

论著·临床研究

急性特发性血小板减少性紫癜儿童 T-bet 和 GATA3 的表达

任少敏 张春霞 李维才

(内蒙古医学院附属医院儿科, 内蒙古 呼和浩特 010050)

[摘要] 目的 通过分析急性特发性血小板减少性紫癜(ITP)儿童血中转录因子 T-bet 和 GATA3 mRNA 的表达及细胞因子 IFN- γ 和 IL-4 的含量,探讨急性 ITP 发病机制中 Th1/Th2 细胞分化的趋势及其与转录因子的关系。**方法** 利用 RT-PCR 技术,测定急性 ITP 患儿发作期($n=30$)和缓解期($n=28$)外周血中 T-bet 和 GATA3 mRNA 的表达,并使用 ELISA 法检测血浆 IFN- γ 和 IL-4 含量。20 例健康儿童作为对照组。**结果** ITP 患儿发作期血中 T-bet mRNA 表达和 IFN- γ 含量明显高于缓解期和对照组($P<0.01$)。发作期血中 GATA3 mRNA 表达和 IL-4 的含量明显低于缓解期和对照组($P<0.01$)。**结论** 儿童急性 ITP 存在明显的 Th1 优势分化现象,且可能与转录因子 T-bet 和 GATA3 的调控作用有关。
[中国当代儿科杂志, 2010, 12(1): 29-31]

[关键词] 特发性血小板减少性紫癜; Th1/Th2; 转录因子; 细胞因子; 儿童

[中图分类号] R725.546 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)01-0029-03

Expression of T-bet and GATA3 in children with acute idiopathic thrombocytopenic purpura

REN Shao-Min, ZHANG Chun-Xia, LI Wei-Cai. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical College, Hohhot 010050, China (Email: rens22@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To study the expression of transcriptional factors T-bet and GATA3 mRNA and the levels of IFN- γ and IL-4 in blood in children with acute idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) and investigate the tendency of polarization of Th1/Th2 in children with ITP. **Methods** Blood T-bet and GATA3 mRNA expression were examined using RT-PCR and plasma IFN- γ and IL-4 levels were measured using ELISA in children with acute ITP in acute ($n=30$) and remission stages ($n=28$). Twenty healthy children served as the controls. **Results** Blood T-bet mRNA expression and IFN- γ levels in children with ITP in the acute stage were markedly higher than those in the remission stage and controls ($P<0.01$). In contrast, blood GATA3 mRNA expression and IL-4 levels in children with ITP in the acute stage were significantly lower than those in the remission stage and controls ($P<0.01$). **Conclusions** The high expression of T-bet and IFN- γ and the low expression of GATA3 and IL-4 indicate the existence of Th1 polarization in children with acute ITP. This might be related to the regulation of T-bet and GATA3. [Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12(1): 29-31]

Key words: Idiopathic thrombocytopenic purpura; Th1/Th2; Transcriptional factor; Cytokine; Child

特发性血小板减少性紫癜(idiopathic thrombocytopenic purpura, ITP)的发病机制尚未完全明确,学者们认为与多种病毒感染有关^[1],但最终还是血小板特异性自身抗体在该病的发病中起关键作用,而这些自身抗体的产生有赖于一个极其复杂的免疫调控网络^[2],以往研究多从细胞因子水平分析其免疫紊乱状态,但结果不甚一致,有的发现呈 Th1 优势分化状态^[3],有的却认为呈 Th2 优势分化状态^[4]。Th 分泌细胞因子受多种因素影响^[5],其中转录因子 T-bet 和 GATA3 发挥着关键作用^[6]。T-bet 促进 Th1 细胞的发育,抑制 Th2 细胞的发育及其细胞因子的

产生;GATA3 促进 Th2 细胞的发育,抑制 Th1 细胞的发育及其细胞因子的产生,两者最终决定 Th 细胞向 Th1 方向分化还是向 Th2 方向分化^[6]。近年来, T-bet 和 GATA3 与疾病的相关性引起了人们的高度重视^[7-8],但有关 T-bet 和 GATA3 与儿童 ITP 的关系,国内外未见报道。因此,本课题检测了儿童急性 ITP 不同时期血中 T-bet 和 GATA3 mRNA 的表达以及 IFN- γ 和 IL-4 的含量,旨在探讨急性 ITP Th1/Th2 细胞分化趋势及其与转录因子的关系,为儿童急性 ITP 免疫诊断和治疗的研究奠定基础。

[收稿日期] 2009-05-22; [修回日期] 2009-07-03

[基金项目] 内蒙古自然科学基金资助(编号:200711020946)。

[作者简介] 任少敏,女,本科,教授,主任。

1 对象与方法

1.1 研究对象

为2006年9月至2007年12月在我院儿科住院的30例急性ITP患儿,其中男19例,女11例,平均发病年龄为 5.0 ± 3.0 岁,符合《诸福棠实用儿科学》的ITP诊断标准^[9]。急性发作期的纳入标准为首次发病,并在院外未应用丙种球蛋白、糖皮质激素等影响免疫状态的药物,排除慢性ITP和药物等引起的继发性血小板减少性紫癜及过敏性紫癜。急性发作期病例经治疗后取得缓解28例。缓解标准依据文献执行^[10]:急性ITP发病治疗后持续2周内无出血症状,每隔3 d测血常规一次,连续3次血小板计数 $\geq 100 \times 10^9/L$ 。对照组20名,均为在我院儿科门诊进行体检的同群体健康儿童,其中男10名,女10名,平均年龄 5.2 ± 2.5 岁,近4周内均无感染、过敏和与免疫密切相关的疾病史或家族史,年龄、性别构成与ITP组差异无显著性。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂及仪器 IFN- γ 和IL-4的ELISA试剂盒购自尚柏生物医学技术有限公司;RNAsimple Total RNA Kit购自天根生化科技有限公司;Improm-II TM Reverse Transcriptase 购自Promega公司;余RT-PCR试剂和PCR扩增引物均购自宝生物工程有限公司。酶标仪由美国Perkin Elmer公司提供;TECHNE PCR仪由英国Flexigene公司提供;凝胶图象分析仪由G:BOX基因有限公司提供。

1.2.2 标本采集 抽取柠檬酸钠抗凝静脉血2.5 mL,其中2 mL用于检测细胞因子,另0.5 mL立即进行总RNA的提取。

1.2.3 RT-PCR法检测T-bet和GATA3 mRNA表达 外周血总RNA提取及鉴定依循RNAsimple Total RNA Kit操作说明提取总RNA,以琼脂糖电泳分析RNA的完全性;RT反应合成cDNA按TaKaRa Ribonuclease Inhibitor试剂盒说明书进行。RT-PCR反应各目的基因引物序列见表1。

表1 RT-PCR反应引物序列及扩增长度

引物名称	扩增长度(bp)	引物序列
β -actin	450	(上游)CCAGCTCACCATGGATGATG (下游)GCCAGAGCGGTACAGGGATA
T-bet	386	(上游)TCCTCTCCTACCCAACCAGT (下游)TTCGCCCACTCCTGAATCAC
GATA3	308	(上游)CTGGGAATCACTGTTACCG (下游)TCCGAGCACAAACCACCTTAG

PCR反应体系:1 μ L反转录产物;1 μ L dNTP Mixture;5 μ L 10 $\times$ ExTaq Buffer;42.35 μ L 灭菌蒸馏水;0.25 μ L TaKaRa Ex Taq;0.2 μ L 特异性上游引物(或 β -actin上游引物);0.2 μ L 特异性下游引物(或 β -actin下游引物)。PCR反应条件:95 $^{\circ}$ C 5 min 1个循环,94 $^{\circ}$ C 30 sec,61.6 $^{\circ}$ C/58.7 $^{\circ}$ C/55 $^{\circ}$ C 30 sec,72 $^{\circ}$ C 30 sec 30个循环,72 $^{\circ}$ C 10 min 1个循环(退火温度 β -actin为61.6 $^{\circ}$ C、GATA3为58.7 $^{\circ}$ C、T-bet为55 $^{\circ}$ C)。取T-bet、GATA3及 β -actin扩增产物5 μ L在1.2%琼脂糖凝胶中,200 V电泳20 min,将凝胶电泳图输入Kodak Digital Science System凝胶成像系统,应用Gene Snap from syngene和Gene Tool from syngeneruan软件进行各条带平均灰度值分析表达,结果判定以同时扩增的 β -actin为内参照,用转录因子/ β -actin的比值表示转录因子相对表达量。

1.2.4 ELISA法检测IFN- γ 和IL-4的血浆含量 以OD值为纵坐标,以标准品浓度为横坐标,绘制标准曲线。根据血浆样品的OD值在标准曲线查出,得出相应的血浆IFN- γ 和IL-4浓度。

1.3 统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件作统计分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用F检验和q检验。外周血IFN- γ 、IL-4含量与T-bet、GATA3 mRNA的相关性分析采用直线相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 外周血T-bet和GATA3 mRNA表达

ITP患儿发作期T-bet mRNA表达高于缓解期 and 对照组,且缓解期亦高于对照组($P < 0.01$);而发作期GATA3 mRNA的表达低于缓解期和对照组,且缓解期亦低于对照组($P < 0.01$)。见表2。

表2 各组T-bet及GATA3 mRNA表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	T-bet	GATA3
对照组	20	0.11 ± 0.01	0.14 ± 0.01
ITP组			
发作期	30	$0.40 \pm 0.01^{a,b}$	$0.08 \pm 0.06^{a,b}$
缓解期	28	0.20 ± 0.01^a	0.13 ± 0.01^a
F值		2355.68	163.94
P值		0.000	0.000

a:与对照组比较, $P < 0.01$; b:与缓解期比较, $P < 0.01$

2.2 血浆IFN- γ 和IL-4含量

ITP患儿发作期血浆IFN- γ 含量高于缓解期和对照组,且缓解期亦高于对照组($P < 0.01$);而发作

期 IL-4 含量低于缓解期 and 对照组,且缓解期亦低于对照组($P<0.01$)。见表 3。

表 3 各组 IFN- γ 及 IL-4 的浓度 ($\bar{x}\pm s$, pg/mL)			
组别	例数	IFN- γ	IL-4
对照组	20	149.3 $\pm$ 10.7	26.4 $\pm$ 1.5
ITP 组			
发作期	30	269.3 $\pm$ 13.0 ^{a,b}	12.3 $\pm$ 1.1 ^{a,b}
缓解期	28	178.8 $\pm$ 7.7 ^a	21.4 $\pm$ 1.4 ^a
F 值		8885.371	725.382
P 值		0.000	0.000

a: 与对照组比较, $P<0.01$; b: 与缓解期比较, $P<0.01$

2.3 IFN- γ 、IL-4 和 T-bet、GATA3 相关性分析

ITP 发作期与缓解期及对照组 IFN- γ 含量与 T-bet mRNA 表达均呈正相关($P<0.01$),而与 GATA3 mRNA 表达均呈负相关($P<0.01$); IL-4 含量与 GATA3 mRNA 表达均呈正相关($P<0.01$),而与 T-bet mRNA 表达均呈负相关($P<0.01$); IFN- γ /IL-4 比值与 T-bet/GATA3 比值呈正相关($P<0.01$)。

3 讨论

辅助性 T 淋巴细胞按其分泌细胞因子的不同可分为 Th1 和 Th2 细胞, Th0 为 Th1 和 Th2 的前体细胞。Th1 细胞主要分泌白细胞介素 (IL)2、 γ -干扰素 (IFN- γ) 等; Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-10 等。其中, IFN- γ 是 Th1 的特征性细胞因子, IL-4 是 Th2 的特征性细胞因子。IFN- γ 能促进 Th0 向 Th1 细胞分化及 Th1 类细胞因子的产生, 而抑制 Th2 类细胞因子的产生; 相反, IL-4 可促进 Th0 向 Th2 细胞分化及 Th2 类细胞因子的产生, 而抑制 Th1 类细胞因子的产生。转录因子 T-bet 和 GATA3 由于可分别与 IFN- γ 基因和 IL-4 基因的启动子区结合, 而对 Th1 和 Th2 两类细胞的发育分化及细胞因子分泌起中心调节作用^[11]。本研究发现急性 ITP 患儿发作期血 T-bet mRNA 表达和 IFN- γ 含量明显高于对照组, 而 GATA3 mRNA 表达和 IL-4 含量显著低于对照组, 提示儿童急性 ITP 存在 Th1 优势分化, 与张鲁勤等^[3]报道一致, 其中 T-bet 的过表达或 GATA3 的表达缺陷可能是急性 ITP 患儿存在 Th1 优势分化的重要原因。

另外, 本研究还发现在 ITP 缓解期血中 T-bet 和 GATA3 mRNA 的表达强度和 IFN- γ 和 IL-4 的含量与对照组比较差异也有显著性。这可能与部分病例取材于缓解期早期有关。由于从转录因子 T-bet/GATA3 水平分析急性 ITP 患儿 Th 免疫紊乱状态的研究较少, 因而尚需增加样本含量, 严格掌握各期纳入和排除标准, 并在缓解期不同时间段采样做对比

分析, 以反复多次实验验证。

本研究提示儿童急性 ITP 免疫紊乱的发生与 Th1/Th2 两类细胞因子间平衡紊乱有关, 而转录因子则在更高的层面调控着细胞因子的水平。急性 ITP 患儿 Th1 优势表达受到核转录因子 T-bet 和 GATA3 调控的影响, 其中 T-bet 高表达诱导了 Th1 的优势分化, GATA3 的低水平则抑制了 Th2 的分化, 最终表现 Th 向 Th1 的漂移。为此, 在临床工作中可通过对转录因子进行检测了解患儿的免疫紊乱状态, 可能为儿童急性 ITP 的实验室诊断开辟一个新的研究前景。针对急性 ITP 患儿 Th1 功能的亢进, 如在细胞分化的上游环节进行干预, 调控 T-bet 和 GATA3 的表达水平, 则有望从可能的源头上逆转急性 ITP 患儿的 Th1 优势状态, 下调 Th1 类细胞因子的表达、上调 Th2 类细胞因子的表达, 达到免疫治疗的目的, 为儿童急性 ITP 的免疫辅助治疗提供新的思路。

[参 考 文 献]

[1] Paling A, Stefan DC. Idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood: a 10-year audit[J]. Hematology, 2008, 13(3):175-180.

[2] Zhou B, Zhao H, Yang RC, Han ZC. Multi-dysfunctional pathophysiology in ITP[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2005, 54(2): 107-116.

[3] 张鲁勤, 葛晋源, 郭玉琳, 赵惠仁. 特发性血小板减少性紫癜患者血浆白细胞介素 18 及其有关细胞因子[J]. 中国实验血液学杂志, 2003, 11(6):662-664.

[4] 王列玲, 张爱梅, 刘洪军, 李春. 儿童慢性特发性血小板减少性紫癜免疫紊乱与治疗[J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志, 2006, 12(11):311-313.

[5] 何广胜, 周玲, 吴德沛. Th1 和 Th2 细胞的分化调节机制[J]. 中华血液学杂志, 2005, 26(2):125-128.

[6] Lametschwandtnr G, Biedermann T, Schwärzler C, Günther C, Kund J, Fassl S, et al. Sustained T-bet expression confers polarized human TH2 cells with TH1-like cytokine production and migratory capacities[J]. J Allergy Clin Immunol, 2004, 113(5): 987-994.

[7] Su RC, Becker AB, Kozyrskyj AL, Hayglass KT. Epigenetic regulation of established human type 1 versus type 2 cytokine responses [J]. J Allergy Clin Immunol, 2008, 121(1):57-63.

[8] Inman D, Kawana K, Schust D, Lininger R, Young S. Cyclic regulation of T-Bet and GATA-3 in human endometrium[J]. Reprod Sci, 2008, 15(1):83-90.

[9] 胡亚美, 江载芳. 诸福棠实用儿科学[M]. 第 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002:688-690.

[10] 何志旭, 尚峰. 国内外特发性血小板减少性紫癜诊断标准的比较[J]. 实用儿科临床杂志, 2006, 21(15):1035-1036.

[11] Chakir H, Wang H, Lefebvre DE, Webb J, Scott FW. T-bet/GATA3 ratio as a measure of the Th1/Th2 cytokine profile in mixed cell populations: predominant role of GATA-3[J]. J Immunol Meth, 2003, 278(1-2):157-169.

(本文编辑:王庆红)