

急性哮喘患者外周血中 Th17 细胞的变化及其意义

李建民¹, 向旭东², 李金秀³, 李文朴¹, 刘绍坤²

(1. 湖南省人民医院呼吸科, 长沙 410008; 2. 中南大学湘雅二医院呼吸科, 长沙 410011; 3. 中南大学湘雅二医院 ICU 中心, 长沙 410011)

[摘要] **目的:**探讨哮喘急性发作期患者外周血中 Th17 细胞的变化及其与哮喘严重程度的关系。**方法:**选取轻度急性哮喘患者、重度急性哮喘患者和健康对照者各 10 名。从血清单个核细胞中分离 T 淋巴细胞, 流式细胞仪检测阳性 Th17 细胞率, 分析其与哮喘严重程度的关系。**结果:**轻度急性哮喘组和重度急性哮喘组外周血阳性 Th17 细胞均较健康对照组增高 ($P < 0.05$), 而重度哮喘组高于轻度哮喘组 ($P < 0.05$)。重度哮喘组外周血 IL-17 水平明显高于轻度哮喘组和健康对照组 ($P < 0.05$)。外周血中 Th17 阳性细胞数与急性哮喘严重程度呈正相关 ($r = 0.869, P < 0.05$)。**结论:**急性哮喘患者外周血 Th17 细胞表达增加, 且与其病情的严重程度呈正相关。

[关键词] 哮喘; Th17 细胞; 白细胞介素-17; 气道炎症

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2010.02.007

Change and significance of peripheral blood Th17 cells in patients with acute asthma

LI Jianmin¹, XIANG Xudong², LI Jinxiu³, LI Wenpu¹, LIU Shaokun²

(1. Department of Respiratory Disease, People's Hospital of Hunan, Changsha 410002;
2. Department of Respiratory Disease, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011; 3. Intensive Care Unit, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

Abstract: **Objective** To observe the change of peripheral blood Th17 cells and relationship between the severity and Th17 cells in patients with acute asthma. **Methods** We recruited patients with mild acute asthma ($n = 10$) and severe acute asthma ($n = 10$), and healthy volunteers ($n = 10$). T-lymphocytes were collected from the peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Flow cytometer (FCM) was used to detect the expression of peripheral blood Th17 cells. IL-17 levels in the peripheral blood were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The rate of positive Th17 cells of peripheral blood in the severe acute asthma group was higher than that in the mild acute asthma group ($P < 0.05$) and the rate of positive Th17 cells of peripheral blood in healthy volunteer group were the lowest among all groups ($P < 0.05$, respectively). The level of IL-17 in the peripheral blood of patients with severe acute asthma increased significantly compared with that in patients with mild acute asthma and healthy volunteers ($P < 0.05$). The positive Th17

收稿日期 (Date of reception) 2009-02-18

作者简介 (Biography) 李建民, 硕士, 主治医师, 主要从事呼吸系统疾病的研究。

通信作者 (Corresponding author) 向旭东, E-mail: Xiangxudong-xy@hotmail.com

基金项目 (Foundation item) 湖南省教育厅课题 (2008 湘财教指 56 号)。This work was supported by the fund from Education Bureau of Hunan Province, P. R. China (200856).

cells of peripheral blood in patients with acute asthma were positively correlated with the severity of acute asthma ($r = 0.869$, $P < 0.05$). **Conclusion** The positive rate of Th17 cells in the peripheral blood increases in patients with acute asthma and has positive correlation with the severity of acute asthma.

Key words: asthma; Th17 cell; interleukin-17; airway inflammatory

支气管哮喘(哮喘)是慢性持续性气道炎症疾病,多种炎性细胞和炎性介质参与其过程,其中肥大细胞、嗜酸性粒细胞、T淋巴细胞为主要效应细胞。白细胞介素(IL)-17是一种前炎症细胞因子,是T细胞诱导的炎症反应的早期启动因素^[1-2]。近年来新发现一类不同于传统的Th1和Th2细胞的前炎症性T辅助细胞,命名为Th17细胞,可诱导产生IL-17, IL-6, 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等细胞因子^[3]。外周血Th17细胞的改变是否与哮喘有关,目前尚未见报道。因此本研究观察了不同程度哮喘患者外周血Th17细胞阳性率,探讨其改变是否与哮喘及其严重程度有关。

1 对象与方法

1.1 研究对象

入选健康自愿者10名,其中男性6名,女性4名,年龄(34.5 ± 9.2)岁,无吸烟史、哮喘家族史、过敏史、心肝肾疾病史,抽血液标本时无感染性疾病。哮喘急性发作期轻度患者10名,其中男性5名,女性5名,年龄(33.6 ± 10.5)岁;重度患者10名,其中男性6名,女性4名,平均年龄(32.2 ± 9.5)岁。3组患者之间性别、年龄差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。哮喘患者均来自2007年12月到2008年3月湖南省人民医院呼吸科门诊和病房,在1月内未全身应用糖皮质激素,均72 h内未吸入或服用糖皮质激素、 β 受体兴奋剂、抗胆碱能类、抗组胺药物、白三烯拮抗剂及茶碱类药物。所有患者均符合2007年中华医学会呼吸病学分会哮喘学组制定的《支气管哮喘防治指南》诊断标准。急性发作是指喘息、气急、咳嗽、胸闷等症状突然发生,或原有症状加重,常有呼吸困难,以呼气流量降低为其特征,常因接触变应原等刺激物或治疗不当

等所致。哮喘急性发作严重程度的判断标准按照2002年“全球哮喘防治倡议”(GINA)方案。轻度发作:步行、上楼梯时发生气短,睡觉可以平卧,说话可连成句,可有焦虑但尚安静,呼吸频率轻度增加,脉搏小于100/min。重度发作:休息时即出现气短,端坐呼吸(不能平卧),只能单字说话,常有焦虑、烦躁,大汗淋漓,呼吸频率大于30/min,脉搏大于120/min。本研究经湖南省人民医院伦理委员会审查批准,所有患者检查前均予告之本研究性质并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 外周血单个核细胞(PBMC)分离(Ficoll密度梯度离心法)

无菌条件下抽取健康者和哮喘患者外周血各15 mL(肝素抗凝,每mL血用20 U肝素抗凝),D-Hank's液1:1稀释外周血。以体积比稀释血:淋巴细胞分离液=5:3将稀释血缓慢沿管壁加到盛有淋巴细胞分离液的无菌离心管,保持清晰界面,室温下2 400 r/min离心30 min,然后小心吸取白膜层细胞,用5倍体积D-Hank's液稀释白膜层细胞悬液,3 900 r/min离心10 min, D-Hank's液洗涤离心(1 500 r/min, 10 min),再用RPMI1640培养基洗涤离心(1 500 r/min, 10 min),最后加入含10%胎牛血清,2 mmol/L谷氨酰胺,100 U/mL青霉素,100 U/mL链霉素和50 μ g/mL的植物血凝素(PHA)的RPMI1640培养基(完全培养基),制成PBMC细胞悬液。

1.2.2 T淋巴细胞分离

取上述轻度哮喘患者、重度哮喘患者和健康对照者的PBMC悬液接种于25 mL培养瓶,于37 $^{\circ}$ C,饱和湿度,含5% CO₂的培养箱中培养4 h,取悬浮细胞,1 500 r/min离心10 min,加入RPMI1640培养基,重悬细胞。取20 μ L细胞悬液加20 μ L台盼蓝,计数细胞,调节细胞浓度为 2×10^6 /mL。

1.2.3 破膜

上述各组细胞 1 000 r/min 离心 10 min,弃上清,加入 500 μL 预冷(4 ℃)固定液。室温孵育 10 min,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清,加入 PBS 洗涤 1 次,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清,加入 1.5 mL 破膜剂,室温孵育 10 ~ 15 min,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入适量破膜剂重悬细胞。

1.2.4 流式细胞仪检测 Th17 细胞表达率

每组各取 100 μL 细胞悬液至流式管中,加入 20 μL FITC 标记的 anti-human IL-17,混匀后于室温避光孵育 15 min。在每管中加入 400 μL PBS 稀释后,流式细胞仪检测 Th17 细胞表达率。

1.2.5 外周血 IL-17 的测定

同时采集所有受试者外周血 2 ~ 3 mL,离心后分离血清,-70 ℃ 冷冻保存。IL-17 检测采用酶联免疫吸附试验(ELISA),使用人 IL-17 试剂盒(美国 Biosouce 公司),严格按试剂盒说明书

操作。

1.2.6 统计学处理

采用 SPSS11.0 统计软件包进行数据处理,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多个样本均数比较采用 *F* 检验;组间参数两两比较采用 LSD-*t* 检验。用直线相关分析探讨两因素之间相关关系。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组外周血中 Th17 细胞表达率

测得健康对照组 Th17 细胞表达率为 30.72% ± 1.82%,轻度哮喘组、重度哮喘组 Th17 细胞表达率分别为 40.06% ± 1.75% 和 64.36% ± 4.36%,均高于 A 组(*P* < 0.05);重度哮喘组表达率高于轻度哮喘组(*P* < 0.05,图 1,2)。

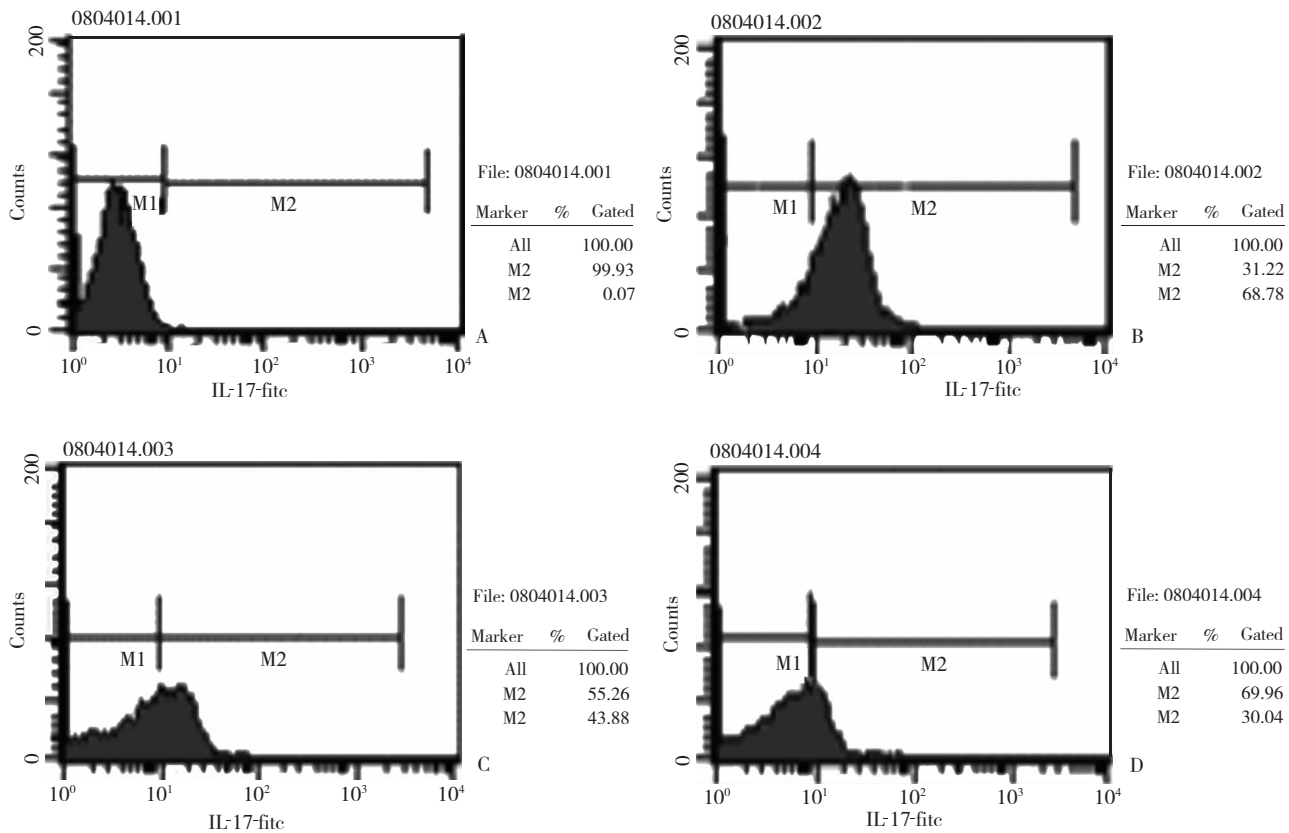


图1 流式细胞图示外周血中 Th17 细胞表达率。A:空白对照组;B:重度哮喘组;C:轻度哮喘组;D:健康对照组。
Fig. 1 Results of flow cytometry showing Th17 cells in human peripheral blood. A: Blank control group; B: Severe acute asthma group; C: Mild acute asthma group; D: Healthy control group.

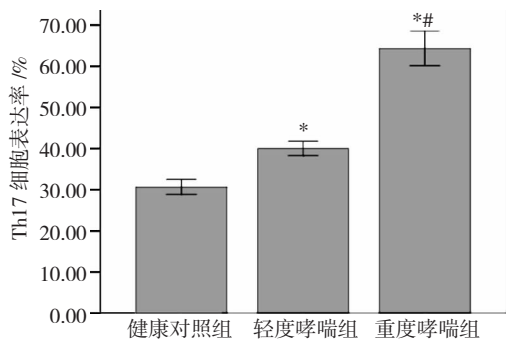


图2 各组外周血单个核细胞中 Th17 细胞表达率的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)。与健康对照组比较, * $P < 0.05$; 与轻度哮喘组比较, # $P < 0.05$ 。

Fig. 2 Comparison of Th17 cells in human peripheral blood among the 3 groups ($\bar{x} \pm s, n = 10$). Compared with the healthy controls, * $P < 0.05$; compared with the mild acute asthma group, # $P < 0.05$.

2.2 各组外周血中 IL-17 水平

重度哮喘组外周血 IL-17 水平为 (142.91 ± 15.37) ng/mL, 高于健康对照组 (41.28 ± 2.56) ng/mL 和轻度哮喘组 (72.75 ± 3.84) ng/mL 水平, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图3)。

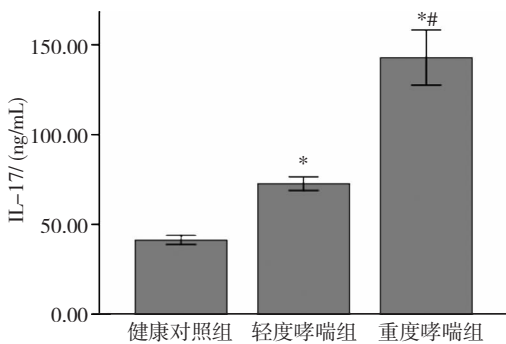


图3 各组外周血中 IL-17 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)。与健康对照组比较, * $P < 0.05$; 与轻度哮喘组比较, # $P < 0.05$ 。

Fig. 3 Comparison of the levels of IL-17 in human peripheral blood among the 3 groups ($\bar{x} \pm s, n = 10$). Compared with the healthy controls, * $P < 0.05$; compared with the mild acute asthma group, # $P < 0.05$.

2.3 Th17 细胞表达与哮喘严重程度及 IL-17 水平的相关性

直线相关分析表明: 外周血中 Th17 细胞表达与哮喘严重程度呈正相关 ($r = 0.869, P <$

0.05)。哮喘越严重, 外周血中 Th17 细胞表达率越高。外周血中 IL-17 水平与哮喘严重程度呈正相关 ($r = 0.956, P < 0.05$); 外周血中 Th17 细胞表达与外周血中 IL-17 水平呈正相关 ($r = 0.921, P < 0.05$)。

3 讨 论

哮喘是一种慢性、非特异性的气道炎症性疾病, 多种组织细胞和炎症细胞参与哮喘炎症的发生发展^[3], 其中 T 淋巴细胞起关键作用。

IL-17 即细胞毒性 T 细胞抗原 8 (cytotoxic T lymphocyte associated antigen 8, CTLA8)^[4]。目前研究普遍认为: IL-17 与多种炎症因子和前纤维化细胞因子相关^[5-6]。IL-17 本身具有强大的趋化并激活中性粒细胞的作用, 还可诱导核因子 NF-KB, IL-6, IL-8 和细胞间黏附分子的表达, 具有与 IL-1 及 TNF-α 的协同作用, 放大其炎症效应, 参与哮喘等炎症性疾病的发生发展^[7]。近来大量研究^[8-9]发现: 一种新的活化的 CD4⁺ T 细胞亚群——Th17 细胞亚群在慢性气道炎症性疾病的发生发展中发挥着重要作用。在炎症起始阶段, 这类细胞能大量分泌 IL-17, 引起进一步的炎症因子级联反应^[10]。

IL-17 是哮喘发病相关细胞因子网络的重要成员之一, 且间接参与哮喘气道重构, 而 Th17 细胞亚群能诱导产生 IL-17 且并不依赖于 Th1 和 Th2 细胞亚群。因此笔者推测: 外周血 Th17 细胞的改变与哮喘有关。检测外周血中 Th17 细胞可能成为一种临床上判断急性哮喘患者病情程度的新方法, 从而对指导治疗起一定的作用。本研究以 Ficoll 密度梯度离心法分离 PBMC, 经贴壁后获取淋巴细胞, 应用 FITC 标记的 anti-human IL-17 染色, 流式细胞仪检测 Th17 细胞表达率。结果发现: 轻重度急性哮喘患者 Th17 细胞表达率均高于健康对照组, 且重度患者增高更明显 ($P < 0.05$)。进行直线相关分析后发现: 外周血中 TH17 细胞表达与哮喘严重程度呈正相关 ($r = 0.869, P < 0.05$), 哮喘越严重, 外周血中 Th17 细胞表达越高。研究同时发现: 外周血中 IL-17 水平与哮喘严重程度呈正相关, 而 Th17 细胞阳性表达与外周血中 IL-17 水平呈正相关。以上结果提示 Th17 细胞可能参与哮喘急性加重的病理生理过程。

综上所述, 急性哮喘患者外周血 Th17 细胞

增加,且与其严重程度呈正相关。检测外周血 Th17 细胞对临床上判断急性哮喘患者病情,指导治疗有一定的作用。本研究仅对哮喘急性发作期患者进行研究,在将来的工作中还需纳入更大样本并且对慢性持续期和缓解期哮喘患者展开研究,以进一步阐明外周血 Th17 细胞表达与急性哮喘的关系及其确切机制。

参考文献:

[1] Hellings P W , Kasran A , Liu Z , et al . Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma [J] . Am J Respir Cell Mol Biol , 2003 , 28 (1) : 42-50 .

[2] Chang S H , Dong C . A novel heterodimeric cytokine consisting of IL-17 and IL-17F regulates inflammatory responses [J] . Cell Res , 2007 , 17 (5) : 435-440 .

[3] 张金花,周怡,刘宇. 内源性哮喘免疫支持治疗的探讨[J] . 中国现代医学杂志,2007,17 (4) : 464-465 .

ZHANG Jinhua ,ZHOU Yi ,LIU Yu . Discussion of immuthera-
py to patients with intrinsic asthma [J] . Chin J Modern
Med , 2007 , 17 (4) : 464-465 .

[4] Dechene L . Th1 / Th2 immune response [J] . J Allergy Clin

Immunol , 2002 , 110 (3) : 539-540 .

[5] Mckenzie B S , Kasteletin R A , Cua D J , et al . Under-
standing the IL-23-IL-17 immune pathway [J] . Trends
Immunol , 2006 , 27 (1) : 17-23 .

[6] Veldhoen M , Hocking R J , Atkins C J , et al . TGF beta in
the context of an inflammatory cytokinemilieu supports de novo
differentiation of IL-17-producing T cells [J] . Immunity ,
2006 , 24 (2) : 179-189 .

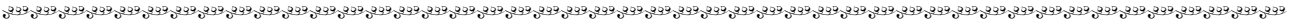
[7] Weiehler S , Proud D . Interleukin-17A modulates human
airway epithelial responses to human rhinovirus infection [J] .
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol , 2007 , 293 (2) :
505-515 .

[8] Zheng Y , Danilenko D M , Valdez P , et al . Interleukin-
22 , a TH17 cytokine , mediates IL-23 induced dermal inflam-
mation and acanthosis [J] . Nature , 2007 , 445
(7128) : 648-651 .

[9] Reinhardt R L , Kang S J , Liang H E , et al . T helper cell
effector fates-who , how and where ? [J] . Curr Opin Immu-
nol , 2006 , 18 (3) : 271-277 .

[10] Chung D R , Kasper D L , Panzo R J , et al . CD4⁺ T cells
mediate abscess formation in intra-abdominal sepsis by an IL-
17-dependent mechanism [J] . J Immunol , 2003 , 170
(4) : 1958-1963 .

(本文编辑 郭征)



《中国医科大学学报》稿约

《中国医科大学学报》为医药卫生类综合性学术期刊,中国自然科学类核心期刊,中国科技论文统计源期刊,中国高等学校自然科学学报优秀期刊,本刊为月刊,1950 年创刊,刊号 ISSN 0258-4646,CN21-1227/R,国内外公开发行。主要刊载科研、医疗等领域的新成果、新理论、新技术。已进入美国化学文摘(CA)、美国生物学文摘(BA)、美国剑桥科学文摘:自然科学(CSA:NS)、俄罗斯文摘(AJ)、波兰哥白尼索引(IC)等国际重要检索系统。本刊设有专家评述,专题报告;论著(基础医学、临床医学、药学、公共卫生学、检验医学、法医学、口腔医学、医学心理学、护理医学等);研究快报、短篇论著、经验交流、疑难病倒、个案与短篇、技术方法等。

省级以上基金课题稿件将优先发表,欢迎国内外作者踊跃投稿。我刊对您的支持与协作,表示诚挚的谢意。

地址:沈阳市和平区北二马路 92 号 邮编:110001

联系电话:(024)23250375-601 网址: <http://www.joucmm.com>