·临床检验研究论著·

特发性血小板减少性紫癜患者 PBMC 中 TRAF2 的表达及分析*

杜朝阳[1]，陈 燕[2#]，谷明莉[2]，张薇薇[2]，叶 辛[2]，张建荣[2]，秦 琴[2]，邓安梅[2△]，钱宝华[3▲]
（1. 中国人民解放军第一七一医院，江西九江 332000；2. 第二军医大学长海医院实验诊断科，上海 200433；3. 第二军医大学长海医院输血科，上海 200433）

摘 要：目的 分析肿瘤坏死因子受体相关因子 2（TRAF2）是否参与了特发性血小板减少性紫癜（ITP）的发病机制。**方法** 采用荧光定量 FQ-PCR（FQ-RT-PCR）检测了 55 例首诊 ITP 患者和 45 例健康体检者外周血单个核细胞（PBMC）中 TRAF2 的 mRNA 表达，分析了其与血小板计数的相关性。对其中 12 例接受糖皮质激素治疗的患者进行随访，分析治疗 2 个月以后 PBMC 中 TRAF2 的表达变换状况。**结果** ITP 患者中 TRAF2 的 mRNA 表达高于正常对照组（$P<0.01$），且与血小板计数呈负相关（$r=-0.56$，$P<0.01$）。患者接受治疗后，PBMC 中 TRAF2 表达下调。**结论** TRAF2 在 ITP 中可能起一定的作用，为以后临床进一步诊治提供一定的帮助。

关键词：紫癜，血小板减少性，特发性； 受体，肿瘤坏死因子； 聚合酶链反应
DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2013.10.005 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-4130(2013)10-1212-02

Increased TRAF2 mRNA expression in PBMC of ITP patients and its clinical implications*

Du Chaoyang[1], *Chen Yan*[2#], *Gu Mingli*[2], *Zhang Weiwei*[2], *Ye Xin*[2], *Zhang Jianrong*[2], *Qin Qin*[2], *Deng Anmei*[2△], *Qian Baohua*[3▲]
(1. 171 *Hospital of the People's Liberation Army*, *Jiujiang*, *Jiangxi* 332000, *China*; 2. *Department of Laboratory Diagnosis*, *Changhai Hospital*, *Second Military Medical University*, *Shanghai* 200433, *China*; 3. *Department of Blood Transfusion*, *Changhai Hospital*, *Second Military Medical University*, *Shanghai* 200433, *China*)

Abstract: Objective To identify whether TNF receptor associated factor 2 (TRAF2) was involved in the pathogenesis of idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). **Methods** The relative expression of TRAF2 in PBMC of 55 ITP patients and 45 healthy controls were detected by FQ-RT-PCR. The relationship between TRAF2 and platelet in ITP patients was analyzed. Twelve ITP patients who received glucocorticoid therapy were followed and relative expression of TRAF2 before and after treatment was compare. **Results** Increased TRAF2 expression, which negatively correlated with platelet count, was observed in ITP patients. Glucocorticoid therapy decrease TRAF2 expression in ITP patients. **Conclusion** TRAF2 was involved in the pathogenesis of ITP.

Key words: purpura, thrombocytopenic, idiopathic; receptors, tumor necrosis factor; polymerase chain reaction

特发性血小板减少性紫癜（ITP）是一种多发生于青少年的自身免疫性疾病[1]。在环境和遗传因素的联合作用下，机体产生了针对血小板的自身抗体，介导了血小板的免疫性清除，最终引起患者外周血血小板计数降低[2]。ITP 的本质是自身免疫性疾病，从细胞层面上讲，ITP 患者免疫功能的紊乱主要表现为各种免疫细胞亚群数量、功能和表型的改变；从分子层面上讲，免疫细胞内多个免疫相关分子的表达异常是造成免疫系统功能紊乱的基础[3]。深入研究在 ITP 发生与发展中表达异常的分子，探讨这些分子在 ITP 发病机制中的作用，以期为 ITP 的免疫干预治疗提供理论依据。肿瘤坏死因子受体相关因子 2（TRAF2）是近年来发现的肿瘤坏死因子家族的成员，具有光发且活跃的免疫调节功能，以往的研究发现其与多种自身免疫性疾病的发病机制有关。但 TRAF2 是否参与了 ITP 的发病机制尚不明确。在本研究中，以采用荧光定量 PCR 检测 55 例 ITP 患者和 45 例健康个体外周血单个核细胞（PBMC）中 TRAF2 的 mRNA 表达。分析了其与患者血小板计数的关系。同时对其中 12 例接受了糖皮质激素的患者进行了随访，分析其治疗前后 TRAF2 表达变化状况，旨在明确 TRAF2 是否参与了 ITP 的发病机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 研究对象为 2010 年 5 月至 2012 年 5 月间在上海长海医院新确诊的 ITP 患者 55 例，男 23 例，女 32 例，平均年龄（43±6）岁。健康个体 45 例为正常对照组，其中男 20 例，女 25 例，平均年龄（38±8）岁。ITP 的诊断标准为：连续两次检测患者血小板计数均在 100×10^9/L 之下，且无法用病史、体征以及实验室误差解释血小板减少的原因。本研究得到了长海医院医学科研伦理委员会的批准，所有受试对象的监护人均签署知情同意书。

1.2 PBMC 的分离及总 RNA 的提取 于患者接受治疗前抽取静脉血 5 mL，以浓度为 109 mmol/L 枸橼酸钠按照体积比 1∶9 的比例抗凝，用淋巴细胞分离液 LymphoprepTM（购自挪威 AXIS-SAIELD 公司）分离 PBMC。采用 Qiagen 试剂盒提取细胞总 RNA，以 Invitrogen 公司的逆转录试剂盒进行反转录，得到 cDNA 后至于－80 ℃保存，待标本收集完成后统一进行 PCR 扩增。以 NCBI 的 Primer Blast 设计 TRAF2 和内参 18 s RNA 的引物，TRAF2 正义链引物为：5′-GGA GGC ATC CAC

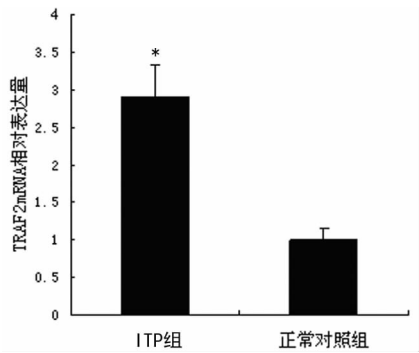
* 基金项目：国家自然科学基金资助项目（81273282，81202353）；上海市科委基金资助项目（11JC1410902）。 作者简介：杜朝阳，男，主治医师，主要从事临床检验诊断学研究；陈燕，女，主管技师，主要从事免疫学及微生物学研究。 # 共同第一作者。 △ 通讯作者，E-mail：amdeng@163.com。 ▲ 通讯作者，E-mail：qianbaohua@163.com。

CTA CGA TG-3′；反义链引物序列为 5′-GGG AGA AGA TGG CGG GTA TG-3′；18 s RNA 的正义链引物序列为：5′-ACA TCC AAG GAA GGC AGC AG-3′；反义链引物序列为：5′-TTC GTC ACT ACC TCC CCG G-3′。

1.3 统计学处理　两组资料的比较采用独立样本 t 检验，患者治疗前后比较采用配对样本 t 检验。患者 TRAF2 与血小板计数的相关性分析采用 Spearman 法。所有统计学处理均在 SPSS17.0 中完成，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结　果

2.1 ITP 患者 PBMC 中 TRAF2 表达状况　ITP 患者 PBMC 中 TRAF2 mRNA 表达量是健康个体的 2.5 倍，差异有统计学意义（$P<0.01$），如图 1 所示。



*：$P<0.01$，与正常对照组比较。

图 1　ITP 患者和健康个体 PBMC 中 TRAF2 mRNA 的比较

2.2 ITP 患者 PBMC 中 TRAF2 mRNA 与血小板计数的相关性　ITP 患者 PBMC 中 TRAF2 mRNA 与血小板计数呈负相关，相关系数为 −0.56（$P<0.01$），如图 2 所示。

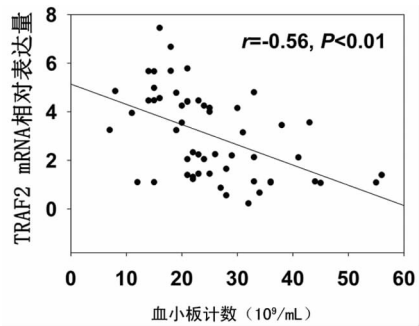


图 2　ITP 患者 PBMC 中 TRAF2 mRNA 与血小板计数的相关性

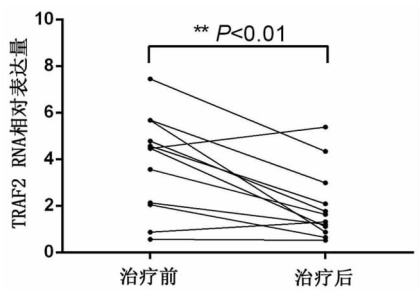


图 3　ITP 患者 PBMC 中 TRAF2 mRNA 治疗前后比较

2.3 ITP 患者 PBMC 中 TRAF2 mRNA 治疗前后比较　对 12 例 ITP 进行随访，分析治疗 2 个月后 PBMC 中 TRAF2 表达量的变化，发现患者在治疗后 TRAF2 的表达逐渐降低（$P<0.01$）。见图 3。

3 讨　论

IPT 患者体内主要是抗血小板抗体增多，血小板破坏过多而出血为特点，发病机制多为复杂，可能涉及细胞因子、B 细胞、T 细胞、转录因子等诸多因素错综复杂的关系[4]。有关 TRAF2 在本病中的发病机制，研究不多，检测 ITP 患者中的 TRAF2 后发现，ITP 患者 PBMC 中 TRAF2 mRNA 较健康个体明显增高，且与血小板计数呈负相关。对 12 例 ITP 患者进行随访后，在经过免疫抑制治疗后，ITP 患者 PBMC 中 TRAF2 表达下调。这些结果提示 TRAF2 可能参与了 ITP 的发病机制。

TRAF2 是一种具有多种生物功能的胞内信号接头分子，其主要通过与受体胞内段的 TRAF 同源结构域结合而形成复合物并向下游传递信号。比如，在 B 细胞的活化过程中，TRAF2 是激活人 B 淋巴细胞 CD40 介导的 NF-κB 信号传导系统中的重要因子，在 B 细胞活化分化中起重要作用[5]。在肿瘤坏死因子（TNF）诱导细胞凋亡的过程中，TRAF2 发挥着十分重要的调节作用[6]。已知多种自身免疫性疾病的发病机制与外周血 TRAF2 表达异常有关，比如系统性红斑狼疮[7]和原发性胆汁性肝硬化[8]。本研究发现 TRAF2 参与了 ITP 的发病机制，提示 TRAF2 表达异常可能是多种自身免疫性疾病发病机制的共同环节，是自身免疫性疾病潜在的治疗靶点。

总之，TRAF2 在 ITP 发病机制中起着重要的作用，值得深入研究。

参考文献

[1] Cines DB, Bussel JB, Liebman HA, et al. The ITP syndrome: pathogenic and clinical diversity[J]. Blood, 2009, 113(26): 6511-6521.

[2] Semple JW, Provan D, Garvey MB, et al. Recent progress in understanding the pathogenesis of immune thrombocytopenia[J]. Curr Opin Hematol, 2010, 17(6): 590-595.

[3] Gernsheimer T. Chronic idiopathic thrombocytopenic purpura: mechanisms of pathogenesis[J]. Oncologist, 2009, 14(1): 12-21.

[4] Nosotti M, Falleni M, Palleschi A, et al. Reaction dectiong of lymph node lung canner micrometastasis using carcinoembryonic antigen marker[J]. Chest, 2005, 128(3): 1539-1544.

[5] 张文，张烜. TRAF2 在人 B 淋巴细胞 AP-1 信号传导系统中的作用[J]. 基础医学与临床，2008，28(5)：465-468.

[6] 张嘉. TRAF2 在 TNF 诱导细胞凋亡过程中的作用及其信号转导途径[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志，2001，8(4)：301-303.

[7] 柴华旗，黎曼，贺丹，等. TRAF1/TRAF2 mRNA 在系统性红斑狼疮患者外周血单个核细胞中的表达及意义[J]. 江苏医药，2005，31(4)：298-299.

[8] 孙懿，韩志君，胡志德，等. 原发性胆汁性肝硬化患者外周血单个核细胞 TRAF2 表达上调及其临床意义[J]. 现代免疫学，2011，31(2)：117-120.

（收稿日期：2012-12-28）