·临床检验研究论著·

慢性 ITP 患儿调节性 B 细胞与效应 Th 细胞的相关性研究*

伍昌林[1]，周雪敏[2]，朱　奕[1]，党鑫堂[1]，张爱根[1]，邵超鹏[1]

（1. 深圳市第二人民医院输血科，广东深圳 518035；2. 深圳市福田区慢病防治院，广东深圳 518048）

摘　要：目的　研究慢性特发性血小板减少性紫癜（CITP）患儿外周血调节性 B 细胞数量与相关细胞因子的变化，分析它们之间的相关性，研究这些细胞的分化在 CITP 发病机制中的作用。**方法**　选择 30 例 CITP 患儿，外周血单个核细胞被分离，Breg 细胞以及 Th1、Th22、Th17 的比例变化通过流式细胞术检测；并体外培养 PBMC 细胞，上述培养液中 IL-10 水平以及 IFN-γ、IL-17、IL-22 运用 ELISA 法检测，与同期选择的健康组比较。**结果**　与健康组比较，CITP 患儿外周血中 Th1、Th17、Th22 细胞亚群的比例均升高（18.4±4.7 vs 10.82±4.4；2.42±1.02 vs 1.23±0.42；0.79±0.24 vs 0.26±0.11，%），调节性 B 细胞（Breg）的比例降低（0.83±0.21 vs 1.89±0.12，%），差异均有统计学意义（$P<0.05$），Breg 细胞分别与 Th 效应细胞亚群的变化呈负相关（$P<0.05$），细胞因子 IL-10 水平与 IFN-γ、IL-17、IL-22 水平也呈负相关（$P<0.05$）。**结论**　调节性 B 细胞比例下调可能参与 CITP 患儿效应 T 细胞免疫紊乱机制，为 CITP 患儿的免疫调节治疗提供了新思分路。

关键词：紫癜，血小板减少性，特发性；　细胞因子类；　酶联免疫吸附测定

DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2014.13.013　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2014)13-1696-03

Correlation study of regulary B cell and effective Th cell in children with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura*

Wu Changlin[1], *Zhuo Xuemin*[2], *Zhu Yi*[1], *Dang Xintang*[1], *Zhang Aigen*[1], *Shao Chaopeng*[1]

(1. *Department of Blood Transfusion, Shenzhen Municipal Second People's Hospital, Shenzhen, Guangdong* 518035, *China*; 2. *Futian District Chronic Disease Hospital, Shenzhen, Guangdong* 518048, *China*)

Abstract: Objective　To study the changes of the peripheral blood regulatory B cells and related cytokines in children patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (CITP), and to analyze their correlations with effective Th cells, and to discuss their roles in the pathogenesis of CITP. **Methods**　The peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were separated in 30 cases of CITP, then percentages of Th1, Th17, Th22 and Breg cells were detected by the flow cytometry(FCM). IFN-γ, IL-17, IL-22 and IL-10 levels in culture supernatant were measured by the ELISA method. **Results**　Compared with the control group, the proportions of the peripheral blood Th1, Th17, Th22 subsets in CITP children were increased[(18.4±4.7)% vs. (10.82±4.4)%; (2.42±1.02)% vs. (1.23±0.42)%; (0.79±0.24)% vs. (0.26±0.11)%], the proportion of Breg cells was reduced significantly, the differences had statistical significance[(0.83±0.21)% vs. (1.89±0.12)%, $P<0.05$]. In CITP children, the IFN-γ, IL-17, IL-22 levels in culture supernatant were higher than those in the control group[(278.2±121.2) pg/mL vs. (181.8±82.2) pg/mL; (214.8±100.5) pg/mL vs. (161.4±67.8) pg/mL; (122.16±22.2) pg/mL vs. (90.8±31.1)pg/mL], but the IL-10 level was lower than that in the healthy control group[(27.4±12.6) pg/mL vs. (46.1±16.2) pg/mL), differences between them had statistical significance($P<0.05$). Besides, there was a positive correlation between the proportion of Breg cells and cytokine IL-10 level($r=0.617$, $P<0.05$), however, there was a negative correlation between the proportion of Breg cells with Th1, Th17 and Th22 cells($P<0.05$), between IL-10 level with IFN-γ, IL-17 and IL-22 levels($P<0.05$). **Conclusion**　The downregulation of Breg cells proportion may participate in the immune disorder mechanism of effective Th cells in CITP children, which can provide a new idea for the immunoregulation therapy in CITP children.

Key words: purpura, thrombocytopenic, idiopathic;　cytokines;　enzyme-linked immunosorbent assay

慢性特发性血小板减少性紫癜（chronic idiopathic thrombocytopenic purpura，CITP）是一种常见的自身免疫性血液系统疾病，其发病机制尚未完全明了。目前从免疫学的角度研究发现，CITP 患者的疾病状态与其体内免疫调节紊乱有关[1]。本研究将从患儿免疫细胞入手，研究调节性 B 细胞及效应性 Th 细胞的表达特点，以及相应的细胞因子水平，并分析它们的相关性。本研究旨在探讨调节性 B 细胞与效应 Th 细胞之间的关系，并分析它们在 CITP 患儿发病机制中的作用。

1　资料与方法

1.1　一般资料　自 2012 年 1 月至 2013 年 6 月，本院儿科病房与门诊共收治 30 例 CITP 患儿（男 16 例，女 14 例，年龄 9 个月至 15 岁，平均 9.9 岁），他们均符合 CITP 的临床诊断标准[2]。另选择对照组为年龄、性别相匹配的健康体检者 30 例（男 17 例，女 13 例，平均 10.5 岁）。

1.2　主要实验材料　荧光标记的抗体：兔抗人 CD5 抗体（FITC）、CD 1d 抗体（PE）、PerCP-cyTM-CD19（美国，BD 公

*　基金项目：广东省医学科研基金项目（NO. A2013588）。　作者简介：伍昌林，副主任检验师，博士，主要从事血液免疫学研究。

司)，抗 CD4(FITC 标记)(美国，EB 公司)，抗-IFN-γ(PE 标记)、抗-IL-17 A(PE 标记)、抗-IL-22(PE 标记)(美国，Miltenyibiotec 公司)；IgG1-FITC，IgG1-PE，IgG1-PerCP-cyTM 分别为同型对照；上海科华生产的 IFN-γ、IL-17、IL-22、IL-10 细胞因子 ELISA 检测试剂盒，美国 sigma 公司生产的淋巴细胞分层液，流式细胞仪(FACSCalibur，BD 公司产品)。

1.3　研究方法

1.3.1　外周血采集及处理　各自 3 mL 外周血分别从 CITP 患儿和健康对照组采集，肝素钠抗凝，PBMC 由密度梯度离心法分离，PBMC 密度调整为 1×109/L，100 mL/L 胎牛血清的 RPMI1640 培养液悬浮 PMBC，同步取 1 mL 细胞悬液，进行细胞荧光抗体染色，B 细胞亚群运用 FCM 测定；加入 PMA(50 μg/L)、离子霉素(1 μmol/L)于 2 mL 细胞悬液中，37 ℃孵箱中培养过夜，用于 ELISA 检测的上清液冻存置于－70 ℃。

1.3.2　Breg 与 Th 效应细胞的检测　分别取上述淋巴细胞分层液分离 PBMC，PBS 洗 2 次计数，共 5 支试管各取浓度为 1×109/L 外周血单个核细胞 100 μL，进行试管编号，第 1 管为同型对照；第 2 管加入 FITC-CD4 抗体与 PE-IFN-γ 抗体各 10 μL；第 3 管加入 FITC-CD4 抗体与 PE-IL-17A 抗体各 10 μL；第 4 管加入 FITC-CD4 抗体与 PE-IL-22 抗体各 10 μL；第 5 管加入 CD5-FITC、CD 1d-PE 和 PerCP-CD19 抗体各 10 μL，将标本与抗体充分混匀后，分别加入破膜剂，避光室温孵育 1 h 后取出，加入 2 mL 红细胞裂解液裂解 10 min，离心后弃上清液，PBS 洗 2 次，上流式细胞仪检测，结果用软件分析。

1.3.3　相关效应分子 IFN-γ、IL-17、IL-22、IL-10 的检测　取上述冻存 PBMC 培养上清液，采用 ELISA 法检测上清液中 IFN-γ、IL-17、IL-22、IL-10 水平，具体操作按试剂盒说明书进行，每个样本和标准品均设 3 个复孔，在 450 nm 波长处用酶联仪依序测量各孔的光密度(OD 值)。

1.4　统计学处理　采用 SPSS 16.0 软件分析，检测结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示，差异性分析采用两样本 t 检验，两变量的相关程度用直线相关分析法 Spearmen，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　　果

2.1　CITP 患儿外周血 Th 效应细胞(Th1、Th17、Th22)与调节性 Breg 比例变化　健康儿童比较，CITP 患儿外周血 Th1、Th17、Th22 细胞比例明显上升，差别有统计学意义($P<0.05$)；调节性 B 细胞(Breg)的比例降低，差别有统计学意义($P<0.05$)，见表 1。

表 1　CITP 患儿及健康儿童外周血 Th1、Th17、Th22、Breg 细胞的检测(%，$\bar{x}\pm s$)

组别	n	Th1	Th17	Th22	Breg
对照组	30	10.82±4.40	1.23±0.42	0.26±0.11	1.89±0.12
CITP 组	30	18.40±4.70#	2.42±1.02#	0.79±0.24#	0.83±0.21#

#：与对照组比较，$P<0.05$。

2.2　CITP 患儿外周血相关细胞因子 IFN-γ、IL-17、IL-22 和 IL-10 的表达水平　与健康对照组比较，CITP 患儿外周血 PBMC 细胞培养上清液中 IFN-γ、IL-17、IL-22 水平升高，IL-10 的表达水平均降低，差异均有统计学意义($P<0.05$)，见表 2。

2.3　CITP 患儿外周血调节性 B 细胞与 Th 效应细胞及 L-10 与 IFN-γ、IL-17、IL-22 因子的相关性　CITP 患儿外周血 Breg 细胞的比例变化与 PBMC 培养上清液中细胞因子 IL-10 表达水平成正相关($r=0.717$，$P<0.05$)；Breg 细胞与效应性 Th 细胞：Th1、Th17、Th22 细胞的比例变化呈负相关性($P<0.05$)。IL-10 水平与 IFN-γ、IL-17、IL-22 水平也呈负相关性($P<0.05$)。

表 2　CITP 患儿及健康儿童外周血 IFN-γ、IL-17、IL-22、IL-10 的检测($\bar{x}\pm s$，pg/mL)

组别	n	IFN-γ	IL-17	IL-22	IL-10
对照组	30	181.8±82.2	161.4±67.8	90.8±31.1	46.1±16.2
CITP 组	30	278.2±121.2#	214.8±100.5#	122.2±22.2#	27.4±12.6#

#：与对照组比较，$P<0.05$。

3　讨　　论

新型调节性 B 细胞(Breg)是一种具有负向调节性作用的细胞，其表型为 $CD1d^{high}CD5^{+}CD19^{+}$，在一些自身免疫病的发病机制中发挥重要的作用。CITP 是一种常见的自身免疫性血液病，$CD4^{+}$ T 细胞分化异常可能引起 CITP 的临床疾病的发生，Th 效应细胞的功能和比例失衡在 CITP 患儿的临床出血与相关症状的出现中起着非常重要的作用[3]。我们前期研究发现，可能导致血小板破坏增多的活性效应性 T 细胞大量存在 CITP 患儿外周血中，引起临床出血症状[4]，造成持续性血小板的免疫损伤。根据免疫调节平衡理论，造成激活的 Th 细胞增多的原因以前主要认为是调节性 T 细胞(Treg)减少或功能异常，但具体机制尚不明确的负向 Breg 也可能在 CITP 免疫失衡中发挥重要作用。这些效应 Th 细胞与 Breg 的相关性如何，有待进一步研究。

我们通过 CITP 患儿临床病例综合分析：患者外周血中 Breg 的数量要比健康对照组低，与健康对照组比较，患者外周血 PBMC 培养液上清液效应细胞相关因子 IFN-γ、IL-17、IL-22 水平升高，IL-10 的表达水平均降低，且具有统计学意义；同时，经相关性分析表明在 CITP 患儿外周血中，Breg 的比例变化与细胞因子 IL-10 表达水平表现为正相关；负相关性表现在 Breg 与 Th1、Th17、Th22 细胞，以及细胞因子 IL-10 与 IFN-γ、IL-17、IL-22 水平之间。由此表明 IL-10 可能是 Breg 的效应分子，并以此发挥免疫抑制功能。抑制 IL-6 和 IL-12 在树突状细胞中的产生可能是由 Breg 分泌的 IL-10 引起的，进一步抑制 Th1、Th17、Th22 细胞亚群的发育[5-6]。由此可见，导致 CITP 患儿 Th1、Th17、Th22 细胞免疫紊乱的重要原因可能是调节性 Breg 细胞的异常。

目前国内外的研究表明 Th1、Th17、Th22 等效应细胞异常可导致自身免疫病的发生[8]。那 Breg 是如何对效应性 Th 细胞发挥免疫抑制功能的呢？据目前的研究理论：IL-10 对 Th1/Th2 失衡的恢复作用可能是 Breg 免疫调节机制的重要功能之一；通过信号调节让 Tregs 等免疫抑制细胞集中发挥作用；直接对效应性 Th、Tc、NK 等细胞产生抑制作用[7-8]。Breg 可抑制炎性反应的发生，它们主要通过分泌细胞因子或抗体，直接或间接发挥相应的作用。而在 SLE、EAE 等患者中，Breg 可通过抑制效应 T 细胞的活性，减弱对自身成分的细胞毒作用，也可通过抑制自身反应性 T 细胞来减弱自身免疫的发生[9-10]；若 Breg 及相关细胞因子的下调可能会使效应性 T 细

胞活化，导致自身免疫病的发生或病情加重。

自身免疫病的治疗是目前临床工作者的难题，但是通过特异性诱导 Breg 抑制自身免疫病患者的自身免疫反应，可能是更有前景的治疗方法。但是，怎样才能有效地诱导 Breg 的产生呢？在 CITP 患儿外周血中，虽然我们发现 Breg 与效应性 Th 细胞间存在负相关性，但是患儿外周血 Breg 是否代表一群独立的调节性细胞，其与调节性 T 细胞间如何协同作用并发挥调节作用的机理不明确。另外，Breg 调节细胞发挥负性调节作用的信号转导通路和转录因子也没有明确。这些深层次的问题还有待我们今后深入研究。

结合前期的研究结果，Breg 与相关细胞因子 IL-10 在 CITP 患儿免疫紊乱中发挥重要作用，并且与效应性 Th 细胞免疫功能紊乱相关。因此可通过检测患儿 Breg 及 IL-10 水平作为 CITP 临床诊断的辅助指标，并用于疾病活动状态的判断；此外可通过调节 Breg 分化来控制 CITP 患儿疾病的进展，在 CITP 的临床治疗和诊断中具有重要的意义。

参考文献

[1] Hu Y, Li H, Zhang L, et al. Elevated profiles of Th22 cells and correlations with Th17 cells in patients with immune thrombocytopenia[J]. Hum Immunol, 2012, 73(6): 629-635.

[2] 张之南. 血液病诊断及疗效标准[M]. 2 版. 北京：北京科学出版社，1998：34-36.

[3] Li X, Zhong H, Bao W, et al. Defective regulatory B-cell compartment in patients with immune thrombocytopenia[J]. Blood, 2012, 120(16): 3318-3325.

[4] Wu CL, Xu JC, Li F, et al. Polarization and apoptosis of T cell subsets in idiopathic thrombocytopenic purpura[J]. Int J Lab Hematol, 2007, 29(3): 177-184.

[5] Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development [J]. J Allergy Clin Immunol, 2013, 131(4): 959-971.

[6] Noh J, Choi WS, Noh G, Lee JH. Presence of Foxp3-expressing CD19(+)CD5(+) B Cells in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Human CD19(+)CD5(+)Foxp3(+) Regulatory B Cell (Breg)[J]. Immune Netw, 2010, 10(6): 247-249.

[7] Sindhava VJ, Bondada S. Multiple regulatory mechanisms control B-1 B cell activation[J]. Front Immunol, 2012, 3: 372.

[8] Cao J, Chen C, Li L, et al. Effects of high-dose dexamethasone on regulating interleukin-22 production and correcting Th1 and Th22 polarization in immune thrombocytopenia[J]. J Clin Immunol, 2012, 32(3): 523-529.

[9] Lee JH, Noh J, Noh G, et al. Allergen-Specific Transforming Growth Factor-β-Producing CD19(+)CD5(+) Regulatory B-Cell (Br3) Responses in Human Late Eczematous Allergic Reactions to Cow's Milk[J]. J Interferon Cytokine Res, 2011, 31(5): 441-449.

[10] Knippenberg S, Peelen E, Smolders J, et al. Reduction in IL-10 producing B cells (Breg) in multiple sclerosis is accompanied by a reduced naive/memory Breg ratio during a relapse but not in remission[J]. J Neuroimmunol, 2011, 239(1/2): 80-86.

（收稿日期：2014-02-18）

（上接第 1695 页）

集也计入大血小板而使 PCT、PDW、MPV 相应升高所致。

综上所述，血小板参数的变化预示血小板生成和功能等方面的改变[14-15]，血小板聚集率、数量及体积的改变与急性脑梗死的发生和发展密切相关，监测它们的变化对预防和治疗急性脑梗死具有重要的临床意义。

参考文献

[1] 乔蕊，王京，李蕾，等. 全血电阻法检测血小板聚集程度对抗血小板治疗效果的评价[J]. 中华检验医学杂志，2007，30(11)：1260-1265.

[2] 褚静英，徐廷云，陆玉霞，等. 全自动法不同模式检测血小板的比较分析[J]. 检验医学与临床，2011，8(4)：432-433.

[3] 中华医学会. 脑血管疾病诊断和分类诊断要点[J]. 中华神经精神科杂志，2007，29(4)：376-378.

[4] Peersehke El, Silver RT, WekSle BB, et al. Examination of Platelet function in whole blood under dynamic flow conditions with the cone and plate(let) analyzer: effect of erythrocytosis and thrombocytosis[J]. Am J ClinPathol, 2007, 127(4): 422-428.

[5] Frossard M, Fuchs I, Leitner JM, et al. Platelet function predicts myocardial damage in patients with acute myocardial infaretion [J]. Circulation, 2004, 1(10): 1392-1397.

[6] Gremmel T, Steiner S, Seidinger D, et al. Comparison of methods to evaluate clopidogrel mediated platelet inhibition after percutaneous intervention with stent implantation[J]. Thromb Haemost, 2009, 101(3): 333-339.

[7] Rollini F, Tello-Montoliu A, Angiolillo DJ. Advances in platelet function testing assessing bleeding complications in patients with coronary artery disease[J]. Platelets, 2012, 23(7): 537-541.

[8] Sharma RK, Voelker DJ, Sharma R, et al. Evolving role of platelet function testing in coronary artery intervention. Vasc Health Risk Manag, 2012, 8(1): 65-75.

[9] Wheeler GL, Braden GA, Steinhubl SR, et al. The Ultegra rapid platelet function assay: comparision to standard platelet function assays in patients undergoing percutaneous coronary intervention with abciximab therapy[J]. Am Heart J, 2002, 143(4): 602-611.

[10] 张有涛，赵益明，季顺东. PL-11 血小板分析仪检测功能的性能评价[J]. 中华检验医学杂志，2012，35(12)：1139-1141.

[11] 张玮，梁红梅. PL-11 血小板分析仪检测功能的性能评价及应用研究[J]. 中国医疗前沿，2013，8(1)：94-95.

[12] 唐万兵，李梅笑，李观强，等. 平均血小板容积、纤维蛋白原含量及血液流变学在青年脑梗死患者外周血中的变化[J]. 中国实验血液学杂志，2012，20(2)：390-393.

[13] 马丽萍，魏菁，常建星，等. 血小板 TLR4 表达介导 LPS 诱导的血小板活化[J]. 中国实验血液学杂志，2009，17(15)：1564-1568.

[14] 闫绍荣，李 强. 急性脑梗死血小板相关参数的改变[J]. 检验医学与临床，2007，4(11)：1036-1037.

[15] 徐永川，冯涓，韩东. 急性脑梗死血小板数量与血小板平均体积的关系[J]. 中风与神经疾病杂志，2011，28(10)：942-943.

（收稿日期：2014-03-18）