

IL-21诱导自身免疫性肝炎患者促炎症细胞因子分泌

王修齐, 刘嫦钦, 刘占举

■背景资料

研究发现IL-21参与了多种自身免疫性疾病的发生, 如炎症性肠病、系统性硬化、风湿性关节炎、系统性红斑狼疮和糖尿病等。本课题重点探讨IL-21R在AIH患者外周血淋巴细胞上的表达及其免疫病理作用。

王修齐, 河南省人民医院消化内科 河南省郑州市 450003
刘嫦钦, 刘占举, 同济大学附属第十人民医院胃肠内科 上海市 200072

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

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王修齐与刘占举完成。

通讯作者: 刘占举, 教授, 200072, 上海市延长中路301号, 同济大学附属第十人民医院胃肠内科. zhanjuliu@yahoo.com

电话: 021-66301164

收稿日期: 2009-04-28 修回日期: 2009-06-05

接受日期: 2009-06-08 在线出版日期: 2009-07-18

IL-21 induces the secretion of proinflammatory cytokines in patients with autoimmune hepatitis

Xiu-Qi Wang, Chang-Qin Liu, Zhan-Ju Liu

Xiu-Qi Wang, Department of Gastroenterology, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, Henan Province, China

Chang-Qin Liu, Zhan-Ju Liu, Department of Gastroenterology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China

Supported by: the New Century Talent Supporting Scheme Projects of the Ministry of Education, No. NCET-05-0609

Correspondence to: Professor Zhan-Ju Liu, Department of Gastroenterology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China. zhanjuliu@yahoo.com

Received: 2009-04-28 Revised: 2009-06-05

Accepted: 2009-06-08 Published online: 2009-07-18

Abstract

AIM: To detect the expression of IL-21 receptor (IL-21R) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with autoimmune hepatitis (AIH) and analyze the secretion of proinflammatory cytokines (e.g., TNF- α , IFN- γ and IL-2) in cultured PBMCs stimulated with IL-21.

METHODS: Peripheral blood samples were collected from 21 AIH patients and 25 healthy controls, respectively. The expression of IL-21R in CD4⁺ and CD8⁺ T cells was examined by flow cytometry. After cultured PBMCs were stimulated with IL-21 and anti-CD3, the secretion of cytokines was examined by ELISA.

RESULTS: IL-21R was significantly upregulated in CD4⁺ and CD8⁺ T cells ($7.66\% \pm 2.37\%$

vs $3.12\% \pm 0.76\%$ and $9.42\% \pm 2.48\%$ vs $4.02\% \pm 0.89\%$, respectively; both $P < 0.05$). After stimulation with IL-21 and anti-CD3, the levels of secreted TNF- α , IFN- γ and IL-2 in PBMCs from AIH patients were significantly higher than those in PBMCs from healthy controls ($P < 0.05$).

CONCLUSION: IL-21R is highly expressed in T cells from AIH patients, and IL-21 is able to induce the secretion of proinflammatory cytokines, suggesting that IL-21 is involved in the process of tissue injury in AIH.

Key Words: Autoimmune hepatitis; Peripheral blood mononuclear cell; T cell; Interleukin-21; Receptor

Wang XQ, Liu CQ Liu ZJ. IL-21 induces the secretion of proinflammatory cytokines in patients with autoimmune hepatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(20): 2096-2098

摘要

目的: 探讨IL-21在自身免疫性肝炎(AIH)发生过程中的免疫病理作用。

方法: 采集21例AIH患者和25例健康成人外周血样本, 使用流式细胞仪检测PBMC表面IL-21R的表达。培养外周血单核淋巴细胞(PBMC), 使用IL-21和抗CD3单抗刺激, 使用ELISA检测上清液中TNF- α 、IFN- γ 和IL-2水平。

结果: AIH患者外周血中CD4⁺、CD8⁺ T细胞表达IL-21R水平比健康对照组显著升高($7.66\% \pm 2.37\%$ vs $3.12\% \pm 0.76\%$, $9.42\% \pm 2.48\%$ vs $4.02\% \pm 0.89\%$, 均 $P < 0.05$)。体外培养PBMC, 发现IL-21可显著诱导AIH患者PBMC分泌高水平的TNF- α 、IFN- γ 和IL-2($P < 0.05$)。

结论: AIH患者外周血T细胞表达IL-21R水平明显升高, 并诱导T细胞分泌高水平的促炎症介质, 提示IL-21参与了肝脏自身免疫损伤过程。

关键词: 自身免疫型肝炎; 外周血单核淋巴细胞; T细胞; 白介素-21; 受体

王修齐, 刘嫦钦, 刘占举. IL-21诱导自身免疫性肝炎患者促炎症

■同行评议者

黄志勇, 教授, 华中科技大学同济医院普外科

细胞因子分泌. 世界华人消化杂志 2009; 17(20): 2096-2098
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2096.asp>

0 引言

自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)是一种原因不明的肝脏慢性炎症, 主要表现为小叶内和间隔胆管的进行性炎症性破坏, 伴门静脉周围炎症, 继而纤维化, 最后演变为肝硬化, 最终引起门静脉高压及终末期肝病的其他并发症而导致死亡^[1]. 大量研究发现AIH患者肝脏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- α), 这些淋巴细胞和炎症介质在肝脏炎症损伤过程中起着重要作用^[1-2]. IL-21是由CD4⁺ T细胞分泌的细胞因子, 并参与了一些免疫病理损伤疾病发生过程^[3]. 本文重点检测AIH患者外周血T细胞IL-21R表达, 并分析IL-21对外周血T细胞的效应应答.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2007-04/2009-04河南省人民医院消化内科门诊或/和病房住院的AIH患者21例, 男3例, 女18例, 年龄19-47(平均为32.4)岁. 其中12例外周血抗核抗体(ANA)阳性, 10例患者抗平滑肌抗体(SMA)阳性, 7例患者ANA和SMA均阳性, 所有患者均未接受任何免疫抑制剂治疗, 并均接受肝脏穿刺病理组织学检查. AIH患者的临床诊断根据临床症状、体征、肝功能检查和肝组织病理学检查等确诊^[4]. 另外, 选择25例健康者作对照研究, 男12例, 女13例, 年龄18-42(平均为30.1)岁. 所有研究对象均征求同意后进行研究, 并取得医院的同意. 异硫氰酸荧光素(FITC)标记的小鼠抗人CD4、CD8单抗、藻红蛋白(PE)标记的羊抗小鼠mAb均为美国BD PharMingen公司原装产品; 小鼠抗人IL-21R mAb为美国R&D公司产品; 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; 淋巴细胞分离液购于上海试剂二厂.

1.2 方法

1.2.1 外周血单核淋巴细胞采集: 收集所有对象抗凝静脉血5 mL, 采用淋巴细胞分离液分离外周血单核淋巴细胞(PBMC), 使用PBS液将PBMC稀释为 1×10^6 /L浓度待用.

1.2.2 IL-21R表达水平分析: 用PBS液洗涤PBMC细胞2次, 然后使用FITC标记的CD4或CD8单克隆抗体染色, 于4℃避光作用20 min, 然后用PBS液洗涤1次去除未结合的抗体. 所得细胞再

用抗人IL-21R抗体染色, 30 min后, 用PBS液洗涤, 再用PE-标记的羊抗小鼠二抗染色, 30 g/L多聚甲醛溶液固定细胞, 最后使用美国BD公司FACScan流式细胞仪测定CD4⁺、CD8⁺ T细胞IL-21R表达水平. 利用CellQuest软件分析样本中IL-21R阳性细胞表达水平^[5].

1.2.3 IL-21诱导PBMC分泌细胞因子: 首先用小鼠抗人CD3 mAb(克隆UCHT1、5 μ g/L)包被24孔培养板, 4℃过夜待用. 培养PBMC(1×10^6 /L), 使用IL-21(50 μ g/L)和抗CD3抗体刺激. 48 h后, 收集培养上清液, 采用ELISA方法检测TNF- α 、IFN- γ 和IL-2, 具体参照我们近期报道文献^[5].

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 AIH患者外周血T细胞IL-21R表达 流式细胞仪检测发现, AIH患者外周血中CD4⁺、CD8⁺ T细胞表达IL-21R水平比健康对照者明显升高($7.66\% \pm 2.37\%$ vs $3.12\% \pm 0.76\%$, $9.42\% \pm 2.48\%$ vs $4.02\% \pm 0.89\%$, $P < 0.05$).

2.2 IL-21诱导AIH患者PBMC分泌促炎症细胞因子水平 实验分析发现, IL-21可显著地诱导AIH患者外周血PBMC分泌高水平的TNF- α 、IFN- γ 和IL-2($P < 0.05$, 表1).

3 讨论

IL-21属于 γ c细胞因子家族成员, 与IL-2、IL-4和IL-15具有同源性, 其中与IL-15同源性最高. 人类的IL-21基因位于4q26-q27染色体上, 其蛋白由162个氨基酸组成, 其中前31个氨基酸为信号肽, 成熟蛋白为131个氨基酸, 形成4个螺旋结构^[3]. 研究发现IL-21主要由激活的CD4⁺ T细胞, 包括Th1、Th2和Th17细胞及NKT细胞表达^[3], 而IL-21R在CD4⁺、CD8⁺ T、B、NK细胞以及树突状细胞均有不同程度的表达^[3]. IL-21可以扩大CD4⁺和CD8⁺ T细胞的增值, 通过其增值提高细胞因子的分泌; 同时IL-21还可以诱导B细胞激活为记忆性细胞并最终分化成浆细胞及提高活化的NKT细胞.

研究发现IL-21可显著增强抗CD3单抗诱导的T细胞增殖分化, 并增加CD8⁺ T细胞的活化、增殖和效应功能, 同时可以诱导Th17细胞的分化^[3,6]. IL-21可诱导激活的免疫记忆T细胞表达Th1相关的转录因子T-bet; 然而, IL-21亦可以抑制幼稚T细胞向表达IFN- γ 的Th1细胞转化, 参与

■相关报道

已有研究报道发现一些促炎症细胞因子(如TNF- α 、IL-12)参与了AIH的病理生理发生过程, 为AIH患者进行靶向生物免疫治疗开辟新的治疗途径. 本文研究IL-21在AIH中的免疫病理作用, 为临床上开展靶向阻断IL-21生物学活性治疗AIH提供理论依据.

■创新盘点

本文使用流式细胞仪检测AIH患者外周血淋巴细胞IL-21R表达. 体外细胞培养发现IL-21可以刺激淋巴细胞激活, 并分泌促炎症细胞因子.

■应用要点

初步发现IL-21R在AIH患者外周血淋巴细胞上表达升高,并诱导淋巴细胞促炎症细胞因子分泌,为将来靶向阻断IL-21生物学活性治疗AIH奠定重要的理论基础。

表 1 IL-21诱导AIH患者PBMC分泌促炎症细胞因子 (pg/L)

分组	n	IFN- γ	TNF- α	IL-2
健康对照	25	1265 \pm 325	118 \pm 31	432 \pm 156
UC患者	21	3468 \pm 528 ^a	468 \pm 98 ^a	869 \pm 253 ^a

^aP<0.05 vs 健康对照。

Th2免疫应答。目前一些研究发现IL-21参与了多种自身免疫性疾病的发生,如系统性硬化、风湿性关节炎(RA)、系统性红斑狼疮、糖尿病等^[3,6]。我们^[7]既往研究报道了IL-21R信号在RA的免疫病理作用,发现IL-21R阳性细胞在RA患者的炎性滑膜中表达增加,流式细胞仪分析证实了IL-21R主要表达在外周血和关节滑液内的CD4⁺、CD8⁺ T、B和NK细胞上。分离RA患者外周血和关节滑液中的T细胞,进行体外培养,使用IL-21刺激,发现IL-21可以显著地刺激T细胞激活,分泌高水平的促炎症细胞因子(如TNF- α 、IFN- γ 、IL-2),这些结果提示IL-21R信号参与了关节滑膜的炎症损伤过程。近期,我们^[5]在炎症性肠病患者中也研究发现IL-21R在外周血T、B和NK细胞表面表达升高,并能诱导外周血T细胞激活,并产生大量促炎症细胞因子。这些研究均提示IL-21参与了一些自身免疫性疾病的发生。

AIH病理生理学改变主要以高球蛋白血症、循环自身抗体和组织学上有界面性肝炎及汇管区浆细胞浸润为特征。已有研究报道^[8],在AIH病变过程中,肝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介质,这些激活的T细胞可以破坏肝脏细胞以及胆管上皮细胞,造成肝组织炎症损伤^[8-10]。本研究发现AIH

患者外周血的CD4⁺、CD8⁺ T细胞表达IL-21R显著升高;体外实验发现,IL-21可以诱导AIH患者外周血T淋巴细胞激活,分泌高水平的TNF- α 、IFN- γ 和IL-2,进一步放大肝脏组织炎症反应。总之,本研究结果提示在AIH病变过程中,淋巴细胞IL-21R表达增高,IL-21R信号可以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AIH奠定了重要的理论基础。

4 参考文献

- 1 Teufel A, Galle PR, Kanzler S. Update on autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 1035-1041
- 2 Vergani D, Mieli-Vergani G. Aetiopathogenesis of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3306-3312
- 3 Leonard WJ, Spolski R. Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 688-698
- 4 Bogdanos DP, Invernizzi P, Mackay IR, Vergani D. Autoimmune liver serology: current diagnostic and clinical challenges. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3374-3387
- 5 夏兴洲, 刘占举. IL-21受体自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. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 102-105
- 6 Spolski R, Leonard WJ. Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 2008; 26: 57-79
- 7 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
- 8 Czaja AJ. Autoimmune liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2008; 24: 298-305
- 9 Eksteen B, Afford SC, Wigmore SJ, Holt AP, Adams DH. Immune-mediated liver injury. *Semin Liver Dis* 2007; 27: 351-366
- 10 Czaja AJ. Autoimmune hepatitis. Part A: pathogenesis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2007; 1: 113-128

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

■同行评价

本研究选题新颖,结果可靠,证据充足,具有较好的学术价值。

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

●消息●

世界华人消化杂志投稿方式

本刊讯 本刊只接受在线投稿,不接受其他方式的投稿,如E-mail,印刷版。在线投稿网址: <http://wcjd.wjgnet.com/>在线提交未成功,请通过submission@wjgnet.com,电话: 010-8538 1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助。投稿须知下载网址<<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>>审稿过程平均时间需要14 d。来稿均经2-3位同行专家严格评审,2位或以上通过为录用,否则将退稿或修改后再审。接受后的稿件作者需缴纳稿件处理费及发表费,文章发表后可获得2本样刊及20套单行本(稿酬)。(常务副总编辑:张海宁 2009-07-18)