

植物凝集素诱导甲状腺相关眼病患者外周单核细胞与眼眶成纤维细胞共培养体系分泌 IL-6、IL-17A 的研究

潘媛 许雪亮 谭佳 许蓓 张灵丽

410008 长沙,中南大学湘雅医院眼科

通信作者:许雪亮,Email:xuxueliang8341@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.08.005

【摘要】 背景 甲状腺相关眼病(TAO)的致病机制尚未明确,目前认为其是一种自身免疫性疾病,研究证实白细胞介素-17A(IL-17A)在多种自身免疫性疾病的发生和发展中起着重要作用,但其是否参与TAO的发病过程目前尚不明确。目的 探讨培养外周血单个核细胞(PBMCs)与眼眶成纤维细胞(OFs)共培养体系中分泌的IL-17A是否参与TAO的发病过程及其可能的作用机制。方法 采集2014年4—12月在中南大学湘雅医院确诊的12例TAO患者的外周血及眼眶结缔组织作为TAO组,并采集同期因先天性眼球萎缩行义眼台植入术的8例患者外周血及眼眶结缔组织作为对照组,采用密度梯度离心法提取所有受试者血中PBMCs,采用组织块培养法培养OFs。采用流式细胞仪检测PBMCs中T淋巴细胞纯度,分别用Giemsa染色法和免疫组织化学法鉴定培养的OFs。以1:20的比例将OFs与PBMCs在U型96孔板中共培养以建立共培养体系,分别在各组共培养体系中加入0、1.0、2.5、5.0、10.0 μg/ml植物凝集素(PHA)刺激72 h,用ELISA法检测共培养体系上清液中IL-6、IL-17A质量浓度以及共培养体系细胞膜中总IL-17A受体(IL-17RA)的质量浓度。比较不同质量浓度PHA作用后各组共培养体系上清液中IL-6、IL-17A、IL-17RA质量浓度的差异。结果 TAO组和对照组PBMCs中T淋巴细胞的纯度分别为(81.10±0.21)%和(80.05±0.38)%,组间差异无统计学意义($t=0.923, P>0.05$)。体外培养的OFs对Vimentin呈阳性反应,Giemsa染色阳性,证实为成纤维细胞。1.0 μg/ml PHA作用后共培养体系中PBMCs和OFs增生能力最强,PHA质量浓度>1.0 μg/ml时,PBMCs出现凋亡,OFs增生明显减弱,相同质量浓度PHA作用下,TAO组的PBMCs和OFs增生均较对照组快。不同质量浓度PHA作用下TAO组与对照组共培养体系IL-6、IL-17A和IL-17RA质量浓度总体比较,差异均有统计学意义(IL-6: $F_{\text{分组}}=12.561, P=0.000; F_{\text{质量浓度}}=23.356, P=0.001$ 。IL-17A: $F_{\text{分组}}=12.037, P=0.000; F_{\text{质量浓度}}=19.206, P=0.000$ 。IL-17RA: $F_{\text{分组}}=16.216, P=0.000; F_{\text{质量浓度}}=4.627, P=0.018$)。1.0 μg/ml PHA作用后各组共培养体系上清液中IL-6、IL-17A和IL-17RA质量浓度均达峰值,随着PHA质量浓度的增加,IL-6、IL-17A和IL-17RA质量浓度均逐渐下降,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);相同质量浓度PHA作用下TAO组共培养体系上清液中IL-6、IL-17A、IL-17RA质量浓度明显高于对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。结论 1.0 μg/ml PHA刺激可增强共培养体系中PBMCs和OFs的增生及免疫炎症因子的分泌,IL-17A能够放大细胞免疫反应和炎症反应,从而参与TAO的发病过程。

【关键词】 细胞培养; 甲状腺相关眼病; 外周血单个核细胞; 眼眶成纤维细胞; T淋巴细胞; 白细胞介素-6; 白细胞介素-17A; 人

基金项目:湖南省发改委基金会项目(湘发改高技[2011]1318号)

A study on the establishment of co-culture system of peripheral blood mononuclear cells with orbital fibroblasts and the secretion of IL-6 and IL-17A induced by phytagglutinin in thyroid associated ophthalmopathy Pan Yuan, Xu Xueliang, Tan Jia, Xu Bei, Zhang Lingli

Department of Ophthalmology, Xiangya Hospital, Centre South University, Changsha 410008, China

Corresponding author: Xu Xueliang, Email: xuxueliang8341@163.com

[Abstract] **Background** The pathogenic mechanism of thyroid associated ophthalmopathy (TAO) is still unclear, which is considered to be an autoimmune disease. It is confirmed that interleukin-17A (IL-17A) plays an important role in the occurrence and development of many autoimmune diseases. It is unclear that whether IL-17A

participates in the pathogenesis of TAO. **Objective** This study was to explore whether IL-17A secreted by co-culture system of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and orbital fibroblasts (OFs) participates in the pathogenesis of TAO and its possible mechanism. **Methods** Periphery blood and orbital connective tissue were obtained from 12 patients with TAO and 8 patients who received prosthesis implantation for eyeball atrophy in Xiangya Hospital during April to December 2014. PBMCs were isolated by density gradient centrifugation, and OFs were cultured by explant culture method. The purity of T leukomonocyte in PBMCs was tested by flow cytometry, and OFs were identified by Giemsa staining and immunocytochemistry. OFs and PMBCs were incubated into 96-well plate in a 1:20 proportion to establish co-culture system. Different concentrations of phytagglutinin (PHA) (0, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was added for 72 hours, and IL-6, IL-17A levels in the co-culture system supernatant and IL-17A receptor (IL-17RA) of the total cell membranes in the co-culture system were assayed by ELISA. The differences of IL-6, IL-17A, IL-17RA levels in co-culture system were compared between the TAO group and control group.

Results The mean purity of T leukomonocyte in PBMCs was (81.10 \pm 0.21)% in the TAO group and (80.05 \pm 0.38)% in the control group respectively, with no significant difference between them ($t=0.923, P>0.05$). Cultured OFs showed the positive response for Vimentin expression and Giemsa staining. After stimulated by 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PHA, the proliferation of both PBMCs and OFs were increased in the co-culture system. Apoptosis exist in PBMCs and the number of OFs decreased when PHA was higher than 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The growth of PBMCs and OFs was faster in the TAO group than that in the control group in the same concentration of PHA. The contents of IL-6, IL-17A and IL-17RA in co-culture system were significantly different among various concentrations of PHA subgroups (IL-6: $F_{\text{group}}=12.561, P=0.000; F_{\text{concentration}}=23.356, P=0.001$. IL-17A: $F_{\text{group}}=12.037, P=0.000; F_{\text{concentration}}=19.206, P=0.000$. IL-17RA: $F_{\text{group}}=16.216, P=0.000; F_{\text{concentration}}=4.627, P=0.018$). The production of IL-6, IL-17A and IL-17RA reached peak in both TAO group and the control group after 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PHA stimulated. However, the concentrations of IL-6, IL-17A and IL-17RA reduced with the increase of PHA concentration. The concentrations of IL-6, IL-17A and IL-17RA in co-culture system were significantly higher in the TAO group than those in the control group under the stimulation of the same concentration of PHA (all at $P<0.05$). **Conclusions** The co-culture system of PBMCs and OFs stimulated with PHA can be the imitation of TAO pathogenesis *in vitro*, and PHA can amplify its immune reaction to imitate TAO pathogenic processes intuitively. The IL-6, IL-17A and IL-17RA secreted by PBMCs and induced by PHA are increased in TAO patients, implying that IL-17A participates in the pathogenesis of TAO through magnifying cellular immune response and inflammatory reaction.

[Key words] Cell culture; Thyroid-associated ophthalmopathy; Peripheral blood mononuclear cells; Orbital fibroblasts; T lymphocytes; Interleukin-6; Interleukin-17A; Human

Fund program: The Development and Reform Commission Foundation of Hunan Province ([2011] 1318)

甲状腺相关眼病(thyroid associated ophthalmopathy, TAO)是常见的眼眶疾病,其发病机制尚未完全明了。目前认为 TAO 是一种自身免疫性疾病,研究表明遗传因素、体液免疫、细胞免疫及其相关的细胞因子、吸烟等多种因素可能在 TAO 发病中均发挥一定的作用^[1-2]。眼眶成纤维细胞(orbital fibroblasts, OFs)是 TAO 病理过程中的靶细胞和效应细胞,TAO 患者外周血中活化的淋巴细胞浸润眼眶组织并刺激 OFs,产生一系列复杂的病理反应,最终表现出相应的临床症状^[1],因此在研究过程中采用传统的单独 OFs 培养方法并不能很好地模拟 TAO 患者的体内环境。Th17 是最近发现的 CD4⁺ T 淋巴细胞亚群,主要分泌白细胞介素-17(interleukin-17, IL-17)。IL-17 家族包括 6 种结构相近的细胞因子 IL-17A、B、C、D、E、F,其中 IL-17A 和 IL-17F 高度同源并高表达^[3-6]。研究证实,IL-17A 在自身免疫性疾病等疾病的发生和发展中起着重要作

用^[7-9]。白细胞介素-17 受体(interleukin-17 receptor, IL-17R)家族包含 IL-17RA、B、C、D、E 共 5 位成员^[10];其中 IL-17RA 分布广泛,主要分布于免疫细胞,如淋巴细胞中,IL-17RC 则主要表达于非免疫细胞,如成纤维细胞中,IL-17A 以同源二聚体(IL-17A/IL-17A)或异源二聚体(IL-17A/IL-17F)的形式与受体异源二聚体(IL-17RA/IL-17RC)结合启动下游信号传导通路^[11]。IL-6 是由多种免疫或非免疫细胞分泌的一种多效性细胞因子,与多种自身免疫性疾病的发病机制密切相关。Salvi 等^[12]研究发现,活动性 TAO 患者血清中 IL-6、IL-6R 水平明显高于非活动性 TAO 患者。植物凝集素(phytohemagglutinin, PHA)是一种由低聚糖和蛋白质构成的有丝分裂原,可特异性地作用于外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)中的 T 淋巴细胞,促进其增生和分化为效应 T 细胞,诱导其分泌 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)、IL-4、IL-17 等,以

增强机体的免疫功能^[13]。为了更好地模拟体内环境,本研究中将 TAO 患者 PBMCs 与 OFs 共培养,并添加不同质量浓度的 PHA 刺激共培养体系,激活 PBMCs 中的 T 淋巴细胞,以建立 TAO 模型,探讨 IL-17A 是否参与 TAO 的发病过程及其可能的致病机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 受试者外周血及眼眶结缔组织标本的收集
收集 2014 年 4—12 月在中南大学湘雅医院眼科确诊的 TAO 患者 12 例作为 TAO 组,TAO 的诊断符合 Bartley 等^[14]的标准,均为 NOSPECS 分级法中的 IV ~ VI 级而需要手术治疗者。患者实验室检查甲状腺功能均稳定在正常范围内 6 个月以上,无其他免疫性、代谢性、感染性疾病和恶性肿瘤。采集患者周围静脉血 10 ml,并采集同期因先天性眼球萎缩行义眼台植入术的 8 例成年患者静脉血作为对照组,术中收集 2 个组患者术眼的眼眶结缔组织标本。

1.1.2 主要试剂 RPMI 1640(美国 Hyclone 公司); PBS(北京鼎国生物技术责任有限公司);胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);含质量分数 0.25% EDTA 胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);青链霉素、PHA、DMSO(美国 Sigma 公司);Giemsa 染色液(江苏凯基生物技术股份有限公司);DAB 显色液、PV 二步法检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);鼠抗人 CD3 单克隆抗体(抗体编号:555330)(美国 BD 公司);FITC 标记的羊抗鼠二抗(抗体编号:115-095-003)(美国 Jackson ImmunoResearch 公司);质量分数 4% 多聚甲醛,人 IL-6、IL-17A、IL-17RA ELISA 试剂盒(武汉华美生物工程有限公司);鼠抗人 Vimentin 单克隆抗体(抗体编号:60330-1-Ig)(美国 Proteintech 公司)。

1.2 方法

1.2.1 PBMCs 的提取及 OFs 培养 将外周血与 PBS 等体积混匀稀释,将人淋巴细胞分离液按照体积比 2:3 比例加入到上述稀释血液中,离心半径 14 cm,2 000 r/min 室温下离心 25 min,取第 2 层单个核细胞悬液;将 PBS 按照体积比 5:1 重悬单个核细胞悬液,4 °C 条件下 2 200 r/min 离心 10 min,弃上清液,用 PBS 重悬细胞,1 600 r/min 室温下离心 10 min,弃上清液,用适量含体积分数 10% 胎牛血清的完全培养基重悬细胞,调整细胞密度为 1×10^6 /ml。在眶减压术或义眼台植入术中获取眼眶结缔组织,剔除结缔组织中的脂肪组织及血管,PBS 反复冲洗 3 次,用眼科剪将其剪成约 1 mm^3 大小,均匀置入已用少量胎牛血清湿润瓶底

的培养瓶中,剪碎的组织之间的摆放间隙约为 5 mm,然后将培养瓶轻轻翻转,瓶底朝上,加入 2 ml 含 20% 胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养基,置入 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 4 ~ 6 h 后轻轻翻转瓶底将其平放,间隔 2 ~ 3 d 换液 1 次;细胞贴壁后 2 周细胞基本覆盖培养瓶底时进行第 1 次传代,继续培养 3 ~ 5 d 进行第 2 次传代,取第 3 代细胞用于后续实验。

1.2.2 PBMCs 和 OFs 的鉴定

1.2.2.1 锥虫蓝染色法判断 PBMCs 细胞活力 在细胞涂片滴加锥虫蓝并静置 3 ~ 5 min,光学显微镜下观察 PBMCs 细胞活力,染色阳性者为失活细胞。

1.2.2.2 采用流式细胞仪检测 PBMCs 中 T 淋巴细胞的纯度 分别提取 PBMCs 悬液 500 μl (约含 5×10^5 个单个核细胞)置入 Eppendorf 管中,加入鼠抗人 CD3 抗体,置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 30 min;离心半径 8.5 cm,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清液,PBS 清洗 2 次,加入 500 μl PBS 重悬细胞;加入 FITC 标记的兔抗鼠 IgG,置于 4 °C 避光环境孵育 30 min,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清液,PBS 清洗 2 次,加入 500 μl PBS 重悬细胞;加入 1% 多聚甲醛固定,上机检测。对照组仅加入 FITC 标记的兔抗鼠 IgG,阴性对照组仅用 PBS 清洗 2 次。

1.2.2.3 采用 Giemsa 染色法鉴定 OFs 制作眼眶成纤维细胞爬片,PBS 漂洗 2 min,甲醛固定,自然干燥后滴加 Giemsa 染色试剂盒试剂一,室温孵育 1 min,滴加 Giemsa 染色试剂盒试剂二混匀,风干,封片后于倒置显微镜下观察成纤维细胞形态并照相。

1.2.2.4 采用免疫组织化学法检测细胞中 Vimentin 的表达 制作细胞爬片,4% 多聚甲醛室温下固定 20 min;加入体积分数 3% H₂O₂ 去离子水 2 ml,室温孵育 10 min;体积分数 5% 牛血清白蛋白在 37 °C 封闭 30 min,加入鼠抗人 Vimentin 单克隆抗体 150 μl ,于 4 °C 下孵育 12 h;PBS 冲洗后滴加 PV-9000 试剂 1,PBS 冲洗后加入 PV-9000 试剂 2;PBS 冲洗后进行 DAB 显色,苏木素复染细胞,自来水冲洗;用梯度乙醇将细胞脱水干燥,二甲苯透明,用中性树胶封片。阴性对照用 PBS 替代一抗进行免疫组织化学染色。

1.2.3 共培养体系的建立 用胰蛋白酶消化第 3 代 OFs,制备成单细胞悬液,调整细胞密度为 1.25×10^5 /ml,取 40 μl 细胞悬液放入 U 型 96 孔板中,每孔 5×10^3 个 OFs,置 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h,待 OFs 大部分贴壁后,每孔再接种密度为 1×10^6 /ml 的 PBMCs 100 μl 。各孔按实验分组的不同分别加入不同质量浓度(0、1.0、2.5、5.0、10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的 PHA 各 10 μl ,37 °C、5%

CO₂ 培养箱中孵育 72 h。每组设 8 个复孔。

1.2.4 ELISA 法检测 IL-6、IL-17A 及总 IL-17RA 质量浓度 采用双抗夹心法检测共培养体系上清液中的 IL-6、IL-17A 质量浓度以及共培养体系细胞膜中总 IL-17RA 质量浓度。具体步骤如下：(1) 标准品的稀释 将标准品稀释成不同浓度用以做标准曲线；(2) 加样 分别设待测样品孔、空白孔，于酶标包被板上的待测样品孔中依次滴加 40 μl 标准品稀释液及 10 μl 待测样品，避免接触孔壁，轻轻晃动均匀，空白孔不加样品及酶标试剂，其余步骤同样品孔；(3) 温育 用封板膜封板后置 37 ℃ 环境下孵育 30 min；(4) 配液 用蒸馏水稀释浓缩洗涤液；(5) 洗涤 移除板孔中液体，轻轻甩干，用 300 μl 上述稀释洗涤液清洗板孔，静置 30 s 后移除，重复洗涤 5 次，轻轻拍干；(6) 加酶 于每孔中加入 50 μl 酶标试剂，温育、洗涤；(7) 显色 每孔中滴加 100 μl 显色剂并摇匀，于 37 ℃ 环境下避光显色 15 min；(8) 终止 于每孔中滴加 50 μl 终止液，终止其反应(可见蓝色立即转为黄色)；(9) 测定及计算 调零空白孔，以 450 nm 波长分别测量各孔吸光度(A)值，绘制标准曲线，计算各孔质量浓度。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计学软件进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经 W 检验呈正态分布，以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用独立均衡分组两水平实验设计，TAO 组与对照组间 PBMCs 中 T 淋巴细胞的纯度比较采用独立样本 t 检验；不同质量浓度 PHA 作用后 2 个组间共培养体系上清液中 IL-6、IL-17A 和 IL-17RA 质量浓度的总体差异比较采用两因素方差分析，组间多重比较采用 SNK-q 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 个组 PBMCs 的形态、细胞活力及 T 淋巴细胞比例

TAO 组和对照组受试者血中提取的 PBMCs 均呈圆形或椭圆形，大小均一，2 个组间细胞形态无明显差别(图 1)。锥虫兰染色阳性 PBMCs 较少，PBMCs 活力约为 97%。流式细胞计数检测显示，TAO 组和对照组受试者 PBMCs 中 T 淋巴细胞比例分别为 (81.10 ± 0.21)% 和 (80.05 ± 0.38)%，差异无统计学意义 (t = 0.923, P>0.05)。

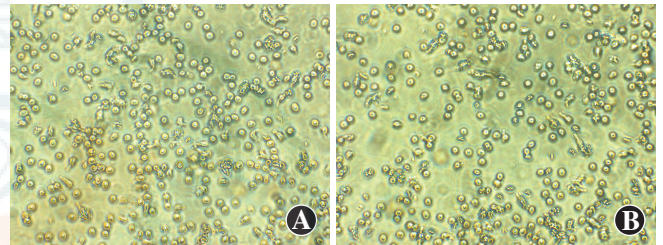


图 1 TAO 组和对照组 PBMCs 的生长状态(×100) 2 个组受试者提取的 PBMCs 胞体均呈圆形或椭圆形，大小均一 A:TAO 组 B:对照组

2.2 2 个组 OFs 的形态表现及鉴定

体外培养的 OFs 生长状况良好，TAO 组与对照组培养的 OFs 形态无明显区别。在组织块贴壁后 3~5 d 可见组织块边缘有少量细胞长出，细胞呈梭形，两端有细长的突起(图 2A, B)；贴壁后 8~12 d 细胞呈典型的梭形，胞体较丰满，细胞质丰富(图 2C, D)。免疫组织化学检测显示，细胞 Vimentin 染色阳性(图 3A)，Giemsa 染色下可更清晰显示培养细胞呈长梭形，细胞核呈蓝紫色，细胞质呈淡粉色(图 3B)，证实为 OFs。

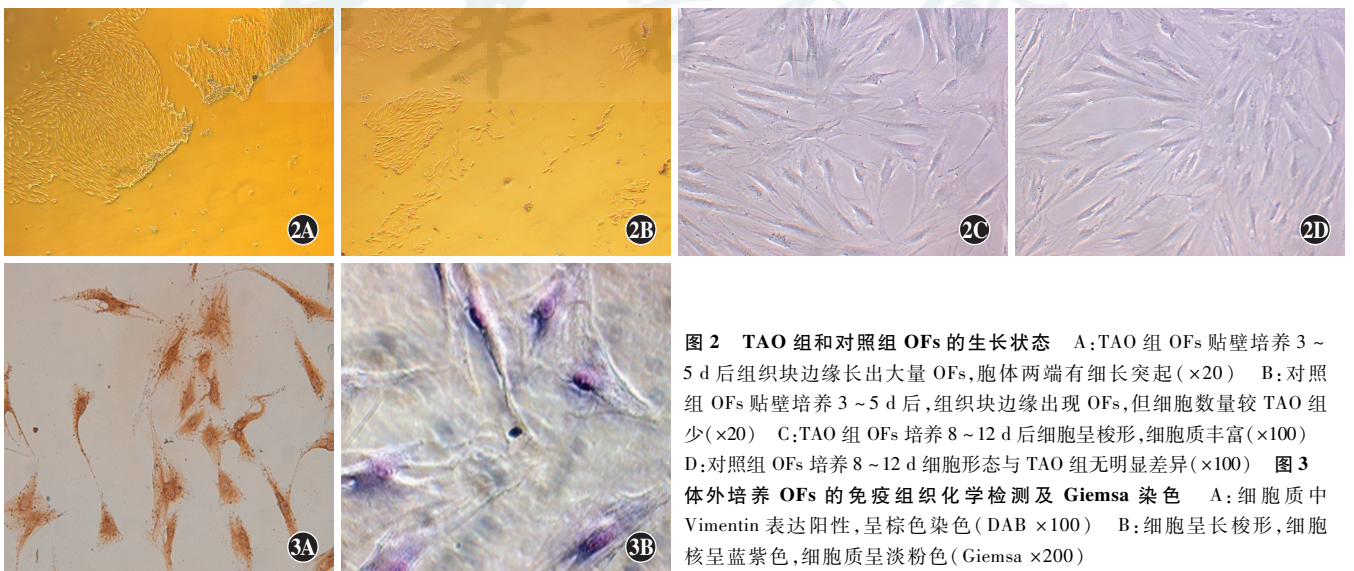


图 2 TAO 组和对照组 OFs 的生长状态 A:TAO 组 OFs 贴壁培养 3~5 d 后组织块边缘长出大量 OFs，胞体两端有细长突起(×20) B:对照组 OFs 贴壁培养 3~5 d 后，组织块边缘出现 OFs，但细胞数量较 TAO 组少(×20) C:TAO 组 OFs 培养 8~12 d 后细胞呈梭形，细胞质丰富(×100) D:对照组 OFs 培养 8~12 d 细胞形态与 TAO 组无明显差异(×100) 图 3 体外培养 OFs 的免疫组织化学检测及 Giemsa 染色 A:细胞质中 Vimentin 表达阳性，呈棕色染色(DAB ×100) B:细胞呈长梭形，细胞核呈蓝紫色，细胞质呈淡粉色(Giemsa ×200)

2.3 不同质量浓度 PHA 作用下共培养体系的生长状况

共培养后 72 h, 1.0 μg/ml PHA 作用下 2 个组共培养体系中 PBMCs 和 OFs 生长均最旺盛, 2 种细胞接

触最紧密, 胞体形态饱满; 随着 PHA 质量浓度的增加, PBMCs 出现凋亡, 胞体欠饱满, OFs 增生明显减弱。相同质量浓度 PHA 作用下 TAO 组共培养体系中 PBMCs 和 OFs 增生能力均较对照组强(图 4)。

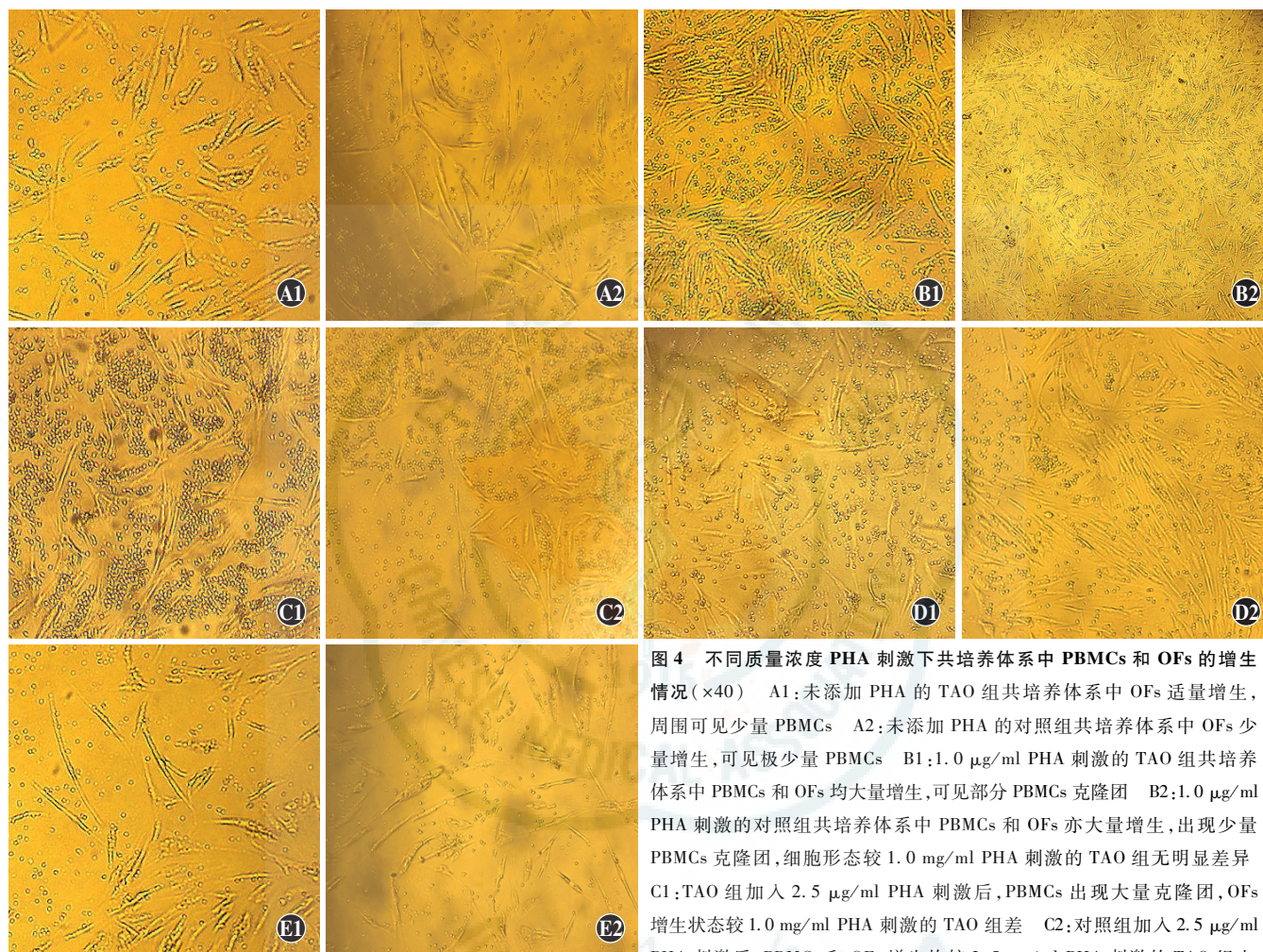


图 4 不同质量浓度 PHA 刺激下共培养体系中 PBMCs 和 OFs 的增生情况(×40) A1:未添加 PHA 的 TAO 组共培养体系中 OFs 适量增生, 周围可见少量 PBMCs A2:未添加 PHA 的对照组共培养体系中 OFs 少量增生, 可见极少量 PBMCs B1:1.0 μg/ml PHA 刺激的 TAO 组共培养体系中 PBMCs 和 OFs 均大量增生, 可见部分 PBMCs 克隆团 B2:1.0 μg/ml PHA 刺激的对照组共培养体系中 PBMCs 和 OFs 亦大量增生, 出现少量 PBMCs 克隆团, 细胞形态较 1.0 mg/ml PHA 刺激的 TAO 组无明显差异 C1:TAO 组加入 2.5 μg/ml PHA 刺激后, PBMCs 出现大量克隆团, OFs 增生状态较 1.0 mg/ml PHA 刺激的 TAO 组差 C2:对照组加入 2.5 μg/ml PHA 刺激后, PBMCs 和 OFs 增生均较 2.5 mg/ml PHA 刺激的 TAO 组少 D1:TAO 组加入 5.0 μg/ml PHA 刺激后, PBMCs 多散在分布, 少见克隆团, 胞体欠饱满, 出现细胞凋亡, OFs 适量增生 D2:对照组加入 5.0 μg/ml PHA 刺激后, PBMCs 较少, 呈散在均匀分布, 胞体较小 E1:TAO 组加入 10.0 μg/ml PHA 刺激后, OFs 极少量增生, PBMCs 数量较 5.0 mg/ml PHA 刺激的 TAO 组更少, 胞体亦欠饱满, 多为凋亡状态 E2:对照组加入 10.0 μg/ml PHA 刺激后, PBMCs 多已凋亡, OFs 亦极少量增生且胞体呈细长梭形

2.4 不同质量浓度 PHA 作用下共培养体系中 IL-6、IL-17A 及 IL-17RA 质量浓度的变化

TAO 组与对照组不同质量浓度 PHA 作用下共培养体系上清液中 IL-6、IL-17A 和 IL-17RA 质量浓度总体比较差异均有统计学意义 (IL-6: $F_{\text{分组}} = 12.561$, $P = 0.000$; $F_{\text{质量浓度}} = 23.356$, $P = 0.001$. IL-17A: $F_{\text{分组}} = 12.037$, $P = 0.000$; $F_{\text{质量浓度}} = 19.206$, $P = 0.000$. IL-17RA: $F_{\text{分组}} = 16.216$, $P = 0.000$; $F_{\text{质量浓度}} = 4.627$, $P = 0.018$)。1.0 μg/ml PHA 作用后 TAO 组和对照组

共培养体系上清液中 IL-6、IL-17A 和 IL-17RA 质量浓度均达峰值, 此后随着 PHA 质量浓度的增加, 2 个组共培养体系上清液中 IL-6、IL-17A 和 IL-17RA 质量浓度均下降, 各组内不同质量浓度 PHA 间共培养体系上清液中 IL-6、IL-17A 和 IL-17RA 质量浓度比较差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 相同质量浓度 PHA 作用条件下 2 个组间共培养体系上清液中 IL-6、IL-17A、IL-17RA 质量浓度比较差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 1)。

表 1 不同质量浓度 PHA 作用后各组共培养体系中 IL-6、IL-17A、IL-17RA 质量浓度比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 样本量 | 不同质量浓度 PHA 作用下 IL-6 测定值 (pg/ml) | | | | |
|-------|-----|------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| | | 0 $\mu\text{g/ml}$ | 1.0 $\mu\text{g/ml}$ | 2.5 $\mu\text{g/ml}$ | 5.0 $\mu\text{g/ml}$ | 10.0 $\mu\text{g/ml}$ |
| 对照组 | 8 | 1 848.58 \pm 0.01 | 1 903.08 \pm 0.01 ^a | 1 897.09 \pm 0.02 ^{ab} | 1 887.38 \pm 0.01 ^{ab} | 1 846.53 \pm 0.01 ^{abcd} |
| TAO 组 | 8 | 1 912.33 \pm 0.01 ^c | 1 954.06 \pm 0.01 ^{ac} | 1 933.76 \pm 0.02 ^{abc} | 1 899.97 \pm 0.00 ^{abc} | 1 898.85 \pm 0.02 ^{abc} |
| 组别 | 样本量 | 不同质量浓度 PHA 作用下 IL-17A 测定值 (pg/ml) | | | | |
| | | 0 $\mu\text{g/ml}$ | 1.0 $\mu\text{g/ml}$ | 2.5 $\mu\text{g/ml}$ | 5.0 $\mu\text{g/ml}$ | 10.0 $\mu\text{g/ml}$ |
| 对照组 | 8 | 181.13 \pm 0.01 | 232.16 \pm 0.01 ^a | 206.27 \pm 0.01 ^{ab} | 166.41 \pm 0.00 ^{abc} | 141.65 \pm 0.01 ^{abcd} |
| TAO 组 | 8 | 201.91 \pm 0.02 ^c | 284.41 \pm 0.01 ^{ac} | 266.33 \pm 0.01 ^{abc} | 239.86 \pm 0.02 ^{abc} | 226.32 \pm 0.01 ^{abcde} |
| 组别 | 样本量 | 不同质量浓度 PHA 作用下 IL-17RA 测定值 (ng/ml) | | | | |
| | | 0 $\mu\text{g/ml}$ | 1.0 $\mu\text{g/ml}$ | 2.5 $\mu\text{g/ml}$ | 5.0 $\mu\text{g/ml}$ | 10.0 $\mu\text{g/ml}$ |
| 对照组 | 8 | 231.29 \pm 0.01 | 245.67 \pm 0.01 ^a | 215.90 \pm 0.01 ^{ab} | 187.21 \pm 0.01 ^{abc} | 167.48 \pm 0.01 ^{abcd} |
| TAO 组 | 8 | 249.60 \pm 0.01 ^c | 262.07 \pm 0.01 ^{ac} | 233.00 \pm 0.01 ^{abc} | 223.52 \pm 0.01 ^{abc} | 222.31 \pm 0.01 ^{abc} |

注: IL-6: $F_{\text{分组}} = 12.561, P = 0.000$; $F_{\text{质量浓度}} = 23.356, P = 0.001$. IL-17A: $F_{\text{分组}} = 12.037, P = 0.000$; $F_{\text{质量浓度}} = 19.206, P = 0.000$. IL-17RA: $F_{\text{分组}} = 16.216, P = 0.000$; $F_{\text{质量浓度}} = 4.627, P = 0.018$. 与各自组内 0 $\mu\text{g/ml}$ PHA 比较, ^a $P < 0.05$; 与各自组内 1.0 $\mu\text{g/ml}$ PHA 比较, ^b $P < 0.05$; 与各自组内 2.5 $\mu\text{g/ml}$ PHA 比较, ^c $P < 0.05$; 与各自组内 5.0 $\mu\text{g/ml}$ PHA 比较, ^d $P < 0.05$; 与同质量浓度 PHA 的对照组比较, ^e $P < 0.05$ (两因素方差分析, SNK- q 检验) PHA: 植物凝集素; IL: 白细胞介素; TAO: 甲状腺相关眼病

3 讨论

Yang 等^[15] 和 Iwakura 等^[16-17] 的研究结果表明, IL-17A 与 IL-17RA 结合并募集 IL-17RC 形成 IL-17RA/IL-17RC 异源二聚体, 核因子 κB (nuclear factor- κB , NF- κB) 激活剂 1 通过与 IL-17RA/IL-17RC 中的 SEF/IL-17 受体结合域 (SEF/IL17 receptor, SEFIR) 结合进行信号传导, 募集更多的泛素连接酶 6 和蛋白激酶 TAK1, 从而激活 NF- κB 通路以及活化丝裂原活化蛋白激酶-激活子蛋白-1 通路 (mitogen-activated protein kinase-activator protein-1, MAPK-AP-1)。而 NF- κB 和 MAPK-AP-1 的激活则上调靶细胞 (成纤维细胞、淋巴细胞、内皮细胞、上皮细胞等) 中一系列编码前炎性因子, 如 IL-1、IL-6 和粒细胞-巨噬细胞刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) 以及趋化因子/抗炎性因子 (抗菌肽、基质金属蛋白酶) 基因的表达, 从而引发一系列病理反应和防御反应。

以往关于 TAO 的相关研究多基于单独培养的 OFs, 不能反映体内多种因素影响下的病理过程, 因此本研究建立体外细胞复合培养模型——PBMCs 和 OFs 共培养体系, 并用不同质量浓度的 PHA 刺激共培养体系。虽然 TAO 组与对照组 PBMCs 形态无明显差别, 但是 TAO 组 PBMCs 中 T 淋巴细胞分泌 IL-17A 和 IL-6 增多, 同时细胞膜中 IL-17RA 表达也增多。研究发现, 活化的 OFs 分泌糖胺聚糖 (glycosaminoglycan, GAG) 和多种细胞因子, 如 IL-6 等。GAG 可引起眼外肌水肿, 细胞因子则通过增加眼眶组织主要组织相容性复合体

(major histocompatibility complex, MHC)-II 类分子、细胞黏附分子、热休克蛋白、CD40 以及前列腺素的表达而调节自身免疫反应, 进而通过级联反应使眼眶局部炎症加剧, 表现出 TAO 的临床症状^[18]。本研究中将 PBMCs 与 OFs 建立共培养体系, 用 PHA 激活共培养体系中的 PBMCs, 更能真实地模拟 TAO 的发病过程。

研究证实, IL-6 是 CD4⁺ T 淋巴细胞向 Th17 分化的关键因子, 转化生长因子 β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)、TGF- β_3 、IL-21、IL-23 在促进 Th17 转化过程中也发挥协同作用^[15], 不同细胞因子间的相互作用可诱导具有致炎能力或者抗炎能力 Th17 亚群的产生^[19-20], IL-6 和 TGF- β_1 等细胞因子可协同诱导 T 淋巴细胞染色质的重建和 IL-17A/F 位点的基因表达, 最终分化为 Th17, 并分泌 IL-17、IL-21、IL-22 等促炎性细胞因子^[21-23]。IL-17 与 IL-17RA 结合可诱导 OFs 和 PBMCs 分泌大量 IL-6, 而 IL-6 可反馈促进 Th17 的分化和 IL-17A 的分泌, 不断放大细胞免疫反应和炎症反应, 从而引起相应的临床症状^[24]。本研究中发现, 在 PHA 质量浓度为 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 时, 共培养体系中的 IL-17A、IL-17RA 和 IL-6 水平均达峰值, 但当 PHA 质量浓度大于 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 时, 随着其质量浓度的增加, 共培养体系中 IL-17A、IL-17RA、IL-6 水平均下降, 这可能与高质量浓度的 PHA 诱导部分 T 淋巴细胞发生凋亡有关。

本研究中采用 PBMCs 和 OFs 共培养体系模拟体内环境对 TAO 的病理机制进行研究, 与以往单纯培养 OFs 的研究方法比较, 更好地验证了 IL-17A 在 TAO 发病和发展过程中的作用。然而, 本研究的方法也存在

一定的局限性,本研究中采用的是同种异体的 PBMCs 和 OFs 共培养体系,2 种细胞间有可能存在一定的排斥反应,虽已有研究证实当发生排斥反应时患者的血清 IL-17 水平上升^[25-26],但是基于在 MHC 不相容的情况下,TAO 组患者的血清 IL-17 水平仍高于对照组的事实,认为 TAO 中 IL-17A 水平的差异性升高与 TAO 的发生和发展有关。

综上所述,本研究成功地建立了模拟自然发病过程的 TAO 体外模型,可用于 TAO 发病机制和治疗策略的研究。本研究发现 TAO 组共培养体系中 IL-17A、IL-17RA、IL-6 质量浓度明显高于对照组,IL-17A 可能通过放大细胞免疫反应和炎症反应而参与 TAO 的发病过程。

参考文献

- [1] Jang JP, Cho WK, Baek IC, et al. Comprehensive analysis of cytokine gene polymorphisms defines the association of IL-12 gene with ophthalmopathy in Korean children with autoimmune thyroid disease[J]. Mol Cell Endocrinol, 2016, 426 : 43-49. DOI:10.1016/j.mce.2016.02.002.
- [2] Shen J, Li Z, Li W, et al. Th1, Th2, and Th17 cytokine involvement in thyroid associated ophthalmopathy [J/OL]. Dis Markers, 2015, 2015 : 609593 [2015-05-29]. http://www.hindawi.com/journals/dm/2015/609593/. DOI:10.1155/2015/609593.
- [3] Kolls JK, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation [J]. Immunity, 2004, 21 (4) : 467-476. DOI:10.1016/j.immuni.2004.08.018.
- [4] Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, et al. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages [J]. Annu Rev Immunol, 2007, 25 : 821-852. DOI:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141557.
- [5] Iwakura Y, Nakae S, Saijo S, et al. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens [J]. Immunol Rev, 2008, 226 : 57-79. DOI:10.1111/j.1600-065X.2008.00699.x.
- [6] Reynolds JM, Angkasekwinai P, Dong C. IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2010, 21 (6) : 413-423. DOI:10.1016/j.cytogfr.2010.10.002.
- [7] Gaffen SL. The role of interleukin-17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. Curr Rheumatol Rep, 2009, 11 (5) : 365-370.
- [8] Amadi-Obi A, Yu CR, Liu X, et al. TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1 [J]. Nat Med, 2007, 13 (6) : 711-718. DOI:10.1038/nm1585.
- [9] Feighery LM, Smith P, O'Mahony L, et al. Effects of *Lactobacillus salivarius* 433118 on intestinal inflammation, immunity status and *in vitro* colon function in two mouse models of inflammatory bowel disease [J]. Dig Dis Sci, 2008, 53 (9) : 2495-2506. DOI:10.1007/s10620-007-0157-y.
- [10] Chang SH, Dong C. Signaling of interleukin-17 family cytokines in immunity and inflammation [J]. Cell Signal, 2011, 23 (7) : 1069-1075. DOI:10.1016/j.cellsig.2010.11.022.
- [11] Kuestner RE, Taft DW, Haran A, et al. Identification of the IL-17 receptor related molecule IL-17RC as the receptor for IL-17F [J]. J Immunol, 2007, 179 (8) : 5462-5473.
- [12] Salvi M, Girasole G, Pedrazzoni M, et al. Increased serum concentrations of interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor in patients with Graves' disease [J]. J Clin Endocrinol Metab, 1996, 81 (8) : 2976-2979. DOI:10.1210/jcem.81.8.8768861.
- [13] 王建发, 张敏, 林玉才. 植物血凝素的研究应用 [J]. 北方牧业, 2008, 9 (8) : 28.
- [14] Bartley GB, Gorman CA. Diagnostic criteria for Graves' ophthalmopathy [J]. Am J Ophthalmol, 1995, 119 (6) : 792-795.
- [15] Yang J, Sundrud MS, Skepner J, et al. Targeting Th17 cells in autoimmune diseases [J]. Trends Pharmacol Sci, 2014, 35 (10) : 493-500. DOI:10.1016/j.tips.2014.07.006.
- [16] Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, et al. Functional specialization of interleukin-17 family members [J]. Immunity, 2011, 34 (2) : 149-162. DOI:10.1016/j.immuni.2011.02.012.
- [17] Iwakura Y, Nakae S, Saijo S, et al. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens [J]. Immunol Rev, 2008, 226 : 57-79. DOI:10.1111/j.1600-065X.2008.00699.x.
- [18] Feldon SE, Park DJ, O'Loughlin CW, et al. Autologous T-lymphocytes stimulate proliferation of orbital fibroblasts derived from patients with Graves' ophthalmopathy [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46 (11) : 3913-3921. DOI:10.1167/iovs.05-0605.
- [19] 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. DOI:10.1038/nature04753.
- [20] Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, et al. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells [J]. Immunity, 2006, 24 (2) : 179-189. DOI:10.1016/j.immuni.2006.01.001.
- [21] Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor RORgamma directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells [J]. Cell, 2006, 126 (6) : 1121-1133. DOI:10.1016/j.cell.2006.07.035.
- [22] Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, et al. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors RORalpha and RORgamma [J]. Immunity, 2008, 28 (1) : 29-39. DOI:10.1016/j.immuni.2007.11.016.
- [23] Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation [J]. Immunity, 2008, 28 (4) : 454-467. DOI:10.1016/j.immuni.2008.03.004.
- [24] Singh RP, Hasan S, Sharma S, et al. Th17 cells in inflammation and autoimmunity [J]. Autoimmun Rev, 2014, 13 (12) : 1174-1181. DOI:10.1016/j.autrev.2014.08.019.
- [25] Chen Y, Wood KJ. Interleukin-23 and Th17 cells in transplantation immunity: does 23 + 17 equal rejection? [J]. Transplantation, 2007, 84 (9) : 1071-1074. DOI:10.1097/01.tp.0000287126.12083.48.
- [26] Rao DA, Tracey KJ, Pober JS. IL-1alpha and IL-1 beta are endogenous mediators linking cell injury to the adaptive alloimmune response [J]. J Immunol, 2007, 179 (10) : 6536-6546.

(收稿日期:2016-01-09)

(本文编辑:尹卫靖 张宇)