

免疫性血小板减少症患者肠道菌群宏基因组学研究进展

吴 敏, 刘 伶

作者单位: 116037 辽宁,大连市妇女儿童医疗中心
作者简介: 吴 敏(1995 -),男,在读硕士研究生,研究方向:免疫性血小板减少与肠道菌群的相关性。E-mail:939640297@qq.com
通讯作者: 刘 伶(1963 -),女,医学博士,主任医师,教授,硕士研究生导师,研究方向:儿童血液肿瘤的诊治。E-mail:liuling63@sina.com



刘 伶,儿科学博士,主任医师,教授,大连医科大学硕士研究生导师、留学生硕士研究生导师,大连妇女儿童医疗中心儿童血液肿瘤科主任。中华医学会大连市血液专业委员会委员,中国抗癌协会会员,东北三省血友病联盟委员会主任委员,辽宁省医学会儿童血液委员会委员。从事儿童血液肿瘤相关专业 20 余年,有着丰富的临床及科研经验。先后主持省级科研项目 1 项,市卫健委项目 3 项,并参与省级科研项目 3 项,指导并参与多项大连市卫健委课题。在中国核心期刊、国家级期刊发表论文 30 余篇,编写学术专著 1 部。获辽宁省科技进步二等奖。

[摘要] 免疫性血小板减少症(ITP)是儿童时期临床最常见的获得性出血性疾病,其发病机制比较复杂。目前认为免疫异常是其发病的主要原因。而近年来肠道菌群在免疫调节自稳和免疫耐受中的作用已逐渐明确,并且其失衡在诸多免疫性疾病中起着关键的作用。因此研究肠道菌群失衡与 ITP 发病的关系,可以进一步通过恢复肠道菌群平衡作为防治 ITP 的一种新的策略。该文就 ITP 患者肠道菌群宏基因组学研究进展进行综述。

[关键词] 免疫性血小板减少症; 肠道菌群; 宏基因
[中图分类号] R 558⁺.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674 - 3806(2021)02 - 0139 - 04
doi:10.3969/j.issn.1674 - 3806.2021.02.05

Research progress in metagenomics of intestinal microbiota in patients with immune thrombocytopenia WU Min, LIU Ling. Dalian Municipal Women and Children's Medical Center, Liaoning 116037, China

[Abstract] Immune thrombocytopenia(ITP) is the most common acquired hemorrhagic disorder during childhood, and the pathogenesis of the disease is complex. At present, immune abnormality is considered to be the main cause of the disease. In recent years, the role of intestinal microbiota in immunomodulatory homeostasis and immune tolerance has been gradually clarified, and its imbalance plays a key role in many immune diseases. Therefore, the study of the relationship between intestinal microbiota imbalance and the onset of ITP can further restore the balance of intestinal microbiota as a new strategy for the prevention and treatment of ITP. In this paper, the research progress in metagenomics of intestinal microbiota in ITP patients is reviewed.

[Key words] Immune thrombocytopenia(ITP); Intestinal microbiota; Metagenes

免疫性血小板减少症(immune thrombocytopenia, ITP)是儿童时期临床最常见的获得性出血性疾病,主要为体液免疫和细胞免疫异常导致的小血小板破坏增多和生成减少。ITP 的发病机制比较复杂,至今仍未完全被了解。传统观念认为,抗体包被的血小板通过与 Fc γ 受体的相互作用在脾脏、肝脏或两者中过早地被破坏^[1]。自身抗体也可以诱导补体介导或去乙酰化诱导血小板的破坏^[2,3],以及抑制巨

核细胞的功能^[4]。T 细胞的异常愈发受到重视,包括辅助性 T 细胞(Th)向 1 型辅助性 T(Th1)和 17 型辅助性 T(Th17)表型倾斜^[5],调节性 T 细胞的数量和功能减少^[2,6],可驱动自身免疫过程。有研究^[7]表明 CD8 细胞也参与其中。因此,免疫异常是其发病的主要原因,全程表现为异常的抗原表达介导的抗体反应、免疫提呈细胞刺激 T 淋巴细胞、活化的 T 淋巴细胞激活 B 淋巴细胞以及补体、单核-巨噬细胞激

活、免疫活性细胞凋亡下调等,其中 T 细胞免疫异常是关键。肠道菌群在免疫调节自稳和免疫耐受中的作用已逐渐明确,并且其失衡在诸多免疫性疾病中起着关键的作用。近年部分研究也发现肠道菌群的失衡可能与 ITP 的发病也有一定相关性,可以通过恢复肠道菌群平衡作为防治 ITP 的一种新的策略。该文就 ITP 患者肠道菌群宏基因组学研究进展进行综述。

1 肠道菌群与免疫性疾病的相关性

肠道菌群的菌体抗原及其代谢产物具有促炎和抗炎双重作用。在小鼠模型中,分段丝状菌(segmented filamentous bacteria, SFB)可上调回肠内急性期血清淀粉样蛋白,促进白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-22 的产生,诱导 Th17 分化,从而促进炎症的发生^[8];此外有研究^[9,10]表明脆弱拟杆菌的多糖 A 和肠道菌群代谢产物短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFAs)可导致 Treg 细胞产生,从而调节炎症反应。因此,肠道菌群失调可能会导致肠道屏障与免疫功能减弱,从而增加免疫性疾病的易感性。在无菌条件下,小鼠模型自身免疫性炎症严重程度明显减弱,且小肠固有层的 Th17 细胞数量减少。而将 SFB 引入无菌小鼠后,固有层的 Th17 细胞可恢复至正常水平,并迅速出现炎症反应样表现^[11],提示 SFB 可通过促进 Th17 细胞亚群分化,驱动自身免疫性炎症的发生。另有研究^[12]发现某些人类共生的细菌如梭状芽孢杆菌 IV、XIV a 和 XVIII,通过产生 SCFAs 来抑制组蛋白去乙酰酶抑制剂,从而抑制 Tregs 的增殖,导致 Th17/Treg 平衡破坏,最终促进炎症发生。此外肠道菌群失调可出现肠道黏膜屏障的破坏,肠道通透性增加,导致细菌移位及 Th17/Treg 平衡破坏,导致炎症发生。综上,免疫性疾病患儿肠道菌群的改变可能有着相似的致病原因。肠道微生物相关分子模式(microbiota-associated molecular patterns, MAMPs)是一类由肠道微生物表达的、反映微生物进化水平的分子,包括脂多糖、多糖 A、磷壁酸和肽多糖。MAMPs 可被树突状细胞、M 细胞和肠上皮细胞表面的模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)识别。PRRs 包括 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)、甲酰肽受体(formylpeptide receptors, FPRs)和核苷酸结合寡聚化结构域样受体(nucleotide binding oligomerization domain like receptors, NLRs)。PRRs 作为感受器,跟识别的分子不同,产生不同的效应,包括保护性反应、炎症反应或触发凋亡,因此 PRRs 在启动固有免疫和适应性免疫、维持肠道内环境稳定、维持黏

膜免疫耐受的完整性方面具有重要的作用。肠道大部分微生物具有相同的 MAMPs 分子,这些分子在人类长期的进化过程中被宿主先天性免疫识别为无害,当做“老朋友”对待,被 PRRs 识别以后不引起强烈的免疫反应,而仅产生基础信号,使宿主对肠道菌群处于耐受状态或者维持低水平的“生理性炎症”。一方面维持机体免疫系统处于适度的“激活或警觉”状态,如增加树突状细胞(dendritic cells, DCs)表面共刺激分子(CD80、CD83、CD86 等)的表达,促进 DCs 成熟和分泌细胞因子;另一方面调节或抑制机体过度的炎症反应,如诱导产生调节性 T 细胞和调节细胞因子如 IL-10 和转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β)等,从而产生对机体的保护性免疫反应。显然肠道菌群在维持肠道黏膜免疫系统的稳定性方面发挥着重要作用。动物模型提示,肠道共生菌和由他们产生的各种配体在肠道黏膜保护和修复中起到决定性作用,共生菌分泌的脂多糖、脂磷壁酸等,以及代谢产生的丁酸作为 TLR 的配体,与正常肠道表面的 TLR 相互作用,产生基础信号。这些信号使得肠上皮细胞耐受损伤的能力增强,获得肠道表面的动态平衡,同时也使肠道表面具有更强的修复能力,保持肠道的健康和微生态的平衡。TLRs 作为一组跨膜的 PRRs,其在血小板与自身抗体的协同作用在 ITP 发病机制中的作用受到关注。TLRs 通过抗原相关分子模式(pathogen-associated molecule pattern, PAMP)识别细菌和病毒的脂多糖或核酸,激活不同通路传递细胞内信号,致使 B 淋巴细胞产生如 IL、干扰素(interferon, IFN)和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)等炎性细胞因子,激活免疫系统活化抗原呈递细胞,从而产生保护性免疫反应。有益的共生微生物能减少机会性感染的发生,其还能直接或间接地抵御病原菌的定植及增强肠道免疫屏障功能,从而阻止免疫性疾病的发生、发展。

2 肠道菌群与 ITP 的相关性

TLRs 是肠道免疫系统介导识别和杀灭细菌的重要组成部分,同时具有保持对肠道共生菌的耐受性、维持肠道稳态的作用。有研究^[13]发现 TLRs 的表达与拟杆菌、肠杆菌及肠球菌的含量呈正相关,与双歧杆菌和乳杆菌的含量呈负相关。一项对 9 例 ITP 患者与 10 名健康成人的粪便样本进行 16S rDNA 高通量测序研究^[14]也提示 ITP 患者肠道菌群存在拟杆菌增多,厚壁菌减少的情况。这些研究都提示 TLRs 的高表达可能与 ITP 的发生密切相关,免疫性疾病患者肠道菌群失调能够增强肠黏膜中 TLRs 的

表达,介导过度的免疫反应。血小板上表达的 TLRs,主要是 TLR 4、TLR 7 和 B 淋巴细胞活化因子(B lymphocyte activation factor, BAFF)。血小板表面 TLRs 的存在提示这些细胞存在于循环中。感染发生后由于 TLRs 参与识别感染性抗原从而加速了受体-Fc 介导的吞噬作用,导致抗血小板抗体产生和血小板破坏增加^[15]。由感染因素触发,TLRs 协同发生的水小板破坏可以解释为何一些 ITP 患者经过抗感染治疗后血小板减少可以获得自限和缓解,而部分患者感染触发因素消失后,免疫紊乱还不能纠正,导致疾病慢性化趋势。研究^[16]发现,ITP 患者的脾脏 B 淋巴细胞和循环 B 淋巴细胞的 TLRs 及下游细胞因子(包括 IL-10 和 IL-1 β)均有上调,说明 B 淋巴细胞的 TLRs 在 ITP 的发病机制中可能有双重作用。有研究表明, Th1/Th2 的失衡与 ITP 的发生有关。Kuwana 等^[17]在慢性 ITP 患者中发现 GP II b/III a 的自体反应性 T 淋巴细胞。其他研究也支持慢性 ITP 患者 Th1/Th2 失衡极化,往往 Th1 细胞明显上升。Th1 细胞释放的细胞因子 IL-2、IFN- α 、TNF- β 参与了 Th1、Th2、细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)及巨噬细胞的趋化和血小板破坏。而免疫异常状态的单核细胞也释放 TNF,促进了 Th1 的增加。Th2 向 Th1 转变依赖于多种因素,但细菌刺激有相当的作用。近期有研究^[18]证实口腔中的克雷伯杆菌发生异位定植于肠道时,可侵入肠上皮细胞被 DCs 细胞吞噬,释放 IL-6 和 TNF,促进 Th1 细胞的炎症反应。此外无菌小鼠的研究证明,肠道正常菌群中属于拟杆菌门的脆弱类杆菌,不仅能够促进脾脏和胸腺的这些外周淋巴组织的细胞和生理的成熟,还能够纠正全身淋巴细胞缺乏,增强分泌 IFN- γ 的 Th1 反应。进一步研究证实这个过程是由脆弱类杆菌外膜上的多糖 A (polysaccharide A, PSA)完成的,缺乏 PSA 的类杆菌,则不能诱导 T 细胞的分化,而纯化的 PSA 则有和野生脆弱类杆菌相同的作用。PSA 被 DCs 摄取、加工后,与 MHC II 类分子一起形成 MHC-抗原复合物被 T 细胞表面的抗原特异性受体(T cell receptor, TCR)识别,激活 T 细胞免疫应答。PSA 刺激 DCs 的 TLR2 产生 IL-12, IL-12 与 T 细胞 IL-12 受体结合,活化 Th1 转录子 Stat-4,进一步生成 IFN- γ 。有研究^[19]还发现脆弱类杆菌 PSA 能够诱导肠黏膜固有层以及血液循环 CD4⁺ T 细胞分化为可分泌 IL-10 的 Treg 细胞发挥抑制促炎 Th17 反应的作用,在精细调节 Th17 和 Treg 细胞平衡中具有重要作用。研究表明,慢性 ITP 患者 Th17 细胞及其分泌的细胞因子 IL-17 较对

对照组明显升高^[5],而成人及儿童 ITP 患者中均检测到二者升高^[20],提示 Th17 细胞与 ITP 患者发病可能相关。研究^[21]发现,ITP 患者 Treg 下降,获得治疗后得以回升。其他研究^[22]也发现 ITP 患者 Th1、Th17 上升和 Treg 下降。研究^[23,24]发现 Treg/Th17 的比值与 ITP 的病程多样性及预后相关。此外,有研究^[25]表明大剂量地塞米松联合利妥昔单抗治疗 ITP 可有效提高 Treg 水平,长期疗效显著优于泼尼松和单纯地塞米松组。因此与 Th1、Th17 和 Treg 平衡相关的脆弱类杆菌在 ITP 发病中的作用值得进一步研究,特别是其是否在慢性、难治性 ITP 患者中起到作用,有利于提示一种新的了解预后以及进行干预的思路。此外 SFB 是另一种受到越来越多关注的肠道共生菌。研究^[26]表明 SFB 能够介导小肠中 Th17 细胞的发育和诱导潘氏结中 Th1 和 Treg 细胞水平上升,从而对肠道黏膜免疫发挥广泛的调节作用。也有研究^[27]证实,口服假丝酵母菌可以减少自身免疫性疾病患者体内 Th17 细胞数量,抑制肠道 IL-6 的产生,并增加调节性 T 细胞数量,提示膳食酵母可能是通过改变肠道菌群组成对自身免疫性疾病产生有利影响。Smith 等^[28]发现,肠道微生物所释放的 SCFAs 能调节 ROR γ t 活性,从而调控非致病性与致病性 Th17 细胞间的平衡。不同的肠道微生物可以刺激 Th17 细胞产生不同的细胞因子,并发挥相应的功能。

3 宏基因组学在 ITP 中的应用及展望

肠道菌群可通过其代谢产物及其他特异性的成分激活免疫细胞,如 Th17 细胞和 Treg 细胞,诱导其分化方向及分泌功能。而研究^[29]证明 ITP 患者还存在 B 淋巴细胞的质和量的异常。有研究^[30,31]表明自身免疫性疾病患者中 Breg 细胞受损或数量减少,而从小鼠模型了解到 Breg 可促进 Treg 细胞的分化及趋化。因此 ITP 患者 Breg 细胞的受损可能导致 Treg 细胞不能正常的分化,以致抗体介导的 T 淋巴细胞参与的血小板破坏增多。宏基因组学研究对特定环境中全部微生物的总 DNA 进行克隆,并通过构建宏基因组文库和筛选等手段获得新的生理活性物质;或者根据 rDNA 数据库设计引物,通过系统学分析获得该环境中微生物的遗传多样性和分子生态信息。可解释微生物群落多样性、进化关系、种群结构、功能活性及环境之间的相关关系,极大扩展了微生物的研究范围。目前宏基因组学在 ITP 中的研究常为通过 16S rDNA 研究 ITP 患者的肠道菌群多样性,找到其潜在致病菌,但目前各研究的样本量均较

少,且缺乏多中心的研究。以后可进行多中心的研究,以确定可能潜在的致病菌,后续通过对相关菌群总 DNA 进行克隆,明确其具体的分子机制,以便于靶向治疗,及早干预。

参考文献

- [1] Zufferey A, Kapur R, Semple JW. Pathogenesis and therapeutic mechanisms in immune thrombocytopenia (ITP) [J]. *J Clin Med*, 2017,6(2):16.
- [2] Stasi R, Cooper N, Del Poeta G, et al. Analysis of regulatory T-cell changes in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura receiving B cell-depleting therapy with rituximab[J]. *Blood*, 2008,112(4):1147-1150.
- [3] Najaoui A, Bakchoul T, Stoy J, et al. Autoantibody-mediated complement activation on platelets is a common finding in patients with immune thrombocytopenic purpura (ITP) [J]. *Eur J Haematol*, 2012,88(2):167-174.
- [4] McMillan R, Wang L, Tomer A, et al. Suppression of in vitro megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult patients with chronic ITP[J]. *Blood*, 2004,103(4):1364-1369.
- [5] Rocha AM, Souza C, Rocha GA, et al. The levels of IL-17A and of the cytokines involved in Th17 cell commitment are increased in patients with chronic immune thrombocytopenia[J]. *Haematologica*, 2011,96(10):1560-1564.
- [6] Bao W, Bussel JB, Heck S, et al. Improved regulatory T-cell activity in patients with chronic immune thrombocytopenia treated with thrombopoietic agents[J]. *Blood*, 2010,116(22):4639-4645.
- [7] Olsson B, Andersson PO, Jernäs M, et al. T-cell-mediated cytotoxicity toward platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura [J]. *Nat Med*, 2003,9(9):1123-1124.
- [8] Gaboriau-Routhiau V, Rakotohe S, Lécuyer E, et al. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses[J]. *Immunity*, 2009,31(4):677-689.
- [9] Round JL, Mazmanian SK. Inducible Foxp3⁺ regulatory T-cell development by commensal bacterium of the intestinal microbiota[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010,107(27):12204-12209.
- [10] Arpaia N, Campbell C, Fan X, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation [J]. *Nature*, 2013,504(7480):451-455.
- [11] Wu HJ, Ivanov II, Darce J, et al. Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells[J]. *Immunity*, 2010,32(6):815-827.
- [12] Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, et al. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota [J]. *Nature*, 2013,500(7461):232-236.
- [13] 李琳,钟青.溃疡性结肠炎患者肠道菌群变化与细胞因子、TLRs 分子表达的相关性研究[J]. *传染病信息*, 2017,30(6):361-364.
- [14] Liu C, Cheng L, Ji L, et al. Intestinal microbiota dysbiosis play a role in pathogenesis of patients with primary immune thrombocytopenia[J]. *Thromb Res*, 2020,190:11-19.
- [15] Kuwana M, Kaburaki J, Ikeda Y. Autoreactive T cell to platelet GP II b-III a in immune thrombocytopenic purpura. Role in production of anti-platelet autoantibody [J]. *J Clin Invest*, 1998,102(7):1393-1402.
- [16] Panitsas FP, Theodoropoulou M, Kouraklis A, et al. Adult chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) is the manifestation of a type-1 polarized immune response [J]. *Blood*, 2004,103(7):2645-2647.
- [17] Kuwana M, Kaburaki J, Kitasato H, et al. Immunodominant epitopes on glycoprotein II b-III a recognized by autoreactive T cells in patients with immune thrombocytopenic purpura [J]. *Blood*, 2001,98(1):130-139.
- [18] Atarashi K, Suda W, Luo C, et al. Ectopic colonization of oral bacteria in the intestine drives TH1 cell induction and inflammation [J]. *Science*, 2017,358(6361):359-365.
- [19] Yang Y, Hu X, Cheng L, et al. Periplocoside A ameliorated type II collagen-induced arthritis in mice via regulation of the balance of Th17/Treg cells[J]. *Int Immunopharmacol*, 2017,44:43-52.
- [20] Liu H, Ouyang X, Li Y, et al. Involvement of levels of Toll like receptor-4 in monocytes, CD4⁺ T-lymphocyte subsets, and cytokines in patients with immune thrombocytopenic purpura [J]. *Thromb Res*, 2013,132(2):196-201.
- [21] Nishimoto T, Kuwana M. CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells in the pathophysiology of immune thrombocytopenia [J]. *Semin Hematol*, 2013,50 Suppl 1:S43-S49.
- [22] Song Y, Wang YT, Huang XJ, et al. Abnormalities of the bone marrow immune microenvironment in patient with immune thrombocytopenia [J]. *Ann Hematol*, 2016,95(6):959-965.
- [23] 曹江,李秀芹,陈翀,等.免疫性血小板减少症患者外周血 Th17/Treg 细胞比率失衡的研究 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2011,19(3):730-733.
- [24] Ji L, Zhan Y, Hua F, et al. The ratio of Treg/Th17 cells correlate with the disease activity of primary immune thrombocytopenia [J]. *PLoS One*, 2012,7(12):e50909.
- [25] 崔允霞.大剂量地塞米松联合妥昔单抗治疗对原发免疫性血小板减少症患者 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞的影响 [J]. *中国临床新医学*, 2015,8(12):1160-1163.
- [26] Honda K, Littman DR. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease [J]. *Nature*, 2016,535(7610):75-84.
- [27] Perricone C, Rinaldi M, Shoenfeld Y. Comment on: dietary yeast reduce inflammation in central nerve system via microflora [J]. *Ann Clin Transl Neurol*, 2015,2(11):1038-1039.
- [28] Smith PM, Howitt MR, Panikov N, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis [J]. *Science*, 2013,341(6145):569-573.
- [29] Olsson B, Ridell B, Jernäs M, et al. Increased number of B-cells in the red pulp of the spleen in ITP [J]. *Ann Hematol*, 2012,91(2):271-277.
- [30] Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, et al. CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi} B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic lupus erythematosus patients [J]. *Immunity*, 2010,32(1):129-140.
- [31] Guo Y, Zhang X, Qin M, et al. Changes in peripheral CD19⁺ Foxp3⁺ and CD19⁺ TGFβ⁺ regulatory B cell populations in rheumatoid arthritis patients with interstitial lung disease [J]. *J Thorac Dis*, 2015,7(3):471-477.

[收稿日期 2020-12-28][本文编辑 吕文娟 余军]

本文引用格式

吴敏,刘伶.免疫性血小板减少症患者肠道菌群宏基因组学研究进展[J]. *中国临床新医学*, 2021,14(2):139-142.