

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.23.019

ITP 患儿 APA 与 IVIG 治疗效果、Treg 细胞、Th17 细胞的关系

贾万理¹, 杨 阳^{1△}, 晋 婕², 苏立贞³, 孟 洁¹, 刘美伟⁴, 高 楠⁴

1. 西安高新医院输血科, 陕西西安 710075; 2. 西安金域医学检验所有限公司, 陕西西安 710018;

3. 西安高新医院生殖医学科, 陕西西安 710075; 4. 西安高新医院检验科, 陕西西安 710075

摘 要:目的 探讨免疫性血小板减少症(ITP)患儿抗血小板抗体(APA)与静脉注射用人免疫球蛋白(IVIG)治疗效果及 Treg 细胞、Th17 细胞的关系。方法 选择 2019 年 1 月至 2021 年 12 月西安高新医院收治的 160 例 ITP 患儿, 按照 APA 检测结果分为 APA 阳性组(76 例)与 APA 阴性组(84 例), 均接受 IVIG 治疗。比较两组患儿的治疗效果、血小板计数(PLT)、调节性 T 细胞与辅助性 T 细胞 17 比值(Treg/Th17 细胞比值)。采用 Spearman 相关系数法分析 APA、PLT 与治疗效果、Treg 细胞、Th17 细胞的关系。结果 治疗第 14 天, APA 阳性组的治疗效果明显优于 APA 阴性组($P < 0.05$); APA 阳性组的 PLT 明显高于 APA 阴性组($P < 0.05$), 两组 Treg 细胞、Th17 细胞及 Treg/Th17 细胞比值比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。APA 与治疗效果呈正相关($r = 0.472, P < 0.001$), 与 Treg 细胞、Th17 细胞无明显相关性($P > 0.05$); PLT 与治疗效果、Treg 细胞呈正相关($r = 0.405, 0.405$, 均 $P < 0.001$), 与 Th17 细胞呈负相关($r = -0.412, P < 0.001$)。结论 ITP 患儿 APA 与 IVIG 治疗后 Treg 细胞、Th17 细胞变化无关, 但与治疗效果存在相关性, 可能成为 ITP 患儿 IVIG 治疗效果的预测指标。

关键词:免疫性血小板减少症; 抗血小板抗体; 静脉注射; 免疫球蛋白; Treg 细胞; Th17 细胞; 相关性

中图分类号: R725.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2022)23-3239-04

Relationship between APA and IVIG treatment effect, Treg cells and Th17 cells in children with ITP

JIA Wanli¹, YANG Yang^{1△}, JIN Jie², SU Lizhen³, MENG Jie¹, LIU Xianwei⁴, GAO Nan⁴

1. Department of Blood Transfusion, Xi'an High-Tech Hospital, Xi'an, Shaanxi 710075, China;

2. Xi'an Jinyu Medical Inspection Office Co., Ltd., Xi'an, Shaanxi 710018, China;

3. Department of Reproductive Medicine, Xi'an High-Tech Hospital, Xi'an, Shaanxi 710075, China;

4. Department of Clinical Laboratory, Xi'an High-Tech Hospital, Xi'an, Shaanxi 710075, China

Abstract: **Objective** To discuss the relationship between anti-platelet antibody (APA) and the therapeutic effect of intravenous immunoglobulin (IVIG), Treg cells and Th17 cells in children with immune thrombocytopenia (ITP). **Methods** A total of 160 children with ITP admitted to Xi'an High-Tech Hospital from January 2019 to December 2021 were selected and divided into APA positive group (76 cases) and APA negative group (84 cases) according to APA test results, all of whom received IVIG treatment. The treatment effect, platelet count (PLT), and the ratio of regulatory T cells to T helper cells (Treg/Th17 cells) were compared between the two groups. Spearman correlation coefficient method was used to analyze the relationship between APA, PLT counts and therapeutic effect, Treg/Th17 cells. **Results** On the 14th day of treatment, the therapeutic effect of APA positive group was significantly better than that of APA negative group ($P < 0.05$). The PLT of APA positive group was significantly higher than that of APA negative group ($P < 0.05$), and there was no significant differences in Treg cells, Th17 cells and Treg/Th17 cells between the two groups ($P > 0.05$). APA positively correlated with the therapeutic effect ($r = 0.472, P < 0.001$), but not with Treg cells and Th17 cells ($P > 0.05$). PLT positively correlated with treatment effect and Treg cells ($r = 0.405, 0.405$, both $P < 0.001$), and negatively correlated with Th17 cells ($r = -0.412, P < 0.001$). **Conclusion** APA in children with ITP doesn't correlated with Treg cells and Th17 cell changes after IVIG treatment, but correlated with treatment effect, which might be a predictor of IVIG treatment effect in children with ITP.

Key words: immune thrombocytopenia; anti-platelet antibody; intravenous injection; immunoglobulin; Treg cells; Th17 cells; correlation

免疫性血小板减少症(ITP)是一种获得性自身免疫性疾病,皮肤和黏膜出血是主要临床表现,儿童是急性 ITP 的主要发病人群^[1]。ITP 的发病机制尚不完全清楚,其主要机制是患者对自身抗原的免疫耐受,导致免疫介导的血小板破坏增多及免疫介导的巨核细胞产生血小板不足^[2]。目前,ITP 尚无根治方法,临床上主要以对症治疗为主。静脉注射免疫球蛋白(IVIG)、糖皮质激素等多种方法被用于 ITP 患儿的临床治疗,但部分患儿会产生耐受及治疗效果不佳等,严重影响预后,甚至会危及生命^[3],因此寻找一种能预测 ITP 患儿治疗效果的指标显得至关重要。抗血小板抗体(APA)是一种自身抗体,有研究显示,APA 在 ITP 患儿的阳性表达率较高,抗 GP II b/III a IgM 抗体与出血严重程度之间存在关联^[4],提示 APA 检测可能有助于 ITP 患儿预后和治疗的决策指导。本研究探讨了 ITP 患儿 APA 与 IVIG 治疗效果及调节性 T 细胞与辅助性 T 细胞 17 比值(Treg/Th17 细胞比值)的相关性,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2019 年 1 月至 2021 年 12 月西安高新医院收治的 160 例 ITP 患儿作为研究对象。纳入标准:原发性 ITP,符合《2019 年美国血液学会免疫性血小板减少症指南》^[5]中儿童 ITP 的诊断标准;新诊断为 ITP(病程小于 3 个月);年龄 ≤ 12 岁。排除标准:继发性 ITP;伴有急慢性感染、活动性出血等。按照 APA 检测结果将其分为 APA 阳性组(76 例)与 APA 阴性组(84 例)。APA 阳性组男 40 例,女 36 例;年龄 1~10 岁,平均 (4.12 ± 1.78) 岁;血小板计数(PLT)为 $(4.27 \pm 1.05) \times 10^9/L$ 。APA 阴性组男 45 例,女 39 例;年龄 1~12 岁,平均 (4.53 ± 1.61) 岁;PLT 为 $(4.80 \pm 1.16) \times 10^9/L$ 。两组年龄、性别等基线资料比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。本研究经西安高新医院医学伦理委员会审查批准,患儿家属均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法 治疗药物:醋酸泼尼松片(上海上药信谊药厂有限公司,国药准字 H31020675),口服,1 mg/(kg·d);静脉注射用人免疫球蛋白(IVIG,浙江海康生物制品有限责任公司,国药准字 S19993039),静脉注射,0.4 g/(kg·d)。连续治疗 5 d,治疗期间每 2 天检测 1 次患儿血常规及凝血功能。于治疗第 14 天进行治疗效果评价。治疗期间未输注血小板。

1.2.2 效果评价 按照文献^[6]报道的标准对治疗效果进行评价。(1)完全反应:PLT $> 100 \times 10^9/L$,没有出血症状;(2)有效:PLT $> 30 \times 10^9/L$ 且较基线水

平升高 2 倍及以上,无出血症状;(3)无效:达不到以上条件。治疗总有效率=(完全反应例数+有效例数)/总例数 $\times 100\%$ 。

1.2.3 APA、PLT 及 Treg/Th17 细胞比值检测

(1)APA 检测:于治疗前采集患儿外周静脉血 3 mL,离心获取血清,将冻干血小板(抗原)与血清等比例混合,于 37℃ 孵育 30 min,蒸馏水洗涤 5 次,加入抗人 IgG 与红细胞,使用专用离心机进行离心,观察检测结果。判定标准:红细胞部分聚集或平铺在底部判定为阳性,红细胞平滑聚集在底部中央判定为阴性。(2)PLT 检测:于治疗前及治疗第 14 天采集患儿外周静脉血 3 mL,采用 HF-3800 全自动血细胞分析仪(上海寰熙医疗器械有限公司)测定 PLT。(3)Treg/Th17 细胞比值检测:于治疗前及治疗第 14 天分别采集患儿外周静脉血 3 mL,采用 Percoll 分离液分离外周血单个核细胞,然后对 Treg 细胞、Th17 细胞进行标记,再采用 BD FACSVia 流式细胞仪测定 Treg/Th17 细胞比值。

1.3 统计学处理 使用 SPSS22.0 统计软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验;采用 Spearman 相关系数法分析 APA、PLT 与治疗效果、Treg/Th17 细胞比值的相关性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组治疗效果的比较 APA 阳性组完全反应 48 例,有效 15 例,无效 13 例,治疗总有效率为 82.89%;APA 阴性组完全反应 30 例,有效 14 例,无效 40 例,治疗总有效率为 52.38%。APA 阳性组的治疗效果明显优于 APA 阴性组,差异有统计学意义($P < 0.001$)。

2.2 两组 PLT 及 Treg/Th17 细胞比值比较 治疗第 14 天,两组 PLT、Treg 细胞及 Treg/Th17 细胞比值较治疗前明显升高($P < 0.05$),Th17 细胞较治疗前明显降低($P < 0.05$),且 APA 阳性组 PLT 明显高于 APA 阴性组($P < 0.05$),但两组 Treg 细胞、Th17 细胞及 Treg/Th17 细胞比值比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.3 APA、PLT 与治疗效果、Treg 细胞、Th17 细胞的相关性 Spearman 相关性分析显示,APA 与治疗效果呈正相关($r = 0.472, P < 0.05$),与 Treg 细胞、Th17 细胞均无明显相关性($r = 0.086, -0.109, P = 0.317, 0.253$);PLT 与治疗效果、Treg 细胞呈正相关($r = 0.472, 0.508$,均 $P < 0.001$),与 Th17 细胞呈负相关($r = -0.412, P < 0.001$)。

表 1 两组治疗前后 PLT 及 Treg/Th17 细胞比值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PLT($\times 10^9/L$)		Treg 细胞(%)		Th17 细胞(%)		Treg/Th17 细胞比值	
		治疗前	治疗第 14 天	治疗前	治疗第 14 天	治疗前	治疗第 14 天	治疗前	治疗第 14 天
APA 阳性组	76	4.27 $\pm$ 1.05	336.17 $\pm$ 58.20 ^a	2.10 $\pm$ 0.73	5.11 $\pm$ 1.03 ^a	2.10 $\pm$ 0.68	1.32 $\pm$ 0.45 ^a	1.18 $\pm$ 0.47	4.64 $\pm$ 1.27 ^a
APA 阴性组	84	4.80 $\pm$ 1.16	298.54 $\pm$ 46.37 ^a	2.39 $\pm$ 0.82	5.06 $\pm$ 1.15 ^a	2.12 $\pm$ 0.70	1.41 $\pm$ 0.60 ^a	1.23 $\pm$ 0.55	4.71 $\pm$ 1.29 ^a
t		0.368	15.293	0.451	0.782	0.497	0.628	0.530	0.641
P		0.714	<0.001	0.639	0.215	0.503	0.371	0.461	0.358

注:与同组治疗前比较,^a $P<0.05$ 。

3 讨 论

目前,儿童 ITP 的发病机制并无定论,但关于免疫介导的病理机制在儿童 ITP 中的研究得到了很大发展,临床上治疗 ITP 患儿的目标是将 PLT 恢复到能满足止血要求的水平^[7]。IVIG 是来源于健康捐赠者血清的血液制品,含有健康人血浆中所有的特异性抗体成分,主要是 IgG,以及少许 IgA 和 IgM,具有免疫替代和免疫调节的双重治疗作用^[8]。IVIG 已经成为临床治疗 ITP 患儿的主要手段,但是部分患儿对于其治疗反应性并不高,PLT 不能维持在有效水平,会对预后产生不利影响^[9]。因此,寻找一种能预测 ITP 患儿 IVIG 治疗效果的指标具有重要的临床实践意义。

ITP 患儿机体内产生的 APA 免疫介导机制已经得到普遍认可,ITP 患儿 APA 阳性率明显高于健康人^[10]。APA 能够能作用于 GPⅡb/Ⅲa 等血小板糖蛋白及巨核细胞表面,对巨核细胞的凋亡及血小板产生 2 条途径进行双重抑制,导致外周血液中 PLT 出现不同程度的降低^[11]。本研究结果显示,治疗后,与 APA 阴性组患儿相比,APA 阳性组患儿的治疗效果更好,PLT 更高,APA、PLT 与治疗效果呈正相关,提示 APA 可能是预测 ITP 患儿 IVIG 治疗效果的一项指标。目前,IVIG 治疗 ITP 患儿的具体机制还不清楚,大部分学者认为其机制是免疫球蛋白阻断巨噬细胞 Fc γ 受体,从而抑制血小板吞噬功能^[12]。此外,免疫球蛋白能对免疫细胞进行调节,从而下调致病性抗体(如 APA 等)水平^[13]。近年来,T 淋巴细胞在儿童 ITP 发生、发展中的作用已得到重视;有研究显示,Treg 细胞缺失或功能发生异常,能激活 Th17/IL-17 细胞受体轴,使 Th17 细胞功能亢进,引起 IL-17 水平及 Th1/Th2 比值升高,机体细胞因子发生异常,免疫抑制转化生长因子水平降低,导致 B 淋巴细胞的增殖,从而诱发抗体介导的自身免疫反应^[14-15]。本研究中,治疗后,两组患儿 Treg 细胞及 Treg/Th17 细胞比值较治疗前明显升高,Th17 细胞较治疗前明显降低,提示 IVIG 治疗后,ITP 患儿机体内的免疫状态通过重建,逐渐趋于稳定;但治疗后两组 Treg/Th17 细

胞比值差异无统计学意义($P>0.05$),PLT 与 Treg 细胞呈正相关,与 Th17 细胞呈负相关。这提示 Treg、Th17 细胞水平与 ITP 患儿疾病进展情况存在密切关系。由于 ITP 患儿的免疫机制非常复杂,冯建军等^[16]的研究显示,ITP 患者血小板特异性抗体与 T 淋巴细胞亚群及自然杀伤(NK)细胞存在一定的相关性。但是本研究发现,APA 与 Treg 细胞、Th17 细胞无相关性,可能与本研究纳入的病例数不足有关,需要进一步深入研究。

综上所述,ITP 患儿 APA 与 IVIG 治疗后 Treg 细胞、Th17 细胞变化无相关性,但与治疗效果存在相关性,提示 APA 可能成为 ITP 患儿 IVIG 治疗效果的预测指标。本研究结果仍需进行多中心、大样本研究进行验证。

参考文献

[1] 张晓琳,侯明. 原发免疫性血小板减少症的诊疗进展[J]. 临床内科杂志,2020,37(1):5-7.

[2] 侯明. 成人原发免疫性血小板减少症的治疗进展[J]. 临床血液学杂志,2011,24(4):377-379.

[3] 李昕雨,何杨,阮长耿. 原发免疫性血小板减少症的治疗进展[J]. 中国实验血液学杂志,2021,29(3):983-987.

[4] ASLAM R, KAPUR R, SEGEL G B, et al. The spleen dictates platelet destruction, anti-platelet antibody production, and lymphocyte distribution patterns in a murine model of immune thrombocytopenia[J]. Exp Hematol, 2016,44(10):924-930.

[5] 徐雨婷,胡群.《2019 年美国血液学会免疫性血小板减少症指南》儿童部分解读[J]. 中国实用儿科杂志,2021,36(2):81-85.

[6] 覃薇,黄少玲,李婷婷. 抗-D 免疫球蛋白治疗儿童免疫性血小板减少症疗效的 Meta 分析[J]. 中国当代儿科杂志,2017,19(10):1070-1076.

[7] 张爱军,刘芹芹,浦婷. 儿童免疫性血小板减少症的规范治疗与管理[J]. 临床儿科杂志,2022,40(2):81-86.

[8] 广东省医师协会儿科医师分会,《中国当代儿科杂志》编辑部,深圳市儿童医院. 静脉注射用免疫球蛋白在儿童血液/肿瘤性疾病中应用的儿科专家共识[J]. 中国当代儿科杂志,2021,23(4):319-327.

(下转第 3245 页)

检测应该在 M-TESE 之前常规进行,这对提高对 NOA 患者的整体诊疗水平具有重要意义。

参考文献

- [1] VIJ S C, SABANEHGH E J, AGARWAL A. Biological therapy for non-obstructive azoospermia[J]. Expert Opin Biol Ther, 2018, 18(1): 19-23.
- [2] KLAMI R, MANKONEN H, PERHEENTUPA A. Successful microdissection testicular sperm extraction for men with non-obstructive azoospermia[J]. Reprod Biol, 2018, 18(2): 137-142.
- [3] 赵连明,姜辉,洪锴,等.显微取精时代下睾丸内情况分析[J]. 北京大学学报(医学版), 2019, 51(4): 632-635.
- [4] 王大川,王璟琦. 睾丸显微取精手术获精率预测的研究进展[J]. 中国男科学杂志, 2018, 32(5): 64-67.
- [5] 曹兴午,曹育爱,邱高辉,等.精子凋亡形态分析与分子机制探讨[J]. 现代检验医学杂志, 2009, 24(3): 1-6.
- [6] 李江源. 精子发生的内分泌激素调节[J]. 生殖医学杂志, 2014, 23(9): 697-702.
- [7] ISHIKAWA T. Surgical recovery of sperm in non-obstructive azoospermia[J]. Asian J Androl, 2012, 14(1): 109-115.
- [8] SHAH R, GUPTA C. Advances in sperm retrieval techniques in azoospermic men: a systematic review[J]. Arab J Urol, 2018, 16(1): 125-131.
- [9] WANG L, HUANG H, JIN F, et al. High expression of follicle stimulating hormone receptor in testicular tissue of idiopathic azoospermic patients with severe spermatogenic defects[J]. Chin Med J (Engl), 2014, 127(3): 488-493.
- [10] 袁长巍,曹兴午,李翠英. 973 例无精子者睾丸体积、生殖激素与精液细胞学分析[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(7): 925-927.

- [11] YANG Q, HUANG Y P, WANG H X, et al. Follicle-stimulating hormone as a predictor for sperm retrieval rate in patients with nonobstructive azoospermia: a systematic review and meta-analysis[J]. Asian J Androl, 2015, 17(2): 281-284.
- [12] AMER M K, AHMED A R, ABDEL HAMID A A, et al. Can spermatozoa be retrieved in non-obstructive azoospermic patients with high FSH level? A retrospective cohort study[J]. Andrologia, 2019, 51(2): e13176.
- [13] MEHMOOD S, ALDAWEESH S, JUNEJO N N, et al. Microdissection testicular sperm extraction: overall results and impact of preoperative testosterone level on sperm retrieval rate in patients with nonobstructive azoospermia[J]. Urol Ann, 2019, 11(3): 287-293.
- [14] 杨竣,任新玲,谷龙杰,等. 不同病因非梗阻性无精子症患者显微切开睾丸取精及 ICSI 结局比较[J]. 中华男科学杂志, 2018, 24(10): 887-892.
- [15] AMER M K, AHMED A R, HAMID A A A. Factors determining the sperm retrieval rate in fresh versus salvage miro-TESE: a comparative cohort study[J]. Int Urol Nephrol, 2019, 51(3): 401-408.
- [16] RAHEEM A A, GARAFFA G, RUSHWAN N, et al. Testicular histopathology as a predictor of a positive sperm retrieval in men with non-obstructive azoospermia[J]. BJU Int, 2013, 111(3): 492-499.
- [17] GHALAYINI I F, AL-GHAZO M, HANI O B, et al. Clinical comparison of conventional testicular sperm extraction and microdissection techniques for non-obstructive azoospermia[J]. J Clin Med Res, 2011, 3(3): 124-131.

(收稿日期: 2022-02-28 修回日期: 2022-09-17)

(上接第 3241 页)

- [9] 黄小龙. 不同剂量人免疫球蛋白联合糖皮质激素治疗免疫性血小板减少症对患儿外周血 Th17 细胞水平的影响[J]. 哈尔滨医药, 2021, 41(1): 3-5.
- [10] 杨硕,王勇,陈淑霞,等. 原发免疫性血小板减少症发生血栓的影响因素研究[J]. 中国全科医学, 2022, 25(5): 603-607.
- [11] 周燕,钟周琳,卢芳,等. ITP 患者血小板抗体特征分析暨 1 例含血小板自身和同种抗体的 ITP 患者输血疗效观察[J]. 重庆医学, 2020, 49(1): 29-32.
- [12] 宋钰,都丽萍,屈静晗,等. 静脉注射用免疫球蛋白药学特点和临床应用探索[J]. 中国药学杂志, 2021, 56(5): 417-421.
- [13] 薛峰,刘敏,赵辉,等. 慢性特发性血小板减少性紫癜患者

在氟美松或静脉注射人免疫球蛋白治疗后体内细胞因子谱的变化[J]. 国际输血及血液学杂志, 2007, 30(6): 487-490.

- [14] 江南静,雷勋明,陈艾. T 淋巴细胞联合血浆细胞因子诊断儿童 ITP 的研究[J]. 重庆医学, 2022, 51(3): 398-401.
- [15] 许军秀,肖玉龙,张根豪. 抗血小板抗体对 ITP 患儿免疫球蛋白治疗疗效及 Treg/Th17 比例的影响[J]. 中国输血杂志, 2021, 34(9): 1003-1005.
- [16] 冯建军,杨林花,陈剑芳,等. ITP 血小板特异性抗体和 T 淋巴细胞亚群及 NK 细胞变化的意义探讨[J]. 临床血液学杂志, 2009, 22(1): 27-29.

(收稿日期: 2022-04-13 修回日期: 2022-09-15)