

论著·临床研究

## 血小板表面 TLR2 和 TLR4 在儿童特发性 血小板减少性紫癜中的变化及意义

王春美, 盛光耀, 邹湘, 白松婷, 王璐

(郑州大学第一附属医院 儿科, 河南 郑州 450052)

**[摘要]** 目的 探讨血小板表面 Toll 样受体 TLR2 和 TLR4、淋巴细胞表面 CD86 和血清中 IL-2、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10 表达的变化及相关性在儿童特发性血小板减少性紫癜 (ITP) 发病中的意义。方法 流式细胞学技术检测 24 例急性特发性血小板减少性紫癜 (AITP) 患儿、21 例慢性特发性血小板减少性紫癜 (CITP) 患儿和 20 例对照组儿童血小板表面 TLR2 和 TLR4、CD86 的表达水平; ABC-ELISA 法检测血清中 IL-2、IL-4、IL-10 和 IFN- $\gamma$  的浓度。结果 ① AITP 组、CITP 组患儿 CD41<sup>+</sup>TLR2<sup>+</sup> 和 CD61<sup>+</sup>TLR4<sup>+</sup> 表达显著低于对照组 ( $P < 0.01$ ); 且 AITP 组显著低于 CITP 组 ( $P < 0.01$ ); ② AITP 组和 CITP 组 CD86<sup>+</sup> 表达较对照组显著增高 ( $P < 0.01$ ), AITP 组和 CITP 组间差异无显著性; ③ AITP 组和 CITP 组血清 IL-2、IL-4、IL-10 及 IFN- $\gamma$  浓度均较对照组显著增高 ( $P < 0.05$ ), AITP 组和 CITP 组间差异无显著性。④ 相关性分析: CD41<sup>+</sup>TLR2<sup>+</sup> 表达与 CD61<sup>+</sup>TLR4<sup>+</sup> 表达呈正相关, 二者均与 CD86<sup>+</sup> 表达及血清 IL-2、IL-4、IL-10 浓度呈负相关, 与血清 IFN- $\gamma$  浓度无相关性。结论 联合检测血小板表面 TLR2 和 TLR4、淋巴细胞表面 CD86 的表达和血清中 IL-2、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10 含量的变化及相关性对于研究儿童 ITP 的发病机制以及早期分型具有重要参考价值。

[中国当代儿科杂志, 2009, 11(10): 797-801]

**[关键词]** 特发性血小板减少性紫癜; Toll 样受体; CD86; 细胞因子; 儿童

**[中图分类号]** R558+.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2009)10-0797-05

### Levels of Toll-like receptors-2, -4 on platelets in children with idiopathic thrombocytopenic purpura

WANG Chun-Mei, SHENG Guang-Yao, ZOU Xiang, BAI Song-Ting, WANG Lu. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Sheng G-Y, Email: shenggy666@yahoo.com.cn)

**Abstract: Objective** To study the changes and significance of Toll-like receptor-2 (TLR2) and Toll-like receptor-4 (TLR4) on platelets, CD86 on lymphocytes and concentrations of IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4 and IL-10 in serum in children with idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). **Methods** Peripheral blood samples were collected from 24 children with acute idiopathic thrombocytopenic purpura (AITP), 21 children with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (CITP) and 20 normal children (control group). Expression of TLR2 and TLR4 on platelets and CD86 on lymphocytes were detected by flow cytometry. Serum concentrations of IL-2, IL-4, IL-10 and IFN- $\gamma$  were measured using ABC-ELISA. **Results** The expression of CD41<sup>+</sup>TLR2<sup>+</sup> and CD61<sup>+</sup>TLR4<sup>+</sup> in the AITP and the CITP groups were significantly lower than those in the control group ( $P < 0.01$ ). The AITP group had lower expression of CD41<sup>+</sup>TLR2<sup>+</sup> and CD61<sup>+</sup>TLR4<sup>+</sup> than the CITP group ( $P < 0.01$ ). The expression of CD86<sup>+</sup> in the AITP and the CITP groups was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.01$ ). The serum concentrations of IL-2, IL-4, IL-10 and IFN- $\gamma$  in the AITP and the CITP groups were significantly higher than those in the control group ( $P < 0.05$ ). There was a positive correlation between CD41<sup>+</sup>TLR2<sup>+</sup> and CD61<sup>+</sup>TLR4<sup>+</sup> expression. CD41<sup>+</sup>TLR2<sup>+</sup> and CD61<sup>+</sup>TLR4<sup>+</sup> expression were negatively correlated with CD86<sup>+</sup> expression and serum concentrations of IL-2, IL-4 and IL-10. **Conclusions** The detections of TLR2 and TLR4 on platelets, CD86 on lymphocytes and serum concentrations of IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4 and IL-10 are of great value in understanding the pathogenesis and predicting types of ITP in children.

[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11(10): 797-801]

**Key words:** Idiopathic thrombocytopenic purpura; Toll-like receptor; CD86; Cytokine; Child

特发性血小板减少性紫癜 (idiopathic thrombocytopenic purpura, ITP) 是儿童最常见的一种出血性

疾病, 临床上根据其病程是否超过 6 个月将其分为急性型 (AITP) 和慢性型 (CITP) 两型<sup>[1]</sup>, 目前越来越

[收稿日期] 2009-01-03; [修回日期] 2009-02-27

[作者简介] 王春美, 女, 博士研究生。主攻方向: 小儿血液病与肿瘤疾病。

[通讯作者] 盛光耀, 男, 教授, 主任医师, 郑州大学第一附属医院儿科, 邮编: 450052。

越多的研究证实,AITP和CITP可能一开始就是两种不同的病理生理过程。其发病机制尚未完全明确,既往研究多数着重于获得性免疫方面,而机体的免疫反应分为天然免疫和获得性免疫,天然免疫在ITP发病过程中的作用尚未见报道。Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs)是新近发现的天然免疫受体,它们可以通过广泛地特异性地识别病原微生物,偶联信号传导途径,并激活天然免疫细胞,最终导致一系列的免疫炎症反应。TLRs不仅能激活天然免疫,而且也能为激活获得性免疫提供共刺激信号,是偶联天然免疫和获得性免疫的桥梁。现已证实,活化的TLRs不仅能增强T细胞共刺激分子CD86的表达,而且还能诱导初始CD4<sup>+</sup>T细胞向Th1或Th2转化。目前已有关于人类血小板表面有TLRs的表达的报道,主要是TLR2,TLR4和TLR9。其中TLR9在外界环境中的表达不稳定,TLR2和TLR4的表达较稳定。本研究旨在探讨血小板表面天然免疫分子TLR2和TLR4、淋巴细胞表面CD86的表达和血清中IL-2,IL-4,IL-10,IFN- $\gamma$ 含量的变化及其相关性在儿童ITP发病机制、早期分型及治疗中的作用。

## 1 资料和方法

### 1.1 一般资料

郑州大学第一附属医院2007年5月至2008年3月儿科门诊及病房初诊的ITP患儿45例,诊断均符合1999年中华医学会儿科分会修订的ITP诊断标准<sup>[2]</sup>。其中急性病例24例,慢性病例21例,年龄1~14岁,平均年龄6.8岁。对照组20例,年龄3~12岁,平均年龄6.5岁,为同期的健康体检儿童,经监护人同意并签署知情同意书。

### 1.2 试剂与方法

1.2.1 试剂和仪器 FITC标记的小鼠抗人TLR2单克隆抗体,PE标记的小鼠抗人TLR4单克隆抗体及阴性对照小鼠IgG2a-FITC和IgG2a-PE,购自美国eBioscience公司,PE标记的小鼠抗人CD41单克隆抗体和FITC标记的小鼠抗人CD61单克隆抗体购自美国Becton-Dickinson公司;FITC标记的小鼠抗人CD86单克隆抗体为美国Caltag Laboratories公司产品。流式细胞仪(EPILS-XL)为美国Beckmen-Coulter公司产品。人IL-2定量酶联免疫检测试剂盒、人IL-4定量酶联免疫检测试剂盒、人IL-10定量酶联免疫检测试剂盒、人IFN- $\gamma$ 定量酶联免疫检测试剂盒由上海森雄科技实业有限公司提

供。酶标仪(BIO-RAD680)为美国BIORAD公司产品。

1.2.2 方法 ①CD41<sup>+</sup>TLR2<sup>+</sup>、CD61<sup>+</sup>TLR4<sup>+</sup>表达率的测定:外周静脉血2 mL加入改良PBS液中,700 r/min,离心10 min,吸取富含血小板的血浆置于另一离心管中备用。用PBS液重悬离心后的血小板,充分混匀,分别吸取100  $\mu$ L悬液于3个无菌干燥试管中,第1管分别加入10  $\mu$ L FITC-IgG2a和PE-IgG2a,第2管分别加入10  $\mu$ L PE-CD41和FITC-TLR2,第3管分别加入10  $\mu$ L FITC-CD61和PE-TLR4,4 $^{\circ}$ C避光反应25 min。再用PBS液洗涤,重悬于500  $\mu$ L PBS中,用流式细胞仪CELLQVGSST软件检测CD41<sup>+</sup>TLR2<sup>+</sup>和CD61<sup>+</sup>TLR4<sup>+</sup>的表达率。②淋巴细胞表面CD86<sup>+</sup>细胞表达率的测定:EDTA试管取外周静脉血1 mL,另外取两个无菌干燥试管,第1个试管为空白对照,第2个试管加入10  $\mu$ L FITC-CD86,于上述两个试管中加入抗凝全血100  $\mu$ L,混匀,避光反应25 min,于上述两个试管中再复加溶血素1 mL,混匀,避光15 min,后1 000 r/min离心5 min,弃上清液,重悬于500  $\mu$ L PBS中,用流式细胞仪CELLQVGSST软件检测淋巴细胞表面CD86<sup>+</sup>细胞的表达率。③血清IL-2、IL-4、IL-10、IFN- $\gamma$ 浓度的测定:无菌抽取外周静脉血2 mL加入普通干燥试管中,于留取标本后30 min内,2 500 r/min离心15 min,用移液器将上清液移入1 mL的Ep管中,-20 $^{\circ}$ C冰箱中冻存待用。遵试剂盒说明书要求,分别用双抗夹心酶联免疫吸附法(ABC-ELISA)检测标本中IL-2,IL-4,IL-10和IFN- $\gamma$ 的浓度。

### 1.3 统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件进行分析,数据以均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。数据进行正态检验和方差齐性检验后,采用单因素方差分析,相关分析采用Pearson分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果

### 2.1 血小板表面TLR2<sup>+</sup>和TLR4<sup>+</sup>表达率及淋巴细胞表面CD86<sup>+</sup>表达率

AITP组和CITP组CD41<sup>+</sup>TLR2<sup>+</sup>及CD61<sup>+</sup>TLR4<sup>+</sup>表达率显著低于对照组( $P < 0.01$ ),且AITP组显著低于CITP组( $P < 0.01$ );AITP组和CITP组CD86<sup>+</sup>表达率较对照组显著升高( $P < 0.01$ ),AITP组和CITP组间差异无显著性,见表1。

### 2.2 血清IL-2,IL-4,IL-10和IFN- $\gamma$ 浓度

AITP组和CITP组血清IL-2,IL-4,IL-10和IFN- $\gamma$

浓度均较对照组显著增高 ( $P < 0.05$ ), AITP 组和 CITP 组间差异无显著性 ( $P > 0.05$ ), 见表 2。

表 1 各组 CD41<sup>+</sup>TLR2<sup>+</sup>, CD61<sup>+</sup>TLR4<sup>+</sup> 和 CD86<sup>+</sup> 表达率的比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	例数	CD41 <sup>+</sup> TLR2 <sup>+</sup>	CD61 <sup>+</sup> TLR4 <sup>+</sup>	CD86 <sup>+</sup>
对照组	20	11.2 ± 3.1	47.1 ± 10.6	4.2 ± 1.9
AITP 组	24	2.6 ± 1.6 <sup>a,b</sup>	15.1 ± 7.3 <sup>a,b</sup>	11.7 ± 3.6 <sup>a</sup>
CITP 组	21	5.4 ± 1.7 <sup>a</sup>	31.6 ± 13.6 <sup>a</sup>	11.2 ± 3.2 <sup>a</sup>
F 值		71.273	42.154	40.085
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

a: 与对照组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与 CITP 比较,  $P < 0.05$

表 2 各组血清 IL-2, IL-4, IL-10 和 IFN- $\gamma$  浓度的比较 ( $\bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$ )

组别	例数	IL-2	IL-4	IL-10	IFN- $\gamma$
对照组	20	212.5 ± 26.9	101.7 ± 17.3	16.4 ± 3.2	1 036.8 ± 46.8
AITP 组	24	313.9 ± 16.1 <sup>a</sup>	200.4 ± 13.8 <sup>a</sup>	23.9 ± 15.4 <sup>a</sup>	1 515.8 ± 35.3 <sup>a</sup>
CITP 组	21	311.4 ± 11.4 <sup>a</sup>	199.7 ± 11.9 <sup>a</sup>	22.9 ± 4.4 <sup>a</sup>	1 499.2 ± 24.2 <sup>a</sup>
F 值		193.573	323.603	3.974	1 176.566
P 值		<0.01	<0.01	<0.05	<0.01

a: 与对照组比较,  $P < 0.05$

### 2.3 相关性分析

CD41<sup>+</sup>TLR2<sup>+</sup> 表达率与 CD61<sup>+</sup>TLR4<sup>+</sup> 表达率呈正相关 ( $r = 0.64, P < 0.01$ ), CD41<sup>+</sup>TLR2<sup>+</sup> 表达率与淋巴细胞表面 CD86<sup>+</sup> 细胞表达率呈负相关 ( $r = -0.59, P < 0.01$ ), 与血清 IL-2 浓度呈负相关 ( $r = -0.735, P < 0.01$ ), 与血清 IL-4 浓度呈负相关 ( $r = -0.761, P < 0.01$ ), 与血清 IL-10 浓度呈负相关 ( $r = -0.336, P < 0.01$ ), 与血清 IFN- $\gamma$  浓度无相关性 ( $r = -0.191, P > 0.05$ ); CD61<sup>+</sup>TLR4<sup>+</sup> 表达率与淋巴细胞表面 CD86<sup>+</sup> 细胞表达率呈负相关 ( $r = -0.361, P < 0.01$ ), 与血清 IL-2 浓度呈负相关 ( $r = -0.624, P < 0.01$ ), 与血清 IL-4 浓度呈负相关 ( $r = -0.587, P < 0.01$ ), 与血清 IL-10 浓度呈负相关 ( $r = -0.277, P < 0.05$ ), 与血清 IFN- $\gamma$  浓度无相关性 ( $r = -0.079, P > 0.05$ )。

### 3 讨论

TLRs 是新近发现的一种天然免疫受体分子, 是一个广泛存在于昆虫、脊椎动物和植物中序列高度保守而古老的家族。它通过识别并结合病原相关的分子模式 (pathogen associated molecular patterns, PAMP), 激活信号传导途径, 诱导某些免疫效应分子的表达。因其胞外段与果蝇 Toll 蛋白同源而得名。目前已发现 TLRs 家族中有 TLR1 ~ 13<sup>[3]</sup>。

ITP 是儿童时期常见的出血性疾病, 其一系列临床症状最终是由血小板减少引起。血小板是从骨髓成熟巨核细胞胞浆裂解脱落下来的有生物活性的小块胞质, 主要生理功能是止血, 它亦在天然免疫<sup>[4]</sup>、获得性免疫<sup>[5]</sup> 和炎症反应<sup>[6]</sup> 中起重要作用。Cognasse 等<sup>[7]</sup> 证实了人类血小板表面有 TLRs 的表达, 主要是 TLR2, TLR4 和 TLR9。其中 TLR9 易受外界环境影响而被激活, TLR2 和 TLR4 的表达较稳定。本研究显示自 AITP 组至 CITP 组及正常对照组 CD41<sup>+</sup>TLR2<sup>+</sup> 和 CD61<sup>+</sup>TLR4<sup>+</sup> 的表达率逐渐升高, 提示 ITP 患儿存在不同程度的天然免疫缺陷, 可能是其易受病原体的攻击, 引起继发的细胞免疫和体液免疫失调, 最终导致血小板减少, 引起一系列临床症状的最根本原因。本研究亦显示 AITP 组患儿 CD41<sup>+</sup>TLR2<sup>+</sup> 和 CD61<sup>+</sup>TLR4<sup>+</sup> 的表达率较 CITP 组明显下降, 可能与大多数 AITP 患儿有前驱的病毒感染或者疫苗接种史有关<sup>[8]</sup>。因其血小板表面 TLR2 和 TLR4 的表达下降, 两者单独或者联合清除病毒感染的能力明显下降, 导致一过性急性病程; CITP 患儿可能由于某些未知因素的影响, 持续存在天然免疫缺陷, 使其血小板较长时间处于低水平, 随着免疫干预和机体自身调节能力的恢复, 大部分患儿痊愈, 少部分患儿转变为难治性 ITP。也可能是 Aslam 等<sup>[9]</sup> 提出的由 TLR4 循 LPS 途径诱导的血小板减少, 具体机制有待于进一步研究。CD41<sup>+</sup>TLR2<sup>+</sup> 和 CD61<sup>+</sup>TLR4<sup>+</sup> 的表达率的高度相关性提示两者可能存在某些共同的调控机制。目前尚无明确指标可以早期预测 ITP 的病程, 只能根据初诊病人的临床病程来决定。本研究随访发现, 可以根据初诊时 CD41<sup>+</sup>TLR2<sup>+</sup> 和 CD61<sup>+</sup>TLR4<sup>+</sup> 的表达率来预测 ITP 的病程。既往研究显示 TLRs 被相应的 PAMP 激活, 除了刺激天然免疫细胞分泌大量的细胞因子、趋化性细胞因子诱导炎症反应外, 还能直接增强天然免疫系统对病原微生物的清除。一方面, TLRs 增强吞噬细胞的吞噬能力, 如 TLRs 激活后中性粒细胞、巨噬细胞的吞噬能力明显增强。另一方面, TLRs 的激活增强天然免疫细胞的杀伤能力。如 TLR2 诱导小鼠的巨噬细胞产生一氧化氮杀死胞内的结核杆菌, TLRs 还可以激活维生素 D 介导的杀菌反应<sup>[10]</sup>。本试验结果提示 ITP 患儿存在不同程度的天然免疫缺陷, 因此使用 TLRs 受体激动剂治疗 ITP 可能是一个值得进一步深入研究的课题。

协同刺激分子 (costimulator) 是 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞活化的第二信号, 由抗原呈递细胞 (antigen presenting cell, APC) 表面和 T 淋巴细胞表面的粘附

分子相互作用提供。参与 T 细胞激活的协同刺激分子中最重要的 T 细胞表面 CD28 分子与 APC 表面相应配体 B7-1 (CD80) 和 B7-2 (CD86)。B7 分子是 1982 年发现的一种活化于 B 细胞表面的蛋白分子,包括 B7-1 和 B7-2,是重要的淋巴细胞活化的第二信号分子。APC 表面 B7 分子在自身免疫性疾病的起始、进展和发病中起着重要的作用。本研究结果显示,ITP 患儿外周血淋巴细胞表面协同刺激分子 CD86 表达明显上调,且 AITP 和 CITP 组差异无显著性。与张春梅等<sup>[11]</sup>及彭军等<sup>[12]</sup>研究的成人 ITP 患者外周血淋巴细胞表面协同刺激分子 CD86 的异常表达结果相一致,推测淋巴细胞表面协同刺激分子 CD86 可能通过 CD86/CD28 共刺激途径参与 ITP 的发病过程。Zhang 等<sup>[13]</sup>应用 CD86 和 CD80 拮抗剂细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 免疫球蛋白 (cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 immunoglobulin, CTLA-4 Ig) 可以诱导血小板特异性 T 细胞无能,认为 CTLA-4 Ig 有可能成为治疗 ITP 的一项有效措施。本研究结果表明,ITP 患儿 CD86 明显增高,通过抗 CD86 单抗治疗 ITP 值得进一步研究。

初始的 CD4<sup>+</sup>T 细胞可分化为 Th1, Th2, Th3 3 类效应细胞,分泌不同的细胞因子,发挥不同的免疫效应,其中最为重要的是 Th1 细胞和 Th2 细胞。Th1 细胞以分泌的 IL-2 和 IFN- $\gamma$  为主, Th2 细胞以分泌的 IL-4, IL-6 和 IL-10 为主。Th1 细胞和 Th2 细胞的相互平衡与否直接影响机体的细胞和体液免疫功能平衡。近年来诸多研究表明,ITP 患者体内存在 Th1 和 Th2 细胞亚群功能失调,但到底是偏向 Th1 细胞还是 Th2 细胞,至今仍存在争议<sup>[14,15]</sup>。

T 细胞在机体的细胞免疫和体液免疫诱导中均有重要作用。胸腺依赖抗原诱导 B 淋巴细胞产生抗体的过程中,需要 Th 细胞协同作用。B 淋巴细胞依赖于 Th 细胞产生自身抗血小板抗体。抗原特异的 Th 细胞的任何缺陷或异常刺激都能改变其免疫反应。当 Th 细胞被激活时,它们通过其分泌的细胞因子来执行免疫效应。近年研究认为,炎性介质和细胞因子参与了 ITP 的发病过程。ITP 是一种自身免疫性疾病,与活化的 Th 细胞有关,不同的 Th 细胞产生的炎性介质和细胞因子可能起了重要作用<sup>[16]</sup>。本研究结果显示,AITP 组患儿、CITP 组患儿血清 IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4 及 IL-10 水平较对照组显著增高,且 AITP 和 CITP 组差异无显著性。可能是因为 ITP 发病初期,不存在 T 细胞亚群的偏移,提示获得性免疫异常可能不是 ITP 发病的始动因素。这对

进一步深入了解 ITP 发病机制、指导临床治疗均有重要意义。

既往研究表明 TLRs 可促进免疫细胞表面表达相关免疫分子。LPS 可经 TLR4 促进树突状细胞的成熟,表达 B7、CD83 等膜分子,亦可诱导静止状态下不表达 TLR2 的小鼠脂肪细胞和人血管内皮细胞合成并表达 TLR2,进而分泌 IL-6 等细胞因子。LPS 可经 TLR2 促使静止树突状细胞表达 CD83, MHC-II, CD80, CD86, CD54 及 CD58 等膜分子,从而使树突状细胞拥有这些和提呈抗原所必须的表面结构分子,成熟的树突状细胞得以产生,因而 TLR2 和 TLR4 可以促进 CD86 的表达<sup>[17]</sup>。本研究提示 CD41<sup>+</sup>TLR2<sup>+</sup> 和 CD61<sup>+</sup>TLR4<sup>+</sup> 表达率均与淋巴细胞表面 CD86<sup>+</sup> 细胞表达率呈负相关,提示 ITP 患儿血小板表面 TLR2 和 TLR4 的表达可能与其他免疫细胞表面 TLR2 和 TLR4 的表达无相关性,或者血小板表面 TLR2 和 TLR4 循不同的途径导致 ITP 的发生,具体机制有待于进一步研究。

TLRs 亦可促进细胞因子的合成与释放<sup>[18]</sup>。不同的 TLR 接受同一种 PAMP 刺激,所诱发产生的细胞因子种类是不同的,其中 TLR4 激活树突状细胞后主要产生 IL-2, IL-12 及 IFN- $\gamma$  介导蛋白 (IP-10) 转录 IFN- $\beta$  等。IL-12 和 IP-10 能够刺激 T 细胞产生 IFN,促使 Th 细胞分化为 Th1 细胞,介导以细胞免疫为主的反应。TLR2 激活树突状细胞后主要产生 IL-8, IL-4, IL-23 及激活 p19 的转录。IL-4 可促使 B 淋巴细胞转化为浆细胞并分泌 IgE,介导体液免疫应答。p19 是近期才被证明的一种可以和 p40 形成杂二聚体的蛋白,与 IL-12 具有相似的作用。这与本试验结果 CD41<sup>+</sup>TLR2<sup>+</sup> 和 CD61<sup>+</sup>TLR4<sup>+</sup> 的表达呈正相关相一致,说明血小板表面 TLR2 和 TLR4 的表达在 ITP 的发病过程中存在协同作用。但与 CD41<sup>+</sup>TLR2<sup>+</sup> 表达率、CD61<sup>+</sup>TLR4<sup>+</sup> 表达率与血清 IL-2 及 IL-4 浓度呈负相关,及与血清 IFN- $\gamma$  浓度无相关性不一致。可能是因为:①体内多种细胞可影响 IL-2, IFN- $\gamma$  和 IL-4 分泌和合成;②TLR2 和 TLR4 可能不是通过促进细胞因子的合成致病;③机体的天然免疫存在缺陷,获得性免疫代偿性增强,过度代偿导致细胞因子失衡;④提示 ITP 存在更复杂的发病机制。本研究亦显示 CD41<sup>+</sup>TLR2<sup>+</sup> 和 CD61<sup>+</sup>TLR4<sup>+</sup> 表达率与血清 IL-10 浓度呈负相关。目前尚无资料显示 TLR2 和 TLR4 可促进或者抑制 IL-10 的合成,因此,本试验可能为两者的相关性研究提供了理论基础,为进一步探讨 TLRs 的生物学作用及 ITP 的发病机制提供了实验室依据。

综上所述,ITP 患儿存在着天然免疫的缺陷,使其抗病毒、抗炎作用及调节免疫应答的能力下降,这可能是 ITP 患儿发病的始动因素。由于某些未知机制使协同刺激分子 CD86 的表达增高,启动获得性免疫,获得性免疫应答过强,导致一系列细胞因子失衡,导致 ITP 的发生。因此天然免疫分子 TLRs、协同刺激分子 CD86 和细胞因子共同参与了 ITP 的发病过程,其间存在精密的网络调节,但具体过程尚未完全明确,有待于进一步的研究。

### [参 考 文 献]

[1] Geddis AE, Balduini CL. Diagnosis of immune thrombocytopenic purpura in children[J]. *Curr Opin Hematol*, 2007, 14(5):520-525.

[2] 罗春华,廖清奎. 特发性血小板减少性紫癜诊疗建议[J]. *中华儿科杂志*, 1999, 37(1):50-51.

[3] Brikos C, O'Neill LA. Signalling of toll-like receptors[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2008, 183:21-50.

[4] Wazna E. Platelet-mediated regulation of immunity[J]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2006, 60:265-277.

[5] Sprague DL, Sowa JM. The role of platelet CD154 in the modulation in adaptive immunity[J]. *Immunol Res*, 2007, 39(3):185-193.

[6] Pitchford SC. Defining a role for platelets in allergic inflammation [J]. *Biochem Soc Trans*, 2007, 35(5):1104-1108.

[7] Cognasse F, Hamzeh H, Chavarin P, Acquart S, Genin C, Garraud O. Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets [J]. *Immunol Cell Biol*, 2005, 83(2):196-198.

[8] Musaji A, Meite M, Detalle L, Franquin S, Cormont F, Pr at V, et al. Enhancement of autoantibody pathogenic by viral infections in mouse models of anemia and thrombocytopenia [J]. *Autoimmun*

Rev, 2005, 4(4):247-252.

[9] Aslam R, Speck ER, Kim M, Crow AR, Bang KW, Nestel FP, et al. Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor-alpha production in vivo [J]. *Blood*, 2006, 107(2):637-641.

[10] Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response[J]. *Science*, 2006, 311(5768):1770-1773.

[11] 张春梅,赵春亭,滕清良,杨宪勇,李毅,孙兆刚. 特发性血小板减少性紫癜患者外周血淋巴细胞标志物的表达及意义[J]. *中华血液学杂志*, 2005, 26(3):184-185.

[12] 彭军,侯明. 特发性血小板减少性紫癜中共刺激信号的作用研究[J]. *中国实验血液学杂志*, 2006, 14(5):1053-1055.

[13] Zhang XL, Peng J, Sun JZ, Guo CS, Yu Y, Wang ZG, et al. Modulation of immune response with cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 immunoglobulin-induced anergic T cells in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura [J]. *Thromb Haemost*, 2008, 6(1):158-165.

[14] Chang-Lin WU, Jian-Cheng XU, Fang LI, Hong XI, Xue-Min ZH, Qun CH, et al. Polarization and apoptosis of T cell subsets in idiopathic thrombocytopenic purpura [J]. *Int J Lab Hematol*, 2007, 29(3):177-184.

[15] 赵春红,侯明. 特发性血小板减少性紫癜的细胞免疫异常研究进展[J]. *中国实验血液学杂志*, 2006, 14(5):1045-1048.

[16] Culic S, Labar B, Marusic A, Salamunic I. Correlations among age, cytokines, lymphocyte subtypes, and platelet counts in autoimmune thrombocytopenic purpura [J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2006, 47(5):671-674.

[17] Asai Y, Makimura Y, Ogawa T. Toll-like receptor 2-mediated dendritic cell activation by a *Porphyromonas gingivalis* synthetic lipopeptide[J]. *Med Microbiol*, 2007, 56(4):459-465.

[18] Cairns BA, Barnes CM, Mlot S, Meyer AA, Maile R. Toll-like receptor 2 and 4 ligation results in complex altered cytokine profiles [J]. *Trauma*, 2008, 64(4):1069-1077.

(本文编辑:吉耕中)