

滤泡辅助性 T 细胞在特发性血小板减少性紫癜患者的变化及其意义 *

黄晓梅¹ 陈协群^{1△} 高广勋¹ 余 芳¹ 肖 春²

(1 第四军医大学第一附属医院血液内科 陕西 西安 710032 2 解放军第二炮兵总医院内分泌科 北京 100080)

摘要 目的: 研究滤泡辅助性 T 细胞 (T follicular helper cells, Tfh) 在免疫性血小板减少性紫癜 (immune thrombocytopenic purpura, ITP) 患者的表达并探讨其临床意义。 **方法:** 用流式细胞术检测 20 例健康人、25 例 ITP 患者外周血 CXCR5⁺CD4⁺T 细胞占 CD4⁺T 细胞的比例。 **结果:** 与健康对照组相比, ITP 患者外周血 CXCR5⁺CD4⁺T 细胞占 CD4⁺T 细胞的比例显著增高 ($P<0.05$)。 **结论:** Tfh 在 ITP 患者外周血比例增高, 为 Tfh 能否为 ITP 的免疫调节和干预提出新的方向提供了证据。

关键词 滤泡辅助性 T 细胞; CXCR5; CD4; IL-21; 特发性血小板减少性紫癜

中图分类号 R558.2 R392.12 **文章标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 05-827-03

T Follicular Helper Cells in Peripheral Blood of Patients with Immune Thrombocytopenic Purpura*

HUANG Xiao-mei¹, CHEN Xie-qun^{1△}, GAO Guang-xun¹, YU Fang¹, XIAO Chun²

(1 Department of Hematology, Xijing Hospital, Forth Military Medical University, Xi'an, 710032, China;

2 Department of Endocrinology, General Hospital Of The Second Artillery, Beijing, 100080, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of the T follicular helper cells (Tfh) in peripheral blood of patients with immune thrombocytopenic purpura (ITP). **Methods:** 25 patients with ITP and 20 healthy adults without immunologic diseases or infectious disorders were chosen in this study. Peripheral blood was stained with anti-CD4-FITC and anti-CXCR5-PerCP. For cell surface staining, both Abs were added and cells were stained for 30 minutes. Stained cells were examined by flow cytometric. **Results:** The ratio of CXCR5⁺CD4⁺T cells in ITP patients is significantly higher than that in the control group [$(13.8 \pm 0.41\% \text{ VS } 9.6 \pm 0.30\%) P<0.05$]. **Conclusion:** The ratio of Tfh increased in ITP patients. Tfh might play a role in evaluation and treatment of ITP.

Key words: Tfh; CXCR5; CD4; IL-21; ITP

Chinese Library Classification: R558.2, R392.12 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273 (2011) 05-827-03

前言

滤泡辅助性 T 细胞 (T follicular helper cells, Tfh) 是新界定的一个独立的 CD4⁺T 效应细胞亚群。Tfh 细胞是主要负责辅助 B 细胞的 T 细胞亚群, 其定位于淋巴滤泡, 具有辅助 B 细胞功能, 表型为 CXCR5⁺CD4⁺CD40hiLICOShi^[1,2]。新近研究发现, Tfh 细胞在人类自身免疫性疾病的发生、发展中发挥着极其重要的作用^[3,4]。本研究采用流式细胞术的方法分析初治免疫性血小板减少性紫癜 (immune thrombocytopenic purpura, ITP) 患者外周血 CXCR5⁺CD4⁺Tfh 细胞的比例及其变化的特点, 初步探讨其与 ITP 这种器官特异性的自身免疫性疾病发病机制的关系及临床意义。

1 材料与方法

1.1 临床资料

实验组选取 2009 年 10 月~2010 年 10 月在我院血液内科门诊及住院的 ITP 初治患者 25 例, 所有患者均符合 ITP 的

诊断标准 (参照张之南, 沈悌 血液病诊断及治疗标准, 第三版, 科学出版社), 均不伴有糖尿病、高血压、消化道溃疡及结核等急慢性感染性疾病, 所有受试者抗核抗体及 HIV 血清学试验均阴性。所选取患者血小板计数 (BPC) 均为 $(0 \sim 20) \times 10^9/L$, 中位数为 $11 \times 10^9/L$, 其中男 11 例, 女 14 例, 年龄 15~65 岁, 中位年龄 42 岁, 所有患者经过治疗后血小板计数均恢复到正常值 ($100 \sim 300 \times 10^9/L$)。健康对照组 20 例, 选用性别和年龄相匹配的健康志愿者作对照, 均无肿瘤与自身免疫性疾病, 男 8 例, 女 12 例, 年龄 20~55 岁, 中位年龄 41 岁, 血小板计数中位数为 $230 (123 \sim 299) \times 10^9/L$ 。

1.2 实验器材及试剂

免疫荧光单克隆抗体 叶绿素蛋白 (PerCp) 标记的 CXCR5 即 CXCR5-PerCp 单克隆抗体, 购自美国 R&D 公司; 异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的鼠抗人 CD4 即 CD4-FITC 单克隆抗体, 购自美国 ebioscience 公司; 红细胞裂解剂购自德国 Beckman Coulter 公司; 磷酸盐缓冲液 (PBS) 为本实验室自配; 流式细胞仪为德国 Beckman Coulter 公司产品。

* 基金项目 国家自然科学基金 (C140202)

作者简介 黄晓梅 (1984), 女, 硕士研究生, 医师, 主要研究方向 ITP 的发病机制, 电话: 13468757716,

E-mail: yuzi1224@yahoo.com.cn

△通讯作者 陈协群, E-mail: exoflyer@gmail.com

(收稿日期 2010-12-03 接受日期 2010-12-26)

1.3 方法

1.3.1 标本采集 采集 ITP 患者及健康对照者的晨起空腹外周血 2ml,置于 EDTA 抗凝的真空采血管(去热源与内毒素),轻轻摇匀,标本于 6h 内测试完毕。

1.3.2 实验方法 流式细胞术 采用直接免疫荧光法,对每一份标本,取 2 个试管,设为对照管和试验管。分别加入 EDTA 抗凝全血 100ul,然后向试验管中加入相应的荧光抗体 CXCR5-Per-Cp 及 CD4-FITC,对照管加入同型对照抗体,加入后混匀,室温避光孵育 30min。每管加红细胞裂解液混匀 10min,1500r/min 离心 5min,弃上清后每管加 PBS 液 2ml,1500r/min 离心 5min,弃上清,重复洗 1 遍,加 400ulPBS 液重悬浮细胞,上机检测。所有样品使用 Beckman Coulter 公司 EpicsXL/XL-MCL 流式细胞仪分析检测,激发波长 488nm,设置各通道之间的荧光补偿后,用前向角散射(FSC)对侧向角散射(SSC)散点图区分细胞群体,每份标本检测 100000 个细胞,测定时各荧光通道均以相应同种型 IgG 染色细胞作阴性对照。

1.4 统计学处理

应用 SPSS11.0 软件,对原始资料进行正态性检验,组内的细胞比例以平均数及标准差表示,以 $P<0.05$ 为显著性界限。

2 结果

ITP 患者外周血 CXCR5⁺CD4⁺T 细胞占 CD4⁺T 细胞的比例显著高于正常人 ($P<0.05$),ITP 患者外周血 CXCR5⁺CD4⁺T 细胞比例为 $(9.6\pm 0.30)\%$,健康对照组外周血 CXCR5⁺CD4⁺T 细胞比例为 $(13.8\pm 0.41)\%$ ($P<0.05$),见表 1。25 位初治患者治疗前后的详细资料见表 2,ITP 患者组及健康对照组的流式细胞术结果见图 1。

3 讨论

免疫性血小板减少性紫癜 (immune thrombocytopenic purpura,ITP) 是一种以血小板破坏加速为特征的获得性器官特异性自身免疫性疾病,以免疫介导的血小板减少为特征,为临床常见疾病^[5,6]。ITP 的发病机制极具异质性与多重性,包括自身抗

表 1 健康对照组和 ITP 患者组 CD4 T 细胞中 CXCR5、CD4 T 细胞比例

Tab.1 CXCR5⁺CD4⁺T cells ratio in ITP patients and control group

Group	n	CD4 ⁺ cells(%)	CXCR5 ⁺ CD4 ⁺ / CD4 ⁺ (%)
Healthy control	20	34.8± 0.21	9.6± 0.30
Patients with ITP	25	29.6± 0.14	13.8± 0.41

表 2 ITP 患者临床资料

Tab.2 Clinical data of ITP patients

N	Sex	Age(year)	PLT (× 10 ⁹ /L)		CXCR5 ⁺ CD4 ⁺ / CD4 ⁺ %
			before therapy	after therapy	
1	famale	20	12	246	13.9
2	male	35	20	168	13.7
3	male	47	5	190	13.6
4	male	56	12	246	13.7
5	famale	33	1	178	14.1
6	famale	18	13	199	14.0
7	famale	25	1	230	13.9
8	male	39	8	216	13.4
9	famale	42	14	267	13.9
10	famale	38	19	189	13.5
11	male	64	11	246	14.0
12	male	15	7	180	13.5
13	famale	49	17	266	14.1
14	male	60	6	210	14.1
15	famale	28	3	200	14.2
16	famale	46	16	195	13.9
17	famale	52	7	224	13.5
18	male	33	9	183	14.0
19	famale	50	3	231	13.7

20	male	22	19	194	13.9
21	famale	44	14	236	14.2
22	famale	41	5	217	13.4
23	male	63	16	240	14.1
24	famale	57	10	192	14.0
25	male	42	12	206	13.6

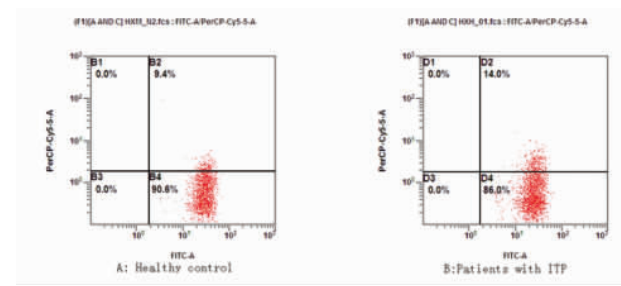


图 1 CXCR5⁺CD4⁺ T 细胞在各组中的表达

Fig 1 The ratio of CXCR5⁺CD4⁺ T cells in CD4⁺ T cells:A: Healthy control;B:Patients with ITP

原识别和耐受的异常，细胞表面分子的异常,Th1/Th2 细胞比例的改变,巨核细胞的损伤以及细胞介导的细胞毒性的异常等^[7]。目前关于其发病机制的研究主要集中于体液免疫异常、T 淋巴细胞及 B 淋巴细胞异常、巨核细胞及血小板生成异常、破坏加速等多个方面,但是其发病机制尚未完全阐明。

Tfh 是近几年才确定的不同于 Th1 和 Th2 的一个新的 T 细胞亚群,主要负责辅助 B 细胞^[8,9]。Tfh 上表达的 CD40L 和 ICOS 分别通过与 B 细胞上 CD40 和 ICOSL 结合,以及 Tfh 所分泌的 IL-21,在刺激 B 细胞的增殖、分化以及免疫球蛋白类别的转换中起着十分重要的作用^[8]。正常的 Tfh 表达 CXCR5,被募集到淋巴组织中的 B 细胞滤泡中,与 B 细胞共定位和相互作用^[10]。因此 CXCR5 是 Tfh 迁移、定位重要的分子。CXCR5 和 IL-21 是 Tfh 细胞重要的表面标志。研究证明,Tfh 功能失调与多种疾病的发生有关,包括自身免疫性疾病、免疫缺陷和肿瘤等^[11]。

关于 Tfh 细胞在自身免疫性疾病方面的临床研究国外已有报道,如系统性红斑狼疮患者外周血中 CD40⁺ICOS⁺T 细胞百分率增加^[13,14],类风湿性关节炎患者局部浸润炎症细胞募集循环中的 B 细胞和 Tfh 到达炎症部位^[15],这些均提示 Tfh 细胞参与自身免疫性疾病的发生发展。但是,关于 Tfh 细胞在免疫性血小板减少性紫癜方面的研究尚未见报道。本课题研究结果显示 ITP 患者组外周血 CXCR5⁺CD4⁺ T 细胞占 CD4⁺ T 细胞的比例显著高于健康对照组。说明 Tfh 在 ITP 患者体内表达高于健康人,提示 Tfh 可能在 ITP 患者体内的病理状态下发生了扩增。在正常情况下,Tfh 表达 CXCR5,并定位于淋巴组织中的 B 细胞滤泡中。当发生自身免疫时,一方面,如果 Tfh 发生病理性扩增,可能对自身反应性 B 细胞产生过强的辅助信号,可能引起抗体介导自身免疫性疾病;另一方面,当发生自身免疫时,Tfh 可迁移到病损部位,并产生大量的 IL-21,可能参与导致了 T 细胞介导的慢性自身免疫性疾病^[16]。

Tfh 可能参与 ITP 的发病机制,这一研究发现将为 ITP 的

免疫调节和免疫干预提供新的方向。ITP 患者治愈后,Tfh 数目和功能是否恢复正常,能否通过降低体内 Tfh 细胞的数量,促进患者自身免疫功能的恢复,能否通过有效抑制 Tfh 的效应分子来治疗 ITP 等自身免疫性疾病,均需要进一步研究分析。

参考文献(References)

[1] Kim CH, Rott LS, Clark-Lewis I, et al. Subspecialization of CXCR5+ T cells:B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells[J]. J Exp Med, 2001, 193(12):1373-1381

[2] Haynes NM, Allen CD, Lesley R, et al. Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-lhigh germinal center-associated subpopulation [J]. J Immunol, 2007, 179, 5099-5108

[3] Vogelzang A, McGuire HM, Yu D, et al. A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells[J].Immunity, 2008, 29(1):127-137

[4] King C, Tangye SG, Mackay CR. T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. Annu Rev Immunol, 2008, 26:741-766

[5] Stasi R, Evangelista ML, Stipa E, et al. Idiopathic thrombocytopenic purpura Current concepts in pathophysiology and management [J]. Thromb Haemost, 2008,99(1) 4-13

[6] Luzina IG, Atamas SP, Storrer CE, et al. Spontaneous formation of germinal centers in autoimmune mice [J].J Leukoc Biol, 2001, 70(4): 578-584

[7] McMillan R. The pathogenesis of chronic immune thrombocytopenic purpura[J].Semin Hemmol,2007, 44(4) :3-11

[8] Silver JS, Hunter CA. With a litter help from their friends interleukin-21,T cells, and B cells [J]. Immunity, 2008, 29(1):7-9

[9] Yu D, Tan AH, H u X, et al. Roquin responses antoimmunity by limiting inducible T-cell co-stimulator messenger RNA [J].Nature, 2007,450(7167):299-303

[10] Takemura S, Braun A, Crowson C, et al. Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis [J]. J Immunol,2001,167(2:1072-1080)

[11] Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, et al. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages[J]. Immunity, 2008, 29(1):138-149

[12] King C, Tangye SG, Mackay CR. T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses [J]. Annu Rev Immunol, 2008, 26:741-766

[13] Hutloff A, Buchner K, Reiter K, et al .Involvement of inducidle costimulator in the exaggerated memory B cell and plasma cell generation in systemic lupus erythematosus [J]. Arthritis Rheum, 2004,10:3211-20

(下转第 843 页)

接种后的成瘤率与接种细胞数成正比。所用的 Matrigel 是由层粘连蛋白、IV型胶原纤维、硫酸乙酰肝素和巢蛋白组成的混合物,在 4℃ 为液体,在 37℃ 则聚合成一种凝胶^[10],在成瘤过程中发挥了重要作用。Matrigel 混合物能够增加异种移植瘤的成活率,可能与该混合物能够形成一个有效的屏障,使肿瘤细胞免于局部免疫效应细胞的攻击而增加移植瘤成活率^[11]。乳腺癌异种移植瘤模型的成功建立,能够为开展中药抗 TAM 耐药机制研究提供稳定的动物模型、缩短研究周期、节约研究经费。

Pgp 是一种能量依赖性跨膜糖蛋白,它具有“药泵”的作用,能将细胞内的药物主动转运到细胞外,使细胞内药物浓度下降或定量丧失而产生耐药^[12,13]。Pgp 与肿瘤细胞的多药耐药发生关系极为密切,Pgp 高表达是肿瘤细胞多药耐药的经典途径,也是研究肿瘤细胞耐药机制与抗耐药效应的重要检测指标之一。Her-2 在多种肿瘤细胞中均有表达,其信号通路活性提高是乳腺癌内分泌治疗过程中产生耐药的机制之一^[14]。研究发现,乳腺癌患者中 Her-2 高表达者对 TAM 治疗不敏感^[15]。Johnston 等以 Her-2 信号通路抑制剂作用于内分泌耐药的乳腺癌细胞,结果发现,Her-2 信号通路抑制剂能够克服或延迟乳腺癌细胞对内分泌治疗的耐药性^[16]。我们的研究结果显示,在建立的耐 TAM 乳腺癌模型中,Pgp、Her-2 均为阳性表达,提示乳腺癌细胞对 TAM 的耐药性可能与二者高表达有相关性,其耐药机制可能为多种因素的综合,并非单一机制。但鉴于 Pgp 在那些经常接触毒物的正常组织中也有表达,故推测 Pgp 的表达可能为正常组织的防御性反应机制。因此,在对该模型的进一步研究中,我们会选择多种指标,进一步研究 TAM 耐药性与化疗药物耐药性之间的耐药机制差异,以便为指导临床治疗提供实验研究依据。

参考文献(References)

[1] 李树玲.乳腺癌肿瘤学[M].北京:科学技术文献出版社,2000.32-71
Li Shu-ling.Breast Oncology [M].Beijing:Science and Technology Document Press,2000.32-71

[2] 程晔.乳腺癌的内分泌药物治疗[J].中华实用中西医杂志,2006,19(1) 369-70
Cheng Ye.The endocrine of the breast cancer treat[J].Chinese Journal of the Practical Chinese With Modern Medicine, 2006,19(1):69-70

[3] Jordan VC,Tamoxifen:a most unlikely pioneering medicine[J].Nat Rev Drug Discov,2003,2(3):205-213

[4] Johnston SR,Dowsett M,Smith IE.Towards a molecular basis for tamoxifen resistance in breast cancer [J].Ann Oncol,1992,3 (7):

503-511

[5] Osborne CK.Tamoxifen in the treatment of breast cancer [J].N Engl J Med,1998,339(22):1609-1618

[6] Clarke R,Brü nner N,Katzenellenbogen BS,et al.Progression of human breast cancer cells from hormone-dependent to hormone-independent growth both in vitro and in vivo [J].Proc Natl Acad Sci USA,1989,86(10):3649-3653

[7] Brü nner N,Frandsen TL,Holst-Hansen C,et al.MCF7/LCC2: A 4-hydroxytamoxifen resistant human breast cancer variant that retains sensitivity to the steroidal antiestrogen ICI182,780 [J].Cancer Res, 1993,53(14):3229-3232

[8] Berstein LM,Wang JP,Zheng H,et al.Long-term exposure to tamoxifen induces hypersensitivity to estradiol [J].Clin Cancer Res,2004,10(4): 1530-1534

[9] 余微波,谷俊朝.乳腺癌动物模型的建立[J].国外医学外科学分册, 2005,32(1) 363-66
Yu Wei-bo,Gu Jun-chao.Establishment of animal model for breast cancer[J].International Journal of Surgery Volume, 2005,32(1):63-66

[10] Fridman R,Kibbey MC,Royce LS,et al.Enhanced tumor growth of both primary and established human and murine tumor cells in athymic mice after coinjection with Matrigel [J].J Natl Cancer Inst, 1991,83(11):769-774

[11] Clarke R.Human breast cancer cell line xenografts as models of breast cancer.The immunobiologies of recipient mice and the characteristics of several tumorigenic cell lines [J].Breast Cancer Res Treat,1996,39(1):69-86

[12] Pastan I,Gottesman M.Multiple-drug resistance in human cancer[J].N Engl J Med,1987,316(22):1388-1393

[13] Rosenberg MF,Callaghan R,Modok S,et al.Three-dimensional structure of P-glycoprotein:the transmembrane regions adopt an asymmetric configuration in the nucleotide-bound state [J].J Biol Chem, 2005,280(4):2857-2862

[14] Osborne CK,Schiff R.Growth factor receptor cross-talk with estrogen receptor as a mechanism for tamoxifen resistance in breast cancer[J]. Breast,2003,12(6):362-367

[15] Witters L,Engle L,Lipton A.Restoration of estrogen responsiveness by blocking the HER-2/neu pathway [J].Oncol Rep,2002,9 (6): 1163-1166

[16] Johnston SR,Lu B,Dowsett M,et al.Comparison of estrogen receptor DNA binding in untreated and acquired antiestrogen-resistant human breast tumors[J].Cancer Res,1997,57(17):3723-3727

(上接第 829 页)

[14] 吴晓东,李振虎,孙兵.滤泡辅助性 T 细胞分化和功能的研究进展 [J].生命科学,2010,22 (4) 529-533
WU Xiao-dong,LI Zhen-hu,SUN Bing.The progress on differentiation and function of T folliculai helper cells [J]. Chinese Bulletin of Life Science. 2010,22 (4) 529-533

[15] Schaerli P, Willimann K, Lang AB, et al. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function[J]. J Exp Med, 2000, 192:1553-62

[16] Weyand CM, Goronzy JJ. Ectopic germinal center formation in rheumatoid synovitis[J]. Ann N Y Acad Sci, 2003, 987:140-149