

网络出版时间: 2017-3-21 13:44 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170321.1344.031.html>

IL-23 和 IL-17 在 OSAHS 患者外周血中的水平变化及意义

周 钦, 凌月福

摘要 探讨白介素(IL)-23和IL-17在睡眠呼吸暂停低通气综合征(OSAHS)患者外周血中的水平变化及临床意义。通过ELISA法检测OSAHS患者与正常健康者血清及外周血单个核细胞(PBMCs)上清液中IL-23、IL-17的水平,检测经韩氏悬雍垂腭咽成形术(H-UPPP)治疗前后OSAHS患者血清中IL-23、IL-17含量的变化。OSAHS患者血清及培养的PBMCs上清液中IL-23和IL-17的水平均高于对照组($P < 0.05$)。血清IL-23和IL-17水平随OSAHS严重程度增加而增高,血清和PBMCs上清液中IL-23与IL-17水平均呈正相关性($r_s = 0.644, P < 0.01; r_s = 0.251, P < 0.05$)。经H-UPPP术2个月后,患者血清IL-23、IL-17水平和呼吸紊乱指数均较治疗前有明显降低($P < 0.05$)。患者睡眠质量和夜间低氧有明显改善,最低血氧饱和度较治疗前显著升高($P < 0.05$)。IL-23和IL-17可能在OSAHS的发病及预后中发挥着重要作用。

关键词 睡眠呼吸暂停低通气综合征; IL-23; IL-17

2016-12-12 接收

基金项目: 广西壮族自治区卫生厅科技研究计划课题(编号: Z2007221)

作者单位: 桂林医学院附属医院耳鼻喉头颈外科 桂林 541001

作者简介: 周 钦,男,硕士研究生;

凌月福,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: Lingyuefu@yahoo.com.cn

中图分类号 R 56

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)04-0601-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.04.031

阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征(obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome, OSAHS)是指睡眠中出现的上气道反复塌陷阻塞,伴睡眠紊乱、呼吸暂停、血氧降低、高碳酸血症、白天嗜睡、打鼾等症状,可导致心血管疾病^[1]等并发症,严重危害人们的健康。目前,OSAHS的发病机制尚不清楚,既往研究^[2]显示相关炎症因子如C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)、白介素(interleukin, IL)-6等在OSAHS患者血清中均呈高表达。而近年来对IL-23、IL-17的系统性研究也越发深刻,但关于其在OSAHS疾病方面的研究仍少有涉足。该研究拟通过检测OSAHS患者血清中及外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)上清液中IL-23与IL-17的水平变化,以及经韩氏悬雍垂腭咽成形术(Han-uvulopalatopharyngoplasty, H-UPPP)治疗前后血清中IL-23、IL-17含量的变化,以期探讨IL-23和IL-17在OSAHS病理生理过程及临床中的

Construction of c-met lentiviral vector and stable transfected bone marrow mesenchymal stem cells

Wang Kun¹, Zhu Tiantian¹, Li Yuwen², et al

(¹Dept of Infectious Disease, Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001;

²Dept of Pediatrics, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029)

Abstract To construct cellular-mesenchymal to epithelial transition factor(c-met) lentiviral vector, then transfect it into bone marrow mesenchymal stem cells(BMSCs) stably. c-met was connected to the lentiviral vector GV358, and the lentiviral vector GV358-c-met was restructured. Then the recombinant and lentiviral helper plasmid were co-transfected into 293T cells to generate the target lentivirus which the titer was 2×10^8 TU/ml. After transfecting this lentiviral vector into BMSCs and screening by puromycin, the positive rate of fluorescence was 100% by fluorescence microscopy, and the expression of c-met protein was confirmed by Western blot. Therefore, we successfully constructed c-met lentiviral vector, and established the BMSCs with the characteristics of stable expression c-met protein.

Key words bone marrow mesenchymal stem cell; c-met; lentiviral vector

作用及意义。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取2014年9月~2016年1月桂林医学院附属医院耳鼻咽喉头颈外科收治并经多导睡眠图(polysomnography, PSG)监测确诊的OSAHS患者64例,均按照中华医学会耳鼻咽喉头颈外科学分会咽喉学组制定的《阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征诊治指南》诊断标准^[3],将OSAHS患者按病情严重程度分为:轻度OSAHS组11例,中度OSAHS组17例,重度OSAHS组36例,其中男36例,女28例;年龄35~61(47.41±12.34)岁,均择期行H-UPPP治疗。另选择期健康体检志愿者30例(经PSG检测均正常)作为对照组,其中男18例,女12例;年龄31~60(43.42±10.23)岁。除外肺心病、单纯鼾症、心脑血管疾病、急慢性肝肾病、恶性肿瘤、合并糖尿病、自身免疫系统等疾病患者。各组间的一般资料比较差异无统计学意义,具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 标本收集 各组均于多导睡眠监测完成后的次日晨起时空腹抽取静脉血两份,其中一份(2 ml)4℃静置并3 000 r/min离心10 min,取上清液并于-80℃冰箱冻存待测;另一份(6 ml)则用于PBMCs的分离与培养。

1.2.2 PBMCs的分离与培养 将无菌环境下抽取的静脉血6 ml注入ACD抗凝管中,轻轻摇匀,室温下按体积比为1:1的比例加入PBS稀释混匀,吸取6 ml淋巴细胞分离液(与稀释前的血液标本体积比为1:1)于离心管中,将稀释后的血液缓慢加入已装有淋巴细胞分离液的离心管,18~20℃、2 000 r/min离心20 min。离心后自下而上分为4层,依次为红细胞和粒细胞层、淋巴细胞分离液层、PBMCs层、血浆层。小心吸出PBMCs层置于新的离心管中并加入PBS液混匀,18~20℃、2 000 r/min、10 min离心洗涤2次。加入含有10%热灭活胎牛血清的RPMI 1640培养基(美国Gibco公司)重悬细胞, Trypan blue染色法检测活细胞比例在90%以上,细胞计数后,调节细胞密度为2×10⁶个/ml。将细胞

接种于培养板内,用于50 ng/ml PMA和500 ng/ml Ionomycin(美国Sigma公司)刺激实验。收集刺激后的细胞培养液上清液,-20℃保存。

1.2.3 血清、PBMCs上清液以及H-UPPP治疗后IL-23和IL-17的测定 采用定量ELISA法检测IL-23和IL-17,IL-23 ELISA试剂盒和IL-17 ELISA试剂盒均购自上海研谨生物科技有限公司。OSAHS组患者均于接受H-UPPP手术治疗2个月后再次测定血清中IL-23和IL-17的水平,并与治疗前的含量变化作对比。

1.3 统计学处理 采用SPSS 20.0软件进行分析,所有呈正态分布的实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析(One-way ANOVA)和t检验,相关性分析采用非参数统计的Spearman检验。

2 结果

2.1 各组血清中IL-23、IL-17水平变化的比较 与对照组比较,OSAHS组的血清IL-23、IL-17水平均升高,且随着病情程度的加重,血清中IL-23、IL-17水平也逐步增高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

2.2 OSAHS组与对照组培养的PBMCs上清液IL-23和IL-17水平的比较 检测刺激后的细胞培养液上清液IL-23、IL-17的水平。结果显示,OSAHS组与对照组培养的PBMCs上清液IL-23和IL-17水平均明显升高,两者比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表2。

2.3 血清及体外培养的PBMCs上清液中IL-23与IL-17水平的关系 OSAHS组血清及PBMCs培养液上清液IL-23和IL-17的水平均比对照组增高,为进一步研究两个因子之间的关系,做了相关性分析。OSAHS组血清及PBMCs培养液上清液IL-17与IL-23含量均呈正相关性($r_s = 0.644, P < 0.01; r_s = 0.251, P < 0.05$)。见图1。

2.4 OSAHS组治疗前后血清IL-23和IL-17水平及相关指标的变化 经H-UPPP手术治疗2个月后,患者血清IL-23、IL-17水平和呼吸紊乱指数(apnea-hypopnea index, AHI)均较治疗前有明显降低,

表1 OSAHS组与对照组血清IL-23和IL-17水平的比较(pg/ml $\bar{x} \pm s$)

项目	对照组(n=30)	OSAHS轻度组(n=11)	OSAHS中度组(n=17)	OSAHS重度组(n=36)	F值
IL-23	3.81±1.74	18.45±4.72*	20.26±6.31*	30.25±6.54*#△	140.97
IL-17	16.55±4.05	59.76±12.95*	82.31±13.14*#	117.19±16.04*#△	364.70

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与OSAHS轻度组比较: # $P < 0.05$; 与OSAHS中度组比较: △ $P < 0.05$

表2 OSAHS组与对照组培养的PBMCs上清液IL-23和IL-17水平的比较 (pg/ml $\bar{x} \pm s$)

项目	对照组 (n=30)	OSAHS组 (n=64)	t值	P值
IL-23	20.03 ± 5.13	90.69 ± 26.52	-14.43	<0.01
IL-17	72.56 ± 19.30	246.63 ± 48.17	-19.04	<0.01

表3 OSAHS组治疗前后血清IL-23和IL-17水平及相关指标的变化 (n=64 $\bar{x} \pm s$)

项目	治疗前	治疗后	t值	P值
IL-23 (pg/ml)	25.57 ± 8.15	9.47 ± 2.85	15.12	<0.05
IL-17 (pg/ml)	98.05 ± 15.86	37.10 ± 6.67	17.97	<0.05
AHI (次/h)	38.55 ± 9.71	9.82 ± 3.95	20.45	<0.05
LSO (%)	78.39 ± 8.25	86.95 ± 5.64	-6.98	<0.05

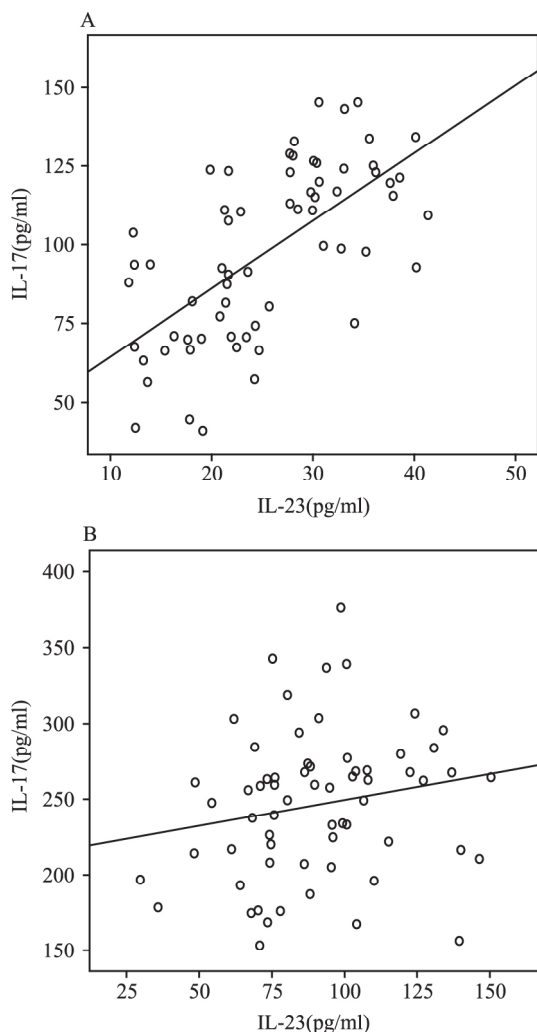


图1 OSAHS组血清与外周血单个核细胞培养液上清液IL-23与IL-17之间的相关性分析
A: OSAHS组血清; B: OSAHS患者PBMCs上清液

差异均有统计学意义 ($P < 0.05$) ,患者睡眠质量有明显提高 ,最低血氧饱和度 (lowest oxyhemoglobin saturation ,LSO) 较治疗前显著升高 ($P < 0.05$) ,差异有统计学意义 ($P < 0.05$) ,夜间低氧状态有明显改善。见表3。

3 讨论

在呼吸睡眠障碍性疾病中 ,以 OSAHS 最为常见^[4] ,可致使人体处于不同程度的低氧状态。长期的慢性间歇性低氧以及高碳酸血症可引起机体的交

感神经兴奋性增高^[5] ,氧化应激 ,导致炎症产生。既往研究^[6]显示 ,OSAHS 是由多种炎症细胞因子介导的一个慢性炎症过程。本研究检测结果显示 ,OSAHS 患者血清中 IL-23、IL-17 的含量较对照组明显升高 ,提示 IL-23、IL-17 可能共同参与 OSAHS 的发生 ,同时两者的水平随着 OSAHS 严重程度分级的增加而增高 ,提示 IL-23、IL-17 在 OSAHS 的动态病程中也起到了重要作用。

随着对炎症及免疫调节机制的深入研究 ,近年来一种主要分泌 IL-17 的 T 细胞亚群逐渐成为新的研究热点 ,称为 Th17 细胞 ,是一类区别于 Th1 和 Th2 的效应 T 细胞 ,能够分化产生 IL-17 ,在炎症反应中具有重要的调节作用^[7]。IL-17 作为一种重要的前炎症因子 ,具有很强的招募和活化中性粒细胞的作用 ,可刺激 T 细胞活化并促进树突状细胞成熟 ,同时介导释放多种炎症介质 ,诱导机体发生炎症反应 ,可提高炎症细胞因子如 IL-6、IL-23 的表达 ,产生协同放大作用^[8-9]。IL-23 是 IL-12 分子家族的成员 ,主要由活化的巨噬细胞和树突状细胞分泌而来 ,具有维持 Th17 细胞活化的重要作用 ,能够刺激 Th17 细胞的增殖和 IL-17 的分泌^[10] ,并促使活化的 Th17 细胞产生慢性炎症因子以及促炎趋化因子^[11]。研究^[12]证明 ,细胞因子 IL-23 在人 Th17 细胞的发育中发挥着不可或缺的作用。有研究^[13]显示 ,缺失 IL-23 的小鼠的抗原呈递细胞刺激 T 细胞分泌 IL-17 前炎症细胞因子的能力显著下降 ,而且 IL-23 缺失小鼠与 IL-17 缺失小鼠呈现相似的表型。由此提示 ,IL-23 可能影响了 IL-17 的表达 ,进而参与 OSAHS 的发展。本研究显示 ,OSAHS 患者血清及培养的 PBMCs 上清液中 IL-23 和 IL-17 的水平均高于对照组 ,且血清和 PBMCs 培养液上清液中 IL-23 与 IL-17 的水平均呈正相关性 ,这表明 IL-23 与 IL-17 在 OSAHS 的病程中存在着一定的相关性 ,两者之间关系密切。

在本研究中 ,OSAHS 组患者经手术治疗 2 个月后血清 IL-23 和 IL-17 水平均较治疗前有明显降低 ,与其他临床常用评价指标如 AHI、LSO 监测结果的

作用相似,说明 IL-23 和 IL-17 的水平变化在一定程度上可以反映 OSAHS 疾病的临床进程和预后。

综上所述,本研究提示 IL-23 和 IL-17 可能共同参与了 OSAHS 的发生发展并影响其炎症反应,同时 IL-23 与 IL-17 的动态水平变化还可作为临床观察 OSAHS 病情进展的又一新指标,进一步完善 OSAHS 的临床诊断。

参考文献

- [1] Jones A, Vennelle M, Connell M, et al. Arterial stiffness and endothelial function in obstructive sleep apnoea/hypopnoea syndrome [J]. *Sleep Med*, 2013, 14(5): 428–32.
- [2] McNicholas W T. Obstructive sleep apnea and inflammation [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2009, 51(5): 392–9.
- [3] 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会,中华医学会耳鼻咽喉头颈外科学分会咽喉学组. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征诊断和外科治疗指南[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2009, 44(2): 95–6.
- [4] 彭裕民, 郭阳. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征的诊断及治疗进展[J]. *临床肺科杂志* 2012, 17(5): 902–3.
- [5] Donadio V, Liguori R, Vetrugno R, et al. Parallel changes in resting muscle sympathetic nerve activity and blood pressure in a hypertensive OSAS patient demonstrate treatment efficacy [J]. *Clin Auton Res*, 2006, 16(3): 235–9.
- [6] 凌月福, 何晓松, 陶赞英, 等. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征患者血清炎症因子的变化及意义[J]. *医学信息旬刊*, 2010, 5(12): 3448–9.
- [7] Sade K, Fishman G, Kivity S, et al. Expression of Th17 and Treg lymphocyte subsets in hypertrophied adenoids of children and its clinical significance [J]. *Immunol Invest*, 2011, 40(6): 657–66.
- [8] Gullick N J, Abozaid H S, Jayaraj D M, et al. Enhanced and persistent levels of interleukin(IL) -17⁺ CD4⁺ T cells and serum IL-17 in patients with early inflammatory arthritis [J]. *Clin Exp Immunol*, 2013, 174(2): 292–301.
- [9] van Nieuwenhuijze A E, van de Loo F A, Walgreen B, et al. 1. 56 Synergism between GM-CSF and IL-17 causes enhanced joint pathology *via* the production of IL-6 and IL-23 [J]. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73 Suppl 1: A24.
- [10] Lv M, Liu Y, Zhang J, et al. Roles of inflammation response in microglia cell through Toll-like receptors 2/interleukin-23/interleukin-17 pathway in cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Neuroscience*, 2011, 176: 162–72.
- [11] Romagnani S. Human Th17 cells [J]. *Arthritis Res Ther*, 2008, 10(2): 206.
- [12] de Beaucoudrey L, Puel A, Filipe-Santos O, et al. Mutations in STAT3 and IL12RB1 impair the development of human IL-17-producing T cells [J]. *J Exp Med*, 2008, 205(7): 1543–50.
- [13] Baars E W, Nierop A F, Savelkoul H F. Development of systems biology-oriented biomarkers by permuted stepwise regression for the monitoring of seasonal allergic rhinitis treatment effects [J]. *J Immunol Methods*, 2012, 378(1–2): 62–71.

The change and significance of IL-23 and IL-17 levels in peripheral blood of patients with OSAHS

Zhou Qin, Ling Yuefu

(Dept of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001)

Abstract To investigate the change and clinical significance of interleukin(IL) -23 and IL-17 levels preliminarily in peripheral blood of patients with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome(OSAHS). The levels of IL-23 and IL-17 in serum and culture supernatants of peripheral blood mononuclear cells(PBMCs) were determined by ELISA in patients with OSAHS and normal volunteers. To observe the changes of IL-23 and IL-17 levels before and after the treatment of Han-uvulopalatopharyngoplasty(H-UPPP) in patients with OSAHS. The levels of IL-23 and IL-17 in serum and culture supernatants of PBMCs in patients with OSAHS were significantly higher than those in normal control group($P < 0.05$), and the levels of serum IL-23 and IL-17 were increased with the disease severity. The levels of IL-23 presented positively correlated with those of IL-17 in both serum and culture supernatants of PBMCs($r_s = 0.644$, $P < 0.01$; $r_s = 0.251$, $P < 0.05$). After two months later of H-UPPP surgery, the levels of serum IL-23 and IL-17 were significantly lower than that before the treatment($P < 0.05$) as well as the apnea-hypopnea index. The sleep quality and low oxygen was improved obviously, and the lowest oxyhemoglobin saturation elevated significantly($P < 0.05$). IL-23 and IL-17 may play an important role in pathogenesis and prognosis of OSAHS.

Key words obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome; IL-23; IL-17