

核因子 κ B 及幽门螺杆菌和细胞毒素相关基因 A 在特发性血小板减少性紫癜发病中的临床意义

吴友伟^a, 高瑛^b, 史丽萍^a, 赵素平^a

(陕西省人民医院, a 消化内二科, b 血液科, 西安 710068)

【摘要】 目的 探究核因子 κ B (NF- κ B)、幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 及幽门螺杆菌细胞毒素相关基因 A (CagA) 在特发性血小板减少性紫癜 (ITP) 发病中的临床意义。**方法** 抽取 168 例 ITP 患者 (ITP 组), 另选择 50 例健康志愿者 (对照组)。均通过 ¹⁴C 呼气试验检测 *H. pylori*, 以酶联免疫法检测血清 NF- κ B 水平及 Hp-CagA-IgG 抗体表达, 并测定血小板计数及血小板相关 IgG 抗体 (PAIgG)、PAIgM。**结果** 与对照组相比, ITP 组除了初诊时血小板计数显著低及 PAlG、PAIgM 含量显著高 ($P < 0.05$) 以外, 其血清 NF- κ B 水平明显高 ($P < 0.05$), *H. pylori*、CagA 阳性率明显高 ($P < 0.05$)。ITP 患者 NF- κ B、*H. pylori*、CagA 与血小板计数负相关, 与 PAlG、PAIgM 含量正相关 ($P < 0.05$)。轻度 ITP 患者初诊时血小板计数 > 中度 ITP 者 > 重度 ITP 者, PAlG、PAIgM 及 NF- κ B < 中度 ITP 者 < 重度 ITP 者, *H. pylori*、CagA 阳性率 < 中度 ITP 者 < 重度 ITP 者, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。ITP 患者中 *H. pylori* 阴性者血小板计数 > *H. pylori* 阳性且 CagA 阴性者 > *H. pylori*、CagA 均阳性者, PAlG、PAIgM 及 NF- κ B < *H. pylori* 阳性且 CagA 阴性者 < *H. pylori*、CagA 均阳性者, 比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** *H. pylori* 感染可能直接通过 CagA 蛋白参与 ITP 的发病, 或 *H. pylori* 感染促使 CagA 激活 NF- κ B 而影响免疫应答导致 PAlG、PAIgM 升高及血小板降低。

【关键词】 紫癜, 血小板减少性, 特发性; NF- κ B; 幽门螺杆菌; 危险因素

DOI: 10.3969/J.issn.1672-6790.2020.02.014

Clinical significance of NF- κ B, *H. pylori* and CagA in onset of idiopathic thrombocytopenic purpura

Wu Youwei*, Gao Ying, Shi Liping, Zhao Suping (* Second Department of Gastroenterology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China)

Corresponding author: Gao Ying, Email: yingg7727@163.com

【Abstract】 Objective To explore the clinical significance of nuclear factor (NF)- κ B, *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) and *H. pylori* cytotoxin associated gene A (CagA) in the pathogenesis of idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). **Methods** A total of 168 patients with ITP were enrolled as the ITP group. And 50 healthy volunteers were enrolled as the control group. *H. pylori* was detected by ¹⁴C breath test. Serum NF- κ B level and Hp-CagA-IgG antibody expression were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The platelet count, platelet-associated IgG antibody (PAIgG) and PAIgM were determined. **Results** Compared with the control group, platelet count was significantly decreased, and PAlG and PAIgM were significantly increased in ITP group when first visit ($P < 0.05$). Serum NF- κ B of ITP group was significantly increased ($P < 0.05$), and positive rates of *H. pylori* and CagA were significantly higher ($P < 0.05$). NF- κ B, *H. pylori* and CagA were negatively correlated with platelet count, but positively correlated with PAlG and PAIgM in ITP patients ($P < 0.05$). Platelet count of mild ITP patients was the highest at first visit, followed by moderate ITP patients and severe ITP patients. The order of PAlG, PAIgM and NF- κ B is completely reversed. The corresponding order of *H. pylori* and CagA positive rate from low to high were mild ITP, moderate ITP and severe ITP ($P < 0.05$). In ITP group, platelet count in patients without *H. pylori* was higher than that in patients with *H. pylori*-positive and CagA-negative, the platelet count in patients with *H. pylori*-positive and CagA-negative was higher than that in patients with *H. pylori*-positive and CagA-positive. The PAlG, PAIgM and NF- κ B in patients without *H. pylori* were lower than those in patients with *H. pylori*, and the PAlG, PAIgM and NF- κ B in patients with *H. pylori*-positive and CagA-negative were lower than those in *H. pylori*-positive and CagA-positive patients ($P < 0.05$).

作者简介: 吴友伟, 副主任医师, Email: wyw0906@163.com

通信作者: 高瑛, 主治医师, Email: yingg7727@163.com

Conclusion *H. pylori* infection may be directly involved in the pathogenesis of ITP through the CagA protein. Or *H. pylori* infection prompts CagA to activate NF- κ B, which influences immune response, and causes PAIgG, PAIgM elevation and thrombocytopenia decline.

[**Keywords**] Purpura, thrombocytopenic, idiopathic; NF-kappa B; *Helicobacter pylori*; Risk factors

特发性血小板减少性紫癜(ITP)是一种自身免疫性疾病,也是一种获得性出血性疾病,以血小板减少为临床特征,还可见正常或较多的骨髓巨核细胞,伴有成熟障碍,皮肤黏膜紫癜是主要临床表现^[1]。现阶段本病的发病机制尚未完全阐明。早在上世纪末就有学者发现幽门螺杆菌(*H. pylori*)感染与ITP存在一定联系,此后陆续有研究证实部分ITP患者根除*H. pylori*后血小板计数明显增多,此治疗方法也一度成为ITP的一线治疗方案^[2-3]。但也有报道^[4]显示因地区、基因、病情不同根除*H. pylori*后患者的有效率存在显著差异。故*H. pylori*与ITP发病的关系还需进一步明确。

近年来有学者发现幽门螺杆菌细胞毒素相关基因A(CagA)蛋白存在与血小板相似的抗原表位,认为表达CagA的高毒力株可诱发系列免疫应答及细胞免疫异常,且CagA参与了核因子 κ B(NF- κ B)的激活,均可能与ITP发病相关^[5]。为进一步了解ITP的发病机制,现以168例成人ITP患者为对象,分析NF- κ B、*H. pylori*、CagA与血小板计数、疾病严重程度、血小板相关IgG(PAIgG)和IgM(PAIgM)等的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选取2016年9月至2019年2月我院收治的168例ITP患者(ITP组),其中男76例,女92例;年龄范围18~65岁,年龄(41.71 ± 9.25)岁;病程范围2 d至3年,病程(34.60 ± 6.51)d;以ITP-BAT出血评分系统评估疾病严重程度,包括轻度48例、中度77例、重度43例。另选择同期入院体检的50例健康志愿者(对照组),男20例,女30例;年龄范围18~65岁,年龄(39.95 ± 9.77)岁。两组年龄、性别等一般资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。本研究方案通过了我院伦理委员会审核,所有患者均对本研究的目的和意义有基本了解,且签署知情同意书。

1.2 纳入与排除标准 纳入标准:(1)年龄18~65岁,男女不限;(2)符合中华医学会血液学分会确定的成人ITP专家共识^[6]中相关诊断要求,血小板计数 $< 50 \times 10^9/L$;(3)初次发病;(4)血红蛋白、白细

胞无异常;(5)临床资料详实。排除标准:(1)年龄 < 18 岁;(2)合并其系统性自身免疫性疾病;(3)3月内接受过糖皮质激素或丙种球蛋白、输注血小板、脾切除术等治疗^[7]。

1.3 主要检测方法 *H. pylori*检测方法:为 ^{14}C 呼气试验(^{14}C 尿素胶囊来源于上海欣科医药有限公司,检测仪器及呼气卡来源于安徽养和医疗器械设备有限公司),测定值 ≥ 150 为*H. pylori*阳性。抽取所有对象外周静脉血5 mL(ED-TA-K2抗凝),离心处理后取血清标本 $-80^\circ C$ 冻存,统一采用酶联免疫法检测血清NF- κ B水平(试剂盒来源于上海BG公司)及Hp-CagA-IgG抗体表达(试剂盒来源于上海晶莹生物技术有限公司),后者结果 ≥ 20 ku/L为阳性, < 20 ku/L为阴性。

PAIgG含量检测方法:以双抗体夹心法测定PAIgG含量(试剂盒来源于上海太阳生物技术公司),按每 10^7 个血小板所含PAIgG、PAIgM计算,并以全自动血细胞分析仪测定血小板计数。

1.4 统计学处理 采用SPSS 19.0软件分析数据,计数资料以率(%)表示,组间Hp、CagA阳性率对比进行 χ^2 检验;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间血小板计数、PAIgG、PAIgM、NF- κ B对比进行独立样本 t 检验,多组间比较采用方差分析;并进行Pearson相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ITP组、对照组NF- κ B、*H. pylori*、CagA测定结果比较 与对照组相比,ITP组血小板计数明显偏低,PAIgG、PAIgM含量明显偏高($P < 0.05$)。此外,ITP组的血清NF- κ B水平、*H. pylori*、CagA阳性率均较对照组明显偏高($P < 0.05$)。见表1。

2.2 NF- κ B、*H. pylori*、CagA与血小板计数、PAIgG、PAIgM含量的相关性分析 ITP患者血清NF- κ B水平与血小板计数负相关,与PAIgG、PAIgM含量正相关($P < 0.05$);*H. pylori*、CagA亦与血小板计数负相关,与PAIgG、PAIgM含量正相关($P < 0.05$)。见表2。

2.3 ITP严重程度与NF- κ B、*H. pylori*、CagA的关系 轻度ITP患者初诊时血小板计数 $>$ 中度ITP患者 $>$ 重度ITP患者,PAIgG、PAIgM含量及NF- κ B $<$ 中

度 ITP 患者 < 重度 ITP 患者, H. pylori、CagA 阳性率 < 中度 ITP 患者 < 重度 ITP 患者, 各组差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 H. pylori、CagA 与 NF-κB、血小板计数、PAIgG、PAIgM 含量的关系 ITP 患者中, H. pylori 阴性者血

小板计数 > H. pylori 阳性且 CagA 阴性者 > H. pylori、CagA 均阳性者, PAIgG、PAIgM 含量及血清 NF-κB 水平 < H. pylori 阳性且 CagA 阴性者 < H. pylori、CagA 均阳性者, 各组差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 1 ITP 组、对照组 NF-κB、H. pylori、CagA 测定结果比较

组别	例数	血小板计数 ($\bar{x} \pm s, \times 10^9/L$)	PAIgG ($\bar{x} \pm s, \mu g/10^7$)	PAIgM ($\bar{x} \pm s, \mu g/10^7$)	NF-κB ($\bar{x} \pm s, \mu g/L$)	H. pylori 阳性 [例(%)]	CagA 阳性 [例(%)]
对照组	50	116.96 ± 24.56	83.12 ± 14.19	25.63 ± 6.00	10.12 ± 2.16	8(16.00)	4(8.00)
ITP 组	168	30.25 ± 7.30	114.41 ± 22.72	42.78 ± 9.58	29.41 ± 6.50	112(66.67)	86(51.59)
$t(\chi^2)$ 值		40.339	9.210	11.968	20.619	(39.974)	(29.652)
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: ITP 为特发性血小板减少性紫癜; NF-κB 为核因子 κB; H. pylori 为幽门螺杆菌; CagA 为毒素相关基因 A; 下表同

表 2 NF-κB、H. pylori、CagA 与血小板计数、PAIgG、PAIgM 含量的相关性分析

类别	血小板计数		PAIgG		PAIgM	
	相关系数	P 值	相关系数	P 值	相关系数	P 值
NF-κB	-0.322	0.002	0.308	0.004	0.297	0.008
H. pylori	-0.461	<0.001	0.346	0.001	0.334	0.002
CagA	-0.447	<0.001	0.340	0.001	0.307	0.002

注: PAIgG 为血小板相关 IgG; PAIgM 为血小板相关 IgM

表 3 ITP 严重程度与 NF-κB、H. pylori、CagA 的关系 [$\bar{x} \pm s, n(\%)$]

组别	例数	血小板计数 ($\bar{x} \pm s, \times 10^9/L$)	PAIgG ($\bar{x} \pm s, \mu g/10^7$ PLT)	PAIgM ($\bar{x} \pm s, \mu g/10^7$ PLT)	NF-κB ($\bar{x} \pm s, \mu g/L$)	H. pylori 阳性 [例(%)]	CagA 阳性 [例(%)]
轻度	48	37.58 ± 7.38	92.59 ± 20.34	31.62 ± 6.32	24.61 ± 5.33	20(41.67)	13(27.08)
中度	77	29.50 ± 6.35	119.70 ± 23.56	42.06 ± 9.54	29.43 ± 6.11	55(71.43)	41(53.25)
重度	43	23.41 ± 3.79	129.26 ± 25.88	56.53 ± 13.69	34.73 ± 6.72	37(86.05)	32(74.42)
$F(\chi^2)$ 值		61.309	31.701	70.036	31.577	(21.553)	(20.580)
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表 4 H. pylori、CagA 与 NF-κB、血小板计数、PAIgG、PAIgM 含量的关系

组别	例数	血小板计数 ($\bar{x} \pm s, \times 10^9/L$)	PAIgG ($\bar{x} \pm s, \mu g/10^7$ PLT)	PAIgM ($\bar{x} \pm s, \mu g/10^7$ PLT)	NF-κB ($\bar{x} \pm s, \mu g/L$)
H. pylori 阴性	56	41.23 ± 6.03	89.25 ± 18.22	35.44 ± 6.27	20.04 ± 4.95
H. pylori 阳性 CagA 阴性	26	30.23 ± 5.34	103.11 ± 22.24	41.92 ± 8.21	26.76 ± 6.88
H. pylori、CagA 均阳性	86	23.11 ± 3.92	134.19 ± 24.39	47.82 ± 11.57	36.31 ± 7.67
F 值		228.593	73.587	28.289	100.708
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

3 讨论

本次研究发现,与对照组相比,ITP 组除了初诊时血小板计数显著低及 PAIgG、PAIgM 含量显著高以外,其血清 NF- κ B 水平及 H. pylori、CagA 阳性率明显高,且相关性分析显示 ITP 患者 NF- κ B、H. pylori、CagA 与血小板计数负相关,与 PAIgG、PAIgM 含量正相关,提示 NF- κ B 表达上调及 H. pylori、CagA 阳性可能与 ITP 发病有关。H. pylori 是常见消化系统疾病的致病菌,已被证实与消化性溃疡、慢性活动性胃炎、胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤等疾病有紧密联系。早在上世纪末就有学者提出 H. pylori 感染与包括 ITP 在内的各种自身免疫性疾病有一定关联^[8],随着近些年来临床对 ITP 与 H. pylori 关系的研究逐渐积累,其可能机制逐渐明确,最常见的观点为 H. pylori 表面的 Lewis 抗原介导 H. pylori 和血小板的粘附,并引发 Th1/Th2 比例失调,机体的免疫自稳状态被破坏后血浆中抗血小板抗体增加,最终诱导自身免疫性血小板减少发生^[9-10]。基于此,多个临床试验进一步证实抗 H. pylori 治疗有助于提高 ITP 的治疗有效率及减少复发,如罗洪强等^[11]的报道显示抗 H. pylori 治疗可通过下调外周血白细胞介素-2/白细胞介素-4 比值发挥治疗 ITP 作用;朱芸等^[12]的研究显示抗 H. pylori 治疗儿童 ITP 的有效率高达 95%,一年内复发率仅为 5%,而未给予抗 H. pylori 治疗的患儿有效率仅为 55%,复发率则高达 37%。但也有研究^[13]发现 H. pylori 清除与否与血小板计数的相关性并不显著,认为由菌株不同所致。事实上,H. pylori 菌株大体分为高毒力株与低毒力株,前者有 CagA 基因、VacA 基因等细胞毒素相关基因,可表达 CagA 蛋白、VacA 蛋白;后者则只有 VacA 基因,不表达相关蛋白^[14]。其中 CagA 蛋白作为 H. pylori 的主要毒力因子,存在免疫原性,并能够引发相关抗体产生,既往学者指出,H. pylori 的 CagA 蛋白具有与人体血小板抗原相同或相似的抗原表位,感染 H. pylori 后机体免疫应答通过分子模拟产生抗血小板自身抗体从而引发 ITP,而 CagA 蛋白可能在 H. pylori 感染的 ITP 发病中起主要作用^[15]。这或许可一定程度解释本研究出现的上述结果。

此外,作为一种转录因子,NF- κ B 是调节细胞转录的关键因子,广泛存在于单核细胞、血管内皮及血管平滑肌细胞中,通常活化的 NF- κ B 与其靶基因的 κ B 位点结合后能够诱导或调控多种参与免疫的黏

附分子、细胞因子及趋化因子等转录。张智亮等^[16]的报道显示,相比于 CagA 阴性的 H. pylori,CagA 阳性的 H. pylori 诱导基质金属蛋白酶-9 启动子活性及 NF- κ B 连接活性的能力更强。程源山等^[17]早期研究发现,H. pylori、CagA 均为阳性的 ITP 患者 PAIgG、PAIgM、PAIgA 水平及 PAIgG 阳性率均显著高于 H. pylori 阴性和 H. pylori 阳性 CagA 阴性的患者,认为其机制之一在于 CagA 参与了 NF- κ B 的激活,增强 NF- κ B 与细胞核的结合,并参与机体免疫应答,导致 PAIgG、PAIgM、PAIgA 升高及血小板下降。近期 Yang 等^[18]的观点与之类似。本研究还发现随着 ITP 患者病情程度加重,其初诊时血小板计数下降越明显,PAIgG、PAIgM 含量及 H. pylori、CagA 阳性率升高越明显;且 ITP 患者中 H. pylori 阴性者、H. pylori 阳性且 CagA 阴性者、H. pylori、CagA 均阳性者初诊时血小板计数依次降低,PAIgG、PAIgM 及 NF- κ B 依次升高,提示 NF- κ B、H. pylori 及 CagA 与 ITP 患者病情程度有关,并推测 H. pylori 感染可能直接通过 CagA 蛋白参与 ITP 的发病,或 H. pylori 感染促使 CagA 激活 NF- κ B 而影响免疫应答导致 PAIgG、PAIgM 升高及血小板降低。因此,在临床中检测血小板、相关抗体的同时建议检测 NF- κ B 水平及明确 H. pylori、CagA 阳性情况,对于针对 ITP 患者是否给予抗 H. pylori 治疗甚至 NF- κ B 拮抗剂治疗有重要的指导意义。

参考文献

- [1] ITO A, YOSHIZAWA K, FUJIMORI K, et al. Autoimmune hepatitis associated with immune thrombocytopenic purpura[J]. Intern Med, 2017, 56(2): 143-147.
- [2] 雷瑚仪, 张子彦. 细胞毒素相关蛋白 A 与特发性血小板减少性紫癜相关性研究[J]. 中国现代医学杂志, 2012, 22(15): 54-56.
- [3] 王静, 郝国平, 王晓欢, 等. 幽门螺杆菌感染与 3 岁以上初诊儿童免疫性血小板减少症的相关性分析[J]. 中国药物与临床, 2018, 18(7): 1193-1195.
- [4] 方拥军, 黄婕. 儿童原发性免疫性血小板减少症的发病机制[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2017, 32(32): 1124-1129.
- [5] 雷瑚仪, 封蔚莹, 兰梅, 等. 核因子- κ B、幽门螺杆菌细胞毒素相关蛋白 A 在特发性血小板减少性紫癜发病中的作用[J]. 中国基层医药, 2017, 24(15): 2268-2271.
- [6] 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.
- [7] 吕明恩, 刘晓帆, 付荣凤, 等. ITP-BAT 出血评分系统在