

# $\gamma\delta$ T 细胞在实验性自身免疫性葡萄膜炎小鼠脾脏中的动态表达及作用机制

王贝贝 田庆梅 解孝锋 宋继科 毕宏生

250002 济南, 山东中医药大学附属眼科医院(王贝贝、田庆梅、解孝锋、毕宏生); 250014 济南, 山东中医药大学眼科与视光医学院(宋继科)

通信作者: 毕宏生, Email: hongshengbi@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.09.006

**【摘要】** 背景 以往研究证明葡萄膜炎的发病机制与  $\gamma\delta$  T 细胞相关,  $\gamma\delta$  T 细胞在实验性自身免疫性葡萄膜炎 (EAU) 中的作用尚不完全清楚。目的 研究  $\gamma\delta$  T 细胞在 EAU 小鼠脾脏中的动态变化, 探讨  $\gamma\delta$  T 细胞在 EAU 病程进展中的作用机制。方法 应用随机数字表法将 45 只 C57BL/6 (B6) 小鼠随机分为正常对照组 6 只和模型组 39 只。用抗原肽光感受器间维生素 A 类结合蛋白<sub>1-20</sub> (IRBP<sub>1-20</sub>) 及完全弗氏佐剂 (CFA) 的乳化液在 B6 小鼠的足垫、尾根部及躯干部均匀注射 6 个点, 用 Genesis-D 动物眼部照相机观察并记录正常小鼠及免疫后不同时间点 (4、8、12、16、20、24、28、32 和 36 d) EAU 小鼠的发病情况, 参照 Thurau 的评分标准进行炎症评分。颈椎脱臼法处死小鼠后摘取右侧眼球, 切片后行组织病理学评分。同时在相同时间点分离模型小鼠脾脏淋巴细胞, 流式细胞仪检测  $\gamma\delta$  T 细胞数量和激活状态。免疫磁珠分选  $\gamma\delta$  T 细胞, 并用流式细胞仪检测其细胞内表达白细胞介素-17A (IL-17A) 的变化。向 EAU 小鼠回输激活的  $\gamma\delta$  T 细胞, 观察炎症变化。结果 经 IRBP<sub>1-20</sub> 及 CFA 乳化液免疫后小鼠于第 12 天可见轻度葡萄膜炎炎症, 炎症反应在免疫后第 16~20 d 达峰, 至第 28 天炎症明显减轻。组织病理学观察发现, 免疫小鼠视网膜外核层皱褶, 玻璃体、视网膜全层炎性细胞浸润及内界膜层增厚。造模后不同时间点的炎症症状评分和病理学炎症评分的总体比较, 差异均有统计学意义 ( $F=51.399, P=0.000; F=47.342, P=0.000$ )。流式细胞仪检测发现, EAU 发病高峰期小鼠的脾脏中  $\gamma\delta$  T 细胞数量增加, 造模后 16 d 和 20 d 分别为  $(5.67 \pm 0.49)\%$  和  $(5.78 \pm 0.55)\%$ , 与造模前的  $(1.53 \pm 0.14)\%$  比较, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ), 且呈活化状态。EAU 发病高峰期小鼠的脾脏中  $\gamma\delta$  T 细胞分泌的 IL-17A 明显增多, 造模后 16 d 和 20 d 分别为  $(13.40 \pm 0.50)\%$  和  $(17.80 \pm 2.37)\%$ , 与正常对照小鼠的  $(1.53 \pm 0.19)\%$  比较, 差异均有统计学意义 ( $P=0.000, 0.001$ )。体内回输激活的  $\gamma\delta$  T 细胞后 EAU 炎症加重, 炎症症状评分为 1.00 (1.00, 2.00), 明显高于未回输激活的  $\gamma\delta$  T 细胞的 0.75 (0.05, 1.00), 二者比较差异有统计学意义 ( $Z=27.00, P=0.03$ )。结论 EAU 中  $\gamma\delta$  T 细胞比例在炎症的高峰期明显升高, 且呈活化状态; 活化性  $\gamma\delta$  T 细胞在 EAU 模型中发挥的免疫调节作用可能是通过分泌 IL-17A 进行的。

**【关键词】** 实验性自身免疫性葡萄膜炎;  $\gamma\delta$  T 细胞; 白细胞介素-17A; 动物模型; 近交系 C57BL 小鼠  
基金项目: 国家自然科学基金项目 (81373826)

**Dynamic expression and mechanism of  $\gamma\delta$  T cells in the spleen of mouse with experimental autoimmune uveitis** Wang Beibei, Tian Qingmei, Xie Xiaofeng, Song Jike, Bi Hongsheng

Affiliated Eye Hospital of Shandong Traditional Chinese Medicine University, Jinan 250002, China (Wang BB, Tian QM, Xie XF, Bi HS); Ophthalmology and Optometry Medical School, Shandong Traditional Chinese Medicine University, Jinan 250014, China (Song JK)

Corresponding author: Bi Hongsheng, Email: hongshengbi@163.com

**【Abstract】** Background Previous studies showed that the pathogenesis of uveitis is related to  $\gamma\delta$  T cells. However, it remains unclear that how these cells are involved in experimental autoimmune uveitis (EAU).

**Objective** This study aimed to observe the dynamic changes of  $\gamma\delta$  T cells in EAU and explore the role of  $\gamma\delta$  T cells in the pathological process of EAU. **Methods** Forty-five C57BL/6 (B6) mice were assigned to the normal control group (six mice) and EAU model group (thirty-nine mice). The mice were immunized subcutaneously at 6 spots on the footpads, tail base, and flank with emulsion containing human interphotoreceptor retinoid binding protein<sub>1-20</sub> (IRBP<sub>1-20</sub>) emulsified in complete Freund's adjuvant. After immunization, the mice were examined for clinical signs of EAU by using a Genesis-D camera. The changes of histopathology were compared by hematoxylin and eosin staining. Mouse lymphocytes were isolated and purified from the spleens of IRBP<sub>1-20</sub>-immunized or normal B6 mice by

using a  $\gamma\delta$  T-cell isolation kit. Flow cytometry was used to detect the changes of intracellular expression of interleukin-17A (IL-17A), and then transferred the activated  $\gamma\delta$  T cells into EAU models to analyze the changes of clinical signs and histopathology of EAU. Experimental study program as well as the use and feeding of the animals were authorized by the Animal Management and Use Committee of Shandong Traditional Chinese Medicine University. **Results**

The inflammatory symptoms in mouse eyes appeared on day 12 after modeling. The initial changes were fundal blood vessel thickening and minimal inflammatory cell infiltration. Then, multifocal chorioretinal lesions, serious vasculitis and linear lesions were observed on days 16–20, along with abundant lymphocyte infiltration in the vitreous and retinal disorganization. The inflammation symptom scores and the pathological inflammation scores at different time points after modeling had statistically significant differences ( $F = 51.399, P = 0.000; F = 47.342, P = 0.000$ ). The inflammatory symptoms in the eyes began to abate from day 28 onwards. The number of  $\gamma\delta$  T cells was obviously increased during the inflammation phase of EAU at day 16–20 after modeling, with the number of  $\gamma\delta$  T cells was  $(5.67 \pm 0.49)\%$  and  $(5.78 \pm 0.55)\%$ , respectively, which was significantly higher than  $(1.53 \pm 0.14)\%$  before modeling, with significant differences between them (both at  $P < 0.05$ ), meanwhile CD69 levels and the integrin lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) and secreted IL-17A were elevated. The secretion level of IL-17A was  $(13.40 \pm 0.50)\%$  and  $(17.80 \pm 2.37)\%$  on day 16 and day 20 after modeling, respectively, which was significantly higher than  $(1.53 \pm 0.19)\%$  before modeling, with significant differences between them ( $P = 0.000, 0.001$ ). The activated  $\gamma\delta$  T cells were transferred into EAU model, the inflammation symptom scores were 1.00 (1.00, 2.00) after activated  $\gamma\delta$  T cells were transferred into EAU model, which was significantly higher than 0.75 (0.05, 1.00) of the untransferred group ( $Z = 27.00, P = 0.03$ ), and the symptoms of EAU were aggravated.

**Conclusions** The proportion of  $\gamma\delta$  T cells reaches peak in inflammation of EAU, and the cells are activated. The activated  $\gamma\delta$  T cells in the EAU model play a immune regulation role by secreting IL-17A.

[**Key words**] Experimental autoimmune uveitis;  $\gamma\delta$  T cells; Interleukin-17A; Disease models, animal; Mice, inbred C57BL

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81373826)

葡萄膜炎是临床上常见的致盲眼病,其发病机制尚未完全阐明,目前认为可能与感染、自身免疫、氧化损伤、免疫和遗传等多种因素有关。既往研究认为,辅助性 T 细胞(helper T cell, Th)1 和 Th17 细胞群在葡萄膜炎的发病过程中发挥重要作用<sup>[1]</sup>。Th1、Th17 细胞可通过分泌炎症因子或与组织靶细胞直接接触,导致葡萄膜炎的发生和发展<sup>[2]</sup>。然而,Th17 细胞的作用机制并不能解释在一些应激反应及宿主免疫早期起重要作用的白细胞介素(interleukin, IL)-17A 的产生。近年来发现了一类以分泌 IL-17A 为主的  $\gamma\delta$  T 细胞亚群,即 IL-17<sup>+</sup> $\gamma\delta$  T 细胞<sup>[3]</sup>,这群细胞与 Th17 细胞的相似之处在于它们也主要分泌 IL-17A、IL-21 和 IL-22 等细胞因子,但与 Th17 细胞不同的是 IL-17A<sup>+</sup> $\gamma\delta$  T 细胞属于天然免疫细胞,能产生不同种类的细胞因子和趋化因子,以主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)非限制性方式直接识别和结合抗原,且具有抗原递呈功能,增强效应 T 细胞的活性,进而促进自身免疫反应,具有连接天然免疫和获得性免疫的桥梁作用。研究表明, $\gamma\delta$  T 细胞是感染和自身免疫时早期浸润的主要细胞,在实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)、脑膜炎和结肠炎等自身免疫性疾病的炎症中具有重要的免疫调节作用<sup>[4-6]</sup>。 $\gamma\delta$  T 细胞在自身免疫疾病中通过

多种途径发挥作用,但其在不同自身免疫疾病中的具体作用机制仍有待进一步研究。多数研究报道  $\gamma\delta$  T 细胞主要起致病作用<sup>[5,7-9]</sup>,少数报道则认为  $\gamma\delta$  T 细胞具有保护作用,还有研究推断  $\gamma\delta$  T 细胞在炎症反应中可能起致病和保护的双重作用<sup>[10-11]</sup>。因此,虽证实葡萄膜炎的发病机制与  $\gamma\delta$  T 细胞相关,但作用机制尚不完全清楚。本研究中以实验性自身免疫性葡萄膜炎(experimental autoimmune uveitis, EAU)小鼠模型为研究对象,拟探讨  $\gamma\delta$  T 细胞在 EAU 过程中的致病或保护作用及其对疾病转归的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 45 只 6~8 周龄 SPF 级雌性 B6 小鼠[购于北京维通利华有限公司,许可证号:SCXK(京)2012-0001],饲养于山东中医药大学眼科研究所动物房。饲养环境:温度为 18~26℃,相对湿度为 40%~70%。噪音 85 dB 以下,氨浓度为 20 ppm 以下,通风换气 8~12 次/h。实验动物的使用和喂养均遵循山东中医药大学实验室动物管理和使用规定。本研究经山东中医药大学伦理委员会审核批准(2015-075)。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 人类光感受器间维生素 A

类结合蛋白<sub>1-20</sub> (interphotoreceptor retinoid binding protein<sub>1-20</sub>, IRBP<sub>1-20</sub>) 多肽 (氨基酸残基为 GPTHLFQPSLVLDMAKVLLD, 合成度 >96.45%) (上海强耀生物科技有限公司); 完全弗氏佐剂 (complete Freund adjuvant, CFA) (美国 Sigma 公司); 百日咳毒素 (pertussis toxin, PTX) (瑞士 ENZO 公司); 流式抗体 (美国 eBioscience 公司); 固定破膜试剂盒 (美国 BD 公司); 细胞分选试剂盒 (德国 Miltenyi Biotec 公司); 复方托吡卡胺滴眼液 (日本参天制药株式会社);  $\gamma\delta$  T 细胞分离试剂盒 (德国 Miltenyi Biotec 公司)。Genesis-D 动物眼部照相机 (日本 Kowa 公司); 石蜡切片机 (德国 SLEE 公司); FACsverse 流式细胞仪 (美国 BD 公司); 磁性细胞分选仪 (德国 Miltenyi Biotec 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 小鼠 EAU 模型的建立** 将小鼠分为正常对照组 6 只和模型组 39 只, 模型组分别于 B6 小鼠足垫、尾根部及躯干 6 个点皮下注射含 300  $\mu\text{g}$  IRBP<sub>1-20</sub> 和 CFA 的乳化液, 每只小鼠共注射 200  $\mu\text{l}$ , 并经腹腔内注射 0.5  $\mu\text{g}$  纯化 PTX, 作为附加免疫佐剂。

**1.2.2 EAU 模型小鼠眼部炎症评分** 正常对照组和模型组小鼠用复方托吡卡胺滴眼液与生理盐水按等体积混合后点眼扩瞳, 用 Genesis-D 动物眼部照相机每天观察小鼠眼部炎症反应。参照文献 [12] 中 Thurau 的眼底评分标准对模型眼炎症症状进行评分, 每 4 天记录 1 次。分别于免疫前和免疫后第 4、8、12、16、20、24、28、32 和 36 天采用颈椎脱臼法各处死 3 只小鼠, 完整取出小鼠右侧眼球, 用质量分数 4% 多聚甲醛固定, 于视神经层面行 5  $\mu\text{m}$  厚连续切片, 行苏木精-伊红染色, 对炎症程度进行病理评分: 仅睫状体有少量细胞浸润而眼球组织结构未见异常者为 0.5 分; 视网膜脉络膜轻度炎性细胞浸润, 出现局部视网膜皱褶者为 1 分; 视网膜脉络膜中度炎性细胞浸润, 有视网膜脱离、皱褶及轻度感光细胞损伤者为 2 分; 视网膜脉络膜重度炎性细胞浸润, 出现大面积视网膜脱离和皱褶, 且可见浆液性渗出和视网膜下出血, 中度感光细胞损伤者为 3 分; 视网膜脉络膜极重度炎性细胞浸润, 重度感光细胞损伤, 视网膜变薄者为 4 分 [12]。

**1.2.3 小鼠 T 淋巴细胞的分离** 小鼠分别在免疫前和免疫后第 4、8、12、16、20、24、28、32 和 36 天用颈椎脱臼法各处死 3 只小鼠, 摘取脾脏后冲洗淋巴细胞, 研磨后 40  $\mu\text{m}$  细胞筛过滤, 将收集的细胞悬液依次经棉花毛柱和尼龙毛柱滤过, 收集抗原特异性 T 细胞, 细胞用 1640 培养液清洗后用小鼠淋巴细胞分离液获取纯化的 T 淋巴细胞。实验均重复 3 次。

**1.2.4  $\gamma\delta$  T 细胞的分离纯化** 用  $\gamma\delta$  T 细胞分离试剂盒行磁珠分选。将研磨的脾脏细胞经红细胞裂解液作用 10 min, 每  $1 \times 10^8$  细胞加 50  $\mu\text{l}$  Non-T cell depletion 混合物, 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育 15 min, 用上样缓冲液洗 1 次, 采用磁性细胞分选仪 Dep105 程序, 收集阴性细胞; 添加 50  $\mu\text{l}$  抗生物素磁珠 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育 15 min, 用上样缓冲液洗 1 次, 选择磁性细胞分选仪 Posseld 2 程序, 收集的阳性细胞即为  $\gamma\delta$  T 细胞。采用 PE 交联的抗  $\gamma\delta$  T 单克隆抗体、抗原呈递细胞 (antigen presenting cell, APC) 交联的抗 CD3e 单克隆抗体染色鉴定  $\gamma\delta$  T 细胞, 采用流式细胞仪分析分离细胞的纯度 (图 1)。

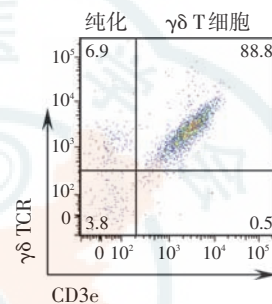


图 1 高纯度  $\gamma\delta$  T 细胞的制备 按照 TCR  $\gamma\delta$  磁珠分选试剂盒说明书进行阳性分选。 $\gamma\delta$  T 细胞纯度用 PE 交联的抗  $\gamma\delta$  T 单克隆抗体、APC 交联的抗 CD3e 单克隆抗体染色鉴定。经磁珠分选的  $\gamma\delta$  T 细胞纯度约为 88.8%

**1.2.5 流式细胞仪检测  $\gamma\delta$  T 细胞的激活状态** 将收集的 T 淋巴细胞用 PE 或 APC 交联的抗  $\gamma\delta$  TCR 抗体、抗 CD3e 抗体进行双染, 500  $\mu\text{l}$  PBS 悬浮细胞后上机检测  $\gamma\delta$  T 分子数量的表达; 在前向角散射 (forward scatter, FS) 和侧向角散射 (side scatter, SS) 散点图上圈定淋巴细胞群, 再基于淋巴细胞群用 CD3e 和  $\gamma\delta$  TCR 画双参数十字门, 双阳性区域即  $\gamma\delta$  T 细胞。用 FITC 及 PE 标记的 CD69 抗体和淋巴细胞功能相关抗原 (lymphocyte function-associated antigen, LFA-1) 抗体检测  $\gamma\delta$  T 细胞的激活状态。实验均重复 3 次。

**1.2.6 流式细胞仪检测脾脏  $\gamma\delta$  T 细胞中 IL-17A 的分泌量** 将磁珠分选的正常和 EAU 小鼠  $\gamma\delta$  T 细胞用含佛波酯 (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)、离子霉素和蛋白转运抑制剂 Brefeldin A 的细胞刺激液在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5%  $\text{CO}_2$  条件下刺激 6 h, 然后洗涤、固定、打孔, 用 APC 标记的 IL-17A 抗体细胞内染色, 检测脾脏  $\gamma\delta$  T 细胞分泌 IL-17A 的量。实验均重复 3 次。

**1.2.7  $\gamma\delta$  T 细胞的体外激活及回输** 从 EAU 小鼠脾脏中分选纯化的  $\gamma\delta$  T 细胞, 在体外经抗原肽 IRBP<sub>1-20</sub> (20 ng/ml)、IL-2 (10 ng/ml) 和 IL-23 (10 ng/ml) 二次刺激后, 于建模后第 8 天进行小鼠腹腔内注射, 注射剂量为  $2 \times 10^6$  / 小鼠, 于建模后第 12 天观察小鼠炎症症状评分及眼球组织病理学的变化。

## 1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件 (SPSS Inc, Chicago,

IL, USA) 进行分析。不同时间点样本  $\gamma\delta$  T 细胞比例及细胞内 IL-17A 表达的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验符合正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间均数经 Levene 方差齐性检验证实方差齐。各时间点样本的总体比较采用单因素方差分析, 多重比较采用 LSD-*t* 检验; 不同时间点小鼠眼球的炎症症状评分及病理学炎症评分经检验不符合正态分布, 用  $M(Q_1, Q_3)$  表达, 各时间点样本的总体比较采用 Kruskal-Wallis 检验, 组间两两比较采用 Mann-Whitney 检验。检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 EAU 模型小鼠眼部炎症表现和评分

小鼠造模后第 12 天出现眼底血管轻微扩张和充

血。造模后 16~20 d 眼底血管明显扩张, 可见视网膜炎症表现达高峰, 以后炎症逐渐缓解(图 2)。组织病理学检查显示, 正常对照组小鼠视网膜组织结构排列整齐。造模后第 12 天视网膜组织结构未见异常, 可见少量炎性细胞浸润; 造模后 16~20 d 视网膜脉络膜炎性细胞数量增加, 玻璃体腔大量炎性细胞浸润, 可见局部视网膜皱褶; 造模后 28 d 炎性细胞消失, 视网膜结构接近正常(图 3)。随着造模后时间延长, 模型鼠炎症症状评分和病理学炎症评分均逐渐增加, 于造模后 20 d 炎症评分最高, 然后炎症症状评分和病理学炎症评分均逐渐下降, 造模后不同时间点的炎症症状评分和病理学炎症评分的总体比较差异均有统计学意义 ( $F = 51.399, P = 0.000; F = 47.342, P = 0.000$ )(表 1)。

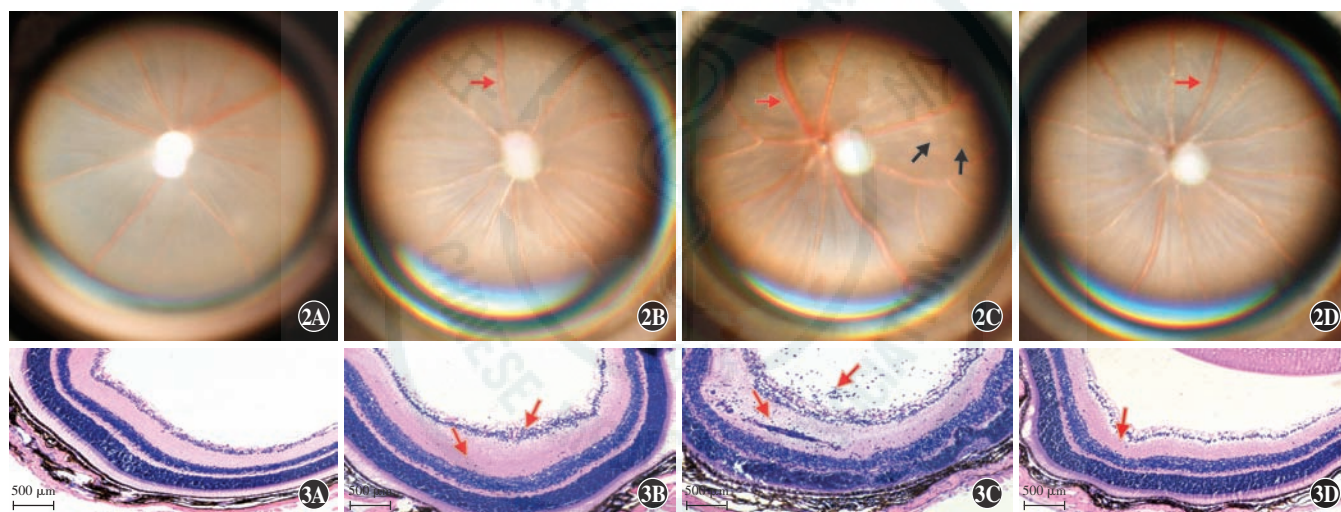


图 2 Genesis-D 照相机观察模型鼠眼部表现 A: 正常对照组小鼠眼底表现正常 B: 造模后 12 d 小鼠视网膜血管轻度扩张(红箭头) C: 造模后 16 d 小鼠视网膜血管扩张(红箭头), 可见视网膜渗出物(黑箭头) D: 造模后 28 d 小鼠视网膜血管轻度扩张(红箭头) 图 3 小鼠造模前后眼球病理组织学表现(HE  $\times 100$ , 标尺 = 500  $\mu\text{m}$ ) A: 正常对照组小鼠无炎症表现 B: EAU 小鼠免疫后 12 d 可见少量炎性细胞(红箭头) C: EAU 小鼠免疫后 16 d 视网膜脉络膜上炎性细胞增加(红箭头), 视网膜外核层皱褶 D: EAU 小鼠免疫后 28 d 炎性细胞浸润消失(红箭头), 视网膜结构接近正常

表 1 造模后不同时间点小鼠炎症评分的比较 [ $M(Q_1, Q_3)$ ]

造模后时间(d)	眼数	炎症症状评分	病理学炎症评分
0	6	0.00(0.00,0.00)	0.00(0.00,0.00)
4	6	0.00(0.00,0.00)	0.00(0.00,0.00)
8	6	0.00(0.00,0.13)	0.00(0.00,0.50)
12	6	0.75(0.50,1.00)	0.50(0.50,1.00)
16	6	1.25(1.00,2.00)	1.00(1.00,2.00)
20	6	1.50(1.00,2.00)	1.00(0.94,1.06)
24	6	1.25(1.00,2.00)	0.50(0.50,0.63)
28	6	1.00(1.00,1.25)	0.50(0.00,0.50)
32	6	0.50(0.50,0.63)	0.00(0.00,0.50)
36	6	0.00(0.00,0.50)	0.00(0.00,0.13)
$\chi^2$ 值		51.399	47.342
P 值		0.000	0.000

(Kruskal-Wallis 检验)

### 2.2 $\gamma\delta$ T 细胞在 EAU 小鼠发病过程中的动态表达

造模前小鼠脾脏  $\gamma\delta$  T 细胞仅占尼龙毛富集的脾脏 T 淋巴细胞的 (1.53  $\pm$  0.14)%, 造模后随着时间的延长, 小鼠脾脏  $\gamma\delta$  T 细胞比例明显增加, 造模前后不同时间点小鼠脾脏  $\gamma\delta$  T 细胞比例整体比较, 差异有统计学意义 ( $F = 19.617, P = 0.000$ )。造模后 16~20 d  $\gamma\delta$  T 细胞比例达峰, 与造模前比较差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ), 然后逐渐下降, 造模后 36 d 降到最低, 接近造模前水平, 与造模前比较差异无统计学意义 ( $P = 0.738$ )(图 4A, B, 表 2)。流式细胞仪检测  $\gamma\delta$  T 细胞激活标志物 CD69 和 LFA-1 均显示呈活化状态(图 4C, D)。

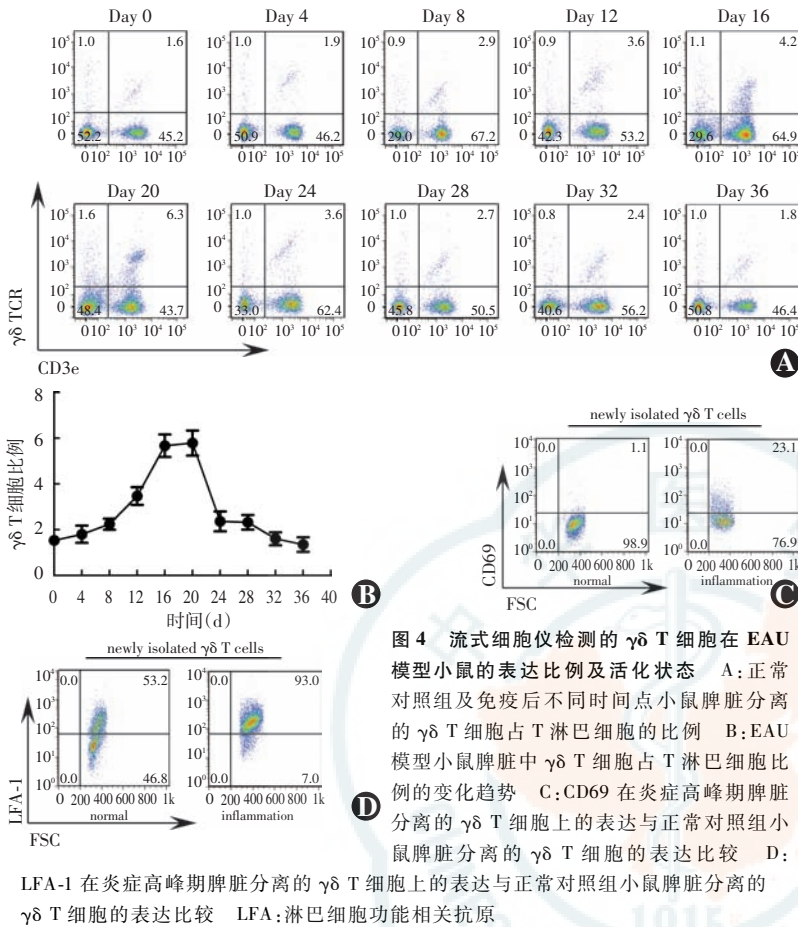


图 4 流式细胞仪检测的  $\gamma\delta$  T 细胞在 EAU 模型小鼠的表达比例及活化状态 A: 正常对照组及免疫后不同时间点小鼠脾脏分离的  $\gamma\delta$  T 细胞占 T 淋巴细胞的比例 B: EAU 模型小鼠脾脏中  $\gamma\delta$  T 细胞占 T 淋巴细胞比例的变化趋势 C: CD69 在炎症高峰期脾脏分离的  $\gamma\delta$  T 细胞上的表达与正常对照组小鼠脾脏分离的  $\gamma\delta$  T 细胞的表达比较 D: LFA-1 在炎症高峰期脾脏分离的  $\gamma\delta$  T 细胞上的表达与正常对照组小鼠脾脏分离的  $\gamma\delta$  T 细胞的表达比较 LFA-1: 淋巴细胞功能相关抗原

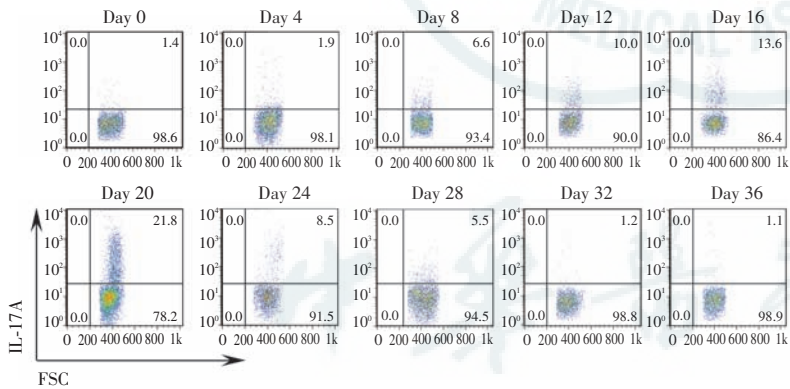


图 5 EAU 模型小鼠  $\gamma\delta$  T 细胞产生 IL-17A 的量 正常对照组和模型组不同时间点小鼠脾脏中分离纯化后的  $\gamma\delta$  T 细胞分泌 IL-17A 的量 IL: 白细胞介素

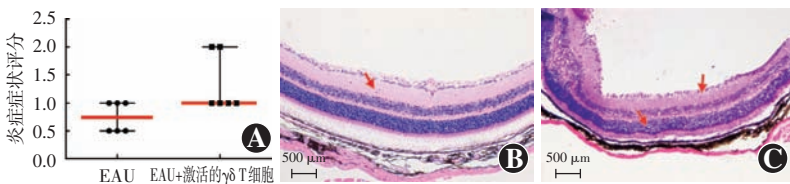


图 6 回输激活  $\gamma\delta$  T 细胞对 EAU 模型小鼠的影响 A: 回输与未回输  $\gamma\delta$  T 细胞的 EAU 模型小鼠炎症症状评分的比较 ( $n=6$ ), 红色线段表示中位数 B: B6 小鼠免疫后第 12 天眼球视网膜组织结构正常, 可见少量炎性细胞浸润 (箭头) (HE  $\times 100$ , 标尺 = 500  $\mu\text{m}$ ) C: 回输激活的  $\gamma\delta$  T 细胞后 B6 小鼠视网膜炎性细胞增多 (箭头), 外核层出现皱褶 (HE  $\times 100$ , 标尺 = 500  $\mu\text{m}$ ) EAU: 实验性自身免疫性葡萄膜炎

表 2 造模后不同时间点小鼠脾脏  $\gamma\delta$  T 细胞比例 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

造模后时间	样本量	$\gamma\delta$ T 细胞比例
0 d	3	1.53 $\pm$ 0.14
4 d	3	1.80 $\pm$ 0.37
8 d	3	2.24 $\pm$ 0.24
12 d	3	3.47 $\pm$ 0.39
16 d	3	5.67 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>
20 d	3	5.78 $\pm$ 0.55 <sup>a</sup>
24 d	3	2.36 $\pm$ 0.43
28 d	3	2.32 $\pm$ 0.31
32 d	3	1.60 $\pm$ 0.28
36 d	3	1.32 $\pm$ 0.32
F 值		19.617
P 值		0.000

注: 与造模后 0 d (造模前) 比较, <sup>a</sup>  $P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验)

### 2.3 活化的 $\gamma\delta$ T 细胞表达 IL-17A 的变化

流式细胞仪分析显示, EAU 高峰期  $\gamma\delta$  T 细胞分泌大量的 IL-17A, 造模后 16 d 和 20 d IL-17A 的分泌量分别为 (13.40  $\pm$  0.50)% 和 (17.80  $\pm$  2.37)%, 与正常对照小鼠的 (1.53  $\pm$  0.19)% 比较, 差异均有统计学意义 ( $P=0.000, 0.001$ )。造模后 16 d 与 20 d IL-17A 的分泌量比较差异无统计学意义 ( $P=0.070$ ) (图 5)。

### 2.4 回输激活 $\gamma\delta$ T 细胞加重 EAU 炎症反应

回输激活  $\gamma\delta$  T 细胞后, IRBP<sub>1-20</sub> 诱导的 EAU 小鼠眼底血管充血扩张明显, 回输激活的  $\gamma\delta$  T 细胞的 EAU 小鼠炎症症状评分为 1.00 (1.00, 2.00), 明显高于未回输激活的  $\gamma\delta$  T 细胞的 0.75 (0.50, 1.00), 差异有统计学意义 ( $Z=27.00, P=0.03$ ) (图 6A)。苏木精-伊红染色结果显示, 与免疫后 12 d 的 EAU 小鼠相比, 回输激活  $\gamma\delta$  T 细胞的 EAU 小鼠眼球炎症加重, 视网膜炎性细胞增多, 视网膜外核层出现皱褶 (图 6B, C)。

## 3 讨论

$\gamma\delta$  T 细胞是 Brenner 等<sup>[13]</sup> 于 1986 年应用 T 细胞受体 (T cell receptor, TCR) 的  $\gamma$  基因序列编码肽段所制备的抗体中发现的。TCR $\gamma$  的基因由重组的 V、D、J 和 C 区组成, 其连接区多样性使 TCR $\gamma$  存在多样性的潜能。 $\gamma\delta$  T 细胞不仅有典型的天然免

疫功能,同时还可作为特殊的 APC 进一步活化获得性免疫应答<sup>[14-15]</sup>,因而  $\gamma\delta$  T 细胞被认为可能是机体连接天然免疫和获得性免疫功能的重要机制<sup>[15]</sup>。研究表明,多种感染和自身免疫性疾病的进展过程中均伴有  $\gamma\delta$  T 细胞数量和功能的改变<sup>[16-17]</sup>。近年发现天然免疫细胞,如  $\gamma\delta$  T 细胞、CD3<sup>+</sup> iNKT 细胞等均能产生 IL-17A, $\gamma\delta$  T 细胞是产生 IL-17A 重要的固有细胞<sup>[18]</sup>。

本研究中成功诱导小鼠 EAU 动物模型,并观察了  $\gamma\delta$  T 细胞在 EAU 小鼠发病过程中脾脏内的动态表达。小鼠脾脏  $\gamma\delta$  T 细胞比例的动态变化与 EAU 小鼠炎症程度有一定相关性。本研究中观察到,在 EAU 特异性抗原肽免疫后, $\gamma\delta$  T 细胞的数量明显增加,提示  $\gamma\delta$  T 细胞在 EAU 的发病中起作用,且增多的  $\gamma\delta$  T 细胞高表达 CD69 和 LFA-1,提示活化的  $\gamma\delta$  T 细胞在 EAU 的发病中起作用。进一步研究发现,如果 IRBP<sub>1-20</sub> 诱导的 EAU 成型后回输活化的  $\gamma\delta$  T 细胞,炎症较未回输  $\gamma\delta$  T 细胞 EAU 小鼠明显加重,提示活化的  $\gamma\delta$  T 细胞在 EAU 的发病中起致病作用。

本研究中也对  $\gamma\delta$  T 细胞的具体致病机制进行了探讨。EAU 分离纯化培养的  $\gamma\delta$  T 细胞体外分泌 IL-17A 量的变化与 EAU 病程一致,在疾病高峰期较正常对照组小鼠明显增加,提示  $\gamma\delta$  T 细胞可能是通过产生 IL-17A 影响 EAU 的发病。IL-17A 在炎症表达中起到重要的免疫调节作用。我们认为,用抗原和含有结核杆菌产物的 CFA 免疫小鼠后, $\gamma\delta$  T 细胞迅速聚集到脾脏等淋巴样器官,不仅起到效应和调节性作用,可能还作为 APC 发挥作用。在 EAU 小鼠模型中, $\gamma\delta$  T 细胞在抗原刺激后可产生 IL-17A, $\gamma\delta$  T 细胞及其产生的 IL-17A 可能通过启动和放大获得性免疫应答,介导 EAU 的发生和发展。

综上所述,本研究成功诱导出 EAU 小鼠模型,并记录了 EAU 小鼠的病程变化及  $\gamma\delta$  T 细胞在 EAU 小鼠发病过程中的动态表达。EAU 中  $\gamma\delta$  T 细胞比例在炎症高峰期明显升高,且呈活化状态。进一步明确了活化的  $\gamma\delta$  T 细胞在 EAU 模型中发挥致病作用,且其可能的调节机制是通过分泌 IL-17A 进行的。但  $\gamma\delta$  T 细胞调控葡萄糖膜炎免疫反应的确切分子机制还需要进一步的研究证实。

## 参考文献

- [1] Cui Y, Shao H, Sun D, et al. Regulation of interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP)-specific Th1 and Th17 cells in anterior chamber-associated immune deviation (ACAID) [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50(12): 5811-5817. DOI: 10.1167/iops.09-3389.
- [2] 崔彦, 毕宏生, Deming Sun. Th1、Th17 细胞对小鼠视网膜星形细胞的杀伤作用[J]. 中华实验眼科杂志, 2012, 30(1): 25-28. DOI: 10.3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2012. 01. 006.
- [3] Cui Y, Bi HS, Deming Sun. Interaction between mouse retinal astrocyte and antigen specific Th1 and Th17 Cells [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2012, 30(1): 25-28. DOI: 10.3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2012. 01. 006.
- [4] Hayday AC. Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response [J]. Immunity, 2009, 31(2): 184-196. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.08.006.
- [5] 李闻文, 龚道科.  $\gamma\delta^+$  T 细胞在抗感染免疫中的作用 [J]. 免疫学杂志, 2002, 18(3): 58-61.
- [6] Li WW, Gong DK. Effect of  $\gamma\delta^+$  T cell in anti-infection immunity [J]. J Immunol, 2002, 18(3): 58-61.
- [7] Tsuchiya T, Fukuda S, Hamada H, et al. Role of gamma delta T cells in the inflammatory response of experimental colitis mice [J]. J Immunol, 2003, 171(10): 5507-5513.
- [8] Odyniec A, Szczepanik M, Mycko MP, et al. Gammadelta T cells enhance the expression of experimental autoimmune encephalomyelitis by promoting antigen presentation and IL-12 production [J]. J Immunol, 2004, 173(1): 682-694.
- [9] Shao H, Fu Y, Song L, et al. Lymphotoxin beta receptor-Ig fusion protein treatment blocks actively induced, but not adoptively transferred, uveitis in Lewis rats [J]. Eur J Immunol, 2003, 33(6): 1736-1743. DOI: 10.1002/eji.200323745.
- [10] Cheng L, Cui Y, Shao H, et al. Mouse gammadelta T cells are capable of expressing MHC class II molecules, and of functioning as antigen-presenting cells [J]. J Neuroimmunol, 2008, 203(1): 3-11. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2008.06.007.
- [11] Lockhart E, Green AM, Flynn JL. IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection [J]. J Immunol, 2006, 177(7): 4662-4669.
- [12] Chung CS, Watkins L, Funches A, et al. Deficiency of gammadelta T lymphocytes contributes to mortality and immunosuppression in sepsis [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2006, 291(5): 1338-1343. DOI: 10.1152/ajpregu.00283.2006.
- [13] Nanno M, Shiohara T, Yamamoto H, et al. Gammadelta T cells: firefighters or fire boosters in the front lines of inflammatory responses [J]. Immunol Rev, 2007, 215: 103-113. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2006.00474.x.
- [14] Thureau SR, Chan CC, Nussenblatt RB, et al. Oral tolerance in a murine model of relapsing experimental autoimmune uveoretinitis (EAU): induction of protective tolerance in primed animals [J]. Clin Exp Immunol, 1997, 109: 370-376.
- [15] Brenner MB, McLean J, Dialynas DP, et al. Identification of a putative second T-cell receptor [J]. Nature, 1986, 322(6075): 145-149.
- [16] 蓝程, 董丽伟, 孙晓宁, 等. 小鼠  $\gamma\delta$  T 细胞抗原呈递功能的实验研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2009, 25(6): 500-503, 507.
- [17] Lan C, Dong LW, Sun XN, et al. Study on the antigen presenting function of murine gamma delta T cells [J]. Chin J Immunol, 2009, 25(6): 500-503, 507.
- [18] Qin G, Liu Y, Zheng J, et al. Phenotypic and functional characterization of human  $\gamma\delta$  T-cell subsets in response to influenza A viruses [J]. J Infect Dis, 2012, 205(11): 1646-1653. DOI: 10.1093/infdis/jis253.
- [19] Eberl M, Moser B. Monocytes and gammadelta T cells: close encounters in microbial infection [J]. Trends Immunol, 2009, 30(12): 562-568. DOI: 10.1016/j.it.2009.09.001.
- [20] Nian H, Shao H, O'Brien RL, et al. Activated gammadelta T cells promote the activation of uveitogenic T cells and exacerbate EAU development [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(8): 5920-5927. DOI: 10.1167/iops.10-6758.
- [21] Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system [J]. Nat Rev Immunol, 2010, 10(7): 479-489. DOI: 10.1038/nri2800.

(收稿日期: 2016-03-18)

(本文编辑: 尹卫靖 杜娟)