

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2022.03.010

❖ 临床研究 ❖

免疫性血小板减少症患者外周血 Th17/Treg 相关因子的表达及意义

仲晓玲, 吴文静

(南京大学医学院附属鼓楼医院输血科, 江苏 南京 210008)

【摘要】目的: 探讨辅助性 T 淋巴细胞 17(Th17)/调节性 T 淋巴细胞(Treg)在免疫性血小板减少症(ITP)患者外周血的表达情况及临床意义。**方法:** 选取 60 例 ITP 患者作为 ITP 组和同期 60 名健康体检者作为对照组,应用流式细胞术进行 Th17、Treg 细胞比例的测定,应用 ELISA 法进行血清白细胞介素 17(IL-17)、IL-10 的测定,并比较组间差异。**结果:** ITP 患者外周血 Th17 细胞比例和 IL-17 水平分别为 $(2.51 \pm 0.87)\%$ 、 $(88.41 \pm 21.57) \mu\text{g/L}$, 高于对照组的 $(0.89 \pm 0.22)\%$ 、 $(49.12 \pm 6.23) \mu\text{g/L}$ ($P < 0.05$); Treg 细胞比例和 IL-10 水平分别为 $(3.68 \pm 1.12)\%$ 、 $(19.14 \pm 4.36) \mu\text{g/L}$, 低于对照组的 $(6.42 \pm 1.32)\%$ 、 $(24.58 \pm 4.12) \mu\text{g/L}$ ($P < 0.05$); Th17/Treg 比值、IL-17/IL-10 比值分别为 (0.68 ± 0.18) 、 (4.62 ± 1.51) , 高于对照组的 (0.14 ± 0.04) 、 (2.00 ± 0.62) ($P < 0.05$)。ITP 患者血小板计数与外周血 Treg 细胞比例、IL-10 水平呈正相关($r = 0.823$ 、 0.744), 而与外周血 Th17 细胞比例、IL-17 呈负相关($r = -0.881$ 、 -0.743)。**结论:** Th17/Treg 失衡在 ITP 的发病机制中至关重要。

【关键词】 免疫性血小板减少症; 免疫失衡; 辅助性 T 淋巴细胞 17; 调节性 T 淋巴细胞

【中图分类号】 R558.2; R392.7 **【文献标志码】** A

Expression and significance of Th17/Treg related factors in patients with immune thrombocytopenia

ZHONG Xiao-ling, WU Wen-jing

(Department of Blood Transfusion, Gulou Hospital Affiliated to Medical College of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu, China)

【Abstract】Objective: To investigate the expression and clinical significance of Th17/Treg in patients with immune thrombocytopenia (ITP). **Methods:** 60 patients with ITP (ITP group) and 60 healthy subjects (control group) diagnosed were selected. The proportion of Th17 and Treg cells was measured by flow cytometry, and the serum interleukin-17 (IL-17) and IL-10 were measured by ELISA, the differences between groups were compared. **Results:** The proportion of Th17 cells and IL-17 levels in peripheral blood of ITP patients were $(2.51 \pm 0.87)\%$ and $(88.41 \pm 21.57) \mu\text{g/L}$, respectively, which were significantly higher than $(0.89 \pm 0.22)\%$ and $(49.12 \pm 6.23) \mu\text{g/L}$ in the control group ($P < 0.05$). The proportion of Treg cells and IL-10 levels were $(3.68 \pm 1.12)\%$ and $(19.14 \pm 4.36) \mu\text{g/L}$, respectively, which were significantly lower than $(6.42 \pm 1.32)\%$ and $(24.58 \pm 4.12) \mu\text{g/L}$ in the control group ($P < 0.05$). The ratios of Th17/Treg and IL-17/IL-10 were (0.68 ± 0.18) and (4.62 ± 1.51) , respectively, which were significantly higher than those in the control group $(0.14 \pm 0.04$ & 2.00 ± 0.62 , $P < 0.05$). Platelet count in ITP patients was positively correlated with the proportion of Treg cells in peripheral blood and IL-10 levels ($r = 0.823$, 0.744), while negatively correlated with the proportion of Th17 cells in peripheral blood and IL-17 ($r = 0.881$, 0.743) **Conclusion:** Th17/Treg imbalance is crucial in the pathogenesis of ITP.

【Key words】 Immune thrombocytopenia; Immunization imbalance; Auxiliary T lymphocyte 17; Regulatory T lymphocytes

免疫性血小板减少症 (immunologic thrombocytopenic purpura, ITP) 是一种自身免疫出血性疾病, 以血小板计数减少为主要表现, 并可伴随皮肤、黏膜甚至内脏出血^[1-2]。近年来, 随着现代社会生活压力的增大, 免疫类疾病越来越高发, ITP 的发病率也呈逐年上升趋势, 严重威胁人们生命健康。ITP 的

发病机制尚未完全明确, 免疫功能紊乱被认为在其中发挥着重要作用, 最初的研究多集中于体液免疫方面, 认为体液免疫异常是 ITP 的主要致病因素^[3]。近年研究^[4]发现, 辅助性 T 细胞(helper T cell, Th) 亚群的免疫异常与 ITP 发病具有关联性。辅助性 T 细胞 17/调节性 T 细胞(helper T cell 17/regulatory

基金项目: 江苏省输血协会英科新创科研基金项目(JS2020007)

作者简介: 仲晓玲(1982-), 女, 主管技师。E-mail: zxl9820092021@163.com

cells, Th17/Treg) 的免疫失衡参与了自身免疫性疾病的病理改变过程^[5-6]。Th17 细胞能够分泌致炎性细胞因子白细胞介素 17 (interleukin-17, IL-17), Treg 细胞可分泌 IL-10 等重要效应细胞因子, 二者在分化、功能上均相互拮抗, 共同维持机体免疫状态的相对稳定。本研究旨在通过检测 ITP 患者外周血 Th17、Treg 比例及血清 IL-17、IL-10 水平变化, 探讨 Th17/Treg 及相关因子失衡在 ITP 发病中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2020 年 1 月至 2021 年 6 月在南京大学医学院附属鼓楼医院确诊的 ITP 患者 60 例 (ITP 组), 其中男性 28 例, 女性 32 例; 年龄 18 ~ 71 岁, 平均 (48.65 ± 8.95) 岁。纳入标准: (1) 符合 ITP 诊断标准^[7], 初次发病; (2) 尚未接受过血小板输注; (3) 未行脾切除治疗; (4) 未服用对凝血功能有影响的药物。排除标准: (1) 合并其他自身免疫性疾病者; (2) 急慢性感染者; (3) 恶性肿瘤患者; (4) 有血液系统疾病史者。另选取 60 名同期健康体检者作为对照组, 均排除自身免疫性疾病、血液系统疾病等, 其中男性 33 例, 女性 27 例; 年龄 20 ~ 65 岁, 平均 (47.11 ± 9.36) 岁。两组性别构成、年龄对比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。本研究经本院医学伦理委员会批准, 入组对象均签署知情同意书。

1.2 Th17、Treg 细胞的检测

入组对象均于次日清晨抽取空腹状态下静脉血 3 mL, 放置在含枸橼酸钠的抗凝管中, 采用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 等体积稀释, 应用人淋巴细胞分离液分离获得外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs), 用 RPMI 1640 培养基调整细胞浓度至 2×10^6 /mL, 然后接种到 24 孔板, 37 °C 孵箱中培养 4 h。参照试剂盒说明书步骤进行操作, 配置完毕后等待上机检测。应用流式细胞仪对 Th17、Treg 细胞比例进行检测。

1.3 血清 IL-17、IL-10 的测定

采集研究对象血清, 置于 -70 °C 环境下保存, 最后进行统一检测。采用酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 法进行 IL-17、IL-10 的检测, 严格按试剂盒说明书进行具体步骤操作。

1.4 统计学分析

应用 SPSS24.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较用独立样本 t 检验; 采用 Pearson 相关性分析对变量之间的相

关性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ITP 患者外周血 Th17、Treg 细胞比例及其比值变化

相比对照组, ITP 患者外周血 Th17 细胞比例和 Th17/Treg 比值增高, Treg 细胞比例降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 ITP 患者与对照组外周血 Th17、Treg 细胞比例及其比值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Th17 (%)	Treg (%)	Th17/Treg
ITP 组 ($n = 60$)	2.51 ± 0.87	3.68 ± 1.12	0.68 ± 0.18
对照组 ($n = 60$)	0.89 ± 0.22	6.42 ± 1.32	0.14 ± 0.04
t 值	13.983	12.260	22.685
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 ITP 患者血清及 IL-17、IL-10 水平及其比值变化

相比对照组, ITP 患者血清 IL-17 水平和 IL-17/IL-10 比值增高, IL-10 水平降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 ITP 患者血清及 IL-17、IL-10 水平及其比值变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	IL-17 (μg/L)	IL-10 (μg/L)	IL-17/IL-10
ITP 组 ($n = 60$)	88.41 ± 21.57	19.14 ± 4.36	4.62 ± 1.51
对照组 ($n = 60$)	49.12 ± 6.23	24.58 ± 4.12	2.00 ± 0.62
t 值	13.555	7.025	12.433
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

2.3 Th17/Treg 细胞及相关因子与血小板计数的相关性分析

ITP 患者血小板计数为 $(18.26 \pm 10.37) \times 10^9$ /L, 与外周血 Treg 细胞比例、IL-10 水平呈正相关 ($r = 0.823, 0.744$), 而与外周血 Th17 细胞比例、IL-17 呈负相关 ($r = -0.881, -0.743$)。见图 1。

3 讨论

ITP 的发病是多种机制共同参与导致, 但免疫功能紊乱是其核心发病机制, 以 T 细胞为主的免疫功能紊乱在疾病发生发展中起着重要作用, 机体免疫异常可致使机体抗血小板抗体与血小板发生结合, 使得网状内皮细胞遭到破坏, 从而造成血小板破坏增多, 血小板数目减少^[8]。既往研究^[9-11]发现, ITP 患者体内存在 T 细胞亚群失衡、相关细胞因子异常表达, 其中细胞免疫功能失调是 ITP 发病的关

键环节之一,如 Th1/Th2、Th17/Treg 细胞平衡失调等。

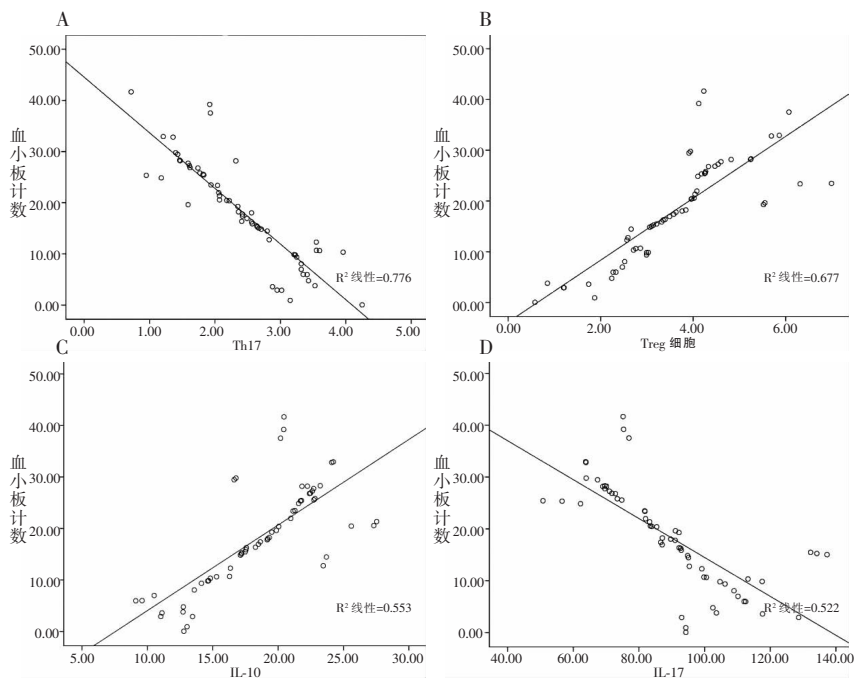


图 1 Th17/Treg 细胞及相关因子与血小板计数的相关性的散点图

A-D. 血小板计数分别与 Th17 细胞比例、Treg 细胞比例、IL-10 水平、IL-17 水平的相关性。

Th17 细胞可与 Th1 细胞发挥协同作用,共同参与自身免疫性疾病的病理过程。Th17 细胞与 Treg 细胞虽有着相同的分化过程,但两者功能相互拮抗,在正常情况下,二者处于平衡状态,Th17/Treg 细胞的动态平衡有助于维持机体免疫状态的稳定,而 Th17/Treg 失衡是导致自身免疫性疾病发病的重要机制。Th17 细胞、Treg 细胞是由 CD4⁺T 淋巴细胞分化而成的两种细胞新亚群。当机体有炎症反应时,IL-6、转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 共同诱导 CD4⁺T 淋巴细胞分化成为 Th17 细胞;机体不存在炎症反应时,TGF- β 单独诱导 CD4⁺T 淋巴细胞分化为 Treg 细胞^[12]。由 Th17 细胞所分泌的致炎细胞因子 IL-17 能够促进炎症因子表达,进而促进自身免疫性疾病的发生发展^[13]。而 Treg 细胞分泌的抗炎因子 IL-10 则能够和细胞间直接接触而介导免疫抑制^[14]。周正菊等^[15]指出,ITP 患者外周血 Th17 细胞比例显著增高。本研究也发现,ITP 患者外周血 Th17 细胞比例和血清 IL-17 水平显著高于对照组,表明 ITP 患者存在 Th17 细胞和相关因子异常表达现象,这可能是 ITP 的重要病理机制之一。

本研究显示,ITP 患者外周血 Treg 细胞比例和 IL-10 水平显著低于对照组,免疫抑制功能的减弱,与张萍等^[16-17]报道一致。此外,本研究还指出研究报告,Th17/Treg 细胞失衡所致的机体免疫异常,可

能参与了 ITP 的病理机制,与 Yazdanbakhsh 等^[18]研究与之一致。Th17 细胞增多,Treg 细胞减少,可使得机体免疫平衡遭到破坏,导致免疫失衡,从而诱发 ITP^[19-20]。本研究相关性分析显示,ITP 患者血小板计数与外周血 Treg 细胞比例、IL-10 水平呈正相关,而与外周血 Th17 细胞比例、IL-17 呈负相关,提示 ITP 患者外周血 Th17、Treg 细胞比例和 IL-17、IL-10 水平可能能够反映病情严重程度。

综上所述,ITP 患者存在 Th17/Treg 细胞失衡及相关因子异常表达,Th17/Treg 失衡可能参与了 ITP 的发生发展。

参考文献

- [1] Elalfy MS, Eltonbary K, Ghamry IE, *et al.* Intracranial hemorrhage in primary immune thrombocytopenia (ITP): 20 years' experience in pediatrics [J]. *European Journal of Pediatrics*, 2021, 180 (5): 1545 - 1552.
- [2] Samson M, Fraser W, Lebowitz D, *et al.* Treatments for primary immune thrombocytopenia: A review [J]. *Cureus*, 2019, 11 (10): e5849.
- [3] 彭军,侯明. 原发免疫性血小板减少症治疗进展[J]. *临床血液学杂志*, 2019, 32(1): 14 - 17.
- [4] Rocha A, Souza C, Rocha GA, *et al.* The serum levels of the cytokines involved in the Th17 and Th1 cell commitment are increased in individuals with borderline thrombocytopenia [J]. *Journal of Hematology & Oncology*, 2013, 6(1): 28.

(下转第 332 页)