

# 185例原发免疫性血小板减少症患者特异性自身抗体种类及类型与地塞米松疗效的相关性

陈洋 葛健 阮敏 朱凌燕 谢研研 夏瑞祥 倪合宇 曾庆曙

**【摘要】目的** 探讨成人原发免疫性血小板减少症(ITP)患者血小板特异性自身抗体种类(GP II b/III a、GP I b $\alpha$ )及类型(IgG、IgM)对地塞米松疗效的影响。**方法** 185例ITP患者纳入研究,男61例,女124例,中位年龄42(18~83)岁。其中新诊断ITP 117例,持续性ITP 35例,慢性ITP 33例。入组患者接受地塞米松(40 mg/d×4 d)治疗,稳定后逐渐减量至5~10 mg/d维持3~4周。采用改良单克隆抗体俘获血小板抗原(MAIPA)法检测患者特异性自身抗体种类及类型,分析抗体种类及类型与地塞米松疗效的相关性。**结果** ①按抗体类型分组:IgG组:单一抗GP II b/III a抗体阳性、单一抗GP I b $\alpha$ 抗体阳性、双抗体阳性、双抗体阴性患者治疗有效率分别为87.5%、50.0%、68.0%、72.3%,四组间抗体种类比较差异有统计学意义( $\chi^2=11.489, P=0.009$ )。IgM组:单一抗GP II b/III a抗体阳性、单一抗GP I b $\alpha$ 抗体阳性、双抗体阳性、双抗体阴性患者有效率分别为82.1%、71.4%、61.9%、68.9%,四组间抗体种类比较差异无统计学意义( $\chi^2=2.719, P=0.437$ )。②按抗体种类分组:抗GP I b $\alpha$ 组:单一IgG抗体阳性、单一IgM抗体阳性、IgG+IgM双抗体阳性、IgG+IgM双抗体阴性患者有效率分别为52.4%、59.1%、76.5%、77.9%,抗体类型在四组间比较差异有统计学意义( $\chi^2=10.811, P=0.013$ )。抗GP II b/III a组:单一IgG抗体阳性、单一IgM抗体阳性、IgG+IgM双抗体阳性、IgG+IgM双抗体阴性患者治疗有效率分别为73.3%、71.0%、78.6%、66.3%,四组间抗体类型比较差异无统计学意义( $\chi^2=1.374, P=0.719$ )。**结论** 血小板特异性自身抗体为GP I b $\alpha$ -IgG型的成人ITP患者对大剂量地塞米松冲击治疗的治疗反应较差。

**【关键词】** 血小板减少; 自身抗体; 免疫球蛋白G; 免疫球蛋白M; 地塞米松

**Study on the relationship of platelet specific-autoantibodies with therapeutic outcomes by dexamethasone in immune thrombocytopenia purpura Chen Yang, Ge Jian, Ruan Min, Zhu Lingyan, Xie Yanyan, Xia Ruixiang, Ni Heyu, Zeng Qingshu. Department of Hematology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China**

**Corresponding author:** Zeng Qingshu, Email: zengqingshu@medmail.com.cn

**[Abstract]** **Objective** To investigate the different outcomes by dexamethasone in adults immune thrombocytopenia purpura (ITP) with different types of platelet specific-autoantibodies. **Methods** A total of 185 ITP were enrolled, 61 males and 124 females, with a median age of 42 (18~83) years, including 117 newly diagnosed, 35 persistent, and 33 chronic cases. All the patients received the dexamethasone at an initial dose of 40 mg per day for 4 days and a low dose of 5~10 mg for 3~4 weeks. The platelet specific-autoantibodies were identified by the modified monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigen (MAIPA) assay. **Results** Among the IgG positive patients, the response rates in anti-GP II b/III a antibody, anti-GP I b $\alpha$  antibody, both antibody positive, and both antibody negative were 87.5%, 50.0%, 68.0%, and 72.3% ( $\chi^2=11.489, P<0.05$ ), respectively. Among the IgM positive patients, the response rates in the four groups were 82.1%, 71.4%, 61.9%, and 68.9% ( $\chi^2=2.719, P=0.437$ ), respectively. Among the GP I b $\alpha$  antibody positive patients, the response rates in IgG alone, IgM alone, both positive, and both negative were 52.4%, 59.1%, 76.5%, and 77.9% ( $\chi^2=10.811, P<0.05$ ), respectively. Among the GP II b/III a antibody positive patients, the response rates in the four groups were 73.3%, 71.0%, 78.6%, and 66.3%

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.03.006

基金项目:国家自然科学基金(81200371);高等学校博士学科点专项科研基金联合资助课题(新教师类联合 20123420120011);安徽省自然科学基金(1208085QH154);安徽省科技厅课题(1308085MH157);安徽省教育厅课题(KJ2013A167)

作者单位:230022 合肥,安徽医科大学第一附属医院血液科

通信作者:曾庆曙,Email:zengqingshu@medmail.com.cn

( $\chi^2=1.374, P=0.719$ ), respectively. **Conclusion** ITP patients with GP I  $\beta\alpha$ -IgG antibody have worse response to dexamethasone treatment.

**【Key words】** Thrombocytopenia; Autoantibodies; Immunoglobulin G; Immunoglobulin M; Dexamethasone

原发免疫性血小板减少症(ITP)是临床常见的出血性疾病,约占出血性疾病的30%<sup>[1-2]</sup>。ITP患者中最常见的血小板特异性抗体被认为是抗GP II b/III a和GP I  $\beta\alpha$ 抗体<sup>[3]</sup>。改良的单克隆抗体特异性俘获血小板抗原法(改良MAIPA法)是目前国际上检测血小板特异性抗体的金标准。我们采用改良MAIPA检测185例成人ITP患者特异性自身抗体及抗体的种类及类型(IgG/IgM),并分析血小板特异性自身抗体种类及类型与大剂量地塞米松冲击疗效的关系。

### 病例和方法

1. 病例:2011年12月至2014年5月于安徽医科大学第一附属医院血液科门诊及住院治疗的185例ITP患者纳入研究,男61例,女124例,中位年龄42(18~83)岁。其中新诊断ITP 117例,持续性ITP 35例,慢性ITP 33例,均符合文献[1]诊断标准。

2. 治疗方案及疗效判定:入组患者均予以地塞米松40 mg/d×4 d,稳定后逐渐减量至5~10 mg/d维持3~4周停药。治疗4周后进行疗效评估:①有效:PLT≥30×10<sup>9</sup>/L,并且至少比基础血小板计数增加2倍,没有出血症状;②无效:PLT<30×10<sup>9</sup>/L或血小板计数增加少于基础值2倍或有出血症状。定义有效时至少检测2次(间隔至少7 d)。

3. 实验试剂:抗GP I  $\beta\alpha$ (CD42b)单克隆抗体为加拿大Beckman Coulter公司产品;抗GP II b/III a单克隆抗体(CD61)为加拿大DakoCytomation公司产品;羊抗鼠IgG、碱性磷酸酶标记的羊抗人IgG全段、蛋白酶抑制剂PMSF、底物PNPP均为美国Sigma公司产品。实验孵育所用的血小板采自合肥市中心血站O型健康人血。

4. 标本采集:采集受试者空腹静脉血5 ml,采用EDTA-K<sub>2</sub>抗凝。

5. 血小板特异性自身抗体检测:参照文献[4]方法检测血小板特异性自身抗体。

6. 统计学处理:采用SPSS19.0软件进行统计学分析,抗体种类及类型与地塞米松治疗效果比较采用卡方检验。抗体类型分布与治疗后血小板计数分析采用多组单向有序定性资料的秩和检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

### 结 果

1. ITP患者血小板特异性抗体种类与大剂量地塞米松疗效的关系:① IgG组:32例单一抗GP II b/III a抗体阳性患者治疗有效率为87.5%,34例单一抗GP I  $\beta\alpha$ 抗体阳性患者治疗有效率为50.0%,25例抗GP II b/III a+GP I  $\beta\alpha$ 抗体双阳性组患者治疗有效率为68.0%,94例双抗体阴性患者治疗有效率72.3%。IgG组中抗体种类(抗GP II b/III a、GP I  $\beta\alpha$ 抗体)的分布在四组间比较差异有统计学意义( $\chi^2=11.489, P=0.009$ );② IgM组:28例单一抗GP II b/III a抗体阳性患者治疗有效率为82.1%,14例单一抗GP I  $\beta\alpha$ 抗体阳性患者治疗有效率为71.4%,21例抗GP II b/III a+GP I  $\beta\alpha$ 抗体双阳性患者治疗有效率为61.9%,122例双抗体阴性患者治疗有效率为68.9%,IgM组中抗体种类(抗GP II b/III a、GP I  $\beta\alpha$ 抗体)的分布在四组间比较差异无统计学意义( $\chi^2=2.719, P=0.437$ )。详见表1。

2. ITP患者血小板特异性抗体类型与大剂量地塞米松疗效的关系:抗GP II b/III a抗体组中,单一IgG抗体阳性(45例)、单一IgM抗体阳性(31例)、IgG+IgM抗体双阳性(14例)、IgG+IgM抗体双阴性

表1 原发免疫性血小板减少症患者血小板特异性抗体种类(IgG、IgM)与大剂量地塞米松疗效的关系[例(%)]

组别	IgG组			IgM组		
	例数	有效	无效	例数	有效	无效
单一抗GP II b/III a阳性	32	28(87.5)	4(22.5)	28	23(82.1)	5(17.9)
单一抗GP I $\beta\alpha$ 阳性	34	17(50.0)	17(50.0)	14	10(71.4)	4(28.6)
抗GP II b/III a+GP I $\beta\alpha$ 双阳性	25	17(68.0)	8(32.0)	21	13(61.9)	8(38.1)
抗GP II b/III a+GP I $\beta\alpha$ 双阴性	94	68(72.3)	26(27.7)	122	84(68.9)	38(31.1)

(95例)患者治疗有效率分别为73.3%、71.0%、78.6%、66.3%,抗体类型在四组间比较差异无统计学意义( $\chi^2=1.374, P=0.719$ )。抗GP I  $\beta\alpha$ 抗体组中,单一IgG抗体阳性(42例)、单一IgM抗体阳性(22例)、IgG+IgM抗体双阳性(17例)、IgG+IgM抗体双阴性(104例)患者治疗有效率分别为52.4%、59.1%、76.5%、77.9%,抗体类型在四组间比较差异有统计学意义( $\chi^2=10.811, P=0.013$ )。详见表2。

3. ITP患者血小板特异性抗体类型(不分组)与大剂量地塞米松疗效的关系:单一IgG抗体阳性(53例)、单一IgM抗体阳性(22例)、IgG+IgM双抗体阳性(41例)、IgG+IgM双抗体阴性(69例)患者治疗有效率分别为56.7%、59.1%、80.5%、76.8%。抗体类型在四组间比较差异有统计学意义( $\chi^2=9.393, P=0.024$ )。

4. ITP患者血小板特异性抗体种类及类型与大剂量地塞米松疗效之间的关系:在GP II b/III a组、GP I  $\beta\alpha$ 组、GP II b/III a+GP I  $\beta\alpha$ 组中抗体类型的分布与地塞米松治疗后血小板计数之间的差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。详见表3。

## 讨 论

1951年,Harrington等<sup>[5]</sup>将ITP患者的血浆注入自身体内,成功制造出一过性血小板减少症状。从此,自身抗体引起的网状内皮系统清除血小板身免疫紊乱被公认为是ITP的病理生理学机制。各种血小板膜糖蛋白成分均可成为血小板自身抗原,机体受到此种抗原刺激后,免疫系统产生血小板特异性自身抗体,抗体的Fab端与其自身抗原相结合,引起网状内皮系统吞噬致敏的血小板,从而引起血小板减少。地塞米松抑制单核-巨噬细胞系统吞噬和破坏被抗体包被的血小板,使血小板生存时间延长,还可以减少抗血小板抗体的产生,降低抗体对

表3 原发免疫性血小板减少症患者血小板特异性抗体种类及类型与大剂量地塞米松疗效之间的关系(例)

组别	例数	地塞米松治疗后PLT ( $\times 10^9/L$ )			H值	P值
		<30	30~100	>100		
GP II b/III a组					5.461	0.141
单一IgG阳性	45	8	23	14		
单一IgM阳性	35	5	28	2		
IgG+IgM双阳性	14	2	8	4		
IgG+IgM双阴性	91	26	49	16		
GP I $\beta\alpha$ 组					5.603	0.133
单一IgG阳性	44	10	26	8		
单一IgM阳性	17	6	9	2		
IgG+IgM双阳性	13	4	9	0		
IgG+IgM双阴性	111	21	64	26		
GP II b/III a+GP I $\beta\alpha$ 组					2.311	0.510
单一IgG阳性	58	13	30	15		
单一IgM阳性	25	6	18	1		
IgG+IgM双阳性	34	6	22	6		
IgG+IgM双阴性	68	16	38	14		

巨核细胞产生血小板的影响,抑制抗原-抗体反应并可使结合的抗体游离,同时可以改善毛细血管脆性<sup>[6]</sup>。1982年,van Leeuwen等<sup>[7]</sup>报道在ITP患者发现血小板膜糖蛋白GP II b/III a复合体的血小板特异性抗体。随后人们发现了抗GP I b/IX、GP I a/II a、GP VI等抗体。

血小板膜糖蛋白GP II b/III a和GP I  $\beta\alpha$ 是血小板表面的主要表达的膜糖蛋白<sup>[3]</sup>。改良MAIPA法一般只检测血小板自身特异性抗体的种类,未对具体抗体的类型(IgG/IgM)加以区分。本研究中,我们采用MAIPA法对185例成人ITP患者的自身特异性抗体种类及类型加以检测,结果显示在抗GP I  $\beta\alpha$ 抗体阳性组抗体类型的差异有统计学意义,而在抗GP II b/III a抗体阳性组抗体类型的差异无统计学意

表2 原发免疫性血小板减少症患者血小板特异性抗体类型与大剂量地塞米松疗效的关系[例(%)]

组别	抗GP II b/III a抗体组			抗GP I $\beta\alpha$ 抗体组		
	例数	有效	无效	例数	有效	无效
单一IgG阳性	45	33(73.3)	12(26.7)	42	22(52.4)	20(47.6)
单一IgM阳性	31	22(71.0)	9(29.0)	22	13(59.1)	9(40.9)
IgG+IgM双阳性	14	11(78.6)	3(21.4)	17	13(76.5)	4(23.6)
IgG+IgM双阴性	95	63(66.3)	32(33.7)	104	81(77.9)	23(22.1)

注:抗GP II b/III a抗体组中抗体类型在四组间比较差异无统计学意义( $\chi^2=1.374, P=0.719$ );抗GP I  $\beta\alpha$ 抗体组中抗体类型在四组间比较差异有统计学意义( $\chi^2=10.811, P=0.013$ )

义,从抗体类型分布情况来看单一IgG抗体阳性患者的有效率与双抗体阳性及双抗体阴性患者的有效率比较差异均有统计学意义,可能提示抗GP I ba抗体引起血小板减少的机制不同,Nieswandt等<sup>[3]</sup>利用注射大鼠抗小鼠的α II bβ3和GP I ba复合体的单克隆抗体,观察到抗α II bβ3(GP II b/III a)抗体需Fc段才能引起小鼠血小板减少,但抗GP I ba的抗体在去掉Fc段后仍能引起小鼠血小板减少,抗GP I ba的抗体介导ITP,血小板破坏可能有不依赖Fc段存在的途径<sup>[8]</sup>。Zeng等<sup>[4]</sup>已报道针对Fc受体的阻断剂对抗GP I ba的抗体阳性的患者治疗效果较差。

IgG抗体是血清和细胞外液中最主要的抗体成分,其亲和力高,在体内广泛分布,持续时间长,在免疫应答中起着激活补体、中和多种毒素的作用。IgG有四种γ链亚类:IgG1、IgG2、IgG3、IgG4,IgG1、IgG3可高效激活补体,并可与巨噬细胞、NK细胞表面Fc受体结合,发挥调理作用、抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用(ADCC)等;IgM抗体为五聚体,相对分子质量最大,半衰期短,具有很强的抗原结合能力,是免疫应答中首先分泌的抗体,与抗原结合后启动补体的级联反应,是机体抗感染的“先头部队”。

本研究中IgG抗体阳性组抗GP I ba抗体阳性的患者的地塞米松治疗有效率低于其他抗体种类患者,而在抗GP I ba抗体组单一IgG抗体阳性的患者的有效率低于其他抗体类型患者,提示抗GP I ba-IgG抗体阳性的ITP患者地塞米松治疗效果差。GP I ba和GP II bIII a可能属于不同家族蛋白质,传递不同的信号,抗GP I ba的抗体介导ITP,血小板破坏可能有不依赖Fc段存在的途径,尽管这种不依赖Fc途径清除血小板的机制尚未完全阐明,但有研究表明,抗GP I ba的抗体通过Ashwell-Morell受体和MAC-1整合素,诱导GP I ba去涎酸化,使血小板活化和凋亡增加<sup>[9]</sup>,此偏向于血小板活化后出现微聚基因而导致巨噬细胞吞噬<sup>[10]</sup>。另一方面IgM抗体参与的免疫应答在ITP发病机制及糖皮质激素治疗中起着重要的作用,IgM抗体阳性时,抗体种类分布差异与地塞米松疗效无相关性,IgM抗体介导的血小板破坏可能与IgG也有着不同的途径。

本组患者中,抗GP I ba-IgG抗体阳性的ITP患者地塞米松治疗效果较差,提示早期检测患者抗体有利于为患者采取个性化的治疗方法。不同抗体种类及类型的ITP患者的发病机制是否相同还需深入研究。

## 参 考 文 献

- [1] 中华医学会血液学分会血栓与止血学组. 成人原发免疫性血小板减少症诊断与治疗的中国专家共识(2012年版)[J]. 中华血液学杂志, 2012, 33(11): 975-977.
- [2] Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group [J]. Blood, 2009, 113 (11):2386-2393.
- [3] Nieswandt B, Bergneier W, Rackebrandt K, et al. Identification of critical antigen-specific mechanisms in the development of immune thrombocytopenic purpura in mice[J]. Blood, 2000, 96 (7):2520-2527.
- [4] Zeng Q, Zhu L, Tao L, et al. Relative efficacy of steroid therapy in immune thrombocytopenia mediated by anti-platelet GP II bIII a versus GP I ba antibodies[J]. Am J Hematol, 2012, 87(2):206-208.
- [5] Harrington WJ, Minnich V, Hollingsworth JW, et al. Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura[J]. J Lab Clin Med, 1990, 115 (5): 636-645.
- [6] 张之南, 郝玉书, 赵永强, 等. 血液病学[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2012:1273-1276.
- [7] van Leeuwen EF, van der Ven JT, Engelfriet CP, et al. Specificity of autoantibodies in autoimmune thrombocytopenia [J]. Blood, 1982, 59(1):23-26.
- [8] Webster ML, Sayeh E, Crow M, et al. Relative efficacy of intravenous immunoglobulin G in ameliorating thrombocytopenia induced by antiplatelet GP II bIII a versus GP I ba antibodies[J]. Blood, 2006, 108(3):943-946.
- [9] Jansen AJ, Josefsson EC, Rumjantseva V, et al. Desialylation accelerates platelet clearance after refrigeration and initiates GP I ba metalloproteinase-mediated cleavage in mice [J]. Blood, 2012, 119(5):1263-1273.
- [10] Provan D, Stasi R, Newland AC, et al. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia[J]. Blood, 2010, 115(2):168-186.

(收稿日期:2014-10-10)

(本文编辑:徐茂强)