

• 论 著 •

浆母细胞在成人原发免疫性血小板减少症中的表达特征及临床价值*

方佩琪¹,朱捷¹,顾梅秀¹,王蓓丽^{1△},潘柏申¹,郭玮^{1,2,3,4}

1. 复旦大学附属中山医院检验科,上海 200032;2. 上海市老年医学中心检验科,上海 201100;3. 上海市宝山区吴淞中心医院检验科,上海 201900;4. 复旦大学附属中山医院厦门医院检验科,福建厦门 361015

摘要:**目的** 探讨成人原发免疫性血小板减少症(ITP)患者外周血中浆母细胞的表达特征及在疾病诊断中的价值。**方法** 选取 2022 年 7—12 月来复旦大学附属中山医院就诊的 20 例 ITP 患者和 20 例继发其他各种疾病导致血小板减少患者(非 ITP 血小板减少患者)分别作为 ITP 组和非 ITP 血小板减少组,并选取同期 24 例体检健康者作为健康对照组。应用流式细胞术检测各组外周血 B 淋巴细胞亚群并比较其差异,采用 Logistic 回归分析 ITP 发生的风险因素。**结果** 与健康对照组比较,ITP 组浆母细胞(CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺)占 CD19⁺细胞比例显著上升,差异有统计学意义($P<0.05$),其余淋巴细胞亚群指标比较差异无统计学意义($P>0.05$)。与健康对照组比较,非 ITP 血小板减少组初始 B 细胞(CD19⁺CD27⁻CD38⁻)占 CD19⁺细胞比例显著上升,记忆 B 细胞(CD19⁺CD27⁺CD38⁻)占 CD19⁺细胞比例均显著下降,差异有统计学意义($P<0.01$),浆母细胞比例差异无统计学意义($P>0.05$)。与非 ITP 血小板减少组比较,ITP 组浆母细胞(CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺)、记忆 B 细胞(CD19⁺CD27⁺CD38⁻)占 CD19⁺细胞比例均显著上升,初始 B 细胞(CD19⁺CD27⁻CD38⁻)占 CD19⁺细胞比例下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。Logistic 回归分析显示,当模型未校准时, $OR=3.31, P<0.01$;校准性别、年龄后,ITP 发生的风险增加 2.65 倍($OR=3.65, P<0.01$);进一步校准性别、年龄和血小板计数后,ITP 发生的风险增加 3.78 倍($OR=4.78, P<0.01$)。**结论** 外周血浆母细胞升高是成人 ITP 发生的独立风险因素。

关键词:原发免疫性血小板减少症; B 淋巴细胞亚群; 浆母细胞; 风险因素

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2024.07.002 **中图法分类号:**R446.11;R558.2

文章编号:1673-4130(2024)07-0772-04 **文献标志码:**A

Expression characteristics and clinical value of plasmablast cells in adult primary immune thrombocytopenia*

FANG Peiqi¹,ZHU Jie¹,GU Meixiu¹,WANG Beili^{1△},PAN Baishen¹,GUO Wei^{1,2,3,4}

1. Department of Laboratory Medicine,Zhongshan Hospital,Fudan University,Shanghai 200032, China;2. Department of Laboratory Medicine,Shanghai Geriatric Medical Center,Shanghai 201100,China;3. Department of Laboratory Medicine,Wusong Central Hospital, Baoshan District,Shanghai 201900,China;4. Department of Laboratory Medicine,Xiamen Branch,Zhongshan Hospital,Fudan University,Xiamen,Fujian 361015,China

Abstract: Objective To investigate the expression characteristics of plasmablast cells in peripheral blood of adult with primary immune thrombocytopenia (ITP) and its diagnostic value. **Methods** A total of 20 patients with ITP and 20 patients with secondary diseases resulting in thrombocytopenia (non-ITP thrombocytopenia) who visited Zhongshan Hospital,Fudan University from July to December 2022 were selected as ITP group and non-ITP thrombocytopenia group, respectively. Additionally, 24 individuals undergoing health examinations during the same period were chosen as healthy control group. Flow cytometry was used to detect B-lymphocyte subsets in peripheral blood of each group and the differences were compared. The risk factors of ITP were analyzed by Logistic regression. **Results** Compared with the healthy control group, the proportion of plasmablast cells (CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺) in CD19⁺ cells in ITP group was significantly increased ($P<$

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81972000,82172348);国家自然科学基金青年科学基金项目(81902139,82202608);复旦大学附属中山医院临床研究专项基金项目(2020ZSLC54);上海市临床重点专科建设项目(shslczdzk03302);上海市宝山区医学重点专科项目(BSZK-2023-A18)。

作者简介:方佩琪,女,主管技师,主要从事流式细胞术相关研究。△ 通信作者,E-mail:wang.beili1@zs-hospital.sh.cn。
网络首发 [http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20231101.1739.004.html\(2023-11-02\)](http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20231101.1739.004.html(2023-11-02))

0.05), and the other lymphocyte subsets indicators were not statistically significant ($P > 0.05$). Compared with healthy control group, the proportion of initial B cells ($CD19^+ CD27^- CD38^-$) in $CD19^+$ cells in non-ITP thrombocytopenia group was significantly increased, and the proportion of memory B cells ($CD19^+ CD27^+ CD38^-$) in $CD19^+$ cells was significantly decreased, with statistical significance ($P < 0.01$). There was no significant difference in the proportion of plasmablast cells ($P > 0.05$). Compared with non-ITP thrombocytopenia group, the proportion of plasmablast cells ($CD19^+ CD27^{++} CD38^{++}$) and memory B cells ($CD19^+ CD27^+ CD38^-$) in $CD19^+$ cells increased significantly in ITP group, while the proportion of initial B cells ($CD19^+ CD27^- CD38^-$) in $CD19^+$ cells decreased, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Logistic regression analysis showed that when the model was not calibrated, $OR = 3.31, P < 0.01$; after adjusting gender and age, the risk of ITP was increased by 2.65 times ($OR = 3.65, P < 0.01$); after further adjustment for gender, age, and platelet count, the risk of ITP was increased by 3.78 times ($OR = 4.78, P < 0.01$). **Conclusion** Elevated levels of peripheral blood plasmablast cells are an independent risk factor for the occurrence of ITP in adults.

Key words: primary immune thrombocytopenia; B lymphocyte subsets; plasmablast cells; risk factors

原发免疫性血小板减少症(ITP)是一种以孤立性血小板减少为特征的获得性自身免疫性出血性疾病,多以自身免疫所介导的抑制血小板生成并加快血小板破坏为表现的血液系统疾病,据文献报道其在临床出血性疾病中约占 30%^[1]。ITP 的发病机制是血小板自身抗原免疫耐受性丢失,导致体液和细胞免疫异常活化,共同介导血小板破坏加速及巨核细胞产生血小板不足所致^[2]。目前临床已知的血小板自身抗体包括 GPII b/III a 和抗 GPI b/IX 抗体等^[3]。而成人患者 B 淋巴细胞亚群的分化状态在 ITP 发病过程中也起着重要作用。B 淋巴细胞是一种在适应性免疫反应中起关键作用的细胞,其通过产生抗体发挥特异性体液免疫作用^[4-5],可生成高亲和力抗体、生成免疫细胞及充当抗原呈递细胞,并分泌细胞因子。本研究拟通过分析成人 ITP 与成人继发性血小板减少患者外周血中 B 淋巴细胞亚群的变化,探索成人 ITP 的发病机制,以期临床鉴别诊断、监测及治疗 ITP 提供新思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2022 年 7—12 月来复旦大学附属中山医院就诊的 20 例 ITP 患者和 20 例继发其他各种疾病导致血小板减少患者(非 ITP 血小板减少患者)分别作为 ITP 组和非 ITP 血小板减少组。纳入标准:(1)ITP 患者的临床诊断符合《成人原发免疫性血小板减少症诊断与治疗中国指南(2020 年版)》中相关要求,初诊为 ITP,血小板计数减少且外周血镜检血常规形态无明显异常,骨髓检查为巨核细胞增多或正常,排除其他继发性血小板减少症,未接受临床治疗。(2)非 ITP 血小板减少患者为由于各种病理疾病和生理原因导致血小板下降者。另选取同期 24 例体检健康者作为健康对照组。本研究通过复旦大学附属中山医院伦理委员会审批(伦理审批号为 B2022-348),符合赫尔辛基宣言。所有研究对象对本研究内容知情并签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂 美国 BD 公司 PerCP-Cy5.5 标记

的小鼠抗人 CD45 单克隆抗体(货号:663499);西班牙 Cytognos 公司 FITC 标记的小鼠抗人 CD38 单克隆抗体(货号:CYT-38F);美国 Beckman Coulter 公司 PC7 标记的小鼠抗人 CD19 单克隆抗体(货号:IM3628);美国 Biolegend 公司 BV510 标记的小鼠抗人 CD27 单克隆抗体(货号:302835)。FACS Canto II 流式细胞仪及溶血素 FACS Lysing Solution(货号:349202)购自美国 BD 公司。

1.3 方法 100 μ L 新鲜外周血中加入 5 μ L PerCP-Cy5.5 标记 CD45 抗体、5 μ L FITC 标记 CD38 抗体、5 μ L BV510 标记的 CD27 抗体、5 μ L PC7 标记 CD19 抗体,避光孵育 15 min。然后,加入 1 000 μ L 的溶血素,避光孵育 10 min。250 $\times$ g 离心 5 min,弃上清液,再加 2 000 μ L 磷酸盐缓冲液(PBS)振荡混匀后再次离心 5 min,弃上清液,加入 500 μ L PBS 重悬细胞,制成所需的单细胞悬液后上机检测。使用 BD 公司的 Diva 流式分析软件获取数据并进行分析。收集细胞使用中速,收集 50 000 个白细胞,在 CD45/SSC 散点图上设门,圈选出淋巴细胞;在淋巴细胞门下以 CD19/SSC 散点图上圈选 $CD19^+$ 为 B 淋巴细胞群;然后,在 CD38/CD27 散点图上分析 $CD19^+$ B 淋巴细胞中各个亚群的分布情况。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件和 R 语言 4.1 软件包进行数据分析,其中满足正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验;不满足正态分布的计量资料以中位数(四分位数) [$M(P_{25}, P_{75})$] 表示,组间比较采用非参数秩和检验;使用 Logistic 回归分析 ITP 发生相关风险因素。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料比较 ITP 组、非 ITP 血小板减少组、健康对照组性别、年龄比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。与健康对照组比较,ITP 组、非 ITP 血小板减少组血小板计数显著下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);ITP 组浆母细胞占 $CD19^+$ 细胞比例显著

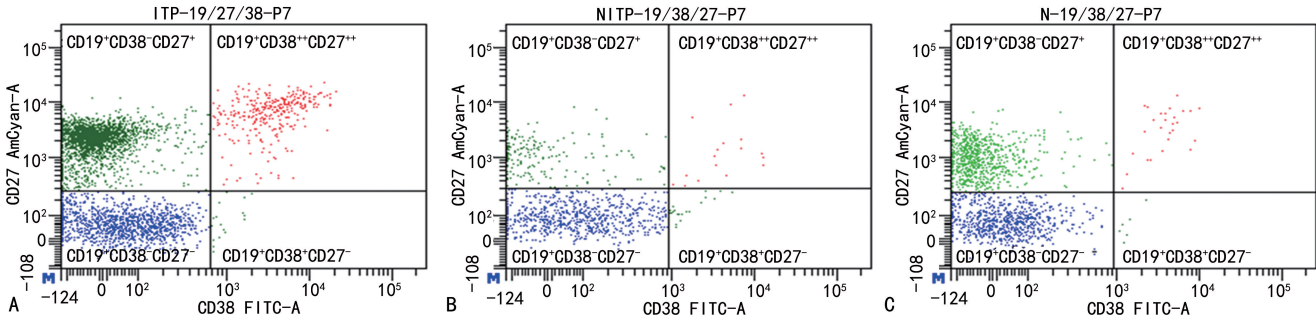
上升,非 ITP 血小板减少组初始 B 细胞占 CD19⁺ 细胞比例显著上升、记忆 B 细胞占 CD19⁺ 细胞比例显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$),其余淋巴细胞亚群指标比较,差异无统计学意义($P>0.05$);与非 ITP 组血小板减少组比较,ITP 组浆母细胞、记忆 B 细胞各占 CD19⁺ 细胞比例均上升,初始 B 细胞占 CD19⁺ 细胞比例下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。见

表 1。
2.2 流式细胞术结果比较 收集细胞以 CD19/SSC 设门,ITP 组、非 ITP 血小板减少组及健康对照组 B 淋巴细胞亚群表面抗原表达为:浆母细胞(CD19⁺ CD27⁺⁺ CD38⁺⁺)、初始 B 细胞(CD19⁺ CD27⁻ CD38⁻)和记忆 B 细胞(CD19⁺ CD27⁺ CD38⁻)。见图 1。

表 1 ITP 组、非 ITP 血小板减少组和健康对照组浆母细胞、初始 B 细胞及记忆 B 细胞及临床参数比较[$\bar{x}\pm s$ 或 n/n 或 $M(P_{25},P_{75})$]

组别	年龄 (岁)	性别 (男/女)	血小板计数 ($\times 10^9/L$)	浆母细胞 (%)	初始 B 细胞 (%)	记忆 B 细胞 (%)
ITP 组	56.70 $\pm$ 18.41	10/10	24.5(8.0,39.0)	2.85(1.20,5.55) ^{ab}	41.12 $\pm$ 14.21 ^b	49.28 $\pm$ 15.53 ^b
非 ITP 血小板减少组	58.25 $\pm$ 14.85	9/11	36.5(21.8,51.5)	0.35(0.11,0.95)	50.98 $\pm$ 13.63 ^a	36.95 $\pm$ 16.46 ^a
健康对照组	44.50 $\pm$ 15.97	16/8	230.0(211.5,292.0)	0.60(0.30,1.12)	35.75 $\pm$ 10.77	50.48 $\pm$ 14.19

注:与健康对照组比较,^a $P<0.05$;与非 ITP 血小板减少组比较,^b $P<0.05$ 。



注:A 为 ITP 组;B 为非 ITP 血小板减少组;C 为健康对照组。

图 1 3 组 B 细胞亚群表面抗原表达流式细胞术检测结果

2.3 浆母细胞与 ITP 发生的相关性 以年龄、性别、血小板、浆母细胞比例为因变量,分析 ITP 发生的危险因素。Logistic 回归分析显示,浆母细胞比例是 ITP 发生的危险因素($P<0.01$)。当模型未校准时, $OR=3.31(P<0.01)$,校准年龄、性别后,ITP 的发生风险增加 2.65 倍, $OR=3.65,95\%CI$ 为 1.74~7.68 ($P<0.01$);进一步校准年龄、性别和血小板计数后,ITP 的发生风险增加 3.78 倍, $OR=4.78,95\%CI$ 为 1.58~14.49($P<0.01$)。随着浆母细胞比例升高,发生 ITP 风险增加。见图 2。

3 讨论
ITP 是一种获得性自身免疫性出血性疾病,以无明确诱因的孤立性外周血血小板计数减少为主要特点^[6],而国内目前尚无基于人口基数的 ITP 流行病学调查统计。国外相关文献报道的成人 ITP 发病率波动范围为(2~10)/10 万,其中儿童及 60 岁以上人群高发^[7-9]。目前普遍认为血小板自身抗原免疫耐受性缺失,导致体液(抗血小板抗体)、细胞(T 细胞)免疫异常活化,共同介导了血小板破坏及单核巨核系统受损,从而导致外周血血小板减少^[10-11]。因此,B 细胞发育失调也与 ITP 的发生有关,其通过产生自身抗体加速血小板的破坏,并黏附于巨核细胞表面,进而影响巨核细胞的成熟,导致 ITP 的发生^[12]。外周血中的浆母细胞是由活化后的 B 细胞逐步分化形成的,转入淋巴结组织的部分浆母细胞形成短寿浆细胞,另一部分迁移入骨髓或炎症组织形成长寿浆细胞^[13]。长寿浆细胞会持续分泌自身免疫抗体,同时在浆细胞样树突细胞的共同参与下激活 B 细胞,再次分化为浆母细胞,进而形成短寿浆细胞,分泌自身免疫抗体,引起疾病复发。衰老的长寿浆细胞在这一机制过程中还会被新生的浆细胞替换,导致浆母细胞比例持续维持在较高的水平^[14]。这表明外周血浆母细胞比例的增

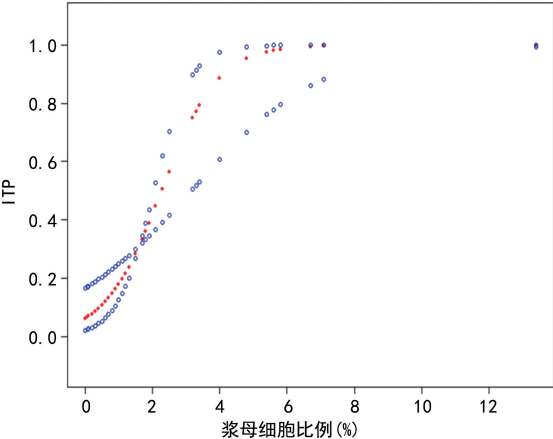


图 2 浆母细胞比例与 ITP 发生风险的量效关系

高是不同自身免疫性疾病的典型表现^[15-16]。

本研究结果发现,与非 ITP 血小板减少组和健康对照组相比,ITP 组外周血浆母细胞比例显著增高,提示浆母细胞在 ITP 发病机制中发挥了相应作用。纪宗斐等^[17]研究显示,IgG4-RD 患者体内的 B 细胞大量地活化并转化为浆细胞,导致 CD19^{low}CD38⁺CD20⁻CD27⁺循环浆母细胞数量显著升高。本研究通过 Logistic 回归分析了患者的年龄、性别、血小板和浆母细胞比例等混杂因素与 ITP 发生风险存在的量效关系,结果显示,浆母细胞是量效关系中的危险因素,可作为独立的风险预测因素。

值得注意的是,FLINT 等^[18]研究发现,B 细胞成熟抗原(BCMA)在 ITP 患者的浆母细胞上持续高表达,因此推测其可能是 ITP 患者浆母细胞靶向治疗的靶点。然而,LEE 等^[19]研究认为,B 细胞清除疗法(抗体药物靶向结合 B 细胞特异性抗原)是治疗自身免疫性疾病的可能策略。本研究中纳入的 ITP 患者均是初诊患者,在未接受免疫或激素治疗前仅浆母细胞比例高于非 ITP 血小板减少组,在后续研究中将进一步关注不同治疗方案、疾病进程等因素对浆母细胞比例、血小板计数变化的影响。

浆母细胞作为浆细胞的前体,既可大量分泌自身免疫抗体,直接参与自身免疫性疾病进程,又可分化为长寿浆细胞,对疾病造成长远的影响。同时,这些存在于外周血中的浆母细胞也便于在临床开展流式细胞术检测,辅助诊断 ITP,为临床提供更多元化的诊断路径。因此,在各类自身免疫性疾病中,监测外周血浆母细胞比例具有重要的临床意义。

本研究仍然存在不足,如缺少对 ITP 发病机制的深入研究,没有更细化分析 ITP 患者的疾病阶段。本课题组将继续探讨浆母细胞在 ITP 发生发展中的机制,并且希望能通过更多的病例来探索不同方法治疗后 ITP 患者体内浆母细胞比例的变化。

参考文献

- [1] 侯明. 免疫性血小板减少症的治疗进展[J]. 临床血液学杂志, 2020, 33(1): 6-9.
- [2] 刘新光, 侯明. 成人原发免疫性血小板减少症: 2019 版美国血液学会指南与国际共识报告更新解读[J]. 中华血液学杂志, 2020, 41(6): 441-445.
- [3] 卢雨萌, 程韵枫. 原发免疫性血小板减少症中调节性 T 淋巴细胞的异常[J]. 中国临床医学, 2016(5): 672-676.
- [4] LAM J H, SMITH F L, BAUMGARTH N. B cell activation and response regulation during viral infections[J]. *Viral Immunol*, 2020, 33(4): 294-306.
- [5] 刘齐烨, 葛繁梅. 淋巴细胞亚群异常在原发免疫性血小板减少症发病机制中的研究进展[J]. 分子影像学杂志, 2017, 40(4): 489-493.

- [6] 刘新光, 侯明. 成人原发免疫性血小板减少症研究与诊治国际共识报告更新(2019 版)解读[J]. 中华血液学杂志, 2020, 41(2): 89-92.
- [7] MOULIS G, PALMARO A, MONTASTRUC J L, et al. Epidemiology of incident immune thrombocytopenia: a nationwide population-based study in France[J]. *Blood*, 2014, 124(22): 3308-3315.
- [8] LEE J Y, LEE J H, LEE H, et al. Epidemiology and management of primary immune thrombocytopenia: a nationwide population-based study in Korea[J]. *Thromb Res*, 2017, 155: 86-91.
- [9] SINGH G, BANSAL D, WRIGHT N A M. Immune thrombocytopenia in children: consensus and controversies[J]. *Indian J Pediatr*, 2020, 87: 150-157.
- [10] ZUFFEREY A, KAPUR R, SEMPLE J W. Pathogenesis and therapeutic mechanisms in immune thrombocytopenia (ITP)[J]. *J Clin Med*, 2017, 6(2): 16.
- [11] YU T, WANG H, ZHAO Y, et al. Abnormalities of bone marrow B cells and plasma cells in primary immune thrombocytopenia[J]. *Blood Adv*, 2021, 5(20): 4087-4101.
- [12] SEMPLE J W, REBETZ J, MAOUIA A, et al. An update on the pathophysiology of immune thrombocytopenia[J]. *Curr Opin Hematol*, 2020, 27(6): 423-429.
- [13] HIEPE F, DÖRNER T, HAUSER A E, et al. Long-lived autoreactive plasma cells drive persistent autoimmune inflammation[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2011, 7(3): 170-178.
- [14] MIKELOV A, ALEKSEEVA E I, KOMECH E A, et al. Memory persistence and differentiation into antibody-secreting cells accompanied by positive selection in longitudinal BCR repertoires[J]. *Elife*, 2022, 11: e79254.
- [15] HAGAG N A, EL-AGAMY O A, ELSHANSHORY M R, et al. Assessment of plasmablast cells in immune thrombocytopenic purpura in children[J]. *Pediatr Hematol Oncol*, 2022, 39(6): 508-516.
- [16] MA K, DU W, WANG X, et al. Multiple functions of B cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(23): 6021.
- [17] 纪宗斐, 马玲瑛, 姜林娣. IgG4 相关性疾病(IgG4-RD)发病机制的研究进展[J]. 复旦学报医学版, 2019, 46(1): 114-118.
- [18] FLINT S M, GIBSON A, LUCAS G, et al. A distinct plasmablast and naive B-cell phenotype in primary immune thrombocytopenia[J]. *Haematologica*, 2016, 101(6): 698-706.
- [19] LEE D S W, ROJAS O L, GOMMERMAN J L. B cell depletion therapies in autoimmune disease: advances and mechanistic insights[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(3): 179-199.

(收稿日期: 2023-10-10 修回日期: 2023-11-01)