

儿童过敏性紫癜 TLR2、TLR4 表达 及其与 Tfh 细胞的相关性

王彬, 邵宽芙蓉, 董晨

徐州医科大学附属医院儿科, 江苏 徐州 221000

摘要: **目的** 研究过敏性紫癜(HSP)患儿外周血单个核细胞(PBMC)中 Toll 样受体(TLR)2、TLR4 的表达及其与滤泡辅助性 T 细胞(Tfh)免疫应答的相关性。**方法** 选取 2019 年 5 月至 10 月于徐州医科大学附属医院住院的初发 HSP 患儿 23 例作为 HSP 组,另同时选取于门诊健康体检的儿童 15 例作为对照组。采用流式细胞术检测两组儿童外周血 PBMC 中 TLR2、TLR4 及 Tfh 细胞的表达,采用 ELISA 法检测两组儿童血浆中干扰素(IFN)- γ 、白细胞介素(IL)-4、IL-6 及 IL-21 水平变化。**结果** HSP 组患儿外周血中 TLR2、TLR4 的表达及 Tfh 细胞比例均明显高于对照组($P<0.01$);HSP 组患儿血浆中 IL-4、IL-6 及 IL-21 水平显著高于对照组,IFN- γ 水平和 IFN- γ /IL-4 比值显著低于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$)。HSP 组急性期患儿外周血中 TLR2 的表达与 Tfh 细胞、IL-21 水平分别呈显著正相关关系($r=0.538, 0.800, P<0.01$);TLR4 的表达与 Tfh 细胞、IL-21 水平分别呈显著正相关关系($r=0.671, 0.660, P<0.01$)。**结论** TLR2 及 TLR4 活化可能参与了 HSP 的发生发展,而活化的 TLR2 及 TLR4 可能通过上调 Tfh 细胞免疫应答从而介导 HSP 的免疫发病机制。

关键词: 过敏性紫癜; Toll 样受体; 滤泡辅助性 T 细胞; 白细胞介素; 干扰素

中图分类号: R725.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2022)02-0194-04

Expression of TLR2 and TLR4 and their correlation with Tfh cells in children with Henoch-Schonlein purpura

WANG Bin, SHAO Kuan-fu-rong, DONG Chen

Department of Pediatrics, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221000, China

Corresponding author: DONG Chen, E-mail: dc2260@163.com

Abstract: Objective To study the levels of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and their correlation with T follicular helper (Tfh) cell immune response in children with Henoch-Schonlein purpura (HSP). **Methods** Twenty-three children with primary HSP hospitalized Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University from May to October in 2019 were selected as the study subjects (HSP group), and 15 children undergoing physical examination at the same time were served as control group. In two groups, the flow cytometry was used to detect the levels of TLR2, TLR4 and Tfh cells in PBMC, and ELISA was employed to determine the changes in interferon- γ (IFN- γ), interleukin(IL)-4, IL-6 and IL-21 levels in the plasma. **Results** Compared with those in control group, the expressions of TLR2 and TLR4, the proportion of peripheral Tfh cells and the plasma levels of IL-4, IL-6 and IL-21 in HSP group significantly increased, and IFN- γ level and IFN- γ /IL-4 significantly decreased in HSP group ($P<0.01$). In the children with acute HSP, the expressions of TLR2 ($r=0.538, r=0.800$) and TLR4 ($r=0.671, r=0.660$) were respectively positively correlated with Tfh cells and IL-21 levels ($P<0.01$). **Conclusion** Activation of TLR2 and TLR4 may be involved in the occurrence and development of HSP and its immune-mediated pathogenesis by up-regulating the immune response of TFH cells.

Keywords: Henoch-Schonlein purpura; Toll-like receptors; T follicular helper cells; Interleukin; Interferon

过敏性紫癜(Henoch-Schönlein purpura, HSP)是由自身免疫介导的儿童常见的血管炎之一,其主要好发于春秋季节,发生率约为每10万儿童12.9~20.4^[1]。HSP以血小板不减少性紫癜为特征,并累及胃肠道、关节及肾脏。一般情况下,HSP为自限性疾病,预后良好。但当病程中出现血尿或蛋白尿时即发展为紫癜性肾炎(HSPN),是影响长期预后的重要因素。关于HSP确切病因及发病机制目前尚未完全清楚,是包括T细胞亚群功能改变、补体、细胞因子及炎症介质合成异常等多种因素综合作用的结果^[2]。目前感染被公认为是诱发HSP的关键因素。Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs)是近年来新发现的一类细胞表面信号转导跨膜受体,是机体抵抗微生物感染的第一道防线。研究表明,TLRs信号过度表达可以引起多种自身免疫性疾病的发生,包括系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎及间质性肾炎等^[3-4]。但有关TLRs是否参与了HSP的免疫发病及可能的作用机制,目前研究较少。本研究拟通过检测HSP患儿外周血中TLR2、TLR4的表达和滤泡辅助性T细胞(T follicular helper cells, Tfh)及白细胞介素(interleukin, IL)-21水平的变化,探讨HSP患儿外周血中TLR2、TLR4表达及其与Tfh细胞之间可能的相关性,为进一步阐明HSP的免疫发病机制提供思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2019年5月至10月在徐州医科大学附属医院儿科住院治疗的初发HSP患儿23例作为研究对象,入HSP组,其中男11例,女12例;年龄2~12(6.83±2.77)岁。入选标准:(1)近期末使用过糖皮质激素、免疫抑制剂等影响免疫功能的药物;(2)所有诊断均参照2000年中华医学会儿科学分会肾脏病学组会议标准^[5];(3)既往无肾脏疾病、变态反应性疾病或自身免疫性疾病等相关病史。排除标准:有严重肝肾功能障碍或血小板计数、凝血功能明显异常患儿。同期选取于门诊健康体检儿童15例入健康对照组,男7例,女8例;年龄3~13(7.45±2.67)岁。既往无肾脏及自身免疫性疾病病史。两组儿童年龄、性别比较差异无统计学意义($P>0.05$)。所有患儿家长均已签署知情同意书,本研究获医院医学伦理委员会批准。

1.2 方法 收集所有参与试验患儿的临床资料。分别于清晨空腹采集健康对照组儿童及HSP组患儿肘静脉血约4 ml置于肝素抗凝试管中,并将其分为I、II两管(各2 ml)。

(1)TLR2、TLR4表达和Tfh细胞检测: I管运用淋巴细胞分离液密度梯度离心法分离单一核细胞(PBMC)。取PBMC分装在加有抗CD14-异硫氰酸荧光素(FITC)抗体试剂管中,分别加入TLR2-藻红蛋白(PE)抗体、TLR4-PE抗体,以PE标记的IgG为阴性对照,室温避光染色30 min,加入溶血素,轻荡混匀后离心15 min,使用PBS洗涤2次,最后加入PBS 0.5 ml,以CD14设门,检测患儿外周血中TLR2、TLR4阳性细胞所占比例。另取已制备好的PBMC,分别加入CD4-FITC、CXCR5趋化因子受体5(CXCR5)-PC5及可诱导共刺激分子(ICOS)-PE抗体各5 μ l,震荡均匀后室温避光孵育30 min;加入PBS洗涤2遍后上机检测(以上抗体试剂均购自康美生物科技,上机仪器为LSRFortessa™型流式细胞仪,美国BD Biosciences公司)。定义CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺细胞群为Tfh细胞群,分析细胞比例。(2)血浆IL-4、干扰素(interferon, IFN)- γ 、IL-6及IL-21水平检测: II管离心后留取血浆,采用ELISA抗体夹心法(试剂盒购自康美生物科技,操作遵循试剂盒说明书)分别检测血浆中IL-4、IFN- γ 、IL-6及IL-21的浓度。以上操作由徐州医科大学附属医院检验中心协助完成。

1.3 统计学方法 采用SPSS 23.0软件进行数据分析。计数资料用例(%)表示,组间比较进行 χ^2 检验;计量资料均符合近似正态分布,使用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验;相关性分析采用Pearson相关分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组儿童外周血PBMC中TLR2、TLR4的表达及IL-4、IFN- γ 、IL-6水平测定 HSP组患儿外周血PBMC中TLR2、TLR4阳性表达细胞比例较健康对照组儿童明显升高,差异有统计学意义($P<0.01$);患儿血浆中IL-4及IL-6水平亦较健康对照组儿童显著升高,但血浆中IFN- γ 水平及IFN- γ /IL-4比值显著下降($P<0.01$)。见表1。

2.2 HSP组患儿TLR2、TLR4的表达与IL-4、IFN- γ 及IL-6水平相关性分析 HSP组患儿外周血中TLR2及TLR4表达与血浆中IL-4、IL-6均呈正相关,而与IFN- γ /IL-4比值呈负相关,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表2。

2.3 两组儿童Tfh细胞及IL-21水平的表达 HSP急性期患儿外周血中Tfh细胞比例及IL-21水平明显高于健康对照组,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表3。同时,急性期患儿Tfh细胞比例与IL-21水平

呈显著正相关($r=0.719, P<0.01$)。

2.4 HSP组患儿外周血中TLR2、TLR4的表达与Tfh细胞及IL-21水平的相关性 HSP组急性期患儿外周血中TLR2的表达与Tfh细胞、IL-21水平分别呈显

著正相关关系($r=0.538, 0.800, P<0.01$)；TLR4的表达与Tfh细胞、IL-21水平分别呈显著正相关关系($r=0.671, 0.660, P<0.01$)。

表1 两组外周血TLR2、TLR4的表达及IL-4、IFN- γ 、IL-6水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab. 1 Comparison of the expression of TLR2 and TLR4 and the levels of IL-4, IFN- γ and IL-6 in peripheral blood between the two groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	TLR2 (%)	TLR4 (%)	IL-4 (ng/L)	IL-6 (ng/L)	IFN- γ (ng/L)	IFN- γ /IL-4
健康对照组	15	19.86 \pm 8.25	27.22 \pm 5.61	19.29 \pm 6.76	8.23 \pm 3.06	33.59 \pm 4.74	1.30 \pm 0.38
HSP组	23	46.55 \pm 6.60	54.75 \pm 9.61	32.15 \pm 4.28	14.63 \pm 4.68	26.00 \pm 5.51	0.59 \pm 0.22
<i>t</i> 值		11.042	10.016	7.201	4.672	8.750	6.515
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表2 HSP组患儿TLR2、TLR4的表达与相关因子水平的相关性

Tab. 2 Correlation between TLR2 and TLR4 and related factors in children with HSP

变量		IL-4	IFN- γ /IL-4	IL-6
TLR2	<i>r</i> 值	0.616	-0.751	0.699
	<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001
TLR4	<i>r</i> 值	0.811	-0.762	0.624
	<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001

表3 两组Tfh细胞及IL-21表达水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab. 3 Comparison of Tfh cells and IL-21 expression levels between the two groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	Tfh细胞 (%)	IL-21 (ng/L)
健康对照组	15	6.28 \pm 2.69	57.88 \pm 16.89
HSP组	23	13.95 \pm 3.16	97.31 \pm 10.96
<i>t</i> 值		7.734	8.750
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

3 讨论

HSP作为一种儿童常见的自身免疫性血管炎,主要是以皮肤黏膜的小血管炎症为病变基础,可伴有关节肿痛、消化道出血等临床症状;绝大多数患儿通过临床治疗后预后一般较好,但当病变累及肾脏时,有小部分患儿可能最终进展成终末期肾衰竭,死于严重的并发症^[6]。目前,HSP的发病机制尚未完全阐明。有研究表明,Th1/Th2细胞、Th17/Treg细胞的免疫平衡失调参与了HSP的发病机制^[7]。TLRs是近年来新发现的一类I型跨膜蛋白表面信号转导受体,目前至少有11个成员(TLR1~11)被发现。目前,已证实的TLR的信号转导通路主要有髓样分化因子88(myeloid differentiation protein 88, MyD88)依赖途径和MyD88非依赖途径两种途径^[8-9]。TLRs作用多样,其不仅可以通过上述途径促进机体细胞因子的合成与释放,引发炎症反应,而且还可以促进抗原提呈

细胞的成熟,从而诱导机体的获得性免疫反应。HSP患者最常见的诱因是感染,而感染使TLRs传导途径异常活化,干扰自身免疫调节机制,导致自身免疫性疾病的发生。本研究发现,TLR2、TLR4活化可能参与了HSP的发病;同时发现HSP组升高的TLR2及TLR4细胞表达与血浆IL-4、IL-6水平呈显著正相关,与IFN- γ /IL-4比值呈显著负相关关系,与国内外研究结果相一致^[10-11]。笔者推测,活化的TLR2、TLR4细胞可能通过多种机制调节Th1/Th2细胞的免疫应答,使Th2细胞过度活化,导致IL-4、IL-6等多种促炎因子大量释放,从而引起HSP的发病。而其中通过其胞浆作用域与MyD88的羧基末端相互作用形成复合物通过MyD88的死亡结构域与白细胞介素-1受体相关激酶(IRAK)相互作用并使其磷酸化,磷酸化的IRAK再与肿瘤坏死因子受体相关因子6(TNFA6)相结合,活化的TNFA6与NF- κ B抑制蛋白(NF- κ B inhibitor, I κ B)相互作用使其磷酸化降解,NF- κ B得以激活并转入胞核中并诱导其下游多种炎症因子表达,从而改变Th1/Th2免疫应答的平衡可能是其主要作用机制之一^[12]。

Tfh细胞在诱导B淋巴细胞增殖、分化及产生抗体的各个环节均发挥着重要的辅助功能。目前,有关Tfh细胞的特异性转录因子尚不清楚,但有多种证据倾向于认为Bcl-6可能调控初始T细胞发育为Tfh。IL-21作为Tfh细胞分泌的特异性细胞因子,具有广泛的免疫性功能。IL-21不仅可以诱导所有B细胞亚群分化为Ig分泌细胞,分泌大量IgM、IgG和IgA,而且其对于Tfh细胞的产生分化、生发中心的形成也发挥了至关重要的作用^[13-14]。有研究表明,当Tfh细胞表达和(或)功能出现异常时,会引起体内抗体异常表达,从而导致SLE、类风湿性关节炎及干燥综合征等自身免疫性疾病的发生^[15-16]。本研究发现,

HSP 急性期患儿外周血中 Tfh 细胞比例及血浆 IL-21 水平较正常儿童上升,而 Tfh 细胞比例与 IL-21 水平亦呈显著正相关,表明 Tfh 细胞异常活化诱导 IL-21 的过量分泌也可能是 HSP 的发病机制之一。Rookhuizen 等^[17]研究发现 TLR9 可以通过其信号转导促进更多的 Tfh 细胞的产生及增强生发中心(GC)反应,同时增加对 IgG2a 的类别转换,亲和力成熟以及记忆抗体反应。而 Ugolini 等^[18]研究也报道了 TLR8 是 Tfh 细胞分化的重要驱动因素。但有关 TLR2、TLR4 与 Tfh 细胞之间的联系,目前尚未见报道。本研究进一步发现,HSP 急性期患儿外周血中 TLR2、TLR4 相对表达量与 Tfh 细胞及血浆 IL-21 水平均呈显著正相关关系。笔者推测,TLR2、TLR4 的异常活化导致 IL-6 高水平表达,其与 Tfh 细胞表面的 IL-6R 相结合从而参与 Tfh 细胞分化,可能是介导 HSP 发生发展的作用机制之一,期待今后更多相关的深入研究及探讨。

综上所述,TLR2、TLR4 的异常活化可能参与了 HSP 的发生发展,而通过上调 Tfh、Th2 细胞的免疫应答从而诱导 IL-21、IL-4、IL-6 等炎症因子释放则可能是其参与发病的途径之一。通过检测或者干预上述因子,有望为今后 HSP 临床诊断及治疗提供新靶点,为探索 HSP 发生发展免疫学机理提供新思路。

参考文献

- [1] Yang YH, Hung CF, Hsu CR, et al. A nationwide survey on epidemiological characteristics of childhood Henoch-Schönlein purpura in Taiwan[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2005, 44(5): 618-622.
- [2] Lau KK, Suzuki H, Novak J, et al. Pathogenesis of Henoch-Schönlein purpura nephritis[J]. *Pediatr Nephrol*, 2010, 25(1): 19-26.
- [3] 弓莉, 王元占. TLRs 在系统性红斑狼疮中的研究进展[J]. *热带医学杂志*, 2016, 16(1): 116-118.
Gong L, Wang YZ. Research progress on TLRs in systemic lupus erythematosus[J]. *J Trop Med*, 2016, 16(1): 116-118.
- [4] Fischer A, Abdollahi-Rodsaz S, Yau ACY, et al. P020 Toll-like receptor 9 influences inflammatory arthritis and osteoclastogenesis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2018, 77 Suppl 1: A22.
- [5] 中华医学会儿科学分会肾脏病学组, 姚勇, 杨霁云, 等. 小儿肾小球疾病的临床分类、诊断及治疗[J]. *中华儿科杂志*, 2001, 39(12): 746-749.
Nephrology Group of Pediatrics Branch of Chinese Medical Association, Yao Y, Yang JY, et al. Clinical classification, diagnosis and treatment of glomerular diseases in children[J]. *Chin J Pediatr*, 2001, 39(12): 746-749.
- [6] Chen JY, Mao JH. Henoch-Schönlein purpura nephritis in children: incidence, pathogenesis and management[J]. *World J Pediatr*, 2015, 11(1): 29-34.
- [7] 王晓莉, 朱志伟, 孔智培. 过敏性紫癜患儿外周血 miR-145 表达水平及其与 Th1/Th2 失衡的关系研究[J]. *热带医学杂志*, 2020, 20(4): 501-504.
Wang XL, Zhu ZW, Kong ZP. Study on the expression of miR-145 and its relationship with Th1/Th2 imbalance in children with henoch schonlein Purpura[J]. *J Trop Med*, 2020, 20(4): 501-504.
- [8] Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2001, 1(2): 135-145.
- [9] Ullah MO, Sweet MJ, Mansell A, et al. TRIF-dependent TLR signaling, its functions in host defense and inflammation, and its potential as a therapeutic target[J]. *J Leukoc Biol*, 2016, 100(1): 27-45.
- [10] 常红, 张秋业, 程娜, 等. 过敏性紫癜患儿外周血单个核细胞 TLR2、TLR4 表达及其与 Th1 和 Th2 型免疫应答相关性观察[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2013, 33(11): 839-844.
Chang H, Zhang QY, Cheng N, et al. Study on the expression of TLR2 and TLR4 in peripheral blood mononuclear cells and their relationship with Th1/Th2 immune response in patients with Henoch-Schönlein purpura[J]. *Chin J Microbiol Immunol*, 2013, 33(11): 839-844.
- [11] 陆焯, 方凤, 袁洁, 等. 过敏性紫癜患儿 PBMC 中 Toll 样受体 2, 4 表达与 T 细胞亚群的关系研究[J]. *现代检验医学杂志*, 2017, 32(6): 46-49.
Lu Y, Fang F, Yuan J, et al. Expression of toll like receptor 2, 4 in PBMC cells of children with henoch schonleinpurpura and its relationship with T-cell subgroups[J]. *J Mod Lab Med*, 2017, 32(6): 46-49.
- [12] 张自力, 王高峰, 梅道启, 等. 过敏性紫癜患儿外周血单核细胞 TLR2 表达及与免疫应答的相关性[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(45): 7356-7361.
Zhang ZL, Wang GF, Mei DQ, et al. TLR2 expression in peripheral blood mononuclear cells of Henoch-Schönlein purpura children and its association with immune response[J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2015, 19(45): 7356-7361.
- [13] King C. New insights into the differentiation and function of T follicular helper cells[J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(11): 757-766.
- [14] Spolski R, Leonard WJ. IL-21 and T follicular helper cells[J]. *Int Immunol*, 2010, 22(1): 7-12.
- [15] Choi JY, Ho John HE, Pasoto SG, et al. Circulating follicular helper-like T cells in systemic lupus erythematosus: association with disease activity[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2015, 67(4): 988-999.
- [16] Yu MX, Cavero V, Lu Q, et al. Follicular helper T cells in rheumatoid arthritis[J]. *Clin Rheumatol*, 2015, 34(9): 1489-1493.
- [17] Rookhuizen DC, DeFranco AL. Toll-like receptor 9 signaling Acts on multiple elements of the germinal center to enhance antibody responses[J]. *PNAS*, 2014, 111(31): E3224-E3233.
- [18] Ugolini M, Gerhard J, Burkert S, et al. Recognition of microbial viability via TLR8 drives TFH cell differentiation and vaccine responses[J]. *Nat Immunol*, 2018, 19(4): 386-396.

收稿日期: 2021-07-02 修回日期: 2021-08-20 编辑: 石嘉莹