

论著·临床研究

白细胞相关免疫球蛋白样受体-1在免疫性血小板减少症患儿中的表达

黄美玲 李长钢 王国兵 祖莹

(遵义医学院深圳儿童医院血液科, 广东 深圳 518026)

[摘要] **目的** 观察白细胞相关免疫球蛋白样受体-1(LAIR-1)在免疫性血小板减少症(ITP)患儿中的表达变化,探讨其在ITP发病中可能的机制。**方法** 采用流式细胞术检测40例ITP患儿外周血CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞及CD19⁺CD20⁺B细胞膜LAIR-1的表达率;ELISA检测ITP患儿血清中可溶性LAIR-1(sLAIR-1)含量及实时荧光定量PCR法检测ITP患儿LAIR-1 mRNA表达水平。32名同龄健康儿童作为对照组。**结果** ITP组CD19⁺CD20⁺B细胞比例高于对照组($P<0.05$),而CD4⁺T细胞比例低于对照组($P<0.05$)。ITP组CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞膜LAIR-1的表达低于对照组($P<0.05$)。ITP组血清sLAIR-1含量和LAIR-1 mRNA表达高于对照组($P<0.05$)。**结论** ITP患儿中CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞膜上LAIR-1表达降低,血清sLAIR-1表达增高,提示LAIR-1可能是导致ITP患儿免疫失衡的重要因素。[中国当代儿科杂志, 2014, 16(4): 370-374]

[关键词] 免疫性血小板减少症;白细胞相关免疫球蛋白样受体-1;免疫失衡;儿童

Expression of leukocyte-associated Ig-like receptor-1 in children with immune thrombocytopenia

HUANG Mei-Ling, LI Chang-Gang, WANG Guo-Bing, ZU Ying. Department of Hematology & Oncology, Shenzhen Children's Hospital Affiliated to Zunyi Medical College, Shenzhen, Guangdong 518026, China (Li C-G, Email: licg6336@sina.com)

Abstract: Objective To study the expression of leukocyte-associated Ig-like receptor-1(LAIR-1) in children with immune thrombocytopenia (ITP), in order to explore the possible role of LAIR-1 in the pathogenesis of childhood ITP. **Methods** Expression levels of LAIR-1 on CD4⁺T cells, CD8⁺T cells and CD19⁺CD20⁺B cells of peripheral blood were measured in 40 children with ITP by flow cytometry. Serum level of solubility LAIR-1 (sLAIR-1) was measured using ELISA. Real-time PCR was used to measure LAIR-1 mRNA expression. Thirty-two healthy children served as the control group. **Results** The percentages of CD19⁺CD20⁺B cells in the ITP group were significantly higher than in the control group ($P<0.05$). In contrast, the percentage of CD4⁺T cells in the ITP group was significantly lower than in the control group ($P<0.05$). The expression levels of LAIR-1 on CD4⁺T cells and CD8⁺T cells were significantly lower in the ITP group than in the control group ($P<0.05$). Serum sLAIR-1 level and LAIR-1 mRNA expression in the ITP group significantly increased compared with the control group ($P<0.05$). **Conclusions** LAIR-1 expression on CD4⁺ and CD8⁺T cells decreases and serum sLAIR-1 level increases in children with ITP, suggesting that LAIR-1 may play an important role in immune imbalance in these children. [Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(4): 370-374]

Key words: Immune thrombocytopenia; Leukocyte-associated Ig-like receptor-1; Immune imbalance; Child

免疫性血小板减少症(immune thrombocytopenia, ITP)是一种由血小板抗体介导的加速血小板的破坏及抑制其生成的获得性自身免疫出血性疾病。目前对于其发病机制尚不完全清楚。既

往研究发现ITP患者的细胞及体液免疫存在失衡现象,是导致ITP患儿血小板减少的另一主要原因^[1-2],但目前关于导致细胞及体液免疫失衡的机制尚未完全明确。

[收稿日期] 2013-11-08; [接受日期] 2014-02-28

[作者简介] 黄美玲,女,硕士研究生。

[通信作者] 李长钢,男,主任医师。

白细胞相关免疫球蛋白样受体-1 (leukocyte-associated Ig-like receptor, LAIR-1) 是一类含有 Ig 样胞外结构域的跨膜糖蛋白, 属于免疫球蛋白超家族成员, 它可在多种免疫细胞膜上表达, 也可从细胞膜表面脱落至血清中成为可溶性 LAIR-1 (sLAIR-1) [3]。LAIR-1 是一类抑制性受体, 可通过其所在细胞质的免疫受体酪氨酸抑制基序 (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif, ITIM) 发挥其免疫抑制功能, 从而使其所表达的免疫细胞的功能失衡 [4]。已有研究报道显示 LAIR-1 的表达异常与系统性红斑狼疮、类风湿关节炎等免疫性疾病的发病机制相关 [5-7]。但在儿童 ITP 急性期 LAIR-1 的表达是否存在异常现象, 目前尚未见相关报道。为此本研究对 ITP 患儿外周血 T 细胞及 B 细胞膜 LAIR-1、sLAIR-1 的水平进行了检测, 以探讨 LAIR-1 在 ITP 发病中可能的机制。

1 资料与方法

1.1 研究对象

参照 2009 年国际 ITP 工作组制定的儿童 ITP 诊断标准 [8], 选取 ITP 患儿 40 例, 其中男 24 例, 女 16 例, 平均年龄 32 ± 29 个月 (1~108 个月), 均为我院住院治疗患儿; 入院时平均血小板计数 $19 \times 10^9/L$ ($1 \times 10^9/L \sim 40 \times 10^9/L$); 所有 ITP 患儿均为急性期, 受试前 4 周均未使用免疫抑制剂及细胞毒性药物。同年龄健康对照组患儿 32 例, 男 17 例, 女 15 例, 平均年龄 35 ± 26 个月 (3~120 个月), 平均血小板计数 $210 \times 10^9/L$ 。两组受试者年龄及性别差异无统计学意义。本研究获受试者家属知情同意, 并通过医院医学伦理委员会批准。

1.2 材料

FITC 标记 CD8⁺ T 细胞、CD19⁺ B 细胞、PE 标记 LAIR-1、PerCP-cy5 标记 CD4⁺ T 细胞、APC-cy7 标记 CD20⁺ B 细胞抗体等均购自 BD Pharmingen 公司; 总 RNA 的提取及纯化试剂盒购自 QiaGen 公司; SYBRGreen 试剂盒购自德国 QIAGEN; 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒购自武汉 EIAab 公司。

引物与酶: 实时荧光定量 PCR 检测的引物根据 GenBank 设计, 由上海英骏 (Invitrogen) 公司合成。LAIR-1 正向序列: 5'-GGGGTCTCACTGCTC-

TTCCT-3'; 3'-CCCCAGAGTCACCAGAAGGA-5'。LAIR-1 反向序列: 5'-TCCATTGACTGTGGCCTTG-T-3'; 3'-AGGTAAGTACTCCGGAAGT-5'。

1.3 标本采集

在 ITP 患儿用药前采集外周静脉血 EDTA 抗凝管 1.5~2 mL, 干燥管 3 mL。为避免其他刺激干扰, 所有标本采集后均在 2 h 内处理。240 μ L 全血用作流式细胞仪分析; 1 mL 提取总 RNA, -80℃ 保存, 批量纯化、cDNA 合成及 mRNA 检测; 干燥管 3 mL 静脉血离心 20 min (1000 r/min), 分离上层血清, 分装至 EP 管中, -80℃ 保存, 采用 ELISA 集中检测 sLAIR-1。

1.4 流式细胞仪检测

全血法配制流式上机液, 采用流式细胞仪检测 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、CD19⁺ B 细胞、CD20⁺ B 细胞比例及其细胞膜上的 LAIR-1 的表达, 并设 PE 标记 IgG1 作同型对照, 阴性表达控制在 1% 左右, 全部数据经 FlowJo 软件分析。

1.5 cDNA 合成

总 RNA 的提取及纯化: 取外周血 1 mL, 按试剂盒说明步骤提取及纯化 RNA。抽取总 RNA 10 μ L, 按照逆转录试剂盒方法操作, 进行逆转录合成 cDNA, 取 1 μ L cDNA 进行 PCR 扩增 50~70 个循环。

1.6 实时荧光定量 PCR

采用 SYBRGreen 试剂盒, 罗氏 (LightCycler480) PCR 仪荧光定量检测总 LAIR-1 mRNA 表达水平, 应用 Relative Quantification 模式进行数据分析, 结果以目的基因/ β -actin GAPDH 比值表示。具体操作步骤参照试剂说明书。

1.7 ELISA

双抗夹心 ELISA 法检测 ITP 患儿血清 sLAIR-1 水平。具体操作步骤见试剂盒说明书。

1.8 统计学分析

所有数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件包进行, 正态分布资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 非正态分布资料以中位数 (四分位间距) [$M(P_{25}, P_{75})$] 表示。经正态性和方差齐性检验后, 采用 t 检验或非参数检验比较各组之间的差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组免疫细胞亚群比例的比较

ITP组外周血CD19⁺CD20⁺B细胞的比例较对照组明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);CD4⁺T细胞比例较对照组降低,差异有统计学意义($P<0.05$);CD8⁺T细胞较对照组稍升高,但两者差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

2.2 两组细胞膜LAIR-1表达的比较

ITP组外周血CD4⁺T细胞膜LAIR-1的表达低于对照组($P<0.05$);CD8⁺T细胞膜LAIR-1表达低于对照组($P<0.05$);CD19⁺CD20⁺B细胞膜LAIR-1的表达与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表2、图1、图2。

2.3 两组血清sLAIR-1水平及LAIR-1 mRNA表达的比较

ITP组血清sLAIR-1水平较对照组明显升高($P<0.05$),总LAIR-1 mRNA水平高于对照组($P<0.05$) (表3)。

表1 两组免疫细胞亚群比例的比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	CD19 ⁺ CD20 ⁺ B	CD4 ⁺ T	CD8 ⁺ T
对照组	32	13 ± 4	36 ± 8	18 ± 6
ITP组	40	17 ± 10	30 ± 10	20 ± 9
t值		-2.5	2.96	-1.714
P值		<0.05	<0.05	>0.05

表2 两组细胞膜LAIR-1表达的比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	CD19 ⁺ CD20 ⁺ B	CD4 ⁺ T	CD8 ⁺ T
对照组	32	90 ± 5	87 ± 3	91 ± 5
ITP组	40	90 ± 7	82 ± 10	87 ± 10
t值		0.147	2.318	2.05
P值		>0.05	<0.05	<0.05

表3 两组血清sLAIR-1水平及LAIR-1 mRNA表达的比较
[$M(P_{25}, P_{75})$]

组别	n	血清sLAIR-1	LAIR-1 mRNA
对照组	32	0.001(0.0095, 0.001)	5.00×10^{-4} (5.78×10^{-3} , 8.43×10^{-3})
ITP组	40	0.265(0.945, 0.001)	0.57(4.70, 0.01)
Z值		-4.059	-4.499
P值		<0.05	<0.05

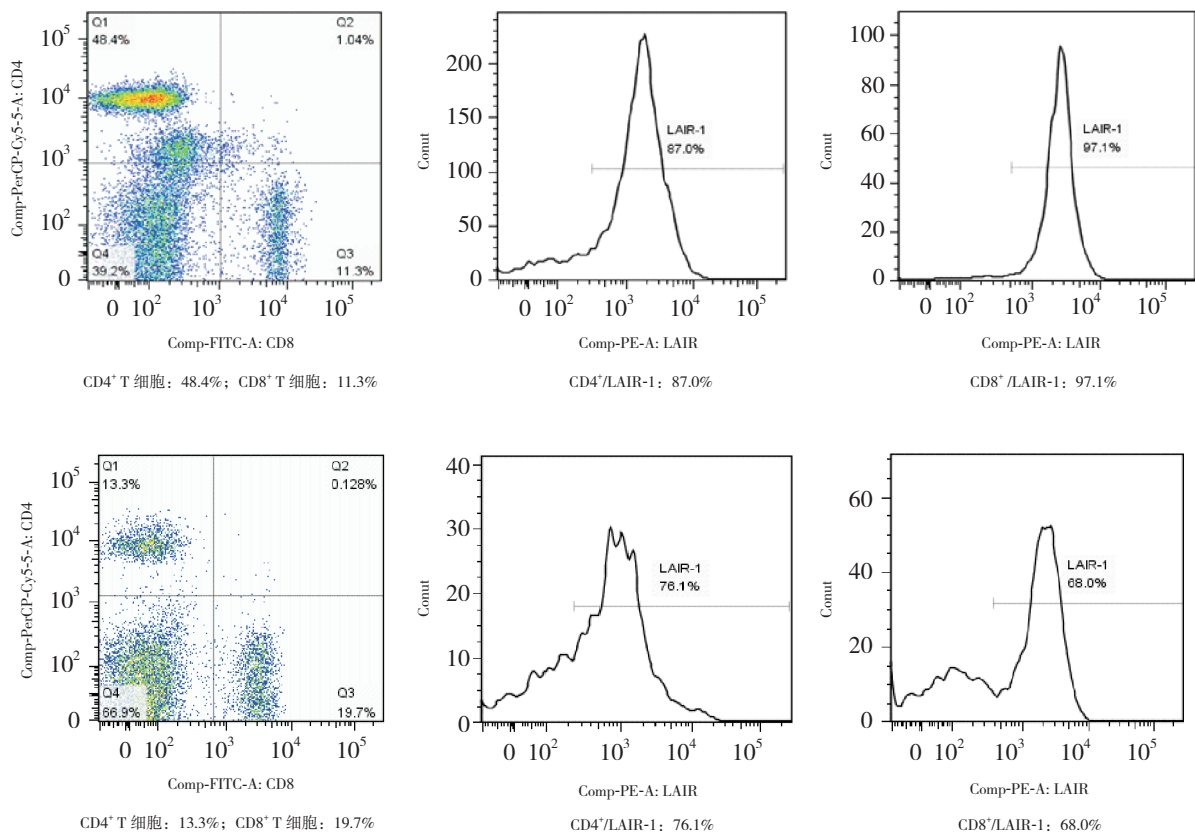


图1 CD4⁺、CD8⁺T细胞表达率及LAIR-1在CD4⁺、CD8⁺T细胞膜的表达率流式细胞仪示意图 上排为对照组,下排为ITP组。ITP组CD4⁺T细胞表达率较对照组降低,差异有统计学意义,而CD8⁺T细胞表达率较对照组稍增高,但两者差异无统计学意义;LAIR-1在CD4⁺、CD8⁺T细胞膜上的表达率较对照组降低,差异有统计学意义。

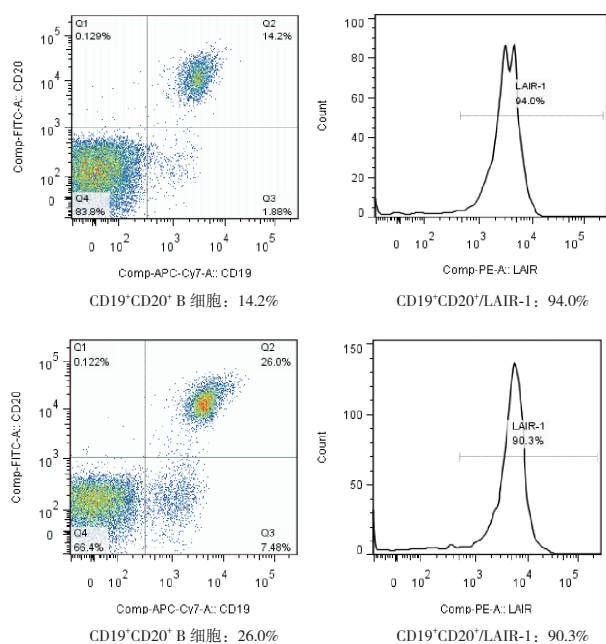


图2 CD19⁺CD20⁺ B细胞的表达率及LAIR-1在CD19⁺CD20⁺ B细胞膜的表达率流式细胞仪示意图 上排为对照组,下排为ITP组。ITP组CD19⁺CD20⁺ B细胞表达率较对照组升高,差异有统计学意义,但LAIR-1在CD19⁺CD20⁺ B细胞膜上的表达率与对照组比较差异无统计学意义。

3 讨论

儿童ITP的发病机制尚不十分清楚,普遍认为血小板的减少是由自身反应性B细胞和浆细胞产生的抗血小板抗体介导所致^[9],这些抗体通过单核巨噬细胞系统的巨噬细胞的Fcγ受体诱导血小板吞噬^[10]。近年研究发现ITP患儿CD4⁺ T细胞及分泌的细胞因子也可影响B细胞产生抗血小板抗体^[11],另外CD8⁺ T细胞也可发挥其细胞毒作用^[12],对血小板进一步破坏。因此,ITP的发病机制与机体免疫功能失衡密切相关。

人LAIR-1是一种跨膜蛋白质,可抑制B细胞的活化及增殖,同时减少相关抗体和细胞因子的产生^[13];也可抑制T细胞相关的TCR介导的信号,最终可抑制T细胞活化、辅助体液免疫及细胞毒性等功能^[4,14-15]。

对系统性红斑狼疮患者的研究发现B细胞膜上LAIR-1的表达缺失,该研究认为因LAIR-1在系统性红斑狼疮患者的B细胞上的缺失表达,LAIR-1不能发挥其抑制作用,导致B细胞异常活化,致使患者产生较多的异常抗体^[7]。同时,类

风湿关节炎的患者关节液中血清可溶性LAIR-1的表达水平均高于正常人,血清sLAIR-1可与膜型LAIR-1竞争结合配体,从而导致患者的免疫细胞过度活化后发生免疫失衡^[5-6]。

本研究结果显示,ITP患儿中外周血CD4⁺ T细胞比例较正常对照组显著降低,CD8⁺ T细胞较对照组稍升高,CD19⁺CD20⁺ B细胞的比例显著升高,这与既往研究结果相似,说明ITP患儿体内存在细胞及体液免疫失衡现象^[11-12]。重要的是本研究发现,ITP患儿外周血CD4⁺ T细胞膜LAIR-1的表达降低,导致其对自身的细胞抑制功能减弱,这可能使CD4⁺ T细胞参与的细胞免疫及辅助体液免疫应答的功能增强,产生较多的抗血小板自身抗体,介导单核巨噬细胞对血小板的吞噬;同时CD8⁺ T细胞膜LAIR-1降低,LAIR-1对CD8⁺ T细胞发挥的抑制性作用减弱,使其细胞毒性功能增强,对血小板破坏增多。另外,研究结果中注意到,LAIR-1在CD19⁺CD20⁺ B细胞膜上的表达与对照组比较差异无统计学意义,这提示膜LAIR-1并不影响体液免疫的抗体产生;但ITP患儿的CD19⁺CD20⁺ B细胞比例较对照组增高,前期研究结果提示ITP患儿存在Th2细胞的过度活化^[16],推测由于CD4⁺ T细胞膜LAIR-1表达降低,加之sLAIR-1的增加,两者导致其对T细胞的抑制功能减弱、Th2细胞过度活化,后者促进体液免疫的功能增强,从而使B细胞活化增殖。因此,推测LAIR-1主要是依靠对T细胞功能及其辅助体液免疫应答的作用进行调节,从而导致ITP患儿机体的免疫失衡。

另外,本研究发现ITP患儿血清中的sLAIR-1表达增加,这可能是由于位于细胞膜上的LAIR-1脱落至血清所致。血清中的sLAIR-1可与膜LAIR-1互相竞争配体,从而进一步使ITP患儿体液及细胞免疫功能失衡。对LAIR-1 mRNA检测发现,ITP组患儿LAIR-1 mRNA表达高于对照组,推测与以下因素有关:(1)由于细胞膜LAIR-1表达降低,而使LAIR-1 mRNA表达代偿性(反馈)增加;(2)尽管ITP患儿的LAIR-1 mRNA转录水平增高,但可能存在翻译过程的障碍。以上结果进一步提示ITP患儿LAIR-1表达的变化在其发病机制中起着重要的作用。

本研究发现ITP患儿LAIR-1在CD4⁺ T细胞、

CD8⁺T 细胞膜 LAIR-1 的表达降低致使对免疫细胞的抑制功能减弱,血清中 sLAIR-1 的表达升高进一步削弱了膜 LAIR-1 的抑制功能,提示 LAIR-1 可能是导致 ITP 患儿的免疫失衡的重要因素。有待进一步研究 ITP 患儿经激素及丙种球蛋白治疗后是否可调控细胞膜及血清中 LAIR-1 的表达变化,或通过影响 T 细胞及 B 细胞的功能、体内细胞因子水平^[17],从而间接调控细胞膜上 LAIR-1 的表达。概括起来,本研究证实了细胞膜上 LAIR-1 与小儿 ITP 体液及细胞免疫功能紊乱的机制相关,血清中 LAIR-1 可能参与细胞膜上 LAIR-1 发挥抑制功能的调控。深入探讨 LAIR 在 ITP 发病机制中的作用,可进一步了解导致 ITP 免疫功能紊乱的机制。

[参 考 文 献]

- [1] McMillan R. The role of antiplatelet autoantibody assays in the diagnosis of immune thrombocytopenic purpura[J]. *Curr Hematol Rep*, 2005, 4(2): 160-165.
- [2] McKenzie CG, Guo L, Freedman J, et al. Cellular immune dysfunction in immune thrombocytopenia (ITP)[J]. *Br J Haematol*, 2013, 163(1): 10-23.
- [3] Walk J, Westerlaken GH, van Uden NO, et al. Inhibitory receptor expression on neonatal immune cells[J]. *Clin Exp Immunol*, 2012, 169(2): 164-171.
- [4] Jansen CA, Cruikshank CW, de Ruiter T, et al. Regulated expression of the inhibitory receptor LAIR-1 on human peripheral T cells during T cell activation and differentiation[J]. *J Immunol*, 2007, 179(4): 914-924.
- [5] Olde Nordkamp MJ, van Roon JA, Douwes M, et al. Enhanced secretion of leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 2 (LAIR-2) and soluble LAIR-1 in rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 63(12): 3749-3757.
- [6] Zhang Y, Ding Y, Huang Y, et al. Expression of leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor-1 (LAIR-1) on osteoclasts and its potential role in rheumatoid arthritis[J]. *Clinics (Sao Paulo)*, 2013, 68(4): 475-481.
- [7] Colombo BM, Canevali P, Magnani O, et al. Defective expression and function of the leukocyte associated Ig-like receptor 1 in B lymphocytes from systemic lupus erythematosus patients[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(2): e31903.
- [8] Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group[J]. *Blood*, 2009, 113(11): 2386-2393.
- [9] 刘晓帆,薛峰,张磊,等. 血小板膜糖蛋白特异性抗体在原发免疫性血小板减少症患者中的分布及与疗效的关系[J]. *中华血液学杂志*, 2013, 34(7): 610-613.
- [10] 周燕,钟周琳,申卫东. ITP 患者血小板特异性自身抗体的检测及意义[J]. *广西医学*, 2010, 32(6): 708-709.
- [11] 胡莹贤,邱虹,徐海洋,等. 35 例特发性血小板减少性紫癜患者治疗前后 T 淋巴细胞亚群检测分析[J]. *宁夏医科大学学报*, 2011, 33(6): 576-577.
- [12] Zhang J, Ma D, Zhu X, et al. Elevated profile of Th17, Th1 and Tc1 cells in patients with immune thrombocytopenic purpura[J]. *Haematologica*, 2009, 94(9): 1326-1329.
- [13] Meyskens L. LAIR and collagens in immune regulation[J]. *Immunol Lett*, 2010, 128(1): 26-28.
- [14] Maasho K, Masilamani M, Valas R, et al. The inhibitory leukocyte associated Ig like receptor-1 (LAIR-1) is expressed at high levels by human naive T cells and inhibits TCR mediated activation[J]. *Mol Immunol*, 2005, 42(12): 1521-1530.
- [15] Tang X, Tian L, Estes G, et al. Leukocyte-associated Ig-like receptor-1-deficient mice have an altered immune cell phenotype[J]. *J Immunol*, 2012, 188(2): 548-558.
- [16] 王国兵,李成荣,李长钢,等. 儿童急性 ITP Th1/Th2 细胞功能状态初步研究[J]. *中国小儿血液与肿瘤杂志*, 2008(4): 156-160.
- [17] Del Vecchio GC, Giordano P, Tesse R, et al. Clinical significance of serum cytokine levels and thrombopoietic markers in childhood idiopathic thrombocytopenic purpura[J]. *Blood Transfus*, 2012, 10(2): 194-199.

(本文编辑: 邓芳明)