

• 临床检验研究论著 •

特发性血小板减少症患者外周血单个核细胞穿孔素表达水平研究*

杜朝阳¹, 李虎^{2#}, 张薇薇², 叶辛², 谷明莉², 徐玉莲², 邓安梅^{2△}, 钱宝华^{3▲}

(1. 中国人民解放军一七一医院, 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 研究穿孔素是否参与了特发性血小板减少症(ITP)的发病机制。方法 采用 RT-PCR 法检测了 35 例特发性血小板减少症患者和 45 例健康个体外周血单个核细胞(PBMC)内穿孔素 mRNA 的表达, 以免疫印迹法检测穿孔素蛋白含量。采用 ELISA 法检测受试对象血浆 IL-4、IL-10、IFN- γ 、TNF- α 水平。以 Spearman 法分析穿孔素与上述细胞因子以及血小板计数的关系。结果 与健康对照组比较, ITP 患者 PBMC 中穿孔素蛋白和 mRNA 的表达均较健康个体增高($P < 0.01$)。穿孔素蛋白水平与 IFN- γ 、TNF- α 水平均呈正相关($P < 0.01$), 与血小板计数呈负相关($P < 0.05$), 与 IL-4、IL-10 水平无相关性($P > 0.05$)。结论 穿孔素参与了 ITP 的发病机制。

关键词:紫癜, 血小板减少性, 特发性; 穿孔素; 白细胞介素 4; 白细胞介素 10; 逆转录聚合酶链反应

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.14.003

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)14-1782-02

Research on perforin expression in peripheral blood mononuclear cell in patient with idiopathic thrombocytopenic purpura*

Du Chaoyang¹, Li Hu^{2#}, Zhang Weiwei², Ye Xin², Gu Mingli², Xu Yulian², Deng Anmei^{2△}, Qian Baohua^{3▲}

(1. 171 Hospital of PLA, 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 investigate whether perforin was involved in the pathogenesis of idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). **Methods** Perforin relative expressions in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of 35 ITP patients and 45 healthy controls were detected by RT-PCR and Western blot. The relationship between perforin protein and platelet count, serum interleukin 4 (IL-4), IL-10, tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interferon gamma (IFN- γ) were analyzed by spearman approach. **Results** Increased perforin, both at mRNA and protein level, was observed in ITP patients ($P < 0.01$). Perforin protein level in PBMCs was positively correlated with serum IFN- γ and TNF- α and negatively correlated with platelet count ($P < 0.05$). The correlations between perforin and IL-10, IL-4 did not achieve statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion** Perforin was involved in the pathogenesis of ITP.

Key words: purpura, thrombocytopenic, idiopathic; perforin; interleukin-4; interleukin-10; reverse transcriptase polymerase chain reaction

特发性血小板减少症(primary immune thrombocytopenia, ITP)是一种原因不明的以血小板减少为典型特征的自身免疫性疾病^[1]。在环境和遗传因素的联合作用下,免疫系统固有的精细调控机制被破坏,产生了针对血小板的自身抗体,被自身抗体致敏的血小板更容易被单核巨噬细胞系统吞噬破坏,患者因而表现出血小板减少的临床特征^[2]。在对 ITP 发病机制的研究历程中,人们发现 ITP 患者的免疫细胞内有多种基因表达异常。研究这些表达异常的基因与 ITP 患者临床特征的关系,有助于我们深入了解 ITP 的发病机制,并可为 ITP 的免疫干预治疗提供新的思路。

穿孔素(perforin)是主要表达于细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL)和自然杀伤细胞(natural killer, NK)内的具有免疫杀伤和免疫调节作用的分子^[2]。有研究发现穿孔素基因敲除的小鼠具有自身免疫性疾病的典型特征,比如球蛋白水平增高、外周血高水平的自身抗体和免疫复合物沉

积于各个器官^[3],提示穿孔素可能参与了自身免疫性疾病的发病机制。最近在多发性硬化中展开的遗传学研究也发现穿孔素基因的多态性与多发性硬化的发病风险有关^[4]。鉴于多种自身免疫性疾病的发病机制都存在一些“共通之处”,我们推测穿孔素可能参与了 ITP 的发病机制。

在本研究中,为明确穿孔素是否与 ITP 发病机制有关,我们检测了 ITP 患者外周血单个核细胞(PBMC)中的穿孔素在蛋白和 mRNA 水平的表达,分析了其与 ITP 临床特征、外周血细胞因子水平的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2011 年 9 月至 2012 年 9 月间在上海长海医院确诊的特发性血小板减少症患者 35 例,其中男 14 例,女 21 例,平均年龄 45(Q₂₅~Q₇₅:33~59)岁。ITP 的诊断依据为中华医学会血液学分会止血与血栓组 2009 年制定的诊断标准^[5]。所有患者均为首诊患者,在血液标本采集前未接受任何

* 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。 # 共同第一作者。 △ 通讯作者, E-mail: amdeng@163.com; ▲ 通讯作者, E-mail: qianbaohua@163.com。

ITP 的相关治疗。另从同期来我院体检的个体中选取 19 例男性和 26 例女性作为健康对照,所有健康对照个体的常规实验室检查、影像学检查和体格检查未见明显异常,平均年龄为 39 (Q₂₅~Q₇₅:25~55)岁。本研究得到了上海长海医院伦理委员会批准,受试对象均签署知情同意书。

1.2 样本的采集 抽取患者外周静脉血 5 mL,枸橼酸钠抗凝,于 3 000 r/min 的条件下离心 10 min,吸取上层血浆置于 -80 ℃ 保存备用,并采用淋巴细胞分离液(购自上海华精生物公司)分离 PBMC,用于 RT-PCR 和免疫印迹的检测。

1.3 RT-PCR 采用 Trizol 法提取总 RNA,以 Invitrogen 公司的逆转录试剂盒进行反转录,得到 cDNA 后置于 -80 ℃ 保存,待标本收集完成后统一进行 PCR 扩增。参照 GENE-BANK 中人 18s rRNA 和穿孔素基因序列设计合成引物和探针,委托美国 ABI 生物公司合成引物。序列见表 1。

表 1 穿孔素以及内参引物序列

基因	引物
18s rRNA	正向:5'-ACA TCC AAG GAA GGC AGC AG-3' 反向:5'-TTC GTC ACT ACC TCC CCG G-3'
穿孔素	探针:FAM-CGC GCA AAT TAC CCA CTC CCG A-TAMRA 正向:5'-TGG AGT GCC GCT TCT ACA GT-3' 反向:5'-GCC CTC TTG AAG TCA GGG TG-3' 探针:FAM-CCA TGT GGT ACA CAC TCC CCC GC-TAMRA

1.4 免疫印迹 用超声破碎仪将 PBMC 裂解,用考马斯亮蓝法检测上清液蛋白浓度,以保证每孔上样量的一致。样本经 10% SDS-PAGE 电泳后进行转印至硝酸纤维素薄膜,用含 5% BSA 的 PBS 封闭 1 h,与 1:1 000 稀释的穿孔素或 β-actin(内参)抗体反应 2 h,充分洗涤后与 1:1 000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠抗体反应 2 h,用凝胶成像分析系统测定其光密度值。以穿孔素/β-actin 光密度值表示穿孔素蛋白相对表达量。

1.5 ELISA 采用 ELISA 法检测受试对象血浆 IL-4、IL-10、TNF-α、IFN-γ 水平,ELISA 检测试剂盒均购自 eBioscience 公司,检测过程参照试剂说明书进行。

1.6 统计学处理 采用 2^{ΔΔCt} 法表示 RT-PCR 检测结果,两组资料的比较采用独立样本 *t* 检验或 Mann-Whitney *U* 检验,两组资料的相关性分析采用 Spearman 法。所有统计学处理均在 Sigmaplot 11.0 中进行,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ITP 患者外周血单个核细胞穿孔素的表达 如图 1A 所示,RT-PCR 结果表明,ITP 患者 PBMC 中穿孔素 mRNA 的相对表达量较健康个体增高了约 3.22 倍,差异具有统计学意义 (*P* < 0.01)。免疫印迹结果表明(图 1B),ITP 患者 PBMC 中穿孔素蛋白的表达量较健康个体增高,如图 1B 所示。

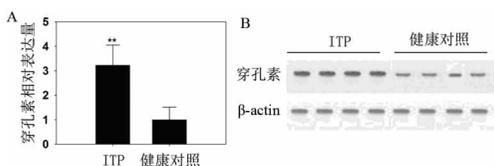


图 1 ITP 患者 PBMC 中穿孔素表达增高

2.2 穿孔素蛋白与 ITP 患者血小板计数的关系 如图 2 所示,相关性分析结果表明,ITP 患者穿孔素蛋白与血小板计数存在较弱的相关性(*r* = -0.50, *P* < 0.01)。

2.3 穿孔素蛋白与 ITP 患者血清 TNF-α、IFN-γ、IL-4 和 IL-10 的关系 如表 2 所示,ITP 患者血清中的 TNF-α 和 IFN-γ 水平较健康个体增高 (*P* < 0.01);IL-4 和 IL-10 水平较健康个体降低 (*P* < 0.01)。其中穿孔素蛋白与 TNF-α、IFN-γ 水平呈正相关 (*P* < 0.05),与 IL-4 和 IL-10 水平之间的相关性无统计学意义 (*P* > 0.05),如图 3 所示。

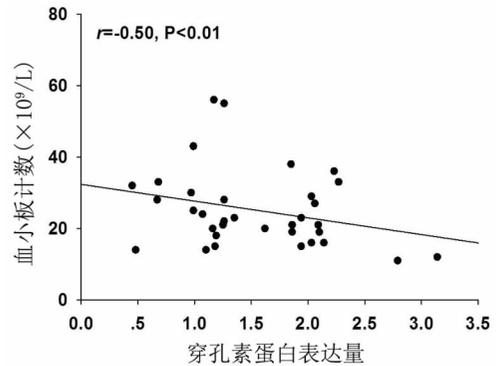


图 2 ITP 患者穿孔素蛋白与血小板计数的相关性

表 2 ITP 患者细胞因子水平(̄x ± s)

组别	IL-4 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)	IFN-γ (pg/mL)	TNF-α (pg/mL)
ITP 组 (n=35)	29 ± 17	25 ± 14	55 ± 34	87 ± 53
健康对照 (n=45)	44 ± 26	39 ± 20	39 ± 22	45 ± 29
<i>P</i>	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

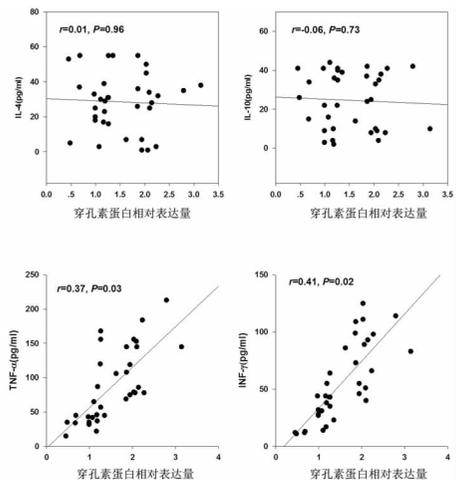


图 3 穿孔素蛋白与 TNF-α、IFN-γ、IL-4 和 IL-10 水平的相关性

3 讨论

ITP 的发病机制存在较多假说,其中尤以分子模拟学说较为流行。该学说认为,入侵机体的病原体(通常为病毒)抗原与血小板上的自身抗原结构相似,因此针对该病原体的抗体与血小板存在“交叉反应”,引起血小板的免疫损伤。支持这一假说的一个重要证据就是多数 ITP 患者在发病以前有感染性疾病的病史。

穿孔素主要表达于 CTL 和 NK 细胞,在病原体感染时表达上调,是免疫系统应对病原体感染的主要武器之一。本研究发现 ITP 患者 PBMC 中穿孔素在 mRNA 和(下转第 1786 页)

制, Th2/Treg 细胞应答水平升高, 说明揭示结核病的免疫学发病机理不能仅从单一的细胞亚型(如 Th1)免疫应答情况来阐述而忽略免疫应答整体的相互影响, 在重视传统的 Th1/Th2 应答的同时, 更多的考虑 Treg/Th17 细胞的作用。本研究发
现 TBM 患者 Th17 反应更低, 说明 Th17 细胞不仅在活动性结核
病保护性免疫中发挥重要作用, 而且与病情的严重程度有一定
关系, 提示 Th17 细胞可以作为病情和预后评估的参考指
标。

参考文献

[1] Chen X, Yang Q, Zhang M, Graner M, et al. Diagnosis of active tuberculosis in China using an in-house gamma interferon enzyme-linked immunospot assay[J]. Clin Vaccine Immunol, 2009, 16(6): 879-884.
[2] Sacco R, Hagen M, Sandor M, Weinstock JV, et al. Established T (H1) granulomatous responses induced by active Mycobacterium avium infection switch to T(H2) following challenge with Schistosoma mansoni. [J]. Clin Immunol, 2002, 104(3): 274-281.
[3] Ordway DJ, Costa L, Martins M, et al. Increased Interleukin-4 production by CD8 and gammadelta T cells in health-care workers is associated with the subsequent development of active tuberculosis[J]. J Infect Dis, 2004, 190(4): 756-766.
[4] Chen X, Zhou B, Li M, et al. CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells suppress Mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease[J]. Clin Immunol, 2007, 123(1): 50-59.
[5] Scott-Browne JP, Shafiani S, Tucker-Heard G, et al. Expansion

and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis[J]. J Exp Med, 2007, 204(9): 2159-2169.
[6] Kursar M, Koch M, Mittrücker HW, et al. Regulatory T cells prevent efficient clearance of Mycobacterium tuberculosis[J]. J Immunol, 2007, 178(5): 2661-2665.
[7] Dong C. Differentiation and function of pro-inflammatory Th17 cells. Microbes Infect[J], 2009, 11(5): 584-588.
[8] Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis[J]. J Clin Invest, 1999, 103(9): 1345-1352.
[9] Pitta MG, Romano A, Cabantous S, et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by Leishmania donovani[J]. J Clin Invest, 2009, 119(8): 2379-2387.
[10] Chatterjee S, Dwivedi VP, Singh Y, et al. Early Secreted Antigen ESAT-6 of Mycobacterium tuberculosis Promotes Protective T Helper 17 Cell Responses in a Toll-Like Receptor-2-dependent Manner[J]. PLoS Pathog, 2011, 7(11): e1002378.
[11] Khader SA, Bell GK, Pearl JE, et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge[J]. Nat Immunol, 2007, 8(4): 369-377.
[12] Nadvi SS, Nathoo N, Annamalai K, et al. Role of cerebrospinal fluid shunting for human immunodeficiency virus-positive patients with tuberculous meningitis and hydrocephalus[J]. Neurosurgery, 2000, 47(3): 644-650.

(收稿日期: 2012-11-08)

(上接第 1783 页)

蛋白水平表达均增高, 且与患者的血小板计数呈负相关, 进一步支持了 ITP 发病机制的“分子模拟”学说。我们推测, ITP 患者 PBMC 中穿孔素表达增高可能是由病原体感染引起的。

穿孔素不仅具有直接的免疫杀伤作用, 同时还有免疫调节作用, 通过调节其他免疫细胞而间接参与了感染免疫的应答过程。比如最近的一项研究就发现了穿孔素可以调节抗原特异性辅助性 T 淋巴细胞的功能以及抗体的产生^[6]。本研究发
现穿孔素与炎症因子 TNF- α 和 IFN- γ 呈正相关, 提示穿孔素对这两个炎症因子的表达可能具有调节作用。本研究与以往的研究^[7-8]一样, 均发现了 ITP 患者 TNF- α 水平增高。TNF- α 是固有免疫应答过程中产生的一类极为重要的炎症因子, 具有促进吞噬细胞活性的功能, 其可能通过增强单核巨噬细胞系统对自身抗体致敏的血小板的吞噬作用而参与了 ITP 的发病机制。

目前已知, 外周血 Th1/Th2 失衡是 ITP 的主要特征之一。Th1 细胞的主要效应因子是 IFN- γ , 而 Th2 细胞主要的效应因子则是 IL-4 和 IL-10。本研究发
现穿孔素与 IFN- γ 呈正相关, 与 IL-4 和 IL-10 无关, 提示穿孔素可能与 Th1 反应亢进有关。

总之, 本研究发现了 ITP 患者 PBMC 中穿孔素的表达明显增高, 且与血小板计数、TNF- α 、IFN- γ 相关, 提示穿孔素参与了 ITP 的发病机制, 值得进一步研究。

参考文献

[1] Cines DB, Bussel JB, Liebman HA, Luning Prak ET. The ITP

syndrome: pathogenic and clinical diversity[J]. Blood, 2009, 113: 6511-6521.
[2] Semple JW, Provan D, Garvey MB, Freedman J. Recent progress in understanding the pathogenesis of immune thrombocytopenia [J]. Curr Opin Hematol, 2010, 17: 590-595.
[3] Peng SL, Moslehi J, Robert ME, Craft J. Perforin protects against autoimmunity in lupus-prone mice[J]. J Immunol, 1998, 160: 652-660.
[4] Cappellano G, Orilieri E, Comi C, Chiocchetti A, Bocca S, Boggio E, et al. Variations of the perforin gene in patients with multiple sclerosis[J]. Genes Immun, 2008, 9: 438-444.
[5] 侯明. 成人特发性血小板减少性紫癜诊断治疗专家共识[J]. 中华血液学杂志, 2009, 30(5): 647-648.
[6] Bi E, Huang C, Hu Y, Wu X, Deng W, Lin G, et al. Novel function of perforin in negatively regulating CD4(+) T cell activation by affecting calcium signaling[J]. Cell Res, 2009, 19: 816-827.
[7] 李守玮, 李霞. ITP 患者血清 IL-2, 4, 6, 10 及 TNF- α , IFN- γ 测定的临床意义分析[J]. 检验医学, 2012, 27(3): 595-597.
[8] 韩志君, 胡志德, 邓安梅, 等. 慢性血小板减少性紫癜患者 microRNA-146a 的表达及其意义[J]. 中华微生物学与免疫学杂志, 2011, 31(6): 81-84.

(收稿日期: 2013-01-15)