

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.19.020

白细胞介素-29 与 Toll 样受体 4 在过敏性紫癜患儿中的表达及临床意义

程广坤¹, 张晓雪¹, 祖道明²

上海市浦东新区人民医院:1. 检验科;2. 儿科, 上海 201200

摘要:目的 观察白细胞介素(IL)-29、Toll 样受体(TLR)4 在过敏性紫癜(HSP)患儿中的表达及临床意义。方法 选择 48 例 HSP 患儿作为观察组,20 例健康儿童作为对照组,实时荧光定量 PCR 检测对照组和观察组(急性期、恢复期)外周血单个核细胞(PBMC)中 IL-29 mRNA、TLR4 mRNA 的表达水平,并检测不同时期血清中 IL-29、TLR4、IL-4、免疫球蛋白(Ig)A、IgM、IgG、C3、C4、 β_2 微球蛋白(β_2 -MG)水平。结果 观察组急性期 PBMC 中 IL-29、TLR4 mRNA 相对表达水平,以及血清中 IL-29、TLR4 水平明显高于恢复期和对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。观察组急性期 IgA、C3、IL-4、 β_2 -MG 水平明显高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。血清中 IL-29 与 TLR4 呈显著正相关($P < 0.05$);血清中 IL-29 与 IgA、C3、IL-4、 β_2 -MG 呈显著正相关($P < 0.05$);血清中 TLR4 与 IgA、C3、IL-4、 β_2 -MG 呈显著正相关($P < 0.05$)。结论 IL-29、TLR4 参与了 HSP 的发生、发展,维持了机体的炎症水平。

关键词:白细胞介素-29; Toll 样受体 4; 过敏性紫癜

中图分类号:R446.6

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)19-2821-03

Expression and clinical significance of interleukin-29 and Toll-like receptor 4 in children with allergic purpura

CHENG Guangkun, ZHANG Xiaoxue, ZU Daoming

1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Pediatric, Shanghai Pudong New Area People's Hospital, Shanghai 201200, China

Abstract: **Objective** To observe the expression and clinical significance of interleukin (IL)-29 and Toll-like receptor (TLR) 4 in children with allergic purpura. **Methods** A total of 48 children with allergic purpura were selected as observation group, 20 healthy children were recruited as control group, FQ-PCR was used to detect IL-29 mRNA and TLR4 mRNA in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) of control group and observation group (different stages including acute phase, recovery phase). The expression of IL-29, TLR4, IL-4, IgA, IgM, IgG, C3, C4, β_2 -microglobulin (β_2 -MG) in serum were detected at different times. **Results** The relative expression levels of IL-29 mRNA and TLR4 mRNA in the PBMC of the observation group were significantly higher than those in the recovery period of observation group and the control group. The levels of IL-29 and TLR4 in serum were significantly higher than those in the recovery period of observation group and the control group ($P < 0.05$). The levels of IgA, C3, IL-4 and β_2 -MG in the observation group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). Serum IL-29 and TLR4 had positive correlation ($P < 0.05$). Serum IL-29 positively correlated with IgA, C3, IL-4, β_2 -MG ($P < 0.05$). Serum TLR4 positively correlated with IgA, C3, IL-4, β_2 -MG ($P < 0.05$). **Conclusion** IL-29 and TLR4 are involved in the occurrence and progression of allergic purpura and maintain the body's inflammation level.

Key words: interleukin-29; Toll-like receptor 4; allergic purpura

过敏性紫癜(HSP)是儿童时期最常见的全身性血管炎,常伴有紫癜性皮疹、关节炎、肾脏受累和腹痛等。HSP 是一种免疫复合物介导的疾病,主要由免疫球蛋白(Ig)A 的循环免疫复合物沉积在小血管壁上导致,但目前尚未完全了解 HSP 发生、发展的分子机制^[1]。白细胞介素(IL)-29 属于干扰素(IFN) λ 家族,具有多种免疫调节活性,如抗病毒、抗增殖和抗肿瘤特性,参与调节 T 辅助细胞(Th)1/Th2 反应,调控巨噬细胞、B 细胞和浆细胞样树突状细胞的功能^[2]。而

Toll 样受体(TLR)为一种天然免疫受体,能特异性地识别并激活天然免疫功能,诱发机体免疫炎症反应。TLR4 是 TLR 中重要的成员,比较稳定^[3]。目前,IL-29、TLR4 与儿童 HSP 的相关性鲜有报道,本研究旨在探讨 IL-29、TLR4 在 HSP 患儿血清及外周血单个核细胞中的表达情况,并分析两者的关系,为阐明 HSP 发病机制提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2016 年 1 月至 2018 年 5 月在

本院接受治疗的 48 例 HSP 患儿纳入观察组,均符合 2006 年欧洲风湿联合会(EULAR)和儿科风湿学会(PReS)对 HSP 的诊断标准^[4],其中男 25 例,女 23 例;年龄 3~13 岁,平均(7.84±3.26)岁。纳入标准:(1)均为初次发病。(2)近 2 周内均未接受糖皮质激素及免疫抑制剂的治疗。排除标准:合并其他免疫系统及血液系统疾病患者。另选取同期接受体检的 20 例健康儿童纳入对照组,其中男 11 例,女 9 例;年龄 4~13 岁,平均(7.68±3.52)岁。两组儿童的年龄、性别等一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。所有儿童及家属均自愿参与本研究,并签署知情同意,本研究经过本院伦理委员会批准后进行。

1.2 方法

1.2.1 标本采集及处理 所有研究对象入院时均采集空腹静脉血 4 mL,作为初发急性期检测标本,病情缓解后[与治疗前采血间隔(9±5)d],再次采集静脉血 4 mL 作为恢复期检测标本。2 mL 血液标本 3 000 r/min 离心 5 min,分离血清,-70℃冻存备用;另外 2 mL 血液标本肝素抗凝并离心,应用人淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞(PBMC),收集细胞,检测 TLR4、IL-4 mRNA 表达水平。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 检测 IL-29 mRNA、TLR4 mRNA 的表达 Trizol 提取 PBMC 总 RNA,测定纯度。按照反转录试剂盒说明书反转录生成 cDNA。FQ-PCR 采用 20 μL 的反应体系,其中 2×SYBRR Premix Ex-Taq II 10 μL,上游(10 μmol)和下游(10 μmol)各 0.5 μL,cDNA 1 μL,PCR 级高纯水 8 μL。采用 light cycleR 96 实时荧光定量 PCR 仪(Roche Diagnostics 公司,德国)同时对目的基因和内参基因(β-actin)进行基因扩增,引物序列由上海英骏公司提供。IL-29(NM_172140.1)上游序列:5'-TGG TGA CTT TGG TGC TAG GC-3',下游序列:5'-GGC CTT CTT GAA GCT CGC TA-3',产物 134 bp;TLR4(NM_003266.3)上游序列:5'-GCT CGG TCA GAC GGT GAT AG-3',下游序列:5'-AAG CTC TGG GTT TCA TGC CA-3',产物 218 bp。采用相对定量 2^{-ΔΔCt} 法比较目的基因水平。

1.2.3 其他检测 采用 ELISA 检测血清中 IL-29(批号 RAB0476)、TLR4(批号 RAB0422)、IL-4(批号 RAB1089)水平,试剂盒购自美国 Sigma-Aldrich 公司;免疫散射比浊法检测 IgA(批号 180421)、IgM(批号 180417)、IgG(批号 180522)、补体 C3(批号 180509)、补体 C4(批号 180512)水平,胶乳增强免疫比浊法测定 β₂ 微球蛋白(β₂-MG)(批号 180315)水平,试剂盒购自南京建成生物工程研究所,严格按照说明书步骤进行操作。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理及统计学分析。呈正态分布的计量资料

以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验,组内比较采用配对样本 t 检验;计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PBMC 中 IL-29 mRNA、TLR4 mRNA 的表达 观察组急性期 IL-29 mRNA 相对表达水平明显高于观察组恢复期和对照组,差异均有统计学意义($t=3.033,4.353, P=0.003,0.000$),TLR4 mRNA 相对表达水平明显高于观察组恢复期和对照组,差异均有统计学意义($t=3.538,7.894, P=0.001,0.000$);观察组恢复期 IL-29 mRNA、TLR4 mRNA 相对表达水平与对照组比较,差异无统计学意义($t=1.665,1.896, P=0.101,0.087$)。见表 1。

表 1 PBMC 中 IL-29 mRNA、TLR4 mRNA 的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	IL-29 mRNA	TLR4 mRNA
对照组	20	1.03±0.37	0.56±0.11
观察组	48		
急性期		1.52±0.57	1.42±0.48
恢复期		1.21±0.42	1.08±0.25

2.2 血清中 IL-29、TLR4 水平比较 观察组急性期 IL-29 水平明显高于观察组恢复期和对照组,差异均有统计学意义($t=6.458,8.175, P=0.000,0.000$),TLR4 水平明显高于观察组恢复期和对照组,差异均有统计学意义($t=5.528,10.775, P=0.000,0.000$);观察组恢复期 IL-29、TLR4 水平与对照组比较,差异无统计学意义($t=1.002,1.892, P=0.319,0.082$)。见表 2。

表 2 血清中 IL-29、TLR4 水平比较($\bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)

组别	<i>n</i>	IL-29	TLR4
对照组	20	22.49±11.26	0.82±0.11
观察组	48		
急性期		55.47±25.58	3.27±1.01
恢复期		28.47±13.59	1.06±0.37

2.3 血清中 Ig 和补体水平比较 观察组急性期 IgA、C3、IL-4、β₂-MG 水平明显高于恢复期,差异均有统计学意义($t=7.083,2.088,3.204,12.996, P=0.000,0.039,0.002,0.000$)。观察组急性期 IgA、C3、IL-4、β₂-MG 水平明显高于对照组,差异均有统计学意义($t=7.191,12.203,2.897,11.269, P=0.000,0.000,0.005,0.000$)。观察组恢复期 IgA、C3 水平与对照组比较,差异无统计学意义($t=1.581,1.508, P=0.119,0.076$)。见表 3。

2.4 相关性分析 血清中 IL-29 与 TLR4 呈显著正相关($r=0.602, P<0.05$);血清中 IL-29 与 IgA、C3、IL-4、β₂-MG 呈显著正相关($r=0.476,0.412,0.501,0.509, P<0.05$),IL-29 与 IgM、IgG、C4 无显著相关($P>0.05$);血清中 TLR4 与 IgA、C3、IL-4、β₂-MG 呈显著正相关

($r=0.458、0.409、0.514、0.503, P<0.05$), 与 IgM、IgG、C4 无显著相关($P>0.05$)。

表 3 血清中免疫球蛋白和补体水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	IgA(g/L)	IgM(g/L)	IgG(g/L)	C3(g/L)	C4(g/L)	IL-4(pg/mL)	β ₂ -MG(mg/L)
对照组	20	1.25±0.42	1.41±0.38	1.22±0.36	0.22±0.04	0.22±0.04	15.33±5.28	1.38±0.43
观察组	48							
急性期		2.37±0.64	1.40±0.51	9.02±1.31	1.51±0.47	0.25±0.06	20.13±6.57	2.98±0.57
恢复期		1.48±0.59	1.43±0.47	8.05±1.27	1.32±0.42	0.23±0.05	16.22±5.32	1.57±0.49

3 讨 论

IL-29 为近年新发现的一种多功能炎性细胞因子,可以引发和扩大炎症反应^[5]。大量研究证实,IL-29 在类风湿关节炎、系统性硬化病、系统性红斑狼疮等自身免疫疾病中发挥重要作用^[6]。本研究显示,HSP 急性期患儿 PBMC 中 IL-29 mRNA 水平明显高于对照组,这说明 IL-29 与 HSP 的发病关系密切,同时也提示 HSP 患者 IL-29 在转录水平已经发生改变。本研究表明,HSP 急性期患儿的血清 IL-29、IL-4 水平明显高于对照组,且血清中的 IL-29 与 IL-4 呈正相关,说明 Th2 过度活化及细胞因子过度释放。同时,也提示 IL-29 在 HSP 发病中扮演着重要的角色,其机制可能是 IL-29 水平的增加,激活 NF-κB 信号通路,并进一步诱导 Th2 过度活化及细胞因子过度释放,严重时诱发 HSP^[7]。HSP 免疫紊乱的原因复杂,其中 TLR4 介导的免疫反应不仅是侵入病原体所必需的,而且在维持共生菌群的稳态和反应中也起着至关重要的作用,可以说 TLR4 与多种自身免疫学疾病相关。有研究显示,TLR2、TLR4、TLR6 活化后可能通过 MyD88 依赖的途径参与 HSP 的发病^[8]。本研究中,观察组急性期患儿的 PBMC 中 TLR4 mRNA 水平及血清中的 TLR4 水平均明显高于对照组,说明 HSP 的患儿体内伴有较高水平的炎症。相关分析显示,TLR4 与 IL-4 呈显著正相关,这也证明了上述观点。

HSP 发病与免疫复合物沉积及补体的活化有关,IgA 在肾脏的沉积是导致肾脏发生病变的重要原因。而且 IgA 与 IgM 合并沉积可加重肾脏病变,而 C3 发生沉积的患者肾脏病变程度更加严重^[9]。本研究中,观察组急性期 IgA、C3 水平明显高于对照组,而缓解期其水平基本恢复正常,这些都说明 IgA、C3 水平加重了 HSP 患儿的病变程度。通过相关性分析发现,IL-29 与 TLR4 均与 IgA、C3 水平呈正相关,其原因可能是 IL-29 增强 HSP 患儿机体释放较高水平的炎症因子和细胞因子,包括 TLR4,并在肾脏损伤发展中起关键作用,两者的紧密关系对于维持炎症反应是必需的。近年来,β₂-MG 与肾脏损伤的关系已得到普遍认可,β₂-MG 水平越高,显示肾脏损伤越严重^[10]。本研究中,观察组急性期患儿 β₂-MG 水平明显高于对照

组,而恢复期基本恢复正常水平,这些与上述情况一致。通过分析发现,IL-29、TLR4 均与 β₂-MG 呈正相关,说明 IL-29 与 TLR4 有望成为判断 HSP 患儿病情程度的早期敏感指标。

综上所述,IL-29、TLR4 参与了 HSP 的发生和进展,维持了机体的炎症水平,IL-29、TLR4 可能成为 HSP 诊断及病情判断的重要指标。

参考文献

[1] 谭雄俊,杨宝辉,张丽,等. IL-10+B 细胞对儿童过敏性紫癜 Th17/Treg 免疫平衡紊乱的影响[J]. 免疫学杂志, 2017,33(2):133-140.

[2] CHO C H, YOON S Y, LEE C K, et al. Effect of interleukin-29 on interferon-α secretion by peripheral blood mononuclear cells[J]. Cell J, 2015,16(4):528-537.

[3] IOTZOVA-WEISS G, FREIBERGER S N, JOHANSEN P, et al. TLR4 as a negative regulator of keratinocyte proliferation[J]. PLoS One, 2017,12(10):e0185668.

[4] 王菲,董丽丽. 过敏性紫癜患儿血清中 IL-33 和可溶性受体的水平及其临床意义[J]. 中国实验血液学杂志, 2017, 25(2):517-521.

[5] 李小莉,冯蕾,童开,等. 白细胞介素-29 在小儿支气管上皮细胞抗呼吸道合胞病毒感染的机制探讨[J]. 上海医学, 2018,41(4):202-210.

[6] ZHANG H, SONG B, HE S. Interleukin 29 activates expression of tissue inhibitor of metalloproteinase 1 in macrophages via toll like receptor 2[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(6):8363-8368.

[7] CHEN T, FU L X, GUO Z P, et al. Elevated serum interleukin-29 levels in patients with Henoch-Schönlein purpura[J]. Australas J Dermatol, 2018,21(2):213-215.

[8] 高辉香,田玲玲,常红,等. 过敏性紫癜患儿外周血单核细胞 TLR2、TLR4、TLR6 及与 Treg 相关细胞因子的表达[J]. 中国组织工程研究, 2014,18(38):6222-6227.

[9] 赵国晓. 过敏性紫癜患儿早期肾损伤血清 IgA/C3 比值分析[D]. 太原:山西医科大学, 2018.

[10] 宋晓颖,王淑义,姜伟. 小儿过敏性紫癜血清白介素-23 水平变化的意义[J]. 临床和实验医学杂志, 2017,16(6): 593-595.