

· 短篇论著 ·

特发性血小板减少性紫癜患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞和 TGF-β1 的检测及意义

段衍超 张志蓉 刘艳

【摘要】 目的 检测特发性血小板减少性紫癜(IITP)患者治疗前后外周血调节性 T 细胞(Treg)和转化生长因子-β1(TGF-β1)的变化,探讨 Treg 细胞和 TGF-β1 在 IITP 发病中的可能作用。方法 采集 25 例新诊断的 IITP 患者糖皮质激素治疗前、后和 20 例正常对照者的外周血标本,流式细胞术(FCM)检测 Treg 细胞比例,ELISA 方法检测血清 TGF-β1 浓度。结果 25 例 IITP 患者治疗前 Treg 细胞的比例为(1.67 ± 0.79)%,明显低于正常对照组(3.84 ± 1.49)%,治疗后为(2.52 ± 1.15)%(*P* 均 < 0.01),治疗后 Treg 细胞比例升高,但仍低于正常对照组(*P* < 0.01);IITP 治疗后完全反应组 Treg 细胞高于有效组和无效组(*P* 均 < 0.01);治疗前血清 TGF-β1 的浓度[(627.7 ± 72.8) ng/L]低于治疗后[(1141.5 ± 125.6) ng/L]和正常对照组[(931.6 ± 95.4) ng/L](*P* 均 < 0.05),治疗后明显上升,高于正常对照组(*P* < 0.05);IITP 患者 Treg 细胞与 TGF-β1 无相关性(*P* > 0.05)。结论 Treg 细胞和 TGF-β1 与 IITP 的发病及转归有关,糖皮质激素治疗可以增加 Treg 细胞数量和 TGF-β1 的浓度。

【关键词】 糖皮质激素类; T 淋巴细胞,调节性; 转化生长因子; 紫癜,血小板减少性

血小板减少性紫癜(IITP)患者血小板减少与自身抗体介导的血小板破坏增加有关。Treg 细胞可以通过直接或者间接抑制其他免疫细胞的增生和活化来维持自身耐受性。近年来研究发现免疫调节细胞 Treg 和细胞因子 TGF-β1 与多种自身免疫性疾病发生有关。我们应用流式细胞仪和 ELISA 检测 IITP 患者治疗前后 Treg 细胞和 TGF-β1 的变化,初步探讨两者与 IITP 发病及转归的关系,并观察糖皮质激素对两者的影响。

一、资料与方法

1. 一般资料:选取 2010 年 10 月至 2012 年 6 月在我院门诊就诊和住院患者 25 例,男 10 例,女 15 例,中位年龄 42(12~71)岁,均符合 IITP 诊断标准^[1],既往无心肝肾等重要脏器功能异常和其他自身免疫病。正常对照 20 例,均为我院健康体检者,男 10 例,女 10 例,中位年龄 45.5(8~75)岁。所有患者检查和治疗前签署知情同意书。治疗前和激素开始治疗后 1 个月采集外周血进行检测。

2. 治疗方案及疗效评价:给予泼尼松 1 mg·kg⁻¹·d⁻¹,当血小板接近正常时逐渐减量;初诊时血小板计数(BPC) < 10 × 10⁹/L 或有明显出血表现者给予人免疫球蛋白 0.4 mg·kg⁻¹·d⁻¹,共 3~5 d,并予以泼尼松维持治疗。所有患者在应用激素同时均应用质子泵抑制剂和钙剂预防消化性溃疡和骨质疏松。疗效判断参考成人特发性 IITP 诊断治疗中国专家共识^[2]。完全反应(CR):治疗后 BPC ≥ 100 × 10⁹/L 且没有出血表现;有效(R):治疗后 BPC > 30 × 10⁹/L,并且至少比基础血小板数增加 2 倍,且没有出血表现;无效(NR):治疗后 BPC < 30 × 10⁹/L 或者 BPC 增加不到基础值的 2 倍或者有出血表现。

3. 外周血 Treg 细胞百分率的 FCM 检测:淋巴细胞分离液购自美国 Invitrogen 公司,人调节性 T 细胞检测试剂盒(Human Regulatory T cell Staining Kit)购自美国 eBioscience 公司。抽取患

者和正常对照者外周血 2 ml,肝素抗凝,淋巴细胞分离液分离单个核细胞(PBMC),PBS 调整至 1 × 10⁹/L。取 PBMC 悬液 100 μl 于标本管中,加入 FITC-CD4 和 APC-CD25 混合单抗 20 μl,加入红细胞裂解液,避光放置 20 min。缓冲液洗涤 2 遍,加入 PE-Foxp3 单抗 5 μl,避光放置 20 min。PBS 洗涤 2 遍,上 FACSibur 流式细胞仪(BD 公司)。检测 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T 细胞/CD4⁺ T 细胞比值。

4. 外周血 TGF-β1 浓度:采集患者治疗前后和正常对照者空腹血 3 ml,按照 ELISA 检测试剂盒(北京方程生物科技有限公司)说明进行操作。

5. BPC:采集静脉空腹血,用血细胞分析仪自动分析计数。

6. 统计学分析:采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 *t* 检验进行两组间差异比较;两变量间相关性采用 Spearman's 检验。以 *P* < 0.05 为有统计学差异。

二、结果

1. 治疗效果:治疗开始 1 个月时,CR 11 例(44%),R 9 例(36%),NR 5 例(20%),总有效率 80%。所有患者均出现不同程度的食欲增加、体重增加。9 例(36%)患者出现高血压,给予降压药物均得到控制,未发生消化性溃疡和骨折等严重并发症。

2. 外周血 Treg 细胞比值:IITP 治疗前 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞/CD4⁺ T 细胞比值显著低于对照(*P* < 0.01)和治疗后(*P* < 0.01),治疗后比治疗前显著升高,仍低于对照组(*P* < 0.01)(表 1)。治疗后,CR 组 Treg(%)高于 R 组(*P* < 0.01)和 NR 组(*P* < 0.01),R 组亦高于 NR 组(*P* < 0.01)(表 2,图 1)。

表 1 IITP 治疗前后与对照组间 Treg 细胞与 TGF-β1 的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Treg (%)	TGF-β1 (ng/L)	
IITP 组	治疗前	25	1.67 ± 0.79	627.7 ± 72.8
	治疗后	25	2.52 ± 1.15 ^a	1141.5 ± 125.6 ^a
对照组	20	3.84 ± 1.49 ^{ab}	931.6 ± 95.4 ^{ab}	

注:与治疗前相比,^a*P* < 0.01;与 IITP 治疗后相比,^b*P* < 0.01

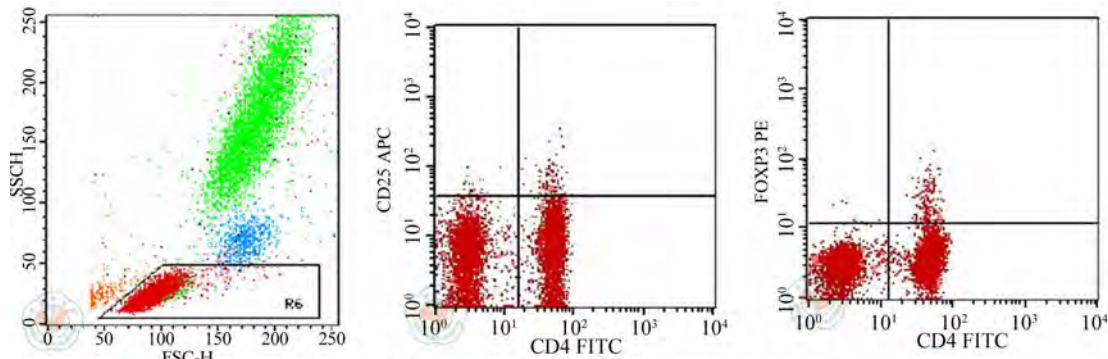


图1 外周血淋巴细胞及Treg细胞FCM检测

表2 ITP 治疗后不同疗效组间的 Treg 细胞的比较(% , $\bar{x} \pm s$)

ITP 疗效组别	例数	治疗前 ^a	治疗后 ^b
CR 组	11	1.69 ± 0.96	3.06 ± 1.38
R 组	9	1.67 ± 0.51	2.32 ± 0.86
NR 组	5	1.63 ± 0.69	1.70 ± 0.52

注:三组间两两比较,^a*P*均>0.05,^b*P*均<0.01

3. 外周血 TGF-β1 浓度:ITP 治疗前 TGF-β1 浓度低于正常对照组(*P*<0.05)和治疗后(*P*<0.05),治疗后高于治疗前和对照组(*P*<0.05)(表1)。

4. 外周血 Treg 比例与 TGF-β1 的相关性:未发现 ITP 患者 Treg 比例与 TGF-β1 浓度具有相关性(*r*=0.063,*P*>0.05)。

三、讨论

ITP 是一种免疫介导的血小板减少引起的出血性疾病,通过不同机制机体免疫耐受被打破,自身反应性 B 淋巴细胞被活化,产生针对血小板膜糖蛋白如 GP II b/III a、GP I b/IX 等抗原的血小板相关抗体。这些自身抗体在血小板膜上与其相应的抗原结合,形成抗原抗体复合物,在单核-巨噬细胞系统中被大量破坏,自身抗体产生过程需要 Th 细胞和 Treg 细胞的调节。其中 Th2 细胞为辅助 B 细胞,通过表达 IL-4、10、13 等刺激 B 细胞产生抗体。Treg 细胞是一种具有免疫抑制作用的细胞,可以抑制 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞的增生和活化来维持自身耐受性。近年来研究发现在多种自身免疫性疾病中存在 Treg 数量和功能异常^[3]。Treg 细胞除了表达 CD4 和 CD25 外,还特异性表达 Foxp3,因此我们以 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 为标志,通过流式细胞术检测发现 ITP 患者治疗前体内 Treg 细胞比例明显降低,而治疗后比值上升,且治疗后不同疗效组 Treg 细胞仍有差异,这说明 ITP 患者产生自身抗体可能与 Treg 对自身反应性 Th 细胞和 B 淋巴细胞的抑制作用减弱有关,糖皮质激素可能通过上调 Treg 数量使得 ITP 病情得以缓解,治疗后 Treg 上调不明显的患者疗效差。另外有学者通过体外培养发现 ITP 患者的 CD4⁺CD25^{high} Treg 细胞不能抑制 CD4⁺CD25⁻T 细胞的增生,而健康对照者的 Treg 细胞可以,说明 ITP 患者不但存在 Treg 数量下降而且存在功能异常^[4]。

TGF-β1 是一种免疫抑制剂,抑制 T、B 细胞增殖,减少主要组织相容性复合体 MHC-II 类抗原表达,减轻局部炎症反应。本研究发现 ITP 患者血清 TGF-β1 浓度低于正常对照,治疗后浓度上升,这与文献报道相似^[5-7]。这说明 ITP 患者经过激素治疗后

Treg 细胞比例上升可能通过分泌 TGF-β1 等细胞因子抑制自身反应性 B 细胞使得病情缓解。但我们发现 Treg 细胞比例和 TGF-β1 无相关性,这可能与 TGF-β1 不单纯由 Treg 细胞分泌有关,如成骨细胞、肾脏、血小板^[8]、巨核细胞^[9]、活化的 B 细胞以及肿瘤细胞等均可以合成大量的 TGF-β1。另有研究发现 TGF-β1 可以诱导 Foxp3⁻ 的 T 细胞转化成 Foxp3⁺ 的 Treg 细胞^[10-11], TGF-β1 受体发生无义突变的转基因小鼠的 Treg 细胞体内抑制功能下降^[12],这说明 TGF-β1 对于维持 Treg 细胞数量和功能方面起着重要作用。因此 ITP 患者发病可能与 Treg 细胞数量和 TGF-β1 水平下降不足以抑制产生自身抗体的 B 淋巴细胞有关,糖皮质激素可能通过诱导 TGF-β1 表达来上调 Treg 的数量和功能,从而抑制自身反应性 T 细胞和 B 细胞使得病情得以缓解,这一推测尚需实验来证实。

参 考 文 献

- [1] 张之南,沈悌. 血液病诊断及疗效标准. 3 版. 北京:科学出版社, 2008:245-249.
- [2] 侯明. 成人特发性血小板减少性紫癜诊断治疗专家共识. 中华血液学杂志, 2009, 30:647-648.
- [3] Shevach EM. Mechanisms of foxp3⁺ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*, 2009, 30:636-645.
- [4] Yu J, Heck S, Patel V, et al. Defective circulating CD25 regulatory T cells in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood*, 2008, 112:1325-1328.
- [5] 阿依姆妮萨·阿卜杜热合曼,哈力达·亚森,赵芳,等. 特发性血小板减少性紫癜患者 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞和 TGF-β1 的相关性研究. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010, 26:895-897.
- [6] 王厚才,李文倩,冯建明. 免疫性血小板减少性紫癜发病的免疫机制. *国际输血及血液学杂志*, 2011(3):250-253.
- [7] Bao W, Bussel JB, Heck S, et al. Improved regulatory T-cell activity in patients with chronic immune thrombocytopenia treated with thrombopoietic agents. *Blood*, 2010, 116:4639-4645.
- [8] Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, et al. Transforming growth factor-beta in human platelets: identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem*, 1983, 258:7155-7160.
- [9] Fortunel NO, Hatzfeld A, Hatzfeld JA. Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood*, 2000, 96:2022-2036.
- [10] Jhunjhunwala S, Balmert SC, Raimondi G, et al. Controlled release formulations of IL-2, TGF-β1 and rapamycin for the induction of regulatory T cells. *J Control Release*, 2012, 159:78-84.
- [11] Zhang C, Zhang X, Chen XH. Hypothesis: human umbilical cord blood-derived stromal cells regulate the Foxp3 expression of regulatory T cells through the TGF-β1/Smad3 pathway. *Cell Biochem Biophys*, 2012,

62:463-466.

(收稿日期:2013-01-11)

- [12] Huber S, Schramm C, Lehr HA, et al. Cutting edge: TGF- β signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4⁺ CD25⁺ T cells. *J Immunol*, 2004, 173:6526-6531.

(本文编辑: 梁雷)

段衍超, 张志榕, 刘艳. 特发性血小板减少性紫癜患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞和 TGF- β 1 的检测及意义[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7(9):4072-4074.

