

儿童免疫性血小板减少症患者 外周血 B 淋巴细胞亚群变化的研究*

刘纯岳, 方俊粤, 林帝金, 鲍蕴文, 陆晓红, 林向华
(中山大学孙逸仙纪念医院检验科, 广州 510120)

摘要:目的 探讨儿童免疫性血小板减少症患者(immune thrombocytopenia, ITP)外周血中 CD38, CD27, CD19 表达阳性的 B 淋巴细胞亚群的变化及临床意义。方法 选取 2017 年 1 月~12 月中山大学孙逸仙纪念医院收治的初诊 ITP 患儿 21 例为初诊未治疗组(untreated ITP, U-ITP), 完全缓解 ITP 患儿 30 例为完全缓解组(remission ITP, R-ITP)及同期健康体检儿童 26 例为健康对照组(normal control, NC), 运用流式细胞术对其外周血 B 淋巴细胞亚群进行检测并与 ITP 患儿的 PLT 计数进行相关性分析。结果 外周血总 CD19⁺B 淋巴细胞比例: U-ITP 组显著高于 R-ITP 组和 NC 组($F=7.543, P<0.01$)。外周血 CD19⁺CD27⁺CD38⁺记忆性 B 细胞占 CD19⁺B 细胞百分率: U-ITP 组显著高于 R-ITP 组和 NC 组($F=8.876, P<0.001$)。CD19⁺CD27⁺CD38⁺初始 B 细胞占 CD19⁺B 细胞百分率: U-ITP 组显著低于 R-ITP 组和 NC 组($F=5.058, P<0.01$)。CD19⁺CD27⁺CD38⁺浆母细胞百分率: U-ITP 组显著高于 R-ITP 组和 NC 组($F=9.588, P<0.001$), 而 R-ITP 组与 NC 组比较, B 淋巴细胞各亚群差异均无统计学意义($F=0.842\sim 1.258$, 均 $P>0.05$)。PLT 计数与总 CD19⁺B 细胞百分率呈负相关($r=-0.318, P=0.007$), 与 CD19⁺CD27⁺CD38⁺记忆性 B 细胞百分率呈负相关($r=-0.444, P=0.000$), 与 CD19⁺CD27⁺CD38⁺初始 B 细胞百分率呈正相关($r=0.416, P=0.000$), 与 CD19⁺CD27⁺CD38⁺浆母细胞百分率呈负相关($r=-0.442, P=0.000$)。结论 B 淋巴细胞亚群在 ITP 患儿体内分布存在异常, 其检测能够为 ITP 患儿临床疾病监测与判断预后提供重要的指导作用。

关键词:免疫性血小板减少症; B 淋巴细胞亚群; CD38; CD27; CD19

中图分类号: R558.2; R392.11 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2018)06-059-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2018.06.015

B Lymphocyte Subsets in Peripheral Blood of Patients with Pediatric Immune Thrombocytopenia

LIU Chun-yue, FANG Jun-yue, LIN Di-jin, BAO Yun-wen, LU Xiao-hong, LIN Xiang-hua
(Department of Clinical Laboratory,
Sun Yat-Sen Memorial Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: **Objective** To investigate the change and clinical significance of B lymphocyte subsets marked by CD38, CD27 and CD19 in peripheral blood of pediatric patients with immune thrombocytopenia. **Methods** A total of 51 ITP patients (21 patients were newly diagnosed and untreated, 30 patients were in remission) were collected from January 2017 to December 2017 in Sun Yat-Sen Memorial Hospital, and 26 normal controls were enrolled in this study. The abnormal of B lymphocyte subsets in peripheral blood of research cohort were detected by flow cytometry and their correlations with platelet count were analyzed. **Results** The percentage of total CD19⁺B cells of untreated ITP patients was significantly higher than that of remission ITP patients and normal controls ($F=7.543, P<0.01$). The percentage of memory B cells in CD19⁺B cells of untreated ITP patients was significantly higher than that of remission ITP patients and normal controls ($F=8.876, P<0.001$). The percentage of naive B cells in CD19⁺B cells of untreated ITP patients was significantly lower than that of remission ITP patients and normal controls ($F=5.058, P<0.01$). The percentage of plasmablasts cells of untreated ITP patients was significantly higher than that of remission ITP patients and normal controls ($F=9.588, P<0.001$). There was no significant difference in B lymphocyte subsets between remission ITP patients and the normal controls ($F=0.842\sim 1.258$, all $P>0.05$). The PLT count had significantly negative correlation with the percentage of total CD19⁺B cells ($r=-0.318, P=0.007$), memory B cells ($r=-0.444, P=0.000$), plasmablasts cells ($r=-0.442, P=0.000$) and had significantly positive correlation with naive B cells ($r=0.416, P=0.000$). **Conclusion** The distribution of B lymphocyte subsets was abnormal in ITP patients. The detection of B lymphocyte subsets can be used as a useful indicator of clinical disease surveillance and prognosis in ITP patients.

* 作者简介: 刘纯岳(1986—), 男, 本科, 检验技师, 主要从事生物化学及免疫方面的工作及研究, E-mail: 738703822@qq.com。
通讯作者: 林向华, E-mail: 13826068632@163.com。

Keywords: immunological thrombocytopenia; B lymphocyte subsets; CD38; CD27; CD19

免疫性血小板减少症 (immune thrombocytopenia, ITP) 是一种适应性自身免疫性出血性疾病, 通常被认为是一种儿童型良性疾病, 在 15 岁以下儿童中发病率为 2~5 人/10 万^[1]。近期有研究指出 ITP 可能与内源性 B 细胞功能亢进有关, 从而产生多种特异性的抗体, 包括针对血小板 (platelet, PLT) 的抗体^[2], 这有可能也是 ITP 的潜在发病机制之一。ITP 患儿体内 B 淋巴细胞亚群的不同分化状态在疾病的发生发展中可能发挥着较为重要的作用, 而目前 B 淋巴细胞亚群在儿童 ITP 中的变化国内外研究较少, 本研究拟通过 ITP 患儿外周血中 B 淋巴细胞亚群的变化, 探索 ITP 患儿的免疫机制, 为临床 ITP 的诊治、监测及判断预后提供依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取 2017 年 1~12 月中山大学孙逸仙纪念医院收治的 ITP 患儿 51 例, ITP 患儿诊断标准符合文献^[3]。其中初诊未治疗 (U-ITP) 患儿以 ITP 诊断收治入院, 主要以发热、皮肤瘀点、瘀斑为主要临床症状, 所有病例中并未发现内脏及颅内出血。体格检查与影像学检查并未见明显异常。所有病例血细胞形态无异常, 并未经过免疫性治疗, 进行 EB 病毒相关抗体检测且均为阴性, 均排除其他继发性血小板减少症, 如低增生性白血病、以 PLT 减少为首发血液学异常的再生障碍性贫血、遗传性血小板减少症、继发于其他免疫性疾病, 以及感染和药物因素等。纳入本研究的 ITP 患儿均使用糖皮质激素 (2 mg/kg/d), 根据病情严重程度, 部分患者加用丙种球蛋白 (400 mg/kg/d×5d)。完全缓解 ITP (R-ITP) 患儿符合 ITP 预后标准, $PLT \geq 100 \times 10^9/L$, 并且增加不少于基础 PLT 的 2 倍, 且无出血表现^[3]。其中初诊未治疗组 (untreated ITP, U-ITP) 患儿 21 例, 男性 12 例, 女性 9 例, 中位年龄 4 岁 (1~9 岁), 均未接受免疫性治疗, $PLT < 100 \times 10^9/L$; 完全缓解组 (remission ITP, R-ITP) 患儿 30 例, 男性 16 例, 女性 14 例, 中位年龄 6 岁 (1~12 岁), 均接受过免疫性治疗, $PLT \geq 100 \times 10^9/L$, 且脱离输血支持; 同期健康体检儿童组 (normal control, NC) 25 例, 男性 10 例, 女性 9 例, 中位年龄 6 岁 (2~13 岁)。各组年龄、性别差异均无统计学意义 ($F=5.112 \sim 8.624$, 均 $P>0.05$)。

1.2 试剂与仪器 FITC 标记的小鼠抗人 CD38 单克隆抗体、PE 标记的小鼠抗人 CD27 单克隆抗体、PC5 标记的小鼠抗人 CD19 单克隆抗体、PC7

标记的小鼠抗人 CD45 单克隆抗体, 各抗体同型对照、溶血素均购自美国 Beckman Coulter 公司。流式细胞仪为 Navios Flow Cytometer, 美国 Beckman Coulter 产品。

1.3 方法 50 μl 新鲜外周血中加入 10 μl FITC 标记的 CD38 抗体、5 μl PE 标记的 CD27 抗体、5 μl PC5 标记的 CD19 抗体和 5 μl PC7 标记的 CD45 抗体, 避光孵育 15 min。加入 500 μl 溶血素, 避光 10 min。402×g 离心 5min, 弃上清, 500 μl 磷酸盐缓冲液 (PBS) 震荡混匀, 再次离心, 弃上清, 加入 500 μl PBS 重悬细胞, 制成所需的单细胞悬液后上机检测。应用 Beckman Coulter 公司的 Kaluza Analysis 流式分析软件对获取的数据进行分析。首先在 CD45/SSC 散点图上圈选淋巴细胞, 在淋巴门下以 CD19/SSC 散点图上圈选 CD19⁺ 细胞为总 B 淋巴细胞群体; 然后在 CD38/CD27 散点图上分析 CD19⁺ B 细胞中各亚群的分布情况。

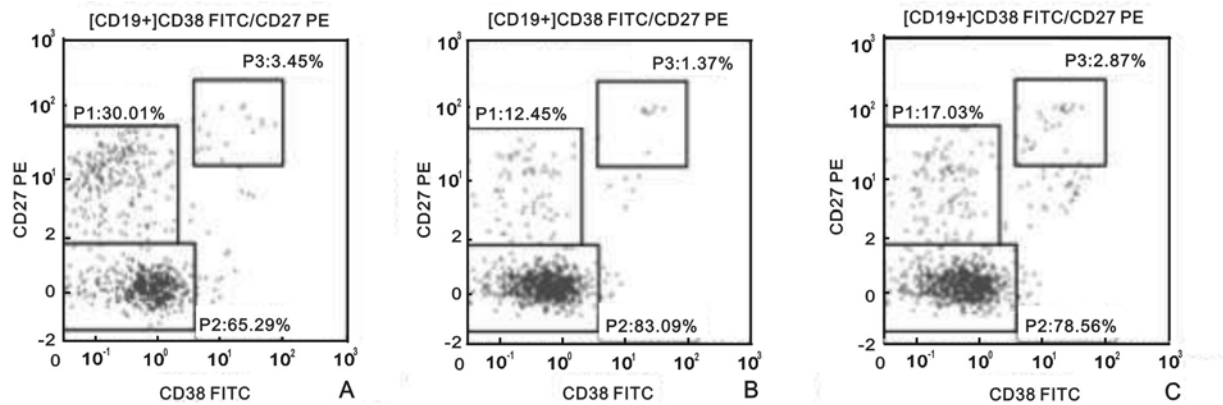
1.4 统计学分析 使用 SPSS 22.0 统计软件, 计量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 其中 PLT, 年龄以中位数表示, 多组间均数的比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA)。相关分析采用 Pearson 相关性分析。采用 GraphPad Prism 7.03 作图。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流式结果分析 见图 1。U-ITP 患儿、R-ITP 和 NC 外周血 B 淋巴细胞亚群流式分析图; 精确设门下的不同 B 细胞亚群的表面抗原表达为初始 B 细胞 (CD19⁺CD27⁻CD38⁻)、记忆 B 细胞 (CD19⁺CD27⁺CD38⁻) 和浆母细胞 (CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺)。

2.2 U-ITP, R-ITP 及 NC 的 B 淋巴细胞亚群表达情况比较 见表 1。U-ITP 与 R-ITP 及 NC 相比, 总 CD19⁺ B 细胞、记忆 B 细胞和浆母细胞的百分率升高, 差异有统计学意义 ($F=7.543 \sim 9.588$, $P<0.001$)。初始 B 细胞百分率降低, 差异有统计学意义 ($F=5.058$, $P<0.01$)。R-ITP 与 NC 相比, B 淋巴细胞各分群差异均无统计学意义 ($F=0.842 \sim 1.258$, 均 $P>0.05$)。

2.3 ITP 患儿 PLT 计数与 B 淋巴细胞亚群相关性分析 ITP 患儿 PLT 计数与总 CD19⁺ B 细胞百分率呈负相关, 与记忆 B 细胞百分率呈负相关, 与浆母细胞百分率呈负相关, 与初始 B 细胞百分率呈正相关, 差异均有统计学意义 ($r=0.444 \sim 0.318$, $P<0.05$)。



注: A 图为 U-ITP B 淋巴细胞亚群流式分析图; B 图为 R-ITP B 淋巴细胞亚群流式分析图; C 图为 NC B 淋巴细胞亚群流式分析图。
P1: 记忆 B 细胞; P2: 初始 B 细胞; P3: 浆母细胞。

图 1 U-ITP, R-ITP 及 NC 的 B 淋巴细胞亚群流式分析图

项 目	U-ITP(<i>n</i> =21)	R-ITP(<i>n</i> =30)	NC(<i>n</i> =26)	<i>F</i>	<i>P</i>
年龄(岁)	4(1~9)	6(1~12)	5(3~13)	5.112	0.127
性别(男/女)	12/9	16/14	12/14	8.624	0.348
PLT 计数($\times 10^9/L$)	14(3~28) ^a	207(113~361) ^{bc}	254(169~433)	4.526	0.007
红细胞计数($\times 10^{12}/L$)	4.75 \pm 0.72	4.83 \pm 0.39	4.21 \pm 0.41	2.147	0.642
白细胞计数($\times 10^9/L$)	9.13 \pm 3.48	8.72 \pm 3.90	8.24 \pm 1.53	1.324	0.742
血红蛋白(g/L)	121.71 \pm 19.11	128.65 \pm 13.01	130.44 \pm 9.56	1.248	0.554
总 CD19 ⁺ B 细胞(%)	22.99 \pm 6.05 ^a	16.86 \pm 5.30 ^b	18.03 \pm 4.03	7.543	0.002
记忆 B 细胞(%)	23.87 \pm 5.56 ^a	19.00 \pm 7.38 ^b	16.72 \pm 3.35	8.876	0.000
初始 B 细胞(%)	68.38 \pm 5.17 ^a	73.57 \pm 7.69 ^b	74.57 \pm 5.52	5.058	0.007
浆母细胞(%)	4.95 \pm 3.82 ^a	2.15 \pm 1.03 ^b	1.88 \pm 1.61	9.588	0.000

注: 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示; ^a 表示 NC 与 U-ITP 比较, $P < 0.05$; ^b 表示 U-ITP 与 R-ITP 比较, $P < 0.05$; ^c 表示 R-ITP 与 NC 比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论 根据相关文献, ITP 的发病机制被证实是复杂多样的, 涉及多种免疫功能上的异常, 如产生血小板生成素或血小板生成素受体等自身抗体^[4], 细胞毒性 T 淋巴细胞介导的血小板溶解^[5], T 辅助细胞反应平衡的失调^[6,7], 调节性 T 细胞亚群减少或功能失调^[8], 细胞因子分泌失调^[9]等。在这些病理因素中, 对产生血小板抗原特异性自身抗体的自体反应性 B 细胞的研究仍处于初级阶段。B 细胞的发育分化是一个有序的过程, 初始 B 细胞被从骨髓运送到脾脏后, B 细胞受体信号促使初始 B 细胞继续发育, 最后成熟定居于淋巴滤泡, 成熟 B 细胞在受到抗原刺激后分化为记忆性 B 细胞和浆细胞。近年来, B 细胞在 ITP 发病机制中的作用日益受到重视。

最近有研究表明, 急性 ITP 患者与健康对照组相比, 其总 CD19⁺ B 细胞的百分率是明显升高的^[10]。本研究显示, ITP 初诊组患儿 CD19⁺ B 升高, 与文献报道一致, 其原因可能与 B 淋巴细胞过度增殖和凋亡减少有关^[11]。有研究发现脾脏对维持 ITP 患者中的外周血记忆 B 细胞稳态是必不可

少的, 这反映在脾切除的 ITP 患者中总 CD19⁺ CD27⁺ 记忆 B 细胞数量的减少^[12]。此外, Lyu 等^[13]发现 ITP 患者循环 CD27⁺ 记忆 B 细胞的百分率升高和 CD27⁻ 初始 B 细胞的百分率下降。这些研究表明, ITP 患者中 B 淋巴细胞亚群的分布的确存在异常。本研究根据 CD38, CD27, CD19 三个指标将人外周血 B 细胞大致分为初始 B 细胞、记忆 B 细胞和浆母细胞三个亚群, 结果显示 U-ITP 相比 R-ITP 和 NC 组, 外周血总 CD19⁺ B 细胞、记忆 B 细胞和浆母细胞明显升高, 而初始 B 细胞则明显降低, 差异均具有统计学意义, 经过免疫性治疗后 B 淋巴细胞亚群的变化趋于正常范围, 与上述研究结果一致。初始 B 细胞分化为记忆 B 细胞, 本研究初始 B 细胞在 U-ITP 中比例明显降低, 而记忆 B 细胞比例明显升高, 可能是由于记忆 B 细胞的过量产生导致初始 B 细胞消耗过多。CD27⁺ 记忆 B 细胞, 可快速分化成抗原依赖性和非抗原依赖的浆母细胞, 具有抗原递呈、分泌细胞因子等功能, 可提高机体自身免疫性^[14,15]。记忆 B 细胞的产生时间具有一定的滞后性, 浆母细胞由记

忆B细胞最终分化而来,前者可产生大量不同类型的自身抗体,造成组织损伤。所以记忆B细胞及浆母细胞比例的增加可能是ITP发病机制及疾病进展的重要因素。而Warnatz等^[16]发现ITP患者的外周血记忆B细胞的百分率是减少的。其原因可能因为本研究主要研究对象是儿童患者,选择的B细胞表面标记不完全一致。本研究还发现ITP患儿U-ITP组的PLT计数与总CD19⁺B细胞百分率、记忆性B细胞百分率、浆母细胞百分率均呈负相关,与初始B细胞百分率则呈正相关。提示ITP患儿外周血PLT计数的变化与ITP发病及疾病进展相关。此外,尽管我们的数据具有显著统计学差异,但研究中的样本数据偏少,未来还需要增加病例数进一步研究证实我们的结论。

综上所述,本研究通过检测ITP患儿外周血B淋巴细胞亚群,发现B淋巴细胞亚群在ITP患儿体内分布存在异常,提示B淋巴细胞亚群的变化在ITP疾病的发生和发展中可能发挥着重要作用,可以为临床疾病监测及判断预后提供重要参考依据。

参考文献:

- [1] Glanz J, France E, Xu S, et al. A population-based, multisite cohort study of the predictors of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura in children[J]. *Pediatrics*, 2008, 121(3): e506-512.
- [2] Giordano P, Cascioli S, Lassandro G, et al. B-cell hyperfunction in children with immune thrombocytopenic purpura persists after splenectomy[J]. *Pediatric Research*, 2016, 79(2): 262-270.
- [3] 中华医学会儿科学分会血液学组,《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童原发性免疫性血小板减少症诊疗建议[J]. *中华儿科杂志*, 2013, 51(5): 382-384.
The Subspecialty Group of Hematology, The Society of Pediatrics, Chinese Medical Association, The Editorial Board, Chinese Journal of Pediatrics. Recommendations for diagnosis and treatment of primary immune thrombocytopenia in children[J]. *Chinese Journal of Pediatrics*, 2013, 51(5): 382-384.
- [4] Nazy I, Kelton JG, Moore JC, et al. Autoantibodies to thrombopoietin and the thrombopoietin receptor in patients with immune thrombocytopenia[J]. *British Journal of Haematology*, 2018, 181(suppl 1): 234-241.
- [5] Olsson B, Andersson PO, Jernas M, et al. T-cell-mediated cytotoxicity toward platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura[J]. *Nat Med*, 2003, 9(9): 1123-1124.
- [6] Panitsas FP, Theodoropoulou M, Kouraklis A, et al. Adult chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) is the manifestation of a type-1 polarized immune response[J]. *Blood*, 2004, 103(7): 2645-2647.
- [7] Rocha AM, Souza C, Rocha GA, et al. The levels of IL-17A and of the cytokines involved in Th17 cell commitment are increased in patients with chronic immune thrombocytopenia[J]. *Haematologica*, 2011, 96(10): 1560-1564.
- [8] Stasi R, Cooper N, Del Poeta G, et al. Analysis of regulatory T-cell changes in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura receiving B cell-depleting therapy with rituximab[J]. *Blood*, 2008, 112(4): 1147-1150.
- [9] Jernas M, Hou Y, Stromberg Celind F, et al. Differences in gene expression and cytokine levels between newly diagnosed and chronic pediatric ITP[J]. *Blood*, 2013, 122(10): 1789-1792.
- [10] Zhu XJ, Shi Y, Zhang F, et al. Reduced tumour necrosis factor receptor superfamily 13C inversely correlated with tumour necrosis factor superfamily 13B in patients with immune thrombocytopenia[J]. *British Journal of Haematology*, 2014, 166(5): 783-791.
- [11] Kim Y, Ryu J, Ryu MS, et al. C-reactive protein induces G2/M phase cell cycle arrest and apoptosis in monocytes through the up regulation of B-cell translocation gene 2 expression[J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(4): 625-631.
- [12] Martinez-Gamboa L, Mei H, Loddenkemper, et al. Role of the spleen in peripheral memory B-cell homeostasis in patients with autoimmune thrombocytopenia purpura[J]. *Clinical Immunology*, 2009, 130(2): 199-212.
- [13] Lyu M, Hao Y, Li Y, et al. Upregulation of CD72 expression on CD19⁺ CD27⁺ memory B cells by CD40L in primary immune thrombocytopenia[J]. *British Journal of Haematology*, 2017, 178(2): 308-318.
- [14] Dorner T. Crossroads of B cell activation in autoimmunity: rationale of targeting B cells[J]. *The Journal of Rheumatology Supplement*, 2006, 77(3): 3-11.
- [15] Roll P, Palanichamy A, Kneitz C, et al. Regeneration of B cell subsets after transient B cell depletion using anti-CD20 antibodies in rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis and Rheumatism*, 2006, 54(8): 2377-2386.
- [16] Warnatz K, Denz A, Dräger R, et al. Severe deficiency of switched memory B cells [CD27(+) IgM(-) IgD(-)] in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease[J]. *Blood*, 2002, 99(5): 1544-1551.