

慢性再生障碍性贫血 CD8⁺T 细胞 CD28 表达与中医辨证分型关系的探讨

邓 颀 王运律 胡 琦 孙思明 章晓鹰

摘要 目的 探讨慢性再生障碍性贫血(chronic aplastic anemia, CAA)患者外周血 CD8⁺T 细胞 CD28 分子的表达与中医辨证分型的关系。**方法** 采用流式细胞仪技术,测定门诊和住院 CAA 患者 45 例、健康对照人群 24 名的外周血 CD8⁺T 细胞 CD28 分子的表达水平,从免疫学角度讨论其与中医分型关系。**结果** (1)CAA 患者的 CD8、CD28、CD8⁺CD28⁺ 表达水平及 CD8⁺CD28⁺/CD8⁺CD28⁻ 均高于健康对照组($P < 0.01, P < 0.05$)。(2)CAA 肾阴虚患者 CD28、CD8⁺CD28⁺ 表达水平及 CD8⁺CD28⁺/CD8⁺CD28⁻ 均高于肾阳虚患者($P < 0.01, P < 0.05$)。**结论** (1)CAA 患者外周血共刺激分子 CD28 异常高表达,提示 CD28 失调可能在 CAA 免疫发病中起重要作用。(2)CAA 患者外周血 CD28、CD8⁺CD28⁺ 的表达水平及 CD8⁺CD28⁺/CD8⁺CD28⁻ 可以作为 CAA 辨证分型的参考指标,肾阴虚患者的免疫紊乱较肾阳虚患者严重。

关键词 再生障碍性贫血;CD8⁺;CD28;辨证分型

Relationship between CD8⁺T-cell CD28 Expression and TCM Deffereniation Type in Patients with Chronic Aplastic Anemia DENG Ting, WANG Yun-lu, HU Qi, et al *Department of Hematology, Shanghai Municipal Hospital of TCM, Shanghai (200071)*

Objective To explore the relationship between CD8⁺T-cell CD28 molecular expression in peripheral blood and TCM type in patients with chronic aplastic anemia (CAA). **Methods** Using flow cytometry to detect the CD28 expression in 45 in-patients or out-patients and 24 healthy subjects for control. And the relation with TCM type was analyzed from the immunological aspect. **Results** (1) The levels of CD8, CD28, CD8⁺CD28⁺ expression and CD8⁺CD28⁺/CD8⁺CD28⁻ were all higher in the CAA patients than those in the healthy subjects ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). (2) The levels of CD28, CD8⁺CD28⁺ expression and CD8⁺CD28⁺/CD8⁺CD28⁻ were all higher in the CAA patients of Shen-Yin deficiency type than those in the CAA patients of Shen-Yang deficiency type ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** (1)The abnormal high expression of peripheral blood co-stimulatory molecules CD28 suggested CD28 disorder may play an important role in immuno-pathogenesis of CAA. (2) The levels of peripheral CD28, CD8⁺CD28⁺ expression and CD8⁺CD28⁺/CD8⁺CD28⁻ can be taken as an objective indexes for TCM typing of CAA, which was disordered more severe in patients of Shen-Yin deficiency type than in those of Shen-Yang deficiency type.

Key words aplastic anemia; CD8⁺; CD28; TCM deffereniation typing

目前有关慢性再生障碍性贫血(chronic aplastic anemia, CAA)中医证型的客观化、标准化的研究已有众多报道,不少学者业已证实 CAA 各证型确有其客观的物质基础^[1]。但中医分型与共刺激分子之间的相关性分析则尚未见报道。我们采用流式细胞仪技术对

45 例 CAA 患者以及 24 名健康人的外周血 CD8⁺T 细胞 CD28 分子的表达进行测定观察,并根据中医辨证分型,探讨两者的相互关系,现报告如下。

资料与方法

1 临床资料 全部病例来自 2002 年 10 月—2004 年 3 月期间本院血液科门诊及病房 CAA 患者共 45 例,符合 1987 年第四届全国再障学术会议的诊断标准^[2]。其中男 19 例,女 26 例;中位年龄 39.73 岁,中位病程 8.27 年。健康对照 24 名全部为门诊健康体

基金项目:上海市卫生局科研基金资助项目(No. 2003G06)

作者单位:上海市中医医院血液科(上海 200071)

通讯作者:邓 颀, Tel:021-56639828 转 3302, E-mail: grace dun@

hotmail.com

检者,其中男 10 名,女 14 名,中位年龄 35.04 岁。参照 1982 年全国首届中西医结合血液病学术会议拟定的再生障碍性贫血辨证分型标准^[3],将 45 例 CAA 患者分为肾阳虚证 27 例和肾阴虚证 18 例。两组患者在年龄、病程方面差异无显著性($P > 0.05$)。

2 观察方法 所有受试者对象均抽取肘静脉血 2ml 置于抗凝管中,进行淋巴细胞表型测定。采用美国 Beckman-Coulter 公司的 EPICS-XL 流式细胞仪,PE-CD28 及相应的同型对照试剂均购自法国 Immunotech 公司;FITC-CD8 及相应的同型对照试剂均购自深圳晶美生物工程有限公司。用常规方法标记细胞,Flow-Check 校准光路,按前散射/侧散射圈定淋巴细胞群,每次每样本淋巴细胞技术均大于 5 000 个,分析该群淋巴细胞,获得相应细胞阳性表达率。

3 统计学处理 实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示;两均数比较用 t 检验;用 SPSS 11.5 软件完成统计过程。

结 果

CAA 患者和各证型患者与健康对照组 CD8、CD28、CD8⁺CD28⁺、CD8⁺CD28⁻ 细胞的表达百分率及 CD8⁺CD28⁺/CD8⁺CD28⁻ 比值,见表 1。

CAA 患者 CD8、CD28 及 CD8⁺CD28⁺ 的表达率均明显高于健康对照组($P < 0.01, P < 0.05$),而且 CD8⁺CD28⁺/CD8⁺CD28⁻ 明显上升($P < 0.05$),提示 CAA 患者存在着 T 细胞免疫紊乱,外周血的 T 淋巴细胞数量明显增多,共刺激分子 CD28 的表达水平也显著增高。CAA 患者肾虚两证型的 CD8/CD28 细胞群表达水平对比有 3 项指标差异具有显著性:肾阴虚患者共刺激分子 CD28、CD8⁺CD28⁺ 的表达水平显著高于肾阳虚患者($P < 0.01$);CD8⁺CD28⁺/CD8⁺CD28⁻ 也较后者上升($P < 0.05$),提示 CD28、CD8⁺CD28⁺ 和 CD8⁺CD28⁺/CD8⁺CD28⁻ 可以作为慢性再障中医辨证分型的客观化指标。

与健康对照组比较,肾阳虚患者各项指标差异无显著性,而肾阴虚患者的 CD28、CD8⁺CD28⁺、CD8 表达增加($P < 0.01, P < 0.05$),而 CD8⁺CD28⁻ 的表达

降低,而 CD8⁺CD28⁺/CD8⁺CD28⁻ 升高($P < 0.05$),提示肾阴虚患者的免疫紊乱较肾阳虚患者严重。

讨 论

中医学认为 CAA 病位在肾,病机以虚为主,肾精不足是 CAA 根本,故治疗以补肾为主。近半世纪来,中西医结合治疗 CAA 临床上获得较好的疗效。中医学的精髓在于辨证论治,证是机体功能状态的综合反应,是辨证论治的核心。中医证型客观化研究是近年来中西医结合临床研究中甚为活跃的领域之一,对于中医证实质的研究越来越深入,许多学者已从不同层次不断地寻求中医证型的物质基础及客观依据。

越来越多的研究证实,免疫介导的造血抑制是再障常见的病理机制,特别是与 T 淋巴细胞数量和功能的异常密切相关^[4]。根据中国医学科学院血液研究所近 40 年对再障调查研究发现^[5]:AA 的发病主要是 T 细胞功能异常激活,分泌大量造血负调控因子,抑制造血导致造血功能衰竭,故提出 AA 是 T 细胞功能亢进导致的造血功能衰竭,是一种免疫病。T 细胞的活化需要两个信号的参与,TCR-MHC/抗原信号和共刺激信号。CD28 是最早被证实的共刺激分子,持续表达于 T 淋巴细胞上,其配体是 APC 上表达的 B7 分子,两者相互作用,可激活 T 细胞^[6]。有研究发现^[7]:CD28 在参与 T 细胞的激活与增殖的同时,可通过产生抗凋亡蛋白 Bcl-xl、Bcl-xr 等抑制 Fas 或 FasL 的表达,延缓 T 细胞凋亡的启动,保证免疫反应的起始、扩大和持续。综上所述,T 细胞活化和凋亡均受共刺激分子的影响和调控。

本研究表明 CAA 患者 CD8、CD28 及 CD8⁺CD28⁺ 的表达均明显高于健康对照组($P < 0.01, P < 0.05$),而且 CD8⁺CD28⁺/CD8⁺CD28⁻ 明显上升($P < 0.05$)。由此可知 CAA 患者 CD8⁺CTL 细胞明显增多,而且共刺激分子 CD28 的表达水平也明显上升,因此我们推测是否由于 AA 患者体内共刺激分子 CD28 的高表达而使激活的 T 细胞抵抗 Fas 介导的凋亡,从而异常持续激活,引起一系列的免疫紊乱。目前有学者提出 AA 患者体内激活的 T 淋巴细胞增多是否

表 1 各组 CD8/CD28 细胞群的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CD8 (%)	CD28 (%)	CD8 ⁺ CD28 ⁺ (%)	CD8 ⁺ CD28 ⁻ (%)	CD8 ⁺ CD28 ⁺ /CD8 ⁺ CD28 ⁻
健康对照	24	29.52 ± 5.53	53.09 ± 9.92	13.72 ± 4.86	16.69 ± 4.82	0.96 ± 0.61
CAA 患者	45	32.90 ± 7.99*	60.55 ± 10.70**	17.12 ± 8.25*	14.79 ± 5.17	1.38 ± 0.94*
CAA 肾阳虚	27	31.68 ± 6.08	56.08 ± 9.98 ^{△△}	13.87 ± 6.59 ^{△△}	16.30 ± 5.83	1.04 ± 0.87 [△]
CAA 肾阴虚	18	35.50 ± 9.17*	66.21 ± 9.22**	21.14 ± 7.49**	13.89 ± 3.65*	1.65 ± 1.04*

注:与健康对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 CAA 肾阴虚患者比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$

与其未能及时有效地凋亡有关^[8]。Walker 等对活化的外周血 T 细胞的研究发现^[9], 正常 T 细胞中低 CD28 表达使细胞易于产生 Fas 介导的凋亡, 而与 CD28 结合可保护其免于凋亡。Kim^[10]等证实 AA 患者淋巴细胞体外活化后 Fas 表达较健康人缓慢, 激活诱导细胞凋亡延迟, 因此其活化后清除也延迟。

CAA 不同肾虚证型各项指标也存在差异, 肾阴虚组患者共刺激分子 CD28、CD8⁺CD28⁺ 的表达水平显著高于肾阳虚组患者 ($P < 0.01$); CD8⁺CD28⁺/CD8⁺CD28⁻ 也较后者上升 ($P < 0.05$)。与健康对照组比较, 肾阴虚组除上述各项指标有显著差异外, 还伴有 CD8 表达增加, CD8⁺CD28⁻ 表达减低 ($P < 0.05$), 而肾阳虚组患者的各项指标只是在数值上存在差别, 与健康对照组并无统计学差异。提示 CAA 不同证型确有其客观的物质基础, 肾阴虚型患者免疫紊乱程度明显甚于肾阳虚组, CTL 及共刺激分子 CD28 均显著高于后者, 众多临床研究也证实肾阳虚型患者的疗效均明显优于肾阴虚患者^[1], 与中医理论“阳虚易治, 阴虚难调”和“阳易回而阴难调”不谋而合。

本研究结果初步证明, CAA 患者外周血 CD28 共刺激分子高表达, 与中医辨证分型密切相关; 为 CAA 患者中医辨证分型提供了客观化、量化指标。

参 考 文 献

- 1 黄振翘. 中医药治疗再生障碍性贫血的临床和实验研究进展. 上海中医药杂志 2000;14(8):46—49.
Huang ZQ. Progress of clinical and experimental research on Chinese medicine in treating aplastic anemia. Shanghai J TCM 2000;14(8):46—49.
- 2 中华血液学会第四届全国再障学术会议. 中华血液学杂志 1987;8(8):封四,468.
The 4th National Seminar on Study of Aplastic Anemia of Chinese Hematology Association. Chin J Hematol 1987;8(8):4th, 468.
- 3 陈贵廷, 杨思澍主编. 实用中西医结合诊断治疗学. 北京: 中国医药科技出版社, 1991:556—557.

Chen GT, Yang SS, editors. Practical diagnosis and therapy of integrated traditional Chinese and western medicine. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Science & Technology Publishing House, 1991:556—557.

- 4 张之南, 李蓉生. 红细胞疾病基础与临床. 北京: 科学出版社, 2000:71—72.
Zhang ZN, Li RS. Basic principles and clinical practice of erythrocyte disease. Beijing: Science Press, 2000:71—72.
- 5 何广胜, 邵宗鸿. 再生障碍性贫血群体基础及临床研究. 医学研究通讯 2002;31(8):15—16.
He GS, Shao ZH. Basic and clinical research in aplastic anemia population. Bull Med Res 2002;31(8):15—16.
- 6 王 晶, 克晓燕. CD80/CD86-CD28/CTLA-4 共刺激信号在移植耐受中的作用. 中华血液学杂志 2002;23(12):665—667.
Wang J, Ke XY. The role of CD80/CD86-CD28/CTLA-4 costimulation signal in transplantation tolerance. Chin J Hematol 2002;23(12):665—667.
- 7 范祖森, 马宝骊. B7/CD28 共刺激对 T 细胞功能和细胞因子格局的作用. 免疫学杂志 1999;15(4):220—222.
Fan ZS, Ma BL. Effects of B7/CD28 costimulation on T cell function and cytokine pattern. Immunol J 1999;15(4):220—222.
- 8 和 虹, 邵宗鸿. 再生障碍性贫血患者的 T 淋巴细胞研究进展. 中华血液学杂志 1999;20(10):553—555.
He H, Shao ZH. Progress of research on T lymphocyte in patients with aplastic anemia. Chin J Hematol 1999;20(10):553—555.
- 9 周建华, 苏燎原, 童 建, 等. CD28 和 Fax 在辐射所致 T 细胞凋亡中作用的研究. 辐射研究与辐射工艺学报 2001;19(13):209—213.
Zhou JH, Su LY, Tong J, et al. Study on effect of CD28 and Fax in T cell apoptosis. J Radiat Process 2001;19(13):209—213.
- 10 Kim SC, Min YH, Lee S, et al. Delayed activation-induced T lymphocytes death in aplastic anemia: related with abnormal Fas system. Korean J Intern Med 1998;13(1):41—46.
(收稿:2004-06-30 修回:2004-09-15)