

论著 · 临床研究

特发性血小板减少性紫癜儿童外周血 调节性 T 细胞的变化

王薛平¹ 邱运树² 郝国平² 朱镭³

(1. 山西医科大学研究生学院, 山西 太原 030001; 2. 山西省儿童医院血液科, 山西 太原 030002;
3. 山西省儿童医院流式细胞室, 山西 太原 030002)

[摘要] **目的** 研究特发性血小板减少性紫癜(ITP)患儿外周血 CD4⁺CD25⁺CD127⁻及 CD3⁺CD4⁻CD8⁻调节性 T 细胞(Treg)的变化及意义。**方法** 采用免疫荧光流式细胞技术检测 33 例 ITP 患儿及 21 例正常儿童外周血 CD4⁺CD25⁺CD127⁻及 CD3⁺CD4⁻CD8⁻ Treg 水平。**结果** ITP 患儿 CD4⁺CD25⁺CD127⁻及 CD3⁺CD4⁻CD8⁻ Treg 百分比明显低于正常儿童,分别为(2.7±1.7)% vs (4.8±1.6)%;(5.2±3.1)% vs (8.1±3.5)% ($P<0.01$)。**结论** ITP 患儿 CD4⁺CD25⁺CD127⁻及 CD3⁺CD4⁻CD8⁻ Treg 百分率降低,提示其可能参与了 ITP 的发病机制。
[关键词] 特发性血小板减少性紫癜; CD4 抗原; CD25 抗原; CD8 抗原; 调节性 T 细胞; 儿童
[中图分类号] R554⁺.6; R558⁺.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)04-0282-03

Levels of regulatory T cells in peripheral blood of children with idiopathic thrombocytopenic purpura

WANG Xue-Ping, QIU Yun-Shu, HAO Guo-Ping, ZHU Lei. Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China (Qiu Y-S, Email:etyyqys@163.com)

Abstract: Objective To study the levels of CD4⁺CD25⁺CD127⁻ and CD3⁺CD4⁻CD8⁻ regulatory T (Treg) cells in peripheral blood of children with idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). **Methods** The flow cytometry was used to detect the expression of CD4⁺CD25⁺CD127⁻ and CD3⁺CD4⁻CD8⁻ Treg cells in peripheral blood of 33 children with ITP and 21 healthy children. **Results** The expression levels of CD4⁺CD25⁺CD127⁻ [(2.7±1.7)% vs (4.8±1.6)%; $P<0.01$] and CD3⁺CD4⁻CD8⁻ [(5.2±3.1)% vs (8.1±3.5)%; $P<0.01$] Treg cells in children with ITP were significantly lower than in the controls. **Conclusions** The expression levels of CD4⁺CD25⁺CD127⁻ and CD3⁺CD4⁻CD8⁻ Treg cells decrease in children with ITP, suggesting that CD4⁺CD25⁺CD127⁻ and CD3⁺CD4⁻CD8⁻ Treg cells might play a role in the pathogenesis of ITP.
Key words: Idiopathic thrombocytopenic purpura; CD4 antigen; CD25 antigen; CD8 antigen; Regulatory T cell; Child

特发性血小板减少性紫癜(ITP)是儿童常见的出血性疾病,临床以出血、外周血血小板减少、骨髓巨核细胞成熟障碍为主要表现,严重者可出现颅内出血甚至危及生命。ITP 发病机制尚未完全明确,目前普遍认为是一种自身免疫性疾病。CD4⁺CD25⁺CD127⁻和 CD3⁺CD4⁻CD8⁻调节性 T 细胞(Treg)具有免疫抑制作用,在感染、肿瘤及自身免疫等过程中进行调节。为深入探讨 ITP 的发病机制,本研究对 33 例 ITP 患儿 CD4⁺CD25⁺CD127⁻及 CD3⁺CD4⁻CD8⁻ Treg 的变化情况及意义进行了探讨。

1 资料与方法

1.1 研究对象

33 例 ITP 患儿均为 2010 年 5 月至 9 月我院收治的住院患儿,诊断符合 ITP 诊断标准^[1]。其中男 20 例,女 13 例,年龄 8 个月至 15 岁,平均 6±4 岁,均为初次发病。选择同期 21 例体检健康儿童作为对照组,男 10 例,女 11 例,年龄 6 个月至 12 岁,平均 7±4 岁。两组性别、年龄差异无统计学意义

[收稿日期]2010-11-15;[修回日期]2010-12-23
[作者简介]王薛平,男,硕士研究生。
[通信作者]邱运树,主任医师。

($P>0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 试剂与仪器 CIM-FITC/CD8-PE/CD3-PC5 三标记单克隆抗体、CD4-PC5、CD25-FITC、CD127-PE 及溶血素购于美国贝克曼库尔特有限公司。FC500 型流式细胞仪购于美国 COULTER 公司。

1.2.2 流式细胞术 采用流式细胞术检测外周血 CD4⁺CD25⁺CD127⁻和 CD3⁺CD4⁻CD8⁻ Treg 水平,以百分比表示。取外周静脉血 1 mL,EDTA 试剂抗凝。于试管 1 中加入 5 μL 的三标记单克隆抗体 (CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PC5),试管 2 中分别加入 CD4-PC5、CD25-FITC 及 CD127-PE 单克隆抗体 5 μL,在每支试管中再加入 20 μL 抗凝静脉血,充分混匀,室温避光孵育 30 min 后,加入红细胞裂解液 (溶血素)100 μL,以 1200 r/min 的速度离心 5 min,弃上清,生理盐水洗涤 1 次,最后以 500 μL 的生理盐水悬浮细胞,流式细胞仪检测 10000 个淋巴细胞。

1.3 统计学分析

用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学处理,数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间差异比较采用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

与对照组比较,ITP 组 CD4⁺CD25⁺CD127⁻和 CD3⁺CD4⁻CD8⁻ Treg 百分比均减低,差异有统计学意义($P<0.01$),见表 1。

表 1 两组 Treg 水平比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	例数	CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻	CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻
对照组	21	4.8 ± 1.6	8.1 ± 3.5
ITP 组	33	2.7 ± 1.7	5.2 ± 3.1
t 值		-4.72	-3.19
P 值		<0.01	<0.01

3 讨论

近年研究发现 ITP 的发生不仅与体液免疫有关,也与细胞免疫功能相关^[2-3],Treg 在维持机体免疫平衡方面有着重要作用,大致分为 4 类:CD4⁺Treg、CD8⁺Treg、NKT Treg 和 双 阴 性 Treg。CD4⁺CD25⁺Treg 为其中最主要的一群,Foxp3 是 CD4⁺CD25⁺Treg 内的特征性标志物^[4],但 Foxp3

定位于细胞内,检测过程复杂,而 CD127 (IL-7 受体)与 Foxp3 的表达呈负相关^[5],因此在 CD4⁺CD25⁺基础上联合 CD127 抗原能识别人 CD4⁺CD25⁺Treg。本研究发现 ITP 患儿 CD4⁺CD25⁺CD127⁻Treg 水平降低,这与国内外报道一致^[6-7]。提示,CD4⁺CD25⁺CD127⁻Treg 的异常表达可能参与了 ITP 疾病的发生、发展过程。CD4⁺CD25⁺CD127⁻Treg 具有免疫无能性和免疫抑制性两大特性^[7],可通过免疫抑制作用抑制自身反应性 T 细胞的活化而维持自身免疫平衡。ITP 患者 CD4⁺CD25⁺CD127⁻Treg 数量减少,对自身反应性 T 细胞抑制作用减弱,从而导致自身反应性 T 细胞活化增多,促进血小板的破坏。

CD3⁺CD4⁻CD8⁻Treg 为双阴性 Treg (DNT 细胞)在自身免疫、免疫抑制、免疫调节、抗肿瘤方面有重要作用^[8-9],其在外周 T 淋巴细胞中所占比例极低,在鼠和人中分别为 1%~5% 和 1%~2%^[10]。DNT 细胞已被证实小鼠以及人体均能通过直接杀伤抗原特异性的效应细胞来抑制各种免疫应答反应^[11]。DNT 细胞具有独特的细胞表面标记和特殊的细胞因子分泌特征,能通过抑制同系基因型 CD4⁺T 细胞或 CD8⁺T 细胞来发挥免疫抑制功能^[12-13]。本研究发现 ITP 患儿 DNT 细胞值较正常儿童减低,提示在 ITP 发病机制中可能存在由于 DNT 细胞减少对 CD8⁺细胞的抑制功能减弱,CD8⁺细胞增多导致细胞免疫功能增强,促进血小板的破坏。Fischer 等^[14]发现 DNT 细胞可大量分泌 IFN-γ, DNT 细胞的减少引起 IFN-γ 的分泌减少,而 IFN-γ 的降低使机体内发生了 Th1 型细胞因子向 Th2 型细胞因子偏移,影响患者机体免疫功能平衡。

总之,本研究结果表明,ITP 患儿外周血 CD4⁺CD25⁺CD127⁻和 CD3⁺CD4⁻CD8⁻Treg 水平较正常儿童降低,提示 CD4⁺CD25⁺CD127⁻和 CD3⁺CD4⁻CD8⁻Treg 可能参与了 ITP 的发病机制,深入研究 CD4⁺CD25⁺CD127⁻和 CD3⁺CD4⁻CD8⁻Treg 在 ITP 发病机制中的作用,不仅可为 ITP 发病机制研究提供新的思路,并能为 ITP 的免疫学治疗提供新的方法。

[参 考 文 献]

[1] 罗春华,廖清奎,贾苍松.特发性血小板减少性紫癜诊疗建议[J].中华儿科杂志,1999,37(1):50-51.
[2] Blanchette V, Bolton-Maggs P. Childhood immune thrombocytopenic purpura: diagnosis and management[J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2010, 24(1): 249-273.

[3] 范淑兰,王静敏,史丽荣. 特发性血小板减少性紫癜免疫球蛋白和 T 细胞亚群等动态观察及其临床意义[J]. 中国当代儿科杂志,2000,2(3):167-168.

[4] Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory cont-rivance : regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3[J]. NAT Immunol, 2005, 6(4): 331-337.

[5] Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells[J]. J Exp Med, 2006, 203(7): 1701-1711.

[6] 杨阳. CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} 调节性 T 细胞、Notch1 及 TGF-β 在特发性血小板减少性紫癜患者中的表达和意义[D]. 广西医科大学,2010.

[7] Sakakura M, Wada H, Tawara I, Nobori T, Sugiyama T, Sagawa N, et al. Reduced Cd4⁺ Cd25⁺ T cells in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura [J]. Thromb Res, 2007, 120(2): 187-193.

[8] 杜敏,陈炯. CD4⁻ CD8⁻ 双阴性 T 细胞在移植免疫耐受形成中的作用[J]. 国际外科学杂志,2007,34(9):608-610.

[9] Young KJ, DuTemple B, Phillips MJ, Zhang L. Inhibition of graft-versus-host disease by double-negative regulatory T cells [J]. J Immunol, 2003, 171(1): 134-141.

[10] Hodak E, David M, Maron L, Aviram A, Kaganovsky E, Fein-messer M. CD4/CD8 double-negative epidermotropic cutaneous T-cell lymphoma: an immunohistochemical variant of mycosis fun-goides[J]. J Am Acad Dermatol, 2006, 55(2): 276-284.

[11] Chen W, Ford MS, Young KJ, Zhang L. The role and mecha-nisms of double negative regulatory T cells in the suppression of immune rponses[J]. Cell Mol Immunol, 2004, 1(5): 328-335.

[12] Yonezawa A, Onaka T, Imada K. Cytomegalovirus-associated in-fectious mononucleosis-like syndrome accompanied by transient monoclonal expansion of CD8⁺ T-cells [J]. Rinsho Ketsueki, 2009, 50(8): 652-657.

[13] 张竹虚,张丽. αβ-TCR⁺ CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻ 双阴性 T 细胞:一种新发现的免疫调节 T 细胞[J]. 现代免疫学,2004,24(1):5-8.

[14] Fischer K, Voelkl S, Heymann J, Przybylski GK, Mondal K, Laumer M, et al. Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta⁺ CD4⁻ CD8⁻ double-negative regulatory T cells[J]. Blood, 2005, 105(7): 2828-2835.

(本文编辑:邓芳明)

· 消息 ·

2011 年国家级继续教育项目《儿童免疫性疾病研讨班》通知

2011 年国家级继续教育项目《儿童免疫性疾病研讨班》[2011-06-01-087 (国)]将于 2011 年 6 月 3 ~ 5 日在广东省广州市珠江新城召开,主题是“儿科临床免疫相关性疾病的诊治”。内容主要包括小儿过敏性变态反应性疾病、自身免疫性疾病、免疫缺陷病、感染与免疫四个方面。研讨班将邀请杨锡强教授、何晓琥教授、香港刘宇隆及李子良教授、赵晓东教授等授课,并将对疑难病例进行讨论及实习。与会代表可获得继续教育 I 类学分。本研讨班紧密结合临床,兼顾科研,内容实用先进。望广大儿科医务人员踊跃报名参加。注册费:980 元/人,资料费:80 元/本。食宿费自理。项目负责人:广州市妇女儿童医疗中心、广州市儿童医院过敏免疫风湿科曾华松主任,具体联系人:任琪医师,手机 15902066171,电子邮箱:doudou86-ren@163.com。