

Scand J Gastroenterol, 2016, 32(2): 45-48.

[10] 关晓梅,王谨言,王艳华,等. 阴道微生态与高危型人乳头瘤病毒感染和宫颈病变的关系研究[J]. 中国微生态学杂志, 2017, 29(3): 347-350.

[11] 朱丽红,袁宁霞,杜冬青. 281 例宫颈上皮内瘤变患者阴道微生态研究[J]. 中国妇幼保健, 2013, 28(19): 3144-3147.

[12] SHARMA R. Microecology, intestinal epithelial barrier and necrotizing enterocolitis[J]. Pediatr Surg Inter, 2010, 26(1): 11-21.

[13] 俞亚媛,周梦妮,谭布珍. 阴道微生物群与子宫颈癌关系的研究进展[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2017, 37(4): 320-324.

[14] 刘建华,王耀玲. 阴道微生态变化与宫颈人乳头瘤病毒感染及相关病变的关系[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2017, 33(8): 807-809.

[15] SHARMA A, RAJAPPA M, SAXENA A, et al. Cytokine profile in Indian women with cervical intraepithelial neoplasia and cancer cervix[J]. Inter J Gynecological Cancer,

2010, 17(4): 879-885.

[16] SCOTT M E, MA Y, KUZMICH L, et al. Diminished IFN-gamma and IL-10 and elevated Foxp3 mRNA expression in the cervix are associated with CIN 2 or 3[J]. Inter J Cancer, 2010, 124(6): 1379-1383.

[17] HUANG Y E, WANG Y, HE Y, et al. Homogeneity of the vaginal microbiome at the cervix, posterior fornix, and vaginal canal in pregnant Chinese women[J]. Microbial Ecology, 2015, 69(2): 407-414.

[18] 曹建芳. 阴道微环境多因素改变与宫颈上皮内瘤变的关系[D]. 太原: 山西医科大学, 2015.

[19] 卢玉,赵建武. 宫颈高危 HPV 持续感染与阴道微生态相关性研究进展[J]. 中国医药导报, 2018, 20(3): 26-29.

[20] 刘莉,林丽丽,唐韵. 宫颈病变与阴道微生态的认识及治疗进展[J]. 中国社区医师, 2018, 22(7): 15.

[21] 邢妍,崔李宁. 阴道微生态与慢性宫颈炎的相关性[J]. 中国妇幼保健, 2017, 32(22): 5557-5558.

(收稿日期: 2018-12-20 修回日期: 2019-03-21)

• 短篇论著 •

Tfh、IL-21 与抗血小板自身抗体检测在 CITP 中的意义*

杨自华,张婕婕,何桂蓉,宋 丽

(深圳市人民医院检验科, 广东深圳 518020)

摘要:目的 探讨慢性特发性血小板减少性紫癜(CITP)患者外周血滤泡辅助性 T 细胞(Tfh)细胞数量变化及白细胞介素(IL)-21 与抗血小板自身抗体水平在 CITP 中的意义。**方法** 选取 30 例 CITP 患者和 30 例健康体检者分别作为 CITP 组和对照组;采用流式细胞仪(FACS)技术测定外周血 Tfh 细胞的数量与比例,ELISA 检测细胞因子 IL-21 水平,采用改良的血小板抗原单抗特异性固相化法(MAIPA)测定血液中抗 GP II b/III a、GP Ib/IX 自身抗体水平。**结果** 与对照组相比,CITP 组 Tfh 细胞比例显著升高,IL-21 的水平高于正常对照组,抗 GP II b/III a、GPIb/IX 抗体的阳性率分别为 46.7%、43.3%,两者之间存在一定的正相关。**结论** Tfh 细胞、效应细胞因子 IL-21、血小板特异性自身抗体可能在 CITP 发病机制中发挥重要作用,其可为 CITP 的诊断与治疗提供一种新思路。

关键词:慢性特发性血小板减少性紫癜; 滤泡辅助性 T 细胞; 白细胞介素-21; 血小板自身抗体

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.15.029

中图法分类号:R446.62

文章编号:1673-4130(2019)15-1905-03

文献标识码:B

慢性特发性血小板减少性紫癜(CITP)又称慢性免疫性血小板减少症,其病程持续时间大于或等于 12 个月,是一种发病机制尚未明确的自身免疫性疾病,常伴有抗血小板自身抗体及血小板减少等特征,除了体液免疫因素外,细胞免疫因素在其发病中发挥着重要的作用。目前,自身抗体与 Tfh 细胞的数量变化及其分泌的重要效应细胞因子 IL-21 的异常表达,在免疫性血小板减少症的研究中广受关注^[1-5],本研究拟通过观察 CITP 患者血液中滤泡辅助性 T 细胞(Tfh)

细胞数量变化及其分泌的重要效应细胞因子 IL-21 的水平,与自身抗 GP II b/III a 和抗 GPIb/IX 血小板抗体的表达情况,初步探讨其与 CITP 的发病机制的关系与临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 CITP 患者 30 例作为 CITP 组,男 12 例、女 18 例,年龄 15~65 岁,中位年龄为 40 岁,为 2016 年 2 月至 2018 年 3 月于本院住院的患者。所有受试者均符合慢性 ITP 的诊断标准^[6]。测试前

* 基金项目:深圳市科技计划项目(JCYJ20170307095922553)。

一个月所有患者禁止使用影响试验结果的相关药物,如糖皮质激素、细胞毒药物等,采血前 24 h 严格禁药,均不伴有高血压、糖尿病及结核等慢性感染性疾病,血小板计数为 $(1\sim 32)\times 10^9/L$ 。另外,选取本院健康体检者 30 例作为对照组,男女各 15 例,年龄 18~56 岁,中位年龄 39 岁,均无肿瘤与自身免疫性疾病,血小板计数为 $(156\sim 322)\times 10^9/L$ 。

1.2 材料与方 法 CXCR5-PerCP、CD4-FITC 单克隆抗体、红细胞裂解剂及 磷酸盐缓冲液(PBS)均为美国 Lifespan 公司产品,IL-21 检测试剂盒来源于美国 R&D 公司;流式细胞仪为 Beckman Coulter 公司产品;通过流式细胞术(FACS)检测外周血 CD4⁺ Th、CD4⁺ CXCR5⁺ Tfh 细胞;设同型对照,阴性表达控制在 2% 以内,流式细胞检测数据结果用 EXPRO32 ADC 软件分析;酶联免疫吸附实验(ELISA)检测细胞因子 IL-21 水平;使用改良血小板抗原单抗原特异性固相化法(MAIPA)检测抗血小板自身抗体^[7],测定波长为 405 nm,结果判定以吸光度(A)值大于对照 A 值的 $\bar{x}+3s$ 为阳性。

1.3 统计学处理 统计软件为 SPSS18.0,使用该软件包对所有数据进行处理、分析;定量检测结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示;经方差齐性检验后,t 检验比较各组间差异,相关分析采用 Pearson 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CD4⁺ T 细胞及 CD4⁺ T 细胞中 CXCR5⁺ CD4⁺ T 细胞比例检测 经流式细胞术检测,CITP 组与对照组 CD4⁺ T 细胞比例分别为 $(32.5\pm 0.12)\%$ 、 $(33.3\pm 0.13)\%$,差异无统计意义($P>0.05$);但 CITP 组外周血中 CXCR5⁺ CD4⁺ T 细胞占 CD4⁺ T 细胞的比例明显高于对照组,差异有统计学意义($t=3.695,P<0.05$),见表 1。

表 1 两组间 CD4⁺ T 细胞及 CD4⁺ T 细胞中 CXCR5⁺ CD4⁺ T 细胞比例($\bar{x}\pm s$)

分组	n	CXCR5 ⁺ CD4 ⁺ / CD4 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)
CITP 组	30	15.5±0.11*	32.5±0.12
对照组	30	11.5±0.14	33.3±0.13

注:* $P<0.05$,与对照组比较

2.2 IL-2、血小板膜糖蛋白特异性抗体的检测 CITP 组 IL-21 水平 $[(183.0\pm 36.2)\text{pg/mL}]$ 高于对照组 $[(126.0\pm 24.9)\text{pg/mL}]$,差异有统计学意义($t=2.461,P<0.01$)。30 例 CITP 患者中出现抗 GP II b/III a 和抗 GPIb/IX 抗体阳性例数分别为 14 例(46.7%)和 13 例(43.3%)。与对照组比较,CITP 组血小板特异性抗体(抗 GP II b/III a 与 GPIb/IX 抗体)阳性者 A 值更高,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

2.3 血浆 IL-21 水平与血小板膜糖蛋白特异性抗体

的相关性分析 IL-21 与抗 GP II b/III a、抗 GPIb/IX 抗体水平进行相关性分析, r 分别为 0.686 和 0.395,IL-21 水平与抗 GP II b/III a、抗 GPIb/IX 抗体呈正相关。

表 2 血清 IL-21 的表达水平及血小板自身抗体 A 值检测结果比较($\bar{x}\pm s$)

分组	n	GP II b/III a	GPIb/IX
CITP 组	14	0.47±0.12*	0.40±0.14*
对照组	13	0.33±0.04	0.30±0.0

注:* $P<0.05$,与对照组比较

3 讨 论

目前,国内外学者对 CITP 的研究常集中于 T 细胞亚群或有关细胞因子的研究,在其发病机制研究中,有学者通过对 T 细胞亚群分化中参与的效应细胞因子,如 IL-21 活化的有关基因表达与关键蛋白分析,发现其在急性特发性血小板减少性紫癜或 CITP 中具有鉴别诊断意义^[8-9]。也有学者对 CTIP 患者中血小板减少的原因进行分析,但其减少的机制并没有完全明确^[10]。近年来,学者们普遍认为,CITP 患者体内存在一种或多种抗血小板自身抗体,其可以与血小板表面靶抗原相结合,在不同程度上激活单核巨噬系统,进而导致血小板破坏,致使其数量减少^[11]。笔者推测,与健康人群相比,CITP 患者 Tfh 细胞的数量与比例上可能存在着差异,其细胞因子、抗血小板自身抗体出现了异常。

Tfh 是新近报道的一种 CD4⁺ T 细胞亚群,其分子表型为 CXCR5⁺ CD40L⁺ ICOS⁺,在 Tfh 自分泌或外分泌的 IL-21 共同作用下,促进 B 细胞增殖、分化以及免疫球蛋白的类别转换^[12]。本研究表明,相较于健康人群,CITP 患者 Tfh 细胞比例明显增加,这与有关学者的研究基本一致^[13],有研究还发现 CITP 患者 Tfh 细胞的过度活化与血小板数量呈负相关,阻断 Tfh 细胞活化路径可对 CITP 的治疗产生作用,因此推测 Tfh 细胞在 CITP 疾病过程中可能也发挥了免疫调节作用。研究表明,与对照相比,有着高表达的 ICOS 与 PD-1 的 CXCR5⁺ CD4⁺ Tfh 的比例在患者中显著增高,进而表明,Tfh 细胞主要定位于异位生发中心(GC),不仅表达 CXCR5,也表达 PD-1、ICOS、CD40L 等效应分子,并具有相对特异的转录调控因子 BCL-6,以及行使功能的主要产物 IL-21^[14]。本研究中,CITP 患者血液中 CXCR5⁺ CD4⁺ T 细胞在 CD4⁺ T 细胞中的比例明显高于对照组,说明 Tfh 在 CITP 患者存在高表达,提示 Tfh 可能在 CITP 患者在病理状态下有异常增殖表现。此外,本研究还发现 CITP 组 IL-21 的水平高于对照组,提示 IL-21 的水平可能影响 Tfh 细胞的分化,间接导致了 T 细胞介导的慢性自身免疫性疾病的发生。有文献报道,IL-21 能维持 GC 中 B 细胞存活和增殖,诱导抗体类别转换和免疫

球蛋白的产生^[15],结合本研究中 CITP 患者 Tfh 细胞比例明显增加,IL-21 浓度明显升高的结果,笔者推测 Tfh 细胞及 IL-21 可能参与 CITP 的发病过程。

针对 CITP 患者,血小板膜表面糖蛋白(GP)抗体(GP II b/III a 或 GPIb/IX)的研究是一大热点,本研究通过改良 MAIPA 法,对 GP II b/III a、GPIb/IX 特异性抗体进行检测,发现其 A 值均高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结合先前的研究,笔者推测:在 CITP 患者中 Tfh 细胞数量的增加与过度活化,可引起细胞免疫失衡,导致大量血小板自身抗体产生,从而引发血小板破坏增加、数量减少。通过本研究,相对健康人群,CITP 患者可能存在 Tfh 细胞的异常,在 Tfh 分泌或外分泌的 IL-21 共同作用下,抗血小板特异性自身抗体可能参与 CITP 发生发展过程。

目前,CITP 尚无可供应用的“金标准”以明确其诊断,大部分为排除性诊断,客观上需要排除自身免疫性疾病和其他原因所致继发性血小板数量降低或血小板功能不足才能诊断。针对 CITP 患者,血小板膜表面糖蛋白(GP)抗体(GP II b/III a 或 GPIb/IX)的研究是一大热点,其检测方法主要有微流控技术、单克隆抗体俘获血小板抗原技术(如 MAIPA)或者放射免疫微球技术等。本研究通过改良 MAIPA 法,对 GP II b/III a、GPIb/IX 特异性抗体进行检测,发现其 A 值均高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结合先前的研究,笔者推测:在 CITP 患者中,Tfh 细胞数量的增加与过度活化,可引起 Tfh 细胞免疫失衡,导致大量血小板自身抗体产生,从而引发血小板破坏增加、数量减少,通过 Tfh 细胞分泌的重要效应细胞因子 IL-21 与血小板特异性自身抗体(GP II b/III a 或 GPIb/IX)相关性分析,证明两者存在密切联系,提示 CITP 中 IL-21 的异常表达与血小板特异性自身抗体是并存的,只不过 GP II b/III a 或 GPIb/IX 性质不同,可能因为其来源于不同蛋白质家族,破坏血小板的途径不同,其相关性也就不同,其对于 CITP 的发病机制研究具有积极意义。

综上所述,本实验研究探讨了 CITP 患者 Tfh 细胞的变化、效应细胞因子 IL-21 的水平及与血小板特异性自身抗体相关性,结果表明,这些因素的参与提示其可能与 CITP 的发病机制有关,其可为临床诊断与治疗提供一种思路。

参考文献

[1] YAO X, LI C, YANG J, et al. Differences in frequency and regulation of T follicular helper cells between newly diagnosed and chronic pediatric immune thrombocytopenia [J]. Blood Cells Mol Dis, 2016, 61(1): 26-36.

[2] 任晓梅,刘启玲,辛宝,等. 急性慢性特发性血小板减少性紫

癜患儿的差异表达基因特征及交互作用网络分析[J]. 中国医学科学院学报, 2018, 40(2): 225-232.

[3] 冯越. 急性慢性 ITP 患儿调节性 T 细胞及相关细胞因子改变的研究[J]. 临床军医杂志, 2011, 38(5): 955-956.

[4] 白峰岩,李戈,王刚,等. 特发性血小板减少性紫癜患儿白介素与细胞免疫的变化研究[J]. 中国现代医学杂志, 2016, 26(13): 75-78.

[5] 阮毅燕,陈瑜毅,唐文珏,等. 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[J]. 医学研究杂志, 2017, 46(2): 43-45.

[6] ORTIZ-SANJUAN F, BLANCO R, HERNÁNDEZ J L, et al. Applicability of the 2006 European League Against Rheumatism (EULAR) criteria for the classification of Henoch-Schönlein purpura: an analysis based on 766 patients with cutaneous vasculitis[J]. Clin Exp Rheumatol, 2015, 33(2 Suppl 89): S44-47.

[7] 宋文倩, TORSTEN J S, MARGIT B, 等. 联合分析血小板特异性抗体和瞬逝生物传感器技术检测血小板抗体的方法比较[J]. 国际免疫学杂志, 2017, 40(1): 31-36.

[8] 任晓梅,刘启玲,辛宝,等. 急性慢性特发性血小板减少性紫癜患儿的差异表达基因特征及交互作用网络分析[J]. 中国医学科学院学报, 2018, 40(2): 225-232.

[9] 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.

[10] DENG G, YU S, LI Q, et al. Investigation of platelet apoptosis in adult patients with chronic immune thrombocytopenia[J]. Hematology, 2017, 22(3): 155-161.

[11] ARNOLD D M, NAZI I, TOLTL L J, et al. Antibody binding to megakaryocytes in vivo in patients with immune thrombocytopenia [J]. Eur J Haematol, 2015, 95(6): 532-537.

[12] WU H, DENG Y, ZHAO M, et al. Molecular control of follicular helper T cell development and differentiation [J]. Front Immunol, 2018, 9(20): 2470.

[13] DAI L, HE L, WANG Z, et al. Altered circulating T follicular helper cells in patients with chronic immune thrombocytopenia[J]. Exp Ther Med, 2018, 16(3): 2471-2477.

[14] XIE J, CUI D, LIU Y, et al. Changes in follicular helper T cells in idiopathic thrombocytopenic purpura patients[J]. Int J Biol Sci, 2015, 11(2): 220-229.

[15] NAKOU M, PAPADIMITRAKI E D, FANOURIKIS A, et al. Interleukin-21 is increased in active systemic lupus erythematosus patients and contributes to the generation of plasma B cells[J]. Clin Exp Rheumatol, 2013, 31(2): 172-179.