

论著·临床研究

## SOCS 低甲基化在儿童过敏性紫癜 Th17/Treg 细胞失衡中的作用研究

常红<sup>1</sup> 林毅<sup>1</sup> 雷珂<sup>2</sup> 王芳<sup>1</sup> 张庆群<sup>1</sup> 张秋业<sup>1</sup>

(1. 青岛大学附属医院儿童医学中心心肾免疫儿科, 山东 青岛 266003;  
2. 青岛大学附属医院儿科研究所, 山东 青岛 266003)

**[摘要]** **目的** 通过研究细胞因子信号转导抑制因子(SOCS)低甲基化与过敏性紫癜(HSP)患儿Th17/Treg细胞失衡的关系,探讨HSP的免疫发病机制。**方法** 选取2014年5月至2015年1月32例急性期HSP住院患儿为研究对象,另选取行健康体检的28例儿童作为健康对照组。采用ELISA法检测血浆IL-6水平;流式细胞术检测外周血CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup>T细胞(Th17细胞)比例、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性T细胞(Treg)比例和CD4<sup>+</sup>T细胞磷酸化STAT3(pSTAT3)蛋白平均荧光强度(MFI);实时荧光定量PCR(RT-qPCR)技术检测CD4<sup>+</sup>T细胞SOCS1、SOCS3基因mRNA表达;高分辨率熔解曲线(HRM)分析法检测外周血单个核细胞SOCS1基因外显子2、SOCS3基因5'端非翻译区(5'-UTR)可能的STAT3结合位点CpG岛甲基化水平。**结果** 与健康对照组比较,HSP组血浆IL-6浓度、CD4<sup>+</sup>T细胞pSTAT3的MFI显著增加;HSP组Th17细胞比例显著上调,Treg细胞比例显著下调( $P<0.05$ )。HSP组患儿急性期外周血单个核细胞SOCS1 mRNA和SOCS3 mRNA水平均显著高于健康对照组( $P<0.05$ );HSP组SOCS1 mRNA及SOCS3 mRNA表达均与Th17/Treg比值呈负相关( $P<0.05$ )。HSP组患儿急性期SOCS1基因外显子2、SOCS3基因5'-UTR区可能的STAT结合位点CpG岛呈低甲基化,而健康对照组呈完全去甲基化状态。**结论** SOCS1、SOCS3基因低甲基化所致其相对表达不足可能是HSP患儿Th17/Treg失衡的因素之一。 [中国当代儿科杂志, 2019, 21(1): 38-44]

**[关键词]** 过敏性紫癜; Th17细胞; 调节性T细胞; 细胞因子信号转导抑制因子; 甲基化; 儿童

### Role of hypomethylation of suppressor of cytokine signaling in T helper 17 cell/regulatory T cell imbalance in children with Henoch-Schönlein purpura

CHANG Hong, LIN Yi, LEI Ke, WANG Fang, ZHANG Qing-Qun, ZHANG Qiu-Ye. Department of Pediatric Cardiology, Nephrology and Rheumatism, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, Shandong 266003, China (Email: 18661802671@yeah.net)

**Abstract: Objective** To investigate the association between suppressor of cytokine signaling (SOCS) hypomethylation and T helper 17 (Th17) cell/regulatory T (Treg) cell imbalance in children with Henoch-Schönlein purpura (HSP) and the immune pathogenesis of HSP. **Methods** A total of 32 children in the acute stage of HSP who were hospitalized from May 2014 to January 2015 were enrolled as subjects, and 28 children who underwent physical examination were enrolled as normal control group. ELISA was used to measure the plasma level of interleukin-6 (IL-6). Flow cytometry was used to measure the percentages of CD4<sup>+</sup> IL-17A<sup>+</sup> T cells (Th17 cells) and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg cells (Treg cells) in peripheral blood and mean fluorescence intensity (MFI) for phosphorylated-STAT3 (pSTAT3) protein in CD4<sup>+</sup> T cells. Quantitative real-time PCR was used to measure the mRNA expression of suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS1) and suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3) in CD4<sup>+</sup> T cells. High-resolution melting (HRM) was used to evaluate the methylation level of the CpG islands in SOCS1 exon 2 and the CpG islands of the potential bind sites for STAT3 in the 5'-untranslated region (5'-UTR) of SOCS3 in peripheral blood mononucleated cells. **Results** Compared with the normal control group, the HSP group had significant increases in plasma IL-6 concentration and MFI for pSTAT3 in CD4<sup>+</sup> T cells, as well as a significant increase in the percentage of Th17 cells and a significant

[收稿日期] 2018-07-12; [接受日期] 2018-12-05

[基金项目] 山东省科技发展计划项目(2014GSF118049)。

[作者简介] 常红,女,博士,主任医师。Email: 18661802671@yeah.net。

reduction in the percentage of Treg cells ( $P<0.05$ ). The HSP group had significantly higher mRNA expression of SOCS1 and SOCS3 in peripheral blood mononucleated cells than the normal control group ( $P<0.05$ ). In the HSP group, the mRNA expression of SOCS1 and SOCS3 was negatively correlated with Th17/Treg ratio ( $P<0.05$ ). The HSP group had hypomethylation of the CpG islands in SOCS1 exon 2 and the potential binding site for STAT3 in SOCS3 5'-UTR, while the normal control group had complete demethylation. **Conclusions** Low relative expression of SOCS1 and SOCS3 caused by hypomethylation may be a factor for Th17/Treg imbalance in children with HSP.

[Chin J Contemp Pediatr, 2019, 21(1): 38-44]

**Key words:** Henoch-Schönlein purpura; T helper 17 cell; Regulatory T cell; Suppressor of cytokine signaling; Methylation; Child

过敏性紫癜 (Henoch-Schönlein purpura, HSP) 是以全身小血管炎症为主要病变的系统性血管炎, 其病因及发病机制尚未完全明确。本课题组前期研究证实, HSP 患儿急性期存在 Th17 细胞过度活化、调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 减少并由此引起免疫抑制效应不足, 但导致免疫功能异常的调控因素仍不清楚<sup>[1]</sup>。Th17/Treg 是一对具有促炎/抑炎作用的 T 淋巴细胞亚群, 参与维持体内免疫功能动态平衡。在炎症反应、自身免疫性疾病及移植排斥反应时, IL-6 等促炎细胞因子过度表达, 并通过影响初始 CD4<sup>+</sup>T 细胞的分化格局, 促进 Th17 细胞分化, 破坏 Th17/Treg 平衡, 导致一系列炎症反应损伤机体<sup>[2]</sup>。细胞因子信号转导抑制因子 (suppressor of cytokine signaling, SOCS) 可通过抑制 IL-6/ 信号转导和转录激活蛋白 3 (STAT3) 信号通路参与调控 T 淋巴细胞分化成熟, 在维持体内 Th17/Treg 稳态中发挥重要作用。HSP 患儿是否存在 IL-6/STAT3 信号途径过度活化而导致 Th17/Treg 失衡? 其负性调节因子 SOCS 表达是否存在相对不足? SOCS 表达相对不足的原因是否存在 SOCS 基因低甲基化? 目前相关研究国内外文献少见报道。故本研究观察 IL-6/STAT3 信号及其负性调节因子 SOCS1、SOCS3 对急性 HSP 患儿 Th17/Treg 失衡的影响, 并通过高分辨率熔解曲线 (high-resolution melting, HRM) 分析法检测 SOCS1 和 SOCS3 表观遗传学修饰, 旨在进一步明确 HSP 的免疫发病机制。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象及分组

选取 2014 年 5 月至 2015 年 1 月在青岛大学附属医院心肾免疫儿科住院的 HSP 患儿 32 例为研究对象, 其中男 18 例, 女 14 例, 年龄 3~12 岁,

平均年龄 6.5 岁, 所有患儿近 4 周内均无糖皮质激素及免疫增强剂或免疫抑制剂等特殊药物使用情况, 且均为首次发病。所有患儿诊断标准参照参考文献<sup>[3]</sup>。另选取我院儿童保健科健康体检儿童 28 例作为健康对照组, 其中男 14 例, 女 14 例, 年龄 3~13 岁, 平均年龄 7.0 岁。两组儿童年龄及性别比较差异无统计学意义, 具有可比性。本研究获得所有受试者家属知情同意后实施, 并报医院医学伦理委员会讨论通过。

### 1.2 流式细胞术检测外周血 CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup>T 细胞 (Th17 细胞) 百分率及 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 百分率

测试管和同型对照管中同时加入 10  $\mu$ L 抗人 CD4-FITC, 随后分别加入 80  $\mu$ L 的外周肝素抗凝静脉血, 避光室温下静置 20 min。每管加入 100  $\mu$ L 破膜剂 1, 用力摇匀后避光室温下静置 20 min, 加入 PBS, 2000 r/min 离心 5 min。弃上清液, 每管加入破膜剂 2, 摇匀后避光室温下静置 5 min, 测试管中加入抗人 IL-17A-PE (美国 eBioscience 公司) 5  $\mu$ L、抗人 CD25-PE 10  $\mu$ L, 对照管中加入鼠源 IgG1-PE 10  $\mu$ L, 用力摇匀后避光室温下静置 30 min。用 PBS 反复洗涤两遍, 2000 r/min 离心 5 min。末次丢弃上清液, 将 PBS 1 mL 分别加测试管和同型对照管。将测试管和同型对照管同时放入流式细胞仪 (Cytomics FC500 型流式细胞仪, 英国 Biogend 公司) 检测, CD4<sup>+</sup>T 细胞设门, 分析门中 IL-17A、CD25 阳性细胞百分率。抗人 CD4-FITC、抗人 CD25-PE 及鼠源 IgG1-PE 试剂均购自美国 Beckman Coulter 公司。

### 1.3 流式细胞术检测外周血 CD4<sup>+</sup>T 细胞磷酸化 STAT3 蛋白平均荧光强度

取 HSP 组患儿急性期 (新发皮疹 1 周内) 及健康对照组儿童肝素抗凝血 80  $\mu$ L, 加入 5  $\mu$ L 1  $\mu$ g/mL 佛波醇乙酯、4  $\mu$ L 50  $\mu$ g/mL 离子霉素工作液及 3  $\mu$ L 1.4  $\mu$ g/mL 莫能菌素, 于 37 $^{\circ}$ C 下刺激 15 min。

测试管和对照管中同时加入 10  $\mu$ L 抗人 CD4-FITC, 随后测试管中加入 80  $\mu$ L 已经刺激的外周静脉血, 对照管中加入未刺激的外周血 80  $\mu$ L, 避光室温下静置 20 min。两管分别加入 100  $\mu$ L 破膜剂 1, 用力摇匀后避光室温下静置 20 min, 加入 PBS, 2000 r/min 离心 5 min。弃上清液, 每管加入破膜剂 2, 摇匀后避光室温下静置 5 min, 测试管中加入鼠源 Anti-STAT3-PE (pY705, 美国 BD 公司) 10  $\mu$ L, 对照管中加入鼠源 IgG2a-PE (美国 Beckman Coulter 公司) 10  $\mu$ L, 用力摇匀后避光室温下静置 30 min。用 PBS 反复洗涤两遍, 2000 r/min 离心 5 min。末次丢弃上清液, 将 PBS 1 mL 分别加入测试管和同型对照管。将测试管和同型对照管同时放入流式细胞仪检测, CD4<sup>+</sup>T 细胞设门, 测定 10000 个外周血淋巴细胞双染色双阳性细胞百分率。选择 CXP Analysis 软件获取细胞并分析。

#### 1.4 分离外周血单个核细胞

无菌采集肝素抗凝静脉血 3 mL, 淋巴细胞分离液 (北京索莱宝科技有限公司) 密度梯度离心法分离外周血单个核细胞 (PBMC), 加入 1 mL RNA 提取液, 放置 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

#### 1.5 实时荧光定量聚合酶链反应法检测 SOCS mRNA 表达

取已加入 RNAiso 的 PBMC, 按试剂盒说明书 (上海杰美基因医药科技有限公司) 步骤提取总 RNA; 紫外分光光度计测量其浓度及纯度。按试剂盒 (FP207, 北京天根生化有限公司) 说明书, 经反转录合成 cDNA。参照 GenBank 中目的基因 mRNA 序列设计相关引物 (由上海生工生物工程有限公司合成), 有关参数见表 1。实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 反应体系 (20  $\mu$ L): 2 $\times$ FastFire qPCR PreMix 10  $\mu$ L、上下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 0.6  $\mu$ L、DNA 模板 2.0  $\mu$ L、dH<sub>2</sub>O 6.8  $\mu$ L。RT-qPCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 60 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 延伸 15 s, 共 40 个循环。RT-qPCR 产物鉴定: 取 SOCS1 及 SOCS3 扩增产物 10  $\mu$ L 在 2% 琼脂糖凝胶中, 90 V 电泳 30 min, 回收纯化, 并送交上海生工生物工程有限公司测序。测序结果与 GenBank 中目的基因 mRNA 序列比较确定完全一致。以目的基因的 Ct 值减去内参 GAPDH 的 Ct 值为  $\Delta$  Ct, 目的基因的相对表达量以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示。具体计算方法参考文献<sup>[4]</sup>。

表 1 RT-qPCR 及甲基化特异性定量 PCR 引物

基因	引物	序列	产物大小 (bp)	复性温度
SOCS1	Forward primer	5'-CTTCTGTAGGATGGTAGCACAC-3'	98	62 $^{\circ}$ C
	Reverse primer	5'-AGGAAGAGGAGGAAGCTTCT-3'		
SOCS3	Forward primer	5'-ACTCTGTGCCTCCTGACTAT-3'	99	62 $^{\circ}$ C
	Reverse primer	5'-AGGCTGAGTATGTGGCTTTC-3'		
SOCS1-M	Forward primer	5'-CGAGTTCCTGGGTATTTTTTTTGGT-3'	146	63 $^{\circ}$ C
	Reverse primer	5'-AACTCTCGCGACTACCATCCAAATA-3'		
SOCS3-M	Forward primer	5'-GATGGAAGTCCGAGATTTTAGGTTT-3'	138	61 $^{\circ}$ C
	Reverse primer	5'-TAAACGCCGCTCAATCCAATAA-3'		

#### 1.6 高分辨率熔解曲线法检测 SOCS1、SOCS3 相应位点甲基化水平

参照 HRM 分析试剂盒 (FP210, 北京天根生化有限公司) 说明书, 提取淋巴细胞基因组 DNA, 基因组 DNA 甲基化修饰, 修饰后 DNA 纯化回收, 标准品配制, 建立 HRM PCR 反应体系, 用 HRM 法获曲线图进行分析。从 Pubmed GenBank 中寻找人 SOCS1、SOCS3 的基因序列, 由相关技术人员设计甲基化特异性引物 (表 1), 检

测 SOCS1 基因外显子 2、SOCS3 基因 5' 端非翻译区 (5'-untranslated region, 5'-UTR) 可能的 STAT3 结合位点 CpG 岛甲基化状态, 引物由上海生物工程有限公司合成。

#### 1.7 血浆 IL-6 水平的测定

采用双抗体夹心法酶联免疫吸附试验检测血浆 IL-6 水平, 实验步骤按 IL-6 酶联免疫吸附试验试剂盒 (上海元龙生物技术有限公司) 说明书进行操作。

### 1.8 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行统计学分析。符合正态分布计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组间比较采用  $t$  检验或  $t'$  检验; 不符合正态分布计量资料以中位数 (四分位间距) [ $M(P_{25}, P_{75})$ ] 表示, 两组间比较采用 Wilcoxon 秩和检验; 相关分析采用 Spearman 秩相关。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组儿童外周血 CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup>T 细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 百分率及 Th17/Treg 比值情况

HSP 组 CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup>T 细胞百分率明显高于健康对照组, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞百分率显著低

于健康对照组, Th17/Treg 比值较对照组明显升高 ( $P < 0.05$ )。见表 2 及图 1。

### 2.2 两组儿童外周血 CD4<sup>+</sup>T 细胞磷酸化 STAT3 蛋白及血浆 IL-6 表达情况

急性期 HSP 组磷酸化 STAT3 (pSTAT3) 蛋白平均荧光强度 ( $34 \pm 8$ ) 明显高于健康对照组 ( $17 \pm 5$ ), 差异有统计学意义 ( $t=9.338, P < 0.01$ ); 急性期 HSP 患儿 IL-6 表达水平 ( $115 \pm 24$  ng/mL) 显著高于健康对照组 ( $38 \pm 11$  ng/mL), 差异有统计学意义 ( $t=16.488, P < 0.01$ )。

### 2.3 两组儿童外周血 PBMC SOCS1 及 SOCS3 mRNA 表达情况

HSP 组 SOCS1 及 SOCS3 mRNA 表达水平均显著高于健康对照组 ( $P < 0.01$ ), 见表 3。

表 2 两组儿童外周血 CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup>T 细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 百分率及 Th17/Treg 比值比较

组别	n	CD4 <sup>+</sup> IL-17A <sup>+</sup> T 细胞 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Treg ( $\bar{x} \pm s, \%$ )	Th17/Treg 比值 [ $M(P_{25}, P_{75})$ ]
健康对照组	28	0.49 ± 0.28	4.0 ± 1.5	0.10(0.02, 1.45)
HSP 组	32	1.58 ± 0.76	2.5 ± 1.0	0.23(0.11, 1.77)
$t(t')[Z]$ 值		(7.585)	4.582	[-4.038]
P 值		<0.05	<0.01	<0.01

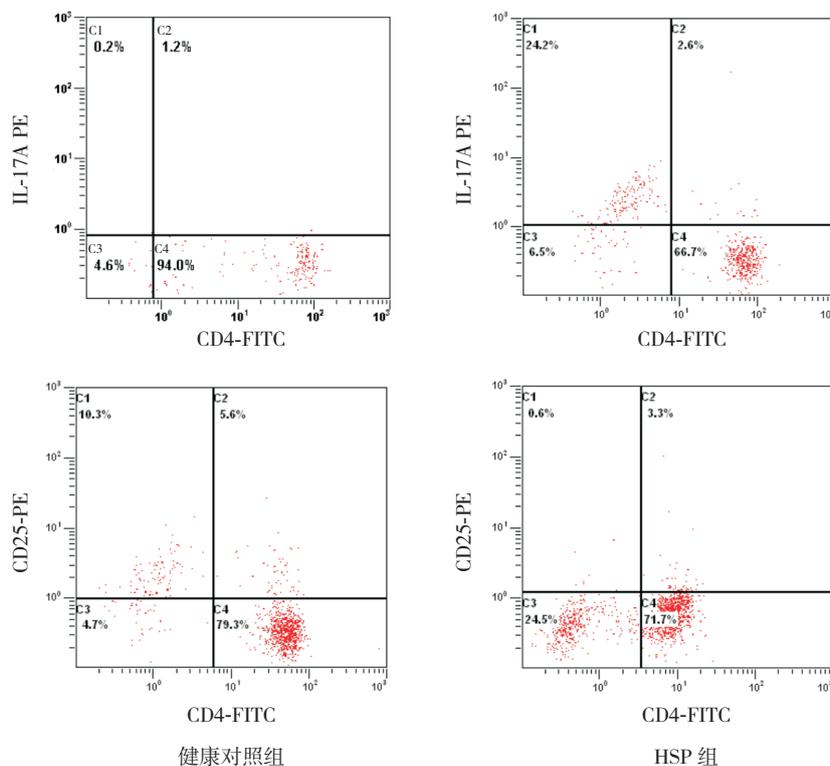


图 1 两组儿童外周血 CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup>T 细胞及 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 百分率 第二象限 (C2) 示 CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup>T 细胞或 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 百分率。

表 3 两组儿童外周血 PBMC SOCS1 及 SOCS3 mRNA 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $\times 10^{-3}$ )

组别	n	SOCS1 mRNA	SOCS3 mRNA
健康对照组	28	1.6 ± 0.9	5.1 ± 1.9
HSP 组	32	3.6 ± 1.0	12.5 ± 4.4
t 值		8.436	8.153
P 值		<0.01	<0.01

## 2.4 相关性分析

HSP 组患儿外周血 PBMC SOCS1 mRNA、SOCS3 mRNA 水平分别与 Th17/Treg 比值均呈负相关 (分别  $r=-0.623$ 、 $-0.644$ ,  $P<0.01$ ) ; CD4<sup>+</sup>T 细胞 pSTAT3 蛋白平均荧光强度与 Th17/Treg 比值呈正相关 ( $r=0.407$ ,  $P<0.05$ ) 。见图 2。

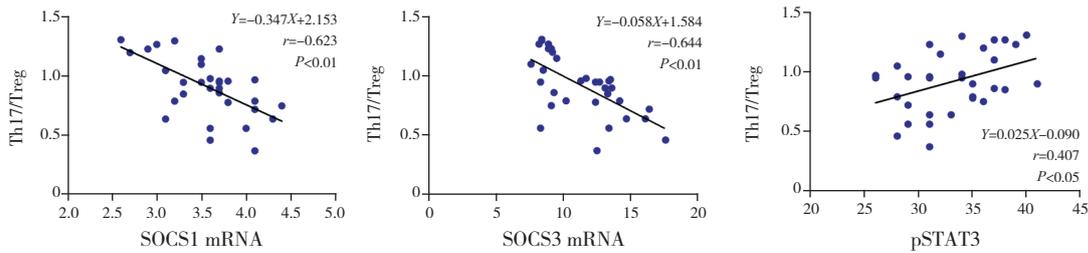


图 2 SOCS1 mRNA、SOCS3 mRNA、pSTAT3 蛋白平均荧光强度与 Th17/Treg 比值相关性分析

## 2.5 外周血 SOCS1 和 SOCS3 基因甲基化检测结果

HRM 能确定特定样品中甲基化的比例。将不同比例的甲基化和未甲基化 DNA 混合, 制作出标准曲线, 同时以甲基化修饰后的待测样品的 DNA 为模板进行检测, 根据待测标本在标准曲线上的位置判定其甲基化程度及比例。每份标本重复检测 3 次, 最后结果为其平均甲基化程度及比例。

SOCS1 基因外显子 2 甲基化检测结果显示, 27 份健康对照组及 2 份 HSP 组标本甲基化水平基本重叠在 0% 标准曲线上; 30 份 HSP 组及 1 份

健康对照组标本甲基化水平在 0%~25% 区域内, 其他区域无标本出现。见图 3。

SOCS3 基因 5'-UTR 可能的 STAT3 结合位点 GpG 岛甲基化检测结果显示, 28 份健康对照组及 1 份 HSP 组标本甲基化水平基本重叠在 0% 标准曲线上; 31 份 HSP 组标本甲基化水平在 0%~25% 区域内, 其他区域无标本出现。见图 4。

通过测定曲线位置可判定 HSP 患儿 SOCS1 和 SOCS3 基因基本处于低甲基化状态, 而健康对照组基本处于完全去甲基化状态。

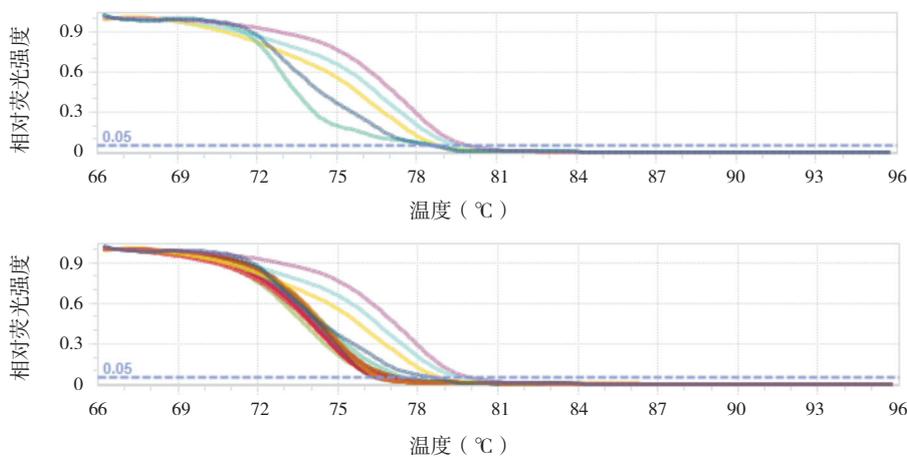


图 3 HRM 绘制 SOCS1 甲基化程度的标准曲线图及 HSP 组 SOCS1 甲基化程度的曲线图 上图: HRM 绘制 SOCS1 甲基化程度的标准曲线图 (曲线从左至右依次代表 0%、25%、50%、75%、100% 甲基化程度); 下图: HRM 绘制 HSP 组 SOCS1 甲基化程度的曲线图 (深红色曲线代表 HSP 组标本甲基化水平在 0%~25% 区域内)。

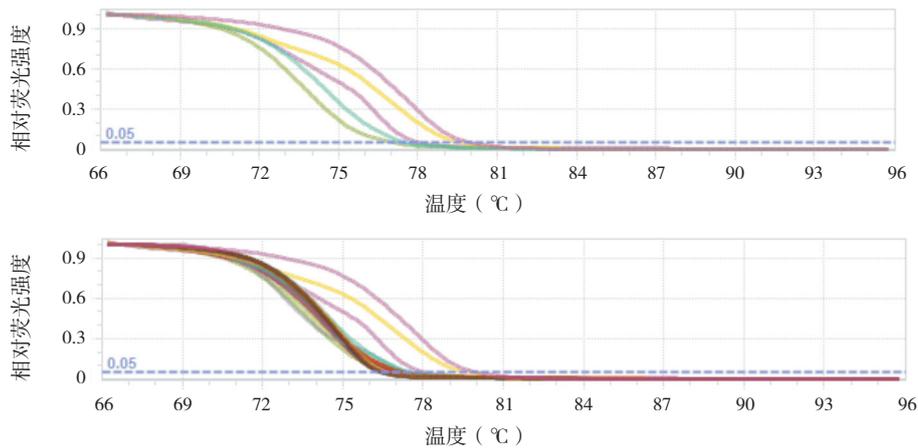


图4 HRM绘制SOCS3甲基化程度的标准曲线图及HSP组SOCS3甲基化程度的曲线图 上图:HRM绘制SOCS3甲基化程度的标准曲线图(曲线从左至右依次代表0%、25%、50%、75%、100%甲基化程度);下图:HRM绘制HSP组SOCS3甲基化程度的曲线图(深红色曲线代表HSP组标本甲基化水平在0%~25%区域内)。

### 3 讨论

HSP是儿童期最常见的系统性血管炎,迄今其发病机制仍未完全阐明,可能涉及体液免疫紊乱、T细胞亚群功能失调、细胞因子分泌异常、凝血与纤溶机制紊乱等多方面参与发病<sup>[5]</sup>。

Th17细胞是一种特征性分泌IL-17的CD4<sup>+</sup>辅助T细胞亚群,在机体炎症反应或自身免疫反应中发挥作用。Treg是一组具有免疫抑制功能的T细胞亚群,对移植排斥、自身免疫性疾病等具有主要的调节功能,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg为其家族中最主要的一群。Th17与Treg细胞都来源于初始CD4<sup>+</sup>T细胞,是一对具有促炎/抑炎作用的T淋巴细胞亚群,参与维持体内免疫功能动态平衡。在炎症反应、自身免疫性疾病及移植排斥反应时,IL-6等促炎细胞因子的过度表达通过影响初始CD4<sup>+</sup>T细胞的分化格局,增加Th17细胞分化,破坏Th17/Treg平衡,导致一系列炎症反应损伤机体<sup>[6]</sup>。本研究结果显示,HSP患儿存在T细胞功能紊乱,Th17过度活化,Treg生成减少,并由此引起免疫抑制效应不足,与既往研究结果相同<sup>[1]</sup>,再次证实HSP患儿体内存在Th17/Treg细胞失衡,但具体调节机制目前仍不清楚。

IL-6与细胞表面受体结合通过JAK/STAT3信号转导途径传递生物信息,IL-6与细胞表面受体结合使受体蛋白胞内段分子构象发生改变,触发JAK/STAT3信号。活化的JAK激酶磷酸化STAT3,pSTAT3可启动下游相关基因诱导

ROR $\gamma$ t、IL-17A/F表达,从而促使初始CD4<sup>+</sup>T细胞向Th17分化<sup>[7]</sup>。IL-6还通过STAT3促使Foxp3基因(Treg细胞发育的重要转录因子)上游增强子CpG岛发生甲基化从而抑制Treg细胞分化,推动机体炎症反应的发展<sup>[8]</sup>。本研究观察到HSP患儿急性期血浆IL-6浓度及CD4<sup>+</sup>T细胞pSTAT3蛋白表达均较健康对照组明显升高,且与Th17/Treg比值呈正相关,提示IL-6/STAT3信号异常活化可能为HSP患儿Th17/Treg失衡的重要原因之一。

SOCS是由细胞因子诱导产生的信号通路中非常重要的负性调节蛋白,通过抑制细胞因子信号转导调节机体对细胞因子的过度刺激。在T淋巴细胞功能亚群的分化调节过程中,SOCS家族起着重要的作用,其中SOCS1和SOCS3对调节T淋巴细胞发育、分化的作用最重要<sup>[9-10]</sup>。研究发现,SOCS在类风湿性关节炎、川崎病、免疫性血小板减少性紫癜、炎症性肠病及肿瘤性疾病等多种疾病的发病中起着重要的作用<sup>[11-13]</sup>。

Zhang等<sup>[14]</sup>通过体内外试验发现黄芪苷通过上调SOCS3表达抑制STAT3活性从而使Th17细胞分化减少,减轻实验性自身免疫性脑脊髓炎。王国兵等<sup>[15]</sup>在研究免疫性血小板减少性紫癜中发现,急性期患儿体内存在Th17/Treg失衡,导致失衡的原因与SOCS1和SOCS3表达不足有关。本研究结果显示HSP患儿外周血PBMC SOCS1 mRNA、SOCS3 mRNA表达均高于健康对照组,且与Th17/Treg比值均呈负相关。即Th17/Treg的比值越高,SOCS1、SOCS3 mRNA表达越低,我们推

测, HSP 患儿虽然 SOCS1、SOCS3 表达上调, 但尚不足以完全抑制 IL-6/STAT3 信号的过度活化, 进而导致 HSP 患儿 Th17/Treg 细胞失衡。提示 HSP 急性期患儿可能存在 SOCS1 和 SOCS3 表达的相对不足。

为探讨急性期 HSP SOCS1 和 SOCS3 相对表达不足的可能影响因素, 我们观察了 SOCS1 和 SOCS3 基因的表现遗传学改变, 结果显示, HSP 组患儿 SOCS1 基因外显子 2 和 SOCS3 基因 5'-UTR 区可能的 STAT 结合位点 CpG 岛基本处于低甲基化状态, 而健康对照组儿童 SOCS1 和 SOCS3 基因处于去甲基化状态, 我们推测, HSP 患儿 SOCS1 和 SOCS3 基因低甲基化可能导致其相对表达不足, 从而干扰 IL-6/STAT3 负反馈调节通路, 反过来抑制 Foxp3 表达, 降低 Treg 细胞分化, 进而导致 Th17/Treg 细胞失衡。DNA 甲基化是一种涉及多种甲基转移酶的酶促动力学过程, 导致 HSP 患儿急性期 SOCS1 和 SOCS3 基因甲基化修饰异常的分子调节机制尚待进一步研究。由于 IL-6/STAT3 信号通路作用机制复杂, 本研究未做相关干预实验, 故本实验结果仅为理论假设。

#### [参 考 文 献]

[1] 刘萍, 张秋业. 儿童过敏性紫癜急性期 Th17 细胞功能和 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞水平变化 [J]. 齐鲁医学杂志, 2012, 27(1): 31-33.  
[2] Kimura A, Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance[J]. Eur J Immunol, 2010, 40(7): 1830-1835.  
[3] Ozen S, Ruperto N, Dillon MJ, et al. EULAR/PReS endorsed consensus criteria for the classification of childhood vasculitides[J]. Ann Rheum Dis, 2006, 65(7): 936-941.

[4] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta CT) method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.  
[5] Trnka P. Henoch-Schönlein purpura in children[J]. J Paediatr Child Health, 2013, 49(12): 995-1003.  
[6] Egwuagu CE. STAT3 in CD4<sup>+</sup>T helper cell differentiation and inflammatory diseases[J]. Cytokine, 2009, 47(3): 149-156.  
[7] Nishihara M, Ogura H, Ueda N, et al. IL-6-gp130-STAT3 in T cells directs the development of IL-17<sup>+</sup> Th with a minimum effect on that of Treg in the steady state[J]. Int Immunol, 2007, 19(6): 695-702.  
[8] Lal G, Zhang N, Touw WVD, et al. Epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells by DNA methylation[J]. Immunol, 2009, 182(1): 259-273.  
[9] Tamiya T, Kashiwagi I, Takahashi R, et al. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins and JAK/STAT pathways: regulation of T-cell inflammation by SOCS1 and SOCS3[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(5): 980-985.  
[10] Takahashi R, Nishimoto S, Muto G, et al. SOCS1 is essential for regulatory T cell functions by preventing loss of Foxp3 expression as well as IFN- $\gamma$  and IL-17A production[J]. J Exp Med, 2011, 208(10): 2055-2067.  
[11] Yoshimura A, Suzuki M, Sakaguchi R, et al. SOCS, inflammation, and autoimmunity[J]. Front Immunol, 2012, 3: 20.  
[12] Malemud CJ. Negative regulators of JAK/STAT signaling in rheumatoid arthritis and osteoarthritis[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(3): E484.  
[13] Chikuma S, Kanamori M, Mise-Omata S, et al. Suppressors of cytokine signaling: potential immune checkpoint molecules for cancer immunotherapy[J]. Cancer Sci, 2017, 108(4): 574-580.  
[14] Zhang Y, Li X, Ciric B, et al. Therapeutic effect of baicalin on experimental autoimmune encephalomyelitis is mediated by SOCS3 regulatory pathway[J]. Sci Rep, 2015, 5: 17407.  
[15] 王国兵, 李成荣, 杨军, 等. IL-6/STAT3 信号活化在川崎病 Th17/T<sub>H</sub> 细胞失衡中的作用 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2011, 31(6): 517-522.

( 本文编辑: 万静 )