

Detection and Significance of Regulatory T Cells in Patients with Refractory Immune Thrombocytopenia

Zonglang Lai, Dongyun Li, Yong Lei, Yuting Chu, Xinyi Chen, Yamei Xu*

Oncology and Hematology Department of Dongzhimeng Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing

Email: tcmlzl@163.com, *xuyamei@sina.com

Received: Jul. 31st, 2014; revised: Aug. 22nd, 2014; accepted: Sep. 3rd, 2014

Copyright © 2014 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Objective: To explore the expression of regulatory T cells in peripheral blood in patients with refractory immune thrombocytopenia (ITP) and the association between them. **Methods:** 21 patients with refractory ITP and 21 health controls were studied. The expressions of CD4⁺CD25⁺ cells and CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ cells were detected by flow cytometry. Statistical analysis was carried out with regard to data in two groups. **Results:** The ratios of CD4⁺CD25⁺ cells and CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ cells/CD4⁺ cells in patients with refractory ITP decreased significantly compared with those in the control group [(4.52 ± 2.95)% vs (6.33 ± 2.93)%, *P* < 0.001; (2.30 ± 0.72)% vs (4.17 ± 1.23)%, *P* < 0.05). There was no correlation between platelet counts and Treg cells. **Conclusions:** Detection of Treg cells in patients with refractory ITP can induce the hyper auto-reactive activation and more damages of platelets, but they don't have relations, which may be one reason of refractory ITP.

Keywords

Refractory Immune Thrombocytopenia, Regulatory T Cells, Traditional Chinese Medicine

难治性免疫性血小板减少症患者调节性T细胞检测及其意义

*通讯作者。

赖宗浪, 李冬云, 雷 勇, 褚雨霆, 陈信义, 许亚梅*

北京中医药大学东直门医院血液肿瘤科, 北京

Email: tcmlzl@163.com, xuyamei@sina.com

收稿日期: 2014年7月31日; 修回日期: 2014年8月22日; 录用日期: 2014年9月3日

摘 要

目的: 探索难治性免疫性血小板减少症患者外周血中调节性T细胞数量的变化, 明确二者之间是否存在相关性。**方法:** 采用流式细胞仪分别检测21例健康人, 21例难治性ITP患者CD4⁺CD25⁺细胞和CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺细胞的表达水平, 将两组计量资料进行统计学分析。**结果:** 难治性ITP患者中外周血CD4⁺CD25⁺细胞比例(4.52 ± 2.95)%、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺占CD4⁺细胞比例(2.30 ± 0.72)%, 与正常对照组相比, 均明显下降, 差异具有统计学意义($P < 0.001, 0.05$), 与血小板下降数量无相关性($P > 0.05$)。**结论:** 难治性ITP患者体内调节性T细胞数量下降, 考虑体内存在自身反应亢进, 可破坏血小板, 但两者无相关性, 这可能也是导致ITP难治的原因之一。

关键词

难治性免疫性血小板减少症, 调节性T细胞, 中医

1. 引言

免疫性血小板减少症(immune thrombocytopenia, ITP)是一种自身免疫性出血性疾病, 其发病机制目前主要认为与自身免疫反应有关[1]。当前 ITP 的治疗方法包括糖皮质激素、脾切除等均主要针对血小板免疫破坏环节, 即通过抑制体液或细胞免疫而发挥疗效。历经皮质激素及脾切除治疗无效的难治性 ITP 其免疫功能异常紊乱主要与免疫调节异常有关[2]。调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)是具有免疫调节功能的 T 细胞群体, 在维持自身内环境稳定和自身免疫耐受方面起到关键作用。其数量减少、免疫抑制功能减弱可能是导致 ITP 患者免疫调节机制紊乱的一个重要机制[3] [4]。本文主要采用流式细胞术检测 Treg 细胞表达, 探讨其在难治性 ITP 发病机制中的作用。

2. 对象和方法

2.1. 研究对象

选取我院于 2011 年 7 月至 2012 年 9 月住院诊断明确的难治性 ITP 患者 21 例, 所有病例均符合难治性 ITP 诊断标准[5]。其中男性 4 例, 女性 17 例, 平均年龄 53.6 ± 14.3 岁, 对照组为健康自愿者 21 例, 男性 5 例, 女性 16 例, 平均年龄 49.4 ± 12.3 岁。

2.2. 试刺与仪器

FITC 标记的抗人 CD4, APC 标记的抗人 CD25, PE 标记的抗人 Foxp3, PerCP 标记的抗人 CD45, 均购自 BD 公司; 流式细胞仪为 BD 公司 BD FACSCanto II。

2.3. Treg 细胞检测步骤

1) 取外周血静脉 2 ml, 肝素抗凝, 每个试管内加入 20 μ l PerCP 标记的 CD45 直标抗体, 并分别加入

FITC、PE、APC 标记的不同抗体 10 μ l，再加入 100 μ l 全血，轻轻混匀 室温避光放置 30 分钟；2) 加入 BD 公司生产的稀释后的溶红细胞液 2 ml，混匀后避光，室温放置 20 分钟；3) 1500 转/分离心 5 分钟；4) 弃上清，加入 0.5 ml 破膜剂，充分混匀后避光放置 20 分钟；5) 用带有 BSA 的 PBS 2 ml 洗涤后加入胞浆 Foxp3 抗体，加入 0.5 ml PBS 混匀后上机检测。以 SSC-A、CD45 PerCP-A 射门分析。

2.4. 统计学处理

使用 SPSS13.0 软件，所有数据均用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，两组资料之间的比较采用独立样本 t 检验；两变量之间的相关性分析采用 Pearson 相关分析；以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3. 结果

3.1. Treg 细胞比例

21 例难治性 ITP 患者外周血中 CD4⁺CD25⁺细胞比例(4.52 \pm 2.95)%、Treg 占 CD4⁺细胞比例(2.30 \pm 0.72)%均明显低于正常人，两者分别为(6.64 \pm 1.42)%、(4.17 \pm 1.23)%，差异具有统计学意义，详见表 1。

3.2. 与血小板的相关性

难治性 ITP 组中 CD4⁺CD25⁺细胞比例及 Treg 细胞比例与血小板计数均没有相关性， P 值均 > 0.05 ，详见表 2。

4. 讨论

调节性 T 细胞属于机体重要的免疫调节细胞，具有免疫应答低下和免疫抑制两大特征，通过“主动”的方式抑制免疫系统对自身和外来抗原的应答，在维持机体免疫耐受和免疫应答稳态方面具有非常重要的作用。它属于 CD4⁺T 细胞亚群中一个独立的 T 细胞亚群，过去常用 CD4⁺CD25⁺T 细胞来标记调节 T 细胞，但后来研究发现人 CD4⁺CD25⁺T 细胞上的 CD25 表达数量或荧光强度可分为阴性、弱阳性、强阳性三个等级，呈连续性低表达状态，这种连续性表达使得采用 CD4/CD25 分子确定 Treg 细胞比例很困难 [6]-[10]。由于缺乏特异的表面标记物来识别，针对它的研究和应用一直存在障碍。叉头状/螺旋状转录因子 p3 (forkhead transcription factor p3, Foxp3)对调节性 T 细胞的发育和功能至关重要，实验研究发现 Foxp3

Table 1. Expression of CD4⁺CD25⁺ and Treg in patients with RITP and controls

表1. 难治ITP组与正常对照组CD4⁺CD25⁺及Treg细胞比例的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CD4 ⁺ CD25 ⁺ (%)	Treg/CD4 ⁺ (%)
难治ITP	21	4.52 \pm 2.95*	2.30 \pm 0.72 [△]
对照组	21	6.33 \pm 2.93	4.17 \pm 1.23

注：与对照组比较比较，* $P < 0.001$ ；[△] $P < 0.05$ 。

Table 2. Correlation analysis between CD4⁺CD25⁺, Treg and platelet counts in patients with RITP

表2. 难治性ITP组中CD4⁺CD25⁺、Treg细胞比例与血小板值相关性比较

血小板计数	CD4 ⁺ CD25 ⁺ (%)	Treg/CD4 ⁺ (%)
15.36 \pm 7.38	4.52 \pm 2.95	2.30 \pm 0.72
Pearson相关系数	-0.05	-0.32
P 值	0.83	0.14

基因敲除或突变的小鼠体内 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞数量减少, 调节功能缺陷, 可诱发严重的自身免疫反应; 并且 Foxp3 在自然发生的调节性 T 细胞表面特异性表达, 因此作为 Treg 细胞内的特征性标记物已得到公认[11] [12]。

研究表明免疫性血小板减少性紫癜患者体内存在自身反应性 T、B 淋巴细胞, 它们能识别和应答自身抗原, 产生抗血小板抗体, 导致血小板持续性减少。而调节性 T 细胞数量减少和功能异常能诱发自身免疫性疾病。一系列临床观察发现 ITP 患者存在 T 淋巴细胞亚群及功能异常。国内伏瑞祥首次发现 CD4⁺CD25⁺T 细胞比例在 ITP 发病患者中与正常人相比较明显减低, 经治疗好转后其细胞比例可显著增加[13]。吕学文通过检测急性特发性血小板减少性紫癜儿童体内调节性 T 细胞的变化发现, CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞数量减少, 并且 Foxp3 mRNA 表达降低。大量研究还发现经应用糖皮质激素或丙种球蛋白等治疗后, 调节性 T 细胞数量增多、免疫抑制功能增强[14]。

但临床上还存在一类对糖皮质激素、脾切除术以及免疫抑制剂等治疗反应很差或毫无反应, 且外周血小板持续减少的难治性 ITP 患者, 这群患者体内调节性 T 细胞数量的减少是否与疾病存在明显相关性尚未得到确认[15]。目前关于难治性 ITP 的诊断标准主要争议在于是否一定要脾切除无效或有效后复发才可以称为难治性 ITP, 在我国由于实施脾脏切除术者较少, 故糖皮质激素治疗无效, 或激素依赖, 血小板数量不在安全范围内也可归为难治性 ITP[16]。本研究观察了 21 例健康自愿者、21 例难治性 ITP 患者外周血中调节性 T 细胞的表达情况, 发现难治性 ITP 患者 CD4⁺CD25⁺、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺的比例均低于正常对照人群, 差异具有统计学意义, 说明在难治性 ITP 患者中, 调节 T 细胞数量和功能明显下降, 导致体内自身反应亢进, 引起血小板破坏增加。但是 Treg 细胞下降比例与血小板计数之间却没有相关性, 这也可能是造成 ITP 难治的原因, 需要进一步的研究。如何提高难治性血小板减少症患者中 T 细胞数量进而提高其治疗效果, 已经成为目前临床研究的热点, 我科长期从事于难治性血小板减少症的临床研究, 验证了芪龙颗粒、益髓颗粒等临床有效制剂, 希望在以后的研究中能明确中医药治疗难治性 ITP 效应机制, 尤其是对免疫调节功能中的影响, Treg 细胞可以作为一个良好的研究靶点。

基金项目

国家重点基础研究发展计划(2013CB531705)。

参考文献 (References)

- [1] Rodeghiero, F., Stasi, R., Gernsheimer, T., et al. (2009) Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: Report from an international working group. *Blood*, **113**, 2386-2393.
- [2] 赵滢, 王红祥, 李菁媛, 等 (2006) 调节性 T 细胞在慢性特发性血小板减少性紫癜中的作用. *中华血液学杂志*, **3**, 203-205.
- [3] Yu, J., Heck, S., Patel, V., et al. (2008) Defective circulating CD25 regulatory T cells in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood*, **112**, 1325-1328.
- [4] 郭守红, 石庆之, 华建媛, 等 (2010) 调节性 T 细胞和 Th17 细胞比值的变化与特发性血小板减少性紫癜发病关系的研究. *中华血液学杂志*, **9**, 610-612.
- [5] 陈方平, 付斌 (2010) 难治性特发性血小板减少性紫癜规范化诊断和治疗. *临床血液学杂志*, **7**, 385-387.
- [6] 沈权, 司今, 俞立权, 等 (2008) 特发性血小板减少紫癜者 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞因子表达. *中国组织工程研究与临床康复*, **25**, 4895-4898.
- [7] Scabeni, S., Lapilla, M., Musio, S., et al. (2008) CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells specific for a thymus-expressed antigen prevent the development of an anaphylaxis to self. *The Journal of Immunology*, **180**, 4433-4440.
- [8] 张爱梅, 徐修才, 王宁玲, 等 (2009) CD4⁺CD25⁺Treg 在儿童急性免疫性血小板减少性紫癜发病机制中的作用. *临床儿科杂志*, **12**, 1157-1161.

- [9] Antony, P.A. and Restifo, N.P. (2005) CD4⁺CD25⁺T regulatory cells, immunotherapy of cancer, and interleukin-2. *The Journal of Immunology*, **28**, 120-128.
- [10] Lin, B., Zhao, H., Poon, M.C., et al. (2007) Abnormality of CD4⁺CD25⁺regulatory T cells in idiopathic thrombocytopenic purpura[J]. *European Journal of Haematology*, **78**, 139-143.
- [11] Walters, S., Webster, K.E., Sutherlandm, A., Gardam, S., Groom, J., Liuwantara, D., et al. (2009) Increased CD4⁺FOXP3⁺ T cells in BAFF-transgenic mice suppress T cell effector responses. *Journal of Immunology*, **182**, 793-801.
- [12] 罗祖军, 刘新海 (2009) 特发性血小板减少性紫癜患者调节性 T 细胞及 Foxp3 基因的检测. *实验与检验医学*, **6**, 589-590, 594.
- [13] 伏瑞祥, 吴德沛 (2003) CD4⁺CD25⁺调控 T 细胞及其在移植耐受中的作用. *中国实验血液学杂志*, **3**, 321-324.
- [14] 吕学文, 刘仿, 伍昌林 (2007) Foxp3 基因表达与 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞在急性特发性血小板减少性紫癜发病中的作用. *实用儿科临床杂志*, **3**, 188-190.
- [15] 陈信义, 李冬云, 许亚梅 (2011) 难治性免疫性血小板减少症中医治疗优势与临床实践. *中国中西医结合杂志*, **8**, 1033-1035.
- [16] 许亚梅, 李冬云, 陈信义 (2006) 难治性血小板减少性紫癜中医治疗初探. *北京教育学院学报(自然科学版)*, **2**, 19-20.