

# 紫癜灵对慢性免疫性血小板减少症患者 Trp 代谢的影响

高云龙<sup>1</sup>, 卓兰云<sup>1</sup>, 陈瑶<sup>1</sup>, 陈秋杰<sup>2</sup>, 马艳<sup>1</sup>, 黄宪章<sup>1</sup>, 吴新忠<sup>1</sup>

1. 广东省中医院, 广东 广州 510120; 2. 广州市海珠区疾病预防控制中心, 广东 广州 510288

**[摘要]** 目的: 观察紫癜灵对慢性免疫性血小板减少症 (ITP) 阴虚血热证患者吲哚胺 2, 3-双加氧酶 (IDO) /色氨酸-tRNA 合成酶 (TTS) 介导的色氨酸 (Trp) 代谢途径的影响。方法: 选取健康志愿者 (正常对照组) 与慢性 ITP 阴虚血热证患者 (患者组) 各 20 例。正常对照组不做任何处理, 慢性 ITP 阴虚血热证患者采用紫癜灵治疗。治疗前后分别采集患者的肝素抗凝血标本, 检测 CD4<sup>+</sup>及 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞中 IDO、TTS 表达及血浆 Trp、Kyn 浓度。结果: 完全反应 10 例, 有效 7 例, 无效 3 例, 有效率 85.0%。患者组治疗前 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞 IDO 的平均荧光强度低于正常对照组 ( $P < 0.05$ ), TTS 的平均荧光强度高于正常对照组 ( $P < 0.05$ )。治疗后, 患者组 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞中 IDO 的平均荧光强度较治疗前上升 ( $P < 0.05$ ), TTS 的平均荧光强度较治疗前下降 ( $P < 0.05$ )。患者组治疗前血浆 Trp 及 Kyn 浓度均高于正常对照组, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。治疗后, 患者组 Trp 浓度较治疗前降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); Kyn 浓度较治疗前升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论: 紫癜灵可能通过影响慢性 ITP 阴虚血热证患者体内 IDO/TTS 介导的 Trp 代谢途径发挥其治疗作用。

**[关键词]** 免疫性血小板减少症 (ITP); 阴虚血热证; 紫癜灵; 吲哚胺 2, 3-双加氧酶 (IDO); 色氨酸-tRNA 合成酶 (TTS); 色氨酸 (Trp); 犬尿氨酸 (Kyn)

[中图分类号] R558<sup>+.2</sup> [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415 (2018) 04-0162-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2018.04.044

## Effect of Zidianling on Trp Metabolism in Patients with Chronic Immune Thrombocytopenia

GAO Yunlong, ZHUO Lanyun, CHEN Yao, CHEN Qiujiie,  
MA Yan, HUANG Xianzhang, WU Xinzhong

**Abstract:** **Objective:** To observe the effect of Zidianling on the metabolic pathway of tryptophan (Trp) mediated by indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) / tryptophanyl-tRNA synthetase (TTS) in patients with chronic immune thrombocytopenia (ITP) with yin-deficiency and blood-heat syndrome. **Methods:** Selected healthy volunteers (the normal control group) and patients with chronic ITP with yin-deficiency and blood-heat syndrome (the patient group), 20 cases in each group. The normal control group received no treatment, while the patient group received Zidianling for treatment. Before and after treatment, collected heparin anticoagulant specimens of patients, and detected the expression of IDO and TTS in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>T of T lymphocytes as well as the concentration of Trp and Kyn in plasma. **Results:** There were 10 cases of complete reaction, in which 7 cases were effective and 3 cases were ineffective, with the total effective rate being 85.0%. Before treatment, the mean fluorescent intensity of IDO in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>T of T lymphocytes in the patient group was lower than that in the normal control group ( $P < 0.05$ ), and the mean fluorescent intensity of TTS was higher than that in the normal control group ( $P < 0.05$ ). After treatment, the mean fluorescent intensity of IDO in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>T of T lymphocytes in the patient group was higher than that before treatment ( $P < 0.05$ ), and the mean fluorescent intensity of TTS was lower than that before treatment ( $P < 0.05$ ). Before treatment, the concentration of Trp and Kyn in plasma in the patient group was higher than that in the normal control group, differences being significant ( $P < 0.05$ ). After treatment, the concentration of Trp in the patient group was lower than that before treatment, difference being significant ( $P < 0.05$ ), and the concentration of Kyn in the patient group was higher than that before treatment, difference being significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Zidianling may exert its clinical effect by influencing the metabolic pathway of Trp mediated by IDO/TTS in chronic ITP patients with

[收稿日期] 2017-04-13

[基金项目] 广东省中医药局资助项目 (20142050); 广东省中医院院内专项 (YN2014ZHR204)

[作者简介] 高云龙 (1986-), 男, 主管检验师, 主要从事临床血液学检验工作。

[通信作者] 吴新忠, E-mail: wuxinzhong5054@163.com。

yin-deficiency and blood-heat syndrome.

**Keywords:** Immune Thrombocytopenia (ITP); Yin-deficiency and blood-heat syndrome; Zidianling; Indoleamine 2, 3-dioxygenase(IDO); Tryptophanyl-tRNA synthetase(TTS); Tryptophan(Trp); Kynurenine(Kyn)

免疫性血小板减少症(ITP)原指不明原因的获得性机体功能紊乱,使外周血血小板计数减少,皮下黏膜出血的一种临床出血性疾病。近年来,越来越多的研究证明ITP的发病是由于机体自身免疫功能紊乱,异常活化的T淋巴细胞刺激B淋巴细胞产生针对自身血小板的抗体,使患者体内血小板数量减少<sup>[1-2]</sup>。色氨酸(Trp)是T淋巴细胞增殖的必需氨基酸,Trp浓度减低会阻止T淋巴细胞的增殖。吲哚胺2,3-双加氧酶(IDO)是Trp沿犬尿氨酸(Kyn)途径进行分解代谢的关键酶和限速酶<sup>[3]</sup>,色氨酰-tRNA合成酶(TTS)能使Trp形成色氨酰-tRNA复合物,构成蛋白质合成的Trp库,可拮抗IDO对T淋巴细胞增殖的抑制。有研究显示,约20%的慢性ITP患者对激素治疗不敏感,并且在脾切除后可复发<sup>[4]</sup>。紫癜灵具有滋阴凉血的功效,临床上常用于治疗病程缠绵、反复出血的慢性ITP阴虚血热证患者。本研究观察治疗前后患者T淋巴细胞IDO和TTS表达及血浆Trp、Kyn浓度的变化,从IDO/TTS介导的Trp代谢途径探讨紫癜灵治疗ITP的作用机制。

## 1 临床资料

选取2014年9月—2015年12月在广东省中医院就诊的20例慢性ITP阴虚血热证患者,其中男8例,女12例;年龄13~61岁,平均(31.42±11.37)岁;血小板计数(2~36)×10<sup>9</sup>/L,平均(14.56±11.63)×10<sup>9</sup>/L。符合《血液病诊断及疗效标准》<sup>[5]</sup>中ITP的诊断标准;符合阴虚血热证的辨证标准:皮肤出现瘀斑,斑色鲜红或紫暗,五心烦热,口干,潮热盗汗,头晕目眩,舌红、少苔或无苔,脉细数。排除糖尿病、高血压病、消化道溃疡、结核、肝炎等慢性疾病及其他自身免疫性疾病;采样之前至少两星期未使用免疫抑制剂或糖皮质激素进行治疗。

## 2 治疗方法

患者组采用紫癜灵(药物组成:熟地黄、龟板、水牛角、茜草、槐花各20g,生地黄15g,白芍、黄精、旱莲草、女贞子、牡丹皮、连翘、贯众、玄参各12g,砂仁3g)治疗。每天1剂,水煎取汁300mL,分2次口服。30天为1疗程,治疗2疗程。治疗期

间不给予其他药物治疗。选取健康志愿者20例作为正常对照组,不做任何处理。

## 3 观察指标与统计学方法

**3.1 观察指标** ①CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞的IDO和TTS表达:抽取ITP患者治疗前后及健康志愿者外周血各10mL,分离外周血单个核细胞(PBMC)。将PBMC浓度调整至5×10<sup>5</sup>个/mL。每一试管加入CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>抗体各5μL,4℃避光静置30min。PBS洗涤1次,漩涡振荡条件下加入500μL固定剂,室温静置10min。PBS洗涤1次,加入200μL破膜剂重悬细胞,1500rpm离心15~20min。除阴性对照管外,每管加入IDO抗体4μL,1:50稀释的TTS抗体5μL,室温避光静置30min,再加入破膜剂洗涤1次。200μL PBS将细胞悬起,加入羊抗兔IgG TTS抗体5μL,4℃避光静置30min。PBS洗涤2次,用400μL PBS重悬细胞,使用BD Canto II流式细胞仪检测,FACS Diva 7.0软件分析流式的检测结果,用CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞中IDO和TTS荧光表达强度来评估IDO与TTS的表达水平。淋巴细胞分离液购自德国Fresenius Kabi公司;CD8-PerCP/Cy5.5、CD4-PECY7购自美国Biollegend公司;TTS-抗体购自ePitomics公司;羊抗兔IgG TTS-APC二抗、兔抗人IDO抗体、固定剂、破膜剂购自美国R&D公司。②液相色谱-质谱联用分析系统(LC-MS/MS)检测IDO酶的活性:取100μL的血浆样品加200μL乙腈,漩涡振荡1min,静置30min后14000g高速离心30min,取上清液10μL加入色谱柱(Thermo Synchronis-C<sub>18</sub>)中进行分析。流动相:A相乙腈与水体积比为5:95(含0.1%甲酸),B相乙腈与水体积比为95:5(含0.1%甲酸),流速为0.2mL/min。采用外标法,以Trp和Kyn标准溶液制备的标准曲线进行测定。L-Trp、L-Kyn购自美国Sigma公司。

**3.2 统计学方法** 采用SPSS17.0统计学软件处理数据。计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,正常对照组和患者组治疗前的数据采用独立样本t检验,患者组治疗前后的数据采用配对样本t检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 4 疗效标准与治疗结果

**4.1 疗效标准** 参照《成人原发免疫性血小板减少症诊断与治疗中国专家共识(2012年版)》<sup>[6]</sup>拟定。完全反应： $100 \times 10^9/L \leq$ 治疗后血小板计数，临床无出血；有效： $30 \times 10^9/L <$ 治疗后血小板计数  $< 100 \times 10^9/L$ ，且至少比基础血小板数增加2倍，临床无出血；无效：治疗后血小板计数  $< 30 \times 10^9/L$  或临床有出血。确定完全反应和有效时至少检测2次，间隔至少7天。

**4.2 紫癜灵的治疗效果** 完全反应10例，有效7例，无效3例，有效率85.0%。

**4.3 2组 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞 IDO 与 TTS 的荧光表达强度比较** 见表1。患者组治疗前 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞 IDO 的平均荧光强度低于正常对照组 ( $P < 0.05$ )，TTS 的平均荧光强度高于正常对照组 ( $P < 0.05$ )。治疗后，患者组 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞中 IDO 的平均荧光强度较治疗前上升 ( $P < 0.05$ )，TTS 的平均荧光强度较治疗前下降 ( $P < 0.05$ )。

表1 2组 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞 IDO 与 TTS 的荧光表达强度比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=20$ )

组别	CD4 <sup>+</sup> T 淋巴细胞		CD8 <sup>+</sup> T 淋巴细胞	
	IDO	TTS	IDO	TTS
正常对照组	554.36±51.12	1768.73±89.15	325.04±61.39	1512.31±105.10
患者组治疗前	188.10±27.16 <sup>①</sup>	4658.97±183.85 <sup>①</sup>	161.58±20.87 <sup>①</sup>	5626.28±405.46 <sup>①</sup>
患者组治疗后	856.85±309.04 <sup>②</sup>	1709.65±1181.35 <sup>②</sup>	754.52±269.47 <sup>②</sup>	2311.63±1261.29 <sup>②</sup>

与正常对照组比较，① $P < 0.05$ ；与患者组治疗前比较，

② $P < 0.05$

**4.4 2组血浆 Trp、Kyn 浓度比较** 见表2。患者组治疗前血浆 Trp 及 Kyn 浓度均高于正常对照组，差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。治疗后，患者组 Trp 浓度较治疗前降低，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )；Kyn 浓度较治疗前升高，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

表2 2组血浆 Trp、Kyn 浓度比较 ( $\bar{x} \pm s$ )  $\mu\text{mol/L}$

组别	n	Trp	Kyn
正常对照组	20	5.948±2.930	0.104±0.042
患者组治疗前	20	9.680±3.403 <sup>①</sup>	0.150±0.052 <sup>①</sup>
患者组治疗后	20	4.896±1.885 <sup>②</sup>	0.191±0.040 <sup>②</sup>

与正常对照组比较，① $P < 0.05$ ；与患者组治疗前比较，

② $P < 0.05$

## 5 讨论

ITP 是由于机体自身免疫功能紊乱，异常活化的

T 淋巴细胞刺激 B 淋巴细胞产生针对自身血小板的抗体，使血小板的生成减少或破坏增加，临床表现为因血小板数量减少而诱发的出血性疾病。近年来，较多研究证明自身反应性 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞为触发和维持病理性抗血小板自身抗体免疫应答的关键<sup>[7-8]</sup>。同时，CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞也可通过 T 淋巴细胞介导的细胞毒性作用参与 ITP 的发病。

中医学认为，ITP 归属于血证范畴，《血证论》中提出治血主要为宁血、止血、补血和消瘀四大治法。慢性 ITP 临床多表现为虚实夹杂，病机以阴虚血热为主，主要以为滋阴凉血为治法。紫癜灵具有清热凉血、化瘀生新、宁络止血的功效，同时可补益肝肾、养阴填精、清热解毒泻火。方中熟地黄、龟板、白芍、黄精、早莲草、女贞子补益肝肾、养阴填精，以顾肝肾本虚；水牛角、生地黄、牡丹皮、茜草、槐花清热降火凉血，兼以化瘀生新、宁络止血；连翘、贯众、玄参清热解毒泻火，以祛火毒之实；砂仁理气和胃，使补药不壅滞，苦药不伤胃。现代医学研究表明，紫癜灵组方中连翘、茜草、牡丹皮等能增强毛细血管的致密性，保持毛细血管的正常抵抗力，缩短出血及凝血时间<sup>[9]</sup>。程宗琦等<sup>[10]</sup>通过动物实验证明了紫癜灵具有抑制单核巨噬细胞的吞噬功能，同时能显著缩短出血时间，临床上对于皮肤紫癜等疾病的渗出性出血具有很好的缓解作用。

Trp 是 T 淋巴细胞活化与增殖的必需氨基酸，通过 IDO 与 TTS 调节 Trp 的分解代谢，参与调控机体免疫应答。实验结果显示，ITP 患者的 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞中 IDO 的表达量明显低于正常对照组，而患者 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞中 TTS 的表达量却明显高于正常对照组。有研究表明，TTS 表达上调和 IDO 介导的 Trp 代谢异常共同参与细胞免疫调节，活化的 T 细胞可以利用氨基酸的能力增强，TTS 表达上调以增加细胞内色氨酸-tRNA 的储备，同时通过竞争抑制机制，减少 IDO 介导的 Trp 降解<sup>[11]</sup>。治疗前患者血浆中 Trp 和 Kyn 浓度较正常对照组高，表明体内 Trp 仍可通过 IDO 途径代谢，IDO 在体内不断消耗，Kyn 的浓度相应升高；但 Trp 浓度未出现降低，可能与 TTS 的高表达储备氨基酸能力增强有关。

服用中药紫癜灵合剂后，治疗有效组患者的 IDO 在 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞的表达明显升高，而 TTS 的表达则下降。Trp 浓度下降，Kyn 浓度上升。说明

紫癜灵的治疗使 TTS 表达下降,减少色氨酸-tRNA 复合物的贮存量。IDO 的活性增高使其更好的发挥免疫抑制作用, T 淋巴细胞的增殖受到抑制,导致自身反应性 T 淋巴细胞的活化减弱,减少了对自身血小板的破坏。此结果表明,在 ITP 患者体内,IDO 的免疫抑制作用并没有减弱,是由于 TTS 加载的色氨酸-tRNA 蛋白复合物增加了 IDO 酶的消耗,无法正常发挥其应有的免疫调节作用。治疗无效的患者 TTS 表达未见明显减低,可能与患者体内存在保护 TTS 酶活性的物质或拮抗紫癜灵药物活性的成分有关,无法抑制 T 淋巴细胞增殖,使得新生血小板继续破坏。

本研究通过检测慢性 ITP 患者体内的 IDO/TTS 介导 Trp 代谢过程中各项指标的变化,发现紫癜灵可能是通过降低慢性 ITP 阴虚血热证患者体内的 TTS 表达,减弱了 TTS 对 IDO 的拮抗作用,使患者已受损的免疫抑制功能得到一定程度的恢复和改善。患者的临床症状有所好转甚至完全缓解,为紫癜灵治疗慢性 ITP 患者的机制研究提供参考。

#### [参考文献]

- [1] 杨仁池. 特发性血小板减少性紫癜的规范化诊治[J]. 中国实用内科杂志, 2007, 27(14): 1095-1097.
- [2] 丁梅, 刘小倩, 高钧明, 等. 色氨酸-tRNA 合成酶(TTS)的免疫调节作用[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2011, 31(10): 958-960.
- [3] Mellor AL, Keskin DB, Johnson T, et al. Cells expressing indoleamine 2, 3-dioxygenase inhibit T cell responses[J]. J Immunol, 2002, 168(8): 3771-3776.
- [4] 代喜平, 李达, 梁冰. 紫癜灵治疗慢性难治性特发性血小板减少性紫癜 28 例[J]. 吉林中医药, 2005, 25(3): 22-23.
- [5] 张之南, 沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2007: 172-175.
- [6] 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断与治疗中国专家共识(2012 年版)[J]. 中华血液学杂志, 2012, 33(11): 975-977.
- [7] Kuwana M, Kawakami Y, Ikeda Y. Suppression of autoreactive T-cell response to glycoprotein IIb/IIIa by blockade of CD40/CD154 interaction: implications for treatment of immune thrombocytopenic purpura[J]. Blood, 2003, 101(2): 621-623.
- [8] Kuwana M, Kaburaki J, Ikeda Y. Autoreactive T cell to platelet GPIIb-IIIa in immune thrombocytopenic purpura. role in production of anti-platelet autoantibody [J]. J Clin Invest, 1998, 102(7): 1393-1402.
- [9] 杨旭, 杨伟鹏, 冷艳枫, 等. 紫癜灵对毛细血管通透性影响的实验研究[J]. 中国中医药科技, 2004, 11(4): 236.
- [10] 程宗琦, 缪丽燕, 许珺, 等. 紫癜灵对小鼠抗炎止血和免疫抑制的作用[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(11): 1512-1514.
- [11] Wang CY, Shi Y, Min YN, et al. Decreased IDO activity and increased TTS expression break immune tolerance in patients with immune thrombocytopenia[J]. J Clin Immunol, 2011, 31(4): 643-649.

(责任编辑: 吴凌, 刘迪成)