

血小板输注无效患者T、B淋巴细胞抗原和血小板抗体表达的研究

杜春红 黄海涛 苑广洋 赵国生 李红学 张元 孙亚军 徐慧民 董守智

【摘要】 目的 探讨T、B淋巴细胞,血小板膜糖蛋白和血小板抗体在血小板输注无效中作用。方法 选择41例临床确诊血小板输注无效患者为研究对象,以27例血小板输注有效患者为对照组,采用流式细胞术检测两组患者外周血细胞毒性T淋巴细胞(CD3⁺CD4⁻CD8⁺)、辅助性T淋巴细胞(CD3⁺CD4⁺CD8⁻)、B淋巴细胞(CD19⁺)比例和血小板膜糖蛋白CD41a、CD61的表达,采用固相凝集法检测两组患者血清中的血小板抗体。结果 与对照组比较,血小板输注无效组患者:①辅助性T细胞比例明显下降(36.60%对48.53%),细胞毒性T细胞比例显著增高(53.26%对44.02%),二者比值下降(0.85对1.31),差异均有统计学意义(P 值均 <0.05);②B淋巴细胞比例差异无统计学意义(3.02%对2.85%, $P=0.901$);③CD41a阳性细胞率[(88.10±12.75)%对(51.69±24.45)%, $P=0.001$]和CD61阳性细胞率[(88.36±12.31)%对(51.83±24.48)%, $P<0.001$]均显著升高;④血小板抗体阳性率显著增高(85.37%对14.82%, $P<0.05$)。结论 细胞毒性T淋巴细胞的激活、辅助性T细胞的抑制、血小板膜糖蛋白CD41a和CD61的表达以及血小板抗体的产生均在血小板输注无效的发生过程中发挥重要作用。

【关键词】 血小板输注; B淋巴细胞亚群; 血小板膜糖蛋白类; 血小板抗体

基金项目:天津医科大学青年研究科学基金(2012KYQ)

Study on the expression of T, B lymphocyte antigen and platelet antibodies in patients with platelet transfusion refractoriness Du Chunhong, Huang Haitao, Yuan Guangyang, Zhao Guosheng, Li Hongxue, Zhang Yuan, Sun Yajun, Xu Huimin, Dong Shouzhi. The General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

Corresponding author: Du Chunhong, Email: 15822661978@163.com

【Abstract】 Objective To explore whether T lymphocytes subgroup, B lymphocytes, platelet antigen CD41a, CD61 or platelet antibodies are involved in the platelet transfusion refractoriness. **Methods** Forty-seven patients diagnosed as platelet transfusion refractoriness and 32 patients that achieved effective platelet therapy were enrolled in this study. Flow cytometry was performed to detect the proportion of cytotoxic T cell (CD3⁺CD4⁻CD8⁺), helper T cell (CD3⁺CD4⁺CD8⁻) and B lymphocytes (CD19⁺), and the expression of platelet glycoproteins, including CD41a and CD61, while platelet antibodies were also measured by solid-phase agglutination. **Results** The significant lower level of helper T cell (36.60% vs 48.53%), higher level of cytotoxic T cell (53.26% vs 44.02%) and lower cytotoxic/helper T cell ratio (0.85 vs 1.31) were observed in platelet refractoriness group when compared with effective platelet therapy group ($P<0.05$). However, the significant difference was not observed in B lymphocytes between the two group (3.02% vs 2.85%, $P>0.05$). Platelet glycoproteins CD41a and CD61 and antibodies were both expressed at high levels in platelet refractoriness group (88.10% vs 51.69%, 88.36% vs 51.83%, 85.37% vs 14.82%, respectively, $P<0.05$). **Conclusions** Activation of cytotoxic T cells, suppression of helper T cells, higher expression level of platelet glycoproteins CD41a and CD61 as well as the development of anti-platelet antibodies are involved in the immunologic mechanism of platelet refractoriness.

【Key words】 Platelet transfusion; B-lymphocyte subsets; Platelet membrane glycoproteins; Antibodies, anti-platelet

Fund program: Tianjin medical university youth science fund project(2012KYQ)

血小板输注无效 (platelet transfusion refractoriness, PTR)指患者接受充足治疗剂量的血小板输注后处于血小板不应性状态,即患者外周血小板未见有效提高、临床出血表现未见明显改善,是临床常见病之一,也是困扰国内外临床治疗的一大难题^[1]。PTR的原因分为非免疫因素和免疫因素两类。非免疫性因素包括发热、血流感染、脾大、DIC等;免疫性因素,即同种异体免疫被认为是PTR的主要原因,其发生机制与血小板膜上血小板相关抗原即人类白细胞抗原(HLA)和血小板同种抗原(human platelet alloantigens, HPA)有关^[2-3]。关于PTR的发病原因虽有不少论点,但其确切的作用机制至今未见系统报道。外源性血小板在PTR患者体内是通过细胞免疫还是体液免疫应答效应被破坏目前尚不清楚,我们通过本研究旨在探讨T、B淋巴细胞和血小板膜糖蛋白、血小板抗体在PTR中的作用。

病例与方法

1. 病例:以2012年12月至2015年1月我院收治的41例PTR患者为研究对象,包括急性髓系白血病(AML)14例,骨髓增生异常综合征(MDS)7例,再生障碍性贫血(AA)7例,多发性骨髓瘤(MM)4例,淋巴瘤5例,骨髓纤维化2例,Evans综合征2例。PTR组41例,男20例,女21例,中位年龄33(14~68)岁。以27例血小板输注有效患者为对照组,包括AML 15例,MDS 4例,AA 2例,急性淋巴细胞白血病2例,MM 1例,Evans综合征1例,阵发性睡眠性血红蛋白尿症1例,化疗相关性血小板减少(肺癌术后)1例。对照组27例,男,12例,女15例,中位年龄32(12~67)岁。PTR患者的诊断依据PTR判断标准即PLT增加指数(CCI)进行判断,若1 h CCI<7 500/μl 或者24 h CCI<4 500/μl,连续2次则定义为PTR。CCI按下列公式进行计算:

$$CCI = \frac{(PLT_{\text{输注后}} - PLT_{\text{输注前}}) \times \text{体表面积} (m^2)}{\text{输入的血小板数} (\times 10^{11})}$$

排除脾肿大伴脾功能亢进、感染、药物(阿司匹林、肝素、两性霉素等)作用和DIC等相关非免疫因素,患者输注的血小板为当日采集或采集后在天津市血液中心已保存1 d[(22±2)℃振荡保存]。本项目通过天津医科大学伦理委员会审批。

PTR组患者输血量均数为5.775(95% CI 4.430~7.120) U,平均输血次数为3.05次;对照组患者输血量均数为5.833(95% CI 4.644~7.022) U,平均输血

次数为3.13次,两组患者输血量 and 输血次数差异无统计学意义(P 值均>0.05),具有可比性。

2. 标本采集与数据收集:对PTR组和对照组患者分别采集外周静脉血5 ml×2支,一支以EDTA抗凝:混匀后每支取出2 ml全血留作流式细胞术检测,其余行4 000 r/min(离心半径为16.3 cm)离心5 min,取上层血浆-80℃保存,备血小板抗体检测;另一支以ACD抗凝,用于检测血小板膜糖蛋白,从血液采集到标本处理不超过6 h。同时收集患者年龄、性别、输血次数(输血量)等数据。

3. 流式细胞术检测外周血T、B淋巴细胞比例和血小板膜糖蛋白CD41a和CD61的表达:EDTA抗凝全血混匀后取50 μl加入流式细胞检测管,分别加入10 μl三标记的单克隆抗体(CD3-PerCP/CD4-FITC/CD8-PE)、CD19-PerCP-Cy5.5、CD41a-APC、CD61-PE(以上抗体均为美国eBioscience公司产品),充分混匀后室温避光孵育30 min,加入红细胞裂解液100 μl,1 200 r/min(离心半径为12.8 cm)离心5 min,弃上清,生理盐水洗涤1次后采用500 μl PBS悬浮细胞上流式细胞仪检测。CD3⁺CD4⁺CD8⁻细胞判定为辅助性T淋巴细胞(Th细胞),CD3⁺CD4⁻CD8⁺细胞判定为细胞毒性T淋巴细胞(Tc细胞),CD19⁺细胞判定为B淋巴细胞,并检测血小板膜糖蛋白CD41a和CD61表达情况。

4. 血小板抗体检测:采用固相凝集法按照血小板抗体检测试剂盒(长春博德生物技术有限责任公司产品)说明书进行操作,加入抗人IgG及人IgG致敏红细胞(指示细胞)。阳性反应为指示细胞平铺在反应孔底部表面,而阴性反应为指示细胞在离心力的作用下聚集于反应孔底部中央。

5. 统计学处理:应用SPSS17.0软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间计量资料比较采用 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验,所有数据均进行方差齐性分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 流式细胞术检测T淋巴细胞亚群比例:与对照组比较,PTR组Th细胞比例下降($P=0.011$)、Tc细胞比例增高($P=0.040$)、Th/Tc比值下降($P=0.039$),差异均有统计学意义(图1、表1)。

2. 流式细胞术检测B淋巴细胞比例和血小板膜糖蛋白CD41a、CD61的表达:PTR组患者B淋巴细胞比例与对照组比较差异无统计学意义($P=0.901$)。PTR组患者血小板膜糖蛋白CD41a、CD61

的表达与对照组比较均显著升高,差异有统计学意义(P 值分别为0.001和 <0.001)(图1、表1)。

3. 固相凝集法检测血小板抗体表达:PTR组41例患者中有35例血小板抗体阳性表达,阳性率为85.37%;对照组27例患者中有4例阳性表达,阳性率为14.82%,差异有统计学意义($P<0.001$)。

PTR组和对照组患者输注血小板24 h后的PLT中位数分别为 $18.5 \times 10^9/L$ 和 $39.0 \times 10^9/L$ 。

讨 论

血小板输注被广泛应用于血小板减少或血小板功能缺陷患者的预防和治疗,为血液病患者支持治疗的重要手段^[1]。随着血小板输注量及输注频率的增加,PTR成为血小板输注的主要并发症,不仅导致急需输注血小板患者出血症状无法缓解,大出血概率增加,生存率降低,而且造成患者住院时间延长、费用增加,同时在一定程度上造成了血液资源的浪费^[2]。PTR产生的原因分为免疫因素和非免疫因素。免疫因素,即同种异体免疫是造成PTR的一个主要原因,而血小板表面HLA抗原和HPA抗原在PTR的免疫机制中起主要作用^[1,3]。外源性血

小板,作为同种异体抗原可诱导受血者机体产生同种异体免疫反应继而导致PTR^[2],然而其诱导机体产生同种异体免疫反应的机制目前尚不清楚。机体的免疫功能分为细胞免疫和体液免疫,通过监测输注血小板后机体T淋巴细胞亚群和B淋巴细胞可以评估患者机体免疫状态^[4],有助于探讨PTR的免疫机制。

在本研究中我们以血液病患者为研究对象,排除非免疫性因素干扰,采用流式细胞术检测PTR组和对照组患者Th细胞、Tc细胞和B淋巴细胞比例。结果显示PTR组患者较对照组Tc细胞比例增高,而Th细胞比例减低,提示Tc细胞在外源性血小板诱导同种异体免疫反应的免疫机制中发挥作用,与其在多种器官移植排斥反应的发生机制中发挥重要作用相类似^[5-8]。此外,CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞的平衡在细胞免疫中占有重要地位^[4]。我们的研究结果显示PTR组患者较对照组CD4⁺/CD8⁺T细胞比值(即Th/Tc比值)降低,提示PTR患者机体细胞免疫功能紊乱更为严重。上述结果均提示细胞免疫在PTR的免疫机制中发挥重要作用。在本研究中我们未检测到B淋巴细胞比例在PTR组和对照组患

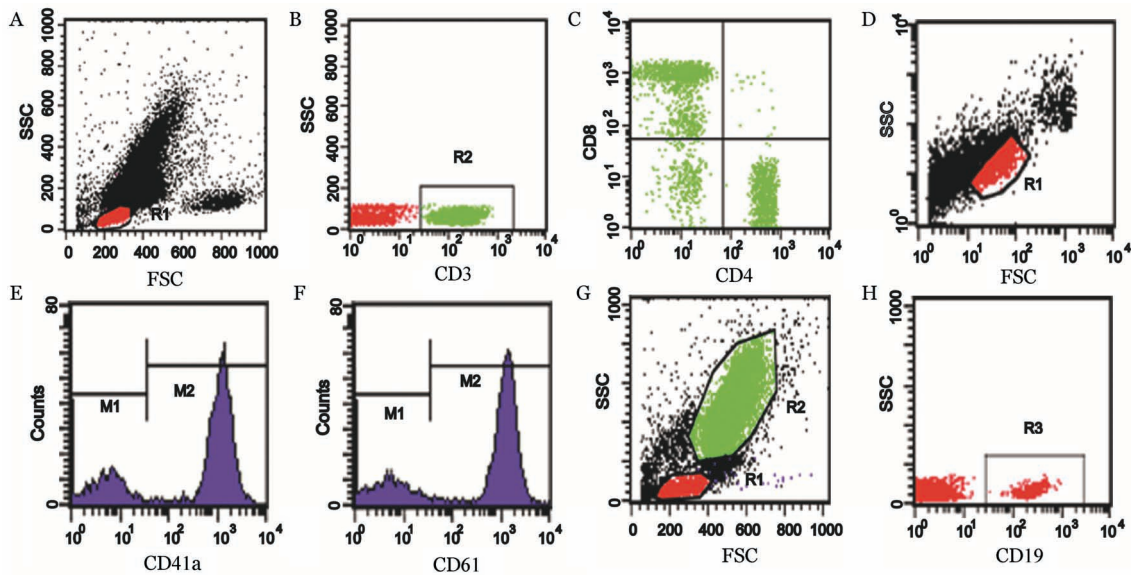


图1 流式细胞术检测T淋巴细胞亚群(A-C)、血小板膜糖蛋白(D-F)及B淋巴细胞抗原(G,H)

表1 流式细胞术检测接受血小板输注治疗患者的T、B淋巴细胞比例和血小板膜糖蛋白的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Th细胞比例 (%)	Tc细胞比例 (%)	Th/Tc 比值	B淋巴细胞比例 (%)	CD41a阳性细胞率 (%)	CD61 阳性细胞率 (%)
有效组	27	48.53 ± 15.27	44.02 ± 13.22	1.31 ± 0.76	2.85 ± 3.68	51.69 ± 24.45	51.83 ± 24.48
无效组	41	36.60 ± 15.01	53.26 ± 16.88	0.85 ± 0.64	3.02 ± 5.26	88.10 ± 12.75	88.36 ± 12.31
P 值		0.011	0.040	0.039	0.901	0.001	<0.001

注:Th细胞:辅助性T淋巴细胞; Tc细胞:细胞毒性T淋巴细胞

者间的差异有统计学意义,可能是由于本研究选取的研究对象为血液病患者,此类患者输注血小板颇为频繁,大部分患者机体已存在血小板抗体(如结果中血小板抗体部分所述),当外源性血小板再次进入机体,机体中已存在的血小板抗体直接破坏外源性血小板,导致PTR,因此未检测到B淋巴细胞比例的显著增高,进一步加大样本量,并同时分析初次血小板输注患者或血小板抗体阴性PTR受血者,能够更好地了解B淋巴细胞在PTR免疫机制中发挥的作用。

血小板表面GP II b/III a复合物参与血小板活化过程,在血小板止血功能及血栓的形成中发挥重要作用,血小板膜糖蛋白CD41a(GP II b)和CD61(GP III a)共同形成GP II b/III a复合物^[9-10],然而这两种分子是否参与PTR的免疫机制尚不知晓。本研究中我们初步分析了PTR组和对照组患者血小板膜糖蛋白CD41a和CD61的表达情况,结果显示PTR组两种分子的表达均显著性增高,因此PTR的免疫机制可能涉及CD41a和CD61的过表达。考虑到CD41a和CD61的检出率可能与PLT有关,我们进一步收集PTR组和对照组患者输注血小板24 h后的PLT(中位数分别为 $18.5 \times 10^9/L$ 和 $39.0 \times 10^9/L$),由于所有患者的PLT均低于 $50 \times 10^9/L$,因此本研究中CD41a和CD61结果的可靠性受到质疑,有待在以后的研究中进一步探讨其在PTR免疫机制中的作用。此外,对PTR组和对照组患者血小板输注前及输注后血小板膜糖蛋白CD41a和CD61同时进行对比分析将更有助于探讨CD41a和CD61参与PTR免疫反应的具体机制,进一步弥补本研究中此方面的不足。

血小板表面表达多种抗原,其中血小板HLA和HPA抗原供受者不相合是诱导受者产生血小板抗体的主要因素。在本研究中我们对PTR组和对照组患者血小板抗体进行了分析,发现PTR组患者血小板抗体阳性率(85.37%)显著高于对照组(14.82%),提示血小板抗体在外源性血小板诱导的同种异体免疫机制中也发挥重要作用,与既往研究报道相符^[2,9,11-12]。

在本研究中由于样本量小,我们未能对患者在接受PTR前后血液中的T淋巴细胞亚群、B淋巴细胞、血小板膜糖蛋白和血小板抗体的差异以及出现PTR时的血小板输注次数等进行分析,上述资料对于探讨PTR的免疫机制具有重要意义,有待在以后的研究中进一步完善。此外,本研究中PTR患者仅

为血液病患者,且样本量较小,因此扩大样本量并对更多病种的PTR患者进行研究也具有重要意义。

综上,我们的研究结果显示Tc细胞的激活、Th细胞的抑制、血小板膜糖蛋白CD41a和CD61的过表达以及血小板抗体的产生均在PTR的免疫机制中发挥重要作用,具体作用机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] Holbro A, Infanti L, Sigle J, et al. Platelet transfusion: basic aspects[J]. Swiss Med Wkly, 2013, 143: w13885. doi: 10.4414/smww.2013.13885.
- [2] Pavenski K, Freedman J, Semple JW. HLA alloimmunization against platelet transfusions: pathophysiology, significance, prevention and management[J]. Tissue Antigens, 2012, 79(4): 237-245. doi: 10.1111/j.1399-0039.2012.01852.x.
- [3] 夏文杰, 叶欣, 邓晶, 等. 血小板输注无效患者血小板同种抗体及血小板特异性糖蛋白抗体表达的研究[J]. 中华血液学杂志, 2010, 31(9): 594-598. doi: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2010.09.005.
- [4] 王光乾, 姜彩红. 去白细胞输血对患者免疫功能的影响[J]. 中国医学创新, 2015, 12(11): 104-106. doi: 10.3969/j.issn.1674-4985.2015.11.036.
- [5] Mizrahi M, Cal P, Rosenthal M, et al. Human $\alpha 1$ -antitrypsin modifies B-lymphocyte responses during allograft transplantation[J]. Immunology, 2013, 140(3): 362-373. doi: 10.1111/imm.12149.
- [6] Patel SR, Zimring JC. Transfusion-induced bone marrow transplant rejection due to minor histocompatibility antigens[J]. Transfus Med Rev, 2013, 27(4): 241-248. doi: 10.1016/j.tmr.2013.08.002.
- [7] von Rossum A, Enns W, Shi YP, et al. Bim regulates alloimmune-mediated vascular injury through effects on T-cell activation and death[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014, 34(6): 1290-1297. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.303649.
- [8] Dobi D, Bodó Z, Kemény É, et al. Morphologic Features and Clinical Impact of Arteritis Concurrent with Transplant Glomerulopathy[J]. Pathol Oncol Res, 2016, 22(1): 15-25. doi: 10.1007/s12253-015-9962-3.
- [9] Hayashi T, Hirayama F. Advances in alloimmune thrombocytopenia: perspectives on current concepts of human platelet antigens, antibody detection strategies, and genotyping[J]. Blood Transfus, 2015, 13(3): 464-471. doi: 10.2450/2015.0275-14.
- [10] 何娟, 闫荣, 戴克胜, 等. 血小板活化的分子标志物的探讨及在疾病中意义[J]. 血栓与止血学, 2014, 20(4): 207-208.
- [11] Brouk H, Bertrand G, Zitouni S, et al. HPA antibodies in Algerian multitransfused patients: Prevalence and involvement in platelet refractoriness[J]. Transfus Apher Sci, 2015, 52(3): 295-299. doi: 10.1016/j.transci.2014.12.028.
- [12] 叶海辉, 李智山, 钟万芬, 等. 血小板抗体检测在本地区血小板输注无效患者诊断中的应用[J]. 中国实验诊断学, 2015, 19(2): 298-300.

(收稿日期:2015-09-01)

(本文编辑:刘志红)