

鼻息肉患者外周血 Th17 细胞的表达及意义

王 悦, 马永明, 濮晓萍

(江苏大学附属人民医院耳鼻咽喉科, 江苏 镇江 212002)

【摘要】 目的 检测鼻息肉患者外周血中 Th17 细胞的表达水平, 初步探讨其与鼻息肉形成的关系。方法 收集 46 例慢性鼻窦炎伴鼻息肉患者的外周血作为鼻息肉组, 另收 22 例单纯鼻出血或者鼻中隔偏曲患者外周血作为对照组。采用流式细胞术检测两组患者的外周血中的 Th17 细胞的表达水平。结果 鼻息肉组外周血中 Th17 细胞的表达水平为 $(4.03 \pm 0.69)\%$, 明显高于对照组的 $(1.35 \pm 0.26)\%$, 差异有显著统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 鼻息肉的发生发展可能与高水平表达 Th17 细胞存在一定关系, 具体发病机制有待进一步研究。

【关键词】 鼻息肉; Th17 细胞; 发病机制

【中图分类号】 R765.25 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003—6350(2015)15—2231—03

Expression and significance of Th17 cells in patients with nasal polyps. WANG Yue, MA Yong-ming, PU Xiao-ping. Department of Otolaryngology, the Affiliated People's Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212002, Jiangsu, CHINA

【Abstract】 Objective To detect the expression of Th17 cells in peripheral blood in nasal polyps, and to explore the role of Th17 cells in pathogenesis of nasal polyposis. **Methods** The peripheral blood samples were collected from 46 patients of chronic sinusitis with nasal polyp (CRSwNP, the study group) and 22 patients with simple nasal bleeding or nasal septum deviation (the control group). Flow cytometry was used to detect the expression levels of Th17 cells in peripheral blood in the two groups. **Results** The levels of Th17 cells in the study group was $(4.03\% \pm 0.69\%)$, significantly higher than $(1.35\% \pm 0.26\%)$ in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The pathogenesis of CRSwNP may be involved in the increased expression of Th17 cells, and the detailed mechanisms should be further studied.

【Key words】 Nasal polyps; Th17 cells; Pathogenesis

鼻息肉(Nasal polyps, NP)是一种各种原因导致的鼻腔和鼻窦黏膜慢性炎症性疾病,成人发病率达 1%~4.5%^[1]。临床以持续性鼻塞伴头痛为主要就诊原因,目前治疗以类固醇激素喷鼻及鼻内镜手术为主,该病术后复发率较高,发病机制不明确,近年来,各类炎性细胞及其释放的炎症介质与细胞因子成为很多疾病研究的热点。本实验小组此前应用免疫组织化学方法对鼻息肉局部组织中 IL-17 进行了检测^[2],发现局部鼻息肉组织中 IL-17 高水平浸润,推测到鼻息肉患者外周血中以分泌 IL-17 为主的 Th17 细胞可能高水平表达。

本研究采用流式细胞术检测鼻息肉患者外周血中 Th17 细胞的表达情况,进一步探讨它对鼻息肉发生发展的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 所有组织标本来自 2013 年 10

月至 2014 年 5 月在本科住院患者。选取慢性鼻窦炎伴鼻息肉患者 46 例(鼻息肉组),其中男性 28 例,女性 18 例;以单纯鼻出血或鼻中隔偏曲患者 22 例作为对照组,其中男性 14 例,女性 8 例。所有患者取外周静脉血 2 ml,收于乙二胺四乙酸二钾真空采血管,随后 3 h 内提取单个核细胞。所有患者术前 1 个月内未使用皮质类固醇激素(包括全身和局部)、非类固醇抗炎药物、组胺药物或者大环内酯类抗生素治疗。患者均无全身疾病、变应性鼻炎、支气管哮喘或者阿司匹林过敏史。鼻息肉组患者术后病理回报均为鼻息肉;对照组患者均排除鼻-鼻窦炎病史,鼻窦 CT 检查无鼻窦病变。本研究经过医院伦理委员会审查通过,所有患者均签署知情同意书。

1.2 仪器和试剂 人淋巴细胞分离液(FICOLL)选自天津 TBD 生物技术发展中心。单抗隆抗体(包括 PE-抗人 IL-17A, PE-Cyanine5-抗人 CD3, FITC-抗

基金项目:镇江市社会发展项目资助(编号:SH2013053)

通讯作者:马永明。E-mail:maym121@163.com

人 CD₈)及相应同型抗体、Th17 细胞破膜液及洗涤液均购于美国 eBioscience 公司。刺激毒素 PMA, 离子霉素(Ionomycin), 莫能霉素(Monensin)购自 Enzo 公司。标准胎牛血清和 RPMI-1640 液选自维森特生物技术有限公司。0.01 mol/L 无菌磷酸盐缓冲液(PBS, PH7.2)自配后高压处理。流式细胞仪 FACS Canto 及 FACS Diva 软件为美国 BD 公司。

1.3 方法 第一步:提取单个核细胞:将外周血 2 000 r/min, 4℃, 离心 5 min, 去上层血清。用等体积无菌 PBS 稀释剩余血细胞, 将稀释的血细胞缓缓加到等体积的 ficoll 液面之上, 2 000 r/min, 24℃, 离心 15 min。取中间白膜层(单个核细胞层), 用 1 ml 无菌 PBS 洗涤 2 遍, 500 g/min, 4℃, 离心 5 min, 去上清。用 1 ml 10%胎牛血清 1640 稀释单个核细胞。取其中 10 μl, 用 PBS 再稀释 5 倍, 显微镜下鲍氏计数板细胞计数。第二步:流式细胞术:24 孔平底细胞培养板每孔约 2×10⁶ 个单个核细胞, 每孔分别加入 5 μl PMA (10 ng/μl), 1 μl 离子霉素(1 μg/μl), 4 μl 莫能霉素(0.5 μg/μl), 加 10%胎牛血清 1640 使总体积为 1 ml, 置于 37℃, 5%CO₂ 孵箱刺激 5 h。然后收集细胞于无菌 1.5 ml EP 管, 1 ml PBS 洗两遍, 500 g/min, 4℃, 离心 5 min。留 100 μl PBS 重悬, 加 PE-Cyanine5-抗人 CD₃ 2 μl, FITC-抗人 CD₈ 4 μl, 置混匀器, 4℃冰箱, 避光孵育 30 min。后离心去上清, 1 ml PBS 洗涤两遍, 500 g/min, 4℃, 离心 5 min。每管加 500 μl 破膜液破

膜, 置混匀器上, 4℃冰箱, 避光 30 min。离心去上清, 1 ml 洗涤液(原液用双蒸水按 1:9 比例稀释)洗两遍, 500 g/min, 4℃, 离心 5 min。留 40 μl 洗涤液, 加 PE-抗人 IL-17A 2 μl, 置混匀器, 4℃冰箱, 避光孵育 1 h。1 ml 洗涤液洗两遍, 500 g/min, 4℃, 离心 5 min, 去上清。250 μl PBS 重悬, 50 μl 多聚甲醛固定。所有标本均做同型对照。用 FACS Canto 检测 Th17 细胞的表达水平, 并用 FACS Diva 软件分析数据。由于既往研究证实 PMA 刺激会使 T 细胞膜 CD₄ 分子表达下降而影响检测^[1], 因此本实验以 CD₃⁺CD₈⁻IL-17A⁺代表 CD₃⁺CD₄⁺IL-17A⁺, 统计其在 CD₃⁺CD₈⁻T 细胞中的比率。

1.4 统计学方法 采用 SPSS16.0 统计分析软件对检测结果进行处理, 计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两独立样本之间比较应用 *t* 检验, 以 *P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

鼻息肉组与对照组患者外周血中 Th17 细胞表达水平见图 1。对两组数据进行 *t* 检验发现, 鼻息肉组患者外周血中 Th17 细胞的比率高, 达 4.73%, 见图 1a, 而对照组患者外周血中 Th17 细胞的比率较低, 仅 1.17%, 见图 1b。鼻息肉组患者外周血 Th17 细胞的比率达(4.03±0.69)%, 明显高于对照组的(1.35±0.26)%, 见图 1c。且两组间差异有统计学意义(*t*=6.25, *P*<0.05)。

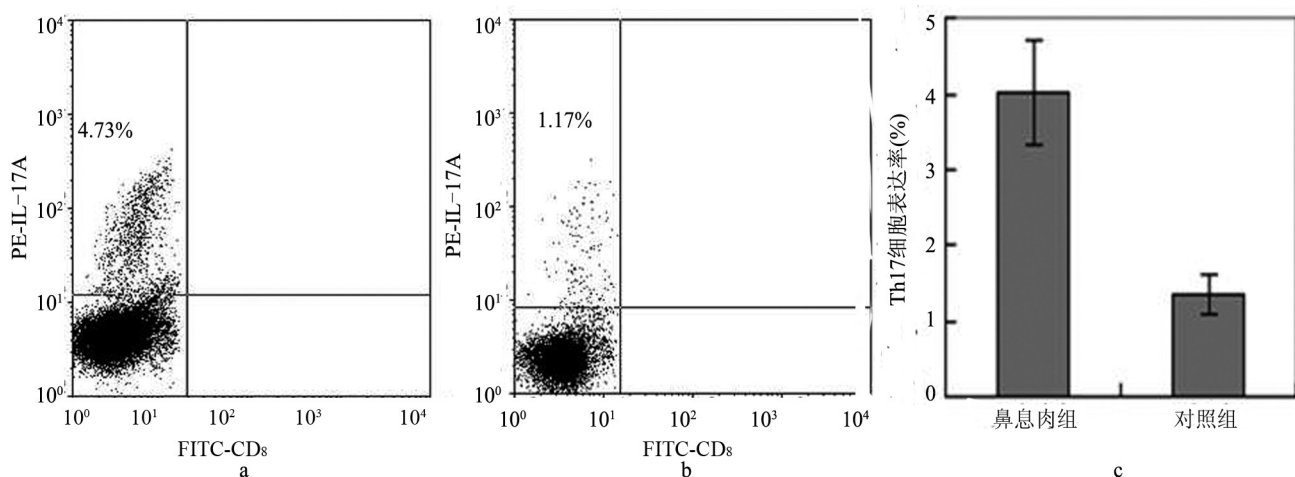


图1 外周血中 Th17 细胞表达水平

注:a:鼻息肉组;b:对照组;c:两组 Th17 细胞的表达水平。

3 讨论

本研究通过对鼻息肉患者外周血中 Th17 细胞的检测发现, Th17 细胞在鼻息肉患者外周血中表达较对照组患者显著增高, 且差异有统计学意义(*P*<0.05), 据此推断 Th17 细胞可能在鼻息肉的发病过程

中起着重要作用, 鼻息肉形成的具体过程自然与 Th17 细胞的功能密切相关。

Th17 细胞是一种不同于 Th1、Th2、Treg 细胞的新型 CD₄⁺T 淋巴细胞亚群, 是固有 T 淋巴细胞在细胞因子 TGF-β、IL-6、IL-1β 和 IL-23 刺激下分化而来,

其主要的效应分子为IL-17, IL-17家族有A~F六个成员^[4],其中IL-17(即IL-17A)与IL-17F生物学功能相似,二者通过与各种细胞表面的IL-17RA和IL-17RC结合,启动相应靶基因转录,促使各种炎症因子的分泌,从而使局部炎症组织中中性粒细胞、T细胞、DC等聚集,产生抗病原微生物作用,促进组织恢复正常^[5]。在气道炎症性疾病中,IL-17能够诱导气道上皮细胞、内皮细胞及成纤维细胞分泌IL-1 β 、IL-6及GM-CSF,从而使中性粒细胞浸润于病变部位,促使局部炎症的持续^[6]。

近年来,大量研究关注于Th17细胞或其分泌的主要效应分子IL-17与各种疾病发病机制之间的关联性,认为Th17细胞在各种炎症性疾病和自身免疫性疾病中都有较高水平表达,它的促炎作用是这些疾病发生的关键。在类风湿关节炎的发病过程中, Th17细胞正是通过诱导产生的多种细胞因子,使中性粒细胞,巨噬细胞及淋巴细胞聚集于滑膜,增强了局部炎症反应,使关节破坏加重^[7-8]。在系统性红斑狼疮(SLE)患者血清中IL-17显著增高,并且在狼疮性肾炎患者肾脏中检测到高水平IL-17和IL-23, IL-17能够促进B细胞的生存,并协同B细胞激活因子避免B细胞的凋亡,从而增加产生自身抗体的细胞的数目,这可能在SLE发病中占有重要作用^[9-10]。据目前的研究发现Th17细胞在炎症性肠病^[11], 克罗恩病^[12], 多发性硬化^[13]的发病中也都发挥着一定的作用。这使耳鼻喉科的研究者们也致力于探测Th17细胞的特异性细胞因子IL-17A在本学科疾病中的作用,试图通过影响Th17细胞的分化增殖去促使一些疾病的好转或减少疾病的复发。在2004及2005连续两年的研究中,王鑫等^[14-15]发现在鼻息肉组织中IL-17及其受体表达增多,认为IL-17是导致鼻息肉发生的重要细胞因子。这为我们研究Th17细胞与鼻息肉提供了一定的基础,由于Th17细胞分泌的炎症因子较多,我们实验组通过流式细胞术直接对这种炎症性细胞进行检测,结果表明慢性鼻窦炎伴鼻息肉患者外周血中Th17细胞较对照组有明显增高,差异有统计学意义,认为Th17细胞分泌的促炎细胞因子通过外周循环到达鼻腔黏膜,与相应受体结合,诱发中性粒细胞和单个核细胞聚集,长期炎症刺激导致鼻黏膜

破坏、重塑,最终形成严重的息肉病变。

本研究仅简单地对鼻息肉患者外周血中Th17细胞表达率进行了检测,而关于其在鼻息肉形成过程中的具体作用环节还尚未明确,对此进一步的研究将为我们治疗鼻息肉及防止其复发具有重要的临床意义。

参考文献

- [1] Rajguru R. Nasal polyposis: current trends [J]. Indian J Otolaryngol Head Neck Surg, 2014, 66(Suppl 1): 16-21.
- [2] 濮小萍, 马永明, 朱伟, 等. 鼻息肉组织中IL-9和IL-17及Foxp3的表达及意义[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2014, 28(8): 513-515.
- [3] 毛建华, 陈志敏, 汤永民, 等. 佛波酯对外周血淋巴细胞CD3和CD4及CD8分子表达的作用[J]. 浙江大学学报(医学版), 2003, 32(6): 155-159.
- [4] Chen Z, O'Shea JJ. Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells [J]. Immunol Res, 2008, 41(2): 87-102.
- [5] Fouser LA, Wright JF, Dunussi-Joannopoulos K, et al. Th17 cytokines and their emerging roles in inflammation and autoimmunity [J]. Immunol Bey, 2008, 226: 87-102.
- [6] Alcorn JF, Crowe CR, Kolls JK. Th17 cells in asthma and COPD [J]. Annu Rev Physiol, 2010, 72: 495-516.
- [7] Azizi G, Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. Th17 Cells in immunopathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis [J]. Int J Rheum Dis, 2013, 16(3): 243-253.
- [8] Truchetet ME, Mossalayi MD, Boniface K. IL-17 in the rheumatologist's line of sight [J]. Biomed Res Int, 2013, 2013: 295132.
- [9] Perry D, Peck AB, Carcamo WC, et al. The current concept of Th17 cells and their expanding role in systemic lupus erythematosus [J]. Arthritis, 2011, 2011: 810649.
- [10] Zhao L, Jiang Z, Jiang Y, et al. IL-22+CD4⁺ T-cells in patients with active systemic lupus erythematosus [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2013, 238: 193-199.
- [11] Dige A, Støy S, Rasmussen TK, et al. Increased levels of circulating Th17 cells in quiescent versus active Crohn's disease [J]. J Crohns Colitis, 2013, 7: 248-255.
- [12] Siakavellas SI, Bamias G. Role of the IL-23/IL-17 axis in Crohn's disease [J]. Discov Med, 2012, 14: 253-262.
- [13] Zepp J, Wu L, Li X. IL-17 receptor signaling and T helper 17-mediated autoimmune demyelinating disease [J]. Trends Immunol, 2011, 32: 232-239.
- [14] 王鑫, 董震. 鼻息肉组织免疫相关基因的表达谱[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 2004, 12(39): 721-723.
- [15] 王鑫, 董震. 白细胞介素-17及其受体在鼻息肉组织中的表达及意义[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2005, 12(40): 899-902.

(收稿日期:2014-12-23)