

CD3⁻ CD19⁺ B 淋巴细胞及 BAFF 在自身免疫性溶血性贫血发病中的变化

何合胜 靳小可 刘善浩 徐又海 杨玉琼 齐 晶

(皖南医学院第一附属医院 弋矶山医院 血液内科 安徽 芜湖 241001)

【摘要】目的: 探讨自身免疫性溶血性贫血(AIHA)患者 CD3⁻ CD19⁺ B 细胞及外周血 B 淋巴细胞活化因子(BAFF)的表达及其在该病发病中的意义。方法: 选择 22 例 AIHA 患者和 14 例健康志愿者为研究对象,用流式细胞术检测外周血 CD3⁻ CD19⁺ B 细胞的比例;ELISA 方法检测血清中 BAFF 的水平。结果: AIHA 及健康志愿者的 CD3⁻ CD19⁺ B 淋巴细胞的比例分别为 (15.79 ± 5.32) %、(11.38 ± 3.17) % ,BAFF 浓度分别为(627.9 ± 138.6) ng/L、(397.2 ± 95.3) ng/L; AIHA 患者 CD3⁻ CD19⁺ B 细胞的比例及血清中 BAFF 的浓度均高于健康志愿者(P < 0.05)。结论: AIHA 患者外周血 CD3⁻ CD19⁺ B 细胞的比例及 BAFF 浓度升高,提示外周血 CD3⁻ CD19⁺ B 淋巴细胞及 BAFF 可能参与 AIHA 的发病过程。

【关键词】自身免疫性溶血性贫血; B 淋巴细胞; B 淋巴细胞活化因子

【中图分类号】R 556.6; R 446.11 **【文献标志码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2019.04.013

Change of CD3⁻ CD19⁺ B cells and B-cell activating factor in patients with autoimmune hemolytic anemia

HE Hesheng JING Xiaoke LIU Shanhao XU Youhai YANG Yuqiong QI Jing

Department of Hematology ,The First Affiliated Hospital of Wannan Medical College ,Wuhu 241001 ,China

【Abstract】Objective: To investigate the count of CD3⁻ CD19⁺ B lymphocytes and levels of B - cell activating factor(BAFF) in peripheral blood in patients with autoimmune hemolytic anemia(AIHA) and analyze the significance of these two indicators in AIHA. **Methods:** A total of 22 AIHA patients and 14 healthy controls were enrolled. Flow cytometry was used to determine the expressions of CD3⁻ CD19⁺ B lymphocytes in peripheral blood and enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) was performed to measure BAFF level. **Results:** The percentage of CD3⁻ CD19⁺ B lymphocytes in PBMCs of AIHA patients was higher than that from healthy controls [(15.79 ± 5.32) % vs. (11.38 ± 3.17) %](P < 0.05). However ,patients of AIHA had higher concentration of BAFF than the control subjects [(627.9 ± 138.6) ng/L vs. (397.2 ± 95.3) ng/L](P < 0.05). **Conclusion:** The expression of CD3⁻ CD19⁺ B lymphocytes and levels of BAFF are significantly increased in AIHA patients ,suggesting that CD3⁻ CD19⁺ B lymphocytes and BAFF may play certain role in the pathogenesis of AIHA.

【Key words】 autoimmune hemolytic anemia; B lymphocytes; B-cell activating factor

自身免疫性溶血性贫血(autoimmune hemolytic anemia ,AIHA)是由于产生抗自身红细胞抗体导致红细胞破坏发生溶血性贫血的一种器官特异性自身免疫性疾病。AIHA 确切的发病机制非常复杂,对该病的研究目前更多集中在体液免疫及细胞免疫方面^[1]。B 淋巴细胞由于其分泌抗体的功能长期被认为在 AIHA 的发病机制中发挥重要作用,在临床应用中针对 CD20 的单克隆抗体清除 B 淋巴细胞作为 AIHA 的二线治疗手段,其对部分患者有效也进一

步支持 B 淋巴细胞数量或者功能异常可能导致 AIHA 疾病发生。B 淋巴细胞活化因子(B-cell activating factor of the TNF family ,BAFF)属于肿瘤坏死因子超家族成员,一般在巨噬细胞、单核细胞、树突状细胞表达,对 B 淋巴细胞的增殖、分化及生存发挥重要作用^[2]。鉴于 B 淋巴细胞在 AIHA 发病中的作用及 BAFF 与 B 淋巴细胞的相关性,我们通过流式细胞检测 CD3⁻ CD19⁺ B 淋巴细胞的变化及 ELISA 方法检测 BAFF 水平,探讨上述两个指标在

基金项目:安徽省重点研究与开发计划项目(201904a07020036)

收稿日期:2019-01-31

作者简介:何合胜(1974-),男,副主任医师,(电话)15255378879,(电子信箱)hhsmed2012@126.com。

AIHA 发病中的变化及意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2015年8月~2018年6月在弋矶山医院及皖南医学院第二附属医院门诊及住院 AIHA 初发患者 22 例,其中男 9 例,女 13 例,年龄 23 ~ 71 岁,中位年龄 52 岁。纳入健康志愿者 14 例,男 6 例,女 8 例,年龄 25 ~ 57 岁,中位年龄 45 岁。EDTA 管抽取外周静脉血进行流式细胞检测,所有外周血血清采集分离后冻存于 -80℃ 冰箱留作 ELISA 检测时使用。

1.2 主要试剂及仪器 流式细胞仪检测标记的抗体均购自 eBioscience 公司,BAFF 的 ELISA 法检测试剂盒购自 R&D 公司。流式细胞仪为 BD 公司产品。

1.3 实验方法 分别抽取 AIHA 患者和健康志愿者外周静脉血 2 mL,EDTA 抗凝处理后,取 100 mL 新鲜 EDTA 管抗凝的血标本加入样品测定管内,以 CD3⁻CD19⁺ 淋巴细胞作为 B 淋巴细胞标记,通过流式细胞仪检测 CD3⁻CD19⁺ B 细胞占淋巴细胞总数的百分比。血清 BAFF 水平检测采用定量 ELISA 法。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据处理。数值以均数 ± 标准差表示,组间差异采用 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组外周血淋巴细胞分析 结果显示, AIHA 患者外周血中淋巴细胞绝对值与健康志愿者组差异无统计学意义(*t* = 0.952, *P* = 0.348)。见表 1。

表 1 两组外周血淋巴细胞分析

组别	<i>n</i>	淋巴细胞绝对值 / (10 ⁹ /L)
健康志愿者	14	1.31 ± 0.30
AIHA 患者	22	1.18 ± 0.45

2.2 两组外周血 CD3⁻CD19⁺ B 细胞的表达 结果显示, AIHA 患者 CD3⁻CD19⁺ B 细胞比例较健康志愿者升高,差异有统计学意义(*t* = 2.793, *P* = 0.009)。见表 2。

2.3 两组外周血 BAFF 浓度的检测 结果显示, AIHA 患者细胞培养上清液中 BAFF 浓度较健康志愿者升高,差异有统计学意义(*t* = 5.449, *P* = 0.000)。见表 3。

3 讨论

AIHA 作为一种自身免疫性溶血疾病,目前针

对该病的发病机制研究更多集中在体液免疫及细胞免疫方面^[1]。近年来国内外学者分别从 T、B 淋巴细胞两方面对 AIHA 疾病进行系列研究,试图通过调节患者的免疫功能状态来更精准地治疗 AIHA^[3]。我们前期的研究发现 AIHA 患者 Th17 细胞增高、Breg 细胞比例降低^[4-5] 我们的研究丰富了对 AIHA 发病机制的更多认识。但是针对 AIHA 的发病机制研究,仍有许多悬而未决的问题,值得我们继续进行后续相关的研究。

表 2 两组外周血 CD3⁻CD19⁺ B 细胞的表达

组别	<i>n</i>	CD3 ⁻ CD19 ⁺ B 细胞/%
健康志愿者	14	11.38 ± 3.17
AIHA 患者	22	15.79 ± 5.32

表 3 两组外周血 BAFF 浓度

组别	<i>n</i>	BAFF 浓度 / (ng/L)
健康志愿者	14	397.2 ± 95.3
AIHA 患者	22	627.9 ± 138.6

目前认为, B 淋巴细胞功能或数量异常产生的抗红细胞自身抗体是 AIHA 发病的主要因素之一。近年来, B 淋巴细胞在 AIHA 发病机制中的作用日益受到重视。B 淋巴细胞介导的体液免疫反应是一个非常复杂的过程,其活化、增殖、分化等受到多种体内外因素影响。有研究显示同为自身免疫性疾病的 ITP 患者 B 淋巴细胞增高,推测可能与 B 淋巴细胞凋亡减少和过度增殖有关^[6]。在我们的研究中, AIHA 患者 CD3⁻CD19⁺ B 细胞较健康志愿者增高,也支持 B 淋巴细胞参与 AIHA 的发病过程。但我们前期的研究表明 AIHA 患者呈现负向免疫调节功能的调节性 B 细胞水平下降^[5],因此 B 淋巴细胞在 AIHA 发病中具体的免疫调节作用应结合 B 细胞的不同亚群决定。

BAFF 是肿瘤坏死因子超家族成员之一,为一种促进 B 细胞成熟和分化的刺激因子,能够促进 B 淋巴细胞的增殖及分化。有研究^[7]显示,BAFF 表达减少可导致 B 细胞数目下降并进一步影响体液免疫功能,BAFF 过表达可激活自身反应性 B 细胞,通过使 B 淋巴细胞分化为浆细胞,从而不断分泌自身抗体,在自身免疫性疾病的发生和进展中发挥一定的作用。已有研究证实^[8-10]在系统性红斑狼疮、类风湿关节炎、ITP 等自身免疫性疾病患者血清中存在高水平的 BAFF。本研究证实 AIHA 患者血清 BAFF 水平高于对照组,进一步支持 BAFF 在 AIHA

的发病中起到一定的作用。我们推测 BAFF 高表达激活自身反应性 B 细胞,不断产生针对自身红细胞的抗体,促进红细胞破坏从而发生自身免疫性溶血。由于我们的条件有限,无法针对所有患者的红细胞自身抗体常见类型 IgG、C3 检测,因此无法评价 BAFF 浓度与红细胞自身抗体类型是否存在一定关联。临床工作中通过检测 AIHA 患者不同阶段的 BAFF 水平,有助于评估疗效,指导治疗,同时也可以针对 BAFF 靶点开发出有针对性的靶向药物。

目前治疗 AIHA 的首选药物为糖皮质激素,但由于该药不能从根本上彻底阻断根治 AIHA,部分患者停用激素后存在复发或需要长期激素维持治疗。相当多的患者因为糖皮质激素的不良反应,不能坚持长期服药。另外有少部分患者经过激素、切脾治疗后仍不能控制病情,迫切需要开发出更多治疗 AIHA 的药物。Belimumab(贝利木单抗)是第一个全人源化抗 BAFF 单克隆抗体,它通过特异性阻断可溶性 BAFF 与 BAFF 受体的结合,从而抑制 B 细胞的生长,包括自体反应性 B 细胞。同时减少 B 细胞分化为成熟浆细胞从而减少免疫球蛋白的产生^[11]。目前已用于系统性红斑狼疮等自身免疫系统疾病的治疗^[8]。因此贝利木单抗对于 AIHA,尤其难治复发性 AIHA 患者是一个可供选择的治疗药物。

总之,我们的研究提示 AIHA 患者外周血 BAFF 浓度增高,可能促进 B 淋巴细胞活化,在 AIHA 发病中起着重要的作用,该研究结果有助于在临床工作中通过检测 AIHA 患者中的 CD3⁻CD19⁺ B 细胞及 BAFF 浓度变化,能够更全面地评估患者疗效、病情演变,同时为通过针对 BAFF 的靶向药物干预 BAFF 水平从而靶向治疗该疾病提供新的方向。

【参考文献】

[1] BARROS MM ,BLAJCHMAN MA ,BORDIN JO. Autoimmune hemolytic anemia: recent progress in understanding the immunobiolo-

gy and the treatment[J]. *Transfusion Medicine Reviews* 2010 24 (3): 195 – 210.

[2] MOORE PA ,BELVEDERE O ,ORR A. Member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator[J]. *Science* ,1999 , 285(5425): 260 – 263.

[3] WILMA BARCELLINI ,FRANCESCO ZAJA ,ANNA ZANINONI *et al.* Low-dose rituximab in adult patients with idiopathic autoimmune hemolytic anemia: clinical efficacy and biologic studies[J]. *Blood* 2012 ,119(16): 3691 – 3697.

[4] 何合胜,谢彦晖. Th17 细胞及其分泌的 IL-17 在自身免疫性溶血性贫血患者中的变化及意义[J]. *细胞与分子免疫学杂志* , 2011 27(6): 662 – 667.

[5] 何合胜,靳小可,徐又海,等. 调节性 B 细胞在自身免疫性溶血性贫血患者外周血中的表达及临床意义[J]. *中国临床药理学及治疗学杂志* 2018 23(3): 329 – 332.

[6] KIM Y ,RYU J ,RYU MS *et al.* C-reactive protein induces G2/M phase cell cycle arrest and apoptosis in monocytes through the up-regulation of B-cell translocation gene 2 expression[J]. *Febs Lett* , 2014 588(4): 625 – 631.

[7] CINES DB ,BUSSEL JB ,LIEBMAN HA *et al.* The ITP syndrome: pathogenic and clinical diversity [J]. *Blood* 2009 ,113(26): 6511 – 6521.

[8] KRYŠŤŮFKOVÁ O ,HULEJOVÁ H ,MANN HF *et al.* Serum levels of B-cell activating factor of the TNF family(BAFF) correlate with anti-Jo-1 autoantibodies levels and disease activity in patients with anti-Jo-1 positive polymyositis and dermatomyositis [J]. *Arthritis Research & Therapy* 2018 20(1): 158.

[9] SAMY E ,WAX S ,HUARD B *et al.* Targeting BAFF and APRIL in systemic lupus erythematosus and other antibody-associated diseases[J]. *Int Rev Immunol* 2017 36(1): 3 – 19.

[10] ZHU XJ ,SHI Y ,PENG J *et al.* The effects of BAFF and BAFF-R-Fc fusion protein in immune thrombocytopenia[J]. *Blood* ,2009 , 114(26): 5362 – 5367.

[11] JORDAN N ,D’ CRUZ DP. Belimumab for the treatment of systemic lupus erythematosus[J]. *Expert Rev Clin Immunol* 2015 ,11(2): 195 – 204.

[12] XU ZZ ,ZHAO BB ,XIONG H *et al.* Serum BAFF and APRIL levels in patients with autoimmune hemolytic anemia and their clinical [J]. *International journal of hematology* ,2015 ,102(4): 394 – 400.