

TRAIL 和 TRAIL-R2 在重型再生障碍性贫血患者外周血 CD8⁺T 细胞的表达变化

巫进明¹ 詹昱¹ 曲佳¹ 冯可欣¹ 杨郁青¹ 谭明珠¹

[摘要] 目的:研究肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)和 TRAIL 受体 2(TRAIL-R2)在重型再生障碍性贫血(SAA)患者外周血 CD8⁺T 细胞的表达变化。方法:将初诊为 SAA 的 47 例患者作为初诊组,同期免疫抑制治疗的 41 例 SAA 患者作为缓解组,34 例健康者作为对照组。采用流式细胞术检测 3 组外周血 CD8⁺T 细胞中 TRAIL 和 TRAIL-R2 表达,采用 RT-PCR 和 Western Blot 检测 3 组外周血 CD8⁺T 细胞中 TRAIL、TRAIL-R2 mRNA 和蛋白表达水平,分析 TRAIL 和 TRAIL-R2 表达水平与 SAA 患者临床指标的关系。结果:初诊组 CD8⁺T 细胞中 TRAIL、TRAIL-R2 阳性表达率均显著低于对照组和缓解组($P<0.05$);3 组 CD8⁺T 细胞中 TRAIL、TRAIL-R2 mRNA 相对表达量比较差异均无统计学意义($P>0.05$);初诊组和缓解组 CD8⁺T 细胞中 TRAIL 和 TRAIL-R2 蛋白表达量显著低于对照组($P<0.05$);SAA 患者 CD8⁺T 细胞中 TRAIL 表达水平与中性粒细胞计数、网织红细胞百分比分别呈显著正相关关系($r=0.615, 0.703, P=0.000, 0.000$)。结论:SAA 患者外周血 CD8⁺T 细胞中 TRAIL 和 TRAIL-R2 表达降低,可能与自身免疫性 T 细胞过度激活有关,在骨髓造血功能损伤及全血细胞减少过程中发挥重要调控作用。

[关键词] 重型再生障碍性贫血;肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体;CD8⁺T 细胞

doi:10.13201/j.issn.1004-2806.2018.11.008

[中图分类号] R556.5 [文献标志码] A

Expressions of TRAIL and TRAIL-R2 in the peripheral blood CD8⁺T cells of patients with severe aplastic anemia

WU Jinming ZHAN Yu QU Jia FENG Kexin YANG Yuqing TAN Mingzhu

(Department of Hematology, the Twelfth People's Hospital of Guangzhou, Guangzhou, 510620, China)

Corresponding author: WU Jinming, E-mail: drwu12@126.com

Abstract Objective: To study the expressions of tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptor 2 (TRAIL-R2) in the peripheral blood CD8⁺T cells of patients with severe aplastic anemia (SAA). **Method:** Forty-seven patients diagnosed with SAA were used as newly diagnosed group, at the same time, 41 patients with SAA treated with immunosuppressive therapy were used as remission group and 34 healthy subjects were used as control group. Flow cytometry was used to detect the expressions of TRAIL and TRAIL-R2 in peripheral blood CD8⁺T cells of three groups, the expression levels of TRAIL, TRAIL-R2 mRNA and protein in peripheral blood CD8⁺T cells of three groups were detected by RT-PCR and Western Blot, the relationships between the expression levels of TRAIL and TRAIL-R2 with clinical indexes of SAA patients were analyzed. **Result:** The positive expression rates of TRAIL and TRAIL-R2 in CD8⁺T cells of the newly diagnosed group were significantly lower than those in the control group and the remission group ($P<0.05$); there was no significant difference in the mRNA relative expressions of TRAIL and TRAIL-R2 in CD8⁺T cells between the three groups ($P>0.05$); the protein expression levels of TRAIL and TRAIL-R2 in CD8⁺T cells in the newly diagnosed group and the remission group were significantly lower than those in the control group ($P<0.05$); the expression level of TRAIL in CD8⁺T cells of SAA patients was significantly positively correlated with absolute neutrophil count and reticulocyte percentage ($r=0.615, 0.703, P=0.000, 0.000$). **Conclusion:** The expressions of TRAIL and TRAIL-R2 in peripheral blood CD8⁺T cells of SAA patients decreased, which may be related to over activation of autoimmune T cells and plays an important regulatory role in injury of hematopoietic function in bone marrow and the process of pancytopenia.

Key words severe aplastic anemia; tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; CD8⁺T cells

¹广州市第十二人民医院血液科(广州, 510620)
通信作者:巫进明, E-mail: drwu12@126.com

重型再生障碍性贫血(severe aplastic anaemia, SAA)是因骨髓造血功能慢性持续性衰竭而导致的严重全细胞减少、骨髓造血功能降低及严重贫血、感染和出血^[1]。SAA 是自身免疫性疾病,目前研究认为过度激活的自身免疫性 T 细胞是其发病主要因素^[2]。齐薇薇等(2014)研究表明,SAA 患者外周血 CD8⁺T 细胞占淋巴细胞百分比明显升高,CD4⁺、CD25⁺等百分比明显降低,是引起 T 细胞功能亢进、免疫耐受被破坏,导致骨髓造血功能衰竭的主要机制之一。CD8⁺细胞毒性 T 细胞对骨髓造血干/祖细胞具有杀伤作用,在骨髓造血细胞凋亡中发挥重要作用,同时 SAA 患者外周血细胞中 TNF-β 等分子表达水平明显升高,研究表明高水平 TNF-β 能够进一步增强 CD8⁺细胞毒性 T 细胞诱导骨髓造血细胞凋亡^[3]。肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)是 TNF 超家族成员,可与其含有死亡结构域的跨膜受体如 TRAIL 受体 2(TRAIL receptor 2, TRAIL-R2)结合诱导细胞凋亡,在多种疾病中参与免疫细胞活化、增殖、迁移及分化^[4]。本研究通过检测 SAA 患者外周血 CD8⁺T 细胞中 TRAIL 及其受体 TRAIL-R2 的表达,旨在探讨 TRAIL 在骨髓造血细胞凋亡中的可能作用机制。

1 资料与方法

1.1 资料

选择 2014-01—2017-12 在我院初诊为 SAA 的 47 例患者作为初诊组,其中男 32 例,女 15 例;年龄 15~70 岁,平均(46.38±11.52)岁。同时选择同期经树突状免疫细胞疗法、环孢菌素和糖皮质激素等免疫抑制治疗后症状缓解患者 41 例作为缓解组,其中男 27 例,女 14 例;年龄 11~65 岁,平均(44.97±10.83)岁。另选 34 例健康志愿者作为对照组,其中男 18 例,女 16 例;年龄 23~70 岁,平均(45.69±12.35)岁。3 组患者性别、年龄差异均无统计学意义(均 $P>0.05$),具有可比性。

纳入标准:①SAA 患者诊断标准符合中华医学会血液学分会红细胞疾病学组《再生障碍性贫血诊断治疗专家共识》;②所有患者染色体核型正常;③经医院伦理委员会批准,所有受试者自愿签署知情同意书。排除标准:①先天性 AA 患者;②骨髓增生异常综合征、阵发性睡眠性血红蛋白尿症等克隆性疾病患者。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂 别藻青蛋白(APC)标记的鼠抗人 CD3(CD3-APC),藻红蛋白(PE)标记的鼠抗人 CD3(CD3-PE),异硫氰酸荧光素(FITC)标记的鼠抗人 CD8(CD8-FITC),PE 标记的鼠抗人穿孔素,APC 标记的鼠抗人颗粒酶 B,PE 标记的鼠抗人

TRAIL(TRAIL-PE),APC 标记的鼠抗人 TRAIL-R2(TRAIL-R2-APC),鼠抗人 TRAIL 单克隆抗体,鼠抗人 TRAIL-R2 单克隆抗体均购自美国 BD pharmingen 公司。人外周血淋巴细胞分离液,TRIZOL 试剂盒,反转录试剂盒,细胞蛋白提取试剂盒,BCA 蛋白检测试剂盒均购于北京索莱宝科技有限公司。TRAIL 上游引物:5'-ACCAAC-GAGCTGAAGCAGAT-3',下游引物:5'-TCCTT-GATGATTCCCAGGAG-3',TRAIL-R2 上游引物:5'-CGCTGCACCAGGTGTGATT-3',下游引物:5'-GTGCCGCTTCGCACTGACA-3',内参 GAPDH 上游引物:5'-GGAGCGAGATCCCTC-CAAAT-3',下游引物:5'-GGCTGTTGT-CATACTTCTCATGG-3'。

1.2.2 流式细胞术 分别采集受试者外周血 3 ml,采用流式细胞术检测外周血 CD8⁺T 细胞中 TRAIL、TRAIL-R2 表达水平,操作方法参考文献[5]。

1.2.3 CD8⁺T 细胞分离纯化 采集受试者外周血,采用人外周血淋巴细胞分离液密度梯度离心法分离 3 组受试者外周血单核细胞,采用磁化细胞分离器分离法(MACS)分离外周血单核细胞 CD8⁺T 细胞,流式细胞术检测分选 CD8⁺T 细胞纯度,保存细胞。

1.2.4 RT-PCR 取上述保存 CD8⁺T 细胞,采用 TRIZOL 试剂盒提取总 RNA,经反转录后 RT-PCR 检测 TRAIL mRNA 和 TRAIL-R2 mRNA 相对表达量。

1.2.5 Western Blot 取上述纯化 CD8⁺T 细胞,采用试剂盒法提取总蛋白,BCA 试剂盒检测蛋白浓度。经聚丙烯酰胺凝胶电泳后转至硝酸纤维素膜,封膜,与稀释后的一抗(1:2000)室温下孵育 1~2 h,TBS 冲洗 2 次,10 min/次,然后与稀释后二抗室温下孵育 1~2 h,同上经 TBS 冲洗后,在 DAB 溶液中显影,拍照,分析图像。

1.3 统计学处理

采用 SPSS22.0 进行数据分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析(F)进行多组比较,LSD-*t* 检验进行两两比较,采用 Pearson 相关系数(*r*)法进行相关性分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组临床指标比较

与对照组比较,初诊组中性粒细胞计数(ANC)、血小板计数(PLT)、网织红细胞百分比(Re%)及血红蛋白(Hb)均显著降低($P<0.05$);3 组 ANC、PLT、Ret% 及 Hb 比较差异有统计学意义($P<0.05$)。详见表 1。

表 1 3 组临床指标比较

| 组别 | 例数 | ANC/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$) | PLT/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$) | Ret/% | Hb/($g \cdot L^{-1}$) |
|-----|----|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| 对照组 | 34 | 3.16 \pm 1.02 | 245.93 \pm 74.47 | 1.92 \pm 0.61 | 133.61 \pm 39.86 |
| 缓解组 | 41 | 2.84 \pm 0.91 | 134.81 \pm 41.23 | 2.12 \pm 0.67 | 129.14 \pm 34.58 |
| 初诊组 | 47 | 0.57 \pm 0.17 ¹⁾ | 15.75 \pm 4.69 ¹⁾ | 0.37 \pm 0.09 ¹⁾ | 72.50 \pm 15.73 ¹⁾ |

与对照组比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。

2.2 3 组 CD8⁺ T 细胞中 TRAIL、TRAIL-R2 表达水平比较

初诊组 CD8⁺ T 细胞中 TRAIL 阳性表达率为 (5.57 \pm 1.68)%, 显著低于对照组 (10.34 \pm 3.25)% 和缓解组 (11.98 \pm 3.94)% ($P < 0.05$); 初诊组 CD8⁺ T 细胞中 TRAIL-R2 阳性表达率为 (2.69 \pm 0.82)%, 显著低于对照组 (3.82 \pm 1.07)% 和缓解组 (4.21 \pm 1.36)% ($P < 0.05$); 缓解组 CD8⁺ T 细胞中 TRAIL 和 TRAIL-R2 阳性表达率均高于对照组, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 3 组 CD8⁺ T 细胞中 TRAIL、TRAIL-R2 mRNA 相对表达量比较

对照组、缓解组、初诊组 CD8⁺ T 细胞中 TRAIL mRNA 相对表达量分别为 (2.81 \pm 0.93)、(2.53 \pm 0.76)、(2.65 \pm 0.81), TRAIL-R2 mRNA

相对表达量分别为 (1.09 \pm 0.31)、(0.96 \pm 0.26)、(1.01 \pm 0.28), 3 组 CD8⁺ T 细胞中 TRAIL、TRAIL-R2 mRNA 相对表达量比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 3 组 CD8⁺ T 细胞中 TRAIL、TRAIL-R2 蛋白表达水平比较

初诊组和缓解组 CD8⁺ T 细胞中 TRAIL 蛋白表达量分别为 (0.47 \pm 0.13)、(0.53 \pm 0.16), 显著低于对照组 (0.89 \pm 0.24) ($P < 0.05$); 初诊组和缓解组 CD8⁺ T 细胞中 TRAIL-R2 蛋白表达量分别为 (0.68 \pm 0.19)、(0.75 \pm 0.23), 显著低于对照组 (0.94 \pm 0.30) ($P < 0.05$); 初诊组和缓解组 CD8⁺ T 细胞中 TRAIL、TRAIL-R2 蛋白表达水平比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。详见图 1。

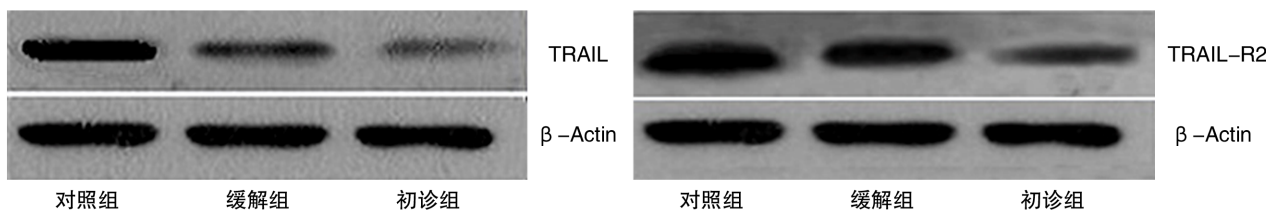


图 1 Western Blot 分析 3 组 CD8⁺ T 细胞中 TRAIL、TRAIL-R2 蛋白表达水平

2.5 SAA 患者 CD8⁺ T 细胞中 TRAIL 表达水平与临床指标的关系

SAA 患者 CD8⁺ T 细胞中 TRAIL 表达水平与 ANC、Ret% 分别呈显著正相关关系 ($r = 0.615$ 、 0.703 , $P = 0.000$ 、 0.000), 而与 Hb、PLT 无相关关系 ($r = 0.286$ 、 0.147 , $P = 0.134$ 、 0.352)。

3 讨论

TRAIL 是一种与 Fas/FasL 高度同源的跨膜蛋白, 研究表明 Fas/FasL 能够与死亡受体 TNFRSF6/FAS 结合, 在 T 细胞发育中介导其细胞毒性引起的凋亡, 在 SAA 免疫发病中发挥重要作用^[6]。TRAIL 能够与 4 种跨膜受体 (TRAIL-R1、TRAIL-R2、DcR1 和 DcR2) 结合, 在各种细胞生物学活性中起调节作用。Zauli 等^[7] 研究表明, 重组人 TRAIL 治疗能够改善 I 型糖尿病的严重程度, 而 TRAIL 缺陷则会导致小鼠自身免疫功能过度而易患关节炎和糖尿病。多项研究证实, TRAIL 途径被抑制与自身免疫性疾病如关节炎、多发性硬化

和脑萎缩等的发生、发展及不良预后有关^[8-9]。SAA 以骨髓造血细胞减少和全血细胞减少为主要特征, 以往研究多关注 TRAIL 诱导的骨髓单个核细胞凋亡在 SAA 发病中的作用。张娟等^[10] 研究报道, 经 TRAIL 抗体治疗的患者骨髓单个核细胞凋亡率明显低于未治疗 SAA 患者, 提示 TRAIL 诱导的骨髓单个核细胞凋亡在 SAA 发病中具有一定意义。近年来研究发现, TRAIL 在活化 T 细胞中表达, 可能与 T 细胞介导的靶细胞凋亡和诱导细胞死亡有关^[11]。Liu 等^[12] 研究报道, TRAIL 在 SAA 患者外周血 CD8⁺ T 细胞中表达降低, 与毒性 T 细胞凋亡呈负相关关系, 提示 TRAIL 通路受阻可能是毒性 T 细胞异常激活的重要原因。

本研究通过流式细胞术检测 SAA 患者、经免疫抑制剂治疗后 SAA 患者和健康者外周血 CD8⁺ T 细胞 TRAIL 及其受体 TRAIL-R2 表达, 结果发现 SAA 患者和健康者外周血 CD8⁺ T 细胞中均有 TRAIL 和 TRAIL-R2 表达, 但 SAA 患者 CD8⁺ T

细胞中 TRAIL 阳性表达率显著低于对照组和缓解组,而缓解组和对照组差异无统计学意义,与 Liu 等研究结果一致,证实 TRAIL 在活化 CD8⁺T 细胞中表达,SAA 患者 CD8⁺T 细胞中 TRAIL 阳性表达降低可能与其过度激活有关。不同的是本研究结果 SAA 患者 CD8⁺T 细胞中 TRAIL-R2 阳性表达率也显著低于对照组和缓解组。RT-PCR 检测 TRAIL 和 TRAIL-R2 mRNA 相对表达量,发现 3 组 TRAIL 和 TRAIL-R2 mRNA 相对表达量差异均无统计学意义,但 Western Blot 检测结果发现 SAA 患者和治疗后 SAA 患者 CD8⁺T 细胞中 TRAIL 和 TRAIL-R2 蛋白表达量均显著低于对照组,提示 TRAIL 及其受体 TRAIL-R2 可能介导 SAA 患者 CD8⁺T 细胞凋亡,经治疗后 SAA 患者可能出现暂时的过度自身免疫后 CD8⁺T 细胞中 TRAIL 表达恢复正常,由其介导的 CD8⁺T 细胞凋亡,骨髓造血功能逐渐恢复。多项研究证实,SAA 患者外周血活化 CD8⁺细胞毒性 T 细胞中颗粒酶 B、穿孔素、TNF- β 、FasL 等杀伤分子表达水平明显升高,证实活化 CD8⁺细胞毒性 T 细胞可通过颗粒酶 B 途径、穿孔素、TNF- β 途径及 Fas/FasL 途径损伤患者骨髓造血功能^[13]。本研究初步分析结果,SAA 患者 CD8⁺T 细胞中 TRAIL 表达水平与 ANC 和 Ret% 呈显著正相关关系,说明 CD8⁺T 细胞中 TRAIL 低表达与患者中性粒细胞和网织红细胞减少密切相关,初步说明 TRAIL 低表达可能参与 SAA 患者发病过程,但其与活化 CD8⁺细胞毒性 T 细胞诱导骨髓造血细胞凋亡途径的关系有待进一步研究。

综上所述,SAA 患者 CD8⁺T 细胞表面 TRAIL 和 TRAIL-R2 表达降低可能与 CD8⁺T 细胞异常激活有关,TRAIL 系统被抑制可能促进 CD8⁺细胞毒性 T 细胞激活,进而促进 CD8⁺细胞毒性 T 细胞分泌杀伤因子,导致骨髓造血细胞凋亡。而经免疫抑制治疗后,CD8⁺T 细胞表面 TRAIL 表达恢复正常,抑制 CD8⁺细胞毒性 T 细胞激活并促进其凋亡,实现恢复骨髓造血功能。本研究仅初步分析 TRAIL 和 TRAIL-R2 在 SAA 患者外周血 CD8⁺T 细胞中的表达水平及可能作用,其调控机制及途径有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] Yamazaki H. Acquired aplastic anemia [J]. Rinsho Ketsueki, 2016, 57: 91-97.
- [2] Xing L, Liu C, Fu R, et al. CD8+HLA-DR+ T cells are increased in patients with severe aplastic anemia [J]. Mol Med Rep, 2014, 10: 1252-1258.
- [3] 刘晓,付蓉,王珺,等. 肿瘤坏死因子- β 对重型再生障碍性贫血患者效应 T 细胞损伤骨髓造血的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2012, 28(6): 544-547.
- [4] Singh AJ, Khosravi-Far R. TNF-related apoptosis-inducing ligand [J]. Encyclopedia Cancer, 2017, 2017: 3709-3713.
- [5] 陈朱波,曹雪涛. 流式细胞术:原理、操作及应用[M]. 2 版. 北京:科学出版社, 2014: 67-152.
- [6] 刘春燕,郑萌颖,付蓉,等. 重型再生障碍性贫血细胞毒性 T 细胞免疫攻击靶点的体外实验[J]. 中华医学杂志, 2016, 96(22): 1728-1732.
- [7] Zauli G, Toffoli B, Di IM, et al. Treatment with recombinant tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand alleviates the severity of streptozotocin-induced diabetes [J]. Diabetes, 2010, 59: 1261-1265.
- [8] Audo R, Daien C, Papon L, et al. Osteoprotegerin and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand as prognostic factors in rheumatoid arthritis: results from the ESPOIR cohort [J]. Arthritis Res Ther, 2015, 17: 193.
- [9] Tawdy MH, Abd El Nasser MM, Abd El Shafy SS, et al. Role of serum TRAIL level and TRAIL apoptosis gene expression in multiple sclerosis and relation to brain atrophy [J]. J Clin Neurosci, 2014, 21: 1606-1611.
- [10] 张娟,张秀莲,张伟华,等. 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体诱导的细胞凋亡在再生障碍性贫血发病中的意义[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2014(5): 825-829.
- [11] Lehnert C, Weiswange M, Jeremias I, et al. TRAIL-receptor costimulation inhibits proximal TCR signaling and suppresses human T cell activation and proliferation [J]. J Immunol, 2014, 193: 4021-4031.
- [12] Liu C, Zheng M, Zhang T, et al. TRAIL in CD8⁺T cells from patients with severe aplastic anemia [J]. Int J Hematol, 2017, 106: 490-499.
- [13] 刘春燕,付蓉,王珺,等. 重型再生障碍性贫血患者 CD8+HLA-DR+T 淋巴细胞效应因子 mRNA 的表达 [J]. 中华医学杂志, 2012, 92(18): 1240-1243.

(收稿日期:2018-05-03)