·实验研究与卫生检验·

# 老年银屑病患者外周血 Th17 细胞的表达变化及 RORγt 基因表达意义

杨爱琴, 卞坤鹏, 翟伟, 翟翊然, 田卓
河南省南阳市中心医院,河南 南阳 473009

**摘要: 目的** 检测银屑病患者外周血中 Th17 细胞、RORγt 基因表达的变化情况,对其在银屑病发病中的作用进行探讨。 **方法** 收集南阳市中心医院 2015 年 6 月-2016 年 6 月收治的银屑病患者血液标本 34 例,另取健康对照标本 20 例。流式细胞仪检测 Th17 细胞的表达百分比;Trizol 提取血液淋巴细胞总 RNA,荧光定量 PCR 检测人孤独核受体 γt(RORγt)基因的表达。 **结果** 对照组和银屑病组受试者外周血中 $CD4^+IL-17^+$抗体双阳的 Th17 细胞比例分别为(1.47±0.86)%和(9.64±2.32)%,两组差异有统计学意义($t$=10.66,$P$<0.01)。正常对照组和银屑病组受试者外周血淋巴细胞中 RORγt 基因的表达量分别为(0.206±0.072)和(0.462±0.113),两组差异有统计学意义($t$=9.92,$P$<0.01)。 **结论** 银屑病患者中存在 Th17 细胞的升高,升高的 Th17 细胞可能参与了银屑病的发生发展,RORγt 基因的激活可能是 Th17 细胞上调的主要原因。

**关键词:** 银屑病; Th17 细胞; RORγt 基因
**中图分类号:**R758.63 **文献标识码:**B **文章编号:**1006-3110(2017)10-1264-03 DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2017.10.034

银屑病(psoriasis)是一个以侵犯皮肤为主的自身免疫性慢性皮肤增生性疾病,人群发病率为 0.1%~3%,其中黄种人发病率略低,约为 0.1%~0.3%[1]。银屑病的发病机制十分复杂,目前尚不清楚,因此临床治疗往往难以取得好的疗效,其皮损病变往往迁延不愈,使患者的正常工作和社会交往受到严重影响,给患者、家庭及社会带来了沉重的精神和经济负担[2],因此对银屑病的发病机理进行深入的研究,寻找新的有效的突破点,是目前临床工作者们急需解决的关键问题。近期 T 淋巴细胞的异常对银屑病的致病作用越来越受到学者们的关注,Th17 细胞是新发现的一类

**基金项目:**河南省卫生计生委科技攻关项目(201406233)
**作者简介:**杨爱琴(1970-),女,本科学历,副主任医师,主要从事皮肤及性病临床工作。

的病原菌以革兰阴性菌为主,常见病原菌耐药现象较为严重,临床应合理应用抗生素,避免多重耐药的院内传播。

**参考文献**

[1] Liu R, Li W, Li Y, et al. Total time of operation is a risk factor of stroke-associated pneumonia in acute ischemic stroke patients with intra-arterial treatment[J]. Medicine,2016,95(29):e3958.
[2] Aoki S, Hosomi N, Hirayama J, et al. The multidisciplinary swallowing team approach decreases pneumonia onset in acute stroke patients[J]. PLoS One,2016,11(5):0154608.
[3] Palazzo P, Brooks A, James D, et al. Risk of pneumonia associated with zero-degree head positioning in acute ischemic stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator[J]. Brain Behav, 2016,6(2):e00425.
[4] Al-Khaled M, Matthis C, Binder A, et al. Dysphagia in patients with acute ischemic stroke: early dysphagia screening may reduce stroke-related pneumonia and improve stroke outcomes[J]. Cerebrovasc Dis, 2016,42(1-2):81-89.
[5] Takizawa C, Gemmell E, Kenworthy J, et al. A systematic review of the prevalence of oropharyngeal dysphagia in stroke, Parkinson´s disease, Alzheimer´s disease, head injury, and pneumonia[J]. Dysphagia,2016,31(3):434-441.
[6] Warusevitane A, Karunatilake D, Sim J, et al. Early diagnosis of pneumonia in severe stroke: clinical features and the diagnostic role of C-reactive protein[J]. PLoS One,2016,11(3):e0150269.
[7] 张玉坤. 脑卒中患者医院内获得性肺炎危险因素及防治对策[J]. 中国实用神经疾病杂志,2016,19(13):102-103.
[8] 辛丽云,陈乾华,潘娜,等. 脑卒中患者医院获得性肺炎的病原菌分布及药敏分析[J]. 现代生物医学进展,2016,16(21):4096-4099.
[9] García-Laorden MI, Stroo I, Blok DC, et al. Granzymes A and B regulate the local inflammatory response during *Klebsiella pneumoniae* pneumonia[J]. J Innate Immun, 2016,8(3):258-268.
[10] Choi IS, Lee YJ, Wi YM, et al. Predictors of mortality in patients with extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* pneumonia receiving colistin therapy[J]. Int J Antimicrob Agents,2016,48(2):175-180.
[11] 林云万,梁颖,茹贺征,等. 某院 ICU 多重耐药鲍曼不动杆菌耐药性和碳青霉烯酶耐药基因分析[J]. 实用预防医学,2015,22(11):1313-1315.
[12] 龚燕飞,曾强,刘湘林,等. 65 株鲍曼不动杆菌耐药性分析[J]. 实用预防医学,2014,21(4):481-483.

**收稿日期:**2017-01-10

CD4 阳性 T 细胞,已有研究显示其与多种炎性和自身免疫性疾病的发生、发展有着密切的关系,例如类风湿关节炎、哮喘、溃疡性结肠炎等[3-4]。孤独核受体 γt (orphan nuclear receptor gammat, RORγt)基因是 Th17 细胞分化发育的重要转录因子,RORγt 可协同转录因子 T-bet 作用而起到重要的调节效应,从而诱导 INF-γ 基因表达,并与 Th17 细胞表达水平有密切的关系。本文对银屑病患者外周血中 Th17 细胞的表达及 RORγt 基因改变情况进行研究分析,进一步探讨其在银屑病致病中的相关临床意义。

## 1 对象与方法

1.1 对象 选取南阳市中心医院 2015 年 6 月-2016 年 6 月收治的银屑病患者血液标本 34 例,病例诊断参照文献[5]的诊断标准,男 21 例,女 13 例,年龄 59~83 岁,平均(71.4±11.5)岁。另取同期该院体检中心健康体检者 20 例作为正常健康对照组,其中女 9 例,男 11 例,年龄范围 61~80 岁,平均年龄(70.4±9.1)岁。所选银屑病患者半年内未服用皮质类固醇激素等免疫抑制剂或免疫调节剂,无心、肝、肺、肾等重要脏器的疾病以及其它炎性或自身免疫系统疾病。两组研究对象在性别比例、年龄范围、体重等一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 主要试剂与仪器 银屑病组淋巴细胞分离液为 FITC-CD4、PE-IL-17A 抗体(由天津灏洋生物制品科技有限责任公司产品),RORγt 试剂盒由美国 BD 公司提供,Trizol、逆转录试剂盒、SYBR Green 荧光定量检测试剂盒(由天根生化科技(北京)有限公司提供),流式细胞液由美国 Beckman Coulter 公司生产的(FC500),荧光定量 PCR 仪为美国 ABI 公司生产(ABI 7000)。

1.3 血液 Th17 T 淋巴细胞的流式细胞仪检测

1.3.1 淋巴细胞分离和抗体染色 严格按照荧光抗体说明书操作,简述如下:收集两组患者静脉血 10 ml 置于含肝素钠抗凝的试管中,让血液中加入 Hank's 缓冲液,置于 2 000 r/min 的离心机中离心 20 min,分离淋巴细胞,并 Hank's 缓冲液洗涤细胞 2 次,加入 500 μl 缓冲液重悬细胞,分别加入一抗、二抗,避光室温孵育 30 min。

1.3.2 流式细胞仪的检测 检测时根据前向散色光(FSC)和侧向散色(SSC)散射光信号对淋巴细胞群进行设门,然后取出杂细胞,同型对照调零,采用双通道检测 CD4 和 IL-17 抗体双阳性的 Th17 T 淋巴细胞。

1.4 淋巴细胞总 RNA 的提取以及荧光定量 PCR 检测 对分离淋巴细胞的总 RNA 按照 Trizol 试剂盒说明书操作方法进行提取,并根据逆转录试剂盒说明书反转录出 cDNA 第一链,同时按照 SYBR Green 荧光定量检测试剂盒说明书进行操作,加入相应的引物和 Taq 酶检测人孤独核受体 γt (orphan nuclear receptor gammat, RORγt)基因的表达。上游引物为:5′- GCTGTGATCTTGCCCAGAACC -3′,下游引物为:5′- CTGCCCATCATTGCTGTTAATCC -3′;内参照取 GAPDH 基因上游引物为:5′-GGATTTGGTCGTATTGGG-3′,下游引物为:5′- GGAAGATGGTGATGGGATT-3′,反应条件是:95 ℃ 1 min;95 ℃ 15 s, 60 ℃ 15 s,72 ℃ 20 s, 35 个循环。Ct 值表明基因扩增达到阈值的循环数,△Ct 值=目的基因 Ct 值-内参基因 Ct 值,目的基因的表达量采用 $2^{-\triangle Ct}$ 进行判定。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件包处理数据,组间计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,采用 $t$ 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

2.1 两组在外周血 Th17 细胞表达上的比较 两组受试者外周血中 $CD4^+IL-17^+$ 抗体双阳的 Th17 T 淋巴细胞比例分别为(1.47±0.86)%和(9.64±2.32)%,统计学分析显示两组之间差异有统计学意义($t=15.10$,$P<0.01$),见表 1。

**表 1** Th17 T 淋巴细胞在两组受试者中的表达百分比的比较

| 组别 | 例数 | Th17 T 淋巴细胞(%,$\bar{x}\pm s$) |
|---|---|---|
| 对照组 | 20 | 1.47±0.86 |
| 银屑病组 | 34 | 9.64±2.32 |

2.2 两组在外周血淋巴细胞 RORγt 基因表达上的比较 两组受试者外周血淋巴细胞中 RORγt 基因的表达量分别为(0.206±0.072)和(0.462±0.113),两组之间差异有统计学意义($t=9.085$,$P<0.01$),见表 2。

**表 2** 两组受试者外周血淋巴细胞中 RORγt 基因表达量的比较

| 组别 | 例数 | RORγt 基因($2^{-\triangle Ct}$) |
|---|---|---|
| 对照组 | 20 | 0.206±0.072 |
| 银屑病组 | 34 | 0.462±0.113 |

## 3 讨 论

银屑病是一种常见的慢性复发性、炎症性皮肤增生性疾病,其发病机制比较复杂,可能涉及遗传、代谢、免疫、感染、内分泌、环境等多种因素,确切病因尚未明了,目前主要有两大学说:一是原发性的表皮细胞生长

紊乱,另一个是免疫异常介导的表皮细胞过度增生。目前,越来越多的学者经过研究相信银屑病是一种多因素、多基因积累引发的自身免疫系统疾病,近年来,银屑病患者免疫系统的异常改变成为相关研究的热点和关键点[6-7]。

自身免疫性疾病多伴有 T 细胞异常的表达,主要是因为 $CD4^+$T 细胞是参与细胞,目前研究发现 $CD4^+$T 细胞有四个亚群为 Th1、Th2、Th17 和 Treg,其中新进发现 Th17 细胞是一种强的致炎细胞,可以产生 IL-17,其能够诱导如 IL-6、IL-8 等很多致炎因子的表达[8-9],其中 IL-6 是已被证实的强炎症反应因子并参与多种炎症性疾病的发生发展,CD4 和 IL-17A 是 Th17 细胞的表面标志,荧光双标记后使用流式细胞仪可以将 $CD4^+IL-17^+$Th17 细胞检测出来,本研究的流式细胞检测结果显示银屑病患者中 CD4 和 IL-17 双阳性的 Th17 细胞显著高于正常对照人群,说明了 Th17 细胞表达的上调与银屑病的发生发展过程有着密切的关系。Th17 细胞活化后可以产生级联反应激活大量的炎症因子,这些因子相互作用调控和刺激了银屑病皮肤表皮细胞的异常增殖,例如 Th17 细胞分泌的 IL-17 就可以激活中性粒细胞并抑制其在炎症反应中的凋亡发生,使其可以长期的存在于病灶处发挥炎症作用[10-11],同时 IL-17 也可以抑制转化生长因子-β1(transforming growth factor-beta1,TGF-β1),TGF-β1 是一个强烈的炎症抑制因子[12-13]。

$CD4^+$T 细胞向 Th17 细胞分化受到孤独核受体 γt(Orphan nuclear receptor gammat,RORγt)的调控,血液中的 IL-6 等炎症因子可以诱导 RORγ 表达升高、Th17 细胞的分化[14-15]。本研究的荧光定量 PCR 结果显示银屑病患者中 RORγt 基因的表达显著高于正常健康对照人群,说明了银屑病患者外周血 Th17 细胞比例的升高是通过激活了 RORγt mRNA 的表达来实现的,可以认为转录因子 RORγt 不仅能直接调控 Th17 细胞分化发育,而且能促进 $CD4^+$T 细胞 IFN-γ 表达。既往研究指出,IFN-γ 能有效抑 Th17 细胞的活性,而本研究中则提示 RORγt 不仅能正性调控 Th17 细胞分化发育,而且可通过诱导 IFN-γ 产生抑制 Th17 细胞过度增殖,让 Th17 细胞数量处于一定水平,维持机体免疫动态平衡。其中具体的表达调控机制还有待进一步的研究。

综上所述,银屑病患者中存在 Th17 细胞的升高,RORγt 基因的激活可能是 Th17 细胞上调的主要原因,调控 Th17 细胞的比率可能成为治疗银屑病的新思路。

**参考文献**


[1] Tan J, Wolfe B. A patient decision aid for psoriasis based on current clinical practice guidelines PDA for psoriasis[J]. Arch Dermatol, 2012, 148(6):718-723.

[2] Ghazizadeh R, Tosa M, Ghazizadeh M. Clinical improvement in psoriasis with treatment of associated hyperlipidemia[J]. Am J Med Sci, 2011, 341(5):394-398.

[3] Xiu-Fen, Zheng Yue-Dong, Sun Xue-Yan, et al. Correlation of expression of STAT3, VEGF and differentiation of Th17 cells in psoriasis vulgaris of guinea pig[J]. Asian Pac J Trop Med, 2014,7(4):313-316.

[4] A, Campanati M, Orciani V, et al. Characterization and profiling of immunomodulatory genes in resident mesenchymal stem cells reflect the Th1-Th17/Th2 imbalance of psoriasis[J]. Arch Dermatol Res, 2014, 306(10): 915-920.

[5] 蒋明, David Yu, 林孝义, 等. 中华风湿病学[M]. 北京:华夏出版社, 2004:1026-1033.

[6] 郑敏. 银屑病是细胞免疫介导性疾病[J]. 中华皮肤科杂志, 2002, 35(2):85-87.

[7] Coimbra S, Figueiredo A, Castro E, et al. The roles of cells and cytokines in the pathogenesis of psoriasis[J]. Int J Dermatol, 2012, 51(4):389-395.

[8] Sonder SU, Paun A, Ha HL, et al. CIKS/Act1-mediated signaling by IL-17 cytokines in context: implications for how a CIKS gene variant may predispose to psoriasis[J]. J Immunol, 2012, 188(12):5906-5914.

[9] Nakajima K. Critical role of the interleukin-23/T-helper 17 cell axis in the pathogenesis of psoriasis[J]. J Dermatol, 2012, 39(3):219-224.

[10] Singh K, Gatzka M, Peters T, et al. Reduced CD18 levels drive regulatory T cell conversion into Th17 cells in the CD18hypo PL/J mouse model of psoriasis[J]. J Immunol, 2013, 190(6):2544-2553.

[11] Dong C. Genetic controls of Th17 cell differentiation and plasticity[J]. Exp Mol Med, 2011, 43(1):1-6.

[12] Pantelyushin S, Haak S, Ingold B, et al. Rorγt+innate lymphocytes and γδ T cells initiate psoriasiform plaque formation in mice[J]. J Clin Invest, 2012, 122(6):2252-2256.

[13] Luan L, Han SX, Wang H, et al. Down-regulation of the Th1, Th17, and Th22 pathways due to anti-TNF-α treatment in psoriasis[J]. Int Immunopharmacol, 2015, 29(2):278-284.

[14] 陈丽娜,苏玉文,陆前进. Th17 细胞与银屑病[J]. 中国医师杂志, 2016, 18(2):165-168.

[15] 陆家晴,丁杨峰,于宁,等. 308nm 准分子激光治疗前后对寻常型银屑病患者外周血 Th17/Treg 细胞免疫失衡的研究[J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志, 2016, 15(2): 69-73, 80.


**收稿日期:**2017-03-01