

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.08.025

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190130.1728.037.html(2019-01-31)

甲泼尼龙琥珀酸钠对急性原发性免疫性血小板减少症患者 Tr 细胞分化及 FoxP3 基因表达的影响*

张琳,徐大明[△],李天宇,张茜,温大科,李方方,郭豆豆,杨燕,包鸿
(江苏省无锡市儿童医院儿血液内科 214023)

[摘要] **目的** 探究甲泼尼龙琥珀酸钠对急性原发性免疫性血小板减少症(AITP)患者调节性 T(Tr)细胞分化及叉头蛋白 P3(FoxP3)基因表达的影响。**方法** 选取该院在 2017 年 1 月至 2018 年 1 月间收治的 56 例 AITP 患儿作为研究对象(AITP 组),给予甲泼尼龙琥珀酸钠治疗,并选择同期 56 例健康体检儿童作为健康组。比较 AITP 患儿治疗效果,以及治疗前、后外周血 T 细胞亚群、细胞因子(IL-10、TGF-β1)、FoxP3 mRNA 表达情况。**结果** AITP 组患儿治疗后血小板计数较治疗前升高 $(134.18 \pm 0.12) \times 10^9/L$,平均水平为 $(95.11 \pm 29.62) \times 10^9/L$;皮肤黏膜紫癜平均消退时间为 $(44.01 \pm 7.48)h$ 。AITP 组患儿治疗前外周血 CD4⁺CD25⁺ Tr 细胞、CD4⁺ Tr 细胞、CD25⁺ Tr 细胞、CD4⁺CD25⁺ Tr 细胞/CD4⁺ Tr 细胞水平低于健康儿童($P < 0.05$);AITP 组患儿治疗后外周血 CD4⁺CD25⁺ Tr 细胞、CD4⁺ Tr 细胞、CD25⁺ Tr 细胞、CD4⁺CD25⁺ Tr 细胞/CD4⁺ Tr 细胞水平高于治疗前($P < 0.05$)。AITP 患儿治疗前外周血 FoxP3 mRNA 表达水平低于健康组($P < 0.05$);AITP 组患儿治疗后 FoxP3 mRNA 表达水平高于治疗前($P < 0.05$)。**结论** AITP 患儿外周血 CD4⁺CD25⁺ Tr 细胞数量、FoxP3 表达水平明显降低,甲泼尼龙琥珀酸钠治疗 AITP 效果显著,可提高外周血 CD4⁺CD25⁺ Tr 细胞数量及 FoxP3 表达水平。

[关键词] 甲泼尼龙琥珀酸钠;紫癜,血小板减少性,特发性;T 淋巴细胞,调节性;FoxP3 基因

[中图法分类号] R725.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)08-1363-04

Effect of methylprednisolone sodium succinate on Tr cell differentiation and FoxP3 gene expression in patients with acute idiopathic thrombocytopenic purpura*

ZHANG Lin, XU Daming[△], LI Tianyu, ZHANG Qian, WEN Dake, LI Fangfang, GUO Doudou, YANG Yan, BAO Hong

(Department of Pediatric Hematology, Children's Hospital of Wuxi city, Wuxi, Jiangsu 214023, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of methylprednisolone sodium succinate on the differentiation of Tr cells and FoxP3 gene expression in patients with acute idiopathic thrombocytopenic purpura (AITP). **Methods** Fifty-six children with AITP admitted to this hospital from January 2017 to January 2018 were selected as the study subjects (AITP group). Methylprednisolone sodium succinate was given to them. Fifty-six healthy children were selected as the health group at the same time. To compare the therapeutic effect of AITP and the expression of T cell subsets, cytokines (IL-10, TGF-beta 1) and FoxP3 mRNA in peripheral blood before and after treatment. **Results** After treatment, the platelet count increased $(134.18 \pm 50.12) \times 10^9/L$, and the average regression time of the skin mucous purpura was $(44.01 \pm 7.48)h$. The levels of CD4⁺CD25⁺, CD4⁺, CD25⁺ and CD4⁺CD25⁺/CD4⁺ Tr cells in peripheral blood of the AITP group were lower than those of the health group ($P < 0.05$). The levels of CD4⁺CD25⁺, CD4⁺, CD25⁺ and CD4⁺CD25⁺/CD4⁺ Tr cells in peripheral blood of children with AITP were higher than those before treatment ($P < 0.05$). The expression level of FoxP3 mRNA in peripheral blood of AITP group was lower than that of the health group ($P < 0.05$). The expression level of FoxP3 mRNA in children with ITP was higher than that before treatment ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression level of CD4⁺CD25⁺ Tr cells, FoxP3 in peripheral blood of children with AITP were significantly reduced. Methylprednisolone sodium succinate is effective in the treatment of AITP, through improving the number of CD4⁺CD25⁺ Tr cells in peripheral blood and FoxP3 expression.

[Key words] methylprednisolone sodium succinate; purpura, thrombocytopenic, idiopathic; T-lymphocytes, regulatory; FoxP3 gene

急性原发性免疫性血小板减少症(acute idiopathic thrombocytopenic purpura, AITP)为儿童常见的出血性自身免疫性疾病之一,其发病机制尚不明确,多数学者认为该疾病的发生与自身存在识别自身血小板抗原的自身抗体有关,致自身抗体与抗原结合,使血小板寿命缩短、破坏增加,导致血小板数量急剧减少^[1]。研究发现^[2-3],AITP 患儿体内多伴有多种 T 淋巴细胞异常,尤其是 T 细胞亚群功能及比例失调,在 AITP 发生发展过程中起着重要作用,当体内激活的淋巴细胞未及时凋亡,可引起机体自身免疫反应,进而引起 T 细胞清除缺失,导致血小板被持续性破坏。糖皮质激素应用于治疗 AITP,疗效显著,安全性高,成为临床中治疗 AITP 的主要策略,其具体机制尚不明确^[4]。既往研究认为^[5],糖皮质激素通过抑制自身免疫细胞过度活化和中和抗血小板抗体而发挥免疫调节作用,但是关于糖皮质激素的作用机制是否与调节性 T(regulatory T, Tr)细胞有关尚不明确。因此,本文将通过检测 AITP 患儿甲泼尼龙琥珀酸钠治疗前、后 Tr 细胞比例、相关细胞因子、FoxP3 基因表达水平的变化,探讨 Tr 细胞在 AITP 发病中的意义及甲泼尼龙琥珀酸钠对其的影响。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本研究通过江苏省无锡市儿童医院伦理委员会审核批准。纳入标准:(1)符合 AITP 诊断标准^[6][即起病急,伴有发热;以自发性皮肤、黏膜出血为主,多为针尖大小的皮内及皮下出血点,鼻、牙龈、胃肠道出血少见,可伴有肉眼血尿;淋巴结不大;该病呈自限性经过,约 1~6 个月可自愈;血小板计数小于 $40 \times 10^9/L$,可见大、变形血小板,寿命缩短;血小板相关免疫球蛋白(PAIg)阳性率约 80%以上;骨髓巨核细胞数正常或增加];(2)年龄 3~7 岁;(3)同意入组研究。排除标准:(1)伴有严重基础性疾病;(2)伴有其他血液病者;(3)对甲泼尼龙琥珀酸钠过敏者。根据以上纳入排除标准,选取本院在 2017 年 1 月至 2018 年 1 月期间收治的 56 例 AITP 患儿作为研究对象(AITP 组),给予甲泼尼龙琥珀酸钠治疗,并同期选择 56 例健康体检儿童作为健康组。两组儿童性别、年龄比较差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性,见表 1。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法

入院完善检查后,均予以抗感染、钙剂、防出血等综合治疗;AITP 组患儿在常规治疗基础上予以甲泼尼龙琥珀酸钠(国药集团容生制药有限公司 40 mg 注射剂,国药准字 H20030727) $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 静脉滴注,病情控制后(本次研究所用时间为 3~5 d),予以泼尼松片(浙江仙琚制药股份有限公司 5 mg,国药准字 H33021207) $1.5 \sim 2.0 \text{ mg} \cdot$

$\text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 清晨口服,3~5 d 后逐渐减量,直至停药,整个疗程约 3~4 周。

表 1 患儿一般情况

组别	健康组(n=56)	AITP 组(n=56)	χ^2/F	P
男/女(n)	28/28	31/25	1.124 1	0.320 9
平均年龄($\bar{x} \pm s$,岁)	5.23 \pm 1.08	5.43 \pm 1.05	1.470 6	0.248 1

1.2.2 外周血 Tr 细胞检测

收集健康儿童外周血 5 mL,以及 AITP 患儿治疗前、后外周血各 5 mL,经肝素抗凝,用淋巴细胞分离液(由挪威 Axis-shield 公司提供)分离外周血单个核细胞,用含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基稀释细胞,细胞悬液浓度为 $1 \times 10^6/mL$,吸取 200 μL 细胞悬液加入 EP 管中,分别加入 20 μL 抗 CD4-FITC、抗 CD25-PE 单克隆抗体,同型对照为 IgG1-FITC, IgG1-PE,混匀后避光孵育约 25~30 min,经 PBS 洗涤 2 次,用 0.5 mL PBS 重悬细胞,混匀后经流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司 CytoFLEX LX 型)检测。

1.2.3 FoxP3 基因表达水平检测

采用 RT-PCR 检测外周血单个核细胞 FoxP3 mRNA 表达水平;TR-Izol 法常规提取外周血单个核细胞总 RNA,采用电泳检测 RNA 质量,定量后吸 2 μg 总 RNA 进行反转录合成 cDNA,以 β -actin(正向引物 5'-CTC CAT CCT GGC CTC GCT GT-3',反向引物 5'-GCT GCT ACC TTC ACC GTT CC-3')作为内参行 PCR 反应扩增 FoxP3 mRNA(正向引物 5'-CAG CAC ATT CCC AGA GTT CCT C-3',反向引物 5'-GCG TGT GAA CCA GTG GTA GAT C-3'),扩增目的基因后进行琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统扫描;PCR 反应条件为 94 $^\circ\text{C}$ 3 min;94 $^\circ\text{C}$ 30 s,56 $^\circ\text{C}$ 30 s,72 $^\circ\text{C}$ 1 min,30 个循环;72 $^\circ\text{C}$ 5 min。

1.3 观察指标

(1)治疗效果评价:记录 AITP 患儿治疗后(即停药时)外周血常规血小板计数,出血点、瘀点、瘀斑等皮下出血情况;(2)记录入组儿童流式细胞仪检查的外周血 T 细胞亚群结果;(3)细胞因子检测:记录健康儿童外周血 FoxP3 基因表达水平,以及 AITP 患儿治疗前、后 FoxP3 基因表达水平。

1.4 统计学处理

采用 SPSS20.0 软件分析数据,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 t 检验;计数资料采用百分率表示,比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患儿治疗效果比较

AITP 组患儿治疗后血小板计数较治疗前升高(134.18 ± 50.12) $\times 10^9/L$,皮肤黏膜紫癜平均消退时间为(44.01 ± 7.48)h;AITP 组患儿治疗过程中血压、血糖、电解质监测均值波动在正常值范围内。

表 2 健康组与 AITP 组治疗前、后外周血 Tr 细胞亚群检测结果 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	CD4 ⁺ CD25 ⁺	CD4 ⁺	CD25 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺ /CD4 ⁺
健康组	56	5.06±0.58	35.31±2.71	4.70±0.92	0.15±0.04
AITP 组	56	2.83±0.26	27.36±3.44	3.51±0.84	0.11±0.03
治疗前		2.83±0.26	27.36±3.44	3.51±0.84	0.11±0.03
治疗后		4.83±0.45	33.28±3.22	4.38±0.79	0.15±0.02
t ₁		10.284 4	7.465 3	4.028 6	4.986 3
P ₁		<0.01	<0.01	0.030 6	0.026 5
t ₂		6.195 2	8.061 7	4.025 7	3.941 8
P ₂		<0.01	<0.01	0.031 1	0.038 2

t₁、P₁:健康对照组与 AITP 组治疗前比较;t₂、P₂:AITP 组治疗前、后比较

2.2 入组儿童外周血 T 细胞亚群检测结果 治疗前 AITP 组患儿外周血 CD4⁺CD25⁺ Tr 细胞、CD4⁺ Tr 细胞、CD25⁺ Tr 细胞、CD4⁺CD25⁺ Tr 细胞/CD4⁺ Tr 细胞水平低于健康组 (P<0.05), 治疗后 AITP 组患儿外周血 CD4⁺CD25⁺ Tr 细胞、CD4⁺ Tr 细胞、CD25⁺ Tr 细胞、CD4⁺CD25⁺ Tr 细胞/CD4⁺ Tr 细胞水平高于治疗前 (P<0.05)。见表 2。

2.3 入组儿童 FoxP3 mRNA 表达情况 AITP 组患儿 FoxP3 mRNA 表达水平低于健康组儿童 (P<0.05); AITP 组患儿治疗后 FoxP3 mRNA 表达水平高于治疗前 (P<0.05)。见表 3。

表 3 入组儿童 FoxP3 mRNA 表达情况检测 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	治疗前	治疗后
健康组	56	0.74±0.13	—
AITP 组	56	0.34±0.11 ^a	0.63±0.14 ^b

^a:P<0.05, 与健康组比较; ^b:P<0.05, 与 AITP 组治疗前比较; —: 此项无数据

3 讨 论

AITP 发病机制尚不明显, 临床中主要表现为血小板减少, 伴有不同程度骨髓巨核细胞增加。AITP 为儿童人群中常见的一种自身免疫性疾病, 既往研究认为是因自身抗体作用, 破坏血小板, 近年研究发现, AITP 的发生, 不仅与体液免疫机制有关, 还与细胞免疫有关^[7]。目前临床中治疗 AITP 首选糖皮质激素, 其可通过抑制巨噬细胞系统, 降低毛细血管的脆性, 并抑制血小板抗体形成, 从而起到治疗效果^[8]。临床中使用的糖皮质激素主要包括泼尼松、地塞米松及甲泼尼龙琥珀酸钠等, 但临床应用研究发现, 泼尼松短期疗效尚可, 远期疗效欠佳, 并且长期服用, 不良反应发生风险较高; 地塞米松相比于泼尼松, 其抗炎、抗过敏、抗毒作用更好, 可降低钠潴留发生风险; 甲泼尼龙琥珀酸钠抗炎作用较强, 钠潴留作用较小, 其在血液中的半衰期短, 并且对于垂体肾上腺周的抑制作用较小, 短期内可大剂量使用^[9-11]。

本次研究使用大剂量静脉注射甲泼尼龙琥珀酸钠 (5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) 治疗 AITP, 该剂量比高于常规用药剂量, 但低于冲击治疗剂量, 基本与 1 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 地塞米松具有等效抗炎作用。结果发现, AITP 组患儿治疗效果显著, 说明静脉给予大剂量甲泼尼龙琥珀酸钠治疗 AITP, 疗效显著。本次研究结果发现 AITP 患儿治疗过程中未见不良反应发生, 说明甲泼尼龙琥珀酸钠治疗 AITP 具有较高安全性, 但有研究报道, 当静脉注射 15~30 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 甲泼尼龙琥珀酸钠冲击治疗 AITP, 伴有心律失常、心脏停搏甚至虚脱等严重不良反应^[12], 与本次研究结果不一致, 可能因本次用药剂量较低, 或与本次研究纳入样本数量较小有关, 因此临床中治疗 AITP 避免采用高剂量甲泼尼龙琥珀酸钠, 高剂量甲泼尼龙琥珀酸钠一般仅用于威胁患者生命的情况。

糖皮质激素治疗 AITP 的疗效显著, 不良反应发生率低, 已成为临床中治疗 AITP 首选药物。关于糖皮质激素治疗 AITP 的机制研究较多, 多数学者认为糖皮质激素治疗效果显著, 与其能够减少血小板自身抗体生成有关, 减少单核-巨噬细胞系统对血小板的破坏, 改善毛细血管通透性有关^[13]。研究发现^[14-15], 健康人群外周血中有 5%~15% 的 CD4⁺ Tr 细胞持续高表达 CD25 而被称作 CD4⁺CD25⁺ Tr 细胞, 该细胞为近年发现的一种专职抑制细胞, 为 T 细胞亚群的一种, 其通过 T 细胞抗原受体 (TCR) 介导信号刺激活化后, 不仅可抑制 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞的活化与增殖, 同时能够抑制机体免疫功能, 如抑制干扰素-γ (IFN-γ) 的产生, 且这种抑制性不具组织相容性复合体 (MHC) 限制性, 能够抑制同种同型或同种异型 T 细胞增殖, 在移植耐受、肿瘤免疫逃逸等过程中起着重要作用, 在自身免疫疾病进展中也发挥重要作用。研究发现^[16-17], 在多种自身免疫性疾病中, Tr 细胞的数量及功能存在不同程度异常, 进一步研究证明 Tr 细胞参与自身免疫性疾病的发生发展。目前研究普遍认为, FoxP3 基因特异且稳定地表达于胸腺及外周淋

巴组织中的 CD4⁺ CD25⁺ Tr 细胞亚群中,可以作为 Tr 细胞的特异性标志,也是维持 Tr 细胞具有免疫抑制功能的必备条件,FoxP3 可能是 CD4⁺ CD25⁺ Tr 细胞中主要的调节基因^[18-20]。临床中根据 ITP 病程是否超过 1 个月,将其分为 AITP、CITP。本次研究采用流式细胞术检测 AITP 患儿外周血中 Tr 细胞的数量,采用 RT-PCR 检查 FoxP3 基因表达情况,来分析 Tr 细胞及 FoxP3 基因在 AITP 发生发展中的作用,以及糖皮质激素的作用机制。

本次研究结果发现,AITP 患儿外周血 Tr 细胞数量、FoxP3 基因表达水平低于健康儿童,说明 AITP 患儿免疫抑制功能低,而自身体液免疫可进一步破坏血小板,进而加重 AITP 患儿病情,增大出血风险。研究结果发现,采用甲泼尼龙琥珀酸钠治疗 AITP 患儿后,患儿外周血 Tr 细胞数量、FoxP3 基因表达水平明显升高,但仍低于健康儿童;结果说明 Tr 细胞与 FoxP3 基因在 AITP 的发生发展过程中起着一定作用,该研究的发现为研制 AITP 治疗方法提供思路,同时为 AITP 的免疫治疗提供临床数据。

综上所述,AITP 患儿外周血 CD4⁺ CD25⁺ Tr 细胞数量、FoxP3 表达水平明显降低,甲泼尼龙琥珀酸钠治疗 AITP 效果显著,可提高外周血 CD4⁺ CD25⁺ Tr 细胞数量及 FoxP3 表达水平。

参考文献

- [1] 叶益锋. 特发性血小板减少性紫癜患者临床特点及血液检验结果分析[J]. 医药前沿, 2016, 6(22): 125-125.
- [2] 高长俊, 张晴, 韩静, 等. 特发性血小板减少性紫癜发病机制研究进展[J]. 中国保健营养, 2016, 26(27): 412-413.
- [3] 石立鹏, 刘明怀, 彭方毅, 等. 特发性血小板减少性紫癜临床研究进展[J]. 实用中医药杂志, 2016, 32(3): 294-295.
- [4] NAKAO H, ISHIGURO A, IKOMA N, et al. Acquired idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura successfully treated with intravenous immunoglobulin and glucocorticoid A case report[J]. *Medicine*, 2017, 96(14): e6547.
- [5] CHHABRA S, GUPTA A. Chronic subdural hematoma associated with idiopathic thrombocytopenic purpura in an elderly female: A rare case report[J]. *Rom Neurosurg*, 2016, 30(3): 419-424.
- [6] 张之南. 血液病诊断及疗效标准[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1991.
- [7] ERIKCI A A, KARAGOZ B, BILGI O. Regulatory T cells in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura[J]. *Turk J Hematol*, 2016, 33(2): 153-155.
- [8] 苏美云, 侯正军, 叶舒婷. 不同剂量丙种球蛋白联合糖皮质激素治疗特发性血小板减少性紫癜的研究[J]. 现代实用医学, 2017, 29(2): 222-224.
- [9] 徐长荣. 急性特发性血小板减少性紫癜的临床治疗研究[J]. 中国保健营养, 2016, 26(33): 95-96.
- [10] 陈天生. 中等剂量甲基泼尼松龙冲击治疗小儿原发性免疫性血小板减少性紫癜[J]. 包头医学院学报, 2016, 32(10): 68-69.
- [11] 宝国秀, 杨晓燕, 黄丽萍. 大剂量地塞米松治疗特发性血小板减少性紫癜 36 例疗效观察[J]. 中国医药指南, 2016, 14(13): 129-129.
- [12] 贾金芳, 王国平. 氨茶碱和甲泼尼龙琥珀酸钠注射液配伍在临床治疗中的应用分析[J]. 海峡药学, 2013, 25(1): 176-177.
- [13] ZHAI J P, DING M Y, YANG T J, et al. Flow cytometric immunobead assay for quantitative detection of platelet autoantibodies in immune thrombocytopenia patients[J]. *J Transl Med*, 2017, 15(1): 214.
- [14] XU F F, YU S Q, QIN M L, et al. Hydrogen-Rich saline ameliorates allergic rhinitis by reversing the imbalance of Th1/Th2 and Up-Regulation of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells, interleukin-10, and Membrane-Bound transforming growth factor-beta in Guinea Pigs[J]. *Inflammation*, 2018, 41(1): 81-92.
- [15] HAMARI S, KIRVESKOSKI T, GLUMOFF V, et al. Analyses of regulatory CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ T cells and observations from peripheral T cell subpopulation markers during the development of type 1 diabetes in children[J]. *Scand J Immunol*, 2016, 83(4): 279-287.
- [16] TAO J H, CHENG M, TANG J P, et al. Foxp3, regulatory T cell, and autoimmune diseases[J]. *Inflammation*, 2017, 40(1): 328-339.
- [17] ELLIS J S, BRALEY-MULLEN H. Mechanisms by which B cells and regulatory T cells influence development of murine Organ-Specific autoimmune diseases[J]. *J Clin Med*, 2017, 6(2): 13.
- [18] LIFSHITZ G V, ZHDANOV D D, LOKHONINA A V, et al. Ex vivo expanded regulatory T cells CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ CD127(Low) develop strong immunosuppressive activity in patients with remitting-relapsing multiple sclerosis[J]. *Autoimmunity*, 2016, 49(6): 388-396.
- [19] WANG D C, GHOSH D, ISLAM S, et al. IFN-beta Facilitates Neuroantigen-Dependent Induction of CD25⁺ FOXP3⁺ Regulatory T Cells That Suppress Experimental Autoimmune Encephalomyelitis[J]. *J Immunol*, 2016, 197(8): 2992-3007.
- [20] KAUR N, MINZ R W, BHADADA S K, et al. Deranged regulatory T-cells and transforming growth factor-1 levels in type 1 diabetes patients with associated autoimmune diseases[J]. *J Postgrad Med*, 2017, 63(3): 176-181.

(收稿日期: 2018-12-26 修回日期: 2019-01-12)