

论著·临床研究

糖皮质激素受体表达与特发性血小板减少性紫癜激素抵抗关系

王纓, 麦惠容, 林琳, 袁秀丽, 石红松, 刘四喜, 李长钢

(深圳市儿童医院, 广东 深圳 518026)

[摘要] 目的 通过研究原发性糖皮质激素抵抗型特发性血小板减少性紫癜(ITP)患儿糖皮质激素受体(GR)亚型GR α 和GR β 表达水平,以揭示ITP糖皮质激素抵抗的可能机制。方法 应用实时荧光定量-PCR法检测18例糖皮质激素敏感型、12例糖皮质激素抵抗型ITP患儿及10例正常儿童外周血单个核细胞GR α 和GR β mRNA的表达水平,同时采用酶免疫分析法测定血清总皮质醇水平。结果 ①对照组、糖皮质激素敏感组和抵抗组3组之间GR α mRNA的表达水平差异无显著性;对照组和糖皮质激素敏感组的GR β mRNA水平差异无显著性,但糖皮质激素抵抗组的GR β mRNA水平显著高于对照组和糖皮质激素敏感组,差异有显著性($P < 0.01$)。②总皮质醇水平在对照组与糖皮质激素敏感组之间差异无显著性,但糖皮质激素抵抗组总皮质醇水平明显高于糖皮质激素敏感组,差异有显著性($P < 0.01$)。结论 ITP患儿糖皮质激素抵抗可能与GR β mRNA的表达增高有关。

[中国当代儿科杂志, 2009, 11(9): 714-716]

[关键词] 特发性血小板减少性紫癜;糖皮质激素受体;激素抵抗;儿童

[中图分类号] R554+.6 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2009)09-0714-03

Relationship between glucocorticoid receptors and glucocorticoid resistance in children with idiopathic thrombocytopenia purpura

WANG Ying, MAI Hui-Rong, LIN Lin, YUAN Xiu-Li, SHI Hong-Song, LIU Si-Xi, LI Chang-Gang. Department of Hematology, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518020, China (Email: ljlwyn@hotmail.com)

Abstract: Objective To identify the relationship between the expression of α and β -isoforms of glucocorticoid receptors (GR) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and glucocorticoid resistance in children with idiopathic thrombocytopenia purpura (ITP). **Methods** Real-time PCR was used to detect the expression of GR α and GR β mRNA in PBMC from 30 children with ITP (glucocorticoid-sensitive, $n = 18$; glucocorticoid-resistant, $n = 12$) and 10 healthy children (control group). Enzyme immunoassay was used to measure plasma levels of total glucocorticoids. **Results** There were no significant differences in PBMC GR α mRNA levels among the glucocorticoid-sensitive, the glucocorticoid-resistant and the control groups. Compared with the glucocorticoid-sensitive and the control groups, the expression of GR β mRNA in the glucocorticoid-resistant group was significantly up-regulated ($P < 0.01$). Plasma total glucocorticoids level in the glucocorticoid-resistant group was found to be much higher than that in the glucocorticoid-sensitive and the control groups ($P < 0.01$). **Conclusions** The up-regulated expression of GR β mRNA may associated with glucocorticoid resistance in children with ITP. [Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11(9): 714-716]

Key words: Idiopathic thrombocytopenia purpura; Glucocorticoid receptor; Glucocorticoid resistance; Child

特发性血小板减少性紫癜(idiopathic thrombocytopenic purpura, ITP)的发病机制目前认为主要与自身免疫有关。糖皮质激素(glucocorticoid, GC)是治疗ITP的主要药物,其疗效通过GC与糖皮质激素受体(GR)结合来完成。对于激素敏感型ITP病例在接受GC治疗后,病情常能够得到及时和有效的控制,而激素抵抗型病例的发病机制和治疗仍是临床上的疑点、难点。为了从分子生物学水平揭示

ITP患儿GR mRNA表达与GC抵抗的关系,本研究以ITP患儿为对象,应用实时荧光定量PCR检测技术检测激素抵抗型和敏感型ITP患儿外周血单个核细胞(PBMC)GR亚型(α 和 β)mRNA表达水平的变化,试图探讨ITP患儿激素抵抗的分子生物学机制,为进一步深入探讨ITP GC抵抗的发病机制和更好的治疗方法提供理论根据。

[收稿日期] 2009-01-01; [修回日期] 2009-02-17

[作者简介] 王纓,女,硕士,副主任医师。主攻方向:儿童血液疾病。

1 材料与方法

1.1 研究对象

符合ITP诊断标准的病例30例,为2005年1月至2006年12月在我院血液内科住院患儿,经骨髓细胞学检查明确诊断,排除其他自身免疫性疾病,年龄7个月~11岁,平均年龄 5.1 ± 3.0 岁;男性19例,女性11例。ITP患儿分别按临床疗效分为两组:①激素敏感组:完整GC治疗6周后(泼尼松 2 mg/kg ,疗效稳定后逐渐减量), $\text{PLT} > 50 \times 10^9/\text{L}$,共18例;②激素抵抗组:完整GC治疗6周后, $\text{PLT} < 50 \times 10^9/\text{L}$,共12例。ITP患儿均为初入院患者,既往未使用激素类药物。另设对照组,为门诊同期健康体检儿童,共10例。受试者家属对实验均已知情,并经医院学术伦理委员会讨论通过。对照组在静脉采血前半个月内均未患感染性疾病,无服用GC或其他免疫抑制剂病史。所有受试儿童均于早晨(7:00~8:00)空腹抽取静脉血,立即送检。

1.2 方法

1.2.1 分离PBMC 无菌抽取乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA)抗凝静脉血10 mL,500 r/min离心3 min,分离上层血浆;采用Ficoll($P = 1.077$)-密度梯度离心法分离PBMC,锥虫蓝染色判定细胞活力 $> 95\%$,备用。

1.2.2 检测外周血血清总皮质醇浓度 按总皮质醇测定试剂盒(DSL-10-2000,英国DSL公司)说明,采用酶免疫分析法测定外周血血清中总皮质醇浓度,于Anthos 2010酶标仪检测相应OD值,结果按标准曲线计算最终血清总皮质醇浓度(以nmol/L表示)。

1.2.3 实时荧光定量PCR 采用SYBGreen试剂盒(QIAGEN,204143),使用罗氏LightCycler荧光定量PCR仪检测,应用Relative Quantification Software Ver1.0软件进行分析,结果以待测基因/ β -actin的比值表示。具体操作参照试剂说明书。

1.3 统计学分析

检测结果计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用SPSS 13.0统计软件,多组间采用单因素方差检验,两组间用 t 检验,计数资料用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 3组病例一般资料比较

比较对照组、激素敏感组和抵抗组3组病例的发病年龄、性别及入院时PLT的差异,经统计

学分析,差异无显著性(均 $P > 0.05$),具有可比性(表1)。

表1 激素敏感组和抵抗组儿童一般资料比较

	例数	年龄 (岁)	性别		入院时 PLT ($\times 10^9/\text{L}$)
			男	女	
对照组	10	5.26 ± 3.3	5	5	204 ± 76.5
激素敏感组	18	5.46 ± 2.9	12	6	16.9 ± 18.4
激素抵抗组	12	4.5 ± 3.2	7	5	11.1 ± 6.3

2.2 3组总皮质醇水平比较

对照组、激素敏感组和激素抵抗组外周血清中总皮质醇浓度见表2。经单因素方差分析, $F = 6.722, P < 0.01$,3组间差异有显著性。激素抵抗组总皮质醇激素水平明显高于对照组和激素敏感组, P 分别为 < 0.01 和 < 0.05 ,差异有显著性。

表2 3组的血清总皮质醇激素水平比较

组别	例数	总皮质醇激素 (nmol/L)
对照组	10	10.3 ± 1.4
激素敏感组	18	11.8 ± 1.8
激素抵抗组	12	$14.9 \pm 1.4^{a,b}$

a:与对照组比较, $P < 0.01$; b:与激素敏感组比较, $P < 0.05$

2.3 GR α 和GR β mRNA定量分析

对照组、激素敏感组和激素抵抗组3组之间GR α mRNA的表达水平,3组间差异无显著性, $P > 0.05$ 。对照组、激素敏感组和激素抵抗组3组之间GR β mRNA的表达水平,3组间差异有显著性, $P < 0.01$ 。进一步多重两两比较,对照组和激素敏感组之间GR β mRNA水平差异无显著性, $P > 0.05$;激素抵抗组与激素敏感组和对照组之间GR β mRNA水平比较,差异具有显著性,均 $P < 0.01$ 。见表3。

表3 3组GR α 和GR β mRNA表达水平结果

分组	GR α	GR β
对照组	$(9.55 \pm 2.30) \times 10^{-2}$	$(2.35 \pm 0.37) \times 10^{-4}$
激素敏感组	$(8.71 \pm 2.15) \times 10^{-2}$	$(2.45 \pm 0.43) \times 10^{-4}$
激素抵抗组	$(9.02 \pm 2.43) \times 10^{-2}$	$(4.76 \pm 1.32) \times 10^{-3a}$

a:与对照组和激素敏感组比较, $P < 0.01$

3 讨论

ITP的病因与自身免疫紊乱有关,故临床上首选用GC治疗,其有效率为60%~80%,但另有20%~40%的患者表现为GC抵抗。迄今为止,部

分 ITP 患儿的激素抵抗机制尚未完全清楚。GC 在体内需与 GR 结合才能发挥作用,GR 有 α 、 β 两种亚型,GR α 位于细胞质,具有与激素结合的能力,结合后迅速转位进入细胞核,作为转录因子直接或间接调控靶基因的转录,从而发挥其抗炎、抗免疫等生物学效应;而 GR β 位于细胞核,缺乏完整的激素结合点,故一直被认为无功能的 GR 亚型^[1]。但近年研究发现,GR β 具有拮抗效应的潜能,是一种内源性激素效应的拮抗因子^[2],这一发现为研究 ITP 患儿 GC 抵抗的发生机制提供了一个切入点。

本研究应用 RT-PCR 定量检测 GR α 和 GR β mRNA 表达结果发现,激素敏感组、激素抵抗组患儿及对照组 PMBC 中均有 GR α 和 GR β mRNA 表达,且各组间 GR α mRNA 表达水平差异无显著性,但激素抵抗组 GR β mRNA 表达水平较激素敏感组及对照组均高,其差异有显著性,提示 GR β mRNA 高表达可能与 ITP 患儿激素抵抗有密切关系。近年朱琦等^[3]同时检测了 40 例成人 ITP 患者和正常对照组 PBMC 中 GR α mRNA 和 GR β mRNA 的表达情况,结果提示 PBMC 中 GR β 可能是决定 ITP 患者 GC 敏感性重要因素之一,与本研究结果基本一致。我们推测,在正常机体和激素敏感型 ITP 患儿中,由于 GR β mRNA 表达水平正常,对 GC 与 GR 的正常结合与生理功能均没有影响,而一旦有某种病态因素诱导了 GR β mRNA 表达增加,通过竞争性结合 GC 反应元件,从而占据更多的 GR α 位点,抑制 GC 诱导的 GR α 核转位,干扰 GC 生物学效应的产生,最终导致 ITP 患者的激素抵抗。至于 GR β mRNA 水平在激素抵抗型 ITP 患者中表达增加的具体机制尚不明确。赵艳红等^[4]在成年 ITP 患者肿瘤坏死因子(TNF) 2α 与 GC 抵抗关系的研究中发现 ITP 激素抵抗组患者血浆中 TNF 2α 含量显著高于对照和 ITP 激素敏感组,并通过 TNF 2α 体外刺激培养 PBMC 实验证实:TNF 2α 有促进 GR β mRNA 及其蛋白表达的

作用。

本研究结果显示,激素抵抗型 ITP 患儿的血清总皮质醇水平显著高于激素敏感型和正常机体,这一特点可能和抵抗型 ITP 患儿 GR 位点减少有关。既往已有研究发现难治性 ITP 患者 GR 位点是减少的,于是机体代偿性通过下丘脑-垂体-肾上腺轴反应,促使 GC 过量释放,造成激素抵抗型 ITP 患儿的血清总皮质醇水平较高^[5,6]。另外抵抗型 ITP 患儿的 GR 降解加快,半衰期缩短,GR 的亲合力(Kd)下降,也可以导致 GC 结合代谢障碍,减少了 GC 的清除。

对于 ITP 患儿的治疗,临床医师希望能尽早鉴定患儿对 GC 是否敏感,敏感类型患者可坚持使用 GC;反之,激素抵抗患者,应尽早使用大剂量 IVIG 或合并使用其他类型免疫抑制剂,将 GC 的副作用减至最低,提高 ITP 免疫治疗的临床效果。

[参 考 文 献]

- [1] Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, et al. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA [J]. *Nature*, 1985, 318 (6047): 635-641.
- [2] Bamberger CM, Bamberger AM, de Castro M, Chrousos GP. Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans [J]. *J Clin Invest*, 1995, 95 (6): 2435-2441.
- [3] 朱琦,程毅敏,叶为德,胡钧培. 特发性血小板减少性紫癜患者激素敏感性与糖皮质激素受体亚型的关系研究[J]. *血栓与止血学*, 2007, 12(4): 166-168.
- [4] 赵艳红,周晋,张凤民,宋武琦. TNF 2α 与特发性血小板减少性紫癜患者激素抵抗的相关性研究[J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2008, 42(4): 381-384.
- [5] 李晓辉,罗春华,廖清奎. 特发性血小板减少性紫癜糖皮质激素受体研究[J]. *中华儿科杂志*, 1994, 32(3): 171-172.
- [6] 聂咏梅,许多荣,洪文德,罗绍凯. 特发性血小板减少性紫癜患者糖皮质激素及其受体改变的临床意义——附 43 例分析[J]. *新医学*, 2000, 31(4): 206-207.

(本文编辑:吉耕中)