



[DOI] 10.3969/j.issn.1001-9057.2022.11.011

<http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2022.11.011>

· 论著 ·

调节性 T 细胞及调节性 B 细胞在成人原发免疫性血小板减少症中的表达研究

傅磊 李亮 卞建军 沈磊 苏玉璇 左金曼

[摘要] 目的 探讨 $CD4^+ CD25^+ FOXP3^+$ 调节性 T 细胞 (Treg 细胞) 及 $CD19^+ CD24^{high} CD38^{high}$ 调节性 B 细胞 (Breg 细胞) 在成人原发免疫性血小板减少症 (ITP) 患者外周血中的表达及其在疾病发展中的意义。方法 纳入 82 例 ITP 患者 (ITP 组) 和 45 例同期健康体检者 (对照组), 收集其年龄、性别、发病时的 PLT 计数, 检测 ITP 组患者治疗前后及对照组的 $CD4^+ CD25^+ FOXP3^+$ Treg 细胞及 $CD19^+ CD24^{high} CD38^{high}$ Breg 细胞水平并比较。根据疗效再将 82 例 ITP 患者分为治疗有效组 (75 例) 和治疗无效组 (7 例), 比较两组患者治疗前后 $CD4^+ CD25^+ FOXP3^+$ Treg 细胞及 $CD19^+ CD24^{high} CD38^{high}$ Breg 细胞水平。结果 治疗前 ITP 组患者 $CD4^+ CD25^+ FOXP3^+$ Treg 细胞及 $CD19^+ CD24^{high} CD38^{high}$ Breg 细胞水平均明显低于对照组 ($P < 0.05$)。治疗后治疗有效组患者两种细胞水平均明显高于同组治疗前及同期治疗无效组 ($P < 0.05$)。结论 $CD4^+ CD25^+ FOXP3^+$ Treg 细胞及 $CD19^+ CD24^{high} CD38^{high}$ Breg 细胞的水平下调可能与 ITP 的免疫发病相关, 增加这两种细胞水平并改善其功能可能是 ITP 患者新的治疗方法。

[关键词] $CD4^+ CD25^+ FOXP3^+$ 调节性 T 细胞; $CD19^+ CD24^{high} CD38^{high}$ 调节性 B 细胞; 原发免疫性 PLT 减少症

[中图分类号] R558.2

[文献标识码] A

成人原发免疫性 PLT 减少症 (ITP) 曾称特发性 PLT 减少性紫癜, 是一种由自身抗体介导, 以 PLT 破坏增加及生成减少为特征的获得性自身免疫性出血性疾病^[1-2]。ITP 患者存在体液免疫功能异常, 亦存在细胞免疫功能异常, 特别是调节性 T 细胞 (Treg 细胞)、调节性 B 细胞 (Breg 细胞) 的数量和 (或) 功能异常在疾病发生发展中起到十分重要的作用^[3]。本文应用流式细胞术检测成年 ITP 患者治疗前后 Treg 细胞、Breg 细胞水平变化, 并与正常人进行比较, 旨在了解 ITP 患者细胞免疫功能异常情况, 为其治疗提供方向。

对象与方法

1. 对象: 2017 年 1 月 ~ 2020 年 6 月于我科门诊就诊及住院的 ITP 患者 82 例 (ITP 组), 其中男 45 例, 女 37 例, 年龄 16 ~ 72 岁, 平均年龄 (44.52 ± 11.26) 岁, 发病时平均 PLT 计数 (10.25 ± 6.32) $\times 10^9/L$ 。ITP 诊断标准参照《成人原发免疫性 PLT 减少症诊断与治疗中国专家共识 (2016 年版)》^[4]。排除标准: (1) 其他

自身免疫性疾病继发 PLT 减少; (2) 颅内出血; (3) 严重血栓病史; (4) 严重肝、肾功能不全或心、肺功能障碍; (5) 忌用糖皮质激素; (6) 妊娠或哺乳期。纳入同期于我院体检的健康者 45 例 (对照组), 其中男 25 例, 女 20 例, 年龄 19 ~ 65 岁, 平均年龄 (43.78 ± 10.59) 岁。所有对照组受试者均已排除自身免疫性疾病和过敏性疾病史者。两组受试者性别、年龄比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。本研究经过我院伦理委员会审核批准, 所有受试者均知情同意。

2. 方法

(1) 一般资料收集: 收集所有受试者的一般资料, 包括年龄、性别。收集 ITP 患者发病时的 PLT 计数。

(2) 治疗方案: 根据治疗方案将 82 例 ITP 患者分为地塞米松组 (地塞米松单药治疗, 10 例) 和地塞米松 + 重组人 PLT 生成素 (rhTPO) 组 (地塞米松联合 rhTPO 治疗, 72 例)。地塞米松单药治疗方案: 地塞米松 40 mg, 每日 1 次静脉滴注, 共 4 日。地塞米松联合 rhTPO 治疗方案: 地塞米松 40 mg, 每日 1 次静脉滴注, 共 4 日; rhTPO 15 000 U, 每日 1 次皮下注射 (PLT 计数 $\geq 100 \times 10^9/L$ 时停用, 最多应用 14 日)。

(3) 疗效判断: 参照《成人原发免疫性 PLT 减少症

诊断与治疗中国专家共识(2016 年版)》^[4],疗效包括完全反应(CR)、有效(R)及无效(NR),治疗有效例数=CR 例数+R 例数。根据疗效将 82 例 ITP 患者分为治疗有效组(75 例)和治疗无效组(7 例)。

(4)Treg 细胞及 Breg 细胞水平检测:所有治疗有效患者均在治疗前、后留取血液样本,治疗无效患者在治疗开始后 4 周留取血液样本,对照组受试者于体检时留取血液样本。加入不同抗体采用 FACSCanto II 流式细胞仪(BD 公司,美国),应用 BD Cell Quest 软件分析实验数据,分别记录 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺Treg 细胞及 CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}Breg 细胞水平。

4. 统计学处理:应用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验。计数资料以例数和百分比表示。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. ITP 患者治疗后的临床疗效:82 例 ITP 患者中地塞米松单药治疗 10 例,地塞米松联合 rhTPO 治疗 72 例。见表 1。两种方案治疗后共 75 例有效(包括 63 例 CR 和 12 例 R),7 例无效,总有效率为 91.46%(75/82)。

表 1 ITP 患者治疗后的临床疗效(例)

组别	例数	CR	R	NR	有效率(%)
地塞米松组	10	6	2	2	80.00
地塞米松+rhTPO 组	72	57	10	5	93.06

2. ITP 组治疗前和对照组受试者两种细胞水平比较:ITP 组治疗前 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺Treg 细胞及 CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}Breg 细胞水平均明显低于对照组(*P* < 0.05)。见表 2。

表 2 ITP 组治疗前和对照组受试者两种细胞水平比较(% , $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ Treg 细胞	CD19 ⁺ CD24 ^{high} CD38 ^{high} Breg 细胞
ITP 组	82	1.38 ± 0.71	1.81 ± 1.12
对照组	45	6.45 ± 1.88	3.81 ± 0.91
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

3. 治疗有效组和治疗无效组患者治疗前后两种细胞水平比较:治疗前两组患者 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺Treg 细胞及 CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}Breg 细胞水平比较差异均无统计学意义(*P* > 0.05);治疗后治疗有效组患者两种细胞水平均高于同组治疗前及同期治疗无效组(*P* < 0.05),治疗无效组患者治疗前后两种细胞水平比较差异均无统计学意义(*P* > 0.05)。见表 3。

表 3 治疗有效组和治疗无效组患者治疗前后两种细胞水平比较(% , $\bar{x} \pm s$)

组别		例数	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ Treg 细胞	CD19 ⁺ CD24 ^{high} CD38 ^{high} Breg 细胞
治疗有效组	治疗前	75	1.36 ± 0.62	1.69 ± 1.08
	治疗后	75	6.39 ± 1.70 ^{ab}	3.78 ± 1.01 ^{ab}
治疗无效组	治疗前	7	1.38 ± 0.71	1.71 ± 0.96
	治疗后	7	1.52 ± 0.65	1.80 ± 0.83

注:与同组治疗前比较,^a*P* < 0.05;与同期治疗无效组比较,^b*P* < 0.05

讨 论

ITP 是一种临床常见出血性疾病,因为各种免疫介导而致患者 PLT 过度破坏、PLT 生成减少,引起发病^[5]。T 细胞及 B 细胞水平异常及功能改变在多种自身免疫性疾病中均起到重要作用。Treg 细胞、Breg 细胞具有低反应性及免疫抑制性,通过独特的免疫调节作用,可诱导和维持机体的自身免疫耐受。Treg 细胞可高表达 CD25,分泌 IL-10 及转化生长因子(TGF)-β 等多种细胞因子,并表达特异性的 FOXP3 转录因子,因此 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺是最经典的 Treg 细胞免疫表型,此类 Treg 细胞可通过抑制 T 细胞的活化及自身反应性 T 细胞的免疫反应,进而促进抑制性细胞因子的分泌等作用,维持外周免疫耐受,可参与多种变态反应性疾病及肿瘤免疫的发病^[6-7]。Breg 细胞是另一类具有独特免疫调节作用的 B 细胞亚群^[8],可分泌 IL-35、IL-10 及 TGF-β 等细胞因子,参与自身免疫性疾病、慢性感染性疾病、恶性肿瘤及过敏性疾病等多种疾病的免疫反应。Breg 细胞的常见表型有 CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}、CD19⁺CD24^{high}CD27⁺、CD19⁺CD25^{high}CD71^{high}、CD19⁺CD24⁺FOXP3⁺等,目前研究最多的是 CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}Breg 细胞。

Treg 细胞减少及其功能缺陷会引起多种自身免疫性疾病,如系统性红斑狼疮(SLE)、类风湿关节炎等^[9-10]。ITP 作为一种十分常见的自身免疫性疾病,越来越多的研究开始探讨其发生、发展进程中 Treg 细胞发挥的作用。现有研究表明,ITP 患者外周血及脾脏中的 Treg 细胞水平均明显下降^[11-12]。还有学者发现 Treg 细胞在 ITP 患者中不仅存在水平减少,还有功能的下降,其伴随增殖相关蛋白水平下降和细胞自噬功能降低,从而参与疾病的发生及发展^[13]。有学者通过检测 ITP 患者体内 Treg 细胞全基因组微小 RNA(miRNA, miR)表达谱,发现其中 miR-155-5p、miR-146b-5p 和 miR-142-3p 的表达较对照组显著降低,推测在 ITP 患者中 miRNAs 的低表达可能影响 Treg 细胞的功能^[14]。本研究检测 ITP 患者外周血中 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺Treg 细胞水平,结果显示,与对照组比较,ITP 患者外

周血 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺Treg 细胞水平明显降低,与上述研究结果一致,提示 Treg 水平减少可能是影响 ITP 疾病发生发展的重要因素。有研究进一步证明,ITP 患者 Treg 细胞水平在进行糖皮质激素治疗前明显低于正常人,但治疗后 Treg 细胞水平明显升高^[15]。特别是经大剂量地塞米松治疗后,ITP 患者 Treg 细胞数量明显升高,PLT 水平迅速恢复^[16]。Sakakura 等^[17]研究也发现,ITP 患者在进行相关治疗后处于完全缓解期时,特别是在脾脏切除术后,其 Treg 细胞水平明显升高。另有学者通过系列针对成人和儿童 ITP 患者的研究发现,Treg 细胞在外周血、骨髓和脾脏中的水平均显著降低,Treg 细胞功能明显受损;在经地塞米松、利妥昔单抗或 PLT 生成素受体激动剂等方案治疗后,Treg 细胞失调情况得以改善,PLT 水平恢复^[18]。本研究所有 ITP 患者在地塞米松单药或联合 rhTPO 治疗方案治疗后,治疗有效组患者 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺Treg 细胞水平较同组治疗前明显升高,而治疗无效组该细胞水平较同组治疗前无明显升高,提示 ITP 患者 Treg 细胞水平异常可能参与疾病发展。

Breg 细胞水平减少及功能缺陷可参与 SLE、再生障碍性贫血等多种自身免疫性疾病的发展过程^[19-20]。目前 Breg 细胞在 ITP 中的作用得到越来越多的研究证实。研究发现,ITP 患者体内 Breg 细胞水平明显下降,并可通过调节体液免疫影响 IL-10 及 TGF- β 等细胞因子的表达,使患者 Breg 细胞功能下降^[21-22]。本研究发现 ITP 患者外周血 CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}Breg 细胞水平明显低于对照组,与上述研究结果一致,提示 Breg 细胞水平减少可能是 ITP 发病的重要因素。相关研究显示,ITP 患者应用地塞米松治疗后,体内 Breg 细胞水平升高,并促进 IL-10 的分泌增加,疗效显著^[22]。另有学者通过应用 rhTPO 联合沙利度胺方案治疗难治性 ITP 患者发现,加用 rhTPO 后患者 Breg 细胞和 Treg 细胞水平均显著升高,总缓解率明显提高^[23]。本研究中,ITP 患者应用地塞米松单药或联合 rhTPO 方案经有效治疗后 CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}Breg 细胞水平明显恢复,而治疗无效者该细胞水平无明显变化,提示 Breg 细胞水平异常可能参与 ITP 患者的疾病发展。

本研究发现 ITP 患者体内 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺Treg 细胞及 CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}Breg 细胞水平较对照组明显下降,经有效治疗后两者细胞水平显著升高,治疗无效时则无明显变化,提示 Treg 细胞及 Breg 细胞可能参与 ITP 的发生和发展。其可能机制是患者体内 Treg 细胞、Breg 细胞水平的减少无法有效抑制免疫作用,使细胞免疫抑制功能出现缺陷,并导致各种细胞因子分泌下降,打破自身免疫平衡,最终引起自身反应性

T 细胞、B 细胞激活增多,导致 PLT 大量破坏。而经过免疫抑制和(或)促 PLT 生成药物治疗后,患者 Treg 细胞、Breg 细胞水平升高,免疫功能恢复,PLT 水平升高,提示 Treg 细胞、Breg 细胞在 ITP 的发生、发展中均起到重要作用,是 ITP 治疗的两个潜在生物靶点,如能及时有效地提高 Treg 细胞、Breg 细胞水平并改善其功能,纠正机体免疫功能紊乱状态,可作为 ITP 的一个新的治疗方法。

参 考 文 献

- [1] 张晓琳,侯明. 原发免疫性血小板减少症的诊疗进展[J]. 临床内科杂志,2020,37(1):5-7.
- [2] 马勇,杜昌,朱继红. 原发免疫性血小板减少症合并肺栓塞 1 例并文献复习[J]. 疑难病杂志,2021,20(11):1162-1163.
- [3] 王玉凤,文瑞婷,杨志刚. 调节性 T 细胞及调节性 B 细胞在免疫性血小板减少症中作用的研究进展[J]. 国际输血及血液学杂志,2019,42(1):41-45.
- [4] 秦平,侯明. 成人原发免疫性血小板减少症诊断与治疗中国专家共识(2016 年版)[J]. 中华血液学杂志,2016,37(02):89-93.
- [5] 李炆,孙丽华,李锋,等. 重组人血小板生成素在老年重症免疫性血小板减少症患者一线治疗中的短期疗效分析[J]. 中国临床医学,2021,28(3):370-374.
- [6] Pellerin L, Jenks JA, Bégin P, et al. Regulatory T cells and their roles in immune dysregulation and allergy[J]. Immunol Res, 2014, 58(2-3):358-368.
- [7] 易雪,关军,周英,等. CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺调节性 T 细胞、黏蛋白 1、干扰素- γ 水平与多发性骨髓瘤关系的研究[J]. 临床内科杂志,2017,34(11):751-752.
- [8] Valizadeh A, Sanaei R, Rezaei N, et al. Potential role of regulatory B cells in immunological diseases[J]. Immunol Lett, 2019, 215:48-59.
- [9] Scheinecker C, Göschl L, Bonelli M. Treg cells in health and autoimmune diseases: New insights from single cell analysis[J]. J Autoimmun, 2020, 110:102376.
- [10] 刘童,李兴锐,陆继娣,等. 来氟米特联合小剂量甲泼尼龙对类风湿关节炎患者 Th17/Treg 细胞比值影响[J]. 临床军医杂志,2021,49(11):1239-1241.
- [11] Zhang J, Zhang Q, Li Y, et al. Immune dysregulation in primary immune thrombocytopenia patients[J]. Hematology, 2018, 23(8):510-516.
- [12] 杨媛媛,张凤琦,潘誉,等. 原发免疫性血小板减少症患者脾脏组织调节性 T 细胞和 Th17 细胞数量的研究[J]. 中华血液学杂志,2017,38(3):227-230.
- [13] 王琦,计雪强,邵惠江,等. 免疫性血小板减少症(ITP)患儿外周血调节性 T 细胞数量减少伴随自噬的降低[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2018,34(9):834-838.
- [14] Zhu Y, Zhu H, Xie X, et al. MicroRNA expression profile in Treg cells in the course of primary immune thrombocytopenia[J]. J Invest Med, 2019, 67(8):1118-1124.
- [15] 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.
- [16] 何正梅,史文婷,陶红,等. 大剂量地塞米松对免疫性血小板减少症患者调节性 T 淋巴细胞的影响[J]. 重庆医学,2017,46(30):4247-4249.
- [17] Sakakura M, Wada H, Tawara I, et al. Reduced CD24⁺CD25⁺T cells in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura[J]. Thromb Res, 2007, 120(2):187-193.
- [18] Nishimoto T, Kuwana M. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺regulatory T cells in the pathophysiology of immune thrombocytopenia[J]. Semin Hematol, 2013, 50 Suppl 1:S43-S49.
- [19] Ma K, Du W, Wang X, et al. Multiple Functions of B Cells in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(23):6021.
- [20] Zaimoku Y, Patel BA, Kajigaya S, et al. Deficit of circulating CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}regulatory B cells in severe aplastic anaemia[J]. Br J Haematol, 2020, 190(4):610-617.
- [21] 唐一君,瞿文,王一浩,等. 免疫性血小板减少症患者调节性 B 细胞数量及功能[J]. 中华医学杂志,2015,95(20):1599-1601.
- [22] Fang J, Lin L, Lin D, et al. The imbalance between regulatory memory B cells reveals possible pathogenesis involvement in pediatric immune thrombocytopenia[J]. Hematology, 2019, 24(1):473-479.
- [23] Yang ZG, Wen RT, Zhang YM, et al. Thalidomide induce response in patients with corticosteroid-resistant or relapsed ITP by upregulating Neuropilin-1 expression[J]. Int Immunopharmacol, 2019, 72:437-444.

(收稿日期:2021-06-11)

(本文编辑:余晓曼)