



杨仁池主任, 中国医学科学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所)血栓与止血诊疗中心主任、博士研究生导师, 卫生部有突出贡献中青年专家, 享受国务院政府特殊津贴人员。主要从事免疫性血小板减少症(ITP)的发病机制和凝血因子抑制物发生机理的研究。在*Leukemia*、*Journal of Hematology & Oncology*、*Haematologica*和*British Journal of Haematology*等国际学术期刊上发表了研究成果, 相关成果获得了国家科技进步二等奖、天津市科技进步一等奖、教育部科技进步二等奖等多个奖项。



李慧媛, 中国医学科学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所)实验血液学国家重点实验室副研究员、硕士研究生导师, 天津市创新人才推进计划青年科技优秀人才。主要从事免疫性血小板减少症(ITP)的发病机制研究。在*Haematologica*和*British Journal of Haematology*等国际学术期刊上发表了研究成果, 相关成果获得了中华医学科技奖三等奖及华夏医学科技奖三等奖。

免疫性血小板减少症与机体免疫失衡

王夕妍 李慧媛* 杨仁池*

(中国医学科学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所), 实验血液学国家重点实验室, 国家血液系统疾病临床医学研究中心, 细胞生态海河实验室, 天津 300020)

摘要 免疫性血小板减少症(ITP)是一种自身免疫性出血性疾病, 多种免疫相关机制参与其中。B细胞产生抗血小板抗体介导巨噬细胞吞噬血小板被认为是ITP经典的发病机制。T细胞亚群以及相关细胞因子介导的细胞免疫失衡在ITP中也逐渐被证实。此外, 抗原提呈细胞、间充质干细胞等免疫细胞失衡、基因表达异常、感染、代谢等因素造成的免疫微环境失调在ITP发病中的作用也逐渐受到重视。该文拟就ITP免疫机制以及相关研究进行综述。

关键词 免疫性血小板减少症; 体液免疫; 细胞免疫; DNA甲基化

Immune Imbalance in Immune Thrombocytopenia

WANG Xiyan, LI Huiyuan*, YANG Renchi*

(State Key Laboratory of Experimental Hematology, National Clinical Research Center for Blood Diseases, Haihe Laboratory of Cell Ecosystem, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

收稿日期: 2021-11-05 接受日期: 2021-12-07

国家自然科学基金面上项目(批准号: 82070125)资助的课题

*通讯作者。Tel: 022-23909063, E-mail: lihuiyuan@ihcams.ac.cn; Tel: 022-23909032, E-mail: rcyang65@163.com

Received: November 5, 2021 Accepted: December 7, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82070125)

*Corresponding authors. Tel: +86-22-23909063, E-mail: lihuiyuan@ihcams.ac.cn; Tel: +86-22-23909032, E-mail: rcyang65@163.com

Abstract ITP (immune thrombocytopenia) is an autoimmune bleeding disease in which multiple immune-related mechanisms are involved. Anti-platelet antibody produced by B cells to mediate platelet phagocytosis by macrophages is considered to be the classic pathogenesis of ITP. The imbalance of cellular immunity mediated by T cell subsets and related cytokines is gradually confirmed in ITP. In addition, the role of immune microenvironment disorders caused by the imbalance of immune cells such as antigen-presenting cells and mesenchymal stem cells, abnormal gene expression, infection, metabolism in the pathogenesis of ITP has gradually received attention. This study intends to review the immune mechanism of ITP and related research.

Keywords immune thrombocytopenia; humoral immunity; cellular immunity; DNA methylation

免疫性血小板减少症 (immune thrombocytopenia, ITP) 是一种以血小板生成减少和破坏增多为特征的自身免疫性疾病。ITP 发病机制复杂, 尚未被完全阐明, 目前普遍认为体液免疫、细胞免疫、遗传易感性、基因表达异常、感染等多种免疫相关机制参与其中。探索 ITP 的发病机制有助于加深对该疾病的认识, 从而开发新药或新的治疗方法以进一步提高其临床疗效。本文拟就 ITP 的免疫机制及相关研究成果进行综述。

1 B细胞介导的体液免疫失衡

1.1 自身抗体介导的血小板破坏

ITP 患者体液免疫失衡, B 细胞增殖分化为浆细胞, 随后浆细胞分泌以 IgG 为主的抗血小板抗体被认为是血小板破坏增多的主要原因。约 60% 的 ITP 患者中可检测到自身抗体的存在, 这类抗体主要识别血小板膜糖蛋白 (glycoprotein, GP) 抗原 GPIIb/IIIa 和 GPIb/IX, 而这两种抗原分别通过依赖或不依赖 Fc γ 受体 (Fc γ receptor, Fc γ R) 的方式, 介导肝脾巨噬细胞对血小板的清除、抑制巨核细胞增殖成熟、调理血小板参与 ITP 的发生^[1-2]。LEYTIN 等^[3]通过向 C57BL/6 小鼠中注射抗小鼠 GPIIb 抗体成功诱导了 ITP 小鼠模型, 并且使血小板表现为线粒体跨膜电位去极化、caspase-3 活化增强和磷脂酰丝氨酸暴露等特点, 说明自身抗体是 ITP 的致病因素, 并且加速了血小板的凋亡。

此外, 血小板生成素 (thrombopoietin, TPO) 或 TPO 受体 (cMpl) 的自身抗体也可能在 ITP 中发挥病理作用。TPO 是高特异性血小板刺激因子和巨核细胞的内源性生长因子, 可与巨核细胞表面 cMpl 配体结合, 激活 JAK 和 STAT 通路, 刺激巨核细胞增殖、分化成熟, 促进血小板生成。一项研究发现, 部分 ITP 患者中存在抗 TPO、抗 cMpl 或抗 TPO/cMpl 复合物

的自身抗体, 这些抗体具有干扰巨核细胞生长和血小板生成的潜力, 但其在 ITP 中的具体致病机制以及在临床中的应用价值有待进一步研究^[4]。

1.2 B细胞亚群失衡

我们的研究发现, 活动性 ITP 患者外周血 CD19⁺ B 细胞比例升高, B 细胞亚群中 CD27⁺ 记忆 B 细胞比例升高, CD27⁻ 初始 B 细胞比例下降^[5]。记忆 B 细胞对于提呈至 B 细胞表面或分子模拟的血小板抗原具有更迅速、更强烈的免疫应答, 从而加速血小板抗体的产生^[2]。CD72 是 B 细胞的共同受体, 在 B 细胞受体 (B-cell receptor, BCR) 信号转导过程中具有双重调节作用。进一步研究发现, ITP 患者记忆 B 细胞表面 CD72 表达和 CD4⁺ T 细胞表面 CD40L 表达上调, 并且 CD72 表达上调与血小板计数减低、抗血小板自身抗体阳性相关。体外实验表明, CD40L 可以特异性诱导记忆 B 细胞 CD72 表达上调, 白细胞介素 -10 (interleukin-10, IL-10) 和 B 细胞活化因子 (B cell activating factor, BAFF) 在此过程中起促进作用^[5]。CD72 的表达上调对于记忆 B 细胞的影响有待进一步研究。然而, 在活动性 ITP 患者体内 CD72 mRNA 总体表达水平下降。我们推测 CD72 的表达下调可能导致 BCR 信号的负调节功能减弱, 抗原提呈能力病理性增强, 从而使得自身抗体产生导致 ITP 的发生^[6]。另外, 我们在中国人群中观察到了 CD72 多态性与 ITP 患者的发病年龄相关^[7]。

除了分泌自身抗体的 B 细胞群外, 人们还发现一类通过分泌 IL-10 等细胞因子或通过效应 T 细胞和单核细胞接触性抑制作用介导负向免疫调节功能的 B 细胞, 称之为调节性 B 细胞 (regulatory B cell, Breg)。在 ITP 患者中, 外周血 CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} Breg 数量以及 IL-10、转化生长因子 - β (transforming growth factor- β , TGF- β) 水平显著低于正常对照^[8], 提示 ITP 患者 Breg 数量和功能均存在缺陷。

ITP患者骨髓中同样存在B细胞亚群失衡,表现为总B细胞、初始B细胞减少,自身抗体阳性的ITP患者骨髓长寿命浆细胞(long-lived plasma cells, LLPCs)数量增加。LLPCs分泌的自身抗体可与骨髓巨核细胞或释放的血小板结合,导致血小板生成减少和破坏增加。此外,ITP患者骨髓Breg数量和免疫抑制功能下降,表现为IL-10和TGF- β 生成量减少,从而抑制了单核细胞表达肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的能力、诱导Th1和调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)分化的能力^[9]。

1.3 B细胞相关因子失衡

BAFF、增殖诱导配体(a proliferation-inducing ligand, APRIL)和趋化因子配体13(CXC chemokine ligand 13, CXCL13)是与B细胞成熟和存活密切相关的细胞因子和趋化因子。BAFF和APRIL均属于TNF超家族成员,BAFF可以与BAFF受体(B cell activation factor receptor, BAFF-R)、钙调和亲环素配基相互作用因子(transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor, TACI)和B细胞成熟抗原(B cell maturation antigen, BCMA) 3种受体结合,APRIL可以与TACI和BCMA结合。BAFF和APRIL过表达会促进自身反应性B细胞活化增殖并分泌大量自身抗体,破坏自身免疫耐受,导致自身免疫性疾病的发生。CXCL13-趋化因子受体5(C-X-C chemokine receptor type 5, CXCR5)轴对于驱动B细胞进入次级淋巴组织至关重要^[9-11]。

我们的研究表明,未治疗的ITP患者血清BAFF水平高于正常对照,治疗后ITP患者BAFF水平显著下降。我们对ITP患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)和脾脏单个核细胞(splenocytes mononuclear cell, SPMNC)中的BAFF和BAFF-R mRNA进行了分析,发现SPMNC是BAFF mRNA过表达的主要部位,其表达量与血清BAFF-R水平呈正相关,提示了BAFF与BAFF-R可能参与了ITP的发生^[12]。BAFF不仅影响B细胞,还显著促进ITP患者CD8⁺T细胞存活,并影响部分T细胞介导的炎症反应的进程^[13]。因此,BAFF可能是通过改变T细胞免疫反应介导ITP的发生。此外,我们对APRIL及其受体进行了分析,发现活动性ITP患者血清APRIL过表达,PBMC可能是过量APRIL的来源。接受糖皮质激素或脾切除术缓解的ITP患者血清APRIL水平下降。APRIL可

能通过促进自身反应性B细胞和T细胞存活、增强B细胞抗原呈递能力、促进Th1反应等机制参与ITP发生^[14]。在ITP患者骨髓中同样发现了BAFF、APRIL的过表达,以及CXCL13-CXCR5轴的过度激活^[9],ITP促炎的骨髓微环境导致了骨髓B细胞群失调,进而参与了ITP的发展。

磷酸酶和张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten, PTEN)被认为通过负调节磷酸肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)信号通路介导B细胞活化,PTEN缺陷的B细胞在接受刺激后表现为过度激活和增殖。我们的研究发现,ITP患者未成熟的初始B细胞亚群PTEN表达下调,其水平与血小板计数呈正相关^[15]。我们随后利用IL-21成功诱导了正常B细胞中PTEN的表达,而在从ITP患者分离的B细胞中利用IL-21诱导PTEN表达失败,表明ITP患者存在PTEN表达降低和功能缺陷,这可能导致B细胞的高反应性,从而介导ITP的发生发展^[15]。

近年来,BAFF/APRIL拮抗剂阿塞西普和贝利木单抗在治疗自身免疫性疾病方面的有效性和安全性逐渐得到验证^[16-17]。B细胞相关因子不仅可作为ITP的生物标志物,而且以其为靶点的药物有望成为治疗ITP的新的途径。

2 T细胞介导的细胞免疫失衡

2.1 CD4⁺T细胞亚群失衡

ITP患者CD4⁺T细胞增殖及凋亡存在异常,我们研究发现这可能与ITP患者CD4⁺T细胞中*Bmi-1*表达增加相关^[18]。*Bmi-1*是多梳组(Polycomb group, PcG)基因之一,可调控细胞的自我更新和分化。活动性ITP患者CD4⁺T细胞中*Bmi-1*表达增加可能导致自身反应性CD4⁺T细胞增殖和抗凋亡能力增强,从而参与抗血小板自身抗体的产生。

此外,ITP患者T细胞的亚群分布也存在明显偏移。Th1由IL-12和 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)诱导分化,特异性表达转录因子T-bet,主要分泌IFN- γ 和IL-2等细胞因子辅助细胞免疫反应。Th2细胞由IL-4诱导分化,特异性表达转录因子GATA结合蛋白-3(GATA binding protein-3, GATA-3),并分泌IL-4、IL-5、IL-9、IL-10和IL-13等多种细胞因子辅助体液免疫反应^[19]。我们的研究表明,ITP患者PBMC中的T-bet/GATA-3值升高,其可以作为衡

量Th1/Th2水平的替代标志物,同时证实ITP的CD4⁺辅助性T细胞(helper T cell, Th)和CD8⁺杀伤性T细胞(cytotoxic T cell, Tc或CTL)群中存在T1细胞极化,即Th1/Th2、Tc1/Tc2显著升高^[20]。相应地,我们的研究发现Th1相关趋化因子CXCL10和CXCL16在ITP患者血浆中的浓度高于正常对照^[20],且CXCL10基因-201 G/A及Th1特异性转录因子T-box转录因子基因(TBX21) -1993 T/C多态性可能与中国人群ITP的易感性有关^[21]。CD26和CD30分别与Th1和Th2反应相关,然而活动性ITP患者的血浆sCD30水平、sCD30/sCD26值升高,我们推测这可能与机体在Th1极化状态下尝试进行负反馈调节有关^[22]。

Th17是一类主要分泌IL-17、IL-21、IL-6等细胞因子的Th细胞亚群,介导机体自身免疫反应与炎症反应。我们在ITP模型小鼠和慢性ITP患者PBMNC中均观察到了Th17水平的升高,并且在ITP小鼠的SPMNC中观察到了Th17比例和相关细胞因子IL-17F、IL-17A和IL-6 mRNA表达增加。此外,我们在中国人群中观察到IL-17F rs763780保护性等位基因G的频率降低与女性ITP易感性相关。以上说明Th17的异常参与了ITP的病理机制^[23]。

Treg是一群以高表达CD25和Foxp3为特征的CD4⁺T细胞,通过分泌TGF- β 、IL-10等抑制性细胞因子,细胞间抑制性接触或促进耐受性抗原提呈细胞(antigen-presenting cell, APC)表型等途径发挥免疫抑制作用,维持自身免疫耐受。活动性和未缓解的ITP患者外周血与脾脏的Treg数量和其对效应细胞增殖的抑制功能均显著降低,促炎细胞因子生成增加,从而导致自身免疫过程的持续存在,造成持续性血小板破坏^[19]。此外,我们在中国人群中观察到FOXP3基因的-3279 A/C多态性可能与慢性ITP的易感性相关^[24]。Toll样受体(Toll-like receptor, TLR)是模式识别受体的一个家族,可识别大量微生物共享的病原体相关分子模式,同时也可识别宿主细胞损伤或死亡时释放的信号,从而参与免疫耐受和免疫监视。我们的研究发现,活动性ITP患者单核细胞TLR4的表达降低,并与血小板数呈正相关^[25]。体外实验表明,用脂多糖刺激单核细胞可上调TLR4表达,从而促进Treg分化,使得Th17/Treg值下降,IL-10、TGF- β 水平上调。因此,TLR4可能在ITP的发病机制中起保护作用,TLR4减少可能通过调节细胞因子分泌和Treg分化介导Treg下调^[25]。相反,活动期

ITP单核细胞TLR2 mRNA的表达显著升高。体外实验表明,TLR2活化能够诱导ITP患者PBMNC通过髓样分化因子88依赖的方式表达TNF- α 及IL-6,因此,ITP患者高表达的TLR2可能通过促进炎症细胞因子的分泌介导ITP发生发展^[26]。

滤泡辅助性T细胞(follicular helper T cell, Tfh)通过支持生发中心B细胞的存活、亲和力成熟和免疫球蛋白同型转换来促进体液免疫反应。在ITP患者尤其是抗血小板抗体阳性的患者中,外周血和脾脏Tfh数量增加,分泌IL-21增加。体外实验证实,ITP患者脾脏B细胞可在IL-21等因子的刺激下分化为浆细胞并产生抗血小板抗体^[19,27]。因此,靶向Tfh、IL-21可作为ITP治疗的方向。

2.2 CD8⁺T细胞亚群失衡

CTL通过多种机制参与ITP的发生。多数学者认为,CTL对血小板的直接杀伤作用是自身抗体阴性ITP患者的主要致病机制。CTL在ITP中的致病机制包括分泌穿孔素、颗粒酶诱导靶细胞凋亡;诱导血小板GPIb-IX复合物去唾液酸化,加速血小板被肝脏巨噬细胞清除的过程;抑制巨核细胞凋亡,使巨核细胞生成血小板受阻等^[28]。

CD8⁺CD28⁻抑制性T细胞(suppressor T cell, Ts)可以通过上调APC表面白细胞免疫球蛋白类受体亚家族B成员4(leukocyte immunoglobulin like receptor subfamily B member 4, LILRB4)和LILRB2的表达、下调CD80表达以及分泌IL-10等方式抑制T细胞增殖以及细胞毒作用,诱导致耐受性APC。活动性ITP患者Ts的数量和功能下调,表现为激活后Ts细胞表面的诱导共刺激分子表达降低,上调APC表面共刺激因子和下调CD80表达的能力丧失,从而导致免疫失耐受^[29]。

2.3 T细胞相关因子失衡

除了上述提及的T细胞分泌的主要细胞因子外,还有其他因子被证实与ITP免疫失衡的发生相关。

IL-27和IL-35属于IL-12细胞因子家族成员。我们的研究发现,活动性ITP患者中的IL-27水平高于正常对照和缓解期ITP患者,IL-27可通过诱导PBMNC分泌TNF- α 、IFN- γ 和颗粒酶B等促炎因子促进Th1极化,增强CTL作用^[30]。然而,活动性ITP患者的IL-35水平低于正常对照。IL-35具有抑制CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞的增殖、诱导Treg增殖分化、促进IL-10和TGF- β 分泌、抑制IFN- γ 和IL-17A分泌的作用^[31]。

因此, IL-27和IL-35的失调可通过调节其他免疫细胞因子影响T细胞亚群, 参与ITP的病理机制。IL-7对T细胞具有诱导增殖和抗凋亡的作用, 体外实验表明, IL-7可促进自体血小板凋亡, 增加外周血和骨髓淋巴细胞IFN- γ 、TNF- α 和IL-10的分泌。我们发现ITP患者外周血IL-7水平低于正常对照, 我们推测这可能是机体对于炎症状态负反馈调节的结果^[32]。

瘦素是由脂肪细胞产生的一种激素样细胞因子, 其水平下降可导致T细胞免疫功能受到抑制。我们的研究发现, 慢性ITP患者血浆瘦素水平显著升高。体外实验证实, 瘦素可以增加血小板反应性T细胞数量, 促进IgG抗血小板抗体的产生。瘦素还可能通过增强Th1极化优势参与ITP的发生^[33-34]。信号素5A(semaphorin 5A, Sema5A)已被证明与细胞免疫反应有关^[35]。慢性ITP患者血浆Sema5A升高, 并与疾病活动相关。Sema5A可能通过下调受体plexin-B3表达参与Th1极化, 监测血浆中Sema5A的水平可能有助于反映ITP的活性^[36]。

此外, ITP患者CD4⁺和CD8⁺T细胞存在脂筏聚集增加。脂筏是细胞膜上富含胆固醇和鞘磷脂的微结构域, ITP患者CD4⁺和CD8⁺T细胞中蛋白酪氨酸磷酸酶(protein tyrosine phosphatase, PTP) CD45和脂筏的共定位升高导致T细胞自发激活, 进而导致脂筏结构和锚蛋白异常, 这些异常反过来又促进了TCR介导的T细胞活化^[37]。而脂筏的这种异常不受血小板数或治疗方案的影响, 因此, 缓解期ITP患者的免疫微环境可能仍存在异常。非受体型PTP22(*PTPN22*)基因在抑制TCR信号转导中起关键作用, 我们在中国人群中观察到了*PTPN22* -1123 G>C多态性与ITP易感性之间存在关联^[38]。

3 其他免疫细胞介导的免疫失衡

活动性ITP患者的促炎单核细胞频率与刺激后产生的TNF- α 水平增加, 进而促进Th1发育、破坏机体免疫耐受^[39]。人单核细胞可以细分为经典型、中间型和非经典型3个子集。ITP患者中间型和非经典型单核细胞频率增加最为显著, 前者促进了TNF- α 、IL-1 β 等炎症细胞因子的分泌, 后者刺激了血小板反应性T细胞增殖和IFN- γ 分泌^[40]。此外, ITP患者单核细胞和巨噬细胞表面活化性受体Fc γ I和Fc γ IIa表达增加, 抑制性受体Fc γ IIb表达降低, 提示了单核细胞和巨噬细胞抗原提呈能力的增强^[41]。

树突状细胞(dendritic cell, DC)是最有效的APC, 它能够有效地呈递抗原并维持机体的免疫稳态, CD70-CD27是除了经典的CD28-CD80/86通路之外重要的T细胞活化共刺激信号。ITP患者DC在接受了抗CD70抗体刺激后, 诱导T细胞增殖的能力增强, 但T细胞向Treg分化的能力受到损害, 同时Th0细胞向Th1细胞方向分化增多^[42]。TNF诱导蛋白3基因编码泛素修饰酶A20, 该酶通过TLR等通路终止NF- κ B激活来限制炎症, 并调节DC功能减弱抗原呈递。我们的研究表明, *TNFAIP3*多态性影响了中国人群慢性ITP的易感性^[43]。

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一种多能干细胞, 具有免疫抑制特性。ITP患者骨髓MSCs功能存在缺陷, 包括增殖受损、形态异常和过度凋亡, 诱导Treg、Ts细胞免疫抑制功能损伤等。在ITP中, 输注外源性脐血MSCs(umbilical cord mesenchymal stem cells, UC-MSCs)可以通过抑制CD8⁺T细胞的激活以及FasL和TNF- α 的表达抑制CTL介导的血小板破坏, 恢复Th1/Th2/Treg细胞因子谱的失衡状态以及Ts的数量和功能, 促进血小板生成、减少血小板和巨核细胞凋亡。基于UC-MSCs的细胞疗法可能是ITP的一种潜在疗法^[44-46]。

4 基因表达异常

4.1 DNA甲基化异常

表观遗传学在ITP病因学中的作用逐渐受到关注, DNA甲基化在基因转录中起重要作用, 是免疫系统表观遗传学研究的重点。DNA甲基化是在DNA甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)的催化下, 以S-腺苷甲硫氨酸(*S*-adenosyl methionine, SAM)作为甲基的供体, 在胞嘧啶环的第五个碳原子上共价添加一个甲基产生5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5mC), 从而将SAM转化为S-腺苷高半胱氨酸(*S*-adenosyl-*L*-homocysteine, SAH)的过程。典型的DNMTs包括DNMT1、DNMT3A和DNMT3B^[47-48]。DNA的低甲基化主要通过诱导甲基化敏感基因的过表达参与自身免疫性疾病的发生。

ITP患者淋巴细胞DNA甲基化水平显著低于健康人群, 表现为血浆SAH浓度增加、DNMT3A和DNMT3B表达水平降低^[49]。CD70和CD11a共刺激分子对T、B细胞的存活至关重要。活动性ITP患者

CD70和CD11a存在过表达, CD70可促进CD8⁺ T细胞的存活并加强细胞毒性T细胞介导的血小板裂解, 而CD11a可促进B细胞的存活和抗体介导的血小板破坏^[50]。ITP患者CD70过表达与低甲基化相关, 这可能是由DNMTs和甲基化CpG结合域2(methyl-CpG-binding domain 2, MBD2)的去甲基化酶作用所致^[51]。CD11a过表达可能与DNMT3A和DNMT3B表达降低导致的低甲基化相关, 异常的CD11a表达还可能引起T1/T2失衡^[49]。我们随后进一步研究了ITP患者T细胞的基因组甲基化状态, 发现CD4⁺ T细胞中*MBD2*和*MBD4* mRNA水平显著低于正常对照, 并且可能与Th1极化相关^[52]。MBD蛋白作为转录阻遏物, 可能通过基因沉默效应促进CD4⁺ T细胞低甲基化的发生, 参与ITP的病理机制。

4.2 非编码RNA异常

微小RNA(microRNA, miRNA)是一种短链非编码RNA, 可通过抑制特定mRNA的翻译或降解来负调节靶基因转录。目前, 在ITP患者中已检测到多种免疫相关miRNA的异常表达, 这些异常的表达会影响ITP患者淋巴细胞亚群、巨核细胞和血小板的增殖分化和功能^[53]。*IFNG*(interferon-gamma)已被验证为miR-409-3p的靶基因之一。在ITP患者中, PBMNC中辅因子DiGeorge综合征临界区基因8(DiGeorge syndrome critical region gene 8, *DGCR8*)水平下降导致miR-409-3p下调, 介导了*IFNG*的表达上调^[54]。同样, 活动性和慢性ITP患者PBMNC中miR-130a下调后, 其对靶基因*TGFB1*(transforming growth factor beta 1)和*IL-18*的负调控作用减弱, *IL-18*水平升高可能会增强Th1免疫反应, 而*TGFβ1*由于Treg和*IL-10*等因素调节, 其总体血浆水平是降低的^[55]。缓解后的ITP患者miR-409-3p和miR-130a表达恢复。此外, miR-98-5p在ITP患者MSCs中的表达上调, 其通过靶向胰岛素样生长因子-2(insulin-like growth factor-2, *IGF-2*) mRNA结合蛋白1导致*IGF-2*下调, 从而抑制PI3K/Akt信号通路, 导致MSC缺陷。全反式视黄酸可通过下调miR-98-5p保护MSCs免于凋亡, 为ITP提供了一种潜在的治疗方法^[56]。MiRNA不仅参与ITP的发病机制, 也可作为ITP的生物标志物, 为预后、分期和治疗反应提供更准确的信息。

另外, TMEVPG1(Theiler's murine encephalomyelitis virus persistence candidate gene 1)是一种

长链非编码RNA, 可以作为增强子促进*IFNG*转录。活动性ITP患者PBMNC中TMEVPG1下调, 下调的TMEVPG1可能与miR-409-3p共同促进*IFNG*转录, 上调*IFN-γ*水平, 介导ITP的病理机制^[57]。

4.3 端粒/端粒酶系统异常

端粒是真核细胞线性染色体末端的特殊DNA蛋白质结构, 负责维持基因组和细胞稳定性以及调节细胞生长。端粒酶是通过复制和延长端粒DNA来稳定染色体端粒长度的一种核蛋白逆转录酶。淋巴细胞的端粒缩短被认为代表了免疫系统的老化, 端粒酶活性增强反映了细胞较高的激活和增殖水平。我们发现ITP患者PBMNC的相对端粒长度明显短于健康对照, 难治性ITP患者尤为显著, 端粒长度与ITP疾病严重程度存在相关性。ITP患者CD4⁺、CD8⁺ T细胞和CD19⁺ B细胞的端粒酶活性增强, 以CD19⁺ B细胞更为显著, 说明了ITP患者淋巴细胞存在异常活化, 以体液免疫激活为主。端粒/端粒酶系统异常调节可能参与了ITP的发病机制, 并且可能作为ITP患者疾病进展、预后的预测标志物^[58]。

5 其他免疫相关影响因素

感染是ITP重要的诱因之一。首诊的急性ITP患者部分有前驱感染病史, 慢性ITP患者与持续感染也存在关联。ITP相关的常见病原体包括幽门螺杆菌、艾滋病毒、肝炎病毒、流感病毒、EB病毒等。这些病原体可通过模拟血小板抗原从而产生交叉抗原反应、调节单核巨噬细胞表面的FcγR平衡、产生高氧化应激反应破坏血小板功能、非特异性刺激自身反应性T细胞和B细胞等方式介导ITP的病理机制, 根除感染因素有利于ITP的缓解^[59-60]。

1α,25-二羟基维生素D3[1,25(OH)₂D3]和维生素D受体(vitamin D3 receptor, VDR)在免疫系统中发挥重要的免疫抑制作用。我们的研究发现, 活动性ITP患者1,25(OH)₂D3/VDR水平降低。1,25(OH)₂D3对ITP患者具有显著的抗炎作用, 包括抑制PBMNC的增殖、逆转异常的T细胞极化、诱导Treg分化、调节抗炎和促炎细胞因子的分泌。1,25(OH)₂D3/VDR降低可能参与了ITP的发生, 补充1,25(OH)₂D3可能是ITP有效的治疗方式^[61]。

程序性死亡受体-1(programmed death-1, PD-1)和配体PD-L在维持外周免疫耐受中起到重要作用。活动性ITP患者CD4⁺ T细胞和CD8⁺ T细胞显示出更高的

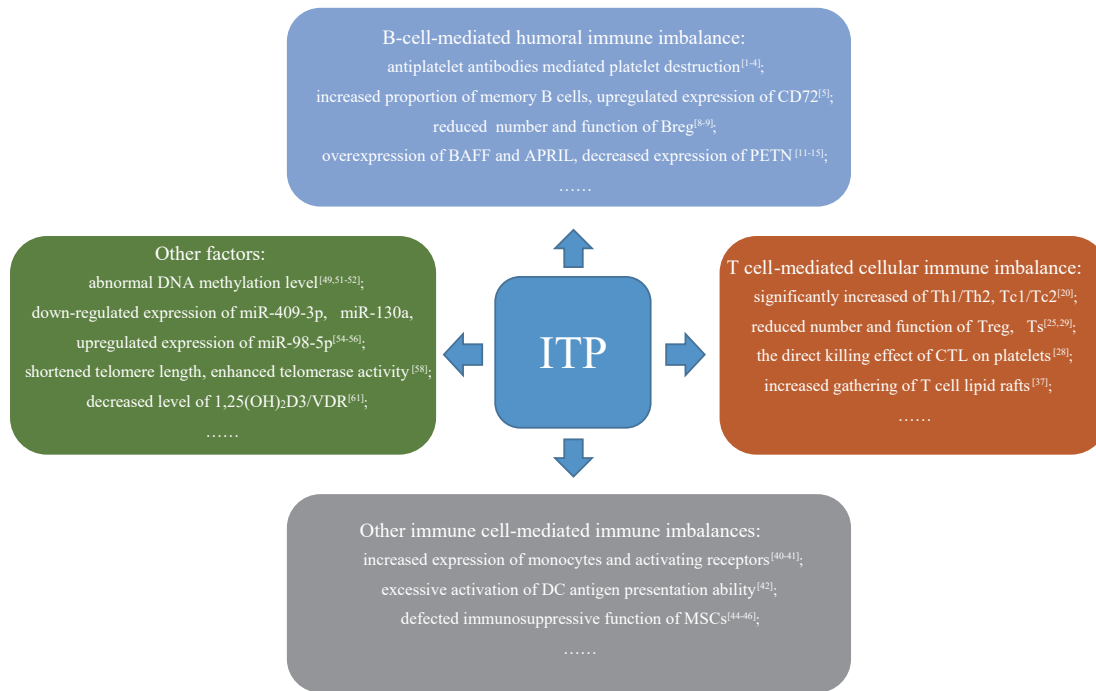


图1 ITP患者免疫失衡相关机制

Fig.1 Related mechanisms of immune imbalance in ITP patients

激活状态, PD-1表达显著增加, 而DC表面PD-L1表达受损。因此, 在T细胞活化期间PD-1/PD-L1触发的抑制性共刺激信号不足, 可能导致自身反应性T细胞的激活, 从而介导了ITP的发病。上调PD-1/PD-L1通路可能有助于通过促进T细胞凋亡、抑制T细胞活化增殖以及减少炎症因子的分泌改善ITP患者的免疫状态, 促进ITP缓解^[62]。

6 总结展望

ITP发病机制复杂, 是免疫细胞及相关因子紊乱、基因表达异常、感染等相关因素共同导致的结果(图1)。随着对ITP的发病机制更深入的探索, 更多新药和新的治疗思路将会产生。由于不同ITP患者机体免疫失衡状态存在差异, 对药物治疗反应不尽相同, 因此对ITP发病机制更系统精确的认识有助于临床医生有针对性地制定个体化治疗方案, 进一步提高ITP治疗疗效。

参考文献 (References)

- [1] AMINI S N, PORCELIJN L, SOBELS A, et al. Anti-glycoprotein antibodies and sequestration pattern of Indium labeled platelets in immune thrombocytopenia [J]. Blood advances, 2021, doi: doi: 10.1182/bloodadvances.2021004822.
- [2] SWINKELS M, RIJKERS M, VOORBERG J, et al. Emerging concepts in immune thrombocytopenia [J]. Front Immunol, 2018, 9: 880.
- [3] LEYTIN V, MYKHAYLOV S, STARKEY A F, et al. Intravenous immunoglobulin inhibits anti-glycoprotein IIb-induced platelet apoptosis in a murine model of immune thrombocytopenia [J]. Br J Haematol, 2006, 133(1): 78-82.
- [4] NAZY I, KELTON J G, MOORE J C, et al. Autoantibodies to thrombopoietin and the thrombopoietin receptor in patients with immune thrombocytopenia [J]. Br J Haematol, 2018, 181(2): 234-41.
- [5] LYU M, HAO Y, LI Y, et al. Upregulation of CD72 expression on CD19⁺ CD27⁺ memory B cells by CD40L in primary immune thrombocytopenia [J]. Br J Haematol, 2017, 178(2): 308-18.
- [6] ZHOU H, QI A P, LI H Y, et al. CD72 gene expression in immune thrombocytopenia [J]. Platelets, 2012, 23(8): 638-44.
- [7] XU J, LU S, TAO J, et al. CD72 polymorphism associated with child-onset of idiopathic thrombocytopenic purpura in Chinese patients [J]. J Clin Immunol, 2008, 28(3): 214-9.
- [8] 朱世荣, 湛海燕, 王明镜, 等. 免疫性血小板减少症患者调节性B细胞变化与临床意义[J]. 中国实验血液学杂志(ZHU S R, CHEN H Y, WANG M J, et al. Level of regulatory B cells in patients with immune thrombocytopenia and its clinical significance [J]. Journal of Experimental Hematology), 2019, 27(1): 175-9.
- [9] YU T, WANG H, ZHAO Y, et al. Abnormalities of bone marrow B cells and plasma cells in primary immune thrombocytopenia [J]. Blood Adv, 2021, 5(20): 4087-101.
- [10] KAMHIEH-MILZ J, GHOSOUN N, STERZER V, et al. Effect of glucocorticoid treatment on BAFF and APRIL expression in patients with immune thrombocytopenia (ITP) [J]. Clin Immunol, 2018, 188: 74-80.
- [11] LIU X G, HOU M. Immune thrombocytopenia and B-cell-acti-

- vating factor/a proliferation-inducing ligand [J]. *Semin Hematol*, 2013, 50(Suppl 1): S89-99.
- [12] ZHOU Z, CHEN Z, LI H, et al. BAFF and BAFF-R of peripheral blood and spleen mononuclear cells in idiopathic thrombocytopenic purpura [J]. *Autoimmunity*, 2009, 42(2): 112-9.
- [13] MIN Y N, WANG C Y, LI X X, et al. Participation of B-cell-activating factor receptors in the pathogenesis of immune thrombocytopenia [J]. *J Thromb Haemost*, 2016, 14(3): 559-71.
- [14] GU D, GE J, DU W, et al. Raised expression of APRIL in Chinese patients with immune thrombocytopenia and its clinical implications [J]. *Autoimmunity*, 2009, 42(8): 692-8.
- [15] WANG S, GUAN Y, WANG Y, et al. Reduced PTEN involved in primary immune thrombocytopenia via contributing to B cell hyper-responsiveness [J]. *Mol Immunol*, 2018, 93: 144-51.
- [16] SHIPA M, EMBLETON-THIRSK A, PARVAZ M, et al. Effectiveness of belimumab after rituximab in systemic lupus erythematosus: a randomized controlled trial [J]. *Ann Intern Med*, 2021, doi: 10.7326/M21-2078.
- [17] WALLACE D J, ISENBERG D A, MORAND E F, et al. Safety and clinical activity of atacicept in the long-term extension of the phase 2b ADDRESS II study in systemic lupus erythematosus [J]. *Rheumatology*, 2021, 60(11): 5379-89.
- [18] MA L, ZHOU Z, ZHANG D, et al. Bmi-1 regulates autoreactive CD4⁺ T cell survival in immune thrombocytopenia patients [J]. *J Clin Immunol*, 2012, 32(3): 505-13.
- [19] KOSTIC M, ZIVKOVIC N, CVETANOVIC A, et al. CD4⁺ T cell phenotypes in the pathogenesis of immune thrombocytopenia [J]. *Cell Immunol*, 2020, 351: 104096.
- [20] WANG T, ZHAO H, REN H, et al. Type 1 and type 2 T-cell profiles in idiopathic thrombocytopenic purpura [J]. *Haematologica*, 2005, 90(7): 914-23.
- [21] ZHANG D, ZHANG X, GE M, et al. The polymorphisms of T cell-specific TBX21 gene may contribute to the susceptibility of chronic immune thrombocytopenia in Chinese population [J]. *Hum Immunol*, 2014, 75(2): 129-33.
- [22] WANG H, GU X, LI H, et al. Levels of soluble CD30 and CD26 and their clinical significance in patients with primary immune thrombocytopenia [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 1279371.
- [23] LI H, ZHOU Z, TAI W, et al. Decreased frequency of IL-17F rs763780 site allele g is associated with genetic susceptibility to immune thrombocytopenia in a Chinese population [J]. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2017, 23(5): 466-71.
- [24] ZHANG D, ZHANG X, LI H, et al. Association of FOXP3 gene polymorphisms with chronic immune thrombocytopenia in a Chinese Han population [J]. *Int J Lab Hematol*, 2021, 43(5): 1104-9.
- [25] HAO Y, LI H, LI Y, et al. Decreased TLR4 expression on monocytes may cause regulatory T cells abnormality in patients with primary immune thrombocytopenia [J]. *Autoimmunity*, 2017, 50(5): 283-92.
- [26] 李慧媛, 张冬雷, 张岷, 等. Toll样受体2在原发免疫性血小板减少症中的作用研究 [J]. *中国实验血液学杂志* (LI H Y, ZHANG D L, ZHANG X, et al. Role of Toll-like receptor 2 in primary immune thrombocytopenia [J]. *Journal of Experimental Hematology*), 2014, 22(4): 1033-7.
- [27] AUDIA S, ROSSATO M, TRAD M, et al. B cell depleting therapy regulates splenic and circulating T follicular helper cells in immune thrombocytopenia [J]. *J Autoimmun*, 2017, 77: 89-95.
- [28] VRBENSKY J R, NAZY I, CLARE R, et al. T cell mediated autoimmunity in immune thrombocytopenia [J]. *Eur J Haematol*, 2021, 108(1): 18-27.
- [29] LI H, HAO Y, ZHANG D, et al. Numerical and functional defects in CD8⁺ CD28⁻ T-suppressor lymphocytes from patients with primary immune thrombocytopenia [J]. *Br J Haematol*, 2017, 178(2): 292-301.
- [30] LI H Y, ZHANG D L, GE J, et al. Elevated interleukin-27 enhances the polarization of Th1/Tc1 cells and the production of proinflammatory cytokines in primary immune thrombocytopenia [J]. *Hum Immunol*, 2012, 73(3): 240-7.
- [31] SUN T, ZHANG D, YANG Y, et al. Interleukin 35 may contribute to the loss of immunological self-tolerance in patients with primary immune thrombocytopenia [J]. *Br J Haematol*, 2015, 169(2): 278-85.
- [32] LI H Y, ZHANG D L, ZHANG X, et al. Interleukin-7 is decreased and maybe plays a pro-inflammatory function in primary immune thrombocytopenia [J]. *Platelets*, 2015, 26(3): 243-9.
- [33] REN H, ZHAO H, WANG T, et al. Leptin enhances in vitro secretion of IgG antiplatelet antibodies by splenocytes and peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura [J]. *Clin Immunol*, 2006, 120(2): 205-11.
- [34] ZHAN M, ZHAO H, YANG R, et al. Serum leptin levels in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura [J]. *Eur J Haematol*, 2004, 72(5): 348-52.
- [35] GRAS C, EIZ-VESPER B, JAIME S Y, et al. Secreted semaphorin 5A activates immune effector cells and is a biomarker for rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2014, 66(6): 1461-71.
- [36] LYU M, LI Y, HAO Y, et al. Elevated Semaphorin 5A correlated with Th1 polarization in patients with chronic immune thrombocytopenia [J]. *Thromb Res*, 2015, 136(5): 859-64.
- [37] ZHANG X, ZHANG D, LIU W, et al. Abnormal lipid rafts related ganglioside expression and signaling in T lymphocytes in immune thrombocytopenia patients [J]. *Autoimmunity*, 2016, 49(1): 58-68.
- [38] GE J, LI H, GU D, et al. PTPN22 -1123G > C polymorphism is associated with susceptibility to primary immune thrombocytopenia in Chinese population [J]. *Platelets*, 2013, 24(6): 448-53.
- [39] ZHAO Y, XU P, GUO L, et al. Tumor necrosis factor- α blockade corrects monocyte/macrophage imbalance in primary immune thrombocytopenia [J]. *Thromb Haemost*, 2021, 121(6): 767-81.
- [40] YANG Y, ZHANG X, ZHANG D, et al. Abnormal distribution and function of monocyte subsets in patients with primary immune thrombocytopenia [J]. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2017, 23(7): 786-92.
- [41] LIU X G, LIU S, FENG Q, et al. Thrombopoietin receptor agonists shift the balance of Fc γ receptors toward inhibitory receptor IIb on monocytes in ITP [J]. *Blood*, 2016, 128(6): 852-61.
- [42] ZHANG X, WANG Y, ZHANG D, et al. CD70-silenced dendritic cells induce immune tolerance in immune thrombocytopenia patients [J]. *Br J Haematol*, 2020, 191(3): 466-75.
- [43] ZHOU H, YANG J, LIU L, et al. The polymorphisms of tumor necrosis factor-induced protein 3 gene may contribute to the susceptibility of chronic primary immune thrombocytopenia in Chinese population [J]. *Platelets*, 2016, 27(1): 26-31.

- [44] LI H, GUAN Y, SUN B, et al. Role of bone marrow-derived mesenchymal stem cell defects in CD8⁺ CD28⁻ suppressor T-lymphocyte induction in patients with immune thrombocytopenia and associated mechanisms [J]. *Br J Haematol*, 2020, 191(5): 852-62.
- [45] MA L, ZHOU Z, ZHANG D, et al. Immunosuppressive function of mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix in immune thrombocytopenia patients [J]. *Thromb Haemost*, 2012, 107(5): 937-50.
- [46] ZHANG D, LI H, MA L, et al. The defective bone marrow-derived mesenchymal stem cells in patients with chronic immune thrombocytopenia [J]. *Autoimmunity*, 2014, 47(8): 519-29.
- [47] GOUDA H M, KAMEL N M, MESHAAL S S. Association of DNA methyltransferase 3b promotor polymorphism with childhood chronic immune thrombocytopenia [J]. *Lab Med*, 2016, 47(4): 312-7.
- [48] LYKO F. The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation [J]. *Nat Rev Genet*, 2018, 19(2): 81-92.
- [49] TAO J, YANG M, CHEN Z, et al. Decreased DNA methyltransferase 3A and 3B mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells and increased plasma SAH concentration in adult patients with idiopathic thrombocytopenic purpura [J]. *J Clin Immunol*, 2008, 28(5): 432-9.
- [50] MA L, ZHOU Z, JIA H, et al. Effects of CD70 and CD11a in immune thrombocytopenia patients [J]. *J Clin Immunol*, 2011, 31(4): 632-42.
- [51] MA L, ZHOU Z, WANG H, et al. Increased expressions of DNA methyltransferases contribute to CD70 promoter hypomethylation and over expression of CD70 in ITP [J]. *Mol Immunol*, 2011, 48(12/13): 1525-31.
- [52] CHEN Z P, GU D S, ZHOU Z P, et al. Decreased expression of MBD2 and MBD4 gene and genomic-wide hypomethylation in patients with primary immune thrombocytopenia [J]. *Hum Immunol*, 2011, 72(6): 486-91.
- [53] JAFARZADEH A, MARZBAN H, NEMAT I M, et al. Dysregulated expression of miRNAs in immune thrombocytopenia [J]. *Epigenomics*, 2021, 13(16): 1315-25.
- [54] LI H, ZHAO H, XUE F, et al. Reduced expression of MIR409-3p in primary immune thrombocytopenia [J]. *Br J Haematol*, 2013, 161(1): 128-35.
- [55] ZHAO H, LI H, DU W, et al. Reduced MIR130A is involved in primary immune thrombocytopenia via targeting TGFB1 and IL18 [J]. *Br J Haematol*, 2014, 166(5): 767-73.
- [56] WANG Y, ZHANG J, SU Y, et al. MiRNA-98-5p targeting IGF2BP1 induces mesenchymal stem cell apoptosis by modulating PI3K/Akt and p53 in immune thrombocytopenia [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 20: 764-76.
- [57] LI H, HAO Y, ZHANG D, et al. Aberrant expression of long noncoding RNA TMEVPG1 in patients with primary immune thrombocytopenia [J]. *Autoimmunity*, 2016, 49(7): 496-502.
- [58] QI A, ZHOU H, ZHOU Z, et al. Telomerase activity increased and telomere length shortened in peripheral blood cells from patients with immune thrombocytopenia [J]. *J Clin Immunol*, 2013, 33(3): 577-85.
- [59] CINES D B, CUKER A, SEMPLE J W. Pathogenesis of immune thrombocytopenia [J]. *Presse Med*, 2014, 43: e49-59.
- [60] TAKEUCHI H, ISLAM J M, KANEKO A, et al. Helicobacter pylori protein that binds to and activates platelet specifically reacts with sera of H. pylori-associated chronic immune thrombocytopenia [J]. *Platelets*, 2021, 32(8): 1120-3.
- [61] LIU W, LI H, HAO Y, et al. Decreased immunosuppressive actions of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D(3) in patients with immune thrombocytopenia [J]. *Mol Immunol*, 2016, 78: 89-97.
- [62] NIE M, LIU Y, LI X X, et al. PD-1/PD-L pathway potentially involved in ITP immunopathogenesis [J]. *Thromb Haemost*, 2019, 119(5): 758-65.