

• 临床检验研究论著 •

特发性血小板减少性紫癜患者 Th1、Th17 和 Treg 细胞及其细胞因子检测及临床意义*

徐维家¹, 李志^{1△}, 杨婷婷², 王波¹

(1. 大连市中心医院检验科, 辽宁大连 116033; 2. 辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁大连 116029)

摘要:目的 研究特发性血小板减少性紫癜(ITP)患者外周血中辅助性 T 细胞 17(Th17)、辅助性 T 细胞 1(Th1)和调节 T 细胞(Treg)及其细胞因子白介素 17(IL-17)和干扰素(IFN)- γ 的表达情况,探讨 Th17、Th1 与 Treg 细胞在 ITP 的发病机制中作用及其临床意义。**方法** 选择 31 例 ITP 患者和 20 例健康对照者,采用流式细胞术检测外周血单个核细胞(PBMCs)中 Th17、Th1 及 Treg 细胞的比例;酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清中相关细胞因子 IL-17 和 IFN- γ 的水平。**结果** ITP 患者 PBMCs 中 Th1 细胞及其细胞因子 IFN- γ 的表达显著高于对照组($P < 0.05$);Treg 细胞的表达显著低于对照组($P < 0.05$);而 Th17 细胞的差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 本实验数据表明 Th1、Th17 和 Treg 及其细胞因子在 ITP 患者外周血中有不同的表达,提示 Th17、Th1 及 Treg 细胞在 ITP 发病过程中发挥不同的作用,为 ITP 的发病机制的研究及临床治疗提供理论基础。

关键词:紫癜,血小板减少性,特发性; T 淋巴细胞,辅助诱导; 细胞因子类

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.14.007

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)14-1792-02

Research the clinical significance of the expression of Th1, Th17 and Treg cells with correlated cytokines in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura*

Xu Weijia¹, Li Zhi^{1△}, Yang Tingting², Wang Bo¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Dalian Municipal Central Hospital, Dalian, Liaoning 116033, China;

2. Life Science College Of Liaoning Normal University, Dalian Liaoning 116029, China)

Abstract: **Objective** To investigate the changes of T helper 17(Th17)、T helper 1(Th1) and regulatory T cell(Treg) in peripheral blood in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura(ITP) and levels of interleukin(IL)-17 and interferon(IFN)- γ in plasma, and to discuss the role of Th17, Th1 and Treg cells in the pathogenesis of ITP. **Methods** Flow cytometric assay was used to analyse the percentages of Th17, Th1 and Treg cells in 31 ITP patients and 20 normal controls; Concentrations of IL-17 and IFN- γ in plasma were used by enzyme linked immunosorbent assay(ELISA). **Results** The percent of Th1 cells and the level of IFN- γ in ITP patients was significantly higher than that of normal controls($P < 0.05$); Treg cells in patients was significantly lower than normal controls($P < 0.05$); Th17 cells in ITP patients and controls had no difference($P > 0.05$). **Conclusion** The data show different expressions of Th1, Th17 and Treg cells in peripheral blood of ITP patients, suggest Th17, Th1 and Treg cells play different roles in ITP pathogenesis process, providing fundamental basis for the pathogenesis of ITP research and clinical treatments.

Key words: purpura, thrombocytopenic, idiopathic; T-lymphocytes, helper-inducer; cytokines

特发性血小板减少性紫癜(idiopathic thrombocytopenic purpura, ITP), 又称自身免疫性血小板减少性紫癜, 是一种细胞免疫和体液免疫共同参与的自身免疫病。本病确切的发病原因尚未完全阐明, 有研究证实调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)、辅助性 T 细胞 17(helper T cells, Th17)和 Th1 可能共同参与 ITP 的发病过程。因此, 作者通过研究 ITP 患者 3 种细胞及相关细胞因子的变化来初步阐述 ITP 的免疫异常, 以利于进一步了解 ITP 的发病机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 患者组为大连市中心医院 2012 年 2~10 月入本院的门诊和住院的 ITP 患者共 31 例, 其中男 6 例, 女 25 例, 年龄 15~61 岁, 平均(30.24 $\pm$ 10.88)岁; ITP 的诊断符合《血液病诊断及疗效标准》的标准^[1], 均为初治患者, 病程 3 周~8 个月。20 例健康体检者作为对照组(男 4 例, 女 16 例), 年龄 19~59 岁, 平均年龄(29.22 $\pm$ 9.43)岁, 标本采集前未接受过糖皮质激素和免疫治疗。两组对象一般资料比较差异无统计

学意义($P > 0.05$)。

1.2 主要试剂与仪器 固定破膜剂 IntraPrepTM、异硫氰酸荧光素(FITC)标记-抗人 CD3 单克隆抗体, FITC 标记-抗人 CD4 单克隆抗体, 藻红蛋白青色素 5.1(PC5)标记-抗人 CD4 单克隆抗体, PC5 标记-抗人 CD25 单克隆抗体购自美国 Beckman 公司, 藻红蛋白(PE)标记-抗人 IL-17 单克隆抗体, PE 标记-抗人 IFN- γ 单克隆抗体, PE 标记-抗人 FoxP3 单克隆抗体及同型购自美国 eBioscience 公司, 佛波酯(PMA)、离子霉素(Ionomycin)、莫能霉素(monensin)购自美国 Sigma 公司, IL-17 和 IFN- γ 的 ELISA 试剂盒购自美国 R&D 公司, 流式细胞仪 Epics-xl 型(Beckman coulter), 酶标仪仪器为瑞典 SUNRISE 酶标仪。

1.3 标本采集和处理 受检者均于入院后第 2 天清晨空腹静脉采血 5~6 mL 于肝素抗凝管中, 密度梯度离心法分离 PBMCs 用于 Th17 和 Th1 细胞的流式检测, 1 mL 外周血直接用于 Treg 细胞的检测。分离血浆于 -20℃ 冻存用于细胞因子

* 基金项目: 大连市医药卫生科学研究项目。 作者简介: 徐维家, 男, 主任技师, 教授, 硕士生导师, 主要从事自身免疫与分子生物学研究。

△ 通讯作者, E-mail: postlizhi@126.com。

检测。所有标本均无乳糜、无溶血。

1.4 实验方法

1.4.1 Th1 和 Th17 细胞的染色 细胞胞外染色:将 CD3-FITC 和 CD4-PC5 单抗加入到分离出的 PBMCs 中,混匀,避光室温孵育 20 min;细胞培养:将孵育后的 PBMCs 用 RPMI-1640 培养液洗涤后加入到 RPMI-1640 培养体系中(含 10% 新生牛血清、50 ng/mL PMA、1 μg/mL ionomycin、3 μmol/L monensin)稀释细胞终浓度至 1×10⁶/mL,37°培养箱中孵育 18 h。细胞固定破膜及胞外染色:用 PBS 洗涤培养后的细胞,固定破膜剂进行固定、破膜(按试剂盒说明书)之后加入 PE-抗人 IFN-γ 和 PE-抗人 IL-17,对照管加入同型对照抗体,孵育 30 min。

1.4.2 Treg 细胞的染色 细胞胞外染色及溶血:取外周血 200 μL 加入 CD4-FITC 和 CD25-PC5 单抗,混匀,避光室温孵育 20 min;加入溶血素溶解红细胞后,PBS 洗涤两次细胞固定破膜及胞外染色:将 PBS 洗涤后的细胞用固定破膜剂进行固定、破膜加入 PE-抗人 FoxP3 单抗,对照管加入同型对照抗体,孵育 30 min。

1.4.3 流式细胞仪检测 Th1、Th17 和 Treg 细胞 应用 Epi-ics-xl 型流式细胞仪测定淋巴细胞内和胞膜各种荧光素的荧光强度,Th1(CD3⁺、CD4⁺、IFN-γ⁺)、Th17(CD3⁺、CD4⁺、IL-17⁺)和 Treg 细胞(CD4⁺、CD25⁺、Foxp3⁺)。

1.4.4 ELISA 检测血清中 IL-17 和 IFN-γ 的水平 对于 IL-17 和 IFN-γ 的测定严格按照 ELISA 试剂盒说明书操作。

1.5 统计学处理 用 SPSS 12.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间数据用独立样本 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组外周血中 Th17、Th1 及 Treg 细胞的表达 ITP 患者外周血中 Th1 细胞占 CD4⁺ T 细胞的比例显著高于对照组(*P* < 0.05);Treg 细胞显著低于对照组(*P* < 0.05);而 Th17 细胞的比例虽高于对照组,但差异无统计学意义(*P* > 0.05),见表 1。

表 1 各组外周血中 Th17、Th1 及 Treg 细胞的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Th17/CD4+T 细胞(%)	Th1/CD4+T 细胞(%)	Treg/CD4+T 细胞(%)
ITP 组	31	0.62±0.24	19.64±8.32*	3.58±0.38*
对照组	20	0.55±0.21	13.37±4.76	6.06±1.42

*:*P* < 0.05,与对照组相比。

2.2 IL-17 和 IFN-γ 水平检测 健康对照组 IFN-γ 水平为(10.34±2.25)ng/L,而 ITP 患者水平则明显升高为(19.83±6.63)ng/L,两组比较差异有统计学意义(*P* < 0.05);两组中 IL-17 水平比较差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

3 讨 论

特发性血小板减少性紫癜是一种获得性器官特异性的自身免疫性疾病,以免疫介导的血小板减少为特征,血小板表面结合有抗血小板抗体,血小板寿命缩短,骨髓巨核细胞可代偿性增多而血小板生成障碍,临床以皮肤黏膜或内脏出血为主要表现。ITP 患者的血浆里的一些因子包括抗血小板抗体与巨核细胞的改变有关,巨核细胞的表面表达 GPIIb/IIIa 或者 GPIb,巨核细胞膜上的自身抗体能引起髓内巨核细胞或血小板破坏及阻碍巨核细胞的成熟,进而干扰骨髓血小板的生

成^[2]。大量的实验证明了 T 淋巴细胞亚群参与了 ITP 免疫应答的诱导和发病,T 淋巴细胞的活化及其产生的细胞因子是引起免疫损伤的重要原因。

调节 T 细胞与多种自身免疫疾病、器官移植耐受等关系密切,来自胸腺的天然的 Treg 细胞通过抑制病原 Th1 及 Th17 细胞的增值和效应功能来维持外周免疫耐受,阻止自身免疫及组织损伤,对维护机体免疫平衡及抑制炎症反应起重要作用。但是在一系列的自身免疫紊乱中,这些淋巴细胞的比例失调,功能受损的 Treg 细胞和数目增加的致病 T 细胞打破了正常的免疫平衡,使免疫系统向着促炎的状态发展^[3]。本实验中 ITP 患者调节 T 细胞的比例显著低于健康对照组,说明 ITP 患者体内确实存在 Treg 细胞的减少,同时也有研究证实 ITP 患者的调节 T 细胞大多出现功能异常^[4],由此推断调节 T 细胞数量的减少致使能够发挥免疫抑制作用的细胞数减少,导致细胞免疫抑制功能下降,免疫耐受平衡被打破,进而 T 细胞增殖失去控制,使自身反应性 T 细胞激活,加之 B 细胞活化,产生大量自身抗体及一系列炎症效应因子,而大量的实验证明促炎环境能使 Treg 细胞向 Th17 细胞分化,使免疫和炎症之间的平衡向着炎症的状态转化,加速了血小板的破坏,成为 ITP 发生的重要原因^[5]。

Th17 细胞与 Treg 细胞表面的大部分趋化受体均相同,两种细胞在许多组织中同时存在,与 Treg 具有抗炎性反应和维持自身免疫耐受的功能相反。Th17 细胞在防御胞外感染、介导慢性炎症和自身免疫性疾病中发挥重要作用。Th1 细胞主要产生 IFN-γ、IL-2 和 TNF-β,协助 B 细胞产生 IgG,在抗细胞内微生物感染和细胞免疫所引起的炎症反应中发挥作用。过去一直认为自身免疫病的发生与 Th1 细胞及细胞因子有重大关系。本实验中 ITP 患者外周血中 Th17 及其细胞因子 IL-17 较健康对照组没有显著差异,与郭宁红等^[6]的研究结果一致,但是 Li 等^[7]却得出完全不同的结论,他们发现 ITP 发病组与缓解组、对照组比较,Th17/CD4⁺ T 细胞比例明显上调、血浆 IL-17 浓度明显增高。近几年来 Th1/Th17 之间的平衡研究成为探讨 ITP 的发病机制的热点,本实验中患者外周血中 Th1 及其细胞因子较健康对照组显著升高。Leonidas^[8]证明 ITP 患者的外周血中 Th1 细胞的数量明显升高,且 Th17 及其相关细胞因子 IL-17、IL-6、IL-8 等高表达,而在 ITP 中 Th17 与 Th1 细胞间亦存在显著的正相关性。有学者指出 Th17 细胞在 TGF-β 的诱导下产生 IL-17,两者共同活化 κβ 核因子(κβNF),因此便起始了 MAP 级联反应并刺激产生 ROR 转录因子,由此导致了很强的致炎效应;同时募集巨噬细胞和中性粒细胞,加强炎症反应^[9]。Hirota 等^[10]曾报道 IL-17 和 IL-6 可以抑制 Th1 的分化及 IFN-γ 的产生;然而在一定条件下 Th17 细胞的应答受局部细胞因子环境的影响,有时不仅只产生 IL-17,而且能产生 I 类细胞因子如 IL-2、TNF-α 和 IFN-γ 等,说明 Th17 细胞可能在向 Th1 细胞转化,IL-17 和 IFN-γ 的相互调节在自身免疫耐受中发挥重要作用^[11]。从以上结果可以看出 Th17 与 Th1 之间的免疫失衡与疾病的发生、发展有很大关系,但目前关于 Th1/Th17 细胞平衡与 ITP 发病机制的相关研究甚少。

从以上结果可以看出 Th17、Th1 与 Treg 之间的免疫失衡与疾病的发生、发展有很大关系,同时其相关的细胞因子也极大的参与了疾病的免疫过程并发挥重要的生物学作用。但各细胞亚群在 ITP 免疫紊乱中的具体作用还不清楚,因此还需要大量的研究文献去进一步阐明它们的相互(下转第 1795 页)

变的原因是病原体感染所致促炎因子产生过度和抗炎介质生成不足^[1]。糖尿病是一个从代谢紊乱到炎症反应的逐渐发展过程,慢性低度炎症与 2 型糖尿病的发生、发展紧密相关^[2]。糖尿病患者存在细胞免疫功能异常,易合并各种不同的感染,其中以肺部感染最为常见^[3]。而艾滋病患者由于免疫细胞急剧减少致免疫力全面下降,非常容易发生各类机会性感染,若患者合并有糖尿病将加剧其发生感染的机会,治疗也相对困难。杨长贵等^[4]认为艾滋病和糖尿病的合并最显著的特点,就是加重了患者的机体免疫功能的抑制和损害,感染症状更重,感染更易出现。

目前有关艾滋病与糖尿病关系研究报道有限,但有研究显示艾滋病合并糖尿病比例更高,可能原因有:(1)而随着生活水平的提高,生活方式的改变,体力活动的减少,营养过剩等原因,致糖尿病患者数量飞速增长,AIDS 合并糖尿病患者将会逐渐增多^[5]。(2)HIV 感染本身可引起胰岛素敏感性下降,因而患者应用胰岛素效果受影响。(3)艾滋病患者在高效抗病毒治疗(HARRT)过程中,其中的部分药物可能诱导血糖升高。如在应用蛋白酶抑制剂(PI)的患者,在非糖尿病患者中,1%~6%的使用 PI 的患者血糖升高,可出现类似于 2 型糖尿病的表现^[6]。(4)HARRT 中的某些药物会加重糖尿病对病程影响或危害。其中的核苷类逆转录酶抑制剂(NRTI)和司他夫定(D4T)可因线粒体毒性加重糖尿病患者的周围神经损伤。(5)艾滋病合并结核病是艾滋病最常见的机会感染^[7-10],而艾滋病、结核病和糖尿病三者会相互影响,通常 AIDS 合并糖尿病因免疫抑制改变了结核病的特征,常以毒血症状态急性起病,发病急骤,进展迅速,干酪性病变和空洞较多见,排菌率高,而结核病又加重胰岛负荷,糖耐量减低,使血糖不易控制,异烟肼(INH)可影响糖代谢,使糖耐量降低,使血液血糖上升^[5]。本研究结果,艾滋病患者组血糖水平显著高于健康人群($P < 0.05$),说明艾滋病患者中患糖尿病比例高于健康人,证实了平常工作中发现艾滋病患者血糖水平比较高的结论,故提示艾滋病临床医生正视艾滋病患者合并糖尿病比例更大的特点,在对艾滋病进行 HARRT 和抗结核治疗时应充分考虑糖尿病对治疗疗效影响,包括抗 HIV 药物、抗结核药物影响及胰岛素应用

中的问题;患者个体的机会感染和身体状况,针对个体制定方案和及时调整方案,注意加强血糖指标监测。研究结果还显示:相对高龄的(>40 岁组)较低龄的(<40 岁组)更有患糖尿病的可能($P < 0.05$),与健康人群表现相似,但对于艾滋病人群却有特殊意义。对于相对高龄艾滋病患者,由于病情更复杂和身体状况,在 HARRT 治疗中应倍加谨慎。

参考文献

- [1] 李洪,李家萱,张志哲,等. 糖尿病合并肺部感染血 CD4+CD25+调节性 T 细胞的变化及意义[J]. 广西医学,2011,33(2):162-164.
- [2] Yudkin JS. Insulin resistance and the metabolic syndrome or the pitfalls of epidemiology[J]. Diabetologia,2007,50(8):1576-1586.
- [3] 李洪,张志哲,李舒萍. 糖尿病合并血管并发症患者血 CD4+CD25+调节性 T 细胞的变化及意义[J]. 内科,2012,7(2):104-106.
- [4] 杨长贵,欧秀莲. 艾滋病合并肺炎 1 例报告[J]. 社区医学杂志,2009,7(8):28-30.
- [5] 刘娜. 艾滋病合并糖尿病的治疗体会[J]. 中国医学创新,2011,8(2):156-158.
- [6] Anand H. Parthasarathi G, Ramesh M. Stavudine-induced pancreatitis followed by lopinavir-ritonavir-induced pancreatitis [J]. J Postgrad Med,2008,54(2):153-155.
- [7] 林桂新,段润宁,刘明团,等. 结核病人感染人类免疫缺陷病毒(HIV)监测结果分析[J]. 中国预防医学杂志,2006,7(5):446-447.
- [8] 金克群. 艾滋病合并肺结核 129 例临床分析[J]. 中国防痨杂志,2005,27(01):51-53.
- [9] 赵红心. HIV/AIDS 混合感染结核的特点及治疗[J]. 中国艾滋病性病. 2003,9(6):396-397.
- [10] 蒙志好,张福杰,刘存旭,等. 人类免疫缺陷病毒感染/艾滋病合并分枝杆菌肺病 133 例临床分析[J]. 临床内科杂志. 2008,25(7):478-480.

(收稿日期:2012-12-10)

(上接第 1793 页)

作用及免疫调节功能,为 ITP 发病机制的认识并为其临床治疗提供新的手段。

参考文献

- [1] 张之南,沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京:科学出版社,2008:172-176.
- [2] Ma DX, Zhu XJ, Zhao P, et al. Profile of Th17 cytokines(IL-17, TGF- β , IL-6) and Th1 cytokine(IFN- γ) in patients with immune thrombocytopenic purpura[J]. Ann Hematol,2008,87(11):899-904.
- [3] Zhang JB, Ma DX, Zhu XJ, et al. Elevated profile of Th17, Th1 and Tc1 cells in patients with immune thrombocytopenic purpura [J]. Haematologica,2009,94(9):1126-1130.
- [4] 赵湜,王红祥,李菁媛,等. 调节性 T 细胞在慢性特发性血小板减少性紫癜中的作用[J]. 中华血液学杂志,2006,27(3):203-206.
- [5] 张蓝方,郝云良. CD4+CD25+调节 T 细胞和 Th17 细胞在特发性血小板减少性紫癜中的表达和意义[J]. 临床医学,2011,31(9):1-4.

- [6] 郭宁红,石庆之,华建媛,等. 调节性 T 细胞和 Th17 细胞比值的变化与特发性血小板减少性紫癜发病关系的研究[J]. 中华血液学杂志,2010,31(9):610-613.
- [7] Li F, Zou SH, Cheng YF, et al. Elevated expression of IL-17 and IL-23 in patients with immune thrombocytopenic purpura [J]. Blood,2008,12(7):3428-3430.
- [8] Leonidas C. Abnormalities in Th17 T cells in aplastic Anemia[J]. Blood,2011,116(20):4039-4045.
- [9] Korn T, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-17 and Th17 cells[J]. Annual Review of Immunology,2009,27(1):485-517.
- [10] Hirota K, Hashimoto M, Yoshitomi H, et al. T cell self-reactivity forms a cytokine milieu for spontaneous development of IL-17 Th cells that cause autoimmune arthritis[J]. J ExpMed,2007,204(1):41-47.
- [11] Henriques A. Th17 cells in systemic lupus erythematosus share functional features with Th17 cells from normal bone marrow and peripheral tissues[J]. Clin Rheumatol,2012,31(3):483-491.

(收稿日期:2012-12-12)