

B细胞活化因子及调节性T细胞在免疫性血小板减少症发病中的作用

文瑞婷, 杨志刚, 聂丽容, 龙杰, 梁亮, 吴国才, 何红华, 李庆华 (广东医科大学附属第一医院血液内科, 广东湛江 524001)

摘要: 目的 了解B细胞活化因子(BAFF)及调节性T(Treg)细胞在免疫性血小板减少症(ITP)发病中的作用。方法 采集34例ITP及28例健康对照者外周血, 用流式细胞术检测外周血Treg细胞数, ELISA检测血浆BAFF水平。结果 ITP患者外周血Treg细胞/CD4⁺细胞比值低于对照者[(1.55±1.13)% vs (2.73±0.83)%, $P<0.01$], 而血浆BAFF水平高于对照者[(1 426.14±1 280.67) μg/L vs (644.29±307.97) μg/L, $P<0.01$]。结论 BAFF与Treg细胞可能存在相互作用, 从而参与ITP发病。

关键词: 免疫性血小板减少症; 调节性T细胞; B细胞活化因子

中图分类号: R 558^{+.2} 文献标识码: A 文章编号: 2096-3610(2017)04-0353-03

Role of B cell activating factor and regulatory T cells in the pathogenesis of immune thrombocytopenia

WEN Rui-ting, YANG Zhi-gang, NIE Li-rong, LONG Jie, LIANG Liang, WU Guo-cai, HE Hong-hua, LI Qing-hua (Department of Hematology, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the role of B cell activating factor (BAFF) and regulatory T (Treg) cells in the pathogenesis of immune thrombocytopenia (ITP). **Methods** Peripheral blood Treg cells and plasma BAFF level of 34 ITP patients and 28 healthy controls were respectively detected by flow cytometry and ELISA. **Results** Compared with control group, the ratio of Treg/CD4⁺ cells was decreased [(1.55±1.13)% vs (2.73±0.83)%, $P<0.01$], while plasma BAFF level was increased [(1 426.14±1 280.67) μg/L vs (644.29±307.97) μg/L, $P<0.01$] in ITP group. **Conclusion** There may be an inter-reaction between BAFF expression and Treg cells, which might be involved in the pathogenesis of ITP.

Key words: immune thrombocytopenia; regulatory T cells; B cell activating factor

免疫性血小板减少症(Immune Thrombocytopenia, ITP)是一种器官特异性自身免疫性疾病, 以免疫介导的血小板减少与抗血小板自身抗体的出现导致耐受丢失为特征。近年来研究发现ITP的发病机制不仅与B淋巴细胞功能异常有关, 与T淋巴细胞的表达及功能异常也密切相关^[1-2]。调节性T细胞(Tregs)在机体免疫负调节中发挥重要作用, 其功能下降可能是导致自身免疫性疾病发生的机制之一。并且研究发现细胞活化因子(B cell activating factor, BAFF)表达过度可使B淋巴细胞分化为浆细胞, 延长浆细胞的生命, 从而不断分泌自身抗体, 最终导

致一系列自身免疫性疾病的发生^[3]。因此, 本研究采用流式细胞术检测了ITP患者及健康对照者外周血CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺Tregs的表达, 采用ELISA法检测了血浆BAFF水平的变化, 以探讨Tregs及BAFF在ITP发病中的作用。

1 资料和方法

1.1 观察对象

选取2013年11月至2014年3月在广东医科大学附属第一医院血液科住院部或门诊确诊的ITP患者34例, 其中男14例, 女20例; 年龄13~58岁。ITP诊断符合文

基金项目: 广东省科技计划项目(No. 2014A020212300、2016A020215149), 广东省医学科研基金立项项目(No. A2015547), 广东医科大学科研基金项目(No. M2014025、M2015002), 湛江市财政资金科技专项竞争性分配项目(No. 2016A06003)

收稿日期: 2017-03-28; **修订日期:** 2017-05-27

作者简介: 文瑞婷(1983-), 女, 硕士研究生, 住院医师。

通信作者: 杨志刚, 教授, 博士生导师, E-mail: yangzhigangcn@aliyun.com。

献标准^[4]。选取同期健康志愿者28例，其中男15例，女13例，年龄18~42岁。

1.2 主要试剂及仪器

人BAFF ELISA试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司); Anti-Human CD4-FITC、CD25-APC、Foxp3-PE-cy7单克隆抗体及同型对照IgG2a-PE-cy7、IgG1-APC(美国Ebioscience公司); FACSCantoII流式细胞仪(美国BD公司); 酶标仪(Thermo公司)。

1.3 实验方法

外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Tregs检测：所有观察对象均于早晨空腹抽取EDTA抗凝的外周血4 mL。(1)Ficoll密度梯度离心法分离人外周血单个核细胞(PBMC)后，用200 μL PBS重悬细胞，苔盼蓝染液计数细胞总数，调整活细胞浓度为1×10⁶个/mL；(2)取2个流式管，各加入100 μL PBMC后，每管加入5 μL Anti-Human CD4-FITC，测定管加入5 μL Anti-Human CD25-APC，对照管加入5 μL IgG1-APC，混匀后避光孵育30 min；(3)加入适量冷的PBS，离心1 500转，8 min后去掉上清；(4)每管加入1 mL新鲜配制的固定/破膜剂，震荡摇匀后在4 ℃避光孵育60 min，离心1 500转，8 min后去掉上清；(5)每管加入2 mL Permeabilization Buffer混匀后，离心1 500转，8 min；(6)重复步骤(5) 1次；(7)同型对照管中加入5 μL的IgG2a-PE-cy7，测定管中加入5 μL的 Anti-Human

Foxp3-PE-cy7抗体，在4 ℃避光孵育30 min；(8)每管加入2 mL 1×permeabilization buffer 混匀后，离心1 500转，8 min；(9)去掉上清后，每管加入500 μL PBS重悬细胞，流式细胞仪检测分析；(10)采用EXPO32 ADC XL软件进行分析 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺细胞占CD4⁺细胞的比例。

血浆BAFF水平检测：所有观察对象均于早晨空腹抽取EDTA抗凝的外周血2 mL，分离出血浆，-80 ℃保存。标本一次性解冻，用Human BAFF ELISA kit行夹心酶联免疫吸附法检测血浆BAFF水平，按照说明书操作步骤进行。通过Microplate Manager Curve Fit Report 程序计算血浆BAFF水平。

1.4 统计学处理

采用SPSS17.0统计软件对所有数据进行统计分析。正态分布计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，计量资料两个变量之间比较采用独立样本的 *t* 检验法，以*P*<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Tregs的比例

ITP患者外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Tregs占CD4⁺T细胞比例较健康对照者低[(1.55±1.13)% vs (2.73±0.83)%]，差异有统计学意义(*P*<0.01)。见图1。

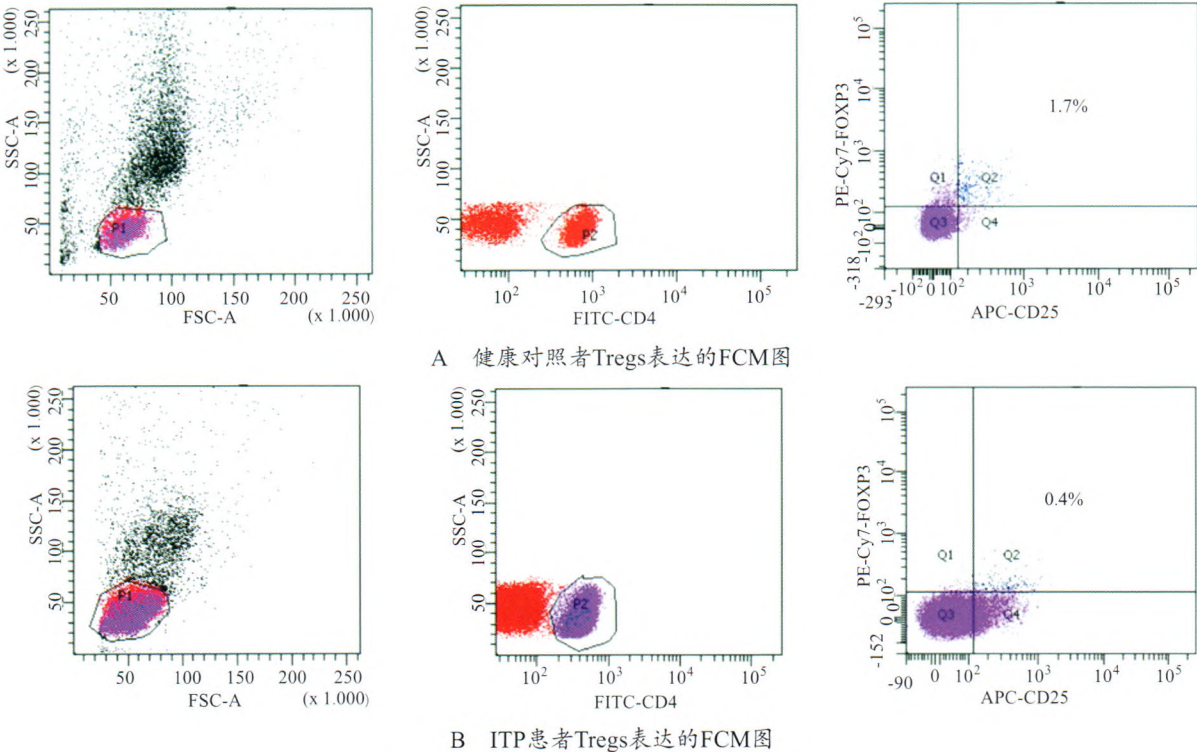


图1 外周血CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Tregs的表达

2.2 ITP患者及健康对照者血浆BAFF水平

ITP患者血浆BAFF水平为($1\,426.14 \pm 1\,280.67$) $\mu\text{g/L}$, 明显高于健康对照者的 (644.29 ± 307.97) $\mu\text{g/L}$, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。

3 讨论

ITP是一种出血性自身免疫性疾病, 其发病机制尚未完全明了。传统观念认为ITP患者血小板减少是由于机体体液免疫异常、B淋巴细胞产生大量抗血小板抗体介导血小板被单核吞噬细胞系统破坏所致。然而, 越来越多的研究发现, T淋巴细胞的表达及功能异常也参与其发病过程^[2]。Tregs是一群具有免疫负性调节功能的 CD4^+ Th细胞亚群, 对维持外周免疫耐受起重要作用。研究发现Tregs数量和功能的受损在多种自身免疫性疾病的发生、发展中扮演了重要作用^[5]。本研究结果发现ITP患者外周血 CD4^+ CD25^+ Foxp3^+ Tregs较健康对照者少, 与既往文献报道一致^[5], 这进一步证实了Tregs的产生不足或功能缺陷可能导致了ITP患者自身耐受的破坏。Tregs发挥免疫抑制作用的具体机制目前尚未明确, 近几年的研究^[6-7]发现可能与以下机制有关: (1)通过分泌免疫抑制因子发挥作用, 如IL-10、TGF- β 、IL-35; (2)通过分泌穿孔素和颗粒酶A活化效应T细胞直接发挥细胞毒作用; (3)Tregs通过作用于细胞表面的免疫抑制分子, 如CTLA4, 使效应T细胞失活参与免疫反应的负调节。因此, 由于Tregs的异常而引起ITP发病的具体机制有待进一步深入研究。

BAFF是近几年发现的肿瘤坏死因子超家族的配体, 对B细胞的发育、存活、增殖、分化和免疫球蛋白生成起重要作用^[8]。研究发现BAFF过表达可能通过使B淋巴细胞分化为浆细胞, 从而不断分泌自身抗体, 最终导致一系列自身免疫性疾病的发生^[9-10]。近几年研究发现ITP患者也存在外周血BAFF水平升高^[11-12], 本研究结果显示ITP患者血浆BAFF水平高于健康对照者, 与既往研究报道一致。但BAFF过表达参与ITP发病的具体机制尚不清楚, 国内外相关报道也甚少, 有研究表明BAFF可能通过促进了 CD19^+ 和 CD8^+ 细胞的存活、血小板的凋亡从而参与了ITP的发生^[13]。本研究结果发现ITP患者存在BAFF水平升高、Tregs数量减少, 因此我们推测BAFF与Tregs的相互作用有可能是其参与ITP发病的另一种机制, 这有待进一步研究证实。

参考文献:

- [1] Wei Y, Hou M. T cells in the pathogenesis of immune thrombocytopenia[J]. *Semin Hematol*, 2016, 53: S13-15.
- [2] McKenzie C G, Guo L, Freedman J, et al. Cellular immune dysfunction in immune thrombocytopenia (ITP) [J]. *Br J Haematol*, 2013, 163(1): 10-23.
- [3] Liu Z, Davidson A. BAFF and selection of autoreactive B cells[J]. *Trends Immunol*, 2011, 32(8): 388-394.
- [4] Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group[J]. *Blood*, 2009, 113(11): 2386-2393.
- [5] Grant C R, Liberal R, Mieli-Vergani G, et al. Regulatory T-cells in autoimmune diseases: Challenges, controversies and Yet-Unanswered questions[J]. *Autoimmun Rev*, 2015, 14(2): 105-116.
- [6] Nishimoto T, Kuwana M. CD4^+ CD25^+ Foxp3^+ regulatory T cells in the pathophysiology of immune thrombocytopenia [J]. *Semin Hematol*, 2013, 50 (Suppl1): S43-49.
- [7] Arandi N, Mirshafiey A, Jeddi-Tehrani M, et al. Alteration in frequency and function of CD4^+ CD25^+ FOXP3^+ regulatory T cells in patients with immune thrombocytopenic purpura[J]. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2014, 13(2): 85-92.
- [8] Rauch M, Tussiwand R, Bosco N, et al. Crucial role for BAFF-BAFF-R signaling in the survival and maintenance of mature B cells[J]. *PLoS One*, 2009, 4(5): e5456.
- [9] Samy E, Wax S, Huard B, et al. Targeting BAFF and APRIL in systemic lupus erythematosus and other antibody-associated diseases[J]. *Int Rev Immunol*, 2017, 36(1): 3-19.
- [10] Lee S J, Oh H J, Choi B Y, et al. Serum 25-Hydroxyvitamin D3 and BAFF levels are associated with disease activity in primary sjogren's syndrome[J]. *J Immunol Res*, 2016, 2016: 5781070.
- [11] Emmerich F, Bal G, Barakat A, et al. High-level serum B-cell activating factor and promoter polymorphisms in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura[J]. *Br J Haematol*, 2007, 136(2): 309-314.
- [12] Zhou Z, Chen Z, Li H, et al. BAFF and BAFF-R of peripheral blood and spleen mononuclear cells in idiopathic thrombocytopenic purpura[J]. *Autoimmunity*, 2009, 42(2): 112-119.
- [13] Zhu X J, Shi Y, Peng J, et al. The effects of BAFF and BAFF-R-Fc fusion protein in immune thrombocytopenia[J]. *Blood*, 2009, 114(26): 5362-5367.