

支气管哮喘患者外周血 IL-4、IL-9、IL-21 的测定及临床意义

潘宇红¹,申卫红¹,姜东林¹,苏 强²,龚 芳^{1*}

(¹无锡市第三人民医院检验科,²呼吸科,江苏 无锡 214041)

[摘要] **目的:**探讨哮喘患者血清细胞因子白细胞介素(interleukin,IL)-4、IL-9、IL-21 在支气管哮喘患者中的表达及与哮喘的相关性。**方法:**选取 48 例急性发作期、41 例缓解期哮喘患者及 48 例性别和年龄相匹配的健康对照作为研究对象,进行肺功能检查。采用 ELISA 和实时荧光定量 PCR 方法,分别从蛋白和基因转录水平测定血清中 IL-4、IL-9、IL-21 表达和单个核细胞 mRNA 的表达水平。**结果:**①急性发作期哮喘患者 IL-4、IL-9、IL-21 在蛋白和基因水平上均显著高于缓解组,且差异具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。缓解组血清 IL-4、IL-9 水平高于对照组 ($P < 0.05$),并且 IL-4、IL-9 mRNA 水平显著高于对照组($P < 0.01$)。而血清 IL-21 以及 mRNA 水平在缓解组与对照组间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。②哮喘患者血清 IL-9 与 IL-4 水平呈正相关($P < 0.05$),IL-21 与 IL-4、IL-9 与 IL-21 间无明显相关性(P 均 > 0.05)。血清 IL-4、IL-9 水平均与患者 FEV1% 成负相关($P < 0.05$),与总 IgE 水平呈正相关($P < 0.05$)。而血清 IL-21 水平与 FEV1%、血清总 IgE 水平无明显相关性($P > 0.05$)。**结论:**Th2、Th9、cTfh 细胞特征细胞因子 IL-4、IL-9、IL-21 均参与了哮喘发病,检测 IL-4 和 IL-9 水平可评估哮喘病情发展状态,指导临床治疗。

[关键词] 哮喘;白细胞介素-4;白细胞介素-9;白细胞介素-21

[中图分类号] R562.25

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)08-1123-04

doi:10.7655/NYDXBNS20150814

Alteration of peripheral blood IL-4, IL-9, and IL-21 in patients with bronchial asthma

Pan Yuhong¹, Shen Weihong¹, Jiang Donglin¹, Su Qiang², Gong Fang^{1*}

(¹Department of Laboratory Medicine, ²Department of Respiratory Medicine, Wuxi No.3 Hospital, Wuxi 214041, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the alteration of peripheral blood interleukin(IL)-4, IL-9, and IL-21 in patients with bronchial asthma. **Methods:** Forty-eight asthma patients in acute stage, 41 patients in remission stage, and 48 sex and age paired healthy controls were enrolled in this study. The expression of IL-4, IL-9, and IL-21 from serum and peripheral blood mononuclear cells were analyzed by ELISA and real-time PCR. And the value of FEV1% and the expression level of serum IgE were detected by allergy method and ELISA respectively. **Results:** ①The mRNA and protein expression levels of IL-4, IL-9, and IL-21 were significantly increased in acute asthma patients compared with patients in remission group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Also the mRNA and protein expression levels of IL-4 and IL-9 were significantly higher in remission group than that of control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). But there was no significant difference in the mRNA and protein expression levels of IL-21 between remission group and control group ($P > 0.05$). ②In asthma patients, no correlation was found among the serum concentration of IL-4, IL-9 and IL-21, except of correlation between IL-9 and IL-4. The serum levels of IL-4 and IL-9 from asthma patients were positively correlated with the serum level of total IgE ($P < 0.05$) but negatively correlated with FEV1% ($P < 0.05$). But no obvious correlation was found between the serum concentration of IL-21 and the serum level of total IgE or FEV1% ($P > 0.05$). **Conclusion:** IL-4, IL-9, and IL-21 may play important roles in the pathogenesis of bronchial asthma. IL-4 and IL-9 monitoring allows for an assessment of the asthma status which is helpful to guide clinical treatment.

[Key words] asthma; IL-4; IL-9; IL-21

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(08):1123-1126]

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(81400021);江苏省自然科学基金(青年科技人才专项, BK20140125)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: gongfang2004@163.com

支气管哮喘是一种以 IgE 异常增高为特征的慢性气道炎症性疾病^[1],其确切病因至今尚不清楚。研究发现免疫功能异常是重要的致病因素^[2]。T 辅助细胞 9 (T helper 9 cell, Th9) 及循环滤泡辅助性 T 细胞 (circulating follicular helper T cells, cTfh) 是最近新发现的两群不同于 Th1、Th2 及 Th17 等的 CD4⁺ T 细胞亚群,其可能与变态反应性疾病的发病机制有关^[3-5]。Th9 细胞主要分泌白细胞介素 (interleukin, IL)-9,促进炎症的发生^[5]。cTfh 细胞在促进 B 细胞增殖、分化以及免疫球蛋白的类别转换中起着十分重要的作用^[6]。因此本研究将初步观察支气管哮喘患者体内 Th2、Th9、cTfh 细胞特征细胞因子 IL-4、IL-9、IL-21 的变化情况,探讨哮喘可能的免疫发病机制。

1 对象和方法

1.1 对象

89 例哮喘患者均来自 2013 年 3 月至 2014 年 8 月本院呼吸科门诊和住院患者。哮喘诊断标准参照 2008 年中华医学会呼吸病学分会哮喘学组制定的《支气管哮喘防治指南》^[7]。支气管哮喘定义为患者有明确过敏史 (接触或吸入某些致敏原,可致哮喘发作),或皮肤点刺试验阳性,或血清过敏原特异性抗体阳性。按患者症状分为急性发作组 (48 例) 和缓解组 (41 例)。选择年龄和性别相匹配的 48 例健康献血员为健康对照组。对所有研究对象进行肺功能检查,记录第 1 秒用力呼气容积 (FEV1) 占预计值的百分比 (FEV1%)。所有研究对象在入选前 1 周内未应用糖皮质激素或其他免疫抑制剂,1 周内无急性感染,无其他慢性病史。标本的采集均获得患者的知情同意,且本实验获南通大学第三附属医院医学伦理委员会的批准。

1.2 方法

1.2.1 血清总 IgE、IL-4、IL-9、IL-21 水平测定

抽取哮喘患者及健康对照组静脉血,室温放置 30 min 后,3 000 r/min,4℃ 离心 8 min,分离血清,置-80℃ 冻存。ELISA 法检测血清总 IgE 水平,试剂盒为上海生工公司。人 IL-4、IL-9、IL-21 ELISA 检测试剂盒分别购自美国 Biologend 公司、美国 PeproTech 公司和美国 R&D 公司,严格按说明书进行操作。

1.2.2 定量 PCR 检测 IL-4、IL-9、IL-21 mRNA 表达

抽取哮喘患者及健康对照组静脉血,肝素抗凝,采用淋巴细胞分离液 (北京达科为公司) 分离外周血单个核细胞 (PBMC),以 PBS 洗涤后重悬备用。使用 RNeasy Mini Kits (Qiagen 公司,德国) 抽提

RNA,再通过逆转生成 cDNA,均按说明书操作。使用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (TaKaRa 公司,大连) 进行实时荧光定量 PCR。PCR 反应体系为 25 μL,其中 SYBR[®] Ex Taq[™] II (2×) 12.5 μL,正向引物和反向引物 (10 μmol) 各 1 μL,用灭菌去离子水补至 25 μL。实时荧光定量 PCR 在 LightCycler 荧光定量 PCR 仪 (Roche Diagnostics 公司,德国) 上进行。同时对目的基因和内参基因 (β-actin) 进行荧光定量 PCR 扩增。IL-4、IL-9、IL-21 基因以及内参引物序列由上海英骏公司合成 (表 1)。利用 Ct 值,计算 3 种细胞因子基因的相对表达量,其计算公式为: 相对 mRNA 表达量 = 2^{-ΔCt} × 100%,其中,ΔCt = Ct (待测基因) - Ct (β-actin)。

表 1 IL-4、IL-9、IL-21 基因及内参引物

Table 1 IL-4, IL-9, IL-21 and β-actin primer sequences

名称	序列 (5'→3')
IL-4	F: CACAACCTGAGAAGGAAACCTTCTG R: CTCTCTCATGATCGTCTTTAGCCTTTC
IL-9	F: GGGATCCTGGACATCAACTTC R: GAAGCATGGTCTGGTGCAGTT
IL-21	F: CACAGACTAACATGCCCTTCAT R: GAATCTTCACTTCCGTGTGTCTT
β-actin	F: TGGCACCCAGCACAATGAA R: CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA

1.3 统计学方法

数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,所有资料处理均用 SPSS19.0 软件进行分析。经方差齐性检验后,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK-*q* 检验,细胞因子与哮喘患者 FEV1%、血清总 IgE 水平采用 Pearson 相关性分析。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 哮喘患者血清 IL-4、IL-9、IL-21 水平

急性发作期哮喘患者血清 IL-4、IL-9、IL-21 水平均显著高于缓解组,且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。缓解组血清 IL-4、IL-9 水平高于对照组 ($P < 0.05$),而血清 IL-21 水平在缓解组与对照组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$,表 2)。

表 2 各组血清 IL-4、IL-9、IL-21 表达水平

Table 2 Serum levels of IL-4, IL-9 and IL-21 of patients

with asthma and control group (ng/L, $\bar{x} \pm s$)				
组别	<i>n</i>	IL-4	IL-9	IL-21
急性发作组	48	203.8 ± 25.5 ^{ab}	251.2 ± 40.3 ^{ab}	29.1 ± 3.4 ^{ab}
缓解组	41	135.6 ± 12.3 ^a	173.9 ± 28.7 ^a	16.8 ± 2.6
健康对照组	48	55.4 ± 7.2	62.6 ± 15.7	15.4 ± 1.3

与健康对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与缓解组比较, ^b $P < 0.05$ 。

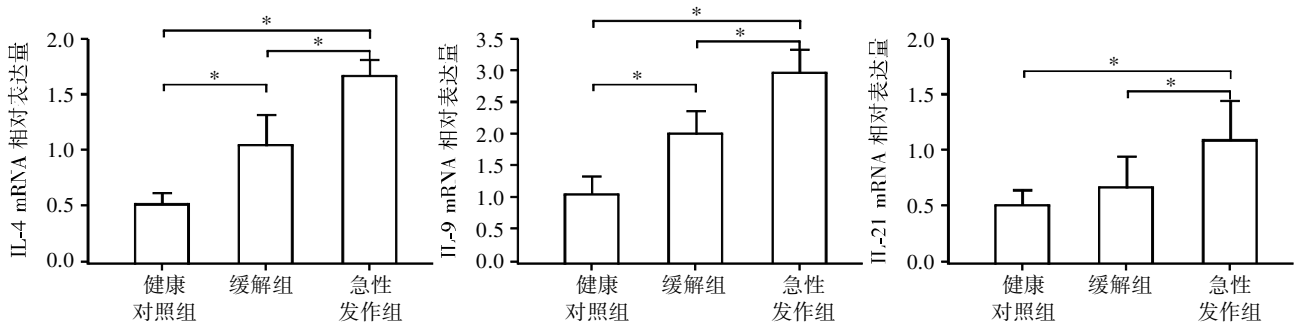
2.2 哮喘患者血清 IL-4、IL-9、IL-21 mRNA 表达水平

急性发作期哮喘患者单个核细胞 IL-4、IL-9、IL-21 mRNA 水平均显著高于缓解组,且差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。缓解组 IL-4、IL-9 mRNA 水平高于对照组 ($P < 0.01$),而血清 IL-21 mRNA 水平在缓解组与对照组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$,图 1)。

2.3 哮喘患者血清 IL-4、IL-9、IL-21 之间及与实验室指标的关系

哮喘患者血清 IL-4、IL-9 与 IL-21 水平明显升

高,经直线相关 Pearson 分析发现 IL-9 与 IL-4 呈正相关($r = 0.582, P < 0.01$);IL-21 与 IL-4,IL-9 与 IL-21 间无明显相关性(r 值分别为 0.212、0.355, P 均 > 0.05)。对哮喘患者血清 IL-4、IL-9、IL-21 水平与患者 FEV1%、血清总 IgE 水平的相关性进行统计学分析发现,血清 IL-4、IL-9 表达水平均与患者 FEV1%成负相关(r 值分别为 -0.631、-0.548, P 均 < 0.05),与总 IgE 水平呈正相关(r 值分别为 0.615、0.522, P 均 < 0.05)。而血清 IL-21 水平与 FEV1%、血清总 IgE 水平无明显相关性(表 3)。



* $P < 0.01$ 。

图 1 哮喘患者 IL-4、IL-9、IL-21 mRNA 表达水平

Figure 1 The mRNA expression level of IL-4, IL-9 and IL-21 of patients with asthma and control group

表 3 哮喘患者血清 IL-4、IL-9、IL-21 水平与实验室指标的相关性

Table 3 The correlation between the serum level of IL-4, IL-9, IL-21 and FEV1% , serum IgE in asthma patients

指标	FEV1%		IgE	
	r 值	P 值	r 值	P 值
IL-4	-0.631	< 0.05	0.615	< 0.05
IL-9	-0.548	< 0.05	0.522	< 0.05
IL-21	-0.357	> 0.05	0.382	> 0.05

3 讨论

支气管哮喘是一种慢性气道炎症性疾病,有多种炎症细胞和炎症介质参与其过程^[1]。近年来世界各地哮喘的发病率、病死率有逐渐增高的趋势。在我国,哮喘也是一种常见病、多发病。据调查,我国至少有 2 000 万以上哮喘患者。哮喘不仅严重危害人类身体健康,且难以根治易反复发作,给患者带来了巨大的经济负担和精神压力。众所周知,Th1 和 Th2 失衡,且向 Th2 偏移是经典的哮喘免疫学致病机制。Th9、cTfh 细胞的发现改变了传统观念,解释了仅用 Th2 不能解释的现象,为哮喘发病机制研究提供了新的研究方向^[3-5]。

IL-9 是 Th9 细胞所分泌的代表性细胞因子。IL-9 不仅能促进 Th2 类细胞因子的表达,加强其在哮喘中的致敏作用^[8],IL-9 还可直接作用于 B 细胞,在 IgE 合成的调控中发挥重要作用^[8]。本研究结果显示,无论是急性发作阶段还是缓解阶段,哮喘患者 IL-9 在蛋白和基因水平上均显著高于对照组。并且 IL-9 表达水平均与患者 FEV1%成负相关,与总 IgE 水平呈正相关。这与国内学者报道一致^[9]。本实验结果还发现哮喘患者血清 IL-9 水平与 IL-4 呈正相关,表示两者具有相关性,说明 IL-9 与 IL-4 共同参与了哮喘呼吸道炎症的病理生理过程,包括嗜酸性粒细胞浸润、黏液过度分泌、气道反应性及 IgE 的合成等。

IL-21 是 cTfh 细胞发挥功能的最重要的细胞因子^[10]。IL-21 能诱导所有 B 细胞亚群分化为抗体分泌细胞,在 B 细胞对 T 细胞依赖抗原的初始免疫应答、再次免疫应答以及体液免疫长期维持中都发挥了重要作用^[11-12]。新近相关研究表明 IL-21 参与调控 IgE^[12-14]。来自小鼠的研究发现 IL-21 能下调 IgE 水平^[12]。IL-21 受体基因敲除小鼠体内 IgG1 降低,而 IgE 水平升高,并且用 T 细胞相关抗原免疫这些小鼠,发现抗原特异性 IgG1 降低,而抗原特异性 IgE 水平升高^[12]。体内注射 IL-21 重组蛋白也可

以明显降低过敏性鼻炎小鼠体内抗原特异性 IgE 水平^[12]。但是,在人的研究中却得出了截然不同的结果^[13-14]。在体外细胞培养中发现,IL-21 能显著促进人PBMC、初始 B 细胞或记忆性 B 细胞分泌 IgE 水平^[13],并且 IL-21 和 IL-4 还具有协同作用^[14]。在 IL-21 和 IL-4 共同作用下,B 细胞分泌 IgE 的量是这 2 种细胞因子单独作用时的 10 倍以上。然而上述研究结果是基于体外培养体系,生理情况下两者关系如何目前仍不得而知。本课题组前期实验发现,哮喘患者血清 IL-4、IL-21 含量均高于正常对照^[15]。本研究进一步在基因水平分析结果显示,与健康对照组相比,哮喘患者单个核细胞 IL-4、IL-21 mRNA 的相对表达量均显著升高,进一步从基因水平上证实了 IL-4、IL-21 参与哮喘疾病进程,为后续研究其功能提供了基础。本研究还发现,哮喘患者 IL-4 与 IgE 呈一致性变化,但与 FEV1%呈反向变化。而血清 IL-21 水平与 FEV1%、血清总 IgE 水平无明显相关性。由于 IgE 和肺功能是评价哮喘的传统公认指标,本研究结果也在一定意义上说明,IL-4 和 IL-9 可以用于评价哮喘的程度。本研究结果还发现 IL-21 与 IL-4, IL-9 与 IL-21 间无明显相关性,可以解释为体内细胞因子水平是个异常复杂的调控网络,一种细胞因子往往受多种细胞及其产生的细胞因子调控。因此在这种慢性炎症疾病中,Th9、cTfh 和 Th2 细胞大量并存所产生的是相互拮抗还是协同作用,有待于进一步的研究证明。

综上所述,哮喘患者 IL-4、IL-9、IL-21 在基因和蛋白水平上均高于正常人,并且血清 IL-4、IL-9 水平和哮喘症状相关。IL-4、IL-9、IL-21 三种细胞因子均参与了哮喘疾病的发生发展,检测 IL-4、IL-9 水平可评估哮喘病情发展状态,指导临床治疗。

[参考文献]

- [1] Kuhl K, Hanania NA. Targeting IgE in asthma[J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2012, 18(1): 1-5
- [2] Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma[J]. *Nat Med*, 2012, 18(5): 673-683
- [3] Kemeny DM. The role of the T follicular helper cells in allergic disease[J]. *Cell Mol Immunol*, 2012, 9(5): 386-389
- [4] Gong F, Su Q, Jiang D, et al. High frequency of circulating follicular helper T cells in patients with bronchial asthma[J]. *Clin Lab*, 2014, 60(6): 963-968
- [5] Schmitt E, Klein M, Bopp T. Th9 cells, new players in adaptive immunity[J]. *Trends Immunol*, 2014, 35(2): 61-68
- [6] Shulman Z, Gitlin AD, Weinstein JS, et al. Dynamic signaling by T follicular helper cells during germinal center B cell selection[J]. *Science*, 2014, 345(6200): 1058-1062
- [7] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2008, 31(3): 177-185
- [8] Kim MS, Cho KA, Cho YJ, et al. Effects of interleukin-9 blockade on chronic airway inflammation in murine asthma models[J]. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2013, 5(4): 197-206
- [9] 邢军超, 倪兵. Th9 与哮喘[J]. *免疫学杂志*, 2011, 27(5): 451-454
- [10] Lüthje K, Kallies A, Shimohakamada Y, et al. The development and fate of follicular helper T cells defined by an IL-21 reporter mouse[J]. *Nat Immunol*, 2012, 13(5): 491-498
- [11] Desjardins M, Mazer BD. B-cell memory and primary immune deficiencies: interleukin-21 related defects[J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2013, 13(6): 639-645
- [12] Ozaki K, Spolski R, Feng CG, et al. A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production[J]. *Science*, 2002, 298(5598): 1630-1634
- [13] Kobayashi S, Haruo N, Sugane K, et al. Interleukin-21 stimulates B-cell immunoglobulin E synthesis in human beings concomitantly with activation-induced cytidine deaminase expression and differentiation into plasma cells[J]. *Hum Immunol*, 2009, 70(1): 35-40
- [14] Avery DT, Ma CS, Bryant VL, et al. STAT3 is required for IL-21-induced secretion of IgE from human naive B cells[J]. *Blood*, 2008, 112(5): 1784-1793
- [15] 龚芳, 苏强, 申卫红, 等. 支气管哮喘患者外周血 CD4⁺CXCR5⁺滤泡辅助性 T 细胞样细胞的变化及其意义[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2013, 33(1): 102-104

[收稿日期] 2014-12-17