

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.04.007

外周血 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞在妊娠合并 ITP 患者中的表达及意义*

李明亮,田笑[△],马昂,栾亮,刘静,刘婷婷

北部战区总医院检验科,辽宁沈阳 110016

摘要:目的 初步探讨外周血 CD4⁺CD25⁺调节性 T(Treg)细胞在妊娠合并原发免疫性血小板减少症(ITP)中的作用。**方法** 选取 2020 年 1—12 月在北部战区总医院就诊的妊娠合并 ITP 患者 100 例作为试验组,其中急性 ITP 患者 36 例、慢性 ITP 患者 64 例,对照组为 100 例年龄、孕周相仿的正常产检孕妇。采用流式细胞术(FCM)检测两组外周血中 CD4⁺T 细胞及 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞的水平。**结果** 试验组 CD4⁺T 细胞、CD4⁺CD25⁺Treg 细胞及 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞/CD4⁺T 细胞比值均低于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。急性 ITP 患者的 CD4⁺T 细胞和 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞低于慢性 ITP 患者,差异均有统计学意义($P < 0.05$);急性 ITP 患者的 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞/CD4⁺T 细胞比值低于慢性 ITP 患者,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。试验组 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞与血小板计数呈较强正相关($r = 0.759, P < 0.001$),CD4⁺CD25⁺Treg 细胞/CD4⁺T 细胞比值与血小板计数呈中等程度正相关($r = 0.539, P < 0.001$)。**结论** 妊娠合并 ITP 患者外周血中 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞水平下降,并且急性 ITP 时下降更明显,同时 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞与血小板计数呈正相关。

关键词:CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞; 免疫性血小板减少症; 流式细胞术

中图法分类号:R446.63

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2022)04-0459-04

Expression and significance of peripheral blood CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell in the patients of pregnancy complicating ITP*

LI Mingliang, TIAN Xiao[△], MA Ang, LUAN Liang, LIU Jing, LIU Tingting

Department of Clinical Laboratory, General Hospital of Northern Theater Command, Shenyang, Liaoning 110016, China

Abstract: Objective To investigate the role of peripheral blood CD4⁺CD25⁺ regulatory T (Treg) cells in pregnancy complicating primary immune thrombocytopenia (ITP). **Methods** A total of 100 patients with pregnancy complicating ITP admitted to this hospital from January 2020 to December 2020 were selected as the experimental group, including 36 cases of acute ITP and 64 cases of chronic ITP. The control group included 100 normal antenatal care pregnant women with similar age and gestational age. The levels of CD4⁺T and CD4⁺CD25⁺Treg cells in peripheral blood of the two groups were measured by the flow cytometry (FCM). **Results** The levels of CD4⁺T cells, CD4⁺CD25⁺Treg cells and CD4⁺CD25⁺Treg cells/CD4⁺T cells ratio in the experimental group were lower than those in the control group and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The levels of CD4⁺T and CD4⁺CD25⁺Treg cells in the patients with acute ITP were lower than those in the patients with chronic ITP, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$); the ratio of CD4⁺CD25⁺Treg cells/CD4⁺T cells ratio in the patients with acute ITP was lower than that in the patients with chronic ITP, and the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). There was a strong positive correlation between CD4⁺CD25⁺Treg cells and platelet count in the experimental group ($r = 0.759, P < 0.001$), and the CD4⁺CD25⁺Treg cells/CD4⁺T cells ratio had a moderate positive correlation with the platelet count ($r = 0.539, P < 0.001$). **Conclusion** The expression level of CD4⁺CD25⁺Treg cells in peripheral blood of the patients with pregnancy complicating ITP is decreased, moreover the decrease in acute ITP is

* 基金项目:辽宁省自然科学基金项目(20180551178)。

作者简介:李明亮,男,主管技师,主要从事肿瘤免疫方面的研究。△ 通信作者, E-mail: smile994016@163.com。

本文引用格式:李明亮,田笑,马昂,等.外周血 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞在妊娠合并 ITP 患者中的表达及意义[J]. 检验医学与临床, 2022, 19(4): 459-462.

more obvious, meanwhile the CD4⁺CD25⁺Treg cells are positively correlated with the platelet count.

Key words: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells; immune thrombocytopenia; flow cytometry

妊娠合并原发性免疫性血小板减少症(ITP)是产科较为常见的一种血液系统合并症,发病率为0.1%~0.2%,它可以引起凝血功能障碍进而导致产后出血,产后出血一旦发生就很难控制,严重后果可能导致产妇死亡,因此对妊娠合并ITP发病机制的研究相当重要。ITP是一种自身免疫性疾病,以骨髓中血小板生成减少、血小板自身抗体的产生、网状系统血小板清除这3种机制致病^[1],以不明原因血小板减少及出血为主要临床表现。妊娠过程实际上是一次成功的“母胎耐受”,因此不论是妊娠还是ITP,两者均与机体自身免疫耐受密切相关,而CD4⁺CD25⁺调节性T(Treg)细胞是一类具有免疫抑制作用的重要辅助性淋巴细胞亚群^[2-3]。本试验通过对妊娠合并ITP患者外周血CD4⁺CD25⁺Treg细胞和血小板计数的测定及二者的相关性分析来初步探讨CD4⁺CD25⁺Treg细胞在妊娠合并ITP中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2020年1—12月在本院就诊的妊娠合并ITP患者100例作为试验组,其中急性ITP患者36例,慢性ITP(把妊娠前即有ITP病史的患者定义为慢性ITP)患者64例。患者年龄21~42岁,中位年龄28岁,孕周8~32周。纳入标准:(1)至少两次血常规检测血小板计数 $<100 \times 10^9/L$;(2)无其他并发症;(3)无继发性血小板减少的因素存在;(4)无其他疾病史。排除标准:一切可以引起血小板减少的其他血液系统疾病;系统性红斑狼疮;抗心磷脂抗体综合征;重度子痫前期;严重的产科出血及贫血等。对照组为同期到本院产检的100例健康产检孕妇,年龄25~40岁,中位年龄29岁,孕周8~32周。本研究经医院伦理委员会通过,所有研究对象签署知情同意书。

1.2 仪器和试剂

1.2.1 仪器 美国BD FACS Calibur流式细胞仪、德国西门子ADVIA2120全自动血细胞分析仪、新康医疗器械有限公司XK96-A快速旋涡混匀器、离心机。

1.2.2 试剂 异硫氰酸荧光素(FITC)标记的鼠抗人CD4单克隆抗体、藻红蛋白(PE)标记的鼠抗人CD25单克隆抗体、PE标记的鼠抗人IgG₁、经去离子水1:10稀释至正常工作浓度的FACS溶血素、磷酸盐缓冲液,所有试剂均购自美国BD公司。

1.3 方法

1.3.1 标本采集与处理 试验组和对照组均用含有EDTA-K₂的抗凝管采集清晨空腹静脉血,每人采集2

管,每管约2 mL,采集后立即颠倒混匀10次,注意不要用力振荡,并于4℃冰箱保存,备用。其中一管用于检测血小板计数,另一管用于流式细胞仪分析。要求所有标本均无凝集、无乳糜、无溶血。

1.3.2 血小板计数的检测 用德国西门子ADVIA2120全血细胞分析仪对两组标本进行全血细胞分析从而获得血小板计数结果。

1.3.3 CD4⁺T细胞及CD4⁺CD25⁺Treg细胞的检测 用美国BD流式细胞仪检测CD4⁺T细胞及CD4⁺CD25⁺Treg细胞。具体步骤:(1)将待测标本从冰箱取出放置室温后,充分混匀,分别取50 μL于2个上样管中,一管作为样品检测管(T管),一管作为同型对照管(C管)。T管加入FITC标记的鼠抗人CD4单抗和PE标记的鼠抗人CD25单抗各10 μL,C管加入FITC标记的鼠抗人CD4单抗和PE标记的鼠抗人IgG₁各10 μL。漩涡振荡混匀后,室温避光孵育15 min。(2)加500 μL溶血素后,漩涡振荡混匀,室温避光孵育15 min,裂解红细胞。(3)1 500 r/min离心5 min,弃上清液,加2 mL PBS清洗细胞,漩涡振荡混匀。(4)1 500 r/min离心5 min,弃上清液,加500 μL PBS重悬细胞,振荡混匀。(5)上机检测,调整电压和荧光补偿,每个上样管收集10 000个细胞,使用CellQuest软件进行分析。同样方法检测CD4⁺T细胞,只是不需要加入PE标记的鼠抗人CD25单克隆抗体。

1.4 统计学处理 应用SPSS 17.0软件分析数据,正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验;试验组CD4⁺CD25⁺Treg细胞及CD4⁺CD25⁺Treg细胞/CD4⁺T细胞比值与血小板计数的关系采用两独立因素的相关性分析,| r |在0.8~1.0为极强相关,0.6~<0.8为强相关,0.4~<0.6为中等程度相关,0.2~<0.4为弱相关。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血小板计数结果 妊娠合并急性ITP患者血小板计数为 $(53.33 \pm 18.26) \times 10^9/L$,妊娠合并慢性ITP患者血小板计数为 $(76.19 \pm 11.23) \times 10^9/L$,对照组血小板计数为 $(193.36 \pm 46.27) \times 10^9/L$ 。

2.2 CD4⁺T细胞、CD4⁺CD25⁺Treg细胞测定结果 试验组CD4⁺T细胞、CD4⁺CD25⁺Treg细胞及CD4⁺CD25⁺Treg细胞/CD4⁺T细胞比值均低于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表1。急性ITP患者的CD4⁺T细胞和CD4⁺CD25⁺Treg细胞低于慢性ITP患者,差异均有统计学意义($P < 0.05$);

急性 ITP 患者的 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞/CD4⁺T 细胞比值低于慢性 ITP 患者,但差异无统计学意义 ($P>0.05$),见表 2。

表 1 试验组和对照组 CD4⁺T 细胞、CD4⁺CD25⁺Treg 细胞测定结果($\bar{x}\pm s$)

组别	n	CD4 ⁺ T 细胞 (%)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg 细胞 (%)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg 细胞/CD4 ⁺ T 细胞
对照组	100	46.71±5.96	4.83±0.56	0.082±0.018
试验组	100	38.05±4.73	1.95±0.79	0.052±0.012
P		<0.05	<0.05	<0.05

表 2 急性 ITP 和慢性 ITP 患者 CD4⁺T 细胞、CD4⁺CD25⁺Treg 细胞测定结果($\bar{x}\pm s$)

组别	n	CD4 ⁺ T 细胞 (%)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg 细胞 (%)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg 细胞/CD4 ⁺ T 细胞
急性 ITP	36	34.27±3.73	1.87±0.57	0.051±0.010
慢性 ITP	64	39.05±5.00	2.13±0.88	0.052±0.011
P		<0.05	<0.05	>0.05

2.3 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞与血小板计数的相关性分析 结果显示,试验组 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞与血小板计数呈较强正相关 ($r=0.759, P<0.001$), CD4⁺CD25⁺Treg 细胞/CD4⁺T 细胞比值与血小板计数呈中等程度正相关 ($r=0.539, P<0.001$)。见图 1、图 2。

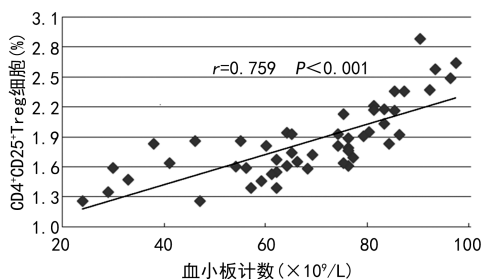


图 1 试验组 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞与血小板计数相关性分析

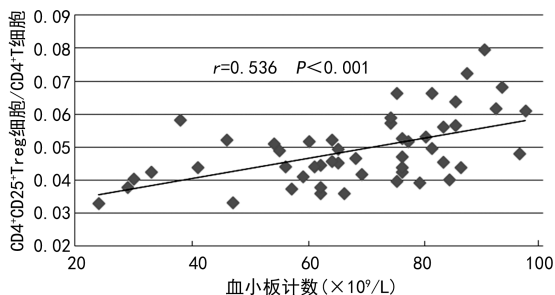


图 2 试验组 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞/CD4⁺T 细胞与血小板计数相关性分析

3 讨论

ITP 是一种由体液免疫和细胞免疫共同介导的

自身免疫性疾病^[4],患者体内常不明原因地产生血小板抗体,该抗体与血小板膜蛋白结合,导致血小板在单核-巨噬细胞系统(MPS)中过多过快地被破坏,引起血小板减少。妊娠是一种复杂的生理过程,从免疫学角度来看,类似于器官移植,携带父源性人类白细胞抗原的胎儿理应受到母体免疫系统的排斥,但事实上母体对胎儿形成了免疫耐受。由此可见,ITP 存在免疫耐受异常,妊娠需要免疫耐受维持,二者均与机体免疫耐受密切相关。另外经过临床病例分析发现,部分 ITP 患者在妊娠期进行性加重或孕后发病,提示妊娠可能是诱导或加重血小板减少的一个因素^[5-7]。

Treg 细胞尤其是 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞,是一类重要的具有独立免疫调节能力的 T 细胞亚群,具有免疫低反应性和免疫抑制性,高表达 CD25,低表达 CD127,特征性表达叉状头转录因子 3(FOXP3),与多种自身免疫性疾病、器官移植耐受有关^[8-10]。在妊娠过程中,母体外周血及胎儿脐带血中均存在 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞,数量随着妊娠的进程发生变化,妊娠早期开始升高,中期达到峰值,分娩时降至最低,这种变化说明其参与母胎耐受^[11]。还有研究发现,去除受精小鼠体内的 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞,小鼠胚胎植入过程严重紊乱,导致胚胎无法植入,也说明了 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞在妊娠过程中发挥重要的免疫功能^[12]。

目前已经有研究表明对于非孕期的慢性 ITP 患者,血液中 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞的数量和比例在其发病机制中发挥了重要作用^[13]。然而,对于妊娠合并 ITP 的患者 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞是否也是同样发挥着作用少见报道。在本试验中笔者对 100 例不同孕周、不同年龄的妊娠合并 ITP 患者按照急性、慢性进行了分组研究,通过数据的比对,发现试验组 CD4⁺T 细胞、CD4⁺CD25⁺Treg 细胞及 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞/CD4⁺T 细胞比值均明显低于对照组 ($P<0.05$),并且急性 ITP 患者的 CD4⁺T 细胞和 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞低于慢性 ITP 患者 ($P<0.05$),但是急性 ITP 患者的 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞/CD4⁺T 细胞比值与慢性 ITP 患者之间无明显差异 ($P>0.05$),这就表明无论在急性还是慢性 ITP 中,CD4⁺CD25⁺Treg 细胞同样发挥着非常重要的作用,并且 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比例与血小板计数呈较强的正相关,而 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞/CD4⁺T 细胞比值与血小板计数呈中等程度正相关。这是因为受妊娠这一特殊状态的影响,ITP 患者免疫功能的变化表现为细胞免疫更加活跃,其发生、发展与妊娠期间机体的免疫系统对自身抗原的识别和耐受异常相关^[14-15]。这一现象提示 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞数量减少后,导致免疫抑制功能减弱,对效应 T 细胞的免疫抑制功能不

足,可能导致了妊娠期间 ITP 的发生^[16]。有研究表明,其机制可能与表达于 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞表面的 FOXP3 蛋白有关。当阻断 FOXP3 表达后 Treg 细胞的免疫抑制功能明显下降,FOXP3 突变或缺乏将导致多种自身免疫性疾病,如系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、自身免疫性肝病^[17-18]等,因此 FOXP3 是决定 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞免疫抑制功能的关键性分子,FOXP3 的突变或缺失将会导致 Treg 细胞的功能缺陷^[19]。

本试验结果显示,妊娠合并 ITP 患者外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞数量较健康孕妇明显减少,且在急性 ITP 患者体内下降更明显,并且 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞与血小板计数呈正相关,这就说明 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞在妊娠合并 ITP 中起着重要的作用。

参考文献

[1] 王莎,李红霞,史连义,等.低血小板孕妇凝血功能变化的研究[J].中国输血杂志,2018,31(6):637-639.

[2] TSUDA S,NAKASHIMA A,MORITA K,et al. The role of decidual regulatory T cells in the induction and maintenance of fetal antigen-specific tolerance; Imbalance between regulatory and cytotoxic T cells in pregnancy complications[J]. Hum Immunol,2021,82(5):346-352.

[3] PATEL A,TREADWELL M,BORRA S,et al. Hereditary angioedema and pregnancy complications and outcomes in a population-based cohort[J]. J Allergy Clin Immunol,2020,145(2):105-108.

[4] 黄炜祺,周咏明.原发免疫性血小板减少症的免疫机制研究进展[J].中国实验血液学杂志,2019,27(4):1321-1324.

[5] APARICIO-RUIZ B,ROMANY L,MESEGUER M. Selection of preimplantation embryos using time-lapse microscopy in in vitro fertilization; State of the technology and future directions [J]. Birth Defects Res, 2018, 110(8):648-653.

[6] 陈哲,周静怡,翟铭雅,等.免疫性血小板减少症妊娠期发病机制研究[J].中国妇产科临床杂志,2019,20(1):45-47.

[7] BANKER M,SORATHIYA D,SHAH S. Effect of body mass index on the outcome of in-vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection in women[J]. J Hum Reprod Sci, 2017,10(1):37-43.

[8] HUANG Q,WU H,LI M,et al. Prednisone improves pregnancy outcome in repeated implantation failure by enhance regulatory T cells bias[J]. J Reprod Immunol, 2021, 143: 103245-103247.

[9] HUANG N,CHI H,QIAO J. Role of regulatory T cells in regulating fetal-maternal immune tolerance in healthy pregnancies and reproductive diseases[J]. Front Immunol,2020,11:1023-1025.

[10] WANG J,YANG J,YAN Y,et al. Effect of adoptive transfer of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺Treg induced by tri-chostatin A on the prevention of spontaneous abortion [J]. J Reprod Immunol,2019,131:30-35.

[11] 曾彬,于婉莹,李翠,等.外周血自然杀伤细胞、Treg 细胞和 Foxp3 表达与体外受精胚胎移植术不良结局的相关性及预测价值研究[J].中国医刊,2021,56(1):85-88.

[12] FAN Q,ZHANG J,CUI Y,et al. The synergic effects of CTLA-4/FOXP3-related genotypes and chromosomal aberrations on the risk of recurrent spontaneous abortion among a Chinese Han population[J]. J Hum Genet,2018, 63(5):579-587.

[13] 常姝婷,杨林花.妊娠合并原发免疫性血小板减少症诊治进展[J].中华全科医师杂志,2018,17(11):947.

[14] 肖润颖,肖建华,邹冬雪,等.不明原因复发性流产(URSA)免疫学机制研究进展[J].细胞与分子免疫学杂志, 2021,37(3):278-286.

[15] GHAEBI M,ABDOLMOHAMMADI-VAHID S,AHMADI M,et al. T cell subsets in peripheral blood of women with recurrent implantation failure[J]. J Reprod Immunol, 2019, 131:21-29.

[16] NARASATI S,RIAYATI O,WIWEKO B,et al. Effect of female body mass index on clinical pregnancy rate after in vitro fertilization [J]. Adv Sci Lett, 2017, 23(7): 7009-7011.

[17] KOLANSKA K,SUNER L,COHEN J,et al. Proportion of cytotoxic peripheral blood natural killer cells and T-cell large granular lymphocytes in recurrent miscarriage and repeated implantation failure: case-control study and meta-analysis[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2019, 67(4):225-236.

[18] LUO L,ZENG X,HUANG Z,et al. Reduced frequency and functional defects of CD4⁺CD25^{high}CD127^{low/-}regulatory T cells in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2020, 18(1):62-65.

[19] PETSIOU A,PASCHOU S A,VARTHOLOMATOS G,et al. A modified flow cytometry method for objective estimation of human CD4⁺ regulatory T cells (CD4⁺Tregs) in peripheral blood, via CD4 /CD25 / CD45RO/ FOXP3 labeling[J]. Cytometry B Clin Cytom, 2020, 98(3):259-269.