

急性免疫性血小板减少症患儿 NK 细胞、NK 样 T 细胞数量变化及槐杞黄联合糖皮质激素疗效探讨

马文典, 张 坤, 王 弘*, 李 雪, 郝良纯

[摘要] 目的 探讨 NK 样 T 细胞及 NK 细胞数量变化对儿童急性免疫性血小板症 (ITP) 发病的影响, 观察槐杞黄口服联合糖皮质激素对儿童 ITP 疗效的影响。方法 采用前瞻性对照研究的方法, 收集 2016 年 1-12 月于我科确诊并住院治疗的 70 例 ITP 患儿及门诊健康体检的 30 例正常儿童资料, 均在未接受任何治疗时采集外周血, 检测淋巴细胞亚群、NK 样 T 细胞数值并进行分析比较。将 70 例 ITP 患儿随机分成观察组和对照组, 每组 35 例。实验组在常规的糖皮质激素治疗方法基础上加用槐杞黄口服, 对照组则仅为激素方法治疗。治疗期间观察两组患儿临床情况, 定期于清晨空腹采血, 记录血小板计数, 同时采用流式细胞仪技术, 检测淋巴细胞亚群、NK 样 T 细胞的表达率。结果 ITP 儿童外周血中 NK 细胞 ($6.2\% \pm 1.37\%$)、NK 样 T 细胞的数量 ($0.98\% \pm 0.41\%$) 较健康儿童 ($15.92\% \pm 3.84\%$, $3.56\% \pm 0.78\%$) 明显下降, 总 B 细胞数量则明显上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 观察组的有效率为 94.3%, 显著高于对照组的 85.7%, 平均住院治疗时间缩短; 治疗后, ITP 患儿外周血 NK 细胞、NK 样 T 细胞的表达率均显著升高 ($P < 0.05$); 治疗期间观察组血小板计数恢复正常范围及 NK 细胞和 NK 样 T 细胞数量上升较对照组明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 NK 细胞及 NK 样 T 细胞数量下降可能与儿童 ITP 发病相关, 槐杞黄联合糖皮质激素治疗儿童 ITP, 可能通过改善免疫功能紊乱, 提升 NK 细胞、NK 样 T 细胞数量, 加快血小板计数的恢复, 进而缩短疗程。

[关键词] 免疫性血小板减少症; 槐杞黄; NK 细胞; NK 样 T 细胞

Quantitative changes of NK and NK-like T cells in children with acute immune thrombocytopenia and the effect of Huaiqihuang oral combined with glucocorticoid

MA Wen-dian, ZHANG Kun, WANG Hong*, LI Xue, HAO Liang-chun (Hematology Treatment Center, Pediatric Hematology Department, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110022, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of the quantity of NK-like T cells and NK cells on the pathogenesis of acute immune platelet disease (ITP) in children, and to observe the effect of Huaiqihuang oral combined with glucocorticoid on ITP in children. **Methods** A prospective, controlled study was conducted to collect data on 70 children with ITP and 30 healthy children from January to December 2016 who were diagnosed and hospitalized in our department. All patients received peripheral blood tests without any treatment. Lymphocyte subsets, NK-like T cells and statistical analysis were compared. The 70 ITP children were randomly divided into experiment group and control group, 35 cases in each group. In experiment group, oral administration of Huaiqihuang was added on the basis of routine glucocorticoid therapy, while control group was only treated by hormone therapy. During the treatment, the clinical condition of the two groups was observed. Blood samples were collected in the morning fasting. Platelet count was recorded. The expression of lymphocyte subsets and NK-like T cells was detected by flow cytometry. **Results** The number of NK cells ($6.2\% \pm 1.37\%$) and NK-like T cells ($0.98\% \pm 0.41\%$) in ITP children was significantly lower than

收稿日期: 2017-01-06

作者单位: 中国医科大学附属盛京医院血液病治疗中心 小儿血液科, 沈阳 110022

基金项目: 国家自然科学基金 (81101528); 辽宁省自然科学基金 (2015020542)

*通信作者

DOI: 10.14053/j.cnki.ppcr.201704006

- [28] Cross DA, Alessi DR, Vandenhede JR, et al. The inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin or insulin-like growth factor I in the rat skeletal muscle cell line L6 is blocked by wortmannin, but not by rapamycin; evidence that wortmannin blocks activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in L6 cells between Ras and Raf [J]. *Biochem J*, 1994, 303 (Pt 1): 21-26.
- [29] Song JJ, Wang Q, Du M, et al. Casein glycomacropeptide-derived peptide IPPKKNQDKTE ameliorates high glucose-induced insulin resistance in HepG2 cells via activation of AMPK signaling [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2017, 61(2).
- [30] Zhao W, Ge H, Liu K, et al. Nandinine, a derivative of berberine, inhibits inflammation and reduces insulin resistance in adipocytes via regulation of AMP-Kinase activity [J]. *Planta Med*, 2017, 83(3-4): 203-209.
- [31] Cordero-Herrera I, Martín MA, Bravo L, et al. Cocoa flavonoids improve insulin signalling and modulate glucose production via AKT and AMPK in HepG2 cells [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2013, 57(6): 974-985.

that in healthy children (15.92%±3.84%, 3.56%±0.78%) and the total number of B cells was higher. The difference was statistically significant ($P < 0.05$); the effective rate in observation group was significantly higher than that of control group (94.3% vs. 85.7%, $P < 0.05$); the average hospitalization time was shortened ($P < 0.05$). After treatment, the platelet count returned to the normal range and the number of NK cells and NK-like T cells increased in observation group during the treatment period, compared with control group, the difference being significant ($P < 0.05$). **Conclusion** NK cells and NK-like T cells may be related to the incidence of ITP in children. The combination treatment of Huaqihuang and glucocorticoid for children with ITP may improve the number of NK cells and NK-like T cells and improve the recovery of platelet count by improving immune function, which thus shorten the course of treatment.

Key words: Immune thrombocytopenia; Huaqihuang; NK cells; NK-like T cells

0 引言

免疫性血小板减少症 (Immune thrombocytopenia, ITP) 是儿童中最常见的获得性自身免疫性出血性疾病, 由于机体免疫系统功能紊乱造成血小板破坏增加、数目减少, 进而导致皮肤黏膜、内脏出血。1~6 岁为小儿高发年龄段, 发病率为小儿群体的 4/10 万~6/10 万, 该时期儿童免疫系统功能仍未健全, 处于不断完善的过程^[1]。体液免疫、细胞免疫在 ITP 的发病中具有重要作用, 然而其详细机制尚不明确, 有待于不断深入探索研究。近年来, 许多研究发现, NK 细胞、NK 样 T 细胞在人体免疫调节机制中起着重要作用, 其数量的改变通常会造成机体免疫机制的紊乱, 在成人中已得到广泛研究^[2], 并且极可能参与了儿童 ITP 的发生。与此同时, 糖皮质激素联合调节免疫机制药物治疗儿童 ITP 也是当前研究的热点。本研究旨在探究在儿童 ITP 发病及治疗过程中 NK 细胞、NK 样 T 细胞、总 B 细胞数量的变化及作用, 进一步观察槐杞黄联合糖皮质激素对 ITP 患儿疗效的影响。

1 资料和方法

1.1 研究对象 2016 年 1-10 月于我院儿科门诊体检的健康儿童 30 例, 男 15 例, 女 15 例, 年龄 2~8 岁, 平均年龄 (5.3±2.1) 岁, 同时收集相同年龄段在血液病房确诊并住院治疗的 ITP 患儿 70 例, 男 32 例, 女 38 例, 平均年龄 (5.3±2.7) 岁, 纳入儿童均符合 2013 年中华医学会制定的诊断标准^[3], 并符合采用一线药物糖皮质激素治疗的患儿, 除外血小板计数 $< 20 \times 10^9/L$ 及有大量活动性出血需立即输注血小板或应用丙球的患儿。所有患儿均在未予任何相关治疗前采集外周血送检。同时, 将参与研究的患儿随机分成观察组和对照组, 每组 35 例。观察组男 16 例, 女 19 例, 平均年龄 (5.4±2.2) 岁; 对照组男 17 例, 女 18 例, 平均

年龄 (5.2±2.1) 岁, 两组患儿一般资料比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 治疗 两组患儿均按一线的 ITP 治疗方案即糖皮质激素治疗, 甲泼尼龙琥珀酸钠 2~3 mg/(kg·d) 静脉点滴, 激素在病情好转时, 按常规予以减量停用, 观察组在此基础上, 同时加用槐杞黄口服 (国药准字 B200020074, 启动盖天力药业有限公司生产), 2~3 岁, 5 g/次, 2 次/d; 3~8 岁, 10 g/次, 2 次/d, 总疗程 2 个月。

1.2.2 淋巴细胞亚群及 NK 样 T 细胞测定 ①标本采集: 70 例 ITP 患儿在治疗前、出院时、出院后 1 周、出院后 2 周, 于清晨空腹状态下采集外周血 2 mL, EDTA 抗凝。门诊健康体检儿童分别于体检当天清晨空腹状态下采集标本。②仪器与试剂: FACS Calibur 流式细胞仪购自美国 BD 公司, 试剂盒购自美国 BD 公司。

1.2.3 疗效观察 显效: 血小板恢复正常, 无出血症状, 持续 2 个月以上; 良好: 血小板升至 $100 \times 10^9/L$ 以上或较原水平上升 $40 \times 10^9/L$, 无或基本无出血症状, 持续 2 个月以上; 好转: 血小板有所回升, 出血有改善, 持续 2 周以上; 无效: 血小板计数及出血均无改善或恶化。有效率 = (显效例数 + 有效例数) / 总例数。记录入院治疗时间, 2 个月内因 ITP 多次入院, 治疗时间累加。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件对数据进行分析处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间计数资料比较采用 t 检验, 计数资料以百分比 (%) 表示, 两组间计数资料比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ITP 患儿与健康儿童外周血淋巴细胞亚群的比较 治疗前, 70 例 ITP 患儿外周血中 NK 细胞的平均数量为 6.2%±1.37%、NK 样 T 细胞的平均

数量为 $0.98\% \pm 0.41\%$, 明显低于 30 例健康体检儿童 ($P < 0.05$)。同时, ITP 患儿外周血中总 B 细胞平均数量较健康儿童明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。而总 T 细胞数量及调节性 T 细胞数量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 ITP 患儿与健康儿童外周血淋巴细胞亚群水平测定 (%)

组别	例数	NK (%)	总 T (%)	总 B (%)	NK 样 T (%)
健康组	30	15.92 ± 3.84	65.23 ± 4.71	12.51 ± 2.69	3.56 ± 0.78
ITP 组	70	6.20 ± 1.37	63.69 ± 5.16	21.47 ± 4.08	0.98 ± 0.41
<i>t</i> 值		4.837	0.892	5.416	3.194
<i>P</i> 值		<0.05	>0.05	<0.05	<0.05

表 2 两组治疗效果比较

组别	例数	显效 (%)	有效 (%)	好转 (%)	无效 (%)	总有效率 (%)	入院治疗时间 (d)
观察组	35	74.3	20.0	5.7	0	94.3*	7.8 ± 1.4*
对照组	35	51.4	34.3	11.4	2.9	85.7	13.2 ± 3.9

注: * 与对照组比较, $P < 0.05$

表 3 两组 $CD3^+ / CD(16^+ 56^+)$ NK 细胞变化情况 (%)

组别	治疗前	出院时	出院后 1 周	出院后 2 周
观察组	6.19 ± 1.35	11.72 ± 3.16	13.42 ± 2.37	14.61 ± 0.79
对照组	6.21 ± 1.27	9.84 ± 2.29	10.76 ± 1.25	11.53 ± 0.66
<i>t</i> 值	0.386	1.785	2.053	3.579
<i>P</i> 值	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05

表 4 $CD3^+ / CD(16^+ 56^+)$ NK 样 T 细胞变化 (%)

组别	治疗前	出院时	出院后 1 周	出院后 2 周
观察组	0.97 ± 0.78	2.75 ± 0.86	3.24 ± 0.48	3.51 ± 0.59
对照组	0.99 ± 0.41	1.84 ± 0.69	2.36 ± 0.37	2.61 ± 0.46
<i>t</i> 值	0.518	2.972	3.554	3.981
<i>P</i> 值	>0.05	>0.05	<0.05	<0.05

3 讨论

ITP 作为儿童最常见的出血性疾病之一, 以不明原因出现皮肤黏膜出血症状伴血小板减少为主要表现。近年来对于免疫失调介导其发病机制的研究已成为热门, 然而既往研究大部分集中于 T、B 淋巴细胞及其相关细胞因子和免疫球蛋白等特异性免疫机制参与者, 关于 NK 细胞、NK 样 T 细胞这类非特异性免疫杀伤细胞数量的改变对于 ITP 发病及疗效影响的研究较少。

NK 细胞是与 T、B 淋巴细胞并列的第 3 类淋

2.2 两组疗效比较 观察组总有效率、显效率明显高于对照组。与对照组相比, 观察组患儿血小板计数回升较迅速, 出血点消失较快, 入院治疗时间较短。见表 2。

2.3 两组 NK 细胞、NK 样细胞在治疗过程中的变化 随着治疗过程的进展, 大部分 ITP 患儿的 NK 细胞数量及 NK 样细胞数量呈现上升趋势, 但平均恢复至正常区间的时间迟于患儿出院时间; 同时, 观察组患儿 NK 细胞及 NK 样 T 细胞数量上升至正常区间的例数较对照组多, 并且总体的上升幅度大, 速度快, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3、表 4。

巴细胞, 临床将 TCR^- 、 mIg^- 、 $CD16^+$ 、 $CD56^+$ 即 $CD3^+ / CD(16^+ 56^+)$ 淋巴样细胞鉴定为 NK 细胞, 是人体固有免疫系统中重要组成部分, 其不需要抗原预先致敏即可杀伤肿瘤细胞、病毒或寄生菌感染的细胞, 活化后还可分泌一些抗感染及免疫调节作用的细胞因子, 如干扰素 ($INF-\gamma$)、肿瘤坏死因子 ($TNF-\alpha$) 等, 而有关研究发现, $TNF-\alpha$ 是健康儿童与 ITP 患儿最有益的变量^[4-5]。范秋霞等^[6]通过临床观察发现, NK 细胞表达下降与 ITP 发病存在一定关系。推测 NK 细胞减少或活性降低后, 失去抑制 B 淋巴细胞增殖分化的能力, 导致大量 B 细胞增殖分化为浆细胞, 产生大量抗血小板抗体, 血小板被大量破坏, 进而导致 ITP 发生。可见, NK 细胞是人体内一种重要的免疫细胞, 其数量的下降可直接导致固有免疫杀伤, 且清除相关病原微生物感染细胞、肿瘤细胞的能力下降, 间接导致调节特异性免疫功能的因子分泌减少, 造成免疫功能失调, 大量血小板破坏消耗, 从而介导小儿 ITP 的发生。本研究的结果为这一猜测提供了有利证据, 表明 NK 细胞数量下降与 ITP 的发生密切相关, 在治疗过程中下降的 NK 细胞数量呈现回升的趋势, 与疗效呈正相关。

NK 样 T 细胞既表达 T 细胞表型, 也表达 NK 细胞表型, 即 $CD3^+ / CD16^+ CD56^+$ 的一类细胞。区别于一般 T 细胞, 其 TCR 不与 MHC 分子组成

复合物,而是特异性识别抗原提呈细胞表面 CD1d 分子递呈的糖脂类抗原,三者形成复合体后,可促使 NK 样 T 细胞迅速活化,直接清除体内病毒、细菌感染的异常细胞,同时可间接通过分泌大量细胞因子如 INF- γ 等,增强 Th1 细胞活性,从而增强细胞免疫功能,相反,对 Th2 细胞增殖具有抑制作用则抑制体液免疫功能^[7-8]。在成人慢性免疫性血小板减少症的临床研究中发现,NK 样 T 细胞数量的改变与 ITP 的发生有着密切的联系^[9]。本研究中,ITP 患儿外周血中 NK 样 T 细胞数量较正常儿童明显下降,故推测当机体内存在病毒、细菌感染时,由于 NK 样 T 细胞数量的减少,不能及时清除病原体,调节免疫功能的细胞因子分泌不足,长时间致使机体特异性免疫机制紊乱,即细胞免疫功能不足、体液免疫功能亢进,异常 B 细胞不但得不到有效清除,反而大量增殖分化为浆细胞,产生大量抗血小板抗体,同时,活化增强巨噬细胞吞噬功能,大量血小板被破坏,发生 ITP。

枸杞黄颗粒作为免疫调节剂在小儿临床相关治疗中广为应用,主要成分为槐耳菌质、枸杞子、黄精,其君药槐耳菌质中含有多种氨基酸和微量元素,有激活 NK 细胞、巨噬细胞和中性粒细胞,增强 T 细胞增殖及成熟分化,调节多种细胞平衡的作用^[10-11]。有研究表明,枸杞黄对儿童过敏性紫癜 Th17/Treg 失衡具有一定调节作用^[12]。同时,诱导产生小剂量、多刺激与联合作用的内源性细胞因子,增强体液免疫。臣药枸杞子可促进免疫细胞活性,调节免疫功能;黄精可增加白细胞数量,促进机体对病原微生物的及时清除,可大大改善机体的固有免疫功能^[13]。本研究发现,加用枸杞黄颗粒口服的 ITP 患儿与常规治疗的 ITP 儿童相比,临床症状消失快,血小板计数恢复正常迅速并能维持在较高水平,NK 细胞及 NK 样 T 细胞数量上升幅度大,趋于平衡所用的时间短,证明其对于儿童可通过提升机体 NK 细胞、NK 样 T 细胞数量来增强并平衡固有免疫、细胞免疫、体液免疫功能,进而辅助治疗儿童 ITP。

综上所述,本研究结果表明,固有免疫细胞中的 NK 细胞及 NK 样 T 细胞数量的改变与 ITP 的

发生、进展、预后有着极为重要的联系。在 ITP 糖皮质激素治疗方法上联合槐杞黄颗粒,可明显提高外周血血小板计数,加快机体 NK 细胞及 NK 样 T 细胞数量上升,促进机体免疫调节功能趋于稳态平衡,改善疗效,缩短疗程。

参考文献:

- [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]. 中国血液学杂志, 2009, 30(3): 215-216.
- [2] 冯建军, 杨林花, 陈建芳. 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.
- [3] 中华医学会儿科学分会血液学组,《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童原发性免疫性血小板减少症诊疗建议[J]. 中华儿科杂志, 2013, 51(5): 382-384.
- [4] Talaat RM, Elmaghraby AM, Barakat SS, et al. Alterations in immune cell subsets and their Cytokine secretion profile in childhood idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) [J]. Clin Exp Immunol, 2014, 176(2): 291-300.
- [5] Culic S, Salamunic I, Konjevoda P, et al. Immune thrombocytopenia; serum cytokine levels in children and adults [J]. Med Sci Monit, 2013, 19: 797-801.
- [6] 范秋霞, 王春美, 盛光耀. NK 细胞在儿童免疫性血小板减少症发病和治疗中的意义 [J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志, 2014, 19(4): 210-212.
- [7] Bojarska Junak A, Tabarkiewicz J, Rolinski J. NKT cells: their development, mechanisms and effects of action [J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2013, 67: 65-78.
- [8] Pita-López ML, Pera A, Solana R. Adaptive memory of human NK-like CD8 + T-cells to aging, and viral and tumor antigens [J]. Front Immunol, 2016, 7: 616.
- [9] Xu R, Zheng Z, Ma Y, et al. Elevated NKT cell levels in adults with severe chronic immune thrombocytopenia [J]. Exp Ther Med, 2014, 7(1): 149-154.
- [10] 陶金金, 贾春梅. 免疫调节剂在哮喘治疗中的作用及研究进展 [J]. 中国小儿急救医学, 2015, 22(7): 494-497.
- [11] 黄晗, 张向峰, 卢红霞. 枸杞黄颗粒防治儿童支气管哮喘的效果及其对免疫功能的影响 [J]. 中国医药, 2016, 11(9): 1367-1371.
- [12] 周杜鹃, 吴小川, 王复娟, 等. 枸杞黄对紫癜性肾炎患儿 Th17/Treg 细胞免疫失衡的调节作用 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2013, 28(5): 765-771.
- [13] 金士杰, 饶花平, 丁妞, 等. 枸杞黄颗粒辅助 GINA 方案治疗支气管哮喘患儿疗效观察 [J]. 中医儿科杂志, 2012, 8(5): 20-22.