

· 实验研究 ·

Anti-IL-12/IL-23 p40 抗体对实验性自身免疫性葡萄膜炎的抑制作用及其机制

崔雪雪 张智慧 吴凌子 栗勇涛 陈爽 陈努 张晓敏

天津医科大学眼科医院 天津医科大学眼视光学院 天津医科大学眼科研究所 国家眼耳鼻喉疾病临床医学研究中心天津市分中心 天津市视网膜功能与疾病重点实验室,天津 300384
通信作者:张晓敏,Email:xzhang08@tmu.edu.cn

【摘要】 目的 探讨 Anti-白细胞介素(IL)-12/IL-23 p40 抗体对实验性自身免疫性葡萄膜炎(EAU)的抑制作用及其机制。方法 选取 SPF 级健康无眼疾 6~8 周龄雌性 C57BL/6N 小鼠 66 只,其中 24 只采用光感受器维生素 A 类结合蛋白(IRBP)651-670 诱导小鼠 EAU 模型,分别在免疫前及免疫后第 3、12、18 天各取 6 只小鼠,流式细胞术检测各时间点小鼠脾脏、淋巴结和眼球中 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞比例。取 6 只小鼠制作 EAU 模型,免疫后 18 d 采用小动物成像仪进行眼底拍照并行光相干断层扫描(OCT)检查。检查完成后处死小鼠,摘取眼球,采用苏木精-伊红染色法检测小鼠视网膜炎症反应和组织结构形态学改变;取淋巴结行流式细胞术检测 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞比例,按照表达数量不同分为 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 细胞高表达组和 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 细胞低表达组,比较 2 个组小鼠视网膜损伤情况。取 36 只小鼠制作 EAU 模型,采用随机数字表法分成 Anti-IL-12/IL-23 p40 组和 IgG 组,每组 18 只,分别尾静脉注射 Anti-IL-12/IL-23 p40 和 IgG,每 3 天 1 次。免疫后第 12 天和第 18 天每组各取 6 只小鼠,分别取淋巴结和眼球组织,采用流式细胞仪检测 T 细胞亚群比例。免疫后第 24 天,每组各取 6 只小鼠,摘取眼球,采用苏木精-伊红染色法观察视网膜损伤情况;采用流式细胞仪检测 CD4⁺ T 细胞体外诱导分化情况;采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞诱导分化后 IL-17 和 IFN- γ 表达情况;采用实时荧光定量 PCR 法检测 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞诱导分化后 Th1 细胞转录因子 T-bet 和 Th17 细胞转录因子维甲酸相关核受体 γ t (ROR- γ t) 相对表达量。结果 免疫前和免疫后第 3、12、18 天,淋巴结、脾脏、眼球中 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞比例总体比较差异均有统计学意义($H=9.642, 16.531, 10.385$, 均 $P<0.05$),其中与免疫前相比,EAU 小鼠免疫后第 12 天淋巴结 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞比例明显升高;免疫后第 18 天脾脏、眼球中 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞比例明显升高,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 细胞高表达组小鼠视网膜严重水肿、视网膜脱离、重度炎性细胞浸润和广泛视网膜褶皱;IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 细胞低表达组小鼠视网膜轻度水肿、局灶性炎性细胞浸润、轻度视网膜褶皱。Anti-IL-12/IL-23 p40 组免疫后 18 d,眼球中 CD3 和 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞比例低于 IgG 组,差异均有统计学意义($t=15.304, 8.080$, 均 $P<0.05$);免疫后 12 d, Anti-IL-12/IL-23 p40 组淋巴结中 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞比例为 $(0.33\pm 0.18)\%$,明显低于 IgG 组的 $(4.83\pm 0.45)\%$,差异有统计学意义($t=15.974, P<0.001$)。与 IgG 组相比, Anti-IL-12/IL-23 p40 组 Th1、Th17、IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞百分比及 IL-17、IFN- γ 、T-bet、ROR- γ t 表达量明显降低,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。结论 Anti-IL-12/IL-23 p40 可通过抑制 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞发挥对 EAU 的治疗作用。

【关键词】 葡萄膜炎; 药物治疗; 白细胞介素 12 亚基 p40; 单克隆抗体; 光感受器间维生素 A 类结合蛋白; 小鼠

基金项目: 国家自然科学基金项目(81671642、82171042、81870651); 天津市科技支撑重点项目(20YFZCSY00990); 天津市自然科学基金重点项目(20JCZDJC00100); 天津市医学重点学科(专科)建设项目(TJYXZDXK-037A)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200820-00601

Therapeutic effect of anti-IL-12/IL-23 p40 on experimental autoimmune uveitis and its mechanism

Cui Xuexue, Zhang Zhihui, Wu Lingzi, Li Yongtao, Chen Shuang, Chen Nu, Zhang Xiaomin

Tianjin Key Laboratory of Retinal Functions and Diseases, Tianjin Branch of National Clinical Research Center for Ocular Disease, Eye Institute and School of Optometry, Tianjin Medical University Eye Hospital, Tianjin 300384, China
Corresponding author: Zhang Xiaomin, Email: xzhang08@tmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the therapeutic effect of anti-interleukin (IL)-12/IL-23 p40 antibody on



experimental autoimmune uveitis (EAU) and its mechanism. **Methods** Sixty-six SPF female C57BL/6N mice aged 6 - 8 weeks were selected. EAU model was established in 24 mice through immunization with the interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) 651-670. The 24 mice were sacrificed before immunization, and on the 3rd, 12th, and 18th day after immunization, with 6 at each time point. Flow cytometry was used to detect the proportion of IL-17A⁺ interferon- γ (IFN- γ)⁺ CD4⁺ T cells in the spleen, lymph nodes and eyeballs. Another 6 mice were selected to establish EAU model, and fundus images of the mice were taken with a small animal imaging instrument and optical coherence tomography (OCT) 18 days after immunization. The 6 mice were sacrificed after OCT examination and the eyeballs were collected. Hematoxylin-eosin staining was used to observe the retinal inflammation and morphological changes in tissue structure. Flow cytometry was employed to detect the proportion of IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T cells in lymph nodes. The 6 mice were divided into IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ highly expressed group and IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ lowly expressed group according to flow cytometry results, and the retinal injury was compared between the two groups. EAU model was established in another 36 mice, which were divided into anti-IL-12/IL-23 p40 group and IgG group by random number table method, with 18 mice in each group. Anti-IL-12/IL-23 p40 or IgG was injected by tail vein at a 3-day interval according to grouping. On the 12th and 18th day after immunization, 6 mice were selected from each group to collect lymph nodes and eyeballs, and the proportion of T cell subsets was detected by flow cytometry. Eyeballs of 6 mice in each group were extracted on the 24th day after immunization and retinal damage was observed by hematoxylin-eosin staining. The induced differentiation of CD4⁺ T cells *in vitro* was assayed by flow cytometry. The expressions of IL-17 and IFN- γ were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) after induced differentiation of IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T cells. The relative expression levels of Th1 transcription factor T-bet and Th17 transcription factor retinoid acid-related orphan nuclear receptor γ t (ROR- γ t) after induced differentiation of IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T cells were detected by real-time quantitative PCR. The use and care of animals followed the ARVO statement and this study protocol was approved by an Ethics Committee of Experimental Animals of Tianjin Medical University Eye Hospital (No. TJYY2019111019). **Results** There were significant differences in the proportion of IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T cells in lymph nodes, spleen and eyeballs between wild-type mice and EAU mice at the 3rd, 12th and 18th day after immunization ($H=9.642, 16.531, 10.385$; all at $P<0.05$). Compared with before immunization, the proportion of IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T cells was significantly increased in lymph nodes of EAU mice on the 12th day following immunization and was significantly increased in spleen and lymph nodes on day 18 after immunization (all at $P<0.05$). Severe retinal exudation, retinal detachment, severe inflammatory cell infiltration and extensive retinal folds were detected in IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ highly expressed mice. Mild retinal edema, focal inflammatory cell infiltration and mild retinal folds were found in IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ lowly expressed mice. The proportion of CD3 and IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T cells in the eyeballs of anti-IL-12/IL-23 p40 group was lower than that in IgG group at the 18th day after immunization, and the differences were statistically significant ($t=15.304, 8.080$; both at $P<0.05$). On day 12 after immunization, the percentage of IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T cells in anti-IL-12/IL-23 p40 group was $(0.33\pm 0.18)\%$, which was significantly lower than $(4.83\pm 0.45)\%$ in IgG group ($t=15.974, P<0.001$). Compared with IgG group, the percentage of Th1, Th17, IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T cells and the expression levels of IL-17, IFN- γ , T-bet, ROR- γ t in anti-IL-12/IL-23 p40 group were significantly decreased, with statistical significances (all at $P<0.05$). **Conclusions** Anti-IL-12/IL-23 p40 has a therapeutic effect on EAU by inhibiting IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T cells.

[**Key words**] Uveitis; Drug therapy; Interleukin-12 subunit p40; Antibodies, monoclonal; Interphotoreceptor retinoid-binding protein; Mice

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81671642, 82171042, 81870651); Key Project of Tianjin Science and Technology Support (20YFZCSY00990); Key Project of Natural Science Foundation of Tianjin (20JJCZDJ00100); Tianjin Medical Key Discipline (Specialty) Construction Project (TJYXZDXK-037A)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200820-00601

自身免疫性葡萄膜炎是一类严重威胁视力且发病机制尚不完全清楚的炎症性眼病。由 CD4⁺ T 细胞功能紊乱引起的眼内炎症反应被认为在葡萄膜炎的发生和发展过程中起到关键作用。人和实验小鼠组织特异的炎症部位均有白细胞介素 (interleukin, IL)-17A⁺

γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ)⁺ CD4⁺ T 细胞存在, 这种细胞具有低细胞毒性、高致病性以及调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Treg) 低敏感性等特征^[1], 已成为治疗多种自身免疫性疾病, 如炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD)、多发性硬化、类风湿关节炎、复发

性葡萄膜炎的新靶点^[2-5]。白细胞介素(interleukin, IL)-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞的形成是多种细胞因子作用的复杂过程, IL-12 和 IL-23 在其中起到重要作用^[6-7]。IL-12 (p35 和 p40 的异源二聚体) 和 IL-23 (p19 和 p40 的异源二聚体) 具有共同亚基 p40, 针对 p40 亚基的单克隆抗体可以抑制 IL-12R 和 IL-23R 介导的信号转导^[8-9]。Anti-IL-12/IL-23 p40 单克隆抗体临床上已用于治疗慢性炎症性疾病, 如银屑病、银屑病关节炎和克罗恩病, 并显示出显著疗效^[10-13], 但其在自身免疫性葡萄膜炎患者及实验性自身免疫性葡萄膜炎(experimental autoimmune uveitis, EAU) 动物模型中的作用研究较少。本研究拟探讨 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞在 EAU 发病中的动态变化, 以及 Anti-IL-12/IL-23 p40 抗体对 EAU 的治疗作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级健康无眼疾 6~8 周龄 C57BL/6N 雌鼠 66 只, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司[合格证号: SCXK(京)2016-0006], 饲养于天津医科大学眼科医院动物房, 室温(23±2)℃, 相对湿度为 50%~60%, 光照强度不超过 300 lx, 12 h 昼夜规律循环。实验小鼠的喂养及使用遵循美国视觉与眼科学研究协会制定的 ARVO 声明, 本研究方案经天津医科大学眼科医院伦理委员会批准(批文号: TJYY2019111019)。

1.1.2 主要试剂及仪器 光感受器维生素 A 类结合蛋白(interphotoreceptor retinoid-binding protein, IRBP) 651-670(上海生物工程有限公司); 完全弗氏佐剂(美国 Sigma 公司); 百日咳毒素(美国 List Labs 公司); CD4 细胞分离试剂盒(美国英杰生命技术有限公司); EZ-press RNA 纯化试剂盒(美国 EZBioscience 公司); FastStart Universal SYBR Green Master(瑞士 Roche 公司); 抗鼠 IL-12/IL-23 p40 单克隆抗体、逆转录试剂盒(16712381, 美国 Thermo Fisher 公司); 大鼠 IgG(上海赛默飞世尔科技有限公司); 布雷菲德菌素 A、离子霉素(美国 Med ChemExpress 公司); 佛波酯(英国 Abcam 公司); 抗鼠 APC-CD4 单克隆抗体(100412)、抗鼠 PE-IL-17A 单克隆抗体(506903)、抗鼠 FITC-IFN- γ 单克隆抗体(505806)、抗鼠 Brilliant Violet 421™-CD3 单克隆抗体(100228)(美国 Biolegend 公司)。小动物成像仪(美国 Pleasanton 公司); 流式细胞仪(美国 BD 公司); PCR 仪(美国 Life Technologies 公司)。

1.2 方法

1.2.1 EAU 模型的建立 采用文献[14]的方法在小鼠的足垫部、尾根部、躯干共 6 个点皮下注射人 IRBP 651-670(250 μ g/只)和完全弗氏佐剂乳化液(200 μ l/只)。免疫前及免疫后 24 h 分别腹腔内注射百日咳毒素 0.5 μ g 作为附加免疫佐剂。

1.2.2 流式细胞术检测 EAU 病程中各时间点 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞比例 取 24 只小鼠, 免疫前及免疫后第 3、12、18 天腹腔内注射过量质量分数 4% 水合氯醛各处死小鼠 6 只。将脾脏、淋巴结研磨制备成单细胞悬浮液, 脾脏用红细胞裂解液作用 5 min, 用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)清洗 2 次。眼球需先剔除晶状体, 剪碎, 研磨, 加入 1 mg/ml 胶原酶 D, 在摇床上 37℃ 孵育 1 h, 得到的细胞用 PBS 清洗 2 次。将细胞用 1640 完全培养基重悬, 以 1×10^6 个/ml 细胞密度接种于 96 孔板中。用含有佛波酯、离子霉素、布雷菲德菌素 A 的细胞刺激液 37℃ 孵育 5 h。收集细胞于流式管中, 加入抗鼠 APC-CD4 单克隆抗体 2 μ l, 4℃ 避光孵育 30 min。PBS 清洗 3 次, 加入 2 ml 细胞破膜液, 添加抗鼠 PE-IL-17A 单克隆抗体和抗鼠 FITC-IFN- γ 单克隆抗体各 2 μ l 的混合液, 4℃ 避光孵育 30 min, PBS 清洗 3 次。采用流式细胞仪检测样本, 根据细胞体积和颗粒度, 通过前向散射光和侧向散射光设门确定单核细胞, 依据 CD4、IL-17A、IFN- γ 圈出 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞。

1.2.3 OCT 仪及小动物成像仪检测 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 细胞高表达组和 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 细胞低表达组视网膜表现 取免疫后 18 d 小鼠 6 只进行全身麻醉。采用频域光相干断层扫描(optical coherence tomography, OCT)以视盘为中心对小鼠眼底进行扫描, 观察是否出现视网膜水肿、炎症细胞渗漏、视网膜脱离。采用小动物成像仪采集常规可见光眼底相, 观察其斑块样、融合和线性脉络膜视网膜炎症浸润情况, 以及视网膜下是否有玻璃体积血、视网膜脱离等。观察后处死小鼠, 取小鼠淋巴结组织, 采用流式细胞术检测淋巴结中 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞数量, 从高到低排序, 取前 3 位为 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 细胞高表达组, 后 3 位为 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 细胞低表达组, 比较 2 个组视网膜炎症程度。

1.2.4 苏木精-伊红染色法观察 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 细胞高表达组和 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 细胞低表达组视网膜组织形态改变 取 1.2.3 部分小鼠, 完整取出小鼠眼球, 于体积分数 10% 甲醛/PBS 中固定 24 h, 石蜡包埋, 于视神经层面行 5 μ m 厚组织切片, 经苏木精-伊红染色, 观察视网膜各层或玻璃体腔炎症细胞浸润、视网膜褶

皱及脱离情况,以及是否出现视网膜下新生血管等。

1.2.5 EAU 小鼠 Anti-IL-12/IL-23 p40 抗体的尾静脉注射 采用随机数表法将 36 只小鼠随机分成 Anti-IL-12/IL-23 p40 组和 IgG 组,每组 18 只。免疫后第 0 天起, Anti-IL-12/IL-23 p40 组小鼠每 3 天尾静脉注射 1 次 Anti-IL-12/IL-23 p40 抗体, IgG 组每 3 天尾静脉注射 1 次大鼠 IgG, 均 500 μg /只。每个时间点各组任取 6 只小鼠,采用流式细胞术检测免疫后 12 d 淋巴结中 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 细胞表达情况,以及免疫后 18 d 眼球中 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 细胞、CD3 细胞表达情况。免疫后第 24 天,取剩余小鼠眼球制作苏木精-伊红染色切片观察视网膜损伤情况。

1.2.6 EAU 模型小鼠眼部视网膜表现评分 Anti-IL-12/IL-23 p40 组和 IgG 组小鼠从免疫后第 10 天起每隔 1 d 扩瞳后使用直接检眼镜进行眼底检查,根据 Caspi 分级标准对视网膜表现进行评分:正常眼底为 0 分;视网膜中央出现局灶性损伤 < 3 处为 0.5 分;视网膜周边和中央出现 < 5 处但 ≥ 1 处局灶性损伤为 1 分;弥漫性视网膜脉络膜损伤,有 > 5 处局灶性损伤,且 < 5 处线性损伤为 2 分;大的融合性视网膜脉络膜损伤,视网膜水肿,且有大量局灶性损伤和线性损伤为 3 分;出现大范围视网膜脱离为 4 分^[15]。

1.2.7 流式细胞术检测 CD4⁺ T 细胞的体外诱导分化情况 采用 CD4 细胞分离试剂盒行磁珠分选,将免疫前小鼠脾脏、腹股沟淋巴结经研磨后置于红细胞裂解液中作用 5 min,每 1×10^7 细胞中加入 20 μl 抗体混合物,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min, 隔离缓冲液冲洗 1 次,添加 200 μl 提前洗好的阴选磁珠,在摇床上轻摇,室温孵育 15 min,置于磁铁上 2 min,收集的悬浮液即为 CD4⁺ T 细胞。实验前一晚在 96 孔板上铺平板结合型抗鼠 CD3 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。取分离的 CD4⁺ T 细胞以每孔 2×10^5 细胞种在 96 孔板中,用可溶性 CD28 (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 激活细胞。将细胞分为 Anti-IL-2/IL-23 p40 组和 IgG 组,分别加入 Anti-IL-12/IL-23 p40 抗体 (10 ng/ml) 和 IgG (10 ng/ml),并用细胞因子诱导细胞分化。Th1 分化条件为 IL-12 (60 ng/ml) 和 anti-IL-4 (300 ng/ml); Th17 细胞分化条件为转化生长因子 (transforming growth factor, TGF)- β (5 ng/ml)、IL-6 (10 ng/ml) 和 IL-23 (10 ng/ml); IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 细胞分化条件为 IL-12 (1 ng/ml)、TGF- β (5 ng/ml)、IL-23 (10 ng/ml) 和 IL-6 (10 ng/ml)。取细胞悬液 200 μl /孔,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 孵育箱中培养 4 d,收集上清及细胞,采用流式细胞术检测 2 个组 Th1 细胞、Th17 细胞和 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ T 细胞诱导分化情况,将剩余

的上清液及细胞储存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.2.8 酶联免疫吸附测定法定量检测 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞诱导分化后 Anti-IL-2/IL-23 p40 组和 IgG 组 IL-17 和 IFN- γ 表达情况 取 1.2.7 中 Anti-IL-2/IL-23 p40 组和 IgG 组细胞上清,按照鼠 IL-17 和鼠 IFN- γ 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒说明书进行检测,将捕获抗体铺在 96 孔板上,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,用试剂稀释剂封闭 1 h。加细胞上清液和小鼠重组 IFN- γ 标准品,室温孵育 2 h 后加入生物素化的山羊抗小鼠 IFN- γ 抗体,室温孵育 2 h 后加入链霉亲和素室温避光孵育 20 min,加入显色剂在室温下孵育 20 min。加入终止液,于酶标仪上定量检测波长 540 nm 或 570 nm 处各组 IL-17 和 IFN- γ 表达水平。

1.2.9 实时荧光定量 PCR 法检测诱导分化后 Th1 细胞和 Th17 细胞转录因子的相对表达量 取 1.2.7 中 Anti-IL-2/IL-23 p40 组和 IgG 组细胞,用 EZ-press RNA 纯化试剂盒提取细胞 mRNA。采用逆转录试剂盒将 mRNA 逆转录成 cDNA,进行 PCR 扩增。引物均购自天津金唯智生物科技有限公司。T-bet 正向引物序列为 5'-TCACTAAGCAAGGACGGCGAATGTT-3',反向引物序列为 5'-GGACATATAAGCGGTTCCCTGGCAT-3'; 维甲酸相关孤核受体 γt (retinoid-related orphan nuclear receptor γt , ROR- γt) 正向引物序列为 5'-ACCTCTTTTCACGGGAGGA-3',反向引物序列为 5'-TCCCACATCTCCCACATTG-3'。GAPDH 正向引物序列为 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3',反向引物序列为 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'。PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,共 40 个循环。以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算各组 Th1 细胞转录因子 T-bet 和 Th17 细胞转录因子 ROR- γt 表达情况。每组设置 3 个样本,每个样本设 3 个复孔。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 23.0 统计学软件进行统计分析。计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实符合正态分布者以 $\bar{x} \pm s$ 表示,不符合正态分布者以 $M(Q_1, Q_3)$ 表示。各组织中不同时间点 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞百分比的比较采用 Kruskal-Wallis 检验; Anti-IL-12/IL-23 p40 组与 IgG 组免疫后不同时间点视网膜表现评分总体比较采用重复测量两因素方差分析,两两比较采用 SNK- q 检验; Anti-IL-12/IL-23 p40 组与 IgG 组 Th1、Th17 和 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞分化比例、IL-17A 和 IFN- γ 及其转录因子表达量的比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EAU 小鼠免疫前后不同时间点脾脏、淋巴结、眼球组织中 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞比例比较

流式细胞术检测结果显示,免疫前和免疫后第 3、12、18 天淋巴结、脾脏、眼球中 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞比例总体比较差异均有统计学意义 ($H=9.642、16.531、10.385$,均 $P<0.05$),其中与免疫前相比,免疫后第 12 天,淋巴结中 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞比例明显增多,免疫后第 18 天,脾脏、眼球中 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞比例明显增多,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)(图 1,表 1)。

2.2 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 高表达组与 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 低表达组小鼠视网膜炎症程度比较

眼底照相结果显示,IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 高表达组眼底可见大片状融合性视网膜脉络膜损伤,视网膜水肿,且有大量局灶性损伤和线性损伤;IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 低表达组眼底呈现弥漫性视网膜脉络膜损伤(图 2)。OCT 结果显示,IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 高表达组视网膜水肿、大量炎症细胞渗漏和视网膜脱离;IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 低表达组视网膜轻度水肿,少量炎症细胞渗漏(图 3)。苏木精-伊红染色结果显示 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 高表达组视网膜各层及玻璃体腔大量炎性细胞浸润、视网膜高度褶皱及大面积视网膜脱离,视网膜各层分界不清;IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 低表达组视网膜各层及玻璃体腔有少量炎性细胞浸润,视网膜中度褶皱,视网膜各层分界清晰(图 4)。

2.3 Anti-IL-12/IL-23 p40 组与 IgG 组视网膜表现评分及炎症情况比较

IgG 组和 Anti-IL-12/IL-23 p40 组不同时间点视网膜表现评分总体比较差异均有统计学意义 ($F_{组别} =$

15.045, $P=0.03$; $F_{时间} = 99.764, P<0.01$),其中免疫后第 12、14、16、18、20、22、24 天视网膜表现评分均低于 IgG 组,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)(表 2)。

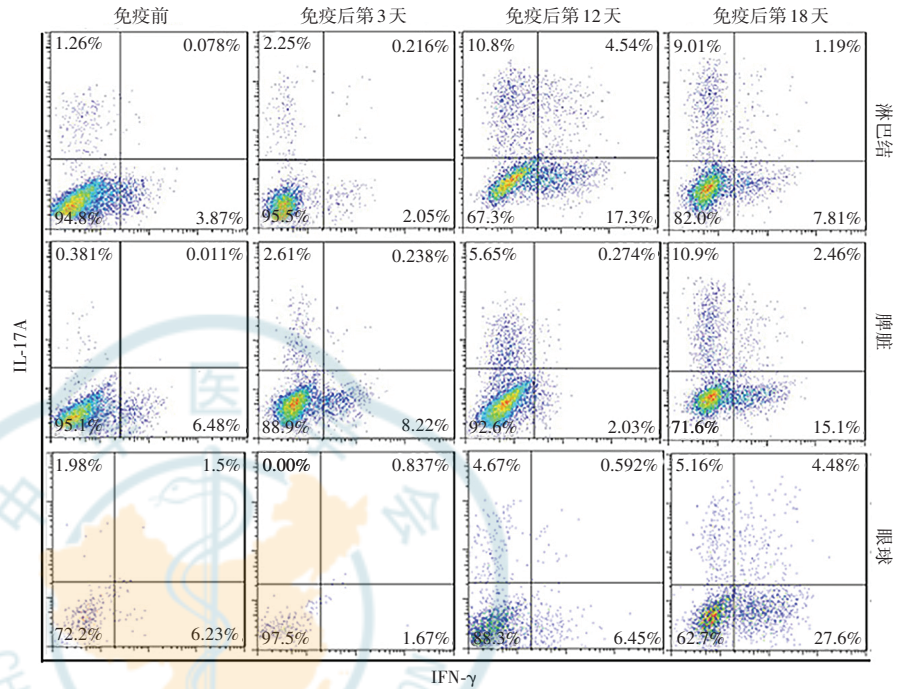


图 1 流式细胞术检测 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞在免疫前及免疫后不同时间点 EAU 小鼠不同组织中表达比例 与免疫前相比,免疫后第 12 天,淋巴结中 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞比例明显增多,免疫后第 18 天,脾脏、眼球中 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞比例明显增多 IL: 白细胞介素;IFN- γ : γ 干扰素

Figure 1 Percentage of IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T cells in EAU mice at different time points before and after immunization detected by flow cytometry Compared with pre-immunization, the proportion of IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T cells was significantly increased in lymph nodes on day 12 after immunization, and was significantly increased in spleen and eye ball on day 18 after immunization IL: interleukin; IFN- γ : interferon- γ

表 1 小鼠免疫前后不同时间点各组织中 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞比例比较 [$M(Q_1, Q_3)$, %]

Table 1 Comparison of the proportion of IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T cells in different mice tissues at different time points ($M[Q_1, Q_3]$, %)

时间	样本量	不同组织中 IL-17A ⁺ IFN- γ ⁺ CD4 ⁺ T 细胞比例		
		淋巴结	脾脏	眼球
免疫前	6	0.08(0.01, 0.11)	0.01(0.01, 0.02)	1.63(1.50, 1.70)
免疫后第 3 天	6	0.18(0.05, 0.22)	0.13(0.09, 0.24)	1.29(0.84, 4.03)
免疫后第 12 天	6	4.53(4.52, 4.55) ^a	0.45(0.27, 0.76)	0.80(0.59, 4.93)
免疫后第 18 天	6	1.19(0.87, 1.27)	1.52(1.28, 2.46) ^a	3.15(1.98, 4.48) ^a
H 值		9.462	16.531	10.385
P 值		0.024	0.001	0.016

注:与免疫前比较, ^a $P<0.05$ (Kruskal-Wallis 检验) IL: 白细胞介素; IFN- γ : γ 干扰素
 Note: Compared with pre-immunization, ^a $P<0.05$ (Kruskal-Wallis test) IL: interleukin; IFN- γ : interferon- γ

苏木精-伊红染色结果显示, IgG 组视网膜出现重度炎性细胞浸润及广泛视网膜褶皱伴脱离。Anti-IL-12/IL-23 p40 组视网膜各层出现中度炎症细胞浸润及中度视网膜褶皱(图 5)。

流式细胞术检测结果显示, Anti-IL-12/IL-23 p40 组免疫后第 18 d 眼球中 CD3⁺ 细胞和 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞比例分别为 (13.58 \pm 4.70)% 和 (1.52 \pm 0.29)%, 分别低于 IgG 组的 (90.11 \pm 8.07)% 和 (4.95 \pm 0.68)%, 差异均有统计学意义 ($t = 15.304, 8.080$, 均 $P < 0.05$)。免疫后第 12 d Anti-IL-12/IL-23 p40 组淋巴结中 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞比例为 (0.33 \pm 0.18)%, 低于 IgG 组的 (4.83 \pm 0.45)%, 差异有统计学意义 ($t = 15.974, P < 0.001$) (图 6)。

2.4 2 个组 Th1、Th17 和 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞分化比例、IL-17A 和 IFN- γ 及其转录因子表达量比较

流式细胞术检测结果显示, 与 IgG 组相比, Anti-IL-12/IL-23 p40 组 Th1、Th17、IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞百分比明显降低, 差异均有统计学意义 ($t = 22.876, 0.634, 7.025$, 均 $P < 0.01$) (表 3)。ELISA 检测结果显示, 与 IgG 组相比, Anti-IL-12/IL-23 p40 组 IL-17 和 IFN- γ 质量浓度明显降低, 差异均有统计学意义 ($t = 9.580, 46.412$, 均 $P < 0.001$) (表 4)。实时荧光定量 PCR 结果显示, Anti-IL-12/IL-23 p40 组 T-bet、ROR- γ t mRNA 相对表达量明显低于 IgG 组, 差异均有统计学意义 ($t = 6.097, 7.526$, 均 $P < 0.05$) (表 5)。

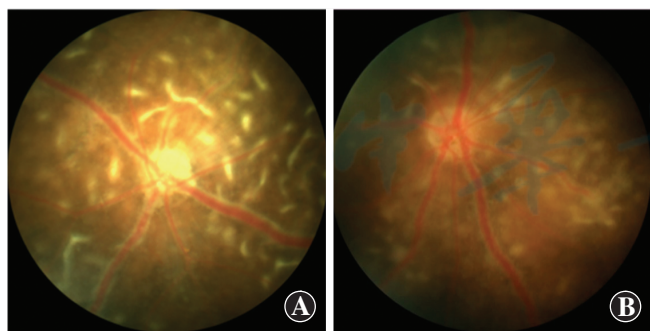


图 2 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 高表达组与 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 低表达组小鼠眼底照相 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 高表达组小鼠眼底可见大片状融合性视网膜脉络膜损伤, 表现为严重的视网膜水肿, 同时可见多个局灶性视网膜脉络膜损伤和线性损伤; IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 低表达组眼底呈现弥漫性视网膜脉络膜损伤 A: IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 高表达组 B: IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 低表达组

Figure 2 Fundus images of mice in the IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ highly expressed group and IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ lowly expressed group Large confluent retinal choroidal injury, retinal edema, and many focal and linear injuries were found in mice with high IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ expression. Diffuse retinal choroidal injury was found in mice with low IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ expression A: IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ highly expressed group B: IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ lowly expressed group

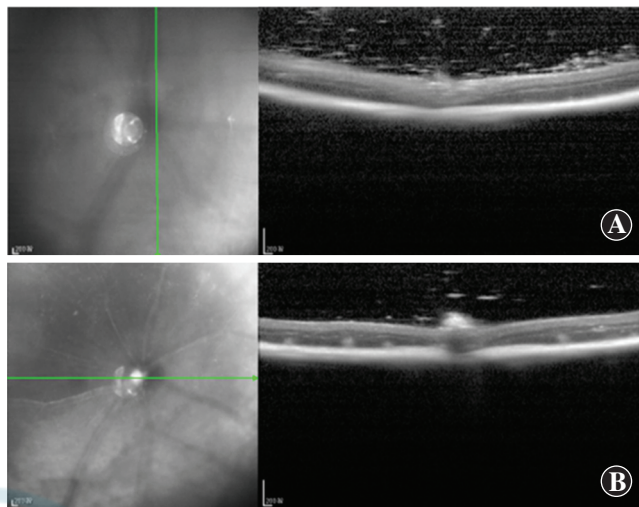


图 3 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 高表达组与 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 低表达组小鼠眼底 OCT 图像 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 高表达组小鼠视网膜水肿增厚; 可见大量炎性细胞渗漏和视网膜脱离; 与 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 高表达组小鼠比较, IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 低表达组视网膜轻度水肿, 少量炎性细胞渗漏 A: IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 高表达组 B: IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 低表达组

Figure 3 OCT images of mice fundus in the IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ highly expressed group and IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ lowly expressed group Retinal edema, a large number of inflammatory cells leakage and retinal detachment were found in mice with high IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ expression. Mild retinal edema and a small amount of inflammatory cells leakage were found in mice with low IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ expression A: IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ highly expressed group B: IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ lowly expressed group

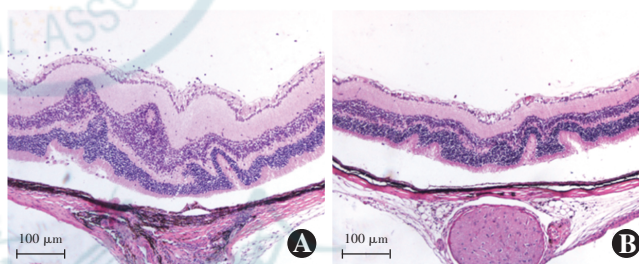


图 4 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 高表达组与 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 低表达组小鼠视网膜组织病理图 (HE $\times 100$, 标尺 = 100 μ m) IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 高表达组视网膜各层及玻璃体腔大量炎性细胞浸润、视网膜高度褶皱及大面积视网膜脱离, 视网膜各层分界不清; IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 低表达组视网膜各层及玻璃体腔有少量炎性细胞浸润, 视网膜中度褶皱, 视网膜各层分界清晰 A: IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 高表达组 B: IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ 低表达组

Figure 4 Retinal histopathology of mice in the IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ highly expressed group and IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ lowly expressed group (HE $\times 100$, bar = 100 μ m) A large number of inflammatory cells infiltrating into each layer of the retina and vitreous cavity, severe retinal folds, a large area of retinal detachment and unclear boundaries between retinal layers were found in mice with high IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ expression. A few inflammatory cells infiltrating each layer of the retina and vitreous cavity, moderate retinal folds and clear boundaries between retinal layers were found in mice with low IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ expression A: IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ highly expressed group B: IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ lowly expressed group

表 2 免疫后不同时间点 2 个组视网膜表现评分比较 ($\bar{x}\pm s$, 分)
Table 2 Comparison of retinal scores between two groups at different time points after immunization ($\bar{x}\pm s$, score)

组别	样本量	免疫后不同时间点视网膜表现评分							
		第 10 天	第 12 天	第 14 天	第 16 天	第 18 天	第 20 天	第 22 天	第 24 天
IgG 组	6	0.08±0.20	0.83±0.41	1.67±0.52	2.33±0.41	2.83±0.52	2.67±0.41	2.08±0.38	1.75±0.27
Anti-IL-12/IL-23 p40 组	6	0.00±0.00	0.17±0.26 ^a	0.83±0.41 ^a	1.67±0.41 ^a	2.08±0.38 ^a	2.00±0.45 ^a	1.50±0.45 ^a	1.17±0.41 ^a

注: $F_{\text{组别}} = 15.045, P = 0.03; F_{\text{时间}} = 99.764, P < 0.01$. 与各自时间点 IgG 组比较, ^a $P < 0.01$ (重复测量两因素方差分析, SNK-*q* 检验) IL: 白细胞介素
Note: $F_{\text{group}} = 15.045, P = 0.03; F_{\text{time}} = 99.764, P < 0.01$. Compared with IgG group at corresponding time points, ^a $P < 0.01$ (Two-way repeated measures ANOVA, SNK-*q* test) IL: interleukin

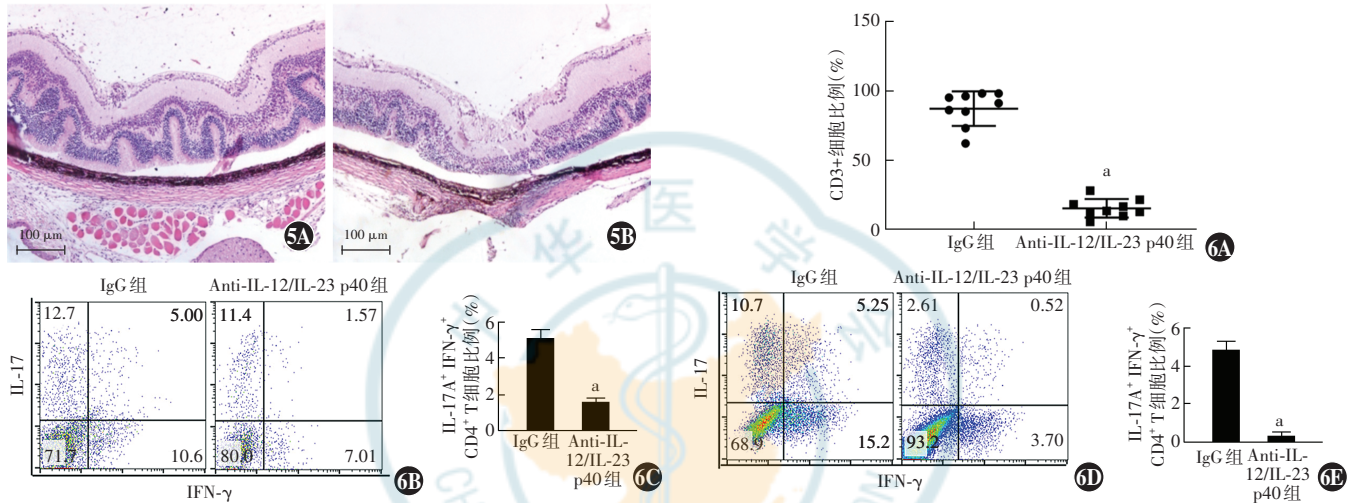


图 5 IgG 组和 Anti-IL-12/IL-23 p40 组视网膜组织病理改变 (HE ×100, 标尺 = 100 μm) A: IgG 组视网膜各层分界不清, 出现重度炎症细胞浸润, 广泛的视网膜褶皱伴脱离 B: Anti-IL-12/IL-23 p40 组视网膜各层出现中度炎症细胞浸润, 中度视网膜褶皱
图 6 免疫后不同时间点 2 个组 IL-17A⁺ IFN-γ⁺ CD4⁺ T 细胞比例比较 A: 各组免疫后第 18 天眼球 CD3 细胞表达情况 与 IgG 组相比, ^a $P < 0.01$ (独立样本 *t* 检验, $n = 9$) B, C: 各组免疫后第 18 天眼球 IL-17A⁺ IFN-γ⁺ CD4⁺ T 细胞比例流式细胞分析 (B) 及量化比较 (C) 与 IgG 组相比, ^a $P < 0.05$ (独立样本 *t* 检验, $n = 6$) D, E: 各组免疫后第 12 天淋巴结 IL-17A⁺ IFN-γ⁺ CD4⁺ T 细胞比例流式细胞分析 (D) 及量化比较 (E) 与 IgG 组相比, ^a $P < 0.05$ (独立样本 *t* 检验, $n = 6$) IL: 白细胞介素; IFN-γ: γ 干扰素

Figure 5 Retinal histopathology of IgG group and anti-IL-12/IL-23 p40 group (HE ×100, bar = 100 μm) A: In IgG group, the boundaries between retinal layers were unclear, and severe inflammatory cell infiltration, extensive retinal folds and detachment were found B: In anti-IL-12/IL-23 p40 group, moderate inflammatory cell infiltration and moderate retinal folds were detected in each retinal layer
Figure 6 Comparison of the proportion of IL-17A⁺ IFN-γ⁺ CD4⁺ T cells between IgG group and anti-IL-12/IL-23 p40 group at different time points A: Expression of CD3 cells in eyeballs on day 18 after immunization Compared with IgG group, ^a $P < 0.01$ (Independent samples *t* test, $n = 9$) B, C: Flow cytometry (B) and quantitative comparison (C) of the percentage of IL-17A⁺ IFN-γ⁺ CD4⁺ T cells in eyeballs on day 18 after immunization Compared with IgG group, ^a $P < 0.05$ (Independent samples *t* test, $n = 6$) D, E: Flow cytometry (D) and quantitative comparison (E) of the proportion of IL-17A⁺ IFN-γ⁺ CD4⁺ T cells in lymph nodes on day 12 after immunization Compared with IgG group, ^a $P < 0.05$ (Independent samples *t* test, $n = 6$) IL: interleukin; IFN-γ: interferon-γ

表 3 2 个组 Th1、Th17 和 IL-17A⁺ IFN-γ⁺ CD4⁺ T 细胞分化比例比较 ($\bar{x}\pm s$, %)

Table 3 Comparison of the differentiation percentage of Th1, Th17 and IL-17A⁺ IFN-γ⁺ CD4⁺ T cells between two groups ($\bar{x}\pm s$, %)

组别	样本量	Th1 细胞比例	Th17 细胞比例	IL-17A ⁺ IFN-γ ⁺ CD4 ⁺ T 细胞比例
IgG 组	3	29.80±1.15	21.27±0.91	5.43±0.89
Anti-IL-12/IL-23 p40 组	3	13.20±0.49	8.71±0.66	1.67±0.27
<i>t</i> 值		22.876	0.634	7.025
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	0.002

注: (独立样本 *t* 检验) IL: 白细胞介素; IFN-γ: γ 干扰素
Note: (Independent samples *t* test) IL: interleukin; IFN-γ: interferon-γ

表 4 2 个组 IL-17A 和 IFN-γ 质量浓度比较 ($\bar{x}\pm s$, pg/ml)

Table 4 Comparison of IL-17A and IFN-γ concentration between two groups ($\bar{x}\pm s$, pg/ml)

组别	样本量	IL-17A	IFN-γ
IgG 组	3	47.28±4.77	794.67±8.08
Anti-IL-12/IL-23 p40 组	3	18.08±3.80	399.33±12.34
<i>t</i> 值		9.580	46.412
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

注: (独立样本 *t* 检验) IL: 白细胞介素; IFN-γ: γ 干扰素
Note: (Independent samples *t* test) IL: interleukin; IFN-γ: interferon-γ

表 5 2 个组 T-bet 和 ROR- γ t mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 5 Comparison of relative expression of T-bet and ROR- γ t mRNA between two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	T-bet	ROR- γ t
IgG 组	3	0.005 4 \pm 0.001 9	0.010 1 \pm 0.001 7
Anti-IL-12/IL-23 p40 组	3	0.000 9 \pm 0.000 4	0.001 3 \pm 0.001 1
<i>t</i> 值		6.097	7.526
<i>P</i> 值		0.040	0.002

注: (独立样本 *t* 检验) ROR: 维甲酸相关孤儿核受体; IL: 白细胞介素
Note: (Independent samples *t* test) ROR: retinoid-related orphan nuclear receptor; IL: interleukin

3 讨论

IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞具有很强的致病性^[16]。在体内和体外实验中, IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞可优先穿过人血-脑屏障, 且在实验性自身免疫性脑脊髓炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) 模型中, IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞可在小鼠发病的效应期内在中枢神经系统中积存^[17]。

本研究发现, 在 EAU 免疫第 3 天各类组织 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞浸润均很少, 随着疾病进展 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞不断增多, 免疫第 12 天引流淋巴结中 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞显著增多, 而眼球和脾脏中 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞则于 EAU 免疫第 18 天达峰值。以上结果表明, 在 EAU 模型诱导的第 12 天左右, 引流淋巴结中的免疫反应被激活, 淋巴结中出现大量 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞, 同时外周免疫组织中的 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞开始循环, 浸润到脾脏、眼特异的炎症组织部位, 因此免疫第 12 天以后, 随着疾病进程的加剧, 淋巴结中 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞减少, 而脾脏和眼球中 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞逐渐增多。陈爽等^[18] 研究 EAU 模型小鼠视网膜表现评分, 发现炎症起始于造模后第 9~12 天, 炎症高峰期于造模后第 16~18 天。本研究表明, 眼球中 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞于炎症起始期开始出现, 于炎症高峰期达峰值。此外, 本研究发现 EAU 进程中 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞占比较多的小鼠眼球视神经层面病理切片、视网膜影像图显示发病更重。因此, 本研究推断 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞多, 表明 EAU 发病更重。

IL-12 和 IL-23 共有 p40 亚基的单克隆抗体可以抑制 IL-12R 和 IL-23R 介导的信号转导, 因此 p40 亚基对 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞的形成有重要作用。本研究试图通过中和 IL-12/IL-23 信号, 抑制 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞的分化, 探讨其对 EAU 进程的作

用。本研究结果表明, EAU 模型小鼠尾静脉注射 Anti-IL-12/IL-23 p40 抗体后, Anti-IL-12/IL-23 p40 组小鼠的视网膜表现评分及视网膜损害表现均减轻, 包括炎症细胞浸润数量、视网膜褶皱数量、视网膜脉络膜新生血管数量和视网膜脱离面积均减少, 且第 18 天眼球中 CD3 细胞比例也明显低于对照组。本研究进一步通过体外实验来验证 Anti-IL-12/IL-23 p40 对 T 细胞炎症因子的作用。CD4⁺ T 细胞诱导分化实验中, 与 IgG 组相比, Anti-IL-12/IL-23 p40 组可明显抑制 CD4⁺ T 细胞群中 Th1、Th17、IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞的分化, 表明 Anti-IL-12/IL-23 p40 可以通过抑制小鼠体内 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞的浸润减轻 EAU 模型小鼠的眼部及病理表现, 并延迟 EAU 的发生。本研究更进一步探讨了 Anti-IL-12/IL-23 p40 对 EAU 治疗作用的具体机制。T-bet 和 ROR- γ t 分别是 Th1 和 Th17 细胞独特的转录因子。本研究发现, Anti-IL-12/IL-23 p40 能分别使 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞 *T-bet*、*ROR- γ t* 基因表达减少。因此, 本研究推断 Anti-IL-12/IL-23 p40 对 EAU 的治疗作用部分可能是通过抑制 Th1、Th17 转录因子 T-bet、ROR- γ t 表达, 从而抑制 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞分化来实现的。但本研究未检测其他相关基因的变化, 我们将在接下来研究中进一步验证。

在 IBD 实验模型中, Th17 细胞向 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞转变需要 T-bet 和 STAT4 的表达^[2]。同样在 EAE 模型中研究表明, 由转录因子 T-bet、Runx1 和 Runx3 来启动 Th17 细胞向 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞分化。Chen 等^[19] 采用干眼小鼠模型证实 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞群来自 Th17 前体并发挥致病作用。然而, 一项新的研究证明 Th1 细胞能够在 TGF- β 和 IL-6 的影响下转分化为 Th17 细胞, 上调 RUNX1 的表达, 增加 ROR- γ t 启动子中 RunX1 结合位点以及 IL-17 启动子中 RunX1 和 ROR- γ t 结合位点的可及性^[20-22]。因此, 目前还没有明确向 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞分化的路线, 或者这个亚群是否代表稳定的 CD4⁺ T 细胞亚群。本研究中, 虽然 Anti-IL-12/IL-23p40 能有效减轻 EAU 的眼部病理变化, 但并未被完全抑制, 我们认为是 Anti-IL-12/IL-23 p40 治疗后仍存在 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞所致。

IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞在 EAU 中的升高可被认为是生物制剂的一个选择性靶点。未来我们希望诱导产生 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞, 以在过继转移疾病实验中评估其诱发疾病的能力, 相信采用生物制剂靶向 IL-17A⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞的可塑性将为未来潜在的葡萄膜炎治疗策略提供有价值的工具。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 崔雪雪: 直接参与选题、酝酿和设计实验、实施研究、采集数据、分析/解释数据、起草文章; 张智慧、吴凌子、栗勇涛、陈爽、陈努: 直接参与选题、酝酿和设计实验; 张晓敏: 直接参与选题、对文章知识性内容的审阅和智力性内容的修改及定稿

参考文献

- [1] Wang Y, Godec J, Ben-Aissa K, et al. The transcription factors T-bet and Runx are required for the ontogeny of pathogenic interferon- γ -producing T helper 17 cells [J]. *Immunity*, 2014, 40 (3) : 355–366. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.01.002.
- [2] Harbour SN, Maynard CL, Zindl CL, et al. Th17 cells give rise to Th1 cells that are required for the pathogenesis of colitis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112 (22) : 7061–7066. DOI: 10.1073/pnas.1415675112.
- [3] van Langelaar J, van der Vuurst de Vries RM, Janssen M, et al. T helper 17.1 cells associate with multiple sclerosis disease activity: perspectives for early intervention [J]. *Brain*, 2018, 141 (5) : 1334–1349. DOI: 10.1093/brain/awy069.
- [4] Srivastava RK, Dar HY, Mishra PK. Immunoporosis: immunology of osteoporosis-role of T cells [J/OL]. *Front Immunol*, 2018, 9: 657 [2021-12-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29675022/>. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00657.
- [5] Diedrichs-Möhring M, Kaufmann U, Wildner G. The immunopathogenesis of chronic and relapsing autoimmune uveitis-lessons from experimental rat models [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2018, 65 : 107–126. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2018.02.003.
- [6] Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, et al. Generation of pathogenic Th17 cells in the absence of TGF- β signalling [J]. *Nature*, 2010, 467 (7318) : 967–971. DOI: 10.1038/nature09447.
- [7] Volpe E, Servant N, Zollinger R, et al. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human Th17 responses [J]. *Nat Immunol*, 2008, 9 (6) : 650–657. DOI: 10.1038/ni.1613.
- [8] Okamoto S, Fujiwara H, Nishimori H, et al. Anti-IL-12/23 p40 antibody attenuates experimental chronic graft-versus-host disease via suppression of IFN- γ /IL-17-producing cells [J]. *J Immunol*, 2015, 194 (3) : 1357–1363. DOI: 10.4049/jimmunol.1400973.
- [9] Bastian D, Sui X, Nguyen HD, et al. Interleukin-23 receptor signaling by interleukin-39 potentiates T cell pathogenicity in acute graft-versus-host disease [J]. *Am J Transplant*, 2021, 21 (11) : 3538–3549. DOI: 10.1111/ajt.16624.
- [10] Leonardi CL, Kimball AB, Papp KA, et al. Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 76-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 1) [J]. *Lancet*, 2008, 371 (9625) : 1665–1674. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)60725-4.
- [11] Papp KA, Langley RG, Lebwohl M, et al. Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 52-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 2) [J]. *Lancet*, 2008, 371 (9625) : 1675–1684. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)60726-6.
- [12] McInnes IB, Kavanaugh A, Gottlieb AB, et al. Efficacy and safety of ustekinumab in patients with active psoriatic arthritis: 1 year results of the phase 3, multicentre, double-blind, placebo-controlled PSUMMIT 1 trial [J]. *Lancet*, 2013, 382 (9894) : 780–789. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60594-2.
- [13] Sandborn WJ, Gasink C, Gao LL, et al. Ustekinumab induction and maintenance therapy in refractory Crohn's disease [J]. *N Engl J Med*, 2012, 367 (16) : 1519–1528. DOI: 10.1056/NEJMoa1203572.
- [14] 王贝贝, 田庆梅, 解孝锋, 等. $\gamma\delta$ 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 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2017, 35 (9) : 793–798. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.09.006.
Wang BB, Tian QM, Xie XF, et al. Dynamic expression and mechanism of $\gamma\delta$ T cells in the spleen of mouse with experimental autoimmune uveitis [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2017, 35 (9) : 793–798. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.09.006.
- [15] Agarwal RK, Silver PB, Caspi RR. Rodent models of experimental autoimmune uveitis [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 900 : 443–469. DOI: 10.1007/978-1-60761-720-4_22.
- [16] Gartlan KH, Varelias A, Koyama M, et al. Th17 plasticity and transition toward a pathogenic cytokine signature are regulated by cyclosporine after allogeneic SCT [J]. *Blood Adv*, 2017, 1 (6) : 341–351. DOI: 10.1182/bloodadvances.2016002980.
- [17] Kebir H, Ifergan I, Alvarez JI, et al. Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis [J]. *Ann Neurol*, 2009, 66 (3) : 390–402. DOI: 10.1002/ana.21748.
- [18] 陈爽, 邵先锋, 张智慧, 等. 实验性自身免疫性葡萄膜炎小鼠视网膜蛋白差异表达及生物信息分析 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2019, 37 (12) : 949–955. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.12.003.
Chen S, Shao XF, Zhang ZH, et al. Differential expression and bioinformatics analysis of retinal proteins in mice with experimental autoimmune uveitis [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2019, 37 (12) : 949–955. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.12.003.
- [19] Chen Y, Chauhan SK, Shao C, et al. IFN- γ -expressing Th17 cells are required for development of severe ocular surface autoimmunity [J]. *J Immunol*, 2017, 199 (3) : 1163–1169. DOI: 10.4049/jimmunol.1602144.
- [20] Leipe J, Pirronello F, Klose A, et al. Increased plasticity of non-classic Th1 cells toward the Th17 phenotype [J]. *Mod Rheumatol*, 2020, 30 (5) : 930–936. DOI: 10.1080/14397595.2019.1667473.
- [21] Geginat J, Paroni M, Kastirr I, et al. Reverse plasticity: TGF- β and IL-6 induce Th1-to-Th17-cell transdifferentiation in the gut [J]. *Eur J Immunol*, 2016, 46 (10) : 2306–2310. DOI: 10.1002/eji.201646618.
- [22] Liu HP, Cao AT, Feng T, et al. TGF- β converts Th1 cells into Th17 cells through stimulation of Runx1 expression [J]. *Eur J Immunol*, 2015, 45 (4) : 1010–1018. DOI: 10.1002/eji.201444726.

(收稿日期: 2021-12-20 修回日期: 2022-06-13)

(本文编辑: 刘艳 施晓萌)

读者 · 作者 · 编者

本期英文缩略语名词解释

IL: 白细胞介素 (interleukin)

miR: 微小 RNA (microRNA)

Th17: 辅助性 T 细胞 17 (T helper cell 17)

ACE: 血管紧张素转换酶 (angiotensin-converting enzyme)

TMPSRS: 跨膜丝氨酸蛋白酶 (transmembrane serine proteases)

FEVR: 家族性渗出性玻璃体视网膜病变 (familial exudative vitreoretinopathy)

(本刊编辑部)

