

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.22.005

外周血 Tfh/Tfr、Breg 比例在 CITP 患者中的临床意义*

陆田田¹, 余吉佳¹, 周雪敏², 黄春秀¹, 雷振兴³, 王明明³, 伍昌林^{3△}

1. 广东省深圳市第二人民医院检验科, 广东深圳 518035; 2. 广东省深圳市福田区慢病院新华社康中心, 广东深圳 518048; 3. 广东省深圳市第二人民医院输血科, 广东深圳 518035

摘要:目的 分析慢性免疫性血小板减少症(CITP)患者外周血滤泡辅助性 T 细胞(Tfh)/滤泡调节性 T 细胞(Tfr)、负性调节性 B 细胞(Breg)比例及相关细胞因子白细胞介素(IL)-21、IL-10 的变化,探讨 Tfh/Tfr、Breg 比例在 CITP 免疫紊乱中的作用及意义。**方法** 选择 30 例 CITP 患者和 30 例健康体检者,淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞(PBMC),采用流式细胞术检测外周血 Tfh、Tfr、Breg 比例;采用 ELISA 检测上清液 IL-21 与 IL-10 表达水平;采用流式细胞术检测患者血小板相关抗体(PAIGG)阳性率。**结果** 与健康对照者比较,CITP 患者外周血 Tfh 比例升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);Tfr、Breg 比例降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);CITP 患者外周 Tfh/Tfr 升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Tfh/Tfr 与 PAIGG 阳性率呈正相关($r = 0.622, P < 0.05$),Breg 比例与 PAIGG 阳性率呈负相关($r = -0.535, P < 0.05$)。CITP 患者外周血 IL-21/IL-10 升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),IL-21/IL-10 与血小板计数呈负相关($r = -0.643, P < 0.05$),与 PAIGG 阳性率呈正相关($r = 0.548, P < 0.05$)。**结论** CITP 患者外周血 Tfh/Tfr、Breg 比例及 IL-21/IL-10 异常,以上指标参与免疫紊乱机制,可为 CITP 的临床诊断与治疗提供新思路。

关键词:慢性免疫性血小板减少症; 滤泡辅助性 T 细胞; 滤泡调节性 T 细胞; 负性调节性 B 细胞; 白细胞介素-21; 白细胞介素-10

中图分类号:R558+.2

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)22-3248-04

Clinical significance of peripheral blood Tfh/Tfr and Breg proportions in patients with chronic immune thrombocytopenia*

LU Tiantian¹, SHE Jijia¹, ZHOU Xuemin², HUANG Chunxiu¹,
LEI Zhenxing³, WANG Mingming³, WU Changlin^{3△}

1. Department of Clinical Laboratory, Shenzhen Municipal Second People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518035, China; 2. Xinhua Community Health Service Center of Shenzhen Futian District Chronic Disease Hospital, Shenzhen, Guangdong 518048, China;
3. Department of Blood Transfusion, Shenzhen Municipal Second People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518035, China

Abstract: Objective To study the changes of follicular helper T cells (Tfh)/follicular regulatory T cells (Tfr), Breg cells proportions and related cytokines (IL-21, IL-10) in the peripheral blood of patients with chronic immune thrombocytopenia (CITP), and to explore the role and significance of Tfh/Tfr, Breg proportions in CITP immunologic derangement. **Methods** Thirty cases of CITP and 30 people undergoing physical examination were selected. Peripheral blood mononuclear cells were isolated from the lymphocytes separation medium. The changes of peripheral blood Tfh, Tfr, Breg proportions were detected by fluid cytometry (FCM) and the expression levels of IL-21 and IL-10 in supernatant were detected by ELISA. The positive rate of platelet related antibody PAIGG was detected by FCM. **Results** Compared with the healthy controls, the peripheral blood Tfh proportion was increased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$), while the proportions of Tfr and Breg were decreased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Tfh/Tfr in the CITP patients was increased with statistical difference ($P < 0.05$). Tfh/Tfr was positively correlated with the PAIGG positive rate ($r = 0.622, P < 0.05$), and Breg proportion was negatively correlated with the PAIGG positive rate ($r = -0.535, P < 0.05$); peripheral blood IL-21/IL-10 levels in the CTIP patients were increase, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$); IL-21/IL-10 was negatively correlated with platelet ($r = -0.643, P < 0.05$), and positively correlated with the PAIGG positive rate ($r =$

* 基金项目:广东省深圳市科技创新基础研究项目(JCYJ20160425103323074, JCYJ20180228162956597)。

作者简介:陆田田,女,主管技师,主要从事临床免疫学研究。△ 通信作者, E-mail: wuchlin@126.com。

0.548, $P < 0.05$). **Conclusion** The abnormalities of peripheral blood Tfh/Tfr, Breg proportions and IL-21/IL-10 in the patients with CITP are involved in its immunologic derangement mechanism, which provides a new idea for clinical diagnosis and treatment of CITP.

Key words: chronic immune thrombocytopenia; follicular helper T cells; follicular regulatory T cells; Breg cells; IL-21; IL-10

慢性免疫性血小板减少症(CITP)是一种发病机制尚未完全明确的自身免疫病。目前国内外研究发现,CITP 的发生、发展与患者体内免疫调节紊乱有关^[1]。近年研究发现,负性调节性 B 细胞(Breg)是一种新型负性调节性细胞,可能与抑制抗体的产生有关。而滤泡辅助性 T 细胞(Tfh)是一种辅助抗体产生的效应性 T 细胞,滤泡调节性 T 细胞(Tfr)是一种负性调节性 T 细胞,Tfh/Tfr 平衡可能调控 B 细胞应答,调节血小板抗体的产生,但 Breg、Tfh、Tfr 在 CITP 发病机制中的作用尚不明确。因此,本研究将通过分离 CITP 患者及健康对照者外周血单个核细胞(PBMC),研究 Breg、Tfh、Tfr 及相关细胞因子的变化,探讨患者外周血 Breg 比例、Tfh/Tfr 及相关细胞因子与血小板计数及血小板抗体之间的关系,分析它们在 CITP 免疫紊乱中的作用机制,为 CITP 的临床诊断与治疗提供新思路与新靶点。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2016 年 10 月至 2018 年 6 月在深圳市第二人民医院住院病房、门急诊收治的 CITP 患者 30 例(男 12 例、女 18 例,年龄 18~67 岁、中位年龄 37 岁),按免疫性血小板减少症的分型标准[急性(< 3 月)、持续性(3~12 月)和慢性(> 12 月)],本研究的病例均符合 CITP 的诊断标准^[2],排除其他自身免疫性疾病患者。健康对照组:于该院选择年龄、性别匹配的健康体检者 30 例(男 16 例、女 14 例,年龄 17~64 岁、中位年龄 38 岁)。

1.2 仪器与试剂 抗人 PercP-CD4 mAb, 抗人 FITC-CXCR5 mAb, 抗人 FITC-ICOS mAb, 抗人 FITC-FoxP3 mAb, 抗人 FITC-CD5 mAb, 兔抗人 PE-CD1d mAb, 兔抗人 PerCP-CD19 mAb; 同型对照 IgG1-FITC, IgG1-PercP, IgG1-PE(美国 BD 公司);流式细胞仪 EPICS-XL 型(美国 Beckman 公司),全自动酶标仪 Elx80 型(美国 Bio-Tek 公司)。

1.3 方法

1.3.1 CITP 患者与健康对照者标本处理 采集 CITP 患者和健康对照者外周血各 5 mL,分离 PBMC,用 RPMI1640 培养液(含 10% 胎牛血清)调整 PBMC 水平为 $1 \times 10^9/L$ 。取 1 mL 细胞悬液,用荧光抗体染色,流式细胞术测定细胞亚群比例;另取 1 mL 细胞悬液加入 $1 \mu\text{mol/L}$ 的离子霉素与 $50 \mu\text{g/L}$ 的佛波酯 PMA,温箱(37°C)培养 24 h,收集上清液,在 -70°C 冰箱内保存。

1.3.2 流式细胞术检测 CITP 患者及健康对照者外

周血 Tfh、Tfr、Breg 比例 取上述分离的 PBMC, PBS 洗 3 次,各取 10^6 个 PBMC 做如下试验:(1)外周血 Tfh 比例的检测。取 2 支试管,分别为试验管和同型对照管,其中 1 支分别加入抗人 PercP-CD4 mAb、抗人 FITC-ICOS mAb 与抗人 FITC-CXCR5 mAb 各 $5 \mu\text{L}$,混匀,设立同型对照,避光 30 min,洗涤 2 次,重悬细胞后检测。(2)外周血 Tfr 比例的检测。取 2 支试管,加入抗人 FITC-FoxP3 mAb、抗人 PercP-CD4 mAb 和抗人 FITC-CXCR5 mAb 各 $5 \mu\text{L}$,设立同型对照,避光 30 min,洗涤 2 次,重悬细胞后检测。(3)外周血 Breg 比例的检测。取 2 支试管,加入 PE-CD1d mAb、FITC-CD5 mAb、PerCP-CD19 mAb 各 $5 \mu\text{L}$,充分混匀后设立同型对照,室温避光孵育 1 h,用 PBS 洗 2 遍,重悬细胞后检测。

1.3.3 ELISA 检测外周血 Tfh、Tfr、Breg 相关细胞因子白细胞介素(IL)-21、IL-10 水平 选取前期冻存的 PBMC 培养液上清液,ELISA 检测外周血 IL-21、IL-10 水平。按试剂盒说明书操作,标本和标准品均设 3 个复孔,酶标仪测定 450 nm 波长处的吸光度,取平均值后,再根据标准曲线确定各个标本 IL-21、IL-10 水平。

1.3.4 CITP 患者与健康对照者外周血血小板相关抗体(PAIgG)检测 采用流式细胞术检测 PAIgG:取上述抗凝血 1 mL, $1\ 000 \text{ r/min}$ 离心 10 min,制备富血小板血浆,取 $100 \mu\text{L}$ 加入试管中,再加入 PBS $500 \mu\text{L}$ 混匀, $2\ 000 \text{ r/min}$ 离心 3 min,去除上清液,加入等体积 PBS,洗涤 3 次, PBS 重悬。取 2 支试管,加入 $50 \mu\text{L}$ 悬浮血小板,分别加入 $10 \mu\text{L}$ FITC-抗 IgG(阴性对照)、FITC-抗人 IgG mAb,混匀,室温下避光孵育 15 min。PBS 洗涤,加 $500 \mu\text{L}$ PBS 悬浮,上机测定,收集 5 000 个血小板进行检测。结果以血小板表面表达 PAIgG 的阳性率表示。

1.4 统计学处理 运用 SPSS18.0 软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用两样本均数 t 检验;两变量相关性分析采用 Spearman 相关。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CITP 患者外周血 Tfh、Tfr、Breg 比例分析 流式细胞仪检测结果显示,与健康对照者比较,CITP 患者外周血 Tfh 比例升高,差异有统计学意义($t = 5.32, P < 0.05$); Tfr、Breg 比例降低,差异有统计学意义($t = 5.52, 4.79, P < 0.05$)。见图 1。

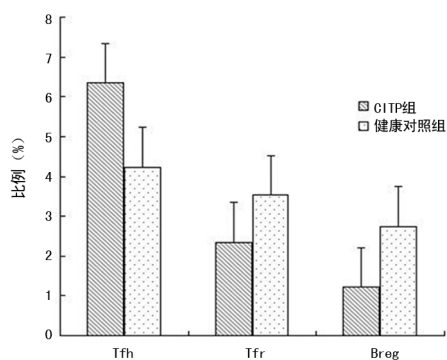


图 1 两组外周血 Tfh、Tfr、Breg 比例比较

2.2 C1TP 患者外周血 Tfh/Tfr、Breg 比例变化与 PAIgG 的相关性 与健康对照组比较, C1TP 组患者外周血 Tfh/Tfr、PAIgG 阳性率升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。同时 C1TP 组患者外周血 Tfh/Tfr 与 PAIgG 阳性率呈正相关($r = 0.622, P < 0.05$); Breg 比例与 PAIgG 的阳性率呈负相关($r = -0.535, P < 0.05$)。见表 1。

表 1 两组外周血 Tfh/Tfr、Breg 比例与 PAIgG 阳性率比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Breg 比例 (%)	Tfh/Tfr	PAIgG 阳性率 (%)
C1TP 组	30	1.21 ± 0.45	3.3 ± 0.2	38.4 ± 12.2
健康对照组	30	2.72 ± 0.64	2.1 ± 0.3	7.8 ± 4.5
t		10.97	6.35	8.62
P		<0.05	<0.05	<0.05

2.3 C1TP 患者外周血 Tfh、Tfr、Breg 相关细胞因子 IL-21、IL-10 的检测结果 测定结果显示, 与健康对照组比较, C1TP 患者外周血 Tfh 相关细胞因子 IL-21 表达水平升高($t = 4.37, P < 0.05$), 而 Tfr 与 Breg 的细胞抑制因子 IL-10 表达水平降低, 差异有统计学意义($t = 3.12, P < 0.05$), IL-21/IL-10 升高, 差异有统计学意义($t = 4.02, P < 0.05$)。

2.4 C1TP 患者外周血 IL-21/IL-10 与血小板计数及 PAIgG 阳性率的相关性分析 C1TP 患者外周血上清液中 IL-21/IL-10 与血小板计数呈负相关($r = -0.643, P < 0.05$), 与 PAIgG 阳性率呈正相关($r = 0.548, P < 0.05$)。

3 讨论

C1TP 发病机制可能与致病性 T 细胞与调节性 T 细胞(Treg)平衡失调相关, CD4⁺ T 细胞能够辅助 B 细胞产生抗体的结论已被证实, 但辅助性 T 细胞(Th 细胞)的作用机制仍不明确。近年研究表明, Tfh 是主要辅助 B 细胞产生抗体的 T 细胞亚群, Tfh 表达的 CD40L 和 ICOS 分别与 B 细胞 CD40 和 ICOSL 结合, Tfh 分泌的 IL-21 在刺激 B 细胞的增殖、分化方面起重要作用。CXCR5 是 Tfh 迁移、定位与转运的重要标志。因此, Tfh 是一种新型 CD4⁺ 效应性 T 细胞。

Tfr 是一种兼有 Tfh 与 Treg 双重性质的负性调节细胞^[3], 但 Tfh/Tfr 平衡在 C1TP 发病机制中的具体作用尚不完全明确。

Breg 是一种具有负性调节功能的新型调节性 B 细胞, 该细胞的负性调节功能可能与 IL-10 有关^[4-5]。动物实验发现, 小鼠体内如果存在缺乏 STIM 蛋白的 B 细胞, 则抗炎细胞因子 IL-10 就不能产生, 导致小鼠多发性硬化症等自身免疫病症状加重。推测自身免疫病的产生可能与 Breg 有重要关系。有研究人员发现在 Breg 缺陷小鼠体内, 小鼠炎症增强, Th1 与 Th17 细胞增多, Treg 数量降低, 表明 Breg 可能是维持 Th17/Treg、Th1/Th2 平衡的重要细胞^[6-7]。Breg 可通过抑制自身反应性 Th 细胞而抑制自身免疫, 也可通过抑制 Tc 细胞活性来减弱对自身成分的细胞毒作用^[8]。但 Breg 在 C1TP 发病机制中的作用尚不完全明确, 通过本研究可为 C1TP 免疫紊乱网络的构建提供理论基础。

笔者对 C1TP 患者外周血 Tfh/Tfr、Breg 平衡机制进行了研究, 发现 Tfh 在 C1TP 患者外周血中比例升高, Tfr、Breg 比例降低, Tfh/Tfr 升高, Tfh/Tfr 与患者 PAIgG 阳性率呈正相关, IL-21/IL-10 与血小板计数呈负相关。由此结果提示: Tfh/Tfr 及 Breg 可能共同参与 C1TP 患者的免疫紊乱机制。通过 ELISA 检测 C1TP 患者 PBMC 培养液中 Tfh/Tfr、Breg 的相关细胞因子发现, 培养液上清液中发挥免疫抑制作用的效应因子 IL-10 水平下降, 提示 C1TP 患者外周血中 Tfr、Breg 的免疫抑制功能可能降低, Tfh 效应分子 IL-21 水平升高, 证实 IL-21 是促炎因子, 而 IL-10 是发挥免疫抑制功能的效应分子之一。IL-21/IL-10 与 PAIgG 阳性率变化呈正相关, 与血小板计数呈负相关, 这与当前研究结果相近^[9]。

近年国内外研究表明 CD4⁺ 效应性 Th 细胞功能和比例失衡在 C1TP 发病机制中发挥重要的作用。笔者前期结果表明, C1TP 患者外周血活化的 T 淋巴细胞通过诱导血小板凋亡发挥细胞毒作用, 导致血小板破坏增多^[10]。由此推测, C1TP 患者血小板减少机制是通过 B 细胞产生的抗血小板抗体与巨核细胞结合, 引起巨核细胞成熟障碍^[11-12]。Tfh 是血小板自身抗体产生的效应细胞, 而 Tfr、Breg 具有负性抑制功能, Tfh/Tfr、Breg 比例及 IL-21/IL-10 免疫失衡共同参与 C1TP 免疫紊乱机制。

综上所述, Tfh、Tfr、Breg 与其相关细胞因子 IL-10、IL-21 在 C1TP 发病过程中发挥重要作用, 可将 Tfh/Tfr、Breg 比例及 IL-21/IL-10 作为 C1TP 临床检测和诊断的新指标, 通过调节 Tfh/Tfr、Breg 比例对治疗 C1TP 有重要临床意义。目前, Tfh/Tfr、Breg 信号调控机制尚不完全明确, 特异性转录因子也在研究中。因此, Tfh/Tfr、Breg 比例在其他自身免疫性疾病中的作用值得深入探讨。

(下转第 3255 页)

(9):1067-1072.

[7] 张嫫,董爱英,汪亚斯,等. 2013—2017 年临床耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌感染检测结果分析[J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(5):553-557.

[8] 刘婧娴,俞静,刘瑛. 产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌的耐药基因及流行病学研究进展[J]. 中国感染与化疗杂志, 2015, 15(1):91-96.

[9] 郑少微,李萍,张正良,等. 2005—2017 年中国 CHINET 常见革兰阴性菌对碳青霉烯类抗生素耐药的监测结果[J]. 临床急诊杂志, 2019, 20(1):40-44.

[10] 陈美恋,王守军,匡季秋,等. 重症监护病区 CRE 主动筛查及其效果评价[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(18):4123-4126.

[11] 张昭勇,杨宏伟,喻飞,等. 碳青霉烯耐药肠杆菌科细菌医院感染危险因素病例对照研究[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(13):1573-1577.

[12] MAGIORAKOS A P, BURNS K, BORG M, et al. Infection prevention and control measures and tools for the prevention of entry of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae into healthcare settings: guidance from the European Centre for Disease Prevention and Control[J]. Antimicrob Resist Infect Control, 2017, 6(1):113-130.

[13] 汪艳,陈乐,周易. 重症监护病房与普通住院科室医院感染中阴沟肠杆菌的耐药性对比[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(2):272-275.

[14] IAIN A, CERQUEIRA G M, SARUAR B, et al. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: laboratory

challenges, mechanistic insights and therapeutic strategies [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2013, 11(4):395-409.

[15] 徐小红,巫之韵,蔡美莉,等. 产酸克雷伯菌耐碳青霉烯类抗生素耐药机制的研究[J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(1):19-21.

[16] 史庆丰,胡必杰,沈燕,等. 不同城市临床医师对碳青霉烯耐药肠杆菌认知和实践的调查[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(20):3141-3144.

[17] TUMBARELLO M, VIALE P, VISCOLI C, et al. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy[J]. Clin Infect Dis, 2012, 55(7):943-950.

[18] AISSA N, MAYER N, BERT F, et al. A new mechanism to render clinical isolates of *Escherichia coli* non-susceptible to imipenem: substitutions in the PBP2 penicillin-binding domain [J]. J Antimicrob Chemother, 2017, 71(1):76-78.

[19] 胡付品,朱德妹. 医疗机构碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌感染防控指南简介[J]. 中国感染与化疗杂志, 2018, 18(3):331-335.

[20] 曾秀玉,张华平,陈夏容,等. 多药耐药菌主动筛查在 ICU 医院感染预防控制中的价值[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(10):2373-2375.

(收稿日期:2019-03-22 修回日期:2019-05-23)

(上接第 3250 页)

参考文献

[1] AUDIA S, MAHEVAS M, SAMSON M, et al. Pathogenesis of immune thrombocytopenia[J]. Autoimmun Rev, 2017, 16(6):620-632.

[2] 张之南. 血液病诊断及疗效标准[M]. 2 版. 北京:北京科学出版社, 1998.

[3] SUN C, YANG J, WANG M, et al. Icaritin improves antibody-induced thrombocytopenia in a mouse model by regulating T-cell polarization[J]. Planta Med, 2018, 84(3):168-175.

[4] AUDIA S, ROSSATO M, TRAD M, et al. B cell depleting therapy regulates splenic and circulating T follicular helper cells in immune thrombocytopenia[J]. J Autoimmun, 2017, 77(1):89-95.

[5] YAO X, LI C, YANG J, et al. Differences in frequency and regulation of T follicular helper cells between newly diagnosed and chronic pediatric immune thrombocytopenia [J]. Blood Cells Mol Dis, 2016, 61(1):26-36.

[6] WEI Y, HOU M. T cells in the pathogenesis of immune thrombocytopenia[J]. Semin Hematol, 2016, 53(Suppl 1):S13- S15.

[7] XIE J, CUI D, LIU Y, et al. Changes in follicular helper T

cells in idiopathic thrombocytopenic purpura patients[J]. Int J Biol Sci, 2015, 11(2):220-229.

[8] 崔亚杰,管玉洁,刘炜,等. 儿童原发免疫性血小板减少症患者外周血滤泡调节性和辅助性 T 细胞的变化[J]. 中华血液学杂志, 2014, 35(11):980-984.

[9] HUA F, JI L, ZHAN Y, et al. Aberrant frequency of IL-10-producing B cells and its association with Treg/Th17 in adult primary immune thrombocytopenia patients[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014:571302.

[10] AUDIA S, ROSSATO M, SANTEGOETS K, et al. Splenic TFH expansion participates in B-cell differentiation and anti-platelet-antibody production during immune thrombocytopenia[J]. Blood, 2014, 124(18):2858-2866.

[11] GUDBRANDSDOTTIR S, BRIMNES M, KOLLGAARD T, et al. Effects of rituximab and dexamethasone on regulatory and proinflammatory B-cell subsets in patients with primary immune thrombocytopenia [J]. Eur J Haematol, 2018, 100(1):45-52.

[12] PERERA M, GARRIDO T. Advances in the pathophysiology of primary immune thrombocytopenia[J]. Hematology, 2017, 22(1):41-53.

(收稿日期:2019-03-10 修回日期:2019-05-11)