

儿童特发性血小板减少性紫癜 Th 亚群细胞因子的测定及意义*

唐玉蓉^a, 王际亮^a, 孙婷婷^a, 伊心浩^b

(山东省胜利油田中心医院 a. 检验科; b. 科教科, 山东东营 257034)

摘要:目的 研究外周血 Th 亚群细胞因子 IFN- γ , IL-4 和 TGF- β 1 在急、慢性儿童特发性血小板减少性紫癜中的浓度及临床意义。方法 应用流式细胞术检测外周血 IFN- γ 和 IL-4 表达水平, 采用酶联免疫(ELISE)法检测外周血单个核细胞生成的 TGF- β 1 水平, 并与 24 例正常对照组检测进行比较。结果 aITP 患儿 Th1 细胞因子 IFN- γ 阳性百分比高于正常对照组($P < 0.05$), cITP 患儿 Th1 细胞因子 IFN- γ 阳性百分比比较对照组显著降低($P < 0.01$)。aITP 患儿 Th2 细胞因子 IL-4 与正常对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$), cITP 患儿 Th2 细胞因子 IL-4 比较对照组显著升高($P < 0.05$)。aITP 和 cITP Th3 细胞因子 TGF- β 1 水平均较正常对照组明显降低, cITP 较 aITP 显著降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 儿童急、慢性 ITP 中 Th 细胞因子对其发病机制研究及鉴别诊断有重要价值。

关键词: 儿童; 特发性血小板减少性紫癜; 干扰素- γ ; 白细胞介素-4; 转化生长因子- β 1; 流式细胞术; 外周血单个核细胞

中图分类号: R554.6; R392.12 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2015)05-143-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.05.045

Determination and Clinical Significance of Th Subsets Cytokines in ITP of Children

TANG Yu-rong^a, WANG Ji-liang^a, SUN Ting-ting^a, YI Xin-hao^b

(a. Department of Clinical Laboratory; b. Department of Science and Education,
Central Hospital of Shengli Oil Field, Shandong Dongying 257034, China)

Abstract: **Objective** To study the determination and clinical significance of Th cytokines subsets of IFN- γ , IL-4 factor and TGF- β 1 in acute and chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. **Methods** The level of IFN- γ , IL-4 and TGF- β 1 (produced by peripheral blood mononuclear cells) were detected by flow cytometry and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISE), respectively, in patients and 24 controls. **Results** The positive percentage of factor IFN- γ in children with aITP was higher than that in the controls ($P < 0.05$). The positive percentage of factor IFN- γ in children with cITP was significantly lower than the controls ($P < 0.01$). The level of IL-4 had no statistical significance in children with aITP compared with controls. The level of IL-4 was higher significantly in children with cITP than that in controls ($P < 0.05$). The level of TGF- β 1 in children with aITP and cITP was lower significantly than that in controls, that was more significance in cITP than that in aITP ($P < 0.05$). **Conclusion** The state of Th cytokines in children with acute and chronic ITP is of great value in the understanding of the pathogenesis and differential diagnosis.

Keywords: children; idiopathic thrombocytopenic purpura; IFN- γ ; IL-4; TGF- β 1; flow cytometry; peripheral blood mononuclear cells

特发性血小板减少性紫癜(idiopathic thrombocytopenic purpura, ITP)是一种自身免疫性血小板减少性疾病,以皮肤、黏膜出血、血小板数目减少,骨髓内巨核细胞成熟障碍、血小板生存时间缩短及患者血清或血小板表面常存在血小板表面抗体为临床特征。根据其发病机理、病程长短、预后的不同,儿童 ITP 可分为急性(aITP)、慢性(cITP)两种。近年来,研究表明 ITP 患者不仅有体液免疫异常,也有细胞免疫的异常,其发病机制与淋巴细胞亚群、细胞因子表达及功能变化有着密不可分的关系^[1]。为了探讨儿童 ITP 发病机制中 Th 亚

群细胞及其相应细胞因子的作用,本文对 2011 年 10 月~2013 年 10 月我院收治的 ITP 患儿外周血 γ -干扰素(IFN- γ), IL-4 和外周血单个核细胞的 TGF- β 1 进行检测,观察其变化,探讨细胞因子在 ITP 发病机理中的作用及临床意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象 本研究共选取 ITP 患儿 44 例,其中 aITP 患儿 24 例,男性 10 例,女性 14 例,平均年龄 2.7~13.4 岁; cITP 患儿 20 例,男性 11 例,女性 9 例,年龄 2.1~12.3 岁,平均年龄 7.23 岁,诊断均符合张之楠^[2]主编的《血液病诊断及疗效标

* 作者简介:唐玉蓉(1975-),女,学士,副主任技师,从事临床检验领域的研究及检验工作, Tel: 0546-8770171, E-mail: zxyjyktyr@163.com。
通讯作者:伊心浩。

准》，分组分型参照《实用内科学》第11版。正常对照为年龄、性别相近的健康儿童25例。

1.2 试剂和仪器 流式细胞仪为Epics XL型(美国 Beckman coulter 公司),Elx80 型酶联免疫仪(美国 BioTeic 公司),藻红蛋白(PE)-Cy5-抗人 CD3 单克隆抗体、抗人 CD8 单克隆抗体及 IgG 同型对照、PE-抗人 IFN- γ 单克隆抗体、PE-抗人 IL-4 单克隆抗体均购自美国 BD 公司,淋巴细胞分层液、伏波酯乙醇(PMA)、离子霉素(ionomycin)和蛋白转运抑制剂莫能霉素(monensin)均为 Sigma 公司的产品,红细胞裂解液(美国 ImmunoProbe 公司),Reagent A 和 Reagent B 均为 An Der Crub 公司的产品。TGF- β 1 用 ELISA 检测试剂盒为科华生物公司产品。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养:无菌采集 ITP 患儿肝素抗凝的静脉血 4 ml,先取 100 μ l 新鲜抗凝血,用 RPMI 1640[不含小牛血清-磷酸盐缓冲液(PBS)]1:1 等体积稀释。加 1 μ g/ml PMA 12 μ l,1 μ g/ml 离子霉素 4 μ l,以及加入 1 mg/ml 的莫能霉素 3.4 μ l,混匀;37 $^{\circ}$ C,5%(v/v)CO₂ 培养箱培养 4~6 h。另取 3 ml 新鲜抗凝血,用密度梯度离心法分离 PBMC,用含 10 g/dl 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液调整 PBMC 密度为 1×10^9 /L;取 2 ml 细胞悬液加 PMA(终浓度为 50 μ g/L)和离子霉素(终浓度为 1

μ mol/L),置 37 $^{\circ}$ C 温箱中培养过夜,收集上清置 -70 $^{\circ}$ C 冻存待测细胞因子。

1.3.2 细胞染色:将上述培养后的外周血细胞平均分为 A、B 二管,各加入 20 μ l CD3,CD8 单抗混匀,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min;加固定剂 A 200 μ l 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min,加 PBS 3 ml 震荡,1 200 r/min 离心 5 min。弃上清后,A 管和 B 管同时加破膜剂 B 100 μ l,A 管加抗 IFN- γ ,IL-4,TGF- β 1 单抗,B 管加入同型对照 IgG 单抗,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min,PBS 洗涤、离心、弃上清液。最后以 PBS 悬浮细胞,经流式细胞仪检测样本 CD3⁺,CD8⁻细胞中表达 IFN- γ ,IL-4 的阳性百分比。所得数据采用 Partec 软件进行分析,以 CD3⁺,CD8⁻设门表达 CD4⁺T 细胞(Th),分析标本中 Th1 和 Th2 细胞占 CD4⁺T 细胞的比例。

1.3.3 TGF- β 1 检测:取上述冻存的 PBMC 培养上清,ELISA 检测其 TGF- β 1 的水平,操作按试剂盒说明书进行,酶联仪上测定 450nm 波长吸光度(A_{450 nm})。

1.4 统计学分析 采用 SPSS10.0 软件进行统计学分析,实验数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组数据进行正态检验及方差齐性检验后,采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

表 1 为 ITP 患儿与正常对照儿童外周血细胞

表 1 ITP 患儿细胞因子与正常对照儿童外周血中细胞因子水平比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 对照组 | aITP | cITP | F | P |
|----------------------------|---------------------|-----------------------------|-------------------------------------|------|-------|
| 例数(n) | 25 | 24 | 20 | | |
| Th1(IFN- γ)(%) | 15.23 \pm 2.65 | 20.08 \pm 4.07 Δ | 11.01 \pm 2.15 $\Delta\Delta$ | 3.15 | <0.05 |
| Th2(IL-4)(%) | 2.80 \pm 0.42 | 2.61 \pm 0.52 | 3.05 \pm 0.56 Δ | 0.02 | >0.05 |
| Th1/Th2(比值) | 5.67 \pm 1.01 | 7.84 \pm 1.21 Δ | 4.01 \pm 0.95 Δ | | |
| Th3(TGF- β 1)(pg/ml) | 280.82 \pm 100.68 | 225.31 \pm 88.46 Δ | 165.64 \pm 80.61 $\Delta\Delta\#$ | 3.19 | <0.05 |

注:与对照组比较, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$, Δ $P < 0.05$;与 aITP 组比较, $\#$ $P < 0.05$ 。

因子检测结果,统计学分析显示,aITP 患儿分泌 IFN- γ 的 CD3⁺,CD8⁻细胞(Th1)与正常对照组比较显著增高($P < 0.05$),cITP 患儿分泌 IFN- γ 的 CD3⁺,CD8⁻细胞较对照组显著降低($P < 0.01$),三组之间差异有统计学显著性意义($P < 0.05$),cITP 患儿分泌 IL-4 的 CD3⁺,CD8⁻细胞明显高于对照组($P < 0.05$),三组之间差异无统计学显著性意义。aITP 患儿外周血单个核细胞的 Th3 细胞因子 TGF- β 1 较对照组显著降低($P < 0.05$),而 cITP 患儿的 Th3 细胞因子 TGF- β 1 较 aITP 组显著升高($P < 0.05$),三组间差异有统计学显著性意义。

3 讨论 Th 细胞是机体免疫应答的中心细胞,按其分泌细胞因子的不同可分为 Th0, Th1, Th2 和 Th3。Th1 细胞主要分泌 TNF- β , IFN- γ 和 IL-2 等,主要参与细胞免疫和巨噬细胞活化。Th2 细胞

主要分泌 IL-4, IL-5, IL-6 和 IL-10 等,促进 B 细胞的分化、成熟和增殖,促进抗体尤其是 IgE 和 IgG1 等抗体的大量产生,介导体液免疫应答^[3~5]。Th3 细胞除分泌大量的 IL-4 和 IL-10 外,主要高表达 TGF- β ,可以下调抗原递呈细胞(antigen presenting cells, APC)及 Th1 细胞的活性,起免疫抑制作用。ITP 免疫发病机制迄今尚未完全阐明,以往众多研究已证实 ITP 免疫活性细胞过度活化、细胞因子过量产生,但有关 ITP Th1/Th2 功能状态仍有争论。IFN- γ 主要生物学功能是免疫调节,除了诱导多种抗原提呈细胞表达 MHC-I/II 分子,活化单核、巨噬细胞并增强其溶菌活性及分泌 IL-1, 6, 8, TNF- α 外,还能活化中性粒细胞、NK 细胞,刺激血管内皮细胞和白细胞合成的黏附分子,促进 Th1 细胞发育和抑制 Th2 细胞活化与增殖,刺激 B 细胞产生抗体。

IL-4 能促进 B 细胞 MHC II 类抗原、Fc ϵ R II / CD23 和 CD40 的表达,并增强 B 细胞提呈抗原能力,使免疫系统对小量抗原刺激发生免疫应答。IL-4 是 T 细胞自身分泌的生长因子,如 HT-2 细胞系是一种 IL-2 依赖细胞系,IL-4 可单独维持 TH-2 的增殖,抗 IL-2 和抗 IL-4 McAb(11B11)可分别抑制 IL-2 和 IL-4 刺激 Th-2 细胞的增殖作用,但相互之间无交叉抑制作用。

TGF- β 1 是由巨核细胞和血小板生成,巨核细胞及血小板 α 颗粒是其最终存储点。TGF- β 1 是调节巨核细胞的负性调节因子,它通过与巨核细胞表面的 TGF- β 1 受体 III (TGF2 β 1 R III) 结合并启动相应的信号途径发挥抑制作用,使巨核细胞成熟障碍、血小板生成减少。本实验结果显示,IFN- γ 在儿童 aITP 组的表达高于对照组,IL-4 与对照组相比无显著意义,提示 aITP 患儿发病时外周血 Th0 细胞向 Th1 细胞的分化增加,疾病呈现 Th1 优势表达;而在 cITP 组 IFN- γ 因子的表达明显低于正常组,而 IL-4 的表达明显高于正常组,提示患儿发病时外周血 Th0 细胞向 Th1 细胞的分化明显减少,Th2 细胞相对优势表达。与此同时,还发现儿童急、慢性 ITP 均存在 Th 细胞的变化,Th1/Th2 功能极化异常,Dominguez 等^[6]认为 Th1/Th2 细胞间的平衡是调节体内体液免疫和细胞免疫间的重要环节。本实验结果显示儿童急、慢性 ITP 细胞因子的变化呈相反变化,说明两者致病的免疫机理可能存在根本区别。儿童 aITP 组 Th1 细胞因子优势表达提示机体自身反应性细胞免疫功能亢进,而 cITP 组 Th2 细胞因子相对优势表达,提示体内体液免疫作用增强,与 TGF- β 1 结果提示 cITP 体液免疫更明显,实验结果相一致。TGF- β 1 在儿童 aITP 组表达显著低于对照组,在儿童 cITP 组表达显著低于 aITP,提示机体对 B 细胞的抑制减弱,B 细胞更加敏感,容易激活,增殖活跃,产生更多的抗血小板抗体,加剧了血小板的破坏。进一步诱导巨噬细胞激活、补体形成和细胞毒细胞活性

增加,终致巨核细胞及血小板的破坏。三种细胞因子的变化,说明 cITP 和 aITP 均存在体液免疫异常,而 cITP 体液免疫更明显,免疫紊乱更为严重,这与 Andersson 等^[7]研究结果相一致。总之,ITP 病因复杂,进一步研究 ITP 患儿多细胞因子的变化,有助于阐明 ITP 具体的发病机制,为临床治疗提供有力的依据,具有重要的临床意义。

参考文献:

- [1] Maurer AM, Liu Y, Caen JP, et al. Ex vivo expansion of megakaryocytic cell [J]. *Int J Hematol*, 2000, 71 (3): 203-210.
 - [2] 张之楠, 沈 梯. 血液病诊断及疗效标准 [M]. 3 版. 北京: 北京科学出版社, 2008: 172-175.
Zhang ZN, Shen T. *Diagnosis and effect of blood diseases* [M]. 3th Ed. Beijing: Beijing Science Press, 2008: 172-175.
 - [3] Mouzaki A, Theodoropoulou M, Gianakopoulos I, et al. Expression patterns of Th1 and Th2 cytokine genes in childhood idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) at presentation and their modulation by intravenous immunoglobulin G (IVIg) treatment; their role in prognosis [J]. *Blood*, 2002, 100(5): 1774-1779.
 - [4] 徐晓军, 汤永民, 赵 宁, 等. Th1/Th2 细胞因子谱在儿童噬血细胞综合征诊断中的意义 [J]. *中华儿科杂志*, 2011, 49(9): 685-689.
Xu XJ, Tang YM, Zhao N, et al. Diagnostic significance of Th1/Th2 cytokine pattern in childhood hemophagocytic lymphohistiocytosis [J]. *Chinese Journal of Pediatrics*, 2011, 49(9): 685-689.
 - [5] Hetland G, Johnson E, Lyberg T, et al. The mushroom agaricus blazei murill elicits medicinal effects on tumor, infection, allergy, and inflammation through its modulation of innate immunity and amelioration of Th1/Th2 imbalance and inflammation [J]. *Adv Pharmacol Sci*, 2011(1687-6334): 157015.
 - [6] Dominguez-garcia MV, Rodriguez-Moyado H. Cellular and biochemical mechanisms involved in physiopathogenesis of autoimmune thrombocytopenic purpura [J]. *Gac Med Mex*, 2002, 15(3): 461-472.
 - [7] Andersson PO, Olsson A, Wadenvik H. Reduced transforming growth factor- β 1 production by mononuclear cells from patients with active chronic idiopathic thrombocytopenic purpura [J]. *Br J Haematol*, 2002, 116(4): 862-867.
- 收稿日期: 2014-10-09
修回日期: 2015-06-03
-
- (上接 142 页)
- Measurement of D-dimer as aid in risk evaluation of VTE in elderly patients hospitalized for acute illness: a prospective, multicenter study in China [J]. *Clinical and Investigative Medicine*, 2011, 34(2): 96-104.
- [4] Kawaguchi T, Kumabe T, Kanamori M, et al. Early detection of venous thromboembolism in patients with neuroepithelial tumor: efficacy of screening with serum D-dimer measurements and Doppler ultrasonography [J]. *Journal of Neuro-Oncology*, 2011, 101(3): 495-504.
 - [5] Roselli M, Ferroni P, Portarena I, et al. Predictive value of high-sensitive D-dimer determination for chemotherapy-associated venous thromboembolism in gastrointestinal cancer patients [J]. *Thrombosis and Haemostasis*, 2012, 108(6): 1243-1245.
 - [6] Antovic JP, Höög Hammarström K, Forslund G, et al. Comparison of five point-of-care D-dimer assays with the standard laboratory method [J]. *International Journal of Laboratory Hematology*, 2012, 34(5): 495-501.
 - [7] 郭 野, 寿玮龄, 吴 卫, 等. INNOVANCE 试验和 PLUS 试验检测 D-二聚体方法比较 [J]. *中华检验医学杂志*, 2013, 36(7): 638-642.
Guo Y, Shou WL, Wu W, et al. Method comparison between INNOVANCE D-Dimer and PLUS D-Dimer [J]. *Clin J Lab Med*, 2013, 36(7): 638-642.
- 收稿日期: 2015-06-15 修回日期: 2015-07-18