

临床研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000383

HMGB1 在过敏性紫癜患儿血清中的表达及其临床意义

甘世伟¹, 赵林胜², 王 燕¹

(1. 重庆医科大学附属永川医院儿科, 永川 402160; 2. 天津市儿童医院病理科, 天津 300074)

【摘要】目的:探讨高迁移率蛋白 1(high mobility group protein, HMGB1)在过敏性紫癜患儿血清中的表达及其临床意义。**方法:**分别利用 ELISA 法检测 183 例过敏性紫癜患儿发病期和康复期血清 HMGB1 表达量以及 real-time PCR 法检测 HMGB1 mRNA 相对表达。40 例健康体检儿童作为对照组。**结果:**患儿发病期血清 HMGB1 蛋白浓度高于对照组($t=7.43, P=0.000$); 患儿康复期血清 HMGB1 蛋白较发病期降低($t=34.257, P=0.000$)。患儿发病期外周血 HMGB1 mRNA 相对表达量升高($t=10.362, P=0.000$); 康复期较发病期明显降低($t=4.651, P=0.000$)。患儿 HMGB1 蛋白在不同性别($t=0.032, P=0.974$)、年龄($F=0.088, P=0.916$)以及初发、复发($t=0.449, P=0.654$)患儿血清中的浓度差异无统计学意义; 在有肾损伤($t=5.672, P=0.000$)、有关节症状($t=3.048, P=0.003$)、有消化道症状($t=2.050, P=0.042$)患儿血清中的浓度有明显差异。有肾损伤、有关节炎症状、有消化道症状患儿外周血 HMGB1 mRNA 相对表达分别高于无肾损伤($t=2.867, P=0.005$)、无关节炎症($t=2.733, P=0.007$)、无消化道症状($t=2.366, P=0.019$)患儿。**结论:**HMGB1 作为一种新的生物学指标, 有助于诊断过敏性紫癜活动期及其并发症, 有利于临床治疗选择。**【关键词】**过敏性紫癜; HMGB1; 肾损伤; 关节症状; 消化道症状

【中图分类号】R554.6

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-12-11

Expression of high mobility group protein 1 in children with anaphylactoid purpura and its clinical significance

Gan Shiwei¹, Zhao Linsheng², Wang Yan¹

(1. Department of Pediatrics, Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University;

2. Department of Pathology, Tianjin Children's Hospital)

【Abstract】Objective: To investigate the expression of high mobility group protein 1 (HMGB1) in children with anaphylactoid purpura and its clinical significance. **Methods:** Expression of serum HMGB1 in 183 children with anaphylactoid purpura was detected by ELISA. HMGB1 mRNA relative expression was detected by real-time PCR. Forty healthy children were enrolled as control group. **Results:** Serum HMGB1 concentration was higher in anaphylactoid purpura group than in control group ($t=7.43, P=0.000$) during disease period and after recovery ($t=34.257, P=0.000$). HMGB1 mRNA in peripheral blood increased ($t=10.362, P=0.000$), and decreased after recovery ($t=4.651, P=0.000$). There were differences in HMGB1 protein concentration between different genders ($t=0.032, P=0.974$), among different ages ($F=0.088, P=0.916$) as well as between initial onset and recurrence ($t=0.449, P=0.654$). There were significant differences in HMGB1 protein concentration between those with and without kidney injury ($t=5.672, P=0.000$), joint symptoms ($t=3.048, P=0.003$), and gastrointestinal symptoms ($t=2.050, P=0.042$). HMGB1 mRNA relative expression in peripheral blood was higher in those with kidney damage, arthritis symptoms, gastrointestinal symptoms than in those without kidney injury ($t=2.867, P=0.005$), arthritis symptoms ($t=2.733, P=0.007$) and gastrointestinal symptoms ($t=2.366, P=0.019$). **Conclusion:** As a new biological marker, HMGB1 could play an important role in diagnosis and treatment of complications of anaphylactoid purpura.

【Key words】anaphylactoid purpura; high mobility group protein 1; kidney damage; joint symptoms; gastrointestinal symptoms

过敏性紫癜又称舒-亨综合征, 是儿童最常见的血管炎综合征, 可由多种因素诱发, 关节、肾脏和

胃肠道常常受累^[1-2]。其病因及发病机制一直是医家学者关注和不断探索的领域, 资料显示过敏性紫癜是一系列复杂的免疫和炎症反应导致的结果^[3]。近来的研究发现高迁移率蛋白 B1 (high mobility group box 1, HMGB1) 在细胞外可发生强大的致炎效应, 能够激活和趋化炎症细胞, 从而被认为是一

作者介绍: 甘世伟, Email: gsw0220@sina.com,

研究方向: 新生儿、呼吸系统疾病、免疫系统疾病。

通信作者: 王 燕, Email: 1102582077@qq.com。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000383.html>

种新型的炎性细胞因子,但国内外对其表达与过敏性紫癜的关系的研究并不多见。本研究旨在探讨 HMGB1 在过敏性紫癜患儿血清中的表达及其临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

2010 年 1 月至 2012 年 12 月,重庆医科大学附属永川医院儿科和天津市儿童医院免疫科收治的过敏性紫癜患儿 183 例,其中男 104 例,女 79 例,年龄 2~14 岁,平均(7.27±3.73)岁。所有患儿均符合过敏性紫癜诊断标准^[4]。入院时平均病程(4.2±17.0) d。其中初发者 112 例,复发者 71 例。所有患儿均出现皮疹,主要表现为典型的紫癜样皮疹,累及双下肢、臀部,也有全身皮疹者;有肾脏损害 53 例,主要表现为尿常规异常,蛋白(+~+++),红细胞计数(+~+++),镜下或肉眼血尿改变;有关节症状 42 例,主要表现为出现轻重程度不等的膝、踝关节肿痛、活动受限;有消化道症状 60 例,包括呕吐、腹痛、便血及便潜血阳性症状。发病诱因中上呼吸道感染或其他部位感染 89 例,进食特殊或易致过敏食物(比如鱼、虾、蟹、海鲜、鸡蛋、牛奶、药物)55 例,接触特殊物质(比如油漆、汽柴油、农药、某些化学物质)17 例,不明原因者 22 例。另 40 例健康体检者作为对照组,与过敏性紫癜组在年龄($t=0.303, P=0.762$)、性别($\chi^2=0.250, P=0.617$)分布没有统计学差异。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 所有受试者抽取 5 ml 静脉血分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),用于提取 RNA 用于 real-time PCR 检测;另抽取 2 ml 用于分离血清,用于酶联免疫吸附(ELISA)测定。以上均征得患者及志愿者监护人同意并签订了知情同意书。

1.2.2 ELISA 方法检测血清中 HMGB1 的浓度 利用人 HMGB1 ELISA 试剂盒(Chondrex, 美国)按照说明书采用双抗体夹心 ELISA 法于波长 450 nm 处测定吸光度(absorbance, A)值,计算血清 HMGB1 蛋白浓度。

1.2.3 PBMC 分离和总 RNA 提取 利用淋巴细胞分离液 LymphoprepTM (AXIS-SHIELD, 挪威)按照说明书进行 PBMC 分离。按照 RNA 提取试剂盒 TRIZOL Reagent (Invitrogen, 美国)的操作说明提取总 RNA。利用紫外分光光度计 NanoDrop ND-1000 (NanoDrop, Wilmington, 美国)测定 RNA 浓度和纯度。利用 1%变性琼脂糖凝胶电泳分析总 RNA 提取的质量。获得的总 RNA 溶液保存于-80℃备用。

1.2.4 Real-time PCR 检测外周血 HMGB1 表达量 按照反转录试剂盒(Bio-Rad, 美国)说明书将 1 μg 总 RNA 反转录为 cDNA,主要反应条件:25℃ 5 min, 42℃ 30 min, 85℃ 5 min。

以反转录合成的 cDNA 为模板,按照 iQ™ SYBR® Green Super-mix 试剂盒(Bio-Rad, 美国)说明书进行 real-time PCR (Bio-Rad iQ5, 美国)。PCR 反应循环条件:第 1 步, 95℃ 预热 3 min; 第 2 步, 95℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 40 个循环;熔解曲线分析 0.5℃/0.5 min; 55℃~95℃。在 Bio-Rad real-time PCR-iQ5 软件进行分析。同时设 GAPDH 为内参。mRNA 的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示, $\Delta\Delta Ct = (Ct_{HSP-HMGB1} - Ct_{HSP-GAPDH}) - (Ct_{NC-HMGB1} - Ct_{NC-GAPDH})$ 。每个样本重复 3 次试验。

运用 Primer Premier 5.0 软件进行设计 HMGB1 和 GAPDH 的特异性引物,由上海生工生物工程有限公司合成。HMGB1 引物:s:5'-TGCTGCATATCGAGCTAAAGG-3', as:5'-CCATACTGTACCAGGCAAGGT-3'。GAPDH 引物:s:5'-TATCGGACGCCTGGTTAC-3', as:5'-CTGTGCCGTTGAAC-TTGC-3'。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件对数据进行统计分析。计数资料采用 χ^2 检验,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组均数比较采用独立样本 t 检验,过敏性紫癜患者发病期与康复期数据均数采用配对样本 t 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 血清 HMGB1 蛋白表达情况以及外周血 HMGB1 mRNA 表达情况

过敏性紫癜患儿发病期血清 HMGB1 蛋白含量高于对照组($t=7.43, P=0.000$);患儿康复期较发病期降低($t=34.257, P=0.000$),与对照组差异无统计学意义($t=0.484, P=0.629$)。过敏性紫癜患儿发病期外周血 HMGB1 mRNA 相对表达量升高,是对照组的 2.87 倍($t=10.362, P=0.000$);康复期较发病期明显降低($t=4.651, P=0.000$),与对照组差异无统计学意义($t=0.593, P=0.521$)(表 1)。

表 1 血清 HMGB1 蛋白表达以及外周血 HMGB1 mRNA 表达情况
Tab.1 HMGB1 protein expression in serum and HMGB1 mRNA expression in peripheral blood

组别	例数 (n)	HMGB1 (ng/ml)	HMGB1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
对照组	40	7.54±0.72	1.00±0.05
过敏性紫癜发病期	183	9.62±1.73 ^a	2.87±0.21 ^a
过敏性紫癜康复期	183	7.75±1.58 ^b	1.79±0.07 ^b

注:发病期与对照组比较:a, $P<0.01$;康复期与发病期比较:b, $P<0.01$

2.2 过敏性紫癜患儿血清 HMGB1 蛋白浓度与临床基本资料的关系

血清 HMGB1 蛋白浓度在不同性别($t=0.032, P=0.974$)、

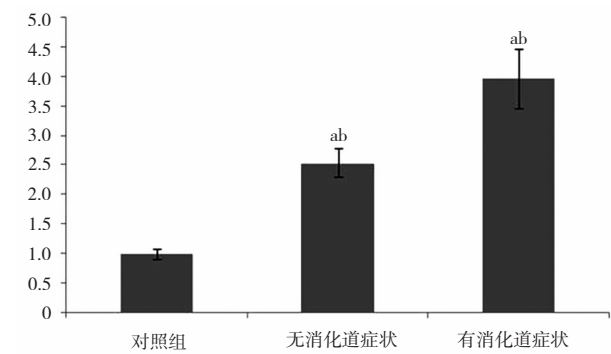
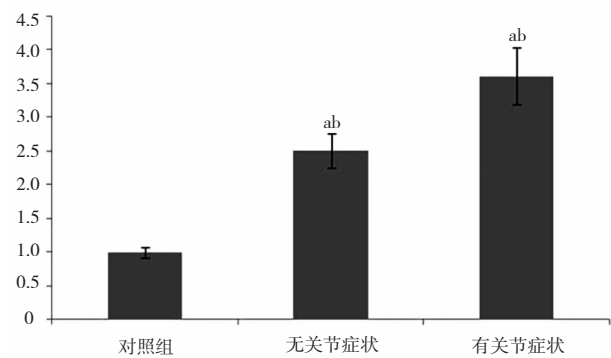
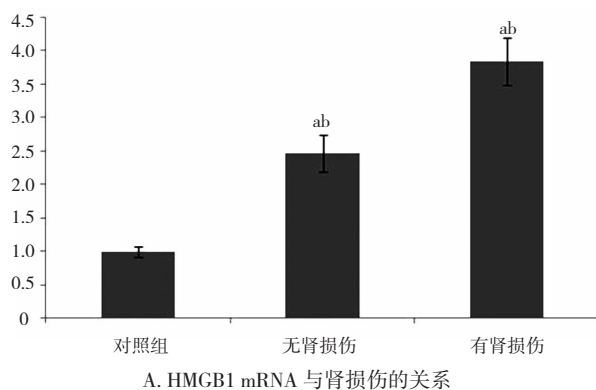
年龄($F=0.088, P=0.916$)以及初、复发($t=0.449, P=0.654$)患者中差异无统计学意义;HMGB1 蛋白浓度在有无肾损伤($t=5.672, P=0.000$)、有无关节症状($t=3.048, P=0.003$)、有无消化道症状($t=2.050, P=0.042$)患儿血清中有明显统计学差异,见表 2。

表 2 过敏性紫癜患儿血清 HMGB1 浓度与临床基本资料的关系
Tab.2 Relationship between serum HMGB1 concentration and basic clinical data of patients with anaphylactoid purpura

项目	例数 (n)	HMGB1 (ng/ml)	t/F 值	P 值
性别	男	104	9.62 ± 1.80	0.032 0.974
	女	79	9.61 ± 1.66	
年龄(岁)	≤6	55	9.55 ± 1.78	0.088 0.916
	7~10	91	9.69 ± 1.68	
	>10	37	9.67 ± 1.71	
发病情况	初发	112	9.66 ± 1.79	0.449 0.654
	复发	71	9.54 ± 1.64	
肾损伤	有	53	10.67 ± 1.79	5.672 0.000
	无	130	9.55 ± 1.64	
关节症状	有	42	10.32 ± 1.46	3.048 0.003
	无	141	9.41 ± 1.76	
消化道症状	有	60	9.99 ± 1.70	2.050 0.042
	无	123	9.44 ± 1.72	

2.3 外周血 HMGB1 mRNA 与过敏性紫癜患儿肾损伤、关节症状、消化道症状的关系

Real-time PCR 检测过敏性紫癜患儿外周血 HMGB1 mRNA 相对表达情况,将患儿分别按有无肾损伤、有无关节症状、有无消化道症状分组进行比较分析。发现有肾损伤患儿外周血 HMGB1 mRNA 相对表达高于无肾损伤患儿($t=2.867, P=0.005$),且 2 组均大于对照组($t=6.736, P=0.000; t=3.007, P=0.003$);有关节炎症患儿外周血 HMGB1 mRNA 相对表达高于无关节炎症患儿($t=2.733, P=0.007$),且 2 组均大于对照组($t=3.403, P=0.001; t=5.608, P=0.000$);有消化道症状患儿外周血 HMGB1 mRNA 相对表达高于无消化道患儿($t=2.366, P=0.019$),且 2 组均大于对照组($t=4.954, P=0.000; t=3.378, P=0.001$)。见图 1。



注:a,与对照组比较: $P<0.05$;b,与无相应症状组比较: $P<0.05$

图 1 Real-time PCR 法检测血清 HMGB1 mRNA 相对表达量

Fig.1 HMGB1 mRNA expression in serum detected by real-time PCR

3 讨论

过敏性紫癜是一种常见的可累及皮肤、胃肠道、关节、肾脏多个系统的全身性血管炎症疾病^[3],是机体对某些致敏物质发生的变态反应^[5-6]。多发生于 4~8 岁的儿童,目前临床尚无特效疗法^[7]。发病诱因可能与感染、药物、食物、花粉吸入、虫咬、疫苗接种等有关^[8]。

多项研究显示一系列复杂的免疫和炎症反应导致过敏性紫癜的发生,多种炎性因子的作用,引起血管壁损伤而通透性升高,导致血液渗出及炎症反应,最终引起皮肤黏膜、内脏器官等多部位病变^[9-11]。作为一个新型细胞因子, HMGB1 在急慢性炎症性疾病中的作用得到越来越多的重视。研究发现^[12-15] HMGB1 是一种新型的炎性细胞因子,能主动或被动分泌到细胞外,参与了类风湿关节炎、系统性红斑狼疮、炎性疾病等多种自身免疫性疾病的发生和发展。在致炎物质刺激下多种炎症细胞、免疫

细胞和固有细胞能够释放 HMGB1,同时 HMGB1 刺激这类细胞释放其他的致炎细胞因子,因而形成炎症放大效应成为一种重要的晚期炎症介质。有研究表明^[16]:HMGB1 蛋白的表达参与了肾细胞癌的发生、发展,可以作为判断肾细胞癌预后的分子指标。

本研究利用 ELISA 法检测血清 HMGB1 蛋白表达情况发现:在过敏性紫癜患儿发病期血清 HMGB1 蛋白含量高于正常对照组,患儿康复期 HMGB1 蛋白降低。而且 real-time PCR 检测外周血 HMGB1 mRNA 相对表达量,其结果与 ELISA 检测结果的趋势一致。提示 HMGB1 的表达水平与疾病的活动性密切相关。血清 HMGB1 蛋白浓度与患儿肾损伤、关节症状、以及消化道症状有相关性。肾损伤、关节症状以及消化道症状均为炎症反应,提示 HMGB1 参与了过敏性紫癜的发病并促进疾病的进展和脏器受损^[17-18]。本研究将患儿按有无肾损伤、有无关节炎、有无消化道症状进行单因素分组比较分析,结果发现有肾损伤、有关节症状、有消化道症状的患儿 HMGB1 mRNA 相对表达量高于相对应的无症状患儿,进一步提示 HMGB1 在过敏性紫癜患者血清中的表达与临床症状轻重有密切关系。其可能机制是通过多种不同途径活化和改变机体炎症细胞和固有免疫细胞,破坏免疫平衡引发免疫紊乱、激活免疫活性细胞产生大量特异性自身抗体、触发和加重炎症反应^[19]。

综上所述,HMGB1 蛋白及 mRNA 在过敏性紫癜患儿血清中高表达,与患儿的临床表现有密切联系。HMGB1 作为一种新的生物学指标,有助于诊断过敏性紫癜活动程度及其并发症,有利于临床治疗选择。

参 考 文 献

- [1] 张 琴.过敏性紫癜的免疫学异常[J].国际免疫学杂志,2007,30(1):61-64.
- [2] 陈 戟.儿童过敏性紫癜 218 例临床分析[J].临床儿科杂志,2008,26(11):961-963.
- [3] Hamdan JM,Barqawi MA.Henoch-Schonlein purpura in children: influence of age on the incidence of nephritis and arthritis[J].Saudi Med J,2008,29(4):549-552.
- [4] 叶任高,陆再英.内科学[M].6 版.北京:人民卫生出版社,2004:655-657.
- [5] 杨 军,李成荣,祖 莹,等.调节性 T 细胞在儿童过敏性紫癜发病机制中的作用初探[J].中华儿科杂志,2006,44(6):411-414.
- [6] 王爱萍,郑茂东,徐今宁.药物治疗过敏性紫癜的研究进展[J].中国药业,2012,21(5):92-94.
- [7] 张碧丽,王文红,范树颖.儿童过敏性紫癜 575 例分析[J].中华儿科杂志,2001,39(11):646-649.
- [8] 陈述枚,莫 樱.过敏性紫癜肾炎的病因和发病机制[J].中国实用儿科杂志,2004,16(4):193-194.
- [9] 张交生,宋丽君.过敏性紫癜病因及发病机制的最新研究进展[J].国际儿科学杂志,2006,33(4):264-266.
- [10] Ha TS.The role of tumor necrosis factor- α in Henoch-Schonlein purpura[J].Pediatr Nephrol,2005,20(2):149-153.
- [11] 李 蕾,杨 岚,陈国千.高迁移率族蛋白 B1 检测及其临床应用[J].中国试验诊断学,2011,15(1):181-182.
- [12] Qin YH,Dai SM,Tang GS,et al.HMGB1 enhances the proinflammatory activity of lipopolysaccharide by promoting the phosphorylation of MAPK p38 through receptor for advanced glycation end products[J].J Immunol,2009,183(10):6244-6250.
- [13] Barkauskaite V,Ek M,Popovic K,et al.Translocation of the novel cytokine HMGB1 to the cytoplasm and extracellular space coincides with the peak of clinical activity in experimentally UV-induced lesions of cutaneous lupus erythematosus[J].Lupus,2007,16(10):794-802.
- [14] Gauley J,Pisetsky DS.The translocation of HMGB1 during cell activation and cell death[J].Autoimmunity,2009,42(4):299-301.
- [15] 张明星,窦中岭,史海军,等.HMGB1 在肾透明细胞癌中的表达及其临床意义[J].中国肿瘤外科杂志,2012,4(2):180-182.
- [16] Sato F,Maruyama S,Hayashi H,et al.High mobility group box chromosomal protein 1 in patients with renal diseases [J].Nephron Clin Pract,2008,108(3):194-201.
- [17] Andersson U,Wang H,Palmblad K,et al.High mobility group 1 protein(HMG-1)stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes[J].J Exp Med,2000(192):565-570.
- [18] Fiuza C,Bustin M,Talwar S,et al.Inflammation promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells[J].Blood,2003,101(7):2652-2660.

(责任编辑:唐宗顺)