

多发性肌炎肌组织中 Th17 细胞的浸润 *

韩文娟 张红鸭 康 娟 胡萌萌 贾宏阁[△]

(第四军医大学附属西京医院神经内科 陕西 西安 710032)

摘要 目的 探讨多发性肌炎(PM)患者肌肉炎性组织中是否存在 Th17 细胞及数量多少。方法 临床和病理诊断确诊的多发性肌炎患者 16 例,对照组来自非炎性肌病患者 6 例。应用免疫荧光组织化学方法检测 Th17 淋巴细胞的定位及数量。结果 与非肌炎患者比较,免疫荧光组织化学检测到肌炎患者肌肉组织中 IL-17 表达阳性,主要分布在细胞内,且细胞数量的多少与炎症的严重程度成正相关。结论 Th17 细胞有可能参与了多发性肌炎的发病过程。

关键词 多发性肌炎;Th17 细胞;白细胞介素 17(IL-17)

中图分类号 R593.2 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2012)07-1277-03

The Infiltration of Th17 Cells in Muscle Tissues of Polymyositis *

HAN Wen-juan, ZHANG Hong-ya, KANG Juan, HU Meng-meng, JIA Hong-ge[△]

(Department of Neurology, Xi jing Hospital, the Fourth Military Medical University, Shanxi, Xi'an, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the existence and quantities of Th17 cells in the muscle tissue of patients with polymyositis.

Methods: 16 patients with polymyositis after a diagnosis of clinical and pathological; control group is 6 patients from non-inflammatory myopathy. Detect the location and the number of IL-17-producing effector T helper cells through immunofluorescence. **Results:** Compared to non-inflammatory myopathy, IL-17 positively expresses in patients with polymyositis which is mainly in cells, and the number of Th17 cells is positively related to the severity of inflammation. **Conclusions:** The Th17 cells may be involved in the pathogenesis of polymyositis.

Key words: Polymyositis; Th17 Cells; Interleukin-17

Chinese Library Classification: R593.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)07-1277-03

前言

Th17 淋巴细胞^[1-3]是近年来发现的一种不同于 Th1 和 Th2 细胞的另一种辅助性 CD4⁺T 细胞亚型,因其分泌 IL-17 而得名,其介导炎症反应,参与多种自身免疫性疾病的发生和发展^[2-5]。目前认为 PM 是细胞毒性 T 细胞为主介导的自身免疫性疾病,但 Th17 细胞是否也参与 PM 发病过程,尚未有直接证据的报道。本研究通过观察 PM 患者肌肉组织中是否存在分泌 IL-17 的 T 淋巴细胞从而分析 Th17 细胞在 PM 发病过程中的可能作用。

1 资料与方法

1.1 临床资料

入选的 16 例 PM 标本均来源于 2009 年 3 月至 2011 年 9 月第四军医大学附属西京医院神经内科收治的患者,所有的病例均符合 PM 典型的临床症状,肌电图示肌源性损害及肌酶升高,并经肌活检免疫荧光法证实 MHC-I 在肌膜上有异常表达且 CD8 阳性 T 淋巴细胞侵犯未坏死肌纤维。对照组来自非炎性肌病患者共 6 例(周期性麻痹、运动神经元病和线粒体脑肌

病各 2 例)。患者为初次发作且肌肉活检术前未用任何免疫抑制剂治疗。本研究通过医院伦理委员会批准,患者签署知情同意书。

1.2 主要试剂

异戊烷和液氮,苏木精和伊红,免疫组织化学抗体为抗人和小鼠 IL-17,抗人 CD8,抗人 MHC-I,均购自于 Abcam 公司

1.3 方法

1.3.1 苏木精-伊红(HE)染色 患者肌肉活检术中获得的肌肉标本,用异戊烷和液氮速冻,恒温切片机连续切片,片厚 10 μ m,贴片后进行 HE 染色,常规显微镜观察照相。

1.3.2 免疫荧光组织化学染色 冰冻组织切片,室温干燥 10 分钟,4%多聚甲醛固定 10~15 分钟;对抗原进行微波修复 5 分钟,抗原修复液为 0.01M 柠檬酸钠 (pH=6.0);新鲜配制 3% H2O2-甲醇灭活内源性过氧化物酶,3% BSA 封闭 30min~1h;两组切片分别加入一抗(MHC-I、CD8)4℃过夜,两种抗体的使用浓度均为 1:100。次日滴加生物素化二抗,室温 2 小时后滴加荧光素 avidin cy3,室温 2 小时,最后 Hoechst 衬核 5 分钟(1:5000)。每一抗体之间用 PBS 冲洗 3 次。甘油封片,荧光显微镜观察。MHC-I 和 CD8 同时阳性确定为多发性肌炎患者,另取

* 基金项目 国家自然科学基金资助项目(81171181)

作者简介 韩文娟(1985-)女,硕士,主要研究方向:神经肌肉病变,电话:15891302181

E-mail hanwenjuan8507@163.com

[△]通讯作者 贾宏阁 E-mail jiahg@fmmu.edu.cn

(收稿日期 2011-10-15 接受日期 2011-11-10)

一套切片继续进行 IL-17 染色(一抗浓度为 1:100) ,方法同上。用 PBS 替代一抗作为阴性对照,用已知抗原阳性片做阳性对照。

2 结果

2.1 病理学改变(HE 染色)

非炎性肌病肌纤维略呈多角形 ,大小基本一致 ,细胞核位于细胞边缘 ,未见明显炎性细胞浸润(图 1A) ,而多发性肌炎患者光镜下见不同程度的肌纤维萎缩 ,其大小不等 ,部分肌纤维出现不同程度的变性坏死 ,变性坏死的肌纤维内或肌内膜、肌束膜弥漫或局灶性炎细胞浸润(图 1B)。

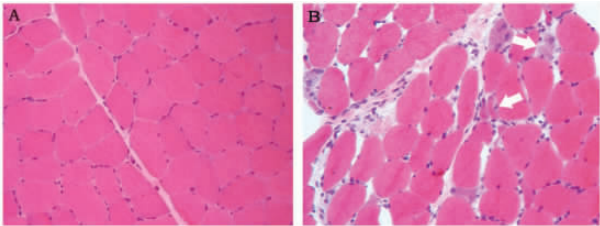


图 1 骨骼肌断面炎症对比图 ,HE× 200。A :非炎性肌病 B :PM。B 图视野中可见肌纤维大小不等 ,周围有炎细胞浸润 ,箭头所指肌纤维有不同程度的变性坏死。

Figure 1 Inflammation of skeleton muscle cross-section in compared chart, HE× 200. Figure A: non-inflammation myopathy, figure B: polymyositis. The fields of figure B show muscle fibers of varying sizes, which is surrounded by inflammatory cells infiltration, the arrowheads pointing to the different degrees of degeneration and necrosis of muscle fibers.

2.2 肌肉组织中 MHC-I、CD8 与 IL-17 的表达

MHC-I 在非炎性肌病患者小血管壁有表达 ,但肌膜不表达 ,PM 患者肌膜上有异常表达(图 2A) ;CD8 阳性 T 细胞主要分布于肌内膜 ,围绕或侵犯未坏死的肌纤维(图 2B) ,在肌束膜 ,血管周围少见。

肌炎患者肌肉炎性组织有较多的 IL-17 阳性表达 ,主要存在于炎性细胞(图 2D) ,IL-17 阳性细胞数量与肌组织炎症的严重程度成正比。而非炎性肌病肌肉组织 IL-17 表达阴性 (图 2C)。

3 讨论

人类特发性炎性肌病(IIM)是一组异质性的骨骼肌炎性疾病 ,以肌肉无力和炎细胞浸润肌纤维表现为特征。而多发性肌炎(PM)为其中一亚型 ,PM 是亚急性或慢性起病、逐渐加重的横纹肌非化脓性炎性过程 ,临床以对称性肢带肌、颈肌及咽肌无力为特征 ,常累及多脏器 ,可伴发肿瘤和其他结缔组织病。目前认为 PM 是细胞毒性 T 细胞为主介导的自身免疫性疾病 ,MHC-I/CD8 复合物的存在对于 PM 具有确诊价值。

Th17 细胞是 2005 年发现的 CD4⁺ 辅助性 T 细胞亚群 ,是一种新型的促炎性 Th 细胞亚群 ,在保护机体抵御某些细胞外病原体中发挥重要作用。但是 Th17 细胞特异性针对自身抗原 ,具有很高的致病性 ,并能导致炎症的发生发展和严重的自身免疫 ,还参与介导免疫调节、宿主防御和自身免疫。其产生的

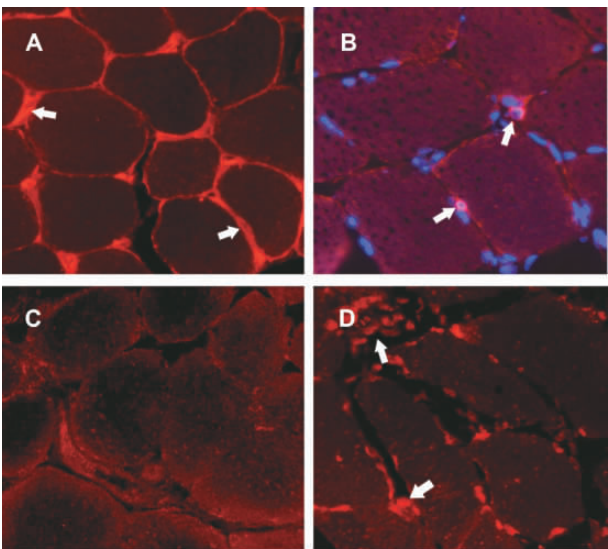


图 2 肌肉组织免疫荧光染色× 400。A :肌炎患者 MHC-I B :肌炎患者 CD8 染色 红色为 CD8 阳性细胞 蓝色为 Hoechst 衬细胞核 C :非炎性肌病 IL-17 染色阴性 D :肌炎患者 IL-17 染色阳性 ,主要表达在浸润的炎性细胞 ,如箭头所指区域。

Figure 2 Muscle tissue immunofluorescence× 400. Figure A: MHC-I in patient with polymyositis; figure B: CD8 staining in patient with polymyositis, and the red is CD8 positive cells, and the nucleolus stained blue by Hoechst; Figure C: IL-17 negative expression in non-inflammation myopathy ; figure D: IL-17 positive expression in patient with polymyositis which is mainly in cells from inflammatory infiltrates (the field of arrowhead shows).

最重要效应因子是 IL-17 ,IL-17 是 T 细胞诱导炎症反应的早期启动因素。近来在动脉粥样硬化^[2] 类风湿性关节炎^[4] 多发性硬化^[5] 等自身免疫性疾病中报道存在 Th17 细胞变化 ,但是否存在于多发性肌炎肌肉组织中还未见有报道。

本研究发现肌炎病人肌肉组织有较高的 IL-17 表达 ,而且依肌肉组织炎性程度的不同 ,IL-17 也有不同程度的表达 ,炎性程度越重 ,IL-17 表达越多。这与其它疾病中的研究结果相一致^[2-5]。在肌炎病人 ,最近有报道指出 ,IL-17 在 PM 病人外周血提取的单核细胞(PBMCs)培养的上清液中 ,与健康对照组相比 ,在肌炎的早期阶段 IL-17 浓度升高^[4] ,此结果间接说明 IL-17 可能参与了 PM 的发病过程。而我们的研究结果发现肌肉炎性组织中存在较多的 IL-17 ,首次直接证明了 IL-17 参与了 PM 的炎性过程。这些分泌 IL-17 的细胞多数为 Th17 细胞。

一般认为 Th17 细胞主要是 IL-6 和 TGF-β 共同存在并诱导初始 CD4⁺ T 细胞转化而来。肌炎时 Th-17 起什么作用 ,目前还不清楚 ,根据已有的 Th17 及其炎性因子 IL-17 特性的研究文献 ,我们推测其在多发性肌炎中可能的地位如下 :外来病原微生物如某种病毒 ,首先引起初始的天然免疫 ,肌肉局部的单核细胞等分泌多种细胞因子 ,包括 IL-6 和 TGF-β ,在此两种细胞因子的刺激下 ,初始 CD4⁺ T 细胞转化为 Th17 ,分泌的 IL-17 可以反过来激活更多的白细胞分泌多种促炎因子、趋化因子 ,以及激活 CD8⁺ T 淋巴细胞的细胞毒效应(CTL) ,导致对肌纤维的炎性反应。这些推测有待我们进一步的研究。

参 考 文 献(References)

- [1] Thomas Korn, Estelle Bettelli, Mohamed Oukka, et al. IL-17 and Th17 Cells [J]. Annu. Rev. Immunol, 2009, 27:485-517
- [2] Jiang jiao Xie, Yan Cheng, Xiang Cheng, et al. The Th17/Treg functional imbalance during atherogenesis in ApoE^{-/-} mice [J]. Cytokine, 2010, 49:185-193
- [3] Wang W, Shao S, Jiao Z, et al. The Th17/Treg imbalance and cytokine environment in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis [J]. Rheumatol Int, 2011, Jan 11 [Epub ahead of print]
- [4] Shen H, Xia L, Lu J, Xiao W. Interleukin-17 and interleukin-23 in patients with polymyositis and dermatomyositis [J]. Scand J Rheumatol, 2011, 40:217-220
- [5] Tzartos J S, Friese M A, Craner M J, et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis [J]. Am J Pathol, 2008, 172 (1): 146-155
- [6] Liu Xue-bin, Stewart Leung, Jian Hong, et al. Crucial role of interleukin-7 in T helper type 17 survival and expansion in autoimmune disease [J]. Nature medicine, 2010, 16(2): 191-197
- [7] Strauss L, Czystowska M, Szajnik M, et al. Differential responses of human regulatory T cells (Treg) and effector T cells to rapamycin [J]. PLoS One, 2009, 4(6): e5994
- [8] Mai J, Wang H, Yang X F. Th 17 cells interplay with Foxp3⁺ Tregs in regulation of inflammation and autoimmunity [J]. Front Biosci, 2010, 15: 986-1006
- [9] Mai J, Wang H, Yang X F., et al. Th 17 cells interplay with Foxp3⁺ Tregs in regulation of inflammation and autoimmunity [J]. Front Biosci, 2010, 15: 986-1006
- [10] Liu X, Leung S, Wang C, Zhang JZ., et al. Crucial role of interleukin-7 in T helper type 17 survival and expansion in autoimmune disease [J]. Nat Med, 2010, 16(2):191-197
- [11] Katsumata Y, Ascherman D.P. Animal models in myositis [J]. Current Opinion in Rheumatology, 2008, 20:681-685
- [12] Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A. The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells [J]. Cell 2006, 126:1121-1133
- [13] Hoyer KK, Kuswanto WF, Gallo E, Abbas AK. Distinct roles of helper T-cell subsets in a systemic autoimmune disease [J]. Blood, 2009, 113(2): 389-395
- [14] Dhodapkar KM, Barbutto S, Vesole D, Jagannath S, Dhodapkar MV., et al. Dendritic cells mediate the induction of polyfunctional human IL17-producing cells (Th17-1 cells) enriched in the bone marrow of patients with myeloma [J]. Blood, 2008, 112(7):2878-2885
- [15] M.C. Dalakas, R. Hohlfeld. Polymyositis and dermatomyositis [J]. Lancet, 2003, 362:971-982
- [16] Kimura A, Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance [J]. Eur J Immunol, 2010, 40(7): 1830-1835
- [17] Andrew C. Melton, Samantha L. Mark A. Travis., Expression of av β 8 integrin on dendritic cells regulates Th17 cell development and experimental autoimmune encephalomyelitis in mice [J]. J Clin Invest, 2010, 120(12): 4436-4444
- [18] Waschbisch A, Schwab N, Ruck T, Stenner M-P, Wiendl H. FOXP3 + T regulatory cells in idiopathic inflammatory myopathies [J]. J Neuroimmunol, 2010, 225(1-2): 137-142
- [19] Yi Chen, Christopher J. Haines, Mandy J. McGeachy, et al. Foxp3⁺ Regulatory T Cells Promote T Helper 17 Cell Development In Vivo through Regulation of Interleukin-2 [J]. Cell Press, 2011, 34:409-421
- [20] McGeachy, M.J., and Cua, D.J. Th17 cell differentiation: The long and winding road [J]. Immunity, 2008, 28: 445-453
- [21] Li, M.O., Wan, Y.Y., and Flavell, R.A. T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation [J]. Immunity, 2007, 26: 579-591
- [22] Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., and Stockinger, B. TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells [J]. Immunity, 2006, 24: 179-189

(上接第 1282 页)

- [3] Bogun F, Taj M, Ting M, et al. Spatial resolution of pace mapping of idiopathic ventricular tachycardia/ ectopy originating in the right ventricular outflow tract [J]. Heart Rhythm, 2008, 5:339-344
- [4] DE PONTI R, HO SY. Mapping of right ventricular outflow tract tachycardia / ectopies: activation mapping versus pace mapping [J]. Heart Rhythm, 2008, 5(3):345-347
- [5] Yarlagadda RK, Iwai S, Stein KM, et al. Reversal of cardiomyopathy in patient with repetitive monomorphic ventricular ectopy originating from the right ventricular outflow tract [J]. Circulation, 2005, 112 (8): 1092-1097
- [6] Gepstein L, Hayam G, Ben-Haim SA. A novel method for nonfluoroscopic catheter-based electroanatomical mapping of the heart: in vitro and in vivo accuracy results [J]. Circulation, 1997, 95 (6):1611-1622
- [7] Friedman PA. Novel mapping techniques for cardiac electrophysiology [J]. Heart, 2002, 87 (6): 575-582
- [8] Boulous M, Lashevsky I, Gep SL. Usefulness of electroanatomical mapping to differentiate between ventricular outflow tract tachycardia and arrhythmogenic right ventricular dysplasia [J]. Am J Cardiol, 2005, 95 (8): 935-940
- [9] Satomi K, Kurita T, Suyama K, et al. Catheter Ablation of Stable and Unstable Ventricular Tachycardia in Patients with Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia [J]. J Cardiovasc Electrophysiol, 2006, 5 (17): 469-476