

哮喘患者外周血单个核细胞 IL-23/Th-17 轴 及相关因子 mRNA 的表达与临床意义*

张杨¹ 梁涛¹ 许依婷¹ 王宁¹ 蔡鹏程¹ 王晓蓓¹ 王琳¹ 胡丽华¹

[摘要] **目的:**探讨哮喘患者外周血单个核细胞(PBMCs)中白细胞介素 23(IL-23)、白细胞介素 17(IL-17)、肿瘤坏死因子 α (TNF α)、转化生长因子 β (TGF β)、Foxp3(Foxp3) 基因 mRNA 的表达及其临床意义。**方法:**以实时定量逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)分别检测 68 例急性发作期哮喘患者及 60 例健康体检者 PBMCs 中 IL-23、IL-17、TNF α 、TGF β 、Foxp3 基因 mRNA 的表达情况,并进一步分析其内在关联性。**结果:**与对照组相比,哮喘急性发作期患者 PBMCs 中的 IL-23 和 TNF α mRNA 表达水平显著增高($P<0.05$),TGF β mRNA 表达水平显著下降($P<0.05$);而 IL-17、Foxp3 mRNA 表达水平差异无统计学意义($P>0.05$);TNF α 表达水平分别与 IL-17、IL-23 呈正相关性,而 Foxp3 与 TGF β 呈正相关性;IL-23 mRNA 水平与哮喘患者病程、疾病严重程度和疾病控制程度存在一定关联性。**结论:**IL-23/Th-17 轴在哮喘炎症反应过程中可能发挥潜在的重要作用,IL-23 与哮喘的严重程度密切相关,有望作为其治疗监测、预后转归的潜在生物评价指标。

[关键词] 哮喘;白细胞介素 23;白细胞介素 17;肿瘤坏死因子 α ;转化生长因子 β

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2016.04.001

[中图分类号] R256.12 **[文献标志码]** A

Expression of IL-23/Th-17 axis and other association genes in peripheral blood mononuclear cells from asthma patients

ZHANG Yang LIANG Tao XU Yiting WANG Ning

CAI Pengcheng WANG Xiaobei WANG Lin HU Lihua

(Department of Clinical Laboratory, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430022, China)

Corresponding author: WANG Lin, E-mail:katelinwang@126.com; HU Lihua, E-mail: lihuahu@hust.edu.cn

Abstract Objective: To investigate the levels of the mRNA expression of IL-23, IL-17, TNF α , TGF β and Foxp3 gene in peripheral blood monocytes (PBMCs) of asthma patients and their clinical significance. **Method:** The mRNA expression of IL-23, IL-17, TNF α , TGF β and Foxp3 in PBMCs of 68 asthma patients and 60 healthy controls were detected using fluorescence quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction, and the correlation between them were analyzed. **Result:** Compared to the normal group, the mRNA expression of IL-23 and TNF α in PBMCs of asthma patients was significantly increased ($P<0.05$), and TGF β was significantly decreased ($P<0.05$), while the expression of IL17 and Foxp3 had no significance between the patients group and the normal group ($P>0.05$). The mRNA expression of TNF α was positively correlated to IL-17 and IL-23, so as TGF β to Foxp3. In addition, the expression level of IL-23 mRNA was correlated to the duration of disease, disease severity and disease control in asthma patients. **Conclusion:** IL-23/Th-17 axis might play an important role in asthma inflammation, and IL-23 may be closely related to the severity of asthma, which is expected as one biomark of its evaluation and treatment.

Key words asthma; IL-23; IL-17; TNF α ; TGF β

哮喘是一种由中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、T 淋巴细胞、肥大细胞等炎症细胞参与的气道慢性炎症疾病。尽管哮喘的确切发病机制目前仍未知,但

多数学者认为是与遗传相关的变态反应性疾病,其发生与气道黏膜局部的免疫细胞及其分泌的细胞因子密切相关。Th-17 细胞是一种能产生 IL-17A、IL-17F 和 IL-22 等细胞因子的 Th 细胞新亚群,可参与机体防御、免疫调节、自身免疫性疾病以及其他慢性炎症反应^[1]。在 Th-17 细胞介导的免疫疾病和慢性炎症反应中,IL-23 对维持 Th-17 细胞稳定和促进 Th-17 细胞增殖有重要作用,直接或间接

* 基金项目:武汉市科技攻关计划项目(No: 2013060602010235)

¹华中科技大学同济医学院附属协和医院检验科(武汉, 430022)
通信作者:王琳, E-mail:katelinwang@126.com; 胡丽华, E-mail:lihuahu@hust.edu.cn

影响 IL-23/Th-17 轴,进而介导炎症反应^[2]。

鉴于 IL-23/Th-17 轴在炎症性疾病及自身免疫性疾病中的重要作用,我们探讨了哮喘患者体内影响该通路的相关基因 mRNA 的表达,以期为进一步深入研究其信号转导调控机制奠定前期基础,故检测了 68 例急性发作期哮喘患者外周血单个核细胞(PBMCs)中 IL-23、IL-17、TNF α 、TGF β 、Foxp3 mRNA 表达水平,并分析其表达差异及与哮喘临床特征的关联性。

1 资料与方法

1.1 资料

于 2014-07—2015-04 收集我院呼吸科门诊就诊的哮喘急性发作期患者 105 例血样,采集前所有患者均参与《哮喘问卷调查表》的信息告知及知情签字。结合检查结果剔除合并肺部感染 15 例,慢性阻塞性肺气肿患者 10 例,哮喘合并其他全身性疾病或免疫性疾病 12 例,最终入选患者 68 例,其中男 31 例,女 37 例;平均年龄 42 岁(范围 9~74 岁)。诊断标准依据 2008 年中华医学会呼吸病学分会哮喘学组修订的《支气管哮喘防治指南》^[3]。筛选健康体检者 60 例作为对照组,其中男、女各 30 例;平均年龄 40 岁(范围 21~58 岁),排除血常规、肝功能、肾功能检查异常者。2 组间年龄与性别差异均无统计学意义($t=0.61$, $P=0.54$; $\chi^2=0.25$, $P=0.62$)。

1.2 仪器与试剂

人 Ficoll 淋巴细胞分离液购自中国科学院天津试剂厂; Trizol 购自 invitrogen 公司; Primer-Script RT Master Mix 及 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 购自 TaKaRa 公司; Stratagene Mx3000P 荧光定量 PCR 仪。

1.3 方法

1.3.1 样本的采集与 PBMCs 提取 所有研究对象均抽取空腹静脉血, EDTA 抗凝。以 Ficoll 淋巴细胞分离液按试剂操作说明书提取人 PBMCs。立即用于提取总 RNA。

1.3.2 RNA 提取及逆转录反应 以 Trizol 试剂、异硫氰酸胍/酚/氯仿法提取 PBMCs 总 RNA, 使用 NanoDrop 仪器检测提取 RNA 的浓度, 吸光度比值 A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0。按照 Takara Prime-Script[™] RT Master Mix (Perfect Real Time) 试剂盒进行 RNA 的逆转录, 获得 cDNA。

1.3.3 目的基因的实时定量检测 采用 SYBE GREEN 实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应 RT-PCR 检测 IL-23、IL-17、TNF α 、TGF β 、Foxp3 基因 mRNA 表达。实时定量引物由武汉擎科创新生物科技有限公司合成。RT-PCR 扩增反应总体系 20 μ l, 含 10 μ l SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (2 $\times$),

0.8 μ l 引物 (10 pmol/ μ l), 0.4 μ l ROX Reference Dye II (50 $\times$), 2 μ l DNA 模板, 6 μ l 灭菌蒸馏水。扩增条件: 95 $^{\circ}$ C, 10 min 变性, 然后 95 $^{\circ}$ C, 15 s, 60 $^{\circ}$ C, 30 s 重复 40 个循环进行扩增。每次扩增均设阴性对照, 阴性对照中加入蒸馏水代替模板, 每个样本的每个基因设立 2 个复孔, 所有扩增产物熔解曲线为特异性单峰, 获取 2 孔 Ct 值后取平均值, 计算 $\Delta Ct = Ct$ 目的基因 - Ct 内参基因, 采用比较 $2^{-\Delta Ct}$ 法进行相对定量。

1.4 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件进行分析。非正态分布数据以中位数表示, 2 组间 PCR 相对定量值之间用 Mann-Whitney U 非参数检验, 多组间差异选用 Kruskal-Wallis 非参数检验。TNF α 与 IL-17、IL-23 分别进行相关性分析, Foxp3 与 TGF β 分别进行相关性分析, 均用非参数 Spearman 等级相关检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组 IL-23、IL-17、TNF α 、TGF β 、Foxp3 mRNA 水平的比较

与对照组相比, 急性发作期哮喘患者 PBMCs 中的 IL-23 和 TNF α mRNA 表达水平均显著增高 ($P<0.01$); TGF β 表达水平显著下降 ($P<0.05$); 而 IL-17、Foxp3 表达水平在 2 组差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见图 1。

2.2 TNF α 与 IL-17、IL-23, Foxp3 与 TGF β 的相关性分析

TNF α mRNA 表达水平与 IL-17、IL-23 均呈正相关性, 其相关系数分别为 $r=0.396$, $P=0.01$; $r=0.695$, $P<0.01$ 。而 Foxp3 与 TGF β 也呈正相关性, 其相关系数 $r=0.570$, $P<0.01$ 。

2.3 IL-23 mRNA 表达水平与哮喘患者临床特征的关系

鉴于 IL-23 在哮喘患者组与健康对照组间差异最显著, 我们进一步探讨其 mRNA 水平与哮喘患者患病时间、吸烟史、疾病严重程度及疾病控制程度等 4 个方面的关联性。根据哮喘患者病程时间长短, 分 10 年以内组和 10 年以上组; 根据吸烟史分为吸烟组和不吸烟组; 根据疾病严重程度分为轻度、中度、重度组; 根据疾病控制程度分为完全控制、部分控制和未控制组。研究结果显示 IL-23 的表达水平与哮喘患者患病时间 ($P=0.011$)、疾病严重程度 ($P<0.01$)、疾病控制程度 ($P<0.01$) 均有显著相关性, 而与是否有吸烟差异无统计学意义 ($P=0.114$)。此外, 研究结果显示, IL-23 mRNA 水平越高, 则哮喘患者的患病时间越长, 疾病严重程度越重, 疾病控制程度也越差。见图 2。

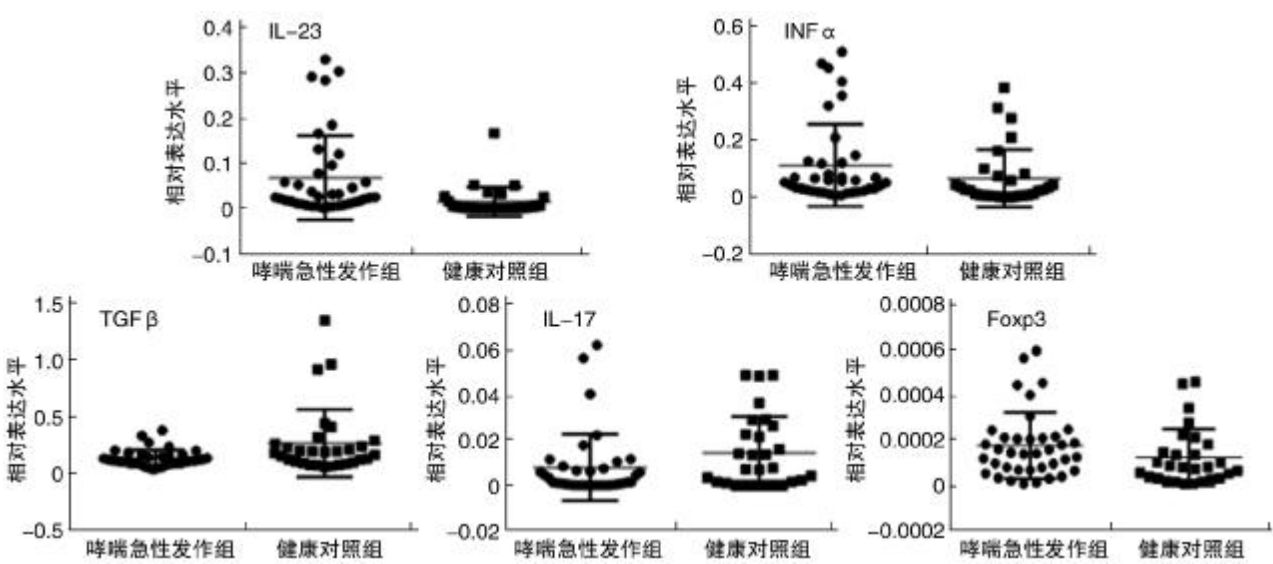


图 1 IL-23、IL-17、TNFα、TGFβ、Foxp3 mRNA 水平在 2 组间的差异

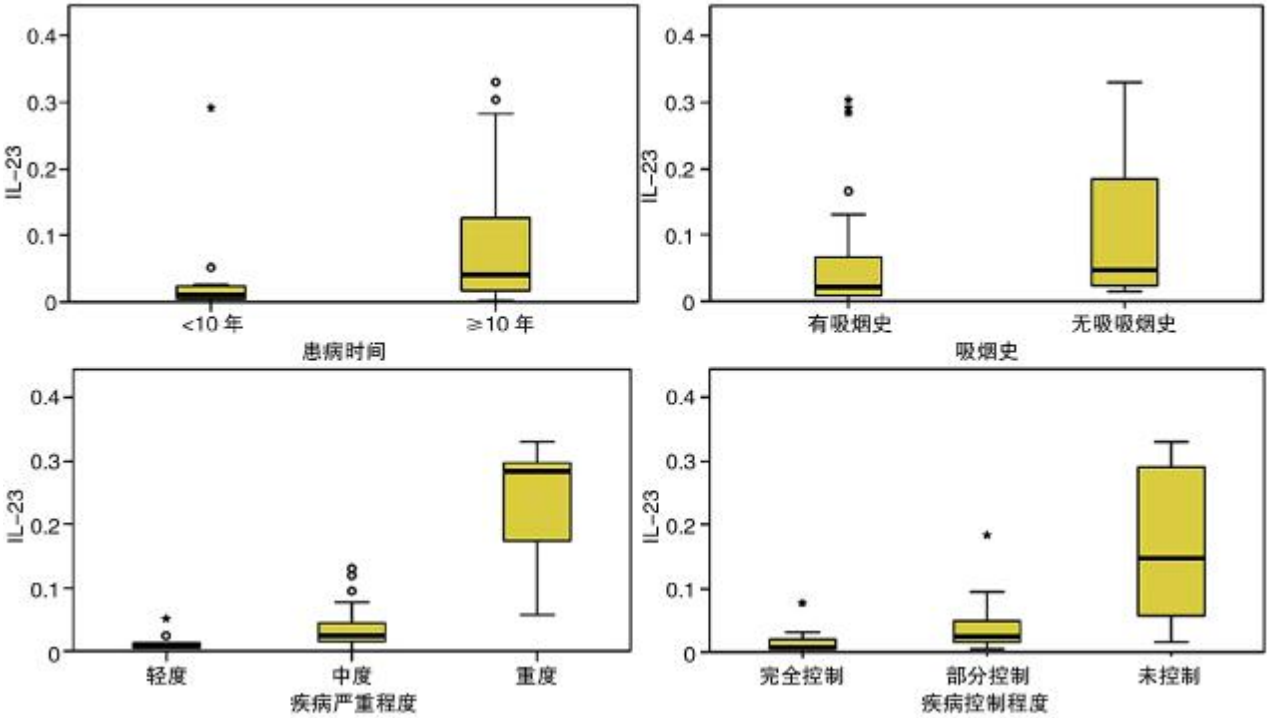


图 2 IL-23 mRNA 表达水平与哮喘患者临床特征的关系

3 讨论

IL-23 是由 p19 和 p40 亚基组成的 IL-12 家族一员,由树突状细胞和巨噬细胞活化后可产生。国外研究显示,哮喘患者血清中 IL-23 水平升高,与肺功能改变、激素治疗效果明显相关^[4]。关于 IL-23 是否可以作为评价哮喘病情监测的生物学标志物,目前正在展开深入研究。越来越多的研究发现,可以通过调控 IL-23 的表达来影响哮喘的发生发展,如发夹 RNA 可以通过抑制 IL-23 的转录而抑制哮喘发生;消退素 E1 也是通过促进 IL-23 的产生及增强其活性,从而增进哮喘的治疗效果^[5]。IL-17 由活化 Th17 细胞产生,可刺激成纤维细胞、

内皮细胞、巨噬细胞等产生多种炎症因子,如 IL-6、IL-1、TNFα 等。IL-17 是变应性哮喘发作所必需的细胞因子,研究证实在患者外周血和肺组织中,IL-17 的 mRNA 表达水平均上升并与哮喘的严重程度呈正比^[6]。最近有研究者还观察到在 IL-17 缺陷的小鼠中,IL-23 同样可以增强 Th2 细胞分泌细胞因子,促进嗜酸性粒细胞的聚集,表明 IL-23 和 Th-17 均能介导炎症反应,参与了哮喘进展的核心环节^[7]。众多研究表明 IL-23/Th-17 轴在哮喘发病过程中的潜在价值。本研究显示,急性发作期哮喘患者外周血 PBMCs 中 IL-23 mRNA 表达水平显著高于健康人群,进一步表明其可能参与哮喘

的致病过程。IL-23 的水平与哮喘患者的临床特征紧密相关,其表达水平越高,患者的患病时间越长,哮喘发作严重程度也越重,哮喘控制的效果也越差,这进一步暗示 IL-23 与哮喘的发生、治疗监测、预后转归密切相关,其有望作为哮喘病情监测、治疗转归中的一个有效生物学标志物。此外,本研究并未发现 IL-17 mRNA 表达水平在哮喘组与对照组中存在差异有统计学意义,这与 Song 等^[8]的研究相一致,该研究认为在哮喘疾病中,IL-17 并非来自 Th-17 细胞,而主要产生于巨噬细胞,而国内多数研究倾向认为哮喘患者体内 IL-17 处于较高表达水平,这暗示 IL-17 的分泌可能受到多种因素的调节。针对 IL-17 在哮喘中的作用仍需进一步从多角度、多层次进行研究。

TNF α 是一种由单核/巨噬细胞分泌在免疫系统中均发挥重要作用的多效应细胞因子。在哮喘患者中 TNF α 维持在较高的水平,动物实验表明:静脉注射或吸入 TNF α 可引发气道对组胺和乙酰胆碱的反应性增高,具有诱发哮喘的作用^[9]。TGF β 作为 Th-17 细胞的启动因子,也是 IL-23 调控 Th-17 细胞过程中不可缺少的一个重要环节。此外,TGF β 作为一种促纤维化生长因子,能促进成纤维细胞增殖并产生大量细胞外基质,该过程在哮喘呼吸道重构的形成中扮演重要角色。Foxp3 的稳定、持续表达是影响 Tregs 细胞发挥免疫抑制功能至关重要的因素,而 Treg 与 Th-17 细胞互为拮抗作用。在儿童哮喘及中重度哮喘患者体内,其 PBMCs 中的 Foxp3 mRNA 表达水平要显著低于正常儿童和轻度组^[10-11]。在本研究中,以上 3 种炎症因子都直接或间接参与了 IL-23/Th-17 轴对哮喘的调节。本研究结果显示,在急性期哮喘患者体内,其 PBMCs 中 TNF α mRNA 表达水平要显著性高于正常健康组,而 TGF β 表达水平显著性低于正常对照,这与国内部分研究者结果相一致。进一步相关分析发现,TNF α 与 IL-17、IL-23 呈正相关,TGF β 和 Foxp3 呈正相关。TGF β 可能通过激活 STAT3 途径,影响 Foxp3 的表达,调节 Th-17 细胞的分化;低表达的 TGF β 也可直接促进 Th-17 细胞的分化,分泌 IL-17^[12]。在本研究中,未发现 Foxp3 存在显著性差异,而 Karagiannidis 等^[13]发现,中度哮喘患者在未接受糖皮质激素(GCs)治疗时 Foxp3 表达与健康人群无差异,在 GCs 治疗后 FOXP3 表达和 Tregs 数量增加,这暗示 Foxp3 水平变化可能与患者的用药情况也存在相关性。

综上所述,IL-23 通过 IL-23/Th-17 轴在哮喘的发生发展过程中可能发挥潜在的作用,而 TNF α 、TGF β 、Foxp3 直接或间接地参与了这一过程。同时,IL-23 与哮喘患者的患病时间、严重程度、病情控制效果存在一定相关性,有望成为哮喘病情监测、预后转归的潜在生物标志物。因本研究仅从 mRNA 水平上初步探讨了以上基因在急性发

作期哮喘患者 PBMCs 中的表达,这为我们进一步研究 IL-23/Th-17 轴在哮喘中信号转导机制奠定部分前期基础,在后续的研究中,我们将继续增加样本量,从不同水平、不同角度进一步探讨 IL-23/Th-17 轴在哮喘中的作用,以期为哮喘的研究提供新的理论基础或治疗靶点。

参考文献

- [1] Vazquez-Tello A, Halwani R, Hamid Q, et al. Glucocorticoid receptor-beta up-regulation and steroid resistance induction by IL-17 and IL-23 cytokine stimulation in peripheral mononuclear cells[J]. J Clin Immunol, 2013, 33: 466-478.
- [2] Nakajima H, Hirose K. Role of IL-23 and Th17 Cells in Airway Inflammation in Asthma [J]. Immune Netw, 2010, 10: 1-4.
- [3] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南(支气管哮喘的定义、诊断、治疗和管理方案)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2008, 31(3): 177-185.
- [4] Ciprandi G, Cuppari C, Salpietro A, et al. Serum IL-23 in asthmatic children[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2012, 26: S53-S61.
- [5] Li Y, Sun M, Cheng H, et al. Silencing IL-23 expression by a small hairpin RNA protects against asthma in mice[J]. Exp Mol Med, 2011, 43: 197-204.
- [6] Alyasin S, Karimi MH, Amin R, et al. Interleukin-17 gene expression and serum levels in children with severe asthma[J]. Iran J Immunol, 2013, 10: 177-185.
- [7] Wakashin H, Hirose K, Maezawa Y, et al. IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2008, 178: 1023-1032.
- [8] Song C, Luo L, Lei Z, et al. IL-17-producing alveolar macrophages mediate allergic lung inflammation related to asthma[J]. J Immunol, 2008, 181: 6117-6124.
- [9] Golikova EA, Lopatnikova JA, Kovalevskaya-Kucheryavenko TV, et al. Levels of TNF, TNF autoantibodies and soluble TNF receptors in patients with bronchial asthma[J]. J Asthma, 2013, 50: 705-711.
- [10] Agarwal A, Singh M, Chatterjee BP, et al. Interplay of T helper 17 cells with CD4⁺ CD25^{high} FOXP3⁺ Tregs in regulation of allergic asthma in pediatric Patients[J]. Int J Pediatr, 2014, 2014: 636238.
- [11] 潘珍珍, 李羚, 郭赞, 等. CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 调节性 T 细胞与 IL-33 在儿童哮喘发病机制中的作用[J]. 中国当代儿科杂志, 2014, 16(12): 1211-1214.
- [12] Shi LZ, Wang R, Huang G, et al. HIF1alpha-dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells[J]. J Exp Med, 2011, 208: 1367-1376.
- [13] Karagiannidis C, Akdis M, Holopainen P, et al. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2004, 114: 1425-1433.

(收稿日期: 2015-09-16)