

原发性免疫性血小板减少症患者脾脏组织调节性T细胞和Th17细胞数量的研究

杨媛媛 张凤琦 潘誉 陈飞 黄美娟 曾德叶 黄鹤光

【摘要】 目的 观察成人原发性免疫性血小板减少症(ITP)患者脾脏组织中调节性T细胞(Treg细胞)和Th17细胞的变化。方法 2008年12月1日至2016年6月30日期间在福建医科大学附属协和医院接受脾切除术治疗的43例ITP患者纳入研究,男20例,女23例,中位年龄36(18~76)岁。以30例因胰腺疾病或脾外伤接受脾切除术的患者作为对照组,男21例,女9例,中位年龄47(21~69)岁。运用免疫组化技术对脾脏组织中Treg细胞和Th17细胞数量进行观察,计算Treg细胞/Th17细胞比值,分析ITP组与对照组以及脾切除有效与无效ITP患者脾脏组织中Treg、Th17细胞数量及Treg/Th17细胞比值差异。结果 ①ITP组脾脏组织中Treg细胞少于对照组[(11.3±4.7)个/mm²对(59.0±15.0)个/mm², $t=-22.894, P<0.001$], Th17细胞多于对照组[(235.2±69.4)个/mm²对(181.1±23.7)个/mm², $t=13.768, P<0.001$], Treg/Th17细胞比值低于对照组(0.048±0.027对0.328±0.086, $t=19.522, P<0.001$)。②脾切除术无效ITP患者脾脏组织中Treg细胞少于有效患者[(9.5±5.0)个/mm²对(11.6±4.7)个/mm², $t=2.723, P=0.010$], Th17细胞计数、Treg/Th17细胞比值差异无统计学意义[(232.3±80.8)个/mm²对(239.6±66.9)个/mm², $t=1.108, P=0.277$; 0.040±0.024对0.053±0.027, $t=0.540, P=0.592$]。结论 成人ITP患者脾脏组织中Treg、Th17细胞数量有显著改变,可能与脾切除术疗效有一定关联。

【关键词】 血小板减少; 脾切除术; T淋巴细胞,调节性; Th17细胞

基金项目: 国家临床重点专科建设及福建省临床重点专科建设(2012-966); 福建省卫计委青年项目(2014-1-42)

Quantity of Treg cells and Th17 cells in spleen of primary immune thrombocytopenic purpura patients Yang Yuanyuan*, Zhang Fengqi, Pan Yu, Chen Fei, Huang Meijuan, Zeng Deye, Huang Heguang*. *Department of Genery Surgery, Fujian Medical University Union Hospital, Fuzhou 350001, China*

Corresponding author: Huang Heguang, Email: hhuang2@aliyun.com

【Abstract】 Objective To observe the quantity of Treg cells and Th17 cells in spleen of adult primary immune thrombocytopenic purpura (ITP) patients. **Methods** 43 ITP cases with splenectomy treatment were enrolled from December 2008 to June 2016 at Union Hospital of Fujian Medical University, including 20 males and 23 females with a median age of 36(18-76) years. The controls were thirty patients who underwent splenectomy because of pancreatic diseases or splenic impairment, including 21 males and 9 females with a median age of 47(21-69) years. The quantity and ratio of Treg cells and Th17 cells were examined by immunohistochemistry between ITP patients and controls. **Results** ①The quantity of Treg cells in ITP were less than controls [(11.3±4.7)/mm² vs (59.0±15.0)/mm², $t=-22.894, P<0.001$], but Th17 cells were more than controls [(235.2±69.4)/mm² vs (181.1±23.7)/mm², $t=13.768, P<0.001$]. So the ratio of Treg/Th17 in ITP was lower than controls (0.048±0.027 vs 0.328±0.086, $t=19.522, P<0.001$). ②The quantity of Treg cells in cases without response after splenectomy were less than cases with response [(9.5±5.0)/mm² vs (11.6±4.7)/mm², $t=2.723, P=0.010$], and there is no statistical differences between the two groups about the quantity of Th17 cells and the ratio of Treg/Th17 cells [(232.3±80.8)/mm² vs (239.6±66.9)/mm², $t=1.108, P=0.277$; 0.040±0.024 vs 0.053±0.027, $t=0.540, P=0.592$]. **Conclusions** There is a significant difference about the quantity of Treg cells and Th17 cells in spleen between ITP patients and

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.03.010

作者单位:350001 福州,福建医科大学附属协和医院基本外科(杨媛媛、张凤琦、潘誉、陈飞、黄鹤光),血液病研究所(黄美娟),病理科(曾德叶)

通信作者:黄鹤光,Email:hhuang2@aliyun.com

healthy controls, and they are relevant to the response after splenectomy.

【Key words】 Thrombocytopenia; Splenectomy; T-Lymphocytes, regulatory; Th17 cells

Fund program: National Key Clinical Specialty Discipline Construction Program China and Fujian Key Clinical Specialty Discipline Construction Program (2012-966); Fujian Health and Family Planning Commission Fund For Young Scholars(2014-1-42)

原发免疫性血小板减少症(ITP)的发病机制尚未完全阐明^[1]。脾脏被认为是血小板抗体产生和血小板破坏的主要场所,脾切除术是糖皮质激素治疗无效或依赖患者的治疗选择之一^[2]。但仍有约30%的ITP患者脾切除治疗无效^[3]。已有研究表明细胞免疫平衡失调参与ITP的发病^[4]。我们对成人ITP患者脾脏组织调节性T细胞(Treg细胞)和Th17细胞数量进行研究,探讨细胞免疫失衡在ITP发病中的作用。

病例与方法

1. 病例: 2008年12月1日至2016年6月30日期间在福建医科大学附属协和医院接受脾切除术治疗的43例ITP患者纳入研究,男20例,女23例,中位年龄36(18~76)岁。以同期因胰腺疾病或脾外伤接受脾切除术的30例患者作为对照组,男21例,女9例,中位年龄47(21~69)岁。ITP组纳入标准:①糖皮质激素正规治疗无效,病程迁延6个月以上;②糖皮质激素治疗有效,但维持量大于等效泼尼松30 mg/d;③存在糖皮质激素治疗禁忌证。对照组纳入标准:①非恶性肿瘤胰腺疾病;②无血液疾病及相关病史;③术前未接受过糖皮质激素治疗。两组患者的排除标准:①继发性血小板减少症;②有血小板减少家族史;③其他血液或肿瘤性疾病。

2. ITP患者脾切除疗效判定:所有病例均在术后1周进行第1次疗效评估,根据文献[2]标准将脾切除疗效分为:①完全反应:治疗后PLT≥100×10⁹/L且没有出血;②有效:治疗后PLT≥30×10⁹/L且至少比基础血小板计数增加2倍且没有出血;③无效:治疗后PLT < 30×10⁹/L或者增加不到基础值2倍或者出现出血症状。本研究中获得完全反应和有效统称为治疗有效。

3. 免疫组织化学技术测定脾脏组织中Treg细胞及Th17细胞:①常规二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化;②枸橼酸盐抗原热修复;③滴加3% H₂O₂过氧化物酶阻断剂;④滴加正常山羊血清封闭液;⑤分别滴加1:100稀释的兔抗人叉头翼状螺旋旋转因子(Foxp3)或IL-17多克隆抗体(北京博奥森生物技

术有限公司产品),4℃过夜,PBS缓冲液冲洗3次;⑥滴加二抗(生物素标记山羊抗兔IgG,北京中杉金桥生物科技有限公司产品)室温孵育30 min,PBS缓冲液冲洗3次;⑦二氨基联苯胺染色(试剂盒为北京中杉金桥生物科技有限公司产品);⑧苏木素复染,脱水封片。

4. 结果判定:Treg细胞核内有棕黄色颗粒判定为Foxp3染色阳性,Th17细胞的细胞质或细胞膜内有棕黄色颗粒判定为IL-17染色阳性。首先在低倍镜(×100)视野选取1个表达最密集的区域,再调到高倍镜(×400)视野连续选取5个视野,计数阳性细胞数,取其平均值。由两位资深病理科医师独立阅片,意见不一致者共同阅片后确定。

5. 统计学处理:采用SPSS 22.0软件进行数据分析,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布两样本比较采用t检验,以P < 0.05为差异有统计学意义。

结 果

1. 成人ITP患者与对照组脾脏组织中Treg、Th17细胞比较:ITP组脾脏组织中Treg细胞低于对照组($t = -22.894, P < 0.001$),Th17细胞多于对照组($t = 13.768, P < 0.001$),Treg/Th17细胞比值低于对照组($t = 19.522, P < 0.001$)。详见表1。

表1 ITP组与对照组脾脏组织Treg、Th17细胞表达水平及Treg/Th17细胞比值比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 例数 | Treg细胞 (个/mm ²) | Th17细胞 (个/mm ²) | Treg/Th17 |
|------|----|--------------------------------|--------------------------------|-------------|
| ITP组 | 43 | 11.3±4.7 | 235.2±69.4 | 0.048±0.027 |
| 对照组 | 30 | 59.0±15.0 | 181.1±23.7 | 0.328±0.086 |
| t值 | | -22.894 | 13.768 | 19.522 |
| P值 | | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

注:ITP:原发免疫性血小板减少症;Treg:调节性T细胞

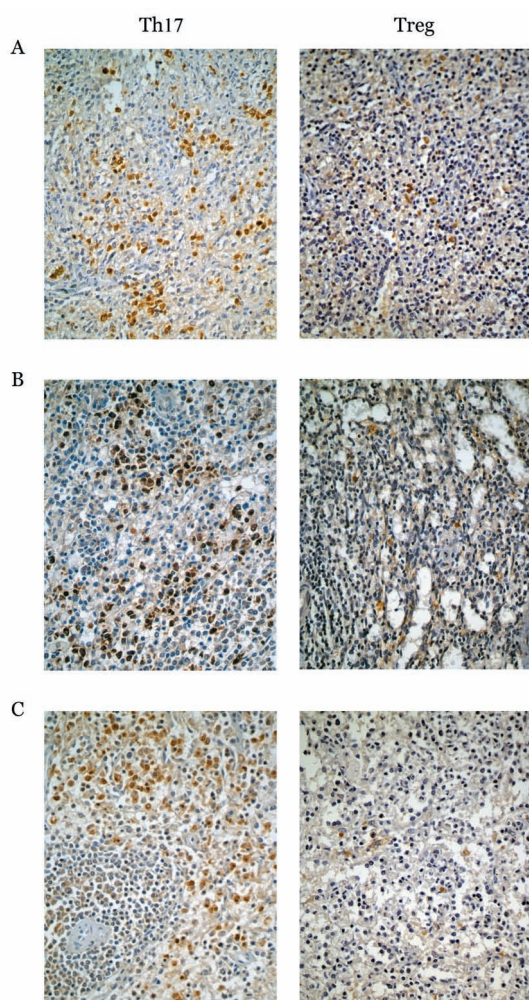
2. 脾切除不同疗效ITP患者脾脏组织Treg、Th17细胞计数及Treg/Th17细胞比值的比较:脾切除术无效组患者脾脏组织中Treg细胞少于治疗有效组($t = 2.723, P = 0.010$),Th17细胞计数差异无统计学意义($t = 1.108, P = 0.277$),Treg/Th17细胞比值差异

无统计学意义($t=0.540, P=0.592$)。详见表2、图1。

表2 脾切除不同疗效ITP患者脾脏组织Treg、Th17细胞计数及Treg/Th17细胞比值比较($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | 例数 | Treg细胞 (个/mm ²) | Th17细胞 (个/mm ²) | Treg/Th17 |
|------------|----|--------------------------------|--------------------------------|-------------|
| 治疗有效组 | 32 | 11.6±4.7 | 239.6±66.9 | 0.053±0.027 |
| 治疗无效组 | 11 | 9.5±5.0 | 232.3±80.8 | 0.040±0.024 |
| <i>t</i> 值 | | 2.723 | 1.108 | 0.540 |
| <i>P</i> 值 | | 0.010 | 0.277 | 0.592 |

注:ITP:原发性血小板减少症;Treg:调节性T细胞



A:对照组;B:脾切除有效组;C:脾切除无效组

图1 免疫组织化学技术检测脾切除不同疗效原发性血小板减少症患者及对照组脾脏组织调节性T细胞(Treg)及Th17细胞表达(高倍镜)

讨 论

ITP是一种常见的自身免疫性出血性疾病^[5],以皮肤、黏膜出血为主要临床表现,严重者可有内脏、颅内出血,成人年发病率为5/10万~10/10万^[2]。一线治疗方案包括肾上腺糖皮质激素和静脉丙种球

蛋白,但仍有疗效欠佳或无法长期耐受药物不良反应的患者需要接受脾切除术。虽然糖皮质激素治疗无效的ITP患者脾切除术的总有效率高达70%~90%^[6],但仍有部分患者效果不甚理想,并且术后并发症(出血、血栓、切口感染、腹腔感染、脾切除后凶险性感染等)严重影响患者的生存质量^[7]。因此,寻找ITP患者脾切除疗效的预测指标尤为重要^[8]。

近年来研究证实,Treg与Th17细胞比值失衡在ITP的发生、发展中发挥重要作用^[9]。产生免疫调节因子的自然CD4⁺CD25⁺T细胞构成了大多数调节性T细胞群,除能控制自身反应性T细胞的活化与增殖外,还涉及调控各种免疫功能:调控体外的细胞增殖、抑制细胞因子产生和分泌、下调共刺激分子和黏附分子的表达、诱导细胞失能、促进细胞凋亡、清除效应细胞、保持体内血流动力学稳定、抑制炎症反应和对超级抗原的耐受、抑制T细胞对自身抗原或异体抗原的过度反应等^[10]。Foxp3是Treg细胞的标志,其基因位于染色体Xp11.23,有11个外显子,cDNA全长1 869 bp,编码由431个氨基酸组成、相对分子质量为47×10³的蛋白质Scurfin,在CD4⁺CD25⁺T细胞维持免疫耐受中起至关重要的作用^[11]。Th17细胞生成受多种细胞因子的调节,其所产生的IL-17作用于相应的靶细胞,参与体内抗胞内细菌、抗真菌感染等炎症反应,亦可引发多种自身免疫性疾病^[12-14],进而导致ITP患者机体免疫调节功能紊乱并影响疾病的发生发展。近年来ITP患者细胞免疫的研究越来越受到重视,其中对外周血T淋巴细胞亚群研究较多,结果也大致相似。Treg细胞数量减少,致使能够发挥有效免疫抑制作用的细胞减少,其分泌的细胞因子减少,导致细胞免疫抑制功能下降,免疫耐受平衡被打破,进而T细胞增殖不能被有效控制,使自身反应性T细胞激活,加之B细胞活化、增殖产生自身抗体,引起细胞免疫和体液免疫功能紊乱,加速了血小板的破坏,成为ITP发生的重要因素之一^[15]。

Treg细胞与Th17细胞的动态平衡可以维持机体适当强度的免疫应答^[16]。Ji等^[17]推测Treg/Th17比值的差异可能与ITP患者临床表现的异质性有关,且可能为ITP患者预后因素之一。目前通过对外周血的研究初步证实了Treg及Th17细胞与疾病严重程度及药物治疗效果密切相关^[18]。脾脏是产生血小板抗体和破坏血小板的主要场所,脾脏组织中T淋巴细胞亚群分布较外周血复杂,脾脏可能是导致机体发生自身免疫反应、启动ITP发病机制的

中心环节,并由此激活脾脏B淋巴细胞产生抗血小板的自身抗体^[19]。目前认为脾脏Treg细胞是维持机体免疫耐受的重要调控者,Th17细胞则参与诱发多种自身免疫病,两者互相拮抗,维持机体免疫状态的相对稳定。Treg、Th17细胞数量以及Treg/Th17细胞比值的改变与ITP患者预后有关^[17]。

本研究结果表明成人ITP患者脾脏组织Treg细胞和Th17细胞数量有显著改变,且与脾切除术疗效有一定关联,值得进一步研究。

参考文献

- [1] Neunert C, Lim W, Crowther M, et al. The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia [J]. *Blood*, 2011, 117 (16):4190-4207. DOI: 10.1182/blood-2010-08-302984.
- [2] 中华医学会血液学分会止血与血栓学组. 成人原发免疫性血小板减少症诊断与治疗中国专家共识(2016年版) [J]. *中华血液学杂志*, 2016, 37(2):89-93. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.02.001.
- [3] Godeau B, Provan D, Bussel J. Immune thrombocytopenic purpura in adults [J]. *Curr Opin Hematol*, 2007, 14(5):535-556. DOI: 10.1097/MOH.0b013e3282b9748f.
- [4] Hu Y. Increased number of Tc17 and correlation with Th17 cells in patients with immune thrombocytopenia [J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): 1091-1095. DOI:10.1371/journal.pone.0026522.
- [5] Cuker A, Cines DB. Immune thrombocytopenic purpura [J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2010, 2010:377-384. DOI: 10.1182/asheducation-2010.1.377.
- [6] 林晓骥,姚荣欣,朱宝玲,等.脾切除治疗特发性血小板减少性紫癜的疗效观察及预后因素分析[J]. *临床血液学杂志*, 2011, 24(3):270-272. DOI: 10.3969/j.issn.1004-2806.2011.03.004.
- [7] Arnold DM, Nazi I, Santos A, et al. Combination immunosuppressant therapy for patients with chronic refractory immune thrombocytopenic purpura [J]. *Blood*, 2010, 115 (1): 29- 31. DOI: 10.1182/blood-2009-06-222448.
- [8] 刘平果,王效民,尹震宇,等.腹腔镜脾切除治疗特发性血小板减少性紫癜疗效及观测指标[J]. *中国普通外科杂志*, 2009, 18 (9): 948-950.
- [9] 曹江,李秀芹,陈翀,等.免疫性血小板减少症患者外周血Th17/Treg细胞比率失衡的研究[J]. *中国实验血液学杂志*, 2011, 19(3): 730-733.
- [10] Yu S, Liu C, Li L, et al. Inactivation of Notch signaling reverses the Th17/Treg imbalance in cells from patients with immune thrombocytopenia [J]. *Lab Invest*, 2015, 95 (2):157-167. DOI: 10.1038/labinvest.2014.142.
- [11] Stelmaszczyk-Emmel A, Jackowska T, Rutkowska-Sak L, et al. Identification, frequency, activation and function of CD4+ CD25 (high) FoxP3 + regulatory T cells in children with juvenile idiopathic arthritis [J]. *Rheumatol Int*, 2012, 32(5):1147-1154. DOI: 10.1007/s00296-010-1728-3.
- [12] Robak E, Kulczycka-Siennicka L, Gerlicz Z, et al. Correlations between concentrations of interleukin (IL) - 17A, IL- 17B and IL- 17F, and endothelial cells and proangiogenic cytokines in systemic lupus erythematosus patients [J]. *Eur Cytokine Netw*, 2013, 24(1):60-68. DOI: 10.1684/ecn.2013.0330.
- [13] Moon YM, Yoon BY, Her YM, et al. IL-32 and IL-17 interact and have the potential to aggravate osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2012, 14(6):R246. DOI: 10.1186/ar4089.
- [14] Teixeira B, Bittencourt VC, Ferreira TB, et al. Low sensitivity to glucocorticoid inhibition of in vitro Th17- related cytokine production in multiple sclerosis patients is related to elevated plasma lipopolysaccharide levels [J]. *Clin Immunol*, 2013, 148 (2):209-218. DOI: 10.1016/j.clim.2013.05.012.
- [15] 张蓝方,郝云良. CD4+CD25+调节性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. DOI: 10.3969/j.issn.1003-3548.2011.09.001.
- [16] Zhao L, Yang J, Wang HP, et al. Imbalance in the Th17/Treg and cytokine environment in peripheral blood of patients with adenocarcinoma and squamous cell carcinoma [J]. *Med Oncol*, 2013, 30(1):461. DOI: 10.1007/s12032-013-0461-7.
- [17] Ji L, Zhan Y, Hua F, et al. The ratio of Treg/Th17 cells correlates with the disease activity of primary immune thrombocytopenia [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (12):e50909. DOI: 10.1371/journal.pone.0050909.
- [18] Yu S, Liu C, Li L, et al. Inactivation of Notch signaling reverses the Th17/Treg imbalance in cells from patients with immune thrombocytopenia [J]. *Lab Invest*, 2015, 95 (2):157-167. DOI: 10.1038/labinvest.2014.142.
- [19] 麦刚,彭兵,吴仲,等. ITP脾脏细胞因子的检测及其临床意义 [J]. *现代预防医学*, 2013, 40(10): 1934-1935.

(收稿日期:2016-08-14)

(本文编辑:徐茂强)