

论著·临床研究

# 急性特发性血小板减少性紫癜患儿外周血淋巴细胞 PPAR- $\gamma$ mRNA 表达变化及其与血浆 IL-13 的相关性

金呈强<sup>1</sup>, 刘仿<sup>1</sup>, 肖红<sup>2</sup>, 王文娟<sup>1</sup>, 陈群<sup>1</sup>, 郑碧英<sup>1</sup>, 李国明<sup>1</sup>

(1. 广东医学院微生物与免疫教研室, 广东 湛江 524023; 2. 广东医学院第一附属医院儿科, 广东 湛江 524000)

**[摘要]** 目的 PPAR- $\gamma$  与免疫细胞分化、凋亡、增殖和细胞因子分泌调控均密切相关, 该实验旨在研究急性特发性血小板减少性紫癜(ITP)患儿外周血淋巴细胞 PPAR- $\gamma$  mRNA 表达变化及其与血浆 IL-13 的相关性。方法 序贯收集 2007 年 9 月至 2008 年 7 月符合试验入选标准的急性 ITP 患儿 53 例, 同时收集相匹配的同期体检儿童 50 例作为对照。RT-PCR 法检测 ITP 患儿外周血淋巴细胞 PPAR- $\gamma$  mRNA 的表达, ELISA 法检测血浆中 IL-13 水平。结果 急性 ITP 患儿外周血淋巴细胞 PPAR- $\gamma$  mRNA 表达显著高于正常对照组[(0.78 ± 0.03) vs (0.52 ± 0.05),  $P < 0.05$ ]; 急性 ITP 患儿血浆中 IL-13 的含量显著高于正常对照组[(160.21 ± 34.26) pg/mL vs (121.42 ± 12.69) pg/mL,  $P < 0.05$ ]。急性 ITP 患儿血浆中的 IL-13 含量与外周血淋巴细胞 PPAR- $\gamma$  mRNA 表达变化呈正相关( $r = 0.89$ ,  $P < 0.05$ )。结论 急性 ITP 患儿外周血淋巴细胞 PPAR- $\gamma$  mRNA 表达上升, 并与 IL-13 水平呈正相关, PPAR- $\gamma$  与 IL-13 可能均参与了急性 ITP 的发病过程。 [中国当代儿科杂志, 2009, 11(5):367-370]

**[关键词]** 急性特发性血小板减少性紫癜; PPAR- $\gamma$ ; IL-13; 儿童

**[中图分类号]** R554+.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2009)05-0367-04

## Correlation of lymphoblastic PPAR- $\gamma$ mRNA expression with plasma IL-13 contents in children with acute idiopathic thrombocytopenic purpura

JIN Cheng-Qiang, LIU Fang, XIAO Hong, WANG Wen-Juan, CHEN Qun, ZHENG Bi-Ying, LI Guo-Ming. Department of Microbiology and Immunology, Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524023, China (Liu Fang, Email: liufang@gdmc.edu.cn)

**Abstract: Objective** PPAR- $\gamma$  is associated with the differentiation, apoptosis, proliferation and cytokine secretion of immunologic cells. This study investigated peripheral blood lymphoblastic PPAR- $\gamma$  mRNA expression and its correlation with plasma IL-13 contents in children with acute idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). **Methods** Fifty-three children with acute ITP who were in line with the standard test between September 2007 and July 2008 were enrolled. Fifty healthy children during the same period were used as the control group. PPAR- $\gamma$  mRNA expression in peripheral blood lymphocytes were detected by RT-PCR. Plasma IL-13 contents were detected using ELISA. **Results** PPAR- $\gamma$  mRNA expression in peripheral blood lymphocytes from acute ITP children were significantly higher than that in the control group (0.78 ± 0.03 vs 0.52 ± 0.05;  $P < 0.05$ ). Plasma IL-13 contents in children with acute ITP were also significantly higher than those in the control group (160.21 ± 34.26 pg/mL vs 121.42 ± 12.69 pg/mL;  $P < 0.05$ ). There was a positive correlation between plasma IL-13 level and lymphoblastic PPAR- $\gamma$  mRNA expression in children with ITP ( $r = 0.89$ ,  $P < 0.05$ ). **Conclusions** PPAR- $\gamma$  mRNA expression in peripheral blood lymphocytes increased and were positively correlated with plasma IL-13 contents in children with acute ITP, suggesting that PPAR- $\gamma$  and IL-13 might participate in the pathogenesis of acute ITP. [Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11(5):367-370]

**Key words:** Acute idiopathic thrombocytopenic purpura; PPAR- $\gamma$ ; IL-13; Child

过氧化物酶体增生物活化受体  $\gamma$  (peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$ , PPAR- $\gamma$ ) 属于核激素受体超家族的亚族, 为配体依赖性转录因子, 其在脂代谢、糖代谢和肿瘤细胞的分化和凋亡中起重要作用。近年发现, PPAR- $\gamma$  广泛表达于 T 细胞、B 细

胞、NK 细胞等免疫细胞, 参与机体的免疫调节。PPAR- $\gamma$  可通过参与调控 Th1/Th2 细胞分化而发挥免疫调节功能, 而 Th 细胞因子也可能影响 PPAR- $\gamma$  的表达, 有实验证明细胞 Th2 型细胞因子(如 IL-4) 可诱导 NK 细胞表达 PPAR- $\gamma$ 。本研究旨在观察急

[收稿日期] 2008-07-30; [修回日期] 2008-09-24

[基金项目] 广东省自然科学基金(No:06028959); 东莞市科技计划项目(No:20081081033)。

[作者简介] 金呈强, 男, 硕士研究生。主攻方向: 血液免疫学。

[通讯作者] 刘仿, 男, 教授, 广东医学院微生物与免疫学教研室, 邮编: 524023。

性特发性血小板减少性紫癜(ITP)患儿外周血淋巴细胞 PPAR- $\gamma$  mRNA 表达及与血浆 IL-13 水平的关系,探讨 IL-13 及 PPAR- $\gamma$  在急性 ITP 发病中的可能作用机制。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象及分组

53 例急性 ITP 患儿系广东医学院附属第一医院和附属湛江中心医院住院病人,男 25 例,女 28 例,年龄 2 个月至 8 岁,平均为  $5.2 \pm 1.8$  岁,均符合急性 ITP 诊断标准,为急性 ITP 组;正常对照组为 50 例健康体检儿童,男 26 例,女 24 例,年龄 3~9 岁,平均为  $5.4 \pm 2.4$  岁。

### 1.2 试剂和仪器

引物合成(上海生工生物工程技术有限公司),淋巴细胞分离液(中国医学科学院生物工程研究所),D-hanks 液(美国 SIGMA),Trizol 试剂(In-vitrogen 公司),异丙醇(上海西唐生物科技有限公司),氯仿(迪申生物技术上海有限公司),人 IL-13 ELISA 试剂盒(Biosource 公司),紫外可见分光光度计(型号:UV-2550,日本岛津),移液器(德国 Eppendorf),电泳系统(美国 BIO-RAD),PCR 仪(型号:Mastercycler 5333,德国 Eppendorf),电子天平(型号:XS225A,瑞士 Precisa),台式低速离心机(型号:5702,德国 Eppendorf),高速冷冻离心机(型号:CF16RX,日本日立),超高灵敏度全自动凝胶成像分析系统(型号:Infinity,法国 VL)。

### 1.3 方法

清晨空腹抽肘静脉血 2 mL,肝素抗凝,2 000 r/min,离心 10 min,血液分为三层。取上层血浆至 1.5 mL EP 管中,-70℃低温冰箱冻存,用作细胞因子 IL-13 的测定;取中间层白细胞,移至一新试管中,用作淋巴细胞总 RNA 的提取。

1.3.1 总 RNA 的提取和定量 按照 1:1 的体积比例,向装有白细胞的试管加入 D-hanks 液,混匀后 1 000 r/min,离心 5 min,取中间膜状物加入到装有 1 mL 的淋巴细胞分离液的 1.5 mL EP 管中,进行单个核细胞的提取,采用吸附柱过滤法分离淋巴细胞。经 PBS 液洗涤后加 1 mL Trizol,于旋涡振荡器上低速震匀,室温放置 5~10 min。加氯仿 0.2 mL,混匀,室温静置 3 min。4℃,12 000 r/min,离心 15 min。吸取上清液至新的 1.5 mL EP 管中,加 0.5 mL(等体积)异丙醇,4℃,12 000 r/min,离心 10 min。弃去上清液,加 DEPC 及新配制的 75% 乙

醇 1 mL 洗涤总 RNA,4℃,7 500 r/min,离心 5 min,弃去上清液,瞬时离心后用小吸管吸尽残留液体,置冰浴盒上,自然干燥,置 -70℃ 冰箱保存。

1.3.2 cDNA 的合成 逆转录反应体系为 20  $\mu$ L,包括 RNA 2  $\mu$ g, Olig(dT) 18 0.5  $\mu$ g, dNTPs 1.0 mmol/L, RNasin 40 U, M-MuLV 逆转录酶 200 U (TaKaRa 生物公司), 5  $\times$  RT 缓冲液 4  $\mu$ L。42℃ 孵育 60 min, 95℃ 灭活酶 5 min, 最后将逆转录产物用于 PCR 扩增。

PCR 扩增:根据 GenBank 序列设计引物:引物正义链(5'-3'): TGAGGAGAAGTCACACTCTG, 反义链(5'-3'): TGGGTCAGCTCTTGTGAATG, 产物长度 241 bp, 内参照:  $\beta$ -actin 引物正义链(5'-3'): AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC, 反义链(5'-3'): CCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT, 产物长度 219 bp。RT-PCR 反应体系:94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 62℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 循环 35 次, 最后 72℃ 延伸 7 min。取 5  $\mu$ L PCR 产物在含有溴化乙锭(EB)的 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳。

1.3.3 细胞因子 IL-13 的检测 取冻存于 -70℃ 低温冰箱的血浆, 严格按照说明书用 ELISA 法检测 IL-13 的含量。

### 1.4 统计学处理

全部数据均经 SAS 10.0 统计软件分析。数据用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 构成比采用  $\chi^2$  检验, 独立样本均数间的比较采用独立样本均数  $t$  检验, 双变量间的相关分析用二变量相关检验,  $P < 0.05$  表示差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 两组一般情况比较

两组研究对象的一般情况见表 1。急性 ITP 组血小板数量明显低于正常对照组 ( $P < 0.01$ )。两组在年龄、性别构成、体重指数、红细胞数量、白细胞数量、血红蛋白、心率、体温、呼吸频率方面差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ )。

### 2.2 急性 ITP 组与正常对照组 PPAR- $\gamma$ mRNA 表达水平及血浆 IL-13 含量比较

将 PCR 电泳凝胶图用 Eagle EyeII 型图像分析系统测量, 计算 PPAR- $\gamma$  mRNA 表达的相对值(图 1)。由表 2 显示, 急性 ITP 患儿 PPAR- $\gamma$  mRNA 表达水平明显高于正常对照组, 同样发现急性 ITP 患儿血浆 IL-13 水平明显高于正常对照组。

表1 急性ITP组和正常对照组一般资料比较

分组	例数	年龄 (岁)	男性 [例数(%)]	体重指数 (kg/m <sup>2</sup> )	红细胞 (×10 <sup>12</sup> /L)	血红蛋白 (g/L)	血小板 (×10 <sup>9</sup> /L)	白细胞 (×10 <sup>9</sup> /L)	心率 (次/min)	体温 (℃)	呼吸频率 (次/min)
正常对照组	50	5.39±2.35	26(52)	16.9±3.4	4.9±1.2	154±10	186.3±14.6	6.8±2.7	80±10	37.1±0.4	16±3
急性ITP组	53	5.15±1.78	25(47)	17.2±2.7	5.1±0.6	152±12	25.6±12.3 <sup>a</sup>	6.3±1.2	83±6	37.2±0.8	17±2

注:以上测量数据均是在抽血前常规检查项目内容。a:与正常对照组比较, $P < 0.01$ 。

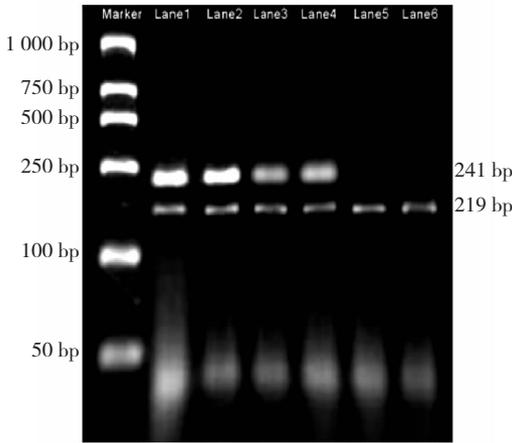


图1 PCR电泳凝胶图 Lane 1和Lane 2为急性ITP组, Lane 3、Lane 4为正常对照组, Lane 5、Lane 6为阴性对照组(未加PPAR- $\gamma$ 引物),241 bp处为PPAR- $\gamma$ ,219 bp处为 $\beta$ -actin。

表2 急性ITP组与正常对照组外周血PPAR- $\gamma$  mRNA表达及血浆IL-13水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	PPAR- $\gamma$ mRNA	IL-13 (pg/mL)
正常对照组	50	0.42±0.09	121.42±12.69
急性ITP组	53	0.78±0.14 <sup>a</sup>	160.21±34.26 <sup>a</sup>

a:与正常对照组比较, $P < 0.05$ 。

### 2.3 急性ITP患儿外周血淋巴细胞PPAR- $\gamma$ mRNA表达与血浆IL-13水平的相关性分析

将PPAR- $\gamma$  mRNA表达与血浆IL-13水平进行相关性分析,如图2所示,急性ITP组PPAR- $\gamma$  mRNA表达越高,血浆中IL-13的水平均越高,二者呈正相关( $r = 0.89, P < 0.05$ )。

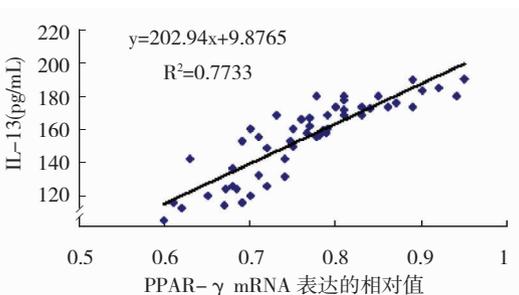


图2 外周血PPAR- $\gamma$  mRNA表达与血浆IL-13水平的相关趋势图

### 3 讨论

ITP是一种获得性自身免疫性疾病,在儿童群体中年发病率约为4~8/10万<sup>[1]</sup>,男女无明显差异,可发生于任何年龄,但以婴幼儿多见,大多数为急性,急性型半数以上患者于发病前3周内内有病毒感染病史,起病急,自发性皮肤与黏膜出血为主要症状,少数发展为慢性ITP<sup>[2]</sup>。近年来研究发现,细胞免疫在急性ITP的发病机制中扮演着极其重要的角色。急性ITP患者体内可检测到自身反应性CD4<sup>+</sup>T细胞,这些T细胞能辅助B细胞产生针对血小板表面糖蛋白的自身抗体<sup>[3]</sup>,自身反应性CD4<sup>+</sup>T细胞的异常激活是ITP发病机制的始动环节之一<sup>[4]</sup>。PPAR- $\gamma$ 参与固有性免疫应答的发生,树突细胞的分化成熟;抑制树突细胞摄取抗原后向引流淋巴结的迁移,影响抗原递呈过程;抑制炎症因子的释放及白细胞的聚集来控制炎症<sup>[5]</sup>。PPAR- $\gamma$ 在免疫内环境稳定中发挥重要作用,随着对PPAR- $\gamma$ 研究日益深入,发现其在自身免疫性疾病、炎症反应、超敏反应、移植免疫及先天性免疫中发挥重要的作用,例如PPAR- $\gamma$ 能够通过抑制NF- $\kappa$ B基因表达,增强识别自身抗原肽MHC T细胞无活性的能力,增强了对自身抗原的耐受,从而避免对机体的损伤<sup>[6,7]</sup>。T-bet、GATA-3是Th0向Th1, Th2分化重要的靶基因转录因子,PPAR- $\gamma$ 能够以下调T-bet或上调GATA-3表达,或增强GATA-3核定位,影响Th1, Th2类细胞因子如IFN- $\gamma$ , IL-4合成与分泌来调控Th细胞平衡<sup>[8]</sup>。在超急性排斥反应中,PPAR- $\gamma$ 能调控其靶基因COX-2,抑制花生四烯酸代谢产物PGE2和TXA2的合成,避免PGE2和TXA2对内皮组织损伤及诱导微血栓形成,从而抑制了超急性排斥反应的发生;对于急性排斥反应,实验证明给予PPAR- $\gamma$ 激动剂匹格列酮明显提高在急性排斥反应中的小鼠存活率<sup>[9]</sup>。

IL-13由B细胞、肥大细胞及活化的T细胞产生,在B细胞的增殖和分化、IgE的类别转换中起到重要作用。Coste等<sup>[10]</sup>发现,IL-13能够活化小鼠腹

膜巨噬细胞的 PPAR- $\gamma$ , 通过甘露糖受体表达途径, 促进白色念珠菌胃肠道中的吸收和杀灭。对有免疫力或免疫缺陷的小鼠腹腔注射 IL-13 后, 通过空腔感染酵母菌 8 d 后, 显示可以减少胃肠道中白色念珠菌的定居。组织因子(TF), 以前称为凝血酶原激酶, 是凝血级联反应的关键起始因子, 它结合因子 VIIa, 导致因子 IX 和 X 因子的激活, 并最终导致纤维蛋白的形成, 纤维酸衍生物是治疗血脂异常的一类药物, 而这些药物可以通过激活过氧化物酶体增殖物激活受体- $\alpha$ (PPAR- $\alpha$ ), 来减少单核细胞和巨噬细胞的 TF 表达。在单核细胞中, IL-13 也可以阻止 Th1 细胞诱导的 TF 的表达, 由于 PPAR- $\alpha$  和 PPAR- $\gamma$  具有相似的性质, PPAR- $\gamma$  和 IL-13 在阻止 TF 表达方面有一定的相似功能<sup>[11]</sup>。

最近的研究发现, 巨噬细胞中的 PPAR- $\gamma$  是血管粥样硬化病变中胆固醇自身稳定的重要调节因子, 在鼠类模型中, PPAR- $\gamma$  促效药能够减弱炎症反应及动脉粥样硬化的进展, IL-13 能够增加低密度脂蛋白的氧化作用, 阻止动脉内壁的脂肪沉积的作用, 同样可以减弱动脉粥样硬化的进展, 但两者之间的具体关系尚未阐明<sup>[12]</sup>。有研究发现, 在肠道样 Caco-2 细胞中, PPAR- $\gamma$  的配体曲格列酮能够显著增加白细胞介素-13 的产生<sup>[13]</sup>。但至今 PPAR- $\gamma$  与 IL-13 的关系在临床中的研究尚未见报道, 我们的研究发现, 在急性 ITP 患儿中外周血淋巴细胞 PPAR- $\gamma$  mRNA 表达与血浆 IL-13 水平呈正相关, PPAR- $\gamma$  与 IL-13 可能均参与了急性 ITP 的发病过程, 具体机制尚需要进一步的研究。

[参 考 文 献]

[1] Medeiros D, Buchanan GR. Current controversies in the management of idiopathic thrombocytopenic purpura during childhood[J]. *Pediatr Clin North Am*, 1996, 43(3):757-772.  
[2] 王运初, 胡立清, 张继生, 高春连. 小儿特发性血小板减少性紫

癜临床治疗体会[J]. *中国当代儿科杂志*, 2007, 9(5):486-488.  
[3] Cines DB, McMillan R. Management of adult idiopathic thrombocytopenic purpura[J]. *Annu Rev Med*, 2005, 56:425-442.  
[4] McMillan R. Classical management of refractory adult immune (idiopathic) thrombocytopenic purpura[J]. *Blood Rev*, 2002, 16(1): 51-55.  
[5] Zhang X, Rodriguez-Galan MC, Subleski JJ. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and its ligands attenuate biologic functions of human natural killer cells[J]. *Blood*, 2004, (10): 3276-84.  
[6] Kanoh M, Uetani T, Sakan H. A two-step model of T cell subset commitment; antigen-independent commitment of T cells before encountering nominal antigen during pathogenic infections[J]. *Int Immunol*, 2002, 14(6):567-575.  
[7] Iruretagoyena MI, Sepúlveda SE, Lezana JP, Hermoso M, Bronfman M, Gutierrez MA, et al. Inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B enhances the capacity of immature dendritic cells to induce antigen-specific tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *JPET*, 2006, 318(1):59-67.  
[8] Inoue K, Takano H, Yanagisawa R. Effects of 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 on nuclear localization of GATA-3 in the murine lung in the presence of lipopolysaccharide[J]. *Arzneimittelforschung*, 2005, 55(3):167-171.  
[9] Kosuge H, Haraguchi G, Koga N. Pioglitazone prevents acute and chronic cardiac allograft rejection[J]. *Circulation*, 2006, 113(22):2613-2622.  
[10] Coste A, Lagane C, Filipe C, Authier H, Galès A, Bernad J, et al. IL-13 attenuates gastrointestinal candidiasis in normal and immunodeficient RAG-2<sup>-/-</sup> mice via peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  activation[J]. *J Immunol*, 2008, 180(7):4939-4947.  
[11] Steffel J, Lüscher TF, Tanner FC. Tissue factor in cardiovascular diseases molecular mechanisms and clinical implications[J]. *Circulation*, 2006, 113(5):722-731.  
[12] Waldo SW, Li Y, Buono C, Zhao B, Billings EM, Chang J, et al. Heterogeneity of human macrophages in culture and in atherosclerotic plaques[J]. *Am J Pathol*, 2008, 172(4):1112-1116.  
[13] Marion-Letellier R, Butler M, Déchelotte P, Playford RJ, Ghosh S. Comparison of cytokine modulation by natural peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  ligands with synthetic ligands in intestinal-like Caco-2 cells and human dendritic cells-potential for dietary modulation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in intestinal inflammation[J]. *Am J Clin Nutr*, 2008, 87(4):939-948.

(本文编辑: 吉耕中)