

· 论 著 ·

35 例多发性硬化患者 Th17 细胞及相关细胞因子的检测

于 周¹, 吕志宇², 李作孝^{2△}

(1. 四川省凉山彝族自治州第一人民医院神经内科, 西昌 615000; 2. 泸州医学院附属医院神经内科, 四川泸州 645000)

摘要:目的 探讨多发性硬化(MS)患者外周血 Th17 细胞水平及相关细胞因子的意义。方法 采用流式细胞分析法检测 35 例 MS 患者(MS 组)和 20 例健康者(对照组)外周血 Th17 细胞占 CD4⁺T 细胞比例, ELISA 法检测外周血 IL-17、IL-23 水平。结果 MS 组患者外周血 Th17/CD4⁺T 细胞比例[(1.94±0.32)%]显著高于对照组[(0.60±0.25)%], 差异有统计学意义($P<0.01$); MS 组患者外周血 IL-17、IL-23 水平亦明显高于对照组[IL-17: MS 组(69.01±19.29)ng/L、对照组(25.94±15.61)ng/L; IL-23: MS 组(550.80±112.06)ng/L、对照组(158.78±33.19)ng/L, ($P<0.01$)。患者外周血 IL-17 水平与 IL-23 水平呈正相关($r=0.731, P<0.01$)。结论 MS 患者外周血 Th17/CD4⁺T 细胞比例增加, 相关细胞因子 IL-17、IL-23 水平升高, Th17 细胞可能参与了 MS 的发生与发展。

关键词: 多发性硬化; 白细胞介素; Th17 细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.07.008

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)07-0644-02

Detection of Th17 cells and related cytokines in 35 cases of multiple sclerosis

Yu Zhou¹, Lv Zhiyu², Li Zuoxiao^{2△}

(1 Department of Neurology, First Hospital of Liangshan, Xichang, Sichuan 615000, China; 2. Department of Neurology, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To investigate the levels of T help 17 cells(Th17) and related cytokines in the patients with multiple sclerosis(MS) and their significance to clinic. **Methods** IL-17 and IL-23 levels for multiple sclerosis patients and controls were evaluated by enzyme-linked immunoassay. The frequencies of Th17 in CD4⁺T cells were checked by flow cytometric analysis. **Results** The frequencies of Th17 in peripheral blood were found to be significantly higher in the patients with multiple sclerosis($P<0.01$). Th17 type cytokine IL-17 and IL-23 markedly increased in multiple sclerosis patients[IL-17: MS(69.01±19.29) ng/L, control(25.94±15.61)ng/L; IL-23: MS(550.80±112.06) ng/L, control(158.78±33.19)ng/L, ($P<0.01$). Plasma concentration of IL-17 was positively correlated with concentration of IL-23 in multiple sclerosis patients($r=0.731, P<0.01$). **Conclusion** The frequencies of Th17 cells and Th17 type cytokines in the patients with multiple sclerosis may suggest a potential role in progression and stability of multiple sclerosis.

Key words: multiple sclerosis; interleukin; T help 17 cell

新近研究发现, 机体存在一种新型的 CD4⁺ 效应性 T 细胞——Th17 细胞, 该细胞具有独立的分化和发育调节机制, 因其主要分泌 IL-17, 不表达干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 和 IL-4, 故被命名为 Th17 细胞(T help 17 cell)。Th17 细胞已经被证实部分自身免疫性疾病、感染等疾病中发挥重要的作用, 但与多发性硬化(multiple sclerosis, MS)的相关报道较少。本实验通过对 MS 患者外周血 Th17/CD4⁺T 细胞比例及相关细胞因子 IL-17、IL-23 水平的检测, 探讨 MS 患者 Th17 细胞比例与功能变化及其意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取泸州医学院附属医院神经内科 2009 年 1~6 月住院 MS 患者 35 例, 男 12 例, 女 23 例; 平均年龄(36±8)岁, 均符合 2005 年新修订的 McDonald 诊断标准; 对照组选取该院门诊健康体检者 20 名, 平均年龄(34±9)岁。排除标准: (1) 并发严重心、肝、肾功能不全; (2) 脑出血、脑梗塞及其他脑部合并症; (3) 急、慢性感染; (4) 合并其他自身免疫性疾病;

(5) 肿瘤; (6) 合并妊娠; (7) 应用免疫调节剂、非甾体类抗炎药物者。

1.2 方法

1.2.1 仪器与试剂 IL-17A(FITC)为 eBioscience 公司产品[含刺激剂佛波醇乙酯(Phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)、离子霉素(ionomycin)和蛋白质转运抑制剂莫能霉素(monesin)]; 淋巴细胞分离液(比重 1.077±0.002 g/mL 为上海君创生物科技有限公司生产; 人 IL-17 ELISA 试剂盒为 Biosource 公司生产; 人 IL-23 ELISA 试剂盒为 Bender MedSystems 公司生产。

1.2.2 标本收集 于入院第 2 天(体检)清晨从研究对象肘静脉采取空腹血标本。标本置入肝素钠抗凝管内; 分离外周血单个核细胞(PBMC)用于流式细胞学检测。外周血离心后取血浆保存于-80℃低温冰箱内用于 ELISA 检测细胞因子。

1.2.3 Th17 细胞流式检测 将肝素抗凝静脉血用 Ficoll 淋巴细胞分离液提取 PBMC, 用 RPMI-1640 调整细胞浓度至 2×

△ 通讯作者, Tel:13882794776; E-mail: lzx3235@sina.com。

10⁶/mL,接种于 24 孔培养板后加入刺激剂 PMA 50 μg/L, ionomycin 1 μmol/L 和 monesin 500 μg/L,在 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱培养 4 h。收集细胞,根据计数等分为测定管和同型对照管,加入 20 μg/μL PE 标记的抗鼠 CD4⁺ 单抗,4 °C 避光孵育 30 min。PBS 洗涤 2 次,固定液室温避光固定反应 20 min 后离心弃上清液,PBS 洗涤 2 次。加入破膜剂进行细胞打孔利于细胞因子单抗进入细胞,离心弃上清液后进行胞内细胞因子染色。测定管中加入 FITC 标记的 IL-17A 0.5 μg,对照管中加入相应的同型对照,4 °C 避光孵育 30 min,PBS 洗涤 2 次后上机检测。

1.2.4 IL-17、IL-23 水平的检测 用 ELISA 试剂盒分别检测研究对象外周血 IL-17、IL-23 水平,操作过程按产品说明书进行。

1.3 统计学处理 所有数据应用 SPSS15.0 软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料两组均数比较用 *t* 检验,变量间相互关系采用 Pearson 直线相关分析,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义

2 结 果

2.1 两组外周血 IL-17/CD4⁺ T 细胞比例比较 实验结果显示 MS 组外周血 Th17/CD4⁺ T 细胞比例[(1.94 ± 0.32)%]明显高于对照组[(0.60 ± 0.25)%],差异有统计学意义(*P* < 0.01)。

2.2 两组外周血 IL-17 及 IL-23 水平比较 MS 组外周血 IL-17 及 IL-23 水平均较对照组明显增高(*P* < 0.01),见表 1。进一步相关分析显示 IL-17 水平与 IL-23 水平呈正相关(*r* = 0.731,*P* < 0.01),见图 1。

表 1 两组外周血 IL-17 及 IL-23 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, ng/L)

组别	<i>n</i>	IL-17	IL-23
MS 组	35	69.01 ± 19.29	550.80 ± 112.06
对照组	20	25.94 ± 15.61	158.78 ± 33.19
<i>P</i>		< 0.01	< 0.01

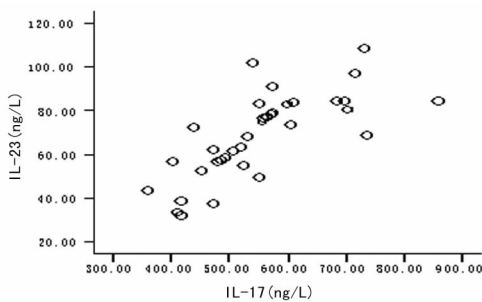


图 1 MS 组患者 IL-17 水平与 IL-23 水平的相关性分析

3 讨 论

CD4⁺ T 细胞是 MS 发病过程中的主要效应细胞^[1]。它有多多个细胞亚群,各细胞亚群间相互作用,相互影响,彼此间保持相对的动态平衡,其间任一环节异常均会打破平衡,引起免疫缺陷病或自身免疫性疾病。

Th17 细胞是由天然 T 细胞前体分化而来,具有独立的分化和发育调节机制,因其主要分泌 IL-17,不表达 IFN-γ 和 IL-4,故被命名为 Th17 细胞。有研究发现转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)与 IL-6 或者 IL-21 的协同作用

是诱导 Th17 细胞分化的关键因素,而 IL-23 在促进 IL-17 分泌、增强 Th17 细胞效应功能方面发挥重要作用^[2]。现证实 ROR-γt(retinoid-related orphan receptors-γt)是促进 Th17 细胞分化、调节其功能的特异性转录调节因子^[3-4]。Th17 细胞分泌的细胞因子除了 IL-17(IL-17A-IL-17F)外,还包括 IL-21、IL-22、IL-6、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)等细胞因子^[5]。目前,在多种自身免疫性疾病,包括类风湿关节炎、系统性红斑狼疮(SLE)、哮喘等患者的血清及组织中检测到了 IL-17 的高表达^[6-10]。有学者发现 SLE 患者中 IL-17 的表达水平升高,在肾移植中也出现 IL-17 蛋白在前期排斥中表达升高。与上述发现一致的是 IL-17 缺陷小鼠或用 IL-17 受体拮抗剂处理的小鼠表现出对佐剂诱导的关节炎或者实验性自身免疫性脑脊髓膜炎的抵抗^[11-12]。

近期关于 Th17 细胞的鉴定、分化、调节的机制已有较多研究和进展,但作为 CD4⁺ T 效应性 Th17 细胞在 MS 患者中的比例与功能改变尚未见报道。本研究结果显示 MS 患者外周血 Th17 细胞比例显著高于对照组,同时 IL-17 的水平也明显高于对照组,说明 Th17 细胞比例升高与细胞功能增强是一致的。由此推测 Th17 细胞作为一种新发现的病理性效应 CD4⁺ T 细胞可能通过 IL-17 的促炎效应,加重机体的病理性免疫应答反应,参与炎性脱髓鞘并促进 MS 发生、发展。因为 IL-23 是由抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC)分泌的促炎性细胞因子,是 IL-6 家族的一员,由一个独特的 p19 亚基以及与 IL-12 共用的 p40 亚基组成,是诱导人 Th17 细胞分化和 IL-17 产生的重要细胞因子,在自身免疫性疾病的发生、发展中发挥关键作用^[13],本研究进一步测定了外周血 IL-23 水平,结果显示 MS 组患者外周血 IL-23 水平也明显高于对照组,从而提示 IL-23 通过促进 Th17 细胞分化和 IL-17 产生参与 MS 发病与疾病进展。

Th17 细胞亚群比例变化证实了 CD4⁺ 细胞亚群功能失衡导致 MS 发病免疫学机制的观点, Th17 细胞比例及相关细胞因子的变化反映了 MS 整个复杂免疫反应异常的一个环节,对 Th17 细胞在 MS 发病机制中作用的研究可以进一步揭示 MS 的发生、发展机制,有望成为治疗 MS 的新靶点。

参考文献:

[1] Nakajima H, Fukuda K, Doi Y, et al. Expression of TH1/TH2-related chemokine receptors on peripheral T cells and correlation with clinical disease activity in patients with multiple sclerosis[J]. Eur Neurol, 2004, 52(3): 162-168.

[2] Park H, Li Z, Yang XO, et al. A distinct lineage of CD4⁺ T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17[J]. Nat Immunol, 2005, 6(11): 1133-1141.

[3] Michel ML, Mends-da-Cruz D, Keller AC, et al. Critical role of ROR-gammat in a new thymic pathway leading to IL-17-producing invariant NKT cell differentiation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(50): 9845-9850.

[4] Chen Z, Laurence A, Oshera JJ, et al. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation[J]. Semin Immunol, (下转第 649 页)

早期诊断、预后判断具有一定价值,并有可能成为乳腺癌治疗的潜在靶点。

参考文献:

- [1] Bagheri-Yarmand R, Mandal M, Taludker AH, et al. Etk/Bmx tyrosine kinase activates Pak1 and regulates tumorigenicity of breast cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(31):29403-29409.
- [2] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.
- [3] Eieenne-Manneille S, Hau A. RhoGTPase in Cell biology [J]. *Nature*, 2002, 420(7):620-635.
- [4] Bokoch GM. Biology of the p21-activated kinases[J]. *Annu Rev Biochem*, 2003, 72:743-81.
- [5] Carter JH, Douglass LE, Deddens JA, et al. Pak-1 expression increases with progression of colorectal carcinomas to metastasis[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(10):3448-3456.
- [6] Mazumdar A, Kumar R. Estrogen regulation of Pak1 and FKHR pathways in breast cancer cells[J]. *FEBS Lett*, 2003, 535(1-3):6-10.
- [7] Coniglio SJ, Zavarella S, Symons MH. Pak1 and Pak2 mediate tumor cell invasion through distinct signaling mechanisms[J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(12):4162-4172.
- [8] Chau CH, Chen KY, Deng HT, et al. Coordinating Etk/Bmx activation and VEGF upregulation to promote cell survival and proliferation[J]. *Oncogene*, 2002, 21(57):8817-8829.
- [9] Molli PR, Li DQ, Murray BW, et al. PAK signaling in oncogenesis[J]. *Oncogene*, 2009, 28(28):2545-2555.
- [10] 罗勇军, 刘昕. 实时荧光定量 PCR 标准品的制备及应用[J]. *重庆医学*, 2005, 34(3):414-415.
- [11] Rayala SK, Talukder AH, Balasenthils, et al. P₂₁-activated kinase 1 regulation of estrogen receptor-alpha activation involves serine 305 activation link with serine 118 phosphorylation[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(3):1694-1701.
- [12] Zoubir M, Mathieu MC, Mazouni C, et al. Modulation of ER phosphorylation on serine 118 by endocrine therapy: a new surrogate maker of efficacy[J]. *Ann Oncol*, 2008, 19(8):1402-1406.
- [13] Faure S, Vigneron S, Galas S, et al. Control of G2/M transition in *Xenopus* by a member of the p21-activated kinase (PAK) family: a link between protein kinase A and PAK signaling pathways[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(6):3573-3579.
- [14] Bagheri-Yarmand R, Vadlamudi RK, Wang RA, et al. Vascular endothelial growth factor up-regulation via p21-activated kinase-1 signaling regulates heregulin-beta1-mediated angiogenesis[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(50):39451-39457.
- (收稿日期:2010-10-10 修回日期:2010-11-10)
-
- (上接第 645 页)
- 2007, 19(6):400-408.
- [5] Sutton C, Brereton C, Kepgh B, et al. A crucial role for interleukin (IL)-in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis[J]. *Exp Med*, 2006, 203(7):1685-1691.
- [6] Wong CK, Ho CY, Li EK, et al. Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Lupus*, 2000, 9(8):589-593.
- [7] Hashimoto T, Akiyama K, Kobayashi N, et al. Comparison of IL-17 production by helper T cells among atopic and nonatopic asthmatics and control subjects[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2005, 137 Suppl 1:S51-54.
- [8] Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells[J]. *J Exp Med*, 2007, 204(8):1849-1861.
- [9] Schnyder-Candrian S, Togbe D, Couillin L, et al. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma[J]. *J Exp Med*, 2006, 203(12):2715-2725.
- [10] Maini RN, Taylor PC, Szechinski J, et al. Double-blind randomized controlled clinical trial of the interleukin-6 receptor antagonist, tocilizumab, in European patients with rheumatoid arthritis who had an incomplete response to methotrexate[J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(9):2817-2829.
- [11] Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Immunology*, 2006, 177(12):566-573.
- [12] Nakae S, Nambu A, Sudo K, et al. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17 deficient mice [J]. *Immunology*, 2003, 171(11):6173-6177.
- [13] Xiao S, Jin H, Korn T, et al. Retinoic acid increases Foxp3 + regulatory T cells and inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF-beta-driven Smad3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression[J]. *Immunology*, 2008, 181(4):2277-2284.
- (收稿日期:2010-05-10 修回日期:2010-09-10)