

过敏性紫癜患儿血清中 IL-33 和可溶性受体的水平及其临床意义

王菲¹, 董丽丽^{2*}山东大学附属省立医院¹血液科, ²儿外科, 山东济南 250021

摘要 目的:探讨白介素 33 (IL-33)和可溶性受体(sST2)在过敏性紫癜(allergic purpura, Henoch-Schönlein purpura, HSP)患儿血清中的水平及其临床意义。方法:采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测 27 例 HSP 患儿和 22 名正常对照者血清 IL-33 和 sST2 水平;应用实时定量 RT-PCR 方法检测 IL-33 和 sST2 水平的 mRNA 表达。结果:HSP 患儿血清 IL-33 水平为 365.5 ± 160.6 pg/ml,较正常对照组 175.9 ± 92.8 pg/ml 明显升高($P < 0.05$);而 HSP 患儿血清中 sST2 水平为 1788.6 ± 523.8 pg/ml,较正常对照组 1083.6 ± 489.6 pg/ml 亦有升高,但差异无统计学意义($P > 0.05$),sST2/IL-33 比值在 HSP 患儿明显降低($P < 0.05$)。RT-PCR 结果显示,HSP 患儿 IL-33 mRNA 水平和 sST2 mRNA 水平较正常对照组分别升高(5.47 ± 1.97)倍和(3.13 ± 2.01)倍,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。sST2/IL-33 mRNA 比值在 HSP 患儿明显降低($P < 0.05$)。结论:HSP 患儿血清 IL-33 和可溶性受体水平较正常儿童升高,而 sST2/IL-33 比值较正常儿童明显降低。

关键词 过敏性紫癜;白介素 33;可溶性受体;儿童

中图分类号 R554.6

文献标识码 A

doi:10.7534/j.issn.1009-2137.2017.02.038

IL-33 and sST2 levels in Serum of Children with Henoch-Schönlein Purpura and Their Clinical Significance

WANG Fei¹, DONG Li-Li^{2*}

¹Department of Hematology, ²Department of Pediatric Surgery, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, Shandong Province, China

* Corresponding Author: DONG Li-Li, Supervising Nurse. E-mail: dlilisdu@sina.com

Abstract **Objective:** To investigate the serum IL-33 and sST2 levels in children with Henoch-Schönlein purpura (HSP), and explore their clinical significance. **Methods:** Total 27 HSP patients and 22 healthy controls were enrolled in present study. The expressions of IL-33 and sST2 were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Using real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR), the mRNA expression of IL-33 and sST2 were detected in all subjects. **Results:** The level of the IL-33 in the serum of HSP group and control group was 365.5 ± 160.6 pg/ml and 175.9 ± 92.8 pg/ml ($P < 0.05$). The level of the sST2 was increased in the serum of HSP group (1788.6 ± 523.8 pg/ml) as compared with that in control group (1083.6 ± 489.6 pg/ml) ($P > 0.05$), but the ratio of sST2/IL-33 in HSP patients was much lower than that in the controls ($P < 0.05$), IL-33 and sST2 mRNA levels were up-regulated in HSP patients by 5.47 ± 1.97 -fold ($P < 0.05$) and 3.13 ± 2.01 -fold ($P < 0.05$) compared with controls, but sST2/IL-33 significantly decreased in HSP patients ($P < 0.05$). **Conclusion:** The levels of IL-33 and sST2 increase in the serum of HSP patients, but the ratio of sST2/IL-33 is much lower than that in control.

Key words Henoch-Schönlein purpura; interleukin 33; soluble ST2; children

J Exp Hematol 2017; (2):517-521

过敏性紫癜(allergic purpura, Henoch-Schönlein purpura, HSP)是一种小血管炎症性疾病,常累及皮肤、胃肠道、肾脏、关节等器官,且该病发病机制迄今为止尚未完全阐明。研究表明,异常表达的炎症相关因子在 HSP 发病中发挥重要作用。白介素 33(interleukin, IL-33)是近年来新发现的 IL-1 家族成员,又被称为 IL-1F11,而 IL-1 家族还包括 IL-1 α 、IL-1 β 和 IL-18 等经典细胞因子^[1]。研究表明,IL-

33 可通过与其受体 ST2(homolog of sulfotransferase)和辅助蛋白结合传递活化信号,激活 NF- κ B 和 MAPK 等通路,诱导 Th2 型细胞因子及趋化因子的释放,发挥免疫调节作用^[2]。IL-33 受体 ST2 有 3 种亚型:ST2V、ST2L 和 sST2。ST2V 主要在胃、小

基金项目:国家自然科学基金项目(81570104)

* 通讯作者:董丽丽,主管护师。E-mail: dlilisdu@sina.com
2016-12-01 收稿;2017-01-11 接受

肠、大肠和脾中表达^[3]。ST2L 作为 IL-33 主要受体引起信号传导,调节 Th2 依赖性炎症过程。而 sST2 (soluble ST2) 为可溶性受体,不能引起信号传导,其主要作用是 与 IL-33 结合从而抑制 IL-33 和 ST2L 结合后的信号传导^[1,4-6]。IL-33 及其受体在自身免疫性疾病、变态反应性疾病、心血管疾病及神经退行性疾病中发挥重要作用并得到了广泛的研究^[7-9],但 IL-33 及可溶性受体在过敏性紫癜患儿中研究相对较少。

本研究采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 和实时定量 RT-PCR 法检测 HSP 患儿和正常对照组血清中 IL-33 和 sST2 的水平及其 mRNA 表达,旨在初步探讨 IL-33 和 sST2 在 HSP 发病机制中的作用,为 HSP 的治疗提供新的策略和方向。

材料与方法

病例资料

选取 2015 年 8 月至 12 月山东大学附属省立医院门诊及住院部 27 例 HSP 患者,患者均符合 2006 年欧洲抗风湿病联盟和欧洲儿科风湿病学会 (EULAR/ PReS) 过敏性紫癜诊断标准^[10]。在 27 例中男 15 例,女 12 例,中位年龄 10 (4 - 12) 岁。同时选取本院同期健康体检儿童 22 名,其中男 10 名,女 12 名,中位年龄 11 (3 - 14) 岁,均无血液系统相关疾病史。所有受试者家属均签署知情同意书,并经医院学术伦理委员会批准。

仪器与试剂

淋巴细胞分离液 (天津市灏洋生物制品科技有限责任公司);IL-33 ELISA 盒 (美国 Usclnife 公司),sST2 ELISA 盒 (美国 RD 公司);IL-4 ELISA 盒 (中国宝莱生物科技有限公司);全自动酶标仪 (美国 Bio-Bad 公司);Total RNA 提取试剂盒 (日本 TaKaRa 公司);cDNA 逆转录试剂盒 (日本 TaKaRa 公司);SYBRw Green PCR 试剂盒 (日本 Toyobo 公司);ABI PRISM[®] 7500 荧光定量 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公

司)。

标本采集

抽取患者及健康对照者肝素抗凝的静脉血 5 - 10 ml,360 × g 离心 15 min,无菌吸管吸取上层血浆于无菌 EP 管中留存。剩余血细胞用生理盐水稀释为 8ml 后缓慢加入盛有 4 ml 淋巴细胞分离液的无菌管中。640 × g 离心 20 min,无菌吸管小心吸取淋巴细胞层,用 5 倍体积的 PBS 洗涤 2 遍,4 300 × g 离心 3 min 留取单个核细胞,血浆及单个核细胞 - 80 °C 冻存。

ELISA 法检测

ELISA 双抗体夹心法检测血浆中 IL-33、sST2 及 IL-4 的水平。IL-33 ELISA 试剂盒最低检测限度为 7.8 pg/ml,sST2 试剂盒最低检测限度为 31.3 pg/ml,IL-4 ELISA 试剂盒最低检测限度为 2.0 pg/ml,严格按照试剂盒说明操作。

RT-PCR 测定

应用 Total RNA 提取试剂提取外周血单个核细胞总 RNA。严格按照 cDNA 逆转录试剂盒操作说明逆转录 RNA 为 cDNA。应用 ABI PRISM[®]7500 荧光定量 PCR 仪,采用 SYBRw Green 为双链 DNA 特异性染料标记扩增所需目的基因及内参。反应体系为:0.4 μl (10 μmol/L) 上下游引物,10 μl SYBRw Green,2 μl (100 ng) cDNA;7.2 μl 双蒸水,总体积为 20 μl。循环参数设定如下:95 °C 5 min 后 95 °C 15 s,60 °C 15 s,72 °C 35 s,连续 40 个循环 (表 1)。每个标本重复 3 次,所有的 PCR 产物均经溶解曲线分析以分辨目的产物与非特异产物以及引物二聚体,并且再经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳证实。

统计学分析

所有统计学处理采用统计软件 SPSS 13.0 for Windows 分析,数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示。RT-PCR 的定量结果采用 REST 软件分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

Table 1. Primers and conditions for the RT-PCR

Gene	Sequence (5' - 3')	T (°C)	Product (bp)
IL-33	ATCCCAACAGAAGGCCAAAG CCAAAGGCCAAAGCACTCCAC	60	198
sST2	GGATTGAGGCCACTCTGCTC CCGCTGCTCTTTGCTATGT	60	269
β -actin	TTGCCGACAGGATGCAGAA GCCGATCCACACGGAGTACT	60	101

结 果

HSP 患儿体内血清中 IL-33、sST2 及 IL-4 含量的变化

ELISA 双抗体夹心法检测血清中 IL-33、sST2 及 IL-4 的水平显示, HSP 患儿血清中 IL-33 及 IL-4 水平明显高于正常对照组儿童 ($P < 0.05$) (表 2)。

Table 2. Comparison of IL-33, sST2 and IL-4 levels between patients with HSP and healthy controls ($\bar{x} \pm SD$)

Group	n	IL-33 (pg/ml)	sST2 (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)
HSP	27	365.5 ± 160.6*	1788.6 ± 523.8	20.1 ± 14.7*
Control	22	175.9 ± 92.8	1083.6 ± 489.6	16.9 ± 13.0

* $P < 0.05$, compared with control group.

HSP 患儿 PBMNC 中 IL-33、sST2 基因表达水平的变化

实时定量 RT-PCR 法检测患者及健康者体内 PBMNC 中 IL-33、sST2 的基因表达水平。结果表明, HSP 患儿 PBMNC 中 IL-33 和 sST2 mRNA 表达水平均较正常对照组明显升高 ($P < 0.05$) (图 1)。

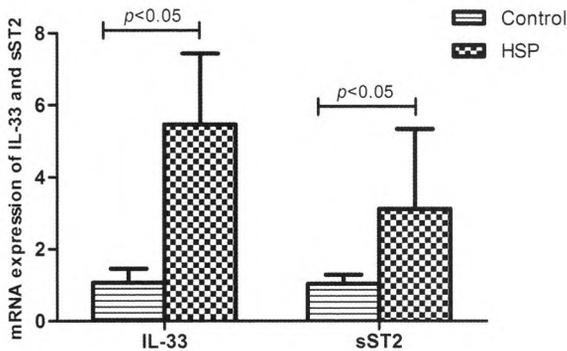


Figure 1. mRNA levels of IL-33 and sST2 in PBMNC of HSP patients and healthy controls.

HSP 患者 sST2/IL-33 比值的变化

经统计学作图分析, HSP 患儿血清中 sST2/IL-33 比值为 (4.84 ± 3.21), 明显低于健康对照组 (6.77 ± 3.84) ($P < 0.05$) (图 2)。HSP 患儿 PBMNC 中

sST2/IL-33 mRNA 表达比值与健康对照组相比, 亦见明显降低 ($P < 0.05$) (图 3)。

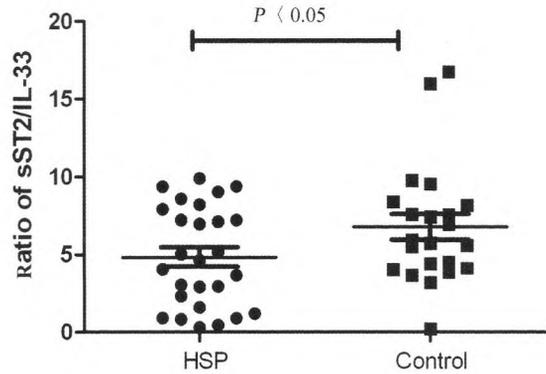


Figure 2. Ratio of sST2/IL-33 in serum of HSP patients and healthy controls.

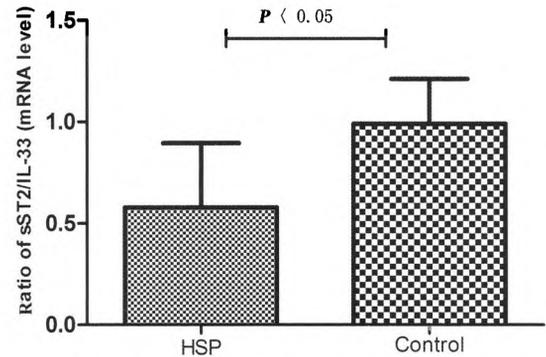


Figure 3. mRNA ratio of sST2/IL-33 in PBMNC of HSP patients and healthy controls.

讨 论

HSP 是一种常见的血管变态反应性疾病。其发病机制目前虽尚未明确, 但以 IgA 类免疫复合物沉积为异常的体液免疫导致血管内皮损伤是 HSP 发病的主要机制之一^[11]; Th1/Th2 细胞活化失衡, Th2 型细胞过度活化及细胞因子 IL-4、IL-6、TNF- α 过度分泌也是 HSP 发病的重要原因^[12]。IL-33 是近年新发现的一种多功能炎性细胞因子, 其基因序列及结构域和 IL-1 家族成员的 IL-1 β 和 IL-18 相似^[13], 都能够激活淋巴细胞、肥大细胞和嗜酸性粒细胞等诱导产生 Th2 类炎症细胞因子和趋化因子, 促进炎症的发生^[7,9,14]。大量研究证实, IL-33 在类风湿关

节炎、系统性硬化病、系统性红斑狼疮、干燥综合征等自身免疫病中发挥重要作用^[15-17],而 IL-33 在 HSP 患儿中的作用研究相对较少。Chen 等^[18]发现在成人 HSP 患者血清中 IL-33 水平明显升高,IL-33 不但与疾病的严重程度密切相关,并能刺激 IgA 自身抗体的产生,说明 IL-33 与 HSP 的发生发展可能存在密切关系。

本研究结果显示,HSP 患儿血清 IL-33 水平较正常对照组明显升高,这与 Chen 等^[18]的研究结果相似,因而进一步说明 IL-33 在 HSP 发病中发挥重要作用,其可能作用机制是 IL-33 与其受体 ST2 及辅助蛋白结合传递活化信号,激活 NF- κ B 和 MAPK 等通路,从而诱导 Th2 型细胞因子及趋化因子的释放,导致 HSP 的发生。这与本研究结果显示 HSP 患儿体内 Th2 型细胞因子 IL-4 水平较正常人明显升高相一致。Xu 等^[19]研究证实,IL-33 能提高 IL-6、IL-1 β 、IL-13 产生,同时能促进骨髓来源的肥大细胞合成趋化因子,而 Palmer 等^[20]在对类风湿关节炎的研究中显示抗 -ST2 抗体可降低 IL-33 诱导的 IL-6 分泌。这些研究都提示 IL-33 的升高可诱导 HSP 患者 IL-6 和 IL-1 β 等炎症因子的上调。Schmitz 等^[1]发现,接受 IL-33 注射的小鼠会出现脾脏肿大,体内单核细胞、浆细胞、嗜酸性粒细胞增加,血清 IgA、IgE、IL-5 及 IL-13 水平升高的现象,这提示 IL-33 的升高也同样可能会增加 HSP 患者 IgA 等炎症因子的产生,从而加重疾病进展。不仅如此,有研究显示 IL-33 可降低血管内皮细胞之间的钙黏蛋白的表达从而增加血管内皮细胞之间的通透性^[21-22],这可能是 HSP 血管内皮受损的原因之一。除此之外,本研究中 RT-PCR 结果显示,HSP 患者 IL-33 mRNA 水平较正常对照明显升高,这不仅进一步说明 IL-33 与 HSP 的发病存在密切联系,还说明在 HSP 患者中 IL-33 在转录水平已发生改变。因此,降低 HSP 患者体内 IL-33 水平可能是治疗 HSP 的一个新方向。

sST2 作为 IL-33 的可溶性受体并不能引起信号传导,而是与 IL-33 结合抑制 IL-33 和细胞膜上其他受体结合,从而抑制信号的传导^[1,4],这提示 sST2 可能抑制 Th2 型细胞因子及趋化因子的释放。有研究发现,以 Th1/Th2 细胞活化失衡,Th1 型细胞过度活化为特点的系统性红斑狼疮患者和干燥综合征患者血清中 sST2 相对于正常人明显升高^[23]。Shan 等^[24]研究发现,同样以 Th1 型细胞过度活化为特点的免疫性血小板减少症患者进展期 sST2 水平较正常人明显升高,而疾病缓解期 sST2 水平与健康对照

组无明显差异,这说明 sST2 与疾病发生发展存在密切联系。我们研究发现,HSP 患者血清中 sST2 水平虽轻度升高,但与正常对照组相比并无统计学意义,而 sST2/IL-33 比值明显降低,说明 HSP 患者体内 sST2/IL-33 的水平失衡,可能是导致 HSP 发生的重要原因。而 RT-PCR 结果显示 sST2/IL-33 mRNA 表达亦明显减低,纠正 HSP 患者体内 sST2/IL-33 水平的失衡可能会缓解 HSP 的发生发展。

综上所述,HSP 患儿体内 IL-33 和其可溶性受体水平明显升高,sST2/IL-33 比值发生失衡,说明 IL-33 和 sST2 在 HSP 的免疫紊乱和发生发展中可能起着重要的作用,但其具体作用机制还需进一步深入的研究。降低 IL-33 的水平或提高 sST2 的表达或许可以缓解 HSP 的发生与发展。因此,重塑 sST2/IL-33 平衡可能是治疗 HSP 的一个新的策略和方向。

参 考 文 献

- Schmitz J, Owyang A, Oldham E, *et al.* IL-33, an interleukin-1 like cytokine that signals *via* the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2 - associated cytokines. *Immunity*, 2005; 23(5): 479 - 490.
- Smith DE. Biological paths of IL-1 family members IL-18 and IL-33. *J Leukoc Biol*, 2011; 89(3): 383 - 392.
- Tago K, Noda T, Hayakawa M, *et al.* Tissue distribution and subcellular localization of a variant form of the human ST2 gene product, ST2V. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001; 285(5): 1377 - 1383.
- Hayakawa H, Hayakawa M, Kume A, *et al.* Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation. *J Biol Chem*, 2007; 282(36): 26369 - 26380.
- Palmer G, Gabay C. Interleukin-33 biology with potential insights into human diseases. *Nat Rev Rheumatol*, 2011; 7(6): 321 - 329.
- Liew FY. IL - 33; a Janus cytokine. *Ann Rheum Dis*, 2012; 71 Suppl 2: i101 - 104.
- Liew FY, Pitman NI, McInnes IB. Disease - associated functions of IL-33; the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol*, 2010; 10(2): 103 - 110.
- Makrinioti H, Toussaint M, Jackson DJ, *et al.* Role of interleukin 33 in respiratory allergy and asthma. *Lancet Respir Med*, 2014; 2(3): 226 - 237.
- Molofsky AB, Savage AK, Locksley RM. Interleukin-33 in Tissue Homeostasis, Injury, and Inflammation. *Immunity*, 2015; 42(6): 1005 - 1019.
- Ozen S, Ruperto N, Dillon MJ, *et al.* EULAR/PRES endorsed consensus criteria for the classification of childhood vasculitides. *Ann Rheum Dis*, 2006; 65(7): 936 - 941.
- Ozen S, Pistorio A, Iusan SM, *et al.* EULAR/PRINTO/PRES criteria for Henoch-Schonlein purpura, childhood polyarteritis nodosa,

- childhood Wegener granulomatosis and childhood Takayasu arteritis: Ankara 2008. Part II: Final classification criteria. *Ann Rheum Dis*, 2010; 69(5): 798 - 806.
- 12 Li YY, Li CR, Wang GB, *et al.* Investigation of the change in CD4⁺ T cell subset in children with Henoch-Schonlein purpura. *Rheumatol Int*, 2012; 32(12): 3785 - 3792.
- 13 Carriere V, Roussel L, Ortega N, *et al.* IL-33, the IL-1 - like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin - associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007; 104(1): 282 - 287.
- 14 Martin MU. Special aspects of interleukin-33 and the IL-33 receptor complex. *Semin Immunol*, 2013; 25(6): 449 - 457.
- 15 Wang S, Ding L, Liu SS, *et al.* IL-33: a potential therapeutic target in autoimmune diseases. *J Investig Med*, 2012; 60(8): 1151 - 1156.
- 16 Awada A, Nicaise C, Ena S, *et al.* Potential involvement of the IL-33 - ST2 axis in the pathogenesis of primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*, 2014; 73(6): 1259 - 1263.
- 17 Jung SM, Lee J, Baek SY, *et al.* The Interleukin 33/ST2 axis in patients with primary Sjogren syndrome: expression in serum and salivary glands, and the clinical association. *J Rheumatol*, 2015; 42(2): 264 - 271.
- 18 Chen T, Jia RZ, Guo ZP, *et al.* Elevated serum interleukin-33 levels in patients with Henoch-Schonlein purpura. *Arch Dermatol Res*, 2013; 305(2): 173 - 177.
- 19 Xu D, Jiang HR, Kewin P, *et al.* IL-33 exacerbates antigen - induced arthritis by activating mast cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008; 105(31): 10913 - 10918.
- 20 Palmer G, Talabot-Ayer D, Lamacchia C, *et al.* Inhibition of interleukin-33 signaling attenuates the severity of experimental arthritis. *Arthritis Rheum*, 2009; 60(3): 738 - 749.
- 21 Kuchler AM, Pollheimer J, Balogh J, *et al.* Nuclear interleukin-33 is generally expressed in resting endothelium but rapidly lost upon angiogenic or proinflammatory activation. *Am J Pathol*, 2008; 173(4): 1229 - 1242.
- 22 Choi YS, Choi HJ, Min JK, *et al.* Interleukin-33 induces angiogenesis and vascular permeability through ST2/TRAF6 - mediated endothelial nitric oxide production. *Blood*, 2009; 114(14): 3117 - 3126.
- 23 Margiotta DP, Navarini L, Vadacca M, *et al.* The IL33/ST2 axis in Sjogren syndrome in relation to disease activity. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016; 20(7): 1295 - 1299.
- 24 Li PP, Zhang XM, Yuan D, *et al.* Decreased expression of IL-33 in immune thrombocytopenia. *Int Immunopharmacol*, 2015; 28(1): 420 - 424.