

## · 实验研究 ·

## miR-31-5p 过表达对兔自身免疫性干眼外周血 Th17 细胞的免疫调控作用

高敏 赵璐 陈思思 魏瑞华 粘红

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:粘红,Email:nianhong@126.com

**【摘要】** 目的 探讨慢病毒介导微小 RNA(miR)-31-5p 过表达对兔自身免疫性干眼模型外周血辅助性 T 细胞 17(Th17)的免疫调控作用。方法 构建 miR-31-5p 重组慢病毒载体。包装 miR-31-5p 过表达及其对照慢病毒,进行浓缩和滴度测定。建立兔自身免疫性干眼模型,并分离模型兔外周血单个核细胞(PBMC),分别感染 miR-31-5p 及阴性对照慢病毒颗粒作为 miR-31-5p 过表达组和对照组,采用实时荧光定量 PCR 法检测 miR-31-5p 的表达水平。将 2 个组 PBMC 与经  $\gamma$  射线照射后的泪腺上皮细胞共培养,采用实时荧光定量 PCR 法检测 2 个组 PBMC 中 Th17 细胞特异性转录因子维甲酸相关孤儿核受体 C(RORC)、标志性细胞因子白细胞介素-17(IL-17)及 Th17 细胞极化相关细胞因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-23 的 mRNA 表达水平;采用 Western blot 法检测 PBMC 中 IL-17 的蛋白表达水平。结果 通过测序验证,成功构建 miR-31-5p 重组慢病毒载体。包装并浓缩 miR-31-5p 过表达和对照慢病毒颗粒,滴度测定结果分别为  $3.82 \times 10^7$  TU/ml 和  $3.50 \times 10^7$  TU/ml,满足后续实验需求。实时荧光定量 PCR 结果显示,miR-31-5p 过表达组 miR-31-5p 相对表达量较对照组显著升高,差异有统计学意义( $t = -9.696, P < 0.001$ )。在兔泪腺上皮细胞与 PBMC 共培养体系中,miR-31-5p 过表达组 PBMC 中的 RORC、IL-17 mRNA 相对表达量分别为  $0.33 \pm 0.03$  和  $0.28 \pm 0.09$ ,明显低于对照组的  $1.00 \pm 0.00$  和  $1.00 \pm 0.00$ ,差异均有统计学意义( $t = 46.256, 13.810$ , 均  $P < 0.05$ )。Western blot 检测结果显示,miR-31-5p 过表达组 PBMC 中 IL-17 蛋白相对表达量较对照组明显降低,差异有统计学意义( $t = 4.977, P = 0.008$ )。实时荧光定量 PCR 结果显示,miR-31-5p 过表达组 PBMC 中 IL-6、IL-23 和 IL-1 $\beta$  mRNA 相对表达量较对照组显著下降,差异均有统计学意义( $t = 220.076, 6.641, 13.271$ , 均  $P < 0.05$ )。结论 miR-31-5p 过表达可能通过下调免疫微环境中 IL-6、IL-23、IL-1 $\beta$  等细胞因子的表达负向调控 Th17 细胞免疫反应。

**【关键词】** 干眼;干燥综合征;Th17 细胞;miR-31-5p;动物模型;外周血单个核细胞

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(81970793、82070929);天津市临床重点学科(专科)建设项目(TJLCZDXKT003)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20210809-00452

### Immunoregulatory effects of miR-31-5p overexpression on peripheral blood Th17 cell in a rabbit model of autoimmune dry eye

Gao Min, Zhao Lu, Chen Sisi, Wei Ruihua, Nian Hong

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: Nian Hong, Email: nianhong@126.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the immunoregulatory effects of lentivirus-mediated microRNA (miR)-31-5p overexpression on peripheral blood T helper cell 17 (Th17) in a rabbit model of autoimmune dry eye.

**Methods** The miR-31-5p recombinant lentiviral vector was constructed. Lentivirus overexpressing miR-31-5p and its control virus were packaged. The concentration measurement and lentiviral titer determination were carried out. A rabbit model of autoimmune dry eye was established and the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of the rabbits were isolated. PBMC infected with miR-31-5p and negative control lentivirus particles were assigned as the miR-31-5p overexpression group and control group, respectively. The miR-31-5p expression level was detected using quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Then PBMC in the two groups were co-cultured with  $\gamma$ -ray irradiated

lacrimal gland epithelial cells. The expressions of Th17 cell related transcription factor retinoic acid-receptor-related orphan receptor C (RORC) and interleukin-17 (IL-17) mRNA, IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-23 were determined by qRT-PCR. The IL-17 protein expression level was detected by Western blot. The use and care of animals complied with Regulation for the Administration of Affair Concerning Experiment Animals by State Science and Technology Commission. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Tianjin Medical University Eye Hospital (No. TJYY20201221036). **Results** The construction of the miR-31-5p recombinant lentiviral vector was verified by DNA sequencing. The lentiviral titer of lentivirus overexpressing miR-31-5p and control lentivirus particles was  $3.82 \times 10^7$  TU/ml and  $3.50 \times 10^7$  TU/ml, respectively. The miR-31-5p relative expression level of PBMC was significantly increased in miR-31-5p overexpression group in comparison with control group, showing a statistically significant difference ( $t = -9.696, P < 0.001$ ). When PBMC were co-cultured with lacrimal gland epithelial cells *in vitro*, the relative expression levels of RORC and IL-17 mRNA in miR-31-5p overexpression group were  $0.33 \pm 0.03$  and  $0.28 \pm 0.09$ , which were significantly decreased in comparison with  $1.00 \pm 0.00$  and  $1.00 \pm 0.00$  in control group, with statistically significant differences between them ( $t = 46.256, 13.810$ ; both at  $P < 0.05$ ). The relative expression level of IL-17 protein in miR-31-5p overexpression group was significantly reduced than control group ( $t = 4.977, P = 0.008$ ). The relative expression levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-23 mRNA were significantly lower in miR-31-5p overexpression group than control group ( $t = 220.076, 6.641, 13.271$ ; all at  $P < 0.05$ ). **Conclusions** The overexpression of miR-31-5p can inhibit the Th17-immune response via down-regulating the expression of IL-6, IL-1 $\beta$  and IL-23.

[Key words] Dry eye; Sjögren syndrome; Th17 cells; miR-31-5p; Disease models, animal; Peripheral blood mononuclear cell

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81970793, 82070929); Tianjin Clinical Key Discipline Project (TJLCZDXKT003)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20210809-00452

干燥综合征 (Sjögren syndrome, SS) 相关干眼是常见的自身免疫性干眼, 严重者可继发角膜溃疡, 造成视力损伤<sup>[1]</sup>。由于 SS 发病机制尚未完全明确, 临床上仍缺乏有效的治疗方案<sup>[2-3]</sup>。辅助性 T 细胞 17 (T helper cell 17, Th17) 是自身免疫性干眼中关键的致炎细胞群<sup>[4]</sup>, 研究发现 Th17 细胞在 SS 患者外周血中比例上调, 并且与 SS 疾病活动指数 ESSDAI 密切相关<sup>[5]</sup>。多项研究证实微小 RNA (microRNA, miRNA) 参与调控 Th17 细胞免疫反应, 进而影响自身免疫性疾病的发生和发展<sup>[6]</sup>。miR-31-5p 是一种进化高度保守的 miRNA, 在多种自身免疫性疾病中发挥免疫调控作用。研究表明 miR-31 可通过促进 T 细胞中白细胞介素 2 (interleukin-2, IL-2) 的异常表达参与系统性红斑狼疮的发病<sup>[7]</sup>, 或通过抑制 Gprc5a 影响调节性 T 细胞的分化, 促进实验性自身免疫性脑脊髓炎的炎症反应<sup>[8]</sup>; 但其在自身免疫性干眼中的调控作用及机制尚不明确。本课题组前期研究结果表明, miR-31-5p 在兔自身免疫性干眼模型泪腺以及外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 中表达显著下调<sup>[9]</sup>。本研究进一步探讨 miR-31-5p 对兔自身免疫性干眼模型外周血 Th17 细胞的免疫调控作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 选用 SPF 级成年雌性新西兰大白兔 4 只, 体质量为 2.5 ~ 3.0 kg (北京维通利华实验动物技术有限公司提供), 实验前排除眼部炎症及其他异常。实验动物的使用及喂养严格遵循国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》, 研究方案通过天津医科大学眼科医院伦理委员会审批 (批文号: TJYY20201221036)。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 慢病毒包装细胞人胚肾 293T 细胞株 (美国 ATCC 细胞库); 辅助包装质粒 pSPAX2 和 pMD2. G, LipoFiter™ (上海汉恒生物有限公司); 大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$  (美国 Invitrogen 公司); I 型胶原酶、DMEM 培养基、RPMI-1640 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、聚乙二醇 8000 (美国 Gibco 公司); Ficoll 粉 (美国 Sigma 公司); 淋巴细胞分离液 (美国 GE 公司); RNA 提取试剂盒 (美国 ZScience Biotechnology 公司); 限制性内切酶、T4 连接酶、逆转录试剂盒、SYBR Green 2 倍 Master Mix (美国 Thermo 公司); 无内毒素质粒抽提试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒 (北京康为世纪有限公司); 小鼠抗兔 IL-17 抗体 (MAA063Rb21, 美国

Cloud-Clone 公司); 鼠抗兔  $\beta$ -actin 抗体 (TA-09, 北京中杉金桥生物技术有限公司); 马抗小鼠 IgG 二抗 (7076s, 美国 Cell Signaling Technology 公司)。BioSpectrum410 凝胶成像仪 (美国 UVP 公司); BX53 型光学显微镜 (日本 Olympus 公司); Light Cycler PCR 仪 (瑞士 Roche 公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 miR-31-5p 过表达慢病毒载体的构建及鉴定

根据 GeneBank 提供的 miR-31-5p 前体序列设计引物, 并在其中引入 Xho I 酶切位点, 正向引物序列: 5'-TGTGGAGAGGAGGCAAGATGCTGGC-3'; 反向引物序列: 5'-CCGCTCGAGAAAAAAGATGGCAATATGTTG GC-3' (下划线标注部分为酶切位点)。以兔脾脏 cDNA 为模板行 PCR 扩增 miR-31-5p 前体序列, 反应体系为: cDNA 模板 1.0  $\mu$ l, 正向引物和反向引物各 0.6  $\mu$ l, 2 倍 pfu PCR mix 5.0  $\mu$ l, 超纯水 2.8  $\mu$ l。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 64.3  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 连续进行 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 保温 5 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定后纯化。慢病毒空载体 pLL3.7 经 Xho I 和 Hpa I 双酶切, 目的片段经 Xho I 单酶切后琼脂糖凝胶电泳纯化, 用 T4 连接酶将酶切后载体和目的片段进行连接反应。取 10  $\mu$ l 连接产物转化入 DH5 $\alpha$  感受态细菌, 在含氨苄抗性的 LB 培养基中 37  $^{\circ}$ C 培养过夜。次日挑取单克隆菌落, 37  $^{\circ}$ C、250 r/min 摇菌 16 h 后进行菌液 PCR 鉴定, 提取阳性克隆菌中质粒送至上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序。

1.2.2 三质粒共转染 293T 细胞行慢病毒包装 将质粒进行高纯度无内毒素抽提, 转染前一天将培养至生长对数期、状态良好的 293T 细胞用胰蛋白酶消化并接种于 100 mm 培养皿中, 次日待细胞融合密度达 70%~80% 时用于慢病毒包装。转染时, 取 2 支灭菌离心管, 将重组载体质粒分别与包装质粒遵循摩尔比 1:1:1 混合 (pSPAX2、pMD2.G、pLL3.7/pLL3.7-miR-31-5p, 共 24  $\mu$ g), 另取 DMEM 基础培养基与 LipoFiter™ (30  $\mu$ l) 混合并于室温孵育 5 min。将质粒混合溶液与 LipoFiter™ 溶液混合均匀, 室温孵育 20 min 后共转染 293T 细胞。6 h 后移去混合液并更换为含体积分数 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的完全培养基。于转染后 48 h 及 72 h 收集细胞上清, 离心半径 16.8 cm, 4  $^{\circ}$ C 条件下 3 000 r/min 离心 15 min, 去除细胞碎片, 0.45  $\mu$ m 过滤器过滤上清液后加入 5 倍聚乙二醇 8000 NaCl 母液, 4  $^{\circ}$ C 摇床过夜。次日 6 500 $\times$ g 离心 20 min, 1640 基础培养基重悬沉淀并取 EP 管分装,

-80  $^{\circ}$ C 储存。

1.2.3 miR-31-5p 重组慢病毒滴度检测 将对数生长期状态良好的 293T 细胞用胰蛋白酶消化法计数, 按每孔  $1 \times 10^4$  个细胞接种于 96 孔板 (总体积为 100  $\mu$ l)。次日细胞融合达 30%~50%, 取 10 个无菌 EP 管分别加入 90  $\mu$ l 含 10% FBS 的完全培养基, 将 10  $\mu$ l 重组慢病毒原液加入第 1 个 EP 管中, 混合均匀后吸取 10  $\mu$ l 加入第 2 个 EP 管中, 重复操作直至最后 1 个 EP 管。移去孔中培养基, 将梯度稀释的病毒加入 293T 细胞中并孵育 24 h, 加入 100  $\mu$ l 完全培养基继续培养 48 h, 于荧光显微镜下观察荧光表达情况。对荧光比例为 20%~40% 的孔进行细胞计数并通过流式细胞仪检测荧光表达比例, 计算病毒原液滴度: 滴度 (TU/ml) = 细胞数  $\times$  荧光百分比  $\times 10^3$  / 病毒原液体积 ( $\mu$ l)。

1.2.4 自身免疫性兔干眼模型的建立 参照前期研究方法<sup>[10-11]</sup>, 分离提纯兔泪腺上皮细胞及 PBMC, 构建细胞混合培养体系。将实验兔全身麻醉后摘取左下泪腺, 分离并提纯泪腺上皮细胞, 进行细胞计数并以  $1 \times 10^6$  / 孔细胞接种于 24 孔板, 置于 37  $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48 h, 25 Gy  $\gamma$  射线照射去除其增生能力, 保留抗原提呈功能。利用静脉采血针于兔耳中动脉采血, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 稀释 4 倍后缓慢加到淋巴细胞分离液上方, 20  $^{\circ}$ C 条件下 2 000 r/min 离心 20 min, 离心后吸取中间白色云雾状单个核细胞, 进行细胞计数并以相同的密度 ( $1 \times 10^6$  / 孔) 与经  $\gamma$  射线照射的泪腺上皮细胞混合培养。混合培养 5 d 后, 收集激活的淋巴细胞, 用 PBS 配制成  $2 \times 10^6$  / ml 细胞悬液 1 ml, 经耳缘静脉输注体内。依照文献[10]评估方法, 于输注前及输注后每 2 周检测干眼临床相关指标, 确定模型成功建立。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 法检测 miR-31-5p 及 Th17 细胞相关基因 mRNA 相对表达量 分离模型兔 PBMC, 分为 miR-31-5p 过表达组和对照组, 分别感染 miR-31-5p 过表达及其对照慢病毒 72 h, 以 U6 为内参照, 实时荧光定量 PCR 法检测 miR-31-5p mRNA 相对表达量, 反应条件为: 95  $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 15 s, 62  $^{\circ}$ C 退火及延伸 40 s, 40 个循环。病毒感染后 24 h 收集 2 个组 PBMC, 换液后与经  $\gamma$  射线照射的泪腺上皮细胞共培养, 72 h 后收集 PBMC。实时荧光定量 PCR 反应引物序列见表 1, 引物序列均由上海生工生物工程有限公司合成, 反应体系: SYBR Green I Master 4  $\mu$ l, 正反向引物各 1  $\mu$ l, cDNA 模板 2  $\mu$ l; 以 GAPDH 为内参照, 检测 IL-17、维甲酸相关孤儿核受体 (retinoic acid-receptor-related orphan receptor C,



RORC)、IL-1β、IL-6、IL-23 mRNA 相对表达量,反应条件:95 °C 预变性 10 min;95 °C 变性 15 s,60 °C 退火及延伸 1 min,40 个循环。2 个组相对定量结果分析采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法。每次独立重复实验中设置 3 个复孔,取平均值。每个实验结果独立重复 3 次以上。

的泪腺上皮细胞体外共培养 72 h,收集 PBMC,加入 RIPA 裂解液、PMSF、磷酸酶抑制剂(体积比 100:1:1)提取细胞总蛋白。用 BCA 试剂盒检测相对蛋白浓度,将蛋白与上样缓冲液混合均匀并于 100 °C 高温变性 10 min。取 80 μg 等量蛋白样品加入十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶孔,100 V 恒压电泳 60 min 后,在 65 V 条件下将蛋白转印至硝酸纤维素膜。用质量分数 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,加入相应的鼠抗兔 IL-17 (1:667) 和小鼠抗兔 β-actin (1:2 000),4 °C 孵育过夜。1 倍 TBST 缓冲液洗涤 10 min,共 3 次,加入马抗小鼠 IgG 二抗(1:2 000),室温下孵育 2 h。经 1 倍 TBST 缓冲液再次洗涤,按体积比 1:1 混合加入 ECL 发光液,采用化学发光凝胶成像仪采集图片信息,采用 ImageJ 软件进行灰度分析,以 β-actin 为内参,计算 IL-17 蛋白相对表达量。实验结果独立重复 3 次。

**表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列**  
**Table 1 Primer sequences for quantitative real-time PCR**

基因	引物序列(5'-3')	扩增片段长度(bp)
IL-17	正向:GGAATGAGGACCACCACATGA	61
	反向:CTGCGTAGGACCAGGATCTCTT	
RORC	正向:GGCCTACCACGCCGA	57
	反向:TCCATGCCACCGTATTTGCG	
IL-1β	正向:CTCCTGCCAACCTACAACAA	60
	反向:TCCAGAGCCACAACGACTGA	
IL-6	正向:GCAGAAAAACCACTGGCTGAA	53
	反向:GGCCGCCAGGATGA	
IL-23	正向:AGGAGTCTCTTGGCAATGTGAT	148
	反向:AGCAGGAGCAGGGTTGATG	
GAPDH	正向:GGGTGGTGGACCTCATGGT	58
	反向:CGGTGTTTGAGGGCTCTTA	
miR-31-5p	正向:CGAGGCAAGATGCTGGCAT	60
	反向:AGTGCAGGTCGGAGGTATT	
U6	正向:CGCTTCGGCAGCACATATAC	87
	反向:TTCACGAATTTGCGTGTTCATC	

注:PCR:聚合酶链式反应;IL:白细胞介素;RORC:维甲酸相关孤儿核受体 C;GAPDH:磷酸甘油醛脱氢酶;miR:微小 RNA;U6:U6 核小 RNA  
Note: PCR: polymerase chain reaction; IL: interleukin; RORC: retinoic acid-receptor-related orphan receptor C; GAPDH: glyceraldehyde phosphate dehydrogenase; miR: microRNA; U6: U6 small nuclear RNA

**1.3 统计学方法**

采用 SPSS 26.0 统计学软件进行统计分析。计量资料的数据经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以  $\bar{x} \pm s$  表示。miR-31-5p 过表达组与对照组中各检测指标差异比较采用独立样本 t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 miR-31-5p 重组慢病毒载体的鉴定**

琼脂糖凝胶电泳结果显示,PCR 扩增 miR-31-5p 前体序列的片段大小为 83 bp,目的片段大小与预期结果相符。将目的片段克隆至 pLL3.7 慢病毒过表达载体后,测序分析结果显示插入片段序列与目的序列一致,miR-31-5p 重组慢病毒载体构建成功(图 1)。

**1.2.6 Western blot 法检测 IL-17 蛋白相对表达量 miR-31-5p 过表达组及对照组 PBMC 与经 γ 射线照射**

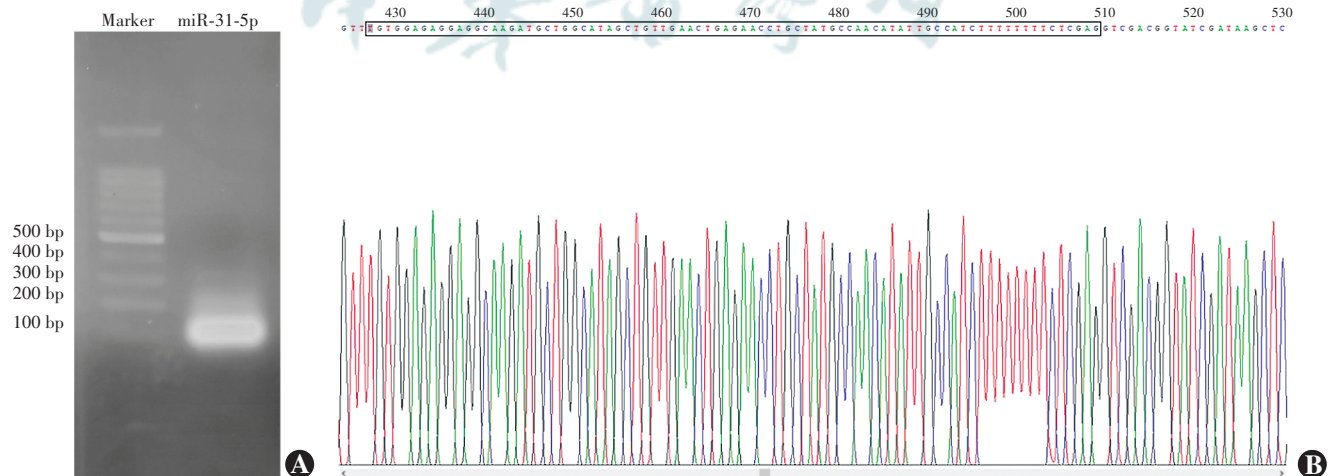


图 1 miR-31-5p 重组慢病毒载体的构建及鉴定 A:PCR 扩增 miR-31-5p 前体片段琼脂糖凝胶电泳图 B:miR-31-5p 重组慢病毒载体测序图 miR:微小 RNA

Figure 1 Construction and identification of miR-31-5p recombinant lentiviral vector A: Agarose gel electrophoresis for miR-31-5p precursor amplified by PCR B:DNA sequencing map of the miR-31-5p recombinant lentiviral vector miR: microRNA

## 2.2 miR-31-5p 重组慢病毒滴度

荧光显微镜下可见转染后 48 h miR-31-5p 重组慢病毒及对照病毒中表达 GFP 蛋白的绿色荧光细胞约占细胞总数的 90% (图 2); 293T 细胞荧光强度随病毒的稀释逐渐减弱 (图 3)。miR-31-5p 重组慢病毒及对照病毒滴度分别为  $3.82 \times 10^7$  TU/ml 和  $3.50 \times 10^7$  TU/ml, 满足后续实验需求。

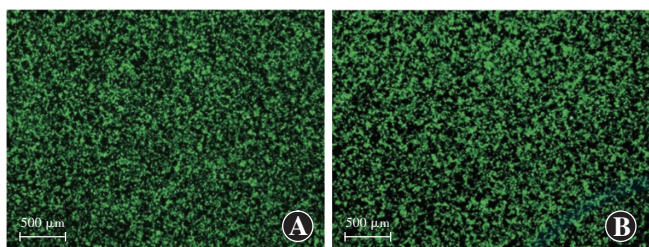


图 2 miR-31-5p 重组慢病毒和对照病毒感染 293T 细胞 48 h GFP 表达情况 (标尺 = 500 μm) A: 对照病毒 B: miR-31-5p 重组慢病毒  
Figure 2 GFP expression of 293T cells after 48-hour transfection of miR-31-5p recombinant lentivirus and control virus (bar = 500 μm) A: control virus B: miR-31-5p recombinant lentivirus

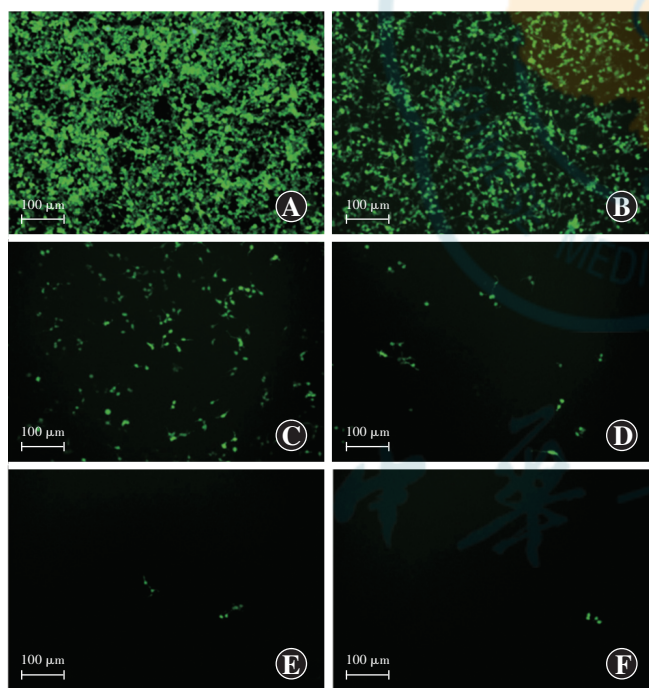


图 3 不同浓度病毒感染 293T 细胞后 72 h GFP 荧光表达情况 (标尺 = 100 μm) A ~ F 所含病毒体积百分比分别为 10%、1%、 $1 \times 10^{-1}$ %、 $1 \times 10^{-2}$ %、 $1 \times 10^{-3}$ %、 $1 \times 10^{-4}$ %  
Figure 3 GFP fluorescence in 293T cells at 72 hours after different concentrations of recombinant lentivirus infection (bar = 100 μm) The virus volume percentage of A - F was 10%, 1%,  $1 \times 10^{-1}$ %,  $1 \times 10^{-2}$ %,  $1 \times 10^{-3}$ %,  $1 \times 10^{-4}$ %

## 2.3 2 个组 PBMC 中 miR-31-5p 相对表达量比较

实时荧光定量 PCR 结果显示, miR-31-5p 过表达组 miR-31-5p 相对表达量明显高于对照组, 差异有统计学意义 ( $t = -9.696, P < 0.001$ ) (表 2)。

表 2 2 个组 PBMC 中 miR-31-5p 相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 2 Comparison of miR-31-5p relative expression level in PBMC between two groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本量	miR-31-5p
对照组	4	1.02 ± 0.03
miR-31-5p 过表达组	4	2.58 ± 0.32
t 值		-9.696
P 值		<0.001

注: (独立样本 t 检验) PBMC: 外周血单个核细胞; miR: 微小 RNA  
Note: (Independent samples t test) PBMC: peripheral blood mononuclear cell; miR: microRNA

## 2.4 2 个组 RORC 及 IL-17 mRNA 相对表达量比较

实时荧光定量 PCR 结果显示, miR-31-5p 过表达组 PBMC 中 RORC、IL-17 mRNA 相对表达量均较对照组降低, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (表 3)。

表 3 2 个组 PBMC 中 RORC 和 IL-17 mRNA 相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 3 Comparison of RORC and IL-17 mRNA relative expression level in PBMC between two groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本量	RORC mRNA	IL-17 mRNA
对照组	3	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
miR-31-5p 过表达组	3	0.33 ± 0.03	0.28 ± 0.09
t 值		46.256	13.810
P 值		<0.001	0.005

注: (独立样本 t 检验) PBMC: 外周血单个核细胞; RORC: 维甲酸相关孤儿核受体 C; IL: 白细胞介素; miR: 微小 RNA  
Note: (Independent samples t test) PBMC: peripheral blood mononuclear cell; RORC: retinoic acid-related orphan receptor C; IL: interleukin; miR: microRNA

## 2.5 2 个组 PBMC 中 IL-17 蛋白相对表达量比较

Western blot 结果显示, miR-31-5p 过表达组 IL-17 蛋白条带较对照组明显减弱, 其相对表达量为  $0.30 \pm 0.05$ , 明显低于对照组的  $0.66 \pm 0.15$ , 差异有统计学意义 ( $t = 4.977, P = 0.008$ ) (图 4)。

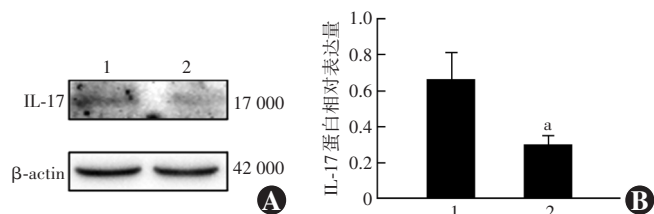


图 4 2 个组 PBMC 中 IL-17 蛋白相对表达量比较 A: Western blot 电泳图 B: IL-17 蛋白相对表达量比较 与对照组相比,  $^a P < 0.01$  (独立样本 t 检验,  $n = 3$ ) 1: 对照组; 2: miR-31-5p 过表达组 IL: 白细胞介素; β-actin: β-肌动蛋白  
Figure 4 Comparison of relative expression level of IL-17 protein in PBMC between miR-31-5p overexpression group and control group A: Electrophoretogram of IL-17 protein expression by Western blot B: Comparison of the relative expression level of IL-17 protein Compared with control group,  $^a P < 0.01$  (Independent samples t test,  $n = 3$ ) 1: control group; 2: miR-31-5p overexpression group IL: interleukin



## 2.6 2 个组 PBMC 中 Th17 细胞极化相关细胞因子 IL-6、IL-23 和 IL-1 $\beta$ mRNA 相对表达量比较

miR-31-5p 过表达组 PBMC 中 IL-6、IL-23、IL-1 $\beta$  mRNA 表达量均明显低于对照组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )(表 4)。

表 4 2 个组 PBMC 中 IL-6、IL-23 和 IL-1 $\beta$  mRNA 相对表达量比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Comparison of IL-6, IL-23 and IL-1 $\beta$  mRNA relative expression levels in PBMC between two groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本量	IL-6 mRNA	IL-23 mRNA	IL-1 $\beta$ mRNA
对照组	3	1.00 $\pm$ 0.00	1.03 $\pm$ 0.06	1.00 $\pm$ 0.00
miR-31-5p 过表达组	3	0.51 $\pm$ 0.00	0.47 $\pm$ 0.11	0.60 $\pm$ 0.05
<i>t</i> 值		220.076	6.641	13.271
<i>P</i> 值		<0.001	0.022	0.006

注:(独立样本 *t* 检验) PBMC:外周血单个核细胞;IL:白细胞介素;miR:微小 RNA

Note:(Independent samples *t* test) PBMC:peripheral blood mononuclear cell;IL:interleukin;miR:microRNA

## 3 讨论

SS 相关干眼主要由 CD4<sup>+</sup> Th 细胞介导,其发病机制复杂,了解其发病机制有助于探索新的治疗策略<sup>[12]</sup>。miRNA 能够在转录后水平调控基因表达并广泛作用于多种生物学过程<sup>[13]</sup>,是目前自身免疫性疾病领域研究的热点。研究表明,miRNA 的异常表达与 SS 相关干眼的发病机制密切相关<sup>[14-16]</sup>,明确 miRNA 的相关调控机制可以为疾病提供新的治疗靶点和干预策略。miR-31-5p 是一种高度保守的微小 RNA,其基因位于染色体 9p21.3 位点。已有研究证明,miR-31-5p 可以靶向抑制滤泡 Th 细胞中 *BTLA*、*SAP* 和 *CD40L* 等基因的表达,从而抑制其与 B 细胞的相互作用,是治疗自身免疫性疾病的一个潜在靶点<sup>[17]</sup>。Johansson 等<sup>[18]</sup>研究发现在 SS 患者 T 细胞中 miR-31-5p 表达水平显著下调。本课题组前期研究结果表明,miR-31-5p 在自身免疫性干眼模型兔泪腺和 PBMC 中表达显著降低,提示 miR-31-5p 可能参与自身免疫性干眼的发生和发展<sup>[9]</sup>。本研究探讨 miR-31-5p 过表达对兔自身免疫性干眼外周血 Th17 细胞的免疫调控作用,以期探索自身免疫性干眼发病机制以及优化治疗方案提供实验基础。

Th17 细胞是一种表达特异性转录因子 RORC 和标志性细胞因子 IL-17 的 CD4<sup>+</sup> 辅助 T 细胞亚群。RORC 可以调控初始 CD4<sup>+</sup> T 细胞向 Th17 细胞分化,是诱导 IL-17 分泌的关键转录因子<sup>[19]</sup>;IL-17 参与中性粒细胞的增生、成熟和迁移过程,加剧组织炎症反

应<sup>[20]</sup>。研究表明,Th17 细胞是介导自身免疫性干眼的主要致病细胞群<sup>[21]</sup>,与健康对照者相比,SS 患者泪液中 IL-17A、IL-6 和 IL-23 等 Th17 相关细胞因子的表达明显上调<sup>[22]</sup>;IL-17A 基因敲除可以有效改善实验性 SS 模型鼠的疾病症状和病理改变<sup>[23]</sup>。目前,越来越多的证据显示 miRNA 可参与 Th17 细胞免疫反应,调控自身免疫性干眼的发生和发展<sup>[24]</sup>。例如,Wang 等<sup>[25]</sup>研究发现 miR-146a-5p 在 SS 患者 PBMC 中表达显著上调,并且通过负调控金属蛋白酶 17 促进 Th17 细胞的分化。然而,在自身免疫性干眼中,miR-31-5p 对 Th17 细胞的调控作用尚未见报道。本研究中观察 miR-31-5p 在 PBMC 中过表达对兔自身免疫性干眼中外周血 Th17 细胞免疫反应的影响,实时荧光定量 PCR 结果表明,miR-31-5p 过表达后 RORC 及 IL-17 mRNA 表达下调;Western blot 检测结果显示 IL-17 蛋白相对水平显著降低,这说明 miR-31-5p 过表达可能通过抑制兔自身免疫性干眼外周血 Th17 细胞免疫反应,参与自身免疫性干眼的发病进程。

多项研究表明,免疫微环境参与调控 Th17 细胞免疫反应。其中,IL-6、IL-1 $\beta$  和 IL-23 是影响 Th17 细胞极化的关键细胞因子,IL-6 能够通过抑制 T 细胞中 Foxp3 的表达,解除其对 ROR $\gamma$ t 的抑制作用,促进 Th17 细胞活化<sup>[26]</sup>;IL-1 $\beta$  参与 Th17 细胞的早期分化,促进 Th17 细胞的分泌功能<sup>[27-28]</sup>;IL-23 则主要通过活化 STAT3 维持 Th17 细胞稳定和分泌功能,加剧组织炎症反应<sup>[29]</sup>。近期研究表明,miRNA 可以通过调控免疫微环境参与 Th17 细胞免疫反应。例如,Wei 等<sup>[30]</sup>研究表明在实验性自身免疫性葡萄膜炎中,树突状细胞过表达 miR-223-3p 可以显著增强 Th17 极化相关细胞因子 IL-23 和 IL-1 $\beta$  的分泌,进而促进致病性 Th17 细胞极化。Yan 等<sup>[31]</sup>研究发现,应用 miR-155 抑制剂治疗实验性自身免疫性心肌炎可以引起脾脏 CD11c<sup>+</sup> 树突状细胞分泌的 Th17 极化相关细胞因子 IL-6、IL-23、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  显著降低,抑制 Th17 细胞免疫反应,缓解心脏损伤。本研究中结果显示,miR-31-5p 过表达组 PBMC 中 Th17 细胞极化相关细胞因子 IL-6、IL-1 $\beta$  和 IL-23 mRNA 相对表达量较对照组明显降低,提示 miR-31-5p 过表达可能创造了一个抑制 Th17 细胞极化的免疫微环境,进而抑制了 Th17 细胞免疫反应。由于目前缺少 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-23 等商用抗兔的单克隆抗体,故本研究中仅对其 mRNA 水平进行了检测。

综上所述,本研究表明 miR-31-5p 过表达可能通过下调免疫微环境中 IL-6、IL-23、IL-1 $\beta$  等细胞因子的

表达负向调控 Th17 细胞免疫反应,为进一步探索 miR-31-5p 对自身免疫性干眼的保护作用及机制提供了实验基础。本研究仅探讨了在体外 PBMC 中 miR-31-5p 过表达对 Th17 细胞的免疫调控及部分机制,关于 miR-31-5p 如何影响 Th17 细胞极化以及在体内过表达 miR-31-5p 是否能够抑制自身免疫性干眼的发病进程,仍需进一步研究。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 高敏:实验设计、实施研究、采集数据、分析数据、起草文章;赵璐、陈思思:实验设计、实施研究、文章修改;魏瑞华:参与选题、研究设计及文章定稿;粘红:参与选题、研究设计、文章修改及定稿

## 参考文献

- Akpek EK, Mathews P, Hahn S, et al. Ocular and systemic morbidity in a longitudinal cohort of Sjögren's syndrome [J]. *Ophthalmology*, 2015, 122(1): 56-61. DOI: 10.1016/j.ophtha.2014.07.026.
- Wan KH, Chen LJ, Young AL. Efficacy and safety of topical 0.05% cyclosporine eye drops in the treatment of dry eye syndrome: a systematic review and meta-analysis [J]. *Ocul Surf*, 2015, 13(3): 213-225. DOI: 10.1016/j.jtos.2014.12.006.
- Fox RI, Fox CM, Gottenberg JE, et al. Treatment of Sjögren's syndrome: current therapy and future directions [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2021, 60(5): 2066-2074. DOI: 10.1093/rheumatology/kez142.
- Psianou K, Panagoulas I, Papanastasiou AD, et al. Clinical and immunological parameters of Sjögren's syndrome [J]. *Autoimmun Rev*, 2018, 17(10): 1053-1064. DOI: 10.1016/j.autrev.2018.05.005.
- Li L, He J, Zhu L, et al. The clinical relevance of IL-17-producing CD4+CD161+ cell and its subpopulations in primary Sjögren's syndrome [J/OL]. *J Immunol Res*, 2015, 2015: 307453 [2021-12-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4578753/>. DOI: 10.1155/2015/307453.
- Huang J, Xu X, Yang J. miRNAs alter T helper 17 cell fate in the pathogenesis of autoimmune diseases [J/OL]. *Front Immunol*, 2021, 12: 593473 [2021-12-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8096907/>. DOI: 10.3389/fimmu.2021.593473.
- Fan W, Liang D, Tang Y, et al. Identification of microRNA-31 as a novel regulator contributing to impaired interleukin-2 production in T cells from patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64(11): 3715-3725. DOI: 10.1002/art.34596.
- Zhang L, Ke F, Liu Z, et al. MicroRNA-31 negatively regulates peripherally derived regulatory T-cell generation by repressing retinoic acid-inducible protein 3 [J/OL]. *Nat Commun*, 2015, 6: 7639 [2021-12-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4510656/>. DOI: 10.1038/ncomms8639.
- Liu B, Zhao L, Wei Y, et al. MicroRNA expression profile of lacrimal glands in rabbit autoimmune dacryoadenitis model [J]. *Int J Med Sci*, 2020, 17(17): 2879-2887. DOI: 10.7150/ijms.50248.
- Lu X, Li N, Zhao L, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate ongoing autoimmune dacryoadenitis in rabbits via polarizing macrophages into an anti-inflammatory phenotype [J/OL]. *Exp Eye Res*, 2020, 191: 107905 [2021-12-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8612174/>. DOI: 10.1016/j.exer.2019.107905.
- 李娜, 粘红, 赵璐, 等. 人脐带间充质干细胞来源外泌体对兔自身免疫性干眼外周血巨噬细胞的调控 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2019, 37(11): 854-862. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.11.002.
- Li N, Nian H, Zhao L, et al. Regulation of human umbilical cord mesenchymal stem cells derived exosomes on peripheral blood macrophages from rabbit autoimmune dry eye [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2019, 37(11): 854-862. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.11.002.
- Pontarini E, Lucchesi D, Bombardieri M. Current views on the pathogenesis of Sjögren's syndrome [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2018, 30(2): 215-221. DOI: 10.1097/BOR.0000000000000473.
- Pham VV, Zhang J, Liu L, et al. Identifying miRNA-mRNA regulatory relationships in breast cancer with invariant causal prediction [J/OL]. *BMC Bioinformatics*, 2019, 20(1): 143 [2021-12-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6419852/>. DOI: 10.1186/s12859-019-2668-x.
- Cha S, Mona M, Lee KE, et al. MicroRNAs in autoimmune Sjögren's syndrome [J/OL]. *Genomics Inform*, 2018, 16(4): e19 [2021-12-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6440664/>. DOI: 10.5808/GI.2018.16.4.e19.
- Reale M, D'Angelo C, Costantini E, et al. MicroRNA in Sjögren's syndrome: their potential roles in pathogenesis and diagnosis [J/OL]. *J Immunol Res*, 2018, 2018: 7510174 [2021-12-07]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6011049/>. DOI: 10.1155/2018/7510174.
- Rassi DM, De Paiva CS, Dias LC, et al. Review: microRNAs in ocular surface and dry eye diseases [J]. *Ocul Surf*, 2017, 15(4): 660-669. DOI: 10.1016/j.jtos.2017.05.007.
- Ripamonti A, Provasi E, Lorenzo M, et al. Repression of miR-31 by BCL6 stabilizes the helper function of human follicular helper T cells [J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(48): 12797-12802 [2021-12-07]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5715737/>. DOI: 10.1073/pnas.1705364114.
- Johansson A, Nyberg WA, Sjöstrand M, et al. miR-31 regulates energy metabolism and is suppressed in T cells from patients with Sjögren's syndrome [J]. *Eur J Immunol*, 2019, 49(2): 313-322. DOI: 10.1002/eji.201747416.
- Chen Z, Laurence A, O'Shea JJ. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation [J]. *Semin Immunol*, 2007, 19(6): 400-408. DOI: 10.1016/j.smim.2007.10.015.
- Korn T, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-17 and Th17 cells [J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 485-517. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132710.
- Matsui K, Sano H. T helper 17 cells in primary Sjögren's syndrome [J/OL]. *J Clin Med*, 2017, 6(7): 65 [2021-12-07]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5532573/>. DOI: 10.3390/jcm6070065.
- Liu R, Gao C, Chen H, et al. Analysis of Th17-associated cytokines and clinical correlations in patients with dry eye disease [J/OL]. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0173301 [2021-12-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5381865/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0173301.
- Lin X, Rui K, Deng J, et al. Th17 cells play a critical role in the development of experimental Sjögren's syndrome [J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(6): 1302-1310. DOI: 10.1136/annrheumdis-2013-204584.
- Garavelli S, De Rosa V, de Candia P. The multifaceted interface between cytokines and microRNAs: an ancient mechanism to regulate the good and the bad of inflammation [J/OL]. *Front Immunol*, 2018, 9: 3012 [2021-12-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6308157/>. DOI: 10.3389/fimmu.2018.03012.
- Wang X, Xin S, Wang Y, et al. MicroRNA-146a-5p enhances T helper 17 cell differentiation via decreasing a disintegrin and metalloprotease 17 level in primary sjögren's syndrome [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 310-324. DOI: 10.1080/21655979.2020.1870321.
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector Th<sub>17</sub> and regulatory T cells [J]. *Nature*, 2006, 441(7090): 235-238. DOI: 10.1038/nature04753.
- Zielinski CE, Mele F, Aschenbrenner D, et al. Pathogen-induced human Th<sub>17</sub> cells produce IFN- $\gamma$  or IL-10 and are regulated by IL-1 $\beta$  [J]. *Nature*, 2012, 484(7395): 514-518. DOI: 10.1038/nature10957.
- van de Veerdonk FL, Netea MG, Dinarello CA, et al. Inflammation activation and IL-1 $\beta$  and IL-18 processing during infection [J]. *Trends Immunol*, 2011, 32(3): 110-116. DOI: 10.1016/j.it.2011.01.003.
- Maddur MS, Miossec P, Kaveri SV, et al. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies [J]. *Am J Pathol*, 2012, 181(1): 8-18. DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.03.044.

[30] Wei Y, Chen S, Sun D, et al. miR-223-3p promotes autoreactive T<sub>H</sub>17 cell responses in experimental autoimmune uveitis (EAU) by inhibiting transcription factor FOXO3 expression [J/OL]. FASEB J, 2019, 33(12): 13951-13965 [2021-12-09]. <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1096/fj.201901446R>. DOI:10.1096/fj.201901446R.

[31] Yan L, Hu F, Yan X, et al. Inhibition of microRNA-155 ameliorates experimental autoimmune myocarditis by modulating Th17/Treg

immune response[J]. J Mol Med (Berl), 2016, 94(9): 1063-1079. DOI:10.1007/s00109-016-1414-3.

(收稿日期:2021-12-26 修回日期:2022-06-14)

(本文编辑:刘艳 施晓萌)

## · 病例报告 ·

# 葡萄膜炎合并全身结核病不当应用阿达木单抗治疗 2 例

孙露丹 朱婕 朱俊 虞晶 陈放

江苏省苏北人民医院眼科,扬州 225001

通信作者:陈放,Email:cfyzsbyy@163.com

基金项目:2020 年扬州市社会发展计划项目(YZ2020112)

### Uveitis complicated with systemic tuberculosis associated with inappropriate adalimumab therapy: two case reports

Sun Ludan, Zhu Jie, Zhu Jun, Yu Jing, Chen Fang

Department of Ophthalmology, Northern Jiangsu People's Hospital of Jiangsu Province, Yangzhou 225001, China

Corresponding author: Chen Fang, Email: cfyzsbyy@163.com

Fund program: Yangzhou Science and Technology Development Plan Project (YZ2020112)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20220506-00196

例 1,患者,男,56 岁,因咳嗽、发热 10 d 于 2020 年 5 月 28 日收入江苏省苏北人民医院呼吸科。患者诉 3 个月前在外院诊断双眼小柳-原田病,先后予以全身糖皮质激素、环孢素、阿达木单抗治疗,但仍反复发作。眼科会诊:最佳矫正视力(best corrected visual acuity, BCVA)右眼 0.3,左眼 1.0,双眼角膜透明, KP(-),房水闪辉(+),玻璃体轻度混浊,右眼后极部视网膜水肿(图 1A),左眼后极部视网膜静脉稍迂曲扩张(图 1B)。光相干断层扫描(optical coherence tomography, OCT)结果示双眼视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)层有高反射物质沉积,右眼黄斑区视网膜浆液性脱离(图 1C, D)。荧光素眼底血管造影(fluorescein fundus angiography, FFA)和吲哚菁绿血管造影(indocyanine green angiography, ICGA)检查示双眼多灶性脉络膜炎,双眼视网膜血管炎(图 1E, F)。入院后呼吸科检查:T 细胞斑点检测(T cell spot test, T-SPOT)阳性;支气管镜活检结果示左主、左上下支支气管结核(炎症浸润+肉芽增生型),痰结核分枝杆菌 DNA(+). 诊断:活动性肺结核,双眼结核相关葡萄膜炎。追问病史,患者首诊原田病使用糖皮质激素治疗前 T-SPOT 阳性,未处理。患者转传染病医院予以正规抗结核治疗,并停用糖皮质激素、环孢素、阿达木单抗。抗结核治疗后 2 周复查,双眼 BCVA 1.0,右眼前房闪辉(-),OCT 提示右眼黄斑区浆液性视网膜脱离已复位(图 1G)。患者经正规抗结核治疗后 3 个月复查,肺部活动性结核病灶稳定,双眼视力 1.0, RPE 层高反射物质较前减少;1 年后停药,随访近 1 年未复发。

例 2,患者,女,28 岁,因双眼反复发红、视物模糊 1 个月于 2021 年 3 月 16 日就诊。患者 1 年前因左眼虹膜睫状体炎在江苏省苏北人民医院就诊, FFA 提示左眼视盘高荧光, OCT 未见明显异常(图 2A, B);血清 HLA-B27 阳性;骶髂关节 CT 示骶髂

关节炎,风湿科诊断强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS),建议生物制剂治疗。治疗前常规筛查发现患者血清 T-SPOT 阳性,结核菌素皮肤试验(PPD 试验)(++),胸部 CT 检查未见明显异常。患者预防性抗结核治疗后 2 个月,风湿科予以阿达木单抗治疗,并停用抗结核药物,治疗后 6 个月,患者开始出现双眼反复发红、视物模糊,局部使用妥布霉素地塞米松滴眼液等治疗无好转。入院后眼部检查:双眼 BCVA 0.5,尘样 KP(+),房水闪辉(++),玻璃体轻度混浊,视盘轻度充血。OCT 示双眼后极部视网膜增厚,黄斑囊样水肿(图 2C);FFA 示双眼视网膜血管弥漫性荧光素渗漏,晚期黄斑囊样水肿,提示双眼视网膜血管炎(图 2D)。再次检测患者血清 T-SPOT 阳性,胸部 CT 检查未见明显异常。诊断:双眼结核相关性葡萄膜炎。遂停用阿达木单抗,转传染病医院进行正规抗结核治疗,未联合使用糖皮质激素等免疫抑制剂治疗。2 周后,患者双眼 BCVA 1.0,玻璃体混浊明显好转, OCT 提示双眼黄斑区神经上皮水肿明显好转(图 2E)。3 个月后, FFA 检查示双眼视网膜血管炎明显好转(图 2F), OCT 示双眼黄斑水肿消失。目前异烟肼、利福平二联抗结核维持治疗中,双眼葡萄膜炎未复发。

讨论:阿达木单抗是目前唯一经美国 FDA 批准用于非感染性葡萄膜炎的肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )抑制剂,随着 TNF- $\alpha$  抑制剂在难治性葡萄膜炎治疗中的广泛应用,患者的生活质量和预后明显改善<sup>[1]</sup>。TNF- $\alpha$  在结核病感染的控制中发挥核心作用,因此 TNF- $\alpha$  抑制剂激活结核感染的风险较高<sup>[2]</sup>,需格外关注 TNF 抑制剂应用过程中结核病的预防与管理问题<sup>[3-4]</sup>。2013 年,《肿瘤坏死因子拮抗剂应用中结核病预防与管理专家共识》发布<sup>[5]</sup>,旨在指导临床医生在使用 TNF 拮抗剂过程中对患者进行结核病的筛查与管理。