

哮喘患者外周血单个核细胞 TIM-3 及 Galectin-9 的表达与临床意义*

梁 涛, 张 杨, 许依婷, 王 宁, 蔡鹏程, 王晓蓓, 胡丽华

(华中科技大学同济医学院附属协和医院检验科, 武汉 430022)

摘要:目的 探讨 T 细胞免疫球蛋白黏蛋白 3(TIM-3)和半乳糖凝集素-9(Galectin-9)基因在急性发作期哮喘患者外周血单个核细胞的表达及临床意义。方法 收集 2014 年 1 月~10 月门诊急性发作期哮喘患者 60 例(排除不符合者 15 例, 确定入选 45 例)及 30 例健康体检者(对照组), 以实时定量 RT-PCR 法分别对哮喘患者及体检者外周血单个核细胞(PB-MCs)中的 TIM-3, Galectin-9 和 IFN- γ 的表达情况进行同步测定, 初步探讨 TIM-3, Galectin-9 在哮喘发病中的潜在作用。结果 急性发作期哮喘患者 PBMCs 中 TIM-3, Galectin-9 及 IFN- γ mRNA 水平平均分别高于健康对照组($U=458.5, P=0.019; U=437.5, P=0.010; U=260, P<0.001$), 二者间的差异均有统计学意义。结论 TIM-3/Galectin-9 可能参与了哮喘的发生、发展, TIM-3 或(和)Galectin-9 有可能为治疗哮喘提供一个新的靶点。

关键词:哮喘; T 细胞免疫球蛋白黏蛋白 3; 半乳糖凝集素-9

中图分类号:R562.25; R392.11 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2016)01-052-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2016.01.014

Express of TIM-3 and Galectin-9 Genes in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with Asthma

LIANG Tao, ZHANG Yang, XU Yi-ting, WANG Ning, CAI Peng-cheng, WANG Xiao-bei,

HU Li-hua (*Department of Clinical Laboratory, Union Hospital,*

Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract: **Objective** To investigate the levels of the mRNA expression of TIM-3 and Galectin-9 in peripheral blood monocytes (PBMCs) of acute exacerbation asthma patients and their clinical significances. **Methods** 60 patients with acute exacerbation asthma (eliminating 15 cases of non-conform to the regulations) and 30 cases of healthy subjects were collected from January to October of 2014. Used fluorescence quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction to measure the mRNA expression of TIM-3 and Galectin-9 in PBMCs of patients with asthma and healthy controls. **Results** The expression of TIM-3, Galectin-9 and IFN- γ mRNA in the PBMCs from acute exacerbation asthma patients were all abnormally higher than healthy controls ($U=458.5, P=0.019; U=437.5, P=0.010; U=260, P<0.001$). There were statistically significant differences between them. **Conclusion** TIM-3/Galectin-9 pathway may participate in the occurrence, development of asthma. TIM-3 or (and) Galectin-9 may prove to be an important target for treatments to asthma.

Keywords: asthma; TIM-3; galectin-9

哮喘是一种由遗传和环境因素共同作用而致的以气道高反应性为特征的慢性气道炎症性疾病。尽管其发病的确切机制目前仍需深入研究, 但近几年的研究表明, 在哮喘患者体内存在 B 细胞活化产生自身抗体, 具有辅助性 T 淋巴细胞(Th)1 和 Th2 细胞因子比例失衡, Th2 型细胞因子占主导地位的免疫学特征^[1]。T 细胞免疫球蛋白黏蛋白 3(TIM-3)是近年来研究热点 TIM 基因家族中的一员, 它最初被发现优势表达在小鼠活化的 Th1 细胞表面并通过 TIM-3, 半乳糖凝集素-9(Galectin-9)参与 Th1 反应的负性调控^[2]。随后发现, TIM-3

广泛分布于多种免疫细胞表面, 尤其可以刺激肥大细胞产生 Th2 型细胞因子^[3]。鉴于 TIM-3 具有调节 Th1/Th2 免疫平衡的潜在作用, 我们初步对哮喘患者外周血单个核细胞(PBMCs)中 TIM-3 及 Galectin-9 的表达水平进行检测, 以期能为哮喘的发病机制和靶向治疗奠定前期实验基础。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 2014 年 1 月~10 月在华中科技大学同济医学院附属协和医院哮喘门诊部确诊的急性发作期哮喘患者 60 例, 哮喘诊断参照 2013 年中华医学会呼吸病学分会哮喘组编制的

* 基金项目: 武汉市科技攻关计划项目, 项目编号: 2013060602010235。

作者简介: 梁 涛(1983—), 男, 硕士研究生, 技师, 从事临床免疫研究。

通讯作者: 胡丽华, Tel: 027-85726311, E-mail: lihuahu@hust.edu.cn。

《中国支气管哮喘防治指南(基层版)》^[4]。采集前所有患者均参与《哮喘问卷调查表》的信息咨询及知情签字。结合检查结果及病人咨询排除并发心脏病患者5例、慢性阻塞性肺气肿患者5例、急性肺炎患者5例,最终入选45例[年龄42(17~60)岁;男性17例,女性28例]。入选的45例哮喘患者中,伴有哮喘家族史6例,伴有过敏性鼻炎17例,诱发因素多为天气变化而致感冒,少数为运动、情绪激动或气味诱发。收集健康体检者30例[年龄33(21~58)岁;男性15例,女性15例]作为健康对照组,无过敏性疾病史。

1.2 试剂和仪器 人 Ficoll 淋巴细胞分离液购自中国科学院天津试剂厂; Trizol 购自 invitrogen 公司; PrimerScript RT Master Mix 及 SYBR® Premix Ex Taq™ II 购自 TaKaRa 公司; Stratagene Mx3000P 荧光定量 PCR 仪。

1.3 方法

1.3.1 标本采集与处理:所有研究对象均抽取空腹静脉血, EDTA 抗凝, 取 2 ml 用淋巴细胞分离液分离出 PBMCs 后, 立即提取总 RNA。

1.3.2 TIM-3 及 Galectin-9 mRNA 实时定量检测:以 Trizol 试剂提取总 RNA, 紫外分光光度计测定溶液的吸光度(A), $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 在 1.8~2.0 之间, 并计算 RNA 浓度。按试剂说明书进行操作, 将 RNA 逆转录成 cDNA。实时定量引物由武汉擎科创新生物科技有限公司合成, 以 GAPDH 为内参, 其上游引物序列为: 5'-GAAGGTGAAG-GTCGGAGTC-3', 下游引物: 5'-GAAGATGGT-GATGGGATTTC-3'; TIM-3 上游引物: 5'-CA-GATACTGGCTAAATGGGGAT-3', 下游引物:

5'-ACCTTGGCTGGTTTGTATGAC-3'; Galectin-9 上游引物: 5'-TTCAGCCTGCCTTCTCCAC-3', 下游引物: 5'-GGATGACTGTCTGGGTA-ATGG-3'; IFN- γ 上游引物: 5'-GAAGAATTG-GAAAGAGGAGAGTGA-3', 下游引物: 5'-TG-GACATTCAAGTCAGTTACCG-3'。实时荧光定量 PCR 扩增反应体系总体积 20 μ l, 反应体系含 10 μ l SYBR® Premix Ex Taq™ II (2 \times), 0.8 μ l 引物 (10 pmol/ μ l), 0.4 μ l ROX Reference Dye II (50 \times), 2 μ l DNA 模板, 6 μ l 灭菌蒸馏水。扩增条件为: 预变性: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 1 个循环; Real-time PCR 反应: 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 20 s, 40 个循环。

1.3.3 结果判读:每次扩增均设立内参和阴性对照, 阴性对照模板用灭菌蒸馏水代替。每个样本设复孔检测, 所有 PCR 扩增产物均经溶解曲线分析。采用比较 $2^{-\Delta C_t}$ 法进行相对定量。

1.4 统计学分析 各检测指标数据若符合正态性分布, 则以均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 以单因素方差分析组间差异; 反之, 以中位数表示, 以 Mann-Whitney U 非参数检验分析组间差异。采用 SPSS17.0 软件进行分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 哮喘组与健康对照组 TIM-3, Galectin-9 及 IFN- γ mRNA 表达水平比较 急性发作期哮喘患者 PBMCs 中 TIM-3, Galectin-9 及 IFN- γ mRNA 水平均分别高于健康对照组 ($U=458.5, P=0.019; U=437.5, P=0.010; U=260, P<0.001$), 二者间的差异均有统计学意义, 见图 1。

3 讨论 哮喘是一种伴有显著多基因遗传倾向的

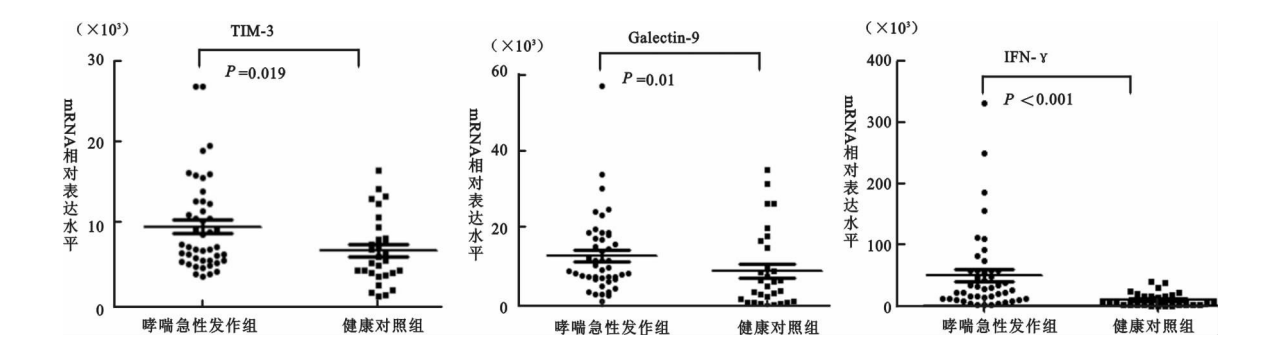


图1 哮喘患者与健康对照组 PBMCs 中 TIM-3, Galectin-9 及 IFN- γ mRNA 表达水平比较

一种慢性过敏性气道炎症性疾病。尽管哮喘发生的确切机制目前仍在深入研究, 但既往研究表明在哮喘患者体内存在 B 细胞过度活化产生自身抗体, 具有辅助性 T 淋巴细胞(Th)1 和 Th2 细胞因子比例失衡, Th2 型细胞因子占主导地位的免疫学特征^[1], 增强或逆转哮喘患者体内 Th2 主导优势

会导致病情的加重或缓解。因此寻求调控 Th1 或 Th2 细胞免疫平衡的靶分子显得尤为关键。

TIM-3 是 TIM 基因家族中的重要一员, 早期被视为选择性表达于 Th1 型细胞表面, 研究的重点多集中于 TIM-3 在适应性免疫应答中的作用, 而近几年的研究发现 TIM-3 广泛表达于固有免疫

细胞,如DCs,巨噬细胞、肥大细胞,此外也表达于Th17细胞、CD8⁺T细胞等^[5],TIM-3在固有免疫中同样起着重要的作用。Galectin-9作为TIM-3的重要配体,主要在免疫系统组织中表达,如胸腺、淋巴结、脾脏及骨髓,此外也在内皮细胞、成纤维细胞等表达。既往研究表明TIM-3通过TIM-3/Galectin-9通路负性调控Th1型细胞参与哮喘的发生、发展。尽管TIM-3已成为当前研究的热点,但在哮喘中的潜在作用研究仍有限。Kearley等^[6]在以卵清蛋白诱导的哮喘小鼠模型中,给予抗-Tim-3单克隆抗体进行体内干预后发现哮喘小鼠气道高反应性受到显著控制,同时伴有局部嗜酸性细胞和Th2型细胞的减少,这暗示抗-Tim-3抗体阻断了Tim-3/Galectin-9这一负性调控通路,从而使Th1型细胞发生免疫逃逸,达到Th2向Th1偏移的目的。同样,Katoh等^[7]在以尘螨过敏原和聚肌胞苷酸(PolyIc)诱导的小鼠慢性哮喘模型中,鼻内给予重组Galectin-9可降低其气道高反应性,并降低巨噬细胞IFN- γ ,TNF- α 等炎症因子的表达水平。国内学者张志英等^[8]以卵清蛋白诱导哮喘模型后,以RT-PCR法检测PPAR- γ 激动剂罗格列酮(ROS)干预治疗前后哮喘小鼠肺组织中Tim-3及Galectin-9的表达,发现干预治疗前二者均有明显升高,且其改变与Th1/Th2细胞因子表达具有相关性,干预后二者表达下调。以上这些动物实验的研究均表明Tim-3和Galectin-9在哮喘小鼠哮喘的发生、发展中起着重要的作用。然而在哮喘患者体内TIM-3及Galectin-9的表达如何,尤其是Galectin-9的表达,其相关报道还较少。

本研究采用实时定量PCR法检测了急性发作期哮喘患者及健康对照组外周血单个核细胞(PBMCs)中TIM-3,Galectin-9及IFN- γ mRNA的表达水平。结果发现,在急性发作期哮喘患者PBMCs中TIM-3,Galectin-9及IFN- γ mRNA水平要高于健康对照组,二者间差异有统计学意义($U=458.5, P=0.019; U=437.5, P=0.010; U=260, P<0.001$)。其中TIM-3 mRNA的表达与国内部分同行的研究结果相一致^[9,10]。哮喘患者体内高表达的Galectin-9一方面可能与TIM-3结合,通过Ca²⁺-钙蛋白酶-半胱天冬酶(caspase)-1途径诱导活化的CD4⁺T细胞凋亡;另一方面,以非TIM-3依赖的方式通过固有免疫细胞发挥潜在的调控细胞免疫的作用,但具体的机制作用仍需深入研究。因本研究仅从mRNA水平上初步探讨了TIM-3及Galectin-9在急性发作期哮喘患者中的表达,在后续研究中,我们需要进一步探讨TIM-3/

Galectin-9信号调节IL-23/Th17轴在抑制哮喘气道炎症中的潜在作用。

参考文献:

- [1] Wang LJ, Gao SS, Xu W, et al. Allergic asthma accelerates atherosclerosis dependent on Th2 and Th17 in apolipoprotein E deficient mice[J]. J Mol Cell Cardiol, 2014, 72(7): 20-27.
- [2] Zhu C, Anderson AC, Schubart A, et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity[J]. Nat Immunol, 2005, 6(12): 1245-1252.
- [3] Li ZH, Ju ZL, Frieri M. The T-cell immunoglobulin and mucin domain(Tim) gene family in asthma, allergy, and autoimmunity [J]. Allergy Asthma Proc, 2013, 34(1): e21-e26.
- [4] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组, 中华医学会全科医学分会. 中国支气管哮喘防治指南(基层版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2013, 36(5): 331-336.
- [5] Yeung MY, McGrath M, Najafian N. The emerging role of the TIM molecules in transplantation[J]. Am J Transplant, 2012, 11(10): 2012-2019.
- [6] Kearley J, McMillan SJ, Lloyd CM. Th2-driven, allergen induced airway inflammation is reduced after treatment with anti-Tim-3 antibody in vivo[J]. J Exp Med, 2007, 204(6): 1289-1294.
- [7] Katoh S, Shimizu H, Obase Y, et al. Preventive effect of galectin-9 on double-stranded RNA-induced airway hyperresponsiveness in an exacerbation model of mite antigen-induced asthma in mice[J]. Exp Lung Res, 2013, 39(10): 453-462.
- [8] 张志英, 栾 斌, 冯晓霞. Galectin-9及其受体Tim-3在哮喘小鼠肺组织中的表达[J]. 中国当代儿科杂志, 2011, 13(5): 406-410.
Zhang ZY, Luan B, Feng XX. Expression of galectin-9 and Tim-3 in lungs of mice with asthma[J]. Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13(5): 406-410.
- [9] 武其文, 浦 春, 方 芳. 变应性哮喘患者外周血单个核细胞 Tim-1 mRNA 及 Tim-3 mRNA 表达及意义[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(16): 1971-1973, 1976.
Wu QW, Pu C, Fang F. Expression of Tim-1 mRNA and Tim-3 mRNA in PBMCs from atopic asthma patients and its clinical significance[J]. Lab Med Clin, 2012, 9(16): 1971-1973, 1976.
- [10] 陆小霞, 胡维琨, 熊盛道, 等. 哮喘患者诱导痰炎性细胞中 Tim-3 mRNA 表达的研究[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2009, 38(3): 301-304.
Lu XX, Hu WK, Xiong SD, et al. Tim-3 mRNA expression in induced sputum from asthmatic patients [J]. Acta Med Univ Sci Technol Huazhong, 2009, 38(3): 301-304.