

Gas6 在免疫性血小板减少症患者中表达增高及临床意义*

李腾达^{1a}, 司宇^{1a}, 刘鹏^{1a}, 徐贵霞^{1a}, 谷明莉^{1b}, 叶辛², 张薇薇^{1b}, 黄元兰³, 钱铮⁴, 邓安梅^{1a}

(1. 长海医院 a. 临床实验中心; b. 检验科, 上海 200433; 2. 复旦大学, 上海 200433;

3. 解放军 455 医院, 上海 200052; 4. 解放军 100 医院, 江苏苏州 215007)

摘要:目的 探究 Gas6 在免疫性血小板减少症(ITP)患者中的表达情况及其临床意义。方法 以 2013 年 10 月~2015 年 12 月于上海长海医院血液科确诊的 35 例 ITP 患者外周血作为实验组, 以同期体检的 35 例健康个体外周血作为对照组, 两组样本分离血浆后以酶联免疫吸附法(ELISA)检测 Gas6, IFN- α , IL-4, IFN- γ 和 IL-17 蛋白表达水平, 组间比较采用两独立样本 t 检验, 对 Gas6 与 IFN- α 等细胞因子的关系进行 Pearson 相关性分析。结果 Gas6 在实验组与对照组的表达水平为 27.28 ± 7.56 ng/ml vs 20.51 ± 5.39 ng/ml ($t=4.314$, $P<0.0001$); IFN- γ 在实验组与对照组的表达水平为 221.67 ± 57.64 pg/ml vs 45.32 ± 16.79 pg/ml ($t=17.38$, $P<0.0001$); IL-4 在实验组与对照组的表达水平为 113.86 ± 26.48 pg/ml vs 49.87 ± 14.98 pg/ml ($t=12.44$, $P<0.0001$); IL-17 在实验组与对照组的表达水平为 168.96 ± 47.88 pg/ml vs 109.56 ± 28.97 pg/ml ($t=6.28$, $P<0.0001$); IFN- α 在实验组与对照组的表达水平为 34.83 ± 8.12 pg/ml vs 29.89 ± 5.76 pg/ml ($t=2.936$, $P=0.0045$), 差异均具有统计学意义($P<0.05$)。Pearson 相关性分析显示 Gas6 与 IL-17, IL-4, IFN- γ 呈正相关($r=0.564, 0.486, 0.449$, P 均 <0.05), 差异具有统计学意义, 与 IFN- α 不具有相关性。结论 Gas6 可能通过影响 Th 细胞亚群细胞因子的分泌参与了 ITP 致病过程, 是临床上治疗和预测该病的潜在靶位点。

关键词:免疫性血小板减少症; 生长捕获特异性蛋白 6; 白细胞介素-4; 干扰素- γ ; 白细胞介素-17

中图分类号:R558.2; R392.11 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2017)03-037-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2017.03.010

Increased Expression of Gas6 in Patients with Immune Thrombocytopenia and Its Clinical Significance

LI Teng-da^{1a}, SI Yu^{1a}, LIU Peng^{1a}, XU Gui-xia^{1a}, GU Ming-li^{1b}, YE Xin²,
ZHANG Wei-wei^{1b}, HUANG Yuan-lan³, QIAN Cheng⁴, DENG An-mei^{1a}

(1a. Clinical Experiment Center; 1b. Department of Laboratory Diagnosis, Changhai Hospital, Shanghai 200433, China; 2. Fudan University, Shanghai 200433, China; 3. No. 455 Hospital of PLA, Shanghai 200052, China; 4. No. 100 Hospital of PLA, Jiangsu Suzhou 215007, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression level of Gas6 in patients with Immune Thrombocytopenia (ITP) and its clinical significance. **Methods** The experimental group was peripheral blood samples collected from 35 cases diagnosed with ITP in hematology department of Changhai Hospital in Shanghai from October 2013 to December 2015. Control group was peripheral blood from 35 healthy examined individuals at the same time. After separating plasma from the two group samples, the protein level of Gas6, IFN- α , IL-4, IFN- γ and IL-17 were measured by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), comparison of expressional level of the two groups was measured by t test. Pearson correlation analysis was used to decide the relation between Gas6 and cytokines such as IFN- α . **Results** The expression level of Gas6 in experimental and control groups was 27.28 ± 7.56 ng/ml vs 20.51 ± 5.39 ng/ml ($t=4.314$, $P<0.0001$); IFN- γ was 221.67 ± 57.64 pg/ml vs 45.32 ± 16.79 pg/ml ($t=17.38$, $P<0.0001$); IL-4 was 113.86 ± 26.48 pg/ml vs 49.87 ± 14.98 pg/ml ($t=12.44$, $P<0.0001$); IL-17 was 168.96 ± 47.88 pg/ml vs 109.56 ± 28.97 pg/ml ($t=6.28$, $P<0.0001$); IFN- α was 34.83 ± 8.12 pg/ml vs 29.89 ± 5.76 pg/ml ($t=2.936$, $P=0.0045$), all with statistical differences ($P<0.05$). Pearson analysis showed that Gas6 was positively related with IL-17, IL-4, IFN- γ ($r=0.564, 0.486, 0.449$, $P<0.05$) and there was difference statistically, but Gas6 was not correlated with IFN- α . **Conclusion** Gas6 may participate in the disease formation of ITP through affection on cyto-

* 基金项目: 973 计划(2013CB531606), 国家自然科学基金(81671556, 81601406, 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, 15ZD009, 15XD007), 美捷登基金(MJR20150019)。

作者简介: 李腾达(1990—), 女, 在读硕士生, 主要从事感染免疫研究, E-mail: tengdali@smmu.edu.cn。

司宇(1990—), 女, 在读硕士生, 主要从事免疫研究, E-mail: tcsy2008@126.com, 共同第一作者。

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

钱铮, 女, 主治医师, E-mail: qiancheng824@126.com, 共同通讯作者。

kines secreted by Th cell subsets, and it was the potential therapeutic and predicted target for this disease clinically.

Keywords: Immune thrombocytopenia; Gas6; IL-4; IFN- γ ; IL-17

免疫性血小板减少性紫癜 (immune thrombocytopenia, ITP) 是一种获得性自身免疫性疾病, 以免疫耐受破坏、血小板总量相对不足为特点^[1]。该病中上升的 Th1/Th2 比率、Th1 型细胞因子、干扰素- γ (IFN- γ) 及 Th17 型 IL-17 与 B 细胞活化、血小板特异性抗体的产生密切相关^[2,3]。此外, 通过 TLRs-IRAKs/PI3K 被激活的炎症因子 IFN- α 等, 在自免性病理形成过程中亦起到了重要作用^[4]。

生长捕获特异性蛋白 6 (growth arrest-specific protein 6, Gas6) 是一种 75kD 大小的维生素 K 依赖性蛋白, 参与了细胞生存繁殖、炎症因子释放等生理过程^[5]。在自身免疫疾病中, Gas6 可抑制单核/巨噬细胞 TNF- α 的分泌与 TLR 通路中 I 型干扰素 IFN- α 的产生, 影响 DCs, APCs, T 细胞功能^[6,7]。目前已有研究表明 Gas6 与系统性红斑狼疮 (SLE)^[8]、舍格伦综合征 (SS)^[9]、多发性硬化症 (MS)^[10] 等疾病的活动度、易感性具有相关性, 但 ITP 疾病形成过程中的作用及机制尚不明确, 本文通过分析 ITP 病人中 Gas6 的表达水平及其与 IL-17 等细胞因子的关系, 旨在为临床 ITP 病人的疾病监测与预后提供潜在有效的靶位点。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 2013 年 10 月~2015 年 12 月来长海医院就诊的 35 例 ITP 患者及同期体检的健康个体外周血分别作为实验组和对照组, 实验组平均年龄 33.8 ± 16.9 岁, 男性 16 例, 女性 19 例, 诊断指标参见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)^[11]; 对照组平均年龄 34.9 ± 17.4 岁, 男女比例为 17:18, 两组间年龄性别差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。本研究经第二军医大学长海医院医学科研伦理委员会批准, 所有受试对象均签署知情同意书。

1.2 试剂和仪器 ELISA 试剂盒 (美国 R&D Systems 公司), 酶标仪 (奥地利 TECAN 公司), 离心机 (美国 Bechman 公司), 生物分光光度计 (德国 Eppendorf 公司)。

1.3 方法

1.3.1 外周血标本收集及血浆分离: 抽取所有受试对象外周抗凝血 2~3 ml, 3 000 r/min 离心 10 min 后分离得到血浆, 冻存于 -80°C 冰箱待用。

1.3.2 ELISA 法检测血浆 Gas6 及相关免疫分子的表达情况: 按照试剂盒操作说明, 以 ELISA (双抗体夹心法) 检测 ITP 病人及健康个体血浆中 Gas6, IFN- α , IL-4, IFN- γ , IL-17 的蛋白表达水平, 于 $A_{450\text{ nm}}$ 处进行检测。

1.4 统计学分析 两组间连续变量的比较采用两独立样本 t 检验, 以 Pearson 相关系数表示 Gas6 与其他细胞因子之间的关系, 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 Gas6 的表达水平 实验组血浆中 Gas6 的表达水平为 27.28 ± 7.56 ng/ml, 对照组为 20.51 ± 5.39 ng/ml, 差异具有统计学意义 ($t = 4.314, P < 0.0001$)。

2.2 实验组与对照组相关免疫分子的表达水平

见表 1。相比较于对照组, 实验组 IFN- α , IL-4, IFN- γ 和 IL-17 表达均升高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 实验组与对照组细胞因子表达情况的比较 ($\bar{x} \pm s$)

项 目	实验组 (pg/ml)	对照组 (pg/ml)	t	P
IFN- α	34.83 ± 8.12	29.89 ± 5.76	2.936	0.0045
IL-4	113.86 ± 26.48	49.87 ± 14.98	12.44	< 0.0001
IFN- γ	221.67 ± 57.64	45.32 ± 16.79	17.38	< 0.0001
IL-17	168.96 ± 47.88	109.56 ± 28.97	6.28	< 0.0001

2.3 实验组 Gas6 与相关免疫分子的 Pearson 相关性分析 实验组血浆 Gas6 的表达水平与 IL-4, IFN- γ , IL-17 呈正相关, 差异具有统计学意义 ($r = 0.486, 0.449, 0.564, P$ 均 < 0.01), 与 IFN- α 不具有相关性 ($r = -0.232, P > 0.05$)。

3 讨论 ITP 是临床上常见的免疫性出血性疾病, 以机体产生针对血小板表面膜糖蛋白的自身抗体为特点^[12]。该病表现为 Th 亚群失衡及细胞因子表达的异常, 有向 Th1, Th17 细胞分化的倾向, 升高的 Th1 型因子 IFN- γ , Th17 型 IL-17 与疾病病理形成过程相关^[1,2]。由于 ITP 存在急性与慢性、儿童与成年 ITP 之分, 其针对人群不同相应细胞因子变化亦不尽相同, 部分研究表明 ITP 中 Th2 型细胞因子 IL-4 亦可升高, 并会影响致病性 B 细胞的存在及自身抗体产生^[3]。本研究中 ITP 病人 IL-4, IL-17, IFN- γ 均上升, 提示 Th1/Th2/Th17 型细胞因子均可能参与了其致病过程。

Gas6 是一种生长因子样分子, 与血浆抗凝血蛋白 S 相似, 表达于内皮细胞、血管平滑肌细胞等细胞, 可抑制 TLR 通路诱导的 IFN- α 产生及抗原提呈细胞 (APCs) 激活, 参与到一系列自身免疫疾病、炎症损伤性疾病的病理过程^[5,7]。在多发性硬化症 (MS) 中, Gas6 能促进中枢神经细胞如皮质神经元、施氏细胞、少突细胞等扩增, 参与 MS 的病理形成过程^[10]; SLE 中, Gas6-/- 小鼠可避免肾小球性肾炎和肾毒性肾炎, 表明 Gas6 与 SLE 疾病活动性

相关^[8];血管损伤模型中, Gas6 可从血小板中释放, 与止血过程相关^[5]。Gas6 在 ITP 中的作用机制尚未明确, 而如上所述 Gas6 可能通过 Gas6-TLR-IFN- α /免疫细胞轴发挥生物学功能, 又由于在 ITP 中, 异常表达的巨噬细胞 TLR7 等 TLR 家族分子可促进自身反应性 B 细胞的增殖及抗血小板抗体的产生^[1];在 SS 中, TLR 能够诱导 IL-17 表达, 调节 Th1/Th2 细胞分化^[9], 故本研究猜想在 ITP 中 Gas6 可能通过 Gas6-TLR-IFN- α /Th 亚群细胞因子发挥免疫作用。经实验验证表明, Gas6 在 ITP 病人中升高, 且与 IL-4, IFN- γ , IL-17 呈正相关, 与 IFN- α 不具有相关性, 由于 IL-4, IFN- γ , IL-17 分别与 Th2, Th1, Th17 功能相关, 故 Gas6 可能通过影响 Th 细胞亚群的功能进而调节 ITP 病人免疫系统, 参与其致病过程, 但本实验样本量相对较少, 尚需扩大样本量进行进一步验证并深入 Gas6 对细胞下游通路调节作用的研究, 以探究其在 ITP 疾病过程中的具体作用机制, 为临床疾病的检测提供潜在的治疗与预测靶点。

参考文献:

- [1] McKenzie CG, Guo L, Freedman J, et al. Cellular immune dysfunction in immune thrombocytopenia (ITP)[J]. *British Journal of Haematology*, 2013, 163(1):10-23.
- [2] Ye X, Zhang L, Wang H, et al. The role of IL-23/Th17 pathway in patients with primary immune thrombocytopenia [J]. *PloS One*, 2015, 10(1): e0117704.
- [3] Talaat RM, Elmaghraby AM, Barakat SS, et al. Alterations in immune cell subsets and their cytokine secretion profile in childhood idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP)[J]. *Clinical and Experimental Immunology*, 2014, 176(2):291-300.
- [4] Abdelsadik A, Trad A. Toll-like receptors on the fork roads between innate and adaptive immunity[J]. *Human immunology*, 2011, 72(12):1188-1193.
- [5] van der Meer JH, van der Poll T, van't Veer C. TAM receptors, Gas6, and protein S: roles in inflammation and hemostasis[J]. *Blood*, 2014, 123(16):2460-2469.
- [6] Alciato F, Sainaghi PP, Sola D, et al. TNF- α , IL-6, and IL-1 expression is inhibited by GAS6 in monocytes/macrophages[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2010, 87(5):869-875.
- [7] Rothlin CV, Lemke G. TAM receptor signaling and autoimmune disease[J]. *Current Opinion in Immunology*, 2010, 22(6):740-746.
- [8] Kim HA, Nam JY, Jeon JY, et al. Serum growth arrest-specific protein 6 levels are a reliable biomarker of disease activity in systemic lupus erythematosus [J]. *Journal of Clinical Immunology*, 2013, 33(1):143-150.
- [9] Chen CH, Chen HC, Chang CC, et al. Growth arrest-specific 6 protein in patients with sjogren syndrome: determination of the plasma level and expression in the labial salivary gland[J]. *PloS One*, 2015, 10(10): e0139955.
- [10] Sainaghi PP, Collimedaglia L, Alciato F, et al. Growth arrest specific gene 6 protein concentration in cerebrospinal fluid correlates with relapse severity in multiple sclerosis[J]. *Mediators Inflammation*, 2013(2013):406483.
- [11] 中华医学会血液学分会血栓与止血学组. 成人原发性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. Hemostasis and Thrombosis Group, Hematology Society, Chinese Medical Association. Expert consensus for diagnosis of adult primary immune thrombocytopenia in China (Revised Edition) [J]. *Chinese Journal of Hematology*, 2011, 32(3):214-216.
- [12] 叶辛, 张蕾, 谷明莉, 等. TRAIL 在原发免疫性血小板减少症患者外周血单个核细胞中的表达及临床意义[J]. *现代检验医学杂志*, 2014, 29(5):46-48. Ye X, Zhang L, Gu ML, et al. Increased TRAIL expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with primary immune thrombocytopenia and its clinical significance[J]. *J Mod Lab Med*, 2014, 29(5):46-48.
- [13] Podhorecka M, Halicka D, Szymczyk A, et al. Assessment of red blood cell distribution width as a prognostic marker in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(22):32846-32853.
- [14] Weng CL, Wang CH, Chen IC, et al. Red cell distribution width is an independent predictor of mortality in necrotizing fasciitis[J]. *The American Journal of Emergency Medicine*, 2014, 32(10):1259-1262.

收稿日期:2016-10-06

修回日期:2017-01-19

(上接 36 页)

- [11] Cakmak E, Altinkaya E, Acibucu F, et al. Evaluation of platelet-to-lymphocyte ratio, red cell distribution width and neutrophil-to-lymphocyte ratio as potential biomarkers in the early detection of gastric cancer[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2016, 9(3):6687-6692.
- [12] 翟海军, 朱晶. 红细胞分布宽度对肺癌预后的临床分析[J]. *现代检验医学杂志*, 2015, 30(6):147-148, 153. Zhai HJ, Zhu J. Clinical analysis of red blood cell distribution width on the prognosis of lung cancer

[J]. *J Mod Lab Med*, 2015, 30(6):147-148, 153.

- [13] Podhorecka M, Halicka D, Szymczyk A, et al. Assessment of red blood cell distribution width as a prognostic marker in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(22):32846-32853.
- [14] Weng CL, Wang CH, Chen IC, et al. Red cell distribution width is an independent predictor of mortality in necrotizing fasciitis[J]. *The American Journal of Emergency Medicine*, 2014, 32(10):1259-1262.

收稿日期:2017-03-16

修回日期:2017-04-18