

免疫性血小板减少性紫癜的免疫学发病机制研究

褚雨霆, 张雅月, 马薇, 侯丽, 陈信义

(北京中医药大学东直门医院血液肿瘤科, 北京, 100700)

摘要: 免疫性血小板减少性紫癜 (immune thrombocytopenic purpura, ITP) 是以外周血血小板减少, 血小板寿命缩短, 骨髓巨核细胞代偿性增多而血小板生成障碍的自身免疫性疾病。现大量研究表明 ITP 的发生与自身免疫机制紊乱有关。本文将从 Treg 细胞、Fas/FasL、T 细胞功能、血小板表面抗体所介导的免疫机制紊乱阐释 ITP 发生机制。

关键词: 中西医结合临床; ITP; 免疫机制

中图分类号: R55

The immunological pathogenesis studies of immune thrombocytopenic purpura

CHU Yuting, ZHANG Yayue, MA Wei, HOU Li, CHEN Xinyi

(Department of Hematology and Oncology of Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100700)

Abstract: Immune thrombocytopenic purpura is an autoimmune disease, with the feature of peripheral thrombocytopenia, shortened the life of platelets, bone marrow megakaryocytes compensated increase and platelets grow barrier. Now lots of studies have proved that the incidence of ITP concerned with the disorders of autoimmune mechanism. This article will explain the mechanism of the incidence of ITP, aspects from Treg cells, Fas/FasL level, mechanism of T cells and platelets surface antibody.

Key words: integrated Chinese and Western Medicine clinical; Immune thrombocytopenic purpura; immune mechanism

免疫性血小板减少性紫癜 (immune thrombocytopenic purpura, ITP) 是以外周血血小板减少, 血小板表面结合有抗血小板抗体, 血小板寿命缩短, 骨髓巨核细胞代偿性增多而血小板生成障碍的获得性自身免疫性疾病。2007 年国际专家组将 ITP 统一命名为免疫性血小板减少症 (immune thrombocytopenia), 并在第 49 届美国血液学年会上将血小板减少的阈值标准定为血小板计数小于 $100 \times 10^9 / L$ 。同时, 也将 ITP 分为原发性和继发性两类^[1]。原发性 ITP 是指没有明确原因的单纯血小板减少 (血小板计数小于 $100 \times 10^9 / L$) ; 继发性 ITP 是指除了原发性 ITP 以外所有形式的免疫介导性血小板减少症。如由系统性红斑狼疮、艾滋病、幽门螺杆菌感染等疾病引起, 或因奎宁、肝素等药物引发。该专家组还修改了既往将病程 6 个月做为区别急性与慢性 ITP 标准, 定为 3 月内为急性, 3-12 月为持续性, 超过 1 年为慢性的病程界点^[2]。虽然 ITP 发病机制迄今尚未完全阐明, 但目前多认为其发病机制既包括体液免疫的紊乱, 也包括细胞免疫的失调。

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目“脾不统血所致血小板减少性紫癜从脾论治的疗效机制及规律研究” (2013CB531705)

作者简介: 褚雨霆 (1986-), 男, 博士研究生, 中西医结合防治血液病

通信联系人: 陈信义 (1954-), 男, 主任医师, 中西医结合防治血液病及恶性肿瘤. E-mail: chenxinyi0729@126.com

1 Treg 细胞异常与 ITP

40 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Treg) 是一群表型和功能特异的 T 细胞亚群, 在维持机体自身免疫耐受中起重要作用^[3-5]。近年来研究发现, Treg 细胞数量减少或功能缺失可导致许多自身免疫性疾病, 如 ITP 等^[6-8]。吴晓勇等通过豚鼠抗小鼠血小板血清 (GP-APS) 建立 ITP 小鼠模型, 于造模 16 天后取脾制备脾单细胞悬液, 用流式细胞仪检测脾 Treg。结果显示, 模型组小鼠 Treg 细胞比例明显低于正常组^[9]。分析认为,

45 ITP 小鼠 Treg 细胞比例减少可能与 ITP 的细胞免疫失调密切相关。贾瑞萍等通过检测成人 ITP 患者外周血中 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞发现, ITP 组外周血中 CD4⁺T 细胞表达率低于对照组 ($p<0.05$), Treg 细胞表达率及 Treg / CD4⁺T 比值也低于正常对照组 ($P<0.01$), 且 Treg 细胞水平与 ITP 病情的严重程度有关。

50 表明 Treg 细胞参与了 ITP 的发病^[10]。Connor 等在对人外周血、脾脏及淋巴结中的 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞研究中发现, 在 CD4⁺CD25⁺纯化的细胞中 Foxp3 的表达与 CD127 低表达相关, 通过 CD4⁺CD127^{dim}纯化出的细胞与 Foxp3 纯化的 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞数量相似, 表现有 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞典型特征^[11]。这一研究结果与其它文献报道具有一致性^[12]。说明 ITP 发病是由 Treg 细胞数目

55 减少导致其功能失调, 进而产生自身免疫性血小板减少。

2 Fas/FasL 水平变化与 ITP

Fas 又称 Apo-1 或 CD95, 是 I 型膜蛋白, 主要表达于激活的 T 淋巴细胞、NK 细胞、眼基质细胞等。属于肿瘤坏死因子受体家族, FasL 是 II 型膜蛋白, 属于肿瘤坏死因子家族。Fas 和 FasL 参与免疫应答过程中淋巴细胞数量的调控,

60 在激活的淋巴细胞开始表达 FasL 的同时, 也有 Fas 表达增加, 当 FasL 与淋巴细胞表面的 Fas 结合后可使激活的淋巴细胞在发挥免疫效应后立即通过激活诱导的细胞凋亡 (activation induced apoptosis, AICD) 途径而被清除, 从而避免对机体的损伤。研究发现, 自身免疫性疾病患者存在外周血淋巴细胞 Fas 系统表达和凋亡异常。如活动期的 ITP 患者, 活化的 T 淋巴细胞不能通过 AICD 途径被清除,

65 从而引起血小板受到免疫损害^[13]。Yoshimura 等首先发现, ITP 患者外周血有较高水平可溶的 Fas 和 FasL, 且活化的 CD8⁺T 淋巴细胞比例升高, 认为高浓度可溶的 Fas 抑制 Fas-FasL 途径介导的细胞凋亡, 使活化的 T 淋巴细胞大量积累, 导致细胞免疫功能紊乱, 血小板被持续破坏^[14]。Shenoy 等证实, 慢性 ITP 异常的 Fas 和 FasL 表达, 伴或不伴 IL-2 缺陷的 Fas 通路改变都可能与 ITP 发病有关

70 ^[15]。钟永根等应用流式细胞仪检测了 ITP 患者 T 淋巴细胞亚型表面 Fas 和 FasL 表达率发现, 患者组 T 淋巴细胞亚群表面的 FasL 表达率较健康对照组增加, 激素治疗可干预 Fas 和 FasL 表达水平^[16]。Fas 的可溶性形式 sFas 是由蛋白水解酶水解膜结合 Fas 或由 Fas 变异体 mRNA 翻译而形成; FasL 的可溶性形式 sFasL

由金属蛋白酶裂解膜结合 FasL 形成。sFas 可与膜型 Fas 竞争与 FasL 结合，从而调节细胞凋亡。贾瑞萍等对成人 ITP 外周血中 sFas 和 sFasL 检测发现，ITP 组患者治疗前外周血中 sFas 和 sFasL 水平高于治疗后和正常对照组($p<0.01$)。说明 sFas 和 sFasL 水平异常参与了 ITP 的免疫学病理过程^[10]。

3 T 细胞功能失调与 ITP

瞿文等用流式细胞术检测 25 例 ITP 患者和 16 例健康体检者外周血 T 细胞亚群、辅助性 T 细胞 (T_h) 亚群、活化状态的 T 细胞及调节性 T 细胞 (Treg) 比例。检测结果发现,ITP 组较健康体检者的 $CD3^+CD4^+/CD3^+$ 和 $CD4^+/CD8^+$ (Th/Tc) 比值下降, $CD3^+CD8^+/CD3^+$ 比值升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)^[17]。辅助性 T 淋巴细胞具有 2 种功能不同的亚群, 即 Th_1 和 Th_2 , 两种细胞之间存在着互为抑制关系。 Th_1 细胞主要分泌 IFN- γ 和 IL-2, 可以增强杀伤细胞的细胞毒作用, 激发迟发性超敏反应, 介导细胞免疫应答; Th_2 细胞主要分泌 IL-4、IL-6、IL-10 和 IL-13, 可促进抗体产生, 介导体液免疫反应^[18-19]。王金慎等通过 RT-PCR 技术研究显示, ITP 患儿治疗前 Th_1 细胞因子表达水平低于健康对照组, Th_2 细胞因子表达水平高于健康对照组^[20]。经激素治疗后 ITP 患者 Th_1 、 Th_2 细胞因子表达与健康对照组比较无统计学意义, 提示 Th_1 、 Th_2 的表达可通过激素治疗后得到纠正。同时, Ogawara 等研究还发现, Th_1/Th_2 比值在一定程度上可反映机体的免疫平衡状态, 说明 ITP 患者的淋巴细胞极化状态存在异常, 是 Th_1 细胞占优势的疾病^[21]。 $CD4^+$ T 细胞可辅助 B 细胞产生抗体及分泌一些细胞因子, 起辅助、诱导细胞免疫和体液免疫的作用。 $CD8^+$ T 细胞具有细胞毒效应。 Th/Tc 细胞的平衡在自身免疫性疾病的发生、进展与康复过程中发挥着重要作用^[22]。瞿文等研究结果显示, 患者组 $CD3^+CD4^+/CD3^+$ 和 Th/Tc 比例低于对照组, $CD3^+CD8^+/CD3^+$ 比例高于对照组, 表明 ITP 患者不仅存在体液免疫紊乱, 同时也存在细胞免疫异常^[17]。患者体内的 T 细胞亚群数量异常及比例失衡使 T 细胞介导的免疫调节机制紊乱, 在 ITP 发病过程中担当的重要角色, 也被 Stockelberg 等研究所证实^[23]。

4 血小板抗体产生与 ITP

血小板抗体分为血小板相关抗体和血小板特异性抗体两大类。血小板相关抗体 (platelet associated immunoglobulins, PAIg) 包括 PAIgG、PAIgM、PAIgA 和 PAC3。杨斌等对 48 例 ITP 患者 (有效组 40 例, 无效组 8 例) 与 50 例健康人为研究对象, 应用流式细胞仪 (FCM) 测定患者治疗前后血浆和血清 PAIgG 及 RP%, 并常规检查血小板计数。研究结果发现, 有效组治疗后较治疗前血小板计数明显升高、PAIgG 和 RP% 显著降低 ($P<0.01$); 无效组治疗前后血小板计数、PAIgG 和 RP 均无明显变化 ($P>0.05$)。治疗前 3 项指标与健康对照组比较, 具有统计学意义 ($P<0.01$), 显示 PAIgG 水平与血小板计数呈明显负相关, 治疗有效者随血小板数上升, PAIgG 值下降或降至正常^[17]。PAIg 是针对血小板膜

GP II b/IIIa、GP I b/IX、GP I a/II a 等抗原的自身抗体, 其与血小板膜上相应抗原结合后, 被单核-吞噬细胞系统吞噬破坏, 从而导致血小板寿命缩短, 数量减少。

ITP 患者外周血血小板特异性抗体 GP II b/IIIa 于 1982 年首次发现。此后, GP I b/IX、GP I a/II a、GPIV、GPV 及 GPVS, GMP-140、PECAM-1 等相继被发现。这些糖蛋白分子是血小板发挥功能所必需成分, 但同时也是血小板自身抗体的靶抗原。抗 GP II b/IIIa 和抗 GP I b/IX 抗体是最常见的血小板抗体。Roark 等对这些抗体的抗原结合区进行序列发现, ITP 自身抗原通过诱导亲和力选择和体细胞突变, 激活有限数目的 B 细胞克隆增殖^[25]。这些抗体也可与血小板相关抗原特异性结合形成抗原抗体复合物, 被巨噬细胞吞噬, 导致血小板破坏增多。也可与巨核细胞上相应的抗原 GP II b/IIIa 和 GP I b 结合, 干扰巨核细胞成熟和血小板产生。

综上所述, 免疫性血小板减少性紫癜的发病机制是多因素综合的结局, 其中, 机体内免疫功能紊乱及相关血小板抗体产生为 ITP 明确的免疫学发病机制。至于其它免疫学发病机制尚需通过相关研究予以证明。

[参考文献] (References)

- [1] 杨仁池, 免疫性血小板减少症的命名、定义与疗效评价的标准化-关于 ITP 国际工作组报告的解读[J], 中华血液学杂志, 2009, 30 (3) :215-216
- [2] Francesco Rodeghiero¹, Roberto Stasi², Terry Gernsheimer³, 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] Ethan M. Shevach, Certified Professionals Cd4+ Cd25+ Suppressor T Cells[J], J Exp Med, 2001, 193(11): F41-45.
- [4] Thompson C, Powrie F. Regulatory T cells[J]. Curr Opin Pharmacol, 2004, 4(4): 408-414.
- [5] Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, et al. Regulatory T Cell and Immune Tolerance[J]. Cell, 2008, 133(5): 775-787
- [6] Douglas B. Cines, M.D., et al. Immune Thrombocytopenic Purpura[J], N Engl J Med 2002; 346(13): 995-1008
- [7] Bin Zhou, Hui Zhao, Ren Chi Yang, Zhong Chao Han. Multi-dysfunctional pathophysiology in ITP[J]. Critical Reviews in Oncology Hematology, 2005, 54(2): 107-116
- [8] Chanock, Stephen. The Etiology of Childhood Immune Thrombocytopenic Purpura: How Complex Is It[J]. Journal of Pediatric Hematology Oncology, 2003, 25(1): 7-10
- [9] 吴晓勇, 李冬云, 陈信义等. 骨髓颗粒对 ITP 小鼠脾脏 CD4+CD25+Foxp3+Treg 细胞及其相关因子影响的研究[J], 当代医学, 2010, 16 (14) : 1-3
- [10] 贾瑞萍, 赵雪芸. 自身免疫性血小板减少性紫癜患者外周血中 CD4+CD25+调节性 T 细胞、sFas 和 sFasL 的表达及临床意义[J], 中国实验血液学杂志, 2011, 19 (5) : 1264-1267
- [11] Hartigan-O'Connor DJ, Poon C, Sinclair E, McCune JM. Human CD4+ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells[J]. J Immunol Methods. 2007, 319(1-2): 41-52
- [12] Chong BH. ITP: Tregs come to the rescue. Blood 2010, 116(22): 4388-4390
- [13] Olsson B; Andersson PO; Jacobsson S. Disturbed apoptosis of T-cells in patients with active idiopathic thrombocytopenic purpura. Thromb Haemost. 2005, 93(1): 139-144.
- [14] Chie Yoshimura, Shosaku Nomura, Minori Nagahama, Yoshio Ozaki, Hideo Kagawa, Shirou Fukuhara. Plasma-soluble Fas (APO-1, CD95) and soluble Fas ligand in immune thrombocytopenic purpura[J]. European Journal of Haematology, 2000, 64(4): 219-224
- [15] Shenoy S, Mohanakumar T, Chatila T, Tersak J, Duffy B, Wang R, Thilenius AR, Russell JH. Defective apoptosis in lymphocytes and the role of IL-2 in autoimmune hematologic cytopenias[J]. Clin Immunol. 2001, 99(2): 266-275.
- [16] 钟永根, 封蔚莹, 罗洪强等. 特发性血小板减少性紫癜患者外周血 T 细胞 Fas-FasL 和 caspase-3 凋亡相关蛋白的表达及其意义[J]. 中华血液学杂志, 2008, 29(5): 329-332.

- [17] 瞿文,伍星,王珺等.免疫性血小板减少性紫癜患者的 T 细胞免疫状态[J].天津医药, 2012, 40(4): 389-391
- 160 [18] Fujio K, Okamura T, Yamamoto K. The Family of IL-10-secreting CD4+ T cells[J].Adv Immunol.2010;105:99-130.
- [19] Glimcher LH, Murphy KM. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. Genes Dev[J].2000 Jul 15;14(14):1693-711.
- [20] 王金慎,韩月芹,魏丽夏等.急性特发性血小板减少性紫癜患儿 Th1/Th2 类细胞因子的基因表达水平[J].中华实用儿科临床杂志,2013,28(3):214-216
- 165 [21] Ogawara H, Handa H, Morita K, et al. High Th1/Th2 ratio in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura[J]. Eur J Haematol.2003;71(4):283-288
- [22] B. HÄGGQVIST, P. HULTMAN, Effects of deviating the Th2-response in murine mercury-induced autoimmunity towards a Th1-response[J]. Clinical & Experimental Immunology,2003,134(2):202-209.
- 170 [23] D. Stockelberg, M. Hou, S. Jacobsson, J. Kutti, H. Wadenvik M.D, Detection of platelet antibodies in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). A comparative study using flow cytometry, a whole platelet ELISA, and an antigen capture ELISA[J]. European Journal of Haematology,1996,56(1-2):72-77
- [24] 杨斌,曹祥山,邱国强等.特发性血小板减少性紫癜患者血小板相关抗体及网织血小板检测的临床意义[J].中国实用内科杂志(临床版),2006,26(1):39-40
- 175 [25] Roark JH, Bussell JB, Cines DB, Siegel DL. Genetic analysis of autoantibodies in idiopathic thrombocytopenic purpura reveals evidence of clonal expansion and somatic mutation[J].Blood. 2002;100(4):1388-1398.