

淋巴细胞亚群及血细胞抗体检测在再生障碍性贫血中的临床意义

高泽莉,汪宏云,叶梅,李莉,周丽,郭峰

(四川省攀枝花学院附属医院血液科 617000)

[摘要] 目的 探讨再生障碍性贫血患者外周血淋巴细胞亚群及血细胞抗体水平的变化及临床意义。方法 采用流式细胞仪检测 25 例再生障碍性贫血患者(重型再生障碍性贫血 7 例,非重型再生障碍性贫血 18 例)及 20 例健康志愿者(对照)外周血淋巴细胞亚群(CD3⁺、CD3⁺ CD4⁺、CD3⁺ CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺、CD3⁻ CD19⁺、CD3⁻ CD16⁺ CD56⁺)及血细胞抗体(抗血小板抗体、抗红细胞抗体及抗粒细胞抗体)。结果 再生障碍性贫血组患者 CD4⁺ T 淋巴细胞百分比、CD4/CD8 比值,CD56⁺ 百分比明显降低($P<0.05$);血细胞抗体(血小板抗体、红细胞抗体、粒细胞抗体)阳性率明显高于对照组($P<0.05$)。结论 再生障碍性贫血患者细胞免疫功能异常,同时血细胞膜上抗体阳性率高,提示体液免疫也存在异常。

[关键词] 再生障碍性贫血;淋巴细胞亚群;血细胞抗体

[中图分类号] R556.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)07-0903-02

Clinical significance of detecting lymphocyte subsets and hematocyte antibody in aplastic anemia

Gao Zeli, Wang Hongyun, Ye Mei, Li Li, Zhou Li, Guo Feng

(Department of Hematology, the Affiliated Hospital of Panzhihua University, Panzhihua, Sichuan 617000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate of the change of peripheral blood lymphocyte subsets and blood cell antibodies in aplastic anemia and its clinical significance. **Methods** The lymphocyte subsets CD3⁺, CD3⁺ CD4⁺, CD3⁺ CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺, CD3⁻ CD19⁺, CD3⁻ CD16⁺ CD56⁺ from 25 aplastic anemia(including SAA 7 cases, NSAA18 cases), and hematocyte antibody detection (granulocyte, erythrocyte, platelet cytomembrane) and 20 controls were examined by flow cytometry. **Results** CD4⁺ T lymphocyte percentage, CD4/CD8 ratio, the percentage of CD56⁺ in aplastic anemia patients significantly decreased($P<0.05$). Blood cell antibodies (platelet antibody, erythrocyte antibody, granulocyte antibody) were significantly higher than the control group ($P<0.05$).

Conclusion Aplastic anemia cellular immune function in patients is abnormal, and antibody positive rate is high, and it prompt that humoral immunity is also abnormal.

[Key words] anemia aplastic; lymphocyte subsets; hematocyte antibody

再生障碍性贫血(aplastic anemia, AA)是一类主要由 T 淋巴细胞介导造血组织损伤而导致的骨髓造血衰竭综合征。近年来,越来越多研究发现,细胞免疫是其主要发病机制,包括 Th/Ts 细胞失衡及 CD8⁺ T 细胞过度活化、Treg 细胞的明显降低等有关。目前,细胞免疫功能 T 淋巴细胞亚群的研究较多,但对 AA 患者血细胞抗体的研究却很少。本研究应用流式细胞仪对 25 例 AA 患者的外周血淋巴细胞亚群及血细胞抗体进行了检测,旨在观察二者在 AA 发病中的变化及临床意义,以便指导治疗及病情观察。

1 资料与方法

1.1 一般资料 全部 AA 病例均为本院住院或门诊患者,根据血常规和骨髓检查及骨髓活检确诊,符合张之南《血液病诊断及疗效标准》。将研究对象分为两组,AA 组:男 13 例,女 12 例;重型 AA 患者 7 例,非重型 AA 患者 18 例;年龄 4~68 岁,中位年龄 35 岁;(2)健康志愿者(对照组):男 11 例,女 9 例,中位年龄 32 岁。主要试剂及仪器:流式细胞仪为美国贝克曼五色流式细胞仪,淋巴细胞亚群试剂盒及血细胞抗体试剂盒(Beckman 公司, America)。试剂为鼠抗人单克隆抗体,溶血素为全血溶血试剂,为 BEKMAN COULT A11895。

1.2 方法

1.2.1 淋巴细胞亚群检测方法 采集外周静脉血 3 mL,乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝后,流式细胞仪检测淋巴细胞亚群表达,包括 CD3⁺、CD3⁺ CD4⁺、CD3⁺ CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺、CD3⁻ CD19⁺、CD3⁻ CD16⁺ CD56⁺ 等。直接免疫荧光

法:荧光素标记的各种单克隆抗体加入到全血中,与白细胞膜上相应的抗原结合,经过荧光标记固定、溶血步骤后,在流式细胞仪上进行分析,从而得到淋巴细胞亚群的百分数,加入 Flow-Count 即可得出绝对计数。

1.2.2 血细胞抗体检测方法 采集外周静脉血 3 mL, EDTA-K₂ 抗凝后,直接免疫荧光法。FITC 标记的各型单克隆抗体,加到全血样本中,与粒细胞膜、血小板膜、红细胞膜上的相应的 IgG-Fc 片段结合,经过洗涤(和固定)等步骤后,在流式细胞仪上进行分析,报告百分数。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件对数据进行分析处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料组间比较行 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AA 组与对照组淋巴细胞亚群的比较 AA 组 CD3⁺ 平均值(70.00±12.25)%,与对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),AA 组 CD4⁺ T 淋巴细胞平均值为(32.50±5.61)%,明显低于对照组($P<0.05$);CD8⁺ 平均值为(39.70±5.02)%,明显高于对照组($P<0.05$),CD4/CD8 比值,平均值为(0.90±0.26)%,与对照组比明显降低($P<0.05$),CD56⁺ 平均值(7.94±4.51)%,明显低于对照组($P<0.05$),见表 1。

2.2 AA 组与对照组外周血血细胞抗体的比较 血小板抗体 PAIGG 平均值(2.30±1.94)%,明显高于对照组($P<0.05$),

表 1 AA 组与对照组淋巴细胞亚群的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	CD3 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺ (%)	CD3 ⁻ CD19 ⁺ (%)
AA 组	25	70.0±12.25	32.5±5.61	39.7±5.02	0.9±0.26	7.94±4.51	7.40±6.51
对照组	20	72.0±4.15	41.6±3.32	33.9±3.55	1.2±0.18	10.8±1.74	8.20±5.65
χ^2		0.28	23.61	10.34	13.81	4.328	0.32
P		>0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05

表 2 AA 组与对照组血细胞抗体的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	血小板抗体 PAIGG	血小板抗体 PAIGA	血小板抗体 PAIGM	红细胞抗体 IGG	红细胞抗体 IGA	红细胞抗体 IGM	粒细胞抗体 IGG	粒细胞抗体 IGA	粒细胞抗体 IGM
AA 组	25	2.30±1.94	2.22±2.09	8.27±9.93	0.40±0.23	1.17±1.76	2.25±1.60	1.86±1.20	3.38±5.26	5.16±6.82
对照组	20	0.75±0.27	0.68±0.48	0.84±0.42	0.20±0.21	0.70±0.52	0.76±0.46	0.86±0.58	0.92±0.42	0.68±0.54
χ^2		7.51	5.63	6.86	4.84	0.647	9.957	8.91	2.975	5.003
P		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05	<0.05	<0.05	>0.05	<0.05

血小板抗体 PAIGA 平均值(2.22±2.09)%,明显高于对照组($P<0.05$),血小板抗体 PAIGM 平均值(8.27±9.93)%,明显高于对照组。红细胞抗体 IGG(0.40±0.23)%,明显高于对照组($P<0.05$),红细胞抗体 IGA(1.17±1.76)%,与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$),红细胞抗体 IGM 平均值(2.25±1.60)%,明显高于对照组($P<0.05$),粒细胞抗体 IGG 平均值(1.86±1.20)%,明显高于对照组($P<0.05$),粒细胞抗体 IGA 平均值(3.38±5.26)%,与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$),粒细胞抗体 IGM 平均值(5.16±6.82)%,明显高于对照组($P<0.05$),见表 2。

3 讨 论

传统学说认为 AA 是原发、继发干细胞缺陷、造血微环境异常及免疫异常 3 种机制导致的骨髓造血功能衰竭。目前,多数学者认为 AA 患者的发病机制为 T 细胞功能异常、细胞免疫亢进并以骨髓为靶器官的自身免疫性疾病。其 T 细胞亚群失衡、CD8 比例增高、CD4/CD8 比例倒置^[1-2]。

本研究表明 AA 患者总 T 细胞与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$),但 CD4/CD8 比值异常,主要见于重型 AA,而非重型 AA 的 CD4/CD8 多正常。

CD19 是 B 细胞标志之一,本研究表明,AA 中 B 细胞数量下降有 6 个,B 淋巴细胞的数量增加的有 3 个,B 细胞数量变化与血细胞抗体改变不一致,B 细胞数量增加或减少的患者都有血细胞抗体的高表达。提示 AA 患者可能存在 B 细胞功能异常,体液免疫在 AA 发病机制中的作用尚无定论。目前,已陆续有文献提及体液免疫在 AA 发病机制中的作用,可能仍有一定的体液免疫参与。但并不是直接参与,也可能不是原发因素而是继发效应所致。也有研究报道是通过表达协同刺激分子途径或调节性 T 细胞途径影响 AA 患者 T 淋巴细胞活化^[3]。

CD16⁺56⁺ 是 NK 细胞的特性标志,参与肿瘤、感染、免疫调节。本研究发现 AA 患者 NK⁺ 减少的有 6 例,均为重型 AA,说明 AA 患者 NK 细胞免疫功能明显受损的。较多文献提及 NK 细胞在 AA 患者中数量是减低的,NK 细胞表面同时存在抑制性受体和活化性受体,但抑制性受体居主导地位,表现为 NK 细胞对自身正常组织细胞不产生杀伤作用,NK 细胞的降低减弱了 T 淋巴细胞的调节作用,导致免疫功能失衡。在 Fas 缺陷的小鼠模型中,NK 细胞在体外可以抑制自身反应性 B 淋巴细胞,而在体内将 NK 细胞清除后则会加重自身免疫性疾病的程度^[4-8],提示 NK 细胞减少在 AA 发病机制中起一

定作用。

本研究同时进行了成熟血细胞抗体的测定。红、粒细胞抗体包括 IGG、IGM、IGA,血小板抗体包括 PAIGG、PAIGA、PAIGM。成熟血细胞抗体测定目前较少文献提及。刘惠等^[9]研究较多的为免疫相关性血细胞减少(immuno-related hemocytopenia,IRH),此病为自身抗体损伤和(或)抑制骨髓不成熟造血细胞导致的造血功能低下,骨髓造血细胞自身抗体是由 T 淋巴细胞调控失衡导致 B 淋巴细胞数量/亚群/功能异常,而产生的一类抗体。刘惠等^[9]对此病的拟诊标准:(1)两系或全血细胞减少,网织红细胞比例不低,骨髓中红系比例正常或偏高,易见红系造血岛及红细胞吞噬现象;(2)除外其他原发或继发血细胞减少症如 AA、MDS、PNH 相鉴别。其确诊标准为 FCM 检测到骨髓造血细胞膜自身抗体即可确诊(治疗前确诊),若未检测到骨髓未成熟造血细胞膜上自身抗体,但对激素、静脉用丙球蛋白等免疫抑制剂有效仍可确诊^[8-9]。

作者没有检测干祖细胞抗体,而是检测外周血成熟血细胞抗体。本研究发现,AA 患者血细胞抗体均为阳性 5/25(20%),红细胞抗体阳性 6/25(24%),粒细胞抗体阳性 9/25(36%),血小板抗体阳性 10/25(40%)。与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),尤其以 IGM 型血细胞抗体为主,提示 AA 患者也存在体液免疫的异常。自身抗体针对骨髓造血细胞膜上何种抗原,这些抗原如何被递呈并激活 TH2 细胞,目前文献不多,还有待进一步研究。付蓉等^[10]发现部分 IRH 患者自身抗体可作用于骨髓红系造血细胞膜上的促红细胞生成素受体(EPOR),封闭 EPOR 信号转导,导致红系较早阶段增殖和分化受抑,EPOR 可能为自身抗体作用的靶点之一。血细胞抗体阳性的 AA 患者如何与 IRH 鉴别? AA 是一种以骨髓造血组织为靶器官,T 细胞免疫功能亢进的自身免疫性疾病,为细胞免疫亢进,血常规网织红细胞及中性粒细胞百分比明显降低,淋巴细胞比例升高,骨髓减低或重度减低。而 IRH 为体液免疫亢进,B 淋巴细胞比例超过正常,而且亚群失衡,特别是 CD5⁺B 淋巴细胞明显多于健康者及 AA 患者,IGG1 及 IGG3 水平增高,血常规网织红细胞及中性粒细胞百分比不低,巨核细胞不少,骨髓易见红系造血岛或嗜血现象,对糖皮质激素及静脉用丙球蛋白疗效好,起效快^[11]。

淋巴细胞亚群联合血细胞抗体的测定,不仅可以帮助探讨 AA 的发病机制,也可以指导临床用药,组内 2 例 AA 患者,血象及骨髓象恢复后,复查淋巴细胞亚群及血细胞抗体仍异常,因在其他医院停药及减量导致病情复发,当重(下转第 908 页)

- for development of atrial fibrillation: the framingham heart study[J]. *Circulation*, 2004, 110(9): 1042-1046.
- [2] 范学慧,李涛,杨国强,等. 心房颤动患者心脏功能变化的研究[J]. *重庆医学*, 2014, 43(5): 513-515.
 - [3] Hussain SK, Malhotra R, DiMarco JP. Left atrial appendage devices for stroke prevention in atrial fibrillation[J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2014, 7(4): 458-464.
 - [4] Moss JD. Left atrial appendage exclusion for prevention of stroke in atrial fibrillation: review of minimally invasive approaches[J]. *Curr Cardiol Rep*, 2014, 16(2): 448.
 - [5] Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB. Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the framingham study [J]. *Stroke*, 1991, 22(8): 983-988.
 - [6] 王斌,徐志云,韩林,等. 术前心房颤动对单纯二尖瓣置换术患者术后中远期疗效的影响[J]. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2012, 19(6): 610-614.
 - [7] 蒋周岑,舒茂琴. 心房颤动抗凝治疗及其临床应用进展 [J]. *重庆医学*, 2013, 42(29): 3569-3571.
 - [8] Holmes DR, Reddy VY, Turi ZG, et al. Percutaneous closure of the left atrial appendage versus warfarin therapy for prevention of stroke in patients with atrial fibrillation: a randomised non-inferiority trial [J] *Lancet*, 2009, 374(9689): 534-542.
 - [9] Weimar T, Schena S, Bailey MS, et al. The cox-maze procedure for lone atrial fibrillation: a single-center experience over 2 decades [J]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2012, 5(1): 8-14.
 - [10] García-Fernández MA, Pérez-David E, Quiles J, et al. Role of left atrial appendage obliteration in stroke reduction in patients with mitral valve prosthesis: a transesophageal echocardiographic study [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 42(7): 1253-1258.
 - [11] Whitlock RP, Vincent J, Blackall MH, et al. Left Atrial Appendage Occlusion Study II (LAAOS II) [J]. *Can J Cardiol*, 2013, 29(11): 1443-1447.
 - [12] Emmert MY, Puippe G, Baumüller S, et al. Safe, effective and durable epicardial left atrial appendage clip occlusion in patients with atrial fibrillation undergoing cardiac surgery: first long-term results from a prospective device trial [J]. *Eur J Cardiovasc Surg*, 2014, 45(1): 126-131.
 - [13] Kim R, Baumgartner N, Clements J. Routine left atrial appendage ligation during cardiac surgery may prevent post-operative atrial fibrillation-related cerebrovascular accident [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2013, 145(2): 582-589.
 - [14] Syed FF, Asirvatham SJ. Left atrial appendage as a target for reducing strokes: justifiable rationale? Safe and effective approaches? [J]. *Heart Rhythm*, 2011, 8(2): 194-198.
 - [15] Hanke T, Sievers HH, Doll N, et al. Surgical closure of the left atrial appendage in patients with atrial fibrillation. Indications, techniques and results [J]. *Herzschrittmacherther Elektrophysiol*, 2013, 24(1): 53-57.
 - [16] 陈灏,杨庆军,严宇,等. 经房间隔路径房颤消融同期瓣膜置换早期研究[J]. *重庆医学*, 2013, 42(18): 2095-2097.
 - [17] 李菲,孟旭. 术前左心房内径对外科射频消融术治疗心房颤动疗效的影响[J]. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2013, 20(1): 38-42.
 - [18] Wolf PA, Mitchell JB, Baker CS, et al. Impact of atrial fibrillation on mortality, stroke, and medical costs [J]. *Arch Intern Med*, 1998, 158(3): 229-234.

(收稿日期: 2015-09-19 修回日期: 2015-11-02)

(上接第 904 页)

新使用环孢素后患者血常规又恢复,故作者根据此 2 项结果来决定用药时间和调整药物剂量^[12]。当 AA 患者血象和骨髓象即使恢复正常后,若淋巴细胞亚群及血细胞抗体仍为阳性时,建议适当延长用药时间。

参考文献

- [1] Kordasti S, Marsh J, Al-Khan S, et al. Functional characterization of CD4⁺ T cells in aplastic anemia [J]. *Blood*, 2012, 119(9): 2033-2043.
- [2] 林果为. 现代临床血液病学 [M]. 上海: 复旦大学出版社, 2013: 365-368.
- [3] 文瑞婷,蔡静怡,吴国才,等. B 淋巴细胞活化因子在再生障碍性贫血发病中的作用 [J]. *广东医学院学报*, 2014, 32(5): 624-625.
- [4] Liu C, Li Z, Sheng W, et al. Abnormalities of quantities and functions of natural killer cells in severe aplastic anemia [J]. *Immunol Invest*, 2014, 43(5): 491-503.
- [5] Li ZS, Shao ZH, Fu R, et al. Percentages and functions of natural killer cell subsets in peripheral blood of patients with severe aplastic anemia [J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2011, 91(16): 1084-1087.
- [6] 曹萍,蒋莎义,谢晓恬,等. 儿童再生障碍性贫血淋巴细胞亚群及与血常规相关性的研究 [J]. *同济大学学报: 医学版*, 2011, 6(6): 70-73.
- [7] 何维,曹雪涛,熊思东. 医学免疫学 [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 135.
- [8] 付蓉,陈瑾,王红蕾,等. 骨髓 cooms 试验阳性血细胞减少症患者调节性 T 细胞数量及功能状态 [J]. *中华医学杂志*, 2010, 90(42): 2989-2992.
- [9] 刘惠,付蓉,邵宗鸿. 免疫相关性血细胞减少症的诊断及鉴别诊断 [J]. *临床血液学杂志*, 2013, 26(4): 437-439.
- [10] 付蓉,刘惠,王珺. 骨髓单个核细胞 cooms 试验阳性血细胞减少患者骨髓红系造血细胞膜靶抗原初步研究 [J]. *中华医学杂志*, 2012, 92(38): 2689-2693.
- [11] Shi J, Ge M, Lu S, et al. Intrinsic impairment of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in acquired aplastic anemia [J]. *Blood*, 2012, 120(8): 1624-1632.
- [12] 陆春伟,佟海侠,陆美言. 再生障碍性贫血患者外周血淋巴细胞亚群和调节性 T 细胞的检测及临床意义 [J]. *中国医科大学学报*, 2010, 46(10): 865-867.

(收稿日期: 2015-09-14 修回日期: 2015-11-19)