

• 论 著 •

急性荨麻疹患者外周血 Th17 细胞数量和功能的变化

石教启, 张继华

(阳新县人民医院检验科, 湖北阳新 435200)

摘要:目的 分析急性荨麻疹患者外周血辅助性 T 细胞 17(Th17)细胞数量和功能的变化,探讨 Th17 细胞在急性荨麻疹免疫致病机制中的作用。方法 收集 50 例急性荨麻疹患者和 50 例健康体检者外周血标本,流式细胞术分析其外周血 Th17 细胞数量,实时荧光定量 PCR(qPCR)法分析其转录因子维甲酸相关孤儿素受体 γ t(ROR γ t)mRNA 水平,酶联免疫吸附测定(ELISA)法分析其外周血 Th17 细胞相关细胞因子转化生长因子- β (TGF- β)、白细胞介素(IL)-6、IL-17A、IL-17F 和 IL-23 水平。结果 急性荨麻疹患者 Th17 细胞数量($t=36.634\ 1, P<0.05$)和 ROR γ t mRNA 水平($t=23.840\ 1, P<0.05$)明显高于对照组, Th17 细胞相关细胞因子 TGF- β ($t=15.521\ 1, P<0.05$)、IL-6($t=7.247\ 3, P<0.05$)、IL-17A($t=15.415\ 3, P<0.05$)和 IL-17F($t=13.032\ 1, P<0.05$)水平均明显高于对照组。结论 Th17 细胞可能通过分泌 IL-17A、IL-17F 和 IL-6 等炎症因子在急性荨麻疹发病过程中发挥作用。

关键词:急性荨麻疹; 辅助性 T 细胞 17; 维甲酸相关孤儿素受体 γ t; 白细胞介素

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.10.043

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)10-1416-03

Changes in number and function of peripheral blood Th17 cells in acute urticaria patients

Shi Jiaoqi, Zhang Jihua

(Department of Clinical Laboratory, Yangxin People's Hospital, Yangxin, Hubei 435200, China)

Abstract: **Objective** To study the changes in number and function of peripheral blood T helper cell 17(Th17) in acute urticaria patients. **Methods** The percentages of Th17 in peripheral blood from 50 acute urticaria patients and 50 healthy persons were analyzed by immunofluorescence staining and bicolor flow cytometry(FCM) in vitro. Retinoic acid-related orphan nuclear receptor γ t(ROR γ t) mRNA from the same research objects were detected by quantitative realtime PCR(qPCR) method. Peripheral blood transforming growth factor- β (TGF- β), interleukin(IL)-6, IL-17A and IL-17F were tested by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) from the same research objects. **Results** The quantity of percentages of Th17($t=36.634\ 1, P<0.05$) and levels of ROR γ t mRNA($t=23.840\ 1, P<0.05$) in urticaria patients were higher than those in healthy persons obviously. Meanwhile, the levels of TGF- β ($t=15.521\ 1, P<0.05$), IL-6($t=7.247\ 3, P<0.05$), IL-17A($t=15.415\ 3, P<0.05$) and IL-17F($t=13.032\ 1, P<0.05$) in urticaria patients were higher than those in healthy persons significantly. **Conclusion** Dysfunction of Th17 in peripheral blood may involve in the immunopathogenesis of acute urticaria.

Key words: acute urticaria; T helper cell 17; retinoic acid-related orphan nuclear receptor γ t; interleukin

荨麻疹是一种常见的、严重的过敏性疾病,是由皮肤、黏膜小血管扩张和通透性增加而导致的一种局限性水肿反应,临床主要表现为风团和红斑,亦可伴发腹痛腹泻,严重者咽喉头水肿甚至休克^[1]。辅助性 T 细胞 17(Th17)是一群重要的介导炎症反应的细胞,分泌白细胞介素(IL)-17 等促炎症因子,其免疫反应失调和多种免疫性疾病密切相关^[2-3],但 Th17 是否参与荨麻疹免疫致病机制目前尚不清楚。因此,本研究拟分析急性荨麻疹患者外周血 Th17 细胞数量及其相关细胞因子水平,探讨外周血 Th17 细胞数量和功能变化与急性荨麻疹的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2010 年 8 月至 2011 年 11 月来本院皮肤科就诊的急性荨麻疹患者 50 例(急性荨麻疹组),男 23 例、女 27 例,平均年龄 41.3 岁(33~52 岁)。50 例同时期于本院体检者,排除免疫性疾病,作为对照组,男 26 例、女 24 例,平均年龄 39.6 岁(28~48 岁)。急性荨麻疹诊断标准见文献[4]。

1.2 仪器与试剂 小鼠抗人 CD4、IL-17 荧光抗体和同型对照试剂购自美国 eBioscience 公司;莫能霉素、依诺霉素、十二

豆蔻佛波醇乙酯(PMA)和皂素均购自 Sigma 公司;淋巴细胞分离液购自深圳达科为生物技术有限公司;Dynal 磁珠 mRNA 抽提试剂购自北京思尔成生物技术有限公司;一步法实时荧光定量 PCR(qPCR)通用试剂盒购自北京博奥生物有限公司;维甲酸相关孤儿素受体(ROR γ t)引物和荧光探针由上海生工生物工程有限公司设计和合成;TGF- β 、IL-6、IL-17A、IL-17F 和 IL-23 酶联免疫法试剂购自美国 DRG 公司;FACS Calibur 型流式细胞仪为美国 BD 公司产品;Thermo Multiskan MK3 型酶标仪为美国赛默飞世尔公司产品。

1.3 方法

1.3.1 外周血 Th17 细胞数量测定 无菌取研究对象肝素抗凝静脉血 2 mL,充分混匀。取 1 mL 全血和 1 mL 含 10%小牛血清的 RPMI-1640 培养液于 12 孔培养板中。加入依诺霉素、PMA 和莫能霉素(终浓度分别为 2 μ mol/L、8 nmol/L、2 μ mol/L),37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 4 h。收集培养物,800 $\times$ 10³ r/min 离心 5 min 去上清,加入 0.85% NH₄Cl 溶液溶解红细胞, PBS 缓冲液洗涤两次。加入 10 μ L CD4-FITC 单抗或小鼠抗人 IgG-FITC,4 $^{\circ}$ C 混匀避光 30 min,800 $\times$ g 离心 5 min 去上清。加入

200 μ L 皂素,室温 20 min, PBS 缓冲液洗涤两次。加入 10 μ L IL-17-PE 单抗或小鼠抗人 IgG-PE, 4 $^{\circ}$ C 混匀避光 30 min, 加入 400 μ L 0.5% 多聚甲醛固定, 上流式细胞仪检测, 以 CD4-FITC 设门, 检测 Th17(CD4⁺IL-17⁺) 细胞百分率。

1.3.2 外周血 Th17 细胞转录因子测定 取研究对象 EDTA-Na₂ 抗凝静脉血 4 mL, 淋巴细胞分离液梯度离心法分离研究对象外周血单个核细胞, 严格按试剂盒说明书抽提纯化 mR-NA, 然后采用 qPCR 检测 ROR γ t mRNA。

1.3.3 外周血 Th17 细胞相关细胞因子测定 取研究对象外周非抗凝血 2 mL, 分离血清, 严格按试剂盒说明书检测诱导因子 TGF- β 和 IL-6 水平, 以及效应因子 IL-17A 和 IL-17F 水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS14.0 软件分析实验数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用成组设计 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 急性荨麻疹患者外周血 Th17 细胞数量和转录因子 ROR γ t mRNA 水平 急性荨麻疹患者外周血 Th17 细胞百分率($t = 36.634\ 1, P < 0.05$)和 ROR γ t mRNA 水平($t = 23.840\ 1, P < 0.05$)均高于对照组, 差异有统计学意义。见表 1、图 1。

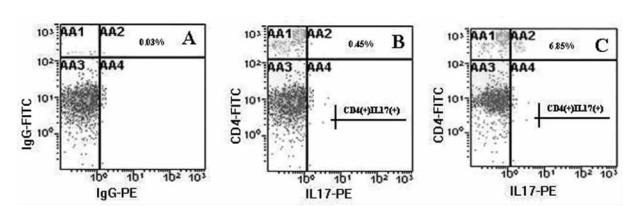
2.2 急性荨麻疹患者外周血 Th17 细胞相关细胞因子水平

急性荨麻疹患者外周血 Th17 细胞诱导因子 TGF- β ($t = 15.521\ 1, P < 0.05$)、IL-6($t = 7.247\ 3, P < 0.05$)和 Th17 细胞效应因子 IL-17A($t = 15.415\ 3, P < 0.05$)、IL-17F($t = 13.032\ 1, P < 0.05$)水平均高于对照组, 差异均有统计学意义, 见表 2。

表 1 急性荨麻疹患者外周血 Th17 细胞百分率和 ROR γ t mRNA 水平($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Th17(%)	ROR γ t mRNA (copies/mL)
急性荨麻疹组	50	6.41 $\pm$ 1.15 *	2 680 $\pm$ 624 *
对照组	50	0.45 $\pm$ 0.03	537 $\pm$ 121

* : $P < 0.05$, 与对照组比较。



A: 同型对照; B: 健康者; C: 急性荨麻疹患者。

图 1 流式细胞术检测急性荨麻疹患者和健康对照者 Th17 细胞数量

表 2 急性荨麻疹患者外周血 Th17 细胞相关细胞因子水平 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	诱导因子		效应因子	
		TGF- β	IL-6	IL-17A	IL-17F
急性荨麻疹组	50	534.2 $\pm$ 122.3 *	230.1 $\pm$ 99.3 *	313.2 $\pm$ 89.6 *	323.5 $\pm$ 108.3 *
对照组	50	220.8 $\pm$ 73.5	100.3 $\pm$ 78.6	97.1 $\pm$ 42.4	100.3 $\pm$ 54.2

* : $P < 0.05$, 与对照组比较。

3 讨 论

荨麻疹是一种变态反应性疾病, 其发病中心环节是皮肤或黏膜组织肥大细胞脱颗粒, 释放血管活性介质如组胺等, 新合成的、胞膜来源的介质如白三烯、前列腺素等随后释放, 造成平滑肌收缩、毛细血管扩张、通透性增加等, 引起荨麻疹的临床表现^[4]。

以往研究认为 IgE 介导的 I 型超敏反应是荨麻疹发生的主要免疫机制, 但近年来研究发现, I 型超敏反应并不能解释所有的荨麻疹, 可能有更多的免疫功能紊乱状况参与了荨麻疹免疫发病机制^[5-6]。研究发现以分泌炎症因子 IL-17 为主要特征的 Th17 细胞与器官移植排斥反应、肿瘤及类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、多发性硬化症、哮喘等炎症免疫性疾病有关, 这些患者的血清和病变组织中都能检测到 IL-17 分子^[7-8]。急性哮喘患者外周血 Th17 细胞表达增加, 并且与疾病的严重程度呈正相关^[9]; 同样, 系统性红斑狼疮患者外周血 Th17 细胞也明显增多, 并且与病情活动性、肾脏损害程度及蛋白尿相关^[10]; 另有研究发现 Th17 功能亢进可能促进了急性胰腺炎的发生与恶化^[11]。但 Th17 细胞是否参与荨麻疹免疫致病机制目前少有报道, 本研究发现急性荨麻疹患者外周血 Th17 细胞数量明显高于对照组, 结果提示 Th17 细胞可能与急性荨麻疹密切相关。

Th17 细胞是一种效应性、记忆性 CD4⁺ T 细胞, 约占其总数的 17.2%。Th17 细胞的确切调控机制仍不十分清楚, 可能受 IL-23、IL-12、IL-6、TGF- β 、INF- γ 等多种细胞因子以及转录

因子 ROR γ t 的共同作用影响, 具有独特的分化和发育途径^[12-13]。体内外实验证实 IL-6 和 TGF- β 的共同刺激为诱导初始 CD4⁺ T 细胞表达 IL-17 和 IL-17F 的始动因素; 同时 IL-6 和 TGF- β 也是诱导 Th17 分化的关键细胞因子, 单独 TGF- β 存在条件下初始 CD4⁺ T 细胞被诱导分化成具有免疫抑制作用的 Treg 细胞, 而 TGF- β 与 IL-6 共同存在时, 初始 CD4⁺ T 细胞则诱导分化成 T17 细胞。TGF- β 和 IL-6 的协同作用能诱导 ROR γ t 的产生, ROR γ t 是 Th17 细胞分化的关键转录因子^[14], ROR γ t 缺陷小鼠体内 Th17 细胞数明显降低, 而过度表达 ROR γ t 可以促进 Th17 细胞的表达。本研究发现急性荨麻疹患者外周血 Th17 细胞诱导因子 TGF- β 、IL-6 和转录因子 ROR γ t mRNA 水平均明显高于对照组; 结果提示高水平的 Th17 细胞诱导因子 TGF- β 、IL-6 和转录因子 ROR γ t mRNA 诱导了急性荨麻疹患者外周血 Th17 细胞的分化和成熟。

Th17 细胞能够产生多种效应分子, 最主要的效应分子是 IL-17A 和 IL-17F^[8]。IL-17A 即通常所说的 IL-17。IL-17 生物学效应广泛, 其最主要功能是作为炎症介质刺激 IL-6、氧化亚氮和前列腺素 E2 的产生, 同时 IL-17 可通过上调 IL-1 β 、TNF- α 、INF- γ 等炎症细胞因子基因的表达, 促进局部炎症进展和扩大化。IL-17F 是 Th17 细胞分泌的另一效应分子, 和 IL-17A 有许多的相似性, IL-17F 可能和 IL-17A 共享相同的受体, 因而发挥与 IL-17A 相同的生物学效应, 参与疾病的进程。研究发现慢性乙型肝炎患者肝组织中 Th17 细胞相关因子过表达, 并且与肝脏炎症和纤维化程度相关^[15]。本研究发现急

性荨麻疹患者外周血 Th17 细胞效应因子 IL-17A 和 IL-17F 水平均明显高于对照组;结果提示 Th17 细胞可通过分泌 IL-17A 和 IL-17F 等效应分子参与急性荨麻疹患者的炎症反应。

综上所述,外周血 Th17 细胞数量增高和炎症因子分泌功能亢进与急性荨麻疹患者的免疫发病机制密切相关。

参考文献

[1] 吴易,蒙金秋. 荨麻疹的研究及治疗新进展[J]. 广西医科大学学报, 2009, 26(5): 816-818.

[2] 朱华芳, 王秀丽, 张建琴. 慢性乙型肝炎患者外周血 Th17 细胞检测及意义[J]. 山东医药, 2010, 50(51): 81-82.

[3] Chen DY, Chen YM, Chen HH, et al. Increasing levels of circulating Th17 cells and interleukin-17 in rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to anti-TNF- α therapy[J]. Arthritis Res Ther, 2011, 13(4): R126.

[4] 任华丽, 王学艳. EAACI/GA2LEN/EDF/WAO 荨麻疹及血管性水肿诊疗指南(2009 版)解读[J]. 实用医学杂志, 2010, 26(4): 531-534.

[5] Daschner A, Rodero M, De Frutos C, et al. Different serum cytokine levels in chronic vs. acute Anisakis simplex sensitization-associated urticaria[J]. Parasite Immunol, 2011, 33(6): 357-362.

[6] 徐永财. 复方甘草酸苷对慢性荨麻疹患者外周血 Th1/Th2 平衡的影响[J]. 中国药师, 2010, 13(1): 109-111.

[7] Prado C, de Paz B, Gómez J, et al. Glucocorticoids enhance Th17/Th1 imbalance and signal transducer and activator of transcription 3 expression in systemic lupus erythematosus patients[J]. Rheumatology (Oxford), 2011, 50(10): 1794-1801.

(上接第 1415 页)

郁的概率较高,尤以女性及未在职患者为甚。因此,关注 ESRD 透析患者心理状态,在其治疗过程中加强对抑郁状态的评估和监测;特别是对女性及未在职患者,必要的心理干预或可明显改善 ESRD 患者生活质量,改善预后。

参考文献

[1] Wu F, Cui L, Gao X, et al. Quality of Life in peritoneal and hemodialysis patients in China[J]. Ren Fail, 2013, 35(4): 456-459.

[2] Oyeke DG, Gülpek D, Sahin EM, et al. Depression, anxiety, body image, sexual functioning, and dyadic adjustment associated with dialysis type in chronic renal failure[J]. Int J Psychiatry Med, 2012, 43(3): 227-241.

[3] Preljevic VT, Asthus TB, Sandvik L, et al. Screening for anxiety and depression in dialysis patients: comparison of the Hospital Anxiety and Depression Scale and the Beck Depression Inventory [J]. J Psychosom Res, 2012, 73(2): 139-144.

[4] Su SF, Ng HY, Huang TL, et al. Survey of depression by Beck Depression Inventory in uremic patients undergoing hemodialysis and hemodiafiltration[J]. Ther Apher Dial, 2012, 16(6): 573-579.

[5] Kimmel PL, Peterson RA, Weihs KL, et al. Multiple measurements of depression predict mortality in a longitudinal study of chronic hemodialysis outpatients[J]. Kidney Int, 2000, 57(5): 2093-2098.

[6] Cukor D, Coplan J, Brown C, et al. Depression and anxiety in urban hemodialysis patients[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2007, 2(3): 484-490.

[7] Macaron G, Fahed M, Matar D, et al. Anxiety, depression and sui-

[8] Hot A, Miossec P. Effects of interleukin (IL)-17A and IL-17F in human rheumatoid arthritis synoviocytes[J]. Ann Rheum Dis, 2011, 70(5): 727-732.

[9] 李建民, 向旭东, 李金秀, 等. 急性哮喘患者外周血中 Th17 细胞的变化及其意义[J]. 中南大学学报: 医学版, 2010, 35(2): 129-133.

[10] 廖卓君, 徐建华, 蔡静等. 系统性红斑狼疮患者外周血 Th17 的变化及与疾病活动性的关系[J]. 临床内科杂志, 2010, 27(6): 391-393.

[11] 高长春, 戴存才. 急性胰腺炎患者血清 Th17 相关因子 IL-17、IL-6 与 TNF- α 水平变化及意义[J]. 中国医药导报, 2009, 6(35): 15-16.

[12] Fujita-Sato S, Ito S, Isobe T, et al. Structural basis of digoxin that antagonizes RORgamma t receptor activity and suppresses Th17 cell differentiation and interleukin (IL)-17 production[J]. J Biol Chem, 2011, 286(36): 31409-31417.

[13] Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, et al. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity[J]. Immunity, 2009, 31(2): 331-341.

[14] Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, et al. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma[J]. Immunity, 2008, 28(1): 29-39.

[15] 赵丽, 王绮夏, 邱德凯, 等. Th17 细胞相关因子在慢性乙型肝炎肝组织中的表达[J]. 胃肠病学, 2010, 15(6): 326-329.

(收稿日期: 2015-02-12)

cidal ideation in Lebanese patients undergoing hemodialysis[J]. Community Ment Health J, 2014, 50(2): 235-238.

[8] Wilson B, Spittal J, Heidenheim P, et al. Screening for depression in chronic hemodialysis patients: comparison of the Beck Depression Inventory, primary nurse, and nephrology team[J]. Hemodial Int, 2006, 10(1): 35-41.

[9] Saduyu A, Sentürk VH, Sezer S, et al. Psychiatric problems, Life quality and compliance in patients treated with haemodialysis and renal transplantation[J]. Türk psikiyatri dergisi, 2006, 17(1): 22-31.

[10] Muhammad A, Haris B, Mahrukh M, et al. Depression in hemodialysis patients[J]. Pak J Med Sci, 2008, 24(4): 560-565.

[11] Hung KC, Wu CC, Chen HS, et al. Serum IL-6, albumin and comorbidities are closely correlated with symptoms of depression in patients on maintenance haemodialysis[J]. Nephrol Dial Transplant, 2011, 26(2): 658-664.

[12] Bayliss GP, Gohh RY, Morrissey PE, et al. Immunosuppression after renal allograft failure: a survey of US practices[J]. Clin Transplant, 2013, 27(6): 895-900.

[13] Kaveh K, Kimmel PL. Compliance in hemodialysis patients: multi-dimensional measures in search of a Gold standard[J]. Am J Kidney Dis, 2001, 37(2): 244-266.

[14] Silva Junior GB, Daher EF, Buosi AP, et al. Depression among patients with end-stage renal disease in hemodialysis[J]. Psychol Health Med, 2014, 19(5): 547-551.

(收稿日期: 2015-02-22)