

• 临床研究 •

大剂量地塞米松对免疫性血小板减少性紫癜患者浆样树突状细胞功能及 Toll 样受体 9 表达的影响

王莉¹ 张连生¹ 柴晔¹ 曾鹏云¹ 吴重阳¹

[摘要] 目的:研究大剂量地塞米松对免疫性血小板减少性紫癜(ITP)患者浆样树突状细胞(pDCs)功能及 Toll 样受体 9 表达的影响。方法:15 例初诊的 ITP 患者给予地塞米松 40 mg/d,连用 4 d。采用免疫磁珠分离法体外分离 15 例正常对照及 13 例治疗有效患者治疗前后外周血中浆细胞样树突状细胞(pDCs),用 CPG-ODN 2216 刺激外周血 pDCs 并与其共培养 24 h,采用酶标记免疫吸附(ELISA)方法检测上清中 IFN- α 、IL-6、TNF- α 的含量;实时定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测 pDCs 的 TLR9 mRNA 表达量。结果:①治疗前 pDCs 产生 IFN- α 、IL-6、TNF- α 细胞因子的水平[(960.83 $\pm$ 164.65)pg/ml,(156.15 $\pm$ 39.89)pg/ml,(137.31 $\pm$ 35.44)pg/ml]明显高于正常对照组[(616.67 $\pm$ 105.98)pg/ml,(89.13 $\pm$ 21.48)pg/ml,(88.53 $\pm$ 25.81)pg/ml]($P<0.05$);治疗后 pDCs 产生 IFN- α 、IL-6、TNF- α 细胞因子水平分别降至(678.46 $\pm$ 128.88)pg/ml,(97.77 $\pm$ 26.31)pg/ml,(103.08 $\pm$ 26.42)pg/ml,与治疗前比较差异有统计学意义($P<0.05$),与正常对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。②治疗前 pDCs 的 TLR9 mRNA 的表达水平高于正常对照组($P<0.05$);治疗后 pDCs 的 TLR9 mRNA 的表达水平低于治疗前($P<0.05$),但与正常对照组的表达水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:pDCs 分泌的细胞因子及其表达的 TLR9 在 ITP 发病中起重要作用;地塞米松可能通过下调 TLR9 的表达,抑制 pDCs 分泌细胞因子的功能,从而对 ITP 起到治疗作用。

[关键词] 免疫性血小板减少性紫癜;浆细胞样树突状细胞;地塞米松;Toll 样受体 9;细胞因子

[中图分类号] R554 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1004-2806(2012)11-0700-04

Effect of high-dose dexamethasone on the function and TLR-9 expression of plasmacytoid dendritic cells in patients with immune thrombocytopenic purpura

WANG Li ZHANG Liansheng CHAI Ye ZENG Pengyun WU Chongyang

(Department of Hematology, Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, 730000, China)

Corresponding author: ZHANG Liansheng, E-mail: zls2170@yahoo.com

Abstract Objective: To investigate the effect of high-dose dexamethasone on the function and TLR-9 expression of plasmacytoid dendritic cells in the patients with immune thrombocytopenic purpura. **Method:** Fifteen newly diagnosed patients with immune thrombocytopenic purpura received high dose(HD)DXM at single daily doses of 40 mg for 4 consecutive days. The peripheral blood plasmacytoid dendritic cells isolated from 13 remission patients and 15 normal controls were separated by immunomagnetic beads and then induced by CpG-OND2216 for 24 hours. The levels of IFN- α , IL-6 and TNF- α in the supernatant were detected by enzyme linked immunosorbent assay. The expression of TLR9 mRNA of pDCs was detected by Real-time quantitative PCR. **Result:** In ITP patients, the levels of IFN- α , IL-6 and TNF- α produced by pDCs were significantly higher compared with those in normal controls and in treated group($P<0.05$). After HD DXM treatment, the levels of IFN- α , IL-6 and TNF- α were decreased significantly without significant difference between HD-DXM treatment patients and normal controls($P>0.05$). The expression of TLR9 mRNA of pDCs in untreated group were significantly higher than control group($P<0.05$). TLR9 mRNA level of pDCs in treated group was significantly reduced, without significant difference from that in control group($P>0.05$). **Conclusion:** pDCs may play important role in ITP by their Toll-like receptor 9 and cytokines secretion; Dexamethasone may reduce the expression of TLR9, inhibit pDC function, and thus play a therapeutic role.

Key words immune thrombocytopenic purpura; plasmacytoid dendritic cells; dexamethasone; toll-like receptor 9; cytokines

免疫性血小板减少性紫癜(ITP)是一种涉及体液免疫和细胞免疫功能异常的自身免疫性疾病,

特点是外周血小板显著减少伴骨髓巨核胞发育成熟障碍,临床上以广泛皮肤、黏膜及内脏出血为主要表现。大剂量地塞米松冲击治疗对 ITP 患者具有效果显著、起效快、不良反应轻等优点,已成为

¹ 兰州大学第二医院血液科(兰州,730000)

通信作者:张连生, E-mail: zls2170@yahoo.com

ITP 一线治疗方案,但其作用机制尚不十分清楚。树突状细胞(DC)是目前所知的机体内功能最强的抗原提呈细胞(antigen presenting cell,APC),外周血 DC 根据其表型和功能可分为髓样树突状细胞(myeloid dendritic cell,mDC)和浆样树突状细胞(plasmacytoid dendritic cell,pDC)。其中,pDC 是机体产生内源性 I 型 IFN 的主要细胞,参与多种自身免疫性疾病的发生过程,如 SLE、银屑病等^[1-3]。Toll 样受体 9(Toll like receptor 9,TLR9)是新近发现的一种模式识别受体,pDCs 依靠 TLR9 识别各种细菌、病毒核酸 CPG 基序而被活化,分泌多种细胞因子,从而连接天然免疫和特异性免疫^[4]。本文通过免疫磁珠法分离和体外培养初诊 ITP 患者在大剂量地塞米松治疗前后外周血中的 pDCs,研究其分泌的细胞因子及其表面的 TLR9 在 ITP 发病机制中的作用,并探讨大剂量地塞米松干预治疗 ITP 的相关机制及可能的作用靶点。

1 资料与方法

1.1 临床资料

15 例初诊的 ITP 患者均为我院 2011-08—2011-12 住院患者,均符合 ITP 的诊断标准^[5],不伴有糖尿病、高血压、消化道溃疡及结核等慢性感染性疾病,无应用糖皮质激素或免疫抑制剂史。所有 ITP 患者均静脉给药:地塞米松 40 mg/d,连用 4 d,无维持治疗;对血小板 $\leq 10 \times 10^9/L$ 或有活动性出血患者给予血小板输注。选取 13 例完全缓解患者(即治疗后血小板 $\geq 100 \times 10^9/L$)为研究对象,其中男 4 例,女 9 例,平均年龄 34.2(18.0~58.0)岁。治疗前血小板平均数 $12.8(1.0 \sim 29.0) \times 10^9/L$ 。正常对照组为 15 例健康志愿者,其中男 5 例,女 10 例;平均年龄 32.7(18.0~55.0)岁;血小板平均数 $161.4(103.0 \sim 267.0) \times 10^9/L$ 。

1.2 主要试剂

人淋巴细胞分离液 Ficoll-hypaque(相对密度 1.007)购自北京 Solarbio 化学试剂公司,鼠抗人 BDCA-4 免疫磁珠购自德国美天妮生物技术公司,CD123、BDCA-2 单抗为荷兰 Hycult 公司,IFN- α 、IL-6、TNF- α 酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒购自美国 R&D 公司,Trizol 试剂、实时荧光定量 PCR 试剂盒购自大连 TakaRa 公司,CpG-ODN2216(5'-GGGGGACGATCGTCGGGG-3')购自上海生物工程技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 外周血 pDCs 的分选 采集外周血 20 ml(40 U/ml 肝素抗凝),用等体积的 PBS 液稀释 1 倍,加等体积的 Ficoll 分离液密度梯度离心,收集单个核细胞层于 10 ml 离心管中,用 PBS 液洗涤 3 次,用 1640 培养液调整细胞密度为 $1 \times 10^6/L$ 。

再经美天妮细胞磁珠分选系统分离获得 pDCs,具体操作严格按照试剂说明书进行。分选出的 pDCs 进行细胞纯度检测为 89.3%,锥虫蓝活细胞染色计数 pDC 存活率为 96%。

1.3.2 外周血 pDC 功能检测 将分选出的 pDCs 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液调整细胞调整密度为 $1 \times 10^6/L$,接种于 48 孔培养板(500 μl /孔),每孔均加入终浓度为 6 $\mu mol/L$ 的 CpC-ODN2216,在 37℃ 饱和湿度、5% CO_2 孵箱中共孵育,24 h 后收集上清液。用 ELISA 法测定各组 IFN- α 、TNF- α 、IL-6 水平,具体实验步骤按 ELISA 检测试剂盒说明书进行,显色后即刻用酶标仪(Bio-Rad Model 680 酶标仪,美国,Bio-Rad 公司)检测 450 nm 波长的吸收度(A)值,根据标准曲线确定 IFN- α 、TNF- α 、IL-6 的含量。

1.3.3 实时荧光定量 PCR 法检测 pDC 的 TLR9 的表达 总 RNA 的提取:采用 TRIzol 一步法提取试剂盒(大连宝生物公司产品)提取各组 pDCs 细胞总 RNA,经紫外分光光度计测定总 RNA 浓度,所有样品 A260/A280 比值均在 1.8 左右。RNA 逆转录:cDNA 合成总反应体积 10 μl ,PrimeScript[®] Buffer 2 μl ,PrimeScript[®] RT Enzyme Mix I 0.5 μl ,Oligo dT primer 0.5 μl ,random 6 mers 0.5 μl ,总 RNA 模板 6.5 μl 。37℃ 45 min,85℃ 5 s。产物于-70℃ 冰箱中保存备用。引物设计及合成:根据 NCBI 网站 Gen-Bank 查询人 TLR7 mRNA、内参照 β -actin mRNA,利用 Oligo 6.71 软件设计引物。引物由大连 TakaRa 生物工程技术有限公司合成。实时荧光定量聚合酶链反应(real-time quantitative PCR):反应体系总体积为 25 μl ,SYBR[®] Premix Ex Tap[™] 12.5 μl ,正向引物 1 μl ,反向引物 1 μl ,cDNA 模板 2 μl ,去离子 8.5 μl 。PCR 循环设置:95℃,15 s;95℃,5 s,60℃,30 s(共 40 个循环)。ABI Prism 7900 测序仪收集检测荧光信号,数据分析用 Rotor-Gene Real-Time Analysis Software 6.1 进行计算标准化后的 2^{-CT} 值表示 mRNA 的相对表达含量。

1.4 统计学分析

采用 SPSS13.0 统计软件包进行统计学处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。样本均数的两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pDC 产生细胞因子能力的检测

ITP 患者治疗前外周血 pDCs 产生 IFN- α 、IL-6、TNF- α 等细胞因子的水平明显高于治疗后($P < 0.01$)和正常对照组($P < 0.05$),经 HD-DXM 治疗后外周血 pDCs 产生上述细胞因子的水平明显下降,但仍略高于正常对照组,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 ITP 患者大剂量地塞米松治疗前后 pDC 产生细胞因子水平的比较

pg/ml, $\bar{x} \pm s$

组别	例数	INF- α	IL-6	TNF- α
治疗前	13	960.83 $\pm$ 164.65 ¹⁾	156.15 $\pm$ 39.89 ¹⁾	137.31 $\pm$ 35.44 ¹⁾
治疗后	13	678.46 $\pm$ 128.88 ²⁾	97.77 $\pm$ 26.31 ²⁾	103.08 $\pm$ 26.42 ²⁾
对照组	15	616.67 $\pm$ 105.98	89.13 $\pm$ 21.48	88.53 $\pm$ 25.81

与对照组比较,¹⁾ $P < 0.05$; 与治疗前比较,²⁾ $P < 0.05$ 。

2.2 pDCs 的 TLR9 mRNA 的表达水平

相对定量法采用 CT 表示,以标准化样本间差异;CT 表示 ITP 组与正常对照组 CT 之差。ITP 患者 pDC 中 TLR9 基因相对表达量为 2.72 ± 0.82 ,正常对照组为 1,两组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。经 HD-DXM 治疗后 ITP 患者 pDC 中 TLR9 基因相对表达量为 1.34 ± 0.45 ,较治疗前显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),但与正常对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

pDC 是树突状细胞的一个亚型,在病毒和 CPG 刺激下能够分泌大量 IFN- α/β 及一定量的 IL-6 和 TNF- α 。IFN- α 激活 NK 细胞、巨噬细胞和细胞毒性 T 细胞等效应细胞,诱导 B 细胞分化为效应性浆细胞,分泌病毒特异性抗体 IgG,进而抑制病毒复制^[6];同时 TNF- α 促进未成熟的 DC 成熟,启动 CD4⁺ T 细胞偏向 Th1 的免疫反应。pDC 是启动固有性免疫应答的关键,也是连接固有性免疫和适应性免疫的桥梁,在机体的免疫系统中发挥着重要的作用。TLR9 主要表达于 B 细胞和浆细胞样树突状细胞上,可特异性地识别细菌和病毒 DNA 中丰富的未甲基化 CpG 基序(CpG-DNA),通过 MyD88 依赖的信号传导途径激活 NF- κ B、AP1 和 IRF-7 等转录因子和蛋白激酶,释放 TNF- α 、IL-6 等炎症递质和 IFN- α ,介导急性炎症及免疫反应,诱发 Th1 型细胞免疫应答^[7]。Robak 等^[1] 研究发现 SLE 患者淋巴细胞凋亡增加,且淋巴细胞凋亡率与外周血 pDCs 数量呈正相关,pDCs 数量与患者 C3、C4 水平及患者的皮损程度成正相关,提示 SLE 患者淋巴细胞凋亡增加,凋亡产物刺激 pDCs 使其持续活化状态。Patole 等^[2] 发现有肾炎表现的狼疮鼠肾组织 TLR9 mRNA 表达明显增加。陈静等^[3] 研究发现银屑病皮损中有 pDCs 浸润,TLR9 及其 mRNA 的表达水平上调,可能与银屑病的发病相关。Summers 等^[8] 发现 I 型糖尿病患者外周血 pDCs 数量减少,且产生 IFN- α 的功能明显减低。pDCs 功能及 TLR9 表达异常参与了多种自身免疫性疾病发生和发展。

ITP 是一种器官特异性自身免疫性疾病,以免疫介导的血小板减少为特征。其发病机制可能与 B 细胞功能亢进、T 细胞功能异常、细胞因子产生

异常及自身免疫耐受破坏等环节相关^[9]。ITP 患者 pDCs 的功能及 TLR9 表达如何,目前尚无报道。我们的研究发现,ITP 患者外周血 pDCs 经 CPG-ODN2216 刺激后,分泌细胞因子 IFN- α 、IL-6 和 TNF- α 的水平明显增高,而在治疗有效组则明显降低。与 pDCs 功能密切相关的 TLR9 mRNA 的表达水平在治疗前组明显上调,而治疗有效组明显下调。说明 ITP 患者 pDCs 的功能亢进及其表面 TLR9 表达的上调与 ITP 的发生及发展密切相关。

近年来,大剂量地塞米松因其疗效高,用药时间短,不良反应发生率低已成为 ITP 一线治疗用药方案^[10-11],其对细胞免疫和体液免疫均具有抑制作用,可以减少血小板自身抗体的生成,抑制单核-巨噬细胞系统对血小板的破坏,改善毛细血管通透性。本研究发现经大剂量地塞米松治疗有效患者 pDCs 的功能及 TLR9 mRNA 的表达均较治疗前下降。地塞米松可能通过下调 pDCs 上 TLR9 mRNA 的表达,抑制了 TLR9/IFN- α 通路的激活,减少 B 细胞多克隆激活产生抗血小板膜糖蛋白的自身抗体,使血小板被破坏减少,从而达到治疗 ITP 的作用。

参考文献

- [1] ROBAK E, SYSA-JEDRZEJOWSKA A, ROBAK T, et al. Peripheral blood lymphocyte apoptosis and circulating dendritic cells in patients with systemic lupus erythematosus correlation with immunological status and disease-related symptom [J]. Clin Rheumatol, 2006, 25: 225-233.
- [2] PATOLE P S, PAWAR R D, LECH M, et al. Expression and regulation of Toll-like receptors in lupus-like immune complex glomerulonephritis of MRL-Fas (lpr) mice [J]. Nephrol Dial Transplant, 2006, 21: 3062-3073.
- [3] 陈静, 谭志建, 刘厚军, 等. 浆细胞样树突状细胞和 TLR9 及其 mRNA 在银屑病患者皮损中的表达 [J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2007, 23(6): 459-461.
- [4] KIYOSHI T, SHIZUO A. Toll-like receptors in innate immunity [J]. Int Immunol, 2005, 17: 1-14.
- [5] 中华医学会血液学会血栓与止血学组. 成人原发免疫性血小板减少症诊治的中国专家共识(修订版) [J]. 中华血液学杂志, 2011, 32(3): 214-216.

(下转第 705 页)

定了血清 FLC 检测在临床应用中的地位和价值。

国内针对 FLC 的相关研究较少,缺乏统一的正常参考值范围,本研究通过对 403 例健康体检患者血清进行 sFLC 检测并计算 rFCL 值,确立了我院正常人群 sFLC 正常参考值范围。本研究同时观察了 sFLC 检测对 MM 患者诊断及疗效评价等方面的作用。通过对 58 例初诊为 MM 患者进行 sFLC 检测结果发现,所有初诊 MM 患者 sFLC 水平及 rFLC 值均异常,与 IFE、SPE、Ig 定量及尿 FLC 检测等常规检测方法一致性较好,而敏感性高于常规检测方法。本研究中,IFE 检测的阳性率为 98.3%,阴性患者 1 例,该患者为 κ 轻链型,其 κ FLC 检测结果为 105.32 mg/L,而 IFE 检测敏感度为 150~500 mg/L,因此该患者 IFE 的检测为阴性结果。SPE 检测的敏感度为 500~2 000 mg/L,在 sFLC 浓度较低时检测不到,同时结果具有主观性,因此其敏感性较低。Ig 定量检测方面,对于 LCMM 患者,其 Ig 定量检测结果均为正常或降低,非 LCMM 患者阳性率为 91.1%,其中阴性的 4 例患者为未达到 MM 诊断的主要标准(IgG>35 g/L,IgA>20 g/L,IgM>15 g/L)。尿轻链检测虽能反应血清游离轻链水平,但是尿液既难收集,又难以储存,且极易受到轻链浓度、pH 和肾功能的影响^[3],本研究也反映了尿轻链检测的局限性。提示 sFLC 的检测对 MM 的诊断更有实际应用价值。

以往 MM 病情检测通常采用骨髓穿刺活检、血清及尿蛋白电泳、IFE 等方法,由于以上方法大多为定性检测,不能准确反应病情变化及化疗疗效。本研究中疗效评价为 SD 的患者中,SPE、IFE 检测在化疗前后均为阳性,Ig 水平未见降低,但化疗后 sFLC 水平较化疗前相比均有所下降,这是由

于 sFLC 在血液中半衰期很短(κ FLC:2~4 h, λ FLC:3~6 h),明显短于完整的免疫球蛋白的半衰期(IgG 为 20~25 d,IgA 约为 6 d,IgD 为 3 d,IgE 约为 2 d),FLC 的浓度和肿瘤细胞负荷密切相关,因此更能实时、定量的检测治疗反应。本研究显示,相比于 SPE、Ig 定量、IFE 及 uFLC 等传统检测方法,sFLC 可以及时、准确、定量的监测治疗反应,在化疗疗效检测方面的敏感性更好,与国外文献报道相似^[4-6]。

参考文献

- [1] 张之南.血液病诊断及疗效标准[M].3版.北京:科学出版社,2007:232-233.
- [2] DURI E, HAROUSSEAU J L, MIGUEL J S, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma[J]. Leukemia, 2006, 20: 2220-2226.
- [3] BASNAYAKE K, STRINGER S J, HUTCHISON C A, et al. The biology of immunoglobulin free light chains and kidney injury[J]. Kidney Int, 2011, 79: 1289-1301.
- [4] MURATA K, CLARK R J, LOCKINGTON K S, et al. Sharply increased serum free light chain concentrations after treatment for multiple myeloma[J]. Clin Chem, 2010, 56: 16-18.
- [5] DISPENZIERI A, KATZMANN J A, KYLE R A, et al. Prevalence and risk of progression of light chain monoclonal gammopathy of undetermined significance: a retrospective population-based cohort study[J]. Lancet, 2010, 375: 1721-1728.
- [6] PRATT G. The evolving use of serum free light chain assays in haematology[J]. Br J Haematol, 2008, 141: 413-422.

(收稿日期:2011-12-16)

(上接第 702 页)

- [6] MEGJUGORAC N, YOUNG H A, AMRUTE S B, et al. Virally stimulated plasmacytoid dendritic cells produce chemokines and induce migration of T and NK cells[J]. J Leukoc Biol, 2004, 75: 504-514.
- [7] KNUEFERMANN P, SCHWEDERSKI M, VELTEN M, et al. Bacterial DNA induces myocardial inflammation and reduces cardiomyocyte contractility: role of toll-like receptor 9[J]. Cardiovasc Res, 2008, 78: 26-35.
- [8] SUMMERS K L, MARLEAU A M, MAHON J L, et al. Reduced IFN- α secretion by blood dendritic cells in human diabetes[J]. Clin Immunol, 2006, 121: 81-89.
- [9] STASI R, EVANGELISTA M L, STIPA E, et al. Idi-

opathic thrombocytopenic purpura: current concepts in pathophysiology and management [J]. Thromb Haemost, 2008, 99: 4-13.

- [10] CHENG Y, WONG R S, SOO Y O, et al. Initial treatment of immune thrombocytopenic purpura with high-dose dexamethasone[J]. N Engl J Med, 2003, 349: 831-836.
- [11] MAZZUCCONI M G, FAZI P, BERNASCONI S, et al. Therapy with high-dose dexamethasone (HD-DXM) in previously untreated patients affected by idiopathic thrombocytopenic purpura: a GIMEMA experience[J]. Blood, 2007, 109: 1401-1407.

(收稿日期:2012-02-09)