

1,25-(OH)₂ 维生素 D3 对再生障碍性 贫血患者 T 细胞亚群的影响

陆静涛¹ 杨建和¹ 章艳¹ 何金媛¹ 陈涛¹ 卢绪章¹

[摘要] 目的:研究再生障碍性贫血(AA)患者外周血中的 T 细胞亚群变化与血清中 1,25-(OH)₂ 维生素 D3 水平的关系。方法:利用流式细胞仪检测 15 例 AA 患者和 25 例健康对照者外周血 T 细胞亚群的变化,并用 ELISA 法检测 AA 患者和健康对照者血清中 1,25-(OH)₂ 维生素 D3 的水平。结果:AA 患者血清中 1,25-(OH)₂ 维生素 D3 水平明显低于健康对照者[(35.5±11.8) pmol/L:(51.8±12.6) pmol/L, P<0.05]。与健康对照者比较,AA 患者外周血中 CD4 在淋巴细胞中比率无明显变化[(31.8±4.7)%:(33.6±4.2)%, P=0.217],但 CD8 在淋巴细胞中比率显著升高[(31.5±5.2)%:(24.8±3.8)%, P<0.01],故 CD4/CD8 比值降低(P<0.01);其中在 CD4⁺ 细胞中,TH1/TH2 比值较健康对照者明显升高[(4.09±1.05):(3.12±0.89), P=0.003]。结论:AA 患者外周血清中 1,25-(OH)₂ 维生素 D3 水平异常降低,可能影响 AA 患者 CD4⁺ T 细胞的分化。

[关键词] 1,25-(OH)₂ 维生素 D3;再生障碍性贫血;T 细胞亚群

doi:10.13201/j.issn.1004-2806.2016.03.009

[中图分类号] R556.5 **[文献标志码]** A

Effects of 1,25-(OH)₂ D3 on T cell subsets in patients with aplastic anemia

LU Jingtiao YANG Jianhe ZHANG Yan HE Jinyuan CHEN Tao LU Xuzhang

(Department of Hematology, Changzhou No. 2 People's Hospital, Nanjing Medical University, Changzhou, 213000, China)

Corresponding author: LU Xuzhang, E-mail: luxuzhang2008@163.com

Abstract Objective: To study the effect of 1,25-(OH)₂ D3 on T cell subsets in patients with aplastic anemia (AA). **Method:** Fresh peripheral blood samples of 15 patients with AA and 25 normal controls were analyzed for the level of 1,25-(OH)₂ D3 with ELISA. The T cell subsets were detected by flow cytometry. **Result:** The median level of serum 1,25-(OH)₂ D3 of AA patients was lower than that of normal controls [(35.5±11.8) pmol/L vs. (51.8±12.6) pmol/L, P<0.05]. There was no significant difference of the median number of CD4⁺ cells between AA patients and normal controls [(31.8±4.7)% vs. (33.6±4.2)%, P=0.217]. The median number of CD8⁺ cells in AA patients was higher than that in normal controls [(31.5±5.2)% vs. (24.8±3.8)%, P<0.01]. In CD4⁺ cells, the ratio of TH1/TH2 of AA patients was higher than that of normal controls [(4.09±1.05) vs. (3.12±0.89), P=0.003]. **Conclusion:** The level of serum 1,25-(OH)₂ D3 is decreased in AA patients, which may affect the differentiation of CD4⁺ T cell in AA patients.

Key words 1,25-(OH)₂ D3; aplastic anemia; T cell subsets

1,25-(OH)₂ D3 是维生素 D3 的活性形式,不仅具有调节钙磷代谢的作用,还具有调节免疫系统的作用^[1]。近年来研究表明 1,25-(OH)₂ D3 可以上调分泌白细胞介素-4 等细胞因子的 CD4⁺ T 细胞(TH2 细胞)和调节性 T 细胞活性,同时抑制分泌干扰素-γ 等细胞因子的 CD4⁺ T 细胞(TH1 细胞),促进 CD4⁺ T 细胞分化时偏向 TH2 细胞^[2]。很多免疫性疾病包括系统性红斑狼疮、风湿性关节炎等均发现患者血清中 1,25-(OH)₂ D3 水平的下降,1,25-(OH)₂ D3 可能参与了免疫性疾病的发病

机制。再生障碍性贫血(aplastic anemia, AA)是一种以免疫介导的造血受抑导致全血细胞减少及骨髓增生低下为特征的血液系统疾病,近年来研究发现 AA 的发病与细胞免疫关系密切,其发病及进展与自身免疫息息相关。我们通过检测 AA 患者外周血中 1,25-(OH)₂ D3 的水平以及 TH1/TH2 细胞的比例,研究 1,25-(OH)₂ D3 在 AA 患者中对免疫细胞的影响。

1 资料与方法

1.1 资料

AA 组为我科 2009-08—2014-10 收治的 15 例 AA 患者,其中男 6 例,女 9 例,中位年龄 46(21~

¹南京医科大学附属常州第二人民医院血液科(江苏常州, 213000)

通信作者:卢绪章, E-mail: luxuzhang2008@163.com

72)岁,所有患者诊断根据《再生障碍性贫血诊断治疗专家共识》,排除合并其他肿瘤性疾病以及自身免疫性疾病等。对照组 25 例均为健康体检者,其中男 10 例,女 15 例,中位年龄 45(18~70)岁。采集 AA 患者及健康者静脉血 5 ml,用于检测血清中 1,25-(OH)₂D₃ 浓度以及外周血中 T 细胞亚群。

1.2 血清中 1,25-(OH)₂D₃ 浓度的测定

采用 ELISA 法分别检测 AA 组和对照组 1,25-(OH)₂D₃。取静脉血 1 ml,待凝固后分离血清送我院检验中心,采用高效液相色谱-串联质谱方法进行检测。

1.3 外周血中 T 细胞亚群的测定

采集外周血 5 ml,用淋巴细胞分离液分离外周血单核细胞,用 PBS 稀释细胞为 10⁵/100 μl,分别用各自的抗体在 4℃冰箱避光孵育 30 min,经 PBS 洗涤 2 遍后使用流式细胞仪测定,计数 10 000 个细胞,测定 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 比值。TH1 和 TH2 细胞的流式检测:将细胞加入抗 CD4 抗体后在 4℃冰箱避光孵育 30 min,用 PBS 洗 1 次后离心去上清,然后加入破膜剂(10% Saponin)1.5 ml,室温下避光 15 min,离心去上清,分别加入抗人 IFN-γ 抗体和抗人 IL-4 抗体,室温下避光 30 min 后以破膜剂洗 1 次,离心去上清,用 PBS 重新悬浮细胞待检测。

1.4 统计学处理

应用 SPSS13.0 软件处理数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用两样本 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组血清中 1,25-(OH)₂ 维生素 D₃ 水平比较

AA 组患者血清中 1,25-(OH)₂ 维生素 D₃ 水平明显低于对照组[(35.5 ± 11.8) pmol/L : (51.8 ± 12.6) pmol/L, *P* < 0.05]。

2.2 2 组外周血中 T 细胞亚群比较

AA 组患者外周血中 CD3 比率、CD8 比率均明显高于对照组(*P* < 0.05、*P* < 0.01),而 2 组外周血中 CD4 比率差异无统计学意义(*P* = 0.217),AA 组患者外周血中 CD4/CD8 比值明显降低(*P* < 0.01),同时 AA 组患者外周血中 TH1/TH2 细胞比值较对照组明显增高(*P* = 0.003),详见表 1。

3 讨论

1,25-(OH)₂D₃ 不仅是一种维生素,也是一种

固醇类激素,其受体广泛存在于人体各类组织中,不仅具有调节钙磷代谢的作用,还通过与受体结合有效调节自然免疫细胞和适应性免疫细胞的增殖、分化,具有调节免疫系统的作用。研究表明 1,25-(OH)₂D₃ 可抑制淋巴细胞的增殖,使细胞中止在细胞周期的 G1A-G2B 阶段^[3-4];其减少与许多免疫相关性疾病的发生有关^[5],同时可抑制 TH1 细胞及相关细胞因子的产生,促进 TH2 辅助细胞及相关白细胞介素的产生,从而抑制 CD4⁺T 细胞的增殖,并抑制 IFN-γ 及 IL-2 的产生进而抑制自身免疫性疾病的进展。有研究表明,当 1,25-(OH)₂D₃ 缺乏或 VDR 信号传递减弱时,TH1 细胞活动会增强,而 TH2 细胞和调节性 T 细胞活动减弱^[6]。研究认为 1,25-(OH)₂D₃ 可直接抑制抗原和凝集素刺激的 T 细胞增殖,抑制 TH1 类细胞因子 IL-2、IFN-γ、TNF-α 等的产生,增强 TH2 类细胞因子 IL-4、转录因子(连接蛋白 3、c-maf)的表达。另外,1,25-(OH)₂D₃ 也可降低同种异体反应性 T 细胞的反应^[7-9]。本研究发现 AA 患者血清中 1,25-(OH)₂D₃ 的水平明显降低,可能促进了 CD4⁺T 细胞向炎症细胞 TH1 细胞分化以及 IFN-γ 的分泌,介导了免疫细胞对骨髓细胞的破坏,从而在 AA 发病中起到一定作用。

我们进一步分析 AA 患者外周血中 T 细胞亚群的比例发现,AA 患者外周血中 CD3⁺和 CD8⁺T 细胞比率明显升高,而 CD4⁺T 细胞比率无明显变化,CD4⁺/CD8⁺ 比值明显降低,这与既往的研究一致^[10]。我们同时发现,TH1 细胞比率明显升高,而 TH2 细胞比率无明显改变,TH1/TH2 比值明显升高(*P* = 0.003)。研究表明 1,25-(OH)₂D₃ 能够调节 CD4⁺T 细胞,在 1,25-(OH)₂D₃ 缺乏情况下 TH1 活动会增强,诱导 TH1 优势免疫应答^[11-12]。因此,患者 TH1 比率升高可能与外周血清中 1,25-(OH)₂D₃ 水平降低促进了 CD4⁺T 细胞向 TH1 细胞分化有关。

TH1 主要通过分泌 IL-2、IFN-γ、IFN-β 介导免疫反应,诱导免疫排斥,是 AA 发病的重要因素。因此,我们通过补充 AA 患者血清中 1,25-(OH)₂D₃ 在体内的浓度,可能会抑制 AA 患者外周血中 TH1 细胞的活性,从而减少 IFN-γ 等炎性介质的分泌,有利于 AA 患者的疾病恢复。

表 1 2 组外周血中 T 细胞亚群的比较

组别	CD3/%	CD4/%	CD8/%	CD4/CD8	TH1/TH2
对照组(25 例)	59.2 ± 5.6	33.6 ± 4.2	24.8 ± 3.8	1.35 ± 0.14	3.12 ± 0.89
AA 组(15 例)	65.3 ± 6.7 ¹⁾	31.8 ± 4.7	31.5 ± 5.2 ²⁾	1.02 ± 0.16 ²⁾	4.09 ± 1.05 ²⁾

与对照组比较,¹⁾ *P* < 0.05,²⁾ *P* < 0.01。

在白血病细胞上表达或高表达,在正常骨髓或外周血细胞上低表达或不表达,FCM 与 PCR 相比速度更快,不足之处在于此方法要求必须详尽掌握患者初发时的表型特征,以便选择适当的标准进行检测^[1]。

本次研究采用 FCM 进行急性白血病患者缓解期 MRD 的检测,结果显示 ALL 患者中,18 例 MRD 持续阳性患者均出现复发,而持续阴性者无一例复发,表明 MRD 水平对患者的预后具有重要意义,这与 Dworzak 等(2002)的研究结果相一致,是由于血液学上骨髓中白细胞计数 <0.05 即为缓解,但 <0.05 的白血病细胞中也可存在恶性增殖能力,从而导致复发,故 MRD 的存在是复发的根源。本研究中所有患者 MRD >0.001 时复发率升高,而复发率与性别、年龄、是否为难治性无关($P>0.05$)。故只要 MRD >0.001 ,须引起高度重视。但梅妍妍等^[4]研究中有 1 例 MRD <0.001 的患者复发,故阴性者不能完全排除复发,仍需加强监测。而 MRD ≥ 0.01 患者的复发时间明显短于 MRD ≤ 0.005 和 $0.005 < \text{MRD} < 0.01$ 的患者,与 Miguel 等(2001)报道的结果一致,对于这类患者,临床上需加大监测并及时调整化疗方案或更换治疗方案。FCM 检测 MRD 在急性白血病治疗过程中具有预测复发、判断预后的作用。但在 ALL 患者的统计结果中发现,复发的敏感性各组均为 100%,但特异性分别为 76.9%、77.8%。可能是因为白血病细胞与正常细胞相比低达 $10^{-5} \sim 10^{-6}$,可低于 FCM 检测范围;同时病程发展,细胞表面抗原变化,也可造成假阴性,从而降低特异性^[5]。尽管如此,从整体

考虑,FCM 检测简单快速,创伤小,比骨髓确诊复发平均提前 6 个月,可采取连续定期动态监测的方法,提高检测结果的准确性,为临床早期复发的预测提供有力证据,有利于临床个体化方案治疗。临床上也有报道采用 RQ-PCR 检测在某些患者可弥补治疗中出现的 FCM 检测 MRD 假阴性的不足^[5]。故综合运用 2 种方法,可较好的避免假阴性。

综上所述,MRD 的水平与急性白血病缓解期患者的预后密切相关,可作为预后评价的敏感指标,MRD ≥ 0.01 时,急性白血病复发的可能性大。FCM 可作为 MRD 检测的常用手段,为临床复发预测、预后判断及个体化治疗提供价值依据。

参考文献

- [1] 袁婷婷. 流式细胞术检测急性白血病完全缓解期微小残留病及临床意义[D]. 浙江:浙江大学医学院,2009.
- [2] 张之南. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京:科学出版社,2007:103-122.
- [3] 田孝鹏,孙爱宁,李渭阳,等. 多参数流式细胞术检测白血病微小残留病在急性髓细胞性白血病诱导治疗阶段的临床意义[J]. 苏州大学学报(医学版),2012,32(3):376-399.
- [4] 梅妍妍,高超,崔蕾,等. 半胱氨酸蛋白酶 A 相关蛋白 2 及微小残留病灶的联合检测在儿童急性淋巴细胞白血病中的预后意义[J]. 中国循证儿科杂志,2013,8(2):122-125.
- [5] 罗琼,黄志新,罗柳萍,等. TRX-2 基因表达在急性白血病微小残留病灶监测中的作用[J]. 中南大学学报:医学版,2013,38(4):383-387.

(收稿日期:2015-11-16)

(上接第 208 页)

参考文献

- [1] Cutolo M, Pizzomi C, Sulli A. Vitamin D endocrine system involvement in autoimmune rheumatic diseases[J]. Autoimmun Rev,2011,11:84-87.
- [2] Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, et al. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells[J]. J Immunol,2001,167:4974-4980.
- [3] Helming L, Bose J, Ehrchen J, et al. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ is a potent suppressor of interferon gamma-mediated macrophage activation[J]. Blood,2005,106:4351-4358.
- [4] Etten E, Stoffels K, Gysemans C, et al. Regulation of vitamin D homeostasis: implications for the immune system[J]. Nutri Rev,2008,66:S125-S134.
- [5] Pelajo CF, Lopez-Benitez JM, Miller LC. Vitamin D and autoimmune rheumatologic disorders[J]. Autoimmun Rev,2010,9:507-510.
- [6] Mahon BD, Wittke A, Wever V, et al. The targets of vitamin D depend on the differentiation and activation status of CD4 positive T cells[J]. J Cell Biochem,2003,89:922-932.
- [7] Joseph RW, Bayraktar UD, Kim TK, et al. Vitamin D receptor upregulation in alloreactive human T cells[J]. Hum Immunol,2012,73:693-698.
- [8] Wang Y, Zhu J, DeLuca HF. Where is the vitamin D receptor? [J]. Arch Biochem Biophys,2012,523:123-133.
- [9] Hewison M. An update on vitamin D and human immunity[J]. Clin Endocrinol (Oxf),2012,76:315-325.
- [10] Hu X, Gu Y, Wang Y, et al. Increased CD4⁺ and CD8⁺ effector memory T cells in patients with aplastic anemia[J]. Haematologica,2009,94:428-429.
- [11] Cantorna MT, Zhu Y, Fruicu M, et al. Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D₃, and the immune system[J]. Am J Clin Nutr,2004,80:1717-1720.
- [12] Cantorna MT, Mahon BD. Mounting evidence for vitamin D as an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence[J]. Exp Biol Med (Maywood),2004,229:1136-1142.

(收稿日期:2015-10-28)