

## sCD93 在免疫性血小板减少症患者中表达升高及临床意义\*

李腾达<sup>1</sup>, 刘 鹏<sup>1</sup>, 谷明莉<sup>1</sup>, 邓顺江<sup>1</sup>, 吴林洪<sup>1</sup>, 叶 辛<sup>1</sup>, 刘 云<sup>1</sup>, 张薇薇<sup>1</sup>, 钱 琤<sup>2</sup>, 邓安梅<sup>1</sup>

(1. 第二军医大学长海医院, 上海 200433; 2. 解放军 100 医院, 江苏苏州 215007)

**摘要:**目的 探究 sCD93 在免疫性血小板减少症(ITP)患者中的表达水平及其与 TNF- $\alpha$  等细胞因子的相关性, 分析其临床意义。方法 收集 2012 年 5 月~2015 年 8 月在上海长海医院血液科确诊的 34 例 ITP 患者和同期体检的 34 例健康个体外周血, 分别作为实验组和对照组, 以酶联免疫吸附法(ELISA)检测血浆中 sCD93, TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-17 和 IFN- $\gamma$  的蛋白表达水平, 对 sCD93 与 TNF- $\alpha$  等细胞因子进行 Pearson 相关性分析。结果 实验组与对照组 sCD93 为  $(367.28 \pm 206.98$  vs  $218.43 \pm 96.14)$  ng/ml, 差异具有统计学意义( $t=3.803$ ,  $P=0.0003$ ); sCD93 与 TNF- $\alpha$ , IL-17 呈正相关, 差异具有统计学意义( $r=0.448, 0.473$ ,  $P$  均  $<0.01$ )。结论 sCD93 可能参与了 ITP 疾病免疫机制, 是该病潜在的疾病预测指标和研究靶点。

**关键词:** 免疫性血小板减少症; sCD93; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 白介素-17

中图分类号: R558.2; R392.11 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2016)06-115-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.06.033

## Higher Expression of Soluble CD93 in Patients with Immune Thrombocytopenia and Clinical Significance

LI Teng-da<sup>1</sup>, LIU Peng<sup>1</sup>, GU Ming-li<sup>1</sup>, DENG Shun-jiang<sup>1</sup>, WU Lin-hong<sup>1</sup>,

YE Xin<sup>1</sup>, LIU Yun<sup>1</sup>, ZHANG Wei-wei<sup>1</sup>, QIAN Cheng<sup>2</sup>, DENG An-mei<sup>1</sup>

(1. Changhai Hospital Affiliated to Second Military Medical University,

Shanghai 200433, China; 2. No. 100 Hospital of PLA, Jiangsu Suzhou 215007, China)

**Abstract:** **Objective** To probe into the expression level of sCD93 in patients with Immune thrombocytopenia (ITP) and its correlation with cytokines such as TNF- $\alpha$ , and analyze its clinical significance. **Methods** Peripheral blood of 34 patients diagnosed as ITP in hematology department and 34 health controls at the same time was collected from Changhai Hospital, in Shanghai during May, 2012 to August, 2015 and classified as experimental and controlled groups respectively. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to test protein level of sCD93, TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-17 and IFN- $\gamma$  in plasma, Pearson correlation analysis was to measure the relation between sCD93 and cytokines such as TNF- $\alpha$ . **Results** sCD93 in experimental and controlled columns was  $(367.28 \pm 206.98$  vs  $218.43 \pm 96.14$  ng/ml,  $t=3.803$ ,  $P=0.0003$ ) with statistical difference; sCD93 was positively related with TNF- $\alpha$ , IL-17 ( $r=0.448, 0.473$ ,  $P<0.01$ ) and there were differences in statistics. **Conclusion** sCD93 might involve in immune mechanism of ITP, it was a potential predictor and studied target for this disease.

**Keywords:** Immune thrombocytopenia; sCD93; TNF- $\alpha$ ; IL-17

免疫性血小板减少症(immune thrombocytopenia, ITP)是一种自身免疫性疾病,其特点是针对自身抗体敏感的血小板清除加快,产生量相对不足,血小板总量减少<sup>[1]</sup>。在 ITP 中,激活的自身免疫性 T 细胞增多,IFN- $\gamma$ , IL-2 等 Th1 型细胞因子与 IL-17 等 Th17 型细胞因子增多,与疾病严重程度相关<sup>[2]</sup>。而在 T 细胞适应性免疫过程中上游固

有免疫 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)扮演了重要角色,它能够在免疫系统受到病原体攻击时快速识别一系列病原体相关模式分子<sup>[1]</sup>。ITP 病人中 TLRs 信号通路的激活能增强促炎因子如 IL-6, TNF- $\alpha$  等表达,从而使机体更有利于调动适应性免疫过程<sup>[1]</sup>。

CD93(也叫 C1qRp),是一种跨膜糖蛋白,表达

\* 基金项目:973 计划(2013CB531606),国家自然科学基金(81471605,81401358,81501397,31500721,81501398,81302579,81273282,81202353),上海申康基金(SHDC22014014),上海教育科学基金(D14017),军队科研基金(BWS14J023,12MA056,15ZD009,15XD007),美捷登基金(MJR20150019)。

作者简介:李腾达(1990-),女,在读硕士研究生,主要从事自身免疫研究,Tel: 18302192042,E-mail: tengdali@smmu.edu.cn。

刘 鹏(1982-),女,在读博士研究生,主要从事自身免疫研究,E-mail: ppliu23@163.com,共同第一作者。

通讯作者:邓安梅,女,教授,E-mail: amdeng70@163.com。

钱 琤,女,检验技师,E-mail: qiancheng824@126.com,共同通讯作者。

于单核细胞、表皮细胞等细胞表面,溶解形式为 sCD93,与细胞黏附和吞噬作用密切相关<sup>[3]</sup>。有报道显示 CD93 能诱导单核细胞分化为巨噬细胞,扩大 TLR 通路反应和促炎因子如 TNF- $\alpha$  的产生<sup>[4]</sup>。近来 CD93 在自身免疫疾病中的作用逐渐突显,在系统性硬化症(systemic sclerosis,SSc)中,血清中 sCD93 升高,与 TLR 配体、TNF- $\alpha$  表达相关<sup>[5]</sup>;在类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis,RA)与骨关节炎的对照研究中,sCD93 在 RA 中显著上升,与疾病形成相关<sup>[4]</sup>。然而,在 ITP 中 CD93 的作用机制尚未明确,本文通过分析 sCD93 在病人血浆中的表达水平及其与 TNF- $\alpha$  等细胞因子的相关性,为进一步研究 CD93 在 ITP 疾病形成过程中的生物学作用奠定基础。

## 1 材料和方法

1.1 研究对象 实验组为 34 例 2012 年 5 月~2015 年 8 月在上海长海医院血液科确诊 ITP 患者,其中新诊患者 19 例,慢性患者 15 例,男性 14 例,女性 20 例,平均年龄  $34.4 \pm 17.8$  岁。新诊断患者为新确诊 ITP 病人,且之前无可靠的临床或实验室确诊证据;慢性患者为已经确诊为 ITP 且持续 12 月以上的病人。对照组 34 例为同期体检的健康个体,男性 16 例,女性 18 例,平均年龄  $36.8 \pm 18.9$  岁,两组间性别、年龄差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。本研究经第二军医大学长海医院医学科伦理委员会批准,所有受试对象均签署知情同意书。

1.2 试剂与仪器 ELISA 试剂盒(美国 eBioscience 公司),酶标仪(Thermo Scientific 公司),生物分光光度计(德国 Eppendorf 公司),离心机(上海戴宝)。

## 1.3 方法

1.3.1 血浆收集及 PBMC 的分离:抽取研究对象 2 ml 左右的 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝无菌外周血,3 000 r/min 离心 10 min 后,将血浆转移至 EP 管中于  $-80^{\circ}\text{C}$  冻存。

1.3.2 ELISA 法检测血浆 sCD93 及细胞因子的蛋白水平:按照 ELISA 试剂盒操作说明进行 sCD93 及相关细胞因子的检测。如下:每个反应孔中加 0.1 ml  $1 \sim 10 \mu\text{g/ml}$  抗体稀释液, $4^{\circ}\text{C}$  过夜。次日,弃孔内液,洗涤,加 0.1 ml 适宜浓度的样本于反应孔中, $37^{\circ}\text{C}$  反应 1 h 后洗涤。加入 0.1 ml 酶标抗体, $37^{\circ}\text{C}$ ,1 h 后再洗涤。最后加 TMB 显色,25 min 后加 2 mol/L 硫酸终止反应,于 450 nm 处检测。

1.4 统计学分析 两组间连续性计量资料的比较采用两独立样本的  $t$  检验,sCD93 与细胞因子的相

关性以 Pearson 系数表示,检验水准为 0.05。统计软件为 GraphPad Prism 6.0。

## 2 结果

### 2.1 实验组与对照组血浆中 sCD93 的表达水平

实验组血浆中 sCD93 蛋白水平为  $367.28 \pm 206.98 \text{ ng/ml}$ ,对照组为  $218.43 \pm 96.14 \text{ ng/ml}$ ,差异具有统计学意义( $t=3.803, P=0.0003$ )。

### 2.2 实验组与对照组细胞因子的表达水平 见表 1。

表 1 实验组与对照组细胞因子表达的比较( $\bar{x} \pm s, \text{pg/ml}$ )

项 目	实验组	对照组	$t$	$P$
TNF- $\alpha$	$476.89 \pm 99.72$	$90.56 \pm 48.76$	20.29	$<0.0001$
IL-4	$108.79 \pm 24.96$	$42.17 \pm 18.96$	12.39	$<0.0001$
IL-17	$161.72 \pm 52.69$	$118.47 \pm 40.78$	3.785	0.0003
IFN- $\gamma$	$212.32 \pm 53.38$	$49.67 \pm 15.96$	17.02	$<0.0001$

与对照组比较,实验组血浆中 TNF- $\alpha$ ,IL-4,IL-17 和 IFN- $\gamma$  蛋白表达量增高,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),其中 TNF- $\alpha$  的表达量约为对照组的 5 倍,IFN- $\gamma$  约为对照组的 4 倍,IL-4 约为对照组的 2 倍。

### 2.3 实验组 sCD93 与细胞因子的相关性分析

实验组 ITP 患者血浆中 sCD93 与 TNF- $\alpha$ ,IL-17 表达水平呈正相关,差异具有统计学意义( $r=0.448, 0.473$ ;均  $P < 0.05$ );与 IL-4,IFN- $\gamma$  不具有相关性( $r=0.198, 0.245$ ,均  $P > 0.05$ )。

3 讨论 ITP 是一种基因异质性的血液疾病,不同群体有不同的致病原因、发病史和疗效<sup>[1,6]</sup>。儿童 ITP 患者常有近期感染史<sup>[7]</sup>,成人 ITP 则常伴有免疫缺陷病毒、幽门螺旋杆菌、丙肝病毒等慢性感染<sup>[1]</sup>。ITP 疾病常常伴有 Th1, Th2, Th17 细胞亚群的失调和 Tregs, Bregs 细胞的免疫缺陷<sup>[1,2]</sup>。研究显示 ITP 病人中,针对血小板自身抗原的 T 细胞分泌 IL-2, IFN- $\gamma$  增加,这表明 CD4+T 细胞群的分化趋向于 Th1 细胞亚群。此外, Th17 细胞与 IL-17 产量也增加,表明 Th17 可能参与了 ITP 的免疫病理过程<sup>[2,7]</sup>。固有免疫中单核细胞被认为是组织性巨噬细胞和树突状细胞的前身,在激活和极化自身免疫相关 Th 细胞方面有重要作用,实验表明去除 CD16+单核细胞能升高 Treg 细胞和 Th17 细胞,抑制 Th1 细胞。在 ITP 中,CD16+单核细胞能促进 Th1 细胞因子分泌,同时抑制 Treg 和 Th17 细胞<sup>[2]</sup>。而 TLRs 作为固有免疫反应的哨兵,在连接固有免疫和适应性免疫反应中起到了重要作用。最近有研究表明,血小板的 TLRs 能促进树突状细胞抗原提呈,在适应性免

