

慢性高原病患者红细胞 CD35、CD44、CD58、CD59 的表达研究

唐 梦¹, 朱黎明², 马 轶¹, 朱明明¹

(1. 青海大学附属医院血液科, 青海 西宁 810000;

2. 安徽中医药大学护理学院, 安徽 合肥 230000)

摘要: 目的 研究 CMS 患者外周血红细胞表面免疫分子 CD35、CD44、CD58、CD59 表达变化。方法 选取自 2019 年 11 月—2021 年 1 月就诊于青海大学附属医院的 CMS 患者设为 CMS 组, 另选取在青海大学附属医院体检中心的健康人(血象正常)设为正常对照组。两组研究对象均为长期居住于海拔 2500~4500 m 的汉族男性, 各 20 例。采用流式细胞术检测 CMS 患者外周血的成熟红细胞表面 CD35、CD44、CD58、CD59 表达变化, 同时分离部分红细胞, 测定其对肿瘤细胞的快速天然免疫黏附反应, 比较两组临床资料。结果 CMS 组患者外周血红细胞表面 CD35、CD44 表达阳性率低于正常对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), CD58、CD59 表达比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。CMS 组患者肿瘤红细胞花环率低于正常对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 其中 5 例长期居住在平均海拔 4500 m 的 CMS 组患者外周血红细胞表面 CD44、CD35、CD58、CD59 表达阳性率均低于 15 名长期居住在平均海拔 3250 m 的 CMS 患者, 但差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 慢性高原病患者的红细胞免疫功能减低可能与 CMS 患者抵抗力下降及感染的发生相关。

关键词: 慢性高原病; 红细胞; CD35; CD44; CD58; CD59

中图分类号: R594.3

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2024.07.015

文章编号: 1006-1959(2024)07-0083-06

Study on the Expression of CD35, CD44, CD58 and CD59 in Red Blood Cells of Patients with Chronic Mountain Sickness

TANG Meng¹, ZHU Li-ming², MA Yi¹, ZHU Ming-ming¹

(1. Department of Hematology, the Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810000, Qinghai, China;

2. Nursing College of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230000, Anhui, China)

Abstract: **Objective** To study the expression of immune molecules CD35, CD44, CD58 and CD59 on the surface of red blood cells in peripheral blood of patients with CMS. **Methods** CMS patients who were admitted to the Affiliated Hospital of Qinghai University from November 2019 to January 2021 were selected as CMS group, and healthy people (normal blood picture) in the physical examination center of the Affiliated Hospital of Qinghai University were selected as normal control group. The subjects of the two groups were Han men who lived at an altitude of 2500–4500 m for a long time, with 20 men in each group. Flow cytometry was used to detect the expression of CD35, CD44, CD58 and CD59 on the surface of mature red blood cells in peripheral blood of CMS patients. At the same time, some red blood cells were isolated to determine their rapid natural immune adhesion to tumor cells. The clinical data of the two groups were compared. **Results** The positive expression rates of CD35 and CD44 on the surface of peripheral blood red blood cells in the CMS group were lower than those in the normal control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The tumor erythrocyte rosette rate in the CMS group was lower than that in the normal control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The positive expression rates of CD44, CD35, CD58 and CD59 on the surface of peripheral blood red blood cells in 5 CMS patients who lived at an average altitude of 4500 m for a long time were lower than those in 15 CMS patients who lived at an average altitude of 3250 m for a long time, but the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion** The decrease of erythrocyte immune function in patients with chronic mountain sickness may be related to the decrease of resistance and the occurrence of infection.

Key words: Chronic mountain sickness; Red blood cells; CD35; CD44; CD58; CD59

慢性高原病 (chronic mountain sickness, CMS) 是高原常见疾病, 是由于机体对高原低氧环境代偿机能失调而引起的红细胞的过度积累, 主要表现为红细胞过度增殖及严重的低氧血症, 对机体多系统产生重大影响, 其中包括免疫系统^[1]。人体在对高原

缺氧环境的适应过程中, 其免疫功能从器官、组织、细胞到分子水平, 都发生着特殊的病理生理变化, 包括红细胞表面参与免疫粘附的相关分子表达也发生改变。近年来, 对于红细胞表面的免疫分子研究多集中在 CD35 即红细胞 I 型补体受体 (complement

基金项目: 1. 青海省科技计划 (编号: 2021-ZJ-966Q); 2. 青海大学 2019 年度中青年科研基金项目 (编号: 2019-QYY-5)

作者简介: 唐梦 (1994.1-), 女, 四川宜宾人, 硕士, 住院医师, 主要从事风湿免疫科工作

通讯作者: 朱明明 (1989.11-), 女, 河南禹州人, 博士, 主治医师, 博士后, 主要从事高原病理生理与临床研究

receptor type 1, CR1)。已有大量研究表明^[2-4],在多种疾病中都存在红细胞表面分子的异常表达,例如自身免疫疾病、慢性肾衰竭患者、感染、败血症、糖尿病、金属中毒、肿瘤、 β -地中海贫血等。而关于 CMS 红细胞免疫功能变化的研究却较少,对于红细胞表面的免疫分子研究目前还停留在红细胞 CD35 上,而红细胞表面还有许多其他分子,如 CD44、CD58、CD59,它们之间相互作用有着紧密联系^[5,6]。目前的研究还未明确这些分子是否也参与了 CMS 患者红细胞免疫功能的变化,因此本研究旨在通过分析流式细胞仪测定 CMS 患者红细胞表面免疫分子 CD35、CD44、CD58、CD59 的表达,同时检测红细胞对肿瘤细胞的快速天然免疫黏附反应,以期进一步探究 CMS 患者红细胞免疫功能的改变及其发生机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 研究所选取的对象均为 2019 年 11 月—2021 年 1 月就诊于青海大学附属医院的汉族男性,设为 CMS 组。年龄 40~60 岁,平均年龄(49.03 ± 1.11)岁。按照第六届国际高原医学和低氧生理学术 CMS 诊断标准确诊^[7]。正常对照组为血象正常的健康体检者,年龄 40~60 岁,平均年龄(49.75 ± 0.90)岁,每组 20 例。两组研究对象居住海拔均大于 2500 m,其中 5 例慢性高原病患者居住海拔高达 4000~5000 m (平均海拔为 4500 m),其余均居住在海拔 2500~4000 m (平均海拔为 3250 m)之间。排除真性红细胞增多症、假性红细胞增多症。曾经有慢性肺部疾病(COPD、肺动脉高压、肺癌等)或存在其他导致低氧血症继发红细胞增多的慢性疾病患者。合并各种感染疾病、自身免疫性疾病、脑卒中、肿瘤等缺血缺氧性疾病的患者。其他引起免疫功能改变的疾病。本研究经医院伦理委员会审批,研究对象知情同意,并签署同意书。

1.2 方法 采集 CMS 组与正常对照组外周静脉血(4~6 ml)入 EDTA 抗凝管中,充分混匀后待测。采用离心机(Eppendorf, Germany)离心 2000 r/min,

5 min,弃上清。配置红细胞悬液,吸取中底层细胞 80 μ l 加入生理盐水 1500 μ l,混匀,细胞数量为 $1 \times 10^6/100 \mu$ l。标记上机管,分别是空白管、实验管,每管中加入 100 μ l 红细胞悬液,加入对应抗体 20 μ l,小鼠抗人 CD35、CD44、CD58、CD59 抗体均来自美国 BD 公司,避光孵育 15 min,加入 2.5 ml PBS,在漩涡混合器(HANUO, China)中混匀,离心力 200 g, 5 min,弃上清,300 目滤网过滤后上机。使用 BD FACSCelesta 流式细胞仪上机检测。红细胞自然免疫黏附肿瘤细胞的测定:肿瘤细胞为小鼠宫颈癌细胞 U14,由青海大学高原医学中心实验室提供。按照郭峰的红细胞花环法,将红细胞洗涤后配置成 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 悬液,加入 EDTA 抗凝自身血浆 50 μ l 和 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 癌细胞 100 μ l。再加生理盐水 100 μ l 和 0.25%戊二醛 50 μ l。取 150 μ l 加瑞氏染液 30 μ l 染色,癌细胞染成蓝色,均衡计数 100 个肿瘤细胞,分别计算出肿瘤红细胞花环率(tumor red cell rosette test, TRR)。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 26.0 统计软件分析数据,正态分布的计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用两独立样本 t 检验,非正态分布的计量资料采用中位数(M)和四分位间距(Q)表示,两组间比较采用两独立样本秩和检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

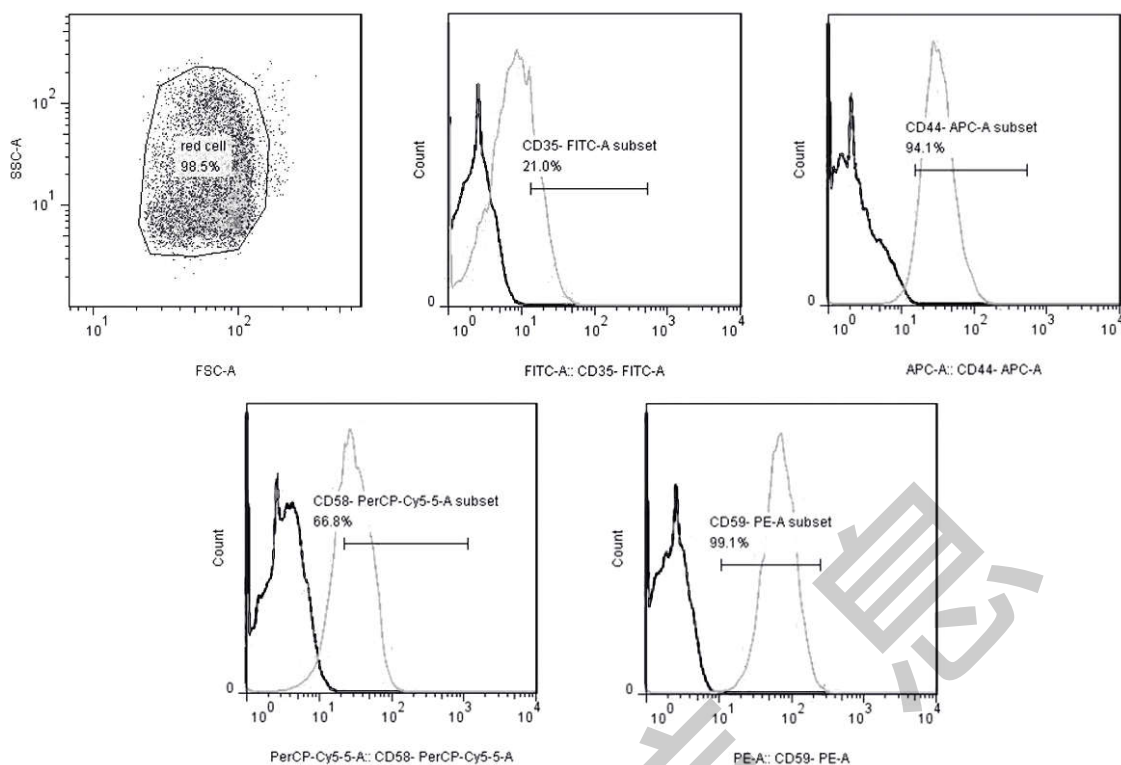
2 结果

2.1 两组外周血红细胞表面 CD35、CD44、CD58、CD59 的阳性表达率比较 CMS 患者外周血红细胞表面 CD44、CD35 表达阳性率低于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),CD58 及 CD59 表达阳性率略低于正常对照组,但差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1、图 1、图 2。

2.2 不同海拔地区 CMS 患者外周血红细胞表面 CD35、CD44、CD58、CD59 的阳性表达率比较 5 名长期居住在平均海拔 4500 m 的 CMS 组患者外周血红细胞表面 CD44、CD35、CD58、CD59 表达阳性率均低于 15 名居住在平均海拔 3250 m 的 CMS 患者,但差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

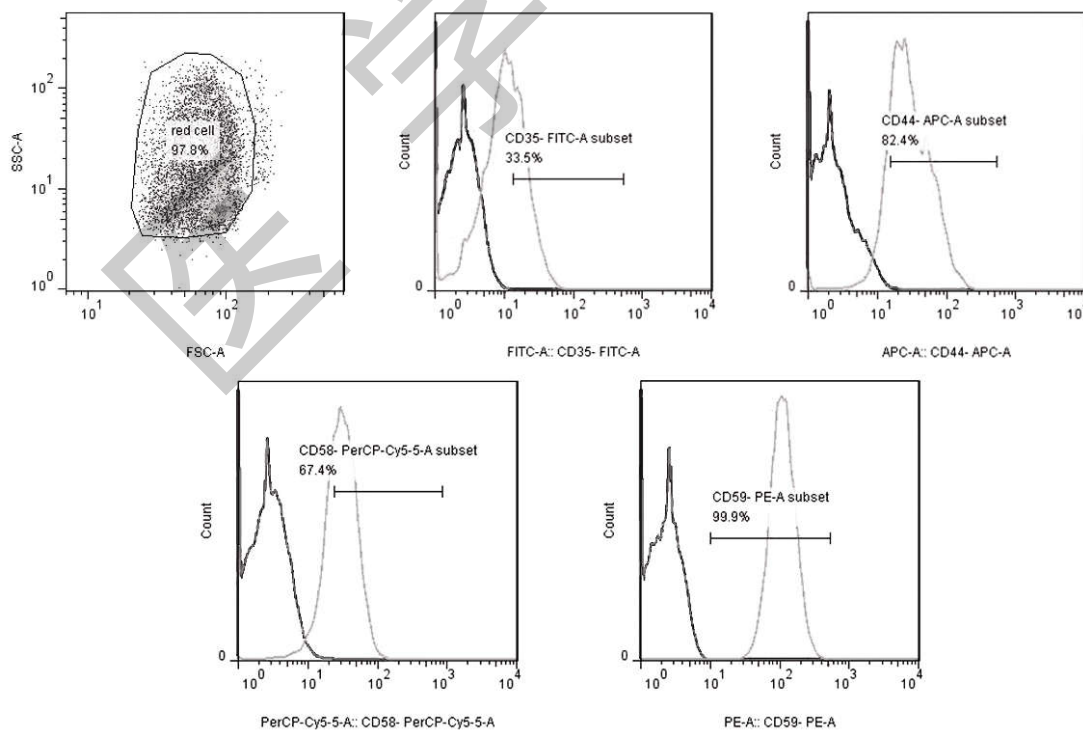
表 1 两组外周血红细胞免疫分子阳性表达率比较(%)

分组	n	CD35	CD44	CD58	CD59
正常对照组	20	31.56 ± 4.91	96.50 ± 2.70	69.13 ± 5.07	99.87 ± 0.13
CMS 组	20	21.45 ± 3.15	75.34 ± 8.70	65.43 ± 5.93	99.50 ± 0.45
t		-7.191	-11.617	-0.913	-2.056
P		0.000	0.000	0.380	0.055



注:深色曲线表示空白组,浅色曲线表示各分子的实验组。

图 1 CMS 组患者红细胞 CD35、CD44、CD58、CD59 荧光强度检测图



注:深色曲线表示空白组,浅色曲线表示各分子的实验组。

图 2 正常对照组红细胞 CD35、CD44、CD58、CD59 荧光强度检测图

表 2 不同海拔地区 CMS 组患者外周血红细胞免疫分子阳性表达率比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

平均海拔	<i>n</i>	CD35	CD44	CD58	CD59
3250 m	15	23.76 \pm 0.67	81.14 \pm 1.67	69.68 \pm 1.43	99.37 \pm 0.34
4500 m	5	19.78 \pm 0.46	73.36 \pm 2.37	63.68 \pm 0.65	98.95 \pm 0.90
<i>t</i>		-1.425	-0.927	-1.236	-1.521
<i>P</i>		0.165	0.330	0.204	0.169

2.3 正常对照组和 CMS 组肿瘤红细胞花环率比较
CMS 患者肿瘤红细胞花环率为 (67.69 \pm 8.69)%, 低

于正常对照组的 (54.00 \pm 8.40)%, 差异有统计学意义 ($t=-4.407, P<0.05$), 见图 3。

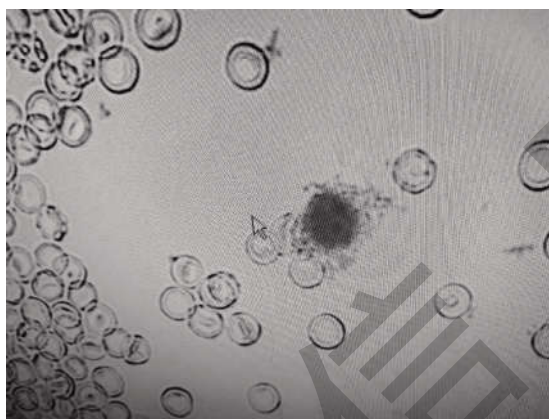


图 3 红细胞与肿瘤细胞黏附形成的花环

3 讨论

CMS 患者的发病主要是因为长期生活在高原, 而高原的突出特点是高海拔、低压、低氧。高海拔暴露会影响机体许多相关的生理和代谢适应, 其中也包括免疫功能^[8]。红细胞 CD35 表达的测定既可通过红细胞免疫黏附肿瘤细胞实验, 还可通过流式细胞术直接测定其表达。本研究通过测定 CMS 患者红细胞免疫黏附肿瘤细胞的花环率, 发现 CMS 组 TRR 低于正常对照组, 这与既往周晶苹等^[9]的研究结果一致。同时通过流式细胞术测定红细胞表面 CD35 的表达, 发现 CMS 患者红细胞 CD35 表达低于正常对照组, 同时随着 CMS 患者居住海拔的上升, 其红细胞表面 CD35 表达有下降的趋势, 其原因可能是 CMS 患者长期生活高原、低氧条件下, 机体循环免疫复合物增多, 导致红细胞上 CD35 被过度消耗或者被封闭导致。但是海拔高度差导致的红细胞表面 CD35 表达的差异无统计学意义, 可能是由于纳入研究对象太少导致, 这可能造成实验结果的偶然性。然而红细胞表面 CD35 的表达还同时受其基因多态性的影响。既往多项研究发现^[10-12], CD35 基因多态

性与多种疾病相关, 其中的密度多态性会影响不同人红细胞膜上 CD35 的表达。本研究中 CMS 患者红细胞上 CD35 表达的降低, 还可能是因为红细胞 CD35 的密度多态性。因此今后的研究有待于围绕 CMS 患者与正常对照组 CR1 基因多态性及红细胞 CD35 的表达测定, 以明确红细胞 CD35 在 CMS 患者中确切的变化, 为 CMS 的免疫功能变化积累更多的资料。

自 1981 年 Siegel I 等^[13]提出了“红细胞免疫系统”的观点后, 人类已经逐步证明了红细胞膜上存在着多种与免疫相关的物质, 包括 CR1、CR3、CD55、CD58、CD59、CD44、NKEF 等。本研究结果提示, CMS 患者红细胞 CD44 表达低于正常对照组, 推测 CD44 参与了 CMS 患者的免疫功能紊乱调节。CD44 是一类广泛分布在人类白细胞、红细胞和一些肿瘤细胞上的高度异质性跨膜蛋白, 正常人红细胞 CD44 分子能增强 T 细胞活性和促进其增殖。CD44 还与机体的急性、慢性炎症、肿瘤、感染相关, CD44 低表达有利于炎症扩散^[14, 15]。因此得出 CMS 高原病患者红细胞 CD44 的下降可能同时影响患者 T 细胞免疫功

能,进而导致机体整体免疫功能受到抑制,易发生感染。

本研究发现 CMS 患者红细胞表面 CD58 虽与正常组无差异,但是有降低的趋势。CD58 又称为人类淋巴细胞功能相关抗原 3(LFA-3),广泛分布在人类红细胞、各类免疫细胞、结缔组织等细胞表面。由于 CD58 为 CD2 的天然配体,与 CD2 分子之间存在高度同源性,CD58 在淋巴细胞膜上与 CD2 相互作用,诱导 T 淋巴细胞产生细胞因子,间接促进 B 淋巴细胞增殖分化^[16,17]。红细胞可诱导 B 淋巴细胞从静息期进入有丝分裂,并促进其增殖分化产生抗体。因此 CD58 升高或者降低都会影响 T、B 细胞所参与的免疫变化,在机体感染的发生中有重要作用^[18]。本研究中 CMS 患者红细胞表面 CD58 与正常组相比有降低趋势,推测患者可能处于免疫下降状态,但是本研究中的差异无统计学意义,因此有待未来通过扩大样本量等进一步研究。

本研究还发现,红细胞 CD59 在 CMS 患者和正常对照组中都较高表达。CD59 又称攻膜复合体(membrane attack complex, MAC)抑制物,其主要功能是在补体系统蛋白质级联反应终末阶段抑制 MAC 的形成,从而保证宿主细胞免遭受 MAC 导致的细胞裂解效应。CD59 为 T 细胞的共刺激分子,参与胞内信号转导,并促使 T 细胞增殖,参与 T 细胞免疫^[19]。Wang X 等^[20]通过检测研究对象红细胞表面 CD55、CD59 的表达发现,缺氧预处理可以提高参与高原训练运动员的免疫功能,提示红细胞 CD59、CD55 协同参与高原环境下机体免疫调节;而本研究结果提示,红细胞 CD59 在 CMS 患者和正常对照组中都较高表达,推测其与红细胞 CD35、CD44、CD58 在 CMS 患者免疫功能变化中无协同作用。

人类免疫系统是一个复杂的、高度调节的、整合的循环,正常的体内免疫平衡需要免疫效应细胞来识别和破坏致病生物和恶性细胞,宿主对感染因子的抵抗力受损可能是由非特异性(先天)或特异性免疫防御的改变引起的。而红细胞免疫是一个相对研究较少的领域,既往关于红细胞 CD35、CD44、CD58、CD59 的研究也多集中在自身免疫性疾病、肿瘤等方面,其研究结果也表明红细胞表面免疫分子可以作为免疫监测的指标,对于预测机体疾病的进程都有重大的意义^[3,4]。本研究提示 CMS 患者红细胞

CD35、CD44 较正常人表达降低,推测其参与的先天性免疫和其介导的特异性免疫防御都受到影响。CMS 患者由于长期处于低压低氧状态下,机体免疫功能发生改变,其中红细胞免疫功能降低,由此推断出 CMS 患者处于一种免疫抑制的状态,红细胞对细菌的清除能力减低,更容易发生感染等情况。

综上所述,CMS 患者的红细胞免疫功能减低可能与患者抵抗力下降及感染的发生相关。本研究没有设计平原正常人的对照组,同时因为纳入研究对象较少,因此未分析各分子之间的相关性,未来还需要纳入更多研究对象,同时进行 CR1 的基因多态性的检测,以及进一步研究导致 CMS 患者红细胞表面免疫分子降低的相关机制及干预措施,明确 CMS 患者免疫功能的变化。

参考文献:

- [1]Leon -Velarde F,Migliorini M,Reeves JT,et al.Consensus Statement on Chronic and Subacute High-Altitude Diseases[J]. High Alt Med Biol,2005,6(2):147-157.
- [2]黄映红,颜慕霞,陈卓瑶,等.重型 β 地中海贫血患儿外周血红细胞 CD55 和 CD59 表达水平检测的意义[J].中国优生与遗传杂志,2019,27(3):268-270.
- [3]Huo X,Dai Y,Yang T,et al.Decreased erythrocyte CD44 and CD58 expression link e-waste Pb toxicity to changes in erythrocyte immunity in preschool children [J].Sci Total Environ, 2019,664:690-697.
- [4]Kisserli A,Audonnet S,Duret V,et al.Measuring Erythrocyte Complement Receptor 1 Using Flow Cytometry [EB/OL]. [2020 -05 -19] (2023 -01 -02).<https://www.jove.com/cn/t/60810/measuring-erythrocyte-complement-receptor-1-using-flow-cytometry>.
- [5]Al -Faris L,Al -Humood S.Altered Expression Levels of CD59, but Not CD55, on Red Blood Cells in Stored Blood.[J]. Medical principles and practice:international journal of the Kuwait University [J].Health Science Centre,2019,28 (4):361-366.
- [6]Kurtoglu AU,Kogtekin B,Kurtoglu E,et al.Expression of CD55, CD59, and CD35 on red blood cells of β -thalassaemia patients[J].Cent Eur J Immunol,2017,42(1):78-84.
- [7]祁生贵,吴天一.慢性高原病诊断标准及相关研究[J].高原医学杂志,2015,25(4):1-11.
- [8]Soliman MM,Aldhahrani A,Althobaiti F,et al.Characterization of the Impacts of Living at High Altitude in Taif: Oxidative Stress Biomarker Alterations and Immunohistochemical Changes [J].Curr Issues Mol Biol,2022,44(4):1610-1625.

- [9]周晶苹.高原红细胞增多症患者红细胞免疫功能测定[J].上海免疫学杂志,2000(5):300.
- [10]Yuan H,Du L,Ge P.Complement receptor 1 genetic polymorphism contributes to sporadic Alzheimer's disease susceptibility in Caucasians: a meta-analysis [J].Biosci Rep,2020,40 (6): BSR20200321.
- [11]Long Z,Du Y,Li H,et al.CR1 gene polymorphisms in Chinese patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria[J].Gene, 2018,659:149-154.
- [12]Luo J,Chen S,Wang J,et al.Genetic polymorphisms in complement receptor 1 gene and its association with HBV-related liver disease: A case-control study[J].Gene,2018,688:107-118.
- [13]Siegel I,Liu TL,Gleicher N.The red-cell immunesystem[J].Lancet,1981,2(8246):556-559.
- [14]Heldin P,Kolliopoulos C,Lin CY,et al.Involvement of hyaluronan and CD44 in cancer and viral infections[J].Cell Signal,2020,65:109427.
- [15]张纾瑜.慢性荨麻疹患者 CR1 基因多态性及红细胞表面免疫相关分子表达研究[D].百色:右江民族医学院,2017.
- [16]Shivam P,Jamal F,Kumari S,et al.Leishmania Donovan:Influence of anti-leishmanial therapy on expression of lymphocyte function-associated antigen-3 and its relevance to pathogenesis in visceral leishmaniasis[J].Hum Immunol,2013,74(12):1575-1578.
- [17]Antunes RF,Brandão C,Maia M,et al.Red blood cells release factors with growth and survival bioactivities for normal and leukemic T cells[J].Immunol Cell Biol,2011,89(1):111-121.
- [18]Yu D,Yin Z,Fu C,et al.Impact on red blood cell immunity patterns in postoperative phase following total hip arthroplasty[J].Cent Eur J Immunol,2014,39(3):377-383.
- [19]胡金川,夏建军,陈松楠,等.红细胞 CD59 分子及其基因单核苷酸多态性与系统性红斑狼疮的关联性[J].临床误诊误治, 2022,35(7):77-81.
- [20]Wang X,Huang L,Gao H.Effects of hypoxic preconditioning combined with altitude training on CD55, CD59 and the immune function of swimmers[J].Ann Palliat Med,2021,10(1):509-517.

收稿日期:2023-02-22;修回日期:2023-05-01

编辑/肖婷婷