

成人原发性免疫性血小板减少症患者外周血IL-37的表达

刘柳 冯可 王美玲 束新辉 周可树 周虎 刘新建 宋永平

Expression of IL-37 in peripheral blood of adults with primary immune thrombocytopenia Liu Liu, Feng Ke, Wang Meiling, Shu Xinhui, Zhou Keshu, Zhou Hu, Liu Xinjian, Song Yongping

Corresponding author: Zhou Hu, Department of Hematology, Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450008, China. Email: tigerzhoupumc@163.com

原发性免疫性血小板减少症(ITP)是一种以血小板减少及出血风险增加为特征的获得性自身免疫性疾病。ITP在成人中的年发病率为3.3/10万^[1]。ITP的发病机制目前仍不清楚。IL-37是一种天然的抗炎因子,2000年被Kumar等^[2]发现。研究表明,IL-37与多种自身免疫性疾病的发病有密切关系^[3],但IL-37在ITP中的表达情况未见报道。本研究中,我们对活动性ITP(未治疗或复发)、缓解后ITP和健康人外周血IL-37、IL-18、IL-18结合蛋白(IL-18BP)、IFN- γ 和TGF- β 表达进行检测,探讨IL-37及相关细胞因子在ITP发病中的作用机制。

病例与方法

1. 病例:自2013年7月至2014年10月在河南省肿瘤医院门诊及住院的ITP患者共40例,入组标准参照文献^[4]。①活动性ITP组(20例):新诊断ITP 13例,持续性ITP 3例,慢性ITP 4例;女14例,男6例,中位年龄31.5(21~63)岁,中位PLT 20(1~35) $\times 10^9/L$ 。②缓解组(20例):新诊断ITP 2例,持续性ITP 9例,慢性ITP 9例;女13例,男7例;中位年龄33.5(18~66)岁,中位PLT 144(101~522) $\times 10^9/L$;治疗方案:单用糖皮质激素治疗12例,糖皮质激素+利妥昔单抗4例,糖皮质激素+静脉丙种球蛋白、糖皮质激素+静脉丙种球蛋白+TPO、糖皮质激素+利妥昔单抗+静脉丙种球蛋白、糖皮质激素+利妥昔单抗+静脉丙种球蛋白+TPO各1例。以20名健康体检者作为正常对照组,男9名、女11名,中位年龄37(23~60)岁,中位PLT 207(135~289) $\times 10^9/L$ 。本研究得到医

院伦理委员会批准,受试者均知情同意。

2. 主要试剂:Ficoll-Paque细胞分离液(天津灏洋生物制品科技有限公司产品);TRIzol RNA提取试剂(美国Invitrogen公司产品);RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(美国Promega公司);SYBR® Premix Ex Taq™(日本东洋纺株式会社);IL-37 ELISA试剂盒(瑞士Adipogen公司);IL-18、IL-18BP、IFN- γ 以及TGF- β ELISA试剂盒(北京欣博盛生物科技有限公司)。

3. 标本采集及制备:采集受试者外周静脉血2 ml,常规离心分离上层血清和下层细胞。血清置于EP管冻存于-80℃,下层细胞采用Ficoll-Paque分层液法提取单个核细胞,-80℃冻存。

4. Real-time PCR检测外周血单个核细胞IL-37、IL-18、IL-18BP、IFN- γ 、TGF- β 基因mRNA表达:将置于-80℃低温保存的单个核细胞解冻,提取总RNA,逆转录试剂盒合成cDNA,以GAPDH为管家基因,Real-time PCR扩增应用SYBR® Premix Ex Taq™试剂盒进行,计算并比较活动性ITP、缓解后ITP与正常对照组IL-37、IL-18、IL-18BP、IFN- γ 以及TGF- β 基因mRNA的相对表达量。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计并合成(表1),PCR产物经测序验证。

5. ELISA法检测血清IL-37、IL-18、IFN- γ 、TGF- β 蛋白浓度:按照试剂盒说明书操作。在酶标仪检测450 nm处测得吸光度(A)值,通过ELISA专用软件或者EXCLE表绘制出标准曲线,进而得出受试者血清IL-37、IL-18、IFN- γ 、TGF- β 浓度。

6. 统计学处理:应用SPSS 22.0软件对数据进行分析,计量资料应用 $\bar{x}\pm s$ 表示,各基因mRNA的相对表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法描述。以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

1. ITP患者外周血IL-37、IL-18、IL-18BP、IFN- γ 、TGF- β 浓度:活动性ITP患者血清IL-37、IL-18、IFN- γ 浓度均高于缓解后ITP组及正常对照组($P < 0.05$),上述因子水平在缓解后ITP组与正常对照组之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。活动性ITP组血清TGF- β 水平低于缓解后ITP组及正常对照组($P < 0.05$),缓解后ITP组与正常对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。三组间IL-18BP比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。详见表2。

2. ITP患者外周血单个核细胞IL-37、IL-18、IL-18BP、

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.07.016

基金项目:国家自然科学基金(81370615、81600097)

作者单位:450000 郑州大学第一附属医院血液科(刘柳);郑州大学附属肿瘤医院(冯可、王美玲、束新辉、周可树、周虎、刘新建、宋永平)

通信作者:周虎,Email: tigerzhoupumc@163.com

IFN- γ 、TGF- β 基因 mRNA 表达水平:活动性 ITP 组 IL-37、IL-18、IFN- γ 基因 mRNA 表达均高于缓解后 ITP 组及正常对照组 ($P < 0.05$);活动性 ITP 组 TGF- β 基因 mRNA 表达水平低于缓解后 ITP 组及正常对照组 ($P < 0.05$);以上各细胞因子的 mRNA 水平在缓解后 ITP 组及正常对照组间比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。三组间 IL-18BP mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。详见表 3。

3. 活动性 ITP 患者细胞因子表达量之间的相关性:活动性 ITP 组 IL-37、IL-18BP 基因 mRNA 表达量呈正相关 ($r = 0.84$, $P = 0.001$), IL-37、IFN- γ 基因 mRNA 表达量呈正相关 ($r = 0.67$, $P = 0.029$), 见图 1。其他细胞因子 mRNA 表达无相关性。

讨 论

ITP 是一种自身免疫性疾病,血小板破坏增加及生成减少、巨核细胞成熟障碍等多种因素导致血小板数量减少^[5]。在 ITP 发病过程中,炎症细胞通过分泌大量促炎因子及抗炎因子,破坏二者间的平衡,从而引起自身免疫紊乱,最终导致了疾病的发生^[6-7]。IL-37 是新近发现的一种天然抗炎因子,可能对多种细胞因子的表达有调控作用。本研究中,我们检

测了活动性 ITP、缓解后 ITP 及正常人外周血 IL-37 浓度及 mRNA 的表达,并观察其与 IL-18、IL-18BP、IFN- γ 和 TGF- β 的相关性,探讨 IL-37 在 ITP 发病中的可能作用机制。

IL-37 是 IL-1 家族第 7 个细胞因子(IL-1F7),后根据其生物学功能改名为 IL-37^[8]。IL-37 广泛存在于人体多种细胞和组织中,但小鼠体内缺乏 IL-37 的表达。IL-37 主要存在于淋巴细胞、单核细胞以及皮肤表皮细胞。国外有学者研究 IL-37b 转基因小鼠的巨噬细胞(RAW 细胞),发现过量的 IL-37 表达可促进 IL-13 等抗炎因子合成,抑制 IL-1 α 、TNF- α 、IL-6、GM-CSF、IL-1 受体拮抗剂(IL-1R α)等促炎因子的表达^[9]。经脂多糖(LPS)处理过的 IL-37 过表达小鼠模型中,血清中 IL-6、IL-1b、IL-17、IFN- γ 水平减低,而 IL-4、IL-10、IL-13 水平升高^[10]。基于这些研究,我们推测 IL-37 能通过影响细胞因子表达来促进 Th2 细胞功能,抑制 Th1 和 Th17 的免疫应答作用,从而减轻炎症反应。

Chen 等^[11]研究发现强直性脊柱炎患者 IL-37 表达水平升高。本研究显示,经治疗缓解后 ITP 患者的 IL-37 表达水平明显降低,提示 IL-37 可能参与了 ITP 的发病。为保证机体内环境稳态,ITP 患者体内免疫失衡造成炎症因子的大量释放的同时,也促进 IL-37 等抗炎因子生成,这可能是活动性

表 1 Real-time PCR 检测原发性血小板减少症患者外周血单个核细胞 IL-37、IL-18、IL-18BP、IFN- γ 、TGF- β 基因 mRNA 表达引物序列

基因	序列(5'→3')		扩增片段长度(bp)
	上游引物	下游引物	
IL-37	CTCTGCGGAGAAAGGAAG	GCTGAAGGGATGGATGAC	101
IL-18	AAGATAGCCAGCCTAGAGGTA	TGTTATCAGGAGGATTCATTC	117
IL-18BP	AACACACCCCTCCTTCTCT	GAGTGCAAGGCTAAGGCATC	211
TGF- β	TGGAAACCCACAACGAAAT	CCATGAGAAGCAGGAAAGG	444
IFN- γ	GGAGACCATCAAGGAAGACA	GCGACAGTTCAGCCATCAC	155
GAPDH	GGATTGTGTCGTATTGGG	GGAAGATGGTGATGGGATT	205

注:IL-18BP:IL-18 结合蛋白

表 2 ITP 患者及正常对照组外周血 IL-37、IL-18、IL-18BP、IFN- γ 、TGF- β 浓度比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	IL-37 (ng/L)	IL-18 (ng/L)	IL-18BP (ng/L)	IFN- γ (ng/L)	TGF- β (μ g/L)
正常对照组	20	49.34 \pm 37.26	284.22 \pm 156.41	24.36 \pm 5.78	225.83 \pm 78.41	23.91 \pm 5.14
活动性 ITP	20	144.54 \pm 63.98 ^a	511.84 \pm 319.95 ^a	22.30 \pm 6.51	348.29 \pm 145.06 ^a	7.44 \pm 5.59 ^a
缓解后 ITP	20	96.03 \pm 65.14 ^b	282.04 \pm 183.0 ^b	27.81 \pm 10.62	162.94 \pm 104.3 ^b	11.13 \pm 4.43 ^b

注:ITP:原发性血小板减少症;IL-18BP:IL-18 结合蛋白。与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与活动性 ITP 组比较,^b $P < 0.05$

表 3 ITP 患者外周血单个核细胞 IL-37、IL-18、IL-18BP、IFN- γ 和 TGF- β mRNA 相对表达量($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	IL-37	IL-18	IL-18BP	IFN- γ	TGF- β
正常对照	20	1.03 \pm 0.87	1.12 \pm 0.79	1.06 \pm 0.39	1.21 \pm 0.42	1.16 \pm 0.41
活动性 ITP	20	4.45 \pm 0.06 ^a	1.52 \pm 0.43 ^a	1.49 \pm 0.52	1.62 \pm 0.28 ^a	0.44 \pm 0.21 ^a
缓解后 ITP	20	0.82 \pm 0.46 ^b	1.04 \pm 0.92 ^b	1.28 \pm 0.63	0.87 \pm 0.37 ^b	1.05 \pm 0.35 ^b

注:ITP:原发性血小板减少症;IL-18BP:IL-18 结合蛋白。与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与活动性 ITP 组比较,^b $P < 0.05$

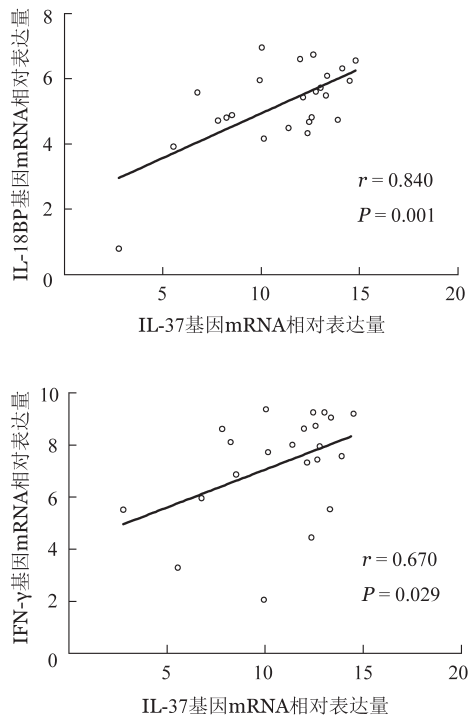


图1 活动性原发性免疫性血小板减少症患者外周血单个核细胞IL-37与IL-18结合蛋白(IL-18BP)、IFN- γ 基因mRNA表达量的相关性

ITP患者IL-37表达量增高的原因。

IL-18是一种强烈的Th1反应诱导因子,能诱导T细胞和NK细胞产生IFN- γ ,促进Th1细胞因子的极化。成熟体IL-18通过与细胞表面的IL-18R结合作用来发挥其生物学作用。IL-18能通过刺激Th1细胞和NK细胞引起免疫紊乱,在自身免疫性疾病及慢性炎症反应的发病中占重要地位。IL-18BP与IL-18有高度亲和力,与之结合可阻断其信号传导,导致IFN- γ 生成减少^[12]。本研究中,活动性ITP患者血清IL-18浓度及mRNA表达明显高于缓解组和对照组,而IL-18BP的表达在三组间无明显差异,另外,IL-37与IL-18BP的基因表达呈正相关。单宁宇等^[13]发现,新诊断ITP患者IL-37的表达与IL-18表达呈正相关。本组病例结果有所不同,可能与纳入部分慢性ITP和持续性ITP患者有关。IL-18BP是IL-18的天然拮抗剂,而IL-37与IL-18的亲和力很低。成熟体IL-37与IL-18BP和IL-18Ra的Fc段结合IL-37可能与IL-18BP相互作用,共同抑制IL-18的信号传导通路。

IFN- γ 是II型IFN家族的唯一成员,是一种强效的促炎性因子。IFN- γ 主要由Th1细胞、CD8⁺毒性淋巴细胞和自然杀伤(NK)细胞产生。国内有研究表明系统性红斑狼疮(SLE)患者体内IL-37与IFN- γ 表达呈正相关^[14]。Nold等^[10]的研究结果显示IFN- γ 可以促进IL-37的生成。本研究结果显示,IL-37的基因表达与IFN- γ 呈正相关,与上述研究结果相似。

除Th1、Th2细胞外,Th3细胞也参与ITP的发病。Th3

细胞是一种调节性T细胞,对Th1、Th2细胞有明显抑制作用^[15],在自身免疫性疾病中发挥免疫调节的作用。1型调节性T细胞(Tr1细胞)主要分泌TGF- β 、IL-10等细胞因子,能有效抑制炎症因子的产生及免疫效应细胞的增殖、活化等。ITP的发病机制与免疫失衡密切相关,Arandi等^[16]研究发现ITP患者血清TGF- β 水平较正常人明显降低。本研究结果亦显示,活动性ITP患者血清中TGF- β 水平明显低于正常人。这说明活动性ITP患者体内的Th3细胞水平下降或功能降低。Andersson^[17]将ITP患者分成活动组、稳定组及缓解组,活动组血清TGF- β 浓度最低,稳定组次之,缓解组最高。这种增长趋势说明随着疾病的好转,患者体内的免疫稳态正在重建,也再次证明了免疫紊乱在ITP发病中的重要作用。

宋立军^[14]研究发现,SLE患者IL-37表达与TGF- β 表达呈正相关。本组ITP患者这两种细胞因子表达无明显相关性。IL-37、TGF- β 均来源广泛,影响其表达的因素很多,这两种因子间的相关调控十分复杂。IL-37是否可以通过调控ITP患者Th3细胞而调控免疫反应,有待进一步研究。

本研究结果初步表明,活动性ITP患者体内IL-37表达明显增高,且能调控多种细胞因子从而发挥其抗炎效应。尽管目前ITP治疗方法很多,仍有部分患者治疗无效,或者病情反复。研究表明,体内或体外的IL-37均能调控细胞因子抑制T细胞功能,减少树突细胞的分化,发挥其抗炎作用^[18]。因此我们推测,对于糖皮质激素甚至切脾治疗无效的ITP患者,外源性增加血清IL-37水平或许可以成为一种新的治疗策略。

参考文献

- [1] Terrell DR, Beebe LA, Vesely SK, et al. The incidence of immune thrombocytopenic purpura in children and adults: A critical review of published reports[J]. Am J Hematol, 2010, 85(3):174-180. DOI: 10.1002/ajh.21616.
- [2] Kumar S, Hanning CR, Brigham-Burke MR, et al. Interleukin-1F7B (IL-1H4/IL-1F7) is processed by caspase-1 and mature IL-1F7B binds to the IL-18 receptor but does not induce IFN-gamma production[J]. Cytokine, 2002, 18(2):61-71.
- [3] Xu WD, Zhao Y, Liu Y. Insights into IL-37, the role in autoimmune diseases[J]. Autoimmun Rev, 2015, 14(12):1170-1175. DOI: 10.1016/j.autrev.2015.08.006.
- [4] 中华医学会血液学分会止血与血栓学组. 成人原发性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. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.02.001.
- [5] McMillan R. Antiplatelet antibodies in chronic immune thrombocytopenia and their role in platelet destruction and defective platelet production[J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2009, 23(6):1163-1175. DOI: 10.1016/j.hoc.2009.08.008.
- [6] Semple JW, Provan D. The immunopathogenesis of immune thrombocytopenia: T cells still take center-stage[J]. Current opinion in hematology, 2012, 19(5): 357-362.
- [7] Ma L, Liang Y, Fang M, et al. The cytokines (IFN-gamma, IL-2,

- IL-4, IL-10, IL-17) and Treg cytokine (TGF-beta1) levels in adults with immune thrombocytopenia [J]. *Pharmazie*, 2014, 69 (9):694-697.
- [8] Dunn E, Sims JE, Nicklin MJ, et al. Annotating genes with potential roles in the immune system: six new members of the IL-1 family [J]. *Trends Immunol*, 2001, 22 (10):533-536. DOI: 10.1016/S1471-4906(01)02034-8.
- [9] Boraschi D, Lucchesi D, Hainzl S, et al. IL-37: a new anti-inflammatory cytokine of the IL-1 family [J]. *Eur Cytokine Netw*, 2011, 22(3):127-147. DOI: 10.1684/ecn.2011.0288.
- [10] Nold MF, Nold-Petry CA, Zepp JA, et al. Interleukin 37 is a fundamental inhibitor of innate immunity [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(11): 1014-1022. DOI: 10.1038/ni.1944.
- [11] Chen B, Huang K, Ye L, et al. Interleukin-37 is increased in ankylosing spondylitis patients and associated with disease activity [J]. *J Transl Med*, 2015, 13:36. DOI: 10.1186/s12967-015-0394-3.
- [12] Wawrocki S, Druszczynska M, Kowalewicz-Kulbat M, et al. Interleukin 18 (IL-18) as a target for immune intervention [J]. *Acta Biochim Pol*, 2016, 63 (1):59-63. DOI: 10.18388/abp.2015_1153.
- [13] 单宁宁, 王欣, 姜玉杰, 等. ITP患者脾细胞分泌IL-18及IL-18结合蛋白的研究[J]. *中国实验血液学杂志*, 2011, 19(4):975-978.
- [14] 宋立军. 免疫调控基因IL-37和TIPE2在SLE患者的表达及其意义[D]. 济南:山东大学, 2012.
- [15] Prud'homme GJ, Piccirillo CA. The inhibitory effects of transforming growth factor-beta-1 (TGF-beta1) in autoimmune diseases [J]. *J Autoimmun*, 2000, 14 (1):23-42. DOI: 10.1006/jaut.1999.0339.
- [16] Arandi N, Mirshafiey A, Jeddi-Tehrani M, et al. Alteration in frequency and function of CD4-CD25-FOXP3- regulatory T cells in patients with immune thrombocytopenic purpura [J]. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2014, 13(2):85-92.
- [17] Andersson J. Cytokines in idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) [J]. *Acta Paediatr Suppl*, 1998, 424:61-64.
- [18] Sharma S, Kulk N, Nold MF, et al. The IL-1 family member 7b translocates to the nucleus and down-regulates proinflammatory cytokines [J]. *J Immunol*, 2008, 180 (8):5477-5482. DOI: 10.4049/jimmunol.180.8.5477.

(收稿日期:2017-01-14)

(本文编辑:徐茂强)

二例丙酮酸激酶缺乏症 PKLR 基因突变确证

黄振东 施均 邵英起 聂能 张静 黄金波 李星鑫 葛美丽 郑以州

Identification and characterization of PKLR gene mutation in two patients with erythrocyte pyruvate kinase deficiency
Huang Zhendong, Shi Jun, Shao Yingqi, Nie Neng, Zhang Jing, Huang Jinbo, Li Xingxin, Ge Meili, Zheng Yizhou
 Corresponding author: Zheng Yizhou, Institute of Hematology & Hospital of Blood Diseases, CAMS & PUMC, Tianjin 300020, China. Email:zheng_yizhou@hotmail.com

丙酮酸激酶缺乏症(PKD)是一种常见的遗传性红细胞酶病,可引起遗传性非球形红细胞溶血性贫血^[1]。PK活性检测是诊断PKD的传统方法,然而PK活性易受患者年龄、

同工酶代谢及检测方法的影响,并且部分患者的PK活性降低不明显甚至代偿性升高,给临床诊断带来困难^[2]。基因检测则不受上述因素的影响,目前已成为确诊PKD的重要手段。我们收治了2例先天性溶血性贫血患者,常规溶血检查均正常,通过二代靶向测序技术诊断为双重杂合子PKD。现报道如下并进行文献复习。

病例资料

例1,女,3岁,籍贯山东。患儿于出生后24h即出现重度黄疸,总胆红素(TBIL)501 μmol/L,间接胆红素(IBIL)482 μmol/L, HGB 60 g/L。考虑为“溶血性贫血”,给予输注红细胞及对症治疗,黄疸有所减退。曾于院外行Coombs试验、酸溶血试验、红细胞渗透脆性试验(EOF试验)、酸化甘油溶血试验(AGLT₅₀试验)及红细胞酶相关检查,均未发现异常。曾给予泼尼松治疗4个月,无效。患儿1岁前每月输注红细胞0.5 U,2岁时每月输注红细胞1 U,目前1个半月输注

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.07.017

作者单位:300020 天津,中国医学科学院、北京协和医学院血液学研究所、血液病医院

通信作者:郑以州,Email:zheng_yizhou@hotmail.com