

儿童慢性 ITP 外周血 CD3⁺T 细胞活性氧的检测及临床意义

宋 丽¹, 杜宁超², 李富荣¹ (1. 深圳市人民医院转化医学协同创新中心, 广州 深圳 518020;
2. 深圳市第二人民医院肛肠外科, 广州 深圳 518035)

摘要: 目的 探讨儿童慢性特发性血小板减少性紫癜 (Idiopathic thrombocytopenic purpura, ITP) 外周血 CD3⁺T 细胞中活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 含量及其与血小板的关系, 为临床诊断和治疗提供依据。方法 随机收集 30 例慢性 ITP 患儿外周血为试验组, 30 例健康儿童外周血为对照组, 用流式细胞术检测外周血 CD3⁺T 细胞和 ROS 平均荧光强度, 进行统计学分析。结果 试验组 CD3⁺T 细胞 ROS 平均荧光强度 (15.98 ± 5.78) 明显高于对照组 ROS 平均荧光强度 (4.65 ± 1.03), 两组间 ROS 的差异有统计学意义 ($t=2.956$, $P < 0.05$); 试验组 CD3⁺T 细胞 ROS 与血小板成负性相关关系。结论 慢性 ITP 患儿外周血 CD3⁺T 细胞的 ROS 明显高于对照组, 说明 ROS 可以为儿童慢性 ITP 的诊断及治疗提供一定的参考依据。

关键词: 儿童; 特发性血小板减少性紫癜 (ITP); CD3⁺T 细胞; 活性氧 (ROS)

中图分类号: R725.5; R392.11 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2020) 06-144-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.035

Detection and Clinical Significance of CD3⁺ T Cell Reactive Oxygen Species in Peripheral Blood of Children with Chronic ITP

SONG Li¹, DU Ning-chao², LI Fu-rong¹

(1. Collaborative Innovation Center of Translational Medicine, Shenzhen People's Hospital, Guangzhou Shenzhen 518020, China; 2. Anorectal Surgery, the Second People's Hospital of Shenzhen, Guangzhou Shenzhen 518035, China)

Abstract: **Objective** To investigate the content of reactive oxygen species (ROS) in peripheral blood CD3⁺ T cells of children with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) and its relationship with platelets, so as to provide basis for clinical diagnosis and treatment. **Methods** Peripheral blood from 30 children with chronic ITP was randomly collected as the experimental group and 30 healthy children as the control group. The mean fluorescence intensity of CD3⁺ T cells and ROS in peripheral blood was detected by flow cytometry and analyzed statistically. **Results** The mean fluorescence intensity of ROS in CD3⁺ T cells in chronic ITP group (15.98 ± 5.78) was significantly higher than that in normal control group (4.65 ± 1.03), and the difference in ROS between the two groups was statistically significant ($t = 2.956$, $P < 0.05$). There was a negative correlation between ROS of CD3⁺ T cells and platelet formation in the experimental group. **Conclusion** The ROS of CD3⁺ T cells in peripheral blood of children with chronic ITP was significantly higher than that of control group, indicated that ROS can provide some reference for the diagnosis and treatment of chronic ITP in children.

Keywords: children; idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP); CD3⁺ T cells; reactive oxygen species (ROS)

特发性血小板减少性紫癜 (idiopathic thrombocytopenic purpura, ITP) 是一种原因不明的自身免疫病, 以血小板和巨核细胞自身抗体产生及成熟血小板破坏增多为主要病理特征, 以及因此引起的皮肤、黏膜或内脏出血为主要临床症状的一类血液系统疾病^[1]。ITP 患儿体内有 T 细胞、B 细胞等的激活, 白细胞分化抗原如 CD3⁺ (cluster differentiation, CD) T 细胞等。细胞活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 主要在线粒体中产生^[2], 具有较强的氧化能力^[3]。总之, 大量产生的 ROS 对许多先天免疫细胞杀死吞噬的病原体至关重要^[4]。在病理因素的诱导下这些吞噬细胞可以产生大量的 ROS, 吞噬细胞

产生的 ROS 可以到达 T 细胞并导致氧化应激。在儿童慢性 ITP 中, CD3⁺ T 细胞的 ROS 含量及其与儿童慢性 ITP 的关系尚不明确。本研究以慢性 ITP 患儿及正常儿童的外周血为研究对象, 分离外周血 CD3⁺ T 细胞来检测其 ROS 的表达含量及 ITP 与 ROS 的关系, 并探讨了 ROS 作为 ITP 潜在诊断靶标的应用价值。

1 材料与方法

1.1 研究对象 见表 1。收集我院 2018 年 1 月 ~ 2019 年 12 月 30 例慢性 ITP 患儿外周血为试验组, 其中男童 14 例, 女童 16 例, 年龄 5.3 ± 2.6 岁, 诊断标准参考 2016 年版 ITP 诊治的中国专家共识指南;

作者简介: 宋丽 (1979-), 女, 医学硕士, 中级检验医师, 研究方向: 血液病及肠道菌群的相关生化和临床的研究, E-mail: 158987215@qq.com。

通讯作者: 李富荣 (1962-), 男, 医学博士, 研究员, 主任技师, 博士生导师, 研究方向: 干细胞与细胞治疗工程技术的研发, E-mail: ffr62@163.com。

杜宁超 (1978-), 男, 医学博士, 副主任医师, 研究方向: 肠道菌群与结直肠相关疾病的研究, E-mail: dncn12008@163.com。

对照组为同期经临床和实验室检查,证明无疾病的健康体检儿童外周血30例,其中男童13例,女童17例,年龄 5.4 ± 2.0 岁。

表1 儿童慢性ITP组和对照组一般资料比较($\bar{x} \pm s$)

类别	慢性ITP组 (n=30)	正常对照组 (n=30)	P
体重指数(kg/m ²)	18.3 ± 1.7	17.6 ± 2.2	0.32
心率(次/min)	85 ± 7	81 ± 8	0.27
体温(℃)	37.2 ± 0.6	37.1 ± 0.8	0.85
呼吸频率(次/min)	17 ± 3	18 ± 2	0.67

1.2 主要试剂和仪器 人CD3⁺T Cell Enrichment Column(美国BD公司), anti-CD3-FITC, MsIgG1-FITC, D-Hanks缓冲液(美国Sigma公司), 淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品有限公司), 2g/dl 台盼蓝染液、PBS缓冲液(pH7.2~pH7.6)(自配), 红细胞裂解液(美国ThermoFisher公司), 胎牛血清(FBS)(杭州四季清公司), BD-LSRFortessa(BD Biosciences), LD5-2A型低速水平离心机(北京医用离心机厂), 电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂), 微量加样器(德国Eppendorf公司)。

1.3 研究方法

1.3.1 外周血CD3⁺T细胞纯度和活性检测:为了验证所提取的CD3⁺T细胞的活性和纯度^[5],我们按如下方法操作:①取慢性ITP患儿及对照组静脉血4ml抗凝, Hanks液稀释1倍,再加入淋巴细胞分离液中。②2000 r/min离心30min,液体分为三层,吸取上层和中间液界面处乳白色液体即为单核细胞。③该单核细胞37℃孵育30min,淋巴细胞悬浮,单核细胞贴壁,吸取悬浮液为纯化的淋巴细胞。④Hanks液稀释此淋巴液5倍,1500 r/min离心10min,弃上清液再裂解红细胞,弃上清。⑤经T淋巴细胞分离柱(CD3⁺T cell enrichment column)过滤,得到纯化的T淋巴细胞悬液。⑥1500 r/min离心10min, Hanks液重悬并细胞计数,计数后加入FBS调整CD3⁺T细胞浓度至 2×10^6 /ml。

CD3⁺T细胞纯度检测:取细胞悬液100 μl,加2 μl FITC标记的CD3⁺T细胞单克隆抗体,充分混匀,4℃避光60 min, PBS洗涤并离心2次,加入200 μl 缓冲液,上流式细胞仪检测。

CD3⁺T细胞活性检测:取20 μl 细胞悬液加入20 μl 2g/dl 台盼蓝染液,轻轻吹打均匀,加盖玻片,高倍显微镜镜检,正常活细胞不着色,折光强;死亡细胞被台盼蓝染成蓝色,体积膨大,据此计数判断CD3⁺T细胞的活性。

1.3.2 流式细胞术(flow cytometry, FC)检测外周血CD3⁺T细胞ROS:按试剂盒说明书操作,用FC检测CD3⁺T细胞ROS^[6]。具体操作步骤如下:①荧光探针检测;②样品处理;③DCFH-DA(活性氧检测试剂)标记及检测;④上流式机检测分析。DCFH-DA的荧光光谱和FITC非常相似,用FITC的参数设置检测DCFH-DA。

1.4 统计学分析 所有数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用GraphPad Prism 5.0软件作图, SPSS 21.0(SPSS Inc, Chicago, IL)软件进行统计学分析。组间计量资料比较采用双尾Students *t*检验,组间性别差异比较用卡方检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患儿血细胞检测结果 见表2。两组患儿的血细胞检测,发现除血小板有明显差异外($t=3.58$, $P<0.05$),其他血细胞检测指标差异均无统计学意义($t=0.89\sim1.20$, 均 $P>0.05$)。

表2 儿童慢性ITP组和对照组血常规比较($\bar{x} \pm s$)

检测指标	慢性ITP组 (n=30)	正常对照组 (n=30)	P
白细胞($\times 10^9$ /L)	6.1 ± 2.0	6.7 ± 2.8	0.24
红细胞($\times 10^{12}$ /L)	4.5 ± 0.4	6.7 ± 0.7	0.11
血红蛋白(g/L)	133 ± 11	156 ± 9	0.09
血小板($\times 10^9$ /L)	25.5 ± 12.2	186.1 ± 14.7	0.007

2.2 T细胞存活率和纯度检测结果 我们运用FC检测CD3⁺T细胞悬液纯度,镜下计数测得两组T细胞悬液试验组和对照组外周血T细胞纯度分别为 $95.6\% \pm 2.4\%$, $96.5\% \pm 1.3\%$;两组的T细胞的存活率分别为 $97.3\% \pm 1.6\%$, $96.0\% \pm 1.8\%$ 。两组的T细胞纯度和存活率之间无统计学意义。

2.3 外周血CD3⁺T细胞及其ROS 与正常对照组相比,试验组外周血CD3⁺T细胞数量明显增加,差异有统计学意义($t=2.70$, $P < 0.05$),见图1。运用FC检测CD3⁺T细胞的ROS水平,与正常对照组相比,慢性ITP患者外周血相同数量CD3⁺T细胞ROS的水平明显增高,差异有统计学意义($t=2.45$, $P < 0.05$),见图2。FC检测CD3⁺T细胞ROS的变化试验组平均荧光强度(Mean fluorescence intensity, MFI)为 15.98 ± 5.78 ,对照组为 4.65 ± 1.03 ,差异有统计学意义($t=2.956$, $P=0.003$)。见图3。

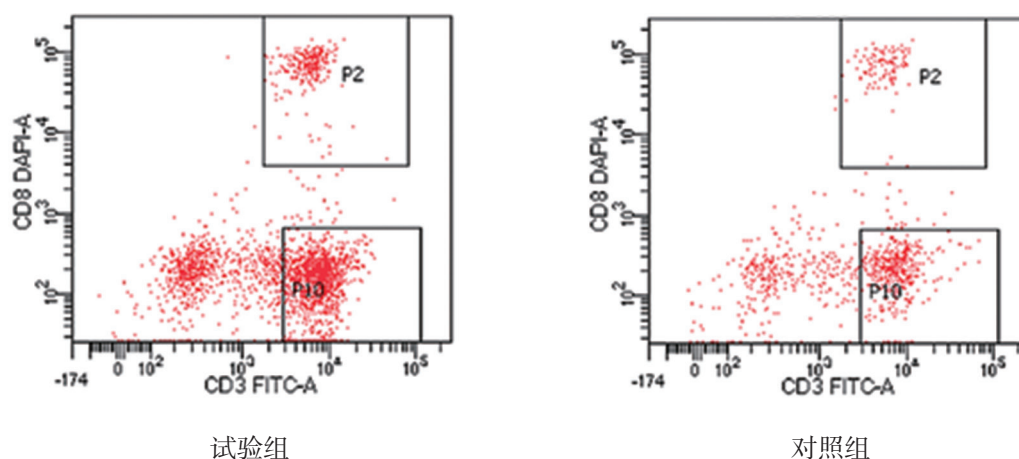
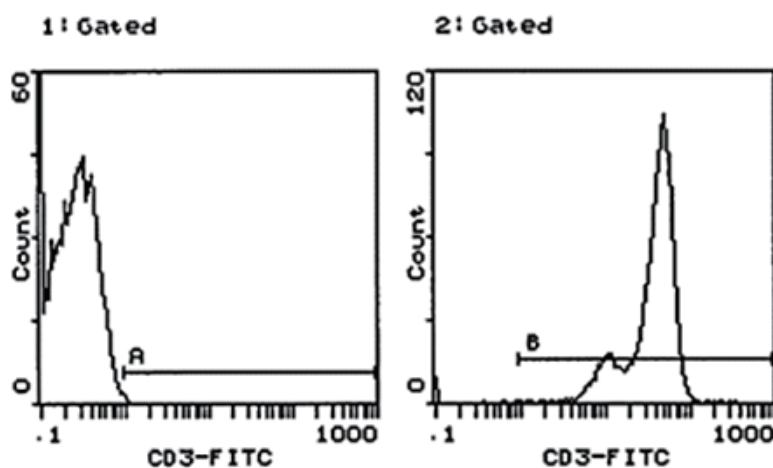
图1 CD3⁺T细胞流式图

图2 FITC-CD3 单抗设门检测ROS

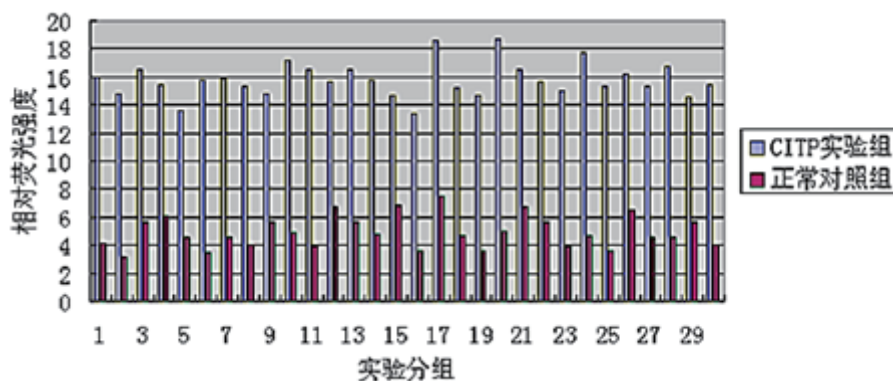


图3 ROS 荧光强度定量分析柱状图 (C1TP: 慢性ITP)

2.4 慢性ITP组外周血CD3⁺T细胞ROS水平与血小板的相关性分析 基于试验组ROS明显升高和血小板降低,我们对二者的关系进行了分析。见图4所示,慢性ITP组外周血CD3⁺T细胞ROS的水平明显增高,而血小板数量明显降低,二者有相关性,呈负性相关($r^2=-0.8601$, $P<0.05$)。

3 讨论

ITP是一种自限性疾病,患儿大多在6个月内

可以痊愈,约10%~20%发展为慢性。ITP高发年龄为4~5岁^[7],无明显性别和季节差异。ITP血小板的破坏与淋巴细胞等的激活以及与抗血小板自身抗体的产生有关。研究也表明ITP患者存在细胞免疫的异常,尤其与T细胞功能改变有关,如CD3⁺T细胞等。也有研究表明T细胞识别人类血小板抗原(human platelet antigen, HPA)表位,进而活化产生细胞因子,激活B淋巴细胞产生自身抗体^[8]

破坏自身血小板。

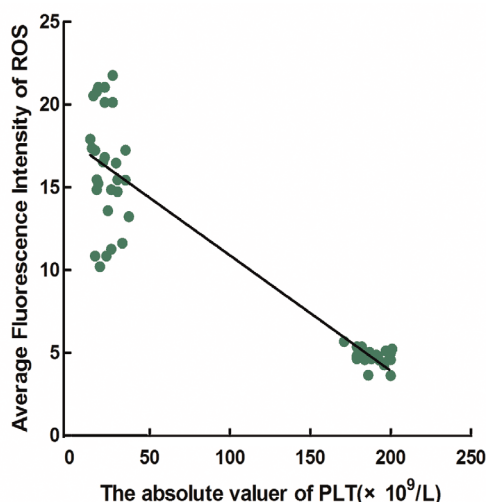


图4 慢性ITP组与ROS与血小板的相关性分析

研究发现ROS与ITP,炎症、肿瘤、自身免疫病等有关^[9]。ROS介导的信号传导涉及多个过程,如细胞生长、死亡^[10-11]等。ROS可以细胞调控活化信号,进而影响血小板功能^[12]。ST段抬高型心肌梗死患者血小板中趋化因子CCL2表达增高,通过NF- κ B信号通路影响血小板功能参与血栓形成^[13];ROS在NF- κ B信号通路上游发挥作用激活I κ B激酶复合物(IKK),从其抑制剂(I κ B)中释放NF- κ B,激活细胞相关的信号通路^[14]。国内有研究表明T细胞CD4⁺Th亚群功能改变、异常激活和凋亡等,参与了ITP血小板的破坏机制^[15]。但CD3⁺T细胞的ROS与儿童慢性ITP的关系尚不明确。

本研究发现慢性ITP患儿外周血CD3⁺T细胞数量增加,其ROS含量明显升高,同时伴有血小板数量的明显降低,发现ROS和血小板二者之间存在负性相关关系,提示ROS可能参与了慢性ITP血小板的破坏。根据我们的实验结果,可以推断在慢性ITP中T细胞特别是CD3⁺T细胞可能被激活且产生大量ROS,ROS作用在血小板的靶点可能是NF- κ B的通路如I κ B, P65或磷酸化P65等,通过其氧化作用影响磷酸化或乙酰化作用,进而激活NF- κ B通路,加速了血小板的凋亡或坏死,最终导致患儿慢性ITP的发生或发展。但ROS可能抑制CD3⁺T细胞的凋亡使其数量增加,这与我们的研究结果一致,但其机理需要进一步研究。B细胞和中性粒细胞的ROS可能也参与慢性ITP的发展,在多种因素的共同作用下决定了ROS对血小板的生成及破坏的影响,最终决定了慢性ITP的转归与结局。

综上所述,慢性ITP患儿外周血CD3⁺T细胞的ROS对血小板的破坏关系密切,可以作为慢性

ITP的诊断和治疗的潜在靶点,为临床工作提供一定的参考价值。同时,后续研究需进一步扩大样本量,研究ROS对血小板信号通路及其结合位点的影响,以期更深入的研究ROS对慢性ITP血小板的破坏机制。

参考文献:

- [1] LAMBERT M P, GERNESHEIMER T B. Clinical updates in adult immune thrombocytopenia[J]. Blood,2017,129(21):2829-2835.
- [2] SHOUKAT B A, ALI O, KUMAR D, et al. Hypogammaglobulinemia observed one year after rituximab treatment for idiopathic thrombocytopenic purpura[J].Case Rep Med,2018, 2018:2096186.
- [3] FUKUDA H, TAKATA K, KITAGUCHI T, et al. Autoimmune hepatitis with concomitant idiopathic thrombocytopenic purpura diagnosed by transjugular liver biopsy[J].Case Reports Hepatol,2018,2018:5305691.
- [4] HOLMSTROM K M, FINKEL T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signaling [J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2014,15 6):411-421.
- [5] MONIKA R. T Cell: Primary culture from peripheral blood[J].Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.),2019, 2020:17-31.
- [6] 赵凯,陈琦,王利,等.流式细胞术在检测细胞内活性氧中的应用[J].现代检验医学杂志,2012,27(1):99-100,103.
- [7] ZHAO Kai, CHEN Qi, WANG Li, et al. Application of flow cytometry in detection of cellular reactive oxygen species[J].Journal of Modern Laboratory Medicine,2012,27 (1):99-100,103.
- [8] RODEGHIERO F, STASI R, GERNESHEIMER T, et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group [J].Blood,2009,113(11):2386-2393.
- [9] KALPATTHI R, BUSSEL J B. Diagnosis, pathophysiology and management of children with refractory immune thrombocytopenic purpura[J].Curr Opin Pediatr,2008,20(1):8-16.
- [10] TAYSI S, POLAT F, GUL M, et al. Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis[J]. Rheumatol Int,2002,21(5):200-204.
- [11] AUGSBURGER F, FILIPPOVA A, RASTI D, et al. Pharmacological characterization of the seven human NOX isoforms and their inhibitors[J].Redox Biol,2019,26:101272.
- [12] BEDARD K, KRAUSE K H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology[J].Physiol Rev,2007,87(1):245-313.
- [13] SANTORO M M. Fashioning blood vessels by ROS signalling and metabolism [J].Semin Cell Dev Biol, 2018, 80: 35-42.
- [14] 曹禹,张效林,田孝祥,等.STEMI患者血浆和血小板CCL2水平及其对血小板NF- κ B信号通路的影响

- 响[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(1): 62-65.
- CAO Yu, ZHANG Xiaolin, TIAN Xiaoxiang, et al. Levels of chemokine CCL2 in the plasma and platelets of patients with ST elevation myocardial infarction and its effect on the signal pathway of nuclear factor kappa B in the platelets[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2017, 17(1): 62-65.
- [14] NOPPARAT C, SINJANAKHOM P, GOVITRAPONG P. Melatonin reverses H₂O₂-induced senescence in SH-SY5Y cells by enhancing autophagy via sirtuin 1 deacetylation of the RelA/p65 subunit of NF-κB[J]. J Pineal Res, 2017, 63(1): 1-13.
- [15] 唐玉蓉, 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 Yurong, WANG Jiliang, SUN Tingting, et al. Determination and clinical significance of Th subsets cytokines in ITP of children[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(5): 143-145.
- 收稿日期: 2020-02-13 修回日期: 2020-06-18
-
- (上接第94页)
- [5] 姚丽, 张梅, 郭先成. 孕妇巨细胞病毒感染载量与胎儿宫内感染的相关性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 25(15): 3550-3552.
- YAO Li, ZHANG Mei, GUO Xiancheng. Correlation between cytomegalovirus infection load of pregnant women and intrauterine fetal infection[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2015, 25(15): 3550-3552.
- [6] 徐婉芳, 刘彦慧. 弓形体、风疹病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒病原体检测与自然流产的相关性研究[J]. 当代医学, 2013, 19(9): 22-23.
- XU Wanfang, LIU Yanhui. Toxoplasma, rubella virus, cytomegalovirus, herpes simplex virus pathogen detection and the correlation between spontaneous abortion[J]. Contemporary Medicine, 2013, 19(9): 22-23.
- [7] 中华医学会儿科学分会感染学组, 全国儿科临床病毒感染协作组, 《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童巨细胞病毒性疾病诊断和防治的建议[J]. 中华儿科杂志, 2012, 50(4): 290-292.
- The Subspecialty Group of Infectious Diseases, The Society of Pediatrics, Chinese Medical Association, National Pediatric Clinical Viral Infection Collaboration Group, The Editorial Board, *Chinese Journal of Pediatrics*. Recommendations for diagnosis and prevention of childhood cytomegalovirus diseases[J]. Chinese Journal of Pediatrics, 2012, 50(4): 290-292.
- [8] 刘震忠, 吴凤琪, 闫静, 等. 2015 ~ 2016 年天津地区新生儿 TORCH 血清学筛查及感染特点[J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(4): 133-136.
- LIU Zhenzhong, WU Fengqi, YAN Jing, et al. TORCH serological screening and infection characteristic in neonate in tianjin area[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(04): 133-136.
- [9] 宋丹, 梅花. 新生儿先天性巨细胞病毒感染的诊断、预防及治疗进展[J]. 医学综述, 2017, 23(22): 4453-4457.
- SONG Dan, MEI Hua. Research progress of congenital cytomegalovirus infection in newborns[J]. Medical Recapitulate, 2017, 23(22): 4453-4457.
- [10] 刘邈珩, 钱继红, 朱天闻, 等. 围生期巨细胞病毒感染 5 年临床总结[J]. 中国当代儿科杂志, 2016, 18(2): 99-104.
- LIU Liwei, QIAN Jihong, ZHU Tianwen, et al. A 5-year retrospective clinical study of perinatal cytomegalovirus infection[J]. Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2016, 18(2): 99-104.
- [11] HAMPRECHT K, MASCHMANN J, JAHN G, et al. Cytomegalovirus transmission to preterm infants during lactation[J]. Journal of Clinical Virology, 2008, 41(3): 198-205.
- [12] MEIER J, LIENICKE U, TSCHIRCH E, et al. Human cytomegalovirus reactivation during lactation and mother-to-child transmission in preterm infants[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(3): 1318-1324.
- [13] MOYLAN D C, SUNIL K P, SHANNON A R, et al. Breast milk human cytomegalovirus (CMV) viral load and the establishment of breast milk CMV-pp65-Specific CD8 T cells in human CMV infected mothers[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2017, 216(9): 1176-1179.
- [14] OMARSDOTTIR S, CASPER C, WIRGART B Z, et al. Transmission of cytomegalovirus to extremely preterm infants through breast milk[J]. Acta Paediatrica, 2007, 96(4): 492-494.
- [15] ROMERO-GÓMEZ M P, MARTA C, MONTES-BUENO M T, et al. Evaluation of cytomegalovirus infection in low-birth weight children by breast milk using a real-time polymerase chain reaction assay[J]. Journal of Medical Virology, 2015, 87(5): 845-850.
- [16] 谢康, 刘艳秋, 阳彦, 等. 母乳、小儿血液及尿液标本中检测巨细胞病毒对诊断小儿 HCMV 感染的临床应用[J]. 实验与检验医学, 2017, 35(3): 340-343.
- XIE Kang, LIU Yanqiu, YANG Yan, et al. Clinical application of cytomegalovirus detection in breast milk, pediatric blood and urine specimens for diagnosis of HCMV infection in children[J]. Experiment and Laboratory Medicine, 2017, 35(3): 340-343.
- [17] 赖源, 朱纯华, 覃亚斌, 等. 人巨细胞病毒感染母婴传播与母乳喂养[J]. 实用预防医学, 2012, 19(9): 1406-1408.
- LAI Yuan, ZHU Chunhua, QIN Yabin, et al. Mother-to-child HCMV transmission and breast-feeding[J]. Practical Preventive Medicine, 2012, 19(9): 1406-1408.
- [18] 赵巍松, 刘伶, 杨飞. 母乳及婴儿血液、尿液人巨细胞病毒 DNA 检测在婴儿 HCMV 感染中的应用[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(6): 1059-1061.
- ZHAO Weisong, LIU Ling, YANG Fei. Clinical significance of fluorescent quantitative PCR in pregnant women and infants HCMV-DNA determination[J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2013, 17(6): 1059-1061.
- [19] TANIMURA Kenji, YAMADA H. Maternal and neonatal screening methods for congenital cytomegalovirus infection[J]. Journal of Obstetrics and Gynaecology Research, 2019, 45(3): 514-521.
- 收稿日期: 2020-04-16 修回日期: 2020-06-03