

免疫性血小板减少患者外周血 Treg 及 Th1, Th2 细胞检测及其临床意义*

高 硕, 徐学静, 王 森, 程 莉, 陈军浩, 孙 健

(南京大学医学院附属鼓楼医院检验科, 南京 210008)

摘要:目的 研究免疫性血小板减少症(primary immune thrombocytopenia, ITP)患者外周血中 CD4+CD25+FoxP3+ 细胞(Treg 细胞)及 Th1/Th2 细胞水平并探讨其临床意义。方法 选取 27 例临床确诊 ITP 患者作为实验组, 采用流式细胞术检测患者外周血 Treg 细胞及 Th1/Th2 细胞的比例, 并与 25 例健康志愿者检测结果进行比较。结果 ITP 患者外周血中 Treg 细胞比例为 $(2.20 \pm 0.93)\%$, 健康对照组为 $(2.99 \pm 0.45)\%$, ITP 患者组 Treg 细胞低于健康对照组($t=3.820$, $P<0.01$); ITP 患者组和健康对照组 Th1/Th2 细胞水平差异无统计学意义($t_{Th1}=0.655$, $t_{Th2}=0.467$, 均 $P>0.05$)。结论 ITP 患者外周血 Treg 细胞减少, 其对 ITP 疾病发生发展的重要作用值得深入研究。

关键词:免疫性血小板减少; Treg; Th1/Th2

中图分类号: R558.2; R392.11 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2018)01-112-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2018.01.028

Detection and Clinical Significance of Treg and Th1, Th2 Cells in Peripheral Blood of Patients with Immune Thrombocytopenia

GAO Shuo, XU Xue-jing, WANG Sen, CHENG Li, CHEN Jun-hao, SUN Jian

(Department of Medical Laboratory, the Drum Tower Hospital

Affiliated to the Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, China)

Abstract: Objective To detect the level of CD4+CD25+FoxP3+ (Treg) and Th1, Th2 cells in peripheral blood of patients with immune thrombocytopenia and discuss its clinical significance. **Methods** Flow cytometry was used to detect the percentage of Treg cells and Th1, Th2 cells in peripheral blood of 27 patients with ITP. 25 healthy volunteers were detected as control group. **Results** The percentage of Treg cells in the peripheral blood of patients with ITP was $(2.20 \pm 0.93)\%$, which significantly decreased compared with the healthy control group $(2.99 \pm 0.45)\%$ ($t=3.820$, $P<0.01$) respectively, and the levels of Th1, Th2 cells were not statistically different between the two groups ($t_{Th1}=0.655$, $t_{Th2}=0.467$, all $P>0.05$). **Conclusion** Treg cells in patients with ITP were decreased, and its important role in the development of ITP deserves further study.

Keywords: immune thrombocytopenia; treg; Th1/Th2

原发性免疫性血小板减少症(primary immune thrombocytopenia, ITP)是临床常见的自身免疫性出血性疾病。患者血小板数量降低, 以皮肤、黏膜及内脏出血为主要临床表现, 发病率有不断增高趋势^[1]。ITP 的发病机制涉及多个方面, 目前仍未被完全阐明。近年来研究发现 T 淋巴细胞亚群的异常在 ITP 免疫发病机制中发挥关键作用^[2]。本研究针对临床 ITP 患者, 采用流式细胞术检测外周血 Treg 细胞及 Th1/Th2 细胞比例, 旨在探讨这几类 T 淋巴细胞亚群数量变化对 ITP 疾病发生和进展的重要作用。

1 材料和方法

1.1 研究对象 选取 2015 年 9 月~2016 年 9 月在我院就诊的 ITP 患者 27 例作为研究对象。其

中男性 11 例, 女性 16 例, 中位年龄 41 岁。25 例健康志愿者作为对照组, 其中男性 9 例, 女性 16 例, 中位年龄 44 岁。入选对照组对象均排除自身免疫性疾病。所有患者及健康志愿者于清晨空腹抽取全血。其中 1 ml 采于 EDTA 抗凝管内, 用于 Treg 细胞检测。4 ml 采于肝素锂抗凝管内, 用于 Th1/Th2 细胞检测。

1.2 试剂和仪器 流式抗体 CD3(PerCP), CD8(APC), IL-4(PE), IFN- γ (FITC), IgG2a(PE), IgG1(FITC), FACSLysing 溶血液及细胞刺激剂 leukemia activation 均购自 Becton Dickison 公司。Treg 检测试剂盒购自 eBioscience 公司。固定破膜剂 FIX&PERM Kit 购自 Life Technologies 公司。实验所用仪器: FACS Calibur 流式细胞仪

* 基金项目: 南京市医学科技发展资金(YKK15138)。

作者简介: 高 硕(1987-), 女, 硕士, 检验技师, 主要研究方向: 临床血液学检验, E-mail: shuoshuo65@163.com。

通讯作者: 孙 健, 副主任技师, E-mail: seine_med@163.com。

(Becton Dickison 公司),二氧化碳培养箱(Thermo Scientific 公司)。

1.3 方法

1.3.1 Treg 细胞检测:实验按照 Treg 检测试剂盒操作说明书进行。对照管和实验管中分别加入 CD4(FITC)和 CD25(APC)各 5 μ l,两管中均加入 50 μ l 全血,混匀后室温避光孵育 15 min。每管加入 Flow Cytometry Staining Buffer 各 1 ml,500 g 离心 5 min,弃上清。加入 500 μ l Fixation/Permeabilization 试剂,混匀后室温避光孵育 30 min。再加入 800 μ l Permeabilization Buffer,500 g 离心 5 min,弃上清。对照管加入 Rat IgG2a(PE)抗体 5 μ l,实验管加入 FoxP3(PE)抗体 5 μ l,置室温避光孵育 30 min。生理盐水洗涤一次,加入 360 μ l Flow Cytometry Staining Buffer 混匀后上机检测。采用 CD4+细胞设门方法,检测 CD25+FoxP3+细胞比例。

1.3.2 Th1/Th2 细胞检测:对照管和实验管均加入 1 μ l 细胞刺激剂至管底。两管中各加入 50 μ l 全血,振荡混匀,于 37 $^{\circ}$ C,5 mg/dl CO₂ 培养箱孵育 4.5 h(每 2 h 震荡混匀一次)。孵育后两管中加入 CD3(PerCP)和 CD8(APC)抗体各 5 μ l,混匀,室温避光孵育 15 min。各管中加入 50 μ l 固定剂 A,避光孵育 15 min。生理盐水洗涤,尽量倒尽上清液。各管再加入 50 μ l 破膜剂 B,实验管中加 IL-4(PE)和 IFN- γ (FITC)标记抗体各 5 μ l,对照管加入相应同型对照抗体,室温避光孵育 30 min。生理盐水洗涤后制成 360 μ l 细胞悬液,上机检测。为排除在刺激培养过程中 PMA 对 CD4 标记的影响,采用 CD3+CD8-设门方法代替 CD4+细胞群,检测 IFN- γ (Th1)和 IL-4(Th2)阳性细胞比例。

1.4 统计学分析 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析。计量资料符合正态分布,用均数 \pm 标准差表示($\bar{x}\pm s$),两组间差异比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ITP 患者组与健康对照组 Treg 细胞检测结果 流式细胞仪检测结果显示,ITP 患者组 Treg 细胞占 CD4+细胞比例的 (2.20 \pm 0.93)%,健康对照组为 (2.99 \pm 0.45)%,ITP 患者外周血 Treg 细胞比例低于健康志愿者,两组间差异有统计学意义 ($t=3.820$, $P=0.0004$)。

2.2 ITP 患者组与健康对照组 Th1/Th2 细胞检测结果 见表 1。流式细胞术分别检测 ITP 患者组和健康对照组 CD4+细胞中 IFN- γ (Th1)与 IL-4(Th2)阳性细胞比例。与健康对照组相比,ITP 患者外周血 Th1 和 Th2 细胞比例差异均无统计学

意义 ($P>0.05$)。

表 1 ITP 患者组与健康对照组 Th1/Th2 细胞水平比较 ($\bar{x}\pm s$,%)

检测项目	ITP 患者组 ($n=27$)	健康对照组 ($n=25$)	t 值	P 值
Th1	25.85 \pm 12.22	24.24 \pm 7.57	0.655	0.5153
Th2	1.20 \pm 0.68	1.26 \pm 0.49	0.467	0.6452

3 讨论 原发性免疫性血小板减少症(ITP)是临床较常见的以血小板减少和出血为特点的自身免疫性疾病。其发病机制涉及机体对血小板和巨核细胞表达的糖蛋白的免疫耐受缺失,表现在抗血小板抗体产生以及血小板破坏过多或生成减少。近年来国内外研究发现,T 细胞数量和功能异常参与了 ITP 的发生发展^[3]。作为具有重要免疫功能的 T 淋巴细胞亚群,Treg 及 Th1/Th2 细胞在 ITP 中的作用越来越受到关注。

调节性 T 细胞是机体诱导和维持自身免疫耐受的重要细胞。其中 CD4+CD25+Foxp3+(Treg)是最经典的 Treg 细胞的免疫表型。Treg 细胞能抑制效应细胞的增殖及免疫活性的发挥,同时在肿瘤免疫及变态反应性疾病中发挥重要作用^[4]。有研究发现 Treg 细胞数量减少和功能异常与多种自身免疫疾病相关^[5,6]。ITP 作为常见的自身免疫病,其疾病进程中 Treg 细胞可能发挥的作用引起了许多关注。国内外多数的研究表明,ITP 患者外周血 Treg 细胞数量有明显降低^[7,8]。然而也有研究者提出不同意见,他们发现 ITP 患者 Treg 细胞数量与健康对照组相比并没有差异^[9]。在本研究中我们检测了 ITP 患者外周血 Treg 细胞比例。结果显示,与健康对照组相比 ITP 患者外周血 Treg 细胞水平明显降低,与大多数的研究结果一致,提示 Treg 数量减少可能是影响 ITP 疾病发生发展的重要因素。

Th1/Th2 细胞是 CD4+T 辅助细胞中重要的两个亚群。Th1 细胞介导细胞免疫应答,包括迟发型超敏反应和器官特异性自身免疫性疾病等。Th2 细胞介导体液免疫应答,在过敏性和感染性疾病、拮抗胞外病原体、B 细胞增殖分化以及哮喘病等方面具有重要作用^[10]。有研究表明 ITP 患者体内存在 Th1/Th2 失衡的现象,而对这一现象的研究结论并非十分一致。唐玉荣等^[11]的研究表明在急性 ITP 患儿外周血中 Th1 细胞占主要优势,而有研究则发现 IL-4 等细胞因子在 ITP 患者中升高,提示 ITP 发病可能与 Th2 功能亢进有关^[12]。本研究在对 Th1/Th2 细胞水平检测中发现,ITP 患者组 Th1/Th2 平均水平与健康对照组相比并无统计学差异,其中约 1/3 患者 Th1 细胞水平较高,

而少部分患者 Th1 细胞少, Th2 细胞比例相对增高。这一结果提示 ITP 患者可能存在个别 Th1/Th2 失衡的现象, 没有证据表明哪种细胞占主要优势, 可能与样本数量少及患者自身免疫状态有关。

综上所述, 本研究发现 ITP 患者外周血 Treg 细胞数量减少, Th1/Th2 细胞水平没有明显变化。对 Treg 及 Th1/Th2 细胞水平的检测, 有助于了解 ITP 患者的免疫状态, 为疾病进展及免疫治疗和预后提供一定的临床依据。今后的研究仍需增加样本数量, 并观察患者治疗前后 T 淋巴细胞亚群数量和功能的变化及与临床特征的相关性, 为 ITP 发病机制的深入研究和寻求临床新的治疗手段提供理论依据。

参考文献:

- [1] 中华医学会血液学分会止血与血栓学组. 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(2): 89-93.
Thrombosis and Hemostasis Group, Hematology Society, Chinese Medical Association. Consensus of Chinese experts on diagnosis and treatment of adult primary immune thrombocytopenia (version 2016) [J]. Chin J Hematol, 2016, 37(2): 89-93.
- [2] 吴晓勇, 陈广雷, 王云龙, 等. T 细胞与免疫性血小板减少发病机制的相关研究进展[J]. 山东医药, 2017, 57(4): 101-104.
Wu XY, Chen GL, Wang YL, et al. Research progress on the T cells and the pathogenesis of immune thrombocytopenia[J]. Shandong Medical Journal, 2017, 57(4): 101-104.
- [3] Kistanguri G, McCrae KR. Immune thrombocytopenia [J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2013, 27(3): 495-520.
- [4] 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.
- [5] Shalini PU, Debnath T, Jvs V, et al. A study on Foxp3 and Tregs in paired samples of peripheral blood and synovium in rheumatoid arthritis[J]. Cent Eur J Immunol, 2015, 40(4): 431-436.
- [6] 方周宾, 林兵英, 李卓成, 等. AIHA 患者外周血 Tfh/Treg 细胞的检测及临床意义[J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(2): 70-72.
Fang ZB, Lin BY, Li ZC, et al. Detection of Tfh/Treg subsets on peripheral blood of the patients with Auto-immune Haemolytic Anaemia [J]. J Mod Lab Med, 2016, 31(2): 70-72.
- [7] 孙志强, 徐芳芳, 郑方, 等. 原发免疫性血小板减少症患者 Th17 细胞和调节性 T 细胞检测的意义[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2017, 11(2): 208-212.
Sun ZQ, Xu FF, Zheng F, et al. Significance of Th17 and regulatory T cells in immune thrombocytopenia [J]. Chinese Journal of Clinicians (Electronic Edition), 2017, 11(2): 208-212.
- [8] Talaat RM, Elmaghraby AM, Barakat SS, et al. Alterations in immune cell subsets and their cytokine secretion profile in childhood idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) [J]. Clin Exp Immunol, 2014, 176(2): 291-300.
- [9] Akyol Eriköi A, Karagiöz B, Bilgi O. Regulatory T cells in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura [J]. Turk J Haematol, 2016, 33(2): 153-155.
- [10] Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, et al. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases [J]. Cytokine, 2015, 74(1): 5-17.
- [11] 唐玉荣, 王际亮, 孙婷婷, 等. 儿童特发性血小板减少性紫癜 Th 亚群细胞因子的测定及意义[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(5): 143-145.
Tang YR, Wang JL, Sun TT, et al. Determination and clinical significance of Th subsets cytokines in ITP of children [J]. J Mod Lab Med, 2015, 30(5): 143-145.
- [12] 李文倩, 王小蕊, 李建平, 等. 免疫性血小板减少症患者免疫抑制治疗前后免疫细胞亚群及细胞因子谱分析[J]. 中华内科杂志, 2016, 55(2): 110-115.
Li WQ, Wang XR, Li JP, et al. A study of immuneocyte subsets and serum cytokine profiles before and after immunosuppression treatment in patients with immune thrombocytopenia [J]. Chin J Intern Med, 2016, 55(2): 110-115.

收稿日期: 2017-08-18

修回日期: 2017-12-16

(上接 111 页)

- Wang LJ, Wu JP, Cheng J, et al. Genotype analysis for 2 686 cases of married women in cervical cells papilloma virus [J]. Progress in Obstetrics and Gynecology, 2014, 23(9): 728-731.
- [8] 才仁卓玛, 张建青, 魏春梅. 青海省 26 622 名临床就诊妇女宫颈乳头瘤病毒感染情况及亚型分布[J]. 中国计划生育学杂志, 2013, 21(12): 812-816.
Cairen ZM, Zhang JQ, Wei CM. Human papillomavirus

infection in 26 622 women in Qinghai [J]. Chinese Journal of Family Planning, 2013, 21(12): 812-816.

- [9] Wheeler CM, Hunt WC, Cuzick J, et al. The influence of type-specific human papillomavirus infections on the detection of cervical precancer and cancer: A population based study of opportunistic cervical screening in the United States [J]. International Journal of Cancer, 2014, 135(3): 624-634.

收稿日期: 2017-12-09

修回日期: 2017-12-27