

噬血细胞综合征儿童血清 HMGB1、CD14⁺ 单核细胞 Toll 样受体的表达及对预后的影响

张思敏¹, 王敏¹, 陈智², 蔡小芳^{1*}

华中科技大学同济医学院附属武汉儿童医院¹急诊科, ²血液科, 湖北武汉 430016

摘要 目的: 检测噬血细胞综合征 (hemophagocytic syndrom, HPS) 患儿血清 HMGB1、CD14⁺ 单核细胞 Toll 样受体的表达水平, 并分析它们对噬血细胞综合征患儿预后的影响。方法: 选取华中科技大学同济医学院附属武汉儿童医院儿科收治的 83 例噬血细胞综合征患儿纳入 HPS 组, 50 例同龄体检健康儿童纳入观察组, 采集外周血, 采用流式细胞术检测外周血 CD14⁺ 单核细胞 Toll 样受体 (TLR2、TLR4、TLR6) 水平, 酶联免疫吸附测定法检测血清中 HMGB1 表达水平, 并分析 TLR2、TLR4、TLR6 及 HMGB1 表达与临床参数、近期疗效及预后的关系及 TLR2、TLR4、TLR6 表达与 HMGB1 的相关性。结果: HPS 组患儿 CD14⁺ 单核细胞表面 TLR2、TLR4、TLR6 表达率及荧光强度明显高于对照组 ($P < 0.05$); HPS 组血清中 HMGB1 含量明显高于对照组 ($P < 0.05$); HPS 组中 HPS 急性期、白蛋白水平降低、血红蛋白水平降低、血小板减少、中性粒细胞绝对值偏低、甘油三酯增高的患儿 TLR2、TLR4、TLR6 及 HMGB 表达水平均明显增高 ($P < 0.05$)。不同性别、年龄患者差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。治疗后, CR 组及 NAD 组 HPS 患儿 TLR2、TLR4、TLR6 及 HMGB 表达较治疗前均明显降低 ($P < 0.05$); AD 组及 RD 组患儿 TLR2、TLR4、TLR6 及 HMGB 表达与治疗前比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 死亡组 HPS 患儿 TLR2、TLR4、TLR6 及 HMGB 表达均明显高于生存组 ($P < 0.05$)。HPS 患儿血清中 HMGB1 含量与 CD14⁺ 单核细胞 TLR2、TLR4 和 TLR6 表达呈正相关 ($P < 0.05$)。结论: 噬血细胞综合征患儿 CD14⁺ 单核细胞表面 TLR2、TLR4 和 TLR6 表达率及表达量均明显高于健康儿童, 且 TLR2、TLR4 和 TLR6 表达量均与血清 HMGB1 含量呈正相关, 这为临床小儿 HPS 的诊断与预后预测提供参考。

关键词 噬血细胞综合征; Toll 样受体; 高迁移率族蛋白 B1; 儿童; 预后

中图分类号 R557.4

文献标识码 A

doi: 10.19746/j.cnki.issn1009-2137.2019.05.047

Expression of Serum HMGB1 and CD14⁺ mononuclear Toll-like Receptors in Children with Hemophagocytic Syndrome and Their Effect on Prognosis

ZHANG Si-Min¹, WANG Min¹, CHEN Zhi², CAI Xiao-Fang^{1*}

¹Department of Emergency, ²Department of Hematology, Wuhan Children's Hospital (Wuhan Maternal and Child Healthcare Hospital), Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430016, Hubei Province, China

*Corresponding Author: CAI Xiao-Fang, Senior Physician. E-mail: qaz998225@163.com

Abstract Objective: To detect the expression of serum HMGB1 and CD14⁺ monocyte Toll-like receptors in children with hemophagocytic syndrome (HPS), and to analyze its effect on the prognosis of children. **Methods:** Eighty-three children with HPS admitted in Department of pediatrics of Wuhan Children's Hospital Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology were selected and enrolled in HPS group, at the same time 50 healthy children with same age were selected and enrolled in control group. The peripheral blood of children in 2 groups was collected. The flow cytometry was used to detect the expression of Toll-like receptors (TLR2, TLR4 and TLR6) in peripheral blood CD14⁺ monocytes, the ELISA was used to detect the expression of HMGB1 in serum of peripheral blood. The relationship of TLR2, TLR4, TLR6 and HMGB1 expression with the clinical parameters, short-term therapeutic efficacy and prognosis was analyzed, the relation of TLR2, TLR4 and TLR6 expression with HMGB1 also was analyzed. **Results:** The expression of TLR2, TLR4 and TLR6 on surface of CD14⁺ monocytes and fluorescence intensity in HPS group were significantly higher than those in control group ($P < 0.05$). The serum HMGB1 level in HPS group was significantly higher than that in control group ($P < 0.05$). The expression levels of TLR2, TLR4, TLR6 and HMGB1 in HPS children who were in acute phase or had decrease of albumin or hemoglobin levels, thrombocytopenia,

*通信作者: 蔡小芳, 主任医师. E-mail: qaz998225@163.com

2019-03-27 收稿; 2019-05-20 接受

neutrophil absolute value to low and increase of triglycerides level, in HPS group all significantly increased, the difference in children with different sex and age was no statistically significant ($P > 0.05$). After treatment, the expressions of TLR2, TLR4, TLR6 and HMGB in CR and NAD groups was significantly lower than that before treatment ($P < 0.05$), while the expressions levels of TLR2, TLR4, TLR6 and HMGB in AD and RD groups were no statistically significant different from those before treatment ($P < 0.05$); the expressions levels of TLR2, TLR4, TLR6 and HMGB in death group all were higher than those in survival group ($P < 0.05$). The serum HMGB1 levels in HPS children positively correlated with expression of TLR2, TLR4 and TLR6 on CD14⁺ monocytes ($P < 0.05$). **Conclusion:** The expression rate and level of TLR2, TLR4 and TLR6 on CD14⁺ monocytes in HPS children are significantly higher than those in healthy children. The expression levels of TLR2, TLR4, and TLR6 positively correlate with serum HMGB1 content, which provides reference for the diagnosis and prognosis of children with HPS.

Key words hemophagocytic syndrome; Toll-like receptor; high mobility group protein B1; children; prognosis

J Exp Hematol 2019; 27 (5): 1664-1671

噬血细胞综合征为细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic lymphocyte, CTL) 及自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞功能缺陷, 导致单核巨噬系统受持续刺激而过度活化, 炎症细胞因子过量分泌而形成的临床综合性征状^[1]。有研究显示, HPS 发病率低, 但死亡率较高, 且 HPS 初次发作病例中 70%–80% 为儿童^[2]。现阶段国内外对 HPS 临床诊断及治疗主要基于国际组织细胞协会 2004 年发布的《噬血细胞综合征诊断治疗指南》(HLH-2004 标准)^[3], 而在实际临床应用中发现, 对早期 HSP 诊断的准确性较低, 且部分诊断指标的临界值尚存在争议。近年来随着对 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLR) 及高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group protein, HMGB1) 研究的不断深入, 发现二者与炎症存在着密切关系^[4-5]。目前, 国内外关于 TLR2、TLR4、TLR6 及 HMGB1 与 HSP 发病的相关性研究甚少。本研究检测噬血细胞综合征儿童血清 HMGB1、CD14⁺ 单核细胞 Toll 样受体的表达水平, 并探讨其对噬血细胞综合征患儿预后的影响, 为临床诊断 HPS 提供参考。

材料和方法

一般资料

2015 年 12 月–2017 年 12 月间华中科技大学同济医学院附属武汉儿童医院儿科收治的继发性噬血细胞综合征患儿 83 例纳入 HPS 组, 其中男 42 例, 女 41 例, 平均年龄 5.4 ± 2.3 (0.5–12) 岁。所有患儿均表现持续高热, 脾肿大 59 例, 肝肿大 66 例, 淋巴结肿大 34 例, 皮肤瘀斑、瘀点 25 例。经血液检测, 合并 EB 病毒 (Epstein-Barr virus, EBV) 感染 65 例, 合并金黄色葡萄球菌感染 15 例, 合并肺炎支原体感染 1 例, 病原不明 2 例。所有患儿诊断均符合国际组织细胞协 HLH-2004 诊断标准^[3]。排除标准: ①合并过敏性紫癜、系统性红斑狼

疮等免疫疾病者; ②入院前 3 个月内接受糖皮质激素或免疫抑制剂药物治疗者。另选取同期体检健康儿童 50 例纳入对照组, 其中男 26 例, 女 24 例, 平均年龄 4.8 ± 2.9 (1–11) 岁, 且排除入选前 7 d 有服药史或感染史, 血缘关系, 肿瘤史和血液病史的患者; 经统计学分析, 两组儿童性别、年龄均无显著性差异, 具有可比性。本研究经本院学术伦理委员会批准, 受试者及家属均知情且签署知情同意书。

治疗方案及疗效评价

对 HPS 组患儿给予地塞米松、环孢素和依托泊苷联合化疗, 分为初始 1–8 周的诱导治疗阶段和 9–40 周的维持治疗阶段, 具体参照 HLH-2004 方案^[3], 抗感染治疗以广谱抗生素、抗真菌药物为主。疗效评定参照国际组织细胞协会提出的疗效标准^[6]:

①有效 (complete remission, CR): 诱导治疗阶段 (第 2, 4 周评估), 患儿体温正常, 脾脏缩小, 血小板计数 $\geq 100 \times 10^9/L$, 纤维蛋白原水平正常, 血清铁蛋白水平下降 $> 25\%$; ②缓解: 诱导治疗结束后 (第 8 周评估), 患儿体温正常, 脾脏大小恢复正常, 血红蛋白 $\geq 90 g/L$, 血小板 $\geq 100 \times 10^9/L$, 中性粒细胞绝对值 $\geq 0.5 \times 10^9/L$, 血甘油三酯 $< 3 mmol/L$, 血清铁蛋白 $< 500 \mu g/L$, 脑脊液检查正常, 血浆可溶性 CD25 下降; ③疾病活动 (activation of disease, AD): 未达到缓解标准时, 判定为疾病活动; ④疾病复发 (relapse of disease, RD): 达到缓解标准后再次出现 HPS-2004 诊断标准 3 条及以上。

试剂与仪器

Anti-Human CD14 FITC、Anti-Human TLR2 PE、Anti-Human TLR4 APC、Anti-Human TLR6 PE 及 Anti-Human CD14 eFlour450、Mouse IgG1 K Isotype Control PE、Mouse IgG1 K Isotype Control APC 均由美国 eBioscience 公司生产。人高迁移率族蛋白 ELISA

试剂盒 (96T) 购自上海康朗生物科技有限公司。流式细胞分析仪为美国 Becton Dickinson 公司产品; 全自动酶标检测仪为美国通用电气公司产品。

单核细胞表面 TLR2、TLR4 和 TLR6 表达水平的检测

采集对照组及 HPS 组化疗前及化疗后且在疗效评估同期晨起的空腹静脉血液 4 ml。取 2 ml 于肝素抗凝管中, 剩余 2 ml 离心取血清 -20 °C 备留。分别取肝素抗凝血液 100 μl 于 2 支洁净流式管中, 标号①、②, 分别加入 2 ml 红细胞裂解液, 振荡混匀, 室温静置 30 min, 高速离心去上清液后, 加 2 ml PBS 离心, 去上清液, 重复 2 次得离心浓缩液后, 加入 0.5-1 μg 抗小鼠 CD16/32 单克隆抗体, 室温孵育 10 min; 于 1 号管中加入 5 μl 的 CD14-FITC、TLR2-PE 及 TLR4-APC、TLR6-PE, 2 号加入 5 μl 的 CD14-FITC、IgG1 k-PE、IgG1 k-APC 作为同型对照。充分混匀后室温避光静置 30 min, 重复用 PBS 洗涤 2 次, 加 200 μl 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 振荡混匀, 快速行流式细胞仪检测。采用 FCS Express Version 3 行数据分析。计算方法: ① TLR 水平表达率 = 样品阳性细胞表达率 - 同型对照中阳性细胞表达率; ② TLR 含量以平均荧光指数 (mean fluorescence index, MFI) 表示, $MFI = (\text{样品平均荧光强度} - \text{同型对照平均荧光强度}) / \text{正常对照样品平均荧光强度}^{[7]}$ 。

血清中 HMGB1 水平的检测

取上述备留血清, 采用酶联免疫吸附测定法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测血清中 HMGB1 含量, 所有 ELISA 检测均由 1 人完成, 且严格按说明书操作。本研究吸光度 (A) 值检测波

长为 450 nm, 经 CurveExpert 软件分析得出血清中 HMGB1 含量。

统计学分析

将本研究的相关数据录入 SPSS 20.0 版统计学软件进行数据处理分析, 计量资料符合正态分布则用 ($\bar{X} \pm SD$) 表示并行 *t* 检验分析; 计数资料用百分率 (%) 表示, 则行 χ^2 检验。变量间的相关关系用 Spearman 相关分析, *P* < 0.05 示差异有统计学意义。

结 果

对照组与 HPS 组 CD14⁺ 单核细胞 TLR2、TLR4 和 TLR6 表达比较

HPS 组患儿 CD14⁺ 单核细 TLR2、TLR4 和 TLR6 表达率及荧光强度明显高于对照组 (*P* < 0.05); HPS 组血清中 HMGB1 含量也明显高于对照组 (*P* < 0.05) (表 1-2, 图 1)。

HPS 组不同临床参数的 TLR2、TLR4、TLR6 及 HMGB 表达水平比较

HPS 组中 HPS 急性期、白蛋白水平降低、血红蛋白水平降低、血小板减少、中性粒细胞绝对值偏低、甘油三酯增高的患者 TLR2, TLR4, TLR6 及 HMGB 表达水平均明显增高 (*P* < 0.05), 不同性别、年龄患者差异无统计学意义 (*P* > 0.05) (表 3)。

不同临床疗效 HPS 患者 TLR2、TLR4、TLR6 及 HMGB 表达水平的比较

HPS 组 83 例患者中, 6 例放弃治疗, 余 77 例接受 HLH-2004 治疗中, 9 例死亡, 35 例在初次诱导治

Table 1. Expression of TLR2, TLR4 and TLR6 on CD14⁺ monocytes of HPS patients and controls ($\bar{X} \pm SD$)

Group	n	TLR2 (%)	TLR4 (%)	TLR6 (%)	HMGB (ng/ml)
Control	50	6.94 ± 2.15	1.24 ± 0.38	5.86 ± 2.47	17.47 ± 6.42
HPS	83	61.24 ± 7.16*	8.46 ± 3.15*	28.13 ± 12.14*	62.06 ± 17.35*

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

Table 2. Fluorescence intensity of TLR2, TLR4 and TLR6 on CD14⁺ monocytes of HPS patients and controls ($\bar{X} \pm SD$)

Group	n	TLR2 (%)	TLR4 (%)	TLR6 (%)
Control	50	1.02 ± 0.06	0.85 ± 0.16	1.73 ± 0.07
HPS	83	11.42 ± 2.24*	12.63 ± 3.35*	12.51 ± 4.32*

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

疗阶段（第 2、4 周评定）获得 CR，27 例于第 8 周达到 NAD 标准，3 例因低纤维蛋白原（Fib ≤ 1.5 g/L）评为 AD，3 例维持治疗第 9 周出现高 TG，给予治疗后仍无法降低，第 28 周出现脾大、低 Plt、发热症状，评估 RD。治疗前，不同临床疗效组患儿 TLR2, TLR4, TLR6 及 HMGB 表达比较差异均无统计学意义（ $P > 0.05$ ）；治疗后，CR 组及 NAD 组患儿 TLR2, TLR4, TLR6 及 HMGB 表达较治

疗前均明显降低（ $P < 0.05$ ），AD 组及 RD 组患儿 TLR2, TLR4, TLR6 及 HMGB 表达与治疗前比较差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ）（表 4）。

存活组与死亡组 HPS 患儿 TLR2, TLR4, TLR6 及 HMGB 表达的比较

死亡组 HPS 患儿 TLR2, TLR4, TLR6 及 HMGB 表达均明显高于生存组，差异均有统计学意义（表 5）。

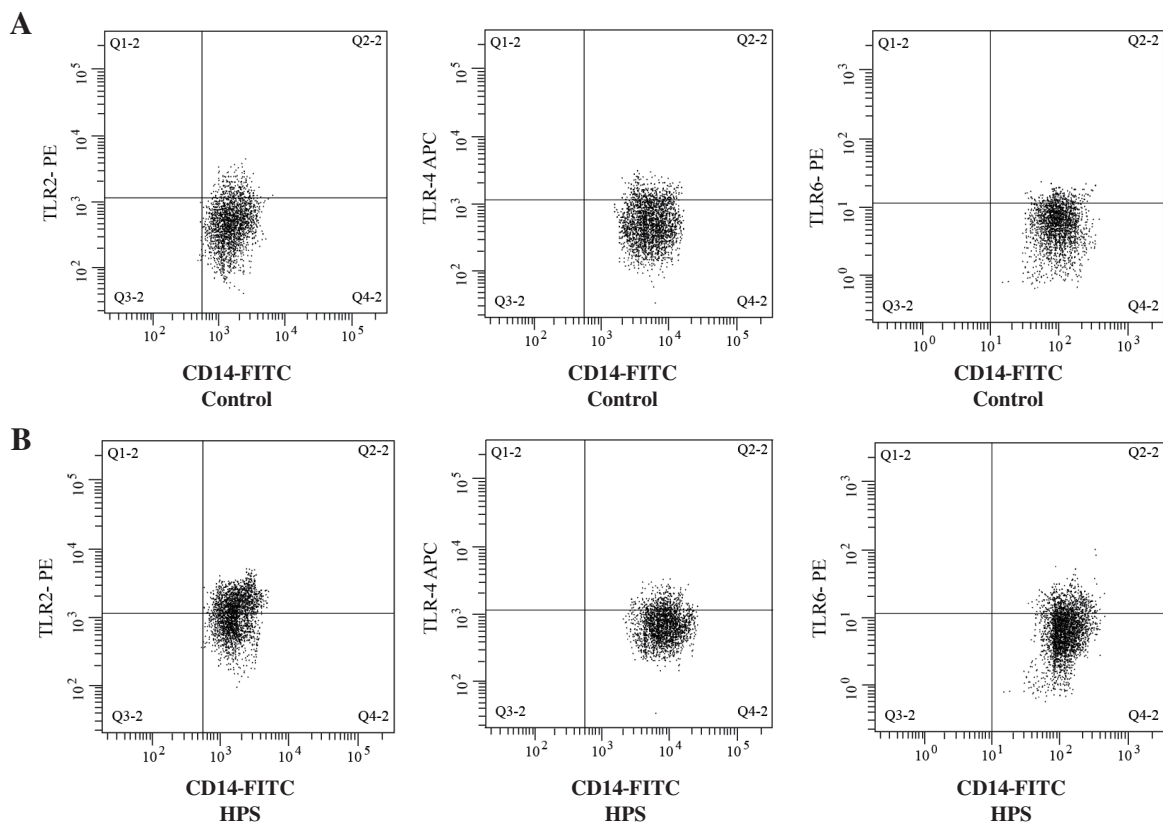


Figure 1. Expression of TLR2, TLR4 and TLR6 on CD14⁺ monocytes of controls (A) and HPS patients (B) by FCM.

Table 3. Comparison of TLR2, TLR4, TLR6 and HMGB expression levels in HPS patients at different clinical parameters ($\bar{X} \pm SD$)

Parameter	n	TLR2 (%)	TLR4 (%)	TLR6 (%)	HMGB (ng/ml)
Sex					
Male	42	58.37 ± 5.15	8.64 ± 3.52	26.83 ± 12.36	61.56 ± 16.27
Female	41	63.16 ± 6.27	8.53 ± 4.03	28.63 ± 11.83	62.82 ± 17.27
Age (year)					
≤ 6	26	60.72 ± 7.53	7.84 ± 4.62	28.82 ± 10.27	62.60 ± 15.62
> 6	57	61.46 ± 7.05	8.16 ± 3.89	27.37 ± 12.63	60.84 ± 16.47

(to be continued)

(continued)

Parameter	n	TLR2 (%)	TLR4 (%)	TLR6 (%)	HMGB (ng/ml)
Clinical stages					
Acute stage	12	64.52 ± 7.83	10.53 ± 4.36	29.73 ± 11.06	64.63 ± 15.68
Remission stage	71	58.68 ± 5.83 ^a	7.27 ± 3.67 ^a	26.26 ± 9.53 ^a	59.94 ± 14.73 ^a
WBC(× 10 ⁹ /L)					
Normal	8	61.85 ± 6.92	7.16 ± 3.63	26.36 ± 12.05	60.64 ± 16.84
Low	75	66.73 ± 7.12 ^b	10.45 ± 4.26 ^b	29.67 ± 11.96 ^b	64.78 ± 17.84 ^b
Hb(g/L)					
Normal	11	58.05 ± 6.82	6.74 ± 4.25	25.86 ± 12.68	61.58 ± 16.47
Low	72	65.08 ± 7.73 ^c	9.63 ± 3.83 ^c	29.92 ± 12.65 ^c	66.25 ± 15.74 ^c
Plt(× 10 ⁹ /L)					
Normal	13	58.75 ± 7.48	7.46 ± 3.25	26.85 ± 10.68	60.75 ± 14.80
Low	70	62.57 ± 8.36 ^d	10.37 ± 4.75 ^d	29.73 ± 12.19 ^d	67.74 ± 16.74 ^d
ANC(× 10 ⁹ /L)					
Normal	10	58.95 ± 6.85	6.57 ± 3.65	25.65 ± 13.47	58.45 ± 15.82
Low	73	64.74 ± 7.28 ^e	9.83 ± 3.70 ^e	30.84 ± 11.63 ^e	65.54 ± 16.74 ^e
TG(mmol/L)					
Normal	9	58.74 ± 8.16	6.03 ± 3.05	26.64 ± 11.57	60.68 ± 16.84
Increase	74	66.54 ± 7.62 ^f	10.83 ± 3.57 ^f	29.84 ± 12.28 ^f	65.63 ± 16.36 ^f
Albumin(g/L)					
Normal	15	59.04 ± 5.84	6.16 ± 3.24	25.35 ± 13.15	62.66 ± 16.08
Low	68	66.06 ± 7.11	8.99 ± 3.12	30.01 ± 11.89	67.11 ± 14.98

^a*P* < 0.05, compared with acute stage group; ^b*P* < 0.05, compared with WBC normal group; ^c*P* < 0.05, compared with Hb normal group; ^d*P* < 0.05, compared with Plt normal group; ^e*P* < 0.05, compared with ANC normal group; ^f*P* < 0.05, compared with TG normal group.

Table 4. Comparison of expression levels of TLR2, TLR4, TLR6 and HMGB in HPS patients with different therapeutic effects ($\bar{X} \pm SD$)

Group	n	TLR2 (%)		TLR4 (%)		TLR6 (%)		HMGB (ng/ml)	
		Pre-chemo therapy	Post-chemo therapy	Pre-chemo therapy	Post-chemo therapy	Pre-chemo therapy	Post-chemo therapy	Pre-chemo therapy	Post-chemo therapy
CR	35	63.53 ± 6.73	21.63 ± 7.52 [*]	8.56 ± 3.42	3.25 ± 1.42 [*]	28.63 ± 11.64	9.52 ± 4.57 [*]	62.82 ± 17.27	25.43 ± 8.63 [*]
NAD	27	62.45 ± 7.25	42.23 ± 5.72 [*]	8.14 ± 3.35	5.57 ± 2.55 [*]	27.94 ± 10.42	15.63 ± 5.63 [*]	64.63 ± 15.68	35.73 ± 7.95 [*]
AD	3	64.83 ± 5.63	66.46 ± 6.52	9.12 ± 3.62	8.63 ± 3.63	28.15 ± 12.53	30.36 ± 11.68	63.78 ± 17.84	64.63 ± 15.68
RD	3	65.43 ± 7.52	65.16 ± 6.43	9.42 ± 4.16	8.83 ± 3.46	29.03 ± 11.14	28.84 ± 10.63	63.54 ± 16.74	64.25 ± 14.25

^{*}*P* < 0.05, compared with level pre-chemotherapy.

Table 5. Comparison of TLR2, TLR4, TLR6 and HMGB in HPS patients between survival and death group ($\bar{X} \pm SD$)

Group	n	TLR2 (%)	TLR4 (%)	TLR6 (%)	HMGB (ng/ml)
Survival	68	58.63 ± 7.24	7.56 ± 3.25	25.43 ± 6.35	56.83 ± 12.54
Death	9	73.42 ± 8.42 [*]	10.36 ± 4.53 [*]	31.35 ± 8.42 [*]	69.34 ± 18.65 [*]

^{*}*P* < 0.05, compared with survival group.

相关性分析

HPS 患儿血清中 HMGB1 与 CD14⁺ 单核细胞 TLR2、TLR4 和 TLR6 表达率呈正相关 ($r=0.634$, $P < 0.05$; $r=0.416$, $P < 0.05$; $r=0.561$, $P < 0.05$)。

讨 论

噬血细胞综合征为反应性单核吞噬系统疾病,患者以持续性发热、肝脾肿大、全血细胞减少以及骨髓、肝、脾、淋巴结内组织增生,并以噬血细胞现象为主要临床特征^[8-9]。HPS 的病因有病毒、细菌、真菌等,病毒感染率最高,尤其是 EB 病毒。HPS 患者感染后,由于体内 CTL 细胞及 NK 细胞功能障碍,在 EB 病毒 (Epstein-Barr virus, EBV)、真菌等抗原持续刺激下过度活化、增殖,导致 CTL 细胞产生过量炎症细胞因子,从而形成“细胞因子风暴”,使机体多器官功能受损,甚至导致死亡^[10-11]。Toll 样受体为免疫调节中重要的模式识别受体,可特异性识别病原微生物核酸、肽聚糖等病原相关分子模式,偶联信号转导途径,促进特定基因表达,诱导相关细胞因子分泌,进而刺激病原体早期应答的启动,从而诱发获得性免疫反应^[12-13],Toll 样受体已成为国内外研究热点。HMGB1 为损伤分子模式的重要指标,在启动、促进炎症反应中发挥着重要作用^[14]。近几年对 HPS 的深入研究发现,HPS 临床症状及检验指标特异性低,易与其他类似疾病混淆,从而错过最佳治疗期。因此,本研究通过比较 HPS 患儿 TLR 及 HMGB1 表达水平及其相关性,为 HPS 疾病的早期诊断提供新思路。

TLR 为 I 型跨膜糖蛋白,主要在固有免疫细胞表面表达,在机体免疫调节中具有重要意义^[15]。目前,已发现广泛分布于机体 20 余种细胞组织中的 TLR 同源物 (TLR1-TLR11) 11 种,并且不同类型 TLR 对病原相关分子模式的识别存在差异。TLR2 可特异性识别肽聚糖、脂蛋白,TRL4 可识别脂多糖、棒酸,TRL6 可识别双乙酰化脂肽、酵母聚糖及调制子配体^[16-17]。Radstake 等^[15]通过类风湿性关节炎患者与健康体检者的比较发现,患者滑膜组织细胞 TLR2 及 TLR4 表达水平较高;而 Tamaki 等^[18]进一步发现类风湿性关节炎患者滑膜组织细胞中 TLR2 及 TLR6 表达水平较高;高辉香等^[19]发现过敏性紫癜患儿外周血单核细胞表面 TLR2、TLR4 及 TLR6 表达水平明显高于健康儿童。有研究证实,TLR2、TLR4 及 TLR6 均于外

周血 CD14⁺ 单核细胞表面表达^[7,20]。HMGB1 为重要的损伤相关分子模式,有文献报道,系统性红斑狼疮、炎性肌病、类风湿关节炎等免疫过度应答疾病患者体内 HMGB1 表达水平较高^[21-23]。已有研究证实^[24-26],TLR2、TLR4 及 TLR6 对患者预后具有重要意义,较高的 TLR2、TLR4、TLR6 及 HMGB1 表达会提示患者疗效及预后不良。邓玲娜等^[24]对脑梗死患者外周血单个核细胞 Toll 样受体表达分析发现,临床终局良好组 TLR2、TLR4 表达均低于临床终局不良组;He 等^[26]对骨肉瘤患者 HMGB1 表达研究发现,较高的 HMGB1 表达水平与较差的预后显著相关,可作为骨肉瘤预后的标志物。本研究结果显示,参与本研究的 83 例患儿,感染 EB 病毒占 78.31%,感染金黄色葡萄球菌占 18.07%,且表现肝、脾及淋巴肿大、皮肤瘀斑、瘀点等临床症状,这与国内其它报道基本一致^[27-28]。HSP 患儿外周血 CD14⁺ 单核细胞 TLR2、TLR4 和 TLR6 蛋白表达率分别为 $(61.24 \pm 7.16)\%$ 、 $(8.46 \pm 3.15)\%$ 和 $(28.13 \pm 12.14)\%$,明显高于健康儿童,并且 TLR2、TLR4、TLR6 及 HMGB1 表达水平较健康儿童明显增高;同时,HPS 患儿 HPS 急性期、白蛋白水平降低、血红蛋白水平降低、血小板减少、中性粒细胞绝对值偏低、甘油三酯增高患者 TLR2、TLR4 和 TLR6 及 HMGB 表达水平均明显增高,而给予有效治疗后,TLR2、TLR4 和 TLR6 及 HMGB 表达均明显下降,对患者预后分析发现,死亡 HSP 患儿 TLR2、TLR4 和 TLR6 及 HMGB 高表达。这提示,HPS 患儿 TLR2、TLR4、TLR6 及 HMGB 表达与 HPS 的发生发展密切相关,且对患儿治疗效果及预后具有一定预测作用。由此推测,HPS 患儿机体感染病毒或细菌后,引发单核细胞表面 TLR2、TLR4 和 TLR6 大量活化,TLR2、TLR4、TLR6 分别特异性识别入侵的革兰阳性菌、革兰阴性菌及革兰阳性菌、葡萄球菌,进而引发炎症细胞因子风暴,同时激活 TLR 信号通路,参与 HPS 病情进展。

病原体入侵机体时,会促进细胞分泌 HMGB1 并释放至胞外,HMGB1 刺激其高亲和力 Toll 样受体,介导并启动免疫反应及炎症反应,引起单核巨噬细胞分泌促炎症因子,而促炎症因子对 HMGB1 存在正反馈调节机制,使机体炎症反应愈发严重^[29]。有诸多文献报道,系统性红斑狼疮、炎性肌病、类风湿关节炎等免疫过度应答疾病患者体内 HMGB1 表达水平较高^[21-23],而尚无 HMGB1 在 HPS 患者表达的研究。另有研究证实,Toll 样受体

中 TLR2 及 TLR4 参与了 HMGB1 对病原体的识别^[30], 目前, 暂无 TLR6 与 HMGB1 相关性的报道。本研究结果显示, 通过 ELISA 法检测, HPS 患儿血清中 HMGB1 平均含量 (62.06 ± 17.35) ng/ml 较健康儿童明显增高, 可用于鉴别疾病情况。同时, 经相关性分析发现, HPS 患儿血清中 HMGB1 含量与其 CD14⁺ 单核细胞表面 TLR2、TLR4、TLR6 表达水平呈正相关。这提示, HMGB1 与 TLR2、TLR4、TLR6 在 HPS 患儿疾病进展中同步表达, 可能存在某细胞因子诱发外周单核细胞分泌 HMGB1, 进入外周血液, 同时通过 CD14⁺ 单核细胞表面 TLR2、TLR4、TLR6 行信号传导, 进一步激活下游炎症因子的释放, 介导免疫性炎症损伤。

笔者推测, HMGB1 与 TLR2、TLR4、TLR6 通路可能在 HPS 发病机制中介导炎症反应发挥着重要作用, 但其在 HPS 发病机制的具体作用及信号传导途径, 还需做进一步研究。同时, 可借鉴系统性红斑狼疮、风湿性关节炎等通过阻断 TLR 信号传导治疗方式, 研制一种可干扰 HMGB1/TLR 通路的药物, 为小儿 HPS 的治疗及预防提供新思路。

综上所述, 噬血细胞综合征患儿 CD14⁺ 单核细胞表面 TLR2、TLR4、TLR6 及血清 HMGB1 水平均明显高于健康儿童, 且 TLR2、TLR4、TLR6 表达量与血清 HMGB1 含量均呈正相关, 可为临床小儿 HPS 的诊断与预后预测提供参考。

参 考 文 献

- Maakaroun NR, Moanna A, Jacob JT, *et al.* Viral infections associated with haemophagocytic syndrome. *Rev Med Virol*, 2010; 20(2): 93-105.
- Madkaikar M, Shabrish S, Desai M. Current updates on classification, diagnosis and treatment of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH). *Indian J Pediatr*, 2016; 83(5): 434-443.
- Henter JI, Horne A, Aricó M, *et al.* HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatric Blood Cancer*, 2010; 48(2): 124-131.
- Elfeky M, Yoneshiro T, Okamatsu-Oqura Y, *et al.* Adiponectin suppression of late inflammatory mediator, HMGB1-induced cytokine expression in RAW 264 macrophage cells. *J Biochem*, 2018; 163(2): 143-153.
- Imhof BA, Jemelin S, Emre Y. Toll-like receptors elicit different recruitment kinetics of monocytes and neutrophils in mouse acute inflammation. *Eur J Immunol*, 2017; 47(6): 1002-1008.
- 张之南, 沈梯, 等. 血液病诊断及疗效标准. 第 3 版. 北京科学出版社, 2007; 254-256.
- 米亚英, 杨丽丽, 孙利平. HMGB1 及 TLR2、TLR4 在类风湿性关节炎中的表达及意义. *基础医学与临床*, 2013; 33(4): 476-479.
- 唐勇, 何志旭, 金皎, 等. 小儿噬血细胞综合征的临床研究. *检验医学与临床*, 2016; 13(1): 237-238.
- 王飞, 程宝金, 何海龙, 等. 30 例儿童噬血细胞综合征临床分析. *中国妇幼保健*, 2014; 29(30): 4948-4949.
- Nanno S, Koh H, Nakashima Y, *et al.* Diagnostic value of serum ferritin and the risk factors and cytokine profiles of hemophagocytic syndrome following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Leuk Lymphoma*, 2017; 58(7): 1664-1672.
- Yoram F, Eyal G. Hemophagocytic lymphohistiocytosis and primary immune deficiency disorders. *Clin Immunol*, 2014; 155(1): 118-125.
- Tartey S, Takeuchi O. Pathogen recognition and Toll-like receptor targeted therapeutics in innate immune cells. *Int Rev Immunol*, 2017; 36(2): 57-73.
- 许聪, 乔亚丽, 张道来. Toll 样受体家族成员在人肝细胞癌中的表达及其与炎性体因子的相关性. *细胞与分子免疫学杂志*, 2017; 33(9): 1182-1186.
- 戴昕, 李文倩, 李建平, 等. 血浆 HMGB1、IFN- γ 、IL-4 和 CD4⁺T 细胞表面 TLR4 的表达在免疫性血小板减少症患者中的意义. *中国实验血液学杂志*, 2016; 24(6): 1837-1841.
- Radstake TR, Roelofs MF, Jenniskens YM, *et al.* Expression of toll-like receptors 2 and 4 in rheumatoid synovial tissue and regulation by proinflammatory cytokines interleukin-12 and interleukin-18 via interferon-gamma. *Arthritis Rheum*, 2004; 50(12): 3856-3865.
- Eidson LN, Inoue K, Young LJ, *et al.* Toll-Like Receptor 4 Mediates Morphine-Induced Neuroinflammation and Tolerance via Soluble Tumor Necrosis Factor Signaling. *Neuropsychopharmacology*, 2016; 42(3):661-670.
- Korppi M, Teräsjärvi J, Vuononvirta J, *et al.* Toll ... ike receptor 1, 2 and 6 polymorphisms: no association with eleven serum cytokine concentrations. *Acta Paediatr*, 2018;107(12): 2217-2218.
- Tamaki Y, Takakubo Y, Hirayama T, *et al.* Expression of Toll-like receptors and their signaling pathways in rheumatoid synovitis. *J Rheumatol*, 2011; 38(5): 810-820.
- 高辉香, 田玲玲, 常红, 等. 过敏性紫癜患儿外周血单核细胞 TLR2、TLR4、TLR6 及与 Treg 相关细胞因子的表达. *中国组织工程研究*, 2014; 18(38): 6222-6227.
- Wantia N, Rodriguez N, Cirl C, *et al.* Toll-Like Receptors 2 and 4 Regulate the Frequency of IFN γ -Producing CD4⁺ T-Cells during Pulmonary Infection with Chlamydia pneumoniae. *PLoS One*, 2011; 6(11): e26101.
- 成传芳, 靳雪琴, 茹晋丽. 高迁移率族蛋白 1 参与系统性红斑狼疮发病机制的研究进展. *中华风湿病学杂志*, 2015; 19(6): 416-419.
- 丛贤滋, 赵征, 李晓峰, 等. 血清高迁移率族蛋白 1 水平与皮肌炎/多肌炎的关系. *解放军医学院学报*, 2012; 33(6): 565-566.
- 王贵, 黄晶, 徐慧慧, 等. 高迁移率族蛋白 1 和 Treg 细胞与类风湿性关节炎相关性的研究进展. *风湿病与关节炎*, 2016; 5(7): 60-64.
- 邓玲娜, 潘经锐, 彭晴霞, 等. 脑梗死患者外周血单个核细胞 Toll 样受体及下游信号分子表达与临床预后的相关性研究.

- 中华神经医学杂志, 2016; 15(12): 1217-1223.
- 25 李航宇, 孙宏治, 李岩, 等. TLR2 和 TLR4 在肝细胞癌中的表达及其与增殖效应因子之间的关系. 中国现代医学杂志, 2014; 24(27): 1-8.
- 26 He J, Zhang P, Li Q, *et al.* Expression of high mobility group box 1 protein predicts a poorer prognosis for patients with osteosarcoma. *Oncol Lett*, 2016; 11(1): 293-298.
- 27 黄莉, 姚红霞. 61 例继发性噬血细胞综合征临床治疗及预后分析. 中国实验血液学杂志, 2016; 24(2):580-583.
- 28 刘燕鹰, 周姝含, 张莉, 等. 噬血细胞综合征 77 例临床分析. 中华医学杂志, 2015; 95(9): 681-684.
- 29 王冬娇, 王菊娟, 宋梦, 等. 血清高迁移率族蛋白-1 在继发性噬血细胞性淋巴组织细胞增多症的表达及临床意义. 中国实验血液学杂志, 2016; 24(3): 878-883.
- 30 Park JS, Svetkauskaite D, He Q, *et al.* Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem*, 2004; 279(9): 7370-7377.