

气不摄血证免疫性血小板减少症患者细胞免疫功能变化及其临床意义

王明镜¹ 胡晓梅¹ 丁晓庆² 许勇钢¹ 全日城¹ 湛海燕² 邓中阳¹ 赵攀¹ 范腾¹ 朱世荣¹

(1 中国中医科学院西苑医院,北京,100091; 2 北京中医药大学东方医院,北京,100078)

摘要 目的:观察气不摄血证免疫性血小板减少症(ITP)患者细胞免疫功能变化,从细胞层面探究气不摄血证ITP的生物学基础。方法:选取2016年12月至2017年5月在中国中医科学院西苑医院与北京中医药大学东方医院门诊就诊的ITP确诊患者42例,依据中医证候积分分级标准,将患者分为轻度、中度、重度3组,同时纳入26例体检健康者作为对照组,观察各组Th1、Th2、Th17、Treg、Breg细胞的表达比例变化情况,并对上述免疫细胞的表达与中医证候积分的相关性进行分析。结果:与正常对照组比较,气不摄血证ITP患者Breg与Th17细胞的表达比例下降,Th1细胞的表达比例上升($P < 0.05$),Th1/Th2呈Th1型($P < 0.05$),Treg与Th2细胞的表达以及Th17/Treg比值无统计学意义。与对照组比较,轻度组($P < 0.05$)、中度组($P < 0.05$)、重度组($P < 0.05$)的Breg细胞的表达显著降低,Th1细胞的表达和Th1/Th2比值显著升高,Treg、Th2以及Th17细胞的表达、Th17/Treg比值差异无统计学意义。中度组与重度组Breg细胞的表达显著低于轻度组($P < 0.05$),其他免疫细胞的表达与轻度组比较差异无统计学意义。重度组上述免疫细胞细胞的表达与中度组比较差异无统计学意义。Breg细胞的表达与中医证候积分具有负相关性($r = -0.488, P = 0.001$),其余免疫细胞无相关性。结论:气不摄血证ITP患者细胞免疫功能变化表现为Th1细胞表达增加导致Th1/Th2失衡。Th17与Breg细胞表达水平下降。Breg细胞表达水平可能反映了气不摄血证患者的气虚严重程度。

关键词 气不摄血证;免疫性血小板减少症;免疫失衡

Immune Function Changes and Clinical Significance of Immune Thrombocytopenia Patient with Syndrome of Qi Failing to Control Blood

Wang Mingjing¹, Hu Xiaomei¹, Ding Xiaoqing², Xu Yonggang¹, Quan Richeng¹,
Chen Haiyan², Deng Zhongyang¹, Zhao Pan¹, Fan Teng¹, Zhu Shirong¹

(1 Xiyuan Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China;

2 Dongfang Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China)

Abstract Objective: To analyze the immune function changes in patients with immune thrombocytopenia (ITP) with syndrome of qi failing to control blood, then figure out the material basis of the syndrome of qi failing to control blood based on the expressions of immune cells. **Methods:** According to the traditional Chinese medicine (TCM) syndrome score, 42 patients with ITP in our hospital from December 2016 to May 2017 were separated into mild group (MIG), moderate group (MOG), and severe group (SG). Twenty-six healthy people were as control group (CG). The expressions of Th1, Th2, Th17, Treg and Breg and the relationship between the expressions of them and the TCM syndrome scores were analyzed. **Results:** As comparison with CG, the expressions of Breg and Th17 were lower ($P < 0.05$), while the Th1, Th1/Th2 were higher ($P < 0.05$) in the ITP patients. The expressions of Th2, Treg and Th17/Treg in ITP patients had no significant differences with those in CG. The expressions of Breg were lower, while as the expressions of Th1 and Th1/Th2 were higher in MIG ($P < 0.05$), MOG ($P < 0.05$), and SG ($P < 0.05$) than those in CG. The expressions of Th2, Treg and Th17/Treg in the three groups had no significant differences with those in CG. As compared with MIG, all of the expressions of immune cells had no significant differences in MOG and SG, except the Breg. The expression of Breg in MOG ($P < 0.05$) and SG ($P < 0.05$) was lower than those in MIG. All the expressions of immune cells had no significant differences between in MOG and in SG. There were negative correlations between expression level of Breg and TCM syndrome scores ($r = -0.488, F = 0.001$). The other expressions of immune cells had no correlations with TCM syndrome scores. **Conclusion:** The higher level of Th1 expression leading to the imbalance of Th1/Th2 and the decreasing expressions of Th17 and Breg might be the signatures of ITP with TCM syndrome of qi failing to control blood. The level of Breg expression might indicate the level of Qi deficiency.

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2015CB554403)

作者简介:王明镜(1989.07—),男,硕士研究生在读,研究方向:中西医结合血液病防治,E-mail:244650151@qq.com

通信作者:胡晓梅(1964.05—),女,博士,主任医师,研究方向:中西医结合血液病防治,E-mail:huxiaomei_2@163.com

Key Words Syndrome of qi failing to control blood; Immune thrombocytopenia; Immune imbalance

中图分类号:R255.7 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.04.009

免疫性血小板减少症(Immune Thrombocytopenia, ITP)是一种以血小板减少为主要表现的常见的免疫相关疾病,临床表现血小板计数不同程度的减少、伴或不伴皮肤黏膜、脏器出血症状,属于中医“血证”“紫癜病”范畴。气不摄血证是 ITP 常见证型之一^[1]。依据中医血证理论,气虚则无力摄血,进而血不循经,旁溢而出。长期以来现代医学对 ITP 的认识是从免疫角度出发,祖国传统医学的切入点则是从气血脉之间的相互联系,笔者认为找出 2 种思维方式之间的对应关系有助于从更深层次揭示 ITP 发病机制,也有助于挖掘人体在 ITP 疾病状态下气对血的作用进而有益于发现中医气不摄血证的发生、发展全过程,同时对探究中医气血理论的物质基础提供必要的参考资料。本研究遴选 42 例符合中医辨证气虚型血证 ITP 诊断的患者进行研究,并以 26 例体检健康者作为对照组,观察 Th1、Th2、Th17、Treg、Breg 细胞表达变化情况,并对上述免疫细胞与中医证候积分的相关性进行分析,拟从免疫细胞的层面入手,探讨气不摄血证 ITP 与免疫细胞变化与中医气不摄血证的关系,为研究中医气血理论的相关物质基础找到新的路径与方向。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 12 月至 2017 年 5 月在中国中医科学院西苑医院与北京中医药大学东方医院门诊就诊的 ITP 确诊患者 42 例,男 18 例,女 24 例,年龄 18~68 岁,中位年龄 49 岁,对照组 28 例为我院体检健康志愿者,男 14 例,女 14 例,年龄 21~55 岁,中位年龄 45 岁。年龄和性别与观察组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。本研究获得中国中医科学院西苑医院临床研究伦理委员会批准(2015XLA108-2)。

1.2 诊断标准 1) 西医诊断:所有入选患者均参照《成人原发免疫性血小板减少症诊断与治疗中国专家共识(2012 年版)》^[2]。2) 中医证候诊断:参照国家中医药管理局 2010 年出版的中医血液病重点专科紫癜病(免疫性血小板减少症)中医诊疗方案^[3]。

1.3 纳入标准 符合免疫性血小板减少症诊断标准,病程 ≥ 3 个月;符合气不摄血证;年龄在 18~75 岁之间。

1.4 排除标准 严重消化道和(或)脏器出血;脏器功能不全;血肌酐大于正常值上限;丙氨酸转氨酶、

天冬氨酸酶、胆红素大于正常值的 2 倍;NYHA 分级 \geq II 级;妊娠、哺乳期妇女、过敏体质者。

1.5 主要仪器 FITC 标记的抗人 CD4 单克隆抗体、抗人 CD38 单克隆抗体、抗人 IFN- γ 单克隆抗体, PE 标记的抗人 CD25 单克隆抗体、抗人 CD24 单克隆抗体, PC5 标记的抗人 CD19 单克隆抗体、抗人 CD4 单克隆抗体、抗人 IL-4 单克隆抗体, APC 标记的抗人 CD127 单克隆抗体、抗人 IL-17A 单克隆抗体,均为美国 BD 公司生产。流式细胞仪(EPICS ELITE 型, BD 公司)、Shel. LABCO2 培养箱,美国 SHELDON 公司。RPMI1640 培养液、红细胞裂解液 OptiLyseC 购自美国 BD 公司。

1.6 研究方法

1.6.1 外周血采集及处理 实验组与正常对照组,每个人取 2 mL 外周静脉血,其中 1 mL 用于检测 Th1、Th2、Th17 细胞群的样本采用肝素钠抗凝,另外 1 mL 用于检测 Treg、Breg 细胞群的样本采用 EDTA 抗凝。PBMC 由密度梯度离心法分离, PBMC 密度调整为 $1 \times 10^9/L$,加入 20 μL CD4PC5 避光静置 30 min 后加入 1 mL 胎牛血清的 RPMI640 培育液悬浮 PMBC, 37 $^{\circ}C$ 孵箱中 18 h 培养;具体操作按照试剂盒要求,配制完毕等待上机检测。

1.6.2 PBMC 免疫细胞 FCM 检测 开机后 Flow-Check 校准光路,并自动设定实验的获取条件,包括 PMT 电压和荧光补偿,然后进入自动分析软件,以 FSC/SSC 设门,确定淋巴细胞群,获取 1×10^4 个细胞,应用 EXPO 32 软件分析。

1.6.3 气不摄血证程度分级 参照国家中医药管理局 2010 年出版的中医血液病重点专科紫癜病(免疫性血小板减少症)诊疗方案,气不摄血证主要临床症状与体征:皮肤紫癜、鼻衄、齿衄、月经量多、神疲乏力、气短、头晕目眩、面色不华、少食、便秘、便溏。量化评分:无(0 分)、轻微(2 分)、中等(4 分)、显著(6 分)。最后统计每一粒入组患者的评分结果。证候分级标准:1)轻度:总分 ≤ 22 分;2)中度:总分:22~44 分;重度 ≥ 44 分。

1.7 统计学方法 采用 SPSS 21.0 统计软件处理实验数据,实验结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。分组之间的比较采用 Kruskal-Wallis 检验,相关性分析采用 Spearman 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表1 ITP患者及健康对照组免疫细胞($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	Treg	Breg	Th1	Th2	Th17	Th1/Th2	Th17/Treg
对照组($n=28$)	7.13 ± 1.61	2.22 ± 1.01	9.19 ± 6.34	1.98 ± 0.62	1.35 ± 0.43	4.96 ± 3.13	0.2 ± 0.08
ITP组($n=42$)	6.73 ± 1.93	0.68 ± 0.55*	18.35 ± 12.74*	1.91 ± 0.68	1.02 ± 0.37*	11.52 ± 9.08*	0.2 ± 0.17

注:与对照组比较,* $P < 0.05$

表2 轻度组、中度组、重度组 ITP 患者及健康对照组免疫细胞($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	Treg	Breg	Th1	Th2	Th17	Th1/Th2	Th17/Treg
对照组($n=28$)	7.13 ± 1.61	2.22 ± 1.01	9.19 ± 6.34	1.98 ± 0.62	1.35 ± 0.43	4.96 ± 3.13	0.2 ± 0.08
轻度组($n=7$)	6.12 ± 1.41	1.8 ± 0.38*	21.12 ± 8.39*	2.02 ± 0.89	1.02 ± 0.36	12.12 ± 6.07*	0.18 ± 0.07
中度组($n=12$)	6.68 ± 1.85	0.69 ± 0.25* Δ	15.05 ± 6.85*	1.83 ± 0.67	1.71 ± 0.94	10.36 ± 7.76*	0.26 ± 0.24
重度组($n=23$)	6.89 ± 2.09	0.44 ± 0.26* Δ	19.48 ± 10.56*	1.92 ± 0.67	0.96 ± 0.31	12.03 ± 10.65*	0.18 ± 0.13

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与轻度组比较, $\Delta P < 0.05$

2 结果

2.1 气不摄血证 ITP 患者细胞免疫功能变化 气不摄血证 ITP 患者与健康对照组 Th1、Th2、Th17、Treg、Breg 细胞表达变化,以及 Th1/Th2、Th17/Treg 结果如表 1 所示。与正常人对照组比较,气不摄血证 ITP 患者 Treg、Breg、Th17、Th2 细胞比例下降, Th1 细胞比例上升, Breg、Th17、Th1 细胞、Th1/Th2 差异有统计学意义($P < 0.05$), Treg、Th2 细胞, Th1/Th2、Th17/Treg 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 不同程度气不摄血证 ITP 患者细胞免疫功能变化 轻度组、中度组、重度组 ITP 患者与健康对照组 Th1、Th2、Th17、Treg、Breg 细胞比例变化,以及 Th1/Th2、Th17/Treg 比值结果如表 2 所示。与对照组比较,轻度组、中度组、重度组的 Breg 细胞表达均显著降低($P < 0.05$),轻度组、中度组、重度组的 Th1 细胞表达、Th1/Th2 比值均显著升高($P < 0.05$), Treg、Th2、Th17 细胞表达、Th17/Treg 比值比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。中度组与重度组的 Breg 细胞表达显著低于轻度组,而中度组、重度组的其他免疫细胞与轻度组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。重度组的上述免疫细胞与中度组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 Breg 细胞表达与气不摄血证程度的相关性 Breg 细胞表达与气不摄血证积分的相关性分析如图 1 所示, $r = -0.488, P = 0.001$,表明 Breg 细胞表达与气不摄血证程度呈负相关($P < 0.05$)。而 Th1、Th2、Th17、Treg 细胞表达与气不摄血证程度未显示相关性($P > 0.05$)。

3 讨论

ITP 以皮肤、黏膜或内脏出血为主要的临床表现,属于中医学的“血证”“虚劳”等范畴,目前统称为“紫癜病”^[3]。气不摄血证是中医“血证”的常见

证型之一^[1],气虚不摄则血不归经,发生各种病证。历代医家关于气虚引发“血证”的论述颇为丰富:《医述·血证》:“气虚不统者,血必散漫”。《景岳全书·血证》:“损者多由于气,气伤则血无以存”。清代医家吴澄更是从“天地之道”将气虚与出血的关系进行概括:“天地之道,无形者依有形,有形者附无形,互相依附。天地之道,亦即气血之道也。气之高,未有不由于血之散,而血之脱未有不由于气之虚。所以善治者,不治其血,而专治其气。气旺则阳能统阴,而血自归经矣”。

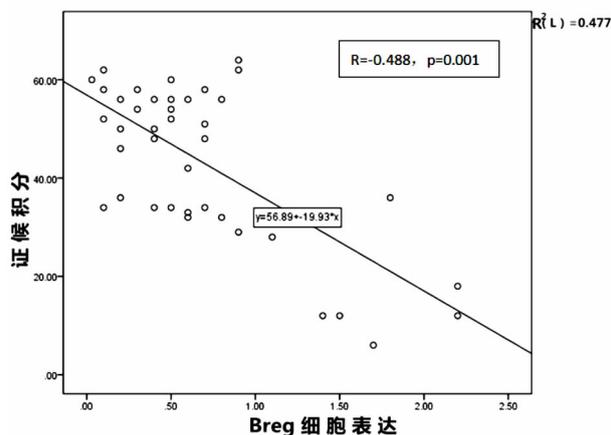


图1 Breg 与中医证候积分相关性分析

现代医学认为 ITP 的发病与机体免疫调节功能失常导致血小板生成障碍或血小板破坏过度有关,其中 T、B 淋巴细胞亚群分泌异常而导致的免疫失衡是主要的发病机制之一,涉及到 Th1、Th2、Th17、Treg、Breg 数量异常,以及 Th1/Th2、Th17/Treg 失衡^[4-7]。Th1 细胞能有效介导细胞免疫,主要作用是增强吞噬细胞介导的抗感染免疫,特别是抗胞内病原体的感染;Th2 细胞可以刺激体液免疫,参与变态反应、对抗细胞外多细胞寄生虫感染^[8-9]。Th17 细胞在防御胞内细菌感染的免疫应答、介导慢性炎症

反应和自身免疫性疾病中发挥重要作用,参与了多种急慢性免疫性疾病的发病^[10]。Treg 细胞是一种具有免疫抑制功能的 T 细胞亚群,能维持免疫系统对自身成分的耐受,使机体保持免疫稳态。Breg 是一群能在多种免疫性疾病中发挥负性调节的作用且与分泌免疫球蛋白无关联的 B 细胞亚群,可以促进 Treg 细胞的分化^[11],调节 Th1/Th2 平衡^[12],抑制原始 T 细胞分化为 Th1、Th17 细胞^[13]。

本研究发现,气不摄血证 ITP 患者 Th1 细胞分泌显著高于对照组, Th2 细胞分泌与对照组比无显著差异, Th1/Th2 存在失衡现象且倾向于 Th1 型; Th17 细胞分泌低于对照组, Treg 分泌情况与对照组无显著差异, Th17/Treg 与对照组比较无显著差异; Breg 分泌显著低于对照组。既往认为, ITP 患者 Th1 分泌水平升高, Th2 细胞降低, Th17 水平升高, Treg 分泌降低, 进而 Th1/Th2 失衡、Th17/Treg 失衡, 即炎症反应因子分泌过多而抑炎因子分泌不足导致 ITP 发病^[14-16]。我们认为, 气不摄血证 ITP 患者发病机制主要是由于 Breg 细胞分泌不足, 对 Th1 细胞抑制不足, 导致 Th1 分泌过量, 同时 Th17 向 Th1 发生了转换, 加剧 Th1/Th2 失衡, Th2 细胞与 Treg 细胞未参与到气不摄血证的发病过程, 与既往的研究结果不尽相同。Henriques 研究发现 Th17 可以产生 IL-2、TNF- α 、IFN- γ 等 Th1 型细胞因子, 进而诱导 T 细胞向 Th1 型极化^[16], 与我们的观点一致。另外, 研究发现 TGF- β 对 Th17 细胞的分化起促进作用^[17], 而 IFN- γ 可以通过抑制 TGF- β 相关信号, 干扰 TGF- β 对 Th17 细胞分化的诱导作用, 进而抑制 Th17 细胞的分化数量^[18], 而 IFN- γ 主要由 Th1 细胞分泌, 据此, 我们认为, Th1 细胞可以抑制 Th17 生成, 高表达的 Th1 细胞会造成 Th17 分泌减少。Adams^[19]等研究发现, ITP 患者可以出现 Th1 细胞数量减少、Th17 分泌数量增多的情形, 与我们的研究相反, 但其纳入的 ITP 患者中医证型未知, 因此, 我们认为 ITP 发病复杂多样, 需要进一步细化入组标准, 扩大样本量深入研究。

同时, 本研究发现, Breg 的分泌与中医证候积分具有显著负相关性, 轻度组、中度组、重度组 3 组之间 Breg 的分泌呈现出递减趋势, 当 Breg 分泌降低时, 中医证候积分显著升高, 意味着患者气不摄血相关中医症状加重。据此我们推断, Breg 细胞异常影响到气对血的固摄功能, Breg 的变化间接的反映了此型 ITP 患者的气虚严重程度。本研究结果表明, 细胞免疫功能的变化, 反映了气不摄血证 ITP 的

发病机制与生物学基础, 也为中医益气摄血法治疗气虚型 ITP 以及其他“血证”提供了生物学依据。

参考文献

- [1] 王明镜, 邓中阳, 胡晓梅. 益气摄血法治疗免疫性血小板减少症概况[J]. 河南中医, 2017, 37(5): 928-930.
- [2] 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中国专家共识(2012年版)[J]. 中华血液学杂志, 2012, 33(11): 975-977.
- [3] 国家中医药管理局医政司. 国家中医药管理局第一批 95 个病种中医诊疗方案: 紫癜病(免疫性血小板减少症)中医诊疗方案[S]. 北京: 中国中医药出版社, 2010.
- [4] 李晓征, 白玉盛, 王永, 等. 不同证型原发免疫性血小板减少症患者淋巴细胞亚群表达特征[J]. 中医杂志, 2017, 58(13): 1126-1129.
- [5] Takahashi N, Saitoh T, Gotoh N, et al. The cytokine polymorphisms affecting Th1/Th2 increase the susceptibility to, and severity of, chronic ITP[J]. BMC Immunol, 2017, 18(1): 26.
- [6] 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.
- [7] Semple JW. Bregging rights in ITP[J]. Blood, 2012, 120(16): 3169.
- [8] 王颖超, 刘满菊, 朱桂英, 等. Th17/Treg 细胞比例失衡在儿童原发性免疫性血小板减少症中的意义[J]. 中国当代儿科杂志, 2016, 18(3): 238-242.
- [9] 张阵, 陈兰举. 特发性血小板减少性紫癜免疫机制研究进展[J]. 中华全科医学, 2011, 9(9): 1438-1440.
- [10] 徐维家, 李志, 杨婷婷, 等. 特发性血小板减少性紫癜患者 Th1、Th17 和 Treg 细胞及其细胞因子检测及临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(14): 1792-1793, 1795.
- [11] 李鑫, 王芳, 丁凯阳, 等. 调节性 B 细胞在免疫性血小板减少症发病过程中的意义[J]. 中国实验血液学杂志, 2014, 22(2): 403-406.
- [12] Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells[J]. Annu Rev Immunol, 2012, 30: 221-241.
- [13] Flores-Borja F, Bosma A, Ng D, et al. CD19 + CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation[J]. Sci Transl Med, 2013, 5(173): 173ra23.
- [14] 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.
- [15] Li J, Wang Z, Hu S, et al. Correction of abnormal T cell subsets by high-dose dexamethasone in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura[J]. Immunol Lett, 2013, 154(1-2): 42-48.
- [16] Henriques A, Inês L, Pais ML, et al. Th17 cells in systemic lupus erythematosus share functional features with Th17 cells from normal bone marrow and peripheral tissues[J]. Clin Rheumatol, 2012, 31(3): 483-491.
- [17] 王玫. Th17 与自身免疫性疾病[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2012, 32(3): 272-276.
- [18] 李蓓, 王敏. Th17 细胞的分化与调节[J]. 现代免疫学, 2009, 29(5): 431-434.
- [19] Adams G, Graebner L, ASayed A, et al. Cytokine Fluctuations in Immune Thrombocytopenia(ITP) over Time: Insights into the Pathogenesis and Evolution of the Disease[J]. Blood, 2016, 128(22): 2549-2551.