

原发性胆汁性肝硬化患者 外周血单个核细胞 IL-23p19 表达增高及意义*

钱 琤¹, 谷明莉², 陈 燕², 秦 琴², 任传路¹, 邓安梅²

(1. 解放军第 100 医院检验科, 江苏苏州 215007;

2. 解放军第二军医大学附属长海医院实验诊断科, 上海 200433)

摘要:目的 研究 IL-23p19 在原发性胆汁性肝硬化(PBC)外周血单个核细胞中的表达及意义。方法 采用实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测了 60 例 PBC 患者及 60 例疾病对照和 60 例健康对照外周血单个核细胞(PBMC)中 IL-23p19 基因表达量,应用统计学软件分析 PBC IL-23p19 基因表达与疾病分期及肝功能指标间的相关性。结果 PBC 患者外周血 PBMC 中 IL-23p19 基因表达较健康对照和疾病对照均明显增高,且在疾病的 I/II 期表达高于 III/IV 期;IL-23p19 表达与谷氨酰转氨酶(GGT)正相关。结论 IL-23p19 基因在 PBC 中表达升高,通过促炎反应参与 PBC 发病。

关键词:原发性胆汁性肝硬化;白介素 23 p19;自身免疫性疾病

中图分类号:R575. 22;R392. 11 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2016)02-020-03

doi: 10. 3969/j. issn. 1671-7414. 2016. 02. 006

High Expression of IL-23p19 in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Patients with Primary Biliary Cirrhosis and Its Clinical Significance

QIAN Cheng¹, GU Ming-li², CHEN Yan², QIN Qin², REN Chuan-lu¹, DENG An-mei²

(1. Department of Laboratory Medicine, No. 100 Hospital of PLA, Jiangsu Suzhou 215007, China; 2. Laboratory Diagnostics, the PLA Second Military Medical University of Affiliated Changhai Hospital, Shanghai 200433, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of IL-23p19 in peripheral blood of patients with primary biliary cirrhosis (PBC) 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 mRNA in the peripheral blood of 60 PBC patients, 60 healthy controls, and 60 patients with hepatitis related cirrhosis. The correlation between the expression of IL-23p19 mRNA with the staging and hepatic functions of PBC patients was analyzed statistically. **Results** The IL-23p19 mRNA level in PBMC of PBC was significantly higher than those in healthy controls and hepatitis related cirrhosis. We also found that the IL-23p19 mRNA level in PBC patients at I, II stages were significantly higher than those at III, IV stages. The IL-23p19 mRNA level in PBC patients were positively correlated with the serum gamma glutamyltransferase level. **Conclusion** The IL-23p19 gene expression of PBMC in PBC patients was significantly elevated, indicating that IL-23p19 play an important role in the pathogenesis of PBC by promoting inflammation.

Keywords: primary biliary cirrhosis; IL-23p19; autoimmune diseases

原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)是一种以肝内中小胆管上皮细胞损伤为主要特征的自身免疫性肝病,其发病机制尚不清楚。一般认为是机体自身免疫耐受被打破,免疫系统对自身组织产生免疫应答,从而造成对肝内中小胆管的攻击所致^[1]。IL-23 是一个由 IL-23p19 和 IL-12p40 组成的异源二聚体分子,具有十分复杂的生物学功能,在抗感染免疫、抗肿瘤免疫以及自

身免疫病的发病中发挥着重要的作用^[2,3]。但关于 IL-23p19 分子的基因表达水平与 PBC 是否存在相关性,迄今国内外未见报道。本研究旨在分析 PBC 患者外周血单个核细胞(PBMC)内 IL-23p19 的基因表达,探讨 IL-23p19 表达量与 PBC 发病的相关性。

1 材料与方法

1.1 研究对象 第二军医大学长海医院和解放军

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

作者简介:钱 琤(1978-),女,医学博士,主治医师,从事自身免疫病及机制研究,E-mail:qiancheng824@163.com。

通讯作者:邓安梅,教授,E-mail:amdeng70@163.com。

任传路,副主任医师,E-mail:clu__ren@126.com。

第100医院PBC患者共60例,其诊断标准参照美国肝病协会2000年制定的PBC诊疗指南。其中,男性3例,女性57例;根据组织学病变共分为4期,I期25例;II期20例;III期8例;IV期7例。疾病对照组肝炎后肝硬化患者60例,男性42例,女性18例。另从同期来院体检者中选择60名健康者作为健康对照。本研究经过伦理委员会批准,所有受试对象均签署知情同意书。

1.2 试剂和仪器 淋巴细胞分离液(美国sigma公司);Trizol(美国Invitrogen公司);反转录试剂盒, Taqman Universal PCR Master Mix, ABI prism7500 荧光定量PCR仪(美国ABI公司);全自动生化分析仪(Beckman CX4)。

1.3 方法

1.3.1 血液标本的采集与PBMC的分离:采集空腹静脉血5ml,置于枸橼酸钠抗凝剂的无菌试管中。采用密度梯度离心法分离PBMC(sigma)。

1.3.2 RNA抽提与反转录:采用Trizol法抽提细胞总RNA,将其反转录为cDNA, -20℃冰箱备用。

1.3.3 定量PCR: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。IL-23p19引物序列为:上游5'-CAGCTTCATGCCTCCCTACTG-3';下游5'-AGGCTTGGAATCTGCTGAGTCT-3',探针FAM-AACTCCTGCAGCCTGA-MGB;内参18s rRNA上游5'-ACATCCAAGGAAGGCAGCAG-3';下游5'-TTCGTCACTACCTCCCCGG-3';FAM-CGCGCAAATTACCCACTCCCGA-TAM-RA。将定量PCR结果以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示。 $\Delta\Delta CT = [\Delta CT(\text{患者})] - [\Delta CT(\text{对照})]$, $\Delta CT = [CT(\text{靶基因})] - [CT(\text{内参基因})]$ 。

1.3.4 临床实验室指标的检测:采用全自动生化分析仪,测定PBC患者ALP,GGT,TBIL,ALT和AST水平。并将IL-23p19表达水平ALP,GGT,TBIL,ALT和AST以及疾病的分期和Mayor Score进行相关性分析。

1.4 统计学分析 采用Graphpad prism5.0统计软件进行统计学分析。多组资料的比较采用方差分析检验,相关性分析采用pearson法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PBC患者PBMC中IL-23p19表达 结果显示,PBC患者中PBMC IL-23p19 mRNA相对表达量显著高于正常对照(9.37 ± 3.05 vs 1.00 ± 0.08 , $q = 34.7$, $P < 0.01$)和疾病对照组肝炎后肝硬化(9.37 ± 3.05 vs 2.81 ± 1.08 , $q = 27.2$, $P <$

0.01),差异均有统计学意义,见图1。

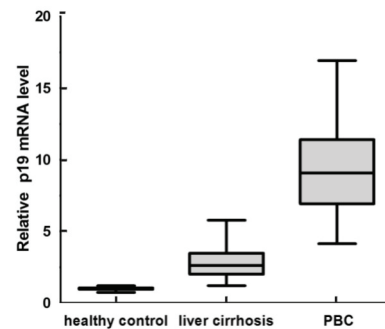


图1 不同组别PBMC中IL-23p19 mRNA水平

2.2 PBC患者PBMC中IL-23p19mRNA分期表达结果 不同分期的PBC患者IL-23p19的表达有差异,IL-23p19相对表达量分别为I期 8.61 ± 2.17 ;II期 12.31 ± 2.25 ;III期 7.02 ± 1.80 ;IV期 5.72 ± 1.12 ,见图2。与I期比较,II期IL-23p19基因表达相对升高($q = 8.429$, $P < 0.05$),IV期相对降低($q = 4.620$, $P < 0.05$);与II期比较,III期和IV期表达降低(II期 vs III期, $q = 8.650$, $P < 0.05$; II期 vs IV期, $q = 10.260$, $P < 0.05$)。

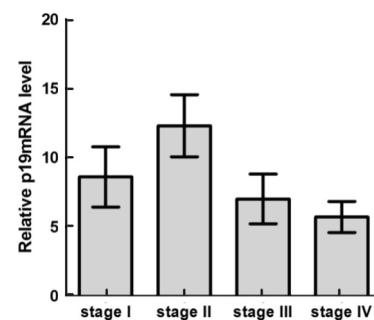


图2 不同疾病分期PBC患者IL-23p19水平比较

2.3 PBC患者外周血PBMC中IL-23p19表达与患者各临床指标的相关性分析 PBC患者PBMC中IL-23p19与血清GGT呈正相关($r = 0.5062$, $P < 0.01$)。IL-23p19mRNA的表达量与ALP, TBIL, ALT和AST以及Mayor Score不相关,见图3。

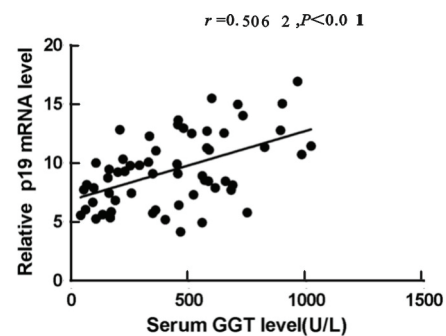


图3 PBC患者外周血PBMC中IL-23p19水平与GGT的相关性

3 讨论 原发性胆汁性肝硬化 (下转25页)

- tory Medicine, 2014, 29(3):141-143.
- [6] 丁欢,曹相原,马希刚,等.脓毒症内皮细胞损伤与炎症、凝血相关性研究[J].中华急诊医学杂志,2013,22(5):482-486.
- Ding H, Cao XY, Ma XG, et al. Endothelial cell injury correlates with inflammatory cytokine and coagulation in the patients with sepsis[J]. Chinese Journal of Emergency Medicine, 2013, 22(5):482-486.
- [7] 杜会双,王志刚,王丽娟,等.肺感染患者C反应蛋白和降钙素原检测的价值[J].标记免疫分析与临床,2015,22(1):23-24,33.
- Du HS, Wang ZG, Wang LJ, et al. The value of the C-reactive protein and procalcitonin detection in patients with pulmonary infection[J]. Labeled Immunoassays and Clinical Medicine, 2015, 22(1):23-24, 33.
- [8] Suarez-de-la-Rica A, Maseda E, Anillo V, et al. Biomarkers (Procalcitonin, C Reactive Protein, and Lactate) as predictors of mortality in surgical patients with complicated intra-abdominal infection[J]. Surg Infect (Larchmt), 2015, 16(3):346-351.
- [9] 罗华,蔡文训,张卫星,等.综合ICU感染患者降钙素原水平的影响因素及相关性分析[J].中国急救医学,2013,33(1):28-32.
- Luo H, Cai WX, Zhang WX, et al. Influencing factors of procalcitonin level of infected patients in Intensive Care Unit[J]. Chinese Journal of Critical Care Medicine, 2013, 33(1):28-32.
- 收稿日期:2015-08-02 修回日期:2015-11-11

(上接21页)(PBC)是一种原因不明的胆汁淤积性自身免疫性肝病,以小叶内和间隔小胆管损伤为主要特征,并可进一步发展为肝硬化和肝衰竭。PBC的病因和发病机制尚不明确,可能与免疫系统对自身抗原的免疫识别异常而引起肝胆管损伤有关^[4]。IL-23是由p19和IL-12p40亚单位通过二硫键相连组成的异二聚体。活化的树突细胞(DC)、巨噬细胞(MΦ)、T细胞和内皮细胞都能产生大量的p19,并且内皮细胞和造血细胞包括B细胞、T细胞、MΦ和DC都能表达p19 mRNA, Th1细胞比Th2细胞表达更多的p19 mRNA^[5]。有学者在由Th1细胞介导的自身免疫性疾病模型EAE中发现IL-12促进了幼稚T细胞的分化,而IL-23是在最后阶段介导炎症反应的关键效应因子^[6]。

本研究检测了PBC患者及健康对照组外周血PBMC IL-23p19 mRNA的表达,结果发现与正常对照组相比,PBC患者PBMC中IL-23p19 mRNA表达量显著增高,差异有统计学意义,说明IL-23p19的表达增高与PBC的发病密切相关。我们进一步研究了不同疾病分期IL-23p19 mRNA的表达,在I、II期和III、IV期之间差异明显,且II期表达显著高于III、IV期,表明IL-23p19 mRNA表达水平在疾病早期高表达,随着疾病的进一步发展,进入到疾病晚期反而有所降低,分析原因可能是由于PBC早期以炎症反应为主,到了晚期以肝纤维化为主,而高表达的IL-23p19主要在疾病的早期促炎症反应中发挥效应。血清GGT可以反映PBC肝脏受损区的炎症程度及胆汁淤积情况,本研究发现IL-23p19与血清GGT密切相关,提示IL-23p19表达与疾病进展有关,对PBC患者肝门汇管区淋巴细胞炎性浸润有一定作用。

本实验建立了IL-23p19基因表达的实时荧光

定量RT-PCR方法,首次从分子水平证实了IL-23p19基因在PBC患者中的表达增高,提示IL-23p19与PBC的发生发展存在一定相关性,为PBC的临床诊断及治疗监控提供了又一有效手段。

参考文献:

- [1] Bowlus CL, Gershwin ME. The diagnosis of primary biliary cirrhosis[J]. Autoimmun Rev, 2014, 13(4-5):441-444.
- [2] Croxford AL, Mair F, Becher B. IL-23: one cytokine in control of autoimmunity[J]. Eur J Immunol, 2012, 42(9):2263-2273.
- [3] 黄菁,张永臣,虞玲.联合检测血清IL-23、甲胎蛋白、同工铁蛋白对原发性肝癌的诊断价值[J].现代检验医学杂志,2011,26(1):124-126.
- Huang J, Zhang YC, Yu L. Value of combined estimation of IL-23, alpha-fetoprotein and acidic isoferitin in the diagnosis of primary hepatic liver cancer[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2011, 26(1):124-126.
- [4] Bianchi I, Carbone M, Lleo A, et al. Genetics and epigenetics of primary biliary cirrhosis[J]. Semin Liver Dis, 2014, 34(3):255-264.
- [5] Feng J, Hu Y, Song Z, et al. Interleukin-23 facilitates Th1 and Th2 cell differentiation in vitro following respiratory syncytial virus infection[J]. J Med Virol, 2015, 87(4):708-715.
- [6] Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain[J]. Nature, 2003, 421(6924):744-748.

收稿日期:2015-04-21

修回日期:2015-11-24