文章编号:1000-5404(2010)07-0677-03

论著

过敏性紫癜发病中树突状细胞与T辅助细胞分化失衡的关系

陶 红,李 秋,王 莉,李翠萃,阳海平,张高福 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院肾脏免疫科)

[摘要] **目的** 探讨树突状细胞(dendritic cells,DC)调控信号的异常与过敏性紫癜(Henoch-Schonlein purpura,HSP)发病中T辅助细胞分化失衡的关系。**方法** 分别采用散射比浊法、ELISA和流式细胞技术,检测50例HSP患儿和20例健康儿童血浆中免疫球蛋白、血浆IL-4、INF-γ和DC培养上清IL-12、IL-10水平及DC表面CD_{86}、CD_{80}、CD_{83}、HLA-DR、CD-209的表达情况。**结果** 与对照组(健康儿童,$n=20$)比较,HSP组患儿:血浆免疫球蛋白IgA及IgE水平升高;血浆中Th2类细胞因子IL-4升高,Th1类细胞因子INF-γ降低;DC培养上清中IL-10升高,IL-12降低;DC表达CD_{86}、CD_{83}、HLA-DR水平升高,表达CD_{80}水平降低($P<0.05$)。CD-209在两组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** DC的抗原特异性信号、协同刺激信号和分化或极化信号3种调控信号的异常,与HSP患儿Th1/Th2失衡、免疫球蛋白合成异常密切相关。

[关键词] 树突状细胞;T淋巴细胞;过敏性紫癜;儿童
[中图法分类号] R554.502;R392.12;R392.3 **[文献标志码]** A

Relationship of dendritic cells with imbalanced T helper cells differentiation in pathogenesis of Henoch-Schonlein purpura: report of 58 children

Tao Hong, Li Qiu, Wang Li, Li Cuicui, Yang Haiping, Zhang Gaofu (Department of Kindey Immunity, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[Abstract] **Objective** To explore the relationship between the abnormal regulation signals of dendritic cells (DCs) and the imbalance of T helper cells during the pathogenesis of Henoch-Schonlein purpura (HSP). **Methods** A total of 58 HSP children, 38 boys and 20 girls, at an age of 3 to 16 (mean 7.1) who were admitted in our department from June 2008 to March 2009 were subjected in this study. Another 20 health matched children, 12 boys and 8 girls, at an age of 6 to 14 (mean 7.5) served as control. Their parents all were fully informed the aim and protocol of this study and signed an informed content. This study was approved by the Ethics Committee of our hospital. No hormone or immunosuppressant was used in 4 weeks before blood sampling. Peripheral blood of 5 ml was collected to culture DCs. Immunoglobulin levels were detected by nephelometry assay in children with HSP. Inflammatory cytokines IL-4, INF-γ in blood plasma and IL-12, IL-10 in the supernatants of cultured DCs were detected by ELISA. The count of CD_{86}, CD_{80}, CD_{83}, HLA-DR and CD-209 expressed on DC were detected by cell flow cytometry. **Results** In HSP group, the levels of plasma IgA and IgE were higher than the control group, IL-12 levels in the supernatants of cultured DC and INF-γ levels in the plasma were lower than the control group, and IL-10 levels in the supernatants of cultured DCs and IL-4 levels in the plasma were significantly increased than the control group. CD_{86}, CD_{83} and HLA-DR expressed in DCs were significantly higher and CD_{80} was significantly lower than the control group ($P<0.05$). CD-209 of 2 groups had no statistical significance ($P>0.05$). **Conclusion** The anomalies of antigen specific signals, costimulatory signals and differentiation or polarization signal of DCs might be involved in Th1/Th2 imbalance and synthesis of abnormal immunoglobulins in pathogenesis HSP.

[Key words] dendritic cells; T lymphocytes; Henoch-Schonlein purpura; child

Corresponding author: LI Qiu, Tel: 86-23-63603929, E-mail: Liqiu809@hotmail.com

过敏性紫癜(henoch-schonlein purpura,HSP)是儿童时期最常见的毛细血管变态反应性疾病,患儿体内最主要的免疫功能紊乱为Th1/Th2失衡,Th0细胞向Th2细胞优势活化及免疫球蛋白产生异常等[1],但其具体机制不详。树突状细胞(dendritic cells,DC)是唯一能激活初始T淋巴细胞产生免疫应答的抗原递呈细胞,在自身免疫性疾病的发生中起重要的作用。本研究模拟DC在外周血的成熟过程,试图了解血清中

[通信作者] 李 秋,电话:(023)63603929,E-mail:Liqiu809@hotmail.com

免疫球蛋白浓度、辅助性T细胞亚群(Th)和DC免疫调控信号的关系,为进一步了解HSP的发病机制提供免疫学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床资料及分组 对照组20例为我院门诊体检的健康儿童,男:女=12:8,年龄6~14岁,平均7.5岁。HSP组患儿58例来自2008年6月至2009年3月我院肾脏免疫科住院患儿,男:女=38:20,年龄3~16岁,平均7.1岁。年龄及性别差异均无统计学意义($P>0.05$)。入选条件:以中华医学会儿科肾脏学组2000年诊断标准为纳入标准,均为急性期患儿,具有明确的病史和体征,采血前4周未使用过激素和免疫抑制剂。

1.1.2 试剂 rhGM-CSF、rhIL-4、rhTNF-α(美国R&D公司),血浆免疫球蛋白(英国伯明翰公司),IL-10、IL-4、INF-γ、IL-12因子EILSA试剂盒(北京生物晶美公司),PE标记的鼠抗人CD_{86}(鼠PE-IgG2b抗体为阴性对照),FITC标记的鼠抗人CD_{80}(鼠FITC-IgG1为阴性对照),FITC标记的鼠抗人CD-209(鼠FITC-IgG2a为阴性对照),PE标记的鼠抗人CD_{83}(鼠PE-IgG1抗体为阴性对照),PE标记的鼠抗人HLA-DR(鼠PE-IgG2b抗体为阴性对照)单克隆抗体(美国Ebioscience公司)。

1.2 方法

1.2.1 DC的诱导和培养 取抗凝外周血5 ml(经伦理委员会及家属同意),20 ℃ 1 500 r/min离心5 min,留取血浆1 ml,常规分离PBMC,用含10%特级胎牛血清的RPMI1640培养液重悬细胞,细胞终浓度为2×10^6/ml。加入6孔培养板,每孔3 ml。放入37 ℃,50 ml/L CO_2的孵箱内培养3 h后,轻柔洗板1次,洗去未贴壁的细胞。按rhGM-CSF 1 000 U/ml、rh-IL-4 500 U/ml终浓度加入细胞因子,隔日半量换液。培养过程中通过倒置显微镜观察细胞的生长情况。第5天加入rhTNF-α 200 U/ml,诱导其成熟,第7天DC培养成熟,收集上清液300 μl于-80 ℃保存以备测[2,3]。余细胞用于形态学鉴定、流式细胞仪分析等。

1.2.2 血浆免疫球蛋白A、G、M、E检测 采用散射比浊法,操作按说明书进行。

1.2.3 血浆IL-4、INF-γ及DC培养上清IL-12、IL-10的检测 用留取的血浆检测IL-4、INF-γ,DC培养的上清检测IL-12、IL-10水平,操作方法按试剂盒说明书进行。

1.2.4 流式细胞仪分析DC 培养第7天的DC用0.01 mol/L PBS洗涤后,调整终浓度为1×10^5/ml的细胞悬液。各取100 μl细胞悬液加入流式细胞仪测定管,分别加入20 μl PE标记鼠抗人CD_{86}、FITC标记的鼠抗人CD_{80}、FITC标记的鼠抗人CD-209(DC表面的特异性标志)、PE标记的鼠抗人CD_{83}、PE标记的鼠抗人HLA-DR单克隆抗体(另各取100 μl加入相应的阴性对照),混匀,4 ℃避光孵育30 min。用预冷PBS洗涤2次,重新悬浮细胞后,用流式细胞仪分析。

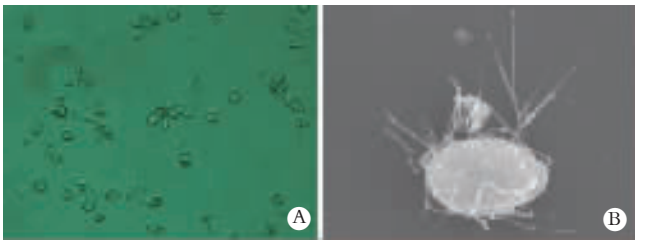
1.3 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 11.5统计软件进行t检验,两变量间相关分析采用直线相关分析法。

2 结果

2.1 DC的分离鉴定

2.1.1 形态学观察 倒置显微镜下,培养第1天细胞大都呈圆形贴壁;第2天部分悬浮,部分贴壁;第3天细胞形态多变(圆形、多边形、不规则形、逗号形等),见聚集现象,且基本悬浮,体积增大,有毛刺样突起;第5天加入rhTNF-α,第7天细胞成熟,突起更加明显,呈典型树枝状外形(图1)。



A:普通光镜 (×40);B:电镜 (×2 000)

图1 培养7 d DC的形态学观察

2.1.2 DC细胞数量观察 DC表面的特异性标志CD-209进行框选,结果示CD-209表达HSP组与对照组间差异无统计学意义[(15.21±2.57)% *vs* (15.67±2.89)%,$P>0.05$],即两组培养的DC细胞数量无差别。

2.2 HSP患儿血浆免疫球蛋白水平

血浆免疫球蛋白IgA及IgE水平HSP组明显高于对照组($P<0.05$);血浆IgG、IgM的水平2组间无统计学意义($P>0.05$,表1)。

表1 血浆免疫球蛋白A、G、M、E检测的比较(g/L,$\bar{x}\pm s$)

组别	n	IgA	IgG	IgM	IgE
对照组	20	1.27±0.51	9.12±3.03	1.25±0.66	1.17±0.68
HSP组	58	2.75±0.23	8.75±4.19	1.49±1.25	3.35±0.75
t值		2.44	0.39	0.56	1.99
P值		<0.05	>0.05	>0.05	<0.05

免疫球蛋白A、G、M、E的对照值为本院免疫室建立

2.3 HSP患儿血浆产生Th1、Th2细胞因子情况

HSP患儿产生Th1类细胞因子INF-γ水平显著低于对照组,Th2类细胞因子IL-4水平HSP组显著高于对照组($P<0.05$,表2)。

表2 血浆IL-4、INF-γ及DC培养上清IL-10、IL-12的水平(ng/L,$\bar{x}\pm s$)

组别	n	血浆IL-4	血浆INF-γ	上清IL-10	上清IL-12
对照组	20	5.69±2.77	37.16±7.26	21.53±7.05	14.03±3.92
HSP组	58	11.71±3.76	16.47±6.30	44.49±15.47	5.52±1.94
t值		5.51	8.04	4.75	5.08
P值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

2.4 HSP组DC培养上清IL-10、IL-12的检测

HSP组DC培养上清中IL-10水平显著高于对照组,IL-12水平显著低于对照组($P<0.05$,表2)。

2.5 HSP患儿DC表面CD_{86}、CD_{80}、CD_{83}、HLA-DR的表达情况

HSP组DC表面标志CD_{86}、CD_{83}、HLA-DR水平显著高于对照组,CD_{80}水平显著低于对照组($P<0.05$,表3)。

表3 DC表面CD_{86}、CD_{80}、CD_{83}、HLA-DR的表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD_{86}(%)	CD_{80}(%)	CD_{83}(%)	HLA-DR
对照组	20	58.30±7.72	32.10±4.23	31.20±3.23	84.71±17.79
HSP组	58	86.86±5.27	26.16±6.06	46.30±7.34	115.65±16.83
t值		10.59	3.16	6.81	4.57
P值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

2.6 相关性分析

HSP组DC培养上清中IL-10与血浆IL-4呈正相关($r=0.54, P<0.05$),IL-12与血浆INF-γ呈正相关($r=0.44, P<0.05$)。HSP组DC表面CD_{86}、HLA-DR与血浆IL-4呈正相关($r=0.46, r=0.59, P<0.05$),CD_{80}与INF-γ呈正相关($r=0.71, P<0.01$)。CD_{83}与IL-4、INF-γ均无相关性。

DC培养上清IL-10浓度与IgA水平呈正相关($r=0.45$, $P<0.05$)。IL-12与血浆免疫球蛋白无相关性。

3 讨论

T细胞在机体免疫反应及炎症反应过程中起着关键的作用。既往已有报道本病的发生与T细胞功能异常、Th1/Th2失衡明显相关[1]。本研究结果显示HSP患儿血浆免疫球蛋白IgA及IgE水平明显高于对照组,患儿体内的Th1型细胞因子INF-γ明显降低,Th2型细胞因子IL-4明显升高,表明HSP患儿体内的确存在着免疫球蛋白合成异常及明显的Th1/Th2细胞免疫应答失衡,与文献[1]报道一致。

生理状况下,Th细胞分化由体内功能最强的抗原递呈细胞DC所调控。DC通过3种信号通道协同调控Th细胞功能[4,5],对Th1/Th2平衡分化起重要的作用。这3种信号包括:抗原特异性信号(主要为DC表面高表达的MHC-Ⅱ类分子递呈的外来抗原,HLA-DR为MHC-Ⅱ的特异性识别片段)、协同刺激信号(CD_{86}、CD_{80}是DC表面的最主要的共刺激分子,决定受抗原刺激的T细胞成为效应细胞,或进入无反应状态。)和分化或极化信号(其中DC分泌的IL-12、IL-10的水平是影响Th细胞分化结果的最重要因素)[5]。HLA-DR、CD_{86}、IL-10是调节Th0细胞向Th2细胞分化的重要分子[6,7];CD_{80}、IL-12则调节Th0细胞向Th1细胞分化[7,8]。

从本研究结果可以看出,HSP患儿的DC表面标志HLA-DR、CD_{86}表达和DC分泌的IL-10均较对照显著升高,均与血浆Th2型细胞因子IL-4呈正相关;而表面标志CD_{80}的表达和IL-12的分泌明显减少,二者与Th1型细胞因子INF-γ呈正相关,表明在HSP发病过程中HLA-DR、CD_{86}的异常表达以及IL-10的高分泌可能是诱导Th0细胞向Th2细胞过渡分化的重要因素;而CD_{80}和IL-12降低同样也是诱导Th0细胞向Th1细胞分化减少、导致Th1/Th2失衡的关键。该结果提示DC对Th细胞调控的3条途径即抗原特异性信号、协调刺激信号和分化或极化信号均出现了异常,这可能与HSP发生Th2细胞优势活化、Th1/Th2细胞功能失衡、机体免疫异常密切相关。

综上所述,树突状细胞调控信号的异常与过敏性紫癜免疫异常相关,但促使DC免疫功能异常的原因尚不清楚。在本研究中已发现HSP中成熟的DC较对照明显增多(CD_{83}为DC成熟的标志[9])。只有成熟DC才是发挥APC细胞免疫调控功能的重要效应细胞。那么,调节DC的发育、成熟及免疫应答的核转录因子NF-κB[10-12]是否参与DC信号调控异常尚需进一步研究。

参考文献:

[1] 李秋, 杨锡强, 李永柏, 等. 过敏性紫癜T淋巴细胞功能状态的研究[J]. 中华儿科杂志, 2001, 39(3): 157-159.
[2] 胡义杰, 范士志, 蒋耀光, 等. 人DeltaNp73α基因修饰的树突状细胞抗瘤免疫学效应研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(9): 763-766.
[3] 陶忠芬, 蔡永国, 杨仕明, 等. 树突状细胞扫描电镜样本制备方法[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(12): 1299-1300.
[4] Lee J S, Kim S G, Kim H K, *et al*. Silibinin polarizes Th1/Th2 immune responses through the inhibition of immunostimulatory function of dendritic cells[J]. J Cell Phusiol, 2007, 210(2): 385-397.
[5] Kalinski P, Hilkens C M, Wierenga E A, *et al*. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal [J]. Immunol Today, 1999, 20(12): 561-567.
[6] Chung F. Anti-inflammatory cytokines in asthma and allergy: interleukin-10, interleukin-12, interferon-gamma\[J\]. Mediators Inflamm, 2001, 10(2): 51-59.
[7] Kuchroo V K, Das M P, Brown J A, *et al*. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy[J]. Cell, 1995, 80(5): 707-718.
[8] 孙大庆, 张秋业, 董增义, 等. 过敏性紫癜病儿树突细胞分泌白细胞介素-12水平与TH1/TH2的变化[J]. 中国当代儿科杂志, 2006, 8(4): 307-310.
[9] Chapuis F, Rosenzwajg M, Yagello M, *et al*. Differentiation of human dendritic cells from monocytes *in vitro*[J]. Eur J Immunol, 1997, 27(2): 431-441.
[10] Ouaaz F, Arron J, Zeng Y, *et al*. Dendritic cell development and survival require distinct NF-kappaB subunits[J]. Immunity, 2002, 16(2): 257-270.
[11] Moore F, Buonocore S, Aksoy E, *et al*. An alternative pathway of NF-kappaB activation results in maturation and T cell priming activity of dendritic cells overexpressing a mutated Ikappa B alpha[J]. J Immunol, 2007, 178(3): 1301-1311.
[12] Wang J, Wang X, Hussain S, *et al*. Distinct roles of different NF-kappa B subunits in regulating inflammatory and T cell stimulatory gene expression in dendritic cells[J]. J Immunol, 2007, 178(11): 6777-6788.

(**收稿**:2009-09-14;**修回**:2009-11-04)
(编辑 邓强庭)