



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103487572 B

(45)授权公告日 2017.03.29

(21)申请号 201310464588.1

(22)申请日 2013.10.08

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103487572 A

(43)申请公布日 2014.01.01

(73)专利权人 北京大学人民医院

地址 100044 北京市西城区西直门南大街
11号

(72)发明人 栗占国 余迪 何菁

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

审查员 赵晓明

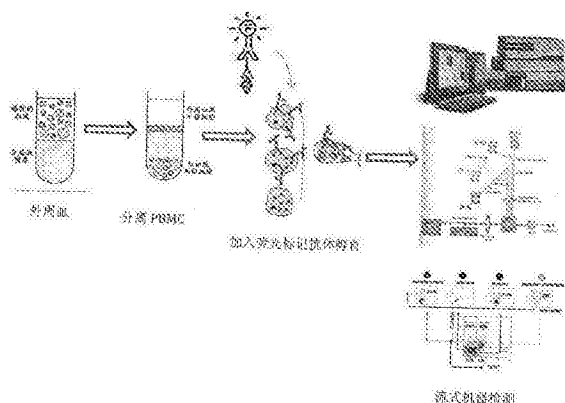
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

滤泡辅助性T淋巴细胞(Tfh)在自身免疫性
疾病病情预警中的应用

(57)摘要

本发明“滤泡辅助性T淋巴细胞(Tfh)在自身
免疫性疾病病情预警中的应用”。提供了一种检
测效应Tfh细胞用于判定自身免疫性疾病(RA,
SLE,SS)活动程度的方法。效应Tfh细胞的表达率
与传统的自身免疫病的活动度评分(DAS28,
SLEDAI,ESSDAI)有较强的一致性,并且直接反应
免疫细胞失衡状态。该指标检测方法简便、稳定,
有利于对常见风湿病患者的病情评估并指导治
疗。



1. 一种非诊断目的的滤泡辅助性T细胞的流式检测方法,其特征在于,将辅助性T细胞表面分子CXCR5和PD-1高表达的CD4细胞定义为Tfh细胞,分离外周血淋巴细胞,细胞数为 10^5 - 10^6 个,标记荧光抗体PD-1、CXCR5、CD4和CCR7,流式方法检测类风湿关节炎病人和干燥综合征病人细胞中 $CD4^+CXCR5^+$ 的 $PD-1^{high}CCR7^{low}$ 的细胞群;通过流式方法计算效应Tfh细胞的表达率。

滤泡辅助性T淋巴细胞(Tfh)在自身免疫性疾病病情预警中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及滤泡辅助性T细胞在类风湿关节炎、系统性红斑狼疮和干燥综合征患者病情活动度评估中的应用。

[0002] 一、背景技术

[0003] 自身免疫性疾病中位居首位的是类风湿关节炎(rheumatoid arthritis,RA),系统性红斑狼疮(Systemic Lupus Erythematosus,SLE)和干燥综合征Syndrome,SS)这三大免疫性疾病。

[0004] 类风湿关节炎是一种以多关节侵蚀性滑膜炎为特征的系统性自身免疫病,患病率为0.33%,我国约有500万患者,且多为中青年女性,未经正规治疗致残率达75%。我国在2006年进行的第二次全国残疾人抽样调查中,致残性关节炎病在导致肢体残疾的21类病因中排第2位(20.1%),仅次于脑血管病(20.6%),其中79.4%为RA致残。

[0005] 系统性红斑狼疮是以免疫性炎症为突出表现的弥漫性结缔组织病。血清中出现多种致病性自身抗体和多系统受累是SLE的两个主要临床特征。SLE患者发病初期多出现低热、面部皮疹、乏力、脱发、关节痛等临床症状,严重者会出现抽搐、晕厥等神经系统症状,晚期多发展为慢性肾炎甚至肾衰竭。该病在我国的患病率约为70/10万人,即患病人数高达90万左右,而5年的生存率仅有50-85%,预后差,严重威胁患者的生活质量,给患者及社会带来了沉重的精神和经济负担。

[0006] 干燥综合征是一种以口、眼干燥为主,并累及全身多个系统和器官的全身性自身免疫病。其主要表现为唾液腺、泪腺及消化道等外分泌腺的炎性细胞浸润及破坏,导致进行性口干、眼干及内脏受累。由于唾液、泪液分泌减少或停止,出现口、眼干燥难忍、口唇破裂、龋齿猖獗或反复角膜炎、结膜炎、腮腺肿大及血管炎等。重症患者可伴有肺间质纤维化、肺动脉高压、肾小管酸中毒及中枢神经系统受累等严重并发症。该病在我国的发病率为0.77%,全国约有8000万人受累,淋巴瘤、骨髓瘤等恶性肿瘤在干燥综合征的发生率可高达正常人的40倍。

[0007] 目前国内外RA,SLE和SS等疾病的诊疗中尚存在以下不足:(1)缺乏敏感性及特异性均高的免疫学预测指标。例如有的RA患者血清RF很高但是经过10年仍关节损伤甚微;相反,某些RA患者血清RF阴性或低滴度的阳性,病程3个月已经出现关节畸形和活动受限,严重影响患者的生活质量。因此自身抗体对治疗的指导意义有限,严重影响了RA的早期治疗。由此可见,寻找敏感性和特异性均较高的靶器官受累或临床预后的指标,对于改善RA治疗的预后具有重要意义。(2)RA、SLE和SS等的疾病过程中缺乏直接的免疫指标对病情活动度的评估,来指导医务工作者的治疗。目前的关于病情活动度的评价指标主要是:SLE患者的SLEDAI评分、RA患者的DAS28、SS患者的ESSDAI。但是缺乏应用直接的指标通过免疫细胞的变化水平来评估疾病,这对于指导治疗,调节异常的免疫水平,评估靶向性的免疫治疗疗效至关重要,其研制工作势在必行。

[0008] 近年来的大量研究表明,自身抗体主要产生于外周淋巴器官的生发中心

(germinal center, GC)。CD4⁺辅助性T (Th) 细胞在GC对B细胞进行辅助, 免疫球蛋白在GC发生亲和力成熟及亚型转换。本研究发明人及国外研究者重新认识了一群定位于生发中心、稳定表达CXCR5, 与CXCR13结合后具有滤泡归巢能力的CD4⁺T细胞, 称为滤泡辅助T细胞 (Tfh)。Tfh细胞能在GC直接辅助B细胞, 选择高亲和力的B细胞分化为记忆细胞或浆细胞, 并维持体液免疫应答。关于人类疾病的研究中, Simpson等发现, SLE患者外周循环中表达CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺或CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺的细胞比例增高, 且与包括抗dsDNA抗体在内的自身抗体滴度及肾脏的终末脏器损伤有关, 而与病程、治疗用药及病情活动度无关。活动性乙型肝炎患者的研究中也发现外周血CD4⁺CXCR5⁺T细胞比例较非活动性乙型肝炎及健康对照增高, 且其比例与血清谷丙转氨酶正相关。自身免疫性甲状腺疾病患者外周血中CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺及CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺T细胞比例也增高, 并与抗甲状腺抗体水平正相关。上述研究提示, Tfh细胞在自身免疫病患者外周血中比例增高, 并且可能与自身抗体的产生相关。

[0009] 本发明人的研究发现, RA、SLE和SS等患者在疾病活动期Tfh细胞高表达, 该群细胞可通过一些成熟稳定且简便的免疫学检测方法 (如: 流式细胞学技术) 检测出来。与现有的疾病活动度有极强的相关性, 而且可以直接了解体内的免疫细胞失衡状态, 对于治疗及其监测疗效有极高的指导意义。

[0010] 二、发明概述

[0011] 本发明的目的之一是提供能够有效评价RA, SLE和SS这三种主要自身免疫性疾病病情活动度的衡量指标, 指导临床治疗。

[0012] 本发明的另一目的是提供效应性滤泡辅助性T细胞 (effective Tfh) 在患者外周循环中检测的方法。

[0013] 本发明所用的术语“Tfh”指具有细胞表面高表达CD4, CXCR5和PD-1的淋巴细胞。

[0014] 发明人发现自身免疫病患者及正常人外周循环中可检测到表达具有CD4, CXCR5和PD-1等标志性表面分子的Tfh细胞。进一步的研究发现Tfh细胞也可以分为不同亚群, 其中效应Tfh细胞 (effective Tfh) 具有CCR7低表达的特点。我们的研究证明, 效应性Tfh细胞与SLE患者的SLEDAI评分、RA患者的DAS28、SS患者的ESSDAI均呈正相关。另外, 在SLE中, 效应性Tfh细胞分别同与脏器受累相关的抗核小体抗体和抗dsDNA抗体强相关。因此效应Tfh细胞可以作为免疫细胞标志物, 正确判断疾病病情活动度, 直接反应异常的免疫细胞状态, 具有重要的临床治疗的指导意义。

[0015] 本发明目的是提供能够有效评价RA, SLE和SS这三种主要自身免疫性疾病病情活动度的衡量指标, 指导临床治疗。基于以上研究, 本研究发明人将CD4, CXCR5和PD-1高表达和CCR7低表达的淋巴细胞定义为“效应Tfh”细胞, 用流式细胞学方法检测正常人和患者外周血中效应Tfh细胞, 通过细胞免疫学方法确定疾病的病情活动度和致病性自身抗体产生的潜能, 直接的反应患者的免疫异常状态, 指导临床治疗, 为评价疾病病情提供客观的实验室依据。

[0016] 本研究发明和验证的细胞亚群可通过流式细胞技术对患者外周血进行检测, 其检测方法为本领域技术人员所熟知的。该检测技术结构稳定, 简便可行, 同时可检测Tfh细胞的其他亚型。

附图说明

[0017] 图1.流式细胞技术原理示意图。

[0018] 图2.流式结果显示效应性Tfh细胞在正常人、RA、SLE及SS的表达不同。

[0019] 图3.效应性Tfh细胞表达水平在RA、SLE和SS患者及健康对照者得比较。由图可见，流式方法检测效应性Tfh细胞表达水平在RA、SLE及SS患者外周血中的水平均明显高于正常人对照组(P均<0.05)。

具体实施方式

[0020] 实施例1效应性Tfh细胞的具体检测方法。

[0021] 分离外周血淋巴细胞,细胞数约 10^5-10^6 个,标记荧光抗体PD-1、CXCR5、CD4和CCR7,流式方法检测CD4⁺CXCR5⁺的PD-1^{high}CCR7^{low}的细胞群。

[0022] 本研究表明:效应性Tfh细胞在RA,SLE和SS患者外周血中高表到,明显高于健康对照人群,对疾病人群的确定具有重要的意义。

[0023] 本研究通过流式方法计算效应Tfh细胞的表达率,检测示意图见说明书附图2。

[0024] 实施例2效应Tfh细胞对RA、SLE、SS患者外周血中表达水平的测定

[0025] 本研究共检测30例类风湿关节炎(RA)、26例系统性红斑狼疮(SLE)、28例干燥综合征(SS)和32例正常人外周血淋巴细胞表达的效应性Tfh细胞水平。以高于正常人的均数+2SD定义为阳性界点。

[0026] 本实施例主要通过以下几个方面阐明本发明Tfh细胞在几个主要的自身免疫病中的检测意义:

[0027] 1、效应Tfh细胞表达阳性情况在RA、SLE、SS及正常人的比较。

[0028] 本研究用FACS方法检测了效应Tfh细胞在各组病人及正常人的阳性率,见表1。应用 χ^2 检验比较各组数据,结果显示,效应Tfh细胞在RA、SLE和SS中的的阳性率显著高于正常人,p值均<0.05。

[0029] 表1效应Tfh细胞在不同疾病中表达的阳性率比较

| 组别 | 总例数 | 阳性例数 (%) | P 值 |
|-----------|-----|-----------|---------|
| [0030] RA | 30 | 6 (20) | 0.036 |
| SLE | 26 | 15 (57.7) | <0.0001 |
| SS | 28 | 14 (50) | <0.005 |
| 健康对照 | 32 | 1 (3.3) | ----- |

[0031] 2、效应Tfh细胞不同疾病中表达(%)的比较:

[0032] 效应Tfh细胞在RA、SLE和SS患者的表达水平明显高于健康对照组(P均<0.05),如说明书附图2所示。

[0033] 3、效应Tfh细胞表达与RA患者的临床和实验室指标之间的关系

[0034] 如表2示:在RA患者中,效应Tfh高表达与低表达组在性别、年龄、病程等差异无统计学意义。效应Tfh细胞高表达组患者的疾病活动指数DAS28评分和ESR均高于效应Tfh低表达组(P<0.05)。两组间抗角蛋白抗体(AKA)、抗核周因(APF)及IgM-RF、IgA、IgM及IgG

[0035] 等差异均无统计学意义。

[0036] 表2. Correlation between clinical characteristics and percentages of Tfhem in 38 patients with RA

[0037]

| Characteristics | Circulating Tfhem | | P value |
|--|-------------------|------------------|----------|
| | Low(n=32) | High(n=6) | |
| Tfhem, %, Mean±SD | 14.2±4.3 | 27.9±4.6 | <0.0001* |
| Tfhem, %, Median (range) | 14.3 (4.3-21.5) | 26.6 (22.3-35.3) | |
| Age in year, Mean±SD | 55.6±10.2 | 56.8±13.6 | 0.602 |
| Age in year, Median (range) | 56 (32-74) | 59 (41-76) | |
| Gender, male/female | 7/25 | 1/5 | 0.781 |
| Duration in year, Mean±SD | 7.6±6.9 | 7.8±5.1 | 0.963 |
| Duration in year, Median (range) | 6.0 (0.3-20) | 7.0 (1.2-13) | |
| DAS28, Mean±SD | 5.08±1.05 | 6.34±1.00 | 0.019* |
| ESR, mm/hr, Mean±SD | 49.1±28.7 | 95.8±31.1 | 0.010* |
| ESR (>20 mm/hr for men >15mm/hr for women), n (%) | 26 (81.3) | 6 (100) | 0.260 |
| CRP, mg/L, Mean±SD | 27.9±29.18 | 51.0±11.5 | 0.203 |
| CRP (>7.90 mg/L), n (%) | 26 (81.3) | 6 (100) | 0.260 |
| RF-IgM, IU/ml, Mean±SD | 494.7±838.7 | 977.0±1261.3 | 0.153 |
| RF-IgM (>30 IU/ml), n (%) | 23 (71.9) | 5 (83.3) | 0.571 |
| Anti-CCP, IgG, RU/ml | 361.7±511.7 | 770.1±830.1 | 0.188 |
| Anti-CCP, IgG (>5 RU/ml), n (%) | 27 (84.4) | 5 (83.3) | 0.951 |
| AKA IgG positive, n (%) | 18 (56.3) | 3(50) | 0.785 |
| APF IgG positive, n (%) | 22 (68.8) | 5 (83.3) | 0.483 |

[0038] ESR: 血沉; RF: 类风湿因子; CRP: C反应蛋白; Anti-CCP: anti-cyclic citrullinated peptide antibody

[0039] AKA: antikeratin antibody; APF: antiperinuclear factor

[0040] *: P value < 0.05

[0041] 4、效应Tfh细胞表达与SLE患者的临床和实验室指标之间的关系

[0042] 本研究共检测25例系统性红斑狼疮(SLE)和32例正常人外周血淋巴细胞表达的效应性Tfh细胞水平。

[0043] 如表3示:在SLE患者中,效应Tfh高表达与低表达组在性别、年龄、病程等差异无统计学意义。效应Tfh细胞高表达组患者的SLEDAI评分、补体C3,抗dsDNA,抗核小体抗体和抗染色质抗体均高于效应Tfh低表达组(P<0.05)。

[0044] 表3. Correlation between clinical characteristics and percentages of Tfhem in 26 patients with SLE

| Characteristics | Circulating Tfhem | | P value |
|--------------------------------------|-------------------|------------------|---------|
| | Low (n=11) | High (n=15) | |
| Tfhem, %, Mean±SD | 14.9±3.1 | 30.1±8.3 | <0.0001 |
| Tfhem, %, Median (range) | 14.3 (9.5-21.1) | 26.2 (21.8-49.8) | |
| Age in year, Mean±SD | 40.5±15.5 | 37.6±16.9 | 0.664 |
| Age in year, Median (range) | 38 (16-65) | 35 (22-76) | |
| Gender, male/female | 1/10 | 1/14 | 0.827 |
| Duration in month, Mean±SD | 66.2±69.5 | 52.5±69.6 | 0.652 |
| Duration in month, Median (range) | 40 (5-240) | 24 (1-240) | |
| Rash, n (%) | 5 (45.5) | 9 (60.0) | 0.482 |
| Photosensitivity, n (%) | 0 (0) | 2 (13.3) | 0.223 |
| Oral ulcers, n (%) | 1 (9.1) | 5 (45.5) | 0.159 |
| Serositis, n (%) | 3 (27.3) | 2 (13.3) | 0.393 |
| Raynaud's, n (%) | 0 (0) | 6 (40.0) | 0.016 |
| Alopecia, n (%) | 4 (36.4) | 6 (40.0) | 0.858 |
| arthritis, n (%) | 2 (18.2) | 8 (53.3) | 0.073 |
| IgA, g/L, Mean±SD | 2.98±1.19 | 3.12±1.47 | 0.802 |
| IgG, g/L, Mean±SD | 15.33±4.44 | 19.09±13.19 | 0.375 |
| IgM, g/L, Mean±SD | 0.94±0.28 | 1.33±0.74 | 0.108 |
| C3, g/L, Mean±SD | 0.67±0.14 | 0.50±0.22 | 0.025* |
| C3 (<0.88 g/L), n (%) | 10 (90.9) | 15 (100) | 0.251 |
| C4, g/L, Mean±SD | 0.15±0.06 | 0.12±0.08 | 0.486 |
| C4 (<0.16 g/L), n (%) | 7 (63.6) | 10 (66.7) | 0.879 |
| urinePRO, g/24h, Mean±SD | 1.15±2.61 | 3.31±4.05 | 0.135 |
| Or urinePRO>0.5g/24h, n (%) | 4 (36.4) | 10 (66.7) | 0.136 |
| Or urinePRO>1g/24h, n (%) | 2 (18.2) | 8 (53.3) | 0.073 |
| anti-dsDNA IgG, IU/ml, Mean±SD | 516.8±517.3 | 1200.7±212.2 | <0.001* |
| anti-dsDNA IgG (>301 IU/ml), n (%) | 6 (54.5) | 15 (100) | 0.002* |
| ANA positive, n (%) | 11(100) | 15(100) | -- |
| anti-Sm IgG, RU/ml, Mean±SD | 38.1±56.3 | 61.6±56.9 | 0.307 |
| anti-Sm IgG (>20 RU/ml), n (%) | 6 (54.5) | 10 (66.7) | 0.549 |
| AnuA IgG, RU/ml, Mean±SD | 50.1±68.0 | 105.1±70.2 | 0.057 |
| AnuA IgG (> 20RU/ml), n (%) | 6 (54.5) | 14 (93.3) | 0.020* |
| anti-Chromatin IgG, IU/ml, Mean±SD | 51.1±50.5 | 121.7±16.6 | 0.001* |
| anti-Chromatin IgG (>20IU/ml), n (%) | 6 (54.5) | 15 (100) | 0.002* |
| AcI IgG, RU/ml, Mean±SD | 1.67±1.20 | 4.67±9.27 | 0.300 |
| AcI IgG (>12 RU/ml), n (%) | 0 (0) | 1 (6.7) | 0.403 |
| SLEDAI score, Mean±SD | 8.73±4.00 | 13.53±3.07 | 0.004* |

[0046] UrinePRO: 24小时尿蛋白; Anti-dsDNA: 抗双链DNA抗体; ANA: 抗核抗体; AcI: 抗心磷脂抗体;

[0047] AnuA: 抗核小体抗体

[0048] *: Pvalue < 0.05

[0049] 5、效应Tfh细胞高表达与SS患者的临床和实验室指标之间的关系

[0050] 本研究共检测28例干燥综合征(SS)和32例正常人外周血淋巴细胞表达的效应性Tfh细胞水平。

[0051] 如表3示: 在SS患者中, 效应Tfh%高表达与低表达组在性别、年龄、病程等差异无统计学意义。效应Tfh细胞高表达组患者的ESSDAI评分、血清IgA水平、抗SSA抗体阳性率均高于效应Tfh低表达组 (P<0.05)。

[0052] 表3. Correlation between clinical characteristics and percentages of Tfhem in 26 patients with SLE

| Characteristics | Circulating Tfhem | | P value |
|-----------------------------------|-------------------|------------------|---------|
| | Low (n=14) | High (n=14) | |
| Tfhem, %, Mean±SD | 14.6±3.5 | 33.4±9.6 | <0.0001 |
| Tfhem, %, Median (range) | 14.3 (9.4-21.7) | 31.3 (22.1-51.2) | |
| Age in year, Mean±SD | 44.5±12.4 | 47.2±13.5 | 0.723 |
| Age in year, Median (range) | 45 (19-71) | 46 (23-79) | |
| Gender, male/female | 0/14 | 0/14 | 1.0 |
| Duration in month, Mean±SD | 28.6±10.8 | 59.5±27.7 | 0.074 |
| Duration in month, Median (range) | 21(1-110) | 40 (5-240) | |
| Parotid Swelling, n(%) | 2 (14.3) | 3(21.4) | 0.637 |
| purpura-lowerlimbs, n(%) | 6 (42.9) | 7 (50) | 0.717 |
| Raynaud's, n(%) | 2 (14.3) | 4 (28.6) | 0.376 |
| PIF, n(%) | 5 (35.7) | 9 (64.3) | 0.141 |
| Renal tubular acidosis, n(%) | 1(7.1) | 2 (14.3) | 0.558 |
| IgA, g/L, Mean±SD | 4.05±1.61 | 8.76±8.26 | 0.043* |
| IgG, g/L, Mean±SD | 19.17±11.81 | 20.09±11.42 | 0.947 |
| IgM, g/L, Mean±SD | 1.23±0.56 | 1.71±1.45 | 0.091 |
| C3, g/L, Mean±SD | 0.91±0.22 | 0.89±0.14 | 0.306 |
| C4, g/L, Mean±SD | 0.26±0.22 | 0.22±0.19 | 0.728 |
| r-G % | 26.77±7.01 | 28.46±14.62 | 0.071 |
| Anti-SSA positive, n (%) | 6(42.9) | 12(85.7) | 0.017* |
| Anti-SSB positive, n (%) | 4 (28.6) | 5 (35.7) | 0.699 |
| ESSDAI score, Mean±SD | 5.91±2.03 | 8.27±3.15 | 0.049* |

[0053] PIF,肺间质纤维化。

[0054]

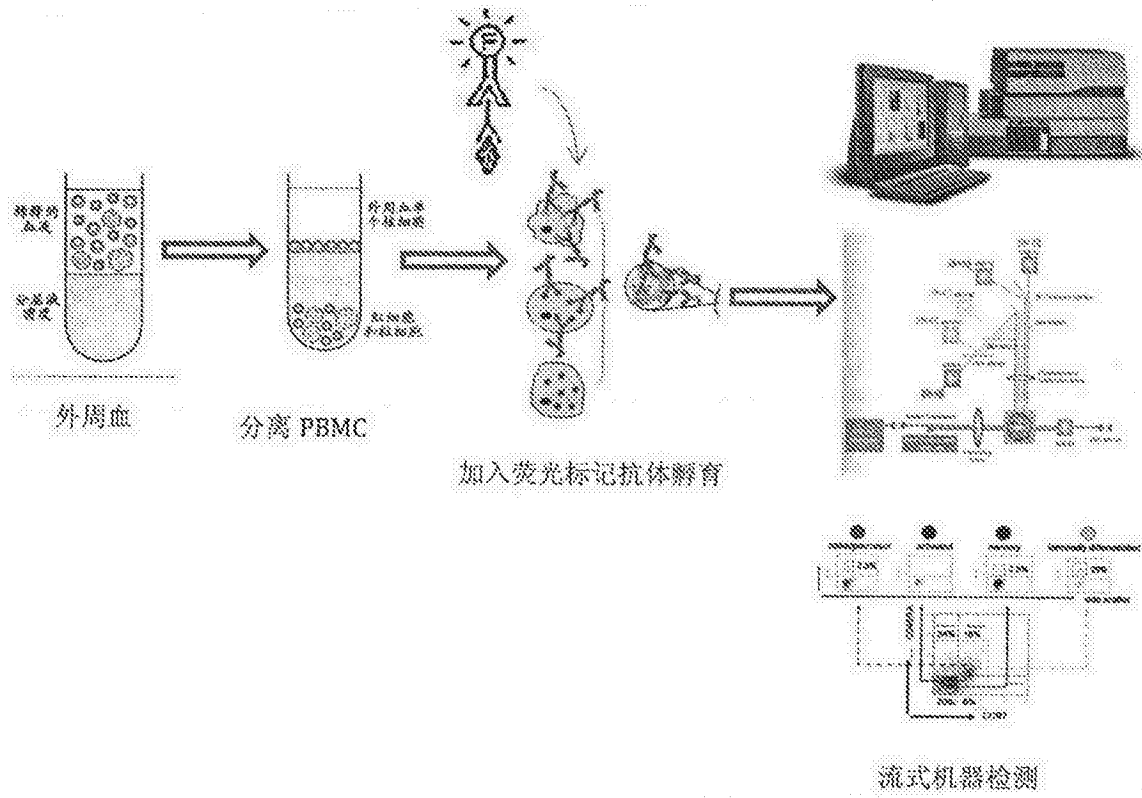


图1

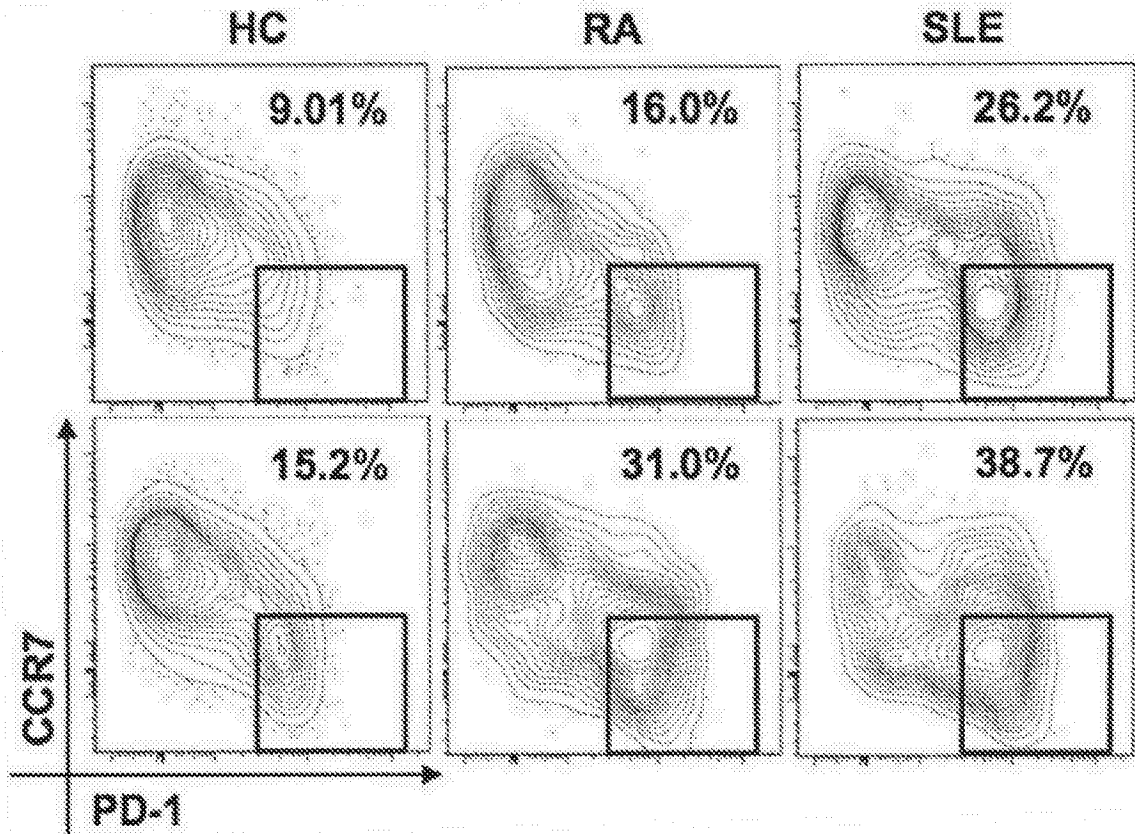


图2

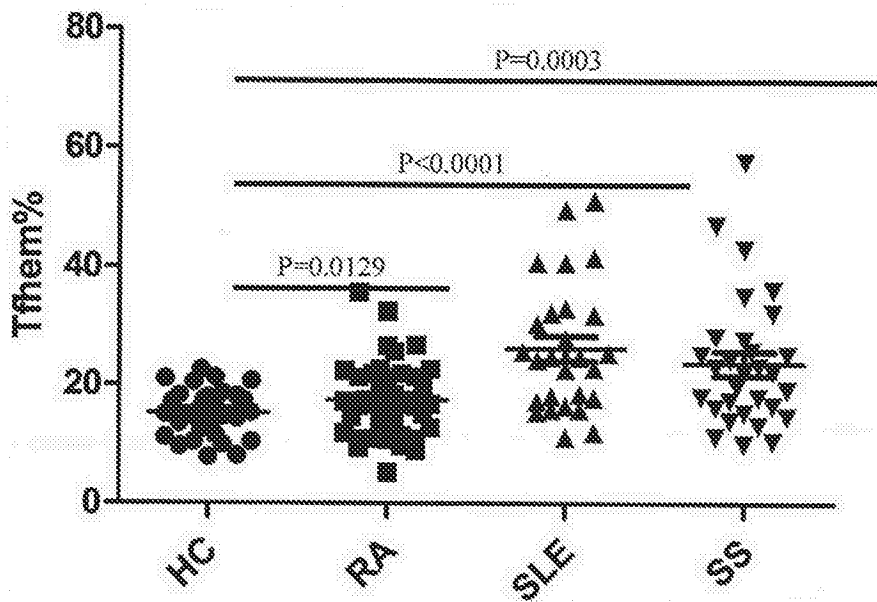


图3

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 滤泡辅助性T淋巴细胞(Tfh)在自身免疫性疾病病情预警中的应用 | | |
| 公开(公告)号 | CN103487572B | 公开(公告)日 | 2017-03-29 |
| 申请号 | CN201310464588.1 | 申请日 | 2013-10-08 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 北京大学人民医院 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 北京大学人民医院 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 北京大学人民医院 | | |
| [标]发明人 | 栗占国 余迪 何菁 | | |
| 发明人 | 栗占国 余迪 何菁 | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 | | |
| CPC分类号 | G01N33/564 | | |
| 审查员(译) | 赵晓明 | | |
| 其他公开文献 | CN103487572A | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明“滤泡辅助性T淋巴细胞(Tfh)在自身免疫性疾病病情预警中的应用”。提供了一种检测效应Tfh细胞用于判定自身免疫性疾病(RA, SLE, SS)活动程度的方法。效应Tfh细胞的表达率与传统的自身免疫病的活动度评分(DAS28, SLEDAI, ESSDAI)有较强的一致性,并且直接反应免疫细胞失衡状态。该指标检测方法简便、稳定,有利于对常见风湿病患者的病情评估并指导治疗。

