

· 论著 ·

NK细胞数及Th1/Th2与再生障碍性贫血的相关性研究

许沛*

河南科技大学第一附属医院(河南 洛阳 471000)

【摘要】目的 探究自然杀伤细胞(NK)数及Th1/Th2与再生障碍性贫血(AA)的相关性。**方法** 选取2020年2月-2022年12月医院诊治的AA患者112例作为研究对象,其中重型患者52例,非重型患者60例,选择医院健康志愿者65例作为对照组,观察基本资料、NK细胞功能、Th1、Th2水平,分析NK细胞、Th1/Th2与再生障碍性贫血的相关性。**结果** AA组、重型AA组及非重型AA组的NK细胞数、IL-2、IL-4、TNF- α 均低于对照组,IL-6高于对照组($P<0.05$);重型AA组IL-10低于对照组,IFN- γ 高于非重型AA组($P<0.05$);AA组IFN- γ 高于对照组($P<0.05$)。重型AA组NK细胞数与CD4+呈正相关;IL-2与IFN- γ 、IL-4呈正相关;IL-6和IFN- γ 与Ret、ARC呈负相关;IL-10与CD8+呈正相关,与B呈负相关。非重型AA组NK细胞数与CD3+、CD8+、CD4+/CD8+、B呈正相关;IL-2与IL-4呈正相关;IL-4与B呈负相关,与CD8+呈正相关;IL-6与WBC、B呈负相关,与IL-10、IFN- γ 呈正相关。**结论** AA患者NK细胞数减少, Th1/Th2细胞比例失衡,两者均与多项血液指标具有明显相关性,可能在AA免疫发病机制中发挥重要作用。

【关键词】 再生障碍性贫血; 自然杀伤细胞; Th1细胞; Th2细胞

【中图分类号】 R556.5

【文献标识码】 A

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2024.8.050

Correlation between NK Cell Number and Th1/Th2 and Aplastic Anemia

XU Pei*

The First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, Henan Province, China

Abstract: Objective To investigate the correlation between natural killer cell (NK) number and Th1/Th2 and aplastic anemia (AA). **Methods** A total of 112 AA patients treated in hospitals from February 2020 to December 2022 were enrolled, including 52 patients with severe disease and 60 patients with non-severe disease, and 65 cases of healthy volunteers in the hospital were selected as the control group, and the basic data, NK cell function, Th1 and Th2 levels were observed, and the correlation between NK cells, Th1/Th2 and aplastic anemia was analyzed. **Results** The number of NK cells, IL-2, IL-4 and TNF- α in AA, heavy AA and non-heavy AA groups were lower than those in the control group, and IL-6 was higher than that in the control group ($P<0.05$). IL-10 in the heavy AA group was lower than that in the control group, and IFN- γ was higher than that in the non-heavy AA group ($P<0.05$). IFN- γ in the AA group was higher than in the control group ($P<0.05$). The number of NK cells in the heavy AA group was positively correlated with CD4+. IL-2 was positively correlated with IFN- γ and IL-4. IL-6 and IFN- γ were negatively correlated with Ret and ARC. IL-10 was positively correlated with CD8+ and negatively correlated with B. The number of NK cells in the non-heavy AA group was positively correlated with CD3+, CD8+, CD4+/CD8+, and B. IL-2 was positively correlated with IL-4; IL-4 was negatively correlated with β and positively correlated with CD8+. IL-6 was negatively correlated with WBC and B, and positively correlated with IL-10 and IFN- γ . **Conclusion** The decrease in the number of NK cells and the imbalance of Th1/Th2 cells in AA patients have obvious correlations with a number of blood indexes, and may play an important role in the pathogenesis of AA immunity.

Keywords: Aplastic Anemia; Natural Killer Cells; Th1 Cells; Th2 Cells

AA是自身免疫性骨髓造血衰竭综合征,以贫血、出血、感染为主要临床表现,我国年发病率为0.74/10万^[1]。再生障碍性贫血病因尚不清楚,现阶段研究表明:机体免疫异常及淋巴因子介导的造血干细胞过度凋亡引发骨髓衰竭,同时大脂肪细胞取代造血干细胞,纤维网间存在较少小淋巴细胞,纤维粘附颗粒基本没有,进而抑制骨髓造血功能^[2]。最新研究表明^[3],NK细胞调节功能减弱、辅助性T细胞亚群Th1/Th2比例失衡等均参与AA发病。NK细胞作为机体免疫重要组成在调节固有免疫应答同时还参与调节获得性免疫应答,是固有免疫与适应性免疫的连接纽带^[4]。Th1细胞主要通过分泌IL-2、IFN- γ 、TNF- α 参与细胞免疫应答, Th2细胞主要通过分泌IL-4、IL-6、IL-10介导体液免疫应答过程^[5]。为明确AA免疫发病机制和指导临床诊治提供可靠依据,本研究探讨了NK细胞数及Th1/Th2与再生障碍性贫血的相关性。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选取2020年2月-2022年12月医院诊治的AA患者112例作为研究对象,其中重型患者52例,男22例、女30例,年龄28~60岁,平均年龄(45.46 \pm 8.25)岁;非重型患者60例,男19

例、女41例,年龄27~61岁,平均年龄(46.37 \pm 9.41)岁。选择医院健康志愿者65例作为对照组,男17例、女48例,年龄29~62岁,平均年龄(46.22 \pm 8.75)岁,以上性别、年龄比较($P>0.05$)。重型AA诊断依据Camitta标准^[3]:①骨髓衰竭:骨髓细胞增生程度低于正常25%;②中性粒细胞绝对值(ANC)低于 $0.5\times 10^9/L$,血小板(PLT)低于 $20\times 10^9/L$,网织红细胞绝对值(ARC)低于 $20\times 10^9/L$,至少具备以上2条。

纳入标准:18~82岁;符合AA诊断标准;均接受阵发性睡眠性血红蛋白尿症克隆筛查、骨髓细胞遗传学检查;一般资料和实验室检查资料完整患者及家属均知情并签署知情同意书;通过医学伦理委员会审核。排除标准:伴有先天性造血功能衰竭症或心脏病;合并恶性肿瘤;合并恶性血液病;存在肝肾等脏器功能不全;合并其他自身免疫性疾病。

1.2 检测方法 流式细胞术检测细胞因子,取受检者空腹静脉血3mL,置于乙二胺四乙酸抗凝管中,一部分用于NK细胞数检测;另一部分用于Th1、Th2细胞因子检测,离心保留血浆在零下80℃保存待测。BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Kit试剂购自上海高创化学科技有限公司提供;FACSCanto II流式细胞仪购自碧迪医疗器械(上海)有限公司。常

【第一作者】许沛,男,主管技师,主要研究方向:血液病实验诊断。E-mail: xupei20230516@126.com

【通讯作者】许沛

规检查血常规和T淋巴细胞亚群。

NK细胞数检测：通过微量全血免疫荧光技术对NK细胞标记，在6h内完成检测。常规标记细胞采用流式细胞仪检测，经EXPO32ADCXL4 Color软件分析处理并在FSC-SSC散点图确定；淋巴细胞群，分析10000分细胞并以“%”表示。NK细胞包括CD16dimCD56bright亚型和CD16brightCD56dim亚型。

Th1、Th2细胞因子检测：首先重悬并进行梯度稀释人Th1/Th2/Th17细胞因子冻干粉制备人Th1/Th2/Th17细胞因子标准品；将制备好的标准品与捕获微球混合：A1~A7小瓶中分别放置7种捕获微球，使用前将其混合并按需转移至试验试管；检测荧光试剂处理后的人Th1/Th2/Th17流式样本：50μL血浆、50μL混合微球、50μL藻红蛋白(PE)抗体，避光180min，加入1mL 1×Wash Buffer，混匀，离心去除上清液，加300μL Wash Buffer，上机检测，注意仪器使用前用仪器调整微球。检测IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IFN-γ、TNF-α。

1.3 统计学方法 数据资料采用SPSS 24.0软件分析。计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示，两组间比较用t检验，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用Turkey's多重比较校正，计数资料用%表示，两组间比较采用 χ^2 检验。P<0.05为有统计学意义。

2 结果

2.1 重型AA组与非重型AA组基本资料比较 重型AA组WBC、Hb、RBC、PLT、Neu、ANC、Lyma、Ret、ARC、CD3+、CD4+、CD8+低于非重型AA组，CD4+/CD8+、B高于非重型AA组(P<0.05)，见表1。

2.2 NK细胞数及其受体表达 AA组、重型AA组及非重型AA组NK细胞数(7.73±2.46)%、(7.06±2.01)%、(8.91±2.55)%均低于对照组(15.43±3.26%)(t=17.767、16.205、11.814, P均<0.001)。

2.3 Th1、Th2细胞因子水平 AA组、重型AA组及非重型AA组IL-2、IL-4、TNF-α低于对照组，IL-6高于对照组(P<0.05)；重型AA组IL-10低于对照组，IFN-γ高于非重型AA组(P<0.05)；AA组IFN-γ高于对照组(P<0.05)，见表3。

2.4 AA患者NK细胞与造血细胞、T淋巴亚群相关性 重型AA患者NK细胞数与CD4+(r=0.369, P=0.001)呈正相关；重新AA患者NK细胞与CD3+、CD8+、CD4+/CD8+、B无相关性(P>0.05)。非重型AA组患者NK细胞数与CD3+(r=0.357, P=0.007)、CD8+(r=0.382, P=0.005)、CD4+/CD8+(r=0.388, P=0.002)、B(r=0.425, P<0.001)呈正相关。

2.5 AA患者Th1、Th2细胞与造血指标、T淋巴亚群相关性 重型AA患者IL-2与IFN-γ(r=0.564, P<0.001)、IL-4(r=0.498, P<0.001)呈正相关；IL-6与Ret(r=0.547, P<0.001)、ARC(r=-0.511, P<0.001)呈负相关；IL-10与CD8+(r=0.497, P<0.001)呈正相关，与B(r=-0.564, P<0.001)呈负相关；IFN-γ与Ret(r=-0.419, P<0.001)、ARC(r=0.533, P<0.001)呈负相关；与其他指标无相关性。

非重型AA组患者IL-2与IL-4(r=0.644, P<0.001)呈正相关；IL-4与B(r=-0.587, P<0.001)呈负相关，与CD8+(r=0.429, P<0.001)呈正相关；IL-6与WBC(r=-0.487, P<0.001)、B(r=-0.511, P<0.001)呈负相关，与IL-10(r=0.574, P<0.001)、IFN-γ(r=0.496, P<0.001)呈正相关，与其他指标无相关性。

表1 重型AA组与非重型AA组基本资料比较

项目	重型AA组(n=52)	非重型AA组(n=60)	t	P
年龄	45.46±8.25	46.37±9.41	0.540	0.590
WBC(×10 ⁹ /L)	1.87±0.54	3.36±0.78	11.576	<0.001
Hb(g/L)	75.22±19.24	105.31±25.39	7.718	<0.001
RBC(×10 ¹² /L)	2.64±0.77	3.71±0.95	6.482	<0.001
PLT(×10 ⁹ /L)	18.25±5.16	75.27±14.83	26.364	<0.001
Neu(%)	25.12±7.49	51.45±9.62	15.978	<0.001
ANC(×10 ⁹ /L)	0.44±0.12	2.04±0.19	52.333	<0.001
Lyma(%)	66.31±16.12	38.56±12.13	10.372	<0.001
Lymb(%)	1.34±0.37	1.45±0.41	1.481	0.141
Ret(%)	0.54±0.13	2.47±0.17	66.682	<0.001
ARC(×10 ⁹ /L)	9.53±2.61	24.72±6.84	15.083	<0.001
CD3+(%)	66.42±12.37	81.55±14.56	5.876	<0.001
CD4+(%)	33.58±8.44	40.29±8.91	4.072	<0.001
CD8+(%)	27.64±7.28	37.43±8.32	6.578	<0.001
CD4+/CD8+	1.21±0.33	1.08±0.31	2.148	0.033
B(%)	18.17±4.21	9.55±2.73	13.017	<0.001

注：AA为再生障碍性贫血；WBC为白细胞；Hb为血红蛋白；RBC为红细胞；PLT为血小板；Neu为中性粒细胞百分比；ANC为中性粒细胞绝对值；Lyma为外周血淋巴细胞百分比；Lymb为外周血淋巴细胞绝对值；Ret为网织红细胞百分比；ARC为网织红细胞绝对值；G为骨髓粒系百分比；E为骨髓红系百分比；L为骨髓淋系百分比；B为B淋巴细胞

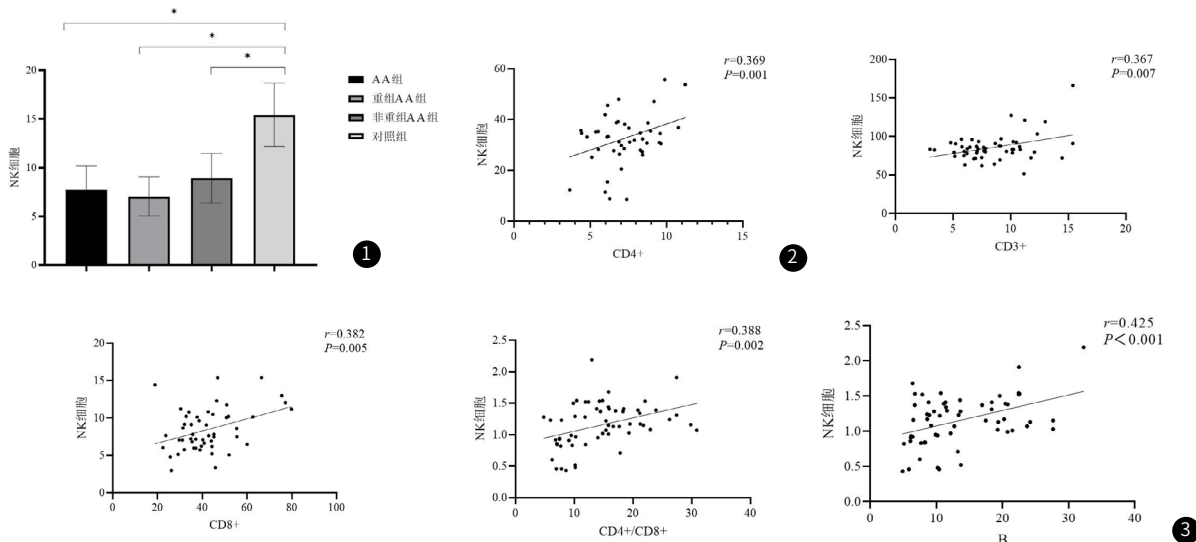


图1 NK细胞数及其受体表达(注：*与对照组相比，P<0.005)。**图2** 重型AA患者NK细胞数与CD4+相关性。**图3** 非重型AA组患者NK细胞数与CD3+、CD8+、CD4+/CD8+相关性。

表3 Th1/Th2细胞因子水平(pg/mL)

组别	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	IFN-γ	TNF-α
AA组(n=112)	0.56±0.15①	0.53±0.15①	22.23±6.38①	1.72±0.56	0.71±0.20①	0.71±0.21①
重型AA组(n=52)	0.59±0.16①	0.53±0.16①	25.42±6.69①	1.69±0.52①	0.82±0.24②	0.70±0.19①
非重型AA组(n=60)	0.54±0.14①	0.55±0.18①	21.74±6.27①	1.73±0.58	0.69±0.16	0.73±0.23①
对照组(n=65)	1.24±0.33	1.19±0.35	4.08±1.12	1.92±0.61	0.55±0.15	1.64±0.48
F	185.210	151.450	187.820	2.220	20.210	167.260
P	<0.001	<0.001	<0.001	0.086	<0.001	<0.001

注: AA为再生障碍性贫血; 与对照组比较①P<0.05; 与非重型AA组比较②P<0.05

3 讨论

目前, 国内外公认AA发病与自身免疫密切相关, 但其诱因和原发病尚不清楚。多数患者对免疫抑制治疗敏感更为这种观点提供了证据。国内穆慧等^[6]学者通过免疫介导的AA小鼠模型研制及王美娟等^[7]报道也表明细胞毒性T淋巴细胞过度活化及功能亢进, 与Th比例失衡, 并偏向寡克隆模式, 是攻击造血系统的直接因素。研究表明^[8], AA患者Th1细胞比例明显升高, 分泌大量IFN-γ, 破坏免疫平衡, 刺激细胞毒性T淋巴细胞增殖及活化, 可能是细胞免疫亢进的始动因素。NK细胞和Th1/Th2是近年来鉴别出来具有免疫调控作用的T淋巴细胞, 推测两者可能在AA免疫发病机制中发挥重要作用。

本研究结果显示: AA组、重型AA组及非重型AA组NK细胞数均低于对照组。Yu等^[9]发现初治重型AA患者外周血NK细胞占淋巴细胞的百分比低于正常人群, 经免疫抑制治疗后升高, 提示这一变化与重型AA患者造血恢复情况呈正相关, 与本研究结果一致。可能是NK细胞能抑制较成熟造血祖细胞集落生长, 在AA患者中内源性穿孔素基因突变或自身粒细胞抑制导致NK细胞及细胞活性受损, 进而NK细胞数低于正常健康人群。此外, NK细胞还能产生IL-2、IFN-γ、IL-1等多种淋巴因子的能力, 调节自身细胞毒性。Nguyen等^[10]检测408名AA患者外周血, 其NK细胞活性减低。NK细胞通过膜上CD16和CD56与Th细胞膜上CD4产生免疫黏附, 刺激巨噬细胞释放IL-1, 激活Th细胞, 活化后的Th细胞分泌IL-2、IFN-γ等促使细胞毒性T淋巴细胞分化成熟, 继而增强T细胞免疫效应。本研究发现, 重型AA组CD3+、CD4+比例下降, 非重型AA组CD8+比例增高, CD4+/CD8+比例失衡, T淋巴细胞免疫出现异常, 造血细胞免疫受损, 骨髓衰竭, 致使血细胞减少, 与王文儒等^[11]报道相符。同时, 重型AA组NK细胞数与CD4+呈正相关, 非重型AA组患者NK细胞数与CD3+、CD8+、CD4+/CD8+、呈正相关, 推测NK细胞可能参与了骨髓造血调控。此外, 重型AA组B淋巴细胞高于非重型AA组, 非重型AA组与B淋巴细胞呈正相关, 体液免疫在重型AA疾病进展中是否发挥重要作用还有待进一步研究。

本研究结果显示: AA组、重型AA组及非重型AA组IL-2、IL-4、TNF-α低于对照组, IL-6高于对照组。研究表明^[12], AA患者存在Th1细胞极化, IFN-γ、IL-2、TNF-α等造血负调控因子明显升高, Th1/Th2细胞比例失衡。王世充等^[13]研究检测AA患者免疫抑制治疗后Th1/Th2发现, 有效者Th1细胞数量、Th1/Th2低于无效者, 提示Th1淋巴细胞在AA发病中占主导作用, 与本研究结果相符。CD4+Th细胞群通过克隆产生细胞因子类别及其功能可分为Th1亚群和Th2亚群, 其中Th1细胞分泌IFN-γ、IL-2、TNF-α等, 诱导巨噬细胞活化, 杀伤胞内病原体, 主要参与细胞免疫应答发挥促炎功能; Th2细胞分泌IL-4、IL-6、IL-10等, 诱导嗜酸性粒细胞活化, 对抗胞外病原体, 主要参与体液免疫应答发挥抑炎功能, 通过刺激B细胞增殖并产生抗体^[14]。而IFN-γ与IL-4是Th1/Th2平衡的重要细胞因子, Th1/Th2平衡是免疫应答重要环节, 病理条件下的Th1/Th2极化异常或缺失在自身免疫性疾病发病过程中扮演重要角色。

本研究还发现, AA组IFN-γ高于对照组, 重型AA组IL-10低于对照组, IFN-γ高于非重型AA组, 与王姣等^[15]研究报道基本一

致。原因可能为高水平IFN-γ能产生较强抑制效应, 抑制造血基因表达, 增强凋亡基因表达和活化细胞毒性T细胞, 加剧造血干细胞和祖细胞破坏, 而低水平IFN-γ能引起骨髓抑制; IL-10能抑制Th1细胞生成IFN-γ、TNF等造血负调控因子, 还能抑制NK细胞活化, 使免疫应答下调, 重型AA患者IL-10水平下降, 对Th1免疫抑制随之减弱, 分泌更多造血负调控因子, 骨髓造血功能受限, 从而加重AA病情。进一步经相关性分析, 重型AA患者IFN-γ、IL-6与Ret、ARC呈负相关, 非重型AA组患者IL-6与WBC、B淋巴细胞呈负相关, 提示造血负调控因子IFN-γ、IL-6直接参与了AA发病。另有研究表明^[16], 造血免疫调节因素也包括各细胞及其分泌的细胞因子间的相互调节, 与本研究结果一致, 如重型AA患者IL-2与IFN-γ、IL-4呈正相关, IL-10与CD8+呈正相关; 非重型AA患者IL-2与IL-4呈正相关, IL-4与CD8+呈正相关, IL-6与IL-10、IFN-γ呈正相关。提示造血负调控因子占主导地位此时骨髓造血功能受损, 致使AA发生。

综上所述, AA患者NK细胞数减低, IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IFN-γ、TNF-α水平异常直接或间接参与了骨髓造血调控, 与骨髓造血衰竭有关, 是AA发病重要环节, 调控机体NK细胞数及白介素水平, 可能成为AA预防和治疗新的突破点。

参考文献

- [1] 中华医学会血液学分会红细胞疾病(贫血)学组. 再生障碍性贫血诊断与治疗中国指南(2022年版)[J]. 中华血液学杂志, 2022, 43(11): 881-888.
- [2] 金相红, 张炎, 庄俊玲. 免疫检查点抑制剂相关血液学毒性的诊治进展[J]. 临床内科杂志, 2023, 40(2): 73-78.
- [3] Camitta BM. What is the definition of cure for aplastic anemia[J]? Acta Haematol, 2000, 103(1): 16-24.
- [4] Killick SB, Bown N, Cavenagh J, et al. Guidelines for the diagnosis and management of adult aplastic anaemia[J]. Br J Haematol, 2016, 172(2): 187-207.
- [5] Giudice V, Sellari C. Aplastic anemia: Pathophysiology[J]. Semin Hematol, 2022, 59(1): 13-20.
- [6] 穆慧, 贾惠, 林赠华, 等. 骨髓巨噬细胞M1/M2亚群失衡对免疫介导的新型再生障碍性贫血小鼠发病的影响[J]. 中华血液学杂志, 2021, 42(11): 945-951.
- [7] 王美娟, 钟雪梅, 马昕, 等. 儿童肝炎相关再生障碍性贫血五例临床特点[J]. 中国小儿急救医学, 2022, 29(12): 994-997.
- [8] 李芮, 丁宇斌, 王文儒, 等. 补肾生血方治疗慢性再生障碍性贫血的临床疗效及对T细胞亚群、T-bet与GATA3表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(15): 94-101.
- [9] Yu W, Wang Q, Ge M, et al. Natural killer cells in peripheral blood at diagnosis predict response to immunosuppressive therapy in severe aplastic anemia[J]. Clin Exp Med, 2022, 190(4): 610-617.
- [10] Nguyen MAT, Hosokawa K, Yoroidaka T, et al. Resistance of KIR ligand-missing leukocytes to NK cells in vivo in patients with acquired aplastic anemia[J]. Immunohorizons, 2020, 4(7): 430-441.
- [11] 王文儒, 杜宇, 许勇钢, 等. 骨髓增生异常综合征的临床特征及T淋巴细胞亚群分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2022, 29(5): 329-336.
- [12] 黄莉荣, 薛征. 基于Th1/Th2失衡探讨再生障碍性贫血中西医结合治疗研究进展[J]. 陕西中医, 2021, 42(11): 1644-1647, 1651.
- [13] 王世充, 葛美丽, 李星鑫, 等. 伴血小板无效输注的重型再生障碍性贫血患者免疫抑制治疗后转归研究[J]. 中国实用内科杂志, 2022, 42(7): 557-562, 567.
- [14] 张甲倩, 张升校, 乔军, 等. 风湿性疾病患者外周血CD4+ T细胞亚群特征及其对免疫调节联合治疗的反应[J]. 中华风湿病学杂志, 2021, 25(6): 368-372.
- [15] 王姣, 兰坚, 周颖. 脐带间充质干细胞静脉输注治疗难治性重型再生障碍性贫血疗效及对外周血Th1、Th17水平的影响[J]. 标记免疫分析与临床, 2021, 28(4): 549-553, 590.
- [16] 张梦露, 陈婉淑, 郝冰. 获得性再生障碍性贫血体细胞突变及其意义[J]. 中国医学科学院学报, 2022, 44(3): 491-496.

(收稿日期: 2023-05-25)

(校对编辑: 姚丽娜)