

HBV 感染并发血小板减少患者 外周血中 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞的表达研究*

刘雯洁¹, 莫秋玉², 林文远², 林 玮¹, 卓梅芳¹, 刘 源¹, 蒋端凤², 董 敏²

(1. 桂林医学院, 广西桂林 541004; 2. 桂林医学院附属医院血液科, 广西桂林 541001)

摘要:目的 探讨 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞与乙肝病毒(HBV)感染并发血小板减少发病的关系及可能机制。方法 收集 2017 年 3~11 月在桂林医学院附属医院确诊的 12 例 HBV 感染并发免疫性血小板减少症(ITP)患者和同期体检的 10 例健康个体外周血, 分别作为实验组和对照组, 应用流式细胞术检测外周血中 CD4⁺/淋巴细胞、CD4⁺CD25⁺/淋巴细胞及 CD4⁺CD25⁺/CD4⁺ 比例。结果 实验组与对照组 CD4⁺/淋巴细胞、CD4⁺CD25⁺/淋巴细胞、CD4⁺CD25⁺/CD4⁺ 比例分别为 (24.64±9.8)% vs (31.72±6.6)%, (4.05±3.7)% vs (3.61±1.2)% 和 (14.97±12.0)% vs (11.27±2.8)%, 差异均无统计学意义 (U=33.0, 51.5, 55.0, P=0.075, 0.575, 0.742)。结论 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞在 HBV 感染并发血小板减少患者外周血中比例与正常人无明显差异, 可能是 HBV 感染相关免疫耐受与 ITP 相关免疫调节异常共同作用的结果。

关键词: HBV 感染; 血小板减少症; 调节性 T 细胞; 流式细胞术

中图分类号: R512.62; R392.11 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2018)04-067-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2018.04.017

Expression of CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells in Peripheral Blood of Patients with Hepatitis B Virus Infection with Thrombocytopenia

LIU Wen-jie¹, MO Qiu-yu², LIN Wen-yuan², LIN Wei¹, ZHUO Mei-fang¹,

LIU Yuan¹, JIANG Duan-feng², DONG Min² (1. Guilin Medical College,

Guangxi Guilin 541004, China; 2. Department of Hematology,

the Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guangxi Guilin 541001, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (Tregs) and the pathogenesis of hepatitis B virus (HBV) infection with thrombocytopenia and its possible mechanism. **Methods** Peripheral blood of 12 patients diagnosed as HBV infection with thrombocytopenia and 10 healthy donors at the same time were collected from the Affiliated Hospital of Guilin Medical College from March to November, 2017 and classified as experimental and controlled groups respectively. Flowcytometry was used to evaluate the proportion of CD4⁺/T cells, CD4⁺CD25⁺/T cells and CD4⁺CD25⁺/CD4⁺. **Results** The proportions of CD4⁺/T cells, CD4⁺CD25⁺/T cells and CD4⁺CD25⁺/CD4⁺ in experimental and controlled group respectively were [(24.64±9.8)% vs (31.72±6.6)%, U=33.0, P=0.075], [(4.05±3.7)% vs (3.61±1.2)%, U=51.5, P=0.575] and [(14.97±12.0)% vs (11.27±2.8)%, U=55.0, P=0.742] with no statistical significance. **Conclusion** There was no significant difference between patients of HBV infection with thrombocytopenia and the normal controls in the proportion of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in peripheral blood. It may be the result of HBV immune related immune tolerance and immune regulatory abnormalities associated with immune thrombocytopenia (ITP).

Keywords: hepatitis B virus infection; thrombocytopenia; regulatory T cells; flow cytometry

人体外周血中 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞是一群具有免疫抑制功能的调节性 T 细胞^[1]。多项研究显示, 长期的乙型肝炎病毒(HBV)感染与外周血中血小板减少存在相关性^[2~4]。乙肝病毒感染并发血小板减少是指伴 HBV 感染的免疫性血小板减少症(ITP)^[5], 除外 ITP 本身疾病因素, 乙

肝病毒感染可能是本病血小板减少的原因之一^[6]。本研究通过检测 12 例 HBV 感染并发血小板减少患者与 10 例健康体检者外周血中 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞的表达情况, 探讨 HBV 感染并发血小板减少可能的发病机制。

1 材料与方法

* 基金项目: 广西高校中青年基础能力提升项目(KY2016YB309), 广西壮族自治区教育厅课题(YB2014286), 国家级大学生创新创业训练计划项目(201610601029)。

作者简介: 刘雯洁(1995—), 女, 本科, 主要从事自身免疫研究, E-mail: 533966607@qq.com。

莫秋玉(1989—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事血小板减少研究, E-mail: 770562381@qq.com, 共同第一作者。

通讯作者: 蒋端凤(1986—), 男, 硕士, 主治医师, E-mail: duanfeng989949@126.com。

董 敏(1972—), 女, 博士, 教授, 硕士研究生导师, E-mail: dm1175@sina.com, 共同通讯作者。

1.1 研究对象 实验组为12例2017年3~11月在桂林医学院附属医院住院及门诊患者,均符合ITP诊断标准^[7],并且乙肝系列检测HBsAg定量增高,符合HBV感染^[8],其中男性患者7例,女性患者5例,年龄35~85岁。对照组10例为同期体检的健康个体,男性3例,女性7例,年龄21~75岁。

1.2 试剂和仪器 FITC标记的鼠抗人CD25单抗、PE-Cy5标记的鼠抗人CD4单抗及BD FACSTTM Lysing Solution(10x)均为BD Biosciences公司产品;淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物公司;FACS Calibur流式细胞仪为Becton Dickinson公司。

1.3 方法

1.3.1 分离单个核细胞:所有研究对象用EDTA抗凝管抽取静脉血2.0 ml,加入PBS液2.0 ml稀释后,用淋巴分离液常规分离获得单个核细胞,加入FACSTTM Lysing Solution(10x)悬浮细胞,使细胞浓度调整为 1.0×10^7 /ml。

1.3.2 细胞免疫荧光染色:取上述悬浮细胞100 μ l,分别加入CD25-FITC、CD4-PE-Cy5各20 μ l,混匀后室温避光孵育15 min;加入PBS液500 μ l混匀,1 500 r/min离心5 min,弃上清。加入0.5 ml PBS充分混匀,悬浮细胞,4 h内流式细胞仪上机检测。

1.3.3 流式细胞检测:采用FACS Calibur流式细胞仪进行检测,应用CellQuest软件分析结果,在FSC-SSC散点图上选定淋巴细胞群,以CD4和SSC设门选择CD4阳性细胞分析CD25表达,分析其中CD4⁺/淋巴细胞、CD4⁺CD25⁺/淋巴细胞及CD4⁺CD25⁺/CD4⁺比例。

1.4 统计学分析 使用SPSS17.0软件统计分析数据,两组间比较采用非参数检验中的两独立样本Mann-Whitney U检验。数据结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果 实验组与对照组比较,CD4⁺/淋巴细胞比例分别为 $(24.64 \pm 9.8)\%$ 和 $(31.72 \pm 6.6)\%$,两者比较差异无统计学意义($U = 33.0, P = 0.075$)。CD4⁺CD25⁺/淋巴细胞比例分别为 $(4.05 \pm 3.7)\%$ 和 $(3.61 \pm 1.2)\%$,两者比较差异无统计学意义($U = 51.5, P = 0.575$)。CD4⁺CD25⁺/CD4⁺的比例分别为 $(14.97 \pm 12.0)\%$ 和 $(11.27 \pm 2.8)\%$,两者比较差异无统计学意义($U = 55.0, P = 0.742$)。

3 讨论 HBV感染并发血小板减少狭义上是指ITP并发乙肝病毒感染,满足以下3个条件:①符合ITP的诊断;②HBV感染发生于血小板减少前或同时发现;③无门脉高压、脾大或肝硬化的证据

(除外脾功能亢进引起的血小板减少)。广义上的HBV感染并发血小板减少应包括肝炎病毒感染后出现的、抗乙肝病毒治疗有效的血小板减少^[5,9]。HBV感染并发血小板减少是临床常见血小板减少疾病之一,我们在临床工作中观察到抗乙肝病毒治疗能显著提高HBV感染并发血小板减少治疗效果。为进一步探讨其可能的发病机制,本研究首次比较了12例乙肝病毒感染并发血小板减少患者与10例健康体检者外周血中CD4⁺/淋巴细胞、CD4⁺CD25⁺/淋巴细胞及CD4⁺CD25⁺/CD4⁺比例,结果表明上述指标均未显示明显差异($P > 0.05$)。

研究表明,慢性乙型肝炎患者外周血CD4⁺CD25⁺调节性T细胞表达水平较正常人明显增高^[10],其机制可能与免疫耐受有关^[11]。此外,ITP发病时外周血CD4⁺CD25⁺调节性T细胞表达水平较正常人明显降低^[12],其机制与免疫调节紊乱有关^[13]。本研究结果显示CD4⁺CD25⁺调节性T细胞在HBV感染并发血小板减少患者外周血中比例与正常人无明显差异。本病既有HBV感染,又符合ITP的诊断,因此我们的研究结果表明可能是乙肝病毒感染相关免疫耐受与ITP相关免疫调节异常共同作用的结果,其发病可能存在较复杂的免疫紊乱。研究发现,经抗乙肝病毒治疗后慢性乙型肝炎患者外周血CD4⁺CD25⁺表达水平可逐渐下降,甚至恢复正常^[14]。而经免疫调节治疗后,ITP患者外周血CD4⁺CD25⁺表达水平可明显升高,并可恢复正常^[15,16]。因此,CD4⁺CD25⁺调节性T细胞在HBV感染并发血小板减少患者的表达水平与患者的病情、免疫状态,及与抗乙肝病毒治疗和免疫调节治疗的关系,值得进一步研究。

参考文献:

- [1] Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses[J]. Ann Rev Immunol, 2004, 22 (3): 531-562.
- [2] 王彦,王笑蕾. 乙型肝炎病毒与血小板减少症的相关性分析[J]. 中国误诊学杂志, 2009, 9(22): 5395. Wang Y, Wang XL. Correlation analysis between hepatitis B virus and thrombocytopenia[J]. Chinese Journal of Misdiagnosis, 2009, 9(22): 5395.
- [3] 袁宏,郝尧,毛小荣,等. 63例慢性肝病合并血小板减少症患者血小板生成素水平及其临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(11): 1036-1037. Yuan H, Hao R, Mao XR, et al. Level of thrombocytopenia in 63 patients with chronic liver disease complicated with thrombocytopenia and its clinical significance[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2008, 29(11): 1036-1037.

- [4] Pradella P, Bonetto S, Turchetto S, et al. Platelet production and destruction in liver cirrhosis[J]. J Hepatol, 2011, 54(5): 894-900.
- [5] 郭振兴, 季林祥, 段毅力, 等. 干扰素治疗肝炎病毒相关性血小板减少症[J]. 临床血液学杂志, 2008, 21(5): 229-232.
- Guo ZX, Ji LX, Duan YL, et al. Interferon alpha for the treatment of patients with hepatitis virus related thrombocytopenia[J]. Journal of Clinical Hematology, 2008, 21(5): 229-232.
- [6] 崔文娟, 朱凤群. 慢性乙型肝炎肝硬化血小板减少影响因素的研究进展[J]. 实用肝脏病杂志, 2010, 13(1): 78-80.
- Cui WJ, Zhu FQ. Research progress on influencing factors of thrombocytopenia in patients with chronic hepatitis B cirrhosis[J]. Journal Clinical Hepatology, 2010, 13(1): 78-80.
- [7] 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 expert on diagnosis and treatment of adult primary immune thrombocytopenia (version 2016) [J]. Chinese Journal of Hematology, 2016, 37(2): 89-93.
- [8] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2015年更新版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2015, 31(12): 1941-1960.
- Chinese Society of Hematology and Chinese Society of Infectious Diseases, Chinese Medical Association. The guideline of prevention and treatment for chronic hepatitis B; 2015 update version [J]. Journal of Clinical Hepatology, 2015, 31(12): 1941-1960.
- [9] 李 贝, 李从荣. 病毒性肝炎血液学变化的研究进展[J]. 临床血液学杂志, 2009, 22(7): 391-393.
- Li B, Li CR. Advances in the study hematological changes in viral hepatitis [J]. Journal of Clinical Hematology, 2009, 22(7): 391-393.
- [10] 沈俊辉, 李 宁, 范学工. 慢性乙型肝炎患者 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞的检测及意义[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(26): 2790-2795.
- Shen JH, Li N, Fan XG. Significance of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in peripheral blood of chronic hepatitis B patients [J]. World Chinese Journal of Digestology, 2007, 15(26): 2790-2795.
- [11] 田 瑛. HBV 感染: 宿主细胞免疫应答与临床转归 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2006.
- Tian Y. HBV infection: Host's cellular response and clinical outcomes [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2006 年.
- [12] 孟亚红, 孙丽华. CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞在 ITP 患者中的表达及与临床预后的相关性[J]. 浙江临床医学, 2017, 19(3): 446-448.
- Meng YH, Sun LH. Expression of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in ITP patients and its correlation with clinical prognosis [J]. Zhejiang Clinical Medical Journal, 2017, 19(3): 446-448.
- [13] 郭小嫚, 李建厂. CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞在免疫性血小板减少性紫癜发病机制中的作用[J]. 国际儿科学杂志, 2016, 43(8): 622-625.
- Guo XM, Li JC. CD4⁺ CD25⁺ regulatory T lymphocytes in the role of the pathogenesis of immune thrombocytopenic purpura [J]. International Journal of Pediatrics, 2016, 43(8): 622-625.
- [14] 肖影群, 黄 波, 陈川英, 等. 抗病毒治疗对慢性乙肝患者的 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 调节 T 细胞的影响及其临床病理意义 [C]. 贵阳全国免疫学学术大会分会场交流报告, 2015.
- Xiao YQ, Huang B, Chen CY, et al. Effect of antiviral therapy on CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells in patients with chronic hepatitis B and its clinicopathological significance [C]. Exchange Report of the National Conference on Immunology, 2015.
- [15] 赵海丰, 张翼鹭. CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞在免疫性血小板减少症发病中的研究进展[J]. 天津医药, 2014, 42(4): 390-392.
- Zhao HF, Zhang YZ. Recent research in role of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell in pathogenesis of immune thrombocytopenia [J]. Tianjin Medical Journal, 2014, 42(4): 390-392.
- [16] 闫 莉, 邵宗鸿. 调节性 T 细胞体外扩增和免疫治疗研究进展[J]. 中国实验血液学杂志, 2015, 23(2): 562-567.
- Yan L, Shao ZH. Advances in ex vivo expansion and immunotherapy application of regulatory T cells [J]. Journal of Experimental Hematology, 2015, 23(2): 562-567.
- 收稿日期: 2018-05-13 修回日期: 2018-06-15
- (上接 66 页) Medical University, 2014: 1-133.
- [13] 王 伟, 胡豫杰, 徐 进, 等. 鼠伤寒沙门菌婴幼儿分离株耐药基因及毒力基因研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2016, 28(5): 567-575.
- Wang W, Hu YJ, Xu J, et al. Analysis of antibiotic resistance genes and virulence genes in *Salmonella typhimurium* isolated from fecal samples of children under 5 year old by whole genome sequencing [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2016, 28(5): 567-575.
- 收稿日期: 2018-03-30 修回日期: 2018-06-29