

DOI:10.7499/j.issn.1008-8830.2013.02.004

论著·临床研究

糖皮质激素对慢性免疫性血小板减少症患儿树突状细胞的影响

旷文勇¹ 郑敏翠¹ 张广森² 宋国才¹ 李婉丽¹ 杨海霞¹ 蒋小梅¹ 张本山¹ 吴攀¹ 顾艳艳¹

(1. 湖南省儿童医院血液内科, 湖南 长沙 410007; 2. 中南大学湘雅二医院血液科, 湖南 长沙 410011)

[摘要] **目的** 探讨树突状细胞(DCs)在儿童慢性免疫性血小板减少症(cITP)中的变化以及糖皮质激素对cITP患儿DCs的作用。**方法** 流式细胞术分别检测15例cITP患儿应用糖皮质激素治疗前后和20例对照者外周血DCs亚群的变化;体外培养并收集cITP患儿外周血单核细胞来源的DCs,采用流式细胞术检测其免疫表型。**结果** 与对照组比较,cITP患儿治疗前髓样DC(mDC)绝对数无明显改变,浆细胞样DC(pDC)绝对数降低,mDC/pDC比值增高($P<0.05$);cITP治疗后,pDC绝对数较治疗前增高,而mDC绝对数及mDC/pDC比值较治疗前降低($P<0.05$);cITP患儿治疗前外周血DCs的HLA-DR、CD80、CD83和CD86阳性表达率均明显高于对照组(均 $P<0.01$);治疗后cITP患儿DCs的HLA-DR、CD80、CD83和CD86表达率较治疗前均明显下降($P<0.01$),与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** DCs亚群比例失衡及功能失调与儿童cITP的发病有关;糖皮质激素能增强cITP患儿DCs的免疫抑制效应,可能是糖皮质激素有效治疗儿童cITP的机制。

[中国当代儿科杂志,2013,15(2):91-94]

[关键词] 免疫性血小板减少症;树突状细胞;糖皮质激素;儿童

Effect of glucocorticoid on dendritic cells in children with chronic immune thrombocytopenia

KUANG Wen-Yong, ZHENG Min-Cui, ZHANG Guang-Sen, SONG Guo-Cai, LI Wan-Li, YANG Hai-Xia, JIANG Xiao-Mei, ZHANG Ben-Shan, WU Pan, GU Yan-Yan. Department of Hematology, Children's Hospital of Hunan, Changsha 410007, China (Zhen M-C, Email: mincui@sina.com)

Abstract: Objective To investigate the change in dendritic cells (DCs) in children with chronic immune thrombocytopenia (cITP) and the effect of glucocorticoid on DCs in children with cITP. **Methods** Fifteen children with cITP and 20 healthy controls were included in the study. Flow cytometry was used to measure the DC subsets count in the 15 children with cITP before and after glucocorticoid treatment as well as the corresponding values in the 20 healthy controls. The DCs derived from peripheral blood monocytes in children with cITP were cultured *in vitro* and collected, and their immunophenotypes were determined by flow cytometry. **Results** Before glucocorticoid treatment, the children with cITP showed no notable change in the absolute count of myeloid DCs (mDCs) but showed decreased absolute count of plasmacytoid DCs (pDCs) and increased mDC/pDC ratio compared with the healthy controls ($P<0.05$). After glucocorticoid treatment, the children with cITP demonstrated increased absolute count of pDCs and decreased absolute count of mDCs and mDC/pDC ratio compared with before treatment ($P<0.05$). Before glucocorticoid treatment, the children with cITP had significantly higher positive rates of HLA-DR, CD80, CD83 and CD86 on peripheral blood DCs than the healthy controls ($P<0.01$). All the positive rates were significantly decreased after glucocorticoid treatment ($P<0.01$), so that there was no significant difference from the healthy controls ($P>0.05$). **Conclusions** Disproportion and functional disturbance of DC subsets is associated with the pathogenesis of cITP in children. Glucocorticoid can strengthen the immunosuppression of DCs in children with cITP, which may contribute to the effectiveness of glucocorticoid as a treatment.

[Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(2):91-94]

Key words: Immune thrombocytopenia; Dendritic cell; Glucocorticoid; Child

[收稿日期]2012-07-31;[修回日期]2012-10-25
[基金项目]湖南省科技厅博士后资助专项(No.2010RS4028);湖南省卫生厅计划项目(No.B2007158)。
[作者简介]旷文勇,男,博士,主治医师。
[通信作者]郑敏翠,主任医师。

免疫性血小板减少症 (immune thrombocytopenia, ITP) 是由于血小板破坏增多或血小板生成下降而导致的出血性自身免疫性疾病^[1], 是一种儿童常见的出血性疾病^[2], 超过 20% 的患儿可表现为反复发作、迁延难愈的慢性病程, 病程超过 1 年的 ITP 为慢性 ITP (chronic ITP, cITP), 目前其发病机制尚未完全清楚。有研究证实 ITP 患者存在 Th1 细胞功能亢进, 而地塞米松可纠正 ITP 患者的 Th1 细胞功能^[3]。王薛平等^[4]的研究表明 ITP 患儿 Treg 细胞百分率降低, 提示其可能参与了 ITP 的发病机制。树突状细胞 (dendritic cells, DCs) 是抗原提呈功能最强的抗原提呈细胞 (antigen presenting cells, APC), 人外周血 DCs 根据其来源和功能主要分为髓样 DC (myeloid DC, mDC 或 DC1) 和浆细胞样 DC (plasmacytoid DC, pDC 或 DC2) 两个亚群。DCs 是体内维持自身免疫耐受最主要的细胞, 目前研究表明, DCs 可促发和调控外周调节性 T 细胞的产生^[5], 后者可通过阻止效应 T 细胞在抗原特异刺激下的激活从而维持外周免疫耐受。在调节 DCs 成熟或其功能方面的任何分子机制的改变都可以增加自身免疫性疾病的易感性^[6], 因此 DCs 在儿童 cITP 发病中可能发挥了重要作用。本研究拟应用流式细胞术检测 cITP 患儿采用糖皮质激素治疗前后的外周血 DCs 亚群, 同时在体外培养 cITP 患儿外周血单核细胞来源的 DCs, 并研究其免疫表型的变化, 探讨糖皮质激素对 DCs 亚群数量和功能的影响, 从而阐明 DCs 亚群数量和功能改变在儿童 cITP 发病中的作用。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2010 年 3 月至 2011 年 12 月在我院血液科住院的 cITP 患儿 15 例, 其中男 9 例, 女 6 例; 年龄 3 ~ 14 岁, 中位年龄 7.2 岁, 根据临床血象和骨髓检查确诊, 诊断标准参照文献^[1], 诊断时血小板数均 $< 30 \times 10^9/L$ 。对照组为 20 例于我院体检健康儿童, 男 8 例, 女 12 例; 年龄 4 ~ 12 岁, 中位年龄 7.8 岁。两组年龄、性别差异无统计学意义, 具有可比性。cITP 患儿经确诊后每日采用地塞米松 1 mg/kg 静脉滴注, 待血小板升至 $\geq 50 \times 10^9/L$ 后停用地塞米松 (地塞米松疗程不超过 1 周), 改为强的松每日 1 ~ 1.5 mg/kg 口服, 共治疗 2 周。本研究通过湖南省儿童医院伦理委员会同意, 已获取 ITP 患者及健康对照组家长知情同意, 并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 试剂和仪器 FITC 标记的 Lin 混合抗体, 包括 CD3、CD14、CD16、CD19、CD20 和 CD56, PerCP 标记的 HLA-DR 单抗, APC 标记的 CD11c 单抗, PE 标记的 CD123、CD40、CD80、CD86、CD83 单抗, PE 标记的同型对照鼠 IgG1 和 IgG2a 单抗均为美国 BD 公司产品; 人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (rhGM-CSF)、重组人白细胞介素-4 (rhIL-4)、脂多糖 (LPS) 购自美国 Sigma 公司; 胎牛血清、RPMI1640 为美国 Gibco 公司产品; 流式细胞仪为美国 BD 公司产品; 倒置显微镜为日本 OLYMPUS 产品。

1.2.2 外周血 mDC 和 pDC 检测 取 cITP 患儿治疗前后外周血 100 μL 和对照组体检时外周血 100 μL 用于检测。试验时向外周血中加入 Lin 混合抗体、CD123、CD11c、HLA-DR 各 20 μL , 并设同型对照, 充分混匀后室温避光孵育 20 min。加溶血素裂解红细胞, PBS 洗涤 2 次, 以 400 μL 冷 PBS 重悬后进行流式细胞仪测定。采用 CellQuestPro 软件分析 Lin 混合抗体阴性细胞, mDC 定义为 CD11c 和 HLA-DR 阳性, pDC 定义为 CD123 和 HLA-DR 阳性。根据血细胞计数仪检测所得同一标本外周血白细胞数及流式细胞术检测所得 DCs 占白细胞的百分比, 分别计算出 mDCs 和 pDCs 在外周血循环中的绝对数量。

1.2.3 DCs 的体外诱导培养 取 15 例 cITP 患儿治疗前后和 20 例对照组空腹静脉血 8 mL 置于含有 1/10 体积抗凝液的离心管中, 用 Ficoll Paque 分离液取得单核细胞层, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基调整细胞浓度为 4×10^6 个/mL 接种于塑料培养瓶中。37°C、5% CO₂ 培养箱全湿条件下培养 3 h, 全量换液, 去除血细胞及其他未贴壁成分。贴壁细胞培养液中加入 L-谷氨酰胺 (0.02 mmol/L), 并按常规方案诱导 DCs, 即加入 rhGM-CSF (1000 U/mL) + rhIL-4 (500 U/mL), 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养, 每 2 ~ 3 d 半量换液 1 次。

1.2.4 DCs 的流式细胞仪分析 取培养至第 6 天的 DCs 细胞, 加入终浓度为 500 ng/mL 的 LPS, 过夜后收集细胞用于流式检测。PBS 洗 2 次, 按 1×10^6 个/mL 重悬, 分别加入 CD40、CD80、CD86、CD83 和 HLA-DR 单克隆抗体及相应的同型对照, 混匀后置 37°C 避光孵育 30 min, PBS 洗 2 次后流式细胞仪分析各抗原表达百分率。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件包对数据进行统计学分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组样本均数比较采用方差分析, 组间两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 cITP 患儿外周血 DCs 亚群检测结果

与对照组相比,cITP 患儿治疗前 pDC 绝对数降低,mDC/pDC 比值增高,差异有统计学意义($P < 0.05$),而 mDC 绝对数无明显改变;糖皮质激素治疗后 cITP 患儿 pDC 绝对数增高,而 mDC 绝对数及 mDC/pDC 比值明显低于治疗前,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 cITP 患儿治疗前、后与对照组 DCs 亚群水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	mDC (个/ μ L)	pDC (个/ μ L)	DC (个/ μ L)	mDC/pDC 比值
对照组	20	28 $\pm$ 11	16 $\pm$ 7	44 $\pm$ 17	1.7 $\pm$ 0.5
cITP 组治疗前	15	30 $\pm$ 10	12 $\pm$ 4 ^a	42 $\pm$ 14	2.5 $\pm$ 0.9 ^a
cITP 组治疗后	15	23 $\pm$ 8 ^b	16 $\pm$ 5 ^b	39 $\pm$ 15	1.4 $\pm$ 0.5 ^b
F 值		6.19	7.69	0.68	8.73
P 值		<0.05	<0.05	>0.05	<0.05

a: 与对照组比较, $P < 0.05$;b: 与治疗前比较, $P < 0.05$

2.2 cITP 患儿 DCs 的体外诱导培养

从外周血获取的单个核细胞贴壁培养 3 h 后获得的贴壁细胞为单核细胞,加入细胞因子培养 6 d 后,大多细胞呈悬浮生长并有聚集现象,形态由圆形变得不规则,加入 LPS 后细胞逐渐由聚集状态变为分散状,且形态明显不规则,可见到具有树突状突起的悬浮细胞。见图 1。

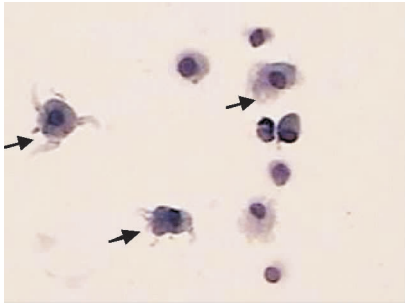


图 1 cITP 患儿体外培养 7 d 的 DCs 形态学观察 (瑞氏-吉姆萨染色, $\times 400$) 可见 DCs 体积较大,形态不规则,且有明显的树突状突起(箭头所示)。

2.3 cITP 患儿体外诱导培养 DCs 的免疫表型

cITP 患儿治疗前外周血 DCs 的 HLA-DR、CD80、CD83 和 CD86 阳性表达率均明显高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。治疗后 cITP 患儿 DCs 的 HLA-DR、CD80、CD83 和 CD86 表达率与治疗前比较均明显下降,差异均有统计学意义($P < 0.01$),与对照组相比差异无统计学意义(P

> 0.05);而 CD40 在治疗前后与对照组比较均无明显变化($P > 0.05$)。

表 2 DCs 的 HLA-DR、CD40、CD80、CD83、CD86 表达情况 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	例数	HLA-DR	CD40	CD80	CD83	CD86
对照组	20	60 $\pm$ 10	15 $\pm$ 4	35 $\pm$ 8	36 $\pm$ 7	43 $\pm$ 8
ITP 组治疗前	15	79 $\pm$ 14 ^a	16 $\pm$ 6	50 $\pm$ 11 ^a	49 $\pm$ 11 ^a	59 $\pm$ 13 ^a
ITP 组治疗后	15	63 $\pm$ 11 ^b	15 $\pm$ 4	40 $\pm$ 8 ^b	37 $\pm$ 7 ^b	46 $\pm$ 11 ^b
F 值		8.42	0.73	7.83	7.95	8.68
P 值		<0.01	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01

a: 与对照组比较, $P < 0.01$;b: 与治疗前比较, $P < 0.01$

3 讨论

T 细胞亚群功能异常和比例失常是导致 ITP 发病的重要因素,B 细胞产生自身抗体结合血小板引起其破坏是 ITP 发病的直接原因,而 T 细胞和 B 细胞的活化需要 DCs 表面 B7-CD28/CTLA4 和 CD40/CD40L 共刺激分子的相互作用^[6]。DCs 主要参与细胞免疫和 T 细胞依赖的体液免疫反应,在维持机体自身免疫耐受和活化外周 T、B 淋巴细胞中发挥重要作用,在调节 DCs 成熟或其功能方面的任何分子机制的改变都可以增加自身免疫性疾病的易感性。

不同成熟程度的 DCs 具有不同的生物学功能。外源性抗原进入体内,被未成熟 DCs 捕获后,加工成抗原肽,这些抗原肽被呈递给 DCs 表面的 MHC-II 类复合物。而内源性抗原,首先被蛋白酶分解为肽,然后在内质网上组装成稳定的 MHC-I 肽复合物,再呈递到 DCs 表面。未成熟 DCs 主要通过 TLR-NF- κ B 途径识别并捕获抗原^[7],然后迁移至次级淋巴器官并成熟,成熟 DCs 的主要任务是抗原提呈。在 DCs 转移并成熟化的过程中,表现为 DCs 抗原摄取能力下调,但加工、呈递抗原的能力上调^[8],同时其表面 MHC-I 及 MHC-II 类分子及 CD80、CD86、CD40、CD87 等的表达也同时上调,进而诱导 T 细胞产生特异性细胞毒 T 细胞。成熟 DCs 诱导的免疫激活在炎症反应及自身免疫性疾病中有重要的作用。不同亚群的 DCs 功能也存在差异,mDCs 通过合成和分泌 IL-12 促使静息 Th 细胞向 Th1 细胞分化,引发 Th1 反应;pDCs 使静息 Th 细胞向 Th2 分化,激发 Th2 型反应^[5]。pDCs 可通过诱导 Th2 型反应而抑制 Th1 型应答的产生,Th2 型反应产生的 IL-12 能影响 DCs 的成熟,减少其 MHC II 类分子、共刺激分子和黏附分子的表达,并能诱导调节性 T 细胞的分化^[9],进而诱导免疫耐受。未成熟 mDCs 和 CD40 配体活化的 pDCs 可通过诱导调节性 T 细胞

亚群而抑制自身 T 细胞反应^[10],所以未成熟 mDCs 和 pDCs 在免疫耐受中发挥重要作用。

DCs 不仅可以通过摄取、加工和提呈作用诱发 T 细胞免疫,还可通过对 T 细胞的杀伤和/或对 Treg 细胞的诱导作用来介导免疫耐受的发生^[11]。T 细胞的活化除需要 APC 通过其细胞表面抗原肽-MHC 复合物与 T 细胞受体结合传导第一信号外,还需要第二信号即 APC 和 T 细胞之间的协同刺激,主要协同刺激途径是 APC 表面的 B7 家族成员 (CD80, CD86) 和 CD40,他们分别与 T 细胞表面 CD28 (或 CTLA-4) 和 CD40L 结合。CD80 和 CD86 为 DCs 活化的标志,而 CD83 为 DCs 成熟的标志^[12]。成熟、活化的 DCs 主要发挥 APC 细胞的免疫激活功能。目前 DCs 在 ITP 中的作用也日益引起重视。Saito 等^[13]的研究表明原发和幽门螺杆菌相关的免疫性血小板减少症患者循环中的 pDCs 降低,它的改变取决于治疗方法。也有研究发现 cITP 患者成熟树突状 T 细胞活化能力显著高于健康对照者^[14]。Hsu 等^[15]发现糖皮质激素可抑制循环血中的 DCs 数量,从而抑制免疫反应,减少抗血小板自身抗体的产生。本研究显示 cITP 患儿治疗前 pDC 绝对数较正常儿童降低,而 mDC/pDC 比值增高;糖皮质激素治疗后 pDC 绝对数较治疗前增高,而 mDC 绝对数及 mDC/pDC 比值降低;cITP 患儿治疗前外周血 DCs 较正常儿童高水平表达 CD80、CD83 及 CD86,糖皮质激素治疗后 DCs 的 CD80、CD83 及 CD86 表达较治疗前均下降,表明 cITP 患儿存在 pDC 减低,不能维持自身免疫耐受,而 DCs 更趋于成熟及活化状态,导致机体免疫应答过度,抗原递呈功能增强,导致机体的免疫平衡紊乱,这可能与 cITP 的发病有关,而糖皮质激素可调节 cITP 患儿 DCs 亚群并抑制 DCs 成熟,这可能是糖皮质激素有效地治疗儿童 cITP 的作用机制。

在 DCs 诱导外周耐受功能的主要机制包括促使初始 T 细胞向调节性 T 细胞分化及扩增、IL-10 和其他免疫调节细胞因子的释放以及吲哚胺 2,3-双加氧酶 (indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO) 的表达。活化的调节性 T 细胞反过来又能提供生物活性的干扰素 (IFN) - γ 促进 IDO 在抗原提呈细胞上的表达,因此形成了正反馈链^[16]。IDO 是 DCs 长期耐受的信号蛋白^[17],最近研究表明 ITP 患者 DCs 的 IDO 表达下降,提高 DCs 的 IDO 表达和酶的活性可能是一种治疗 ITP 的很有前途的方法^[18],但还需进一步研究以证实。

[参 考 文 献]

[1] 胡群. 规范儿童免疫性血小板减少症的诊断和治疗[J]. 临床

儿科杂志, 2011, 29(5):411-413.

[2] Provan D, Stasi R, Newland AC, Blanchette VS, Bolton-Maggs P, Bussell JB, et al. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia[J]. Blood, 2010, 115(2): 168-186.

[3] Guo C, Chu X, Shi Y, He W, Li L, Wang L, et al. Correction of Th1-dominant cytokine profiles by high-dose dexamethasone in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura[J]. J Clin Immunol, 2007, 27(6): 557-562.

[4] 王薛平,邱运树,郝国平,朱镭. 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[J]. 中国当代儿科杂志, 2011, 13(4): 282-284.

[5] Mahnke K, Enk AH. Dendritic cells: key cells for the induction of regulatory T cells? [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2005, 293: 133-150.

[6] Watowich SS, Liu YJ. Mechanisms regulating dendritic cell specification and development[J]. Immunol Rev, 2010, 238(1):76-92.

[7] Biragyn A, Ruffini PA, Leifer CA, Klyushnenkova E, Shakhov A, Chertov O, et al. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2 [J]. Science, 2002, 298(5595): 1025-1029.

[8] Reis E, Sousa C. Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity[J]. Curr Opin Immunol, 2004, 16(1): 21-25.

[9] Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F, Squadrone S, de Waal Malefyt R, Roncarolo MG. IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells [J]. J Immunol, 2001, 166(9): 5530-5539.

[10] Gilliet M, Liu YJ. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells [J]. J Exp Med, 2002, 195(6): 695-704.

[11] Ouabed A, Hubert FX, Chabannes D, Gautreau L, Heslan M, Josien R. Differential control of T regulatory cell proliferation and suppressive activity by mature plasmacytoid versus conventional spleen dendritic cells[J]. J Immunol, 2008, 180(9): 5862-5870.

[12] Chapuis F, Rosenzweig M, Yagello M. Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro[J]. Eur J Immunol, 1997, 27(2):431-441.

[13] Saito A, Yokohama A, Osaki Y, Ogawa Y, Nakahashi H, Toyama K, et al. Circulating plasmacytoid dendritic cells in patients with primary and Helicobacter pylori-associated immune thrombocytopenia[J]. Eur J Haematol, 2012, 88(4): 340-349.

[14] Zhang XL, Peng J, Sun JZ, Guo CS, Yu Y, Wang ZG, et al. Modulation of immune response with cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 immunoglobulin-induced anergic T cells in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura [J]. J Thromb Haemost, 2008, 6(1): 158-165.

[15] Hsu NC, Chung CY, Horng HC, Chang Cs. Corticosteroid administration depresses circulating dendritic cells in ITP patients[J]. Platelets, 2004, 15(7): 451-454.

[16] Rutella S, De Cristofaro R, Ferraccioli G. Function and dysfunction of dendritic cells in autoimmune rheumatic diseases[J]. Hum Immunol, 2009, 70(5): 360-673.

[17] Pallotta MT, Orabona C, Volpi C, Vacca C, Belladonna ML, Bianchi R, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells[J]. Nat Immunol, 2011, 12(9): 870-878.

[18] Xu SQ, Wang CY, Zhu XJ, Dong XY, Shi Y, Peng J, et al. Decreased indoleamine 2,3-dioxygenase expression in dendritic cells and role of indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells in immune thrombocytopenia[J]. Ann Hematol, 2012, 91(10): 1623-1631.

(本文编辑:万静)