

输血相关性急性肺损伤患者调节性 T 细胞亚群 与细胞因子的相关性研究

陶书超¹ 闫瑛¹

[摘要] **目的:**研究输血相关性急性肺损伤(TRALI)患者调节性 T 细胞亚群(Treg)与细胞因子的相关性。**方法:**收集 2020 年 1 月—2021 年 2 月收治的 TRALI 患者 43 例,选取同期接受输血治疗未出现急性肺损伤患者(非 TRALI 组)和进行体检健康自愿者(健康组)各 40 例,采集受试者外周静脉血,采用流式细胞仪测定血液中 T 淋巴亚群分布及 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞因子表达,并进行数据分析。**结果:**3 组 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺T 细胞分布均差异无统计学意义($P>0.05$);健康组和非 TRALI 组外周血 CD3⁺CD8⁺、CD4⁺CD25⁺Treg、CD4⁺/CD8⁺ 的差异无统计学意义($t=0.461, 0.240, 0.631, P>0.05$),与健康组和非 TRALI 组比较,TRALI 组 CD3⁺CD8⁺、CD4⁺CD25⁺Treg 细胞占比明显增加($P<0.05$),而 CD4⁺/CD8⁺ 明显降低($P<0.05$);健康组与非 TRALI 组外周血单个核细胞上清液 TGF- β 1、IL-10 表达水平差异无统计学意义($P>0.05$),与健康组与非 TRALI 组比较,TRALI 组 TGF- β 1、IL-10 水平明显升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);相较于存活组,TRALI 死亡患者外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 占比及 IL-10、TGF- β 1 表达水平升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);Pearson 相关性分析结果显示,TRALI 组患者外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 分布与 TGF- β 、IL-10 呈显著正相关($r=0.830, 0.159, P<0.05$)。 **结论:**TRALI 患者外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞占比升高,通过上调细胞因子表达而发挥免疫抑制作用,早期监测 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞及其细胞因子表达可为 TRALI 预后评估和临床干预措施提供参考。

[关键词] 输血相关性急性肺损伤; Treg 细胞; TGF- β 1; IL-10; 预后

DOI:10.13201/j.issn.1004-2806.2021.08.012

[中图分类号] R457.1 **[文献标志码]** A

Study on the correlation between regulatory T cell subsets and cytokines in patients with blood transfusion-related acute lung injury

TAO Shuchao YAN Ying

(Department of Blood Transfusion, First People's Hospital of Zaoyang City, Zaoyang, 441299, China)

Abstract Objective: To study the correlation between regulatory T cell subsets(Treg) and cytokines in patients with transfusion-related acute lung injury(TRALI). **Methods:** We collected 43 TRALI patients who admitted to our hospital from January 2020 to February 2021. At the same time, 40 cases of patients with no acute lung injury(non-TRALI group) and healthy volunteers(healthy group) in the physical examination department were selected during the same period. The peripheral venous blood of the subjects was collected and the T lymphocytes in the blood were measured by flow cytometry. Population distribution and CD4⁺CD25⁺Treg cytokine expression, and data analysis. **Results:** There was no significant difference in the distribution of CD3⁺, CD3⁺CD4⁺T cells in the 3 groups($P>0.05$). There was no significant difference in the peripheral blood CD3⁺CD8⁺, CD4⁺CD25⁺Treg, CD4⁺/CD8⁺ between the healthy group and the non-TRALI group($t=0.461, 0.240, 0.631, P>0.05$). Compared with healthy group and non-TRALI group, the proportion of CD3⁺CD8⁺, CD4⁺CD25⁺Treg cells in TRALI group increased significantly($P<0.05$), while CD4⁺/CD8⁺ significantly reduced($P<0.05$). The expression levels of TGF- β 1 and IL-10 in the PBMNC supernatant of the healthy group and the non-TRALI group were not significantly different($P>0.05$). Compared with the healthy group and the non-TRALI group, the TGF of the TRALI group- β and IL-10 levels were significantly increased($P<0.05$). Compared with the survival group, the proportion of CD4⁺CD25⁺Treg in the peripheral blood of patients who died of TRALI and the expression of IL-10 and TGF- β 1 significantly increased($P<0.05$). Pearson correlation analysis showed that the distribution of CD4⁺CD25⁺Treg in the peripheral blood of the TRALI group was significantly positively correlated with TGF- β 1 and IL-10($r=0.830, 0.159, P<0.05$). **Conclusion:** The proportion of CD4⁺CD25⁺Treg cells in the peripheral blood of TRALI patients is increased, which exerts an immunosuppressive effect by up-regulating the expression of cytokines. Early monitoring of CD4⁺CD25⁺Treg cells and their cytokine expression can provide reference for prognostic evaluation of TRALI and clinical intervention measures.

Key words blood transfusion-related acute lung injury; Treg cells; TGF- β 1; IL-10; prognosis

¹ 枣阳市第一人民医院输血科(湖北枣阳,441299)

输血相关性急性肺损伤(blood transfusion-related acute lung injury, TRALI)是输血过程中或输血后 6 h 内出现的急性肺损伤,以急性非心源性肺水肿、突发呼吸困难、低氧血症等为主要特征,其病死率高达 34%,已成为输血相关性死亡的主要原因^[1]。TRALI 发病机制未完全阐明,但基础临床研究表明 TRALI 发病早期就存在免疫抑制^[2]。CD4⁺CD25⁺Treg 细胞为近年发现的具有免疫抑制功能的细胞亚群,可通过其表面的转化生长因子(TGF)- β 1、白介素(IL)-10 等细胞因子发挥免疫负向调节作用而抑制 T 细胞,是维持外周免疫耐受的关键细胞^[3-4]。但 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞及其细胞因子在 TRALI 患者外周血中表达的研究鲜见报道,为此,本研究探讨 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞及其细胞因子表达与 TRALI 的关系,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 资料

收集 2020 年 1 月—2021 年 2 月我院收治的 TRALI 患者 43 例,其中男 26 例,女 17 例;年龄 23~50(38.51 \pm 7.20)岁;创伤性大失血 23 例(脑外伤和脑血管意外 15 例,外伤性脾破裂 6 例,股血管损伤 2 例),术后出血 20 例(产后出血 11 例,剖腹产术后 5 例,子宫切除术后 4 例);TRALI 诊断参照 2005 年美国国家心肺血液研究所制定的 TRALI 诊断标准^[5]。选取同期接受输血治疗未出现急性肺损伤患者和体检健康自愿者各 40 例,设为非 TRALI 组和健康组,非 TRALI 组男 22 例,女 18 例,年龄 22~49(38.31 \pm 7.15)岁,其中创伤性大失血 21 例(脑外伤和脑血管意外 13 例,外伤性脾破裂 5 例,股血管损伤 3 例),术后出血 19 例(产后出血 8 例,剖腹产术后 6 例,子宫切除术后 5 例);健康组男 23 例,女 17 例,年龄 23~49(38.46 \pm 7.31)岁。3 组均排除风湿免疫性疾病、恶性肿瘤、感染及接受过免疫抑制治疗,受试对象性别、年龄等资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),具可比性。

1.2 方法

1.2.1 材料与仪器 FACS calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司);全自动酶标仪(美国 Bio-Rad 公司 3550UV 型);淋巴细胞分离液(北京百奥莱博科技有限公司);胎牛血清(GIBCO 公司,10099141C);

RPMI Medium 1640(北京索莱宝生物有限公司);CD3PE/CD4 FITC/CD8APC/FITC 抗人 CD4 mAb 抗体/PE 抗人 CD25mAb 抗体均购自美国 invitrogen 公司;TGF- β 1、IL-10 酶联免疫试剂盒购自美国 eBioscience 公司。

1.2.2 T 细胞亚群分析 采集受试者外周静脉血 10 mL,取 50 μ L 按照 Ficoll 密度梯度离心法分离外周血单个核细胞(PBMNC),并以 50 mL 10%胎牛血清(含 RPMI 1640)溶液重悬细胞,分别加入 CD3PE/CD4FITC/CD8APC,4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,PBS 洗涤后上流式细胞仪检测。测定 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺、CD4⁺CD25⁺Treg 淋巴细胞亚群分布情况。

1.2.3 CD4⁺CD25⁺Treg 检测 取上述 PBMNC 混悬液,1500 r/min 离心 10 min,滴加 20 μ L FITC 抗人 CD4 mAb 抗体、PE 抗人 CD25 mAb 抗体进行标记,加入固定/破膜剂,4 $^{\circ}$ C 室温环境孵育 30 min,PBS 洗涤,上流式细胞仪检测。

1.2.4 PBMNC 检测 上清液中 TGF- β 1、IL-10 检测取上述 PBMNC 混悬液,1500 r/min 离心 10 min 后取上清液,采用酶联免疫法测定 TGF- β 1、IL-10 含量,采用分光光度计进行读数。

1.2.5 临床指标分析 收集 TRALI 组患者氧合指数、Murray 肺损伤评分、血红蛋白计数、白细胞计数等临床指标,记录患者预后。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验,多组间的方差分析;计数资料以例(%)表示,采用 χ^2 检验,相关性采用 Pearson 相关性分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组外周血 T 淋巴细胞亚群分布

3 组 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺T 细胞分布均差异无统计学意义($P>0.05$);健康组和非 TRALI 组外周血 CD3⁺CD8⁺、CD4⁺CD25⁺Treg、CD4⁺/CD8⁺ 的差异无统计学意义($t = 0.461$ 、 0.240 、 0.631 , $P>0.05$),与健康组和非 TRALI 组比较,TRALI 组 CD3⁺CD8⁺、CD4⁺CD25⁺Treg 细胞占比明显增加($P<0.05$),而 CD4⁺/CD8⁺ 明显降低($P<0.05$),见表 1。

表 1 3 组受试者外周血 T 淋巴细胞亚群分布

组别	例数	CD3 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
健康组	40	64.21 \pm 9.85	46.32 \pm 8.61	20.35 \pm 4.16	25.34 \pm 3.93	2.40 \pm 0.51
非 TRALI 组	40	63.75 \pm 8.76	44.95 \pm 7.43	21.10 \pm 3.97	26.82 \pm 4.26	2.34 \pm 0.42
TRALI 组	43	62.41 \pm 9.05	43.59 \pm 8.05	28.41 \pm 6.10	38.96 \pm 7.05	1.50 \pm 0.27
F		0.168	0.840	4.591	5.037	4.319
P		0.341	0.576	0.027	0.010	0.036

2.2 3 组 CD4⁺CD25⁺Treg 相关细胞因子表达

健康组与非 TRALI 组 PBMNC 上清液 TGF-β1、IL-10 表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 与健康组和非 TRALI 组比较, TRALI 组 TGF-β、IL-10 水平明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.3 不同预后 TRALI 患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ Treg 占比及细胞因子表达情况

TRALI 组 43 例患者中死亡 35 例, 存活 8 例; 相比于存活组, TRALI 死亡患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ Treg 占比及 IL-10、TGF-β1 表达水平升高,

差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 2 3 组受试者 PBMNC 上清液 CD4⁺ CD25⁺ Treg 相关细胞因子表达

组别	例数	$\bar{x} \pm s$	
		TGF-β1/ (ng · mL ⁻¹)	IL-10/ (pg · mL ⁻¹)
健康组	40	23.15 ± 6.05	10.53 ± 2.40
非 TRALI 组	40	50.10 ± 8.49	11.09 ± 2.61 ¹⁾
TRALI 组	43	48.25 ± 9.62	39.51 ± 6.73
F		5.168	8.720
P		0.024	<0.001

表 3 不同预后 TRALI 患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ Treg 占比及细胞因子表达情况

组别	例数	$\bar{x} \pm s$		
		CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg/%	TGF-β1/(ng · mL ⁻¹)	IL-10/(pg · mL ⁻¹)
存活组	8	30.28 ± 8.43	20.20 ± 5.37	35.37 ± 5.29
死亡组	35	46.16 ± 7.52	26.51 ± 4.79	43.16 ± 6.84
t		5.375	4.861	5.994
P		0.026	0.035	0.012

2.4 相关性分析

Pearson 相关性分析显示, TRALI 组患者外周血 CD4⁺CD25⁺ Treg 分布与 TGF-β、IL-10 呈显著正相关 ($r = 0.830, 0.159, P < 0.05$)。

3 讨论

TRALI 为输血治疗围术期最常见并发症, 具有起病急骤、病情凶险、病死率高、预后效果差等特点, 其主要由于输血过程中肺血管的通透性增加, 导致患者出现急性呼吸困难, X 线提示双侧对称肺水肿、弥漫性肺浸润病变。TRALI 临床症状多不典型, 特异性低, 且缺乏特异性实验室指标, 导致临床诊断和治疗难度大, 病死率高^[6]。而目前国内 TRALI 文献报道较少, 对其尚处于认知阶段, 因此, 本研究就 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞及其细胞因子与 TRALI 发病的关系作探讨, 旨在为 TRALI 的临床诊断和预后评估提供参考。

CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞为新型专职免疫抑制性调节细胞, 可通过表达 CD4 分子、CD25 分子和高表达转录因子 Foxp3, 产生免疫抑制作用, 介导 T 细胞向 Th2 漂移, 调节 Th1/Th2 细胞平衡, 在维持机体的免疫耐受中具有重要作用^[7-8]。本研究结果显示, 与健康组和非 TRALI 组比较, TRALI 组 CD3⁺CD8⁺、CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞占比明显增加 ($P < 0.05$), 而 CD4⁺/CD8⁺ 细胞占比明显降低 ($P < 0.05$), 同时, 健康组与非 TRALI 组 PBMNC 上清液 TGF-β1、IL-10 表达水平无明显差异 ($P > 0.05$), 与健康组和非 TRALI 组比较, TRALI 组 TGF-β1 水平明显降低, 而 IL-10 水平明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示 TRALI 患者存在 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞介导的免疫抑制, 与胡媛

等^[9]报道结果一致。根据“双重打击学说”, 患者在受严重外伤、大创伤性手术和大量失血等应激源刺激下, 机体会产生过度炎症反应, 活化中性粒细胞, 并经肺循环聚集于肺部; 而大量输血过程中血制品中血小板碎片、白细胞及变性蛋白等形成的微聚物、异物免疫成分易与患者血液循环中免疫成分形成免疫排斥, 促进中性粒细胞趋化作用增强, 加重肺微循环紊乱, 导致肺泡上皮细胞和肺血管内皮细胞损伤, 使患者出现低氧血症、肺水肿和呼吸窘迫综合征^[10]。而在大量输血早期即存在肺 Th1/Th2 细胞因子的失衡, CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞可能通过表达 IL-10、TGF-β 而发挥机体自身免疫作用, 导致全身性免疫紊乱。本研究中 Pearson 相关性分析结果显示, TRALI 组患者外周血 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞分布与 TGF-β1、IL-10 呈显著正相关 ($r = 0.830, 0.159, P < 0.05$), 再次证实 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞通过上调 TGF-β1、IL-10 表达水平发挥免疫抑制作用。此外, 本研究还发现, 相较于存活组, TRALI 死亡患者外周血 CD4⁺CD25⁺ Treg 占比及 IL-10、TGF-β1 表达水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞占比高及其高表达预示着 TRALI 患者不良预后, CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞可能成为免疫阻断的新靶点, 同时为 TRALI 疗效评估提供参考。

综上所述, TRALI 患者外周血 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞占比升高, 其通过上调细胞因子表达而发挥免疫抑制作用, 早期监测 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞及其细胞因子表达可为 TRALI 预后评估和临床干预措施提供参考。

时可减少新输入血液的免疫原性,减少对红细胞的破坏,从而改善患者凝血-纤溶功能的影响。但目前国内对于其具体机制的研究较为少见,尚未有明确阐释,故仍有待于后续进一步研究。在输血安全性方面,本研究结果显示输血组发热、过敏反应以及紫癜总发生率明显低于置换组,提示去白细胞红细胞悬液输血安全性更高。输血患者发生不良反应的原因与受血者被动接受部分炎性因子而产生排斥反应、供血者的白细胞进入受血者体内出现抗体免疫识别等因素有关。既往研究还表明异体不相容的白细胞抗原是影响输血安全性的重要因素,而去白细胞红细胞悬液输血对于血小板、白细胞的清除率高达 95% 以上,可有效降低输血不良反应;同时马会敏等^[13]研究表明该输血方式还可降低患者体内 NK 细胞活性,增强免疫功能,从而抑制输血不良反应。

综上所述,去白细胞红细胞悬液输血与血浆置换应用于 AIHA 患者治疗均具有较好的效果,但前者对于患者的凝血-纤溶功能改善效果更好,同时输血安全性更高,值得临床推荐应用。但本研究仍存在不足之处,AIHA 患者存在多种分型,受样本量和研究时间的限制,本研究未针对不同分型的治疗效果作进一步分析,这也是下一步研究方向。

参考文献

[1] 张秋会,胡兴斌,安群星,等.多种红细胞抗原相合性输血在自身免疫性溶血性贫血患者中的临床应用[J].临床血液学杂志,2020,33(2):87-89.
 [2] Hill QA, Hill A, Berentsen S. Defining autoimmune hemolytic anemia: a systematic review of the terminology used for diagnosis and treatment[J]. Blood Adv, 2019, 3(12): 1897-1906.
 [3] Barcellini W, Fattizzo B, Zaninoni A. Current and e-

merging treatment options for autoimmune hemolytic anemia[J]. Expert Rev Clin Immunol, 2018, 14(10): 857-872.
 [4] 李宇红,邵晓珊,蒋新辉.血浆置换治疗儿童自身免疫性溶血性贫血专家共识解读[J].中华实用儿科临床杂志,2018,33(15):1144-1147.
 [5] 郑强.去白细胞红细胞悬液输血及自体血液回输在非溶血性发热性输血反应中的临床应用[J].武警后勤学院学报(医学版),2015,24(11):886-888.
 [6] 中华医学会血液学分会红细胞疾病(贫血)学组.自身免疫性溶血性贫血诊断与治疗中国专家共识(2017年版)[J].中华血液学杂志,2017,38(4):265-267.
 [7] 金伟媚,江锦红,方炳木.利妥昔单抗联合常规治疗自身免疫性溶血性贫血的疗效观察[J].药物流行病学杂志,2017,26(04):230-233.
 [8] Chen C, Wang L, Han B, et al. Autoimmune hemolytic anemia in hospitalized patients: 450 patients and their red blood cell transfusions[J]. Medicine (Baltimore), 2020, 99(2): e18739.
 [9] 阎羽欣,陈广洁.适应性免疫细胞在自身免疫性溶血性贫血发病机制中的研究进展[J].中国免疫学杂志,2020,36(11):1392-1396.
 [10] 李玖平,陈利红,杨浩莹.自身免疫性溶血性贫血对输血前血型鉴定、抗体筛查及交叉配血的影响[J].实用临床医药杂志,2017,21(9):199-201.
 [11] Anani W, Wucinski J, Baumann Kreuziger L, et al. Therapeutic plasma exchange in refractory warm autoimmune hemolytic anemia[J]. Transfusion, 2017, 57(6):1336.
 [12] 李宇红,邵晓珊,新辉.血浆置换治疗儿童自身免疫性溶血性贫血专家共识解读[J].中华实用儿科临床杂志,2018,33(15):1144-1147.
 [13] 马会敏,史景莉,许秀兰,等.红细胞悬液中致热源性细胞因子对非溶血性发热性输血反应发生的影响[J].中国卫生检验杂志,2017,27(11):1566-1568.
 (收稿日期:2020-11-24)

(上接第 578 页)

参考文献

[1] 孙小茜.输血相关性急性肺损伤患者血清 B 型钠尿肽的表达水平与肺损伤的相关性分析[J].中国医师进修杂志,2021,44(4):357-361.
 [2] 李锐,黄宇光.输血相关急性肺损伤的免疫机制[J].中国临床药理学与治疗学,2013,18(5):575-579.
 [3] Walter GJ, Fleskens V, Frederiksen KS, et al. Phenotypic, Functional, and Gene Expression Profiling of Peripheral CD45RA+ and CD45RO+ CD4+CD25+ CD127low Treg Cells in Patients With Chronic Rheumatoid Arthritis[J]. Arthritis Rheumatology, 2016, 68(1):103-116.
 [4] 张义东,王青青. CD4+ CD25+ Foxp3+ 调节性 T 细胞在 HDCP 外周血中水平变化及其意义[J].中国免疫学杂志,2015,31(9):1253-1256.
 [5] Toy P, Popovsky MA, Abraham E, et al. Transfusion-related acute lung injury: definition and review[J].

Crit Care Med, 2005, 33(4): 721-726.
 [6] 卞成蓉,刘佳,陈霖,等.慢性丙型肝炎患者 CD4+ CD25+ Treg 细胞与自身抗体的相关性研究[J].检验医学与临床,2016,13(4):24-26,29.
 [7] 卞成蓉,刘佳,陈霖,等. CD4+ CD25+ Treg 细胞对慢性丙型肝炎患者干扰素治疗疗效预判作用研究[J].军事医学,2015,39(9):725-728.
 [8] 魏明,涂玲,梁颖红,等.输血相关性急性肺损伤患者免疫调节性 T 淋巴细胞表达与预后的关系[J].广东医学,2013,34(5):726-728.
 [9] 胡媛,陈唯韫,黄宇光.输血相关急性肺损伤发病机制及防治措施研究进展[J].中国医学科学院学报,2020,42(5):674-680.
 [10] 江颖,庄远,孙桂香,等.输血相关急性肺损伤的研究进展[J].解放军医学院学报,2020,41(8):826-829,853.
 (收稿日期:2021-06-22)