

特发性血小板减少性紫癜患儿细胞免疫功能变化及临床意义

阮毅燕 陈瑜毅 唐文珏 胡雪桦 陆盅好 冯军坛 谢翠玲 刘敏成

摘要 **目的** 探讨特发性血小板减少性紫癜(ITP)患儿细胞免疫功能的变化及其临床意义。**方法** 将2013年8月~2015年7月在笔者医院儿科住院的83例ITP初治患儿及31例同期在笔者医院门诊体检的健康同龄儿纳入研究,采用流式细胞术检测外周血T淋巴细胞亚群CD3、CD4、CD8、CD4/CD8比例,采用酶联免疫吸附试验检测血浆细胞因子IFN- γ 及IL-4浓度。**结果** 治疗前病例组CD3 60.07% $\pm$ 11.85%、CD4 34.18% $\pm$ 11.72%、CD4/CD8 1.76% $\pm$ 0.94%及IL-4 11.24 $\pm$ 8.42pg/ml水平显著低于对照组70.96% $\pm$ 7.26%、45.05% $\pm$ 6.53%、2.26% $\pm$ 0.66%及21.26 $\pm$ 9.34pg/ml,IFN- γ 水平5.88 $\pm$ 4.02pg/ml显著高于对照组2.12 $\pm$ 1.09pg/ml;治疗后8周后,CD3 65.76% $\pm$ 10.87%、CD4 38.71% $\pm$ 11.81%及IL-4 14.59 $\pm$ 11.59pg/ml水平均较治疗前升高,IFN- γ 3.65 $\pm$ 3.15pg/ml水平均较治疗前降低,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。**结论** ITP患儿存在细胞免疫功能紊乱,Th1/Th2平衡失调可能与ITP的发病机制和疾病的活动状态密切相关。

关键词 血小板减少性紫癜 儿童 细胞免疫 淋巴细胞亚群 细胞因子

中图分类号 R72

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.02.013

Changes of Cellular Immune Function in Children with Idiopathic Thrombocytopenic Purpura and Its Clinical Significance. Ruan Yiyan, Chen Yuyi, Tang Wenjue et al. Department of Pediatrics, Maternal and Child Health Hospital of Guangxi, Guangxi 530003, China

Abstract **Objective** To investigation the changes of cellular immune function in children with idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) and its clinical significance. **Methods** Eighty-three children with ITP hospitalized in our hospital from August 2013 to July 2015 and 31 healthy children as control group were enrolled in this study. The proportion of T lymphocyte CD3, CD4, CD8, CD4/CD8 in peripheral blood of the patients and healthy subsets were analyzed by flow cytometry. The plasma concentrations of cytokines IFN- γ and IL-4 were detected by ELISA. **Results** ① Compared with the control group, the levels of CD3 60.07% $\pm$ 11.85%, CD4 34.18% $\pm$ 11.72%, CD4/CD8 1.76% $\pm$ 0.94% and IL-4 11.24 $\pm$ 8.42pg/ml were significantly lower and IFN- γ 5.88 $\pm$ 4.02pg/ml was significantly higher in the case group before treatment. ② After 8 weeks of treatment, the levels of CD3 65.76% $\pm$ 10.87%, CD4 38.71% $\pm$ 11.81% and IL-4 14.59 $\pm$ 11.59pg/ml were significantly increased and IFN- γ 3.65 $\pm$ 3.15pg/ml was significantly decreased than before ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusion** There is a disorder of cellular immune function in children with ITP, and the imbalance of Th1/Th2 may be closely related to the pathogenesis of ITP and the active state of the disease.

Key words Idiopathic thrombocytopenic purpura; Child; Cellular immune; Lymphocyte; Cytokine

特发性血小板减少性紫癜(ITP)是儿童最常见的出血性疾病,发病原因及机制迄今未明。本研究对2013年8月~2015年7月在笔者医院儿科住院的83例ITP患儿的细胞免疫功能进行检测,观察ITP患儿细胞免疫功能的特点,探讨细胞免疫功能变化与ITP发病的关系,为ITP的发病机制提供理论依据。

资料与方法

1. 研究对象:病例组均为2013年8月~2015年7月在笔者医院儿科住院的ITP初治患儿,符合ITP诊断标准,入院前4周内均未曾使用过激素、静脉人丙种球蛋白(IVIG)、免疫抑制剂或免疫调节剂,对照组来源于同期健康查体儿童,近期均无感染史^[1]。该研究经笔者医院医学伦理委员会批准,所有入组患儿均由家长签署知情同意书。

2. 实验室检查:所有入组对象均于清晨空腹抽取外周静脉血4ml,分2管,一管用肝素抗凝处理,用以检测血常规及T细胞亚群CD3、CD4、CD8、CD4/CD8;另一管分离血清,置-20℃冰箱保存待检,用以

基金项目:中国疾病预防控制中心妇幼保健中心科研项目(2013FY015)

作者单位:530000 南宁,广西壮族自治区妇幼保健院儿科(阮毅燕、陈瑜毅、唐文珏、陆盅好、冯军坛、谢翠玲、刘敏成),检验科(胡雪桦)

通讯作者:阮毅燕,主任医师,电子信箱:yuanyuyan@163.com

检测细胞因子 IFN- γ 及 IL-4。治疗 8 周后,病例组再次抽血复查上述指标。血常规以 Beckman Coulter LH75 全自动血细胞分析仪检测;T 细胞亚群采用双色免疫荧光法以 Beckman Coulter EpicsXL 流式细胞仪检测,试剂盒为美国 Beckman Coulter 专用配套试剂;细胞因子采用定量酶联免疫吸附试验(ELISA)法,试剂盒为德国 IBL 公司生产,瑞士 Tecan 全自动酶免分析系统上机检测。

3. 治疗方法:所有病例均按常规予糖皮质激素治疗,重症者同时予 IVIG 冲击,总量 2g/(kg·d),分 2 天静脉滴注。病情稳定后门诊随访,视血小板情况予激素渐减量,激素疗程 4~6 周。

4. 疗效评定标准:所有病例均于治疗后第 8 周末按以下标准进行疗效评定:显效:无出血症状,血小板计数 $>100 \times 10^9/L$;好转:无或基本无出血症状,血小板计数 $>50 \times 10^9/L$ 但 $<100 \times 10^9/L$;无效:出血症状及血小板计数无改善或恶化。

5. 统计学方法:采用统计软件包 SPSS 19.0 处理数据,数据描述采用百分比(%),均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组计量资料比较采用 t 检验,计数资料进行 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 一般资料:病例组 83 例,其中男性 55 例,女性 28 例;患儿年龄 2~60 个月,平均年龄 13.13 ± 12.76 个月,病程 1~90 天。其中 1 例患儿因初始时 PLT 一直在 $50 \times 10^9/L \sim 80 \times 10^9/L$ 之间,且无出血倾向,予门诊随访,未予特殊治疗,随访中于病程 90 天时出现皮肤出血点,PLT 下降至 $28 \times 10^9/L$,故入院治疗。对照组患儿 31 例,其中男性 21 例,女性 10 例;患儿年龄 2~47 个月,平均年龄 14.55 ± 12.62 岁。对照组与病例组间性别($\chi^2 = 0.022, P = 0.882$)、年龄($t = -0.529, P = 0.598$)相匹配。共完成随访 61 例,其中显效 49 例(80.33%),好转 8 例(13.11%),无效 4 例(6.56%)。退出 14 例,失访 8 例。

2. 病例组与对照组 T 细胞亚群水平比较:病例组 61 例、对照组 31 例完成 T 细胞亚群水平检测。病例组治疗前 CD3、CD4、CD4/CD8 水平显著低于对照组,差异有统计学意义($t = -5.440, P = 0.000; t = -5.705, P = 0.000; t = -2.945, P = 0.004$),CD8 水平在两组间差异无统计学意义,如表 1 所示;治疗后 CD3、CD4 水平较治疗前显著增高($t = -2.660, P = 0.010; t = -2.012, P = 0.049$),CD4/CD8 水平亦较治疗前增高,但差异无统计学意义,CD8 水平在治疗

前后差异无统计学意义,如表 2 所示。

表 1 病例组治疗前与对照组 T 细胞亚群水平比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	<i>n</i>	CD3	CD4	CD8	CD4/CD8
病例组	61	60.07 ± 11.85	34.18 ± 11.72	22.23 ± 7.53	1.76 ± 0.94
对照组	31	70.96 ± 7.26	45.05 ± 6.53	21.25 ± 4.87	2.26 ± 0.66
<i>t</i>		-5.440	-5.705	0.750	-2.945
<i>P</i>		0.000	0.000	0.455	0.004

表 2 病例组治疗前后 T 细胞亚群水平比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	<i>n</i>	CD3	CD4	CD8	CD4/CD8
治疗前	61	60.07 ± 11.85	34.18 ± 11.72	22.23 ± 7.53	1.76 ± 0.94
治疗后	61	65.76 ± 10.87	38.71 ± 11.81	23.23 ± 6.42	1.94 ± 1.28
<i>t</i>		-2.660	-2.012	-0.935	0.913
<i>P</i>		0.010	0.049	0.353	0.365

3. 病例组与对照组细胞因子水平比较:病例组 44 例、对照组 20 例完成细胞因子 IFN- γ 及 IL-4 检测。与对照组比较,病例组治疗前 IFN- γ 水平显著增高,IL-4 水平显著降低,差异有统计学意义($t = 5.769, P = 0.000; t = -4.265, P = 0.000$),如表 3 所示;治疗后 IFN- γ 水平较治疗前降低,IL-4 水平较治疗前增高,差异有统计学意义($t = 3.491, P = 0.001; t = -2.367, P = 0.022$),如表 4 所示。

表 3 病例组治疗前与对照组细胞因子水平比较 ($\bar{x} \pm s, \text{pg/ml}$)

组别	<i>n</i>	IFN- γ	IL-4
病例组	44	5.88 ± 4.02	11.24 ± 8.42
对照组	20	2.12 ± 1.09	21.26 ± 9.34
<i>t</i>		5.769	-4.265
<i>P</i>		0.000	0.000

表 4 病例组治疗前后细胞因子水平比较 ($\bar{x} \pm s, \text{pg/ml}$)

组别	<i>n</i>	IFN- γ	IL-4
治疗前	44	5.88 ± 4.02	11.24 ± 8.42
治疗后	44	3.65 ± 3.15	14.59 ± 11.59
<i>t</i>		3.491	-2.367
<i>P</i>		0.001	0.022

讨 论

ITP 的发病机制与机体 T 细胞紊乱的关系已成为近年来研究的热点,目前认为 T 淋巴细胞在儿童 ITP 的发生和发展中起关键性的作用。本研究结果显示,ITP 患儿 CD3、CD4 及 CD4/CD8 水平显著低于对照组,治疗 8 周后,随着病情好转,CD3、CD4 水平较治疗前显著增高,CD4/CD8 水平亦有增高趋势,提示 ITP 患儿细胞免疫功能呈异常状态,且与疾病严重程度有较大的关系,与既往研究相符^[2,3]。随着免疫

学、细胞及分子生物学的迅速发展,现认为 ITP 发病机制以 CD4 记忆辅助性 T 细胞(Th)尤为重要,与 Th 细胞之间的失衡有关^[4-6]。

免疫学研究表明,Th1 主要介导细胞免疫应答,其分泌的代表性细胞因子如 IL-2、IL-12、IFN- γ 等;Th2 主要介导体液免疫反应,其代表性的细胞因子是 IL-4、IL-6、IL-10 和 IL-13 等,正常情况下这两类细胞因子处于动态平衡,以维护机体处于相对稳定的状态^[7]。Th 细胞分泌细胞因子受多种因素影响,Th1 细胞分泌的细胞因子可抑制 Th2 细胞的分化与功能,而 Th2 细胞分泌的细胞因子反过来又可抑制 Th1 细胞的分化与功能^[8]。IFN- γ 具有较强的免疫调节作用,可作用于 B 细胞,使免疫球蛋白分泌增多,并通过上调巨噬细胞受体增强单核-吞噬细胞功能,抑制 Th2 类细胞因子的产生,促进 Th1 类细胞因子的产生^[9]。相反,IL-4 为免疫抑制因子,可抑制 Th1 类细胞因子的合成,下调巨噬细胞抗原递呈功能,促进 Th2 类细胞因子的产生^[10]。

促炎性的 IFN- γ 和抑炎性的 IL-4 在生物学作用上相互拮抗,IFN- γ /IL-4 在一定程度上可以反映机体内 Th1/Th2 变化,目前一般将 IFN- γ 活性作为 Th1 的标志,将 IL-4 作为 Th2 活性的标志。本组资料中,治疗前 IFN- γ 水平显著增高,IL-4 水平显著降低,提示儿童 ITP 发病中存在异常的淋巴细胞极化状态,是一种 Th1 优势的疾病,Th 向 Th1 的漂移可能在急性 ITP 的发病机制发挥重要作用;治疗后 IFN- γ 水平较治疗前降低,IL-4 水平较治疗前增高,同样支持 Th1/Th2 类细胞的高比率与该病的发病机制和疾病的活动状态密切相关^[9]。虽亦有研究得出相反的结果,但均提示 ITP 患儿存在 Th1/Th2 细胞免疫功能紊乱^[11,12]。糖皮质激素是目前临床治疗 ITP 的主要药物,研究发现其可以调节 Th1/Th2 细胞

的平衡发挥免疫调节作用^[13]。

参考文献

- 1 罗春华,廖清奎.特发性血小板减少性紫癜诊疗建议[J].中国实用儿科杂志,1999,37(7):441-442
- 2 刘文彬,刘华君,袁丽.急性特发性血小板减少性紫癜患儿免疫功能变化及其临床意义[J].中国小儿血液与肿瘤杂志,2012,17(3):132-141
- 3 罗祖军,何春辉,丁家华,等.特发性血小板减少性紫癜患者免疫状态分析[J].国际检验医学杂志,2012,33(6):694-695
- 4 Rodeghiero F,Stasi R,Gernsheimer T,et al. Standardization of terminology, and children:report from an international working group[J]. Blood,2009,113(11):2386-2393
- 5 Liu H, Ouyang X, Li Y, et al. Involvement of levels of Toll like receptor-4 in monocytes, CD4⁺ T-lymphocyte subsets, and cytokines in patients with immune thrombocytopenic purpura[J]. Thromb Res, 2013, 132(2): 196-201
- 6 Semple JW, Provan D, Garvey MB, et al. Recent progress in understanding the pathogenesis of immune thrombocytopenia [J]. Curr Opin Hematol, 2010, 17(6):590-595
- 7 Fu JK, Okamu RT, Yamamoto K. The Family of IL-10-secreting CD4⁺ T cells[J]. Adv Immunol, 2010, 105: 99-130
- 8 Smyk DS, Koutsoumpas AL, Mytilinaiu MG, et al. Helicobacter pylori and autoimmune disease: cause or bystander[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(3):613-629
- 9 赵艳红,赵艳秋,杨昆鹏,等.特发性血小板减少性紫癜患者免疫素抵抗与 Th1/Th2 细胞因子表达的相关性研究[J].国际免疫学杂志,2014,2(37):161-164
- 10 Del Vecchio GC, Giordano P, Tesse R, et al. Clinical significance of serum cytokine levels and thrombopoietic markers in childhood idiopathic thrombocytopenic purpura [J]. Blood Transfus, 2012, 10(10):194-199
- 11 王明圣,靳杭红,上官静.急性特发性血小板减少性紫癜患儿免疫功能变化及其临床意义[J/CD].中华妇幼临床医学杂志:电子版,2012,8(2):209-210
- 12 王金慎,韩月芹,魏丽夏,等.急性特发性血小板减少性紫癜患儿 Th1/Th2 类细胞因子的基因表达水平[J].中华实用儿科临床杂志,2013,3(28):214-216
- 13 Li J, Wang Z, Hu S, et al. Correction of abnormal T cell subsets by high-dose dexamethasone in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura[J]. Immunol Lett, 2013, 154(1-2):42

(收稿日期:2016-05-05)

(修回日期:2016-06-21)

《医学研究杂志》专家论坛栏目约稿启事

《医学研究杂志》由卫生部主管、中国医学科学院主办的国家级医学学术刊物。本杂志为“第3届中国精品科技期刊”以及“领跑者 F5000——中国精品科技期刊顶尖论文”来源期刊、中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、世界卫生组织西太区医学索引(WPRIM)收录期刊。为进一步推广科学研究成果,扩大学术交流,《医学研究杂志》专家论坛栏目在此向广大医学专家约稿。

来稿要求如下:论文第一作者为博士生导师。文章内容为所研究的某一领域的最新研究进展,来稿为综述形式,不必写中英文摘要。字数 4000 字左右,并附 200 字左右的个人简历一并刊登。来稿请发送至编辑部电子信箱:yxyjzz@imicams.ac.cn,请注明“专家论坛栏目约稿”及第一作者联系方式。专家论坛栏目稿件采用后不收取版面费,论文发表后付给专家稿费。

《医学研究杂志》编辑部