

# 免疫相关性血细胞减少症患者CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞中CD70表达水平 及其启动子甲基化水平研究

任悦 付蓉 王化泉 李丽娟 刘惠 王一浩 齐薇薇 陶景莲 邵宗鸿

**【摘要】** 目的 研究免疫相关性血细胞减少症(IRP)患者外周血CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞CD70 mRNA和蛋白的表达水平及CD70启动子甲基化水平,探讨CD70在IRP发病中的作用。方法 选取35例IRP患者(初治组16例,恢复组19例)及15名正常对照,应用密度梯度离心法分离其外周血单个核细胞,免疫磁珠分选CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞,应用实时定量PCR(RT-PCR)检测CD70 mRNA相对表达水平,采用流式细胞术检测CD4<sup>+</sup>CD70<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>细胞比例,采用甲基化特异性PCR(MSP)法检测CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞CD70基因启动子区域甲基化水平。结果 IRP患者外周血CD4<sup>+</sup>CD70<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>细胞比例初治组[(7.46±1.51)%]高于恢复组[(5.95±1.34)%]和正常对照组[(1.83±0.60)%],恢复组高于正常对照组( $P$ 值均<0.05);IRP初治组、恢复组及正常对照组CD70 mRNA的表达水平分别为2.314(0.200~6.084)、1.021(0.135~3.434)及0.353(0.008~2.258),两两比较差异均有统计学意义( $P$ <0.05)。IRP患者CD70启动子甲基化水平低于正常对照组( $P$ <0.05)。IRP患者CD70表达率与CD5<sup>+</sup>B淋巴细胞比例呈正相关( $r=0.533, P<0.01$ )。结论 CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞CD70启动子区域低甲基化水平导致CD70的过表达可引起免疫紊乱,可能在IRP的发病中发挥重要作用。

**【关键词】** 全血细胞减少; CD4阳性T淋巴细胞; 抗原,CD70; DNA甲基化

**Hypomethylation and overexpression of CD70 in CD4<sup>+</sup> T cells of the patients with immuno-related pancytopenia** Ren Yue, Fu Rong, Wang Huaquan, Li Lijuan, Liu Hui, Wang Yihao, Qi Weiwei, Tao Jinglian, Shao Zonghong. Department of Hematology, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

Corresponding author: Shao Zonghong, Email: shaozonghong@sina.com

**【Abstract】 Objective** To study the expression of CD70 and the methylation level of CD70 promoter in immuno-related pancytopenia (IRP) patients, and explore the role of CD70 in the pathogenesis of IRP. **Methods** Thirty-five IRP patients and fifteen healthy donors were enrolled in this study. Peripheral blood mononuclear cells were isolated from venous blood by density gradient centrifugation, and CD4<sup>+</sup>T cells were isolated by immunomagnetic beads. The mRNA level and the percentage of CD70 on CD4<sup>+</sup>T cells were measured by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) and flow cytometry respectively. Methylation-Specific PCR (MSP) was performed to determine the methylation level of CD70 promoter. **Results** The percentage of CD70 expression on CD4<sup>+</sup>T cells of untreated IRP patients [(7.46±1.51)%] was significantly higher than that of recovered ones [(5.95±1.34)%] and normal controls [(1.83±0.60)%], and that of recovered IRP patients was significantly higher than of normal controls ( $P$ <0.05). The relative expressions of CD70 mRNA in CD4<sup>+</sup>T cells were 2.314 (0.200–6.084), 1.021 (0.135–3.434), 0.353 (0.008–2.258) in three groups respectively. The differences among untreated IRP patients, recovered IRP patients and normal controls were significant ( $P$ <0.05). The CD70 promoter methylation level in CD4<sup>+</sup>T cells of all IRP patients was significantly lower than that of normal controls

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.08.008

基金项目:国家自然科学基金(81170472、81370607);天津市自然科学基金重点项目(12JCZDJC21500);天津市抗癌重大专项攻关计划(12ZCDZSY17900、12ZCDZSY18000);天津市卫生行业重点攻关项目(11KG135);卫生公益性行业科研专项(201202017)

作者单位:300052 天津医科大学总医院血液科

通信作者:邵宗鸿,Email:shaozonghong@sina.com

( $P < 0.05$ ). The expression of CD70 positively correlated to the ratio of CD5<sup>+</sup> B cells ( $r = 0.533$ ,  $P < 0.01$ ).

**Conclusions** The overexpression of CD70 may lead to immunologic disarrangement of patients, which may play important role in the pathogenesis of IRP.

**【Key words】** Pancytopenia; CD4-positive T-lymphocytes; Antigens, CD70; DNA methylation

免疫相关性血细胞减少症 (immuno-related pancytopenia, IRP) 是由于某种原因导致机体产生抗骨髓造血细胞的自身抗体从而抑制和(或)破坏骨髓造血细胞引起外周血细胞减少的一种自身免疫性血细胞减少性疾病<sup>[1-2]</sup>。DNA 甲基化是一种重要的基因表达调控方式,在免疫紊乱、肿瘤发病中起重要作用<sup>[3]</sup>。CD70 是 B 淋巴细胞的一种协同刺激因子,在与其受体 CD27 结合后可活化 B 淋巴细胞并刺激自身抗体产生<sup>[4]</sup>。目前,多项研究证实在系统性红斑狼疮(SLE)、类风湿性关节炎(RF)、系统性硬皮病(SSC)等多种自身免疫性疾病 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞中,CD70 表达显著增高且与 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞的低甲基化有关。本研究中,我们对 IRP 患者 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞中 CD70 的表达及其启动子甲基化水平进行研究,探讨 CD70 在 IRP 中的作用,进一步探索 IRP 的发病机制。

### 病例和方法

1. 病例:2012 年 12 月至 2013 年 12 月我科明确诊断的 IRP 患者共 35 例,诊断标准参照文献<sup>[1-2]</sup>。其中初治组 16 例,男 7 例、女 9 例,中位年龄 30(11~54)岁。恢复(经免疫抑制及造血治疗)后血常规恢复正常组 19 例,男 8 例,女 11 例,中位年龄 29(8~67)岁。正常对照组为 15 名健康志愿者,其中男 7 名,女 8 名,中位年龄 40(20~76)岁。患者及对照者进入本研究均签署知情同意书。

2. 主要试剂与仪器:CD4 免疫磁珠购自德国 Miltenyi Biotec 公司;CD4-异硫氰酸荧光素(FITC)、CD70-藻红蛋白(PE)、CD5-FITC 和 CD19-PE 抗体均购自美国 BD 公司;M-MLV 逆转录试剂盒和 SYBR Taq 酶购自美国 Invitrogen 公司;DNA 提取试剂盒为天根生化科技(北京)有限公司产品;DNA 甲基化试剂盒为荷兰 Qiagen 公司产品;FACS Calibur 型流式细胞仪为美国 Becton Dickinson 公司产品;iQ5 型实时荧光定量 PCR 仪为美国 Bio-Rad 公司产品;Nano DropND-1000 型分光光度计为美国 Gene 公司产品;紫外透射仪为南通其林贝尔仪器制造有限公司产品。

3. 外周血 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞分选:乙二胺四乙酸

(EDTA)抗凝管取 IRP 患者及对照者外周血 20 ml,应用密度梯度离心法分离外周血单个核细胞,加入 5 倍以上体积的 PBS,1 500 r/min 离心(离心半径 15 cm)10 min,洗涤细胞 2 次。计数细胞,约每  $1 \times 10^7$  个细胞中加 20  $\mu$ l CD4 磁珠抗体,4  $^{\circ}$ C 孵育 20 min,洗涤 2 次,磁性条件下过柱,脱离磁场洗脱并收集细胞。经流式细胞术(FCM)验证分选细胞纯度均 > 90%。

4. RT-PCR 检测 CD70 mRNA 的表达水平:采用 TRIzol 一步法提取 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞总 RNA,分光光度法检测 RNA 浓度。取 2  $\mu$ g RNA 加入 Oligo(dT)<sup>18</sup> 1  $\mu$ g、焦碳酸二乙酯水补充至 12  $\mu$ l,70  $^{\circ}$ C 水浴 5 min,-20  $^{\circ}$ C 静置 30 s,依次加入 5 $\times$ RT 缓冲液 4  $\mu$ l、RNA 酶抑制剂 20 U、脱氧核糖核苷三磷酸 2  $\mu$ l,37  $^{\circ}$ C 水浴 5 min,加入 M-MLV 逆转录酶 200 U,42  $^{\circ}$ C 水浴 1 h,70  $^{\circ}$ C 水浴 10 min 逆转录为 cDNA,以 cDNA 为模板扩增。引物序列:CD70 上游引物:5'-TGCTTTGGTCCCATTGGTCG-3',下游引物:5'-TCCTGCTGAGGTCCTGTGTGATTG-3';内参  $\beta$ -actin 上游引物:5'-GCACCACACCTTCTACAATGAGC-3',下游引物:5'-GGATAGCACAGCCTGGATAGCAAC-3'。引物均由上海生工生物工程股份有限公司合成。PCR 体系 20  $\mu$ l,反应条件:95  $^{\circ}$ C 15 min,95  $^{\circ}$ C 15 s,60  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 30 s,共 50 个循环。反应结束后做熔解曲线。荧光定量 PCR 结果以每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数 Ct 值表示,基因相对表达量以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示。每份样本均设 3 个复孔,实验重复 3 次。

5. FCM 检测 CD4<sup>+</sup>CD70<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>细胞比例:取 EDTA 抗凝新鲜外周血 50  $\mu$ l,试验管加入 CD70-PE、CD4-FITC 单抗各 10  $\mu$ l。对照管加入 CD4-FITC、IgG1-APC 同型对照各 10  $\mu$ l。4  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,红细胞裂解液溶血后上流式细胞仪检测 CD4<sup>+</sup>CD70<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>细胞比例。每组设 3 个复管,实验重复 3 次。

6. FCM 检测骨髓 CD5<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>细胞比例:取新鲜肝素抗凝骨髓液 100  $\mu$ l,检测管中加入鼠抗人 CD5-FITC、CD19-PE 单抗 20  $\mu$ l,室温避光孵育 15~30 min;加入 2 ml 红细胞裂解液,混匀后室温避

光 10 min;PBS 液洗涤两遍,加入多聚甲醛 4 ℃ 固定 30 min。对照管加入鼠抗人 IgG1-FITC/IgG1-PE 单抗各 20 μl,方法同前。采用 FCM 检测骨髓 CD5<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> 细胞比例。每组设 3 个复管,实验重复 3 次。

7. 甲基化特异性 PCR(MSP)检测 CD70 启动子甲基化水平:CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞的 DNA 提取用 DNA 提取试剂盒,按产品说明书操作,分光光度法测定 DNA 纯度及含量。采用 DNA 甲基化试剂盒进行重亚硫酸盐修饰并纯化。根据 CD70 启动子研究热门位点位置设计引物。引物序列:CD70 甲基化正义链:5'-CGTGCGTATGTTATTTTTAGTTATTT-3';CD70 甲基化反义链:5'-TAAAAATACTCCCCAAATATTCGTA-3';CD70 非甲基化正义链:5'-CGCGTATGTTACTCCCAGCTACTC-3';CD70 非甲基化反义链:5'-TAAAAATACTCCCCAAATATTCATA-3'。产物长度均为 176 bp。引物均由上海生工生物工程股份有限公司合成。反应条件:94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 30 s,57 ℃ 40 s,72 ℃ 30 s,共 40 个循环,72 ℃ 延伸 10 min。凝胶电泳分离产物,紫外透射仪下观察结果。

8. 统计学处理:应用 SPSS 17.0 统计软件分析。计数资料比较采用 χ<sup>2</sup> 检验;正态分布计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,偏态分布变量以中位数(第一四分位数~第三四分位数)表示,组间比较采用成组设计方差分析,如方差不齐采用多组间 Kruskal-Wallis H 法进行分析。采用 Spearman 法进行相关性分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

1. CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞 CD70 表达水平比较:初治组、恢复组、正常对照组 3 组 CD70 mRNA 的相对表达水平分别为 2.314(0.200~6.084)、1.021(0.135~3.434)、0.353(0.008~2.258),组间两两比较差异均

有统计学意义( $P$  值均  $< 0.05$ )。CD4<sup>+</sup>CD70<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> 的细胞比例分别为  $(7.46 \pm 1.51)\%$ 、 $(5.95 \pm 1.34)\%$ 、 $(1.83 \pm 0.60)\%$ ,组间两两比较差异均有统计学意义( $P$  值均  $< 0.05$ )(图 1)。

2. CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞中 CD70 启动子甲基化水平的比较:结果见表 1。初治组、恢复组及正常对照组间两两比较 CD70 启动子甲基化水平无显著差异,但初治组甲基化水平有低于恢复组及对照组的趋势。与正常对照组比较,IRP 患者 CD70 启动子甲基化水平明显降低( $P < 0.05$ )。

表 1 免疫相关性血细胞减少症(IRP)患者 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞中 CD70 启动子甲基化水平

组别	例数	甲基化例数	非甲基化例数	甲基化水平(%)
正常对照组	15	10	5	66.67
IRP 初治组	16	3	13	18.75
IRP 恢复组	19	6	13	31.58

3. 相关性分析:IRP 患者外周血 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞上 CD70 的表达率与骨髓 CD5<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> 细胞比例呈正相关( $r=0.533, P < 0.001$ )(图 2)。

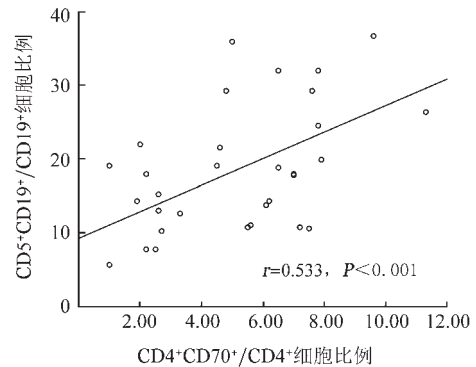


图 2 免疫相关性血细胞减少症患者外周血 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞上 CD70 的表达与 CD5<sup>+</sup> B 淋巴细胞比例的相关性

### 讨 论

IRP 是一类从其他骨髓衰竭性疾病中分离出来

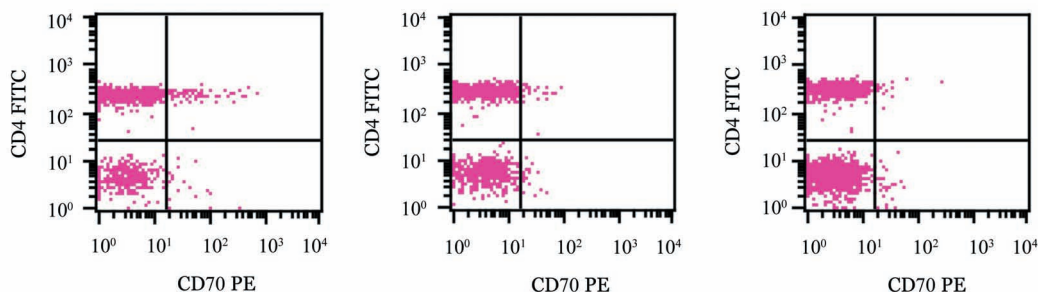


图 1 流式细胞术检测 CD70 在免疫相关性血细胞减少症(IRP)患者 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞中的表达

的自身免疫性血细胞减少症,目前研究认为是T淋巴细胞调控失衡、Th2细胞功能亢进导致B淋巴细胞数量、亚群、功能异常,进而产生骨髓造血细胞的自身抗体并抑制和(或)破坏骨髓造血,最终导致外周血细胞减少<sup>[5-6]</sup>。本课题组前期研究证实自身抗体所针对的靶抗原多为正常的细胞膜成分<sup>[7]</sup>,故推想其免疫遗传背景可能在IRP的发病中发挥重要作用。

CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞是一群异质性细胞,对细胞免疫及体液免疫均有调节作用。很多学者在对SLE、SSC等多种自身免疫性疾病进行研究后发现一些免疫相关性基因,如CD70,在自身免疫性疾病患者的CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞中表现为低甲基化及过度表达并导致自身异常免疫的发生、发展<sup>[8-9]</sup>。CD70是肿瘤坏死因子超家族中的一员,是B淋巴细胞的一种协同刺激因子,主要表达于活化的T、B淋巴细胞及成熟的树突细胞,通过选择性转录CD70主要激活淋巴细胞和树突细胞。CD70与其B细胞上的受体CD27的结合对B淋巴细胞的激活、分化、自身抗体的产生、记忆B细胞的产生都非常重要<sup>[4]</sup>。Brugnoni等<sup>[10]</sup>发现在慢性免疫活化情况下,CD70分子表达于大多数活化的T淋巴细胞膜表面,提示CD70可能在免疫异常导致的疾病中起重要作用。米向斌等<sup>[11]</sup>通过试验证实无论是蛋白水平还是转录水平,活动期、非活动期SLE患者外周血CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞的CD70表达均明显增加,且CD4<sup>+</sup>CD70<sup>+</sup> T淋巴细胞阳性率与SLE疾病活动密切相关,证明CD70在SLE的发病过程中起关键作用。

本研究结果显示在IRP初治组CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞中CD70 mRNA相对表达水平及CD4<sup>+</sup>CD70<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>细胞比例均高于恢复组及正常对照组,恢复组亦高于正常对照组。正常对照组CD70启动子的甲基化水平分别高于IRP初治组及恢复组,但差异无统计学意义,可能与样本量不足有关。与所有IRP患者比较,正常对照组CD70启动子甲基化水平明显增高,差异有统计学意义。本课题组前期研究显示,IRP患者恢复组CD5<sup>+</sup> B淋巴细胞比例较初治组显著降低,且恢复组胞质内抗凋亡蛋白Bcl-2的表达显著低于初治组<sup>[5]</sup>,提示IRP患者自身抗体的产生可能与B淋巴细胞及其亚群数量异常、凋亡受抑有关。同时,CD4<sup>+</sup>CD70<sup>+</sup> T淋巴细胞阳性率常与自身免疫性疾病活动密切相关,那么CD5<sup>+</sup> B淋巴细胞

比例与CD4<sup>+</sup>CD70<sup>+</sup> T淋巴细胞阳性率二者间在IRP患者中是否存在某些关系呢?经相关性分析我们发现CD4<sup>+</sup>CD70<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>的细胞比例与CD5<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>的细胞比例呈正相关。以上结果说明IRP患者CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞CD70启动子区域低甲基化水平导致CD70明显过表达,CD70过表达与B淋巴细胞的活化状态呈正相关,即CD70的表达随着治疗好转有下降趋势,提示CD70可能在IRP的发病过程中起重要作用。IRP患者中CD70的过表达是否与抗体产生有关,是否直接参与了IRP的发病有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] 邵宗鸿,付蓉. 免疫相关性血细胞减少症——一种新认知的疾病(上)[J]. 中国医刊, 2005, 40: 5-8.
- [2] 邵宗鸿,付蓉. 免疫相关性血细胞减少症——一种新认知的疾病(下)[J]. 中国医刊, 2005, 41: 6-9.
- [3] Richardson BC. Role of DNA methylation in the regulation of cell function: autoimmunity, aging and cancer[J]. J Nutr, 2002, 132(8 Suppl):2401S-2405S.
- [4] Kuka M, Munitic I, Giardino Torchia ML, et al. CD70 is down-regulated by interaction with CD27[J]. J Immunol, 2013, 191(5):2282-2289.
- [5] 付蓉,邵宗鸿,何虹,等. 免疫相关性全血减少症患者骨髓B淋巴细胞数量及凋亡相关蛋白水平[J]. 中华血液学杂志, 2002, 23(5): 236-238.
- [6] 付蓉,邵宗鸿,刘鸿,等. 与免疫相关的血细胞减少患者骨髓造血祖细胞增殖功能及T辅助淋巴细胞功能观察[J]. 中华血液学杂志, 2004, 25(4):213-216.
- [7] 付蓉,刘惠,邵宗鸿,等. 骨髓单个核细胞Coombs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.
- [8] Lu Q, Wu A, Richardson BC. Demethylation of the same promoter sequence increases CD70 expression in lupus T cells and T cells treated with lupus-inducing drugs[J]. J Immunol, 2005, 174(10): 6212-6219.
- [9] Yin H, Zhao M, Wu X, et al. Hypomethylation and overexpression of CD70 (TNFSF7) in CD4<sup>+</sup> T cells of patients with primary Sjögren's syndrome[J]. J Dermatol Sci, 2010, 59(3):198-203.
- [10] Brugnoni D, Airò P, Marino R, et al. CD70 expression on T-cell subpopulations: study of normal individuals and patients with chronic immune activation[J]. Immunol Lett, 1997, 55(2): 99-104.
- [11] 米向斌,邱贤文,谭国珍. CD70在SLE患者外周血T淋巴细胞中表达的研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2008, 41(11):739-741.

(收稿日期:2015-04-11)

(本文编辑:刘爽)