

特发性血小板减少性紫癜患者外周血调节性 T 细胞表达的研究

熊 荣¹, 宋建新² (1. 云南省文山市人民医院检验科 663000; 2. 云南省第一人民医院检验科, 昆明 650032)

【摘要】 目的 通过分析特发性血小板减少性紫癜(ITP)患者治疗前后外周血 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的变化,探讨它们在 ITP 发生过程中的作用。**方法** 流式细胞仪检测 40 例 ITP 患者治疗前后和 30 例健康对照者的外周血 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的比例并分析比较。**结果** 40 例 ITP 患者治疗前 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的表达明显低于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),治疗后除无效组外,其表达明显高于治疗前($P < 0.05$),但仍低于对照组($P < 0.05$),初诊组与无效组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);显效组、良效组和进步组均明显高于无效组($P < 0.05$),但良效组和进步组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** ITP 患者外周血 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞比例降低,但治疗后随着病情的好转逐渐升高,提示 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞可能在 ITP 的发病中起着重要作用。

【关键词】 特发性血小板减少性紫癜; 外周血; CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.13.018 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)13-1573-02

Study on alterations of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell in peripheral blood of patients with idiopathic thrombocytopenic purpura XIONG Rong¹, SONG Jian-xin² (1. Department of Clinical Medicine, People's Hospital of Wenshan City, Yunnan 663000, China; 2. Department of Clinical Medicine, The First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032, China)

【Abstract】 Objective To compare the changes of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura(ITP) before and after treatment, and to analyze the effect of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell in the pathogenesis of ITP. **Methods** Flow cytometry was used to test the CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell in peripheral blood of 40 ITP patients and 30 healthy people, and we investigated the change before and after treatment. **Results** The expression of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell in patients with ITP before treatment was significantly lower than that of control one($P < 0.05$), but it was higher than that of patients after treatment (except the ineffective group) ($P < 0.05$). The expression of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell in patients with ITP after treatment was still lower than those of controls($P < 0.05$). Compared to ineffective group, the levels of the CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell in effective group, moderate effect group and progress group were obviously higher($P < 0.05$). However, there was no difference between moderate effect group and progress group($P > 0.05$). **Conclusion** The expression of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell in patients with ITP decreases, but it will increase after the treatment. So CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell may play an important role in ITP pathogenesis.

【Key words】 idiopathic thrombocytopenic purpura; peripheral blood; CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell

特发性血小板减少性紫癜(ITP)是一种儿童及青年女性常见的获得性器官特异性自身免疫性疾病,以免疫介导的血小板减少为特征。临床表现为外周血中血小板减少,皮肤、黏膜或内脏出血^[1]。其发病机制尚未完全明了。近年研究发现,CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞是机体重要的 T 细胞亚群,在自身免疫性疾病的发生和发展及维持自身内环境稳定和自身耐受方面起到关键作用。本研究采用流式细胞仪对 ITP 患者治疗前后外周血 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞水平进行检测和分析,以探讨 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞在 ITP 发病中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 ITP 组 40 例,为 2009 年 11 月至 2010 年 4 月血液科或儿科住院患者,年龄 8~51 岁(中位数为 29.6 岁),其中男 12 例,女 28 例,诊疗符合《血液病诊断及疗效标准》^[2],无其他自身免疫性疾病。健康对照组为健康体检者,无自身免疫性疾病及免疫相关性疾病,共 30 例;其中男 11 例,女 19 例,

年龄 9~52 岁(中位数为 30.7 岁)。两组的年龄、性别差异无统计学意义。40 例 ITP 患者经治疗后,显效 22 例(55.0%)、良效 9 例(22.5%)、进步 4 例(10.0%)、无效 5 例(12.5%)。

1.2 主要试剂与仪器 FC500 型流式细胞仪,购自美国 Beckman Coulter 公司产品;荧光标准微 Flow-Check, FITC-CD25、PE-CD69、PE-Cy5-CD4 及同型对照 PE-CY5-IgG1、FITC-IgG2a、PE-IgG1 均购自 Immunotech 公司;鞘液购自 Beckman Coulter 公司。

1.3 样本制备 顺利抽取 ITP 患者治疗前、治疗后 2 周及健康人静脉血 3.0 mL 于乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝管中。于测定管和同型对照管中各加入抗凝血 100 μ L,分别加入不同荧光标记的单克隆抗体各 20 μ L 混匀,室温避光孵育 30 min。经 Q-Prep 处理后,用 4.0 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞一次,弃上清液,加入 0.5 mL PBS 重悬细胞待测。

1.4 流式细胞术(FCM)检测 用荧光标准微球 Flow-Check

校准流式细胞仪的光路和流路,用藻红蛋白-青蓝色素荧光纱(PE-Cy5)标记抗人免疫球蛋白 G(PE-Cy5-IgG1)、异硫氰酸荧光素标记抗人 IgG2a(FITC-IgG2a)、藻红蛋白(PE)标记抗人 IgG1(PE-IgG1)分别设定 CD69、CD25、CD4 的域值,先以前向散射角(FSC)及侧向散射角(SSC)确定淋巴细胞群,再以 CD4⁺T 细胞设门检测测定管和同型对照管中 CD4⁺CD25⁺细胞及 CD4⁺CD69⁺细胞的表达,每份样本均检测并分析 10 000 个淋巴细胞,结果以百分率表示。用 CD4⁺CD69⁺细胞表达的百分率减去 CD4⁺CD25⁺细胞表达的百分率,排除已活化 CD4⁺CD25⁺T 细胞。

1.5 统计学方法 使用 SPSS12.0 统计软件包进行统计学分析,CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞百分率以 $\bar{x} \pm s$ 表示;组间比较采用 *t* 检验,对指标进行相关性分析。

2 结 果

各组间 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞百分率见表 1。

表 1 各组间 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞表达比较($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	<i>n</i>	CD4 ⁺ CD25 ⁺ 调节性 T 细胞
健康对照组	30	8.26±2.41
初诊组	40	1.72±0.44
显效组	22	5.92±0.98
良效组	9	3.67±0.39
进步组	4	3.40±0.34
无效组	5	1.67±0.38

表 1 显示,40 例 ITP 患者治疗前 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的表达明显低于对照组($P<0.05$),治疗后除无效组外,其表达明显高于治疗前($P<0.05$),但仍低于对照组($P<0.05$),初诊组与无效组比较差异无统计学意义($P>0.05$);CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞在治疗显效组、良效组和进步组均明显高于无效组($P<0.05$),但良效组和进步组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨 论

在机体自身免疫性疾病中,细胞免疫起重要作用,尤其是以 T 细胞亚群占主导地位。现已清楚 B 细胞产生自身抗体需要自身反应性 T 细胞参与,这些自身反应性 T 细胞的免疫表型几乎都是 CD4⁺。多数研究表明,ITP 患者 T 细胞亚群中 Th1 细胞功能占优势^[3-4]。正常情况下 Th1/Th2 类细胞呈动态平衡,以维护机体处于相对稳定的状态。CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞是机体重要的 T 细胞亚群,具有抑制功能性 T 细胞亚群的作用^[5],其免疫抑制表现为 T 细胞抗原受体(TCR)信号刺激后能够抑制 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞的增殖活化,还可产生白细胞介素-10(IL-10)、转化生长因子-β(TGF-β),通过非抗原依赖机制抑制 Th1 细胞增殖,能下调 Th1 和 Th2 细胞比例,抑制 B 细胞增殖活化和抗体的产生,在维持机体自身免疫耐受中发挥重要作用。有研究表明,其细胞数目的减少或功能失调均可引起自身免疫性疾病^[6]。

本研究结果显示:与健康对照组比较,ITP 患者治疗前 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的表达明显低于对照组($P<0.05$),使机体内免疫耐受平衡破坏,调节性 T 细胞数量减少,

不能正常抑制自身反应性 T、B 细胞的活化和增殖。一方面使 B 细胞活化和增殖,产生 IgG 等类抗体;另一方面则导致 Th 极化漂移,产生免疫紊乱,从而使 Th2 细胞向 Th1 细胞漂移、Th1 通过分泌白细胞介素-2(IL-2)、干扰素-γ(IFN-γ)和表达 CD40L 辅助 B 细胞产生 IgG、IgA 和 IgM 等抗体,使其被单核巨噬细胞系统含 Fc 受体(FcγR)的巨噬细胞对自身血小板的破坏,而导致血小板减少。治疗后除无效组外,其表达明显高于治疗前($P<0.05$),但仍低于对照组($P<0.05$);初诊组与无效组比较差异无统计学意义($P>0.05$);显效组、良效组和进步组均明显高于无效组($P<0.05$),这一结果与刘家华等^[7]的报道相似。但良效组和进步组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。这可能与病例选择和实验方法的不同有关。经过免疫抑制等治疗后 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的比例逐步回升,说明 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞开始抑制自身反应性 T、B 细胞的活化和增殖,使 Th1 细胞向 Th2 漂移,而倾向于 Th2 优势模式。Ogawara 等^[8]研究发现 ITP 患者 Th2 类细胞因子下降, Th1/Th2 比率明显高于对照组,治疗后 Th2 因子逐渐升高,并证明 ITP 患者 Th1/Th2 类细胞的高比率与该病的发病机制和疾病的活动状态密切相关。而初诊组与无效组比较差异无统计学意义,也说明 ITP 的发病机制具有复杂性,有待于进一步研究。

参考文献

[1] 李科成,付琴,于明华. 44 例特发性血小板减少性紫癜形态学特征分析[J]. 检验医学与临床,2010,7(7):635-636.

[2] 张之南. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京:科学出版社,2007:172-173.

[3] Nelson BP, Naelsnik MA, Babler DW, et al. Epstein-Barr virus-negative post-transplant lymphoproliferative diseases: a distinct entity[J]. Am J Surg Pathol, 2000, 24(3): 375-385.

[4] Kuehnle I, Huls MH, Liu Z, et al. CD20 monoclonal antibody(rituximab) for therapy of Epstein-Barr virus lymphoma after hemopoietic stem-cell transplantation [J]. Blood, 2000, 95(4): 1502-1505.

[5] Peters JH, Preijers FW, Weestenenk R, et al. Clinical sntde Treg; GMP isolation, improvement of purity by CD127 depletion, Treg expansion, and Treg cryopreservation[J]. PLo S One, 2008, 3(9): e3161.

[6] Balandina A, Lecart S, Darteville P, et al. Functional defect of regulatory CD4⁺CD25⁺T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis [J]. Blood, 2005, 105(2): 735-741.

[7] 刘家华,徐军发,钟明,等. CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞在免疫性血小板减少性紫癜中的调节作用[J]. 临床内科杂志, 2006, 23(6): 382-384.

[8] Ogawara H, Handa H, Morita K, et al. Hight Th1/Th2 ratio in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura[J]. Eur J Haematol, 2003, 71(4): 283-288.