

文章编号 1006-8147(2014)04-0289-04

论 著

Th17 细胞在免疫性血小板减少症患者中数量及功能研究

王丽静, 瞿文, 邵宗鸿, 阮二宝, 王晓明, 王国锦, 刘 鸿, 吴玉红, 宋 嘉, 邢莉民, 关 晶, 李丽娟, 王化泉
(天津医科大学总医院血液科, 天津 300052)

摘要 目的:研究免疫性血小板减少症(ITP)患者 Th17 细胞数量、相关功能分子水平及其与临床指标的相关性,探讨 Th17 细胞在 ITP 发病机制中的作用。方法:ITP 患者 40 例,正常对照组 14 名。应用流式细胞术(FCM)检测骨髓 IL-23R⁺ CD4⁺/CD4⁺细胞比例;应用 ELISA 检测骨髓上清液 IL-17、IL-23 水平;RT-PCR 测定骨髓单个核细胞中 IL-17 mRNA 的相对表达水平,并与临床指标进行相关性分析。结果:ITP 患者骨髓中 IL-23R⁺ CD4⁺/CD4⁺细胞比例[(4.933±6.162)%]、IL-17 水平[(13.434±7.189) ng/L]、IL-23 水平[(56.930±58.512) ng/L]、IL-17mRNA 相对表达水平(0.921±0.196)均明显高于正常对照组[(0.897±0.803)%]、[(4.134±2.879) ng/L]、[(17.841±11.033) ng/L]、[(0.749±0.136) (P<0.05)];活动期 ITP 患者 IL-23R⁺ CD4⁺/CD4⁺细胞比例 [(6.699±7.008)%]、IL-17 水平[(16.021±7.114) ng/L]、IL-23 水平[(72.474±64.835) ng/L]、IL-17mRNA 相对表达水平[0.967±0.186]均明显高于缓解期患者[(1.656±1.286)%]、[(7.972±3.326) ng/L]、[(24.114±17.654) ng/L]、[(0.801±0.163) (P<0.05)]。ITP 患者上述指标与其临床指标存在相关性。结论:Th17 细胞在 ITP 患者免疫发病机制中发挥重要作用,在 ITP 患者中不仅数量增加,而且功能活跃。

关键词 Th17 细胞;免疫性血小板减少症;白介素 17;白介素 23;白介素 17 mRNA

中图分类号 R558.2

文献标志码 A

Quantity change and function of Th17 cells in patients with immune thrombocytopenia

WANG Li-jing, QU Wen, SHAO Zong-hong, RUAN Er-bao, WANG Xiao-ming, WANG Guo-jin, LIU Hong, WU Yu-hong, SONG Jia, XING Li-min, GUAN Jing, LI Li-juan, WANG Hua-quan

(Department of Hematology, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China)

Abstract Objective: To study the quantity, related functional molecule level of Th17 cells and its correlation with clinical parameters in patients with immune thrombocytopenia, and to explore the role of Th17 cells in the immune pathogenesis. **Methods:** Forty patients were divided into two groups, including 26 ITP patients in activity, 14 patients in remission. There were 14 normal controls. The ratio of IL-23R⁺ CD4⁺/CD4⁺ cells in bone marrow of patients were measured with flow cytometry, and the level of IL-17, IL-23 in bone marrow supernatant was obtained using enzyme-linked immunosorbent assay while the relative expression levels of IL-17 mRNA in bone marrow with reverse transcription-polymerase chain reaction technique. The correlation analysis on clinical indicators of ITP patients was made. **Results:** The ratio of IL-23R⁺ CD4⁺/CD4⁺ cells[(4.933±6.162)%], the level of IL-17 [(13.434±7.189) ng/L], IL-23[(56.930±58.512) ng/L] and IL-17 mRNA [0.921±0.196] in bone marrow with ITP patients were significantly higher than those of normal controls[(0.897±0.803)%], [(4.134±2.879) ng/L], [(17.841±11.033) ng/L], [0.749±0.136] (P<0.05). These four indicators in active ITP patients [(6.699±7.008)%], [(16.021±7.114) ng/L], [(72.474±64.835) ng/L], [0.967±0.186] were significantly higher than those in remission[(1.656±1.286)%], [(7.972±3.326) ng/L], [(24.114±17.654) ng/L], [0.801±0.163] (P<0.05). The above parameters of ITP patients were correlated with clinical indicators. **Conclusion:** Th17 cells are very active with increased numbers in ITP patients, which plays an important role in the immune pathogenesis of ITP.

Key words Th17 cells; immune thrombocytopenia; interleukin 17; interleukin 23; interleukin 17 mRNA

免疫性血小板减少症(immune thrombocytopenia, ITP)是一种以血小板减少为特征的获得性自身免疫性疾病,主要是由于血小板破坏过多和/或血小板生

成减少导致血小板减少,是临床最为常见的出血性疾病^[1-2]。辅助性 T 细胞 17 型(T helper 17 cells, Th17 细胞)是近年来新发现的 CD4⁺T 细胞亚群,因其特异性分泌白介素 17 而命名。本试验检测 ITP 患者 Th17 细胞比例及相关效应因子水平,并与临床指标进行统计学分析,探讨 Th17 细胞在 ITP 发病机制中的作用。

基金项目 天津市自然科学基金重点项目(12JCZDJC21500),卫生行业科研专项项目(201202017)

作者简介 王丽静(1987-),女,硕士在读,研究方向:血液病学;通信作者:瞿文,E-mail: quwentj923@sina.com;邵宗鸿,E-mail: shao-zonghong@sina.com。

1 资料与方法

1.1 研究对象 40例ITP患者均为2013年1~9月天津总医院血液科住院病人,男性16例,女性24例,中位年龄35.5岁(7~79岁),其中活动期ITP患者26例,男12例,女14例,中位年龄46岁(15~79岁),中位血小板(PLT)计数 $14 \times 10^9/L$;缓解期患者14例,男4例,女10例,中位年龄27岁(7~58岁),中位PLT计数 $147 \times 10^9/L$;所有病人均按《血液病诊断及疗效标准》确诊。另选取正常对照14名,男6名,女8名,中位年龄49.5岁(30~81岁),中位PLT计数 $285 \times 10^9/L$ 。患者及对照者进入本研究均经本人知情同意并签署知情同意书。

1.2 试剂 藻蓝蛋白(APC)标记的鼠抗人CD3,异硫氰酸荧光素(FITC)标记的鼠抗人CD4、IgG1,藻红蛋白(PE)标记的鼠抗人白介素23受体(IL-23R)、IgG1,均为美国BD PharMingen公司的产品。IL-17、IL-23 ELISA试剂盒分别为美国R&D公司及Ray-Biotech公司产品。TIANScript cDNA第一链合成试剂盒、MIX及Marker均为北京天根生化科技有限公司产品。IL-17基因引物序列为上海生工生物工程有限公司合成。引物序列为:IL-17:上游:5'-CTCAGGCTTCCTTTGGAGATTA-3',下游:5'-CTCCTTTCTGGGTTGTGTGGTG-3',产物长度为123 bp;内参 β -actin:上游:5'-TGGCAGCCAGCACAAATGAA-3',下游:5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTA-GAAGCA-3',产物长度为186 bp。

1.3 方法

1.3.1 FCM检测骨髓IL-23R⁺CD4⁺/CD4⁺细胞比例

试验管分别加入APC标记的鼠抗人CD3、FITC标记的鼠抗人CD4、PE标记的鼠抗人IL-23R单抗各5 μL ,对照管分别加入APC标记的鼠抗人CD3

1 μL 、IgG1-FITC及IgG1-PE同型对照各4 μL 。试验管及对照管各加入新鲜肝素抗凝骨髓液50 μL ,4 $^{\circ}C$ 避光孵育30 min后,溶血8 min,PBS洗涤2遍后,上流式细胞仪检测IL-23R⁺CD4⁺/CD4⁺细胞比例。

1.3.2 ELISA法检测骨髓上清液IL-23和IL-17水平 用促凝法收集骨髓上清液(由于试剂盒原因,例数有所变化),应用ELISA试剂盒检测ITP患者及正常对照组骨髓上清液中IL-23及IL-17水平,操作步骤按照试剂盒说明。

1.3.3 RT-PCR法检测骨髓单个核细胞(BMMNC)IL-17 mRNA表达相对水平 取骨髓2 mL,溶血素溶血20 min后,PBS洗涤2遍,按照TRIzol说明书提取BMMNC RNA,使用分光光度仪测定RNA浓度,OD_{260/280}值在1.8~2.0之间。按照TIANScript cDNA第一链合成试剂盒说明书合成cDNA。于PCR管中加入cDNA 3 μL 、MIX 12.5 μL 、上游和下游引物各1 μL ,然后用ddH₂O将PCR管内总量补至25 μL 于PCR仪上进行扩增。IL-17及内参反应条件为:94 $^{\circ}C$ 预变性5 min,94 $^{\circ}C$ 变性30 s,63 $^{\circ}C$ 退火30 s,72 $^{\circ}C$ 延伸1 min,进行35次循环,72 $^{\circ}C$ 延伸10 min。取5 μL 扩增产物在琼脂糖凝胶电泳上用120 V条件下电泳45 min,用凝胶成像分析仪观察结果及进行半定量分析。

1.4 统计学方法 应用SPSS 19.0数据统计软件,应用方差分析及pearson相关进行分析。

2 结果

2.1 骨髓IL-23R⁺CD4⁺/CD4⁺细胞比例 ITP患者[(4.933 \pm 6.162)%]明显高于正常对照组[(0.897 \pm 0.803)%]($P < 0.05$),差异具有统计学意义。ITP活动期[(6.699 \pm 7.008)%]明显高于缓解期[(1.656 \pm 1.286)%]($P < 0.05$),差异具有统计学意义。ITP患者Th17细胞流式图见图1。

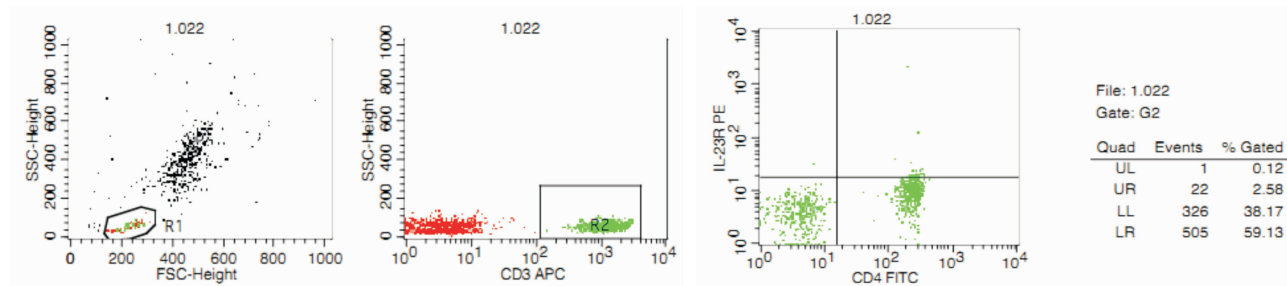


图1 ITP患者Th17细胞流式图

Fig 1 The flow cytometry chart of Th17 cells in ITP patients

2.2 骨髓上清液IL-23和IL-17水平 ITP患者IL-17、IL-23水平明显高于正常对照组。ITP活动期患者两者水平均明显高于缓解期患者。结果见表1与表2。

2.3 骨髓单个核细胞(BMMNC)IL-17 mRNA表达

相对水平 ITP患者IL-17 mRNA水平(0.921 \pm 0.196)明显高于正常对照组(0.749 \pm 0.136)($P < 0.05$),差异具有统计学意义。活动期ITP患者(0.967 \pm 0.186)高于缓解期(0.801 \pm 0.163)($P < 0.05$),差异具有统计学意义。见图2。

表 1 ITP 患者与正常对照者骨髓上清液 IL-17、IL-23 水平
(ng/L, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The level of IL-17, IL-23 in bone marrow with ITP patients and normal controls (ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	IL-17	IL-23
ITP 组	28	13.434 \pm 7.188 ^a	59.930 \pm 58.512 ^b
正常对照组	8	4.134 \pm 2.879	17.841 \pm 11.033

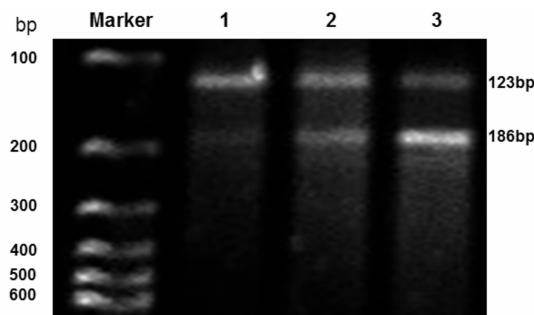
^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.05$

表 2 活动期 ITP 患者与缓解期骨髓上清液 IL-17、IL-23 水平
(ng/L, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 The level of IL-17, IL-23 in bone marrow with ITP patients in activity and remission (ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	IL-17	IL-23
活动期患者	19	16.021 \pm 7.114 ^a	72.474 \pm 64.835 ^b
缓解期患者	9	7.972 \pm 3.326	24.114 \pm 17.654

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.05$



1:活动期 ITP 患者,2:缓解期 ITP 患者,3:正常对照者。IL-17mRNA 产物大小为 123 bp,内参 β -actin 产物大小为 186 bp

图 2 ITP 患者与正常对照组 IL-17mRNA 表达相对水平比较

Fig 2 The relative levels of expression of IL-17mRNA comparison in ITP patients and normal controls

2.4 各指标间进行相关性分析 IL-23R⁺CD4⁺/CD4⁺ 细胞比例与 IL-17、IL-23、IL-17mRNA 均呈正相关 ($r=0.833, 0.526, 0.744$)。

2.5 统计临床资料并与上述各指标进行相关性分析 ITP 患者 Th17 细胞比例、IL-17、IL-23、IL-17 mRNA 与髂骨巨核细胞计数 ($r=0.479, 0.440, 0.321, 0.473$)、免疫球蛋白 A ($r=0.449, 0.374, 0.510, 0.453$) 呈正相关;ITP 患者 IL-17、IL-23、IL-17mRNA 与血小板计数呈负相关 ($r=-0.385, -0.397, -0.362$)。

3 讨论

ITP 既往也称特发性血小板减少性紫癜、免疫性血小板减少性紫癜,在 2007 年被国际 ITP 工作组正式统一为免疫性血小板减少症。近年来研究发现:血小板自身抗体是引起血小板破坏的主要原因;血小板自身抗体还可影响巨核细胞克隆的形成和血小板的生成;自身反应性 T 细胞在 ITP 的发病机制中起重要作用;固有免疫系统在 ITP 的发病中

起了某些作用等^[2]。ITP 的发病机制可以分为体液免疫异常及细胞免疫异常,最近的研究发现细胞免疫异常在 ITP 患者发病机制中的作用越来越受到重视。Th17 细胞作为一种新的效应 T 细胞亚群,其在感染、过敏性疾病、肿瘤、自身免疫性疾病等中的发病机制、作用靶点及分子效应是近年来的研究热点。IL-17 是 Th17 细胞最具特征性的细胞因子,是一种具有强大招募中性粒细胞功能和促进多种细胞释放炎症因子的前炎症因子,但是其在自身免疫性疾病中的作用同样不容忽视。Jennifer 等^[4]还发现人 Th17 细胞特征性的表达 IL-23R 及趋化因子受体 CCR6。IL-23 可使 STAT3 激活,进而促进 IL-17 的分泌。研究发现 Th17 细胞在风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、多发性硬化症等多种自身免疫性疾病发生发展中发挥重要作用^[5-6]。但 Th17 细胞在 ITP 的作用机制尚不明确。Ma 和 Guo 等^[7-8]均发现 ITP 患者 Th17 细胞比例及相关细胞因子水平较正常对照无统计学差异,推测 Th17 细胞可能在 ITP 发病中无明显作用。最近 Rocha、Hu 和 Ji^[9-12]等发现 Th17 细胞比例及相关细胞因子如 IL-17A、IL-6、IL-23 等在慢性 ITP 患者均高于正常对照,这与近年来大部分研究结果一致。

本试验通过检测骨髓中 IL-23R⁺CD4⁺/CD4⁺ 细胞比例、细胞因子 IL-17 和 IL-23、IL-17mRNA 相对表达水平,发现 ITP 患者 Th17 细胞比例、IL-17、IL-23 及 IL-17mRNA 较正常对照者均明显升高,表明 ITP 患者的 Th17 不仅数量增加而且功能活跃,Th17 细胞可能在 ITP 发病机制中发挥重要作用。这可能是由于 Th17 细胞通过其分泌的细胞因子与其他 CD4⁺T 细胞相互作用,进而促进 B 细胞产生抗体破坏自身血小板,导致血小板破坏增多;B 细胞产生的抗体破坏骨髓巨核细胞,使巨核细胞产板不良,导致血小板生成减少。本研究还发现 ITP 活动期患者 Th17 细胞比例、IL-17、IL-23 及 IL-17mRNA 较恢复组明显增高。缓解期患者应用糖皮质激素、环孢素、环磷酰胺等免疫抑制治疗后 PLT 恢复病情好转,Th17 细胞及其相关细胞因子的增高水平较前明显减低,进一步证明了 Th17 细胞数量增加功能亢进是 ITP 患者免疫异常表现之一。随后应用 SPSS19.0 软件对 ITP 患者上述指标及相关临床指标进行相关性分析发现 Th17 细胞及其细胞因子与 IgA、髂骨巨核细胞计数呈正相关,与血小板计数呈负相关,说明 Th17 细胞比例及相关细胞因子水平的增高在一定程度上与 ITP 患者疾病严重程度有正相关性。但 Th17 细胞在 ITP 患者发病中的具体机

制仍不能得到详细的阐述,仍需进一步大量的相关研究。

总之,本研究发现 Th 细胞的新亚群--Th17 细胞在 ITP 患者中数量增加且功能亢进,经过免疫抑制治疗后这种增高趋势较前明显减低,且 Th17 细胞与相关临床指标具有相关性,提示 Th17 细胞在 ITP 发病中发挥重要作用,且与疾病严重程度具有相关性。因此对 Th17 细胞及 IL-17 的研究,有望成为治疗 ITP 及判断预后的新目标和新靶点。

参考文献:

- [1] Provan D, Stasi R, Newland A C, et al. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia[J]. *Blood*, 2010, 115(2): 168
- [2] 季丽莉. 免疫性血小板减少性紫癜的免疫学发病机制[J]. *血栓与止血*, 2010, 16(5): 228
- [3] Bi Y, Yang R. Direct and indirect regulatory mechanisms in Th17 cell differentiation and functions[J]. *Scand J Immunol*, 2012, 75(6): 543
- [4] Jennifer L, Katia B, Rene de W M. Development and function of TH17 cells in health and disease[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, 123(5): 1004
- [5] Miossec P. IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases[J]. *Microbes Infect*, 2009, 11(5): 625
- [6] 胡锦涛, 毕胜利, 吕元. Th17 细胞—正逐步获得深入研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2012, 28(4): 372
- [7] Ma D, Zhu X, Zhao P, et al. Profile of Th17 cytokines (IL-17, TGF-beta, IL-6) and Th1 cytokine (IFN-gamma) in patients with immune thrombocytopenic purpura[J]. *Ann Hematol*, 2008, 87(11): 899
- [8] Guo Z X, Chen Z P, Zheng C L, et al. The role of Th17 cells in adult patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura[J]. *Eur J Haematol*, 2009, 82(6): 488
- [9] Rocha A M, Souza C, Rocha G A, et al. The levels of IL-17A and of the cytokines involved in Th17 cell commitment are increased in patients with chronic immune thrombocytopenia[J]. *Haematologica*, 2011, 96(10): 1560
- [10] Hu Y, Ma D X, Shan N N, et al. Increased number of Tc17 and correlation with Th17 cells in patients with immune thrombocytopenia [J]. *Plos One*, 2011, 6(10): e26522
- [11] Hu Y, Li H Y, Zhang L, et al. Elevated proles of Th22 cells and correlations with Th17 cells in patients with immune thrombocytopenia [J]. *Human Immunol*, 2012, 73(6): 629
- [12] Ji L L, Zhan Y X, Hua F L, et al. The ratio of Treg/Th17 cells correlates with the disease activity of primary immune thrombocytopenia [J]. *Plos One*, 2012, 7(12): e50909

(2014-01-10 收稿)

(上接第 288 页)

- [10] 周友乾, 尹凤鸣, 冯经华. 湘南地区住院患者丙型肝炎病毒感染方式的特征分析[J]. *临床肝胆病杂志*, 2012, 28(6): 443
- [11] 张立新, 安勇, 张孝国, 等. 山东地区慢性 HCV 感染者病毒的基因型分布[J]. *中国病原生物学杂志*, 2011, 6(8): 567
- [12] 张帆, 王小红, 王宇明, 等. 重庆地区 HCV 基因亚型的分布状态 [J]. *第四军医大学学报*, 2005, 26(14): 1253
- [13] Dieterich D T, Rizzetto M, Manns M P. Management of chronic hepatitis C patients who have relapsed or not responded to pegylated interferon alfa plus ribavirin[J]. *J Viral Hepat*, 2009, 16(12): 833
- [14] 严艳, 李卓, 郭向华, 等. 北京地区慢性丙型肝炎患者血清 HCV-RNA 定量检测与基因分型的研究[J]. *医学理论与实践*, 2007, 20(7): 756
- [15] 沈玲, 顾小军, 刘新钰, 等. 南京地区丙肝基因型、HCV RNA 与临床预后[J]. *江苏医药*, 2007, 33(10): 1050
- [16] Lu L, Nakano T, He Y, et al. Hepatitis C virus genotype distribution in China: predominance of closely related subtype 1b isolates and existence of new genotype 6 variants[J]. *J Med Virol*, 2005, 75(4): 538
- [17] Ikeda K, Kobayashi M, Someya T, et al. Influence of hepatitis C virus subtype on hepatocellular carcinogenesis: A multivariate analysis of a retrospective cohort or 593 patients with cirrhosis[J]. *Inter-virology*, 2002, 45(1): 71
- [18] Noursbaum J B, Pol S, Nalpas B, et al. Hepatitis C virus type 1b(II) infection in France and Italy[J]. *Ann Intern Med*, 1995, 122(3): 161
- [19] Yotsuanagi H, Koike K, Yasuda K, et al. Hepatitis C virus genotype and development of hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer*, 1995, 76(8): 1352

(2014-02-21 收稿)