原发性胆汁性肝硬化患者外周血单个核细胞中IL-37表达增高及临床意义*

李腾达[1],陈 燕[1],龙曙萍[1],谷明莉[1],刘 鹏[1],吴林洪[1],邓顺江[1],张薇薇[1],钱 铮[2],邓安梅[1]
(1. 第二军医大学附属长海医院,上海 200433;2. 解放军100医院,江苏苏州 215007)

摘 要:目的 检测原发性胆汁性肝硬化(PBC)患者外周血单个核细胞(PBMCs)中IL-37的表达水平,进一步探究其在PBC致病过程中的临床意义。**方法** 收集2013年6月~2015年8月于长海医院确诊的42例PBC患者和38例同期体检的健康对照者外周血,采用蔗糖密度梯度离心法分离PBMCs,以实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测PBMCs中IL-37的mRNA表达水平,以酶联免疫吸附法(ELISA)检测血浆中IL-37,IL-6,IL-17,TNF-α,TGF-β,IL-18和IL-23的蛋白水平,同时记录PBC患者的病理性分期。对IL-37与IL-6,TNF-α,IL-17,TGF-β,IL-18,IL-23进行Pearson相关性分析,对IL-37与PBC疾病分期进行Spearman秩相关性分析。**结果** 实验组与对照组IL-37的mRNA水平和蛋白水平分别为2.81±0.94 vs 1.09±0.56,356.14±169.36 pg/ml vs 86.68±48.23 pg/ml,差异具有统计学意义(t=9.811,9.462,P均<0.000 1)。相关性分析表明:IL-37与IL-17,TNF-α,IL-6,TGF-β呈正相关(r=0.561 2,0.661 9,0.672 1,0.765 3;P值均<0.001),与疾病分期(Ⅰ~Ⅳ)呈正相关(r_s=0.348 9,P<0.05)。**结论** IL-37可能参与了PBC的致病过程,对疾病预测与诊断有重要意义。

关键词:原发性胆汁性肝硬化;白细胞介素-37;白细胞介素-17;白细胞介素-6;表皮生长因子-β
中图分类号:R575.22;R392.11 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2017)01-012-04
doi:10.3969/**j. issn.** 1671-7414.2017.01.004

Increasing Expression of IL-37 in Peripheral Blood Mononuclear Cell of Patients with Primary Biliary Cirrhosis and Its Clinical Significance

LI Teng-da[1], CHEN Yan[1], LONG Shu-ping[1], GU Ming-li[1], LIU Peng[1], WU Lin-hong[1], DENG Shun-jiang[1], ZHANG Wei-wei[1], QIAN Cheng[2], DENG An-mei[1]
(1. *Changhai Hospital Affiliated to Second Military Medical University, Shanghai* 200433, *China*; 2. No. 100 *Hospital of PLA, Jiangsu Suzhou* 215007, *China*)

Abstract: Objective To test the expression level of IL-37 in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients with primary biliary cirrhosis (PBC) and further explore its clinical significance in the pathological process of PBC. **Methods** Peripheral blood samples were collected from 42 patients diagnosed as PBC and 38 health individuals examined at the same time during June 2013 to August 2015 in Changhai Hospital. PBMCs were separated by sucrose density gradient centrifugation, qualified Real Time-Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) was used to measure IL-37 mRNA expression level in PBMCs. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) was to measure the protein level of IL-37, IL-6, IL-17, TNF-α, TGF-β, IL-18 and IL-23 in plasma. Meanwhile, the pathological stages of PBC cases were recorded. Pearson correlation analysis was performed on IL-37 and IL-6, TNF-α, IL-17, TGF-β, IL-18 and IL-23. Spearman rank correlation analysis was on IL-37 and pathological stages of PBC. **Results** The mRNA and protein level of IL-37 in experimental and controlled group were 2.81±0.94 vs 1.09±0.56, 356.14±169.36 pg/ml vs 86.68±48.23 pg/ml separately(t=9.811, 9.462, P<0.000 1), with statistical differences. The correlation analysis showed that IL-37 was positively related with IL-17, TNF-α, IL-6 and TGF-β (r=0.561 2, 0.661 9, 0.672 1, 0.765 3, P<0.001), and disease stages (Ⅰ~Ⅳ) (r_s=0.348 9, P<0.05). **Conclusion** IL-37 might involve in the pathological process of PBC, and it is significant for disease prediction and diagnosis.

Keywords: primary biliary cirrhosis; IL-37; IL-17; IL-6; TGF-β

原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis,PBC)是一种由于免疫性肝内胆小管炎症损伤

* 基金项目:973计划(2013CB531606),国家自然科学基金(81471605,81401358,81501397,31500721,81501398,81302579,81273282,81202353),上海申康基金(SHDC22014014),上海教育科学基金(D14017),军队科研基金(BWS14J023,12MA056,15ZD009,15XD007),美捷登基金(MJR20150019)。
作者简介:李腾达(1990-),女,在读硕士研究生,主要从事自身免疫研究,Tel:18302192042,E-mail:tengdali@smmu.edu.cn。
陈 燕(1977-),女,检验医师,主要从事感染免疫研究,E-mail:chenyan770628@163.com,共同第一作者。
通讯作者:邓安梅,女,教授,E-mail:amdeng70@163.com。
钱 铮,女,主治医师,E-mail:qiancheng824@126.com,共同通讯作者。

导致的慢性胆汁淤积性肝脏疾病[1]。其特点是血清中抗线粒体抗体(AMA)阳性,并伴有抗线粒体自身抗原的免疫性T细胞和B细胞[1]。由于免疫紊乱引起的进行性肝胆管损伤能形成胆管炎、进行性肝胆管纤维化和硬化,进而导致肝功能丧失[1,2]。目前PBC的作用机制尚且不明确,研究表明其与病人的基因易感性、免疫耐受能力等具有相关性[1]。

IL-37,也叫做IL-1F7/FIL-1ζ/IL-1H4/IL-1H/IL-1RP1,是IL-1家族的新成员,其能被一些Toll样受体激动剂和外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMCs)促炎因子如IFN-γ激活而发挥免疫功能[3,4]。研究表明成熟的IL-37b能通过半胱天冬氨酸-1依赖途径转位到细胞核内,证明其可能在细胞内、外均发挥了生物学功能[3]。近来有专家认为IL-37在自身免疫性疾病,如系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus,SLE),类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis,RA),炎症性肠道疾病(inflammatory bowel disease,IBD),强制性脊柱炎(ankylosing spondylitis,AS)等疾病中表达异常,且与疾病活动性相关[4]。但目前IL-37在PBC中的作用机制尚不明确,本研究通过检测PBC患者血浆和PBMCs中IL-37的表达水平,进一步分析其与一些抗炎/促炎分子之间的关系,为进一步研究PBC的致病机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 研究对象 实验组为42例2013年6月～2015年8月于长海医院风湿科确诊的PBC患者,男女比例为1∶6,平均年龄为45.3±6.4岁。患者诊断标准为:①血碱性磷酸酶(ALP)和γ-谷氨酰转肽酶(GGT)升高;②肝穿刺病理活检结果的支持;③AMA阳性,排除其他原因导致的病毒性、酒精性等肝炎。病理学分期:Ⅰ期表现为汇管区小叶间胆管炎;Ⅱ期为汇管区周围有细小胆管增生,伴炎性细胞浸润;Ⅲ至Ⅳ期为胆管病变消失,出现再生结节、肝硬化、进展性纤维化、纤维间隔[5]。健康对照组为同期体检的38例健康个体,男性7例,女性31例,平均年龄42.34±5.9岁,与实验组年龄、性别比较差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究经第二军医大学长海医院医学科研伦理委员会批准,所有受试对象均签署知情同意书。

1.2 试剂与仪器 Trizol(Thermo公司),Trizol LS(Invitrogen公司),Ficoll 400*(Sigma-aldrich公司),PCR检测试剂盒及引物(Thermo公司),ELISA试剂盒(eBioscience公司),反转录试剂盒(Takara公司),Nanodrop 2000(Thermo公司),Lambda 35紫外分光光度计(Perkin-Elmer公司),酶标仪(BIO-TEK)。

1.3 方法

1.3.1 PBMCs与血浆的分离:将收集到的2～3 ml外周抗凝血离心(3 000 r/min,10 min)后,得到血浆,冻存于－80℃待用。血标本用Ficoll 400*试剂进行密度梯度离心,得到PBMCs。

1.3.2 ELISA检测血浆待测分子的蛋白水平:用碳酸盐包被缓冲液将抗体稀释为1～10 μg/ml,每个反应孔中加0.1 ml左右,4℃过夜。第二天,弃孔内液,洗涤三次,从－80℃取出标本,加适宜浓度的待测样本0.1 ml于上述反应孔中,37℃孵育1 h,洗涤。各孔加入酶标抗体0.1 ml,37℃孵育约1 h,洗涤。加底物液TMB显色10～30 min后,加2 mmol/L硫酸终止反应,于450 nm处检测计算待测分子浓度。

1.3.3 mRNA反转录及RT-PCR:以Tizol试剂盒提取PBMCs总RNA后,用Trizol LS试剂盒进行纯化。RNA的反转录按照Takara试剂盒说明书进行,得到的cDNA作为PCR的模板。PCR反应体系为10 μl,设立平行对照组,β-actin为参照基因,采用相对定量法。

1.4 统计学分析 对实验组与对照组中连续性计量资料进行两独立样本t检验,对IL-37与IL-6等细胞因子进行Pearson相关性分析(以r表示),对IL-37与PBC病人病理分期(Ⅰ～Ⅳ)进行Spearman秩相关性分析(以r_s表示)。

2 结果

2.1 实验组与对照组IL-37的表达情况 实验组与对照组IL-37的mRNA水平分别为2.81±0.94,1.09±0.56;蛋白水平分别为356.14±169.36 pg/ml,86.68±48.23 pg/ml,差异均具有统计学意义($t=9.811,9.462$,$P<0.000\ 1$)。

2.2 实验组与对照组相关免疫分子的表达水平 见表1。与对照组相比,实验组IL-6,IL-17,TNF-α,TGF-β,IL-18和IL-23表达增高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

表1 实验组与对照组细胞因子水平的比较($\bar{x}\pm s$,pg/ml)

细胞因子	实验组	对照组	t	P
IL-6	352.87±184.54	212.67±132.98	3.862	0.000 2
IL-17	194.73±56.98	126.89±39.75	6.114	<0.000 1
TNF-α	182.64±78.66	102.56±68.42	4.835	<0.000 1
TGF-β	115.87±56.78	87.56±38.23	2.588	0.011 5
IL-18	92.34±46.76	49.87±26.72	4.918	<0.000 1
IL-23	357.98±96.27	176.32±57.92	10.09	<0.000 1

2.3 IL-37与细胞因子、疾病病理分期的相关性分析 见表2。实验组血浆中IL-37与IL-6,IL-17,TNF-α,TGF-β呈正相关,与疾病分期(Ⅰ~Ⅳ)呈正相关,差异具有统计学意义($P<0.05$),与IL-18,IL-23不具有相关性($r=0.129\ 3$,$0.192\ 3$,$P>0.05$)。

表2 IL-37与细胞因子、疾病病理分期的相关性分析

细胞因子	相关性分析	相关系数(r或r_s)	P
IL-6	Pearson	0.672 1	<0.001
IL-17	Pearson	0.561 2	<0.001
TNF-α	Pearson	0.661 9	<0.001
TGF-β	Pearson	0.765 3	<0.001
疾病分期(Ⅰ~Ⅳ)	Spearman	0.348 9	<0.05

3 讨论 PBC是一种慢性自身免疫性炎症疾病,患者细胞免疫调节紊乱占主导,特别是T细胞数量和功能的异常[6],目前随着对PBC免疫机制的深入理解,除了对经典的$CD4^+$ T细胞及其细胞亚群Th1/Th2/Th17的探究,对PBC固有免疫反应,特别是一些促炎因子如TNF-α,IL-6,抑炎因子如IL-4等,TLR等信号通路的研究亦备受关注[2,7]。

IL-37是一种新型IL-1家族成员,与大多数促进炎症反应的IL-1家族成员不同,它是一种对固有免疫反应有抑制作用的免疫分子,与效应性记忆T细胞、巨噬细胞的生物学功能密切相关[8]。研究表明PBMCs与树突状细胞(DCs)在TLR配体与一些促炎因子的刺激下能增加IL-37的分泌量[7],IL-37的表达或过度表达反过来能抑制促炎因子如IL-6,TNF的生产[8]。对PBMCs进一步细化分类的研究发现:IL-37处理过的M1型巨噬细胞在LPS刺激之后表现出p38,ERK,JNK磷酸化的下降与IL-6,TNF-α的低表达[9]。此外,在以小鼠巨噬细胞系RAW为模型的研究中发现,IL-37处理的细胞除表现出LPS诱导的促炎因子分泌下降,亦表现出GM-CSF,IL-1β,IL-23等细胞因子产量的减少[4]。在以单核细胞系THP-1为模型的研究中发现IL-37b与Smad3表达共位,用Smad3抑制剂处理的细胞分泌IL-1β上升[4],而由于Smad3位于TGF-β信号通路下游,故IL-37亦可能与TGF-β的表达相关。

近年来IL-37在自身免疫中的作用亦逐渐显现,研究报道RA患者血浆或者PBMCs中IL-37显著增高,且与同时增高的TNF-α,IL-6,IL-17,CRP,疾病活动分数28(DAS28)呈正相关[10];SLE患者中增高的IL-37与IL-18,IL-18结合蛋白(IL-18BP),IFN-γ,IL-16,疾病活动度(SLEDAI)正相关,与C3,C4负相关[11];强直性背柱炎患者血清中IL-37与BASDAI,CRP,ESR呈正相关[12],当强直性背柱炎,系统性红斑狼疮病人的PBMCs用IL-37处理后,促炎因子TNF-α,IL-6,IL-17等就会被抑制[11,12]。但值得注意的是,目前对IL-37在PBC中的作用及其机制尚不明确,本文在上述理论的基础上,假设IL-37参与了PBC疾病形成过程,对其进行初步检测和探究,结果发现IL-37在PBC患者中表达增高,且与IL-17,IL-6,TNF-α,TGF-β呈正相关,与疾病活动度呈正相关,表明其可能参与了PBC的免疫机制调节。但本文样本量较少,分析的免疫分子较少,尚待进一步探究以完善。

参考文献:

[1] Gao J,Qiao L,Wang B. Primary biliary cirrhosis is a generalized autoimmune epithelitis[J]. International Journal of Molecular Sciences,2015,16(3):6432-6446.

[2] Chang CH,Chen YC,Zhang W,et al. Innate immunity drives the initiation of a murine model of primary biliary cirrhosis[J]. PLoS One,2015,10(3):e0121320.

[3] Dinarello CA,Bufler P. Interleukin-37[J]. Seminars Immunology,2013,25(6):466-468.

[4] Xu WD,Zhao Y,Liu Y. Insights into IL-37,the role in autoimmune diseases[J]. Autoimmunity Reviews,2015,14(12):1170-1175.

[5] 许 帅.原发性胆汁性肝硬化患者的临床与病理学特征研究[J].中国医药指南,2015,13(19):140-141.
Xu S. Clinical and pathological characteristics research of primary biliary cirrhosis patients[J]. Guide of China Medicine,2015,13(19):140-141.

[6] 陈 燕,谷明莉,叶 辛,等.STING在原发性胆汁性肝硬化患者外周血单个核细胞中的表达及临床意义[J].现代检验医学杂志,2016,31(3):33-35.
Chen Y,Gu ML,Ye X,et al. Expression of STING in peripheral blood in patients with primary biliary cirrhosis and its clinical significance[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine,2016,31(3):33-35.

[7] Kim S,Becker J,Bechheim M,et al. Characterizing the genetic basis of innate immune response in TLR4-activated human monocytes[J]. Nature Communications,2014(5):5236.

[8] Teng X,Hu Z,Wei X,et al. IL-37 ameliorates the inflammatory process in psoriasis by suppressing proinflammatory cytokine production[J]. Journal of Immunology,2014,192(4):1815-1823.

[9] Li S,Neff CP,Barber K,et al. Extracellular forms of IL-37 inhibit innate inflammation in vitro and in vivo but require the IL-1 family decoy receptor IL-1R8

[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(8): 2497-2502.

[10] Zhao PW, Jiang WG, Wang L, et al. Plasma levels of IL-37 and correlation with TNF-alpha, IL-17A, and disease activity during DMARD treatment of rheumatoid arthritis[J]. PLoS One, 2014, 9(5): e95346.

[11] Ye L, Ji L, Wen Z, et al. IL-37 inhibits the production of inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus: its correlation with disease activity[J]. Journal of Translational Medicine, 2014(12): 69.

[12] Chen B, Huang K, Ye L, et al. Interleukin-37 is increased in ankylosing spondylitis patients and associated with disease activity[J]. Journal of Translational Medicine, 2015(13): 36.

收稿日期:2016-07-25　　**修回日期**:2016-08-02