

· 临床研究 ·

哮喘患者外周血 Th17 细胞水平及功能的研究

刘泽宇, 夏书月, 王 冉

(沈阳医学院附属中心医院呼吸内科, 沈阳 110024)

摘要:目的 探讨 Th17 细胞在哮喘发病机制中的作用。方法 以 10 例哮喘患者和 10 例健康志愿者为研究对象, 分别留取外周血标本。利用 RT-PCR 技术检测外周血中淋巴细胞所表达的维甲酸相关孤儿受体 γ t (ROR γ t) mRNA 的相对量, 流式细胞仪检测外周血中 Th17 细胞的比例, ELISA 法检测血浆中白细胞介素 (IL)-17 的水平。结果 ROR γ t mRNA 在哮喘组的表达水平 (0.46 ± 0.07) 高于对照组 (0.15 ± 0.02), 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。Th17 细胞在哮喘组的比例 (28.53 ± 7.20)% 高于对照组 (14.72 ± 2.33)%, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。IL-17 在哮喘组的水平 (102.31 ± 11.45) pg/mL 明显高于对照组 (59.68 ± 8.85) pg/mL。结论 Th17 细胞与哮喘具有相关性, 可能通过分泌以 IL-17 为主的细胞因子来上调炎症反应, 加重哮喘病情。

关键词:哮喘; 白细胞介素 17; Th17 细胞; 维甲酸相关孤儿受体 γ t

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.31.015

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)31-3766-03

Study of the level and function of Th17 cells in the peripheral blood of asthmatic

Liu Zeyu, Xia Shuyue, Wang Ran

(Department of Respiratory, Central Hospital Attached to Shenyang Medical College, Shenyang, Liaoning 110024, China)

Abstract: Objective To explore the role of Th17 cells in the pathogenesis of asthma. Methods Peripheral blood was obtained from 10 patients with asthma (asthma group) and 10 healthy volunteers (control group). ROR γ t mRNA expression of lymphocytes was measured by RT-PCR, percentage of Th17 cell was detected by FCM, IL-17 in plasma was examined by ELISA. Results ROR γ t mRNA level in asthma group (0.46 ± 0.07) was significantly higher than that in control group (0.15 ± 0.02), proportion of Th17 cell in asthma group (28.53 ± 7.20)% was significantly higher than that in control group (14.72 ± 2.33)%, $P < 0.01$. Compared with IL-17 level in control group (59.68 ± 8.85) pg/mL, there was significant increase in asthma group (102.31 ± 11.45) pg/mL ($P < 0.01$). Conclusion Th17 cell is associated with asthma, and probably aggravating asthma condition through increasing inflammation secreting IL-17.

Key words: asthma; interleukin-17; Th17 cell; ROR γ t

哮喘是由多种细胞(如嗜酸性粒细胞、肥大细胞、淋巴细胞、中性粒细胞、气道上皮细胞等)参与的气道慢性炎症性疾病。这种慢性炎症导致气道高反应性, 通常出现广泛多变的可逆性气流受限, 并引起反复发作性的喘息、气急、胸闷或咳嗽等症状。目前认为, 气道炎症学说是最重要的哮喘发病机制, 免疫调节失衡是发病机制的核心。近年的研究发现了一种新型的 T 细胞亚群, 可以产生白细胞介素 (IL)-17, 但不能产生 γ 干扰素 (interferon-gamma, INF- γ) 和 IL-4, 因此称之为 Th17 细胞亚群^[1]。维甲酸相关核孤儿受体 γ t (Retinoid-related orphan receptor γ t, ROR γ t) 是调节 Th17 细胞分化的特异性转录因子, 直接决定了 Th17 细胞的分化能力。Th17 细胞通过分泌 IL-17 等细胞因子, 在免疫调控网络中发挥重要作用, 参与炎症反应、自身免疫性疾病和移植排斥等。进一步的研究表明, Th17 细胞和哮喘、慢性阻塞性肺疾病 (COPD)、肺炎、结节病、囊性纤维化等多种肺部疾病具有相关性。但对于人体 Th17 细胞在哮喘发病过程中的作用机制, 目前还不清楚。本研究通过检测哮喘患者外周血中 ROR γ t mRNA 的表达量、Th17 细胞的比例和血浆中 IL-17 的水平来了解 Th17 细胞的分化能力、数量多少和功能状况, 进而明确 Th17 细胞和

哮喘的关系, 推测 Th17 细胞可能发挥的调控作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2009 年 10 月至 2011 年 12 月在本科住院的急性发作期哮喘患者 10 例。入选标准: 符合中华医学会呼吸病学分会哮喘学组《支气管哮喘防治指南》的诊断标准, 且近 2 周内未使用糖皮质激素。其中男 5 例, 女 5 例, 平均年龄 (36 ± 6) 岁。对照组为健康志愿者 10 例, 男 5 例, 女 5 例, 平均年龄 (30 ± 5) 岁。本研究得到了本院伦理委员会批准, 所有受试者均已签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 收集标本 清晨空腹抽取受试者外周血至少 7 mL。其中 5 mL 用于提取 RNA, 1 mL 用于流式细胞学检测, 1 mL 用于 ELISA 检测。

1.2.2 Trizol (购自美国 Invitrogen 公司) 法提取 RNA 取 5 mL 外周血, 用淋巴细胞分离液分离得到单个核细胞, 通过台盼兰染色测定细胞存活率, 活细胞的比例应不少于 95%。利用 Trizol 法获取 RNA 沉淀, 再用 DEPC 水溶解, 紫外分光光度计测定 RNA 的纯度和浓度, 并计算 RNA 总量。再通过琼脂糖凝胶电泳, 鉴定 RNA 的完整性。

1.2.3 将 RNA 逆转录成 cDNA(RT-PCR 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司) 首先配制 RNA/Primer 混合物:总 RNA 5 μ L+50 μ mol/L 多聚胸腺嘧啶 1 μ L+10 mmol/L dNTP 混合物 1 μ L+DEPC 处理双蒸水 3 μ L(补到 10 μ L),再配制 cDNA 合成混合物:10 \times RT 缓冲液 2 μ L+25 mmol/L MgCl₂ 4 μ L+0.1 mol/L 二硫代苏糖醇 2 μ L+RNaseOUT (40 U/ μ L) 1 μ L+SuperScript III RT(200 U/ μ L)1 μ L。将 10 μ L cDNA 合成混合物加入 RNA/引物混合物中,反应后加入 RNase H 降解残留的 RNA。

1.2.4 PCR 扩增 ROR γ t 的 cDNA 在 NCBI 中查到 ROR γ t 的 cDNA 序列,设计上游引物:5'-GCA ACA GCA GCA ACA GGA-3',下游引物:5'-TCA GGG AGG CAT AGG GTG-3',产物长度为 428 bp(引物由上海英骏生物技术有限公司合成)。将 β 肌动蛋白(β -actin)基因作为内参,上游引物:5'-GCT CGT CGT CGA CAA CGG CTC-3',下游引物:5'-CAA ACA TGA TCT GGG TCA TCT TCT C-3',产物长度为 353 bp。将 PCR 缓冲液、dNTP 混合物、上游引物、下游引物、Taq 酶、cDNA 模板、双蒸水加入一薄壁离心管中,进行 PCR 扩增(PCR 仪为德国 Promega 公司产品)。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min。94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,61.5 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s,30 个循环。最后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。

1.2.5 PCR 产物的半定量分析 配制 1% 琼脂糖凝胶,将扩增产物 5 μ L 加入加样孔中,DM2000(购自北京天根生化科技有限公司)为 DNA 分子量标准,进行琼脂糖凝胶电泳,110 伏电压电泳 30 min。把电泳凝胶放入扫胶仪中进行观察并拍照。通过 Gel-Pro 软件,用 ROR γ t 对 β -actin 的累积光密度(OD)的比值作为 ROR γ t 的相对量,进行统计分析。

1.2.6 流式细胞术检测 Th17 细胞的比例 将外周血按 1:1 的比例与 RPMI 1640 培养基(购自美国 Gibco 公司)混匀,加入激活剂佛波酯(PMA),离子霉素(Ionomycin)和高尔基体阻断剂 Brefeldin-A(BFA)(均购自美国 Sigma 公司),培养 4 h 后与结合有 FITC 的抗人 CD4 单抗(购自美国 BD 公司)反应 30 min。再经过溶血素(购自碧云天公司)裂解红细胞,Fix&-perm(购自美国 Caltag 公司)固定、破膜。最后与结合有 PE 的抗 IL-17 单抗(购自美国 BD 公司)反应,流式细胞仪(美国 BD 公司产品)检测。

1.2.7 ELISA 检测 IL-17 水平 先将试剂盒(购自美国 R&D 公司)平衡至室温,再将标准品、生物素化抗体和酶结合物稀释后备用。取出包被有 IL-17 抗体的酶标板。除空白孔外,分别将析出的血浆和不同浓度的标准品(100 μ L/孔)加入相应的板孔中孵育。此后依次经过与生物素化抗体、酶结合物、显色剂、终止液的多步反应,最后测量 OD₄₅₀ 值。每个标准品和标本的 OD 值均应减去空白孔的 OD 值。根据标准品的 OD 值,绘制标准曲线,计算血浆中 IL-17 水平。

1.3 统计学处理 首先进行两样本的方差齐性检验, $P > 0.05$ 为方差齐。再做两个独立样本的 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 外周血中 ROR γ t mRNA 的表达水平 ROR γ t mRNA 在哮喘组的表达水平(0.46 \pm 0.07)高于对照组(0.15 \pm 0.02),差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 1。

2.2 外周血中 Th17 细胞的比例 Th17 细胞在哮喘组的比例(28.53 \pm 7.20)%高于对照组(14.72 \pm 2.33)%,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 2。

2.3 血浆中 IL-17 水平比较 IL-17 在哮喘组为(102.31 \pm 11.45)pg/mL 明显高于对照组(59.68 \pm 8.85)pg/mL。

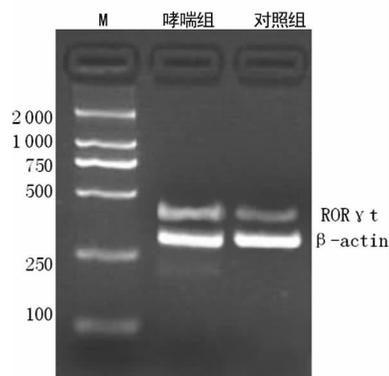


图 1 两组 ROR γ t mRNA 的表达水平

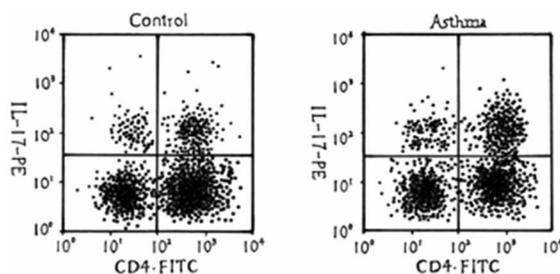


图 2 两组 Th17 细胞的比例

3 讨 论

哮喘的发病基础是慢性气道炎症。气道炎症学说是近年公认的最重要的哮喘发病机制。外源性过敏原使肥大细胞脱颗粒所释放出的炎性介质,除了能引起速发相哮喘反应外,其中的白三烯、血小板活化因子和嗜酸性粒细胞趋化因子等,可使嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、中性粒细胞、巨噬细胞等炎症细胞从外周血募集到气道,并活化,释放出很多炎症介质,可使气道黏膜上皮破坏,微血管渗漏,黏膜水肿,腺体分泌增加,导致迟发相哮喘反应。这些细胞,细胞因子和炎症介质共同构成了哮喘炎症反应和免疫调节的网络。目前认为,免疫调节失衡是发病机制的核心。避免免疫调节失衡是控制哮喘发作,改善预后的关键,也是目前研究的热点之一。

对于在免疫调控网络中起重要作用的 Th,根据所分泌的细胞因子的不同,传统上将其分为 Th1 和 Th2 两个亚群。Th1 细胞以分泌 INF- γ 和 IL-2 为主,Th2 细胞以分泌 IL-4、IL-5 和 IL-13 为主,Th1/Th2 失衡可以导致哮喘等多种疾病的发生。近年的研究发现了一种新型的 Th 细胞亚群,以产生 IL-17 为主,但不能产生 INF- γ 和 IL-4,因此称之为 Th17 细胞亚群^[1]。Th17 细胞是由初始 T 细胞分化而来,在细胞和分子水平受到精细调节。转化生长因子(transforming growth factor-beta, TGF- β)是启动 Th17 细胞分化的始动因素^[2],IL-6 是协同促进 Th17 细胞分化的关键因子,而 IL-23 则对 Th17 细胞的存活和增殖发挥关键作用^[3]。此外,Th17 细胞还可以通过自分泌的方式释放 IL-21,正向调节自身分化。目前发现起负向调节作用的细胞因子包括 INF- γ 、IL-4、IL-12、IL-25 等。虽

然 Th17 细胞可以分泌多种细胞因子,但主要还是通过分泌 IL-17 来发挥生物学作用,广泛参与抗感染、自身免疫和移植排斥等^[4-6]。

ROR γ t 是调节 Th17 细胞分化的特异性转录因子,在 Th17 细胞分化发育过程中起到极其重要的作用。体外实验显示,在 TGF- β 和 IL-6 的共同作用下,初始 CD4⁺ T 细胞可以分化为 Th17 细胞,但需要 ROR γ t 的表达,即使没有其他的外源性细胞因子,加强表达 ROR γ t 也足以诱导 Th17 细胞的分化^[7]。当 ROR γ t 缺乏时,Th17 细胞的数量也随之显著下降^[8]。ROR γ t 基因敲除的小鼠不易出现严重的自身免疫性疾病^[9],炎症组织中 Th17 细胞也明显减少^[10]。这些研究结果均提示,ROR γ t 可以通过促进 Th17 细胞的分化,间接起到上调炎症反应的作用。本研究的结果表明,在哮喘患者的外周血中,淋巴细胞表达 ROR γ t 的水平较对照组明显升高,这会有力地促进初始 CD4⁺ T 细胞向 Th17 细胞分化,进而上调炎症反应,这与上面提到的研究结论是一致的。

虽然有多种细胞可以分泌 IL-17,但 IL-17 的主要来源仍然是 Th17 细胞。作为一种细胞因子,IL-17 可以通过募集并激活中性粒细胞等多种方式发挥促炎作用^[11],参与包括哮喘在内的多种慢性炎症性疾病。利用哮喘的动物模型,对 Th17 细胞/IL-17 和哮喘发病之间关系所进行的研究,已经取得了一定进展。李鸿佳等^[12]等发现,哮喘组小鼠外周血中 Th17 细胞明显增多,支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中 IL-17 的水平显著升高。在哮喘小鼠肺组织中,增多的 Th17 细胞不但促进中性粒细胞在局部的浸润,而且增强变应原诱导的气道高反应性^[13]。McKinley 等^[14]等将 Th17 细胞通过静脉注入 T 细胞缺失的哮喘小鼠体内,诱导出 IL-17,气道内中性粒细胞聚集和气道高反应性。最新的研究表明,Th17 细胞分泌的 IL-17,可以直接作用于气道平滑肌细胞,诱发气道高反应性^[15]。动物模型的研究结果表明,Th17 细胞/IL-17 与哮喘发病密切相关。而在哮喘患者体内,是否也有类似情况,目前还不清楚。作者对哮喘患者外周血中 Th17 细胞和 IL-17 进行研究后发现:与对照组相比较,Th17 细胞的比例和 IL-17 的浓度均明显升高,差异有统计学意义,这与哮喘动物模型的研究结果是吻合的。Th17 细胞的增多可能与初始 CD4⁺ T 细胞在多种细胞因子的刺激下,分化和增殖得到加强有关。而 Th17 细胞活化后,对 IL-17 的表达明显增强,机体内 IL-17 的水平升高,进而上调炎症反应。

综上所述,哮喘患者外周血中 Th17 细胞的分化加强,数量增多,血浆中 IL-17 的水平增高。据此推测,Th17 细胞参与了哮喘的发病过程,可能通过分泌以 IL-17 为主的多种细胞因子,加重气道炎症反应。今后的研究方向包括进一步深化对 Th17 细胞生物学特点的认识,尝试通过干预 Th17 细胞来控制炎症反应,改善哮喘的预后。

参考文献:

[1] Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages[J]. Nat Immunol, 2005, 6(11): 1123-1132.

[2] Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, et al. Transfor-

ming growth factor-beta induces development of the Th17 lineage[J]. Nature, 2006, 441(7090): 231-234.

[3] McGeachy MJ, Chen Y, Tato CM, et al. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo [J]. Nat Immunol, 2009, 10(3): 314-324.

[4] Blnesu P, Ldaru A, Voiosu T, et al. Th17 and IL-17 immunity in chronic hepatitis C infection [J]. Rom J Int Med, 2012, 50(1): 13-18.

[5] Chiricozzi A, Zhang S, Dattola A, et al. New insights into the pathogenesis of cutaneous autoimmune disorders[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2012, 26(2): 165-170.

[6] Nakagiri T, Inoue M, Minami M, et al. Immunology mini-review: the basics of T(H)17 and interleukin-6 in transplantation[J]. Transplant Proc, 2012, 44(4): 1035-1040.

[7] Cha HR, Chang SY, Chang JH, et al. Downregulation of Th17 cells in the small intestine by disruption of gut flora in the absence of retinoic acid[J]. J Immunol, 2010, 184(10): 6799-6806.

[8] Hirahara K, Ghoreschi K, Laurence A, et al. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in Th17 cell differentiation [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2010, 21(6): 425-434.

[9] Kwan BC, Tam LS, Lai KB, et al. The gene expression of type 17 T-helper cell-related cytokines in the urinary sediment of patients with systemic lupus erythematosus[J]. Rheumatol(Oxford), 2009, 48(13): 1491-1497.

[10] Buonocore S, Ahern PP, Uhlig HH, et al. Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology[J]. Nature, 2010, 464(14): 1371-1375.

[11] Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, et al. Functional specialization of interleukin-17 family members [J]. Immunity, 2011, 34(2): 149-162.

[12] 李鸿佳, 盖庆玲, 王立华, 等. Th17 淋巴细胞在哮喘小鼠气道炎症中的初步研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(1): 30-32.

[13] Wilson RH, Whitehead GS, Nakano H, et al. Allergic sensitization through the airway primes Th17-dependent neutrophilia and airway hyperresponsiveness[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 180(8): 720-730.

[14] McKinley L, Alcorn JF, Peterson A, et al. TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice [J]. Immunol, 2008, 181(243): 4089-4097.

[15] Kudo M, Melton AC, Chen C, et al. IL-17A produced by $\alpha\beta$ T cells drives airway hyper-responsiveness in mice and enhances mouse and human airway smooth muscle contraction[J]. Nat Med, 2012, 18(4): 547-554.