

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.20.019

Fas/FasL 在原发免疫性血小板减少症发病机制中的作用研究*

陈 燕,邢宏运[△],李晓明,吴鹏强,马 涛,陈 梅

(西南医科大学附属医院血液内科,四川泸州 646000)

[摘要] 目的 探讨 Fas 及 FasL 系统在成年原发免疫性血小板减少症(ITP)发病机制中的作用。方法 收集成年初诊 ITP 患者及健康成年人外周抗凝静脉血。采用流式细胞术检测 ITP 患者 Th/Tc、Th1/Th2、Tc1/Tc2 细胞 Fas 及 FasL 的表达率、血小板表面 Fas 及 FasL 的表达率。结果 与健康对照组相比,ITP 组 Th、Th1、Th2、Tc、Tc1、Tc2 细胞表面 Fas 及 FasL 的表达率均明显升高($P<0.05$);同时 ITP 组血小板表面 Fas 的表达率明显升高($P<0.05$),而血小板表面 FasL 的表达无明显变化($P>0.05$)。结论 ITP 患者 T 细胞亚群及血小板表面 Fas 及 FasL 表达的异常,可能与 ITP 发病机制密切相关。

[关键词] 血小板减少;Fas/FasL 系统;T 细胞亚群;血小板

[中图分类号] R558

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)20-2795-03

Study on role of Fas/FasL in pathogenesis of primary immune thrombocytopenia*

Chen Yan, Xing Hongyun[△], Li Xiaoming, Wu Pengjiang, Ma Tao, Chen Mei

(Department of Hematology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the role of Fas and FasL system in the pathogenesis of adult primary immune thrombocytopenic purpura (ITP). **Methods** The peripheral anticoagulant venous blood samples were collected from the patients with newly diagnosed ITP and healthy adults. The expression rates of Fas and FasL in Th/Tc, Th1/Th2, Tc1/Tc2 cells and their expression rates at platelet surface were detected by flow cytometry. **Results** The Fas and FasL expression rates on the surface of Th, Th1, Th2, Tc, Tc1 and Tc2 in the ITP group were increased compared with the healthy control group ($P<0.05$), meanwhile the FasL expression on the platelet surface was significantly increased ($P<0.05$), but the expression of FasL on the platelet surface had no obvious change ($P>0.05$). **Conclusion** The Fas and FasL expression on T cell subsets and platelet surface in ITP patients is abnormal, which may be related with the pathogenesis of ITP.

[Key words] thrombocytopenia; Fas/FasL system; T cell subsets; thrombocyte

目前,关于原发免疫性血小板减少症(primary immune thrombocytopenia, ITP)发病机制的研究越来越多,以往研究证实 ITP 的发病机制主要与体液免疫异常相关,即自身抗体介导的血小板破坏增多。但近年来,多数研究表明细胞免疫因素在 ITP 的发病机制中也起着重要作用。本试验以初诊成年 ITP 患者及健康成年人外周血 T 淋巴细胞亚群和血小板为研究对象,检测其表面 Fas 及 FasL 蛋白的表达情况,进一步探讨细胞免疫在 ITP 的发病机制中的作用,从而为 ITP 的临床诊断和治疗提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 研究对象分为 ITP 组及对照组,ITP 组 25 例,均符合成人初诊 ITP 诊断标准^[1],取自西南医科大学附属医院血液内科,其中女 13 例,男 12 例,中位年龄 45 岁;对照组 25 例,取自西南医科大学附属医院门诊健康体检者,其中女 15 例,男 10 例,中位年龄 49.5 岁;ITP 组及对照组经患者知情同意后,取外周静脉血,肝素抗凝备测。

1.2 试剂与仪器 PE 标记的 anti-CRTH2 mAb、CY5 标记的 anti-CD4、CD8mAb 以及小鼠抗人 IgG1 为 Biolegend 公司产品, ECD 标记的 anti-CD3 及 PC7 标记的 anti-CD45 mAb 为 Beckman Coulter 公司产品, FITC 标记的 anti-Fas、FasLmAb

及 APC 标记的 anti-CD42b mAb 为 BD 公司产品,流式细胞仪为美国 NAVIDS Beckman Coulter。

1.3 方法

1.3.1 外周血 T 细胞亚群及其表面 Fas 及 FasL 蛋白表达率的测定 取外周静脉血 200 μ L,加入溶血剂溶解红细胞得到白细胞悬液;设置空白对照管(ISO)及检测管(A、B、C、D),各管加入相应抗体各 5 μ L, ISO: anti-IgG1-ECD、anti-IgG1-PE、anti-IgG1-CY5、anti-IgG1-FITC、anti-CD45-PC7; A: anti-CD3-ECD、anti-CRTH2-PE、anti-CD4-CY5、anti-Fas-FITC、anti-CD45-PC7; B: anti-CD3-ECD、anti-CRTH2-PE、anti-CD4-CY5、anti-FasL-FITC、anti-CD45-PC7; C: anti-CD3-ECD、anti-CRTH2-PE、anti-CD8-CY5、anti-Fas-FITC、anti-CD45-PC7; D: anti-CD3-ECD、anti-CRTH2-PE、anti-CD8-CY5、anti-FasL-FITC、anti-CD45-PC7; 空白对照管及检测管各加入白细胞悬液 50 μ L,避光反应 15 min 后加入 PBS 缓冲液上流式细胞仪检测。

1.3.2 血小板表面 Fas 及 FasL 表达率的检测 设置空白对照管(ISO)及检测管(A、B),各管加入相应抗体各 5 μ L, ISO: anti-IgG1-FITC、anti-CD42b-APC; A: anti-Fas-FITC、anti-CD42b-APC; B: anti-FasL-FITC、anti-CD42b-APC; ISO 管及检

* 基金项目:四川省卫生厅项目(110349);泸州医学院附属医院青年人才基金[(2011)43 号]。作者简介:陈燕(1986—),住院医师,硕士,主要从事血液病诊断与治疗方面的研究。 △ 通讯作者,E-mail:xinghy52003@foxmail.com。

表1 T淋巴细胞亚群中Fas蛋白的表达情况比较($\bar{x} \pm s$, %)

组别	n	ThFas	Th1Fas	Th2Fas	TcFas	Tc1Fas	Tc2Fas
对照组	25	22.73±4.47	15.41±3.50	7.32±1.92	1.30±0.32	0.78±0.28	0.52±0.27
ITP组	25	51.03±6.46*	29.24±5.04*	21.79±4.29*	3.94±1.22*	2.50±0.74*	1.44±0.78*

*: $P<0.05$, 与对照组比较。

表2 T淋巴细胞亚群表面FasL蛋白的表达情况比较($\bar{x} \pm s$, %)

组别	n	ThFasL	Th1FasL	Th2FasL	TcFasL	Tc1FasL	Tc2FasL
对照组	25	15.44±3.56	12.36±3.23	3.08±1.70	18.53±5.25	10.80±2.79	7.73±3.65
ITP组	25	36.92±5.04*	23.39±3.21*	13.54±4.72*	35.78±7.70*	19.06±5.12*	16.72±4.51*

*: $P<0.05$, 与对照组比较。

测管各加入全血5 μ L, 避光反应25 min后加入PBS缓冲液上流式细胞仪检测。

1.4 统计学处理 采用SPSS20.0进行统计分析, 两样本均数满足正态性和方差齐性, 采用两独立样本的t检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 T细胞亚群(Th、Th1、Th2、Tc、Tc1、Tc2)表面Fas/FasL的表达情况 与对照组相比, ITP组T细胞亚群表面Fas蛋白

的表达率明显升高, 差异有统计学意义($P<0.05$), 见表1。与对照组相比, ITP组T亚群表面FasL蛋白的表达率明显升高, 差异具有统计学意义($P<0.05$), 见表2。流式细胞检测结果分析, 以淋巴细胞群为研究对象, 分别以Th1细胞(CD3⁺CD4⁺CRTH2⁻)及Th2细胞(CD3⁺CD4⁺CRTH2⁺)、Tc1细胞(CD3⁺CD8⁺CRTH2⁻)、Tc2细胞(CD3⁺CD8⁺CRTH2⁺)射门, 检测其表面Fas/FasL的表达情况如图1~8所示。

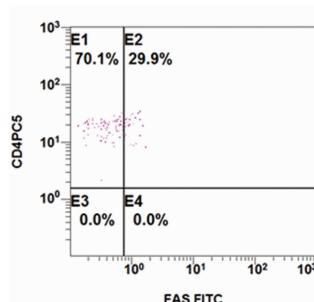


图1 Th1细胞表面Fas的表达率

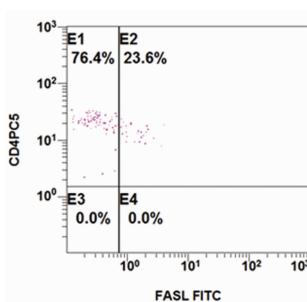


图2 Th1细胞表面FasL的表达率

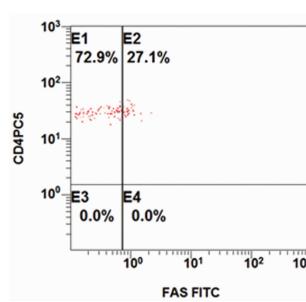


图3 Th2细胞表面Fas的表达率

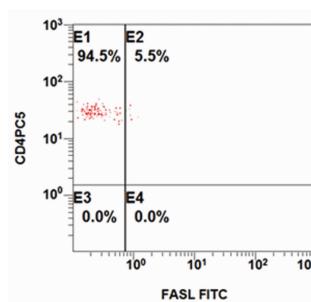


图4 Th2细胞表面FasL的表达率

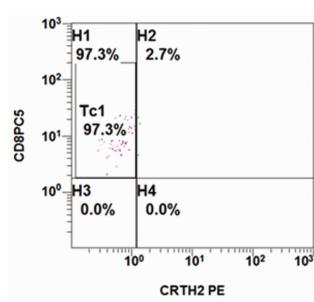


图5 Tc1细胞表面Fas的表达率

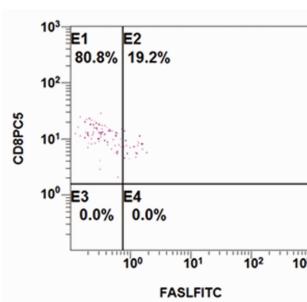


图6 Tc1细胞表面FasL的表达率

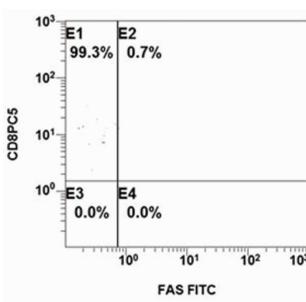


图7 Tc2细胞表面Fas的表达率

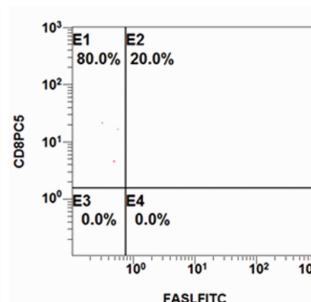


图8 Tc2细胞表面FasL的表达率

2.2 外周血血小板表面Fas及FasL蛋白的表达率 与对照组相比, ITP组血小板表面Fas蛋白的表达率明显升高, 差异具有统计学意义($P<0.05$), 而FasL蛋白的表达率无明显变化, 见表3。流式细胞检测结果分析, 根据FSC、SSC及CD42b确定血小板群, ITP组血小板表面Fas及FasL蛋白的表达情况如图9~10所示。

表3 血小板表面Fas及FasL蛋白的表达率比较($\bar{x} \pm s$, %)

组别	n	Fas	FasL
对照组	25	0.52±0.22	5.33±1.82
ITP组	25	6.94±1.43*	6.07±1.44

*: $P<0.05$, 与对照组比较。

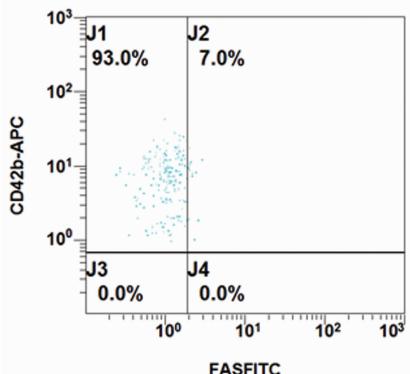


图 9 ITP 组血小板表面 Fas 的表达率

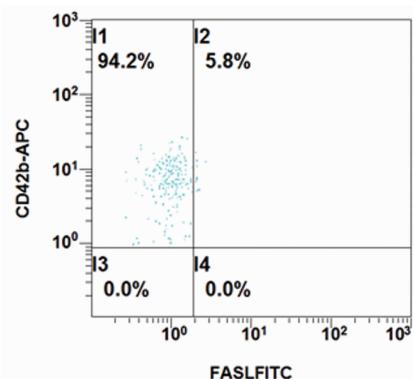


图 10 ITP 组血小板表面 FasL 蛋白的表达率

3 讨 论

Shenoy 等^[2]收集了 20 例伴有 Fas 基因突变的血液系统慢性自身免疫性疾病的儿童患者,研究其淋巴细胞凋亡情况,最终证实血液系统自身免疫性疾病的发生与 Fas 信号通路的改变密切相关。而后, Sedger 等^[3]发现致命性的自身免疫性血小板减少症可发生于 FASL 和 TRAIL 双敲除小鼠,提示 ITP 的发生与 FAS/FASL 信号通路密不可分。同时,不少研究^[4-5]通过不同方法检测了 ITP 患者血清中游离状态 sFas、sFasL 的水平,结果发现其明显高于健康人。这些研究认为 ITP 患者血清中高水平的 sFas 及 sFasL 将导致 Fas 及 FasL 蛋白的封闭,从而导致免疫下调机制失效,B 淋巴细胞的凋亡减少,进一步导致抗体的持续产生,血小板的破坏增加。以上研究结果均证实 ITP 的发病机制与 Fas/FasL 信号同路密切相关。

本研究采用流式细胞术检测了成年初诊 ITP 患者及健康成年人外周血 T 细胞亚群表面 Fas 及 FasL 蛋白的表达率,结果显示:(1)与对照组相比,ITP 组 T 细胞亚群表面 Fas 及 FasL 蛋白的表达均是明显升高的;(2)Tc 细胞表面以 FasL 蛋白高水平更为明显;(3)Th 细胞表面以 Fas 蛋白升高更为明显。因此,笔者认为:ITP 组 Th 细胞 Fas 及 FasL 表达失衡,Fas/FasL 信号通路异常,导致 Th 细胞的自我清除减少。一方面,ITP 组 Th 细胞增多,主要是 Th1 类细胞增多,其释放的细胞因子(γ-干扰素、白细胞介素-2、转化生长因子-β)增多,进一步促进 Th1、CTL 及 NK 细胞的增殖和活化,加速患者体内的血小板破坏;另一方面, Th 细胞的增加,可进一步辅助 B 细胞产生血小板抗体,辅助 Tc 细胞的细胞毒性作用,最终导致血小板的破坏增加。此外, FasL 主要表达于被激活的 T 细胞、NK 细胞,其能够诱发表达 Fas 的 T 细胞发生凋亡,Fas/FasL 系统参与了免疫应答过程中淋巴细胞数量的调控^[6]。本研究

结果中 Tc 细胞以 FasL 蛋白增高更明显,因此笔者认为 ITP 组活化的 Tc 细胞 Fas/FasL 凋亡途径发生异常,外周血中活化的 Tc 细胞增多,最终使血小板的破坏增加。

肖红等^[7]检测了 ITP 患儿及健康儿童外周血 T 细胞(Th/Tc、Th1/Th2、Tc1/Tc2)及血小板表面 Fas 及 FasL 的表达情况,结果提示 Th、Tc、Th1、Th2、Tc1、Tc2 细胞 Fas、FasL 表达均明显升高。此外 Zhong 等^[8]研究发现,与对照组相比,ITP 组 CD4⁺ 及 CD8⁺ T 淋巴细胞 FasL 蛋白的表达都是明显增高的。本研究结果与以上研究是基本一致的。高清平等^[9]采用流式细胞仪检测了健康对照组及慢性特发性血小板减少症治疗前后淋巴细胞及血小板表面 Fas 及 FasL 蛋白的表达,结果显示与健康对照组相比,ITP 患者 T 细胞表面 Fas 的表达明显降低,FasL 表达明显升高,与本研究结果不完全一致,其原因可能是:本研究主要以急性 ITP 为研究对象,而高清平等主要以慢性 ITP 为研究对象;笔者采用了多标记荧光检测,而高清平等采用的是双标记荧光检测法;与患者个体差异及所收集标本含量不同相关。

同时笔者采用流式细胞术,以全血法处理标本,结合 CD42b、FSC 确定血小板群,检测其表面 Fas 及 FasL 蛋白的表达率,结果显示与肖红等的研究结果一致,ITP 组血小板表面 Fas 表达明显升高,FasL 表达无明显变化。笔者认为血小板表面 Fas 蛋白的表达增高,其可与活化的 T 淋巴细胞(即表达 FasL 的 T 淋巴细胞)结合,最终通过 Fas/FasL 信号通路促进血小板的凋亡。

综上所述,本试验结果表明,ITP 患者 T 细胞亚群及血小板表面 Fas、FasL 的表达异常,在 ITP 细胞免疫功能紊乱、T 细胞亚群及血小板的凋亡中起着重要作用,Fas 及 FasL 系统可能与 ITP 的细胞免疫病理机制密切相关。

参考文献

- [1] 张之南. 血液病诊断及疗效标准 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1998.
- [2] Shenoy S, Mohanakumar T, Chatila T, et al. Defective apoptosis in lymphocytes and the role of IL-2 in autoimmune hematologic cytopenias [J]. Clin Immunol, 2001, 99(2): 266-275.
- [3] Sedger LM, Katewa A, Pettersen AK, et al. Extreme lymphoproliferative disease and fatal autoimmune thrombocytopenia in FasL and TRAIL double-deficient mice [J]. Blood, 2010, 115(16): 3258-3268.
- [4] Yoshimura C, Nomura S, Nagahama M, et al. Plasma-soluble Fas (APO-1, CD95) and soluble Fas ligand in immune thrombocytopenic purpura [J]. Eur J Haematol, 2000, 64(4): 219-224.
- [5] Jin L, Stolpa JC, Young RM, et al. MHC class II structural requirements for the association with Igalpha/beta, and signaling of Calcium mobilization and cell death [J]. Immunol Lett, 2008, 116(2): 184-194.
- [6] Jia Rp ZX, clinical significance of CD4⁺ CD25⁺ Treg cells, sFas and sFasL in peripheral blood of patients with autoimmune thrombocytopenic purpura [J]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2011, 19(5): 1264-1267. (下转第 2800 页)

于通过其收缩运动,增加胃窦内压力,将更多食糜送入十二指肠,从而促进胃排空。MI 是检测胃排空的参数之一,本试验设定 MI 的值为胃窦收缩幅度 \times 3 min 内收缩次数,故在收缩次数相似的情况下,收缩幅度决定了其值的大小。本试验中,服用造影剂初期,两组收缩次数相似,但焦虑症患者胃窦收缩幅度小于对照组(图 1、2),故胃窦动力指数低于对照组,提示在进食后的早期,焦虑症患者的胃窦排空能力就低于对照组。在服用造影剂后 5~30 min,两组胃窦收缩幅度、胃窦收缩次数及 MI 均逐渐升高,于 10 min 时达到峰值,之后下降。提示无论是否患有焦虑症,胃肠运动与时间关系的趋势不变,但就每个时间段的值而言,焦虑症组均明显低于对照组,表明焦虑症患者胃窦收缩幅度、胃窦收缩次数及 MI 均为其胃肠动力异常的因素。本试验中,两组在口服造影剂后 20 min GER 显示出明显差别,其原因可能与胃排空能力与神经调节有关。焦虑症患者本身就易出现植物神经功能紊乱,故常伴有胃肠自主神经异常,出现胃肠功能的降低,但其机制尚未完全明了。Lee 等^[12]发现,处于焦虑状态的小鼠对胃肠道扩张的敏感性增加,可能导致功能性消化不良;Carabotti 等^[13]的研究表明,焦虑症患者消化道症状可能与中枢系统对脑-肠轴的双向调节有关。Nan 等^[14]发现脑部糖代谢异常与焦虑症患者的消化不良症状存在密切联系。Chen 等^[15]发现电针刺激小鼠足三里穴位,其胃窦蠕动加强,可能与 SCF/c-kit 信号通路有关。

4 结 论

本试验通过胃肠超声造影,对焦虑症患者的胃肠动力各参数进行了测量,与健康人进行定量对比,为证实焦虑症患者的胃肠动力异常提供了实验室证据。该方法经济、可操作性强,且无创、可重复性高,能较好地协助临床评价患者胃肠动力异常。但本试验由于测定时间有限,对服用造影剂 30 min 后的胃肠动力参数,有待在后续试验中进一步完善。

参考文献

- [1] Ly HG, Weltens N, Tack J, et al. Acute anxiety and anxiety disorders are associated with impaired gastric accommodation in patients with functional dyspepsia [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2015, 13(9): 1584-1591.
- [2] 郭心璋,张武.口服胃肠超声造影的临床应用[J].中华医学超声杂志,2010,3(7):4-8.
- [3] Fruehauf H, Steingoetter A, Fox MR, et al. Characterization of gastric volume responses and liquid emptying in functional dyspepsia and health by MRI or barostat and simultaneous C-acetate breath test[J]. Neurogastroenterol Motil, 2009, 21(7): 697-737.
- [4] Kwiatek MA, Menne D, Steingoetter A, et al. Effect of meal volume and calorie load on postprandial gastric function and emptying: studies under physiological conditions by combined fiber-optic pressure measurement and MRI [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009, 297(5): 894-901.
- [5] Goetze O, Treier R, Fox M, et al. The effect of gastric secretion on gastric physiology and emptying in the fasted and fed state assessed by magnetic resonance imaging[J]. Neurogastroenterol Motil, 2009, 21(7): 725-742.
- [6] Simonian HP, Maurer AH, Knight LC, et al. Simultaneous assessment of gastric accommodation and emptying: studies with liquid and solid meals[J]. J Nucl Med, 2004, 45(7): 1155-1160.
- [7] Dobó I, Szilvási I, Pastuszky I, et al. A simple isotope method for studying of gastric emptying of solid foods [J]. Orv Hetil, 1989, 130(19): 995-997.
- [8] Haruma K, Kusunoki H, Manabe N, et al. Real-time assessment of gastroduodenal motility by ultrasonography [J]. Digestion, 2008, 77(Suppl 1): 48-51.
- [9] Kusunoki H, Haruma K, Manabe N, et al. Therapeutic efficacy of acotiamide in patients with functional dyspepsia based on enhanced postprandial gastric accommodation and emptying: randomized controlled study evaluation by real-time ultrasonography[J]. Neurogastroenterol Motil, 2012, 24(6): 540-545.
- [10] Matsueda K, Hongo M, Tack J, et al. A placebo-controlled trial of acotiamide for meal-related symptoms of functional dyspepsia[J]. Gut, 2012, 61(6): 821-828.
- [11] Huang ZP, Yang XF, Lan LS, et al. Correlation between social factors and anxiety-depression in function dyspepsia: do relationships exist? [J]. Prz Gastroenterol, 2014, 9(6): 348-353.
- [12] Lee KJ. Differences in the sensorimotor response to distension between the proximal and distal stomach in humans[J]. Gut, 2004, 53(7): 938-943.
- [13] Carabotti M, Scirocco A, Maselli MA, et al. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems[J]. Ann Gastroenterol, 2015, 28(2): 203-209.
- [14] Nan J, Liu JX, Mu JY, et al. Brain-based correlations between psychological factors and functional dyspepsia[J]. Neurogastroenterol Motil, 2015, 21(1): 103-110.
- [15] Chen Y, Xu J, Liu S, et al. Electroacupuncture at ST36 increases contraction of the gastric antrum and improves the SCF/c-kit pathway in diabetic rats[J]. Am J Chin Med, 2013, 41(6): 1233-1249.

(收稿日期:2016-01-15 修回日期:2016-03-22)

(上接第 2797 页)

- [7] 肖红,刘仿,伍昌林,等.特发性血小板减少性紫癜患儿外周血 T 细胞亚群及血小板凋亡相关蛋白表达的研究[J].临床血液学杂志,2007,20(5):275-277.
- [8] Zhong YG, Feng WY, Luo HQ, et al. Fas-FasL and caspase-3 signal transduction pathway and apoptosis of peripheral T lymphocytes in ITP patients[J]. Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi, 2008, 29(5): 329-332.

- [9] 高清平,黄望香,李秀珍.慢性特发性血小板减少性紫癜淋巴细胞和血小板凋亡蛋白的表达[J].临床血液学杂志,2001,14(3):104-106.

(收稿日期:2015-12-23 修回日期:2016-03-06)