

全血和外周血单个核细胞检测 IL-17 和 IFN- γ 的比较*王 莉¹, 郭振涛², 彭美玉^{3△}

(1. 临沂市精神卫生中心检验科, 山东临沂 276005; 2. 潍坊医学院附属医院肾内科, 山东潍坊 261031; 3. 潍坊医学院临床医学院免疫学教研室, 山东潍坊 261053)

摘要:目的 通过比较全血标本和外周血单个核细胞(PBMC)中白细胞介素 17(IL-17)和 γ -干扰素(IFN- γ)的检测率,为今后检测外周血中 IL-17 的相关试验中有没有必要分离 PBMC 提供依据。方法 采集健康成年人外周血,密度梯度离心法分离 PBMC,收集中性粒细胞(PMN)和自体血浆。流式细胞仪和酶联免疫吸附试验(ELISA)检测各组中 IL-17 和 IFN- γ 。结果 PBMC+PMN 组、PBMC+血浆组、PBMC+PMN+血浆组和全血组中 CD3⁺T 细胞中分泌 IL-17 细胞的比例(分别为 0.30%, 0.26%, 0.55%, 1.25%)与 PBMC 组(0.10%)比较,差异有统计学意义($P<0.05$);各组 $\gamma\delta$ T 细胞中分泌 IL-17 细胞的比例(分别为 2.18%, 1.20%, 3.87%, 7.28%)与 PBMC 组(0.44%)比较,差异有统计学意义;CD3⁺CD8⁺ T 细胞中分泌 IL-17 细胞的比例(分别为 0.29%, 0.24%, 0.42%, 2.63%)与 PBMC 组(0.14%)比较,差异有统计学意义;CD3⁺CD8⁻ T 细胞中分泌 IL-17 细胞的比例(分别为 0.52%, 0.48%, 0.91%, 0.93%)与 PBMC 组(0.19%)比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。全血中 IL-17 浓度(109.90 ± 38.68)pg/mL 也明显高于 PBMC 中 IL-17 浓度(37.06 ± 6.45)pg/mL,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 与分离出的 PBMC 相比,全血标本更有利于提高 IL-17 和 IFN- γ 的检出率。

关键词:全血; 外周血单个核细胞; 白细胞介素 17; γ -干扰素

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.19.005

中图法分类号:R392.33

文章编号:1673-4130(2018)19-2352-04

文献标识码:A

The comparison of detecting IL-17 and IFN- γ in whole blood and peripheral blood mononuclear cells*WANG Li¹, GUO Zhentao², PENG Meiyu^{3△}

(1. Department of Clinical Laboratory, the Mental Health Center of Linyi City, Linyi, Shandong 276005, China; 2. Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Weifang Medical University, Weifang, Shandong 261031, China; 3. Department of Immunology, School of Clinical Medicine, Weifang Medical University, Weifang, Shandong 261053, China)

Abstract: **Objective** To compare the test rates of interleukin-17 (IL-17) and interferon- γ (IFN- γ) in whole blood samples and in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), so as to provide experimental basis for future tests to detect IL-17 in peripheral blood. **Methods** Peripheral blood of healthy adults was collected, PBMC was separated by density gradient centrifugation, and neutrophil (PMN) and autologous plasma were collected. Flow cytometry and ELISA were used to detect IL-17 and IFN- γ in each group. **Results** The percent of IL-17 producing cells in CD3⁺T (0.30%, 0.26%, 0.55%, 1.25%, respectively) in the PBMC+PMN group, in the PBMC+plasma group, in the PBMC+PMN+plasma group and in the whole blood group were all statistically significant compared with that in the PBMC group (0.10%), the difference was statistically significant ($P<0.05$). The percent of IL-17 producing cells in $\gamma\delta$ T (2.18%, 1.20%, 3.87%, 7.28%, respectively) in each group was statistically significant compared with that in the PBMC group (0.44%). The percent of IL-17 producing cells in CD3⁺CD8⁺ T cells (0.29%, 0.24%, 0.42%, 2.63%, respectively) in each group was statistically significant compared with that in the PBMC group (0.14%). The percent of IL-17 producing cells in CD3⁺CD8⁻ T cells (0.52%, 0.48%, 0.91%, 0.93%, respectively) in each group compared with that in the PBMC group (0.19%), the difference was statistically significant ($P<0.05$). The concentration of IL-17 in whole blood (109.90 ± 38.68)pg/mL was obviously higher than that of PBMC (37.06 ± 6.45)pg/mL, the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Compare with isolated PBMC, whole

* 基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(81502469);山东省自然科学基金资助项目(ZR2015HL061);山东省医药卫生科技发展计划项目(2015WS0050)。

作者简介:王莉,女,主管技师,主要从事炎症相关疾病研究。△ 通信作者, E-mail: pmy-107@163.com。

本文引用格式:王莉,郭振涛,彭美玉.全血和外周血单个核细胞检测 IL-17 和 IFN- γ 的比较[J].国际检验医学杂志,2018,39(19):2352-2355.

blood samples are more beneficial to improve the detection rate of IL-17 and IFN- γ .

Key words: whole blood; peripheral blood mononuclear cell; interleukin-17; interferon- γ

关于外周血白细胞分泌细胞因子的检测,不同的研究者描述了不同的方法,主要表现在检测标本的不同,如全血、分离的外周血单个核细胞(PBMC)或分选的 T 细胞亚群^[1-3]。白细胞介素 17(IL-17)是一种炎症前因子,主要由激活的 CD4⁺ T 细胞表达,其中 Th17 细胞是 IL-17 的最主要来源^[4-5];CD8⁺ T、 $\gamma\delta$ T 和自然杀伤(NK) T 细胞也可产生 IL-17^[6-8]。IL-17 在宿主防御和炎症性疾病中起重要的作用,连接着固有免疫和适应性免疫机制。越来越多的研究证明,在多种疾病,如炎症、自身免疫性疾病及肿瘤等多种疾病中,IL-17 起着关键的作用^[9-12]。因此临床需要采集外周血标本检测 IL-17 的实验越来越多。而 IL-17 在全血中的检测结果是否高于其在分离的 PBMC 中的检测结果目前还不清楚。因此本研究应用流式细胞仪法和酶联免疫吸附试验(ELISA)法比较全血标本与 PBMC 中 IL-17 和 γ -干扰素(IFN- γ)的检出率,同时检测了将分离出的中性粒细胞和血浆返回 PBMC 后,分泌 IL-17 和分泌 IFN- γ 细胞的检出率。以便为今后检测外周血中 IL-17 相关试验时,是否需要分离 PBMC 提供一定的实验依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 采集本实验室健康职工外周静脉血 5 mL,共 10 例。

1.2 实验分组 设置如下 5 个实验组:(1)500 μ L 全血加 500 μ L 不完全 RPMI-1640 稀释;(2)1 $\times$ 10⁶ PBMC 加 500 μ L 不完全 RPMI-1640 和 500 μ L 新生小牛血清(NBS)重悬;(3)1 $\times$ 10⁶ PBMC 加 500 μ L 不完全 RPMI-1640 和 500 μ L 自体血浆重悬;(4)1 $\times$ 10⁶ PBMC +1 $\times$ 10⁶ 中性粒细胞(PMN)加 500 μ L 不完全 1640 和 500 μ L NBS 重悬;(5)1 $\times$ 10⁶ PBMC +1 $\times$ 10⁶ PMN 加 500 μ L 不完全 RPMI-1640 和 500 μ L 自体血浆重悬,各组同时加入终浓度为 20 ng/mL 的佛波醇脂(PMA)和终浓度为 1 μ g/mL 的钙离子酶素(Iono)。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 6 h,其中后 4 h 加入终浓度为 2.5 μ mol/L 的莫能霉素阻断细胞因子分泌,各实验组均同时设置单加莫能霉素对照组。

1.3 方法

1.3.1 血浆和细胞分离 外周静脉血 3 mL,肝素抗凝,2 500 r/min 20 min 离心收集血浆,密度梯度离心法分离 PBMC,收集中性粒细胞,红细胞用 0.83% 氯化氨溶解。

1.3.2 流式细胞仪检测 收集以上细胞按如下方法染色:100 μ L 全血或分离的(1~2) $\times$ 10⁶ 细胞加入 CD3-PeCy5.5 和 TCR $\gamma\delta$ -PE,4 $^{\circ}$ C 避光染色 30 min。全血标本溶解红细胞,每管加 1 mL 染色缓冲液(SB)洗 2 次,SB 为磷酸缓冲液(PBS)+5% NBS+0.1% 叠氮钠(NaN₃);每管加 500 μ L 2% 多聚甲醛(PFA)4 $^{\circ}$ C 避光固定 30 min;每管加 1 mL SB 洗 2 次;每管

加 500 μ L 透膜缓冲液(0.1% 皂素)4 $^{\circ}$ C 避光透膜 15 min;每管加入 Fc 抗体 4 $^{\circ}$ C 避光封闭 30 min;每管分别加入 IL-17A-FITC 和 IFN- γ -FITC 4 $^{\circ}$ C 避光染色 30 min,每管加 1 mL 透膜缓冲液洗 2 次;加 1 mL SB 洗 1 次,每管加 200 μ L SB 重悬;最后用流式细胞仪 FACSCalibur 检测。获取数据应用 BD CellQuest software 和 WinMDI 2.8 软件分析。所用试剂均购自 BD Biosciences 公司。

1.3.3 ELISA 检测 设置两个实验组:(1)500 μ L 全血加 500 μ L 不完全 RPMI-1640 稀释;(2)5 $\times$ 10⁵ PBMC 加 500 μ L 不完全 RPMI-1640 和 500 μ L NBS 重悬,各组同时加入终浓度为 20 ng/mL 的 PMA 和终浓度为 1 μ g/mL 的 Iono,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 6 h,收集培养上清用联科生物公司提供的 ELISA 试剂盒检测 IL-17 和 IFN- γ 浓度,两实验组均同时设置未加刺激剂对照组。

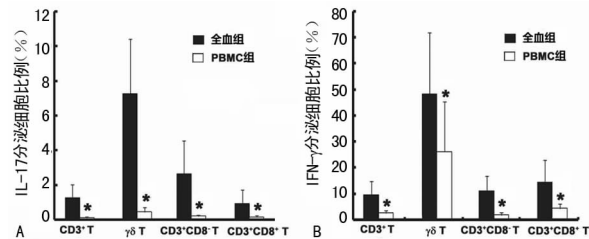
1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较用 Student's unpaired *t*-test,*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 全血和 PBMC 中 IL-17、IFN- γ 分泌细胞比例 为了比较全血标本和分离的 PBMC 检测 IL-17 分泌细胞比率的不同,本实验同时采用来自同一个体的全血和分离的 PBMC,应用流式细胞仪法检测 IL-17 和 IFN- γ 分泌细胞的比例。见图 1A 所示,全血标本中分别检测到的 CD3⁺ T 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、CD3⁺CD8⁺ T 细胞和 CD3⁺CD8⁻ T 细胞中分泌 IL-17 细胞的比例(分别为 1.25%、7.28%、0.93%、2.63%)均明显地高于其分别在 PBMC 中检测到的比例(0.1%、0.44%、0.14%、0.19%),差异有统计学意义(*P*<0.05)。同样的,全血标本中分别检测到的 CD3⁺ T 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、CD3⁺CD8⁺ T 细胞和 CD3⁺CD8⁻ T 细胞中分泌 IFN- γ 细胞的比例(分别为 9.52%、48.38%、14.21%、10.9%)也均明显地高于其分别在 PBMC 中检测到的比例(2.47%、26.15%、4.22%、1.72%),差异有统计学意义(*P*<0.05),见图 1B。虽然与 PBMC 相比,IL-17 和 IFN- γ 在全血中的检测结果均显著升高,但是 IL-17 升高的程度(约 10 倍)明显高于 IFN- γ 升高的程度(约 2~3 倍)。因此,用全血法检测 IL-17 的优势更明显。

2.2 PMN 和血浆的存在可促进细胞分泌 IL-17 和 IFN- γ 为了确定 PMN 和血浆是否可起到促进细胞分泌 IL-17 和 IFN- γ 的作用,将分离出的 PMN 和血浆分别或同时返回 PBMC 后再测定分泌 IL-17 和分泌 IFN- γ 细胞的比例。结果如图 2 所示,PBMC+PMN 组、PBMC+血浆组、PBMC+PMN+血浆组和全血组中 CD3⁺ T 细胞中分泌 IL-17 细胞的比例(分别为 0.30%、0.26%、0.55%、1.25%)与 PBMC 组细

胞比例(0.1%)相比(图 2A),差异有统计学意义($P<0.05$); $\gamma\delta$ T 细胞中分泌 IL-17 细胞的比例(分别为 2.18%、1.20%、3.87%、7.28%),与 PBMC 组细胞比例(0.44%)相比(图 2B),差异有统计学意义($P<0.05$); $CD3^+CD8^+$ T 细胞中分泌 IL-17 细胞的比例(分别为 0.29%、0.24%、0.42%、2.63%)与 PBMC 组细胞比例(0.14%)相比(图 2C),差异有统计学意义($P<0.05$); $CD3^+CD8^-$ T 细胞中分泌 IL-17 细胞的比例(分别为 0.52%、0.48%、0.91%、0.93%)与 PBMC 组细胞比例(0.19%)相比(图 2D),差异有统计学意义($P<0.05$)。同样的, PBMC+PMN 组、PBMC+血浆组、PBMC+PMN+血浆组和全血组中 $CD3^+$ T 细胞中分泌 IFN- γ 细胞的比例(分别为 5.99%、6.35%、6.15%、9.52%)与 PBMC 组(2.47%)比较(图 2E),差异有统计学意义($P<0.05$); $\gamma\delta$ T 细胞中分泌 IFN- γ 细胞的比例(分别为 33.60%、54.87%、46.25%、48.38%)与 PBMC 组(26.15%)比较(图 2F),差异有统计学意义($P<0.05$); $CD3^+CD8^+$ T 细胞中分泌 IFN- γ 细胞的比例(分别为 5.63%、4.94%、6.89%、10.90%)与 PBMC 组(1.72%)比较(图 2G),差异有统计学意义($P<0.05$); $CD3^+CD8^-$ T 细胞中分泌 IFN- γ 细胞的比例(分别为 11.90%、9.20%、10.25%、14.21%)与 PBMC 组(4.22%)比较(图 2H),差异有统计学意义($P<0.05$)。



注:与 PBMC 组比较, * $P<0.05$
图 1 全血和 PBMC 中 IL-17 和 IFN- γ 分泌细胞的比例

表 1 全血和 PBMC 中 IL-17 和 IFN- γ 的浓度($\bar{x}\pm s$, pg/mL)

标本	IL-17		IFN- γ	
	加 PMA/Iono	不加 PMA/Iono	加 PMA/Iono	不加 PMA/Iono
全血	109.90 $\pm$ 38.68	79.75 $\pm$ 25.58	769.84 $\pm$ 532.46	72.52 $\pm$ 37.91
PBMC	37.06 $\pm$ 6.45 *	33.05 $\pm$ 7.54 *	182.73 $\pm$ 191.61 *	56.64 $\pm$ 33.12 *

注:与全血比较, * $P<0.05$

3 讨 论

全血血浆中多种生物活性物质与提高人 PBMC 分泌细胞因子相关,如泛素可促进 PBMC 分泌 IL-8 和 IL-4^[13]。另外,红细胞也可刺激细胞因子 IFN- γ 、IL-1 β 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的分泌^[14]。MANEL 等^[15]报道,在无血清存在时,初始 $CD4^+$ T 细胞分泌 IL-17 依赖于 TGF- β , IL-1 β , IL-6, IL-21 或 IL-23 的存在。由此可推测全血环境应该比分离出的 PBMC 更有利于 IL-17 的分泌。因此本研究选用全血标本和分离的 PBMC,应用流式细胞仪和 ELISA

2.3 全血和 PBMC 中 IL-17 和 IFN- γ 的浓度 为了进一步确定全血中细胞分泌 IL-17 和 IFN- γ 的能力高于 PBMC,全血标本和分离出的 PBMC 同时加/不加 PMA/Iono 刺激培养 6 h 后收集培养上清,ELISA 试剂盒检测 IL-17 和 IFN- γ 的浓度。结果见表 1,全血培养上清中 IL-17 和 IFN- γ 的浓度均高于其在 PBMC 培养上清中的浓度。

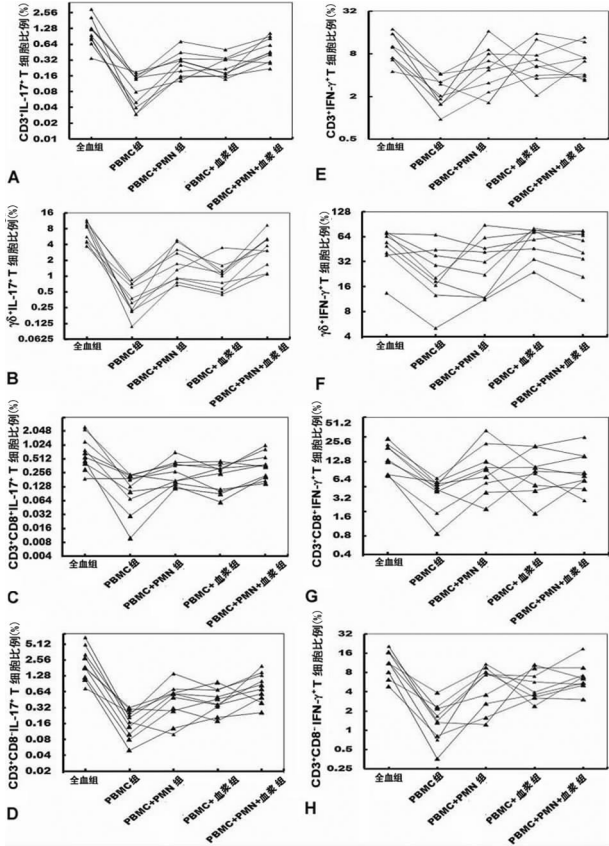


图 2 PMN 和血浆对各组 IL-17 和 IFN- γ 分泌细胞比例的影响

法对 IL-17 和 IFN- γ 检测结果进行比较。结果表明全血标本检测到的 IL-17 和 IFN- γ 的结果均明显地高于其在 PBMC 中的检测结果,见图 1、表 1;而且将分离出的中性粒细胞和血浆返回 PBMC 后,分泌 IL-17 和分泌 IFN- γ 的 T 细胞亚群的检测结果与 PBMC 相比也均明显升高,但其仍然低于全血中的检测结果,见图 2。

4 结 论

总之,本研究发现选用全血标本检测 IL-17 的结果明显的优于分离出 PBMC,这为今后检测外周血白

细胞分泌 IL-17 的相关试验时,是否需要分离 PBMC 提供了实验依据。

参考文献

[1] EVANS R,PRAKASHA K,ZACHARY K,et al. CD4 T-cell expression of IFN- γ and IL-17 in pediatric malarial anemia[J]. PLoS One,2017,12(4):e0175864.

[2] ZHANG L X,CHEN J Y,XU C Y,et al. Effects of iodine-131 radiotherapy on Th17/Tc17 and Treg/Th17 cells of patients with differentiated thyroid carcinoma[J]. Exp Ther Med,2018,15(3):2661-2666.

[3] CRISTINA W,JOANA H,THAIS B,et al. Interleukin-17 and interleukin-22-secreting myelin-specific CD4⁺ T cells resistant to corticoids are related with active brain lesions in multiple sclerosis patients[J]. Immunology,2016,147(2):212-220.

[4] WANG Y L,FANG M,WANG X M,et al. Proinflammatory effects and molecular mechanisms of interleukin-17 in intestinal epithelial cell line HT-29[J]. World J Gastroenterol,2014,20(47):17924-17931.

[5] ZHU J F,YAMANE H,PAUL W E. Differentiation of effector CD4 T cell populations[J]. Annu Rev Immunol,2010,28(1):445-489.

[6] LI P,YANG Q Z,WANG W,et al. Increased IL-4-and IL-17-producing CD8⁺ cells are related to decreased CD39⁺ CD4⁺ Foxp3⁺ cells in allergic asthma [J]. J Asthma,2018,55(1):8-14.

[7] PENG M Y,WANG Z H,YAO C Y,et al. Interleukin 17-producing gamma delta T cells increased in patients with active pulmonary tuberculosis [J]. Cell Mol Immunol,2008,5(3):203-208.

[8] ANSELM E,SANDA S,CHARIS T,et al. Zbtb7b (Th-POK) regulates the development of IL-17 producing CD1d-restricted mouse NKT-cells[J]. J Immunol,2012,189(11):5240-5249.

[9] ZENOBIA C,HAJISHENGALLIS G. Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation[J]. Periodontol,2000,2015,69(1):142-159.

[10] TABARKIEWICZ J,POGODA K,KARCZMARCZYK A,et al. The role of IL-17 and Th17 lymphocytes in autoimmune diseases[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz),2015,63(6):435-449.

[11] PUNT S,LANGENHOFF J M,PUTTER H,et al. The correlations between IL-17 vs. Th17 cells and cancer patient survival: a systematic review [J]. Oncoimmunol,2015,4(2):e984547.

[12] BOB Y,HEECHAN K,ANTHONY F,et al. The role of interleukin 17 in tumour proliferation, angiogenesis and metastasis mediators[J]. Inflamm,2014,20(14):623759.

[13] 朱鑫方,攸璞,于兵,等. 保存全血中泛素对人外周血单个核细胞分泌细胞因子的影响[J]. 中华血液学杂志,2011,32(6):421-422.

[14] 宿振国,周玉明,高梅兰,等. 红细胞在外周血单个核细胞活化过程中对细胞因子分泌的影响[J]. 国际检验医学杂志,2007,28(2):117-121.

[15] MANEL N,UNUTMAZ D,LITTMAN D R. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma[J]. Nat Immunol,2008,9(6):641-649.

(收稿日期:2018-02-10 修回日期:2018-04-18)

(上接第 2351 页)

[2] MAO S G,HUANG S M. Association of AGT M235T gene polymorphism with HSP/HSPN risk[J]. Ren Fail,2015,37(1):16-21.

[3] 陈旭光. 成人过敏性紫癜的诊治研究进展[J]. 西部医学,2016,18(12):1773-1776.

[4] 丁一,张艺杰,苗青. 儿童过敏性紫癜 256 例临床分析[J]. 中国麻风皮肤病杂志,2016,21(6):348-350.

[5] 王茂生,王海南,范华. 过敏性紫癜的辨治经验[J]. 中国中医急症,2016,20(2):370-372.

[6] 史梅,史伟峰,谭保真. 91 例过敏性紫癜患儿血清特异性 IgE 和总 IgE 检测[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(11):1304-1305.

[7] 宋丽,郭彦敏,李书考. 儿童过敏性紫癜的临床护理[J]. 河北医药,2015,37(15):2397-2398.

[8] CASOLA C,SCHIWEK J E,REINEHR S A,et al. S100 alone has the same destructive effect on retinal ganglion cells as in combination with HSP 27 in an autoimmune glaucoma model[J]. J Mole Neur,2015,56(1):228-236.

[9] KERO D,GOVORKO D K,MIKIC I M,et al. Analysis of expression patterns of IGF-1, caspase-3 and HSP-70 in developing human tooth germs[J]. Arch Oral Bio,2015,60(10):1533-1544.

[10] 康天,孙伟力,王丹,等. 石家庄市儿童过敏性紫癜的流行病学分析[J]. 河北医药,2017,35(21):3325-3328.

[11] 王学红,朱永梅,高来强,等. 过敏性紫癜相关检测指标研究进展[J]. 中国麻风皮肤病杂志,2015,21(11):666-669.

[12] 卢井发,尤聪,黄雪娇,等. 过敏性紫癜并发肠套叠 2 例分析[J]. 中国医药导报,2016,34(26):120-123.

[13] 杜川,李强,董璇. 儿童过敏性紫癜早期肾损伤的危险因素分析[J]. 国际检验医学杂志,2017,23(15):2057-2059.

[14] 谢志玉,邱光钰. 肠粘膜屏障功能与儿童过敏性紫癜的相关性分析[J]. 中国实验诊断学,2015,16(8):1396-1397.

[15] 李作艳,王予川. 过敏性紫癜研究进展[J]. 中国医药,2015,10(5):764-768.

(收稿日期:2018-02-16 修回日期:2018-04-28)