

再生障碍性贫血 TIGIT, CD96, CD226 表达及与中医证型关系*

胡令彦, 周永明[△], 朱文伟, 胡明辉

(上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院, 上海 200437)

摘要: **目的** 研究 TIGIT, CD226, CD96 在再生障碍性贫血(AA)外周血的表达率, 以及与中医分型的关系。**方法** 收集再生障碍性贫血患者共 60 例, 以及正常组 20 例, 再障组根据中医诊断标准分为脾肾阴虚组及脾肾阳虚组, 流式法检测不同分组外周血淋巴细胞 TIGIT, CD226, CD96 表达的水平比较。**结果** 再障组患者的 TIGIT 水平较正常组降低, CD226, CD96 表达水平高于正常组; 再障组中脾肾阴虚型 CD226 及 CD96 表达水平较脾肾阳虚型升高; 病程小于 1 年的患者 TIGIT 低于病程较长的再障患者。结果有统计学差异 ($P < 0.05$)。**结论** TIGIT, CD226, CD96 表达在再障的发病过程有一定作用, 在中医分型物质基础上有一定差异, 与病程长短有一定相关性。

关键词: 再生障碍性贫血; TIGIT; CD226; CD96

中图分类号: R259

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2017)03-0050-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.03.012

再生障碍性贫血(aplastic anemia, 简称 AA)是一种以全血细胞减少和骨髓造血衰竭为特征的血液系统难治性疾病^[1]。目前, 越来越多的研究证明大多数 AA 的发生与 T 细胞免疫功能亢进有密切关系^[2-3]。

T 细胞表面具有抑制功能的多种协同刺激分子可以通过不同的方式来抑制 T 细胞的活化。Abbas 等^[4]在新的免疫共刺激或抑制分子时对一些具有免疫调节样结构域的蛋白质分子进行研究时发现了一个在 T 细胞和 NK 上表达的新分子, 该分子具有免疫球蛋白样结构域、跨膜区和免疫受体蛋白酪氨酸抑制模体(ITIM), 命名为 TIGIT(T cell immunoglobulin and ITIM domain)TIGIT^[5]。经研究, TIGIT, 及其相关调节因子 CD226, CD96 之间的相互激活对再障发病及中医分型有一定的影响及相关性。

1 临床资料与方法

1.1 诊断标准

AA 的诊断标准: 按照张之南主编的《血液病诊断及疗效标准》(第 3 版)中再生障碍性贫血(AA), 慢性再生障碍性贫血(CAA)重型再生障碍性贫血(SAA)的诊断标准^[6]。

中医诊断标准: 参照 1989 年 6 月在大连召开的

中国中西医结合研究会血液病专业委员会第 3 届第 2 次学术座谈会制订的辨证分型标准, 结合临床实际并作适当合并, 辨证分为脾肾阳虚型和脾肾阴虚型^[7]。

1.2 一般资料

收集本院血液科病房 2015 年 3 月至 2016 年 12 月的 12 至 65 岁再障患者, 共 60 例。其中, 男 30 例, 女 30 例; 平均年龄(47.07 ± 12.63)岁; 脾肾阴虚组 29 例, 脾肾阳虚组 31 例。正常对照组 20 例, 其中, 男性 14 例, 女性 6 例, 平均年龄(46.10 ± 12.01)岁。

1.3 检测方法

流式细胞术检测外周血 TIGIT、CD226、CD96 亚群。

取抗凝全血, 以 PBS 等体积稀释, 调整细胞浓度为 $4 \times 10^9/L$, 对细胞进行三色荧光直接染色, 取 100 μL 细胞悬液分别加入荧光标记 CD3、CD4、CD8、CD226、CD96、TIGIT 单抗各 20 μL 室温避光孵育 20min。加入 500 μL 溶血素, 37 $^{\circ}C$ 孵育 10min, 排除红细胞, 1 500r/min 离心 5min, 去上清加入 4ml PBS 缓冲液。室温避光 10min, 应用四色流式细胞仪以相应荧光标记的同型对照 IgG1 染色细胞为阴性对照, 设置各通道之间的荧光补偿后以 CD3 阳性细胞设门, 测定各 T 细胞亚群上 CD226, CD96, TIGIT 的表达率, 用

* 基金项目: 上海虹口区科委基金(30304115283); 国家中医药管理局中医临床研究基地业务建设科研专项基金(JDZX2012179)

收稿日期: 2017-05-12

作者简介: 胡令彦(1981-), 女, 浙江宁波人, 博士, 主治医师, 研究方向: 中医血液病临床及实验研究。

[△]通信作者: 周永明, E-mail: yongmingz@sohu.com

EX-po32 软件分析结果。

1.4 统计学方法

用 excel 录入数据,管理,核实校验锁定。计量资料若正态分布,用 t 检验数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,多个样本均数间的两两比较采用 Student-Newman-Keuls (SNK) 检验,若非正态分别使用非参数检验,两组比较用 U 检验,用四分位数($M(Q1, Q3)$)表示。数据统计分析采用 SPSS 16.0 软件。 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 正常组及再障组 TIGIT、CD226、CD96 在各组中的表达结果

结果提示,再障组外周血 TIGIT 表达水平低于正常组,CD226 及 CD96 表达水平高于正常组 ($P<0.05$)。见表 1。

表 1 TIGIT、CD226、CD96 在正常组及再障组中的表达结果

组别	<i>n</i>	TIGIT	CD226	CD96
再障组	60	11.30 (3.35, 19.90)	18.15 (10.90, 27.29)	9.95 (3.98, 16.50)
正常组	20	15.40 (10.93, 28.40)	12.36 (6.60, 19.39)	3.80 (0.53, 11.33)
<i>Z</i>		-2.061	-2.033	-2.811
<i>P</i>		0.039*	0.042*	0.005**

Mann-Whitney U 检验 注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

2.2 不同中医分型分组的 TIGIT、CD226、CD96 表达

60 例再障患者中,脾肾阴虚患者的外周血 CD226,CD96 表达水平高于脾肾阳虚患者 ($P<0.05$)。TIGIT 表达水平与脾肾阳虚组患者无差异 ($P>0.05$)。见表 2。

表 2 TIGIT、CD226、CD96 在不同中医证型中的表达结果

组别	<i>n</i>	TIGIT	CD226	CD96
脾肾阴虚组	29	16.20 (2.80, 27.25)	20.30 (12.30, 31.65)	12.80 (7.00, 26.40)
脾肾阳虚组	31	7.10 (3.50, 17.80)	16.12 (8.40, 22.90)	5.90 (3.60, 12.90)
<i>Z</i>		-0.651	-2.123	-2.9
<i>P</i>		0.515	0.035*	0.004**

Mann-Whitney U 检验 注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

2.3 不同病程分组比较 TIGIT、CD226、CD96 表达

将再障患者按病程大于 1 年及小于 1 年分为两组比较外周血 TIGIT、CD226、CD96 表达,提示病程较长组 TIGIT 表达水平高于病程较短组,有统计学差异 ($P<0.01$),两组 CD226 及 CD96 无明显差异。见表 3。

表 3 TIGIT、CD226、CD96 在不同病程分组中的表达结果

病程组别	<i>n</i>	TIGIT	CD226	CD96
小于 1 年	29	5.31 (1.25, 11.85)	19.7 (11.00, 31.65)	5.90 (3.55, 14.30)
大于 1 年	31	17.80 (6.20, 28.30)	15.70 (9.90, 27.10)	10.60 (3.90, 16.70)
<i>Z</i>		-3.136	-0.777	-1.243
<i>P</i>		0.002**	0.437	0.214

Mann-Whitney U 检验 注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

3 讨论

T 细胞免疫亢进与再生障碍性贫血的发病机制的相关性已被公认多年,Th1/Th2、Th17/Treg 比例失衡的作用已被本课题组近年较多研究所证实^[8-9],但其发生的原因及失衡过程中的调节因素仍需要进一步深入探索。近来,TIGIT 以及受其作用相关 T 细胞受体表达及细胞因子水平受到瞩目。目前研究认为,TIGIT 并未直接作用于 T 细胞,而是通过数种细胞因子配合下的刺激与共刺激作用来调节 T 细胞的状态和功能。CD155,CD226,PVRL,CD96,IL-10 形成了对 T 细胞活化的重要调节作用^[10]。

在体外,行 Th1、Th2、Th9 和 Th17 细胞的诱导培养 T 细胞表面的 TIGIT 受体活化导致 Th 细胞对应的转录因子均减少。用 CD226 siRNA 电穿孔转染 CD4⁺T 细胞,可导致 IFN- γ (Th1 型细胞因子)减少和 T- β (Th1 特异的转录因子)增加。与此相反,用 TIGIT siRNA 干预 T 细胞则导致 IL-10 分泌减少和 IFN- γ 增加,同时,这种效应可以被阻断性抗 CD226 所逆转,提示 CD226 的作用是促进 T 细胞活化,而 TIGIT 信号则能够抑制 T 细胞活化^[11]。TIGIT 和 CD226 分子能同时与配体 CD155/CD112 结合并分别对 T 细胞活化产生刺激和抑制作用,但与 CD226 分子相比,TIGIT 分子与配体 CD155/CD112 的结合力要强得多,因此,可以认为 TIGIT 对 T 细胞免疫耐受起主要作用^[12]。

CD226 是 CD155 和 CD112 共同的受体,而 CD96

仅是 CD155 的受体。CD226 在结构和功能上与活化 T 细胞上的 LFA-1 及 v3 相关联,并参与多个免疫环节的调节。CD96 又称 T 细胞活化晚期因子(Tactile),属于 T 细胞活化抗原^[13]。经证实,CD226 和 CD96 的结构特征有着高度的同源性。Levin 通过试验证实,CD226 和 TIGIT 分子同时与 CD155 作用时,对 T 细胞起活化作用,而单独刺激 TIGIT 分子后则对 T 细胞发挥抑制性作用^[14]。这种差别可能与其在 T 细胞表面表达量的变化,或上一级刺激因子的调节有关^[15],其在再生障碍性贫血患者体内的变化是否与发病有关,是否有协同性非常值得探索。

像 CD226/CD96 和 TIGIT 这种识别同一配体,但分别具有活化和抑制功能的成对受体在 T 细胞表面作用,能够对 T 细胞在不同环境下发生的变化产生重要意义^[14]。TIGIT 相关细胞因子对再障患者中 T 细胞免疫紊乱可能有较为重要的作用。本实验结果提示再障患者的 TIGIT 表达水平较正常组降低,CD226、CD96 高于正常组,证实了可能与 CD226、CD96 表达升高后对 T 细胞的免疫促进导致了细胞持续损伤有关。比较了不同病程患者 TIGIT 相关受体变化,提示病程小于一年的患者 TIGIT 低于病程较长的再障患者。而 CD226 及 CD96 在不同病程中对比无明显差异。提示随着病程延长,有可能有其它协同因子参与导致 AA 的缓解困难。

TIGIT 相关受体研究近年在各疾病领域较为收到关注,但再障中医证型与之的关系尚未有广泛研究。再障属祖国医学的“虚劳”“髓枯”等范畴,“肾者,主骨生髓”;《素问生气通天论篇》云:“骨髓坚固,气血皆从。”《病机沙篆》也说:“血之源头在乎肾。”说明肾与造血密切相关。脾统血,为后天之本,生化之源。因此,我们以脾肾阴虚及脾肾阳虚为再障的中医研究的基本分型。

前期研究提示,T 细胞免疫相关因子在不同证型中表达水平存在统计学差异。Th17 表达水平,IL-6,IL-17 脾肾阴虚组高于脾肾阳虚组^[16]。此次结果亦显示,脾肾阴虚型 CD226 及 CD96 表达水平较脾肾阳虚型升高。CD226 及 CD96 为导致 T 细胞过度活化的因素,可以提示对于脾肾阴虚型患者 T 细胞免疫紊乱程度较脾肾阳虚患者更为明显。证型分布可能与 T 细胞免疫紊乱的途径与程度有关,对证型及物质基础研究,预后研究以及治疗手段及起效途径均有一

定提示作用。

近年诸多的临床研究表明,脾肾亏虚是再障发病病机的关键,以健脾补肾为主的方药取得了较好的疗效。如何用现代思维解释理解其病机,以及中医分型和用药所体现的双向性在 TIGIT 相关受体的调控机制方面也是值得深入探讨的角度。

参考文献:

- [1] Young NS. Hematopoietic cell destruction by immune mechanism in acquired aplastic anemia[J]. Semin Hematol, 2000, 37(1): 3-14.
- [2] Young NS, Calado RT, Scheinberg P, et al. Hematopoietic cell destruction by immune mechanism in acquired aplastic anemia: recent concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia[J]. Blood, 2006, 108(8): 2509-2519.
- [3] 邵宗鸿. 再生障碍性贫血的研究[J]. 基础医学与临床, 2007, 27(3): 233-237.
- [4] Abbas AR, Baldwin D, Ma Y, et al. Immune response in silico (IRIS): immune-specific genes identified from a compendium of microarray expression data [J]. Genes Immun, 2005, 6(4): 319-331.
- [5] Levin SD, Taft DW, Brandt CS, et al. Vstm3 is a member of the CD28 family and an important modulator of T-cell function [J]. Eur J Immunol, 2011, 41(4): 902-915.
- [6] 张之南. 血液病诊断及疗效标准 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1998: 19-21.
- [7] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则 (试行) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 178-179.
- [8] 胡令彦, 周永明, 陈英坤, 等. 非重型再生障碍性贫血患者 Th17/Treg 比例及相关细胞因子白细胞介素-6、-17 和转化生长因子 $\beta 1$ 水平的临床意义 [J]. 临床内科杂志, 2013, 30(9): 636-638.
- [9] 李峻, 周永明, 胡明辉, 等. 生血合剂影响慢性再障患者外周血单个核细胞 T-bet/GATA-3 及相关信号分子、细胞因子表达的体外研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(1): 28-31.
- [10] Yu X, Harden K, Gonzalez LC, et al. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells [J]. Nat Immunol, 2009, 10(1): 48-57.
- [11] Lozano E, Dominguez-Villar M, Kuchroo V, et al. The TIGIT/CD226 axis regulates human T cell function [J]. J Immunol, 2012, 188(8): 3869-3875.

- [12] 方修移,刘俊,周海燕,等. CD226、TIGIT 在类风湿关节炎患者 T 细胞亚群的表达及其与病情活动性关系的研究[J]. 中南药学, 2016, 14(10): 1041-1044.
- [13] Chan CJ, Martinet L, Gilfillan S, et, al. The receptors CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of natural killer cell functions[J]. Nat Immunol, 2014, 15(5): 431-438.
- [14] Stanitsky N, Mandelboim O. Paired NK cell receptors controllong NK cytotoxicity [J]. FEBS Lett, 2010, 584(24): 4895-4900.
- [15] 张慧敏,朱影,刘清池,等. CD226 在再生障碍性贫血患者 T 淋巴细胞上的表达及其与血清中相关细胞因子浓度的关系 [J]. 临床血液学杂志, 2010, 23(11): 661-663.
- [16] 胡令彦,周永明,陈英坤,等. 健脾补肾方对再生障碍性贫血患者外周血 Th17 及相关细胞因子水平的影响 [J]. 云南中医学院学报, 2013, 36(3): 4-7.

(编辑:徐建平)

The Expression Rates of TIGIT, CD226, CD96 in the Peripheral Blood of AA Patients and the Relationship between Them and Chinese Tradition Medicine Type

HU Lingyan, ZHOU Yongming, ZHU Wenwei, HU Minghui

(Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine. Shanghai University of Traditional Chinese Medicin, Shanghai 200437, China)

ABSTRACT: Objective To research the expression rates of TIGIT, CD226, CD96 in the peripheral blood of AA patients and the relationship between them and Chinese tradition medicine type. **Methods** 60 AA patients and 20 normal persons were enrolled in the research. The AA group was devided into PISHENYINXU and PISHENYANGXU. The percantage of TIGIT, CD226, CD96 in he peripheral blood were determined by flow cytometry (FCM). **Results** In AA patinets group, the proportions of TIGIT decreased and the CD226, CD96 expression rate was higher than the normal group. The CD226, CD96 expression rate in the PishenYinxu group was higher than it in PishenYangxu group. The TIGIT expression in the patients that the duration was less than one year was less than that in the patients that the duration was longer than one year. The results were significantly different ($P < 0.05$). **Conclusion** It is suggested that the costimulatory molecules TIGIT, CD226 and CD96 play a role in the pathogenesis of AA. The expression of them has difference on basis of the TCM different syndrome type. The expression of them has relationship with the course of disease.

KEY WORDS: alastic anemia; TIGIT; CD226; CD96

(上接第 49 页)

- 析[J]. 中国医学创新, 2014, 11(9): 82-83.
- [16] 范丽丽,郑作文,杨柯,等. 毒性中药附子量效关系的实验研究[J]. 四川中医, 2011, 29(5): 53-57.
- [17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015: 191-193.
- [18] 马娜,罗来成,朱东海. 右归丸对肾阳虚大鼠垂体-肾上腺轴动态影响的实验研究 [J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(6): 1324-1326.
- [19] 肖静,王毅兴,高建东,等. 肾阳虚证的研究进展[J]. 上海中医药大学学报, 2008, 22(2): 73-76.
- [20] 贺文彬,张俊龙,陈乃宏. “肾-髓-脑”生物轴理论初探[J]. 中医杂志, 2015, 56(14): 1182-1184.

(编辑:徐建平)