。另外,TIGIT⁺PD1⁺TFH 细胞与这些指标相关性的相关系数要高于 TIGIT⁺PD1⁺TFH 细胞,这与 TIGIT 和 PD1 双阳的 TFH 细胞其促进 B 细胞转化和抗体产生的能力明显高于共刺激分子单阳的 TFH^[6]是相符合的,提示 TFH 细胞上共表达的 TIGIT 和 PD1 具有协同作用。进一步逻辑回归分析也显示升高的 TIGIT⁺PD1⁺TFH 细胞是 RA

表 1 单因素和多因素分析与 RA 相关的危险因素

项目	单因素分析				多因素分析			
	OR	B 值	95% CI	P 值	OR	B 值	95% CI	P 值
TIGIT ⁺ PD1 ⁺ TFH 细胞百分率	0.935	-0.068	0.897~0.974	<0.000 1	0.917	-0.087	0.862~0.976	0.006 0
TIGIT ⁺ PD1 ⁺ TFH 细胞百分率	1.087	0.084	1.040~1.710	0.007 0	1.138	0.129	1.047~1.237	0.002 0
TIGIT ⁺ PD1 ⁺ TFH 细胞 PD1 表达 MFI	1.829	0.604	1.194~2.802	0.006 0				
TIGIT ⁺ PD1 ⁺ TFH 细胞百分率	1.211	0.192	1.041~1.410	0.013 0				
TIGIT ⁺ PD1 ⁺ TFH 细胞 PD1 表达 MFI	2.655	0.976	1.284~5.490	0.008 0				

发病的危险因素,而升高的 TIGIT⁺PD1⁺TFH 细胞不是。这些结果表明 TIGIT⁺PD1⁺TFH 促进致病性自身抗体产生在 RA 发生发展中发挥重要作用。

研究表明 TIGIT⁺PD1⁺TFH 细胞是一群能促进 B 细胞活化和分化的功能性细胞^[6]。本研究结果显示 RA 患者外周血 TIGIT⁺PD1⁺TFH 细胞水平降低,且 TIGIT⁺PD1⁺TFH 细胞水平越低,RA 患者的疾病炎症程度和严重程度越高,患病越严重;而之前也有研究^[16]证实 RA 患者外周血 T 细胞上负性共刺激分子 TIGIT 的表达水平降低,且与疾病活动性呈负相关。此外,本研究并未发现 RA 患者外周血中 TIGIT⁺PD1⁺TFH 细胞水平与自身抗体存在相关性,提示 RA 患者中 TIGIT⁺PD1⁺TFH 细胞可能是一群功能不同于之前研究^[5]报道的细胞,RA 患者中这群细胞并不是通过促进 B 细胞转化和抗体产生参与 RA 致病。进一步逻辑回归分析显示降低的 TIGIT⁺PD1⁺TFH 细胞水平是 RA 发病的危险因素,表明 TIGIT⁺PD1⁺TFH 在 RA 致病中呈现保护性作用。这些研究结果亦表明 RA 患者 TIGIT⁺PD1⁺TFH 细胞可能以不同于 TIGIT⁺PD1⁺TFH 细胞作用方式参与 RA 的发生发展,但其具体作用方式及机制还有待于进一步探索。

综上所述,RA 患者外周血升高的 TIGIT⁺PD1⁺TFH、TIGIT⁺PD1⁺TFH 细胞水平与疾病的抗体产生、炎症程度及活动性有关;降低的 TIGIT⁺PD1⁺TFH 细胞水平与疾病的炎症程度及活动性有关。今后尚需进一步探讨 TIGIT 在 TFH 细胞及 RA 发生发展中作用及其机制,以期 RA 治疗提供新靶点。

参考文献

- [1] 黄自坤,黄清水,李雪,等. CD64 在 RA 患者单核细胞中的表达及与 TNF- α 的相关性研究[J]. 安徽医科大学学报,2019,54(2):281-5.
- [2] Zhou S, Lu H, Xiong M. Identifying immune cell infiltration and effective diagnostic biomarkers in rheumatoid arthritis by bioinformatics analysis[J]. Front Immunol, 2021,12:726747.
- [3] Rao D A, Gurish M F, Marshall J L, et al. Pathologically expanded peripheral T helper cell subset drives B cells in rheumatoid arthritis[J]. Nature, 2017, 542(7639):110-4.
- [4] Aldridge J, Andersson K, Gjertsson I, et al. Blood PD-1⁺TFH and CTLA-4⁺CD4⁺T cells predict remission after CTLA-4Ig treatment in early rheumatoid arthritis[J]. Rheumatology (Oxford), 2022,61(3):1233-42.
- [5] Anaparti V, Tanner S, Zhang C, et al. Increased frequency of TIGIT⁺CD4⁺T Cell subset in autoantibody-positive first-degree relatives of patients with rheumatoid arthritis[J]. Front Immunol, 2022,13:932627.
- [6] Godefroy E, Zhong H, Pham P, et al. TIGIT⁺positive circulating follicular helper T cells display robust B-cell help functions: potential role in sickle cell alloimmunization[J]. Haematologica, 2015, 100(11):1415-25.
- [7] Chauvin J M, Pagliano O, Fourcade J, et al. TIGIT and PD-1 impair tumor antigen-specific CD8⁺T cells in melanoma patients[J]. J Clin Invest, 2015, 125(5):2046-58.
- [8] Simon S, Voillet V, Vignard V, et al. PD-1 and TIGIT coexpression identifies a circulating CD8⁺T cell subset predictive of response to anti-PD-1 therapy[J]. J Immunother Cancer, 2020, 8(2):e001631.
- [9] Aletaha D, Neogi T, Silman A J, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative[J]. Ann Rheum Dis, 2010, 69(9):1580-8.
- [10] Prevoo M L, Van 't Hof M A, Kuper H H, et al. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 1995, 38(1):44-8.
- [11] Piantoni S, Regola F, Scarsi M, et al. Circulating follicular helper T cells (CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺) decrease in patients with rheumatoid arthritis treated with abatacept[J]. Clin Exp Rheumatol, 2018, 36(4):685.
- [12] Fukuyo S, Nakayama S, Iwata S, et al. Abatacept therapy reduces CD28⁺CXCR5⁺follicular helper-like T cells in patients with rheumatoid arthritis[J]. Clin Exp Rheumatol, 2017, 35(4):562-70.
- [13] Cao G, Chi S, Wang X, et al. CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺T follicular helper cells play a pivotal role in the development of rheumatoid arthritis[J]. Med Sci Monit, 2019, 25:3032-40.
- [14] Akiyama M, Suzuki K, Yoshimoto K, et al. Peripheral TIGIT⁺T follicular helper cells that produce high levels of interleukin-21 via OX40 represent disease activity in IgG4-related disease[J]. Front Immunol, 2021, 12:651357.
- [15] Mao L, Hou H, Wu S, et al. TIGIT signalling pathway negatively regulates CD4⁺T-cell responses in systemic lupus erythematosus[J]. Immunology, 2017, 151(3):280-90.
- [16] 方修移,刘俊,周海燕,等. CD226、TIGIT 在类风湿关节炎患者 T 细胞亚群的表达及其与病情活动性关系的研究[J]. 中南药学,2016,14(10):1041-4.

Expression of TIGIT and PD1 on TFH from RA patients and clinical significance

Huang Zikun, Zhang Lu, Li Xue, Luo Qing

(Dept of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006)

Abstract **Objective** To investigate the expression of T-cell immunoglobulin and immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif domain (TIGIT) and programmed death 1 (PD1) on follicular T helper cells (TFH) from the patients with rheumatoid arthritis (RA) and to analyze the clinical relevance to disease severity. **Methods** The expression of TIGIT and PD1 on TFH cells were examined from 79 RA patients and 45 healthy controls (HC) by the technique of flow cytometry. The expression of TIGIT and PD1 including percentage of TIGIT⁺ TFH, PD1⁻ TFH, TIGIT⁺ PD1⁻ TFH, TIGIT⁺ PD1⁺ TFH, TIGIT⁻ PD1⁺ TFH cells and the mean fluorescence intensity (MFI) on these TFH cells were compared between RA patients and HC. Moreover, its correlation with laboratory inspection was analyzed. **Results** ① The percentage of PD1⁺ TFH and the MFI of PD1 on PD1⁺ TFH from RA patients significantly increased compared with HC ($P < 0.01$). ② The percentage of TIGIT⁺ PD1⁻ TFH significantly decreased compared with HC ($P < 0.01$), whereas the percentage of TIGIT⁺ PD1⁻ TFH, the MFI of PD1 on TIGIT⁺ PD1⁻ TFH, the percentage of TIGIT⁺ PD1⁺ TFH and the MFI of PD1 on TIGIT⁺ PD1⁺ TFH significantly increased ($P < 0.05$). ③ The MFI of PD1 on TIGIT⁺ PD1⁺ TFH in RA patients was positively associated with rheumatoid factors (RF) ($P < 0.05$). The percentage of TIGIT⁻ PD1⁺ TFH, the MFI of PD1 on TIGIT⁻ PD1⁺ TFH, the MFI of PD1 on TIGIT⁺ PD1⁺ TFH in RA patients were positively associated with increased RF ($P < 0.05$). ④ The percentage of TIGIT⁺ PD1⁻ TFH in RA patients was negatively associated with erythrocyte sedimentation rate (ESR) ($P < 0.05$). The percentage of TIGIT⁻ PD1⁺ TFH in RA patients was positively associated with ESR ($P < 0.05$). The percentage of TIGIT⁺ PD1⁺ TFH in RA patients was negatively associated with lymphocyte count (Lym) ($P < 0.05$). The MFI of PD1 on TIGIT⁺ PD1⁺ TFH in RA patients was negatively associated with lymphocyte percentage (Lym%), and positively associated with neutrophil count (Net), neutrophil percentage (Net%), neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR), systemic immune inflammation index (SII), derived neutrophil to lymphocyte ratio (dNLR), ESR, C-reactive protein (CRP) ($P < 0.05$). The MFI of PD1 on TIGIT⁻ PD1⁺ TFH in RA patients was positively associated with Net, ESR, CRP ($P < 0.05$). ⑤ The percentage of TIGIT⁺ PD1⁻ TFH in RA patients was negatively associated with disease activity score 28 (DAS28)-ESR ($P < 0.05$). The MFI of PD1 on TIGIT⁺ PD1⁺ TFH and the MFI of PD1 on TIGIT⁻ PD1⁺ TFH in RA patients was positively associated with DAS28-ESR, DAS28-CRP, tender joint count (TJC), swollen joint count (SJC), patient visual analogue scale (VAS) ($P < 0.05$). ⑥ Decreased percentage of TIGIT⁺ PD1⁻ TFH and increased percentage of TIGIT⁺ PD1⁺ TFH were risk of RA. **Conclusion** The decreased percentage of TIGIT⁺ PD1⁻ TFH, increased percentage of TIGIT⁺ PD1⁺ TFH and TIGIT⁻ PD1⁺ TFH were observed in patients with RA. Aberrations level of TIGIT⁺ PD1⁻ TFH, TIGIT⁺ PD1⁺ TFH, TIGIT⁻ PD1⁺ TFH were associated with the production of antibody, inflammation, and also disease activity.

Key words rheumatoid arthritis; TFH cells; PD1; TIGIT