

急性脑出血患者外周血 Th17 细胞变化及其临床意义

张立堂 庞敏 杨筱君

【摘要】 探讨脑出血急性期外周血辅助 T 细胞 17(Th17)表达变化及其临床意义。分别采用流式细胞术、实时定量逆转录-聚合酶链反应和酶联免疫吸附试验检测急性脑出血患者外周血 Th17 细胞比例及核转录因子维 A 酸相关孤儿受体 γ t(ROR γ t)mRNA 和 IL-17 表达水平。结果显示,脑出血后 Th17 细胞比例及 ROR γ t mRNA 和 IL-17 表达水平持续升高,并于脑出血后 24 h 及第 3 和 7 天显著高于正常值范围(均 $P=0.000$);至脑出血后第 14 天时 Th17 细胞比例和 ROR γ t mRNA 表达水平降至正常水平(均 $P>0.05$),而外周血 IL-17 表达水平仍高于正常值范围且差异有统计学意义($P=0.000$)。提示脑出血急性期外周血 Th17 细胞比例及 IL-17 表达水平升高可能参与了急性脑出血的病理进程。

【关键词】 脑出血; T 淋巴细胞,辅助诱导; 白细胞介素 17; RNA,信使

Changes and clinical significances of Th17 cells in the peripheral blood of patients with acute cerebral hemorrhage

ZHANG Li-tang, PANG Min, YANG Xiao-jun

Department of Neurology, Central Hospital of Zaozhuang Coal Mining Group,

Zaozhuang 277011, Shandong, China

Corresponding author: ZHANG Li-tang (Email: zhilitang@126.com)

【Abstract】 This study aims to explore the changes and clinical significances of T helper 17 (Th17) cells in the peripheral blood of patients with acute cerebral hemorrhage. The percentage of Th17 cells were assessed by flow cytometry. The mRNA levels of retinoid-related orphan receptor γ t (ROR γ t) were detected by real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). The serum levels of interleukin-17 (IL-17) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). According to the examination results, the percentage of Th17 cells, the mRNA expression of ROR γ t and the serum levels of IL-17 at 24 h, 3 d and 7 d increased significantly in patients with acute cerebral hemorrhage than in normal controls ($P=0.000$, for all). Although the patients with acute cerebral hemorrhage had no significant differences in the percentage of Th17 cells, the mRNA expression of ROR γ t comparable with normal controls ($P=0.058, 0.239$), the serum levels of IL-17 in patients were statistically higher than those in normal controls at 14 d ($P=0.000$). The percentage of Th17 cells and the serum levels of IL-17 increase in the peripheral blood of patients with acute cerebral hemorrhage, suggesting Th17 cells may participate in the occurrence and development of cerebral hemorrhage.

【Key words】 Cerebral hemorrhage; T-lymphocytes, helper-inducer; Interleukin-17; RNA, messenger

脑出血是临床病死率和病残率极高的中枢神经系统危重症之一,严重危及患者生命并影响生活质量,目前研究认为,脑出血后继发的炎症反应在继发性脑损伤中发挥重要作用^[1]。辅助 T 细胞 17(Th17)为新近发现的一类 CD4⁺ T 细胞亚群,其主要

效应分子 IL-17 为促炎性因子,因此推测 Th17 细胞可能参与了炎症反应、自身免疫性疾病、移植反应、过敏反应和肿瘤等的发病或促进病情进展^[2-4],而且 IL-17 在脑组织缺血-再灌注损伤过程中亦起重要作用^[5-7]。有关 Th17 细胞在脑出血发病机制中的研究尚处于初期阶段,本研究拟通过检测急性脑出血患者发病后不同时间点外周血 Th17 细胞、核转录因子维 A 酸相关孤儿受体 γ t(ROR γ t)mRNA 和 IL-17 表达

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2013.07.013

作者单位:277011 山东省枣庄矿业集团中心医院神经内科

通讯作者:张立堂(Email:zhilitang@126.com)

变化,初步探讨 Th17 细胞和 IL-17 在急性脑出血病程中的变化及其临床意义。

对象与方法

一、研究对象

1. 急性脑出血组(脑出血组) 选择山东省枣庄矿业集团中心医院神经内科 2012 年 1-8 月住院治疗的急性脑出血患者 55 例,男性 30 例,女性 25 例;年龄 42~75 岁,平均(57.28±10.83)岁。入院时均符合第四届全国脑血管病会议修订的诊断标准^[8],并经头部 CT 检查证实,为首次发病且于 6 h 内入院。经病史询问及临床检查排除以下疾病:(1)发病前 1 周内罹患感染性疾病、接受外科手术治疗或服用抗生素。(2)合并肝肾疾病、肿瘤、血液系统疾病、慢性肺疾病、内分泌系统疾病及自身免疫性疾病。(3)住院期间合并感染。

2. 正常对照组(对照组) 选择同期在我院体检中心进行体格检查的健康志愿者 40 例,男性 25 例,女性 15 例;年龄 40~73 岁,平均(54.32±9.16)岁。均排除心脑血管疾病、糖尿病、肿瘤、内分泌系统疾病及自身免疫性疾病,近 4 周内无感染、外科手术及服用抗生素史。

两组受试者性别($\chi^2 = 0.601, P = 0.438$)和年龄($t = 1.402, P = 0.164$)比较,差异无统计学意义,均无可比。本研究得到我院伦理委员会批准及所有受试者知情同意。

二、研究方法

1. 试剂与仪器 佛波酯(PMA)、离子霉素及 BD GolgiPlug™ 蛋白转运抑制剂购自美国 eBioscience 公司。TRIzol 液由美国 Invitrogen 公司提供。逆转录试剂盒为立陶宛 Fermentas 公司产品。SYBR® Premix Ex Taq™ II 反应体系购自大连宝生物工程有限公司。IL-17 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自美国 R & D 公司。免疫试剂中抗体为异硫氰酸荧光素(FITC)标记的小鼠抗人 CD4 单克隆抗体和 Alexa Fluor® 647 标记的小鼠抗人 IL-17 单克隆抗体,均购自美国 eBioscience 公司。FACS Calibur 型流式细胞仪由美国 Beckman Coulter 公司提供。聚合酶链反应(PCR)仪为美国 Bio-Rad 公司产品。酶联免疫检测仪购自美国 Bio-Tek 公司。

2. 流式细胞术检测外周血 Th17 细胞变化 脑出血组患者于发病后 6、24 h 和第 3、7、14 天,对照组

受试者于入组时晨起空腹抽取肘静脉血 3 ml,分离外周血单个核细胞,调整细胞密度至 $1 \times 10^6/\text{ml}$,取 100 μl 单细胞悬液,加入佛波酯(50 ng/ml)、离子霉素(500 ng/ml)以及 BD GolgiPlug™ 蛋白转运抑制剂(1 $\mu\text{l}/\text{ml}$),37 °C、体积分数为 5% 二氧化碳条件下孵育 4 h,加入异硫氰酸荧光素标记的小鼠抗人 CD4 单克隆抗体,常温下避光孵育 20 min;洗涤、弃上清液,加入 2 ml 4 °C 1× 固定液,4 °C 避光孵育 30 min;洗涤、弃上清,加入 2 ml 37 °C 1× 破膜液,37 °C 避光孵育 30 min;洗涤、弃上清液,加入 20 μl Alexa Fluor® 647 标记的小鼠抗人 IL-17 单克隆抗体,室温避光孵育 20 min;洗涤重悬细胞后流式细胞仪检测,以 CD4⁺ T 细胞设门,每例计数 10×10^3 个细胞。

3. 实时定量逆转录-聚合酶链反应检测外周血 ROR γ t mRNA 表达变化 分离外周血、收集单个核细胞,以 TRIzol 液提取细胞总 RNA,逆转录试剂盒合成 cDNA 第 1 链。参照 GenBank cDNA 中 ROR γ t 和内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)序列设计引物。ROR γ t: 上游引物序列为 5'-GAGCCAAGGCTCAGTCATGAGAA-3'、下游引物序列为 5'-GTCCCTCTGCTTCTTGGACAT-3',产物大小为 289 bp; GAPDH: 上游引物序列为 5'-GAGAAGGCTGGGGCTCATT-3'、下游引物序列为 5'-AGTGATGGCATGGACTGTGG-3',产物大小为 231 bp。采用 50 μl SYBR® Premix Ex Taq™ II 反应体系进行 PCR 扩增,反应条件为:95 °C 预变性 30 s,95 °C 5 s,60 °C 30 s,共进行 40 个循环。采用美国 Bio-Rad 公司 iQ520 系统软件 V2.0 进行数据收集,自动获得扩增曲线和循环阈值(CT 值), $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算 ROR γ t mRNA 相对表达量。

4. 酶联免疫吸附试验检测外周血 IL-17 表达变化 无菌条件下分离血清,-80 °C 冰箱保存,ELISA 试剂盒检测 IL-17 表达水平,每一样本检测 3 个复孔,IL-17 最低值 < 4 pg/ml。严格按照试剂盒说明书进行操作,于酶联免疫检测仪波长为 450 nm 处读取光密度(OD)值。

三、统计分析方法

采用 SPSS 16.0 统计软件对实验数据进行处理与分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用两独立样本均数比较的 t 检验;计数资料以相对数构成比(%)或率(%)表示,行 χ^2 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

表 1 急性脑出血组与正常对照组受试者外周血 Th17 细胞比例的比较($\bar{x} \pm s, \%$)**Table 1.** Comparison of the percentage of Th17 cells in the peripheral blood between 2 groups ($\bar{x} \pm s, \%$)

Group	N	6 h	24 h	3 d	7 d	14 d
Control	40	0.87 ± 0.17	0.87 ± 0.17	0.87 ± 0.17	0.87 ± 0.17	0.87 ± 0.17
Cerebral hemorrhage	55	0.92 ± 0.17	1.05 ± 0.19	1.21 ± 0.20	1.13 ± 0.19	0.94 ± 0.18
<i>t</i> value		1.415	4.762	8.996	7.359	1.915
<i>P</i> value		0.160	0.000	0.000	0.000	0.058

表 2 急性脑出血组与正常对照组受试者外周血 ROR γ t mRNA 相对表达量的比较($\bar{x} \pm s$)**Table 2.** Comparison of the mRNA relative expression of ROR γ t in the peripheral blood between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	N	6 h	24 h	3 d	7 d	14 d
Control	40	0.34 ± 0.11	0.34 ± 0.11	0.34 ± 0.11	0.34 ± 0.11	0.34 ± 0.11
Cerebral hemorrhage	55	0.36 ± 0.12	0.46 ± 0.15	0.57 ± 0.19	0.48 ± 0.16	0.37 ± 0.13
<i>t</i> value		0.830	4.288	8.218	4.771	1.183
<i>P</i> value		0.408	0.000	0.000	0.000	0.239

表 3 急性脑出血组与正常对照组受试者外周血 IL-17 表达水平的比较($\bar{x} \pm s, \text{pg/ml}$)**Table 3.** Comparison of the serum levels of IL-17 at different time points between 2 groups ($\bar{x} \pm s, \text{pg/ml}$)

Group	N	6 h	24 h	3 d	7 d	14 d
Control	40	22.17 ± 11.08	22.17 ± 11.08	22.17 ± 11.08	22.17 ± 11.08	22.17 ± 11.08
Cerebral hemorrhage	55	27.12 ± 13.43	38.36 ± 17.32	61.34 ± 27.69	48.32 ± 21.37	35.17 ± 16.06
<i>t</i> value		1.906	5.186	8.458	7.072	4.410
<i>P</i> value		0.060	0.000	0.000	0.000	0.000

结 果

一、急性脑出血患者外周血 Th17 细胞变化

流式细胞术检测结果显示,脑出血后 6 h 外周血 Th17 细胞比例开始升高,但与正常对照组之间差异无统计学意义($P > 0.05$);此后持续升高,脑出血后 24 h 及第 3 和 7 天时 Th17 细胞比例均高于对照组,且差异有统计学意义($P = 0.000$);至第 14 天时降至正常值范围($P > 0.05$,表 1)。

二、急性脑出血患者外周血 ROR γ t mRNA 表达变化

实时定量 RT-PCR 检测结果显示,脑出血后 6 h ROR γ t mRNA 表达水平与正常对照组之间差异无统计学意义($P > 0.05$);此后持续升高,于脑出血后 24 h 及第 3 和 7 天时表达水平均高于正常对照组,差异有统计学意义($P = 0.000$);至第 14 天时降至正常值范围($P > 0.05$,表 2)。

三、急性脑出血患者外周血 IL-17 表达变化

ELISA 检测显示,脑出血后 6 h 外周血 IL-17 表达水平开始升高,但与正常对照组之间差异无统计

学意义($P > 0.05$);此后持续升高,于脑出血后 24 h 及第 3、7 和 14 天时均高于正常对照组,且差异具有统计学意义($P = 0.000$,表 3)。

讨 论

脑出血后继发性脑损伤是导致患者病情加重的主要原因,在脑出血急性期,血肿压迫、继续出血、代谢异常、炎症反应、兴奋性氨基酸(EAA)毒性作用、钙离子超载等因素均可能是引起继发性脑损伤的原因,其中炎症反应在脑出血后继发性脑损伤过程中发挥重要作用^[1,9]。脑出血可诱发脑组织局部和外周组织炎症反应,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-6、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、基质金属蛋白酶(MMPs)等多种炎症因子参与该过程^[10-14]。

Th17 细胞是在研究自身免疫性疾病过程中被发现的,目前认为,Th17 细胞是一种独立的 CD4⁺ T 细胞亚群,ROR γ t 是其分化过程中关键的转录激活因子^[15]。Th17 细胞主要通过分泌 IL-17、21 和 22 等细胞因子发挥效应,因 Th17 细胞可产生大量 IL-17,绝大多数 Th17 细胞介导的效应均是由 IL-17 产生

的。后者主要通过促进多种细胞因子的释放及招募中性粒细胞而发挥效应,是一种强大的促炎性因子^[16]。许多研究结果业已证实,IL-17在脑组织缺血-再灌注损伤中发挥重要作用^[5-7],但关于Th17细胞和IL-17在脑出血中的研究甚少。为了研究Th17细胞在脑出血过程中的作用,我们对急性脑出血后不同时间点外周血Th17细胞比例,以及ROR γ t mRNA和IL-17表达水平进行检测。结果发现,脑出血后6小时Th17细胞比例、ROR γ t mRNA和IL-17表达水平开始升高,至脑出血后第3天达峰值水平,随后开始下降,脑出血后第14天Th17细胞比例、ROR γ t mRNA表达水平已降至正常水平($P > 0.05$),而外周血IL-17表达水平仍然高于正常值范围($P = 0.000$)。提示急性脑出血后6小时Th17细胞即开始活化并分泌IL-17,后者通过刺激多种细胞释放TNF- α 、IL-6或基质金属蛋白酶-1(MMP-1)等多种细胞因子参与炎症反应。有研究显示,脑出血后72小时炎症反应及脑组织损伤最严重^[17],本研究结果显示,脑出血后第3天时Th17细胞比例、ROR γ t mRNA和IL-17表达水平均达峰值,此与脑组织炎症反应时间基本一致,进一步证实Th17细胞及IL-17在脑出血后的炎症反应中发挥重要作用。与此同时,本研究结果还证实随着病程的进展,Th17细胞比例和IL-17表达水平逐渐下降,但脑出血后第7天时二者仍高于正常值范围(均 $P = 0.000$),此时炎症反应逐渐减轻,直至出血后第14天时Th17细胞比例方降至正常值范围($P > 0.05$),而外周血IL-17表达水平仍高于正常值范围($P = 0.000$)。推测可能与除Th17细胞产生IL-17外,自然杀伤T细胞(NKT)、 $\gamma\delta$ T细胞、嗜酸性粒细胞和中性粒细胞亦可以产生IL-17有关。

本研究结果显示,Th17细胞及IL-17在脑出血急性期发挥诱导、促进炎症反应作用,参与脑出血后的病理进程。但Th17细胞及IL-17在脑出血发病中的具体作用机制尚待进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Kleinig TJ, Vink R. Suppression of inflammation in ischemic and hemorrhagic stroke: therapeutic options. *Curr Opin Neurol*, 2009, 22:294-301.
- [2] Maddur MS, Miossec P, Kaveri SV, Bayry J. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *Am J Pathol*, 2012, 181:8-18.
- [3] Wilke CM, Bishop K, Fox D, Zou W. Deciphering the role of Th17 cells in human disease. *Trends Immunol*, 2011, 32:603-611.
- [4] Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA. Th17 cells in human disease. *Immunol Rev*, 2008, 223:87-113.
- [5] Zhao D, Hou N, Cui M, Liu Y, Liang X, Zhuang X, Zhang Y, Zhang L, Yin D, Gao L, Zhang Y, Ma C. Increased T cell immunoglobulin and mucin domain 3 positively correlate with systemic IL-17 and TNF- α level in the acute phase of ischemic stroke. *J Clin Immunol*, 2011, 31:719-727.
- [6] Zhang Z, Li GZ, Ding ZM, Wang GY, Zhang Y, Peng L, Li Y, Li HL, Wang DD. The initial research of interleukin-17 and its receptor in the process of cerebral ischemia. *Zhong Feng Yu Shen Jing Ji Bing Za Zhi*, 2009, 26:653-656. [张喆, 李国忠, 丁兆明, 王广友, 张瑶, 彭雷, 李瑶, 李呼伦, 王丹丹. 白细胞介素17及其受体在脑缺血损伤中作用的初步研究. *中风与神经疾病杂志*, 2009, 26:653-656.]
- [7] Gelderblom M, Weymar A, Bernreuther C, Velden J, Arunachalam P, Steinbach K, Orthey E, Arumugam TV, Leyboldt F, Simova O, Thom V, Friese MA, Prinz I, Hölscher C, Glatzel M, Korn T, Gerloff C, Tolosa E, Magnus T. Neutralization of the IL-17 axis diminishes neutrophil invasion and protects from ischemic stroke. *Blood*, 2012, 120:3793-3802.
- [8] Chinese Neuroscience Association, China Association of Neurological Surgeons. Diagnostic points of various types of cerebrovascular disease. *Zhonghua Shen Jing Ke Za Zhi*, 1996, 29:379-380. [中华神经科学会, 中华神经外科学会. 各类脑血管疾病诊断要点. *中华神经科杂志*, 1996, 29:379-380.]
- [9] Wang J. Preclinical and clinical research on inflammation after intracerebral hemorrhage. *Prog Neurobiol*, 2010, 92:463-477.
- [10] Hanafy KA, Grobelny B, Fernandez L, Kurtz P, Connolly ES, Mayer SA, Schindler C, Badjatia N. Brain interstitial fluid TNF- α after subarachnoid hemorrhage. *J Neurol Sci*, 2010, 291:69-73.
- [11] Ni W, Gu YX, Song DL, Leng B, Li PL, Mao Y. The relationship between IL-6 in CSF and occurrence of vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl*, 2011, 110:203-208.
- [12] Yang JT, Lee TH, Lee IN, Chung CY, Kuo CH, Weng HH. Dexamethasone inhibits ICAM-1 and MMP-9 expression and reduces brain edema in intracerebral hemorrhagic rats. *Acta Neurochir (Wien)*, 2011, 153:2197-2203.
- [13] Wang J, Dong WW, Jia YJ, Li GY, Zheng M. The dynamic changes of plasma matrix metalloproteinase-9 and its clinical significance in cerebral hemorrhage. *Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi*, 2004, 4:101-103. [王健, 董为伟, 贾延颖, 李国秧, 郑敏. 脑出血患者血浆基质金属蛋白酶-9水平的动态变化及其临床意义. *中国现代神经疾病杂志*, 2004, 4:101-103.]
- [14] Huang Y, Zhou GX, Li XY. The effect of interleukin and matrix metalloproteinase on the vulnerability of carotid atherosclerotic plaque and cerebral infarction. *Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi*, 2012, 12:349-353. [黄燕, 周广喜, 李秀艳. 白细胞介素和基质金属蛋白酶对颈动脉粥样硬化斑块易损性及脑梗死的影响. *中国现代神经疾病杂志*, 2012, 12:349-353.]
- [15] Dong C. Genetic controls of Th17 cell differentiation and plasticity. *Exp Mol Med*, 2011, 43:1-6.
- [16] Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nat Rev Drug Discov*, 2012, 11:763-776.
- [17] Rosenberg GA, Mun - Bryce S, Wesley M, Kornfeld M. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke*, 1990, 21:801-807.

(收稿日期:2013-05-03)