

• 临床检验研究论著 •

# 嗜血细胞综合征患儿外周血 Th17 细胞的检测及意义

平竹仙, 宋建新, 朱红艳

(云南省第一人民医院检验科, 昆明 650032)

**摘要:**目的 观察嗜血细胞综合征(HPS)患儿外周血 CD4<sup>+</sup>细胞白介素(IL)-17 的变化,探讨其在 HPS 发病中的作用及临床意义。方法 分离 HPS 患儿(初诊组和缓解组)和健康者(对照组)外周血单个核细胞(PBMC),采用免疫磁珠阴选 CD4<sup>+</sup>T 细胞,然后加佛波酯(PMA)、离子霉素(Ion),经固定、透膜处理进行细胞内染色,流式细胞术检测 CD4<sup>+</sup>T 细胞内 IL-17<sup>+</sup>水平。结果 初诊组 HPS 患儿 IL-17 表达水平明显高于缓解组( $t=11.34, P<0.01$ ),二者又明显高于对照组( $t=35.28, 9.38, P<0.01$ )。结论 Th17 细胞水平与病情活动相关,是判断 HPS 患儿病情活动的指标之一。

**关键词:**淋巴组织细胞增多症,嗜血细胞性; T 淋巴细胞,辅助诱导; 白介素 17; 细胞内染色

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2012.10.021

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2012)10-1194-02

## Detection and significance of Th17 cells in peripheral blood from children with hemophagocytic syndrome

Ping Zuxian, Song Jianxin, Zhu Hongyan

(Laboratory Department, the First Yunnan Province People's Hospital, Kunming, Yunnan 650032, China)

**Abstract:** Objective To study the level and clinic significance of Th17 cells in peripheral blood from children with hemophagocytic syndrome(HPS). **Methods** Peripheral blood mononuclear cells was separated in children with HPS (preliminary diagnosis group and relieved group) and healthy children(control group). CD4<sup>+</sup>T cells were negative selected by immunomagnetic beads, treated with phorbol ester(PMA), ionomycin (Ion), fixation and intra-cellular dyeing by penetrate membrane, and level of IL-17 in CD4<sup>+</sup>T cells were then detected by flow cytometry. **Results** Among children with HPS, The level of IL-17 in preliminary diagnosis group was significantly higher than that in relieved group( $t=11.34, P<0.01$ ), both of which were significantly higher than in control group( $t=35.28, 9.38, and P<0.01$ ). **Conclusion** Th17 cells could play an important role in HPS. Level of Th17 cells might be one index for estimating disease status in children with HPS.

**Key words:** lymphohistiocytosis, hemophagocytic; T-lymphocytes, helper-inducer; interleukin-17; intra-cellular dyeing

嗜血细胞综合征(hemophagocytic syndrome, HPS)亦称血细胞性淋巴组织细胞增生症(HLH),属组织细胞病<sup>[1]</sup>, HPS 发病机制目前尚未明确,但免疫调节异常在发病中起重要作用<sup>[2]</sup>。Th17 细胞是新近发现的一类不同于 Th1 或 Th2 的 CD4<sup>+</sup> Th 细胞亚群<sup>[3]</sup>,是一种促炎性细胞因子,参与机体炎性反应。本文检测了 HPS 患者 CD4<sup>+</sup>T 细胞内白介素(interleukin, IL)-17<sup>+</sup>水平,观察其在疾病中的变化及与临床表现之间的相互关系,探讨 Th17 细胞在 HPS 发病中的作用及临床意义。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 初诊组(急性期组)为初发 HPS 患儿 21 例,均为 2008 年 2 月至 2010 年 12 月本院儿科住院患者,其中男 15 例,女 6 例,年龄 9 个月至 13 岁,平均 7.6 岁;经诱导治疗后取得临床缓解 15 例(缓解组),3 例转院而失访,死亡 3 例。诊断及疗效均符合张之南主编的《血液病诊断及疗效标准》之国际组织细胞协会 2004 年诊疗标准<sup>[4]</sup>。对照组为来本院体检的健康儿童 25 例,年龄 2~12 岁,平均 8.1 岁。

**1.2 试剂和仪器** 荧光素标记的抗体[藻红蛋白(PE)标记抗人 IL-17 抗体、莫能霉素及相应同型对照抗体]购自 EBioscience 公司,佛波酯(PMA)、离子霉素(Ion)购自 Sigma 公司,免疫磁珠阴选试剂盒(Dynabeads Untouched Human CD4 T 细胞)购自 Dynal 公司,破膜剂、固定液购自 Beckman Coulter 公司,淋巴细胞分离液(Ficoll)购自上海试剂二厂, RPMI1640、胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 CD4<sup>+</sup>T 细胞的分离** 采用 Ficoll 分离外周血单个核

细胞(PBMC),然后根据免疫磁珠阴选试剂盒说明书分选 CD4<sup>+</sup>T 细胞,免疫磁珠阴选 CD4<sup>+</sup>T 细胞纯度大于 90%。以含 10%FBS 的 1640 培养液重悬细胞(终浓度为  $1 \times 10^6$ /mL)。

**1.3.2 CD4<sup>+</sup>T 细胞内 IL-17<sup>+</sup>的检测** 在上述细胞悬液中加入 PMA(50 ng/mL)、Ion(1  $\mu$ g/mL)及阻断剂莫能霉素,予 37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 条件下培养 5 h,然后取细胞悬液 100  $\mu$ L,加入 100  $\mu$ L 固定剂 A,反应 15 min,洗涤[3 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)、0.1%Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、5%FBS]1 次,再加入透膜剂 B 100  $\mu$ L,反应 5 min,加入 10  $\mu$ L PE 标记抗人 IL-17 抗体,同时设同型对照反应管,反应 30 min 后洗涤 2 次,以 300  $\mu$ L 冷 PBS 重悬,流式细胞术(FCM)检测 CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> 双阳性细胞。

**1.4 统计学处理** 使用 SPSS12.0 统计软件进行分析。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。两样本均数比较采用  $t$  检验。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

### 2 结果

**2.1 各组外周血 Th17 细胞检测** 初诊组患儿 CD4<sup>+</sup>T 细胞内 IL-17 表达水平明显高于缓解组( $t=11.34, P<0.01$ ),且明显高于对照组( $t=35.28, P<0.01$ );缓解组又明显高于对照组( $t=9.38, P<0.01$ ),见表 1。

表 1 各组 CD4<sup>+</sup>T 细胞 IL-17 表达的比较( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	n	CD4 <sup>+</sup> IL-17 <sup>+</sup>
对照组	25	0.52 $\pm$ 0.08
初诊组	21	2.12 $\pm$ 0.21*
缓解组	15	1.14 $\pm$ 0.15* $\Delta$

\*:  $P<0.01$ ,与对照组比较; $\Delta$ :  $P<0.01$ ,与初诊组比较。

2.2 各组 FCM 分析的散点图 见图 1。

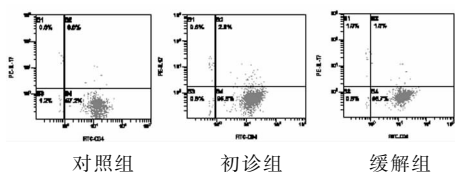


图 1 FCM 检测各组外周血 CD4<sup>+</sup> T 细胞 IL-17 表达

3 讨论

HPS 是淋巴细胞、巨噬细胞增生和活化，伴吞噬血细胞现象的一组综合征，是在遗传性或后天获得性免疫缺陷基础上的过度炎症反应。不予治疗病死率极高<sup>[5]</sup>。高细胞因子血症是 HPS 发病的中间环节细胞因子产生失衡<sup>[6]</sup>，如 TGF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-2 等细胞因子持续产生，使作为免疫应答的反应性 T 细胞和单核吞噬细胞过度分泌细胞因子，刺激巨噬细胞的增殖而吞噬血细胞。

分化成熟的 Th17 细胞分泌许多细胞因子，最具特征性的是 IL-17(包括 IL-17A~F)<sup>[7]</sup>。IL-17A、F 同源性最高，可与上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞、巨噬细胞等受体细胞上的 IL-17RA、RC 结合，通过信号传导活化特定转录因子，启动相关靶基因转录，引起 IL-6、IL-8、粒-单核细胞集落刺激因子(GM-CSF)、单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1, 又称 CCL2)、粒细胞趋化蛋白 2(GCP-2)、人 B 防御素 2(hBD2)、巨噬细胞炎症蛋白 3(MIP3, 又称 CCL20)以及基质金属蛋白酶(MMP)等炎症细胞因子的表达，进而招募树突状细胞(DC)、T 细胞、中性粒细胞至炎症部位，发挥抗病原微生物、修复损伤组织等作用<sup>[8]</sup>。Th17 细胞分泌 IL-17A(及通常所指的 IL-17)<sup>[9]</sup>，胞内 IL-17 的表达可以作为检测 Th17 细胞的标志<sup>[10]</sup>。

本研究结果显示，初诊组患儿外周血 CD4<sup>+</sup> T 细胞 IL-17 表达比对照组明显升高，提示 HPS 患者外周血中存在异常增多的 Th17 细胞，可能是 HPS 发病的一个重要因素，Th 细胞可能通过其分泌的细胞因子作用于不同靶细胞，诱导其他细胞因子的产生，导致 HPS 患者免疫调节功能紊乱，激活巨噬细胞而吞噬血细胞，引起血细胞减少，导致出现 HPS 的病理生理过程，诱导疾病的发生。本研究还发现，IL-17 表达水平与 HPS

病情相关，初诊组患儿表达水平明显高于缓解组，而后者又高于对照组，提示细胞因子水平越高，症状越重，细胞因子参与免疫性损伤的程度越强；在缓解期，机体仍处于免疫应激状态，说明此时患儿的免疫功能仍未完全恢复，提示 IL-17 胞内表达水平可作为判断 HPS 患者病情活动的指标之一。

总之，HPS 患者体内存在异常增高的 Th17 细胞，提示 Th17 细胞在 HPS 发病过程中起着重要作用，且其水平高低可反映 HPS 的活动性，对指导临床合理应用免疫调节剂调整细胞因子水平具有重要价值。

参考文献：

- [1] 吴梓良. 嗜血细胞综合征[J]. 中国小儿血液, 2000, 5(5): 219-222.
- [2] 牛钰, 何爱丽, 张王刚. 嗜血细胞性淋巴瘤组织细胞增生症研究进展[J]. 中国实验血液学杂志, 2010, 18(1): 262-267.
- [3] Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, et al. Interleukin23 promotes a distinct CD4<sup>+</sup>T cell activation state characterized by the production of interleukin217[J]. J Bio Chem, 2003, 278(3): 1910-19141.
- [4] 张之南, 沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 254-255.
- [5] Roupheal NG, Talati NJ, Vaughan C, et al. In fections associated with haemoph agocytic syndrome[J]. Lancet Infect Dis, 2007, 7(12): 814-822.
- [6] Ohlsson K. Interleukin-1 receptor antagonist reduces mortality from endotoxin shock[J]. Nature, 1990, 348(6301): 550-552.
- [7] 陈怡丽. Th17 细胞及其在神经免疫疾病中的作用[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(2): 242-244.
- [8] Fouser LA, Wright JF, Dunussi-Joannopoulos K, et al. Th17 cytokines and their emerging roles in inflammation and autoimmunity[J]. Immunol Rev, 2008, 226: 87-102.
- [9] Semik-Orzech A, Barczyk A, Pierzchala W. The role of interleukin 17A inducing neutrophilic inflammation in the pulmonary tract[J]. Pol Merker Lekarski, 2007, 22(1): 163-168.
- [10] Liu GW, Zhao Y. New subset of CD4<sup>+</sup>T cells: Th17 and its biological effects[J]. Prog Biochem Biophys, 2007, 34(2): 348-353.

(收稿日期: 2011-10-08)

(上接第 1193 页)

3 讨论

RNase9 是核糖核酸酶家族成员，本室用原核表达载体(PET)28/E. coli BL21 系统构建了人 RNase9 重组蛋白表达载体，并得到有效表达，结果发现 RNase9 蛋白具有抗菌活性。生物信息学发现 RNase9 较 RNaseA 家族其他成员 1~8 在 N 末端区多出 40~50 氨基酸插入，但具体功能未知<sup>[4]</sup>。RNase9 基因缺乏明显的核糖核酸酶活性中心和保守基序，测活试验也证明其复性产物虽具有抗菌和肝素结合能力，却无常见降解酵母 tRNA 的能力，因而，可以推测 RNase9 根本无酶活性<sup>[5]</sup>。本研究结果显示，RNase9 蛋白尽管等电点很低，但却具有抗菌活性，具体机制值得进一步探讨<sup>[6]</sup>。RNase9 重组蛋白具有抗菌活性，因此，作者想到 RNase9 是否在炎症反应中表达异常，从而为功能研究提供一些线索。结果发现健康者和炎症患者精浆和附睾组织中均有 RNase9 蛋白表达，但炎症患者 RNase9 含量明显升高。FQ-PCR 检测结果也显示，炎症附睾组织中 RNase9 转录水平较高。所有这些证据均支持 RNase9 蛋白参与了附睾炎症过程，且可能具有抑制炎症发生的作用，其具体作用机制尚有待于进一步研究。

参考文献：

- [1] Yuan HX, Liu AH, Zhang L, et al. Proteomic profiling of regionalized proteins in rat epididymis indicates consistency between specialized distribution and protein functions[J]. J Proteome Res, 2006, 5(2): 299-307.
- [2] Zhu CF, Liu Q, Zhang L, et al. RNase9, an androgen-dependent member of the RNase A family, is specifically expressed in the rat epididymis[J]. Biol Reprod, 2007, 76(1): 63-73.
- [3] Liu J, Li J, Wang H, et al. Cloning, expression and location of RNase9 in human epididymis[J]. BMC Res Notes, 2008, 1(1): 111.
- [4] Castella S, Fouthecourt S, Teixeira-Gomes AP, et al. Identification of a member of a new RNase a family specifically secreted by epididymal caput epithelium[J]. Bio Reprod, 2004, 70(2): 319-328.
- [5] Cho S, Beintema JJ, Zhang J. The ribonuclease A superfamily of mammals and birds: identifying new members and tracing evolutionary histories[J]. Genomics, 2005, 85(2): 208-220.
- [6] Cheng GZ, Li JY, Li F, et al. Human ribonuclease 9, a member of ribonuclease A superfamily, specifically expressed in epididymis, is a novel sperm-binding protein[J]. Asian J Androl, 2009, 11(2): 240-251.

(收稿日期: 2011-10-08)