

抗幽门螺旋杆菌联合重组人血小板生成素对难治性特发性血小板减少性紫癜 Th1/Th2 细胞因子的影响

周颖, 周莉, 袁韵

四川大学华西医院血液科, 四川 成都 610000

摘要: **目的** 探讨抗幽门螺旋杆菌(Hp)治疗联合重组人血小板生成素(rhTPO)对难治性特发性血小板减少性紫癜(ITP)患者辅助性T细胞1/辅助性T细胞2(Th1/Th2)细胞因子的影响。**方法** 选择2008年6月至2018年6月收治的71例难治性ITP患者为研究对象进行回顾性研究,按照治疗方案的不同将患者分为对照组($n=36$)及观察组($n=35$)。对照组给予rhTPO治疗,观察组在对照组治疗的基础上使用抗Hp治疗,两组均连续治疗2周。统计两组患者治疗2周后临床疗效;比较两组患者治疗前与治疗后Th1细胞因子[白细胞介素(IL)-2、 γ -干扰素(IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)]和Th2细胞因子(IL-4、IL-10)、B淋巴细胞(CD19⁺、B1细胞)与血小板(PLT)计数;比较治疗后1年内两组患者的复发率。**结果** 治疗2周后,观察组总有效率高于对照组(94.29% vs 69.44%, $P < 0.01$)。治疗2周后,两组IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-2/IL-4、CD19⁺、B1水平均较治疗前降低,且观察组低于对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$);IL-4、IL-10、PLT水平均较治疗前升高,且观察组高于对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。随访1年内观察组总复发率低于对照组(21.21% vs 48.00%, $P < 0.05$)。**结论** 抗Hp联合rhTPO治疗难治性ITP患者可显著提高临床疗效,升高PLT,调节Th1/Th2免疫平衡,缓解临床症状,改善预后。

关键词: 紫癜, 血小板减少性, 特发性; 抗幽门螺旋杆菌; 重组人血小板生成素; 辅助性T细胞1/辅助性T细胞2; B淋巴细胞

中图分类号: R 554⁺.6 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2020)12-1624-04

Impacts of anti-Hp therapy combined with recombinant human thrombopoietin on Th1/Th2 cytokines in patients with refractory ITP

ZHOU Ying, ZHOU Li, YUAN Yun

Department of Hematology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610000, China

Abstract: Objective To explore the effect of anti-*Helicobacter pylori* (Hp) therapy combined with recombinant human thrombopoietin (rhTPO) on T helper type 1/T helper type 2 (Th1/Th2) cytokines in patients with refractory idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). **Methods** Seventy-one patients with refractory ITP treated from June 2008 to June 2018 were enrolled for retrospective study and were divided into control group ($n=36$) and observation group ($n=35$) according to different treatment schemes. The rhTPO were given in both groups, while anti-Hp was added in observation group. Before and after 2 weeks of treatment, the levels of interleukin (IL)-2, IL-4, IL-10, interferon-gamma (IFN- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α), CD19⁺, B1 cells and platelet count (PLT) were compared between two groups. The recurrence rate within 1 year after treatment was compared between two groups. **Results** The total effective rate in observation group was significantly higher than that in control group (94.29% vs 69.44%, $P < 0.01$). At two weeks after treatment, the levels of IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-2/IL-4, CD19⁺ and B1 cells were significantly lower than those before treatment in two groups and were significantly lower in observation group than those in control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while levels of IL-4, IL-10 and PLT were higher than those before treatment, and were higher in the observation group than those in the control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The total recurrence rate in observation group was significantly lower than that in control group (21.21% vs 48.00%, $P < 0.05$). **Conclusion** Anti-Hp combined with rhTPO in the treatment of refractory ITP patients can significantly improve clinical efficacy, increase PLT level, regulate Th1/Th2 immune balance, alleviate clinical symptoms and improve prognosis.

Key words: Purpura, thrombocytopenic, idiopathic; Anti-*Helicobacter pylori*; Recombinant human thrombopoietin; T helper

type 1 T helper type 2; B lymphocyte

特发性血小板减少性紫癜 (idiopathic thrombocytopenic purpura, ITP) 是一种自身免疫性出血综合征, 其临床特点是未成熟的小血小板在单核巨噬系统被吞噬细胞破坏引起血小板减少症^[1]。常规使用激素治疗即可取得很好的疗效, 但部分难治性患者对激素治疗无效或呈依赖性, 常常使病情慢性、反复发作。研究发现, 针对难治性 ITP 患者使用重组人血小板生成素 (rhTPO) 可取得较好的疗效^[2]。此外, 研究显示, 难治性 ITP 发病与幽门螺旋杆菌 (*helicobacter pylori*, Hp) 感染后导致辅助性 T 细胞 1/辅助性 T 细胞 2 (Th1/Th2) 免疫系统紊乱有关^[3]。本研究旨在探讨抗 Hp 治疗联合 rhTPO 对难治性 ITP 患者 Th1/Th2 细胞因子的影响。现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 纳入 71 例难治性 ITP 患者为研究对象进行回顾性研究, 71 例均为四川大学华西医院 2008 年 6 月至 2018 年 6 月收治的患者, 按照治疗方案的不同分为对照组 ($n=36$) 及观察组 ($n=35$)。观察组男 14 例, 女 21 例; 年龄 20~60 (38.6 ± 2.3) 岁; 病程 4 个月~7 年, 平均 (2.9 ± 0.3) 年; 对照组 36 例中, 男 15 例, 女 20 例; 年龄 21~62 (38.9 ± 2.1) 岁; 病程 5 个月~9 年, 平均 (2.7 ± 0.5) 年。两组患者基线资料比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

1.2 诊断标准与纳入标准 选取患者均符合中华医学会制定的难治性 ITP 的诊断标准^[4]。纳入标准: (1) 年龄 18~65 岁; (2) 病程 >3 个月; (3) 血小板 (PLT) 计数 $<50 \times 10^9/L$; (4) 接受糖皮质激素正规治疗和/或脾脏切除术无效者; (5) ^{14}C 尿素呼气试验及 Hp 抗体检测均为阳性者; (6) 思路清晰, 沟通无障碍, 且积极配合治疗者; (7) 未参加其他临床研究患者; (8) 家属已签订本研究知情同意书。

1.3 排除标准 (1) 其他疾病导致血小板减少者; (2) 合并严重心脑血管、肝、肾等疾病者; (3) 对本研究使用药物及其成分过敏者; (4) 妊娠或哺乳期妇女; (5) 合并急性肺水肿、肺源性心脏病、严重肝、肾疾病者等; (6) 合并严重脑出血, 导致神志昏迷, 无法从事研究者。

1.4 治疗方法 两组患者治疗前停用所有免疫抑制剂至少 7 d, 包括糖皮质激素。

1.4.1 对照组 给予 rhTPO 治疗。rhTPO 注射液 (沈阳三生制药, 国药准字 S20050049, 7 500 u/ml), 15 000 u/d, 连续治疗 2 周, 若治疗过程患者 PLT 计

数已恢复正常则停用, 如果治疗过程中患者 PLT 计数 $<10 \times 10^9/L$, 并且伴有明显出血症状, 应给予 PLT 输注。

1.4.2 观察组 在对照组治疗的基础上使用抗 Hp 治疗。奥美拉唑胶囊 (桂林华信制药, 国药准字 H20143204, 20 mg), 20 mg/次, 2 次/d; 克拉霉素片 (广州白云山医药集团白云山制药总厂, 国药准字 H20063961, 250 mg), 500 mg/次, 2 次/d; 阿莫西林胶囊 (上海新亚药业, 国药准字 H31021076, 250 mg), 1 000 mg/次, bid。以上 3 种药物联合服用, 连续治疗 2 周。2 周后通过 ^{14}C 尿素呼气试验检测 Hp 感染情况并检测 PLT 计数。对两组患者均进行 1 年的随访。

1.5 观察指标 (1) 统计两组治疗 2 周后临床疗效。(2) 分别于治疗前与治疗 2 周后抽取两组患者晨起空腹静脉血 5 ml, 离心分离血清, 将其放置于 $-70^\circ C$ 的冰箱里储存备用。采用 PZ-MB01 全自动酶标仪 (北京普赞生物技术) 通过酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测 Th1 细胞因子 [白细胞介素 (IL)-2、 γ -干扰素 (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)]、Th2 细胞因子 (IL-4、IL-10), 严格按照 ELISA 说明书进行操作。(3) 分别于治疗前与治疗 2 周后抽取两组患者晨起空腹静脉血 5 ml, 采用 LH 750 全自动血细胞分析仪 (美国贝克曼库尔特) 对患者血液中 PLT 计数进行检测。(4) 分别于治疗前与治疗 2 周后抽取两组患者晨起空腹静脉血 2 ml 于肝素钠抗凝试管中, 室温染色 15 min 并在 $4^\circ C$ 冰箱中孵育 30 min 后加入 3 ml 红细胞破解液后离心去上清液, 经磷酸盐缓冲液冲洗后, 采用 CytoFLEX 流式细胞仪 [贝克曼库尔特商贸 (中国) 有限公司] 检测 B 淋巴细胞, 主要包括 B1 细胞及 CD19⁺ 细胞。(5) 统计两组治疗 2 周后有效患者 1 年内复发率。复发: 治疗有效后, 患者 PLT 计数再次降至 $30 \times 10^9/L$ 以下或不到基础值 ($20 \times 10^9/L$) 的 2 倍或出血症状再次出现。

1.6 疗效判定标准 按文献^[5]标准评定本研究中两组患者治疗后临床疗效。(1) 显效: PLT 计数 $\geq 100 \times 10^9/L$, 且无出血表现, 持续 3 个月以上; (2) 良效: PLT 计数回升至 $50 \times 10^9/L$ 或较原水平上升 $>30 \times 10^9/L$ 以上, 并且至少比基础 PLT 计数增加 2 倍, 且无或基本无出血表现, 持续 2 个月以上; (3) 进步: PLT 有所上升, 出血症状有所改善, 持续 2 个月以上; 无效: 上述指标均无明显改善或加重。总有效率 = (显效 + 良效 + 进步) 例数 / 总例数 $\times 100\%$ 。

1.7 统计学方法 使用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内比较使用配对 t 检验,组间比较使用独立样本 t 检验。计数资料以例 (%) 表示,采用 χ^2 检验比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者临床疗效比较 治疗 2 周后,观察组总有效率高于对照组 (94.29% vs 69.44%, $P < 0.01$)。见表 1。

2.2 两组治疗前后 Th1、Th2 细胞因子水平比较 治疗前两组 IFN- α 、TNF- α 、IL-2、IL-4、IL-10 及 IL-2/IL-4 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。治疗 2 周后,两组 IFN- α 、TNF- α 、IL-2 及 IL-2/IL-4 均较治疗前降低,且观察组低于对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); IL-4、IL-10 均较治疗前升高,且观察组高于对照组 ($P <$

0.05, $P < 0.01$)。见表 2。

2.3 两组患者治疗前后 B 淋巴细胞及 PLT 水平比较 治疗前两组患者的 CD19⁺、B1、PLT 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。治疗 2 周后,两组患者的 CD19⁺、B1 较治疗前均降低,且观察组低于对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); PLT 较治疗前升高,且观察组高于对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 3。

2.4 两组复发率比较 随访 1 年内观察组总复发率低于对照组 (21.21% vs 48.00%, $P < 0.05$)。见表 4。

表 1 两组患者治疗 2 周后临床疗效比较 例 (%)

组别	例数	显效	良效	进步	无效	总有效率
观察组	35	15(42.86)	12(34.29)	6(17.14)	2(5.71)	33(94.29)
对照组	36	12(33.33)	10(27.78)	3(8.33)	11(30.56)	25(69.44)
χ^2 值						7.322
P 值						0.007

表 2 两组治疗前后 Th1、Th2 细胞因子水平比较 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

时间	组别	例数	IFN- α	TNF- α	IL-2	IL-4	IL-10	IL-2/IL-4
治疗前	观察组	35	20.01 \pm 1.52	8.48 \pm 0.94	4.41 \pm 0.50	1.91 \pm 0.24	0.98 \pm 0.12	2.31 \pm 0.57
	对照组	36	19.96 \pm 1.55	8.52 \pm 0.96	4.44 \pm 0.53	2.00 \pm 0.27	1.02 \pm 0.15	2.28 \pm 0.60
	t 值		0.137	0.177	0.245	1.483	1.239	0.216
	P 值		0.891	0.860	0.807	0.143	0.220	0.829
治疗 2 周后	观察组	35	15.81 \pm 1.59 ^a	7.01 \pm 0.73 ^a	3.22 \pm 0.34 ^a	2.51 \pm 0.27 ^a	2.79 \pm 0.30 ^a	1.28 \pm 0.65 ^a
	对照组	36	17.02 \pm 1.71 ^a	7.52 \pm 0.85 ^a	3.84 \pm 0.41 ^a	2.22 \pm 0.18 ^a	2.58 \pm 0.25 ^a	1.73 \pm 0.59 ^a
	t 值		3.086	2.709	6.926	5.339	3.208	3.056
	P 值		0.003	0.009	0.000	0.000	0.002	0.003

注:与治疗前比较,^a $P < 0.05$ 。

表 3 两组治疗前后 B 淋巴细胞及 PLT 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CD19 ⁺ (%)	B1 (%)	PLT ($\times 10^9/L$)	
治疗前	观察组	35	20.58 \pm 2.31	8.93 \pm 0.96	18.57 \pm 1.58
	对照组	36	20.61 \pm 2.40	9.05 \pm 1.02	18.64 \pm 1.60
	t 值		0.054	0.510	0.185
	P 值		0.957	0.612	0.853
治疗 2 周后	观察组	35	14.20 \pm 1.43 ^a	3.84 \pm 0.59 ^a	60.12 \pm 6.15 ^a
	对照组	36	16.27 \pm 1.61 ^a	5.12 \pm 0.74 ^a	45.95 \pm 5.02 ^a
	t 值		5.722	8.045	10.649
	P 值		0.000	0.000	0.000

注:与治疗前比较,^a $P < 0.05$ 。

表 4 两组 1 年内复发率比较 [例 (%)]

组别	例数	≤ 6 个月复发	> 6 个月复发	合计
观察组	33	5(15.15)	2(6.06)	7(21.21)
对照组	25	7(28.00)	5(20.00)	12(48.00)
χ^2 值				4.634
P 值				0.031

3 讨论

难治性 ITP 患者内源性血小板生成素(TPO)相

对不足可能也是造成 PLT 生成障碍的病因之一^[6]。rhTPO 是一种可促进血小板生成的造血生长因子,可刺激巨核细胞的生长、成熟、分化,产生和释放有功能的 PLT,使外周 PLT 计数显著升高^[7]。

研究显示,Hp 感染可影响宿主的免疫遗传背景,可能与以下因素有关,Hp 与人 PLT 某些抗原存在交叉状态,而 Hp 感染易被机体免疫系统识别,最终产生抗 PLT 抗体,或慢性炎症使机体细胞因子网络发生变化,产生免疫耐受并激活 T、B 淋巴细胞^[8-10]。T 细胞主要分泌 Th1 细胞,以 IL-2 为主要代表和 IFN- α 和 TNF- α 等细胞因子,主要介导细胞免疫,还可诱发病,加速疾病进程;分泌的 Th2 细胞,则是以 IL-4 为主要代表和 IL-10 等细胞因子,具有阻止发病,缓解病情的作用,因此当 IL-2/IL-4 比值高于正常值时可判断出 Th1/Th2 平衡紊乱以 Th1 细胞占据主导优势,而 Hp 感染就可引起以 Th1 为主的免疫应答,Th1 介导的细胞免疫不仅对感染患者无保护作用,抑制 Th2 细胞的表达,而且进一步对巨核细胞及 PLT 造成破坏^[11-12]。本研究结果显示,治疗 2 周后两组 Th1 分泌的细胞因子水平及 IL-2/IL-4 比值均降低,观察

组低于对照组, Th2 分泌的细胞因子水平均升高, 观察组高于对照组, 且治疗 2 周后, 观察组临床有效率显著高于对照组, 提示抗 Hp 治疗联合 rhTPO 可能通过下调 IL-2/IL-4 比值调整 Th1/Th2 的平衡紊乱, 增强 Th2 细胞表达, 恢复机体免疫功能, 与国内外研究结果一致^[13-14]。诸多研究表明, B 淋巴细胞水平异常在 ITP 发病中起重要的作用, 大部分初发的 ITP 患者其体内 B 淋巴细胞水平较正常水平显著升高, 其水平越高即表明病情越严重, 此时体内 PLT 水平明显下降^[15-17]。有研究显示, ITP 患者经过治疗预后良好患者其体内 B1 细胞水平随着 PLT 水平的升高而下降, 呈负相关^[18]。本研究通过对治疗前与治疗 2 周后外周血 B 淋巴细胞及 PLT 水平的检测发现, 难治性 ITP 患者经过抗 Hp 联合 rhTPO 治疗后, 其 B 淋巴细胞水平较治疗前显著下降, 且低于对照组, 而 PLT 水平较治疗前有所上升, 且高于对照组, 提示经过抗 Hp 联合 rhTPO 有效治疗对 B1 细胞水平的变化存有一定的相关性。即 Hp 感染导致 ITP 的发病可能是通过 B1 细胞途径而发挥作用, 而进行抗 Hp 治疗可在一定程度上抑制机体免疫异常, 强化 T 诱导细胞对 T 抑制细胞(Ts)细胞的诱导作用, 增强 Ts 细胞对 B 淋巴细胞的抑制作用, 从而使治疗后 B 淋巴细胞生成减少, PLT 水平逐渐恢复^[19-20]。此次研究治疗后 1 年内观察组患者复发率显著低于对照组, 提示对难治性 ITP 患者给予根治 Hp 治疗可显著降低 ITP 的复发率, 结合治疗后临床有效率, 可说明 Hp 感染与 ITP 的发生、发展及预后密切相关。

综上所述, 抗 Hp 联合 rhTPO 治疗难治性 ITP 患者可显著提高临床疗效, 降低复发率, 升高 PLT 水平, 而对于 Hp 感染与难治性 ITP 患者 T 细胞及 B 淋巴细胞水平的关系还有待进一步研究证实。

参考文献

- [1] Katchan V, David P, Shoenfeld Y. An idiopathic thrombocytopenic Purpura with polyneuropathy [J]. Immunol Res, 2017, 65 (1): 193 - 196.
- [2] 陶媛, 吴秉毅, 杜庆锋, 等. 重组人血小板生成素可能通过调节免疫负调控因子水平治疗免疫性血小板减少性紫癜[J]. 血栓与止血学, 2014, 20(6): 315 - 318.
- [3] 罗洪强, 封蔚莹, 钟永根, 等. 抗幽门螺杆菌治疗对难治性血小板减少性紫癜患者 Th1/Th2 细胞因子及血小板水平的影响[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(1): 46 - 48.
- [4] 中华医学会血液学分会止血与血栓学组. 成人原发免疫性血小板减少症诊断与治疗中国专家共识(2016 年版)[J]. 中华血液学杂志, 2016, 37(2): 89 - 93.
- [5] 胡兰, 喻雕, 周泽平, 等. 难治性原发免疫性血小板减少症的诊疗进展[J]. 实用医学杂志, 2017, 33(3): 337 - 339.
- [6] Mitchell WB, Pinheiro MP, Boulard N, et al. Effect of thrombopoietin receptor agonists on the apoptotic profile of platelets in patients with chronic immune thrombocytopenia [J]. Am J Hemato, 2014, 89 (12): 228 - 234.
- [7] 陶红, 何正梅, 史文婷, 等. 重组人血小板生成素治疗免疫性血小板减少症的效果分析及对炎症因子的调控作用研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2017, 16(8): 780 - 783.
- [8] 杨湛南, 方文, 黄茜. 幽门螺杆菌感染对冠心病患者抗血小板治疗后上消化道出血的影响[J]. 贵州医科大学学报, 2017, 42 (9): 1050 - 1054.
- [9] Hwang JJ, Lee DH, Lee A, et al. Efficacy of moxifloxacin-based sequential therapy for first-line eradication of *Helicobacter pylori* infection in gastrointestinal disease [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21 (16): 5032 - 5038.
- [10] Campuzano-Maya G. Hematologic manifestations of *Helicobacter pylori* infection [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20 (36): 12818 - 12838.
- [11] Kalach N, Gosset P, Dehecq E, et al. A one-step immune-chromatographic *Helicobacter pylori* stool antigen test for children was quick, consistent, reliable and specific [J]. Acta Paediatr, 2017, 106(12): 2025 - 2030.
- [12] Jarque I, Andreu R, Llopis I, et al. Absence of platelet response after eradication of *Helicobacter pylori* infection in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura [J]. Br J Haematol, 2001, 115 (4): 1002 - 1003.
- [13] 李桂水, 杨敏京, 边连朵, 等. 抗幽门螺杆菌治疗在特发性血小板减少性紫癜治疗中的临床意义[J]. 医药导报, 2016, 35(21): 15 - 16.
- [14] Bussel JB, Hsieh L, Buchanan GR, et al. Long-term use of the thrombopoietin-mimetic romiplostim in children with severe chronic immune thrombocytopenia (ITP) [J]. Pediatr Blood Cancer, 2015, 62 (2): 208 - 213.
- [15] 罗洪强, 钟永根, 周国忠, 等. 外周血 B1 细胞在 ITP 患者个体化治疗中的应用[J]. 中华全科医学, 2015, 13(11): 1763 - 1765.
- [16] 罗洪强, 钟永根, 封蔚莹. rhTPO 对原发性免疫性血小板减少性紫癜患者 T, B 淋巴细胞免疫功能的影响[J]. 中国实验血液学杂志, 2019, 27(6): 1962 - 1965.
- [17] 张军红, 王从军, 雷中劲. B 细胞激活因子在特发性血小板减少性紫癜患儿中的表达及意义 [J]. 临床血液学杂志, 2014, 27 (2): 216 - 217, 220.
- [18] 郭莹, 瞿文, 王一浩, 等. 共刺激信号分子对免疫性血小板减少症患者 B 淋巴细胞免疫功能的影响[J]. 中国实验血液学杂志, 2016, 24(4): 1110 - 1115.
- [19] Li X, Sheng G, Xing H. Relationships among HLA-DRB1 Alleles, *Helicobacter pylori* infection and idiopathic thrombocytopenic purpura in children [J]. Minerva Pediatr, 2015, 67(4): 377 - 379.
- [20] Yujiri T, Tanaka Y, Tanaka M, et al. Alteration in serum B cell-activating factor levels inpatients with idiopathic thrombocytopenic purpura after *Helicobacter pylori* eradication therapy [J]. Br J Haematol, 2011, 152(4): 496 - 498.