

强直性脊柱炎外周血 Th17 细胞的检测及意义

邵 慧¹, 吕 坤² (1. 安徽省芜湖市第二人民医院检验科 241001; 2. 安徽省芜湖市弋矶山医院 241001)

【摘要】 目的 探讨 Th17 细胞在强直性脊柱炎(AS)患者外周血中的水平及意义。**方法** 取 20 例 AS 患者(分 AS 病情稳定组及活动组各 10 例)和健康人外周血单个核细胞(PBMC)、免疫磁珠分选 CD4⁺T 细胞,用或不用非特异性刺激剂(anti-CD3、anti-CD28),然后加佛波酯/离子霉素,经固定/透膜处理进行细胞内染色,流式细胞术检测 CD4⁺T 细胞内白细胞介素-17(IL-17)、 γ -干扰素(IFN- γ)、及 IL-6 水平。**结果** 免疫磁珠分选 CD4⁺T 细胞纯度达 90% 以上。AS 病情活动组 IL-17 表达水平较病情稳定组和健康对照组显著增高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。用 anti-CD3、anti-CD28 刺激后,CD4⁺T 细胞 IL-17 胞内表达水平较无刺激有一定的增加。AS 患者 CD4⁺T 细胞 IFN- γ 胞内表达水平呈现与 IL-17 表达相似的特点。**结论** AS 患者外周血 CD4⁺T 细胞胞内 IL-17 和 IFN- γ 呈高表达,提示分泌 IL-17 的 Th17 细胞和分泌 IFN- γ 的 Th1 细胞共同参与了 AS 发病过程。

【关键词】 强直性脊柱炎; Th17 细胞; 单个核细胞

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2011. 22. 037 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)22-2763-02

The detection and significance of IL-17 in peripheral blood of patients with ankylosing spondylitis SHAO Hui¹, LV Kun² (1. The Second People's Hospital of Wuhu City, Anhui 241001, China; 2. Yijishan Hospital of Wuhu City, Anhui 241001, China)

【Abstract】 Objective To study the expression and significance of Th17 cells in peripheral blood of patients with ankylosing spondylitis(AS). **Methods** The venous blood specimens of peripheral blood mononuclear cell(PBMC) were collected from 20 patients with AS and 15 healthy persons. Intracellular flow cytometry detection of IL-17, IFN- γ and IL-6 was established by using Anti-CD3/Anti-CD28 as stimulators after isolation of untouched human CD4⁺T cells from PBMC. **Results** The isolation of untouched human CD4⁺T cells from PBMC was effective and its purity was over 90%. The percentage of intracellular IL-17 in CD4⁺T cells from AS patients increased significantly. Such percentage in AS active group was higher than that in AS stable group and control group($P < 0.01$). Under Anti-CD3/Anti-CD28 stimulation, the percentage of intracellular IL-17 increased as well. The percentage of intracellular IFN- γ was similar to that of IL-17. **Conclusion** There is an abnormal expression of IL-17 and IFN- γ in human CD4⁺T cells from AS patients, suggesting that Th17 cells together with Th1 cells participates the pathogenesis of AS.

【Key words】 ankylosing spondylitis; Th17 cell; mononuclear cell

强直性脊柱炎(AS)是一种慢性炎症性疾病,目前病因仍有待于进一步阐明。Th17 细胞是新近发现的第三类效应性 T 细胞,它属于不同于 Th1 或 Th2 的 CD4⁺Th 细胞亚群^[1],在自射免疫性疾病及炎症性疾病中发挥重要的作用^[2-4]。已知 Th17 细胞是以产生白细胞介素-17(IL-17)为特征,胞内 IL-17 的表达可作为检测 Th17 细胞的标志^[5]。本文通过流式细胞术(FCM)检测 AS 患者外周血 Th17 细胞的比例变化,探讨其在 AS 发病过程中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 肝素抗凝静脉血标本取自芜湖市第二人民医院就诊的 AS 患者,活动期 10 例、稳定期 10 例,其中人类白细胞抗原 B27(HLA-B27)阳性 15 例;HLA-B27 阴性 5 例。男 19 例,女 1 例,平均年龄(34 $\pm$ 5)岁。诊断符合 1984 年修订的纽约标准。活动指标定义为:红细胞沉降率大于 25 mm/h,有脊背痛,晨僵大于或等于 30 min,伴周围关节肿痛,Bath AS 活动性指数大于或等于 4。分组:(1)AS 病情稳定组 10 例(稳定组);(2)AS 病情活动组 10 例(活动组);(3)选年龄和性别相匹

配的 10 例健康献血员作为对照组,男 8 例,女 2 例,平均年龄(29 $\pm$ 8)岁,无 AS 既往史和家族史,排除其他自身免疫性疾病和感染性疾病表现。

1.2 方法

1.2.1 试剂与仪器 荧光素标记的抗体:PE 标记的抗人 IL-17、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗人 γ -干扰素(IFN- γ)及相应同型对照抗体购自 EBioscience 公司;佛波酯(PMA)、离子霉素(Ion)购自 Sigma 公司;抗 CD3 单抗(anti-CD3)、anti-CD28 购自 EBioscience 公司;免疫磁珠分选试剂盒(MACS Human CD4⁺T Cells)购自 Miltenyi biotec 公司;固定与透膜试剂盒(FIX/PERM)购自 EBioscience 公司;淋巴细胞分离液(Ficoll)购自上海试剂二厂;RPMI 1640 细胞培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司;FACS Calibur 流式细胞仪(BD 公司产品)。

1.2.2 胞内细胞因子检测 采用 Ficoll 分离外周血单个核细胞(PBMC),然后根据 MACS 分选试剂盒操作说明分选出 CD4⁺T 细胞,以含 10% 胎牛血清(FBS)的 1640 培养液重悬细胞(终浓度为 1 $\times$ 10⁶/mL),加入 PMA 50 ng/mL、Ion 1 μ g/mL

及阻断剂莫能霉素,予 37℃,5%二氧化碳条件下培养 5 h,然后取细胞悬液 100 μL,加入 100 μL 固定剂反应 15 min,洗涤(3 mL 磷酸盐缓冲液+0.1%叠氮钠+5%磷酸盐缓冲液 1 次,再加入透膜剂 100 μL,反应 5 min,加入 10 μL PE 标记的抗人 IL-17 和 10 μL FITC 标记的 IFN-γ 及 IL-6,同时设同型对照,反应 30 min 后洗涤 2 次,以 300 μL 冷磷酸盐缓冲液重悬,进行 FCM 测定,结果用 Cellquest 软件分析。

1.3 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS11.5 统计软件处理,进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 AS 患者外周血 CD4⁺T 细胞分选 免疫磁珠阴性分选 CD4⁺T 细胞纯度大于 90%,见图 1。

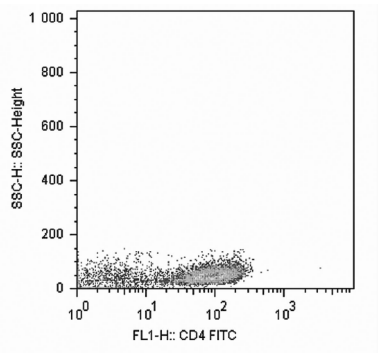


图 1 MACS 分选人外周血 CD4⁺T 细胞纯度检测

2.2 AS 患者 CD4⁺T 细胞 IL-17、IFN-γ、IL-6 表达 见表 1。由表 1 可见,与稳定组相比,经过 anti-CD3、anti-CD28 作用后,活动组 IL-17、IFN-γ 表达显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$),而且活动组 IL-17、IFN-γ 表达显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$),但 IL-6 水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 AS 患者 CD4⁺T 细胞 IL-17、IFN-γ、IL-6 表达变化($n=10, \%$)

组别	IL-17	IFN-γ	IL-6
对照组	0.40±0.09*	1.28±0.50*	0.48±0.20
稳定组	0.52±0.13*	1.18±0.45*	0.45±0.14
活动组	1.28±0.35	5.25±2.68	0.48±0.16

注:与活动组比较,* $P < 0.01$ 。

3 讨 论

Th17 细胞是以分泌 IL-17 为特征的 CD4⁺T 细胞亚群。IL-17 是一种致炎因子,它通过不同机制发挥致炎作用,主要介导防御胞外病原微生物的感染,参与自身免疫和炎性反应,与免疫调节、免疫病理和宿主免疫关系密切^[6]。目前认为,IL-17 可以上调滑膜成纤维细胞及软骨细胞基质金属蛋白酶的表

达,促进软骨蛋白多糖及胶原降解,从而可能加重 AS 的病理改变,但其具体的机制尚不清楚^[7-8]。本研究发现,AS 病情活动组 CD4⁺T 细胞 IL-17 的表达水平显著高于稳定组和对照组,提示 AS 病情活动期患者外周血中存在异常增多的 Th17 细胞,这些异常增加的 Th17 细胞可能通过分泌 IL-17 参与 AS 的发病过程。本研究还发现,AS 患者 CD4⁺T 细胞 IFN-γ 的表达水平显著高于稳定组和对照组。IFN-γ 可以活化巨噬细胞,增强主要组织相容性抗原 I、II 类抗原的表达,抑制纤维母细胞产生胶原,刺激并增强炎性反应,与关节炎发病密切相关。IFN-γ 主要由 Th1 细胞产生,IFN-γ 的高表达提示 Th1 细胞也可能参与了 AS 的发病过程。但 Th17 细胞与 Th1 细胞是否协同参与了关节炎的过程尚不清楚。

有学者认为 Th17 细胞可能在炎症的急性期发挥作用,而 Th1 细胞则在延长或促进后期组织炎性反应方面发挥主导作用,可能的原因有待于进一步研究。

参考文献

[1] Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, et al. Interleukin-23 promotes a distinct CD4⁺T cell activation state characterized by the production of interleukin-17 [J]. J Bio Chem, 2003, 278(3): 1910-1914.

[2] Zhao L, Tang Y, You Z, et al. Interleukin-17 contributes to the pathogenesis of autoimmune hepatitis through inducing hepatic interleukin-6 expression [J]. PloS One, 2011, 6(4): 18909-18917.

[3] Yasumi Y, Takikawa Y, Endo R, et al. Interleukin-17 as a new marker of severity of acute hepatic injury [J]. Hepatol Res, 2007, 37: 248-254.

[4] 于月红,孙海玲,钱雷. 类风湿关节炎患者外周血 Th17 细胞的检测及其临床意义 [J]. 检验医学与临床, 2011, 8(13): 52-55.

[5] Liu GW, Zhao Y. New subset of CD4⁺T cells: Th17 and its biological effects [J]. Prog Biochem Biophys, 2007, 34(4): 348-353.

[6] Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease [J]. Altern Med Rev, 2003, 8(3): 223-246.

[7] Lubberts E, Joosten LA, Van de Loo FA, et al. Reduction of interleukin-17 induced inhibition of chondrocyte proteoglycan synthesis in intact murine articular cartilage by interleukin-4 [J]. Arthritis Rheum, 2000, 43(6): 1300-1306.

[8] 姚琦,袁丁. IL-17 在类风湿关节炎中的研究进展 [J]. 江苏医药, 2007, 33(1): 68-69.

(收稿日期: 2011-06-19)