

儿童初诊原发性免疫性血小板减少症患者细胞 及体液免疫功能分析

倪蔚文, 储金华, 杨林海, 刘亢亢, 王宁玲

摘要 目的 研究儿童初诊原发性免疫性血小板减少症 (ITP) 患者细胞免疫及体液免疫功能, 提高临床上对儿童 ITP 的发病机制的认识。方法 检测与初诊 ITP 体液免疫及细胞免疫相关的实验室指标, 包括球蛋白、免疫球蛋白、补体、淋巴细胞亚群, 并与健康对照组比较。结果 ① 共入组了 51 例初诊 ITP 患儿, 所有患儿的年龄、性别与健康对照组比较均无明显差异。② ITP 组血清 IgG 水平较健康对照组明显升高, 而 IgA、IgM 及补体 C3、C4 均无明显差异。③ ITP 组外周血 CD4/CD8 比值、NK 细胞及 CD4⁺ 调节性 T 细胞 (Treg) 比例明显低于健康对照组, B 细胞比例明显高于健康对照组。结论 初诊 ITP 患儿存在细胞免疫及体液免疫功能异常, 提示其可能与 ITP 患儿发病机制相关。

关键词 原发性; 免疫性血小板减少症; 发病机制; 体液免疫; 细胞免疫

中图分类号 R 725.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)10-1628-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.10.027

原发性免疫性血小板减少症 (primary immune thrombocytopenia, ITP) 是一种儿童常见的获得性自身免疫性出血性疾病, 年发病率约为 (1 ~ 6.4) / 100 000, 发病高峰年龄为 2 ~ 5 岁^[1]。该病存在重要脏器或颅内出血引起死亡的风险, 据报道, 重症 ITP 患者的死亡率每年约为 1% ~ 3%^[2-3]。初诊 ITP 患儿的预后一般较好, 其对糖皮质激素、静脉丙种球蛋白 (intravenous immune globulin, IVIG) 一般都有较好的治疗反应。然而, 仍有约 20.0% 的患儿治疗效果不佳, 病程迁延、进展为慢性 ITP^[4]。

免疫紊乱在 ITP 的发病机制中具有重要作用, 但其发病机制目前尚不明确, 目前的研究认为体液

2019-06-25 接收

基金项目: 安徽高校省级自然科学研究重点项目 (编号: KJ2012A168)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院儿科, 合肥 230601

作者简介: 倪蔚文, 女, 硕士研究生;

王宁玲, 女, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: zwn-lt@126.com

computed tomography (CT) scan in the differential diagnosis of benign and malignant thyroid nodules. **Methods** 53 patients with thyroid nodules confirmed by operation and pathology, including 16 benign nodules and 37 malignant nodules. All patients underwent plain and contrast-enhanced neck CT scan before surgery. The images were imported into Artificial Intelligent Kit software to delineate the maximum level of the lesion, automatically calculated by software and get the histogram parameters: entropy, skewness, kurtosis, SD, the 50th, 90th and 95th percentiles. The *t* test of independent samples was used to compare the differences in the histogram parameters of benign and malignant thyroid nodules, and the ROC curve was drawn to calculate the optimal diagnostic threshold.

Results Entropy was statistically significant in both plain and contrast-enhanced images. The skewness, kurtosis and the 50th percentile showed no statistical significance. SD, the 90th and the 95th percentiles were not statistically significant in the plain image, but significant in the contrast-enhanced images. The AUC of entropy in the plain image was 0.698 (95% CI: 0.547 ~ 0.848), and the sensitivity and specificity were 43.8% and 89.2%, respectively. The AUC of the entropy in the enhanced image was 0.841 (95% CI: 0.705 ~ 0.978), and the sensitivity and specificity were 81.2% and 81.1%. The SD value in the enhanced image, the 90th and 95th percentiles AUC were 0.787 (95% CI: 0.638 ~ 0.937), 0.660 (95% CI: 0.493 ~ 0.828), and 0.687 (95% CI: 0.525 ~ 0.850), respectively. The sensitivity and specificity were 56.2%, 97.3%, 50%, 83.8% and 43.8%, 91.9%.

Conclusion The histogram parameters may have certain reference value for the differential diagnosis of benign and malignant thyroid nodules. The enhanced images have a higher diagnostic value for the differential diagnosis of benign and malignant nodules, the 95th percentiles can have higher diagnostic efficiency.

Key words thyroid nodules; CT histogram analysis; the differential diagnosis

免疫和细胞免疫异常都可能参与了 ITP 的发病。然而,由于 ITP 好发于年轻女性及年龄大于 60 岁的老年人,目前的许多研究都是针对成人患者,针对儿童患者的研究则较少。该研究旨在对收治的 51 例初诊 ITP 患儿的临床资料及相关免疫指标进行分析,提高临床上对儿童 ITP 发病机制的认识,从而为临床上合理选择药物提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集安徽医科大学第二附属医院 2013 年 1 月~2018 年 6 月确诊的 51 例初诊 ITP 患儿的临床资料。诊断标准依靠 2013 年版《儿童原发性免疫性血小板减少症诊疗建议》^[5]。在收集这些患儿临床资料的同时,进一步分析了与患儿细胞免疫及体液免疫相关的实验室指标,包括球蛋白、免疫球蛋白(包括 IgG、IgA、IgM)、补体(C3 及 C4)、淋巴细胞亚群[包括 CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞、B 细胞、NK 细胞、CD4⁺CD25⁺CD127^{low} 调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)]。同时选取了 30 例体检结果正常者作为健康对照组(组 1)用于比较体液免疫功能相关的数据,另 20 例体检结果正常者用于比较淋巴细胞亚群的健康对照组(组 2)。所有患儿的血液标本均在开始治疗前采集。所采集的血液标本均保存在肝素钠(1:9)抗凝管中,并在采集后 4 h 内处理。

1.2 流式细胞术检测外周血免疫细胞亚群

1.2.1 试剂和仪器 异硫氰酸荧光素(FITC)标记的小鼠抗人 CD4(克隆号:13B8.2)、CD20(克隆号:L26)、藻红蛋白(PE)标记的 CD8(克隆号:B9.11)、CD19(克隆号:J3.119)、CD¹⁶⁺⁵⁶(克隆号:3G8)、CD25 单抗(克隆号:B1.49.9)、CD127 单抗(克隆号:R34.34)、叶绿素蛋白偶联物(PC5)标记的 CD3(克隆号:UCHT1)、CD45(克隆号:J.33)、CD4 单抗(克隆号:13B8.2)及各自对应的同型阴性对照试剂购自美国 Beckman-Coulter 公司;溶血剂为去离子蒸馏水配制的 0.83% 氯化铵溶液,由本实验室自行配

置;流式细胞仪型号为 FC500-MCL,购自美国 Beckman-Coulter 公司。实验数据应用 CXP 系统进行分析。

1.2.2 步骤 ① 采集静脉血 2~3 ml,应用肝素抗凝管,室温下放置 4 h 内检测。② 将抗凝血 100 μ l 分别加入 4 只 12 mm \times 75 mm 试管,然后 1 管加入 CD4-FITC、CD8-PE 及 CD3-PC5 单抗各 10 μ l,第 1 只加入 CD19-PE、CD20-FITC 及 CD45-PC5 各 10 μ l,第 2 只加入 CD3-PC5 及 CD¹⁶⁺⁵⁶-PE 各 10 μ l,第 3 只加入 CD4-PC5、CD25-FITC 及 CD127-PE 各 10 μ l,第 4 只加入同型对照 10 μ l。③ 混匀,室温下避光反应 15 min,然后加入 1 ml 溶血剂并置于 37 $^{\circ}$ C 水浴箱 10 min,完全溶血后上机检测。检测前调节流式细胞仪光流路质量调控和荧光补偿。检测时首先对淋巴细胞群进行设门,依据前向(FSC)和侧向(SSC)散射光信号。每份标本获取设门内细胞不少于 10 000,并保存数据进行分析。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。计数资料采用 χ^2 检验。分类数据采用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 入组患者一般临床资料 共 51 例初诊 ITP 患儿入组,其中 45 例(88.2%)患儿有皮肤瘀点瘀斑、牙龈或消化道出血等出血性症状。初诊组血小板计数较健康对照组明显降低。所有患儿的年龄、性别与健康对照组比较差异均无显著性,见表 1。

2.2 初诊 ITP 患者的免疫球蛋白及补体水平 同时比较了初诊 ITP 与健康对照组(组 1)与体液免疫功能相关的实验室指标,结果发现,ITP 组血清 IgG 水平较健康对照组明显升高 [(16.70 \pm 8.19) vs (9.65 \pm 3.08)],差异具有统计学意义($P < 0.001$)。而 IgA、IgM 及补体 C3、C4 差异无显著性,见表 2。

2.3 初诊 ITP 患者的细胞免疫功能 为了分析初

表 1 初诊 ITP 组与健康对照组一般临床资料比较

临床资料	初诊 ITP 组 (<i>n</i> = 51)	健康对照组(组 1) (<i>n</i> = 30)	健康对照组(组 2) (<i>n</i> = 20)	<i>t</i> 1/ χ^2 值	<i>t</i> 2/ χ^2 值	<i>P</i> 1 值	<i>P</i> 2 值
年龄(岁)	4.26 \pm 3.70	5.49 \pm 4.74	4.49 \pm 3.27	-1.292	-0.251	0.200	0.803
男/女	28/23	17/13	12/8	0.024	0.152	0.877	0.697
血小板($\times 10^9$ /L)	14.3 \pm 10.6	188.0 \pm 38.5	205.2 \pm 40.2	-24.161	-20.958	<0.001	<0.001
伴出血症状	45	0	0	59.559	48.190	<0.001	<0.001

*t*1、*P*1: 初诊 ITP 组与健康对照组 1 比较; *t*2、*P*2: 初诊 ITP 组与健康对照组 2 比较

表2 初诊ITP与健康对照组体液免疫功能相关指标水平($\bar{x} \pm s$ g/L)

指标	ITP组 (n=39)	健康对照组 (组1) (n=30)	t 值	P 值
球蛋白	30.07 ± 8.14	28.21 ± 5.16	1.156	0.175
IgG	16.70 ± 8.19	9.65 ± 3.08	4.472	<0.001
IgA	1.01 ± 0.60	0.98 ± 0.37	0.279	0.768
IgM	1.15 ± 0.54	1.12 ± 0.28	0.300	0.747
补体 C3	1.10 ± 0.32	1.21 ± 0.39	-1.408	0.164
补体 C4	0.23 ± 0.11	0.25 ± 0.08	-1.135	0.260

诊ITP患者细胞免疫功能,进一步分析外周血淋巴细胞亚群,结果发现:① ITP组CD4⁺T细胞及CD8⁺T细胞与健康对照组均有明显差异[CD4⁺T细胞:(30.91 ± 8.23) vs (38.25 ± 6.39), P=0.003; CD8⁺T细胞:(34.53 ± 4.73) vs (31.44 ± 4.46), P=0.037], CD4/CD8比值明显低于健康对照组[(0.92 ± 0.29) vs (1.24 ± 0.27)],差异有统计学意义(P=0.001);② ITP组B细胞水平明显高于健康对照组[(8.85 ± 5.53) vs (4.28 ± 1.91), P=0.001],NK细胞水平明显低于健康对照组[(9.30 ± 4.97) vs (13.37 ± 5.72), P=0.020];③ ITP组CD4⁺Treg细胞水平明显低于健康对照组[(4.14 ± 1.69) vs (5.47 ± 0.94), P=0.004],见表3。

表3 初诊ITP与健康对照组细胞免疫功能相关指标水平

指标	ITP组 (n=21)	健康对照组 (组2) (n=20)	t 值	P 值
CD3 ⁺ T细胞(%) [*]	71.43 ± 8.35	75.01 ± 8.47	-1.361	0.181
CD4 ⁺ T细胞(%) [△]	30.91 ± 8.23	38.25 ± 6.39	-3.176	0.003
CD8 ⁺ T细胞(%) [△]	34.53 ± 4.73	31.44 ± 4.46	2.159	0.037
CD4/CD8比值	0.92 ± 0.29	1.24 ± 0.27	-3.689	0.001
B细胞(%) [*]	8.85 ± 5.53	4.28 ± 1.91	3.503	0.001
NK细胞(%) [*]	9.30 ± 4.97	13.37 ± 5.72	-2.427	0.020
Treg细胞(%) [○]	4.14 ± 1.69	5.47 ± 0.94	3.039	0.004

*为占淋巴细胞门; △为占CD3⁺T细胞门; ○为占CD4⁺T细胞门

3 讨论

目前ITP的治疗已有标准的诊疗指南作为指导,但仍有相当一部分患者对一线治疗药物无效或治疗有效后复发。ITP的发病机制十分复杂,目前并没有统一的认识。许多研究发现免疫异常与ITP的发病密切相关,因此进一步分析ITP患儿初诊时的细胞及体液免疫对于研究ITP的发病机制都具有重要意义。本研究分析了51例初诊的ITP患儿的体液免疫及细胞免疫相关指标水平,证实了这些患儿体内确实同时存在着细胞及体液免疫异常。目前

已有许多研究对ITP患者T细胞亚群水平进行了报道,El-Rashedi et al^[6]发现CD4/CD8比值降低和CD8⁺T细胞比例升高,Koyanagi et al^[7]发现CD4/CD8比值与健康人无统计学差异。本研究表明CD4/CD8比值在初诊ITP患儿外周血较正常人明显降低,提示CD8⁺T细胞在ITP的发病机制中可能发挥重要作用。有研究^[8]也证实,在抗血小板抗体阴性的患者体内可检测到CD8⁺T细胞介导血小板裂解的作用明显高于健康对照组,在已缓解的ITP患者体内CD8⁺T细胞介导血小板裂解的作用与健康对照组却无明显差异。总之,ITP患者体内确实存在着免疫紊乱,但CD4⁺及CD8⁺T细胞为两大类细胞群,均包含许多不同表型及功能的细胞亚群,仅依靠CD4/CD8比值不足以反映ITP患者的免疫状态。这也可能是不同研究所报道的结果不一致的原因。

NK细胞是人体固有免疫细胞,它同样参与了ITP的发病,主要通过调节B细胞分泌抗体。目前关于NK细胞在ITP中研究的文献较少且结论并不统一,有研究^[9]显示ITP患者外周血循环NK细胞的比例正常但功能下调,本研究表明,初诊ITP患儿的NK细胞比例较健康对照组明显降低。本研究结果与Talaat et al^[10]、El-Rashedi et al^[6]的结果相符。

B细胞同样与ITP的发病密切相关。早期有学者将ITP患者的血清输注到健康志愿者体内,后来这些患者发生血小板计数明显下降,随后的研究发现抗血小板抗体IgG在其中发挥主要作用。抗血小板抗体通过结合血小板表面糖蛋白或血小板表面糖蛋白复合物,或通过调节补体的细胞毒作用等方式溶解血小板^[11]。本研究也表明,ITP患儿B细胞水平及IgG水平明显升高,提示体液免疫异常同样与ITP的发病密切相关。正因为B细胞参与了ITP的发病,目前临床上已应用利妥昔单抗靶向清除B细胞来治疗ITP,且取得了一定的疗效。

Treg是一类具有免疫无能和免疫抑制功能的细胞群,在自身免疫性疾病中发挥重要作用^[12]。Yu et al^[13]发现ITP患者的Treg水平与健康对照组无统计学差异,但许多研究^[14-15]都证实ITP患者存在Treg细胞水平或功能的下调,这与本研究结果一致。Treg细胞发挥免疫抑制作用的机制尚不明确,目前认为主要包括以下几个方面。① Treg细胞可通过分泌免疫抑制因子发挥免疫抑制作用,如TGF-β、IL-10和IL-35;② Treg细胞通过分泌穿孔素和颗粒酶对活化的效应器T细胞产生直接的细胞毒性;③

Treg 细胞通过细胞表面免疫抑制分子使效应 T 细胞失活,如细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 4(CTLA4)和 Fas 配体;④ Treg 细胞与 CD4⁺T 细胞竞争与抗原呈递细胞的相互作用。

参考文献

- [1] Terrell D R, Beebe L A, Vesely S K, et al. The incidence of immune thrombocytopenic purpura in children and adults: A critical review of published reports[J]. *Am J Hematol* 2010, 85(3): 174-80.
- [2] Cohen Y C, Djulbegovic B, Shamai-Lubovitz O, et al. The bleeding risk and natural history of idiopathic thrombocytopenic purpura in patients with persistent low platelet counts[J]. *Arch Intern Med*, 2000, 160(11): 1630-8.
- [3] Michel M. Immune thrombocytopenic purpura: epidemiology and implications for patients[J]. *Eur J Haematol Suppl*, 2009, 71: 3-7.
- [4] Evim M S, Baytan B, Güneş A M. Childhood immune thrombocytopenia: long-term follow-up data evaluated by the criteria of the International Working Group on immune thrombocytopenic purpura[J]. *Turk J Haematol* 2014, 31(1): 32-9.
- [5] 中华医学会儿科学分会血液学组,《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童原发性免疫性血小板减少症诊疗建议[J]. *中华儿科杂志* 2013, 51(5): 382-4.
- [6] El-Rashedi F H, El-Hawy M A, Helwa M A, et al. Study of CD4⁺, CD8⁺, and natural killer cells (CD16⁺, CD56⁺) in children with immune thrombocytopenic purpura[J]. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 2017, 10(1): 8-14.
- [7] Koyanagi H, Kishida K, Shimomura K, et al. Immunological study of childhood acute ITP at onset[J]. *Pediatr Hematol Oncol*, 1992, 9(1): 11-9.
- [8] Zhao C, Li X, Zhang F, et al. Increased cytotoxic T-lymphocyte-mediated cytotoxicity predominant in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura without platelet autoantibodies[J]. *Haematologica* 2008, 93(9): 1428-30.
- [9] Semple J W, Bruce S, Freedman J. Suppressed natural killer cell activity in patients with chronic autoimmune thrombocytopenic purpura[J]. *Am J Hematol*, 1991, 37: 258-62.
- [10] Talaat R M, Elmaghraby A M, Barakat S S, et al. Alterations in immune cell subsets and their cytokine secretion profile in childhood idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) [J]. *Clin Exp Immunol* 2014, 176(2): 291-300.
- [11] Tsubakio T, Tani P, Curd J G, et al. Complement activation in vitro by antiplatelet antibodies in chronic immune thrombocytopenic purpura[J]. *Br J Haematol*, 1986, 63: 293-300.
- [12] 刘西凤,王勇,王志涛,等. CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}调节性 T 细胞在 1 型糖尿病中表达及功能分析[J]. *安徽医科大学学报* 2016, 51(9): 1316-9.
- [13] Yu J, Heck S, Patel V, et al. Defective circulating CD25 regulatory T cells in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura[J]. *Blood*, 2008, 112: 1325-8.
- [14] Nishimoto T, Kuwana M. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in the pathophysiology of immune thrombocytopenia[J]. *Semin Hematol*, 2013, 50 Suppl 1: S43-9.
- [15] Li Z, Mou W, Lu G, et al. Low-dose rituximab combined with short-term glucocorticoids up-regulates Treg cell levels in patients with immune thrombocytopenia[J]. *Int J Hematol*, 2011, 93(1): 91-8.

Analysis of immune status in children with newly diagnosed primary immune thrombocytopenia

Ni Weiwen, Chu Jinhua, Yang Linhai, et al

(Dept of Pediatrics, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To study the cellular and humoral immune functions of primary immune thrombocytopenia (ITP) in children and improve the clinical understanding of the pathogenesis of ITP in children. **Methods** Laboratory indexes related to humoral and cellular immunity of newly diagnosed ITP were detected, including globulin, immunoglobulin, complement, lymphocyte subsets, then analyze the results compared to the healthy control group. **Results** ① 51 newly diagnosed ITP patients were enrolled. There was no significant difference in age and sex between the two groups. ② The serum IgG level of ITP group was significantly higher than that of healthy control group but no significant difference in IgA, IgM, complement C3 and C4. ③ The CD4/CD8 ratio, NK cell and CD4⁺Treg cell proportions in ITP group were significantly lower than those in healthy control group, and the proportion of B cell was significantly higher than that in healthy control group. **Conclusion** There are abnormal cellular and humoral immune functions in newly diagnosed children with ITP, suggesting that they may be related to the pathogenesis of ITP.

Key words primary; immune thrombocytopenia; pathogenesis; humoral immunity; cellular immunity