

Th17 细胞及相关因子 IL-17 与绝经后骨质疏松的相关性研究

刘连勇^{1,2} 陆志仁³ 游利⁴ 胡晓晖⁵

1. 上海市浦东新区浦南医院内分泌科, 200125
2. 江苏省苏州大学医学院研究生院, 215123
3. 上海市宝山区淞南社区服务中心, 上海 200441
4. 上海市第一人民医院, 上海 200080
5. 上海市浦东新区浦南医院脊柱外科, 200125

中图分类号: R68 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 05-0545-05

摘要: 目的 观察辅助性 T 细胞 17 (T helper cell 17, Th17) 及相关因子白细胞介素 17 (interleukin 17, IL17) 在绝经后骨质疏松 (Postmenopausal osteoporosis, PMOP) 患者外周血及血清中的表达水平, 并探讨 IL-17 细胞与绝经后骨质疏松的发病的关系。方法 选取 2011 年 7 月 ~ 2014 年 7 月在我院确诊的绝经后骨质疏松患者 (60 例) 为研究组, 选取同期来我院体检的绝经后骨量正常人群为对照组 (60 例), 采用流式细胞术检测绝经后骨质疏松患者及骨质正常人群外周血中 Th17 细胞水平, 采用 ELISA 法检测两组人群外周血中 IL-17、IL-6 及 TGF- β 的蛋白水平; 采用 RT-PCR 法检测两组人群外周血中转录因子 T 孤独核受体 (retinoid-related orphan receptor gamma t, ROR γ T) 的 mRNA 水平。通过 Pearson 相关分析绝经后骨质疏松患者中 IL-17 水平与骨密度 (bone mineral density, BMD) 以及血清钙可能存在的关系。结果 绝经后骨质疏松患者外周血中 Th17 细胞比例为 $(2.17 \pm 0.41)\%$, 显著高于健康对照人群的 $(0.61 \pm 0.45)\%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$); 绝经后骨质疏松患者血清 IL-17 水平 $(31.51 \pm 10.09) \text{ pg/ml}$, 显著高于对照人群的 $(16.61 \pm 9.93) \text{ pg/ml}$, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$); 绝经后骨质疏松患者外周血 ROR γ T mRNA 的表达水平显著高于正常人群, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。绝经后骨质正常对照人群外周血血清中 IL-6 及 TGF- β 水平均显著低于绝经后骨质疏松患者, 差异有统计学意义 ($t = 8.99, P = 0.000; t = 4.71, P = 0.000$); 此外, Pearson 相关分析结果显示, 绝经后骨质疏松患者血清中 IL-17 与 BMD 呈显著负相关 ($r = 0.788, P < 0.05$)。结论 Th17 细胞可能通过分泌 IL-17 促进绝经后骨质疏松的产生, IL-17 可能作为治疗绝经后骨质疏松的重要靶点。

关键词: 辅助性 T 细胞 17; 白细胞介素 17; T 孤独核受体; 雌激素; 绝经后骨质疏松

The effect of Th17 and IL-17 on the pathogenesis of postmenopausal osteoporosis

LIU Lianyong^{1,2}, LU Zhiren³, YOU Li⁴, HU Xiaohui⁵

1. Department of Endocrinology, Punan Hospital of Pudong New District, Shanghai 200125
2. Medical College of Soochow University, Suzhou, Jiangsu, China 215123
3. Songnan Community Service Center, Baoshan District, Shanghai 200441
4. Shanghai First People's Hospital, Shanghai 200080, China
5. Department of Spine, Punan Hospital of Pudong New District, Shanghai 200125

Corresponding author: HU Xiaohui, Email: weisskopf@hotmail.com

Abstract: Objective To observe T helper cell 17 (Th17) and serum interleukin 17 (IL-17) expression in peripheral blood in patients with postmenopausal osteoporosis (PMOP), and to explore the relationship between IL-17 cells and the pathogenesis of PMOP. **Methods** Sixty PMOP patients in our hospital from July 2011 to July 2014 were selected as the study group, and 60 normal postmenopausal people at the same time were selected as the control group. The peripheral blood Th17 cells were detected using flow cytometry. Serum levels of IL 17, IL-6, and TGF- β were detected using ELISA. The mRNA level of retinoid-related orphan receptor gamma T (ROR γ T) was detected using RT-PCR in two groups. The relationship between IL-17 and bone mineral density (BMD), serum calcium was studied in PMOP. **Results** Th17 cells in the peripheral blood in PMOP patients $(2.17 \pm$

*通讯作者: 胡晓晖, Email: weisskopf@hotmail.com

0.41%) were significantly higher than those in normal people ($0.61 \pm 0.45\%$, $P < 0.001$). IL-17 level in PMOP patients (31.51 ± 10.09 pg/ml) was significantly higher than those in normal people (16.61 ± 9.93 pg/ml, $P < 0.001$). The expression of ROR γ T mRNA in PMOP patients was significantly higher than that the control group ($P < 0.001$). In addition, IL-6 and TGF- β in PMOP patients were significantly higher than those in the control group ($P < 0.001$). Furthermore, Pearson correlation analysis showed that IL-17 was negatively correlated with BMD ($r = 0.788$, $P < 0.05$) in PMOP patients. **Conclusion** Th17 cells promote the pathogenesis of PMOP by secreting IL-17. IL-17 may act as an important target for the treatment of PMOP.

Key words: Th17; IL-17; ROR γ T; Estrogen; Postmenopausal osteoporosis

绝经后骨质疏松症 (Postmenopausal osteoporosis, PMO) 是一种由于雌激素缺乏导致骨量减少及骨组织结构变化,从而使骨脆性增多的疾病。该病主要发生在绝经后妇女,临床上易于骨折,以及由骨折引起疼痛、骨骼变形等症状,严重地影响患者的身体健康和生活质量,甚至缩短寿命。研究认为,绝经后骨质疏松被认为可能是一种炎症过程,许多促进炎症和 T 细胞衍生的细胞因子对骨量的丢失起到了重要作用^[1]。然而目前,绝经后骨质疏松症的发病过程中的机制尚未完全清楚。

CD4⁺ T 细胞是人体免疫系统中的一种重要免疫细胞,在抗原与抗原提呈细胞 (Antigen presenting cell, APC) 存在时可以主要主要分化为 Th1, Th2, Th17 及 Treg 细胞^[2-5]。其中, Th17 细胞是一群通过产生细胞因子白介素-17 (IL-17) 发挥多种生理病理学功能的细胞亚群^[6], 目前的研究发现, Th17 细胞通过分泌 IL-17 在风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 中起作用,并与 TNF- α 共同作用时增强了骨转换和炎症的发展的过程^[7]。此外,研究发现 IL-17 是关节炎等其他影响骨量疾病的一个很重要的介导因素,并可以作治疗上述疾病的重要的靶分子^[8]。然而迄今,对于 Th17 细胞及相关因子在绝经后骨质疏松进展中的具体作用及机制尚不完全明了。

因此,本研究通过对比绝经后骨质正常人群及绝经后骨质疏松患者的外周血 Th17 细胞、分泌的细胞因子以及相应的转录因子水平,分析探讨绝经后骨质疏松患者中 Th17 细胞与骨密度以及血清钙可能存在的关系。

1 对象与方法

1.1 临床资料

选择 2011 年 7 月 ~ 2014 年 7 月来我院治疗的 60 例女性绝经后骨质疏松患者为研究组,选取同期来我院体检的 60 例女性绝经后骨量正常人群为对照组。绝经后骨质疏松组纳入标准:①自然绝经 1

年以上;②年龄 50-65 岁,平均 61.3 岁。排除标准:①各种骨软化症、钙与维生素 D 缺乏症及肾小管酸中毒;②原发性、继发性甲状腺机能亢进;③恶性肿瘤的骨转移;④多发性骨髓瘤;⑤脊髓血管瘤;⑥化脓性脊髓炎;⑦有明显限制运动性疾病者,慢性内科疾病以及内分泌疾病引起继发性骨质疏松者;⑧服用雌激素、肝素、皮质类固醇激素、二磷酸盐等与骨质疏松有关的药物^[9]。研究组和对照组的研究对象的性别、年龄等一般资料具有可比性,差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 两组人群外周血 Th17 细胞流式染色:两组人群均在早餐空腹采集外周血 5 ml,加入 EDTA 抗凝剂,加入红细胞裂解液裂解红细胞后,以完全 1640 培养液调节浓度至 1×10^6 细胞/ml。离心并重悬于 100 μ L PBS 中,加入 CD3-APC (eBioscience, 0.25 mg/ml) 和 CD4-FITC (eBioscience, 0.2 mg/ml) 抗体,混匀后室温避光孵育 30 min,以 PBS 缓冲液洗完 2 遍后,加入破膜固定工作液 1 ml 后 4 度避光孵育 30 min。离心后,重悬于 100 μ L permeabilization buffer 中,加入 IL-17A-PE (BioLegend, 0.25 mg/ml), 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 45 min,以 PBS 缓冲液洗 2 遍后, 500 μ L 缓冲液重悬细胞后用流式细胞仪 (FACS Calibur, 美国 BD 公司) 检测。

1.2.2 ELISA 法检测两组人群血清中 IL-17、IL-6、TGF- β 1 水平:人的 IL-17、IL-6、TGF- β 1 试剂盒均购自美国 eBioscience 公司,检测流程严格按照试剂盒的说明书。

1.2.3 采用 RT-PCR 法检测两组人外周血中转录因子 ROR γ T 的 mRNA 水平:外周血离心后提取上层血浆 200 μ L,加入到 1 ml Trizol 充分匀浆,按照说明书的要求抽提总 RNA,所得 RNA 溶于 30 μ L DEPC 水中。提取的总 RNA 经紫外分光光度计进行定量分析。然后再采用 Femantes 逆转录试剂盒逆转录成 cDNA,于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。本实验 PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 变性 20 s,然后 60 $^{\circ}$ C 20s 和 70 $^{\circ}$ C 1 s 进行 40

个循环。ROR γ T 引物序列:正义序列:5'-GCAGCGCTCCAACATCTTCT-3',反义序列:5'-ACGTACTGAATGGCCTCGGT-3';内参 GAPDH 引物序列:正义序列:5'-GCATGGGTCAGAAGGATTCCTc-3',反义序列:5'-TCGTCCCAGTTGGTACGAT-3'。使用 ABI 公司的 7300 型号 Real-Time PCR 仪器进行扩增,所得结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行相对定量分析^[10]。

1.3 骨密度测量

应用美国通用 PRODIGY 双能 X 线吸收仪检测测定 L1-4 椎体、股骨颈、桡骨远端的骨密度 BMD 值,以面积骨密度值准确性 (0.5% - 1%) g/cm 表示。腰椎 1-4,股骨颈和桡骨远端检测的变异系数 (CV) 分别为 1.2%, 1.2%, 1.4%。

1.4 统计学及作图分析

所有数据采用 SPSS19.0 软件统计分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示,组间比较采用两独立样本 t 检验,相关分析采用 Pearson 相关分析法。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 绝经后骨质疏松患者及对照人群外周血 Th17 细胞水平比较

流式细胞术检测显示,绝经后骨质正常对照人群外周血中 Th17 细胞比例为 $(0.67 \pm 0.39)\%$,显著低于绝经后骨质疏松患者中的 Th17 细胞比例 $(2.10 \pm 0.83)\%$,差异有统计学意义 ($t = 12.08, P = 0.000$)。提示 Th17 细胞可能参与绝经后骨质疏松的发展。见图 1。

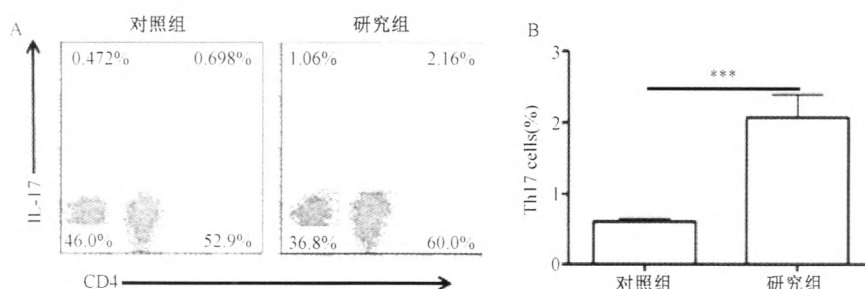


图 1 两组人群外周血中 Th17 细胞比例 (***, $P < 0.001$)

Fig. 1 The proportion of Th17 cells in peripheral blood in the two groups.

2.2 绝经后骨质疏松患者及对照人群血清中 IL-17 及外周血中转录因子 ROR γ T 的 mRNA 水平

ELISA 结果显示,绝经后骨质正常对照人群外周血中 IL-17 水平为 (19.51 ± 11.21) pg/ml,显著低于绝经后骨质疏松患者血清中 IL-17 水平 (27.54 ± 10.48) pg/ml,差异有统计学意义 ($t = 4.05, P = 0.000$)。RT-PCR 检测结果显示,与绝经后骨质正常对照人群比较,绝经后骨质疏松患者外周血

ROR γ T mRNA 水平显著高于正常人群,差异有统计学意义 ($t = 15.12, P = 0.001$)。提示了 Th17 细胞可能通过激活转录因子 ROR γ T 以及分泌细胞因子 IL-17 及来参与绝经后骨质疏松的发展。见图 2。

2.3 绝经后骨质疏松患者及对照人群外周血血清 IL-6 及 TGF- β 水平比较

ELISA 结果显示,绝经后骨质正常对照人群外周血血清中 IL-6 水平显著低于绝经后骨质疏松

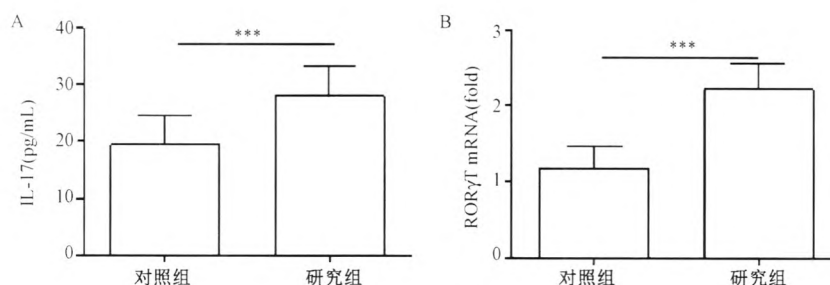


图 2 两组人群外周血血清中 IL-17 蛋白水平及外周血 ROR γ T 的 mRNA 水平

Fig. 2 The levels of serum IL-17 protein and ROR γ T mRNA in peripheral blood in the two groups.

患者,差异有统计学意义($t = 8.99, P = 0.000$);此外,绝经后骨质正常对照组人群外周血中 TGF- β 水平显著低于绝经后骨质疏松患者,差异有统计学意义($t = 4.71, P = 0.000$),见表 1。

表 1 两组外周血清中 IL-6 及 TGF- β 的关系

Table 1 Relationship between serum IL-6 and TGF- β

组别	例数	IL-6 (pg/ml)	TGF- β (pg/ml)
对照组	60	114.46 $\pm$ 12.11	1122.41 $\pm$ 240.18
研究组	60	135.51 $\pm$ 13.49 [△]	1342.17 $\pm$ 270.41 [▼]

注:与对照组比较,[△] $t = 8.99, P = 0.000$;[▼] $t = 4.71, P = 0.000$

2.4 绝经后骨质疏松患者及对照人群外周血中 Th17 细胞与骨密度的关系

与对照组比较,绝经后骨质疏松患者的 BMD 显著降低,差异有统计学意义($t = 6.14, P = 0.000$),见表 2。进一步 Pearson 相关分析显示,绝经后骨质疏松患者血清中 IL-17 与骨密度呈显著负相关($r = 0.671, P < 0.05$)。见图 3。

表 2 两组外周血中 Th17 细胞与骨密度的关系

Table 2 Relationship between Th17 cells in peripheral blood and bone mineral density.

组别	例数	IL-17 (pg/ml)	骨密度 (g/cm ²)
对照组	60	19.51 $\pm$ 11.21	0.714 $\pm$ 0.145
研究组	60	27.54 $\pm$ 10.48	0.511 $\pm$ 0.211 [△]

注:与对照组比较,[△] $t = 6.14, P = 0.000$ 。

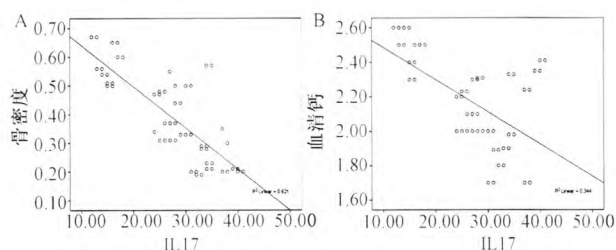


图 3 绝经后骨质疏松患者血清中 IL-17 与骨密度的相关分析

Fig. 3 Correlation analysis of serum IL-17 and BMD in PMOP patients

3 讨论

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是多种原因引起的一类以骨量减少、骨的微观结构破坏,从而导致骨的脆性增加,易发生骨折为特征的一种全身代谢性骨骼疾病。随着近年来社会的老龄化以及生活水平的提高,骨质疏松症的患病率逐年增加。目前的研究认为,骨质疏松症的发病的诱导机制主要包括雌激素缺乏、维生素 C、D 缺乏、甲状腺功能亢进症以

及胃肠吸收功能障碍等^[11, 12]。绝经后骨质疏松症是一种因绝经后卵巢合成雌激素减少导致骨质疏松症。研究发现,妇女绝经后机体内的细胞因子,如 IL-1、TNF- α 、IL-6 和巨噬细胞集落刺激因子的表达水平显著增加,并与骨丢失密切相关^[13, 14]。

IL-17 是一类主要由 Th17 细胞诱导下产生的细胞因子,IL-17 在抵抗胞外病原体感染的宿主防御以及各种自身免疫性疾病发病中发挥极其重要的作用^[15, 16]。在骨关节炎模型研究发现,IL-17 可以通过与 TNF- α 的协同作用共同参与关节炎的炎症反应及骨转换过程^[7]。DeSelm CJ 等在小鼠模型中发现,经历卵巢切除术 (OVX) 的野生型小鼠由于雌激素缺失可以导致骨小梁减少,而 IL-17 受体缺失的小鼠却具有较完整的骨小梁^[17],从而提示了 IL-17 在雌激素缺失的小鼠中可能具有促进骨质疏松作用。本研究通过对人群样本研究发现,在绝经后骨质疏松患者外周血中 Th17 细胞及 IL-17 水平显著高于对照人群,提示 Th17 细胞可能通过产生 IL-17 参与绝经后骨质疏松的免疫应答,这与以往研究发现的产生 IL-17 的 Th17 细胞在雌激素 (estrogen, E2) 缺失的小鼠体内水平增加与骨丢失一致的结果相符^[18]。我们进一步检测了 ROR γ T 的 mRNAs 水平,该指标是 Th17 细胞功能的关键转录因子^[19],结果发现,绝经后骨质疏松患者血清中 ROR γ T 的 mRNA 水平均高于对照人群,从而进一步验证了以上结果。由于转化生长因子 β (TGF- β) 和 IL-6 在诱导 T 细胞向 Th17 细胞分化的过程中发挥重要的作用^[20],因此,本研究亦观察了绝经后骨质疏松患者体内以上两种细胞因子水平,结果亦发现,在绝经后骨质疏松患者外周血中 TGF- β 及 IL-6 水平显著高于对照人群。Islander U 等学者在类风湿性关节炎小鼠模型中发现的 IL-6 具有促骨质疏松特性^[21],且 Grainger, D. J 等学者发现 TGF- β 在美国的骨质疏松妇女血清中表达增加^[22],均支持了本研究的结果。

目前关于 Th17 分泌的 IL-17 影响绝经后骨质疏松的机制尚未完全明了,因此,我们通过分析了绝经后骨质疏松患者体内 IL-17 水平与骨密度的关系,探讨 IL-17 对于绝经后骨质疏松的影响机制。结果发现,绝经后骨质疏松患者血清中 IL-17 越高,骨密度越低,从而提示了 IL-17 可能通过影响骨密度参与绝经后骨质疏松发病的过程。

综上所述,Th17 细胞及其相关因子在绝经后骨质疏松致病中发挥着重要的功能,Th17 细胞及其相

关因子的增加,可能是促进绝经后骨质疏松发生的重要原因,降低绝经后骨质疏松患者体内增加的 IL-17 可能对绝经后骨质疏松治疗及预后具有重要的临床意义。

【参 考 文 献】

- [1] Teitelbaum SL. Postmenopausal osteoporosis, T cells, and immune dysfunction[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(48): 16711-16712.
- [2] Zanetti M. Tapping CD4 T Cells for Cancer Immunotherapy: The Choice of Personalized Genomics[J]. J Immunol, 2015, 194(5):2049-2056.
- [3] Antignano F, Zaph C. Regulation of CD4 T-cell differentiation and inflammation by repressive histone methylation [J]. Immunology and cell biology, 2015, 93(3):245-252.
- [4] Protti MP, Monte LD, Lullo GD. Tumor antigen-specific CD4 + T cells in cancer immunity: from antigen identification to tumor prognosis and development of therapeutic strategies[J]. Tissue antigens, 2014, 83(4):237-246.
- [5] Assudani DP, Horton RB, Mathieu MG, et al. The role of CD4 + T cell help in cancer immunity and the formulation of novel cancer vaccines[J]. Cancer immunology, immunotherapy: CII, 2007, 56(1):70-80.
- [6] Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells[J]. Nature, 2006, 441(7090):235-238.
- [7] Lubberts E. IL-17/Th17 targeting: on the road to prevent chronic destructive arthritis? [J]. Cytokine, 2008, 41(2):84-91.
- [8] Yuan FL, Li X, Lu WG, et al. Type 17 T-helper cells might be a promising therapeutic target for osteoporosis [J]. Molecular biology reports, 2012, 39(1):771-774.
- [9] 郭华平 郁, 陈文华, 余波, 祁奇. 绝经后骨质疏松症发病相关危险因素分析及预防措施探讨[J]. 中国康复医学杂志, 2011, 26(5):424-428.
GUO Huaping, YU Yanyan, CHEN Wenhua, YU Bo, QI Qi. Analysis of relevant risk factors and prevention of postmenopausal osteoporosis. Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2011, 26(5):424-428.
- [10] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method[J]. Methods, 2001, 25(4):402-408.
- [11] Nakchbandi IA. Osteoporosis and fractures in liver disease: relevance, pathogenesis and therapeutic implications[J]. World journal of gastroenterology: WJG, 2014, 20(28):9427-9438.
- [12] Targownik LE, Bernstein CN, Leslie WD. Risk factors and management of osteoporosis in inflammatory bowel disease [J]. Current opinion in gastroenterology, 2014, 30(2):168-174.
- [13] Klein-Nulend J, van Oers RF, Bakker AD, et al. Bone cell mechanosensitivity, estrogen deficiency, and osteoporosis [J]. Journal of biomechanics, 2015, 48(5):855-865.
- [14] Weitzmann MN, Pacifici R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale [J]. The Journal of clinical investigation, 2006, 116(5):1186-1194.
- [15] van Bruggen N, Ouyang W. Th17 cells at the crossroads of autoimmunity, inflammation, and atherosclerosis [J]. Immunity, 2014, 40(1):10-12.
- [16] Kleinewietfeld M, Hafler DA. The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity [J]. Seminars in immunology, 2013, 25(4):305-312.
- [17] DeSelm CJ, Takahata Y, Warren J, et al. IL-17 mediates estrogen-deficient osteoporosis in an Act1-dependent manner[J]. Journal of cellular biochemistry, 2012, 113(9):2895-2902.
- [18] Tyagi AM, Srivastava K, Mansoori MN, et al. Estrogen deficiency induces the differentiation of IL-17 secreting Th17 cells: a new candidate in the pathogenesis of osteoporosis [J]. PloS one, 2012, 7(9):e44552.
- [19] Barbi J, Pardoll D, Pan F. Metabolic control of the Treg/Th17 axis[J]. Immunological reviews, 2013, 252(1):52-77.
- [20] Wang Y, Xing F, Ye S, et al. Jagged-1 signaling suppresses the IL-6 and TGF-beta treatment-induced Th17 cell differentiation via the reduction of RORgamma/IL-17A/IL-17F/IL-23a/IL-12rb1 [J]. Scientific reports, 2015, 5:8234.
- [21] Islander U, Jochems C, Lagerquist MK, et al. Estrogens in rheumatoid arthritis; the immune system and bone[J]. Molecular and cellular endocrinology, 2011, 335(1):14-29.
- [22] Grainger DJ, Percival J, Chiano M, et al. The role of serum TGF-beta isoforms as potential markers of osteoporosis [J]. Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA, 1999, 9(5):398-404.

(收稿日期: 2016-01-11)