

钙卫蛋白和晚期糖基化终末产物受体在儿童过敏性紫癜中的表达研究

王凤英, 黄路圣, 徐康, 叶林华, 黄云, 王小象, 殷荔

(扬州大学附属泰兴医院儿科, 江苏 泰兴 225400)

[摘要] 目的:研究过敏性紫癜(Henoch-Schoenlein purpura, HSP)患儿外周血钙卫蛋白(calprotectin, CP)、晚期糖基化终末产物受体(receptor of advanced glycosylation end products, RAGE)、超敏 C 反应蛋白(high sensitivity C-reactive protein, hs-CRP)的表达情况,探讨 CP 在 HSP 患儿中的意义。方法:选取 HSP 儿童(HSP 组)36 例和正常健康儿童(对照组)17 例。采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清 CP 的水平,应用逆转录-聚合酶链反应检测外周血单个核细胞中 RAGE mRNA 表达水平,全自动生化分析仪检测血清 hs-CRP 水平。结果:HSP 患儿血清 CP 表达量(22.51 ± 17.28) $\mu\text{g/L}$,低于对照儿童(67.73 ± 15.15) $\mu\text{g/L}$,差异有统计学意义($P < 0.001$);HSP 组和对照组儿童 RAGE mRNA 表达量差异无统计学意义($P > 0.05$);HSP 患儿血清 hs-CRP 表达量(11.16 ± 6.70) mg/L ,高于对照儿童(1.59 ± 1.02) mg/L ,差异有统计学意义($P < 0.001$)。混合型 HSP 患儿 CP 表达量(19.14 ± 14.11) $\mu\text{g/L}$ 低于单纯型患儿(43.90 ± 23.44) $\mu\text{g/L}$,差异有统计学意义($P < 0.05$);混合型 HSP 患儿 RAGE mRNA 表达量与单纯型相比差异无统计学意义($P > 0.05$);混合型 HSP 患儿 hs-CRP 表达量(12.80 ± 6.59) mg/L 较单纯型(5.95 ± 2.65) mg/L 增高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。HSP 患儿的 CP、RAGE、hs-CRP 的表达量均无性别差异。HSP 患儿 CP、RAGE 及 hs-CRP 的表达量均无明显相关性。结论:HSP 患儿 CP 低表达。在 HSP 中,RAGE 不是 CP 发挥作用的主要受体。

[关键词] 钙卫蛋白;晚期糖基化终末产物受体;超敏 C 反应蛋白;过敏性紫癜;儿童

[中图分类号] R725.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)03-0364-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20170324

过敏性紫癜(Henoch-Schoenlein purpura, HSP)是一种以小血管病变为主的变态反应性疾病,好发于学龄前和学龄期儿童,是儿童最常见的血管炎,常累及皮肤、关节、消化道、肾脏,其中病情又以肾脏受累最为严重,少数患儿可进展至慢性肾衰竭和终末期肾脏病。但迄今为止 HSP 病因和发病机制尚未完全清楚^[1],故对其病因和发病机制仍需进一步研究。钙卫蛋白(calprotectin, CP)是一种主要来源于中性粒细胞和单核-巨噬细胞的钙-锌结合蛋白质,具有抗微生物、抗细胞增殖、诱导细胞凋亡、免疫调节、调节炎症反应、促进肿瘤细胞生长等多种生物学作用^[2-3]。国外已有较多研究发现其与许多种疾病相关,大多认为其具有较好的临床应用前景,但亦有不一致的研究结论。在免疫性疾病方面,CP 在类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、骨关节炎、川崎病等中均有研究,但在 HSP 中的研究国内外均较少。晚期糖基化终末产物受体(receptor of advanced glycosylation end products, RAGE)是 CP 信号通路的主要受体之一。超敏 C 反应蛋白(high sensitivity C-reactive protein, hs-CRP)是使用高敏感检测方法检测到的低浓度 CRP,在 HSP 急性期 CRP 等反映炎症的指标可增高。本研究通过检测 HSP 患儿血 CP、

RAGE、hs-CRP 的表达水平,探讨 CP 是否参与儿童 HSP 的发病。

1 对象和方法

1.1 对象

选择扬州大学附属泰兴医院儿科住院和门诊治疗的 HSP 患儿。HSP 诊断符合 2013 年中华医学会儿科学分会免疫学组制定的儿童 HSP 循证诊治建议^[4]。HSP 患儿均为初次发病,病程 3 d 内;受检前 4 周内未使用任何糖皮质激素或细胞毒性药物;除外伴有其他儿内科疾病或 HSP 暂不能确诊者。对照组儿童为本院正常健康体检儿童,既往无过敏性疾病病史,4 周内未使用任何糖皮质激素或细胞毒性药物,采血前 24 h 无用药史,性别、年龄与 HSP 患儿相匹配。本研究经医院伦理委员会批准,所有受试对象家长均知情同意。

1.2 方法

1.2.1 标本采集

采用肝素钠抗凝管和非抗凝管同时采集 HSP 患儿治疗前和对照儿童外周静脉血各 2 mL,使用抗凝管采用密度梯度离心法分离出外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC),用

TRIzol 重悬, -80℃冰箱保存以备检测 RAGE mRNA 含量。非抗凝管离心取血清, -80℃冰箱保存以备检测 CP 含量。同时用临床免疫管采集外周血测定 hs-CRP 含量。

1.2.2 血清 CP 的检测

使用武汉伊莱瑞特生物科技有限公司的 ELISA 试剂盒, 采用酶联免疫吸附法检测血清 CP 水平, 按照仪器操作规程和试剂盒说明书要求进行, 严格质量控制, 减少误差。以标准品浓度作为横坐标, 吸光度值作为纵坐标, 绘制标准曲线, 得出标准方程, 根据标准方程计算出每个样本的浓度。

1.2.3 RAGE mRNA 表达水平检测

①mRNA 提取和 cDNA 合成, 严格按照 TRIzol 试剂盒 (Invitrogen 公司, 美国) 说明书的步骤用 PBMC 提取 mRNA, 然后将 mRNA 逆转录为 cDNA, 在 0.2 mL 的 EP 管里进行, 逆转录反应总体积为 20 μL。②RAGE 基因的表达量应用 SYBR Green I 荧光定量 PCR 试剂 (Thermo 公司, 美国) 检测, 反应体系为 25 μL (SYBR Green I 12.5 μL, cDNA 0.3 μL, 上下游引物各 0.3 μL, 加去核酸水至 25.0 μL)。PCR 反应条件: 95.0℃ 3 min 变性; 95.0℃ 30 s, 52.4℃ 30 s, 72.0℃ 60 s, 共 39 个循环。以 GAPDH 作为内参基因。RAGE、GAPDH 的引物设计和合成由生工生物工程 (上海) 有限公司完成。RAGE: 上游 5'-TCCAGGA-TGAGGGGATTTTC-3', 下游 5'-GGGAACACCAGC-CGTGAG-3'; GAPDH: 上游 5'-GGAGTCCACTG-GCGTCTT-3', 下游 5'-GAGTCCTTCCACGATAC-CAA-3'。③RAGE mRNA 表达水平用 ΔCt 值表示, ΔCt 为内参基因与目的基因 Ct 值差异, 为基因的相对表达量。

1.2.4 血清 hs-CRP 含量的检测

应用全自动生化分析仪检测血清 hs-CRP, 严格按照操作程序完成定标和检测, 同时进行室内质量控制。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间均数比较采用独立样本 *t* 检验。采用 Pearson 进行参数间的相关性分析, 同时进行方差齐性检验。P ≤ 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床资料

HSP 患儿 36 例, 其中男 21 例、女 15 例, 平均年龄 (7.8 ± 3.2) 岁, 仅有皮肤损害 8 例 (称为单纯

型), 有 28 例伴有皮肤外的脏器损害 (称为混合型, 其中有 23 例伴有关节症状, 16 例伴消化道症状, 5 例伴肾脏损害)。对照组儿童 17 例, 男 10 例、女 7 例, 平均年龄 (7.5 ± 2.5) 岁。两组儿童的年龄 (*t*=0.19, *P*=0.871)、性别 ($\chi^2=0.01$, *P*=0.931) 差异无统计学意义。

2.2 两组儿童 CP、RAGE、hs-CRP 含量及比较

HSP 组血清 CP 含量比对照组低, hs-CRP 含量比对照组高, 差异均有统计学意义 (*P* 均 < 0.001); HSP 组外周血单核细胞 RAGE mRNA 表达量比对照组低, 但差异无统计学意义 (*P* > 0.05, 表 1)。

表 1 HSP 组和对照组 CP、RAGE、hs-CRP 检测结果的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	CP(μg/L)	RAGE mRNA	hs-CRP(mg/L)
对照组(n=17)	67.73 ± 15.15	143.27 ± 82.52	1.59 ± 1.02
HSP 组(n=36)	22.51 ± 17.28	97.64 ± 66.70	11.16 ± 6.70
<i>t</i> 值	8.38	0.439	5.82
<i>P</i> 值	<0.001	0.665	<0.001

2.3 临床类型不同的 HSP 患儿 CP、RAGE、hs-CRP 检测结果比较

混合型 HSP 患儿 CP 表达量比单纯型低, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05); hs-CRP 表达比单纯型高, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05); RAGE mRNA 表达量比单纯型高, 但差异无统计学意义 (*P* > 0.05, 表 2)。

表 2 临床类型不同的 HSP 患儿 CP、RAGE、hs-CRP 检测结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

HSP 类型	CP(μg/L)	RAGE mRNA	hs-CRP(mg/L)
混合性(n=28)	19.14 ± 14.11	105.45 ± 87.34	12.80 ± 6.59
单纯型(n=8)	43.90 ± 23.44	70.25 ± 62.19	5.95 ± 2.65
<i>t</i> 值	2.61	0.33	2.47
<i>P</i> 值	0.017	0.746	0.020

2.4 性别不同 HSP 患儿 CP、RAGE、hs-CRP 检测结果比较

不同性别 HSP 患儿 CP、RAGE mRNA、hs-CRP 的表达量差异均无统计学意义 (*P* 均 > 0.05, 表 3)。

表 3 不同性别 HSP 患儿 CP、RAGE、hs-CRP 检测结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

性别	CP(μg/L)	RAGE mRNA	hs-CRP(mg/L)
男(n=21)	64.83 ± 14.16	39.63 ± 23.09	10.56 ± 5.09
女(n=15)	67.79 ± 14.82	12.20 ± 4.61	10.33 ± 7.71
<i>t</i> 值	0.39	0.73	0.10
<i>P</i> 值	0.703	0.474	0.919

2.5 HSP 组 CP 和 RAGE、hs-CRP 的相关性分析

HSP 患儿 CP 和 RAGE mRNA 的表达量无明显相关性 (*r*=0.438, *P*=0.069); CP 和 hs-CRP 的表达量

无明显相关性($r=-0.123, P=0.584$)

3 讨论

CP 属于 S100 家族,是一种杂合性的钙结合蛋白,是由 S100A8 与 S100A9 两种蛋白以共价键联合形成的异二聚体。这种蛋白在细胞内外均具有生物学活性,在细胞内可以结合钙离子及花生四烯酸产生生物学效应,释放出细胞外通过 RAGE 和 Toll 样受体 4 及其他受体发挥细胞外功能。CP 广泛分布于人体组织、体液及细胞中,参与了许多生理活动和病理过程,在许多炎症及自身免疫反应中发挥作用^[5]。CP 表达具有组织和细胞特异性,且有年龄差异。Oord 等^[6]报道健康人群中,4 岁以下儿童和婴幼儿的粪 CP 表达量高于 4 岁以上儿童和成人。研究发现,CP 跟多种感染性疾病、自身免疫性疾病、心血管疾病、糖尿病等相关,一般认为可作为炎症性肠病(inflammatory bowel disease,IBD)、类风湿性关节炎、骨关节炎、系统性红斑狼疮、皮炎、川崎病等炎症过程中的标志物,病情疗效检测指标^[3,7-11]。但 CP 在上述及其他疾病中的研究有相反结论,且对其作用机制的研究也不尽一致。有研究者认为粪 CP 在其他胃肠道炎症状态下也会增高,不是 IBD 的特异性标志物,但可用于监测治疗反应^[12]。Mahler 等^[13]的研究发现 CP 在膝、髌、手骨关节炎中不起重要作用,不能作为该病的炎症标志物。一项在心血管疾病中的 Meta 分析认为 CP 不符合作为心血管疾病诊断和预后因子的要求^[14]。CP 可调节细胞因子的分泌,但作为促炎介质或抗炎介质的报道亦不一。

目前国内外对 CP 在 HSP 中的相关研究较少。Kawasaki 等^[15]研究发现 CP 在紫癜性肾炎血清中的表达较对照组增高,且与 E 选择素表达有相关性,提示 CP 可能与 HSP 肾损害及内皮细胞功能失调有关。hs-CRP 敏感性和特异性均较 CRP 高,是临床常用的炎症检测标志物。新近研究表明 CRP 本身也是促炎症介质,其水平高低与炎症反应的程度有关^[16]。本研究 HSP 组 hs-CRP 水平显著高于对照组,与有关文献报道一致^[17],且混合型 hs-CRP 表达水平较单纯型增高,提示 hs-CRP 高者炎症反应重。本研究发现 HSP 患儿 CP 表达量降低,但与炎症指标 hs-CRP 无相关性,提示 CP 不能作为 HSP 患儿的炎症标志物;分型统计结果显示混合型 HSP 患儿的 CP 表达较单纯型明显低,提示 HSP 患儿 CP 降低明显者炎症更明显,更容易累及皮肤外的其他脏器,故 CP 可能对 HSP 起一定保护作用,保护 HSP 患儿免

于出现多脏器受累混合类型。Perera 等^[18]研究认为糖皮质激素和 IL-10 可促进 CP 表达,提示了 CP 作为抗炎介质的可能性,我们分析 CP 在儿童 HSP 中可能也发挥了抗炎作用,由于其表达减低,不能拮抗炎症因子的致炎作用,从而导致全身小血管的损伤和炎症。RAGE 是一种表达在免疫细胞和炎症细胞上的跨膜受体,通过结合配体引起炎症反应,CP 是其配体之一。由于 CP 可通过多种配体发挥作用,在本研究中 HSP 组 CP 表达量减低,混合型 HSP 组 CP 表达量亦降低,但 RAGE mRNA 表达量变化无统计学意义,且 CP 和 RAGE mRNA 的表达无相关性,故本研究分析,在 HSP 中 RAGE 不是 CP 发挥作用的主要受体。

本研究提示 CP 不能作为 HSP 的炎症标志物,在 HSP 患儿可能作为抗炎介质发挥保护作用。本研究结果不支持 Kawasaki 等^[15]的观点,质疑其作为炎症标志物的潜能。Klingberg 等^[19]研究发现在强直性脊柱炎中,CP 一般在粪中升高,血清中不升高,推测在 HSP 不同部位,CP 表达可能也存在差异。故下一步拟扩大样本数,更全面地研究 CP 在粪、尿、肾组织等标本中的表达,研究 CP 发挥作用的其他受体、信号通路分子等,以进一步探讨其在儿童 HSP 发病中的作用。

[致谢]

感谢本院临床实验室李浩主任、叶婷老师的技术支持。

[参考文献]

- [1] Rigante D, Castellazzi L, Bosco A, et al. Is there a crossroad between infections, genetics, and Henoch-Schönlein purpura? [J]. *Autoimmun Rev*, 2013, 12(10):1016-1021
- [2] Goyette J, Geczy CL. Inflammation-associated S100 proteins: new mechanisms that regulate function [J]. *Amino Acids*, 2011, 41(4):821-842
- [3] Vaos G, Kostakis ID, Zavras N, et al. The role of calprotectin in pediatric disease [J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 542363. DOI: 10.1155/2013/542363
- [4] 中华医学会儿科学分会免疫学组《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童过敏性紫癜循证诊治建议 [J]. *中华儿科杂志*, 2013, 51(7):502-507
- [5] Kerkhoff C, Klempt M, Sorg C. Novel insights into structure and function of MRP8(S100A8) and MRP14(S100A9) [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1448(2):200-211
- [6] Oord T, Hornung N. Fecal calprotectin in healthy children [J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2014, 74(3):254-258
- [7] Meuwis M, Vernier-Massouille G. Serum calprotectin as a biomarker for Crohn's disease [J]. *Crohns Colitis*, 2013, 7(12):e678-e683

- [8] Kruzliak P,Novak J,Novak M,et al. Role of calprotectin in cardiometabolic diseases[J]. Cytokine Growth Factor Rev,2014,25(1):67-75
- [9] Ortega FJ,Sabater M,Moreno-Navarrete JM,et al. Serum and urinary concentrations of calprotectin as markers of insulin resistance and type 2 diabetes[J]. Eur J Endocrinol,2012,167(4):569-578
- [10] Soyfoo MS,Roth J,Vogl T,et al. Phagocyte-specific S100A8/A9 protein levels during disease exacerbations and infections in systemic lupus erythematosus[J]. J Rheumatol,2009,36(10):2190-2194
- [11] Kang KY,Woo JW,Park SH. S100A8/A9 as a biomarker for synovial inflammation and joint damage in patients with rheumatoid arthritis[J]. Korean J Intern Med,2014,29(1):12-19
- [12] Ezri J,Nydegger A. Pediatrics. Fecal calprotectin in children;use and interpretation[J]. Rev Med Suisse,2011,7(277):69-70
- [13] Mahler E,Zweers MC, Van Lent PL,et al. Association between serum levels of the proinflammatory protein S100A8/A9 and clinical and structural characteristics of patients with established knee,hip,and hand osteoarthritis[J]. Scand J Rheumatol,2015,44(1):56-60
- [14] Montagnana M,Danese E,Lippi G. Calprotectin and cardiovascular events. A narrative review[J]. Clin Biochem,2014,47(12):996-1001
- [15] Kawasaki Y,Ohara S,Abe Y,et al. The role of serum myeloid-related protein 8/14 complex in Henoch-Schlein purpura nephritis [J]. Pediatr Nephrol,2012,27(1):65-71
- [16] Howren MB,Lamkin DM,Suls J. Associations of depression with C-reactive protein,IL-1,and IL-6;a meta-analysis[J]. Psychosom Med,2009,71(2):171-186
- [17] 周利江,高 纯,蒋天如,等. 血清 Cys-C、ASO、hs-CRP 和尿 mALB 对过敏性紫癜患儿早期肾功能损伤的诊断意义[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(23):2908-2909
- [18] Perera C,Mcneil HP,Geczy CL. S100 calgranulins in inflammatory arthritis[J]. Immunol Cell Biol,2010,88(1):41-49
- [19] Klingberg E,Carlsten H,Hilme E,et al. Calprotectin in ankylosing spondylitis-frequently elevated in feces,but normal in serum[J]. Scand J Gastroenterol,2012,47(4):435-444

[收稿日期] 2015-12-15

连续性数据分组

连续性量值如速率、高度、时间、年龄等分组表示不科学的情形是很常见的。

例如“年龄(岁)”数据分组为:10 以下,10~20,20~30,⋯,60~70,70 以上。

这是不准确、不科学的。这里其实涉及了极限数值的表示方法。GB/T 8170-2008 给出的下列允许用语和表示方式:

从 A 到 B $A \sim B$, $A \leq X \leq B$;

超过 A 到 B $>A \sim B$, $A < X \leq B$;

至少 A 不足 B $A \sim < B$, $A \leq X < B$;

超过 A 不足 B $>A \sim < B$, $A < X < B$ 。

上述关于年龄不科学的分组可作如下修改:

1. 如果 10 在第 2 组,则表示为:

年龄(岁) $<10, 10 \sim < 20, 20 \sim < 30, \dots, 60 \sim < 70, \geq 70$ 。

2. 如果 10 在第 1 组,则表示为:

年龄(岁) $\leq 10, >10 \sim 20, >20 \sim 30, \dots, >60 \sim 70, >70$ 。