

45例原发性免疫性血小板减少症患者IL-23/IL-17轴表达的研究

钱铮 崔庆亚 邓安梅 秦琴 陈海飞 沈红石 王兆钺 任传路 吴天勤

【摘要】 目的 研究IL-23/IL-17轴各亚基、受体基因及蛋白在原发性免疫性血小板减少症(ITP)患者外周血中的表达及意义。方法 采用实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测45例初诊ITP患者及30例健康对照外周血单个核细胞(PBMC) IL-23p19、p40、IL-12 p35、受体IL-23R、IL-12Rβ1、IL-12Rβ2、IL-17A、IL-17F基因表达量,用ELISA方法检测IL-23、IL-17的蛋白表达,分析ITP患者IL-23、IL-17表达与PLT的相关性。结果 ①ITP患者外周血PBMC IL-23p19、p40,受体IL-23R、IL-12Rβ1、IL-17A、IL-17F相对表达量分别是健康对照组的5.58、2.13、4.20、2.45、4.29、2.50倍。②ITP组外周血清IL-23蛋白表达高于健康对照组[(198.70±94.56) ng/L 对 (50.72±22.97) ng/L, $t=10.06$, $P<0.001$],血清IL-17表达高于健康对照组[(85.25±21.97) ng/L 对 (11.39±4.27) ng/L, $t=21.94$, $P<0.001$]。③ITP患者外周血中IL-23表达与PLT呈负相关($r=-0.408$, $P<0.01$),IL-17的表达与PLT呈负相关($r=-0.464$, $P<0.01$),IL-23与IL-17的表达呈正相关($r=0.496$, $P<0.01$)。结论 IL-23/IL-17轴基因及蛋白在ITP中表达异常,提示IL-23/IL-17轴在ITP发病中有一定作用。

【关键词】 血小板减少; 白细胞介素类; 发病机制

Abnormal expression of IL-23/IL-17 axis in peripheral blood of 45 patients with primary immune thrombocytopenia Qian Cheng, Cui Qingya, Deng Anmei, Qin Qin, Chen Haifei, Shen Hongshi, Wang Zhaoyue, Ren Chuanlu, Wu Tianqin*. Department of Hematology, 100th Hospital of PLA, Suzhou 215007, China

Corresponding author: Wu Tianqin, Email: wtq100@vip.163.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression of IL-23/IL-17 axis in peripheral blood of patients with primary immune thrombocytopenia (ITP) and its clinical significance. **Methods** The real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to determine the expression of IL-23p19, p40, p35, IL-23R, IL-12Rβ1, IL-12Rβ2, IL-17A, IL-17F mRNA in the peripheral blood of 45 ITP patients and 30 healthy controls. The correlations between the expression of IL-23 and IL-17, platelet counts, serum cytokine concentrations of ITP patients were analyzed. Furthermore, nine newly diagnosed ITP patients were followed up during treatment. **Results** The gene expressions of IL-23p19, p40, IL-23R, IL-12Rβ1, IL-17A, IL-17F in ITP patients were significantly higher than those in healthy controls, the relative expression levels of ITP were 5.58, 2.13, 4.20, 2.45, 4.29, 2.50 times as much as that of healthy controls. And elevated serum IL-23 [(198.70±94.56) ng/L vs (50.72±22.97) ng/L, $t=10.06$, $P<0.001$], IL-17 [(85.25±21.97) ng/L vs (11.39±4.27) ng/L, $t=21.94$, $P<0.001$] levels were also observed in these ITP patients. In addition, the serum IL-23 level in ITP patients was positively correlated with IL-17 ($r=0.496$, $P<0.01$), but negatively correlated with the platelet counts ($r=-0.408$, $P<0.01$), and IL-17 level was negatively correlated with platelet counts ($r=-0.464$, $P<0.01$). **Conclusion** The IL-23/IL-17 expression in ITP patients was significantly elevated, indicating IL-23/IL-17 play an important role in the pathogenesis of ITP.

【Key words】 Thrombocytopenia; Interleukins; Pathogenesis

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.12.012

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973计划)(2013CB531606);国家自然科学基金(81273282、81202353);南京军区面上项目(14MS026)

作者单位:215007 苏州,解放军第100医院检验科(钱铮、任传路),血液科、南京军区血液肿瘤治疗中心(崔庆亚、陈海飞、沈红石、吴天勤);第二军医大学附属长海医院实验诊断科(邓安梅、秦琴);苏州大学附属第一医院(王兆钺)

通信作者:吴天勤,Email:wtq100@vip.163.com

原发免疫性血小板减少症(ITP)是一种获得性自身免疫性疾病,目前主要认为是机体产生抗血小板自身抗体从而引发血小板破坏。除了体液免疫外,细胞免疫也参与发病^[1],ITP患者Th1/Th2比值增高,调节性T细胞(Treg)比例下降、Th17细胞比例增高^[2-4]。IL-23和IL-17是T细胞分泌的促炎细胞因子,在机体中形成IL-23/IL-17轴发挥作用^[5]。近年来研究发现IL-23/IL-17轴与系统性红斑狼疮(SLE)^[6]、原发性胆汁性肝硬化^[7]等自身免疫性疾病的发病密切相关。本研究中,我们观察了IL-23/IL-17及其受体的基因和蛋白在ITP患者中的表达,探讨IL-23/IL-17轴在ITP发病中的作用机制。

病例和方法

1. 病例:2013年1月至2014年12月间在我院就诊的45例初诊ITP患者纳入研究,其中男21例,女24例,中位年龄32(16~62)岁,诊断符合文献^[8],且在确诊ITP前均未接受相关治疗。以同期30名健康体检者作为健康对照组。本研究获得本院医学科研伦理委员会批准,受试者均签署知情同意书。

2. 标本采集:采集受试者治疗前外周枸橼酸钠抗凝血6 ml,采用密度梯度离心法分离出患者外周血单个核细胞(PBMC),置-80℃保存。另抽取外周血2 ml,离心后收集上层血清,-80℃保存。

3. 实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 PBMC IL-23p19、p40、IL-2p35、IL-23R、IL-12Rβ1、IL-12Rβ2、IL-17A、IL-17F基因表达:采用TRIzol法抽提细胞总RNA,将其逆转录为cDNA,-20℃冰箱保存备用。采用Taqman探针技术,以18s rRNA为内参将逆转录得到的cDNA模板进行PCR扩增。各探针引物序列参考文献^[7,9]。PCR条件:50℃ 2 min;95℃ 10 min;95℃ 15 s,60℃ 1 min,循环45次。所有样本重复检测3次。定量PCR结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{患者} - \Delta Ct_{对照}$$

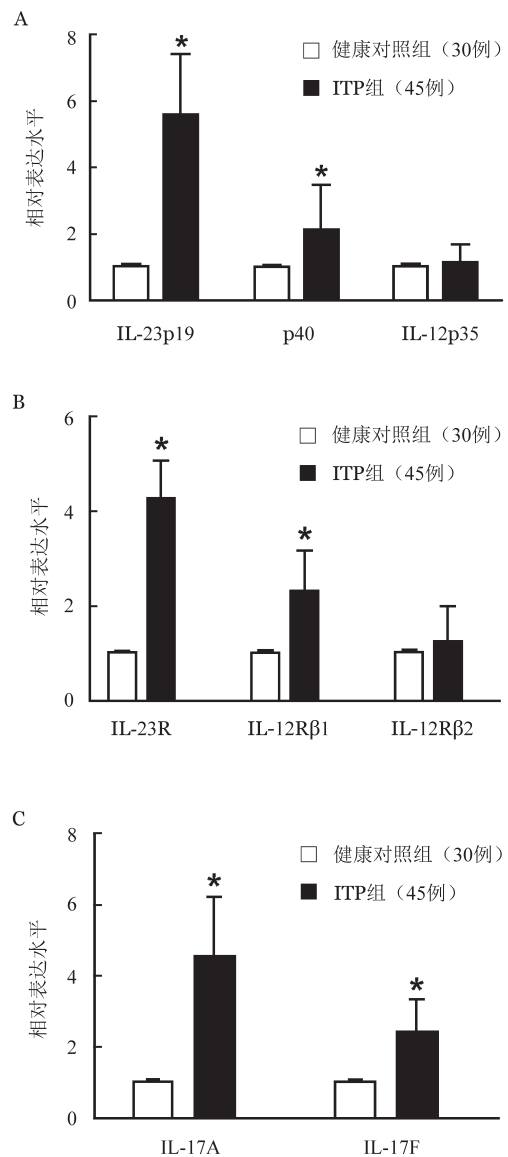
$$\Delta Ct = Ct_{靶基因} - Ct_{管家基因}$$

4. ELISA法检测血清IL-17和IL-23:ELISA试剂盒为美国eBioscience公司产品。操作按照说明书进行。

5. 统计学处理:用GraphPad Prism 5.0软件对数据进行统计学分析。呈正态分布的资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用独立样本t检验。相关性分析采用Spearman相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1. ITP患者外周血IL-23、IL-17及其受体mRNA的表达:ITP患者外周血PBMC中IL-23p19、p40,受体IL-23R、IL-12Rβ1、IL-17A、IL-17F mRNA表达较健康对照明显增高,相对表达量分别是健康对照组的5.58、2.13、4.20、2.45、4.29、2.50倍(图1)。



A: IL-23p19、p40、IL-12p35; B: IL-23R、IL-12Rβ1、IL-12Rβ2; C: IL-17A、IL-17F

图1 原发免疫性血小板减少症(ITP)患者与健康对照组外周血单个核细胞(PBMC)IL-23/IL-17 mRNA相对表达水平比较(与健康对照组比较,* $P < 0.05$)

2. ELISA法检测ITP患者外周血IL-23、IL-17结果:ITP组外周血清IL-23蛋白表达高于健康对照组[(198.70±94.56) ng/L对(50.72±22.97) ng/L, $t =$

10.06, $P < 0.001$], 血清 IL-17 表达高于健康对照组 [(85.25±21.97) ng/L 对 (11.39±4.27) ng/L, $t=21.94$, $P < 0.001$] (图2)。

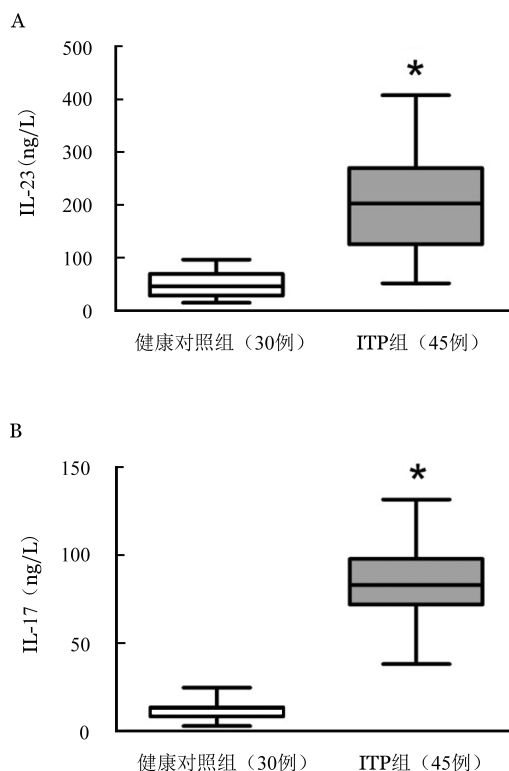


图2 原发性血小板减少症(ITP)患者外周血血清IL-23(A)和IL-17(B)表达(与健康对照组比较, * $P < 0.05$)

3. ITP患者外周血IL-23、IL-17与血小板水平的相关性分析: ITP患者外周血中IL-23表达与PLT呈负相关($r = -0.408$, $P < 0.01$) (图3)。IL-17的表达量与PLT呈负相关($r = -0.464$, $P < 0.01$) (图4)。血清IL-23与IL-17的表达呈正相关($r = 0.496$, $P < 0.001$) (图5)。

讨 论

ITP的具体发病机制尚不清楚。目前主要认为是由于血小板生成减少和破坏增多导致。近年来人们注意到细胞免疫在ITP发病中也有重要作用,可能是部分ITP患者发病的主要原因。IL-23属于IL-12家族成员,由p19和p40亚单位组成的异二聚体,p19为IL-23所特有,p40是和IL-12共有。具有活性的二聚体IL-23主要表达于树突细胞和巨噬细胞等抗原提呈细胞^[10]。IL-23被认为是产生IL-17的关键性启动因子,可诱导naive T细胞分化成Th17细胞,分泌IL-6和IL-17。IL-23在某些自身免疫性疾病中表达升高,包括类风湿性关节炎^[11]、多发性

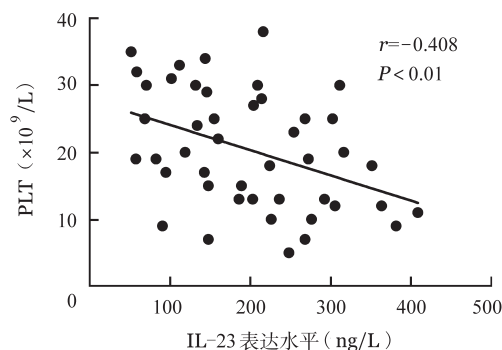


图3 45例原发性血小板减少症患者外周血IL-23表达水平与血小板计数的相关性

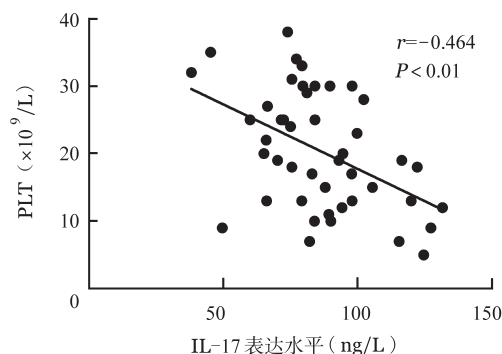


图4 45例原发性血小板减少症患者外周血IL-17表达水平与PLT的相关性

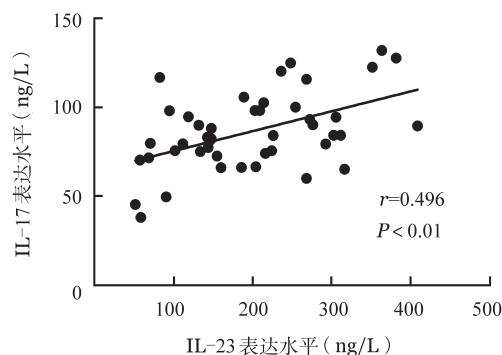


图5 45例原发性血小板减少症患者外周血IL-23表达水平与IL-17表达水平的相关性

硬化症、克罗恩氏病^[12]等。IL-12和IL-23功能不同是由于受体不同,从而引起的下游信号的不同。IL-12R β 1是p40的受体,而IL-23R、IL-12R β 2分别是p19、p35的独特受体。IL-23与受体结合后分别激活下游的Jak2和Tyk2,活化的Jaks分子使受体胞内区的STAT3磷酸化,并以二聚体的形式入核,作用于下游靶基因转录^[13]。我们研究发现,与健康对照组相比,ITP患者PBMC中p19及受体IL-23R mRNA增高最显著,IL-12R β 1和p40 mRNA表达也增高,而IL-2p35和IL-12R β 2变化差异无统计学意义,这说明ITP中IL-23的基因表达增加,增加的p40

主要是由IL-23引起,也表明ITP患者中IL-23比IL-12作用更明显。

本研究中我们还发现ITP患者血清中IL-23蛋白水平表达明显高于正常对照组,这可能是由于ITP患者外周血中活化的树突细胞、巨噬细胞及血小板自身反应性T细胞产生的IL-23分泌到细胞外,血清中增多的IL-23可以诱导激活的CD4⁺记忆T细胞产生IFN- γ 、IL-17等炎性细胞因子,同时还能通过树突细胞来活化和调节T细胞依赖的免疫应答,参与ITP免疫反应。

IL-17是Th17分泌的特征性细胞因子,在宿主抵抗胞外细菌、真菌感染的防御过程中起到了重要的作用。但是过度的IL-17反应又会引发自身免疫性疾病发病。近年来研究表明IL-17在类风湿性关节炎(RA)、实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)和炎症性肠病(IBD)等多种自身免疫病中表达升高^[14],提示其在自身免疫病中有重要作用。本研究结果显示,基因IL-17A和IL-17F和血清IL-17表达均增高,与Rocha等^[15]的研究结果基本一致。

本研究结果显示IL-23与IL-17表达具有相关性,这可能是由IL-23可以促进T细胞活化为Th17细胞,释放IL-17,导致血清IL-17表达增高。而与此同时,IL-17又可通过NF- κ B和p38 MAPK信号途径促进IL-23的诱导表达。

总之,我们的实验结果提示ITP患者外周血IL-23/IL-17轴基因表达上调,血清中IL-23和IL-17表达上调,且血清IL-23和IL-17增高水平与PLT有一定的相关性,反映了ITP的严重程度及出血状况。然而,有关IL-23/IL-17在ITP中的作用机制还需要进一步研究。

参考文献

- [1] Semple JW, Provan D. The immunopathogenesis of immune thrombocytopenia: T cells still take center-stage[J]. *Curr Opin Hematol*, 2012, 19(5):357-362.
- [2] Yazdanbakhsh K, Zhong H, Bao W. Immune dysregulation in immune thrombocytopenia[J]. *Semin Hematol*, 2013, 50 Suppl 1:S63-67.
- [3] Bao W, Bussel JB, Heck, et al. Improved regulatory T-cell activity in patients with chronic immune thrombocytopenia treated with thrombopoietic agents [J]. *Blood*, 2010, 116 (22):4639-4645.
- [4] Gaffen SL, Jain R, Garg AV, et al. The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(9):585-600.
- [5] Wong CK, Lit LC, Tam LS, et al. Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implications for Th17-mediated inflammation in auto-immunity [J]. *Clin Immunol*, 2008, 127(3): 385-393.
- [6] Martin JC, Baeten DL, Josien R. Emerging role of IL-17 and Th17 cells in systemic lupus erythematosus [J]. *Clin Immunol*, 2014, 154(1):1-12.
- [7] Qian C, Jiang T, Zhang W, et al. Increased IL-23 and IL-17 expression by peripheral blood cells of patients with primary biliary cirrhosis [J]. *Cytokine*, 2013, 64(1):172-180.
- [8] 中华医学会血液学分会血栓与止血学组. 成人原发免疫性血小板减少症诊治的中国专家共识(修订版) [J]. *中华血液学杂志*, 2011, 32(3): 214-216.
- [9] Ye X, Zhang L, Wang H, et al. The role of IL-23/Th17 pathway in patients with primary immune thrombocytopenia [J]. *PLoS One*, 2015, 10(1):e0117704.
- [10] Duvallet E, Semerano L, Assier E, et al. Interleukin-23: a key cytokine in inflammatory diseases [J]. *Ann Med*, 2011, 43(7): 503-511.
- [11] Abu Al Fadl EM, Fattouh M, Allam AA. High IL-23 level is a marker of disease activity in rheumatoid arthritis [J]. *Egypt J Immunol*, 2013, 20(2):85-92.
- [12] Fransen K, van Sommeren S, Westra HJ, et al. Correlation of genetic risk and messenger RNA expression in a Th17/IL23 pathway analysis in inflammatory bowel disease [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2014, 20(5):777-782.
- [13] McGeachy MJ, Chen Y, Tato CM, et al. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo [J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(3):314-324.
- [14] Pappu R, Ramirez-Carrozzi V, Sambandam A. The interleukin-17 cytokine family: critical players in host defence and inflammatory diseases [J]. *Immunology*, 2011, 134(1):8-16.
- [15] Rocha AM, Souza C, Rocha GA, et al. The levels of IL-17A and of the cytokines involved in Th17 cell commitment are increased in patients with chronic immune thrombocytopenia [J]. *Haematologica*, 2011, 96(10):1560-1564.

(收稿日期:2015-06-19)

(本文编辑:徐茂强)