

• 论 著 •

传染性单核细胞增多症患儿外周血 Th17 细胞表达的研究

宋建新, 朱红艳, 向自金

(云南省第一人民医院检验科, 昆明 650032)

摘要:目的 探讨传染性单核细胞增多症(IM)患儿外周血 Th17 细胞、IL-17、IL-6 水平的变化及临床意义。方法 分离 IM 患儿和健康者外周血单个核细胞(PBMC), 免疫磁珠阴选 CD4⁺T 淋巴细胞, 然后加佛波酯/离子霉素(PMA/Ion), 经固定, 透膜处理进行细胞内染色, 流式细胞术检测 CD4⁺T 淋巴细胞内 IL-17、IL-6 水平。结果 IM 患儿急性期 IL-17、IL-6 表达水平显著高于恢复期($P < 0.01$), 两者又显著高于健康对照组($P < 0.01$)。结论 IM 患儿外周血中存在异常增高的 Th17 细胞及其分泌的细胞因子, 且其水平与病情活动相关, 是判断 IM 患儿免疫状态和预后的指标之一。

关键词: 传染性单核细胞增多症; Th17 细胞; 外周血单个核细胞

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.01.010

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)01-0025-02

Preliminary study on Th17 cells in peripheral blood of child patients with infectious mononucleosis

Song Jianxin, Zhu Hongyan, Dian Zijin

(Department of Laboratory, the First People's Hospital of Yunnan, Kunming 650032, China)

Abstract: Objective To study the changes and clinic significance of Th17 cells of IL-17, IL-6 in peripheral blood of child patients with infectious mononucleosis(IM). **Methods** CD4⁺T lymphocytes were negatively selected from peripheral blood mononuclear cells(PBMC), separated from peripheral blood of child patients with IM and healthy controls, and were analyzed for the expression level of IL-17 and IL-6 by flow cytometry, after being treated with PMA/Ion, fixation and intra-cellular dyeing by membrane penetration. **Results** The expression levels of IL-17 and IL-6 in child patients with IM at acute stage were higher than at convalescence stage($P < 0.01$), and all of them were higher healthy controls($P < 0.01$). **Conclusion** There could be abnormal increase of Th17 cells and related cytokines in child patients with IM, both of which might be correlated with pathogenetic condition and could be performed as indexes for the estimation of immune function and prognosis of child patients with IM.

Key words: infections mononucleosis; Th17 cells; peripheral blood mononuclear cells

Th17 细胞亚群是一群不同于 Th1、Th2 亚群的新型效应性 T 细胞, 参与多种自身免疫性疾病, 包括类风湿关节炎、多发性硬化、系统性红斑狼疮(SLE)以及哮喘、移植排斥反应等的发病过程。在感染性疾病方面, 已证实 Th17 细胞在某些细菌感染性疾病中发挥保护性作用, 然而在病毒感染性疾病中研究较少, 并且其作用仍存有争议, 而在 EB 病毒感染引起的传染性单核细胞增多症(IM)中的作用目前未见报道。作者采用 IL-6、IL-17 胞内染色的方法, 应用流式细胞技术, 检测 IM 患者急性期及恢复期外周血单个核细胞(PBMC) Th17 细胞变化, 并对其意义进行初步探讨。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2009 年 5 月至 2010 年 11 月本院收治的 IM 患儿 30 例, 其中男 18 例, 女 12 例; 年龄 0.8~13 岁, 平均(8.6±4.3)岁。均符合 IM 诊断标准^[1], 起病后 1~7 d 为急性期, 25~30 d 为恢复期。急性期及恢复期均未用过免疫调节剂。对照组为来本院体检的健康儿童, 共 30 例; 年龄 2~12 岁, 平均(8.1±3.7)岁。

1.2 仪器与试剂 荧光素标记的抗体: 藻红蛋白(PE)标记抗人 IL-17、异硫氰酸荧光素(FITC)标记抗人 IL-6、莫能霉素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; 免疫磁珠阴选试剂盒(Dynabeads Untouched Human CD4 T 细胞)购自 DYNAL 公司; 破膜剂、固定液购自 Beckman Coulter 公司; 淋巴细胞分离液(Ficoll)购自上海试剂二厂; RPMI 1640、胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司; FC500 流式细胞仪(Beckman Coulter 公司)。

1.3 胞内细胞因子检测 采用 Ficoll 分离外周血单个核细胞(PBMC), 然后根据免疫磁珠阴选试剂盒操作说明分选出 CD4⁺T 细胞, 以含 10% FBS 的 1640 培养液重悬细胞(终浓度为 1×10^6 /mL), 加入 PMA(50 ng/mL)、Ion(1 μg/mL)及阻断剂莫能霉素, 予 37 °C, 5% CO₂ 条件下培养 5 h, 然后取细胞悬液 100 μL, 加入 100 μL 固定剂 A 反应 15 min, 洗涤(3 mL PBS+0.1% Na₃ + 5% FBS)1 次, 再加入 100 μL 透膜剂 B, 反应 5 min, 加入 10 μL PE 标记的抗人 IL-17 和 10 μL FITC-IL-6 抗体, 同时设同型对照反应管, 反应 30 min 后洗涤 2 次, 以 300 μL 冷 PBS 重悬, 进行 FCM 测定。

1.4 统计学处理 使用 SPSS12.0 统计软件包进行统计学分析, 数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 用成组设计的两样本均数比较的 *t* 检验。

2 结果

IM 患儿外周血 Th17 细胞检测结果显示, 免疫磁珠阴选 CD4⁺T 细胞纯度大于 90%。IM 患儿和正常 CD4⁺T 细胞经 PMA、Ion 作用后, FCM 检测结果见表 1。

表 1 两组 CD4⁺T 细胞 IL-17、IL-6 的表达 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-17	IL-6
急性期	1.79±0.18*	2.60±0.15*
恢复期	0.91±0.12*△	1.27±0.15*△
对照组	0.50±0.10	0.33±0.05

*: $P < 0.05$, 与对照组相比; △: $P < 0.05$, 与急性期相比。

如表 1 所示,IM 患儿在急性期胞内 IL-17、IL-6 表达水平显著高于对照组($t=34.4, 17.8$);急性期胞内 IL-17、IL-6 表达水平显著高于恢复期($t=22.3, 14.1$),恢复期与对照组相比($t=10.1, 19.7$)。

3 讨论

IM 是由 EB 病毒感染引起的一种急性或亚急性感染性网状内皮增生性疾病,是累及多系统的全身性疾病。患儿体内 B 淋巴细胞是 EB 病毒侵犯的靶细胞,该细胞表面有 EB 病毒受体,病毒侵入该细胞,在细胞内复制,引起该细胞变性、凋亡。同时引起 T 淋巴细胞强烈反应,此过程不仅导致患儿体液免疫受抑制,而且使其细胞免疫和免疫调节功能也明显受损。

Th17 细胞的发现源于对实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)及胶原诱导的关节炎(CIA)的研究。Th17 细胞主要分泌 IL-17(IL-17A、IL-17F 等)炎症因子发挥致炎作用,参与自身免疫和炎症反应,与免疫调节、免疫病理和宿主免疫关系密切^[2-3]。

IL-6 是体内许多细胞产生的一种具有多种生物活性的刺激因子,又称前炎症反应细胞因子,是炎症细胞因子网络中的关键因子,与感染性疾病的发生、发展与转归密切相关^[4-5],具有较强的免疫抗感染作用,也是评价患儿免疫反应的重要指标,同时,IL-6 是 Th17 细胞分化所必须的启动因子^[6]。

目前,检测 Th17 细胞的方法主要是采用 FCM 进行胞内细胞因子染色,细胞经 PMA/Ion 作用后,经过固定和透膜,可以在单个细胞水平分析分泌 IL-17 的 Th17 细胞。作者对 30 例 IM 患儿外周 CD4⁺ T 细胞内 IL-17、IL-6 的研究表明,急性期 IL-17、IL-6 水平明显高于对照组($P<0.01$)。说明患儿在 EB 病毒感染后,B 细胞异常增殖,其抗原性也随之发生改变,从而导致 T 细胞出现强烈的免疫应答反应^[7-9]。CD4⁺ T 细胞通过分泌多种细胞因子(如 IL-6、TGF- β 等)使初始 CD4⁺ 细胞转化成 Th17 细胞,Th17 细胞分泌 IL-17 诱导其他炎症细胞因子(如 TNF- α)、趋化因子(如 MCP-1、MCP-2)和基质金属蛋白酶的表达,引起炎症细胞浸润和组织损伤,介导促炎性反应。Hou 等^[10]研究发现,IL-17 能促进持续性病毒感染,并参与病毒感染引起的慢性脱髓鞘疾病的发病。IL-17 上调抗凋亡分子的表达后,通过增强病毒感染细胞的存活能力及阻止 CTL 细胞杀伤靶细胞来维持病毒的持续感染,提示 Th17 细胞在 IM 发病中起着重要作用。中和 IL-17 可清除病毒感染细胞,

促进细胞毒性 T 细胞的溶解功能,从而阻止病毒感染的进展。随着病情的好转,IL-6 呈逐渐下降的趋势,IL-6 诱导 Th17 细胞形成也逐渐减少。但 IM 恢复期患儿 IL-17、IL-6 水平仍高于对照组($P<0.01$),提示细胞因子水平越高,症状越重,细胞因子参与免疫性损伤的程度越强,机体仍处于免疫应激状态,说明此时患儿机体的免疫功能仍未完全恢复。

综上所述,IM 患儿外周血存在异常增高的 Th17 细胞,其水平与病情活动相关,是判断 IM 患儿免疫状态和预后的指标之一,对指导临床合理地应用免疫调节剂,调理细胞因子水平具有重要的临床价值。

参考文献

- [1] 胡亚美,江裁芳. 诸福棠实用儿科学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社,2002:821-825.
- [2] Wei L, Laurence A, Elias KM, et al. IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner [J]. J Biol Chem, 2007, 282(48): 34605-34610.
- [3] Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease [J]. Altern Med Rev, 2003, 8(3): 223-246.
- [4] 马庆海,杨文东. 2 型糖尿病合并冠心病与 Leptin 及 IL-6、CRP 的相关性 [J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(12): 1209-1210.
- [5] 王琦,李红,王宇萍,等. 反复呼吸道感染患儿免疫球蛋白及相关细胞因子水平分析 [J]. 宁夏医学院学报, 2007, 29(5): 451-452.
- [6] 陈怡丽. Th17 细胞及其在神经免疫疾病中的作用 [J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(2): 242-244.
- [7] 胡国强. EB 病毒相关疾病与免疫应答 [J]. 国外医学微生物学分册, 1997, 20(6): 926-933.
- [8] 周丽芳,蒋丽蓉,王薇,等. 传染性单核细胞增多症和 T 细胞免疫 [J]. 临床儿科杂志, 2003, 21(8): 458-460.
- [9] Rickinson A. Epstein-Barr virus [J]. Virus Research, 2002, 82(1/2): 109-113.
- [10] Hou W, Kang HS, Kim BS. Th17 cells enhance viral persistence and inhibit T cell cytotoxicity in a model of chronic virus infection [J]. Exp Med, 2009, 206(2): 313-328.

(收稿日期:2011-07-21)

(上接第 24 页)

- [9] 张泓,李万华,蔡琴,等. MRSA 杀白细胞素基因检测和 SCCmec 分子流行病学调查 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2009, 9(4): 248-251.
- [10] 周信云,胡龙华. 232 株金黄色葡萄球菌的临床分布特征及耐药性分析 [J]. 中国微生态学杂志, 2010, 22(10): 930-932.
- [11] 金咏絮,林其昌,陈公平,等. 我院 2007~2008 年金黄色葡萄球菌耐药性分析 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2010, 10(1): 53-56.
- [12] 张保华,付光林,余桂香,等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性及分子流行病学研究 [J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(2): 131-132.
- [13] 朱德妹. 2005 年中国 CHINET 葡萄球菌属耐药性分析 [J]. 中国

感染与化疗杂志, 2007, 7(4): 269-273.

- [14] Micek ST, Dunne M, Kollef MH. Pleuropulmonary complications of panton-valentine leukocidin-positive community-acquired methicillin-resistant staphylococcus aureus importance of treatment with antimicrobials inhibiting exotoxin production [J]. Chest, 2005, 128(4): 2732-2738.
- [15] Stevens DL, Ma Y, Salmi DB, et al. Impact of antibiotics expression of virulence-associated genes in methicillin-sensitive and methicillin-resistant staphylococcus aureus [J]. Infect Dis, 2007, 195(2): 202-211.

(收稿日期:2011-07-25)