

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.13.012

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

李曉征¹, 白玉盛^{*}, 王永², 杜青容²

(1. 新疆医科大学附属中医医院, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市黄河路 116 号, 830000; 2. 新疆医科大学)

摘要 目的 比较不同中医证型原发免疫性血小板减少症 (ITP) 患者淋巴细胞亚群表达的差异性。方法 收集 186 例 ITP 患者, 中医辨证分为阳虚证、阴虚证、血瘀证、血热证、气虚证 5 个证型, 检测各证型患者血淋巴细胞亚群包括 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺、CD19⁺、CD16⁺56⁺ 的表达情况, 分析各证型患者淋巴细胞亚群表达的差异性。结果 186 例 ITP 患者气虚证 80 例、阴虚证 57 例、阳虚证 24 例、血热证 15 例、血瘀证 10 例。CD8⁺ 在 5 个基本证型的表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 其余各指标在 5 个证型表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。CD3⁺ 表达在阳虚证与阴虚证之间差异有统计学意义, CD4⁺ 表达在阴虚证与气虚证之间差异有统计学意义, CD8⁺ 表达在阳虚证与血瘀证、阳虚证与血热证、阳虚证与气虚证、气虚证与阴虚证之间差异均有统计学意义, CD4⁺/CD8⁺ 阴虚证与血瘀证、阴虚证与气虚证之间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); CD19⁺ 和 CD16⁺56⁺ 表达在 5 个证型之间两两比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 CD8⁺ 在 ITP 不同证型患者的表达均有差异, 而 CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 在阴虚证与气虚证之间的表达均有差异。

关键词 原发免疫性血小板减少症; 淋巴细胞亚群; 阳虚证; 阴虚证; 血瘀证; 血热证; 气虚证

特发性血小板减少性紫癜 (idiopathic thrombocytopenic purpura, ITP) 是一组获得性免疫介导的血小板过度破坏所致的出血性疾病, 以皮肤黏膜及内脏出血为主要临床特征, 表现为短暂或持续的血小板计数下降, 随着血小板减少程度的加重出血风险增加^[1]。ITP 国际工作组 2007 年将该病正式更名为原发免疫性血小板减少症, 简称仍为 ITP^[2]。有研究表明, ITP 患者存在复杂的细胞免疫异常, 其发病与淋巴细胞亚群的变化有密切联系^[3]。ITP 属中医学“血证”“紫癜”范畴, 本研究分析 ITP 不同中医证型患者淋巴细胞亚群表达特征, 以为中医药辨证论治调节 ITP 免疫机制奠定基础。

1 临床资料

1.1 一般资料

收集 2011 年 3 月至 2016 年 11 月在新疆医科大学附属中医医院住院的 186 例 ITP 患者, 其中男性 64 例, 女性 122 例; 年龄 4 ~ 82 岁, 中位年龄

50 岁; 病程 0.5 ~ 2.6 个月, 中位病程 1.4 个月。

1.2 诊断标准

西医诊断标准参照《成人原发免疫性血小板减少症诊断与治疗的中国专家共识 (2016 年版)》^[4]: 1) 至少 2 次血常规检查示血小板计数减少 (血小板计数 $< 100 \times 10^9/L$), 血细胞形态无异常; 2) 脾脏一般不增大; 3) 骨髓检查显示巨核细胞数量增多或正常、有成熟障碍; 4) 排除其他继发性血小板减少症。

中医辨证标准参照《中药新药临床研究指导原则 (试行)》^[5] 及《中医内科学常见病诊疗指南·西医疾病部分》^[6] 中辨证标准拟定, 具备 3 个以上主症, 或 2 个主症及 1 个以上次症, 或 1 个主症及 3 个以上次症即可诊断为该证。1) 阳虚证。主症: 畏寒肢冷、气短懒言、腰膝酸冷; 次症: 面色无华、食少纳呆、耳鸣、颜面或下肢水肿、腹胀、舌淡胖、苔白、脉滑。2) 阴虚证。主症: 肌肤斑色鲜红或紫暗、五心烦热、口干、潮热盗汗; 次症: 起病缓慢、时发时愈、头晕目眩、便秘、舌干红、少苔或无苔、脉细数。3) 血瘀证。主症: 肌肤斑

基金项目: 国家自然科学基金 (81560727)

* 通讯作者: bysh0606@163.com, 13999173066

色紫黑、面色晦暗或唇指青紫、脉涩；次症：心悸失眠、胸或腰腹固定疼痛、舌质紫暗、舌底络脉迂曲。4) 血热证。主症：肌肤斑色鲜红或暗紫甚则发黑、发热、烦渴；次症：起病急骤、尿赤便秘或关节腰腹疼痛、舌红苔黄、脉滑数或弦数。5) 气虚证。主症：肌肤斑色淡红、神疲乏力、气短懒言；次症：病程较长、容易反复、面色苍白或萎黄、头晕、食少、便溏、舌质淡、苔白、脉细弱或无力。

1.3 纳入标准

符合 ITP 诊断标准和中医辨证标准者；病程 < 3 个月；未参加其他任何临床试验；知情同意并签署知情同意书者。

1.4 排除标准

有严重出血如颅内出血；周期性血小板减少性紫癜；合并严重心、肝、肾功能不全及其他并发症。

2 方法

2.1 中医证型的判定

按照中医辨证标准^[4-5]制定 ITP 症状临床观察表，由经过培训的主管医生和研究生对入组的患者进行访谈，收集四诊信息填写症状量表；症状量表一式三份，由 3 名副主任医师及以上人员分别进行辨证并判别证型；两名或以上人员证型相同者确定证型，三者均不同者进行讨论再确定。

2.2 淋巴细胞亚群检测

2.2.1 仪器与试剂 FACS Calibur 双激光四色流式细胞分析仪，美国 BD Biosciences 公司；Multi-SET 四色免洗淋巴细胞亚群试剂盒（批号分别为 20531、39974、36700、61900）、FACS Lysing Solution 红细胞裂解液（批号 6207653）均购自美国 BD Biosciences 公司。

2.2.2 检测方法 由专人空腹抽取患者 EDTA-K2 抗凝静脉血 2 ml，取 20 μ l CD3⁺/CD8⁺/CD45⁺/CD4⁺ 荧光标记抗体和 20 μ l CD3⁺/CD16⁺56⁺/CD45/CD19⁺ 荧光抗体分别加入 2 支 FACS 专用上

样管底部，然后再分别加入抗凝全血 50 μ l，低速混匀 3 s，室温避光孵育 15 ~ 20 min；加入 450 μ l FACS 溶血素，充分混匀后室温避光静置 15 min，24 h 内上机，用 MultiSET V3.0.2 软件（美国 BD Biosciences 公司）获取 15 000 个细胞进行检测。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计分析软件，计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示，采用方差分析比较不同证型 ITP 患者淋巴细胞亚群水平的表达及两两证型淋巴细胞亚群水平的表达，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 186 例 ITP 患者中医证型分布

186 例患者中阳虚证 24 例 (12.9%)、阴虚证 57 例 (33.9%)、血瘀证 10 例 (6.0%)、血热证 15 例 (8.9%)、气虚证 80 例 (47.6%)，以气虚证和阴虚证为多，呈现气虚证 > 阴虚证 > 阳虚证 > 血热证 > 血瘀证。

3.2 不同证型 ITP 患者淋巴细胞亚群水平比较

对 ITP 不同中医证型患者淋巴细胞亚群检测结果采用单因素方差分析法进行方差齐性检验和 F 值计算，5 个基本证型结果均服从正态分布且方差齐性。表 1 示，CD8⁺ 在 5 个基本证型的表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，其余各指标在 5 个证型表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3.3 不同证型 ITP 患者淋巴细胞亚群水平之间两两比较

表 2 示，CD3⁺ 表达在阳虚证与阴虚证之间差异有统计学意义，CD4⁺ 表达在阴虚证与气虚证之间差异有统计学意义，CD8⁺ 表达在阳虚证与血瘀证、阳虚证与血热证、阳虚证与气虚证、气虚证与阴虚证之间差异均有统计学意义，CD4⁺/CD8⁺ 在阴虚证与血瘀证、阴虚证与气虚证之间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)；CD19⁺ 和 CD16⁺56⁺ 表达在 5 个证型之间两两比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 不同证型原发免疫性血小板减少症患者淋巴细胞亚群检测结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

证型	例数	CD3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD19 ⁺ (%)	CD16 ⁺ 56 ⁺ (%)
阳虚证	24	73.83 $\pm$ 8.38	34.58 $\pm$ 10.85	38.13 $\pm$ 15.80	1.16 $\pm$ 0.82	12.00 $\pm$ 4.77	11.33 $\pm$ 7.32
阴虚证	57	69.72 $\pm$ 9.73	32.18 $\pm$ 12.13	34.54 $\pm$ 11.72	1.15 $\pm$ 0.74	14.79 $\pm$ 6.06	12.09 $\pm$ 7.47
血瘀证	10	69.30 $\pm$ 12.17	38.60 $\pm$ 8.98	28.20 $\pm$ 13.41	1.70 $\pm$ 0.82	15.00 $\pm$ 6.88	13.00 $\pm$ 9.96
血热证	15	69.53 $\pm$ 11.74	34.33 $\pm$ 10.63	30.40 $\pm$ 7.98	1.21 $\pm$ 0.50	8.60 $\pm$ 2.22	10.73 $\pm$ 13.67
气虚证	80	70.70 $\pm$ 9.30	37.25 $\pm$ 9.42	30.55 $\pm$ 9.92	1.42 $\pm$ 0.74	8.02 $\pm$ 0.90	11.99 $\pm$ 7.71
F 值		1.341	2.217	2.959	2.131	1.100	1.154
P 值		0.256	0.069	0.021	0.070	0.358	0.961

表 2 不同证型原发免疫性血小板减少症患者
淋巴细胞亚群检测结果两两比较 P 值情况

对比证型	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD19 ⁺	CD16 ⁺ 56 ⁺
1—2	0.031	0.351	0.200	0.968	0.108	0.710
1—3	0.131	0.315	0.022	0.052	0.263	0.596
1—4	0.089	0.943	0.042	0.827	0.061	0.827
1—5	0.069	0.280	0.005	0.127	0.081	0.736
2—3	0.900	0.078	0.108	0.031	0.931	0.750
2—4	0.947	0.483	0.214	0.779	0.435	0.576
2—5	0.560	0.006	0.046	0.036	0.929	0.945
3—4	0.953	0.325	0.638	0.106	0.630	0.506
3—5	0.667	0.704	0.541	0.261	0.967	0.718
4—5	0.667	0.329	0.963	0.313	0.454	0.593

注: 1, 阳虚证; 2, 阴虚证; 3, 血瘀证; 4, 血热证; 5, 气虚证

4 讨论

ITP 患者出现自身免疫性血小板减少、伴或不伴皮肤黏膜出血等临床表现, 其发病机制与免疫介导有关^[1]。近年来, 体液免疫和细胞免疫发病机制研究不断深入, 淋巴细胞亚群检测包括 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺、CD19⁺、CD16⁺56⁺等, 即 T 细胞亚群、B 细胞亚群和 NK 细胞亚群, 尤其是 T 细胞亚群越来越被关注^[2]。已有研究证明中医药治疗 ITP 具有较好的疗效, 如孙凤等^[3]采用紫茜合剂治疗慢性 ITP 临床总有效率为 65.71%, 优于对照组的 48.57%。ITP 属于中医学“血证”“紫癜”范畴, 为了进一步研究中医药治疗 ITP 的效应机制, 我们对 ITP 中医证型进行了研究。临床中我们发现 ITP 患者往往以复合证型多见, 包含两个或两个以上基本证型, 为了简化研究, 本研究从 ITP 复合证型中提取共有的基本证型进行研究, 分为阳虚证、阴虚证、血瘀证、血热证、气虚证 5 个分型, 体现了辨证阴阳、寒热和虚实的基本要素, 为复合证型的研究奠定基础。本研究结果显示, ITP 患者以气虚证、阴虚证为多, 呈现气虚证 > 阴虚证 > 阳虚证 > 血热证 > 血瘀证的情况, 说明基本证型的辨证结果与血证病机为“火盛”和“气伤”是一致的, 而 ITP 又以“气伤”更突出, 虽然虚证和实证均有表现, 总体结果显示虚证多于实证。还有部分的阳虚证患者似乎与基本病机相左, 还有待进一步研究。

淋巴细胞亚群检测结果显示, 以 CD8⁺T 细胞表达差异最为突出, 而 B 细胞 (CD19⁺) 和 NK 细胞 (CD16⁺56⁺) 的表达差异均无统计学意义。CD3⁺T 细胞是 CD4⁺ 和 CD8⁺ 的总和, CD4⁺ 和

CD8⁺T 细胞的比值当显示两个亚群的正常状态^[4]。本研究中阳虚证与阴虚证在 CD3⁺ 的表达存在差异, 阳虚证又与血瘀证、血热证、气虚证在 CD8⁺ 表达上存在差异, 说明阳虚证在 T 细胞亚群表达有显著与其他证型的不同。CD8⁺ 在 5 个基本证型的表达差异有统计学意义, 其余各指标在 5 个证型表达差异无统计学意义。因此, CD8⁺ 的表达将会为中医辨证治疗 ITP 的疗效机制研究提供客观的指标依据。阳虚证与血热证在病性上是相反的, 一个属虚寒证, 一个属实热证, 有虚实和寒热之别; 阳虚与气虚临床表现上则有程度的差别, 气虚是阳虚之渐, 而阳虚是气虚之极。气虚证与阴虚证在 CD4⁺、CD8⁺ 的表达上均有统计学差异, 说明在 T 细胞亚群中辅助性和抑制性 T 细胞的表达均有差异。因此, 辨证治疗 ITP 中气虚证和阴虚证可以将 CD4⁺、CD8⁺ 以及两者的比值作为客观的评价指标。总之, 与中医证型相关性的研究是将免疫相关指标转化为可辨证依据的重要环节, 对研究中医药辨证论治的疗效机制有着积极的指导作用。

参考文献

- [1] RODEGHIERO F, STASI R, GERNSHEIMER TA, 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.
- [2] 中华医学会血液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的中国专家共识 (2016 年版) [J]. 中华血液学杂志, 2016, 37(2): 89-93.
- [3] MAURER AM, LIU Y, CARN JP, et al. Ex vivo expansion of megakaryocytic cells [J]. Int J Hematol, 2000, 71(3): 203-210.
- [4] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则 (试行) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 181-182.
- [5] 中华中医药学会. 中医内科学常见病诊疗指南: 西医疾病部分 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2008: 7.
- [6] 侯明. 原发免疫性血小板减少症的现状与展望 [J]. 中华血液学杂志, 2012, 33(9): 697-698.
- [7] SAKAKURA M, WADA H, TAWARA I, et al. Reduced CD4⁺CD25⁺ T cells in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura [J]. Thromb Res, 2007, 120(2): 187-193.
- [8] 孙凤, 倪虹, 郝晶. 紫茜合剂治疗慢性原发免疫性血小板减少症的临床观察 [J]. 中医药信息, 2016, 32(1): 95-97.
- [9] 曹雪涛. 医学免疫学 [M]. 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 89.

Expression Features of Lymphocyte Subsets in Patients with Primary Immune Thrombocytopenia of Different Syndromes

LI Xiaozheng¹, BAI Yusheng¹, WANG Yong², DU Qingrong²

(1. Chinese Medicine Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi, 830000; 2. Xinjiang Medical University)

ABSTRACT Objective To compare the difference of expression of lymphocyte subsets in patients with immune thrombocytopenia (ITP) of different syndrome. **Methods** Collected 186 patients with ITP and divided them into 5 syndrome types, including Yang deficiency, Yin deficiency, blood stasis, blood heat and Qi deficiency syndromes. Through the blood samples of patients with each syndrome type, examined the expression of lymphocyte subsets, including CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺, CD19⁺ and CD16⁺56⁺. Analyzed expression difference of lymphoid subsets cells in patients with different syndrome. **Results** In 186 patients with ITP, there were 80 cases of Qi deficiency syndrome, 57 cases of Yin deficiency syndrome, 24 cases of Yang deficiency syndrome, 15 cases of blood heat syndrome and 10 cases of blood stasis syndrome. The differences in expression of CD8⁺ among the 5 basic syndrome types were statistically significant ($P < 0.05$), and the differences of the other indices among 5 syndromes were not statistically significant ($P > 0.05$). The expression difference of CD3⁺ between Yang deficiency and Yin deficiency syndrome was statistically significant. The difference of CD4⁺ expression between Yin deficiency syndrome and Qi deficiency syndrome was statistically significant. There was statistically significant difference between the expression of CD8⁺ in the Yang deficiency and blood stasis syndrome, Yang deficiency and blood heat syndrome, Yang deficiency and Qi deficiency syndrome, Qi deficiency and Yin deficiency syndrome. The differences of CD4⁺/CD8⁺ between Yin deficiency syndrome and blood stasis syndrome, Yin deficiency and Qi deficiency syndrome were statistically significant ($P < 0.05$). The differences of expression of CD19⁺ and CD16⁺56⁺ among the 5 syndrome types were not statistically significant in pairwise comparison ($P > 0.05$). **Conclusion** There were expression difference of CD8⁺ among patients of different syndromes. There were expression difference of CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ between Yin deficiency and Qi deficiency syndrome.

Keywords primary immune thrombocytopenia; lymphocyte subsets; Yang deficiency; Yin deficiency; blood stasis; blood heat; Qi deficiency

(收稿日期: 2017-02-10; 修回日期: 2017-04-05)

编辑: 邓 媛

中西医结合肝癌治疗技术新进展学术研讨会征文通知

由中华中医药学会主办、河南省中医院、《世界中西医结合杂志》社承办的“中西医结合肝癌治疗技术新进展学术研讨会”拟定于 2017 年 9 月 8-10 日在河南省郑州市召开,会议将邀请知名的中西医肿瘤学专家学者作专题报告及学术论文交流。会议期间,将聘请部分与会专家为中华中医药学会部分系列杂志的编委并颁发证书。现将有关事宜通知如下:

1. 征文内容与要求

未在国内外杂志公开发表的,内容涉及肝癌、肝硬化、各类慢性肝炎等的文献研究、理论探讨、实验研究、临床研究、药物研究、临证经验总结、思路与方法研究、最新研究进展以及治未病等。论文将择优汇集在《世界中西医结合杂志》增刊中。来稿体裁不限,要求论点明确,论据充分,逻辑性强;字数 3000~4000 字;附 400 字以内摘要、3~5 个关键词及 100 字的个人简介。论文发送至邮箱: sjzyjh@126.com (注明会议征稿)。稿件末尾注明作者姓名、单位、详细通讯地址、邮编、电话、电子邮箱。截稿日期为: 2017 年 8 月 15 日。

2. 会议费用

会务费 1000 元/人,餐饮、住宿由大会统一安排,交通费、住宿费自理。

3. 报到地点

河南索尔斯酒店(郑州市金水区东风路与丰庆路交叉口向北三百米路西,河南省中医院西门)。

4. 联系人

乔利梅 13811106829; 杨露露 13522879627