

大剂量地塞米松联合利妥昔单抗治疗对原发性免疫性血小板减少症患者 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞的影响

崔允霞

作者单位: 463000 河南, 驻马店市中心医院输血科

作者简介: 崔允霞(1960-), 女, 大学本科, 副主任技师, 研究方向: 输血。E-mail: cuiyx9006@163.com

[摘要] 目的 探讨大剂量地塞米松联合利妥昔单抗治疗对原发性免疫性血小板减少症(ITP)患者 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞的影响。方法 选择 ITP 患者 146 例, 根据随机数字表法将患者分为对照组($n=51$)、地塞米松组($n=47$)、联合组($n=48$); 另选取健康体检人员 40 名作为体检组。对照组采用泼尼松治疗, 地塞米松组采用地塞米松治疗, 联合组采用地塞米松联合利妥昔单抗治疗, 测定并比较三组治疗前及体检组的 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞水平, 临床治疗前、治疗 2 周、治疗 4 周时的 CD4⁺ CD25⁺ CD127 Treg 细胞水平、临床疗效和复发情况。结果 对照组、地塞米松组、联合组的 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞水平均明显低于体检组, 治疗 2 周、治疗 4 周时均比治疗前明显增加, 但对照组、地塞米松组先升高后降低, 联合组则逐渐升高, 在治疗 4 周时明显高于对照组和地塞米松组, 联合组疗效优于对照组和地塞米松组($P<0.01$)。联合组复发率为 22.9%, 明显低于对照组和地塞米松组($P<0.01$)。结论 大剂量地塞米松联合利妥昔单抗治疗 ITP, 可有效提高 Treg 细胞水平, 维持长期疗效显著好于泼尼松和单纯的地塞米松, 值得临床借鉴推广。

[关键词] 地塞米松; 利妥昔单抗; 原发性免疫性血小板减少; 泼尼松

[中图分类号] R 558⁺.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2015)12-1160-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2015.12.15

Effect of large dose of dexamethasone combined with rituximab on CD4⁺ CD25⁺ Treg cells in patients with primary immune thrombocytopenia CUI Yun-xia. Department of Blood Transfusion, Zhumadian Central Hospital, Henan 463000, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of large dose of dexamethasone combined with rituximab on CD4⁺ CD25⁺ Treg cells in the patients with primary immune thrombocytopenia. **Methods** One hundred and forty-six patients with ITP were collected and divided into the control group($n=51$), dexamethasone group($n=47$) and combination group($n=48$). 40 healthy people were taken as the physical examination group. The control group was given prednisone and the dexamethasone group was treated with dexamethasone. The combination group was given dexamethasone combined with rituximab. CD4⁺ CD25⁺ Treg cells were determined in all groups. The levels of CD4⁺ CD25⁺ Treg cells were compared among the three groups and the physical examination group before the treatment. The levels of CD4⁺, CD25⁺ and CD127 Treg cells were compared among the three groups before the treatment and 2, 4 weeks after the treatment. The curative effect and recurrence were compared among the three groups. **Results** The levels of CD4⁺ CD25⁺ Treg cells in the control group, dexamethasone group and combination group were significantly lower than those in the physical examination group. The above indicators were significantly increased after the treatment of 2 and 4 weeks than those before the treatment. The indicators were increased at first and then decreased in the control group and dexamethasone group, but they were gradually increased in the combination group and were significantly higher than those in the control group and dexamethasone group after the treatment of 4 weeks. The total effective rate of the combination group was significantly higher than that of the control group and dexamethasone group ($P<0.01$). The recurrence rate of the combination group(22.9%) was significantly lower than that of the control group and the dexamethasone group($P<0.01$). **Conclusion** Large dose of dexamethasone combined with rituximab can effectively improve the levels of Treg cells, with a satisfactory long-term curative effect.

[Key words] Dexamethasone; Rituximab; Primary immune thrombocytopenic; Prednisone

原发免疫性血小板减少症(ITP)是一种免疫功能紊乱引起的以抗血小板自身抗体为主要特征的出血性疾病的总称,主要临床表现为血小板数量减少、皮肤黏膜紫癜、口腔黏膜、牙龈等部位出血等,严重者可引起颅内出血及内脏出血甚至死亡^[1]。其病机目前尚存争议,通常认为是患者的免疫功能障碍、遗传、环境等因素所致,而自身抗体引起单核巨噬细胞大量吞噬破坏血小板而导致血小板减少是其主要机制^[2]。但近期有研究者发现,机体免疫耐受被打破,细胞免疫异常也诱发该病的始动因素。CD4⁺CD25⁺Treg 细胞是细胞免疫的重要组成部分,因此,其异常在 ITP 中发挥着重要作用。目前,Treg 细胞表面标记分子主要为 CD25、CD127 及 Foxp3 等,其高表达 CD25 的 CD4⁺T 细胞发挥免疫抑制作用^[3]。然而国外有研究报道,Treg 细胞低表达 CD127 时,活化的 CD4⁺T 细胞同样高表达 CD127,可见,通过检测 CD127 的表达情况可对 Treg 与活化的 T 细胞进行识别,因此可作为 Treg 细胞的标志物^[4]。本研究在 ITP 患者经大剂量地塞米松和妥昔单抗治疗前后检测 CD4⁺CD25⁺CD127 的表达情况,并以常规剂量泼尼松治疗为对照,分析大剂量地塞米松联合妥昔单抗治疗对 ITP 患者 Treg 细胞水平的影响,以探讨 Treg 细胞在 ITP 中的作用机制。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集 2011-02~2014-01 在我院住院治疗的 ITP 患者 146 例,其中男 62 例,女 84 例;年龄 18~70(41.6±6.1)岁。ITP 诊断参考相关资料推荐的标准^[5]。病例选择标准:(1)血小板计数(PLT)低于 30×10⁹/L;(2)均为初治病人,入院前未接受任何治疗;(3)无肝肾心肺功能不全、病毒感染;(4)除外妊娠或哺乳患者。上述研究对象均对本研究目的了解并签署知情同意书。根据随机数字表法将患者分为对照组、地塞米松组和联合组。对照组 51 例,其中男 22 例,女 29 例;年龄 18~69(40.7±6.3)岁;白细胞计数(WBC)为(8.6±1.2)×10⁹/L,血红蛋白(HGB)为(128.6±18.1)g/L,PLT 为(17.5±2.3)×10⁹/L;出血部位:皮肤黏膜 39 例,鼻腔 8 例,月经量过多 8 例,血尿 6 例,消化道 1 例。地塞米松组 47 例,其中男 19 例,女 28 例;年龄 18~70(42.0±6.9)岁;WBC 为(8.3±1.5)×10⁹/L,HGB 为(129.7±19.0)g/L,PLT 为(18.0±2.6)×10⁹/L;出血部位:皮肤黏膜 32 例,鼻腔 8 例,月经量过多 5 例,血尿 4 例,消化道 2 例。联合组 48 例,其中男 21 例,女 27 例;年龄 18~70(41.0±6.1)岁;

WBC 为(8.8±1.6)×10⁹/L,HGB 为(130.0±20.4)g/L,PLT 为(18.0±2.9)×10⁹/L;出血部位:皮肤黏膜 36 例,鼻腔 9 例,月经量过多 6 例,血尿 7 例,消化道 2 例。三组在性别、年龄、WBC、HGB、PLT 水平方面比较差异均无统计学意义,具有可比性。另外选取同期在本院进行健康体检人员 40 名作为体检组,其中男 22 例,女 18 例;年龄 19~69(42.0±6.3)岁。

1.2 治疗方法 所有患者在治疗期间均给予氨甲苯酸、酚磺乙胺等止血药物辅助治疗;对 PLT<10×10⁹/L 和(或)伴活动性出血者,给予输注新鲜血小板辅助治疗,输注新鲜血小板 1~2 个治疗量。输注后复查血小板数量升高不理想,可能是 ITP 患者体内存在着自身抗血小板抗体,输入的血小板被自身抗体破坏有关。

1.2.1 对照组 采用泼尼松(天津天药药业股份有限公司,5 mg/片,批号 2010101572A)治疗,口服 1.5 mg/(kg·d),起效后降低剂量维持 3~6 个月。

1.2.2 地塞米松组 采用地塞米松(天津天药药业股份有限公司,0.75 mg/片,批号 2011121080B)治疗,口服 12.5~25 mg/次,2~4 次/d,连续治疗 4 d。

1.2.3 联合组 地塞米松联合利妥昔单抗(德国勃林格殷格翰药业公司,100 mg/50 ml/瓶,批号:20101125203C)治疗,地塞米松口服 12.5~25 mg/次,2~4 次/d,连续治疗 4 d;利妥昔单抗 100 mg 静脉滴注,分别在治疗开始后第 7、14、21、28 天进行。

1.3 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞测定 分别在治疗前、治疗第 2 周、治疗第 4 周时采集晨起空腹静脉血 3 ml,加入 EDTA 抗凝剂。采用流式细胞检测法测定:取抗凝血 30 μl,依次加入异硫氰酸荧光素标记的鼠抗人 CD4 抗体,藻红蛋白标记的鼠抗人 CD25 抗体,AF647 标记的鼠抗人 CD127 抗体,24~26℃下避光孵化 15 min,加入溶血素 500 μl,振荡混匀后 24~26℃下避光孵化 15 min,离心 5 min,去掉上层清液,加入 pH7.2 的磷酸盐缓冲液 2 ml 洗涤后,再离心 5 min,去掉上层清液,加入 pH7.2 的磷酸盐缓冲液 500 μl 悬浮细胞,放进 FACS Calibur 流式细胞检测仪检测,并使用其配套软件进行数据分析。采用相同的检测方法测定体检组的血 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞水平。

1.4 疗效判定标准 治疗 4 周时进行疗效评定。参考相关研究资料的疗效判断标准^[6]进行:(1)完全反应:PLT≥100×10⁹/L 且无出血;(2)有效:PLT≥30×10⁹/L 或较治疗前增长幅度>2 倍且无出血;(3)无效:PLT<30×10⁹/L 者,PLT 水平较治疗前上

升 <2 倍或有出血。所有患者随访 6 个月以上,比较三组的复发率。复发是指经治疗达有效后,PLT 再次降至 $<30 \times 10^9/L$ 或出血。

1.5 统计学方法 应用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理,计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用重复测量数据两因素多水平方差分析,非重复测量数据采用单因素方差分析,计数资料用率表示,采用 χ^2 检验,等级资料采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组治疗前及体检组的 $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞水平比较 对照组、地塞米松组、联合组及体检组的 $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞水平分别为 $(1.68 \pm 0.71)\%$ 、 $(1.72 \pm 0.73)\%$ 、 $(1.69 \pm 0.75)\%$ 及 $(4.94 \pm 0.83)\%$,对照组、地塞米松组、联合组的 $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞水平均明显低于体检组 ($F = 194.576, P < 0.01$)。

2.2 三组不同时点 $CD4^+CD25^+CD127$ Treg 细胞水平比较 三组治疗前的 $CD4^+CD25^+CD127$ Treg 细胞水平无统计学差异,治疗 2 周、4 周时均比治疗前明显增加,但对照组、地塞米松组先升高后降低,联合组则逐渐升高,在治疗 4 周时明显高于对照组和地塞米松组。见表 1。

表 1 三组不同时点 $CD4^+CD25^+CD127$ Treg 细胞水平比较 ($\bar{x} \pm s$), %

组别	例数	治疗前	治疗 2 周	治疗 4 周
对照组	51	1.68 ± 0.71	3.45 ± 0.78	2.66 ± 0.62
地塞米松组	47	1.72 ± 0.73	3.32 ± 0.72	2.58 ± 0.57
联合组	48	1.69 ± 0.75	4.29 ± 0.93	4.47 ± 0.60

注: $F_{\text{组别}} = 4.381, P = 0.023$; $F_{\text{时点}} = 29.847, P = 0.015$; $F_{\text{组别} \times \text{时点}} = 3.958, P = 0.011$

2.3 三组疗效及复发率比较 联合组疗效优于对照组和地塞米松组 ($P < 0.01$)。联合组复发率明显低于对照组和地塞米松组 ($P < 0.01$),对照组和地塞米松组完全反应率、复发率差异无统计学意义。见表 2。

表 2 三组疗效及复发率比较 [$n(\%)$]

组别	例数	完全反应	有效	无效	复发
对照组	51	15	20	16	20(39.2)
地塞米松组	47	12	21	14	22(46.8)
联合组	48	28	10	10	11(22.9)
Z/χ^2	-		16.241		8.092
P	-		0.000		0.000

3 讨论

3.1 ITP 发病机制是近年来血液科领域的研究热点,但截至目前为止仍未能完全阐明。一直以来,抗血小板自身抗体引起的血小板破坏增加是导致 ITP 发病的直接原因,但近期与研究发现,T 调节细胞异常引起的 B 细胞活化可能是 ITP 发生的真正原因。最近有研究报道, $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞异常参与了 ITP 的发生过程,其数量减少、免疫抑制功能降低可能是导致患者免疫调节障碍的一个重要机制^[7]。据报道,ITP 患者外周血 $CD4^+CD25^+CD127$ Treg 细胞所占比例显著降低,活性减弱,其所分泌的 IL-10、TGF- β 等抑制性细胞因子明显减少,从而降低其对 Th 细胞的抑制作用,致使 T、B 细胞异常活化;而高表达血小板表明,由于糖蛋白自身抗体原因,从而造成血小板被破坏^[8]。

3.2 糖皮质激素可诱导 $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞分化、增殖,并分泌 IL-10、TGF- β 等细胞因子,进而上调 $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞的表达水平,提高其免疫抑制功能,从而改善 ITP 的临床症状。本研究结果显示,ITP 患者外周血 $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞水平均明显低于体检组,经泼尼松、地塞米松及地塞米松联合利妥昔单抗治疗后明显增加,提示 Treg 细胞可能参与 ITP 的发生发展过程。进一步对比三组患者治疗后不同时点的外周血 $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞水平发现,对照组、地塞米松组先升高后降低,联合组则逐渐升高,在治疗 4 周时明显高于对照组和地塞米松组,且发现联合组的完全反应率明显高于对照组和地塞米松组,说明地塞米松联合利妥昔单抗对 Treg 细胞水平的改善作用更明显,这种改善作用具有持续性,而对照组、地塞米松组在治疗 28 d 时, Treg 细胞水平开始降低,这可能是导致其疗效降低的一个原因。隋涛等^[9]采用利妥昔单抗单药治疗 ITP,发现其能清除 B 细胞,促进 Treg 细胞水平的恢复,其机制可能是利妥昔单抗单药通过刺激未成熟 DC 摄取凋亡的 T 细胞后释放大量的 IL-10、TGF- β 而诱导产生 Treg 细胞,而新产生的 Treg 细胞通过识别和结合 DC 后而对 DC 的活性产生抑制作用;B 细胞被清除后,异常活化的 B 细胞、体细胞相互作用减弱,从而增加了 Treg 细胞水平。

3.3 本研究结果表明,大剂量地塞米松联合利妥昔单抗治疗 ITP 疗效优于泼尼松组和地塞米松组,复发率也明显降低,提示 Treg 细胞维持在较高水平能提高患者机体对药物的敏感性,降低其复发的风险。

总而言之,大剂量地塞米松联合利妥昔单抗可

有效提高 Treg 细胞水平,维持长期疗效显著好于泼尼松和单纯的地塞米松,值得临床借鉴推广。但由于本研究样本量偏少,患者均为初治病人,对慢性难治性 ITP 患者是否有效,尚需更多的临床研究加以证实。

参考文献

- 1 张璐娟,张 钊. CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞在特发性血小板减少性紫癜发病中的研究新进展[J]. 中国实验血液学杂志,2008,16(4):950-953.
- 2 Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, 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 赵 霞,丁慧芳,郭成山,等. 间充质干细胞对原发免疫性血小板减少症患者 T 细胞分泌细胞因子及调节性 T 细胞水平影响的体外研究[J]. 中华血液学杂志,2013,34(12):1015-1019.
- 4 Shao Q, Ning H, Lv J, et al. Regulation of Th1/Th2 polarization by tissue inhibitor of metalloproteinase-3 via modulating dendritic cells[J]. Blood, 2012, 119(20):4636-4644.
- 5 中华医学会血液学分会血栓与止血学组. 成人原发免疫性血小板减少症诊治的中国专家共识(修订版)[J]. 中华血液学杂志, 2011, 32(3):214-216.
- 6 Zaja F, Vianelli N, Volpetti S, et al. Low-dose rituximab in adult patients with primary immune thrombocytopenia[J]. Eur J Haematol, 2010, 85(4):329-334.
- 7 汪 俭,许 喆,程邦宁. 急性原发免疫性血小板减少症患者 T 淋巴细胞亚群 NK 细胞及 B 细胞变化的探讨[J]. 安徽医学,2012,33(3):280-281.
- 8 胡成琳. 对免疫性血小板减少症发病机制及治疗的研究进展[J]. 重庆医学,2012,41(24):2541-2544.
- 9 隋 涛,张 磊,周泽平,等. 两种小剂量利妥昔单抗治疗方案治疗原发免疫性血小板减少症疗效比较[J]. 中华血液学杂志, 2011, 32(9):583-586.

[收稿日期 2015-04-07][本文编辑 黄晓红]

临床研究·论著

便携式低频电刺激治疗仪用于产后整体康复的临床价值

陆翠英, 张小玲, 李智卿, 刘月美

作者单位: 528400 广东, 中山市南区医院妇产科(陆翠英, 李智卿, 刘月美); 529200 广东, 台山市妇幼保健院 B 超科(张小玲)
作者简介: 陆翠英(1967-), 女, 大学本科, 学士学位, 主治医师, 研究方向: 产后整体康复治疗。E-mail: zag_zhang@126.com

[摘要] 目的 探讨便携式低频电刺激治疗仪用于顺产后泌乳、子宫复旧与恶露排出及盆底组织康复的临床价值。方法 选取该院住院顺产分娩的产妇 600 例, 随机分为治疗组和对照组各 300 例。治疗组采用便携式低频电刺激治疗仪治疗; 对照组产后进行母乳喂养宣教, 指导盆底肌训练(即 Kegel 运动), 不予其他任何治疗。比较两组产妇产后泌乳、子宫复旧与恶露量及盆底组织康复情况。结果 治疗组泌乳、子宫复旧与恶露量减少及盆底肌肉肌力恢复明显优于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 便携式低频电刺激治疗仪可以用于产后泌乳、子宫复旧与恶露及盆底组织康复治疗, 效果显著, 值得临床推广应用。

[关键词] 低频电刺激泌乳; 子宫复旧; 盆底功能障碍

[中图分类号] R 714 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2015)12-1163-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2015.12.16

Clinical research on postpartum rehabilitation using portable low-frequency electrical stimulation therapy apparatus LU Cui-ying, ZHANG Xiao-ling, LI Zhi-qing, et al. Department of Obstetrics and Gynecology, the Southern Area Hospital of Zhongshan City, Guangdong 528400, China

[Abstract] **Objective** To study the promotion of lactation and uterine instauration and the influence of lochia and pelvic floor rehabilitation after natural birth, using portable low-frequency electrical stimulation therapy apparatus and to summarize its clinical application value. **Methods** Six hundred cases with natural childbirth in hospital were randomly divided into the treatment group($n=300$) and the control group($n=300$). The treatment group was