

网络出版时间: 2019-8-12 17:31 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20190812.1006.015.html>

CD8⁺ CD28⁻ 调节性 T 细胞及血小板特异性自身抗体在免疫性血小板减少症中的表达

张小侠, 张美玲, 杨明珍

摘要 目的 检测免疫性血小板减少症 (ITP) 患者外周血中 CD8⁺ CD28⁻ 调节性 T 细胞 (Treg)、血小板特异性自身抗体、细胞因子的表达水平, 分析其在 ITP 发病机制以及临床治疗中的意义。方法 73 例 ITP 患者分为激素治疗组 ($n=42$)、重组人血小板生成素 (rhTPO) 治疗组 ($n=31$), 并根据治疗效果分为有效组和无效组。流式细胞术检测患者治疗前后外周血 CD8⁺ CD28⁻ Treg 的表达, 流式微球技术检测患者外周血小板特异性自身抗体的表达。ELISA 法检测患者治疗前后转化生长因子 (TGF)- β 1、白介素 (IL)-4 和干扰素 (IFN)- γ 表达水平。以 30 例健康体检者作为正常对照组。结果 ① 73 例 ITP 患者治疗前 CD8⁺ CD28⁻ Treg 及细胞因子 IL-4、TGF- β 1 的表达低于正常对照组, IFN- γ 表达高于正常对照组 ($P<0.05$), 激素及 rhTPO 治疗后有效组 CD8⁺ CD28⁻ Treg、IL-4、TGF- β 1 的表达均比治疗前显著上升, IFN- γ 的表达较治疗前显著降低 ($P<0.05$)。无效组 CD8⁺ CD28⁻ Treg、IFN- γ 、IL-4、TGF- β 1 的表达和治疗前相比均未有明显变化。② 根据受试者工作特征曲线 (ROC), 激素组治疗前 CD8⁺ CD28⁻ Treg 的临界值为 14.35, 此时预测激素疗效的敏感性和特异性分别为 66.7% 和 73.3%。27 例有效者中小于 14.35 的有 18 例 (66.7%), 15 例无效者中大于 14.35 的有 11 例 (73.3%)。rhTPO 组治疗前 CD8⁺ CD28⁻ Treg 的临界值为 15.45, 此时预测 rhTPO 疗效的敏感性和特异性分别为 63.6% 和 88.9%。22 例有效者中大于 15.45 的有 14 例 (63.6%), 9 例无效者中小于 15.45 的有 8 例 (88.9%)。③ 激素组抗血小板膜糖蛋白 IIb/IIIa (GPIIb) 抗体阳性患者 18 例, 治疗后有效率 44.4%, 抗 GPIIb 抗体阴性 24 例, 有效率 79.1%, 两者比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。结论 CD8⁺ CD28⁻ Treg 及相关细胞因子的表达异常参与了 ITP 的发病, 激素和 rhTPO 可能通过改变这种异常发挥作用。治疗前检测 CD8⁺ CD28⁻ Treg 有助于预测激素及 rhTPO 的疗效。抗 GPIIb 抗体阳性可能是激素治疗不敏感的影响因素之一。

关键词 免疫性血小板减少症; CD8⁺ CD28⁻ 调节性 T 细胞; 血小板特异性自身抗体

中图分类号 R 558.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)09-1405-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.09.015

免疫性血小板减少症 (immune thrombocytopenia, ITP) 是以血小板 (platelet, PLT) 减少、巨核细胞增加且成熟障碍、皮肤黏膜出血为特征的自身免疫性疾病^[1-2]。既往研究^[3]表明 ITP 主要发病机制是 PLT 特异性自身抗体介导的 PLT 破坏, 常见类型是抗血小板膜糖蛋白 (glycoprotein, GP) IIb/IIIa 和抗 GPIIb 抗体。深入研究^[4-5]发现调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 及其相关细胞因子表达异常也参与 ITP 发病机制。研究^[6]表明清除小鼠体内 CD8⁺ CD28⁻ Treg 会加剧 PLT 降低, 输注富含 CD8⁺ CD28⁻ Treg 的 CD8⁺ T 细胞可升高 PLT, 延缓小鼠 ITP 疾病进展。但人 ITP 中 CD8⁺ CD28⁻ Treg 的表达变化和作用机制尚不清楚。激素是 ITP 治疗一线用药, 效果显著, 但副作用大且部分患者无效。重组人血小板生成素 (recombinant human thrombopoietin, rhTPO) 为 ITP 治疗的二线用药, 疗效已有研究^[7]证实, 但停药后, PLT 易回落, 不能维持疗效。该实验检测患者治疗前后 CD8⁺ CD28⁻ Treg 及细胞因子的表达, 分析 CD8⁺ CD28⁻ Treg 及细胞因子在 ITP 发病及临床治疗中的意义, 检测治疗前 PLT 自身抗体的表达, 分析抗体种类与临床用药疗效的关系。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取 2017 年 2 月~2018 年 11 月安徽医科大学第一附属医院门诊和住院治疗的初诊 ITP 患者 73 例。其中男 27 例, 女 46 例, 年龄 16~82 岁, 中位年龄 47 岁, 超过 40 岁者 25 例, PLT 计数 $\leq 10 \times 10^9/L$ 者 41 例, 均符合 ITP 诊断标准。患者临床资料见表 1。正常对照组 30 例, 均为同时期健康体检者, 男 12 例, 女 18 例, 年龄 22~68 岁, 中位年龄 38 岁。

1.2 疗效判定标准 参考文献^[8]: ① 完全反应:

2019-05-23 接收

基金项目: 安徽省 2017 年度第一批科技计划项目 (编号: 1704a0802166); 安徽省自然科学基金项目 (编号: 1808085MH299)

作者单位: 安徽医科大学第四附属医院血液内科, 合肥 230032

作者简介: 张小侠, 女, 硕士研究生;

杨明珍, 男, 主任医师, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: yangmz89@163.com

表 1 ITP 患者临床资料 [n(%)]

临床资料	总例数(n = 73)	rhTPO 组(n = 31)	激素组(n = 42)	χ^2 值	P 值
年龄(岁)					
≤40	48(65. 8)	21(67. 7)	27(64. 3)	0. 095	0. 758
>40	25(34. 2)	10(32. 3)	15(35. 7)		
性别					
女	46(63. 0)	19(61. 3)	27(64. 3)	0. 069	0. 793
男	27(37. 0)	12(38. 7)	15(35. 7)		
血小板计数					
≤10 × 10 ⁹ /L	41(56. 2)	12(38. 7)	20(47. 6)	0. 575	0. 448
>10 × 10 ⁹ /L	32(43. 8)	19(61. 3)	22(52. 4)		

治疗后 PLT ≥ 100 × 10⁹ /L, 无出血症状。② 有效: 治疗后 PLT > 30 × 10⁹ /L, 比基础 PLT 计数增加至少 2 倍、无出血症状。③ 无效: 治疗后 PLT ≤ 30 × 10⁹ /L, PLT 计数增加不到基础值的 2 倍或有出血症状。

1.3 主要试剂与器材 别藻蓝蛋白抗体(APC) 标记的小鼠抗人 CD28 单克隆抗体(mAb)、异硫氰酸荧光素(FITC) 标记的小鼠抗人 CD8 mAb、藻红蛋白-德州红-X(ECD) 标记的小鼠抗人 CD3 mAb、溶血剂、破膜剂、流式细胞仪均购自美国 BD 公司。Coulterlh750 型血细胞自动计数仪购自美国 Beckman 公司。转化生长因子(transforming growth factor, TGF) -β1、白介素(interleukin, IL) -10 和干扰素(interferon, IFN) -γ ELISA 试剂盒购于武汉 ABclonal 公司。ITP 抗血小板抗体检测试剂盒购自常州福隆生物有限公司。

1.4 主要实验方法

1.4.1 CD8⁺CD28⁻Treg 检测 采集 ITP 患者治疗前、治疗后及健康对照者外周肝素抗凝血 6 ml。2 ml 2 500 r/min 离心 10 min, 收集无溶血血清标本, -80 °C 冰箱冻存, 用于细胞因子检测。50 μl 抗凝血中加入抗人 CD3-ECD、CD8-FITC、CD28-APC 单克隆抗体各 5 μl, 避光孵育 15 min, 再加入红细胞裂解液 500 μl, 振荡后混匀, 避光孵育 10 min。1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入 1 ml PBS 后以 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 用 800 μl PBS 重悬后上流式细胞仪检测。

1.4.2 血小板特异性自身抗体检测及血小板制备

采集标本 1 400 r/min 离心 5 min, 分离富血小板血浆(platelet rich plasma, PRP), 取 PRP, 再 5 400 r/min 离心 2 min, 弃上清液, 下层沉淀为 PLT, PLT 用 800 μl 血小板洗涤液洗涤 3 次, -20 °C 保存(时间: 2 周); 向 PLT 中加入 110 μl 裂解液震荡混匀后室温摇床裂解 30 min, 5 400 r/min 离心 20 min; 取上清液 100 μl 到另一 EP 管, 加入已经包被 5 种不同

单抗的微球混合液 50 μl, 震荡混匀, 室温避光孵育 1 h; 加入 600 μl 微球洗涤液, 3 800 r/min 离心 20 min, 轻轻吸取上清液, 底部约留 100 μl 残留液; 再加入 FITC 标记的羊抗人 IgG 多克隆抗体 10 μl, 震荡混匀。室温避光孵育 30 min; 加入 600 μl 微球洗涤液, 3 800 r/min 离心 20 min, 轻轻吸取上清液, 底部约留 100 μl 残留液, 加入 500 μl 微球洗涤液, 上机检测; 在使用前, 按照本实验方法用 3 份正常人 PLT 作为阴性对照实验, 以确定本实验室的临界值。

1.4.3 检测细胞因子 TGF-β1、IFN-γ 和 IL-10 含量

采用 ELISA 法检测, 按有关试剂盒说明书进行操作。

1.4.4 治疗方法 激素组患者应用糖皮质激素治疗, 给予地塞米松 40 mg/d, 连用 4 d, 或甲泼尼龙 1 ~ 2 mg/(kg · d), 至 PLT 达到(80 ~ 100) × 10⁹ /L 后改为泼尼松 1 mg/(kg · d) 口服。rhTPO 组患者皮下注射 rhTPO 注射液, 剂量 300 U/(kg · d), 疗程 14 d。若未达 14 d, 当 PLT ≥ 100 × 10⁹ /L, 停止给药。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 19.0 进行统计分析, ITP 患者与对照组 CD8⁺CD28⁻Treg 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验分析。特异性自身抗体种类和疗效之间关系以及临床资料各分类变量采用 χ^2 检验分析。绘制受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC) 曲线。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对照组及 ITP 患者治疗前后 CD8⁺CD28⁻Treg 及细胞因子的表达结果

2.1.1 对照组与患者治疗前 CD8⁺CD28⁻Treg 及细胞因子的表达结果比较 ITP 患者治疗前 CD8⁺CD28⁻Treg 低于正常对照组, 细胞因子 IL-10、TGF-β1 的表达低于正常对照组, IFN-γ 的表达高于正常对照组, 两组比较差异有统计学意义(P < 0.05), 见

表 2。

表 2 对照组及 ITP 患者治疗前
CD8⁺CD28⁻Treg 及细胞因子的表达($\bar{x} \pm s$)

项目	对照组($n=30$)	ITP 治疗前($n=73$)	t 值
CD8 ⁺ CD28 ⁻ Treg(%)	23.03 ± 7.5	15.13 ± 4.23*	5.418
TGF-β1(pg/ml)	1 464.53 ± 369.21	1 034.56 ± 246.55*	5.864
IL-10(pg/ml)	19.92 ± 2.82	13.55 ± 2.55*	11.170
IFN-γ(pg/ml)	75.85 ± 13.50	97.81 ± 12.97*	-7.745

与对照组比较: * $P < 0.05$

2.1.2 有效组治疗前后 CD8⁺CD28⁻Treg 及细胞因子的表达结果比较 激素及 rhTPO 治疗后 CD8⁺CD28⁻Treg 的表达均较治疗前上升,细胞因子 IL-10、TGF-β1 的表达均较治疗前增加,IFN-γ 的表达均较治疗前下降,治疗前和治疗后比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。CD8⁺CD28⁻Treg 的流式表达图例见图 1。

2.1.3 无效组治疗前后 CD8⁺CD28⁻Treg 及细胞因子的表达结果比较 激素及 rhTPO 治疗后 CD8⁺CD28⁻Treg、IFN-γ、IL-10、TGF-β1 的表达和治疗前相比均未出现明显变化,治疗前和治疗后比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 4。

2.2 ITP 患者治疗前 CD8⁺CD28⁻Treg 的表达对疗效预测的意义 根据有效组和无效组患者治疗前所测 CD8⁺CD28⁻Treg 的值,绘制 ROC 曲线,分析

CD8⁺CD28⁻Treg 对临床用药疗效的预测作用。激素组治疗前 CD8⁺CD28⁻Treg 的临界值为 14.35,曲线下面积(area under curve, AUC) 为 0.74 ($P < 0.05$),95% CI: 0.575 ~ 0.904。此时预测激素疗效的敏感性和特异性为 66.7% 和 73.3%,27 例治疗有效者中,CD8⁺CD28⁻Treg 小于 14.35 的有 18 例(66.7%),15 例无效者中大于 14.35 的有 11 例(73.3%),见图 2。rhTPO 组治疗前 CD8⁺CD28⁻Treg 的临界值为 15.45,AUC 为 0.75 ($P < 0.05$),95% CI: 0.560 ~ 0.940。此时预测 rhTPO 疗效的敏感性和特异性为 63.6% 和 88.9%。22 例治疗有效者中,CD8⁺CD28⁻Treg 大于 15.45 的有 14 例(63.6%),9 例治疗无效者中小于 15.45 的有 8 例(88.9%),见图 3。上述结果提示 CD8⁺CD28⁻Treg 有可能作为患者疗效预测的指标之一。

2.3 血小板特异性抗体的表达结果 激素组抗 GP II b/III a 抗体阳性患者 17 例,有效 10 例,无效 7 例。GP II b/III a 抗体阴性患者 25 例,有效 17 例,无效 8 例。两组比较差异无统计学意义($\chi^2 = 0.371$, $P > 0.05$)。抗 GPIb 抗体阳性患者 18 例,有效 8 例,无效 10 例,抗 GPIb 抗体阴性患者 24 例,有效 19 例,无效 5 例,差异有统计学意义($\chi^2 = 5.401$, $P < 0.05$)。rhTPO 组抗 GP II b/III a 抗体阳性患者 11

表 3 激素及 rhTPO 有效组治疗前后 CD8⁺CD28⁻Treg 及细胞因子的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD8 ⁺ CD28 ⁻ Treg(%)	TGF-β1(pg/ml)	IL-10(pg/ml)	IFN-γ(pg/ml)
激素组治疗前	27	13.55 ± 3.25	1 027.20 ± 260.92	13.99 ± 2.48	101.71 ± 7.46
激素组治疗后	27	22.80 ± 6.27*	1 504.09 ± 255.48*	18.98 ± 2.73*	79.75 ± 15.40*
rhTPO 组治疗前	22	16.86 ± 4.83	1 071.44 ± 265.16	13.31 ± 2.69	102.71 ± 8.12
rhTPO 组治疗后	22	26.18 ± 7.80#	1 523.58 ± 374.94#	20.85 ± 3.43#	70.48 ± 12.91#

与激素治疗前比较: * $P < 0.05$; 与 rhTPO 治疗前比较: # $P < 0.05$

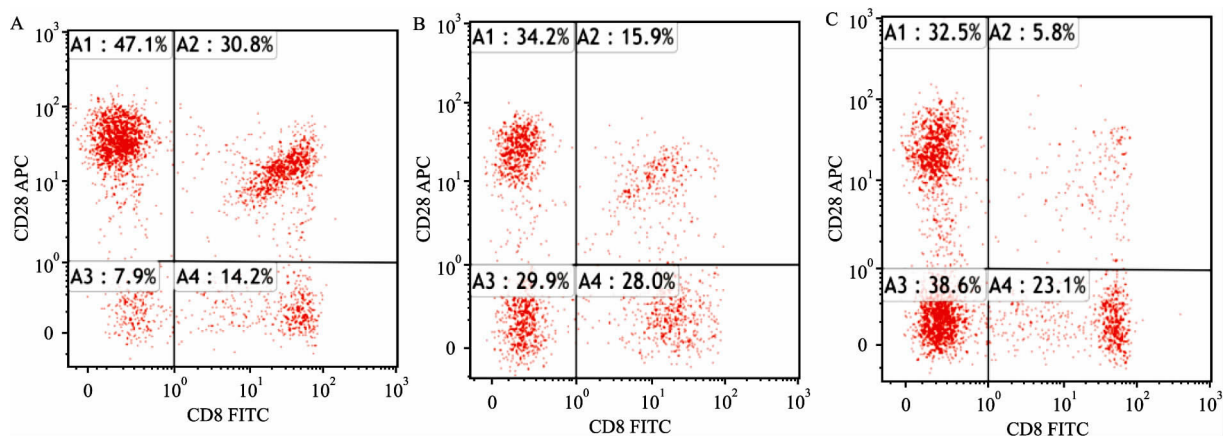


图 1 CD8⁺CD28⁻Treg 流式细胞表达图

A: 有效组治疗前 CD8⁺CD28⁻Treg 的表达情况; B: 有效组治疗后 CD8⁺CD28⁻Treg 的表达情况; C: 健康对照组 CD8⁺CD28⁻Treg 的表达情况

表4 激素及 rhTPO 无效组治疗前后 CD8⁺CD28⁻Treg 及细胞因子的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD8 ⁺ CD28 ⁻ Treg(%)	TGF- β 1(pg/ml)	IL-10(pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)
激素组治疗前	15	16.62 $\pm$ 4.04	1 004.88 $\pm$ 201.95	14.04 $\pm$ 2.23	97.07 $\pm$ 15.68
激素组治疗后	15	16.78 $\pm$ 4.91	1 103.98 $\pm$ 276.77	13.03 $\pm$ 2.01	90.11 $\pm$ 16.72
rhTPO 组治疗前	9	13.20 $\pm$ 3.41	1 015.95 $\pm$ 252.85	11.93 $\pm$ 2.59	95.26 $\pm$ 14.27
rhTPO 组治疗后	9	17.37 $\pm$ 4.62	1 113.49 $\pm$ 161.23	13.64 $\pm$ 2.57	92.59 $\pm$ 15.27

例,有效7例,无效4例,抗 GP II b/IIIa 抗体阴性患者20例,有效15例,无效5例,两组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。抗 GPIb 抗体阳性患者13例,有效7例,无效6例,抗 GPIb 抗体阴性患者18例,有效15例,无效3例,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表5、6和图4。

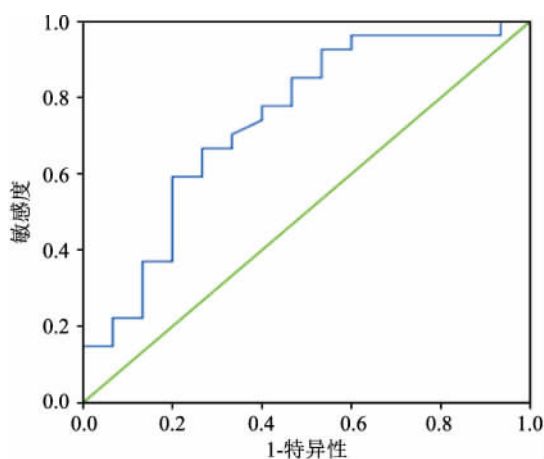
图2 激素组治疗前 CD8⁺CD28⁻Treg 的变化在 ROC 曲线中的表现

表5 激素组血小板特异性抗体表达类型和疗效的关系(n)

分组	抗体类型	有效	无效	合计
A	GPIb 抗体阳性	8*	10*	18*
B	GPIb 抗体阴性	19	5	24
C	GP II b/IIIa 抗体阳性	10	7	17
D	GP II b/IIIa 抗体阴性	17	8	25

与 B 组比较: * $P < 0.05$

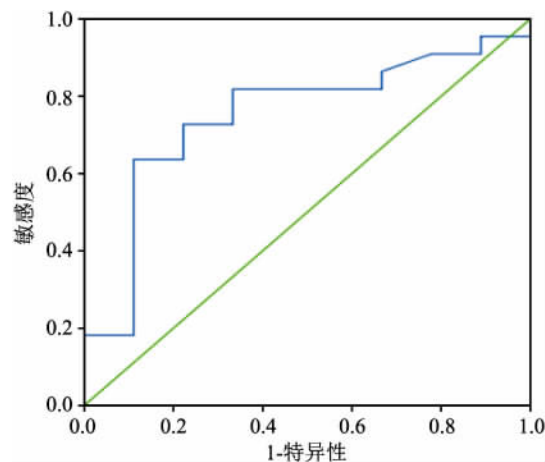
图3 rhTPO 组治疗前 CD8⁺CD28⁻Treg 的变化在 ROC 曲线中的表现

表6 rhTPO 组血小板特异性抗体表达类型和疗效的关系(n)

分组	抗体类型	有效	无效	合计
A	GPIb 抗体阳性	7	6	13
B	GPIb 抗体阴性	15	3	18
C	GP II b/IIIa 抗体阳性	7	4	11
D	GP II b/IIIa 抗体阴性	15	5	20

3 讨论

ITP 是出血性疾病中最为常见的一种,约占出血性疾病的 30%。ITP 发病机制文献报道众多,涉及多个方面,其可能与多种病理因素引起的体液免

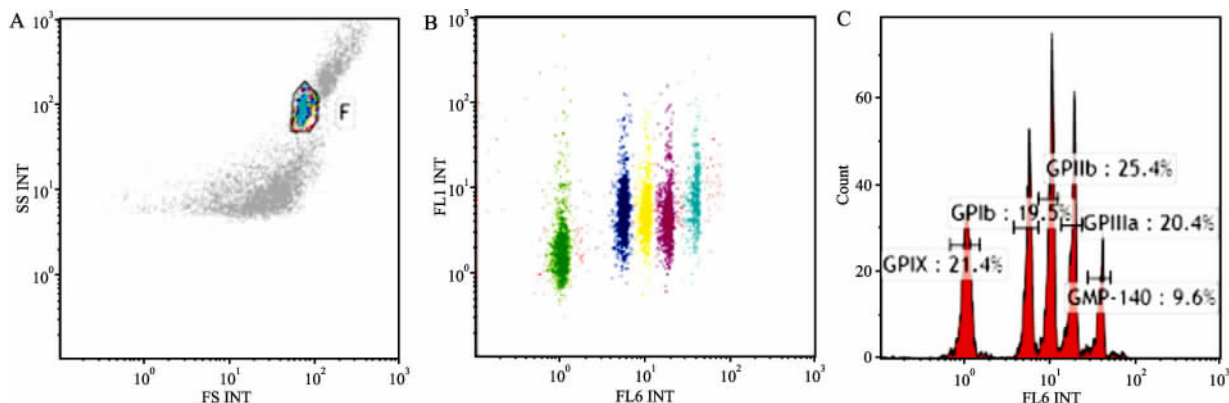


图4 流式微球检测结果图

A: 荧光微球; B: 荧光微球分布图; C: 荧光微球强度值

疫和细胞免疫异常有关。课题组前期研究^[9]表明 ITP 患者外周血中存在 CD8⁺T 细胞亚群及树突状细胞亚群的改变。且在部分糖皮质激素无效的患者中比例较对照组下降,提示 CD8⁺T 细胞中除具有免疫杀伤作用外,应还具有类似 Treg 的功能,CD8⁺CD28⁻Treg 是 CD8⁺T 细胞的重要组成部分,通过细胞检测发现 CD8⁺CD28⁻Treg 的受体多样性降低,端粒变短,抗原诱导增殖的能力减弱,分化能力降低,细胞毒性减弱或消失^[10]。目前认为 CD8⁺CD28⁻Treg 主要通过细胞与细胞之间直接接触或者分泌相关细胞因子如 IL-10、TGF- β 1、IFN- γ 等发挥其免疫调节功能^[11]。有研究^[12]报道该类细胞在炎症、肿瘤、自身免疫病等发病过程中起到了重要的作用。

本研究显示 ITP 患者治疗前 CD8⁺CD28⁻Treg 及细胞因子 IL-10、TGF- β 1 的表达低于正常对照组,IFN- γ 的表达高于正常对照组,说明在 ITP 患者中存在 CD8⁺CD28⁻Treg 及相关细胞因子的表达异常。激素和 rhTPO 治疗后有效患者 CD8⁺CD28⁻Tregs、IL-10、TGF- β 1 的表达明显增加,INF- γ 的表达降低。治疗后无效患者改变不大,说明激素和 rhTPO 可能通过调节 CD8⁺CD28⁻Treg 及细胞因子在 ITP 患者体内的表达发挥疗效。通过绘制治疗前 CD8⁺CD28⁻Treg 与疗效的 ROC 曲线分析得知,通过检测治疗前 CD8⁺CD28⁻Treg 的比例可以预测激素及 rhTPO 的疗效,为临床治疗提供参考作用。

有研究^[13]显示,约 60% ITP 患者外周血中能检测出血小板特异性自身抗体,其中最重要的组成部分是抗 GP II b/GP III a 抗体和抗 GPIb 抗体。两种抗体也可同时存在于部分患者。本实验显示,抗 GPIb 抗体阳性患者使用激素治疗的疗效不佳。而抗 GP II b/III a 抗体是否阳性,激素治疗效果差异不大,分析原因可能是两种抗体导致 PLT 减少的机制不同。GP II b/GP III a 属于整合素家族,具有联接 PLT 与纤维蛋白原的功能,与 PLT 特异性 GP II b/GP III a 抗体结合后形成抗原-抗体复合物,通过 Fc 受体单核巨噬细胞系统识别抗原-抗体复合物破坏血小板。GPIb 属于富含亮氨酸家族蛋白,可结合血管假性血友病因子介导血小板黏附,与抗体结合之后会通过非 Fc 受体依赖途径引起血小板破坏^[13-14]。建议对抗 GPIb 阳性患者避免应用激素等以网状内皮系统的 Fc 受体为主要作用靶点的治疗方法。

综上所述,ITP 患者存在 CD8⁺CD28⁻Treg 及其相关细胞因子的表达异常,激素和 rhTPO 可能通过

调节 CD8⁺CD28⁻Treg 及其相关细胞因子的表达来发挥疗效。CD8⁺CD28⁻Treg 有可能作为激素及 rhTPO 的疗效预测指标之一,同时对抗 GPIb 抗体阳性的 ITP 患者采取非激素治疗,可能取得更好的治疗效果。后续可以纳入以丙球、利妥昔单抗等用药作为治疗方案的 ITP 患者作为实验组,进一步探究 CD8⁺CD28⁻Treg 及 PLT 特异性抗体在其临床治疗中的意义,为临床的个体化治疗提供参考依据。

参考文献

- [1] Lazarus A H, Semple J W, Cines D B. Innate and adaptive immunity in immune thrombocytopenia [J]. *Semin Hematol*, 2013, 50 Suppl 1: S68 - 70.
- [2] Rodeghiero F, Michel M, Gernsheimer T, et al. Standardization of bleeding assessment in immune thrombocytopenia: report from the International Working Group [J]. *Blood*, 2013, 121(14): 2596 - 606.
- [3] Kuwana M, Okazaki Y, Ikeda Y. Detection of circulating B cells producing anti-GPIb autoantibodies in patients with immune thrombocytopenia [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e86943.
- [4] Zhang J, Zhang Q, Li Y, et al. Immune dysregulation in primary immune thrombocytopenia patients [J]. *Hematology*, 2018, 23 (8): 510 - 6.
- [5] Son B R, Kim J Y. Association of CD4(+) CD25(+) FoxP3 (+) regulatory T cells with natural course of childhood chronic immune thrombocytopenic purpura [J]. *Korean J Pediatr*, 2015, 58 (5): 178 - 82.
- [6] Ma L, Simpson E, Li J, et al. CD8⁺T cells are predominantly protective and required for effective steroid therapy in murine models of immune thrombocytopenia [J]. *Blood*, 2015, 126(2): 247 - 56.
- [7] Wang S, Yang R, Zou P, et al. A multicenter randomized controlled trial of recombinant human thrombopoietin treatment in patients with primary immune thrombocytopenia [J]. *Int J Hematol*, 2012, 96(2): 222 - 8.
- [8] 侯明,秦平. 成人原发免疫性血小板减少症诊治的中国专家共识(2016版)解读 [J]. *临床血液学杂志*, 2016, 29(7): 523 - 7.
- [9] 谢研研,杨明珍. 地塞米松治疗前后免疫性血小板减少症患者树突状细胞亚群及细胞因子变化的研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2016, 51(7): 998 - 1001.
- [10] Zabińska M, Krajewska M, Koscielska-Kasprzak K, et al. CD3 (+) CD8(+) CD28(-) T lymphocytes in patients with lupus nephritis [J]. *J Immunol Res*, 2016, 2016: 1058165.
- [11] Reiser J, Banerjee A. Effector, memory, and dysfunctional CD8 (+) T cell fates in the antitumor immune response [J]. *J Immunol Res*, 2016, 2016: 8941260.
- [12] Chen X, Liu Q, Xiang A P. CD8⁺CD28⁻T cells: not only age-related cells but a subset of regulatory T cells [J]. *Cell Mol Immunol*, 2018, 15(8): 734 - 6.

- [13] Cantoni S, Carpenedo M, Nichelatti M, et al. Clinical relevance of antiplatelet antibodies and the hepatic clearance of platelets in patients with immune thrombocytopenia [J]. *Blood*, 2016, 128 (17): 2183–5.
- [14] Quach M E, Dragovich M A, Chen W, et al. Fc-independent immune thrombocytopenia *via* mechanomolecular signaling in platelets [J]. *Blood*, 2018, 131(7): 787–96.

Expression of CD8⁺ CD28⁻ regulatory T-cells and platelet-specific autoantibody in immune thrombocytopenia

Zhang Xiaoxia, Zhang Meiling, Yang Mingzhen

(Dept of Hematology, The Fourth Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To detect the expression levels of CD8⁺CD28⁻ regulatory T cells(Treg) , platelet-specific autoantibody and cytokines in the peripheral blood of patients with immune thrombocytopenia(ITP) , so as to analyze their significance in the pathogenesis and clinical treatment of ITP. **Methods** 73 ITP patients were divided into hormone treatment group($n=42$) and recombinant human thrombopoietin(rhTPO) treatment group($n=31$) ; moreover, they were further divided into response group and non-response group according to the therapeutic effect. Expression of CD8⁺CD28⁻ Treg in the peripheral blood of patients before and after treatment was detected through flow cytometry, and that of platelet-specific autoantibody in the peripheral blood was detected through cytometric bead array. In addition, the expression levels of transforming growth factor(TGF) - β 1, interleukin(IL) -40 and interferon(IFN) - γ were also detected in patients before and after treatment according to the ELISA assay. In addition, 30 subjects receiving physical examination were enrolled as the normal control group. **Results** ① The expression of CD8⁺CD28⁻ Treg as well as the cytokines IL-40 and TGF- β 1 in the 73 ITP patients before treatment was lower than that in the normal control group, while IFN- γ expression was higher than that in the normal control group ($P<0.05$). After hormone and rhTPO treatment, the expression of CD8⁺CD28⁻ Treg, IL-40 and TGF- β 1 in the response group was markedly up-regulated compared with that before treatment, while IFN- γ expression was evidently down-regulated relative to that before treatment($P<0.05$). Meanwhile, the expression of CD8⁺CD28⁻ Treg, IFN- γ , IL-40 and TGF- β 1 in the non-response group showed no obvious change compared with that before treatment. ② According to the receiver operating characteristic(ROC) curve, the threshold of CD8⁺CD28⁻ Treg in hormone group before treatment was 14.35, and the sensitivity and specificity in predicting hormone efficacy were 66.7% and 73.3%, respectively, at this time. Among the 27 responders, 18(66.7%) had the value of <14.35 , while 11(73.3%) out of the 15 non-responders had the value of >14.35 . The threshold of CD8⁺CD28⁻ Treg in rhTPO group before treatment was 15.45, and the sensitivity and specificity in predicting rhTPO efficacy were 63.6% and 88.9%, respectively, at this time. Among the 22 responders, 14(63.6%) had the value of >15.45 , while 8(88.9%) out of the 9 non-responders had the value of <15.45 . ③ 18 cases in hormone group had positive anti-GPIIb antibody, with the response rate after treatment of 44.4%; in addition, 24 cases had negative platelet membrane glycoprotein Ib specific autoantibody, yielding the response rate of 79.1%, and the difference between these two was statistically significant($P<0.05$). **Conclusion** The abnormal expression of CD8⁺CD28⁻ Treg and the related cytokines participates in the pathogenesis of ITP, while hormone and rhTPO may exert their functions through changing such abnormality. Detection of CD8⁺CD28⁻ Treg before treatment contributes to predicting the efficacy of hormone and rhTPO. Positive anti-GPIIb antibody may be one of the influence factors of insensitivity to hormone therapy.

Key words immune thrombocytopenia; CD8⁺CD28⁻ regulatory T-cell; platelet-specific autoantibody