

神经病学

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000443

Th17 细胞及相关因子在多发硬化中表达变化及临床意义

刘博文¹, 谭戈²

(重庆医科大学附属第一医院 1. 金山医院内科, 重庆 401122; 2. 神经内科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨多发硬化(multiple sclerosis, MS)患者体内 Th17 细胞及相关细胞因子表达的变化及临床意义。**方法:**收集 MS 患者 27 例(MS 组)和健康对照 20 例(对照组)。采用逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)中白介素(interleukin, IL)-17 mRNA 的表达;采用酶联免疫法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测 IL-17、IL-23 和 IL-6 水平;采用流式细胞仪检测 Th17 细胞的表达。**结果:**MS 组外周血 PBMCs 中 IL-17 mRNA 的表达明显高于对照组($P<0.05$);MS 组外周血中 Th17 细胞及相关细胞因子 IL-17、IL-23 和 IL-6 的表达也明显高于对照组($P<0.05$)。**结论:**Th17 细胞及其相关细胞因子可能参与了 MS 的发生与进展,检测 Th17 细胞对诊断 MS 具有一定的临床意义。

【关键词】Th17 细胞;白介素 17;多发硬化

【中图分类号】R733.3

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-11-06

Changes in expression of Th17 cells and related cytokines in multiple sclerosis and its clinical significance

Liu Bowen¹, Tan Ge²

(1. Department of Internal Medicine of Jinshan Hospital; 2. Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the expression of change of Th17 cells and related cytokines in multiple sclerosis patients and its clinical significance. **Methods:** Totally 27 multiple sclerosis patients (MS group) and 20 healthy subjects (control group) were selected. RT-PCR was used to detect IL-17 mRNA; ELISA was used to detect IL-17, IL-23 and IL-6; FACS was used to detect Th17 cells in peripheral blood. **Results:** Level of IL-17 mRNA was significantly increased in MS group ($P<0.05$). When compared with that control group, expression of Th17 cells and related cytokines (IL-17, IL-23 and IL-6) was significantly increased in MS group ($P<0.05$). **Conclusion:** Th17 cells and related cytokines may participate in the pathogenesis of multiple sclerosis. Detection of Th17 cells could have clinical value in diagnosis of multiple sclerosis.

【Key words】Th17 cells; interleukin-17; multiple sclerosis

多发硬化(multiple sclerosis, MS)是一种慢性自身免疫性疾病,以中枢神经系统炎症性脱髓鞘和脑血管周围炎性细胞浸润为主要特征^[1]。目前尚不明确 MS 确切的发病机制,但已有研究证实,在 MS 的发病和病情进展中 CD4⁺ T 细胞起着重要的介导

作用^[2]。Th17 细胞是近年来发现的一种新型 CD4⁺效应性 T 细胞,通过分泌白介素(interleukin, IL)-17 等前炎症因子,在多种自身免疫性疾病、感染和肿瘤等疾病中发挥重要作用^[3]。有研究者发现,在 MS 的动物模型——实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)小鼠体内, Th17 细胞分泌的细胞因子 IL-17 增高^[4]。但有关 Th17 细胞及其相关细胞因子在 MS 患者体内表达的报道不多,本文通过检测 MS 患者外周血中 Th17 细胞、IL-17、IL-6 和 IL-23 等细胞因子的表达,探讨其与 MS 发病的关系。

作者介绍:刘博文, Email: noblemandoctor@163.com,

研究方向:神经病学。

通信作者:谭戈, Email: titot@sina.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号 30970988);国家临床重点专科建设资助项目(编号:卫办医政函[2012]649号)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150112.1655.008.html>
(2015-01-12)

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集 2011 年 1 月至 2013 年 10 月来我院神经内科就诊的 MS 患者 27 例(男 10 例,女 17 例),其中急性复发期 11 例,临床缓解期 16 例;平均年龄(34.3 ± 10.7)岁,平均病程(3.1 ± 0.9)年。所有患者均符合 2010 年新修订的 McDonald 诊断标准^[5]。另外收集同期来我院门诊的健康体检者 20 人归入对照组,其中男 7 例,女 13 例,平均年龄(32.1 ± 9.6)岁。MS 组和对照组的观察对象在性别构成和平均年龄上差异无统计学意义($P > 0.05$)。排除标准:(1)合并脑出血、脑梗塞等其他中枢神经系统及脑部疾病;(2)合并其他自身免疫性疾病;(3)近期使用糖皮质激素或其他免疫调节剂。

1.2 标本采集

抽取空腹外周静脉血,置于乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)抗凝管,5 ml/管,共 2 管。以 Ficoll 分层液法分离 PBMCs;将分离所得 PBMCs 调整浓度为 2×10^6 个/ml,向细胞悬液内加入单克隆抗体 anti-CD3 ($0.2 \mu\text{g/ml}$)和 anti-CD28 ($1 \mu\text{g/ml}$) (Gibco, 美国)。将细胞悬液分为三部分:(1)置于 6 孔板内,于 5% CO_2 , 37 °C 孵箱培养 20 h,用于提取 RNA;(2)置于 96 孔板内,于 5% CO_2 , 37 °C 孵箱培养 72 h,吸取上清液,用于 ELISA 检测;(3)置于 5 ml 培养管内,加入蛋白转运阻滞剂(brefeldin A, BFA) (Sigma, 美国),于 5% CO_2 , 37 °C 孵箱培养 4 h,用于细胞染色。

1.3 IL-17 mRNA 检测

采用 Trizol 一步法 (Invitrogen, 美国) 提取单个核细胞总 RNA, 严格按照试剂盒说明书进行操作。RT-PCR 反应体系如下: Taq 酶 (TaKaRa, 日本) $0.5 \mu\text{l}$ 、IL-17 和内参 GAPDH 上下游引物各 $0.5 \mu\text{l}$ 、模板 cDNA $1 \mu\text{l}$ 、100 mmol MgSO_4 $1 \mu\text{l}$ 、2 mmol/L dNTP $0.5 \mu\text{l}$ 、10 × PCR Buffer $5 \mu\text{l}$ 和 ddH₂O $15 \mu\text{l}$, 共计 $50 \mu\text{l}$ 。反应条件为: 95 °C 预变性 5 min; 循环 30 次 (95 °C 变性 45 s, 65 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min), 最后 72 °C 延伸 5 min。扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶中于 120 V 下进行电泳, 使用 Bio-capt 凝胶成像系统对结果进行分析。本研究引物采用 Primer 5.0 设计, IL-17 上游引物: 5'-GGACTGTGATGGT-CAACCTGA-3', 下游引物: 5'-TCATGTGGTAGTCCACGTT-CC3'; GAPDH 上游引物: 5'-GCATGGCCTTCCGTGTCC-3', 下游引物: 5'-TGAGTGTGGCAGGGACTC-3'。

1.4 IL-17、IL-6 和 IL-23 检测

采用双抗体夹心法 ELISA 试剂盒 (凯博, 上海) 测定培养细胞上清液中 IL-17、IL-6 和 IL-23, 严格按照说明书规定的步骤进行操作, 于波长 450 nm 处读取标准品和标本各孔吸光度 (abstract, A) 值, 根据标准曲线判定结果。

1.5 Th17 细胞检测

用流式抗体 PE-CD5、FITC-CD8 和 APC-IL-17 对细胞按常规进行染色; 使用流式细胞仪 (BD Calibur, 美国) 进行细胞亚群和细胞因子检测, 并采用 Flowjo 软件对数据进行分析。

1.6 统计学处理

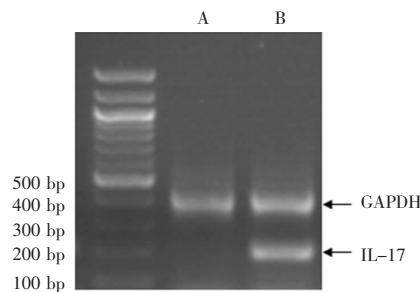
所有数据采用 SPSS 12.0 软件分析, 所有数据以均数 $\pm$

标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组均数间比较采用 t 检验进行统计, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 2 组 IL-17 mRNA 表达水平比较

如图 1 所示, 经 RT-PCR 后, 产物大小为 198 bp。对照组中几乎无 IL-17 mRNA 表达, 而 MS 组中 IL-17 mRNA 表达水平明显增高。



A. 对照组; B. MS 组

图 1 MS 组和对照组 PBMCs 中 IL-17 mRNA 的表达

Fig.1 Expression of PBMCs IL-17 mRNA in MS group and control group

2.2 2 组 Th17 细胞比较

如表 1 所示, 流式结果表明, MS 组外周血 Th17 细胞较对照组明显增高 ($P < 0.05$)。

2.3 2 组 IL-17、IL-23 及 IL-6 比较

实验结果显示, Th17 细胞相关细胞因子 IL-17、IL-23 及 IL-6 在 MS 组外周血的表达水平较对照组均有明显增高 ($P < 0.05$), 见表 1、图 2。

表 1 MS 组和对照组 Th17 细胞及相关细胞因子比较

Tab.1 Comparison of Th17 cells and related cytokines in MS group and control group

组别	Th17 (%)	IL-17 (pg/ml)	IL-23 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)
对照组 ($n=20$)	0.43 ± 0.08	20.7 ± 4.2	16.4 ± 3.1	12.9 ± 5.5
MS 组 ($n=27$)	1.57 ± 0.31	194.3 ± 17.6	153.1 ± 20.9	107.6 ± 14.8
t 值	4.380	9.875	8.937	8.673
P 值	0.012	0.009	0.006	0.011

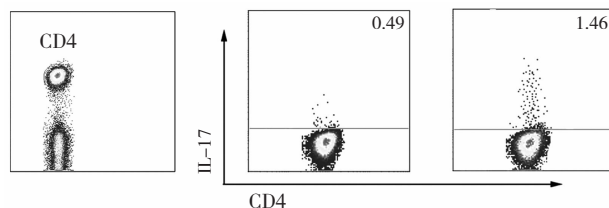


图 2 流式结果代表图

Fig.2 Results of flow cytometry

3 讨论

MS 以慢性进展性中枢神经系统脱髓鞘为特征,全世界约有超过一百万人患有该疾病,以中青年多见,主要表现为乏力、共济失调、视野缺损等严重的感觉、运动、神经认知方面的障碍,患者的自理生活能力受到极大的损害,给家庭社会造成了严重负担^[6-7]。MS 的发病机制目前尚不明确,除与自身免疫相关外,病毒感染、遗传倾向、环境因素及个体易感因素等都参与了 MS 的发病。关于 MS 病因学的研究多建立在其动物模型 EAE 小鼠的实验上。自身反应性 CD4⁺ T 细胞是 EAE 中的主要效应细胞。以往的研究发现,EAE 小鼠体内 Th1 细胞及其分泌的 IL-12 水平升高^[8],因此认为 Th1 细胞参与 EAE 的发病;但进一步的实验表明,阻断 IL-12 与其受体结合或将 IL-12 从小鼠体内清除后,小鼠仍然对 EAE 易感^[9]。

Th17 细胞是近年来新发现的一群效应性 CD4⁺ T 细胞,主要分泌 IL-17A (即 IL-17)、IL-17F、IL-22 和 TNF- α 等前炎症因子发挥促炎作用^[10]。目前在多种自身免疫性疾病,如系统性红斑狼疮、类风湿关节炎、支气管哮喘等患者的血清及局部组织中检测到高水平的 Th17 细胞^[11]。而在小鼠 EAE 模型中,Fitzgerald 等^[12]发现 EAE 病情的进展与小鼠体内 IL-17 和 IL-6 水平成正相关,且 IL-17 缺陷小鼠或 IL-17 受体经封闭处理后的小鼠对 EAE 不敏感^[13]。针对 MS 的基础研究结果显示,MS 患者血脑屏障的上皮细胞可表达 IL-17 受体,从而使得 IL-17 易于通过血脑屏障;Th17 细胞在移行通过血脑屏障进入中枢神经系统后又可进一步分泌 IL-17 及募集炎症性 CD4⁺ T 细胞,加重中枢炎症性脱髓鞘和脑血管周围的炎性细胞浸润,从而促进 MS 病情的进展^[14-15]。国内目前关于 MS 患者体内 Th17 细胞变化的报道不多,本研究从 RNA 水平和蛋白水平证实了 MS 患者外周血中 IL-17 水平升高;并且流式结果从单个细胞水平证明 MS 患者外周血 Th17 细胞比例显著高于对照组。因此认为,MS 患者体内 Th17 细胞数量增加和功能增强具有一致性。除此之外还发现 MS 患者外周血 IL-6 和 IL-23 的水平也明显高于健康对照。IL-6 和 IL-23 是 IL-6 家族的成员,由抗原提呈细胞分泌,是诱导初始 CD4⁺ T 细胞向 Th17 细胞分化及 IL-17 产生的关键因子。本研究结

果提示,MS 患者体内 Th17 细胞的增加与其诱导因子 IL-6 和 IL-23 密切相关。

总言之,Th17 细胞及其相关细胞因子可能参与了 MS 的发生与进展,其作用的确切机理还有待进一步的研究;而检测 Th17 细胞可能对诊断 MS 具有一定的临床意义。在后续研究中,将进行更大样本,更深入地研究,推动 Th17 细胞检测在 MS 诊断中的临床应用。

参考文献

- [1] Gaby A. Multiple sclerosis[J]. Glob Adv Health Med, 2013, 2(1): 50-56.
- [2] 任晓曦, 吴卫平, 徐全刚, 等. 多发性硬化患者 CD4⁺ T 细胞表型与病情变化的关系[J]. 临床荟萃, 2008, 9(15): 1080-1082.
- [3] 瞿金涛, 汪 玫, 肖 林. Th17 在多发性硬化中发病机制及相关治疗进展[J]. 中国实用医药, 2010, 13(1): 229-232.
- [4] Bedoya SK, Lam B, Lau K, et al. Th17 Cells in Immunity and Autoimmunity[J]. Clin Dev Immunol, 2013, 12(26): 789-986.
- [5] 郭 俊, 李宏增, 李柱一. 2010 版多发性硬化 McDonald 诊断标准[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2011, 6(4): 299.
- [6] Poser CM, Paty DW, Scheinbe L, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols[J]. Ann Neurol, 1983, 8(1): 227-231.
- [7] 张星虎. 多发性硬化的临床诊断[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2012, 3(2): 122-126.
- [8] Becher B, Durell BG, Noelle RJ. Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12[J]. Journal of Clinical Investigation, 2002, 110(4): 493-497.
- [9] Kanakasabai S, Casalini E, Walline CC, et al. Differential regulation of CD4⁺ T helper cell responses by curcumin in experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. J Nutr Biochem, 2012, 23(11): 1498-1507.
- [10] Miossec P and Kolls JK. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation[J]. Nat Rev Drug Discov, 2012, 11(10): 763-776.
- [11] Okada H and Khoury SJ. Type 17 T-cells in central nervous system autoimmunity and tumors[J]. J Clin Immunol, 2012, 32(4): 802-808.
- [12] Fitzgerald DC, Fonseca KZ, Cullimore ML, et al. Independent and interdependent immunoregulatory effects of IL-27, IFN- β , and IL-10 in the suppression of human Th17 cells and murine experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. Journal of Immunology, 2013, 190(7): 3225-3234.
- [13] Kalinke U, Prinz M. Endogenous, or therapeutically induced, type I interferon responses differentially modulate Th1/Th17-mediated autoimmunity in the CNS[J]. Immunol Cell Biol, 2012, 90(5): 505-509.
- [14] Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis[J]. The American Journal of Pathology, 2008, 172(1): 146-155.
- [15] Wang X, Ma C, Wu J, et al. Roles of T helper 17 cells and interleukin-17 in neuroautoimmune diseases with emphasis on multiple sclerosis and Guillain-Barré syndrome as well as their animal models[J]. J Neurosci Res, 2013, 91(7): 871-881.

(责任编辑: 冉明会)