

CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺调节性 T 细胞在成人免疫性血小板减少症中的意义

袁红建,孙善芳,潘怀富

(泰州市第二人民医院血液科,江苏 姜堰 225500)

[摘要] 目的:探讨 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺调节性 T 细胞(Treg)在成人免疫性血小板减少症(ITP)发病及发展中的意义。方法:采集 26 例成人 ITP 患者和 20 例正常对照组外周血标本,应用流式细胞术检测正常对照组及 ITP 患者治疗前后的 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg 细胞的比例,并将正常对照组与 ITP 组及 ITP 组治疗前后的 Treg 细胞进行比较。结果:ITP 组(治疗前)较对照组 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg 细胞下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);ITP 组经治疗后 18 例有效,8 例无效,有效组治疗后 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg 细胞明显上调($P < 0.05$);治疗无效组治疗后 Treg 细胞的比值较前无明显统计学意义($P > 0.05$)。结论:ITP 的发病可能与 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg 细胞的比例下调相关,治疗有效后 Treg 细胞的失调会得到改善,改善 Treg 细胞的功能并增加其数量可能是一个新的治疗方法。

[关键词] ITP; CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺调节性 T 细胞;流式细胞术

[中图分类号] R558.2

[文献标志码] B

[文章编号] 1007-4368(2014)12-1715-02

doi:10.7655/NYDXBNS20141226

免疫性血小板减少症(immune thrombocytopenia, ITP)是一种自身抗体介导的以血小板破坏增加和生成减少为特征的获得性自身免疫性疾病。近年来越来越多的研究表明免疫性血小板减少性紫癜除体液免疫异常外,还存在细胞免疫功能异常,但其具体发病机制尚未完全阐明。为探讨调节性 T 细胞(Treg)细胞在 ITP 发病机制中的地位,本文应用流式细胞术检测了 26 例成人 ITP 患者治疗前后的 Treg 细胞的变化,并与正常人进行了比较,旨在分析其临床意义。

1 对象和方法

1.1 对象

2013 年 3 月~2015 年 5 月在本院血液科门诊及住院的 ITP 患者 26 例(ITP 组),其中,男 15 例,女 11 例;年龄 18~76 岁,中位年龄 38 岁,发病时血小板(PLT)值:(1~49)×10⁹个/L。诊断标准和疗效判断参照血液病诊断及疗效标准^[1]。正常对照组为 20 例健康体检者,男 12 例,女 8 例;年龄 18~63 岁,中位年龄 35 岁。

细胞表面染色的荧光抗体(CD4-FITC、CD25-PC5)(BD 公司,美国);细胞内染色荧光抗体(Foxp3-APC,美天旎生物公司,德国);Perfix-nc 破膜试剂盒(PerFix-nc buffer1 fixative reagent,buffer2 permeabilizing reagent,buffer3 final 10 × solution PBS,贝克曼公司,美国);FACS Calibur 流式细胞仪(BD 公司,美国)。

1.2 方法

所有患者均在治疗前、治疗有效后进行样本收集,无效者在治疗开始后 4 周取样本,取外周血 2 ml 加入 EDTA 抗凝管。实验步骤:①取 50 μl 外周血样本于 12mm × 75 mm 流式管中,加 5 μl buffer1,漩涡混匀,室温避光孵育 15 min;②加入 300 μl buffer2 混匀后,加入抗体 CD4-FITC、CD25-PC5、Foxp3-APC 各 5 μl,混匀室温避光 15~30 min;同时做同型对照管,对照管加相应的 IgG1 抗体;③加入 3 ml 1 × buffer3 混匀离心,重悬于 500 μl buffer3;④流式细胞仪获取收集 10 000 个细胞,测试和分析。FSC-SSC 散点图圈定淋巴细胞群,CD4-FITC/SSC 圈定 CD4⁺淋巴细胞,再从 CD4⁺看 CD25/Foxp3 散点图,即可得到 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg 细胞比例。

1.3 统计学方法

采用 STATA7.0 软件进行统计学分析,结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验分析两样本数据的差异,多样本均数的比较采用方差分析,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

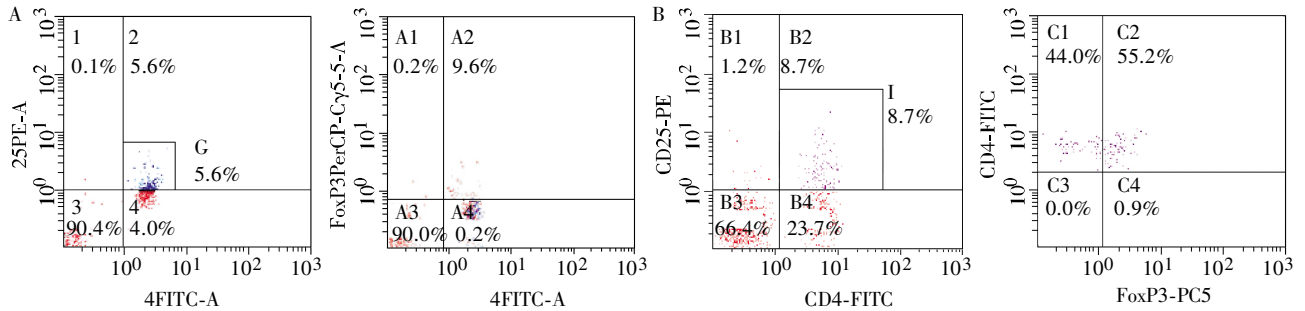
26 例患者经激素、美罗华、特比澳、免疫球蛋白、环孢素及硫唑嘌呤、长春新碱等不同的综合措施治疗后,18 例有效(包括 CR 和 R),8 例无效。

流式细胞仪检测结果,ITP 组治疗前与正常对照组比较具有更低的 Treg 细胞水平:(1.59 ± 0.76)% vs (4.55 ± 1.88)%,2 组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。

ITP 组在治疗后 Treg 细胞水平(3.20 ± 1.37)%明显上调,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 1)。

进一步分析,ITP 有效组与无效组在治疗前后 Treg 细胞的变化各异,有效组在治疗后 Treg 细胞水平

明显上升(1.63 ± 0.73)% vs (3.81 ± 1.1)%, $P < 0.05$,无效组治疗后 Treg 细胞水平较前无明显差异 (1.47 ± 0.86)% vs (1.81 ± 0.72)%, $P > 0.05$,两组治疗前的 Treg 水平无统计学差异($P > 0.05$)。



A: ITP 治疗前 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺的 Treg 细胞; B: 治疗后的 Treg 细胞。

图 1 流式细胞检测图

3 讨论

ITP 是一种由体液免疫和细胞免疫异常导致血小板破坏增多,生成减少,临床上以皮肤、黏膜出血为特征的血小板减少性疾病。其发病机制尚不完全明确。目前多认为其发病机制与免疫异常有关。CD4⁺CD25⁺ Treg 是一类特定亚群的 T 细胞,存在于正常人外周血和脾脏中,具有独特免疫调节作用,其胞质中高表达叉头翼状螺旋转录调节因子(fork-head box protein P3, Foxp3), 根据来源和作用机制不同,可分为天然 CD4⁺CD25⁺Treg (nTreg)和适应性 CD4⁺CD25⁺Treg (iTreg), 通常所说的 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺Treg 主要是指 nTreg^[2]。近来,有证据显示, Treg 细胞功能受损可能在 ITP 的发展中起着促进作用^[3-4]。它们在抑制反应性淋巴细胞以维持免疫耐受方面扮演着关键角色。一旦这些调节性的 T 细胞受损,抗血小板的 T 细胞激活,细胞因子产生失衡,这些都加速着血小板的破坏^[5]。本研究证实,ITP 患者的 Treg 细胞较对照组明显下降,提示 Treg 细胞可能在 ITP 的发病机制中起着关键的作用。Bao 等^[6]发现了 ITP 患者在使用血小板受体激动剂治疗后,CD4 (+) CD25 (hi) T (Treg) 细胞较治疗前明显增加;Li 等^[7]用小剂量利妥昔单抗联合激素及单用激素治疗 ITP 患者,发现两组患者治疗有效后 Treg 细胞均有明显上调,但小剂量利妥昔单抗联合激素组获得更高的水平及更久的持续时间;强萍等^[8]也发现 ITP 患者中的 Treg 细胞的水平在治疗有效后得到明显升高。本组 ITP 经治疗后 Treg 细胞水平在有效组表达明显上升,而无效组的变化无统计学差异。据此本文推测 Treg 细胞的变化可能在

ITP 的发病和发展中起着重要作用。因此,推测改善 Treg 细胞的功能并增加其数量对 ITP 可能是一个新的治疗方法;尽管确切的机制仍未完全阐明, Treg 细胞仍然可能是一个潜在的生物靶点。

[参考文献]

- [1] 张之南,沈 梯. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版.北京:北京科学出版社,2007:172-176
- [2] Nishimoto T, Kuwana M, et al. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T Cells in the pathophysiology of immune thrombocytopenia [J]. Seminars in Hematology, 2013, 50(1):S43-S49
- [3] Ji L, Zhan Y, Hua F, et al. The ratio of treg/th17 cells correlates with the disease activity of primary immune thrombocytopenia[J]. PLoS One, 2012, 55(7):509-513
- [4] Teke HU, Gunduz E, Akay OM, et al. Abnormality of regulatory T-cells in remission and non-remission idiopathic-thrombocytopenic purpura patients[J]. Platelets, 2013, 24(8):625-631
- [5] Semple JW, Provan D. The immunopathogenesis of immune thrombocytopenia; T cells still take center-stage[J]. Current Opinion in Hematology, 2012, 19(5):357-362
- [6] Bao W, Bussel JB, Heck S, et al. Improved regulatory T cell activity in patients with chronic immune thrombocytopenia treated with thrombopoietic agents [J]. Blood, 2010, 116(22):4639-4645
- [7] Li Z, Mou W, Lu G, et al. Low-dose rituximab combined with short-term glucocorticoids up-regulates Treg cell levels in patients with immune thrombocytopenia[J]. International Journal of Hematology, 2011, 93(1):91-98
- [8] 强 萍,朱薇波,吴竞生,等. CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞在特发性血小板减少性紫癜发病中的作用[J]. 临床输血与检验, 2012, 14(1):9-14

[收稿日期] 2014-03-17