

原发性免疫性血小板减少症(ITP)患者CD5⁺B细胞对CD4⁺T细胞Th1/Th2型细胞因子分泌的影响

于慧辉^{1,2} 詹延霞³ 季丽莉³ 李 炆² 孙丽华² 程韵枫^{2,3} 化范例^{1,2,Δ}

(¹复旦大学附属金山医院血液科 上海 201508; ²复旦大学附属中山医院青浦分院血液科 上海 201700;

³复旦大学附属中山医院血液科 上海 200032)

【摘要】 目的 探讨原发性免疫性血小板减少症(immune thrombocytopenia, ITP)患者CD5⁺B细胞对CD4⁺T细胞分泌Th1/Th2型细胞因子的调节作用及其在大剂量地塞米松(high dose dexamethasone, HD-DXM)治疗后的变化。**方法** 采集5例初发原发性ITP患者HD-DXM治疗前后外周静脉血各20 mL及5例健康对照者外周静脉血20 mL, Ficoll密度梯度离心法分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 进一步以免疫磁珠法分选CD5⁺B细胞、CD5⁻B细胞和CD4⁺T细胞。CD5⁺B细胞或CD5⁻B细胞与CD4⁺T细胞按1:9、1:5、1:3、1:1、3:1的梯度比例混合培养72 h或144 h。ELISA方法检测细胞培养上清液中IFN-γ(代表Th1型细胞因子)和IL-4(代表Th2型细胞因子)水平。**结果** 共培养72 h后, 健康对照者CD5⁺B细胞与CD4⁺T细胞比例在1:3时, 细胞培养上清液IFN-γ浓度与T细胞单独培养时相比明显下降[(2 427.99 ± 632.62)pg/mL vs. (1 109.25 ± 338.10)pg/mL, $P=0.001\ 2$]; 而ITP患者CD5⁺B细胞与CD4⁺T细胞比例在3:1时才对IFN-γ的分泌有显著抑制[(3 060.02 ± 493.98)pg/mL vs. (1 769.45 ± 634.73)pg/mL, $P=0.000\ 3$]。共培养144 h后得到相似的结果。HD-DXM治疗有效的ITP患者CD5⁺B细胞与CD4⁺T细胞比例在1:1时共培养72 h后, 对IFN-γ的分泌有明显抑制[(3 600.02 ± 838.00)pg/mL vs. (1 157.97 ± 383.20)pg/mL, $P<0.000\ 1$]。健康对照者及ITP患者CD5⁺B细胞对CD4⁺T细胞分泌IL-4均无明显影响。**结论** 原发性ITP患者CD5⁺B细胞抑制CD4⁺T细胞分泌Th1型细胞因子IFN-γ的能力明显受损, 经HD-DXM治疗后CD5⁺B细胞抑制IFN-γ分泌的能力可部分恢复。

【关键词】 免疫性血小板减少症(ITP); CD5⁺B细胞; Th1/Th2; IFN-γ; IL-4

【中图分类号】 R554 **【文献标志码】** A **doi:**10.3969/j.issn.1672-8467.2020.01.010

Impaired ability of CD5⁺B cells to regulate Th1/Th2 cytokines secretion by CD4⁺T cells in patients with primary immune thrombocytopenia (ITP)

YU Hui-hui^{1,2}, ZHAN Yan-xia³, JI Li-li³, LI Yang², SUN Li-hua², CHENG Yun-feng^{2,3}, HUA Fan-li^{1,2,Δ}

(¹Department of Hematology, Jinshan Hospital, Fudan University, Shanghai 201508, China; ²Department of Hematology, Qingpu Branch of Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 201700, China; ³Department of Hematology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

【Abstract】 Objective To investigate the regulatory functions of peripheral blood CD5⁺B cells on the secretion of Th1/Th2 cytokines by CD4⁺T cells in patients with primary immune thrombocytopenia (ITP) and the immunomodulation alterations of CD5⁺B cells after treatment with high dose dexamethasone (HD-DXM). **Methods** Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from 20 mL peripheral blood of 5 newly-diagnosed primary ITP patients before and after HD-DXM treatment and 5 healthy

上海市自然科学基金(19ZR1410000);上海市科委引导类项目(19411972200);上海市卫计委基金(201840352)

^ΔCorresponding author E-mail: hua_fanli@fudan.edu.cn

网络首发时间:2020-01-02 18:03:58 网络首发地址:https://kns.cnki.net/KCMS/detail/31.1885.r.20191231.0848.032.html

control subjects using Ficoll density gradient centrifugation. CD5⁺B cells, CD5⁻B cells and CD4⁺T cells were magnetically separated from PBMCs. CD5⁺B cells or CD5⁻B cells were cocultured with CD4⁺T cells for 72 hours or 144 hours at a gradient ratio of 1:9, 1:5, 1:3, 1:1 and 3:1. Supernatant IFN- γ (representing Th1 type cytokines) and IL-4 (representing Th2 type cytokines) concentration was detected by ELISA. **Results** In healthy subjects, the concentration of IFN- γ in supernatant of cell culture for 72 hours with the ratio of CD5⁺B cells to CD4⁺T cells at 1:3 was significantly lower than that in T cell culture alone [(2 427.99 \pm 632.62) pg/mL vs. (1 109.25 \pm 338.10) pg/mL, $P=0.0012$]. While in ITP patients, CD5⁺B cells were not observed to decrease IFN- γ secretion until the ratio of CD5⁺B cells to CD4⁺T cells increased to 3:1 [(3 060.02 \pm 493.98) pg/mL vs. (1 769.45 \pm 634.73) pg/mL, $P=0.0003$]. Similar results were obtained after 144-hours coculture. After HD-DXM therapy, in ITP patients the concentration of IFN- γ after 72-hour coculture was significantly decreased with the ratio of CD5⁺B cells to CD4⁺T cells at 1:1 [(3 600.02 \pm 838.00) pg/mL vs. (1 157.97 \pm 383.20) pg/mL, $P<0.0001$]. There was no significant effect of CD5⁺B cells on IL-4 secretion by CD4⁺T cells both in healthy subjects and in ITP patients. **Conclusions** The ability of CD5⁺B cells to suppress the secretion of IFN- γ , one of Th1-type cytokines, is impaired in primary ITP patients. After HD-DXM treatment, the ability of CD5⁺B cells to inhibit IFN- γ secretion could be partially restored.

【Key words】 immune thrombocytopenia (ITP); CD5⁺B cell; Th1/Th2; IFN- γ ; IL-4

* This work was supported by the Natural Science Foundation of Shanghai (19ZR1410000), the Guidance Project Fund of Shanghai Municipal Science and Technology Commission (19411972200) and the Scientific Research Project Fund of Shanghai Municipal Health and Family Planning Commission (201840352).

原发性免疫性血小板减少症 (immune thrombocytopenia, ITP) 是临床常见的获得性自身免疫性出血性疾病, 由于免疫紊乱导致血小板及巨核细胞破坏增加和/或生成减少。原发性 ITP 患者体内存在多种免疫细胞亚群数量和功能异常^[1], Th1/Th2 显著失衡, 目前公认原发性 ITP 为 Th1 优势自身免疫性疾病^[2]。部分 B 细胞可以通过分泌 IL-10 而影响 T 细胞亚群 (如 Th1、Th17 等) 的分化和功能, 其中 CD5⁺B 细胞是产生 IL-10 的重要 B 细胞亚群^[3-4], 多种具有免疫调节功能的 B 细胞亚群都表达 CD5 分子标志物^[5-7]。我们发现原发性 ITP 患者 CD5⁺B 细胞存在数量及分泌 IL-10 能力的异常^[8-9], 提示在原发性 ITP 患者中 CD5⁺B 细胞对 T 细胞亚群的免疫调节功能可能存在缺陷。原发性 ITP 的一线治疗药物为糖皮质激素, 首选大剂量地塞米松 (high-dose dexamethasone, HD-DXM) 冲击治疗^[10]。本研究通过观察原发性 ITP 患者 CD5⁺B 细胞对 CD4⁺T 细胞分泌 Th1 和 Th2 型代表性细胞因子 IFN- γ 和 IL-4 的调节作用, 以及经过 HD-DXM 治疗后 CD5⁺B 细胞免疫调节功能的变化, 探讨 CD5⁺B 细胞在原发性 ITP 患者 Th1/Th2 失衡中的作用。

资 料 和 方 法

研究对象 所有研究对象均符合《成人原发性免疫性血小板减少症诊断与治疗中国专家共识(2016 年版)》^[11] 的诊断标准。收集 2018 年 2 月至 6 月复旦大学附属中山医院青浦分院血液科病房 ITP 患者共 5 例 (男 1 例、女 4 例), 中位年龄 49 (35~62) 岁。招募健康对照者 5 例 (男 2 例、女 3 例), 中位年龄 35 (28~46) 岁。本研究经复旦大学附属中山医院青浦分院医学伦理委员会批准, 所有研究对象均签署知情同意书。

HD-DXM 冲击治疗方案 患者起始血小板计数 $<30 \times 10^9/L$ 和/或有出血表现, 接受 HD-DXM 冲击治疗: 口服地塞米松 40 mg/d \times 4 天, 重症患者同时给予静脉注射丙种球蛋白 $0.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 5$ 天和/或血小板输注和/或重组人血小板生成素; 4 天后停药, 若血小板稳定, 则不再用药; 若血小板下降至 $<50 \times 10^9/L$, 则重复给药 1 次, 然后以泼尼松 15 mg/d 维持。疗效评估参照文献^[11]。

淋巴细胞分选 ITP 患者接受 HD-DXM 治疗前、后均采集外周静脉血 20 mL, EDTA-K2 抗凝; 健

康对照组采集外周静脉血 20 mL。采用 Ficoll 密度梯度离心法获得外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。分选 CD4⁺T 细胞: 1×10^7 PBMC 重悬于 80 μ L 分选缓冲液中,加入 20 μ L CD4 磁珠,置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育 15 min;洗涤重悬后过柱,获得阳性细胞(纯度 $>99\%$)。分选 CD19⁺CD5⁺B 细胞和 CD19⁺CD5⁻B 细胞: 1×10^7 PBMC 重悬于 80 μ L 分选缓冲液中,加入 20 μ L CD19 磁珠,置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育 15 min,后 10 min 加入 CD5-Biotin 抗体 10 μ L;洗涤后过柱,分选获得 CD19⁺B 细胞;1 mL CD19⁺细胞中加入 20 μ L 酶切试剂,4 $^{\circ}$ C 孵育 10 min,洗涤后重悬于 50 μ L 缓冲液;加入 30 μ L 终止液;加入 20 μ L Biotin 磁珠,4 $^{\circ}$ C 孵育 15 min;洗涤重悬后过柱,分选获得 CD19⁺CD5⁺B 细胞(纯度 $>90\%$),其余为 CD19⁺CD5⁻B 细胞(纯度 $>98\%$)。

淋巴细胞共培养 CD4⁺T 细胞(2×10^5 /mL)与完全 RPMI 1640 培养基混合,接种于预包被 CD3 mAb 的 96 孔培养板,在 2.5 μ g/mL CD28 mAb 和 10 ng/mL IL-2 的条件下,磁珠纯化出的 CD19⁺CD5⁺B 细胞或 CD19⁺CD5⁻B 细胞与 CD4⁺T 细胞按 1:9、1:5、1:3、1:1,混合培养 72 h 或 144 h。

ELISA 检测 IFN- γ 和 IL-4 水平 取上述细胞共培养上清,按 ELISA 试剂盒说明书检测 IFN- γ 和 IL-4 水平,每个样本和标准品均设 3 个复孔,酶标仪读取波长 450 nm 处的吸光度(D)值,绘制标准曲线,计算 IFN- γ 和 IL-4 含量。所用 ELISA 试剂盒 IFN- γ 和 IL-4 的最低检测浓度分别为 5 pg/mL 和 0.5 pg/mL。

表 1 健康对照组 CD5⁺/CD5⁻B 细胞与 CD4⁺T 细胞共培养上清液中 IFN- γ 浓度

Tab1 The concentration of IFN- γ in supernatant of CD4⁺T cells cocultured with CD5⁺/CD5⁻B cells in healthy control group

[($\bar{x} \pm s$), pg/mL]

B:T	IFN- γ (72 h)		IFN- γ (144 h)	
	CD5 ⁺ B+CD4 ⁺ T	CD5 ⁻ B+CD4 ⁺ T	CD5 ⁺ B+CD4 ⁺ T	CD5 ⁻ B+CD4 ⁺ T
0:1	2 427.99 \pm 632.62	—	15 310.13 \pm 2472.15	—
1:9	1 996.37 \pm 505.12	2 856.17 \pm 726.38	13 750.67 \pm 2678.16	20 670.34 \pm 3296.2 ⁽¹⁾
1:5	1 734.41 \pm 507.16	2 653.23 \pm 660.17	7 134.54 \pm 1236.08 ⁽¹⁾	12 625.23 \pm 1030.06
1:3	1 109.25 \pm 338.10 ⁽¹⁾	2 489.97 \pm 655.32	3 889.32 \pm 1648.10 ⁽¹⁾	7 283.69 \pm 1313.04 ⁽¹⁾
1:1	395.22 \pm 136.54 ⁽¹⁾	2 057.47 \pm 466.13	1 645.37 \pm 875.36 ⁽¹⁾	7 530.35 \pm 683.47 ⁽¹⁾

⁽¹⁾vs. T cell culture alone, $P < 0.01$. T: T cell; B: B cell.

ITP 患者 CD5⁺B 细胞对 CD4⁺T 细胞分泌 IFN- γ 的影响 共培养 72 h, ITP 患者 CD5⁺B 细胞与 CD4⁺T 细胞比例增至 3:1 时,较 T 细胞单独培养时 IFN- γ 的分泌显著下降[(3 060.02 \pm 493.98) pg/mL vs. (1 769.45 \pm 634.73) pg/mL, $P = 0.000\ 3$]。共培养

统计学分析 运用 SPSS 16.0 和 GraphPad Prism 7 统计软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间计量资料比较采用双因素 ANOVA 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有显著统计学意义。

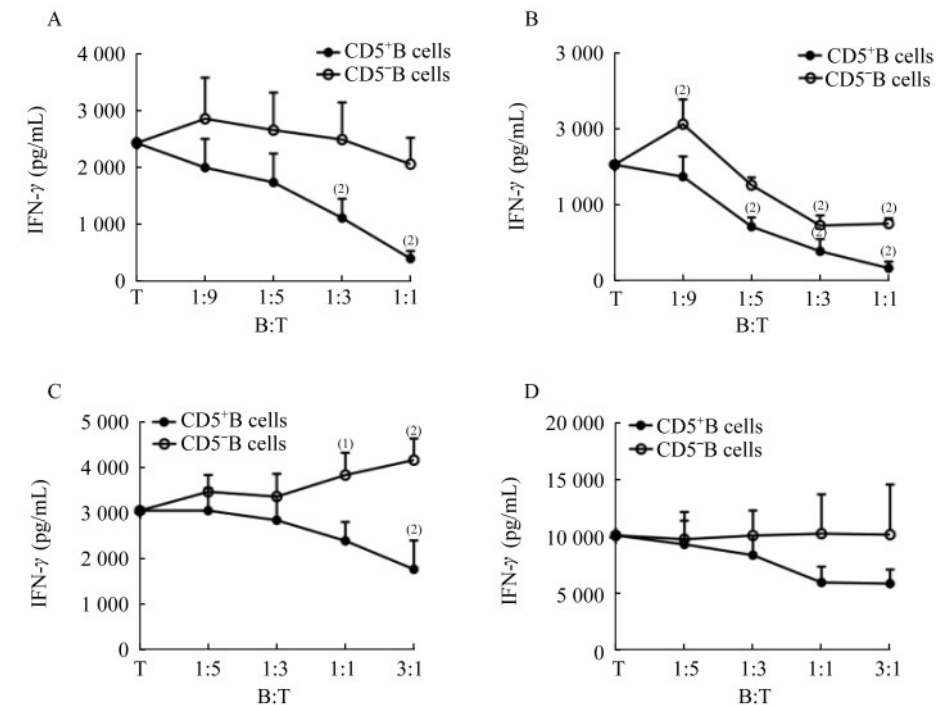
结 果

健康对照组 CD5⁺B 细胞对 CD4⁺T 细胞分泌 IFN- γ 的影响 共培养 72 h,健康对照组 CD5⁺B 细胞与 CD4⁺T 细胞比例在 1:3 时,CD4⁺T 细胞分泌 IFN- γ 浓度明显下降,与 T 细胞单独培养相比差异有统计学意义[(2 427.99 \pm 632.62) pg/mL vs. (1 109.25 \pm 338.10) pg/mL, $P = 0.001\ 2$]。CD5⁺B 细胞与 CD4⁺T 细胞比例增加至 1:1 时,CD4⁺T 细胞分泌 IFN- γ 浓度下降至 (395.22 \pm 136.54) pg/mL ($P < 0.001$)。共培养 144 h 得到相似的结果,但培养上清液中 IFN- γ 浓度较共培养 72 h 高出数倍。

共培养 72 h,各浓度梯度下 CD5⁺CD5⁻BB 细胞对 CD4⁺T 细胞培养上清液中 IFN- γ 浓度均未见明显影响(P 均 >0.05);当 CD5⁻B 细胞与 CD4⁺T 细胞比例增加至 1:1 时,IFN- γ 浓度有下降趋势,但差异无统计学意义。共培养 144 h, CD5⁻B 细胞与 CD4⁺T 细胞比例为 1:9 时表现为促进 IFN- γ 的分泌,而 B 与 T 细胞比例增加至 1:3 时对 IFN- γ 的分泌才产生抑制作用,较 T 细胞单独培养时 IFN- γ 浓度显著下降(P 均 <0.01 ,图 1、表 1)。

144 h, ITP 患者 CD5⁺B 细胞有轻度抑制 CD4⁺T 细胞分泌 IFN- γ 的趋势,但差异无统计学意义。

共培养 72 h, ITP 患者 CD5⁻B 细胞与 CD4⁺T 细胞比例为 1:1 时,CD5⁻B 细胞促进 CD4⁺T 细胞分泌 IFN- γ ,与 T 细胞单独培养相比差异有统计学意义



The concentration of IFN- γ in supernatant of CD4⁺T cells cocultured with CD5⁺/CD5⁻B cells in healthy controls after 72-h (A) and 144-h (B) coculture. The concentration of IFN- γ in supernatant of CD4⁺T cells cocultured with CD5⁺/CD5⁻B cells of primary ITP patients after 72-h (C) and 144-h (D) coculture.*vs.*T cell culture alone, ⁽¹⁾ $P<0.05$; ⁽²⁾ $P<0.01$. T: T cell; B: B cell.

图1 健康对照组和ITP组CD5⁺/CD5⁻B细胞对CD4⁺T细胞分泌IFN- γ 的影响

Fig 1 The effect of CD5⁺/CD5⁻B cells on IFN- γ secretion by CD4⁺T cells in healthy control group and ITP group
($P=0.029$ 1)。共培养 144 h, ITP 患者 CD5⁻B 细胞 0.05, 图 1、表 2)。对 CD4⁺T 细胞分泌 IFN- γ 几乎没有影响 (P 均 $>$

表2 原发性ITP患者HD-DXM治疗前CD5⁺和CD5⁻B细胞与CD4⁺T细胞共培养上清液中IFN- γ 浓度
Tab 2 The concentration of IFN- γ in supernatant of CD4⁺T cells cocultured with CD5⁺/CD5⁻B cells of primary ITP patients before HD-DXM treatment [$(\bar{x} \pm s)$, pg/mL]

B:T	IFN- γ (72 h)		IFN- γ (144 h)	
	CD5 ⁺ B+CD4 ⁺ T	CD5 ⁻ B+CD4 ⁺ T	CD5 ⁺ B+CD4 ⁺ T	CD5 ⁻ B+CD4 ⁺ T
0:1	3 060.02 \pm 493.98	—	10 179.57 \pm 3 670.25	—
1:5	3 060.02 \pm 493.98	3 475.54 \pm 370.49	9 375.27 \pm 2 081.19	9 843.75 \pm 2 385.66
1:3	2 850.17 \pm 535.72	3 369.08 \pm 503.17	8 437.50 \pm 1 734.33	10 161.29 \pm 2 202.15
1:1	2 394.57 \pm 417.42	3 845.12 \pm 493.16 ⁽¹⁾	6 029.90 \pm 1 387.46	10 322.58 \pm 3 463.92
3:1	1 769.45 \pm 634.73 ⁽²⁾	4 175.14 \pm 473.21 ⁽²⁾	5 937.50 \pm 1 235.45	10 241.94 \pm 4 404.30

⁽¹⁾*vs.*T cell culture alone, ⁽¹⁾ $P<0.05$; ⁽²⁾ $P<0.01$. T cell; B: B cell.

ITP 患者 HD-DXM 治疗后 CD5⁺B 细胞对 CD4⁺T 细胞分泌 IFN- γ 的影响 经 HD-DXM 治疗后 ITP 患者均获得完全或部分反应。共培养 72 h, CD5⁺B 细胞与 CD4⁺T 细胞比例为 1:1 时,即表现出对 CD4⁺T 细胞分泌 IFN- γ 的抑制作用[(3 600.02 \pm 838.00) pg/mL *vs.* (1 157.97 \pm 383.20) pg/mL, $P<$

0.000 1];当比例增加至 3:1 时,CD4⁺T 细胞分泌 IFN- γ 浓度进一步下降至 (829.67 \pm 314.25) pg/mL ($P<0.000$ 1)。共培养 144 h 的结果同样显示,经过 HD-DXM 有效治疗后,CD5⁺B 细胞与 CD4⁺T 细胞比例为 1:3 时,表现出对 CD4⁺T 细胞分泌 IFN- γ 的抑制作用[(11 543.53 \pm 3 541.90) pg/mL *vs.* (5 102.81 \pm

1 734.33) pg/mL, $P=0.002\ 9$];当比例增至1:1和3:1时,CD4⁺T细胞分泌IFN- γ 的浓度随着B:T细胞比例的增加进一步下降(P 均 $<0.000\ 1$,表3)。

表3 原发性ITP患者HD-DXM治疗后CD5⁺B细胞对CD4⁺T细胞分泌IFN- γ 的影响

Tab 3 The concentration of IFN- γ in supernatant of CD4⁺T cells cocultured with CD5⁺B cells of primary ITP patients after HD-DXM treatment [($\bar{x}\pm s$),pg/mL]

B:T	IFN- γ (72 h)	IFN- γ (144 h)
	CD5 ⁺ B+CD4 ⁺ T	CD5 ⁺ B+CD4 ⁺ T
0:1	3 600.02 \pm 838.00	11 543.53 \pm 3 541.90
1:5	3 359.27 \pm 523.75	8 181.81 \pm 2 187.71
1:3	2 553.97 \pm 358.07	5 102.81 \pm 1 734.33 ⁽¹⁾
1:1	1 157.97 \pm 383.20 ⁽¹⁾	2 232.93 \pm 579.18 ⁽¹⁾
3:1	829.67 \pm 314.25 ⁽¹⁾	1 363.64 \pm 1 062.27 ⁽¹⁾

⁽¹⁾vs. T cell culture alone, $P<0.01$.T:T cell;B:B cell.

健康对照者及ITP患者的CD5⁺B细胞对CD4⁺T细胞分泌IL-4的影响 在健康对照者和ITP患者中,CD5⁺B细胞以不同比例与CD4⁺T细胞共培养,无论72 h还是144 h,培养上清中IL-4的浓度变化与T细胞单独培养时比较,差异均无统计学意义。CD5⁺B细胞以不同比例与CD4⁺T细胞共培养,同样对IL-4的浓度无明显影响。

讨 论

CD5⁺B细胞具有分泌IL-10的能力,其免疫调节作用已经在动物实验中得到证实:体外诱导扩增的CD5⁺B细胞回输小鼠体内可以缓解实验性变态反应性脑脊髓炎疾病,而CD5⁺B细胞则不具备这种免疫调节功能^[12]。本研究证实,健康对照组共培养72 h时CD5⁺B细胞具有抑制CD4⁺T细胞分泌IFN- γ 的作用,提示CD5⁺B细胞影响Th1细胞亚群的细胞因子分泌,并在维持Th1/Th2平衡中起到重要作用。

我们发现在原发性ITP患者中CD5⁺B细胞存在数量及分泌IL-10能力的异常^[8-9],这提示在ITP患者中CD5⁺B细胞免疫调节功能可能存在缺陷。本研究发现,相较于健康对照组,CD5⁺B细胞对CD4⁺T细胞分泌IFN- γ (Th1型代表性细胞因子)有显著抑制作用,ITP患者中CD5⁺B细胞抑制IFN- γ 分泌的能力明显受损,CD5⁺B细胞在更高的比例下才表现出对CD4⁺T细胞分泌IFN- γ 的抑制作用,而且在相同的B:T细胞比例下,IFN- γ 分泌受抑制的

程度远低于健康对照组。说明在ITP患者中CD5⁺B细胞调节CD4⁺T细胞分泌IFN- γ 的功能存在缺陷。CD5⁺B细胞主要通过分泌IL-10发挥免疫抑制功能,本研究结果也与我们之前发现的ITP患者CD5⁺B细胞存在分泌IL-10能力异常相一致。B细胞分泌IL-10主要由Toll样受体及其下游的MyD88通路所介导,针对ITP患者CD5⁺B细胞,我们运用PCR Array方法对TLRs/MyD88信号传导通路中的相关分子进行初步探索,筛选出一些重要的差异表达分子,如FOS、JUN、IRF3等^[13],为后续机制研究提供了方向。

另一方面,健康对照者和原发性ITP患者的CD5⁺B细胞对Th2型代表性细胞因子IL-4的分泌均无明显影响。CD5⁺B细胞可以下调Th1/Th2型细胞因子的比例,但在ITP患者中由于CD5⁺B细胞抑制IFN- γ 分泌的能力明显受损,可能造成Th1/Th2失衡和Th1型细胞因子优势。ITP是一种典型的Th1优势的自身免疫性疾病,Th1/Th2失衡在ITP的发病机制中起到重要作用^[14-16]。本研究结果提示,CD5⁺B细胞的免疫调节功能缺陷参与了ITP患者形成Th1优势和Th1/Th2失衡的过程。

HD-DXM治疗疗效好、疗程短、不良反应小,故推荐作为ITP的一线治疗^[10],但其作用机制尚不完全清楚。与治疗前相比,在HD-DXM治疗有效的ITP患者中观察到Th1/Th2失衡可被纠正^[17]及Treg数量增加^[18]等免疫细胞和细胞因子的变化。本课题组前期研究发现ITP患者CD5⁺B细胞的IL-10分泌障碍可以被HD-DXM修复^[8]。本研究进一步发现,患者接受HD-DXM治疗后,CD5⁺B细胞抑制IFN- γ 分泌的能力部分恢复,提示CD5⁺B细胞免疫调节功能的恢复可能也是HD-DXM的作用机制之一。功能部分恢复的CD5⁺B细胞对IFN- γ 分泌的抑制程度仍显著低于健康对照者,这说明经过HD-DXM治疗,患者的血小板计数升高到相对安全的范围,但其CD5⁺B细胞对CD4⁺T细胞的免疫调节功能尚未完全恢复,患者仍处于免疫失衡状态,这可能是导致疾病复发的原因之一。本研究中有2例患者同时使用具有免疫调节功能的丙种球蛋白,其对T细胞分泌IFN- γ 的影响尚无明确定论,丙种球蛋白联合地塞米松对T细胞分泌细胞因子方式的影响及其临床意义值得进一步探讨。

本研究还比较了CD5⁺B细胞与CD5⁺B细胞在

免疫调节功能上的差异。无论是在健康对照者还是ITP患者中,共培养72 h,CD5⁺B细胞均不能抑制CD4⁺T细胞分泌IFN- γ ,在ITP患者中随着CD5⁺B细胞比例的增加,反而有促进CD4⁺T细胞分泌IFN- γ 的趋势。共培养时间延长至144 h,健康对照组中随着CD5⁺B细胞比例的增加,表现出对IFN- γ 的分泌有一定的抑制作用,而ITP患者中CD5⁺B细胞对IFN- γ 的分泌几乎不产生影响。Lemoine等^[19]研究认为,在T细胞与B细胞相互作用的过程中,B细胞可上调CD5的表达并获得抑制T细胞免疫反应的能力。ITP患者中B细胞的异常表现提示其获得免疫抑制功能的通路受阻,但具体机制有待深入研究。

总之,本研究发现原发性ITP患者CD5⁺B细胞抑制CD4⁺T细胞分泌Th1型代表性细胞因子IFN- γ 的能力明显受损,但是对Th2型代表性细胞因子IL-4的分泌无明显影响。HD-DXM治疗有效的ITP患者中,CD5⁺B细胞抑制IFN- γ 分泌的能力可部分恢复。本研究一方面揭示了CD5⁺B细胞在ITP疾病发生发展尤其是Th1/Th2失衡中可能发挥的作用,另一方面也为ITP患者B细胞免疫调节功能缺陷制定相应的治疗策略提供了实验基础。

参 考 文 献

- [1] SWINKELS M, RIJKERS M, VOORBERG J, *et al.* Emerging concepts in immune thrombocytopenia[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 880.
- [2] OGAWARA H, HANDA H, MORITA K, *et al.* High Th1/Th2 ratio in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura [J]. *Eur J Haematol*, 2003, 71 (4): 283-288.
- [3] O'GARRA A, CHANG R, GO N, *et al.* Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10 [J]. *Eur J Immunol*, 1992, 22(3): 711-717.
- [4] XING C, MA N, XIAO H, *et al.* Critical role for thymic CD19⁺CD5⁺CD1dhiIL-10⁺ regulatory B cells in immune homeostasis [J]. *J Leukocyte Biol*, 2015, 97(3): 547-556.
- [5] YANABA K, BOUAZIZ J, HAAS KM, *et al.* A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5⁺ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses [J]. *Immunity*, 2008, 28(5): 639-650.
- [6] BLAIR PA, NORE ALY, FLORES-BORJA F, *et al.* CD19⁺CD24hiCD38hi B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic lupus erythematosus patients [J]. *Immunity*, 2010, 32(1): 129-140.
- [7] MATSUMOTO M, BABA A, YOKOTA T, *et al.* Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation [J]. *Immunity*, 2014, 41(6): 1040-1051.
- [8] HUA F, JI L, ZHAN Y, *et al.* Pulsed high-dose dexamethasone improves interleukin 10 secretion by CD5 (+) B cells in patients with primary immune thrombocytopenia [J]. *J Clin Immunol*, 2012, 32(6): 1233-1242.
- [9] 李锋, 化范例, 季丽莉, 等. 原发免疫性血小板减少症患者外周血CD5⁺B细胞水平及其分泌IL-10的能力 [J]. *中华血液学杂志*, 2012, 33(12): 1028-1032.
- [10] LIU XG, BAI XC, CHEN FP, *et al.* Chinese guidelines for treatment of adult primary immune thrombocytopenia [J]. *Int J Hematol*, 2018, 107(6): 615-623.
- [11] 中华医学会血液学分会止血与血栓学组. 成人原发免疫性血小板减少症诊断与治疗中国专家共识(2016年版) [J]. *中华血液学杂志*, 2016, 37(2): 89-93.
- [12] YOSHIZAKI A, MIYAGAKI T, DILILLO DJ, *et al.* Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions [J]. *Nature*, 2012, 491 (7423): 264-268.
- [13] HUA F, LI Y, ZHAO X, *et al.* The expression profile of toll-like receptor signaling molecules in CD19⁺B cells from patients with primary immune thrombocytopenia [J]. *Immunol Lett*, 2016, 176: 28-35.
- [14] OGAWARA H, HANDA H, MORITA K, *et al.* High Th1/Th2 ratio in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura [J]. *Eur J Haematol*, 2003, 71 (4): 283-288.
- [15] WANG T, ZHAO H, REN H, *et al.* Type 1 and type 2 T-cell profiles in idiopathic thrombocytopenic purpura [J]. *Haematologica*, 2005, 90(7): 914-923.
- [16] LAMBERT MP, GERNESHEIMER TB. Clinical updates in adult immune thrombocytopenia [J]. *Blood*, 2017, 129 (21): 2829-2835.
- [17] LI JQ, WANG ZY, HU SY, *et al.* Correction of abnormal T cell subsets by high-dose dexamethasone in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura [J]. *Immunol Lett*, 2013, 154(1-2): 42-48.
- [18] ZHAN Y, ZOU S, HUA F, *et al.* High-dose dexamethasone modulates serum cytokine profile in patients with primary immune thrombocytopenia [J]. *Immunol Lett*, 2014, 160(1): 33-38.
- [19] LEMOINE S, MORVA A, YOUINOUP, *et al.* Human T cells induce their own regulation through activation of B cells [J]. *J Autoimmun*, 2011, 36(3-4): 228-238.

(收稿日期: 2018-12-17; 编辑: 段佳)