

溃疡性结肠炎患者Th1类细胞因子的表达

庞艳华, 郝建宇, 关玉盘, 郑长青, 张文杰

庞艳华, 郝建宇, 关玉盘, 首都医科大学附属北京朝阳医院
消化内科 北京 100020

郑长青, 中国医科大学附属盛京医院消化内科 辽宁省沈阳市
110004

张文杰, 武汉大学中南医院医学科学研究中心 湖北省武汉市
430020

通讯作者: 庞艳华, 100020, 北京市朝阳区白家庄路8号, 首都医
科大学附属北京朝阳医院消化内科. yanhuapang@yahoo.com
电话: 010-85231502

收稿日期: 2007-04-11 接受日期: 2007-04-18

Expression of Th1 type cytokines in patients with ulcerative colitis

Yan-Hua Pang, Jian-Yu Hao, Yu-Pan Guan,
Chang-Qing Zheng, Wen-Jie Zhang

Yan-Hua Pang, Jian-Yu Hao, Yu-Pan Guan, Department of
Gastroenterology, Chaoyang Hospital Affiliated to Capital
University of Medical Sciences, Beijing 100020, China
Chang-Qing Zheng, Department of Gastroenterology,
Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University,
Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Wen-Jie Zhang, Medical Research Center, Zhongnan Hos-
pital of Wuhan University, Wuhan 430020, Hubei Province,
China

Correspondence to: Yan-Hua Pang, Department of
Gastroenterology, Chaoyang Hospital Affiliated to
Capital University of Medical Sciences, Beijing 100020,
China. yanhuapang@yahoo.com

Received: 2007-04-11 Accepted: 2007-04-18

Abstract

AIM: To explore the expression of Th1 type cytokines, interleukin-12 (IL-12) and interferon- γ (IFN- γ), in ulcerative colitis (UC), and to investigate the mechanism of UC at molecular level.

METHODS: Thirty UC patients diagnosed with colonoscopy and mucosal biopsy were enrolled in this study and 20 healthy volunteers were used as controls. IL-12 and IFN- γ mRNA expression were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The serum levels of IL-12 and IFN- γ were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS: The expression of IL-12 mRNA in UC patients (light, moderate and severe degree)

was significant higher than that in controls (0.51 ± 0.09 , 0.59 ± 0.07 , 0.66 ± 0.06 vs 0.25 ± 0.03 , $P < 0.05$), but no difference was found in IFN- γ mRNA expression between the two groups. The level of serum IL-12 was not markedly different between UC patients and controls ($P > 0.05$), while IFN- γ were not detectable in both groups.

CONCLUSION: IL-12 may play an important role in the pathogenesis of UC.

Key Words: Ulcerative colitis; Interleukin-12; Interferon- γ ; Reverse transcription-polymerase chain reaction; Enzyme-linked immunosorbent assay

Pang YH, Hao JY, Guan YP, Zheng CQ, Zhang WJ. Expression of Th1 type cytokines in patients with ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(14):1665-1667

摘要

目的: 检测Th1类细胞因子IL-12, IFN- γ 在溃疡性结肠炎(UC)中的表达, 从分子水平上探讨UC的发病机制。

方法: 选取通过结肠镜诊断并经病理证实的患者UC 30例, 正常对照者20例。用RT-PCR方法检测Th1类细胞因子IFN- γ 和IL-12 mRNA表达, 用双抗体夹心ELISA法检测血清IL-12, IFN- γ 的水平。

结果: UC组(轻、中、重度)IL-12 mRNA表达较正常对照组显著增加(0.51 ± 0.09 , 0.59 ± 0.07 , 0.66 ± 0.06 vs 0.25 ± 0.03 , $P < 0.05$), 而IFN- γ 与正常对照组相比, 表达无显著差异($P > 0.05$)。UC组和正常对照组IL-12的血清浓度差异没有显著性($P > 0.05$), IFN- γ 未达到可检测浓度。

结论: IL-12在UC的发病中可能起重要作用。

关键词: 溃疡性结肠炎; IL-12; IFN- γ ; 逆转录聚合酶链式反应; 酶联免疫试验

庞艳华, 郝建宇, 关玉盘, 郑长青, 张文杰. 溃疡性结肠炎患者Th1类细胞因子的表达. 世界华人消化杂志

■背景资料

Th细胞的研究近来进展迅速, 而有研究发现免疫反应异常在溃疡性结肠炎的发病中起重要作用, 主要效应细胞为Th1和Th2细胞, 关于它们的具体作用, 研究者意见不一。

■同行评价

本文研究思路清晰, 结合分子水平来研究临床疾病, 对进一步探讨UC的发病机制有很大意义。

2007;15(14):1665-1667

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1665.asp>

0 引言

免疫反应异常在溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis, UC)的发病中起重要作用。CD4⁺T细胞是免疫应答的重要效应细胞, 分为Th1和Th2细胞, Th1细胞表达 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)和肿瘤坏死因子 β (tumor necrosis factor- β , TNF β), 而Th2细胞表达IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10和IL-13^[1-2]。一般而言, Th1细胞因子有促炎作用, 而Th2细胞因子则发挥抗炎作用。在对UC的免疫学发病机制研究中, 研究者们意见不一。Lakatos^[3]认为UC与Th2细胞密切相关, Sawa *et al*^[4]认为UC是Th1和Th2共同作用的结果。UC究竟与Th1或Th2何者更为密切相关还有待研究。我们检测了UC患者结肠黏膜和外周血中Th1类细胞因子IL-12, IFN- γ 的表达, 旨在探讨UC的发病机制。

1 材料和方法

1.1 材料 UC患者30例, 经结肠镜检查确诊并经病理证实, 诊断符合2000年成都会议标准^[5], 年龄26-69岁。正常对照组20例, 年龄25-51岁。取每例患者直肠或乙状结肠部位的活检组织, 置于液氮罐中, 每例抽取全静脉血5 mL, 离心取血清, 均置于-70℃保存备用。所有引物上海博亚生物技术有限公司合成, ELISA试剂盒购于上海森雄实业有限公司。

1.2 方法

1.2.1 提取组织RNA, 用反转录法合成cDNA, RT-PCR法检测IL-12和IFN- γ 的表达 PCR反应体系为50 μ L, 含cDNA模板2 μ L、PCR缓冲液5 μ L、50 mol/L dNTP混合物、10 μ mol/L上下游引物和Taq DNA聚合酶0.5 μ L。PCR反应参数为94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共30个循环。72℃延伸10 min, 4℃终止反应。取5 μ L PCR扩增产物以12 g/L琼脂糖进行凝胶电泳, 用图像分析仪进行分析。

1.2.2 采用双抗体夹心ELISA法测血清IL-12和IFN- γ 的水平 具体检测程序如下: 建立标准曲线: 设标准孔8孔, 每孔中各加入样品稀释液100 μ L, 第1孔加入标准样品100 μ L, 混匀后用加样器吸出100 μ L, 移至第2孔。如此反复作对倍稀释至第7孔, 最后, 从第7孔中吸出100 μ L弃去, 使之体积均为100 μ L。第8孔为空白对照。加样: 待测样品孔中每孔各加入样品稀释液及待测样品

表 1 IFN- γ 和IL-12的表达

细胞因子	对照组	轻度UC	中度UC	重度UC
IFN- γ	0.64 \pm 0.04	0.65 \pm 0.03	0.70 \pm 0.03	0.77 \pm 0.05
IL-12	0.25 \pm 0.03	0.51 \pm 0.09 ^a	0.59 \pm 0.07 ^a	0.66 \pm 0.06 ^a

^a $P < 0.05$ vs 对照组。

各50 μ L。将反应板置37℃ 2 h。洗板: 用洗涤液将反应板充分洗涤4次, 在滤纸上印干。每孔中加入第一抗体工作液50 μ L。将反应板充分混匀后置37℃ 1 h, 洗板。每孔加酶标抗体工作液100 μ L。将反应板置37℃ 1 h, 洗板。每孔加入底物工作液100 μ L, 置37℃暗处反应5-10 min。每孔加入1滴终止液混匀。在492 nm处测吸光值 A_{492} 。用标准物浓度与 A_{492} 值计算出标准曲线的直线回归方程, 将样品的 A_{492} 值代入方程式求出样品浓度。

统计学处理: 采用单因素方差分析, 用SPSS10.0统计软件分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 IL-12 mRNA 和IFN- γ 的表达 UC组IL-12的表达较正常对照组增加($P < 0.05$), 而IFN- γ 与正常对照组相比, 差异无显著性($P > 0.05$), IL-12和IFN- γ 在轻中重度UC中差异都无显著性($P > 0.05$, 表1)。

2.2 外周血IL-12和IFN- γ 的检测 UC组和正常对照组, IL-12的浓度分别为23.32 \pm 7.86 ng/L和27.97 \pm 10.75 ng/L, 两者差异没有显著性($P > 0.05$)。IFN- γ 在两组中都未达到可检测浓度。

3 讨论

在正常状态下, 体内的Th1和Th2处于动态平衡, 两者相互制约, 从而维持机体内环境的稳定。如果由于某种原因导致Th1/Th2失衡, 比如Th1反应亢进或Th2反应减弱, 组织器官就可能发生炎症。IL-12是细胞免疫中非常重要的因子^[6], 由活化的单核-巨噬细胞、树突状细胞等抗原呈递细胞产生, 能促进Th1细胞的分化和增殖, IL-12还可刺激自然杀伤细胞(NK细胞)和T细胞产生包括IFN- γ 在内的多种细胞因子。IL-12和IFN- γ 作为前炎症因子都对Th1反应提供了重要信号。我们的实验结果表明UC组肠黏膜IL-12 mRNA的表达较正常对照组增加, 这与Nielsen *et al*^[7]的研究结果一致, 说明IL-12参与了UC的发病。IFN- γ 主要由T细胞和NK细胞产生, 有广泛的免疫调节作用, Th1是产生IFN- γ 的主要细胞。IFN- γ

主要通过两种途径促进Th1分化: (1)通过阻止Th2的分化而使Th1的分化占优势; (2)在抗原致敏过程中, IFN- γ 和IL-12直接调节Th1的分化^[8]. Stevceva *et al*^[9]用类似人类UC的IL-4缺乏小鼠模型检测IFN- γ , 认为IFN- γ 在急性炎症结肠组织的含量高. Camoglio *et al*^[10]用免疫组化法检测UC患者IFN- γ 和IL-4的表达, 结果二者均未有显著性升高. Watanabe *et al*^[11] Northern杂交及定量PCR法在CD组织中检测到IFN- γ , 而未受刺激的自身外周血单核细胞(PBMC)、正常对照及炎症对照组肠黏膜固有层单个核细胞(LPMC)未能检出IFN- γ . 对于IFN- γ 在Th1细胞的发展中是否必需这个问题一直有争论. Bot *et al*^[12]发现在完全缺乏IL-4时, T细胞在IL-12存在的情况下开始向Th1分化, 此时不需要IFN- γ . 我们的实验结果提示IFN- γ 在UC的发病中的作用不明显, IL-12可能在IFN- γ 不升高的情况下诱导了Th1细胞.

近年来, 对Th细胞的研究进展迅速, 人们已经认识到细胞因子、T细胞受体、转录因子等共同调节着Th1/Th2分化方向. 但是, Th1/Th2整个通路的调节是很复杂的过程, 对整个通路的初始调节和最重要的调节以及对UC免疫机制的最终阐明都有待进一步研究.

4 参考文献

- 1 Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med* 2002; 8: 567-573
- 2 Jankovic D, Sher A, Yap G. Th1/Th2 effector choice in parasitic infection: decision making by committee. *Curr Opin Immunol* 2001; 13: 403-409
- 3 Lakatos L. Immunology of inflammatory bowel diseases. *Acta Physiol Hung* 2000; 87: 355-372
- 4 Sawa Y, Oshitani N, Adachi K, Higuchi K, Matsumoto T, Arakawa T. Comprehensive analysis of intestinal cytokine messenger RNA profile by real-time quantitative polymerase chain reaction in patients with inflammatory bowel disease. *Int J Mol Med* 2003; 11: 175-179
- 5 中华医学会消化病学分会. 对炎症性肠病诊断治疗规范的建议. *中华消化杂志* 2001; 21: 236-239
- 6 Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 933-944
- 7 Nielsen OH, Kirman I, Rudiger N, Hendel J, Vainer B. Upregulation of interleukin-12 and -17 in active inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 180-185
- 8 金伯泉. 细胞和分子免疫学. 第2版. 北京: 科学出版社, 2001: 399
- 9 Stevceva L, Pavli P, Husband A, Ramsay A, Doe WF. Dextran sulphate sodium-induced colitis is ameliorated in interleukin 4 deficient mice. *Genes Immun* 2001; 2: 309-316
- 10 Camoglio L, Te Velde AA, Tigges AJ, Das PK, Van Deventer SJ. Altered expression of interferon-gamma and interleukin-4 in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 1998; 4: 285-290
- 11 Watanabe M, Ueno Y, Yajima T, Iwao Y, Tsuchiya M, Ishikawa H, Aiso S, Hibi T, Ishii H. Interleukin 7 is produced by human intestinal epithelial cells and regulates the proliferation of intestinal mucosal lymphocytes. *J Clin Invest* 1995; 95: 2945-2953
- 12 Bot A, Smith KA, von Herrath M. Molecular and cellular control of T1/T2 immunity at the interface between antimicrobial defense and immune pathology. *DNA Cell Biol* 2004; 23: 341-350

电编 郭海丽 编辑 程剑侠