

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.29.001

贫血患者外周血中 T 淋巴细胞亚群和 CD55⁺、CD59⁺ 检测的意义*

何 苗,乔静巧,陈吉祥,马海珍,白 海[△]
(兰州军区兰州总医院血液科,兰州 730050)

[摘要] **目的** 探讨 T 淋巴细胞亚群 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 比值和 CD55⁺、CD59⁺ 水平在各种贫血患者外周血中的表达及意义。**方法** 利用流式细胞术,测定 100 例贫血患者,其中巨幼细胞贫血(MA)25 例,缺铁性贫血(IDA)40 例,再生障碍性贫血(AA)35 例,30 名健康对照组外周血 T 淋巴细胞亚群(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 和 CD4⁺/CD8⁺ 比值)和 CD55⁺、CD59⁺ 水平的变化,比较与健康对照组间的差异。**结果** 与健康对照组相比,3 类贫血患者的 CD3⁺、CD4⁺ 和 CD4⁺/CD8⁺ 均低于健康对照组[(69.2±3.62)%、(38.7±3.56)%、(1.69±0.15)%],其中 AA 患者的 CD4⁺/CD8⁺ 比值为 0.94±0.59,与健康对照组相比明显下降($P<0.05$);CD8⁺ 均高于健康对照组(22.9±2.35)%,其中 AA 患者的 CD8⁺ 为(34.5±2.44)%,明显高于健康对照组($P<0.05$);MA 患者 CD55⁺ 和 CD59⁺ 表达正常,大约 40% 的 IDA 和 34% 的 AA 患者 CD55⁺ 和 CD59⁺ 表达异常。**结论** 3 类贫血患者免疫功能均有不同程度异常,IDA 患者可能是由缺铁引起。AA 患者可能是由 T 细胞功能亢进和 CD55⁺、CD59⁺ 表达异常引起的。

[关键词] T 淋巴细胞亚群;贫血;免疫功能;CD55⁺;CD59⁺
[中图分类号] R556 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2015)29-4033-03

Clinical significance of peripheral blood CD55⁺,CD59⁺ and lymphocyte subset determination in patients with anemia*
He Miao,Qiao Jingqiao,Chen Jixiang,Ma Haizhen,Bai Hai[△]

(Department of Hematology,Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Region,Lanzou,Gansu 730050,China)

[Abstract] **Objective** To investigate the clinical significance and expression of peripheral blood T lymphocyte subset CD3⁺,CD4⁺,CD8⁺ and CD4⁺/CD8⁺ ratio and CD55⁺,CD59⁺ in patients with anemia. **Methods** Peripheral blood T lymphocyte subset CD3⁺,CD4⁺,CD8⁺,CD4⁺/CD8⁺ and CD55⁺,CD59⁺ ratio were determined by flow cytometry in a total of 100 patients with anemia(including 25 patients with MA,40 patients with IDA,35 patients with AA and 30 healthy controls were enrolled). The differences between the anemia group and the healthy control group were analyzed statistics. **Results** The peripheral blood T lymphocyte subset CD3⁺,CD4⁺ and CD4⁺/CD8⁺ ratio in three groups of anemia patients [(69.2±3.62)%,(38.7±3.56)%,(1.69±0.15)%] were lower than the healthy control group. The ratio of CD4⁺/CD8⁺ in AA patients(0.94±0.59) was the lowest($P<0.05$). The level of CD8⁺ in three groups of anemia patients were higher than the healthy control group(22.9±2.35)%,and CD8⁺ in AA patients(34.5±2.44)% was the highest($P<0.05$). The expression of CD55⁺ and CD59⁺ was normal in MA patients,but was abnormal in approximately 40% IDA and 34% AA patients. **Conclusion** The immune function of three kinds of anemia patient were abnormal,abnormal immune function of IDA and AA patients may be caused directly by the iron and T-lymphocyte,CD55⁺,CD59⁺ expression abnormal dependently.

[Key words] T-lymphocyte subset;anemia;immune function;CD55⁺;CD59⁺

T 淋巴细胞是一类具有特殊标志的人胸腺输出细胞,介导机体的细胞免疫,主要功能是调节蛋白质抗原引起的所有免疫应答,并清除细胞表面抗原或细胞内微生物的效应作用^[1-2]。机体免疫功能主要由不同的 T 淋巴细胞亚群决定,最重要的是辅助性细胞(CD4⁺)和杀伤抑制细胞(CD8⁺)。在正常情况下,T 淋巴细胞各亚群之间相互拮抗,达到平衡,维持机体免疫功能的稳定,但是其中任一种或几种细胞水平发生紊乱,即可引起机体免疫功能的异常,临床上通过淋巴细胞的百分比或各 T 细胞亚群水平来了解免疫系统的变化^[3]。膜结合调节蛋白 CD55(decay-accelerating factor,DAF)和 CD59 (membrane inhibitor of reactive lysis,MIRL)作为补体调节蛋白的主要成分,参与 T 淋巴细胞的活化、增殖、分化以及凋亡,能够调控 T 淋巴细胞免疫反应^[4],CD55 和 CD59 可能就是连接自然免疫

和适应性免疫的重要分子。有研究发现 CD55、CD59 在各类贫血性疾病中均有不同程度的表达异常^[5-6]。目前,有关贫血患者外周血细胞 T 细胞亚群水平和 CD55⁺、CD59⁺ 的表达程度及其之间的关系尚未见文献报道。在本研究中,通过检测巨幼细胞贫血(megaloblastic anemia,MA)、缺铁性贫血(iron deficiency anemia,IDA)和再生障碍性贫血(aplastic anemia,AA)患者外周血细胞 T 细胞亚群水平和 CD55⁺、CD59⁺ 的表达程度,以探讨其临床意义,为临床更有效地治疗提供一定的基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院 2014 年 6 月至 2015 年 3 月住院的贫血患者 100 例,男 43 例,女 57 例,年龄 14~82 岁,其中 MA 患者 25 例,IDA 患者 40 例,AA 患者 35 例。健康对照组 30 名,为来本院进行体检的人员,其中男 13 名,女 17 名,年龄

* 基金项目:甘肃省自然科学基金资助项目(145RJZA151)。 作者简介:何苗(1989—),硕士,技师,主要从事兰州军区兰州总医院血研所检验工作。 △ 通讯作者,Tel:(0931)8994171;E-mail:baihai@tom.com。

25~65 岁,均排除近期有感染情况和其他疾病。

1.2 方法 采集患者外周静脉血 2 mL,用乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝备用。流式细胞仪检测,样品处理:白细胞处理方法,10 μ L 抗体(CD3、CD4、CD8、CD55、CD59)与 100 μ L 血样混合避光孵育 20 min,加入 1 mL 红细胞裂解液裂解 10 min,再加入 1 mL PBS 洗涤,离心 1 000 r/5 min,弃上清液,加入 500 μ L PBS;红细胞处理方法,5 μ L 抗体(CD55、CD59)与 5 μ L 血样混合避光孵育 20 min,充分混匀之后加入 500 μ L PBS 上机检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件处理数据,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,用 *t* 检验方法比较各组间差异。计量资料用率表示,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各种贫血与健康对照组 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 和 CD4⁺/CD8⁺ 比值水平检测 如表 1 所示,MA、IDA 和 AA 患者的 CD3⁺ T 细胞水平与健康对照组相比均降低,分别降低了 10.8%、9.2%、1.3%,差异均无统计学意义($P>0.05$);与健康对照组相比,3 类贫血患者的 CD4⁺ T 细胞水平依次为 (34.2 \pm 3.43)%、(33.9 \pm 2.95)%、(32.2 \pm 3.37)%,略有降低,差异均无统计学意义($P>0.05$);健康对照组 CD8⁺ T 细胞水平为 (22.9 \pm 2.35)%,MA、IDA 和 AA 患者的 CD8⁺ T 细胞水平与健康对照相比分别增加了 0.5%、2.3%、11.6%,其中 AA 患者增高最为显著($P<0.05$);CD4⁺/CD8⁺ 的比值健康对照组为 1.69 \pm 0.15,IDA 和 MA 患者稍低于健康对照组,差异均无统计学意义($P>0.05$),而 AA 患者的比值为 0.94 \pm 0.59,低于健康对照组,且差异有统计学意义($P<0.05$),CD4⁺/CD8⁺ 的比值由大到小排列为:健康对照组、MA 组、IDA 组、AA 组。

表 1 各组 CD3 ⁺ 、CD4 ⁺ 、CD8 ⁺ 、CD4 ⁺ /CD8 ⁺ 比值水平检测结果 ($\bar{x}\pm s$,%)					
组别	<i>n</i>	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
MA 组	25	58.4 \pm 5.08	34.2 \pm 3.43	23.4 \pm 2.07	1.50 \pm 1.45
IDA 组	40	60.0 \pm 4.0	33.9 \pm 2.95	25.2 \pm 2.06	1.32 \pm 0.65
AA 组	35	67.9 \pm 2.44	32.2 \pm 3.37	34.5 \pm 2.44*	0.94 \pm 0.59*
健康对照组	30	69.2 \pm 3.62	38.7 \pm 3.56	22.9 \pm 2.35	1.69 \pm 0.15

*: $P<0.05$,与健康对照组比较。

表 2 各种贫血与健康对照组 CD55 ⁺ 、CD59 ⁺ 水平检测					
组别	<i>n</i>	红细胞(%)		中性粒细胞(%)	
		CD55 ⁺	CD59 ⁺	CD55 ⁺	CD59 ⁺
MA 组	25	96.71~99.21	97.40~99.35	96.98~99.78	95.92~99.60
IDA 组	40	82.67~99.86	86.35~99.69	96.21~99.92	96.45~99.89
AA 组	35	88.45~99.65	87.78~99.74	92.84~99.91	92.12~99.09
健康对照组	30	96.87~100	97.65~100	96.93~100	96.42~100

2.2 各种贫血与健康对照组 CD55⁺、CD59⁺ 水平检测 结果如表 2 所示,健康对照组及 MA 患者外周血中红细胞和中性粒细胞膜 CD55⁺、CD59⁺ 百分率均大于 95%。40%(16/40)的 IDA 患者红细胞膜 CD55⁺、CD59⁺ 表达异常,其中 40 例 IDA 患者中红细胞膜 CD55⁺ 百分率在 80%~95% 的有 15 例,CD59⁺ 红细胞膜百分率在 85%~95% 的有 17 例,CD55⁺、CD59⁺ 中性粒细胞的百分率均大于 95%。约 34% 的 AA 患者

中存在 CD55⁺、CD59⁺ 表达异常,在 35 例 AA 患者中红细胞膜 CD55⁺ 百分率在 85%~95% 有 11 例,CD59⁺ 百分率在 85%~95% 有 13 例;中性粒细胞膜 CD55⁺ 百分率 90%~95% 有 14 例,CD59⁺ 百分率在 90%~95% 有 10 例。

3 讨 论

目前,临床上用来判断贫血患者细胞免疫功能状态最常用的指标是 CD3⁺ T、CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞水平,其中 CD4⁺/CD8⁺ 比例是监视人体免疫功能、反映机体免疫状态的最重要指标^[1-2]。CD3⁺ T 细胞与 T 细胞受体(TCR)通过带正负电荷的氨基酸装配在一起形成复合物,在细胞免疫中起关键作用^[3]。CD4⁺ T 细胞利用细胞因子调节免疫应答,可协助 B 细胞分泌抗体,且 CD4⁺ 具有辅助造血的功能。静止或天然的 CD8⁺ T 细胞在与抗原结合后,会分化成细胞毒细胞(CTL),在生理条件下,CTL 的产生需要 CD4⁺ T 细胞的帮助,所以 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞相对存在,并且 CD8⁺ T 细胞具有抑制造血的作用^[3,7-8]。

MA 是由于体内缺乏维生素 B₁₂ 和叶酸,导致细胞的 DNA 合成减慢,大部分巨幼红细胞在骨髓内未到成熟阶段即遭到破坏的一种贫血现象。许多实验证实,叶酸缺乏时细胞出现增殖受抑和过度凋亡,同时伴有粒细胞和血小板的减少,这可能与骨髓内粒系及巨核系细胞亦有类似的 DNA 合成障碍和成熟障碍(无效应生成)有关^[9]。本文数据显示,CD3⁺、CD4⁺ T 细胞与健康对照组相比均降低,CD8⁺ T 细胞水平高于健康对照组,CD4⁺/CD8⁺ 比值略低于健康对照组。表明 MA 患者可出现轻微的免疫功能紊乱,而细胞膜 CD55⁺、CD59⁺ 均在正常范围之内,说明 MA 患者免疫功能紊乱与 CD55⁺、CD59⁺ 的表达无关。

从细胞生物学角度来讲,T 细胞免疫主要通过 T 细胞的增殖分化来实现,这是一个消耗能量、依赖核酸、蛋白质合成的复杂过程。研究表明,三羧酸循环中 50% 以上的酶和因素含铁或有铁存在时才能发挥作用。如果铁缺乏,将使各类含铁酶或铁依赖酶的功能受到影响,细胞色素含量减少,核糖核酸酶活性降低,DNA 和蛋白质合成受到抑制,能量代谢障碍,从而影响 T 细胞的增殖和分化,使 T 淋巴功能受损,导致免疫功能低下和免疫调节紊乱^[10-11]。在本研究中还发现 40%(16/40) 的 IDA 患者红细胞膜 CD55⁺、CD59⁺ 百分率在 80%~95%,而中性粒细胞的百分率均大于 95%,缺铁是造成小细胞低色素贫血的主要因素,而阵发性夜间血红蛋白尿(PNH)患者也出现了小细胞低色素贫血的表现。已有研究证实 PNH 患者细胞由于造血干细胞基因突变,其异常细胞膜上糖基磷脂酰基醇(GPI)生成障碍,导致细胞膜上 GPI 链接锚蛋白异常,部分细胞上补体衰变加速因子 CD55 缺失和膜反应性溶解移植物 CD59 缺陷,导致红细胞破坏加速,出现频繁的血蛋白尿^[4]。因此 IDA 患者的红细胞膜 CD55⁺、CD59⁺ 表达异常。至于为何缺铁性贫血患者红细胞会有阵发性睡眠性血红蛋白尿症样异常细胞出现,而中性粒细胞正常的原因还不清楚。因此 IDA 患者免疫功能紊乱可能是由缺铁引起的,而与 CD55⁺、CD59⁺ 的表达异常没有直接关系。

AA 是一种 Th1 细胞功能亢进,以造血细胞为靶目标的自身免疫性疾病,发病机制极为复杂,近年来研究发现,部分 AA 患者骨髓造血干/祖细胞和外周血中性粒细胞膜 CD55⁺、CD59⁺ 表达水平下降^[6],并有研究提示 AA 的免疫发病机制可与补体分子的表达异常有关。

CD55 作为信号分子在介导淋巴细胞免疫应答过程中,可能参与多种自身免疫性疾病的发生^[12],已证实 PNH 患者血细胞表达 CD55 缺失,自身免疫性疾病发生后,DAF 基因表达水平下降,增加 T 淋巴细胞活化,从一定程度上解释 CD55 的缺失更容易引起自身免疫性疾病恶化这一现象^[13]。体内实验发现 CD55 对 T 淋巴细胞免疫具有抑制作用,CD55 的缺失可以引起 T 细胞免疫功能的增强。Liu 等^[13]发现在敲除 DAF 基因的小鼠淋巴细胞对抗原的免疫反应比野生(wild-type,WT)小鼠更强烈,更易引起 Th1/Th2 平衡向 Th1 方向漂移,另外 Kwan 等^[14]也证实了 DAF 缺失的 APCs 刺激 T 淋巴细胞向 IFN- γ 介导方向分化,可见,补体成分在 CD55 调控 T 淋巴细胞免疫反应中具有一定的作用。然而有关研究证实 AA 发病过程中存在 Th1/Th2 比值显著增加,且 Th1/Th2 失衡的严重程度与 AA 患者体内造血衰竭程度相关,其机制可能是抗原对免疫系统刺激后,Th1 细胞过度活化,并产生大量造血负调控因子如 IFN- γ 和 IL-12,促进 CD8⁺ T 细胞增殖,进而阻止细胞周期的进行和通过 Fas 信号通路促进造血干细胞免疫损伤与诱导凋亡^[15-16],因此,CD55⁺表达异常可能是引起 Th1/Th2 失衡的前期事件,从而导致 AA 的发生。

CD59 在 T 淋巴细胞活化、分化、调控中的作用及机制也日益成为热点。Sivasankar 等^[17]研究发现 CD59 缺失可以明显提高 CD4⁺ T 免疫反应,提示 CD59 过度表达可能会抑制 T 细胞免疫。有关研究发现,患者活化的 CD8⁺ T 细胞表面 CD59 减少,认为 CD59 表达的变化同患者自身疾病活动有关,也可能参与活化诱导的凋亡,提示 CD59 减少可能引起活化的 T 细胞增多^[18]。这与 AA 中 T 细胞亚群水平的变化相一致。在本研究中 AA 患者的平均 CD8⁺ T 细胞水平达 36.5%,CD4⁺/CD8⁺ 的比值为 0.94,两个指标与健康对照组相比均明显增高,并且差异有统计学意义($P < 0.05$)。所以 CD55 和 CD59 是 T 淋巴细胞亚群水平变化的决定性因素。

MA、IDA、MA 3 类贫血的机制均不相同,IDA 免疫紊乱可能直接是由缺铁引起的,AA 患者免疫紊乱可能是由 CD55 和 CD59 表达异常引起的。本研究仅在 T 细胞亚群水平上对 IDA、MA、AA 3 类贫血患者的免疫机能进行探讨,不同贫血患者的免疫机能都可以通过 T 细胞亚群指标来反应,而 T 细胞活化信号又由磷脂酰肌醇途径所调节,这在临床上有针对性调整贫血患者体内异常的调控造血因子、高效地恢复造血功能、有效地提高贫血治疗靶点具有更大的临床意义。

参考文献

- [1] 王永才.最新血液骨髓细胞诊断学多媒体图谱[M].北京:人民军医出版社,2008:176-241.
- [2] 礼征楠,王亚男,董敏,等.T-淋巴细胞亚群在血液病中的诊断应用[J].中国医疗前沿,2010,5(4):63,73.
- [3] 张之南.血液病学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2011:975-980.
- [4] 张亚军,陈佩杰,王茹.补体调节蛋白 CD55、CD59 调控 T 淋巴细胞免疫研究进展[J].中国运动医学杂志,2010,29(4):502-505.
- [5] 欧阳红梅,张芹,甸自金,等.CD55、CD59 在健康者红细胞及中性粒细胞上表达的研究[J].国际检验医学杂志,2010,31(2):109-110,112.
- [6] Ruiz-Delgado GJ,Vázquez-Garza E,Méndez-Ramírez N,et al.Abnormalities in the expression of CD55 and CD59 surface molecules on peripheral blood cells are not specific to paroxysmal nocturnal hemoglobinuria[J].Hematology,2009,14(1):33-37.
- [7] Dufour C,Ferretti E,Bagnasco F,et al.Changes in cytokine profile pre-and post-immunosuppression in acquired aplastic anemia[J].Haematologica,2009,94(12):1743-1747.
- [8] Moon HW,Kim BH,Park CM,et al.CD4⁺ CD25^{high} FoxP3⁺ regulatory T-cells in hematologic diseases[J].Korean J Lab Med,2011,31(4):231-237.
- [9] 揭旭日,陆翔,王小超.巨幼细胞性贫血患者同型半胱氨酸与淋巴细胞亚群及血细胞变化的关系[J].广东医学,2013,34(22):3449-3451.
- [10] 张文娟,徐丽,刘加军.缺铁性贫血患儿免疫功能变化的研究[J].临床医学工程,2013,20(7):793-794.
- [11] 王腊梅,周红彬.3~6岁缺铁性贫血患儿免疫功能变化研究[J].西南军医,2004,6(4):9-10.
- [12] Barros MM,Yamamoto M,Figueiredo MS,et al.Expression levels of CD47,CD35,CD55,and CD59 on red blood cells and signal-regulatory protein-alpha,beta on monocytes from patients with warm autoimmune hemolytic anemia[J].Transfusion,2009,49(1):154-160.
- [13] Liu J,Miwa T,Hilliard B,et al.The complement inhibitory protein DAF (CD55) suppresses T cell immunity in vivo[J].J Exp Med,2005,201(4):567-577.
- [14] Kwan WH, Van Der Touw W,Paz-Artal E,et al.Signaling through C5a receptor and C3a receptor diminishes function of murine natural regulatory T cells[J].J Exp Med,2013,210(2):257-268.
- [15] Ballesteros-Tato A,León B,Graf BA,et al.Interleukin-2 inhibits germinal center formation by limiting T follicular helper cell differentiation[J].Immunity,2012,36(5):847-856.
- [16] Kaito K,Otsubo H,Usui N,et al.Th1/Th2 lymphocyte balance in patients with aplastic anemia[J].Rinsho Byori,2004,52(7):569-573.
- [17] Sivasankar B,Longhi MP,Gallagher KM,et al.CD59 blockade enhances antigen-specific CD4⁺ T cell responses in humans:a new target for cancer immunotherapy? [J].J Immunol,2009,182(9):5203-5207.
- [18] Alegretti AP,Schneider L,Piccoli AK,et al.Diminished expression of complement regulatory proteins on peripheral blood cells from systemic lupus erythematosus patients[J].Clin Dev Immunol,2012(3):725684.

(收稿日期:2015-04-12 修回日期:2015-07-16)