论著

文章编号:1000-5404(2011)10-1068-03

氧化应激上调IL-17水平在Graves眼病中的意义

李 强,田 杰,陈紫君,李霞绯,刘 纯 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院内分泌科)

【摘要】 **目的** 研究氧化应激及细胞因子白细胞介素17(IL-17)在Graves眼病(Graves ophthalmopathy,GO)发病中的作用。**方法** 收集15例正常对照组和25例初发Graves眼病病例组外周血,检测血清中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)以及IL-17水平。从正常对照和病例组中各选取10例,采外周血分离T淋巴细胞,每例标本均分为空白对照组(H_2O_2=0,VitC=0)、过氧化氢组(H_2O_2=1 000 nmol/L,VitC=0)、维生素C组(H_2O_2=0,VitC=25 μmol/L)、过氧化氢+维生素C组(H_2O_2=1 000 nmol/L,VitC=25 μmol/L)。体外培养后检测细胞培养上清液IL-17水平并进行统计分析。**结果** ①GO病例组血清MDA、IL-17明显高于正常对照组($P<0.05$),SOD水平及SOD/MDA显著低于正常对照组($P<0.05$),且IL-17与MDA呈显著正相关($r=0.527$,$P<0.01$);②T淋巴细胞培养上清液IL-17水平检测分析,GO病例组中H_2O_2组显著高于空白对照组、VitC组及H_2O_2+VitC组($P<0.05$);VitC组及H_2O_2+VitC组均明显低于空白对照组($P<0.05$)。正常对照者各组间无显著差异($P>0.05$)。**结论** 氧化应激可诱导GO患者T淋巴细胞分泌IL-17,抗氧化剂VitC可在一定程度减少IL-17释放。

【关键词】 氧化应激;白细胞介素17;Graves眼病

【中图法分类号】 R581.102;R392.3;R363.13 【文献标志码】 A

Oxidative stress up-zegnlale IL-17 in patients with Graves' ophthalmopathy

Li Qiang, Tian Jie, Chen Zijun, Li Xiafei, Liu Chun (Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the relationship between oxidative stress and secretion of interleukin-17 (IL-17) from T cells, and to study the effect of IL-17 on pathogenesis of Graves' ophthalmopathy (GO). **Methods** Venous blood from 15 healthy persons and 25 patients newly diagnosed with GO was collected to prepare serum specimens, and the levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), and IL-17 in the serum specimens were analyzed. Venous blood from 10 of the healthy persons and 10 of the GO patients was additionally collected to prepare T-cell specimens. Each of the T-cell specimens was divided into a blank group [H_2O_2=0, vitamin C (VitC)=0], an H_2O_2 treatment group (H_2O_2=1 μmol/L, VitC=0), a VitC treatment group (H_2O_2=0, VitC=25 μmol/L), and an H_2O_2+VitC treatment group (H_2O_2=1 μmol/L, VitC=25 μmol/L). The T-cell specimens were cultured *in vitro*, and the IL-17 level of each group was tested. **Results** The levels of MDA and IL-17 in the serum specimens from the GO patients were significantly higher than those in the serum specimens from the healthy persons (6.77±1.11 nmol/mL and 13.62±2.43 ng/L *vs* 4.16±0.61 nmol/ml and 10.15±0.93 ng/L, $P<0.05$). The SOD level and SOD/MDA ratio of the serum specimens from the GO patients were significantly lower than those of the serum specimens from the healthy persons (53.95±17.53 U/ml and 7.9±3.5 *vs* 73.16±15.33 U/ml and 18.1±5.2, $P<0.05$). The IL-17 level and MDA level of the serum specimens from the GO patients were in significantly positive correlation ($r=0.527$, $P<0.01$). In the GO patients, the IL-17 level of the H_2O_2 treatment group was significantly higher than those of the blank group, VitC treatment group, and H_2O_2+VitC treatment group (27.55±4.75 ng/L *vs* 20.24±2.13 ng/L, 18.76±1.13 ng/L, and 17.59±1.85 ng/L, $P<0.05$), and the IL-17 levels of the VitC treatment group and H_2O_2+VitC treatment group were significantly lower than that of the blank group (18.76±1.13 and 17.59±1.85 *vs* 20.24±2.13, $P<0.05$). No significant differences were found in IL-17 levels of the groups from healthy persons ($P>0.05$). **Conclusion** Oxidative stress can induce IL-17 secretion from T cells of patients with Graves' ophthalmopathy. Antioxidant VitC can inhibit the secretion to a certain degree.

【**Key words**】 oxidative stress; interleukine-17; Graves' ophthalmopathy

Supported by the General Program of Chongqing Municipal Health Bureau (2009-2-319). Corresponding author: Liu Chun, Tel: 86-23-89012009, E-mail: liuchun200157@sina.com

【基金项目】 重庆市卫生局面上项目(2009-2-319)

【通信作者】 刘 纯,电话:(023)89012009,E-mail:liuchun200157@sina.com

Graves 眼病（Graves ' ophthalmopathy，GO）是 Graves 病常见的一种合并症，严重可导致失明。目前认为其发病机制是 T 淋巴细胞识别甲状腺和眼眶组织自身抗原，浸润眶后组织和眼外肌，产生大量细胞因子，刺激纤维细胞增殖和前脂肪细胞分化为脂肪细胞，分泌黏多糖。此外，淋巴细胞释放大量氧自由基所造成的氧化应激可介导热休克蛋白和 HLA-DR 表达，参与 T 淋巴细胞抗原识别和募集[1-4]。研究表明，氧化应激可通过信号转导通路对免疫细胞功能进行调节，在免疫病理中起重要作用[5]。IL-17 是一种由 Th17 淋巴细胞分泌的强促炎细胞因子，参与多种自身免疫性疾病的发病[6-7]。Huber 等[8]研究发现，在 GO 的发病中 $CD4^+$ T 淋巴细胞 IL-23/Th17 轴被激活，推测 IL-17 在 GO 的发病中发挥作用。本实验检测初发 GO 患者血清中丙二醛（MDA）、超氧化物歧化酶（SOD）以及 IL-17 水平。分离外周血 T 淋巴细胞，体外低浓度过氧化氢（H_2O_2）、维生素 C（VitC）作用后，检测细胞培养上清液 IL-17 水平，探讨 IL-17 在 GO 发病中的作用以及与氧化应激的关系。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

淋巴细胞分离液（天津 TBD 生物技术发展中心），植物凝集素（PHA）、维生素 C（美国 Sigma 公司，过氧化氢（H_2O_2，AR 级由川东化工），MTT、抗人 IL-17、抗人 TRAb 试剂盒（购于美国 R&D 公司），MDA、SOD 试剂盒均（购于南京建成生物工程研究）。

1.2　方法

1.2.1　研究对象　　按第 7 版内科学诊断标准[9]首次确诊为 Graves 眼病的患者 25 例为病例组（GO 组），男性 5 例，女性 20 例，年龄 17～44 岁；同期 15 例健康体检者为正常对照组，男性 3 例，女性 12 例，年龄 27～41 岁。入选对象均排除其他自身免疫性疾病、孕娠、急性感染及慢性疾病。1 个月内未服用微生素 C；微生素 E 等抗氧化剂。

1.2.2　标本采集及单个核细胞（peripheral blood mononuclear cell，PBMC）分离、培养　　空腹抽取静脉血 5 ml 于无任何添加剂采血管，30 min 后收集血清保存 -70 ℃冰箱。从病例组和对照组中各选择 10 例，另取 10 ml 静脉血于 EDTA 抗凝采血管，采用 Ficoll 密度梯度离心法分离 PBMC，调节细胞数为 1×10^7/ml，用台酚蓝染色计数活细胞数大于 95%；接种于 50 ml 培养瓶，置于 37 ℃、5% 孵箱内培养 4 h。

1.2.3　T 淋巴细胞分离及鉴定　　取 PBMC 悬浮细胞层，调节细胞数至 1×10^6/ml。Wright-Gimsa 法染色，根据细胞形态及细胞内颗粒判断，所分离的细胞中 95% 以上为淋巴细胞。

1.2.4　T 淋巴细胞悬液实验分组　　将每孔 1×10^6/ml 的 T 淋巴细胞悬液加入终末浓度为 50 μg/ml 的 PHA，每例标本均分组为空白对照组（H_2O_2 = 0，VitC = 0）、过氧化氢组（H_2O_2 = 1 000 nmol/L，VitC = 0）、维生素 C 组（H_2O_2 = 0，VitC = 25 μmol/L）、过氧化氢 + 维生素 C 组（VitC = 25 μmol/L 后 4 h，再加 H_2O_2 = 1 000 nmol/L）。H_2O_2 浓度为采用 MTT 法筛选出对 GO 患者淋巴细胞抑制率小于 5% 的最高浓度，保存数据。T 淋巴细胞接种于 24 孔培养板，于 37 ℃、5% 孵育箱内培养 48 h，收集上清液 -70 ℃保存。

1.2.5　血清、细胞培养上清液 IL-17 及血清促甲状腺激素受体抗体（TRAb）检测　　取上述冻存血清和细胞培养上清，采用 ELISA 法检测，具体操作按试剂盒提供的说明书进行。

1.2.6　血清 SOD/MDA 检测　　血清 MDA、SOD 测定分别采用硫代巴比妥酸法和比色法，具体操作按说明书进行。

1.2.7　血清甲状腺功能及抗体检测　　采用电化学发光法检测 FT3、FT4、uTSH（试剂盒及检测仪器由 DiaSorin 公司提供），及 TgAb、TPOAb（试剂盒及检测仪器由德国罗氏公司提供）。

1.3　统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件，计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间比较采用 t 检验，组内采用配对 t 检验。多因素采用 pearson 相关分析和多元逐步回归分析。

2　结果

2.1　GO 组和正常对照组血清 SOD、MDA、SOD/MDA 及 IL-17 水平

GO 组与正常对照组血清 SOD、MDA、SOD/MDA、IL-17 水平差异均有统计学意义（$P<0.05$，表 1）。

表 1　2 组血清 SOD、MDA、SOD/MDA 及血清 IL-17 水平比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	SOD（U/ml）	MDA（nmol/ml）	SOD/MDA	IL-17（ng/L）
正常对照组	15	73.16 ± 15.33	4.16 ± 0.61	18.10 ± 5.23	10.15 ± 0.93
GO 组	25	53.95 ± 17.53[a]	6.77 ± 1.11[a]	7.94 ± 3.54[a]	13.62 ± 2.43[a]

a：$P<0.05$，与正常对照组比较

2.2　GO 组和正常对照组甲状腺功能和自身抗体水平

GO 组与正常对照组血清 FT3、FT4、uTSH、TRAb、TPOAb、TgAb 水平差异均有统计学意义（$P<0.05$，表 2）。

2.3　GO 组和正常对照组淋巴细胞培养上清液 IL-17 水平

T 淋巴细胞各组的细胞培养上清液 IL-17 水平在正常对照者中各组间无差异（$P>0.05$）；而在 GO 组中，H_2O_2 组显著高于空白对照组、VitC 组及 H_2O_2 + VitC 组（$P<0.05$），VitC 组及 H_2O_2 + VitC 组均明显低于空白对照组（$P<0.05$）。见表 3。

2.4　血清 IL-17 与其他各血清指标水平相关性分析

GO 组血清 IL-17 与血清 MDA 水平呈显著正相关（r = 0.527，$P<0.01$，表 4）。

表 2　2 组甲状腺功能和自身抗体水平比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	年龄（岁）	FT3（pg/ml）	FT4（ng/dl）	uTSH（mIU/L）	TRAb	TPOAb（IU/ml）	TgAb（IU/ml）
正常对照组	15	31.00 ± 5.30	3.11 ± 0.20	1.24 ± 1.36	1.24 ± 0.14	12.47 ± 1.15	44.20 ± 37.51	59.52 ± 34.66
GO 组	25	31.04 ± 8.33	13.49 ± 4.96[a]	6.03 ± 2.64[a]	0.02 ± 0.02[a]	19.41 ± 3.77[a]	300.38 ± 233.05[a]	1 542.54 ± 1 614.51[a]

a：$P<0.05$，与正常对照组比较

表3 2组淋巴细胞培养上清液IL-17水平比较（$n=10$，ng/L）

组别	空白对照组	H_2O_2组	H_2O_2 + VitC组	VitC组
正常对照组	14.23±2.73	13.33±2.58	12.71±1.33	13.46±1.33
GO组	20.24±2.13[a]	27.55±4.75[ab]	17.59±1.85[abc]	18.76±1.13[abc]

a：$P<0.01$，与正常对照组比较；b：$P<0.05$，与GO组中空白对照组比较；c：$P<0.05$，与GO组中H_2O_2组比较

表4 GO组血清IL-17与血清其他各指标水平相关性分析

统计指标	年龄	SOD	MDA	SOD/MDA	FT3	FT4	uTSH	TRAb	TPOAb	TgAb
r	−0.102	0.316	0.527	0.02	−0.23	−0.18	−0.19	−0.27	0.43	0.06
P	0.628	0.12	0.007[a]	0.93	0.28	0.38	0.36	0.20	0.83	0.97

3 讨论

氧化应激（oxidative stress，OS）是指由于氧自由基过量生成和/或抗氧化防御系统受损，导致氧自由基及其相关代谢产物过量聚集的病理状态。氧自由基（oxygen free radio，OFR）对细胞钙离子信号传递、蛋白质磷酸化过程及转录因子等均有不同的作用[4]。现已证实氧自由基可激活淋巴细胞JAK-STAT3通路。核因子STAT3活化转位可进一步激活孤IL-17特异性转录因子孤独核受体RORγt[10-11]。

本实验发现GO患者血清抗氧化SOD活力较正常对照组明显降低，氧化代谢产物MDA明显升高（$P<0.01$），表明GO患者抗氧化/氧化系统失衡，处于氧化应激状态，与研究[12]结果一致。研究表明，甲状腺功能恢复正常和亚临床甲减患者也存在明显抗氧化下降，脂质过氧化增加[13]。推测氧化应激的出现在甲状腺功能改变之前。本实验同时检测血清细胞因子IL-17发现，GO患者较正常对照显著升高（$P<0.01$）。Pearson相关性分析示，IL-17与MDA水平呈正相关（$r=0.527$，$P<0.01$），而与年龄及血清其他指标无相关性（$P>0.05$），表明氧化应激与IL-17产生有密切关系，独立于其他因素。实验进一步体外采用四唑盐比色法（MTT法）筛选出对GO患者T淋巴细胞低毒性的H_2O_2浓度为1 000 nmol/L，利用该浓度的H_2O_2造成低毒氧化微环境和具有强抗氧化作用的VitC体外干预T淋巴细胞，检测细胞培养上清液IL-17水平。统计分析显示，在GO患者中，H_2O_2组显著高于其余3组（$P<0.05$），VitC组及H_2O_2 + VitC组均明显低于空白对照组（$P<0.05$），VitC组与H_2O_2 + VitC组间无明显差异（$P>0.05$）。据此推测，H_2O_2可诱导GO患者淋巴细胞分泌IL-17，VitC通过抗氧化作用抑制IL-17的分泌。正常对照各组间IL-17无显著差异（$P>0.05$），分析原因可能为GO患者淋巴细胞已发生氧化应激，而正常人淋巴细胞处于抗氧化/氧化平衡状态，H_2O_2浓度较低不足以引起细胞释放足够氧自由基诱导IL-17的产生。

本研究表明GO患者Th17淋巴细胞在氧自由基诱导下分泌IL-17。其机制可能为氧自由基激活JAK2-STAT3通路，治疗转录因子RORγt，上调IL-17基因表达，合成分泌增多。IL-17可进一步诱导TNF-α、IL-1β、INF-γ等细胞因子大量释放，刺激纤维细胞增殖，分泌粘多糖堆积[1,14-16]。VitC可在一定程度通过改善氧化应激减少IL-17释放，为临床补充抗氧化剂作为GO辅助治疗提供思路和依据。

参考文献：

[1] Gianoukakis A G, Khadavi N, Smith T J. Cytokines, Graves' disease, and thyroid-associated ophthalmopathy[J]. Thyroid, 2008, 18(9): 953-958.

[2] Bahn R S. Graves' ophthalmopathy[J]. N Engl J Med, 2010, 362(8): 726-738.

[3] Tsai C C, Wu S B, Cheng C Y, *et al*. Increased oxidative DNA damage, lipid peroxidation, and reactive oxygen species in cultured orbital fibroblasts from patients with Graves' ophthalmopathy: evidence that oxidative stress has a role in this disorder[J]. Eye (Lond), 2010, 24(9): 1520-1525.

[4] Cataldi A. Cell responses to oxidative stressors[J]. Curr Pharm Des, 2010, 16(12): 1387-1395.

[5] Frossi B, De-Carli M, Piemonte M, *et al*. Oxidative microenvironment exerts an opposite regulatory effect on cytokine production by Th1 and Th2 cells[J]. Mol Immunol, 2008, 45(1): 58-64.

[6] Afzali B, Mitchell P, Lechler R I, *et al*. Translational mini-review series on Th17 cells: induction of interleukin-17 production by regulatory T cells[J]. Clin Exp Immunol, 2010, 159(2): 120-130.

[7] Onishi R M, Gaffen S L. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease[J]. Immunology, 2010, 129(3): 311-321.

[8] Huber A K, Jacobson E M, Jazdzewski K, *et al*. Interleukin (IL)-23 receptor is a major susceptibility gene for Graves' ophthalmopathy: the IL-23/T-helper 17 axis extends to thyroid autoimmunity[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2008, 93(3): 1077-1081.

[9] 陆再英，钟南山. 内科学[M]. 第7版. 北京：人民卫生出版社，2010：715-716.

[10] Durant L, Watford W T, Ramos H L, *et al*. Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis[J]. Immunity, 2010, 32(5): 605-615.

[11] Ivanov I I, McKenzie B S, Zhou L, *et al*. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17$^+$ T helper cells[J]. Cell, 2006, 126(6): 1121-1133.

[12] Kaur A, Pandey S, Kumar S, *et al*. Oxidative stress profile in graves' ophthalmopathy in Indian patients[J]. Orbit, 2010, 29(2): 97-101.

[13] 蒋兴亮，凡瞿明，张晓岚，等. 亚临床甲状腺功能减退症患者血浆对氧磷酯酶1活性与氧化应激状态的评价[J]. 第三军医大学学报，2009，31(21)：2016-2018.

[14] Xu S, Cao X. Interleukin-17 and its expanding biological functions[J]. Cell Mol Immunol, 2010, 7(3): 164-174.

[15] 秦贵军，罗方，赵艳艳，等. IL-1β对体外人Graves眼病球后成纤维细胞分泌RANTES的影响[J]. 郑州大学学报：医学版，2005，40(3)：485-488.

[16] Zhu J, Paul W E. Peripheral CD4$^+$ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors[J]. Immunol Rev, 2010, 238(1): 247-262.

（收稿 2010-10-24 修回 2010-11-13）

（编辑 张 维）