

# PTR 患者外周血 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞的检测及其临床意义

宋晨辉 张乾龙

(新疆医科大学第六附属医院)

**摘要:**目的:探究 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞在免疫性血小板输注无效发生机制中的重要作用。方法:采用流式细胞术检测免疫性 PTR 患者和输注血小板有效者外周血 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞和 B 淋巴细胞。运用 SPSS 23.0 软件分析免疫性 PTR 与外周血 T/B 淋巴细胞的相关性。结果:免疫性 PTR 与血小板输注有效者比较,外周血 CD4<sup>+</sup>T 细胞比例降低,而 CD8<sup>+</sup>T 细胞比例上升;B 淋巴细胞比例无明显差异,但 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T 细胞比值降低。结论:患者 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞的异常表达提示 T 细胞免疫可能参与介导免疫性 PTR 发生。

**关键词:**免疫性血小板输注无效;CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞;细胞免疫

## 前言

血小板输注是治疗血小板数量减少和其他血小板功能缺陷所致疾病的一种具有良好效果的方法。但临床上存在患者在输入足量血小板后,血小板计数并未明显增加、止血目的未达到的情况,同时还会有发热、过敏等不良反应,这种情况就是血小板输注无效(platelet transfusion refractoriness, PTR)。PTR 是治疗出血性疾病过程中常见的难治性临床问题,发生率高达 30%~70%<sup>[1-2]</sup>,可导致患者严重的不良后果,增加医疗费用,给家庭和社会造成极大的负担。现在临床上应对免疫性 PTR 时多采取人类白细胞抗原(HLA)配型和血小板交叉配型,但实际临床工作中由于血小板的保存期短、库存不足、供应不及时,配型输注很难在短时间内完成。并且,对 PTR 的防治进行深入研究一直比较稀缺,发生发展的具体机制尚不清楚。

近年来公认免疫性 PTR 的发生机制是由 B 细胞通过体液免疫应答产生血小板抗体引起<sup>[3]</sup>。但新的研究发现在难治性血小板输注无效和免疫性血小板减少症患者中约 17%~40%并没有明确的血小板抗体<sup>[4]</sup>,说明体液免疫清除机制不能完全解释 PTR 的发生。有研究表明外周血中具有抗血小板反应性的 CD4<sup>+</sup>T 细胞,同时存在有血小板自身反应性的 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞<sup>[5]</sup>。CD4<sup>+</sup>T 细胞的数量减少可使自身反应性 B 淋巴细胞得到相应增殖,从而产生一些使血小板破坏增加的抗体,而 CD8<sup>+</sup>T 细胞能抑制 B 淋巴细胞产生相应的血小板抗体,说明 CD4<sup>+</sup>T 细胞和 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞可能调控血小板抗体产生<sup>[6,7]</sup>。

在本研究中,我们通过比较 PTR 患者与血小板输注有效者 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>T、B 淋巴细胞的差异,旨在说明 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞的在 PTR 患者发病中具有一定意义,从而为 PTR 的治疗提供新的思路。

表 流式细胞术检测血小板输注患者的 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>T 细胞, B 淋巴细胞的表达

组别	例数	CD4 <sup>+</sup> T	CD8 <sup>+</sup> T	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> T	B 淋巴细胞比例
对照组	10	50.35 ± 12.23	43.52 ± 11.68	1.16 ± 1.05	2.75 ± 3.23
PTR 组	23	37.45 ± 14.31	52.63 ± 14.77	0.71 ± 0.97	3.18 ± 5.62
P 值	-	0.021	0.040	0.039	0.825

## 3 讨论:

PTR 诊断标准为两次连续输注足量随机 ABO 同型血小板,或者在 2 周内 3 次输用血小板(不必是连续输用)都未能达到预期结果,血小板数量不增加,临床症状无改善<sup>[8]</sup>。高达 80% 的 PTR 都是由非免疫因素引起,包括发热、弥漫性血管内凝血、药物(两性霉素、抗生素、肝素)、脾亢等,可以采取相应对症治疗。但是免疫因素引起的 PTR 不易消除且机制复杂,是发生难治性 PTR 的重要原因<sup>[9]</sup>。其中, B 细胞通过体液免疫应答产生的血小板抗体,如 HLA 抗体(80%~90%)、HPA 抗体(5%~10%)、HLA/HPA 复合抗体(10%~15%)是近年被公认引起免疫性 PTR 的主要原因<sup>[10]</sup>。但体液免疫清除机制不能完全解释 PTR 的发生。有研究说明 T 淋巴细胞表面分化抗原表达异常、Th 细胞/T<sub>H</sub> 细胞失衡、CTL 细胞靶向杀伤等均发挥双向调控作用影响血小板的存活和凋亡<sup>[11-13]</sup>。

## 1 资料与方法:

**1.1 研究对象:**选取 2021 年 1 月至 2021 年 11 月新疆医科大学第六附属医院收治的共 33 名需要输血的患者,其中 PTR 患者(PTR 组)23 名,包括男 10 名,女 13 名,平均(39.25 ± 2.68)岁;血小板输注有效患者(对照组)10 名,包括男 4 名,女 6 名,平均(40.10 ± 2.57)岁。两组年龄、性别构成比较,差异无统计学意义(P>0.05)。本次研究所有患者均表示知情同意,本研究经本院伦理委员会批准同意。

**1.2 外周血 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>T、B 淋巴细胞检测:**采集所有纳入研究对象抽取空腹静脉血 3~5 mL,向抗凝血液中加入细胞表面荧光标记抗体,轻轻混匀后低温避光静置 15min,用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤 3 次,再加入溶血素(美国 BD 公司)2mL,室温下作用 10min,1500r/min 离心 10min,弃上清,加入破膜剂 1mL,室温下作用 30min,1500r/min 离心 10min,弃上清。加入内标荧光标记抗体,轻轻混匀后低温避光静置 30min。PBS 洗涤 2 到 3 次,采用 FACS Aria 流式细胞仪(美国 BD 公司)检测 T、B 淋巴细胞亚群比例。流式细胞术涉及抗体均购自美国 BD 公司。

**1.3 统计学方法** 采用 SPSS 23.0 统计学软件对所得数据进行分析,所有数据采用均值 ± 标准差(x ± s)表示,两组组间比较采用独立样本 T 检测,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果:

PTR 患者外周血 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>T 细胞和 B 细胞变化情况 采用流式细胞术对 PTR 患者(PTR 组)和血小板输注有效患者(对照组)外周血 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T 细胞和 B 淋巴细胞表达情况进行检测,结果显示在 PTR 组 B 淋巴细胞比例无明显差异,但较对照组 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T 细胞比值降低, PTR 组较对照组 CD8<sup>+</sup>T 细胞比例增高,但 CD4<sup>+</sup>T 细胞比例减低。如表所示。

T 淋巴细胞亚群是免疫系统重要组成部分,在免疫应答过程中发挥中枢作用。T 淋巴细胞亚群通常分为 2 类:一类是 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞表面仅表达 CD4,具有辅助细胞免疫应答和体液免疫应答的作用;另一类是 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞,表面表达 CD8,具有细胞毒作用,可特异性杀伤靶细胞。CD4<sup>+</sup>辅助 T 淋巴细胞在适应性免疫反应的招募、激活和调节多个方面发挥着关键作用。有研究显示,相当数量的 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞存在于人和动物的外周血循环中。尤其在某些病毒感染性疾病、肿瘤、自身免疫病中,CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞显著增加<sup>[14]</sup>。

本次研究对两组的外周血 T 淋巴细胞表达情况进行检测,结果显示 PTR 组 B 淋巴细胞比例无明显差异,但较对照组 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T 细胞比值降低,提示 CD4<sup>+</sup>T 细胞和 CD8<sup>+</sup>T 细胞的失衡在 PTR 患者

(下转第 88 页)

(上接第 68 页)

发病中具有一定意义。同时 PTR 组较对照组 CD8+T 细胞比例增高,但 CD4+T 细胞比例减低,提示在免疫性 PTR 患者体内 CD8+T 细胞在免疫调控方面发挥了一定作用。

综上所述,免疫性 PTR 的发生不能完全归于血小板抗体的产生,患者 T 淋巴细胞的异常表达提示 T 细胞免疫可能参与介导免疫性 PTR 的发生,深入了解其机制可以为 PTR 的治疗提供新的思路,从而建立更加有效和全面的小血小板输注策略。

参考文献:

[1] 杨小莉,余泽波.血小板输注无效原因及对策研究进展[J].检验医学与临床,2019,16(07):127-130.

[2] 周燕,李丽兰,钟周琳,等.造血干细胞移植术后抗-CD36 注无效症和相关病例的实验研究[J].中国实验血液学杂志,2018,26(2):541-546.

[3] Silberstein, Leslie, E, et al. Platelet refractoriness: it's not the B-all and end-all[J].Blood: The Journal of the American Society of Hematology, 2016,127:1740-1741.

[4] Vassallo R R, Norris P J. Can we "terminate" alloimmune platelet transfusion refractoriness?[J].Transfusion,2016,56(1):19-22.

[5] Arthur C M, Patel S R, Sullivan H C, et al. CD8+T cells mediate antibody -independent platelet clearance in mice[J].Blood, 2016,127(14):1823-1827.

[6] Rita C, Annalisa L, Costanza C M. The Centenary of Immune Thrombocytopenia -Part 1: Revising Nomenclature and Pathogenesis

[J].Frontiers in Pediatrics, 2016,4,102.

[7] Audia S, Samson M, Matthieu Mah é vas, et al. Preferential splenic CD8(+) T-cell activation in rituximab-nonresponder patients with immune thrombocytopenia [J].Blood,2013,122(14):2477-2486.

[8] 杨成民,刘进,赵桐茂等.中华输血学.北京:人民卫生出版社 2017: 477 - 478.

[9] Slichter S J, Bailey S L, Gettinger I, et al. Pathogen reduction with amotosalen/UVA reduces platelet refractoriness in a dog platelet transfusion model[J].Vox Sanguinis,2019,114(6):595-604.

[10] Silberstein, Leslie, E, et al. Platelet refractoriness: it's not the B-all and end-all[J].Blood: The Journal of the American Society of Hematology, 2016,127:1740-1741

[11] Arthur C M, Patel S R, Sullivan H C, et al. CD8+T cells mediate antibody -independent platelet clearance in mice[J].Blood,2016,127(14):1823-1827.

[12] Audia S, Mah é vas, Matthieu, Samson M, et al. Pathogenesis of immune thrombocytopenia[J].Autoimmunity Reviews,2017, 6(6):620-632.

[13] Novais F O, Carvalho A M, Clark M L, et al. CD8+ T cell cytotoxicity mediates pathology in the skin by inflammasome activation and IL-1  $\beta$  production[J].Plos Pathogens, 2017,

[14] 唐甜,张子宁,傅雅静,等. 2939 例临床患者 CD4+CD8+T 淋巴细胞检测结果的回顾性分析[J].中国医科大学学报,2013,42(11):978-981.