

· 临床研究 ·

过敏性紫癜患儿树突细胞分泌 白细胞介素-12 水平与 TH1/TH2 的变化

孙大庆, 张秋业, 董增义, 白枫

(青岛大学医学院附属医院儿科, 山东 青岛 266003)

[摘要] 目的 观察过敏性紫癜(HSP)患儿外周血树突细胞(DC)产生 IL-12 的变化,并探讨其对 TH1/TH2 平衡的影响及在 HSP 发病机制中的意义。方法 应用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 60 例 HSP 患儿(HSP 组)及 21 例健康儿童(对照组)血浆干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素-12(IL-12)水平。并对其中 22 例 HSP 患儿及 21 例健康儿童外周血单个核细胞(PBMC)进行体外培养以诱生出 DC,用 ELISA 法检测培养上清液中 IL-12 水平,同时应用间接免疫荧光法检测 CD1a⁺ 细胞表达率。结果 ①HSP 组血浆 IFN- γ 水平低于对照组(30.59 ± 11.27 pg/mL vs 43.38 ± 19.19 pg/mL, $P < 0.01$),IL-4 水平高于对照组(45.08 ± 9.19 pg/mL vs 32.95 ± 7.10 pg/mL, $P < 0.01$),IFN- γ /IL-4 比值低于对照组(0.70 ± 0.28 vs 1.33 ± 0.57 , $P < 0.01$),IL-12 水平低于对照组(153.95 ± 91.88 pg/mL vs 323.06 ± 162.34 pg/mL, $P < 0.01$);HSP 组和对照组各自血浆中 IL-12 水平与 IFN- γ 水平呈正相关($P < 0.01, 0.05$),与 IL-4 水平无相关性($P > 0.05$),与 IFN- γ /IL-4 比值呈正相关($P < 0.01$)。②HSP 组培养上清液 IL-12 水平低于对照组(357.06 ± 153.56 pg/mL vs 489.80 ± 213.45 pg/mL, $P < 0.05$),且与血浆 IL-12 水平呈正相关($P < 0.01$)。③HSP 组 CD1a⁺ 细胞表达率低于对照组($27.42 \pm 10.75\%$ vs $35.68 \pm 12.18\%$, $P < 0.05$),与培养上清液和血浆 IL-12 水平皆呈正相关($P < 0.01$)。结论 HSP 患儿存在 TH1/TH2 平衡失调,TH1 功能的下降与血浆 IL-12 水平低下呈正相关,而后者又与 DC 数量减少和/或功能低下关系密切,表明 HSP 患儿外周血 DC 数量减少和/或功能低下间接导致了 TH1/TH2 平衡的失调。

[中国当代儿科杂志,2006,8(4):307-310]

[关键词] 紫癜,过敏性;树突细胞;干扰素 γ ;白细胞介素 4;白细胞介素 12;TH1 细胞;TH2 细胞

[中图分类号] R554⁺.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2006)04-0307-04

Levels of IL-12 produced by dendritic cells and changes of TH1/TH2 balance in children with Henoch-Schonlein purpura

SUN Da-Qing, ZHANG Qiu-Ye, DONG Zeng-Yi, BAI Feng. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital, Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, China (Zhang Q-Y, Email: qyzh9816@163.com)

Abstract: Objective To study the changes of IL-12 produced by dendritic cells in peripheral blood in children with Henoch-Schonlein purpura (HSP), and to explore its influence on TH1/TH2 balance in order to elucidate its significance in the pathogenesis of HSP. **Methods** The levels of interferon- γ (IFN- γ), interleukin-4 (IL-4) and interleukin-12 (IL-12) in plasma were determined by ELISA in 60 HSP children (HSP group) and 21 healthy children (Control group). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of 22 HSP patients and 21 healthy children were cultured *in vitro* and then were transformed into dendritic cells. The levels of IL-12 in the supernatant were detected by ELISA and the positive expression rate of CD1a⁺ was detected by indirect immunofluorescence procedure. **Results** ①The levels of IFN- γ and the ratio of IFN- γ /IL-4 in plasma of the HSP group were lower than those of the Control group (IFN- γ 30.59 ± 11.27 pg/mL vs 43.38 ± 19.19 pg/mL; IFN- γ /IL-4 ratio 0.70 ± 0.28 vs 1.33 ± 0.57) ($P < 0.01$). The levels of IL-12 in the HSP group were also lower than those of the Control group (153.95 ± 91.88 pg/mL vs 323.06 ± 162.34 pg/mL; $P < 0.01$). In contrast, the levels of IL-4 were higher than those of the Control group (45.08 ± 9.19 pg/mL vs 32.95 ± 7.10 pg/mL; $P < 0.01$). The plasma levels of IL-12 positively correlated with the IFN- γ levels ($r = 0.52$, $P < 0.01$) and the ratio of IFN- γ /IL-4 ($r = 0.43$, $P < 0.01$) in the HSP group. ②The IL-12 levels in the supernatant of the HSP group were lower than those of the Control group (357.06 ± 153.56 pg/mL vs 489.80 ± 213.45 pg/mL; $P < 0.05$), and had a positive correlation with the plasma IL-12 levels ($r = 0.74$, $P < 0.01$). ③The positive expression rate of CD1a⁺ of the HSP group was lower than that of the Control group [$(27.42 \pm 10.75)\%$ vs $(35.68 \pm 12.18)\%$; $P < 0.05$], and positively correlated with the IL-12 levels in the supernatants ($r = 0.57$, $P < 0.01$) and in plasma ($r = 0.68$, $P < 0.01$).

[收稿日期]2005-11-15;[修回日期]2006-02-09

[作者简介]孙大庆,男,硕士,主治医师。主攻方向:小儿临床免疫。

[通讯作者]张秋业,教授,青岛大学医学院附属医院儿内科。邮编 266003。

Conclusions There was an imbalance of Th1/Th2 in HSP children. The decrease of Th1 function had a positive correlation with the low levels of IL-12 in plasma, while the latter correlated closely with decreased number and / or function of dendritic cells, suggesting that the decreased number and / or function of dendritic cells in peripheral blood resulted in the imbalance of Th1/Th2 indirectly. [Chin J Contemp Pediatr, 2006, 8 (4): 307-310]

Key words: Purpura, Schoenlein-Henoch; Dendritic cell; Interferon- γ ; Interleukin-4; Interleukin-12; Th1 cell; Th2 cell

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。既往研究发现 HSP 病儿急性期体内存在明显的 Th1/Th2 免疫应答失衡,即 Th1 功能降低,Th2 优势活化^[1]。Th2 应答过强与 HSP 病儿的体液免疫紊乱关系密切。影响 Th1/Th2 应答状态的因素甚多,其中树突细胞(dendritic cells, DC)在 Th0 细胞分化中起重要作用^[2],DC 分泌的 IL-12 是目前已知特异性最强的诱导 Th0 向 Th1 分化的最关键细胞因子^[3]。本研究主要通过对 HSP 病儿外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)体外诱导而进行 DC 的培养与鉴定,以了解 HSP 病儿辅助性 T 细胞亚群功能与 DC 功能变化之间的关系,报告如下。

1 对象与方法

1.1 对象

1.1.1 HSP 组 选择 2003 年 10 月至 2004 年 12 月住我院儿内科的 HSP 急性期病儿 60 例,男 33 例,女 27 例,年龄 4~16 岁,平均年龄 8.6 岁。其中进行 PBMC 诱导培养 22 例,男 12 例,女 10 例,年龄 5~13 岁,平均年龄 7.4 岁。

1.1.2 对照组 选自我院门诊体检的健康同龄儿童 21 例,男 12 例,女 9 例,年龄 3~13 岁,平均年龄 7.9 岁。近期无感染及过敏性疾病史,无免疫抑制剂使用史。对照组所有儿童均进行 PBMC 体外诱导培养。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 入院后当日或次日(应用激素前)采血,无菌操作。分别采取 HSP 急性期病儿和对照组儿童外周静脉血 2~3 mL,加入无菌肝素抗凝管(肝素 20 U/mL),1 800 r/min 室温下离心 5 min,收集血浆 1 mL, -80℃ 保存以备测。

1.2.2 DC 的诱导培养 采用密度梯度离心法制备 PBMC,将分离出的 PBMC 用不含细胞因子的 RPMI-1640 培养液(含 10% 灭活小牛血清、青霉素及链霉素)调整细胞浓度为 2×10^6 /mL。取 1 mL 细胞悬液加入 24 孔培养板的一个孔中,做好相应标记。37℃,5% CO₂ 条件下培养 3 h 后,轻摇培养板,吸去上层培养液(吸弃细胞悬液,去除非粘附细胞,获得

粘附细胞)。然后再加入含重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF,美国 Peprotech 公司)1 000 U/mL、重组人白细胞介素 4(rhIL-4,美国 Peprotech 公司)500 U/mL 的 RPMI-1640 完全培养液 1 mL。放入 37℃,5% CO₂ 的细胞培养箱培养 7 d,培养过程中通过倒置显微镜观察细胞的生长情况。第 4 天时半量换液,并补充两种细胞因子至原浓度;第 7 天时收集上清液 300 μ L 于 -80℃ 保存以备测,将剩余细胞悬液调适当浓度后检测 DC 膜表面标志 CD1a 分子。

1.2.3 CD1a⁺ 细胞的检测 采用单克隆抗体间接免疫荧光法。参照试剂说明(CD1a 单克隆抗体购自天津协和干细胞基因工程有限公司)操作完毕后,在荧光显微镜下先用普通透射光计数视野中的单个核细胞总数(共计数 100~200 个细胞),然后用紫外光计数同一视野中的荧光阳性细胞(见图 1),计算阳性细胞百分率。

1.2.4 血浆中 IFN- γ 、IL-4、IL-12 及培养上清中 IL-12 水平的测定 采用双抗体夹心 ELISA 法,按试剂盒说明书进行操作,试剂盒购自上海森雄科技实业公司。

1.3 统计学处理

结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用组间 t 检验或 t' 检验,两变量间相关分析采用直线相关分析法。应用 SPSS11.0 统计分析软件, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DC 体外培养过程中形态学观察

PBMC 贴壁 3 h 后获得粘附细胞,当加入 rhGM-CSF 和 rhIL-4 两种细胞因子诱导培养 24 h 后可见到贴壁细胞有所减少,而悬浮细胞开始增多,并呈细胞聚集现象,以后悬浮细胞逐渐增多并具有树突样突起。培养至第 7 天,可见到大量具有树突样突起的悬浮细胞。见图 2。

2.2 血浆 IFN- γ 、IL-4、IL-12 水平及其相关性分析

HSP 组血浆 IFN- γ 水平较对照组水平低下;IL-4 水平较对照组水平升高;IFN- γ /IL-4 比值较对照组比值低下;IL-12 水平较对照组水平低下,以上比较差异均有显著性(均 $P < 0.01$)。见表 1,2。

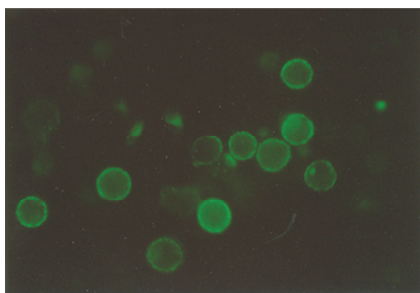


图1 荧光显微镜下所见 CD1a 阳性细胞($\times 400$)

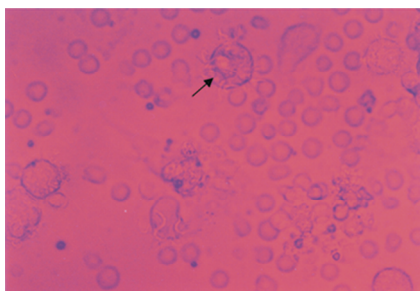


图2 倒置显微镜下树突细胞形态($\times 600$),可见明显树枝状突起

HSP 组血浆 IL-12 水平与 IFN- γ 水平呈正相关($r = 0.52, P < 0.01$);与 IL-4 水平无相关性($r = 0.07, P > 0.05$);与 IFN- γ /IL-4 比值呈正相关($r = 0.43, P < 0.01$)。对照组血浆 IL-12 水平与 IFN- γ 水平呈正相关($r = 0.54, P < 0.05$);与 IL-4 水平无相关性($r = 0.22, P > 0.05$);与 IFN- γ /IL-4 比值呈正相关($r = 0.58, P < 0.01$)。

表1 HSP 组与对照组血浆 IFN- γ , IL-4 水平及 IFN- γ / IL-4 比较 ($\bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)

组别	例数	IFN- γ	IL-4	IFN- γ /IL-4
对照组	21	43.38 $\pm$ 19.19	32.95 $\pm$ 7.10	1.33 $\pm$ 0.57
HSP 组	60	30.59 $\pm$ 11.27 ^a	45.08 $\pm$ 9.19 ^a	0.70 $\pm$ 0.28 ^a

a 与对照组比较 t 或 $t' = 2.88, 5.49, 4.85$, 均 $P < 0.01$

表2 HSP 组与对照组血浆及培养上清液 IL-12 水平比较 ($\bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)

组别	例数	血浆 IL-12	例数	培养上清液 IL-12
对照组	21	323.06 $\pm$ 162.34	19	489.80 $\pm$ 213.45
HSP 组	60	153.95 $\pm$ 91.88 ^a	21	357.06 $\pm$ 153.56 ^b

与对照组比较 a $t' = 4.53, P < 0.01$; b $t = 2.27, P < 0.05$

2.3 DC 培养上清液 IL-12 水平变化及其相关性分析

HSP 组上清液 IL-12 水平与血浆 IL-12 水平呈正相关($r = 0.74, P < 0.01$)。对照组上清液 IL-12 水平与血浆 IL-12 水平也呈正相关($r = 0.69, P < 0.01$)。

2.4 CD1a⁺ 细胞表达率及其相关性分析

HSP 组 CD1a⁺ 细胞表达率($27.42 \pm 10.75\%$)

较对照组表达率($35.68 \pm 12.18\%$)低下,差异有显著性($t = 2.38, P < 0.05$)。HSP 组 CD1a⁺ 细胞表达率与培养上清液和血浆 IL-12 水平皆呈正相关($r = 0.57, 0.68; P < 0.01$)。对照组 CD1a⁺ 细胞表达率与培养上清液和血浆 IL-12 水平亦皆呈正相关($r = 0.60, 0.46; P < 0.05$)。

3 讨论

树突细胞(DC)是机体免疫反应的始动者,是抗原提呈细胞(antigen-presenting cell, APC)中的最强者,在免疫应答的诱导中具有独特的地位。外周血中的单个核细胞在 GM-CSF 和 IL-4 条件下培养可以诱生出 DC,现在尚未发现所有 DC 都携带的特异性表面标志或针对 DC 的特异性抗体,DC 表型随成熟及活化的不同阶段而不同,目前国内外鉴定 DC 采用的主要检测标志为 CD1a 和 CD83 分子。CD1a 是比较公认的外周血不成熟 DC 的表面标记,CD83 则是成熟 DC 的表面标记。根据辅助性 T 细胞(T_H)分泌的细胞因子不同而将其分为 4 个亚群,即 T_H0, T_H1, T_H2 和 T_H3 。 T_H0 细胞为 T_H1, T_H2 细胞的前体,当受到抗原刺激并在某些特定的细胞内外因素影响下可向 T_H1 或 T_H2 分化发育。 T_H1/T_H2 平衡状态决定着免疫应答反应的类型,抗原提呈细胞的功能状态是影响 T_H1/T_H2 平衡的最重要因素。DC 在 T_H0 细胞分化中起重要作用,DC 分泌的 IL-12 是目前已知特异性最强的诱导 T_H0 向 T_H1 分化的最关键细胞因子。一方面,DC 分泌 IL-12 诱导强烈的 T_H1 分化,并产生 T_H1 型细胞因子 IFN- γ ,后者反过来增强 DC 表达 IL-12,从而形成正反馈,增强 T_H1 应答反应;另一方面,IL-12 可直接抑制 T_H2 应答反应及 T_H2 细胞因子的合成,降低 B 淋巴细胞过度合成 IgE。如 Kuipers 等^[4]的研究表明,树突细胞 IL-12 的高表达可有效提高 T_H1 类细胞因子 IFN- γ 的产生水平,并使 T_H2 丧失其致敏作用。本研究无论 HSP 患儿还是正常儿童,血浆 IL-12 与 IFN- γ 及 IFN- γ /IL-4 均呈正相关,与 IL-4 均无相关性,证实了 IL-12 与 T_H1 型细胞因子 IFN- γ 之间存在的密切关系。

IL-12 和 IFN- γ 在促进 T_H0 细胞向 T_H1 分化中起着决定性作用,而 IL-4 和 IL-10 是促进 T_H0 细胞向 T_H2 分化的主要因素^[5]。 T_H1 细胞分泌 IFN- γ 、IL-2 和 TNF- α 等,介导细胞免疫过程; T_H2 细胞则分泌 IL-4、IL-10 和 IL-13 等,介导体液免疫过程。由于各 T_H 亚群缺乏特异性的细胞表面标记,故目前通常根据血浆中 IL-4、IFN- γ 表达程度来评价 T_H 细胞亚群的功能,即 T_H1 (IFN- γ)、 T_H2 (IL-4)。 T_H1 与

Th2 细胞间存在着相互制约与调节作用, Th1/Th2 功能状态与平衡决定着免疫反应的表现形式和活性, Th1/Th2 失衡则引起免疫功能紊乱, 协同其他因子导致免疫性疾病的发生。HSP 是儿童时期最常见的毛细血管变态反应性疾病, 国内外众多学者的研究已证实 HSP 患儿存在免疫功能紊乱, 主要表现为体液免疫功能上调, B 淋巴细胞呈多克隆活化, 免疫球蛋白产生异常(血浆中 IgA, IgE 升高), 血循环中免疫复合物增加, 以及相关细胞因子改变等^[6,7]。本研究发现 HSP 患儿急性期外周血中 Th1 型细胞因子 IFN- γ 水平减少, Th2 型细胞因子 IL-4 水平增加, IFN- γ /IL-4 比值明显降低, 表明 HSP 患儿体内的确存在着明显的 Th1/Th2 免疫应答失衡(即 Th1 功能下降, Th2 优势活化), 与既往文献报道相一致。上述 Th 细胞功能的紊乱成为了该病免疫球蛋白合成异常及产生免疫复合物性血管炎的重要原因。

本研究发现 PBMC 在细胞因子 rhGM-CSF 和 rhIL-4 的诱导培养下, 可以转化成典型的树突细胞, 形态学观察具有树枝状突起, 表型检测证实了 CD1a 分子的阳性表达。Bellinghausen 等^[8]证实, 使用过敏原致敏的自体 DC 体外刺激, 特异性变态反应患者 Th2 分泌 IL-4, IL-5 和 IL-10 增强。Reider 等^[9]发现经 CD40L 刺激, 过敏症患者 PBMC 来源 DC 分泌 IL-12 的量减少。本文对 PBMC 来源的 DC 进行研究, 发现 HSP 组上清液与血浆 IL-12 水平均较对照组低下且两组的上清液 IL-12 与血浆 IL-12 亦各呈正相关, 结果表明 HSP 患儿外周血 DC 产生 IL-12 的能力较正常低下, IL-12 的减少驱动 Th0 分化为 Th2, 抑制 Th1 型细胞因子 IFN- γ 产生, 增强 Th2 型细胞因子 IL-4 合成, IFN- γ /IL-4 比值因而明显降低, 引起 Th1/Th2 失衡, 导致 HSP 发病。本研究还发现 HSP 组 CD1a⁺ 细胞表达率(代表 PBMC 来源 DC 的数量)明显低于对照组, 提示 HSP 患儿外周血 DC 的数量减少; 且两组 CD1a⁺ 细胞表达率也均与各自的培养上清及血浆中 IL-12 呈正相关, 表明 HSP 患儿 DC 数量的减少是导致血浆 IL-12 水平低下的另一原因。经典 DC 培养的细胞因子组合是 GM-CSF、IL-4 和/或 TNF- α , 它们相辅相成的作用使 DC 得以有效扩增并特异性介导机体免疫反应^[10]。本实验采用细胞因子 rhGM-CSF 与 rhIL-4 联合诱导培养 PBMC 以产生较多 DC, 由于培养时间短(7 d), 且未加入促 DC 成熟的细胞因子 TNF- α , 故培养出的 DC 以未成熟 DC 为多, CD1a 分子的阳性表达也证实了这一点。再者, 由于 HSP 组未成熟 DC 的量比对照组明显减少, 因而推测 HSP 患儿 DC

功能低下可能与其前体细胞向 DC 分化发育的过程发生障碍有关。

本研究结果初步表明:与健康儿童相比, HSP 患儿外周血中 DC 的数量减少和/或功能低下, 降低了 IL-12 的分泌水平, 使得 Th0 向 Th2 细胞分化增多, 导致 Th1 功能低下及 Th2 优势活化, 从而引发 Th1/Th2 免疫应答失衡。因此可通过对 DC 或其前体细胞进行调节而间接调控 Th1/Th2 平衡, 以达到治疗过敏性疾病的目的。目前针对 HSP 的治疗主要是应用免疫抑制疗法, 但患儿多反复发作, 本研究探讨了 HSP 患儿外周血 DC 功能变化与 Th1/Th2 平衡之间的相关性, 为该病的免疫治疗提供了新思路, 即通过应用免疫调节剂来调节 DC 的功能变化, 以增强 Th1 细胞反应及降低 Th2 细胞反应, 从而可能更有效地抑制体液免疫应答, 减少抗体产生和免疫复合物的形成, 以防治 HSP 的发生和反复。

[参 考 文 献]

- [1] 曾巧慧, 梅志勇, 钟凤仪, 梁少军, 陈环. 白介素 12、白介素 4 及 γ -干扰素在过敏性紫癜儿童中的表达及意义[J]. 中国小儿血液, 2005, 10(6): 247-249.
- [2] Lambrecht BN. Allergen uptake and presentation by dendritic cells [J]. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2001, 1(1): 51-59.
- [3] Dabbagh K, Dahl ME, Stepick-Biek P, Lewis DB. Toll-like receptor 4 is required for optimal development of Th2 immune responses: role of dendritic cells[J]. J Immunol, 2002, 168(9): 4524-4530.
- [4] Kuipers H, Heirman C, Hijdra D, Muskens F, Willart M, van Meirvenne S, et al. Dendritic cells retrovirally overexpressing IL-12 induce strong Th1 responses to inhaled antigen in the lung but fail to revert established Th2 sensitization [J]. J Leukoc Biol, 2004, 76(5): 1028-1038.
- [5] Ouyang W, Lohning M, Gao Z, Assenmacher M, Ranganath S, Radbruch A, et al. Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment[J]. Immunity, 2000, 12(1): 27-37.
- [6] 李秋, 杨锡强, 李永柏, 王莉佳. 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.
- [7] 江华, 丁甫月, 顾龙君. 过敏性紫癜患儿血清 IFN- α IL-2 IL-4 TNF- α 水平的变化[J]. 中国当代儿科杂志, 2002, 4(2): 117-118.
- [8] Bellinghausen I, Brand U, Knop J, Saloga J. Comparison of allergen-stimulated dendritic cells from atopic and nonatopic donors dissecting their effect on autologous naive and memory T helper cells of such donors[J]. J Allergy Clin Immunol, 2000, 105(5): 988-996.
- [9] Reider N, Reider D, Ebner S, Holzmann S, Herold M, Fritsch P, et al. Dendritic cells contribute to the development of atopy by an insufficiency in IL-12 production[J]. J Allergy Clin Immunol, 2002, 109(1): 89-95.
- [10] 白慈贤, 冯凯, 李梁, 裴雪涛. 树突状细胞体外定向诱导扩增及其分离纯化[J]. 中国免疫学杂志, 2000, 16(8): 419-422.

(本文编辑: 吉耕中)