

# IL-21受体在溃疡性结肠炎中的表达及对促炎症细胞因子分泌的诱导作用

夏兴洲, 刘占举

## ■背景资料

许多促炎症细胞因子参与了UC的免疫病理损伤, IL-21在一些自身免疫性疾病发病过程中起着重要作用, 本文研究IL-21对UC患者外周血和肠黏膜组织内淋巴细胞

夏兴洲, 郑州大学第五附属医院消化内科 河南省郑州市450052

刘占举, 郑州大学第二附属医院消化内科 河南省郑州市450014

教育部新世纪优秀人才支持计划基金资助项目, No. NECT-05-0609

河南省卫生厅科技攻关基金资助项目, No. 200704009

作者贡献分布: 此课题由刘占举设计; 实验操作与论文写作由夏兴洲与刘占举完成。

通讯作者: 刘占举, 450014, 河南省郑州市经八路2号, 郑州大学第二附属医院消化内科. zhanjuli@yaho.com

电话: 0371-63939084

收稿日期: 2008-11-06 修回日期: 2008-12-11

接受日期: 2008-12-15 在线出版日期: 2009-01-08

## IL-21 receptor is highly expressed and induces proinflammatory cytokine secretion in patients with ulcerative colitis

Xing-Zhou Xia, Zhan-Ju Liu

Xing-Zhou Xia, Department of Gastroenterology, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Zhan-Ju Liu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 2 Jingba Road, Zhengzhou 450014, Henan Province, China

Correspondence to: Professor Dr. Zhan-Ju Liu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China. zhanjuli@yaho.com

Received: 2008-11-06 Revised: 2008-12-11

Accepted: 2008-12-15 Published online: 2009-01-08

## Abstract

**AIM:** To explore the role of IL-21 receptor (IL-21R) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and lamina propria mononuclear cells (LPMC) for patients with ulcerative colitis (UC).

**METHODS:** Peripheral blood samples and colonic biopsies were obtained from 28 patients with UC and 22 healthy controls. Expression of IL-21R in peripheral blood or lamina propria CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T cells, B cells and NK cells was analyzed using flow cytometry. Cytokine secretion by PBMC or LPMC under stimulation with IL-21 and anti-CD3 was detected using ELISA.

**RESULTS:** Expression of IL-21R was significantly higher in peripheral blood and lamina propria CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T cells, B cells and NK cells of UC patients than in healthy controls (PBMC:  $8.42 \pm 2.14$  vs  $3.46 \pm 0.54$ ,  $10.35 \pm 2.17$  vs  $5.28 \pm 2.2$ ,  $7.27 \pm 1.15$  vs  $2.35 \pm 0.41$ ,  $12.55 \pm 3.12$  vs  $5.45 \pm 1.06$ ; LPMC:  $22.44 \pm 3.46$  vs  $6.26 \pm 1.15$ ,  $24.48 \pm 4.57$  vs  $6.87 \pm 1.02$ ,  $16.24 \pm 3.10$  vs  $5.56 \pm 1.44$ ,  $23.54 \pm 4.12$  vs  $8.45 \pm 1.68$ , all  $P < 0.05$ ). PBMC or LPMC from UC patients, when stimulated with IL-21 and anti-CD3, produced significantly higher levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-2 compared with healthy controls ( $346 \pm 72$  vs  $120 \pm 27$ ,  $3048 \pm 426$  vs  $1182 \pm 242$ ;  $625 \pm 113$  vs  $154 \pm 35$ ,  $3827 \pm 418$  vs  $1520 \pm 304$ , all  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** IL-21R is significantly increased in PBMC and LPMC from UC patients, and IL-21 induces proinflammatory cytokine secretion. It suggests that IL-21 is associated with intestinal mucosal injury and that target therapy directed against IL-21 may be used to treat UC patients.

**Key Words:** Ulcerative colitis; Peripheral blood mononuclear cells; Lamina propria mononuclear cells; Interleukin-21; Receptor

Xia XZ, Liu ZJ. IL-21 receptor is highly expressed and induces proinflammatory cytokine secretion in patients with ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(1): 102-105

## 摘要

**目的:** 探讨IL-21对UC患者外周血和肠黏膜固有层组织内淋巴细胞的免疫病理调节。

**方法:** 收集28例UC患者和22例健康成人外周血标本和肠黏膜活检标本, 分离外周血单个核淋巴细胞(PBMC)和肠黏膜固有层单个核淋巴细胞(LPMC), 利用流式细胞仪检测IL-21R在CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T细胞、B细胞和NK细胞表面表达。培养PBMC和LPMC, 使用IL-21和抗CD3单抗体外刺激, 48 h后收集上清液, 使用ELISA检测促炎症细胞因子(TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-2)分泌, 分析IL-21在疾病发展过

## ■同行评议者

房静远, 教授, 上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海市消化疾病研究所

程中的免疫病理作用。

**结果:** UC患者外周血和肠黏膜固有层组织内CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T细胞、CD20<sup>+</sup> B细胞和CD56<sup>+</sup> NK细胞表达IL-21R水平比健康者显著升高(PBMC:  $8.42 \pm 2.14$  vs  $3.46 \pm 0.54$ ,  $10.35 \pm 2.17$  vs  $5.28 \pm 2.2$ ,  $7.27 \pm 1.15$  vs  $2.35 \pm 0.41$ ,  $12.55 \pm 3.12$  vs  $5.45 \pm 1.06$ ; LPMC:  $22.44 \pm 3.46$  vs  $6.26 \pm 1.15$ ,  $24.48 \pm 4.57$  vs  $6.87 \pm 1.02$ ,  $16.24 \pm 3.10$  vs  $5.56 \pm 1.44$ ,  $23.54 \pm 4.12$  vs  $8.45 \pm 1.68$ , 均 $P < 0.05$ )。体外培养PBMC或LPMC, 使用IL-21刺激, 发现IL-21可显著诱导UC患者的PBMC和LPMC激活, 并分泌高水平的TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ ( $346 \pm 72$  vs  $120 \pm 27$ ,  $3048 \pm 426$  vs  $1182 \pm 242$ ;  $625 \pm 113$  vs  $154 \pm 35$ ,  $3827 \pm 418$  vs  $1520 \pm 304$ , 均 $P < 0.05$ )。

**结论:** IL-21R参与肠黏膜炎症损伤, 阻断IL-21生物学效应可能治疗UC的发生。

**关键词:** 溃疡性结肠炎; 外周血单个核淋巴细胞; 肠黏膜固有层单个核淋巴细胞; 白介素-21; 受体

夏兴洲, 刘占举. IL-21受体在溃疡性结肠炎中的表达及对促炎症细胞因子分泌的诱导作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(1): 102-105

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/102.asp>

## 0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是发生在肠道黏膜慢性非特异性炎症性疾病, 其发病机制仍然不清楚。近年来研究发现, UC的发生与肠黏膜组织内免疫系统对肠腔内细菌微生物抗原应答异常、肠黏膜上皮屏障损伤、患者的基因遗传因素等有关<sup>[1-7]</sup>。大量研究发现在UC患者炎症肠黏膜组织内有大量激活的淋巴细胞浸润, 并分泌高水平的促炎症细胞因子(如TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-8、IL-15等), 这些促炎症细胞因子在肠黏膜炎症损伤过程中起着重要作用。IL-21是由CD4<sup>+</sup> T细胞分泌的细胞因子, 其受体(IL-21R)主要表达在T、NK、B细胞和树突状细胞上<sup>[8-9]</sup>。本研究主要检测IL-21R在UC患者外周血单个核淋巴细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)和肠黏膜固有层单个核淋巴细胞(lamina propria mononuclear cells, LPMC)表达, 并探讨IL-21对UC患者外周血和肠黏膜固有层组织内淋巴细胞的免疫病理调节。

## 1 材料和方法

1.1 材料 收集2006-06/2008-06郑州大学第二附

属医院消化内科门诊或/和住院的活动性UC患者26例, 男15例, 女11例, 年龄31-64(平均为39.2)岁。其中15例接受了柳氮磺吡啶、甲硝唑和/或泼尼松治疗, 所有患者均未接受任何免疫抑制剂治疗, 未合并其他自身免疫性疾病(如风湿性疾病、系统性红斑狼疮、银屑病)和HIV感染。UC患者的临床诊断根据临床症状、体征、结肠镜检查结果和组织病理学检查等, 诊断符合中华医学会消化病学分会炎症性肠病学科组制定的诊断指南<sup>[10]</sup>。另外, 选择22例健康者作对照研究, 男12例, 女10例, 年龄24-45(平均为34.5)岁。所有研究对象均征求同意后进行研究, 并取得医院科研部分的同意后进行。淋巴细胞分离液购于上海试剂二厂; 小鼠抗人IL-21R单抗购于美国R&D公司; 异硫氰酸荧光素(FITC)标记的小鼠抗人CD4、CD8、CD20、CD56单抗、藻红蛋白(PE)标记的羊抗小鼠单抗均购于美国BD PharMingen公司; RPMI 1640培养液、胎牛血清、链霉素、青霉素、谷氨酰胺和庆大霉素均购于美国GIBCO公司(Grand Island, NY, USA)。EDTA-Na2、二硫苏糖醇、分离肠黏膜固有层淋巴细胞分离液(Percoll)购于美国Sigma公司。其他普通化学试剂均为国产分析级。

### 1.2 方法

1.2.1 PBMC和LPMC分离过程: 采集所有对象EDTA-Na2抗凝外周静脉血5-10 mL, 使用淋巴细胞分离液分离PBMC, 使用生理盐水稀释细胞成 $1 \times 10^9$ /L浓度待用。在接受电子结肠镜检查时, 于病变部位取7-8块活检标本, 其中3块使用100 g/L中性甲醛固定, 常规石蜡包埋、切片、HE染色, 行常规病理组织学检查; 5块立即放置于4℃含有庆大霉素的RPMI 1640培养液中, 送到实验室进行细胞分离和培养。待活检组织转送到实验室后, 用含有庆大霉素的RPMI 1640培养液清洗, 去除表面黏膜和血液, 用于分离LPMC, 方法参见文献<sup>[11-12]</sup>。

1.2.2 流式细胞仪分析IL-21R水平表达: 将PBMC和LPMC用生理盐水洗涤2次, 然后使用FITC标记的CD4或CD8或CD20或CD56单抗染色, 于4℃避光作用20 min, 用生理盐水洗涤2次去除未结合的抗体; 然后使用抗人IL-21R抗体染色上述细胞, 于4℃避光作用30-60 min, 用生理盐水洗涤2次去除未结合的抗体, 再使用PE标记的羊抗小鼠二抗染色, 使用30 g/L多聚甲醛溶液0.5 mL固定上述细胞, 最后使用流式细胞仪(美国BD公司FACScan)检测CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T细

### ■创新盘点

本文使用流式细胞仪详细分析UC患者外周血和肠黏膜组织内淋巴细胞IL-21R表达水平, 体外细胞培养发现IL-21可诱导UC患者淋巴细胞分泌促炎症细胞因子。

## ■ 相关报道

IL-21R在类风湿关节炎患者关节滑液中T细胞表达增高,并诱导TNF和IL-1分泌.已报道IL-21在UC患者炎症肠黏膜组织表达增高,并诱导肠黏膜组织内成纤维母细胞分泌基质金属蛋白酶.

表 1 IL-21R在PBMC中表达水平 (mean  $\pm$  SD, %)

分组	<i>n</i>	CD4 <sup>+</sup> T细胞	CD8 <sup>+</sup> T细胞	CD20 <sup>+</sup> B细胞	CD56 <sup>+</sup> NK细胞
UC患者	26	8.42 $\pm$ 2.14 <sup>a</sup>	10.35 $\pm$ 2.17 <sup>a</sup>	7.27 $\pm$ 1.15 <sup>a</sup>	12.55 $\pm$ 3.12 <sup>a</sup>
健康者	22	3.46 $\pm$ 0.54	5.28 $\pm$ 2.2	2.35 $\pm$ 0.41	5.45 $\pm$ 1.06

<sup>a</sup>*P* < 0.05 vs 健康者.

表 2 IL-21R在LPMC中表达水平 (mean  $\pm$  SD, %)

分组	<i>n</i>	CD4 <sup>+</sup> T细胞	CD8 <sup>+</sup> T细胞	CD20 <sup>+</sup> B细胞	CD56 <sup>+</sup> NK细胞
UC患者	20	22.44 $\pm$ 3.46 <sup>a</sup>	24.48 $\pm$ 4.57 <sup>a</sup>	16.24 $\pm$ 3.10 <sup>a</sup>	23.54 $\pm$ 4.12 <sup>a</sup>
健康者	16	6.26 $\pm$ 1.15	6.87 $\pm$ 1.02	5.56 $\pm$ 1.44	8.45 $\pm$ 1.68

<sup>a</sup>*P* < 0.05 vs 健康者.

表 3 IL-21 诱导PBMC和LPMC细胞因子分泌 (mean  $\pm$  SD, ng/L)

	<i>n</i>	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IL-2	IL-4
UPBMC					
健康者	26	1182 $\pm$ 242	120 $\pm$ 27	585 $\pm$ 112	86 $\pm$ 21
UC患者	22	3048 $\pm$ 426 <sup>a</sup>	346 $\pm$ 72 <sup>a</sup>	613 $\pm$ 138	92 $\pm$ 32
LPMC					
健康者	20	1520 $\pm$ 304	54 $\pm$ 35	776 $\pm$ 154	112 $\pm$ 26
UC患者	16	3827 $\pm$ 418 <sup>a</sup>	625 $\pm$ 113 <sup>a</sup>	821 $\pm$ 181	134 $\pm$ 33

<sup>a</sup>*P* < 0.05 vs 健康者.

胞、CD20<sup>+</sup> B细胞、CD56<sup>+</sup> NK细胞表达IL-21R水平.利用CellQuest软件分析样本中IL-21R阳性细胞表达水平<sup>[13]</sup>.

1.2.3 IL-21诱导细胞因子水平测定: 首先将24孔培养板用小鼠抗人CD3单克隆抗体(克隆UCHT1、工作浓度5 mg/L)包被过夜.将PBMC或LPMC( $1 \times 10^6$ /L)放于剩有1 mL RPMI 1640培养液的24孔培养板中培养,并加用IL-21(50  $\mu$ g/L)体外刺激.细胞培养液的配制和培养条件见文献<sup>[11-13]</sup>.经培养48 h,收集上清液,采用ELISA方法检测TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-2和IL-4水平,具体参照我们近期报道文献<sup>[11-13]</sup>.

**统计学处理** 数据以mean  $\pm$  SD表示,采用*t*检验进行数据分析,检验水准 $\alpha = 0.05$ .

## 2 结果

2.1 PBMC表达IL-21R水平 UC患者外周血中CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T细胞、CD20<sup>+</sup> B细胞、CD56<sup>+</sup> NK细胞IL-21R阳性表达率比健康者明显升高(*P* < 0.05, 表1).

2.2 LPMC表达IL-21R水平 UC患者LPMC中IL-21R阳性的CD4<sup>+</sup> T、CD8<sup>+</sup> T、CD20<sup>+</sup> B和CD56<sup>+</sup> NK细胞比健康对照显著增多(*P* < 0.05, 表2).

2.3 IL-21诱导UC患者PBMC和LPMC分泌促炎症细胞因子 IL-21可诱导UC患者PBMC和LPMC分泌高水平的TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ ,而IL-2和IL-4水平UC和健康对照组之间无统计学意义(*P* > 0.05, 表3).

## 3 讨论

文献报道显示,在UC患者的外周血和肠壁黏膜组织中,存在有大量激活的炎症细胞浸润,如CD4<sup>+</sup> T细胞、B细胞、巨噬细胞和树突状细胞,并产生大量的辅助T细胞(Th)2样促炎症细胞因子(如IL-4、IL-5、IL-13)<sup>[1-7]</sup>.IL-21来源于激活的CD4<sup>+</sup> T细胞,其受体(IL-21R)主要表达在CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T细胞、B细胞和NK细胞等表面<sup>[8-9]</sup>.近年来国内外学者已经进行了IL-21对各种淋巴细胞的免疫调节以及在一些自身免疫性疾病(如类风湿关节炎、多发硬化)的研究,已证实IL-21参与了这些自身免疫性疾病的发展过程<sup>[8-9]</sup>.我们前

期工作证实<sup>[13]</sup>, 在类风湿性关节炎患者的关节滑膜组织内IL-21R表达显著升高, 体外培养发现IL-21可以显著地诱导上述患者外周血和关节滑液内T细胞激活, 并产生大量的促炎症细胞因子, 如TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ , 提示IL-21参与了关节滑膜组织慢性炎症发生。

已有研究报道<sup>[14]</sup>, 在炎症性肠病患者, 尤其是克罗恩病患者的炎症肠黏膜组织内IL-21 mRNA水平增高, IL-21可以诱导肠黏膜组织内单个核淋巴细胞增殖, 分泌高水平的促炎症介质(如TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ )等。同时文献报道证实, IL-21可以诱导炎症性肠病患者肠黏膜组织内成纤维母细胞表达高水平的基质金属蛋白酶(如MMP-1, -2, -3, -9), 参与肠黏膜组织的炎症损伤<sup>[15]</sup>。本研究发现UC患者外周血和肠黏膜组织内的CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T细胞、B细胞和NK细胞IL-21R表达显著升高, 其可能的机制是在活动性UC病变时, 上述淋巴细胞可能受到肠道内细菌抗原等的刺激, 诱导上述淋巴细胞激活。另外, 体外实验发现, IL-21可以诱导UC患者外周血和肠黏膜组织内淋巴细胞激活, 分泌高水平的促炎症细胞因子, 进一步放大肠黏膜局部炎症反应。近来, 文献报道提示在小鼠关节炎动物模型中使用IL-21R融合蛋白阻断IL-21R信号传递, 可以显著地阻断小鼠关节炎的发生<sup>[16]</sup>。而本研究结果提示在UC患者外周血和肠黏膜组织内淋巴细胞IL-21R表达增高, 并能诱导淋巴细胞分泌促炎症介质。因此, 本结果为将来在临床上实施靶向性阻断IL-21R信号治疗UC奠定了重要的理论基础。

#### 4 参考文献

- 1 刘占举, 王丽萍. 肠黏膜先天性免疫应答与炎症损伤. 胃肠病学 2007; 12: 120-123
- 2 Strober W, Fuss I, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 2007; 117: 514-521
- 3 申民强, 刘占举. 炎症性肠病患者NK细胞激活和效应应答. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3173-3177
- 4 任宏宇, 邹开芳. 炎症性肠病肠黏膜组织内淋巴细胞激活和效应应答. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3178-3180
- 5 刘丽娜, 梁丽娜. 炎症性肠病与肠黏膜免疫调节细胞. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3181-3186
- 6 白爱平. 炎症性肠病肠黏膜屏障损伤机制. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3187-3191
- 7 吴小平, 欧阳春晖. 防御素与炎症性肠病. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3204-3207
- 8 Leonard WJ, Spolski R. Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 688-698
- 9 Spolski R, Leonard WJ. Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 2008; 26: 57-79
- 10 中华医学消化病学分会炎症性肠病协作组. 中国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见. 中华内科杂志 2008; 47: 73-79
- 11 刘占举, 酒金霞. CD40辅助信号诱导对炎症性肠病患者淋巴细胞细胞因子分泌的影响. 郑州大学学报(医学版) 2006; 50: 823-825
- 12 Liu Z, Jiu J, Liu S, Fa X, Li F, Du Y. Blockage of tumor necrosis factor prevents intestinal mucosal inflammation through down-regulation of interleukin-23 secretion. *J Autoimmun* 2007; 29: 187-194
- 13 Li J, Shen W, Kong K, Liu Z. Interleukin-21 induces T-cell activation and proinflammatory cytokine secretion in rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* 2006; 64: 515-522
- 14 Monteleone G, Monteleone I, Fina D, Vavassori P, Del Vecchio Blanco G, Caruso R, Tersigni R, Alessandroni L, Biancone L, Naccari GC, MacDonald TT, Pallone F. Interleukin-21 enhances T-helper cell type I signaling and interferon-gamma production in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2005; 128: 687-694
- 15 Monteleone G, Caruso R, Fina D, Peluso I, Gioia V, Stolfi C, Fantini MC, Caprioli F, Tersigni R, Alessandroni L, MacDonald TT, Pallone F. Control of matrix metalloproteinase production in human intestinal fibroblasts by interleukin 21. *Gut* 2006; 55: 1774-1780
- 16 Young DA, Hegen M, Ma HL, Whitters MJ, Albert LM, Lowe L, Senices M, Wu PW, Sibley B, Leathurby Y, Brown TP, Nickerson-Nutter C, Keith JC Jr, Collins M. Blockade of the interleukin-21/interleukin-21 receptor pathway ameliorates disease in animal models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 1152-1163

#### ■同行评价

本文科学性较强, 结果可信, 有一定的理论意义和潜在的应用价值。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

#### • 消息 •

## 中国科技期刊引证报告(核心版)发布 WJG 2007 年影响因子 0.745

本刊讯 2007年World Journal of Gastroenterology(WJG)的总被引频次为4431, 位居全部1723种中国科技论文统计源期刊的第14位, 内科医学类28种期刊的第1位。2007年WJG的影响因子为0.745, 内科医学类28种期刊的第10位。即年指标0.163, 他引率0.85, 引用刊数482种, 扩散因子10.88, 学科影响指标0.73。(编辑: 程剑侠 2009-01-08)