

托法替尼对实验性自身免疫性脑脊髓炎大鼠滤泡调节性 T 细胞/滤泡辅助性 T 细胞平衡及 CXCL13、转化生长因子- β 1 表达的影响

李玲, 李作孝

西南医科大学附属医院神经内科, 四川省泸州市 646000

摘要: **目的** 探讨托法替尼对实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) 大鼠滤泡调节性 T 细胞 (Tfr)/滤泡辅助性 T 细胞 (Tfh) 平衡及 CXCL13、转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 表达的影响。 **方法** 选择 50 只 Wistar 雌性大鼠, 随机分为正常对照组、EAE 对照组、托法替尼小、中、大剂量防治组, 每组 10 只。采用髓鞘碱性蛋白及完全弗氏佐剂制造 EAE 模型。从造模前 3 d 开始 EAE 对照组及小、中、大剂量托法替尼防治组分别予以生理盐水和托法替尼 1、2、4 mg/kg/d 灌胃, 连续 10 d。观测大鼠发病情况、脾组织中 Tfh 和 Tfr 比例、Tfr/Tfh 比值变化、脑组织匀浆中 CXCL13、TGF- β 1 含量变化。 **结果** EAE 对照组大鼠发病潜伏期 (10.20 ± 1.99) d, 托法替尼小、中、大剂量防治组发病潜伏期分别为 (16.70 ± 1.50) d、(20.20 ± 2.44) d 和 (22.90 ± 1.79) d, 托法替尼各防治组发病潜伏期均较 EAE 对照组延长 ($P < 0.01$)。EAE 对照组大鼠进展期 (10.50 ± 1.84) d, 托法替尼小、中、大剂量防治组发病进展期分别为 (8.00 ± 2.00) d、(5.60 ± 1.51) d 和 (3.00 ± 1.16) d, 托法替尼各防治组发病进展期均较 EAE 对照组缩短 ($P < 0.01$)。EAE 对照组大鼠发病高峰期神经功能障碍评分 (3.80 ± 1.03) 分, 托法替尼小、中、大剂量防治组发病高峰期神经功能障碍评分分别为 (2.30 ± 1.34) 分、(1.20 ± 1.40) 分和 (0.60 ± 0.84) 分, 托法替尼各防治组发病高峰期神经功能障碍评分均较 EAE 对照组降低 ($P < 0.01$)。托法替尼各防治组与 EAE 对照组比较, Tfh 细胞比例显著降低, Tfr 细胞比例及 Tfr/Tfh 比值显著升高, CXCL13 含量明显减少、TGF- β 1 含量明显增加, 且呈剂量依赖关系, 剂量越大作用越明显 ($P < 0.01$; $P < 0.05$)。 **结论** 托法替尼对 EAE 大鼠发病具有防治作用, 且呈剂量依赖关系。其防治作用机制可能与下调 EAE 大鼠 Tfh 比例及 CXCL-13 的表达, 上调 Tfr 比例及 TGF-1 的表达, 维持 Tfr/Tfh 平衡, 并促使平衡向 Tfr 偏移有关。

关键词: 托法替尼; 实验性自身免疫性脑脊髓炎; 滤泡辅助性 T 细胞; 滤泡调节性 T 细胞; CXCL13; 转化生长因子- β 1; 大鼠

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2017.06.003

Effects of tofacitinib on T follicular regulatory cell/T follicular helper cell balance and expression of CXCL13 and TGF- β 1 in experimental autoimmune encephalomyelitis rats

Li Ling, Li Zuo-Xiao. Department of Neurology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China

Corresponding author: Li Zuo-Xiao, Email: lzx3235@sina.com

Abstract: Objective To examine the effects of tofacitinib on T follicular regulatory cell / T follicular helper cell (Tfr/Tfh) balance and expression of CXCL13 and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) rats.

Methods Fifty female Wistar rats were randomly assigned to the normal control group, EAE control group, and low-dose, median-dose, and high-dose tofacitinib groups (10 rats per group). The rats were given subcutaneous injection of the myelin basic protein of the guinea pig spinal cord and complete Freund's adjuvant to induce EAE. Rats in the control group and low-dose, median-dose, and high-dose tofacitinib groups were gavaged with normal saline and 1, 2, and 4 mg/kg/d tofacitinib, respectively, for 10 days starting on day 3 before EAE induction. Disease condition, the percentage of splenic Tfh cells and Tfr cells, the change in splenic Tfr/Tfh ratio, and the changes in CXCL13 and TGF- β 1 concentrations in brain tissue homogenates were measured and recorded. **Results** The incubation period was significantly prolonged in the low-dose (16.70 ± 1.50 d), medium-dose (20.20 ± 2.44 d), and high-dose (22.90

基金项目: 四川省卫生厅科研课题 (080192)

收稿日期: 2017-05-08; **修回日期:** 2017-11-14

作者简介: 李玲 (1986-), 女, 住院医师, 硕士研究生, 主要从事神经免疫研究。

通信作者: 李作孝 (1964-), 男, 硕士, 教授, 硕士生导师, 主要从事神经免疫研究。Email: lzx3235@sina.com。

± 1.79 d) tofacitinib groups than in the EAE control group (10.20 ± 1.99 d) (all $P < 0.01$). In contrast, the progressive stage was significantly shortened in the low-dose (8.00 ± 2.00 d), medium-dose (5.60 ± 1.51 d), and high-dose (3.00 ± 1.16 d) tofacitinib groups than in the EAE control group (10.50 ± 1.84 d) (all $P < 0.01$). Furthermore, the neurological dysfunction score was significantly reduced in the low-dose (2.30 ± 1.34 points), medium-dose (1.20 ± 1.40 points), and high-dose (0.60 ± 0.84 points) tofacitinib group than in the EAE control group (3.80 ± 1.03 points) in the peak period of disease onset (all $P < 0.01$). Compared with the EAE control group, the tofacitinib groups had significantly reduced percentage of Tfh cells and CXCL13 concentration and significantly increased percentage of Tfr cells, Tfr/Tfh ratio, and TGF- $\beta 1$ concentration, all in a dose-dependent manner ($P < 0.01$; $P < 0.05$). **Conclusions** Tofacitinib has a dose-dependent preventive and therapeutic effect on EAE in rats. Its preventive and therapeutic effect may be associated with the downregulation of the percentage of Tfh cells and expression of CXCL13, upregulation of the percentage of Tfr cells and expression of TGF- $\beta 1$, and the increase in Tfr/Tfh ratio.

Key words: tofacitinib; experimental autoimmune encephalomyelitis; T follicular helper cell; T follicular regulatory cell; CXCL13; transforming growth factor - $\beta 1$; rat

多发性硬化 (multiple sclerosis, MS) 是中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 的自身免疫性疾病, 本病以白质炎性脱髓鞘为特点^[1], 好发于青壮年女性, 且复发率和致残率高。实验性自身免疫性脑脊髓炎 (experimental allergic encephalomyelitis, EAE) 是公认研究 MS 的理想动物模型。托法替尼 (tofacitinib) 是一种作用于两面神激酶 (Janus Kinase, JAK) 的新型小分子口服抑制剂, 早期用于类风湿性关节炎的治疗^[2], 有研究显示其对银屑病、炎症性肠病、肾移植排斥反应等多种免疫性疾病也取得了较好的疗效^[3-5]。Zhou 等^[6] 近期研究发现, 托法替尼可诱导产生耐受性树突状细胞 (tolerogenic DCs, tolDCs), 进而通过干扰 Th17/Treg 平衡来改善 EAE 病情的进展。但目前国内外还未见托法替尼通过影响滤泡调节性 T 细胞 (follicular regulatory T cell, Tfr)/滤泡辅助性 T 细胞 (T follicular helper cell, Tfh) 平衡来防治 EAE/MS 的报道, 因此, 本研究通过探讨托法替尼对 EAE 大鼠 Tfr/Tfh 平衡及相关细胞因子的影响, 期望为 MS 的治疗提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选用 SPF 级 6~8 周龄、体质量 200~250 g Wistar 雌性大鼠 50 只及体质量 250~300 g 健康豚鼠 10 只, 均购自我院实验动物中心, 动物使用许可证: SYXK (川) 2013-181。实验前在我院动物房适应性饲养 7 d, 保持动物房清洁适宜的温度和湿度。

1.1.2 实验药品及试剂 托法替尼 (Pfizer, 美国); 百日咳毒素 (上海雅吉生物科技有限公司, 中国); 完全弗氏佐剂 (Sigma, 美国); Anti-Mouse

CD4-FITC、Foxp3-PE、CXCR5-APC、ICOS-PE-CY5 (上海嵘崑实业有限公司, 中国); CXCL13 ELISA 试剂盒、TGF- $\beta 1$ ELISA 试剂盒 (上海桥社生物科技有限公司, 中国)。

1.2 方法

1.2.1 EAE 模型制作 将 50 只 Wistar 雌性大鼠随机分为正常对照组、EAE 对照组及托法替尼小、中、大剂量防治组, 每组 10 只。EAE 对照组及托法替尼小、中、大剂量防治组大鼠双侧后肢足掌皮下注入髓鞘碱性蛋白 (myelin basic protein, MBP) 与完全弗氏佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA) (0.2 ml/ 100 g) 建立模型, 正常对照组按同等剂量注入无菌生理盐水与 CFA。建模后当天及第 2 天, 将百日咳素 (pertussis toxin, PTX) 注入各组大鼠腹腔, 每只 0.2 ml, 加强免疫反应。

1.2.2 模型干预 托法替尼小、中、大剂量组自造模前 3 d 开始连续 10 d 分别按体重灌胃托法替尼 1、2、4 mg/kg/d, 正常对照组和 EAE 对照组均灌胃等量生理盐水。

1.2.3 动物模型评价 由同一人自建模后每天上午定时 (9:00) 评判大鼠临床表现及神经功能障碍评分。评分标准: 0 分: 无临床症状; 1 分: 尾部瘫痪拖地, 轻度后肢无力; 2 分: 中度单后肢或双后肢无力; 3 分: 重度双后肢无力; 4 分: 四肢全瘫、尿便失禁; 5 分: 抽搐、濒死或死亡。

1.2.4 实验终止 在发病高峰期 (症状评分连续 3 d 无加重、四肢全瘫或死亡) 处死大鼠, 未发病大鼠饲养 8 周后处死。

1.2.5 脾脏 Tfh 细胞及 Tfr 细胞比例测定 实验终止时取大鼠脾脏制作脾细胞悬液, 采用流式细胞仪测定脾细胞悬液 Tfh 细胞及 Tfr 细胞比例, 按说

说明书操作进行。

1.2.6 脑组织匀浆 CXCL13、TGF-β1 含量测定
采用双抗体夹心(ABC-ELISA)法(按说明书操作进行)对脑组织匀浆 CXCL13、TGF-β1 含量进行测定。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件包完成统计分析,计量资料结果均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间样本均数比较采用 *t* 检验。当方差齐时,多组计量资料均数比较用单因素方差分析(one-way ANOVA),当方差不齐时用 H 检验(Kruskal-Wallis),变量间相互关系采用 Pearson 直线相关分析。检验水准为双侧 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 表示差异存在统计学意义。

2 结果

2.1 EAE 对照组及托法替尼各防治组大鼠发病情况

正常对照组未发病。EAE 对照组大鼠均不同程度发病,托法替尼各防治组大鼠部分发病,发病大鼠多于造模后 10 ~ 12 d 开始出现精神萎靡、体重减轻、活动及食量减少等,此后病情逐渐加重,造模后 15 ~ 20 d 达疾病高峰(衰弱、消瘦、单后肢或双后肢无力拖地、共济失调、瘫痪甚至死亡)。EAE 对照组及托法替尼各防治组大鼠发病潜伏期、进展期和高峰期神经功能障碍评分结果见表 1。

表 1 EAE 对照组及托法替尼各防治组发病潜伏期、进展期和高峰期神经功能障碍评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数 (<i>n</i>)	潜伏期 (<i>d</i>)	进展期 (<i>d</i>)	神经功能 障碍评分
EAE 对照组	10	10.20 ± 1.99	10.50 ± 1.84	3.80 ± 1.03
小剂量托法替尼防治组	10	16.70 ± 1.50 ^a	8.00 ± 2.00 ^a	2.30 ± 1.34 ^a
中剂量托法替尼防治组	10	20.20 ± 2.44 ^{ab}	5.60 ± 1.51 ^{ab}	1.20 ± 1.40 ^{ac}
大剂量托法替尼防治组	10	22.90 ± 1.79 ^{abd}	3.00 ± 1.16 ^{abd}	0.60 ± 0.84 ^{abe}

注:a 为与 EAE 对照组相比较, $P < 0.01$; b 为发病潜伏期和进展期与小剂量托法替尼组相比较, $P < 0.01$; c 为发病高峰期神经功能障碍评分与小剂量托法替尼组相比较, $P < 0.05$; d 为发病潜伏期和进展期与中剂量托法替尼组相比较, $P < 0.01$; e 为发病高峰期神经功能障碍评分与中剂量托法替尼组相比较, $P > 0.05$ 。

2.2 正常对照组、EAE 对照组及托法替尼各防治组大鼠发病高峰期 Tfh 细胞、Tfr 细胞比例及 Tfr/Tfh 比值

EAE 对照组与正常对照组比较, Tfh% 显著升高, Tfr% 及 Tfr/Tfh 比值显著降低 ($P < 0.01$; $P <$

0.05)。而托法替尼各剂量组较 EAE 对照组 Tfh% 明显降低, Tfr% 及 Tfr/Tfh 比值明显升高 ($P < 0.01$; $P < 0.05$)。见表 2。

2.3 正常对照组、EAE 对照组和托法替尼各防治组脑组织匀浆中 CXCL13、TGF-β1 含量变化

EAE 对照组与正常对照组比较, CXCL13 含量明显增加, TGF-β1 含量明显减少 ($P < 0.01$), 而托法替尼各剂量组较 EAE 对照组 CXCL13 含量明显降低, TGF-β1 含量明显升高 ($P < 0.01$; $P < 0.05$)。见表 3。

表 2 正常对照组、EAE 对照组及托法替尼各剂量组大鼠脾脏 Tfh、Tfr 含量及 Tfr/Tfh 比值变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(<i>n</i>)	Tfh(%)	Tfr(%)	Tfr/Tfh
正常对照组	10	3.03 ± 0.62	7.07 ± 1.01	2.23 ± 0.39
EAE 对照组	10	8.86 ± 0.57 ^a	2.13 ± 0.91 ^a	0.23 ± 0.09 ^a
小剂量托法替尼防治组	10	7.42 ± 0.61 ^{ac}	4.23 ± 0.77 ^{ac}	0.57 ± 0.06 ^{ac}
中剂量托法替尼防治组	10	6.49 ± 1.05 ^{ace}	5.05 ± 0.63 ^{acd}	0.78 ± 0.05 ^{ac}
大剂量托法替尼防治组	10	5.48 ± 1.06 ^{acdf}	6.14 ± 0.89 ^{bedg}	1.13 ± 0.10 ^{acdf}

注:a 为与正常对照组相比较, $P < 0.01$; b 为与正常对照组相比较, $P < 0.05$; c 为与 EAE 对照组相比较, $P < 0.01$; d 为与小剂量托法替尼组相比较, $P < 0.01$; e 为与小剂量托法替尼组相比较, $P < 0.05$; f 为与中剂量托法替尼组相比较, $P < 0.01$; g 为与中剂量托法替尼组相比较, $P < 0.05$ 。

表 3 正常对照组、EAE 对照组及托法替尼各防治组大鼠脑组织匀浆中 CXCL13、TGF-1 含量变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(<i>n</i>)	CXCL13(ng/ml)	TGF-1(ng/ml)
正常对照组	10	5.84 ± 0.78	85.60 ± 8.14
EAE 对照组	10	9.03 ± 0.35 ^a	42.70 ± 5.13 ^a
小剂量托法替尼防治组	10	8.31 ± 0.49 ^{ab}	49.15 ± 6.01 ^{ab}
中剂量托法替尼防治组	10	7.54 ± 0.70 ^{acd}	59.79 ± 6.33 ^{ace}
大剂量托法替尼防治组	10	6.79 ± 0.81 ^{acef}	68.68 ± 7.03 ^{aceg}

注:a 为与正常对照组相比较, $P < 0.01$; b 为与 EAE 对照组相比较, $P < 0.05$; c 为与 EAE 对照组相比较, $P < 0.01$; d 为与小剂量托法替尼组相比较, $P < 0.05$; e 为与小剂量托法替尼组相比较, $P < 0.01$; f 为与中剂量托法替尼组相比较, $P < 0.05$; g 为与中剂量托法替尼组相比较, $P < 0.01$ 。

3 讨论

MS 是一种以 CNS 炎性脱髓鞘为特点的自身免疫性疾病。MS 的发病机制迄今尚不明了, 细胞免疫被认为是 MS 发病的主要机制, 而近期研究发现 B 细胞介导的体液免疫也可促进 MS 的发展。Tfh 是 Schaerli 等^[7] 和 Breitfeld 等^[8] 在人扁桃体中发现

的以 $CD4^+CXCR5^+$ 为表型的 T 细胞亚群, Tfh 可辅助 B 细胞活化、增殖和分化, 并形成生发中心, 产生高亲和力抗体, 参与体液免疫反应^[9]。Tfh 细胞数量增加及功能增强在多发硬化、类风湿性关节炎和系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病的发病机制中起到重要作用^[10]。另外, Tfr 是在人类扁桃腺中新发现的一类调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 亚群, 能够高分泌 Treg 标志性分子 (Foxp3、CD25、TGF-1 和 IL-10 等), 抑制 Tfh 细胞介导的免疫反应, 发挥免疫调节作用^[11, 12]。Dhaeze 等^[13] 研究发现, MS 患者体内 Tfr 数量较正常对照组明显减少, 支持 Tfr 与 MS 发病有关。本研究发现, 与正常对照组相比, EAE 对照组大鼠发病高峰期脾组织中 Tfh 细胞比例升高, Tfr 细胞比例及 Tfr/Tfh 比值均降低。表明在本实验中 EAE 大鼠脾脏 Tfh 细胞比例升高、Tfr 细胞比例降低、Tfr/Tfh 比值失衡可能参与了 EAE 的发病过程。

CXCL-13 由 Tfh 细胞、树突状细胞和吞噬细胞合成^[14]。当机体免疫应答异常时, 树突状细胞、Tfh 细胞数量及活性上调, 过表达 CXCL-13, 后者可与 Tfh 细胞表面 CXCR5 结合, 趋化 Tfh 细胞至淋巴滤泡内, 辅助 B 细胞活化、产生抗体, 诱导异常体液免疫反应。已有研究表明, CXCL-13 的异常表达与多发硬化及其严重程度正相关^[15]。TGF-1 是 Tfr 细胞发挥免疫抑制作用的关键因子之一。2014 年, McCarron 等^[16] 研究发现, TGF-1 能够抑制 Tfh 细胞的聚积、自身反应性 B 细胞的激活及自身抗体的产生, 进而抑制体液免疫反应。Feger 等^[17] 研究发现, 在复发-缓解型 MS 患者急性期 TGF-1 表达下降、症状加重而缓解期表达升高、症状缓解。本研究发现, 与正常对照组相比, EAE 对照组大鼠发病高峰期脑组织匀浆中 CXCL-13 含量增加, TGF-1 含量减少。表明在本实验中 EAE 大鼠脑组织中 CXCL-13 含量增加, TGF-1 含量减少可能参与了 EAE 的发病过程。

托法替尼是 JAK 抑制剂, 其通过抑制 JAK 磷酸化, 阻断细胞内 JAK-STAT 信号转导通路, 抑制 $CD4^+$ T 细胞增殖及多种炎性细胞因子 (IL-2、IL-6、IL-7、IL-9、IL-11、IL-15 和 IL-21 等) 的合成与分泌, 达到抗炎、调节免疫的作用。Zhou 等^[6] 研究发现, 托法替尼可通过产生耐受性树突状细胞 (tolerogenic DCs, tolDCs)、下调 Th1/Th17 细胞比例、上调 Treg 细胞比例以调节 Th17/Treg 平衡来延

缓 EAE 病情的进展, 并且 Benveniste 等^[18] 提出托法替尼有望成为 MS 新的有效治疗方式。本研究发现, 与 EAE 对照组相比, 托法替尼各防治组大鼠发病潜伏期延长、进展期缩短、高峰期神经功能障碍评分降低, 且呈剂量依赖关系, 提示托法替尼对 EAE 发病具有防治作用。同时本研究发现, 与 EAE 对照组相比, 托法替尼各防治组大鼠发病高峰期 Tfh 细胞比例、CXCL-13 含量降低, 而 Tfr 细胞比例、Tfr/Tfh 比值及 TGF-1 含量升高, 提示托法替尼可通过下调 Tfh 细胞比例及 CXCL-13 水平、上调 Tfr 细胞比例及 TGF-1 水平、维持 Tfr/Tfh 平衡并促使平衡向 Tfr 偏移而发挥对 EAE 的防治作用。

综上所述, 托法替尼可能通过调节 Tfr/Tfh 平衡及 CXCL-13、TGF-1 因子表达发挥对 EAE 大鼠的防治作用。相信随着研究的不断深入, 有望将托法替尼作为 MS 治疗新的靶向药物。

参 考 文 献

- [1] 王进昆, 高峰, 谢姝姮, 等. 百日咳毒素减轻实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠模型炎症反应的机制研究 [J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2016, 43 (2): 112-118.
- [2] Fleischmann R, Kremer J, Tanaka Y, et al. Efficacy and safety of tofacitinib in patients with active rheumatoid arthritis: review of key Phase 2 studies [J]. Int J Rheum Dis, 2016, 19 (12): 1216-1225.
- [3] Ortiz-Ibáñez K, Alsina MM, Muñoz-Santos C. Tofacitinib and other kinase inhibitors in the treatment of psoriasis [J]. Acta Dermosifiliogr, 2013, 104 (4): 304-310.
- [4] Sandborn WJ, Ghosh S, Panes J, et al. Tofacitinib, an oral Janus kinase inhibitor, in active ulcerative colitis [J]. N Engl J Med, 2012, 367 (7): 616-624.
- [5] Vincenti F, Tedesco SH, Busque S, et al. Randomized phase 2b trial of tofacitinib (CP-690, 550) in de novo kidney transplant patients: efficacy, renal function and safety at 1 year [J]. Am J Transplant, 2012, 12 (9): 2446-2456.
- [6] Zhou Y, Leng X, Luo S, et al. Tolerogenic Dendritic Cells Generated with Tofacitinib Ameliorate Experimental Autoimmune Encephalomyelitis through Modulation of Th17/Treg Balance [J]. J Immunol Res, 2016, 2016: 5021537.
- [7] Schaerli P, Willmann K, Lang AB, et al. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function [J]. J Exp Med, 2000, 192 (11): 1553-1562.
- [8] Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, et al., Follicular B helper

- T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production [J]. *J Exp Med*, 2000, 192(11): 1545-1552.
- [9] Cannons JL, Qi H, Lu KT, et al. Optimal germinal center responses require a multistage T cell: Bcell adhesion process involving integrands, SLAM-associated protein, and CD84 [J]. *Immunity*, 2010, 32(2): 253-265.
- [10] Nurieva RI, Chung Y. Understanding the development and function of T follicular helper cells [J]. *Cell Mol Immunol*, 2010, 7(3): 190-197.
- [11] Szanya V, Ermann J, Taylor C, et al. The subpopulation of CD4⁺ CD25⁺ splenocytes that delays adoptive transfer of diabetes expresses L-selectin and high levels of CCR7 [J]. *J Immunol*, 2002, 169(5): 2461-2465.
- [12] Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di MD, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression [J]. *Blood*, 2007, 110(4): 1225-1232.
- [13] Dhaeze T, Peelen E, Hombrouck A, et al. Circulating Follicular Regulatory T Cells Are Defective in Multiple Sclerosis [J]. *J Immunol*, 2015, 195(3): 832-840.
- [14] Vermijlen D, Ellis P, Langford C, et al. Distinct cytokine-driven responses of activated blood gammadelta T cells: insights into unconventional T cell pleiotropy [J]. *J Immunol*, 2007, 178(7): 4304-4314.
- [15] Sellebjerg F, Börnsen L, Khademi M, et al. Increased cerebrospinal fluid concentrations of the chemokine CXCL13 in active MS [J]. *Neurology*, 2009, 73(23): 2003-2010.
- [16] McCarron MJ, Marie JC. TGF- β prevents T follicular helper cell accumulation and B cell autoreactivity [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(10): 4375-4386.
- [17] Feger U, Luther C, Poeschel S, et al. Increased frequency of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in the cerebrospinal fluid but not in the blood of multiple sclerosis patients [J]. *Clin Exp Immunol*, 2007, 147(3): 412-418.
- [18] Benveniste EN, Liu Y, McFarland BC, et al. Involvement of the Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription Signaling Pathway in Multiple Sclerosis and the Animal Model of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2014, 34(8): 577-588.