

系统性红斑狼疮患者外周血BLyS表达水平变化与CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ Breg细胞关系的相关性研究

徐云帆¹, 邢 倩^{2*}

¹青岛大学医学部青岛市市立医院, 山东 青岛

²青岛市市立医院风湿免疫科, 山东 青岛

收稿日期: 2024年2月25日; 录用日期: 2024年3月19日; 发布日期: 2024年3月26日

摘 要

目的: 此文旨在研究系统性红斑狼疮(SLE)患者外周血BLyS的表达水平与CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ Breg细胞表达比例的相关性, 为寻求SLE个体化免疫治疗策略提供理论依据。实验方法: 选择SLE患者40例, 根据SLEDAI-2k评分分为低活动度组(评分 ≤ 9); 中高活动度组(评分 ≥ 10), 并选取健康查体患者37例, 分析受试者外周血Breg细胞比例水平、BLyS水平、临床指标等。结果: SLE患者外周血Breg表达水平低于健康人, 且与疾病活动度负相关; SLE患者的BLyS表达水平高于健康人, 且与疾病活动度正相关; BLyS表达水平与Breg细胞比例表达水平存在负相关性。结论: 系统性红斑狼疮的发病可能与Breg细胞的负性调节作用减弱有关; BlyS可能参与了系统性红斑狼疮的疾病进展, 为探究此细胞在系统性红斑狼疮发病机制方面提供了一些新的思路。

关键词

Breg细胞, 系统性红斑狼疮, BLyS

Correlation Study between Changes in Peripheral Blood BLyS Expression Levels and CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ Breg Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus

Yunfan Xu¹, Qian Xing^{2*}

*通讯作者。

文章引用: 徐云帆, 邢倩. 系统性红斑狼疮患者外周血 BLyS 表达水平变化与 CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ Breg 细胞关系的相关性研究[J]. 临床医学进展, 2024, 14(3): 1369-1375. DOI: 10.12677/acm.2024.143853

¹Qingdao Municipal Hospital, Medical Department of Qingdao University, Qingdao Shandong

²Rheumatology and Immunology Department, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao Shandong

Received: Feb. 25th, 2024; accepted: Mar. 19th, 2024; published: Mar. 26th, 2024

Abstract

Objective: This article aims to investigate the correlation between the expression level of peripheral blood BlyS and the expression ratio of CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ Breg cells in patients with systemic lupus erythematosus (SLE), providing a theoretical basis for seeking personalized immunotherapy strategies for SLE. **Experimental Method:** Forty SLE patients were selected and divided into a low activity group (score ≤ 9) based on the SLEDAI-2k score; Middle to high activity group (score ≥ 10), and 37 healthy physical examination patients were selected to analyze the proportion of peripheral blood Breg cells, BlyS levels, clinical indicators, etc. **Result:** The expression level of Breg in peripheral blood of SLE patients was lower than that of healthy individuals, and it was negatively correlated with disease activity; the expression level of BlyS in SLE patients is higher than that in healthy individuals and positively correlated with disease activity; there is a negative correlation between the expression level of BlyS and the proportion expression level of Breg cells. **Conclusion:** The pathogenesis of systemic lupus erythematosus may be related to the weakened negative regulatory effect of Breg cells; BlyS may be involved in the progression of systemic lupus erythematosus, providing new insights into the role of this cell in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus.

Keywords

Breg Cell, Systemic Lupus Erythematosus, BlyS

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

系统性红斑狼疮(Systemic Lupus Erythematosus, SLE)是一种多系统累积、反复发作、多种抗体参与、复杂的自身免疫性疾病, SLE 的发病机制较为复杂, 其中 B 淋巴细胞的参与至关重要[1]。调节性 B 细胞(Regulatory B Cells, Breg)是一群新近被发现和定义的 B 细胞亚群, 以负性免疫调节作用为特征, 具有抑制炎症免疫反应、预防自身免疫反应的调节作用, 参与多种免疫作用[2]。Breg 作为组成复杂的细胞亚群(IL-10 + Breg、IL-35 + Breg、CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} Breg、CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ Breg 等) [3], 具有多种细胞因子(IL-10、IL-35、APRIL、BlyS 等), 且细胞亚群在功能上有所不同, IL-10 + Breg、IL-35 + Breg 可以通过释放 IL-10、IL-35 抑制 Th1 和 Th17 细胞活化增殖, 从而起到抑制免疫反应的作用; 而 CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} Breg、CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ Breg 可以通过释放 TGF- β 、APRIL、BlyS 等细胞因子, 从而参与免疫反应的过程, 目前 Breg 细胞在 SLE 病程中对于免疫细胞的影响以及免疫调节功能的作用尚不明确[4]。此文旨在研究 SLE 患者外周血 B 淋巴细胞刺激因子(B-Lymphocyte stimulator, BlyS)的表达水平及 CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ Breg 细胞表达的关系, 寻求 SLE 个体化免疫治疗策略提供理论依据。

2. 资料收集与实验方法

2.1. 一般资料收集

选择 2022 年 8 月至 2023 年 8 月就诊于青岛市市立医院风湿免疫科住院或者门诊的 SLE 患者 40 例。纳入标准：1) 确诊为 SLE，诊断符合 1997 年的美国风湿病学会(ACR)修订的 SLE 分类标准。2) 年龄 18~70 岁。3) 患者签署知情同意书，并对研究表示知情。排除标准：1) 最近 2 个月内有严重狼疮性肾炎或者最近 2 个月内有由 SLE 导致或非 SLE 导致的中枢神经系统疾病者。2) 现患有活动性肝炎或曾有过肝脏严重病史的患者。3) 免疫缺陷、未控制的严重感染及活动性或复发性消化道溃疡患者。4) 孕妇、哺乳期妇女及近 12 个月有生育计划的男性或女性。5) 过敏反应：对人源性生物制品有过敏史。6) 最近一个月接种活疫苗者。7) 一年内使用 B 细胞靶向治疗药物、静脉用丙种球蛋白(IVIG)的患者。

根据疾病活动度分为低活动度组 19 例、中高活动度组 21 例。对照组为 37 例我院健康查体患者，均体健，且未服用影响免疫的药物，且均知情同意本实验。三组基线资料比较见表 1。本实验通过青岛市市立医院医院伦理委员会审核审核。

Table 1. Baseline data comparison
表 1. 基线资料比较

基线资料	低活动组	中高活动组	健康组	P 值
n	19	21	37	
年龄	34.4 ± 8.81	34.5 ± 9.20	35.1 ± 9.19	0.964
女性比例(%)	85%	90%	80%	0.687
SLEDAI-2K	5.45 ± 2.03	12.35 ± 3.78	NA	<0.001
尿蛋白(mg/d)				<0.001
≥150 (%)	4	16	0	
<150 (%)	15	5	37	
Antids DNA				0.036
阳性	13	19	0	
阴性	6	2	37	
C3 (g/L)				0.524
<0.85	6	17	0	
0.85~1.7	13	4	37	
C4 (g/L)				0.530
<0.2	12	16	0	
0.2~0.6	7	5	37	
ANA				<0.001
≤1:320	15	3	37	
>1:320	4	18	0	

2.2. 实验方法

本实验采用 Elisa 试剂盒(武汉云克隆生物有限公司)检测抗双链 DNA 抗体; BLYS 的表达水平, 根据试剂商的说明, 按照标准流程检测。采用免疫荧光法检测抗核抗体; 免疫化学法检测补体。

本实验检测 Breg 细胞采用流式细胞术检测, 征得同意后从入组人员处采用新鲜外周血于肝素管中, 经过溶血剂(美国迈瑞公司)处理, 分成多管后分别加入 CD19-ECD; CD27-APC; CD24-PE 等抗体(均为美国贝克曼公司), 后经避光孵育, 加入磷酸缓冲盐溶液, 多次离心后, 上流式细胞仪(美国贝克曼公司)检测 Breg (CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺)细胞的表达水平。

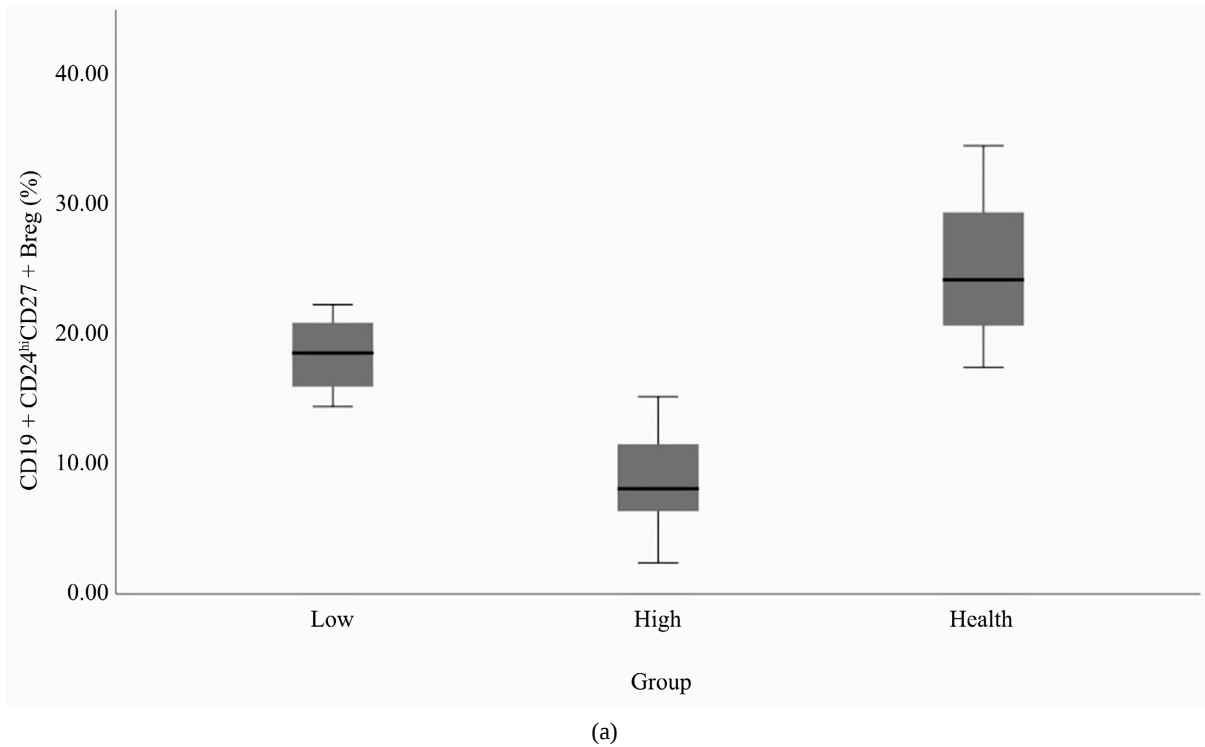
2.3. 统计学方法

本实验采用 IBM SPSS (Statistical Package for the Social Sciences)软件进行统计学分析, 计数资料使用卡方检验, 等级资料比较则使用秩和检验, 计量资料使用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 F 检验和 t 检验。正态分布资料采用皮尔逊相关性分析; 非正态分布资料采用斯皮尔曼相关性分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

3. 实验结果

3.1. SLE 患者外周血 Breg 细胞表达水平的比较

此实验通过流式细胞术, 分析了低活动度、中高活动度狼疮患者与健康人的 CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ Breg 细胞表达水平(图 1(a))。可以发现低活动度狼疮患者的外周血中的 CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ Breg 细胞表达水平为 $18.75\% \pm 4.26\%$, 低于健康人的表达水平 $24.84\% \pm 5.29\%$, 具有统计学意义(P < 0.01)。高活动度狼疮患者的外周血中的 CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ Breg 细胞表达水平为 $8.62\% \pm 3.77\%$, 显著低于低活动度狼疮患者, 具有统计学意义(P < 0.05)。



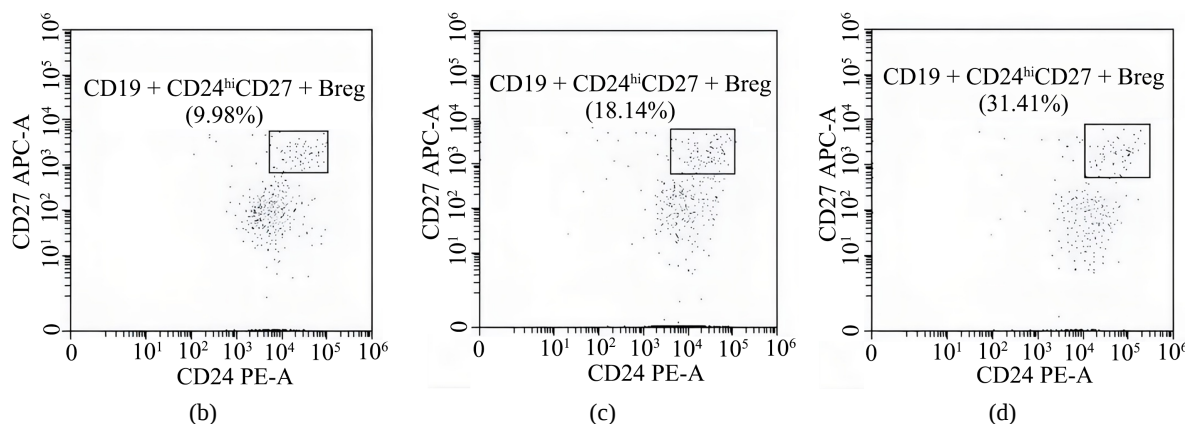


Figure 1. The expression levels and representative graphs of Breg cells in SLE patients and healthy individuals with different levels of activity; (a) shows the average expression levels of three groups of Breg; (b) shows a representative flow cytometry image of the middle to high activity group; (c) shows a representative flow cytometry image of the low activity group; (d) shows a representative flow cytometry image of the healthy control group

图 1. SLE 患者与健康人的 Breg 细胞表达水平及代表图; 其中(a)为三组 Breg 的平均表达水平; (b)为中高活动度组的流式细胞代表图; (c)为低活动度组的流式细胞代表图; (d)为健康对照组的流式细胞代表图

3.2. 相关临床指标、BLyS 与 Breg 表达比水平的相关性分析

本研究检测了中高活动度组、低活动度组及健康人组的外周血 BLyS 表达水平, 可以发现, 低活动度组的 BLyS 表达水平为 8.52 ± 3.36 ng/mL, 相比较中高活动度的水平 15.95 ± 4.23 ng/mL, 表达水平显著降低, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。健康人的 BLyS 表达水平为 4.31 ± 2.96 ng/mL, 显著低于系统性红斑狼疮患者, 差异具有统计学意义。

通过相关性分析, 可以发现低活动组外周血的 $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$ Breg 细胞表达水平与 SLEDAI-2K 评分存在负相关性, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。中高活动组外周血的 $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$ Breg 细胞表达水平与 SLEDAI-2K 评分存在负相关性, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。低活动组外周血的 $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$ Breg 细胞表达水平与 BLyS 表达水平存在负相关性, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。中高活动组外周血的 $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$ Breg 细胞表达水平与 BLyS 表达水平存在负相关性, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。抗核抗体、补体 C3、补体 C4、抗双链 DNA 抗体、抗核抗体与 $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$ Breg 表达水平未见明显的相关性。

4. 讨论

系统性红斑狼疮是一种以 B 细胞表达异常及自身免疫为特征的疾病, 最新的研究发现 Breg 细胞功能障碍是一种重要表现。系统性红斑狼疮患者存在 B 细胞活化、多种自身抗体表达、免疫蛋白升高等特性[5]。有关系统性红斑狼疮的研究已经确定了 B 细胞发育、激活和信号传导的基因多态性, 从而导致自身反应 B 细胞的增加。因此 B 细胞在疾病发病过程中起到关键作用[6]。

随着技术的进步, 一种新型免疫细胞成为目前热点, Breg 细胞是一群最新的免疫调节细胞, 它对免疫系统的调节作用以及通过小鼠及人类免疫系统的实验所证实, 并因其在免疫反应中参与的作用而被广泛研究[7], 它具有负性免疫调节作用, 可以抑制炎症免疫反应、预防自身免疫反应的调节作用, 参与多种免疫病理过程[8]。在最新的研究进展中 $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$ Breg 被认为是主流标记方法, 但是此种标记方法在系统性红斑狼疮中的作用仍值得探索[9]。B 细胞的发育成熟及活化获能的形成过程中, 需要多种细胞因子的参与, BLyS 就是一种重要的细胞因子。实验主要通过流式细胞术分析了不同活动度患者外周血的 $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$ Breg 细胞表达水平, 通过 ELISA 法分析相关临床指标以及外周血的 BLyS 表

达水平, 以求探究此细胞在系统性红斑狼疮中发挥的生物学作用。

此前有研究发现系统性红斑狼疮患者外周血的 $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$ Breg 表达水平低于健康人, 而本研究发现系统性红斑狼疮患者外周血的 $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$ Breg 表达水平低于健康人这与之之前的观点相同[10], 且与疾病活动度相关, 中高活动度的系统性红斑狼疮患者外周血的 $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$ Breg 表达水平低于低活动度的患者, 这可能提示系统性红斑狼疮患者的发病与进展可能与 $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$ Breg 细胞的负性调节功能减弱有关。

BLyS 主要由髓系细胞表达, 此前有研究表明 BLyS 主要由滤泡 T 辅助细胞表达, 并在 B 细胞存活中发挥决定性作用[11], 它的作用有: 刺激免疫活化增殖和浆细胞形成, 刺激形成自身反应性 B 细胞, 刺激分泌 IgM 的自身反应性 B 细胞克隆向分泌 IgG 的病理性克隆转换等。这些作用都与 SLE 的发病机制息息相关, 如 BLyS 可以使 SLE 患者体内 B 淋巴细胞对 IgA、IgM 两类免疫球蛋白的分泌增加, 使得 B 淋巴细胞能活化, 进行连锁反应之后产生记忆性 B 淋巴细胞、浆细胞, 从而在 SLE 的发病中发挥作用[12]。

本实验发现中高活动度组系统性红斑狼疮患者外周血的 BLyS 表达水平显著高于低活动度组的系统性红斑狼疮患者, 且系统性红斑狼疮患者外周血的 BLyS 表达水平高于健康人, 这说明 BLyS 可能参与了系统性红斑狼疮的发病与进展。

同时, 本实验发现系统性红斑狼疮患者外周血的 BLyS 的表达水平与 $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$ Breg 表达水平存在一定的负相关性, 这可能说明 $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$ Breg 细胞存在着一定的抑制 BLyS 释放的作用, 为探究此细胞在系统性红斑狼疮作用机制方面提供了一些新的思路。

本实验的不足之处在于, 入组样本数量较少, 未进一步探究其他表型的 Breg 细胞与 BLyS 的相关性分析, 后续研究会增加样本数量, 增加标记表型, 进一步分析 Breg 细胞在系统性红斑狼疮中的作用。

参考文献

- [1] Ci, W., Zhao, J. and Qi, W. (2022) Characteristics and Risk Factors of Severe Coronary Artery Disease in Systemic Lupus Erythematosus: A Multicenter, Chinese Rheumatism Date Center Database Study. *International Journal of Rheumatic Diseases*, **25**, 1186-1195. <https://doi.org/10.1111/1756-185X.14402>
- [2] Long, D., Yang, B. and Yang, M. (2023) Bach2 in $CD4^+$ T Cells from SLE Patients Modulates B-Cell Differentiation and IgG Production. *European Journal of Immunology*, **53**, e2250109. <https://doi.org/10.1002/eji.202250109>
- [3] Horikawa, M., Spolski, R. and Venturi, G.M. (2013) Regulatory B cell (B10 Cell) Expansion during *Listeria* Infection Governs Innate and Cellular Immune Responses in Mice. *Journal of Immunology*, **190**, 1158-1168. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201427>
- [4] Samy, E., Wax, S. and Huard, B. (2017) Targeting BAFF and APRIL in Systemic Lupus Erythematosus and Other Antibody-Associated Diseases. *International Reviews of Immunology*, **36**, 3-19. <https://doi.org/10.1080/08830185.2016.1276903>
- [5] Kiriakidou, M. and Ching, C.L. (2020) Systemic Lupus Erythematosus. *Annals of Internal Medicine*, **172**, Itc81-itc96. <https://doi.org/10.7326/AITC202006020>
- [6] Karrar, S. and Cunningham Graham, D.S. (2018) Review: Abnormal B Cell Development in Systemic Lupus Erythematosus: What the Genetics Tell Us. *Arthritis & Rheumatology*, **70**, 496-507. <https://doi.org/10.1002/art.40396>
- [7] Alhabbab, R.Y., Burton, H.M. and Lechler, R.I. (2019) Regulatory B Cells: Development, Phenotypes, Functions, and Role in Transplantation. *Immunological Reviews*, **292**, 164-179. <https://doi.org/10.1111/imr.12800>
- [8] Kline, N.L., Morales, R.E. and Eisenman, D.J. (2020) Association of Pulse Synchronous Tinnitus and Sigmoid Sinus Wall Abnormalities in Patients with Idiopathic Intracranial Hypertension. *American Journal of Otolaryngology*, **41**, 102675. <https://doi.org/10.1016/j.amjoto.2020.102675>
- [9] Sumimoto, K., Uchida, K. and Okazaki, K. (2014) The Role of $CD19^+CD24^{high}CD38^{high}$ and $CD19^+CD24^{high}CD27^+$ Regulatory B Cells in Patients with Type 1 Autoimmune Pancreatitis. *Pancreatology*, **14**, 193-200. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2014.02.004>
- [10] Jin, L., Weiqian, C. and Lihuan, Y. (2013) Peripheral $CD24^{hi}CD27^+CD19^+$ B Cells Subset as a Potential Biomarker in

Naïve Systemic Lupus Erythematosus. *International Journal of Rheumatic Diseases*, **16**, 698-708.

<https://doi.org/10.1111/1756-185X.12229>

- [11] Goenka, R., Zhang, B. and Stohl, W. (2014) Local BLyS Production by T Follicular Cells Mediates Retention of High Affinity B Cells during Affinity Maturation. *Journal of Experimental Medicine*, **211**, 45-56.
<https://doi.org/10.1084/jem.20130505>
- [12] Regola, F., Reggia, R. and Lowin, T. (2019) Association Between Changes in BLyS Levels and the Composition of B and T Cell Compartments in Patients with Refractory Systemic Lupus Erythematosus Treated with Belimumab. *Frontiers in Pharmacology*, **10**, 433. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00433>