

体外阻断 CD134 对过敏性紫癜患者外周血单个核细胞 TH1 和 TH2 细胞因子表达的影响*

王 竹, 郑利雄, 黄炳坤(广东省深圳市福田区中医院 518034)

【摘要】 目的 探讨 CD134/CD134L 共刺激分子对 TH1/TH2 细胞因子表达的影响及在过敏性紫癜(HSP)发病机制中的可能作用。**方法** 活动期 HSP 患者 10 例, 分别采集外周静脉血, 用密度梯度离心法制备新鲜外周血单个核细胞(PBMC), 分成: (1) 对照培养组; (2) 单纯刺激组; (3) 抗 CD134 组; (4) 地塞米松(Dex)组。另选取 10 例健康体检者作为健康对照组。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法分别测定培养上清液中干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素-4(IL-4)表达水平。**结果** (1) 在植物血凝素(PHA)刺激前, 活动期 HSP 患者 PBMC 培养液上清分泌的 IL-4 水平明显高于健康对照组, 而 IFN- γ 低于健康对照组; (2) 在 PHA 刺激下, 活动期 HSP 患者 PBMC 分泌的 IL-4 又较刺激前明显增加; (3) 抗-CD134 单抗可使经 PHA 刺激的 HSP 患者 PBMC 分泌 IL-4 水平显著下降, 导致 IFN- γ 水平增高, 免疫应答朝 TH1 方向偏离; (4) Dex 能显著抑制 PHA 刺激的原代培养 PBMC 中 IL-4、IFN- γ 的分泌水平。**结论** 糖皮质激素的抗炎机制具有多重性, 对 TH1、TH2 细胞因子的作用并不均衡; 抗-CD134 单抗对减轻 HSP 患者 PBMC 的异常活化有一定作用。

【关键词】 细胞因子; 过敏性紫癜; 干扰素- γ ; 白细胞介素-4

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.04.027 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)04-0434-02

过敏性紫癜(HSP)是以全身广泛性血管炎为主要病理改变的常见病, 本病因及发病机制尚未完全清楚, 研究表明, HSP 患者存在免疫调节功能紊乱^[1]。近年 Weinberg 等^[2]研究发现, 共刺激分子 CD134(OX40)和它的配体 CD134L 在自身免疫反应及炎症过程中发挥重要作用。作者应用抗-CD134 单抗(ACT35)在体外阻断活动期 HSP 患者外周血单个核细胞(PBMC)的 CD134/CD134L 共刺激途径后, 观察对培养上清液中 T 细胞分泌的 TH1(IFN- γ)和 TH2(IL-4)细胞因子的影响, 以探讨 CD134/CD134L 共刺激分子对 TH1、TH2 细胞因子表达的影响及其在 HSP 发病机制中的可能作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 HSP 组 10 例均选自 2008 年 6 月至 2009 年 4 月深圳市人民医院及福田区中医院的就诊患者, 具有典型皮疹, 并伴有腹痛以及关节痛, 处于疾病急性期。男女各 5 例, 采血前未使用糖皮质激素及其他免疫抑制剂。对照组 10 例系门诊体检的健康人群。对照组与病例组在年龄、性别构成等方面差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 实验方法

1.2.1 外周血单个核细胞的分离、培养 10 例新入院患者和 10 例健康体检者, 早晨分别空腹抽取外周静脉血 10 mL, 密度梯度离心法分离 PMBC, 含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基将 PMBC 制成细胞悬液。

1.2.2 PMBC 的培养及分组 以植物血凝素(PHA)刺激活化 T 细胞, 设对照培养组、单纯刺激组、抗-CD134 单抗组和地塞米松组和健康对照组, (1)对照培养组: 将 2×10^6 /mL 淋巴细胞加入培养皿, 培养 48 h 后离心收集培养上清液。(2)单纯刺激组: 将相同数量的淋巴细胞加入培养皿, 加入 PHA 20 pg/mL 刺激 T 细胞活化, 48 h 后收集培养上清液。(3)抗 CD134 组: 将同样数量的淋巴细胞加入培养皿, 加入 PHA 20 pg/mL 刺激 T 细胞活化, 同时加入 20 μ g/mL 抗 CD134 单抗, 余下步骤同(2)。(4)地塞米松(Dex)组: 将 2×10^6 /mL 淋巴细胞加入培养皿后, 加入 PHA 20 pg/mL 刺激 T 细胞活化, 同时加入

Dex 1 μ g/mL, 余下步骤同(2)。(5)健康对照组: 每例健康体检者分离得到的 PBMC 作为健康对照组, 处理方法与对照培养组相同。

1.2.3 培养上清液中 IFN- γ 、IL-4 的检测 采用酶联免疫法检测, 购买试剂盒, 按照说明书操作, 酶标仪读出结果。

1.3 统计学方法 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS11.0 统计软件处理, 组间比较用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 活动期 HSP 患者在 PHA 刺激前(对照培养组), 其 PBMC 培养上清液分泌的 IL-4 水平都明显高于健康对照组($P < 0.01$), 而 IFN- γ 低于健康对照组($P < 0.05$)。

2.2 活动期 HSP 患者在 PHA 刺激后(单纯刺激组), 其 PBMC 培养上清液分泌的 IL-4 水平又明显高于刺激前(对照培养组)的水平($P < 0.01$), 而 IFN- γ 改变不明显。

2.3 抗-CD134 单抗组 PBMC 分泌 IL-4 水平与单纯刺激组相比显著下降($P < 0.01$), IFN- γ 的水平与对照培养组和单纯刺激组相比都显著增加($P < 0.05$)。

表 1 各组 PBMC 培养液上清分泌 IFN- γ 和 IL-4 的水平比较 (ng/L, $n = 10$)

组别	IFN- γ	IL-4
健康对照组	9.32 \pm 3.87	12.36 \pm 5.52
对照培养组	7.47 \pm 2.48	60.71 \pm 19.33
单纯刺激组	7.86 \pm 3.45	137.52 \pm 34.54
抗-CD134 单抗组	16.12 \pm 4.15	53.20 \pm 15.36
Dex 组	5.06 \pm 1.69	79.26 \pm 20.84

2.4 Dex 组 PBMC 分泌 IL-4 水平与对照培养组相比差异无统计学意义($P > 0.05$), 但显著低于单纯刺激组($P < 0.05$); 而 PBMC 分泌 IFN- γ 的水平低于对照培养组及单纯刺激组, 差异

* 基金项目: 深圳市福田区科技局基金项目(FTWS032)。

有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

3 讨 论

过敏性紫癜(HSP)的发病机制尚未明了。TH 细胞异常活化及其分泌的细胞因子在调节 SHP 的免疫反应和促进病理性自身抗体的产生中起着关键性作用。依据所产生的细胞因子的不同,TH 细胞主要分为 TH1、TH2 两类。目前对于 HSP 中 TH1/TH2 细胞因子平衡的偏向性尚无定论,各家报道不一。既往研究发现 HSP 急性期 TH2 类细胞因子如 IL-4、IL-5 等分泌增加,且 IL-4 与 IgE、IL-5 与 IgA 间存在正相关;而 TH1 类细胞产生的 IFN- γ 分泌减少,推测 TH2 优势活化在促进 HSP 炎症的发展中都起着重要的作用^[3]。本研究的观察结果也显示,活动期 HSP 患者在 PHA 刺激前,其 PBMC 培养上清液分泌的 IL-4 水平已明显高于健康对照者,IFN- γ 明显低于健康对照组;而在 PHA 刺激后,PBMC 分泌的 IL-4 又较刺激前显著增加,IFN- γ 无明显改变,表明 HSP 患者 PBMC 中 TH2 类细胞存在异常活化。TH2 细胞因子分泌增高,可能是导致 HSP 的炎症反应和组织损伤主要因素。

Dex 作为一种广谱的免疫抑制剂,是治疗 HSP 的传统药物。以往的研究指出,糖皮质激素在 TH1 和 TH2 平衡的免疫调节中有选择性作用,Agarwal 和 Marshall^[4] 的研究发现,Dex 可通过抑制 TH1 类细胞因子的产生而引发 TH2 类细胞因子水平的相对升高,TH1/TH2 平衡偏向 TH2 应答。本研究发现,对于活动期 HSP 患者,Dex 能显著抑制 PHA 刺激的原代培养 PBMC 中 IL-4、IFN- γ 的分泌水平,表明糖皮质激素的抗炎机制具有多重性,对 TH1、TH2 细胞因子的产生均有调节作用。

近年来,对于 CD134/CD134L 共刺激分子影响 TH1 和 TH2 细胞分化的研究日益受到重视。Ohshima 等^[5] 的研究表明,CD134 可以和抗原提呈细胞 (APC) 或 B 细胞上的 CD134L 结合,诱导 CD4⁺ T 细胞产生 TH2 类 (IL-4) 细胞因子,阻断 CD134 可抑制 TH2 类细胞因子及相关的抗体同种型 IgG1 和 IgE 产生,而促进炎症性 TH1 反应。本实验结果也显

示,对于活动期 HSP 患者,抗-CD134 单抗可显著抑制 TH2 细胞的功能,使经 PHA 刺激的 PBMC 分泌 IL-4 的水平显著下降,免疫应答朝 TH1 方向偏离,导致 IFN- γ 的水平增高。表明抗-CD134 抗体与 CD4⁺ T 细胞表面的 CD134 结合,能抑制 CD134 与 APC 或 B 细胞上的 CD134L 结合,诱导 TH 细胞类型转换,TH2 细胞功能受抑制。因此,抗-CD134 抗体在减轻 HSP 炎症的治疗中也许是有利的,但它的更大的优势可能在于治疗慢性反复发作性自身免疫病,因为抗-CD134 抗体在不需要鉴别引起自身免疫病究竟是何种自身抗原时,即能被其他活化的自身反应性 T 细胞库(特异性 CD4⁺ T 细胞)作为靶点而清除,有效地控制免疫损伤作用。

参考文献

- [1] 李秋. 过敏性紫癜 T 淋巴细胞功能状态的研究[J]. 中华儿科杂志, 2001, 39(2): 157-159.
- [2] Weinberg AD. Antibodies to OX40 (CD134) can identify and eliminate autoreactive T cells; implications for human autoimmune disease [J]. Mol Med Today, 1998, 4: 76.
- [3] 朱国际. 儿童过敏性紫癜 CD40、CD40L 的表达[J]. 中华血液流变学杂志, 2005, 15(1): 115-117.
- [4] Agarwal SK, Marshall GD. Dexamethasone promotes type 2 cytokine production primarily through inhibition of type 1 cytokines[J]. J Interferon Cytokine Res, 2001, 21 (3): 147-155.
- [5] Ohshima Y, Yang LP, Uchiyama T, et al. OX40 costimulation enhances interleukin24(IL-24) expression at priming and promotes the differentiation of naive human CD4⁺ T cells into high IL-24 producing effectors[J]. Blood, 1998, 92(9): 3338-3345.

(收稿日期: 2010-09-06)

• 临床研究 •

尿液干化学分析法检测尿中红细胞与白细胞结果假阴性的探讨

胡 卫(湖南省株洲市一医院检验科 412000)

【摘要】 目的 对 AX-4280 全自动尿液分析仪(尿液干化学法分析仪)检测尿液中红细胞、白细胞产生假阴性结果的原因进行分析探讨。**方法** 对 914 例患者经尿液干化学法分析仪检测全为阴性的标本进行显微镜检查。**结果** 914 例经尿液干化学法分析仪检测为全阴性的标本,经显微镜检查,红细胞镜检阳性数为 34 例,假阴性率约为 3.7%,白细胞镜检阳性数为 93 例,假阴性率约为 10.2%。**结论** 在使用尿液干化学法分析仪检测为全阴性的结果时,为了避免不漏诊、不误诊,实验室应选择性进行显微镜检查。

【关键词】 尿分析; 干化学法; 显微镜检查

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.04.028 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)04-0435-02

尿液干化学分析仪是利用试带垫中含有的特定试剂,同尿液中的化学成分进行化学反应产生的颜色变化进行检查的方法,可在 1 min 内对尿中化学成分葡萄糖、胆红素、酮体、尿胆原、亚硝酸盐、蛋白质及有形成分红细胞、白细胞进行半定量分析,可大大简化操作程序,提高工作效率。对于干化学法检测尿液全阴性的标本是否应该镜检一直成为尿液检查争议的论点^[1]。为此,作者对 914 例干化学法检测全阴性的尿液标本进行镜检,以探讨其出现假阴性的原因,报道如下。

1 资料与方法

1.1 标本来源 收集本院 2010 年 6~7 月住院患者晨尿标本,随机挑选经干化学检测结果为全阴性的尿液标本 914 例,其中男 384 例,女 530 例,年龄 1~92 岁,平均(46±6)岁。

1.2 标本采集 用一次性塑料杯收集住院患者清晨中段尿 5~10 mL 立即送检,并于 2 h 内检测完毕。

1.3 试剂与仪器 日本 ARKRAY 公司生产的 AX-4280 全自动尿液分析仪及配套的尿 10 项试纸条。日本 OLYMPUS 双