

白细胞介素-17 诱导单核细胞分泌白细胞介素-10 的初步机制研究

王行政(重庆医科大学附属永川医院核医学科,重庆 402160)

【摘要】 目的 探讨白细胞介素-17(IL-17)诱导单核细胞分泌白细胞介素-10(IL-10)的分子机制。**方法** 收集该院体检中心健康者外周血,经淋巴细胞分离液分离获得单个核细胞后,利用免疫磁珠分选技术纯化 CD14 阳性的单核细胞,然后在体外用 IL-17 进行刺激培养,或预先加入信号通路抑制剂孵育 1 h 后再进行刺激培养,酶联免疫吸附试验检测 IL-10 的水平。**结果** CD14 阳性的单核细胞经 IL-17 刺激后明显诱导 IL-10 的分泌($P<0.01$),且具有剂量和时间依赖性;加入核转录因子(NK- κ B)抑制剂可明显抑制 IL-17 诱导单核细胞分泌 IL-10 的作用($P<0.05$),但 MEK1/2 抑制剂、p38/MAPK 抑制剂和 JNK 抑制剂则无明显抑制作用。**结论** IL-17 可能通过 NK- κ B 信号途径诱导单核细胞上调 IL-10 的分泌,从而发挥免疫抑制作用。

【关键词】 白细胞介素-17; 白细胞介素-10; NK- κ B 信号

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.14.051 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)14-2095-02

Study on preliminary mechanism of monocytes secreting IL-10 induced by IL-17 WANG Hang-zheng (Department of Nuclear Medicine, Affiliated Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China)

【Abstract】 Objective To explore the molecular mechanism of IL-17-induced the secretion of IL-10 by monocytes. **Methods** The peripheral blood was collected from the healthy individuals undergoing the health physical examination in our hospital physical examination center, the mononuclear cells were isolated by ficoll density gradient centrifugation, and the CD14 positive monocytes were purified from mononuclear cells by using immunomagnetic beads. In vitro CD14 positive monocytes were stimulated by IL-17, or signal pathway inhibitors were pre-incubated for 1 h and then stimulated by IL-17, the level of IL-10 was detected by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** after IL-17 stimulation, the secretion of IL-10 by CD14 positive monocytes was significantly increased ($P<0.01$), which is in a dose and time dependent manner. However, IL-17-induced the secretion of IL-10 was significantly decreased while adding the NK- κ B inhibitor ($P<0.05$), but the MEK1/2 inhibitor, p38/MAPK inhibitor and JNK inhibitor had no obvious inhibiting effect. **Conclusion** IL-17 could induce monocytes to secrete IL-10 by the NK- κ B signal pathway and thus plays the immunosuppressive effect.

【Key words】 IL-17; IL-10; NK- κ B signal

Th17 细胞是新近发现的一群以表达白细胞介素-17(IL-17)为主要特征的 CD4⁺ T 细胞,在多个疾病如感染性疾病、自身免疫性疾病和肿瘤中起着重要作用^[1-2]。早期的研究主要集中于 Th17 细胞的分化调控及其效应分子 IL-17 作用于上皮细胞后的下游信号^[3]。但是最近发现 IL-17 受体(IL-17R)除了表达于上皮细胞,在外周血单核细胞和组织浸润巨噬细胞表面也组成性表达^[4],提示 IL-17/IL-17R 可影响单核细胞和巨噬细胞的功能。在炎症微环境中,巨噬细胞可产生大量的促炎因子如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)等介导炎症应答,但是为了防止导致炎症损伤,巨噬细胞也会产生抗炎因子如白细胞介素-10(IL-10)等进行负向调节^[5];在肿瘤微环境中,肿瘤浸润巨噬细胞也通过产生大量 IL-10 抑制抗肿瘤免疫细胞的功能,进而促进了肿瘤的不断进展^[6]。本研究收集健康者外周血,将分离纯化得到的单核细胞在体外进行培养,探讨 IL-17 是否能够诱导单核细胞分泌 IL-10,并进一步阐明其作用的分子机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 10 例本院体检中心健康者外周血,其中

男 5 例,女 5 例,年龄 23~38 岁。

1.2 试剂与方法

1.2.1 试剂 重组人细胞因子 IL-17 购自美国 Peprotech 公司;淋巴细胞分离液购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司;CD14⁺ 分选试剂盒和 PE 标记的抗人 CD14 抗体购自德国美天旌生物技术公司,NF- κ B 抑制剂(BAY 11-7082)、MEK1/2 抑制剂(U0126)、p38/MAPK 抑制剂(SB203580)和 JNK 抑制剂(SP600125)购自上海碧云天生物技术有限公司,红细胞裂解液购自北京天根生化科技有限公司,IL-10 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒购自北京达科为公司。

1.2.2 方法 收集健康人外周血于本院免疫细胞培养室,利用淋巴细胞分离液将外周血中的单个核细胞分离,然后用德国美天旌生物技术公司的分选磁铁结合 CD14⁺ 免疫磁珠分选试剂盒操作说明对单个核细胞中的 CD14⁺ 单核细胞进行分选纯化,分离后的细胞利用 PE 标记的抗人 CD14 抗体染色 30 min 后进行流式细胞仪检测纯度;按照 1×10^5 细胞/孔加入到 96 孔板,设置三重复孔,加入不同浓度(1、10、100 ng/mL)的重组人细胞因子 IL-17 进行刺激,或预先加入浓度均为 10 μ mol/L

的信号抑制剂;NF-κB 抑制剂 (BAY 11-7082)、MEK1/2 抑制剂 (U0126)、p38/MAPK 抑制剂 (SB203580) 和 JNK 抑制剂 (SP600125) 作用 1 h, 然后换取新的培养基后再加入 IL-17 (100 ng/mL) 刺激 24 h, 收集培养上清液, ELISA 检测 IL-10 的水平, 每个实验利用 3 例健康者外周血进行重复。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 单核细胞经 IL-17 刺激后培养上清液中 IL-10 水平的检测 首先, 利用免疫磁珠分选技术将 CD14⁺ 的单核细胞进行分离纯化, 得到分选后的 CD14⁺ 单核细胞纯度达 90% 以上 (图 1), 表明单核细胞可用于下一步试验。ELISA 检测结果显示, 单核细胞经重组细胞因子 IL-17 刺激后, 刺激组单核细胞培养上清液中的 IL-10 水平明显高于未刺激组单核细胞, 且这种效果以剂量和时间依赖的方式增加 (图 2), 表明 IL-17 可诱导单核细胞分泌免疫抑制性的细胞因子 IL-10。

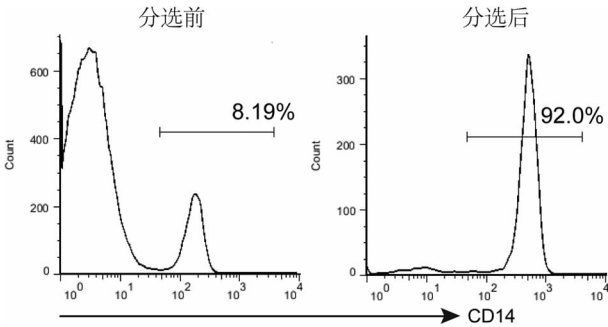
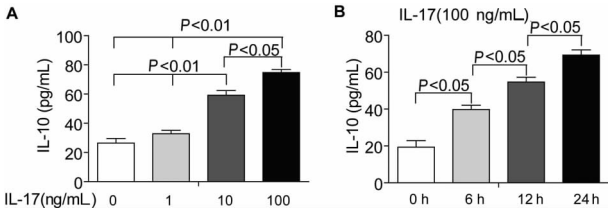


图 1 外周血单个核细胞经 CD14⁺ 免疫磁珠分选试剂盒分离纯化, 然后流式细胞技术染色检测分选前后 CD14⁺ 细胞占总细胞比例



注: A 为不同浓度 IL-17 刺激单核细胞 24 h 后培养上清液中 IL-10 的水平; B 为同一浓度的 IL-17 (100 ng/mL) 刺激单核细胞不同时间点培养上清液中的 IL-10 水平。

图 2 IL-17 刺激和未刺激单核细胞培养上清液中 IL-10 水平的比较

2.2 不同信号通路抑制剂阻断 IL-17 刺激后培养上清液中 IL-10 水平的比较 基于 IL-17 可诱导单核细胞分泌 IL-10, 进一步探讨其可能的信号机制。在单核细胞培养体系中预先加入以下终浓度均为 10 μmol/L 的信号通路抑制剂进行阻断: NF-κB 抑制剂 (BAY 11-7082)、MEK1/2 抑制剂 (U0126)、p38/MAPK 抑制剂 (SB203580) 和 JNK 抑制剂 (SP600125)。结果显示, 在 IL-17 刺激的条件下, 加入 NF-κB 抑制剂组 IL-10 的水平明显低于未加抑制剂组 ($P < 0.05$); 而加入 MEK1/2 抑制剂、p38/MAPK 抑制剂和 JNK 抑制剂组 IL-10 的水平则与未加抑制剂组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 3。表明 IL-17 刺激单核细胞分泌 IL-10 并不依赖 MEK1/2、p38/MAPK

和 JNK 信号通路, 而是依赖于 NF-κB 信号途径。

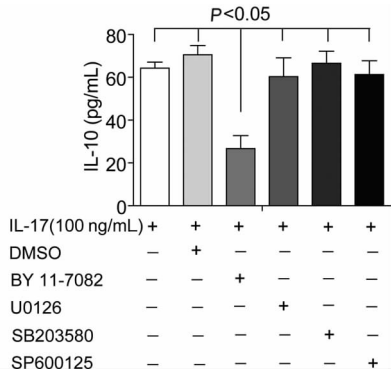


图 3 不同信号通路抑制剂对 IL-17 (100 ng/mL) 诱导单核细胞分泌 IL-10 的抑制效果

3 讨 论

IL-17R 是传递 Th17 细胞信号的受体, 主要由 IL-17RA 和 IL-17RC 以异二聚体的形式组成。Th17 细胞的效应分子 IL-17 与 IL-17R 结合后, 通过一系列的级联反应可激活多个包括 NF-κB、MEK1/2、p38/MAPK 和 JNK 在内的信号通路, 进而促使基因的表达并转录翻译成蛋白后释放到胞外发挥作用^[7-9]。

本研究发现, IL-17 可刺激外周单核细胞分泌大量的调节性因子 IL-10, 而且具有剂量和时间依赖性, 表明 IL-17 除了诱导上皮细胞产生促炎因子外, 还可诱导髓样来源细胞产生抗炎因子, 能够有效防止炎症应答导致的免疫损伤。但是 IL-10 在肿瘤中可抑制 CD8⁺ T 细胞的抗肿瘤功能, 提示 IL-17 在肿瘤中起着免疫抑制作用。此外, 加入多个信号通路抑制剂检测 IL-17 诱导单核细胞分泌 IL-10 的信号机制, 结果发现仅有 NF-κB 抑制剂能够明显抑制 IL-10 的分泌, 而 MEK1/2 抑制剂、p38/MAPK 抑制剂和 JNK 抑制剂则没有明显的变化, 提示虽然 IL-17 可激活多个信号通路, 但是诱导单核细胞分泌 IL-10 主要依赖于 NF-κB 信号而不依赖于 MEK1/2、p38/MAPK 和 JNK 信号。文献^[10]报道, 在肿瘤中除了巨噬细胞高表达 IL-10, 肿瘤细胞也可大量产生 IL-10, 那么, IL-17 是否能够有效刺激肿瘤细胞分泌 IL-10 还有待进一步研究。

总之, IL-17 可通过 NF-κB 信号通路诱导单核细胞分泌 IL-10 发挥免疫抑制作用, 进一步全面阐明 IL-17 在不同疾病下的调节功能, 将为发展针对细胞因子 IL-17 的免疫治疗提供帮助。

参考文献

[1] 庄园, 邹全明. Th17: 新兴的辅助 T 细胞[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2008, 24(9): 935-927.
[2] Zou W, Restifo NP. T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy[J]. Nat Rev Immunol, 2010, 10(4): 248-256.
[3] Ishigame H, Kakuta S, Nagai T, et al. Differential roles of interleukin-17A and-17F in host defense against mucocutaneous bacterial infection and allergic responses[J]. Immunity, 2009, 30(1): 108-119.
[4] Shen F, Gaffen SL. Structure-function relationships in the IL-17 receptor: implications for signal (下转第 2123 页)

自洁作用差,所以有观点认为在龋病预防发面,偏侧咀嚼的影响不可忽视^[11]。

在本研究中,有 55.71% 的儿童伴有口腔不良习惯,提示在每天的诊疗工作中需要重视加强对儿童及家长普及口腔不良习惯的相关知识,帮助家长形成正确的认知,及早发现孩子的不良习惯并予以合理的指导,以阻断错颌畸形的发生。纠正孩子的不良习惯应该从出生做起,研究认为母乳喂养与机能异常的口腔习惯对于颌面的异常发育有协同作用,母乳喂养的小孩,尤其是半岁以内的婴幼儿应该避免某些不良口腔习惯^[12]。虽然并非所有的口腔不良习惯均会导致错颌畸形的发生,但是吮指、咬物、咬唇、偏侧咀嚼等常见的口腔不良习惯在长期作用下可能会破坏了口腔内外肌肉张力的平衡,对牙、牙槽、颌骨产生异常的作用力,妨碍正常的生长发育,造成错颌畸形^[13]。本研究结果也证实,伴有口腔不良习惯的儿童错颌畸形的发生率明显高于无口腔不良习惯的儿童($P<0.05$)。

发达国家儿童龋患率逐步下降归因于氟化、窝沟封闭、全民口腔健康宣教等措施“三管齐下”。应抓住学龄儿童这一年龄阶段做好龋病预防工作,提高儿童的自我保健意识,培养良好的口腔卫生习惯,口腔专业机构和学校及相关部门应该有组织的对马尔康地区龋病高危儿童采取针对性的预防措施,从而有效地控制龋病的发生和发展,提高儿童口腔健康和保健水平。

参考文献

[1] Gaszynska E, Szatko F, Godala M, et al. Oral health status, dental treatment needs, and barriers to dental care of elderly care home residents in Lodz, Poland[J]. Clin Interv Aging, 2014, 9(9): 1637-1644.

[2] 付海霞, 胡晓丽, 陈彬. 2008~2010 年阿坝州马尔康城区部分中小學生常見病監測[J]. 預防醫學情報雜誌, 2013, 29(4): 322-324.

[3] Díaz-Cárdenas S, González-Martínez F. The prevalence of dental caries related to family factors in schoolchildren from the city of Cartagena in Colombia[J]. Rev Salud Pública (Bogota), 2010, 12(5): 843-851.

[4] Natto ZS, Petersen FF, Niccola Q. The oral health status

and the treatment needs in Chad; a pilot study[J]. Niger Postgrad Med J, 2014, 21(3): 245-249.

[5] 季成叶. 我国中小學生齲齒流行現狀及齲患程度構成[J]. 中國學校衛生, 2008, 29(2): 114-117.

[6] 毛夢堃, 周玉喬, 陳謙明, 等. 習慣性偏側咀嚼與齲病相關性調查[J]. 現代預防醫學, 2013, 40(5): 848-849.

[7] Thomaz EB, Cangussu MC, Assis AM. Maternal breast-feeding, parafunctional oral habits and malocclusion in adolescents; a multivariate analysis[J]. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2012, 76(4): 500-506.

[8] Saccomanno S, Antonini G, D'Alatri L, et al. Causal relationship between malocclusion and oral muscles dysfunction; a model of approach[J]. Eur J Paediatr Dent, 2012, 13(4): 321-323.

[9] Sofola OO, Folayan MO, Oginni AB. Changes in the prevalence of dental caries in primary school children in Lagos State, Nigeria[J]. Niger J Clin Pract, 2014, 17(2): 127-133.

[10] Gaddam KR, Nuvvula S, Nirmala S, et al. Oral health status among 6-to 12-year-old haemophilic children—an educational intervention study[J]. Haemophilia, 2014, 20(4): 338-341.

[11] Richa, Yashoda R, Puranik MP. Oral health status and parental perception of child oral health related quality-of-life of children with autism in Bangalore, India[J]. J Indian Soc Pedod Prev Dent, 2014, 32(2): 135-139.

[12] Rath H, Raj SC. Assessment of oral health status and Treatment needs of HIV/AIDS patients visiting Government Hospitals and Rehabilitation centers in Bangalore city[J]. Indian J Sex Transm Dis, 2013, 34(1): 59-60.

[13] Sanadhya S, Nagarajappa R, Sharda AJ, et al. The oral health status and the treatment needs of salt workers at sambhar lake, jaipur, India[J]. J Clin Diagn Res, 2013, 7(8): 1782-1786.

(收稿日期: 2015-01-20 修回日期: 2015-03-15)

(上接第 2096 页)

transduction and therapy[J]. Cytokine, 2008, 41(2): 92-104.

[5] MacKenzie KF, Clark K, Naqvi S, et al. PGE(2) induces macrophage IL-10 production and a regulatory-like phenotype via a protein kinase A-SIK-CRTC3 pathway[J]. J Immunol, 2013, 190(2): 565-577.

[6] Liu CY, Xu JY, Shi XY, et al. M2-polarized tumor-associated macrophages promoted epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells, partially through TLR4/IL-10 signaling pathway[J]. Lab Invest, 2013, 93(7): 844-854.

[7] Gaffen SL, Jain R, Garg AV, et al. The IL-23, IL-17 im-

mune axis; from mechanisms to therapeutic testing[J]. Nat Rev Immunol, 2014, 14(9): 585-600.

[8] Xiang T, Long H, He L, et al. Interleukin-17 produced by tumor microenvironment promotes self-renewal of CD133 + cancer stem-like cells in ovarian cancer[J]. Oncogene, 2015, 34(2): 165-176.

[9] Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family[J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9(8): 556-567.

[10] Li Y, Gao P, Yang J, et al. Relationship between IL-10 expression and prognosis in patients with primary breast cancer[J]. Tumor Biol, 2014, 35(11): 11533-11540.

(收稿日期: 2015-02-25 修回日期: 2015-03-25)