

TLR7 激动剂 CL097 对实验性自身免疫性葡萄膜炎中 Th17 细胞活性的促进作用

陈琳 粘红 魏瑞华 张红梅 张晓敏 肖青 李雪 李筱荣

【摘要】 背景 研究表明, Toll 样受体 7 (TLR7) 在自身免疫性疾病中发挥重要作用, 但 TLR7 在实验性自身免疫性葡萄膜炎 (EAU) 中是否通过树突状细胞 (DCs) 调控辅助性 T 淋巴细胞 17 (Th17) 的作用机制鲜见报道。目的 探讨 TLR7 激动剂 CL097 处理的小鼠骨髓树突状细胞 (BMDCs) 对光感受器间维生素 A 类结合蛋白 (IRBP)₁₋₂₀-特异性 Th17 细胞的影响。方法 采用 C57BL/6 小鼠股骨和胫骨分离小鼠骨髓细胞, 将重组小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (rmGM-CSF) 及重组小鼠白细胞介素-4 (rmIL-4) 加入培养基在体外定向诱导 BMDCs, 于诱导后第 6 天在培养基中加入 5 μg/ml CL097 作用 8 h, 对照组加入 PBS, 采用实时荧光定量 PCR 技术检测 CL097 处理组与对照组 BMDCs 中 IL-6、IL-23、IL-1β 及转化生长因子-β (TGF-β) mRNA 的相对表达量。小鼠腹腔内注射百日咳毒素 1 μg, 注射后 2 h 将 IRBP₁₋₂₀ 与等容积含有结核分枝杆菌 HR37RA 的完全弗氏佐剂充分乳化后主动免疫 C57BL/6 小鼠, 眼底检查参照 Caspi 0~4 分标准进行炎症评分。免疫后第 13 天取眼球制作病理切片, 苏木精-伊红染色后行组织病理学检查, 并分离小鼠脾脏及淋巴结中 IRBP₁₋₂₀-特异性 T 细胞, 分别与 CL097 处理组及对照组的 BMDCs 共培养 5 d, 收集细胞, 采用实时荧光定量 PCR 技术检测 2 个组细胞中 IL-17、γ 干扰素 (IFN-γ)、维甲酸相关核孤儿受体 γt (RORγt) 和 T 细胞中表达的 T 盒 21 转录因子 (T-bet) mRNA 的相对表达量; 采用流式细胞仪检测并分析 CL097 处理组和对照组 Th1 与 Th17 细胞比例的变化。结果 EAU 模型成功建立。实时荧光定量 PCR 检测结果显示, CL097 处理组 BMDCs 中 IL-6、IL-23、IL-1β mRNA 的相对表达量明显高于对照组, 差异均有统计学意义 ($t=4.560, P=0.045$; $t=5.476, P=0.032$; $t=17.240, P=0.003$), 而 TGF-β mRNA 相对表达量明显低于对照组, 差异有统计学意义 ($t=10.410, P=0.009$)。CL097 处理组 BMDCs 与 IRBP₁₋₂₀-特异性 T 细胞共培养后, RORγt 和 IL-17 mRNA 相对表达量较对照组明显升高, 差异均有统计学意义 ($t=8.844, P=0.012$; $t=8.831, P=0.013$), 而 CL097 处理组中 T-bet、IFN-γ mRNA 的相对表达量与对照组比较差异均无统计学意义 ($t=2.078, P=0.173$; $t=1.082, P=0.393$)。流式细胞仪检测证实, CL097 处理组 Th17 细胞的百分比为 (17.750±4.793)%, 明显高于对照组的 (10.240±3.173)%, 差异有统计学意义 ($t=4.938, P=0.039$), CL097 处理组和对照组 Th1 细胞的百分比分别为 (1.123±0.356)% 和 (1.060±0.384)%, 差异无统计学意义 ($t=2.714, P=0.113$)。结论 TLR7 激动剂 CL097 促进 BMDCs 分泌与 Th17 细胞极化相关的细胞因子, 并促进 IRBP₁₋₂₀-特异性 Th17 细胞的分化。

【关键词】 Toll 样受体 7/激动剂; CL097; 葡萄膜炎/免疫性; CD4⁺ T 淋巴细胞/分泌; 辅助性 T 细胞 17; 细胞极性/免疫; 炎症因子; 树突状细胞/骨髓源性; C57BL/6 小鼠

Enhancement effect of TLR7 agonist CL097 on the activity of Th17 cells in experimental autoimmune uveitis

Chen Lin, Nian Hong, Wei Ruihua, Zhang Hongmei, Zhang Xiaomin, Xiao Qing, Li Xue, Li Xiaorong. Tianjin Medical University Eye Hospital, Tianjin Medical University Eye Institute, Tianjin Medical University College of Optometry, Tianjin 300384, China

Corresponding author: Li Xiaorong, Email: xiaorli@163.com

【Abstract】 **Background** Toll like receptor 7 (TLR7) has been implicated in the development of autoimmune diseases, but its role in the regulation of T helper cell 17 (Th17) response in experimental autoimmune uveitis (EAU) by dendritic cells (DCs) has not been revealed yet. **Objective** This study was to investigate the effect of bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) treated by TLR7 agonist CL097 on the regulation of interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP)₁₋₂₀-specific Th17 cells response in EAU. **Methods** BMDCs were isolated and collected from femur and tibia of naive C57BL/6 mice and cultured with recombinant mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rmGM-CSF) and recombinant mouse interleukin-4 (rmIL-4).

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.04.002

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81100646); 国家教育部留学回国人员科研启动基金项目 (第 48 批); 天津市自然科学基金面上项目 (13JCYBJC23300); 天津市科委自然科学基金项目 (11JCYBJC26000); 天津医科大学校级基金项目 (2013kyQ10)

作者单位: 300384 天津医科大学眼科医院 天津医科大学眼科研究所 天津医科大学眼视光学院

通信作者: 李筱荣, Email: xiaorli@163.com

After cultured for six days, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CL097 was added into the medium for 8 hours in the CL097 treated group, and PBS was used in the control group. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) was employed to detect the relative expressions of IL-6, IL-23, IL-1 β and transforming growth factor- β (TGF- β) mRNA in BMDCs. These mice received 1 μg of Bordetella pertussis toxin intra-peritoneally on the day of immunization, C57BL/6 mice were immunized with IRBP₁₋₂₀ in complete Freund adjuvant containing heat-killed mycobacterium tuberculosis H37RA after two hours, EAU was evaluated by fundus examination on a scale of 0-4 reported by Caspi. Eyes harvested at 13 days after active immunization were processed for histopathological examination and stained with hematoxylin and eosin. IRBP₁₋₂₀-specific T cells were isolated from spleen cells and lymph node cells on the thirteenth day after immunization and co-cultured with CL097 treated or untreated BMDCs. After co-cultured for 5 days, cells were collected. Then, the relative expressions of IL-17, interferon- γ (IFN- γ), retinoic acid-related orphan receptor- γ t (ROR γ t), T-box 21 transcription factor (T-bet) mRNA expression in T cells were tested by RT-qPCR. Percentages of Th1 cells and Th17 cells were assessed by flow cytometry. The results were compared between the two groups by independent sample *t* test. **Results** EAU model was successfully established. Compared with the control group, the expressions of IL-6, IL-23, IL-1 β mRNA in BMDCs were significantly much higher, but the expression of TGF- β was much lower in the CL097 treated group than those in the control group ($t = 4.560, P = 0.045$; $t = 5.476, P = 0.032$; $t = 17.240, P = 0.003$; $t = 10.410, P = 0.009$). After IRBP₁₋₂₀-specific T cells co-cultured with CL097-treated BMDCs, the expressions of ROR γ t mRNA and IL-17 mRNA were significantly higher than those of the control group ($t = 8.844, P = 0.012$; $t = 8.831, P = 0.013$), but no significant differences were seen in the expressions of T-bet mRNA and IFN- γ mRNA between the CL097 treated group and the control group ($t = 2.078, P = 0.173$; $t = 1.082, P = 0.393$). The flow cytometry revealed that the average percentages of Th17 cells were (17.750 \pm 4.793)% in the CL097 treated group and (10.240 \pm 3.173)% in the control group, showing a significant difference between them ($t = 4.938, P = 0.039$); while the average percentages of Th1 cells were not significantly different between the two groups ([1.123 \pm 0.356]% versus [1.060 \pm 0.384]%) ($t = 2.714, P = 0.113$). **Conclusions** TLR7 agonist CL097 can stimulate BMDCs to secrete Th17-polarizing cytokines and promote the differentiation of Th17 cells.

[Key words] Toll-like receptor 7/agonist, CL097; Uveitis/immunology; CD4-positive T-lymphocytes/secretion; T helper cell 17; Cell polarity/immunology; Inflammation mediators; Dendritic cells/bone marrow-derived; C57BL/6 mouse

Toll样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 是天然免疫系统中一类重要的模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs), 能特异性识别病原微生物进化过程中高度保守的病原相关分子模式。迄今为止, 在人类已经发现的 TLRs 有 10 种 (TLR1-10), 而在小鼠中表达的有 12 种 (TLR1-9 和 TLR11-13)^[1-2], 其中 TLR7 是一种表达于细胞内体膜表面的跨膜信号传导受体, 广泛存在于体内免疫细胞中, 尤以树突状细胞 (dendritic cells, DCs) 为主。作为能识别病毒单链 RNA 以及某些小分子抗病毒化合物的 PRRs^[3], TLR7 可通过调控 DCs 的成熟过程、产生细胞因子、刺激初始 T 细胞向辅助性 T 淋巴细胞 17 (T helper cell 17, Th17)、Th1 等不同的细胞亚群分化^[4-5] 而介导免疫应答反应。近年来的研究表明, Th17 细胞与多种自身免疫性疾病, 如白癜风^[6]、胶原诱导性关节炎^[7-8]、实验性自身免疫性葡萄膜炎 (experimental autoimmune uveitis, EAU)^[9-10] 等的发病机制密切相关。TLR7 在一些自身免疫性疾病的发展过程中可影响 Th17 细胞的分化, 如原发性胆管炎中 TLR5、TLR7 的激活可通过 TLR 信号通路诱导 Th17 细胞的产生, 从而增强 Th17 细胞的免疫应答反应^[11]。近来的研究还显示, TLR7 激动剂 imiquimod 诱导的银屑病小鼠背部表皮上白细胞介素-23 (interleukin-23, IL-23)、IL-17A、IL-17F 的表达增加,

且其脾脏中 Th17 细胞增多^[12], 但目前 TLR7 对 EAU 中 Th17 细胞的作用及调控机制还鲜见报道。CL097 属于咪唑并喹啉家族成员, 是 TLR7 的激动剂, 本研究主要观察经 CL097 处理的骨髓树突状细胞 (bone marrow-derived dendritic cells, BMDCs) 对 EAU 中光感受器间维生素 A 类结合蛋白 (interphotoreceptor retinoid-binding protein, IRBP)₁₋₂₀-特异性 Th17 细胞的影响, 并探讨其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂及仪器 胎牛血清 (美国 Gibco 公司); RPMI-1640 培养基 (美国 Hyclone 公司); 重组小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (recombinant mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, rmGM-CSF)、重组小鼠 IL-4 (recombinant mouse IL-4, rmlL-4) (美国 R&D 公司); CL097、Trizol (美国 Invivogen 公司); 逆转录试剂盒 (美国 Thermo 公司); 实时荧光逆转录 PCR 试剂盒 (美国 Roche 公司); IRBP₁₋₂₀ 多肽片段由上海生物工程股份有限公司合成; 佛波醇 12-十四酸酯 13-乙酸酯 (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)、布雷菲尔得菌素 A (Brefeldin A, BFA)、inomycin (美国 Sigma 公司); 结核分枝杆菌 H37RA (美国 Difco

公司);固定剂、破膜剂(美国 eBioscience 公司);异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的抗小鼠 IL-17 流式抗体(FITC-IL-17)(506907#, 稀释比例 1:100)、巯基化藻红蛋白(phycoerythrin, PE)标记的抗小鼠 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)流式抗体(PE-IFN- γ)(505807#, 稀释比例 1:100)(美国 Biolegend 公司)。ABI 7900HT real-time PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司);FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.1.2 实验动物 清洁级健康雌性 8~10 周龄 C57BL/6 小鼠由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供,体质量 20~22 g。实验动物的使用遵循天津市科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》,并通过天津医科大学动物伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 BMDCs 的制备 颈椎脱臼法处死 C57BL/6 小鼠,在体积分数 75% 乙醇中浸泡 5 min,无菌操作下取出小鼠双下肢股骨和胫骨,置于 RPMI-1640 培养基中,剪去骨两端,用 1 ml 无菌注射器吸取 RPMI-1640 培养基反复冲洗骨髓腔,直至骨髓腔发白,收集并吹打均匀细胞悬液,用棉花柱过滤肌肉组织和骨碎片,离心半径 15 cm,4 $^{\circ}$ C 条件下、1 221 r/min 离心 5 min,弃上清。用新鲜的完全培养基(含质量分数 10% 胎牛血清及体积分数 0.2% β -巯基乙醇)重悬骨髓细胞并接种于 24 孔板中,细胞密度为 1×10^6 /ml,每孔加入细胞因子 rmGM-CSF 和 rmIL-4,质量浓度均为 10 ng/ml,放置于 37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5% CO_2 的细胞培养箱中进行培养。体外培养 3 d 后换液,并补充细胞因子,继续培养至第 6 天,应用流式细胞仪进行检测,显示细胞表面活化分子 CD11c 表达阳性率约为 90%。

1.2.2 EAU 模型的建立以及 IRBP₁₋₂₀-特异性 T 细胞的制备 小鼠腹腔内注射 1 μ g 百日咳毒素,注射后 2 h,用 150 μ l 含 150 μ g IRBP₁₋₂₀ 的 PBS 及等容积含 0.8 mg 结核分枝杆菌 HR37RA 的完全弗氏佐剂充分乳化,将其注射于 C57BL/6 小鼠的单后足垫及背部皮下建立 EAU 模型。免疫后第 13 天,将小鼠双眼扩瞳,利用间接检眼镜进行眼底检查,并对 EAU 病变程度进行评分^[13],取眼球制作石蜡切片,行苏木精-伊红染色,依照 Caspi 0~4 分的评分标准进行评分^[13],鉴定 EAU 模型是否成功建立。同时摘取小鼠脾脏和淋巴结,研磨后用尼龙柱过滤,分离出 IRBP₁₋₂₀-特异性 T 细胞。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 法检测各种相关因子基因的相对表达 于 BMDCs 中加入终质量浓度为 5 μ g/ml 的 TLR7 激动剂 CL097 作为 CL097 组,另一组加入等容积的 PBS,培养后 8 h 收集细胞,一部分用于提取

BMDCs 的总 RNA,另一部分细胞分别与 IRBP₁₋₂₀-特异性 T 细胞共培养,5 d 后收集共培养细胞并提取总 RNA。总 RNA 的提取及 real-time PCR 步骤如下:加入 1 ml Trizol 试剂,置于无 RNA 酶的 PCR 管中,再加入 0.2 ml 氯仿/1 ml Trizol 分离 RNA,剧烈振荡、混匀并静置 15 min;离心半径 8 cm,4 $^{\circ}$ C 条件下、12 000 r/min 离心 15 min,吸取上层无色水样层,并加入与无色水样层等容积的异丙醇沉淀 RNA,室温下静置 10 min;离心半径 8 cm,4 $^{\circ}$ C 条件下、12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,再用 75% 无水乙醇洗涤 RNA;离心半径 8 cm,4 $^{\circ}$ C 条件下、10 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,空气干燥 10 min,加 20 μ l 焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate, DEPC)水溶解 RNA 沉淀。1 μ g RNA 在逆转录酶的作用下合成 cDNA,以 cDNA 为模板,经 ABI 7900HT real-time PCR 仪行 PCR 扩增,IL-6、IL-23、IL-1 β 、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、IL-17、IFN- γ 、维甲酸相关核孤儿受体 γ t(retinoic acid related orphan receptor- γ t, ROR γ t)、T 盒 21 转录因子(T-box 21 transcription factor, T-bet)各引物序列见表 1,以 GAPDH 为内参,引物由苏州金维智生物有限公司合成。每组包含 SYBR Green PCR Master Mix 4 μ l,上下游引物各 1 μ l,cDNA 2 μ l,进行 8 μ l 定量的 PCR。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min,95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s,40 个循环。根据荧光定量 PCR 仪给出的相应 Ct 值以及公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 得到目的基因的相对表达水平。实验重复 3 次。

表 1 引物序列

基因	引物序列
GAPDH	F:5'-CATGGCCTTCCTGTCCTA-3' R:5'-GCCGCACGTCAGATCCA-3'
IL-6	F:5'-CCACGGCCTTCCCTACTTC-3' R:5'-TTGGGAGTGGTATCCTCTGTGA-3'
IL-23	F:5'-CATAGCTGCCCGGCTCTTT-3' R:5'-GGCACTAAGGGCTCAGTCAGA-3'
IL-1 β	F:5'-AGTTGACGGACCCCAAAAGA-3' R:5'-GGACAGCCAGGTCAAAGG-3'
TGF- β	F:5'-CAGCTTTGCTCACTGCAGTACA-3' R:5'-TGGCCGCCTCTAACGATATC-3'
IL-17	F:5'-CCTGGCGGCTACAGTGAAG-3' R:5'-TTTGGACACGCTGAGCTTTG-3'
IFN- γ	F:5'-TTGGCTTTGCAGCTCTTCT-3' R:5'-TGACTGTGCCGTGGCAGTA-3'
ROR γ t	F:5'-CCTCAGCGCCCTGTGTTTT-3' R:5'-GAGAACCAGGGCCGTGTA-3'
T-bet	F:5'-ACCTGTTGTGGTCCAAGTTCAA-3' R:5'-GCCGTCCTTGCTTAGTGATGA-3'

注:GAPDH:磷酸甘油醛脱氢酶;IL:白细胞介素;TGF:转化生长因子;IFN- γ : γ 干扰素;ROR:维甲酸相关核孤儿受体;T-bet:T 盒 21 转录因子

1.2.4 流式细胞仪检测各组 Th17 和 Th1 细胞的百分比 参照 Nian 等^[14]的方法,将 IRBP₁₋₂₀-特异性 T 细胞分别与 CL097 处理组和对照组 BMDCs 共培养 5 d 后收集的细胞中加入含有 50 ng/ml PMA、1 μg/ml BFA 和 1 μg/ml inomycin 的刺激液,在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中刺激 4 h;离心半径 15 cm,4 °C 条件下、1 500 r/min 离心 8 min,弃上清液,加入固定剂和破膜剂后于 4 °C 条件下避光过夜;离心半径 15 cm,4 °C 条件下、1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,洗涤重悬细胞 3 次,加入抗小鼠 FITC-IL-17、PE-IFN-γ 抗体,4 °C 避光孵育 2 h,洗涤重悬细胞,应用 FACSCalibur 流式细胞仪检测。实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 统计学软件 (Version 5.01, 加拿大 GraphPad Software 公司) 进行统计分析。本研究测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数经 Levene 检验证实方差齐。采用单因素干预均衡分组两水平实验设计,CL097 处理组与对照组间 BMDCs 中各种相关因子基因的相对表达、Th17 及 Th1 细胞相关基因的相对表达和 Th17 及 Th1 细胞百分比的差异比较均采用独立样本 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EAU 模型的建立

主动免疫 C57BL/6 小鼠的第 13 天,小鼠眼底表现为视盘边缘模糊,轻微的血管炎,评为 1 分。眼球组织病理学切片示,视网膜可见少量炎性细胞浸润以及局部轻微的视网膜皱褶,炎症评分为 1 分(图 1)。

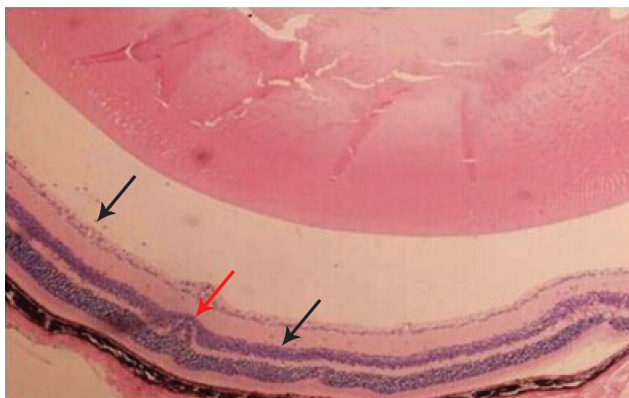


图 1 主动免疫 C57BL/6 小鼠后第 13 天眼球的组织病理学表现 (HE ×200) 视网膜及玻璃体腔内可见少量炎性细胞(黑箭头),局部视网膜轻微皱褶(红箭头)

2.2 各组 BMDCs 中 IL-6、IL-23、IL-1β、TGF-β mRNA 的相对表达量

CL097 刺激后 8 h, BMDCs 中 IL-6、IL-23、IL-1β mRNA 的相对表达量分别为 4.578 ± 1.359、16.170 ± 4.799 和 75.310 ± 7.466,显著高于对照组的 1.000 ± 0.000、1.000 ± 0.000、1.000 ± 0.000,差异均有统计学意义 (IL-6: *t* = 4.560, *P* = 0.045; IL-23: *t* = 5.476, *P* = 0.032; IL-1β: *t* = 17.240, *P* = 0.003); CL097 处理组 BMDCs 中 TGF-β mRNA 的相对表达量为 0.497 ± 0.084,明显低于对照组的 1.000 ± 0.000,差异有统计学意义 (*t* = 10.410, *P* = 0.009) (图 2)。

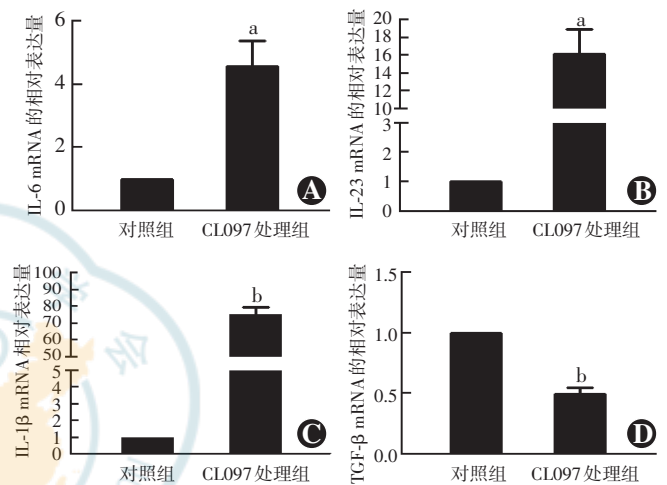


图 2 各组 BMDCs 中 IL-6、IL-23、IL-1β 和 TGF-β mRNA 相对表达量的比较 (独立样本 *t* 检验, *n* = 3) A: 2 个组 IL-6 mRNA 的相对表达量比较 与对照组比较, ^a*P* < 0.05 B: 2 个组 IL-23 mRNA 的相对表达量比较 与对照组比较, ^a*P* < 0.05 C: 2 个组 IL-1β mRNA 的相对表达量比较 与对照组比较, ^b*P* < 0.01 D: 2 个组 TGF-β mRNA 的相对表达量比较 与对照组比较, ^b*P* < 0.01 注: IL: 白细胞介素; TGF: 转化生长因子

2.3 各组 BMDCs 对 Th17 及 Th1 细胞分化的影响

IRBP₁₋₂₀-特异性 T 细胞分别与 CL097 处理组和对照组 BMDCs 共培养后 5 d, CL097 处理组 Th17 细胞的阳性百分比明显高于对照组,差异有统计学意义 (*t* = 4.938, *P* = 0.039), CL097 处理组 Th1 细胞的阳性百分比稍高于对照组,但 2 个组间差异无统计学意义 (*t* = 2.714, *P* = 0.113) (表 2, 图 3)。

组别	样本量	Th17 细胞	Th1 细胞
对照组	3	10.240 ± 3.173	1.060 ± 0.384
CL097 处理组	3	17.750 ± 4.793	1.123 ± 0.356
<i>t</i>		4.938	2.714
<i>P</i>		0.039	0.113

注: Th: 辅助性 T 淋巴细胞 (独立样本 *t* 检验)

2.4 各组 IRBP₁₋₂₀-特异性 T 细胞中 RORγt、IL-17、T-bet 和 IFN-γ mRNA 的相对表达量

CL097 处理组和对照组 BMDCs 分别与 IRBP₁₋₂₀-

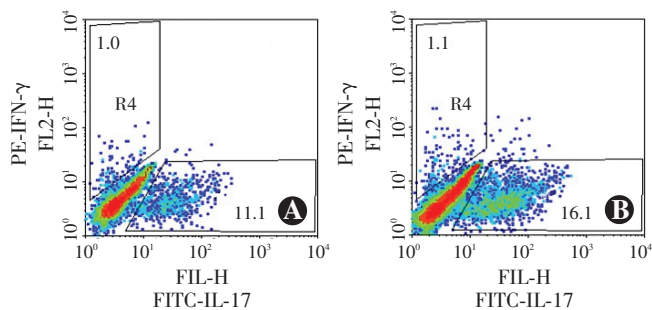


图 3 CL097 处理组和对照组中 Th17 及 Th1 细胞的百分比 A: 对照组 B: CL097 处理组 注: PE-IFN- γ : 羧基藻红蛋白标记的 γ 干扰素; FITC-IL-17: 异硫氰酸荧光素标记的白细胞介素-17

特异性 T 细胞共培养后 5 d, CL097 处理组中 ROR γ t、IL-17 mRNA 的相对表达量分别为 1.463 ± 0.091 和 1.927 ± 0.182 , 显著高于对照组的 1.000 ± 0.000 和 1.000 ± 0.000 , 差异均有统计学意义 (ROR γ t: $t = 8.844$, $P = 0.012$; IL-17: $t = 8.831$, $P = 0.013$); CL097 处理组中 T-bet、IFN- γ mRNA 的相对表达量分别为 1.120 ± 0.100 和 1.113 ± 0.181 , 稍高于对照组的 1.000 ± 0.000 和 1.000 ± 0.000 , 但差异均无统计学意义 (T-bet: $t = 2.078$, $P = 0.173$; IFN- γ : $t = 1.082$, $P = 0.393$) (图 4)。

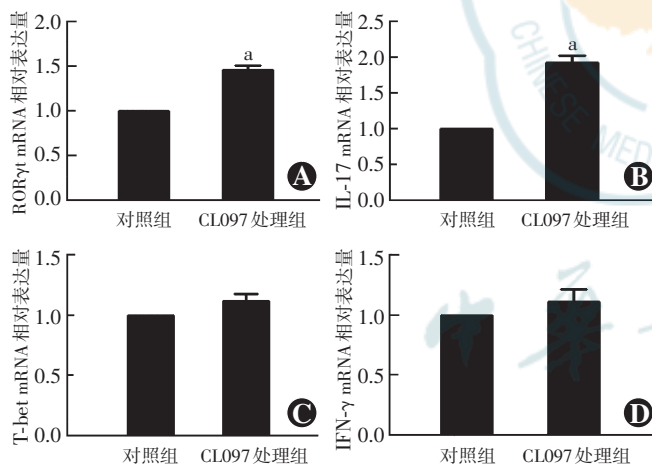


图 4 CL097 处理组和对照组中 Th17 及 Th1 细胞相关基因相对表达量的比较 (独立样本 t 检验, $n = 3$) A: 2 个组中 ROR γ t mRNA 的相对表达量比较 与对照组比较, $^a P < 0.05$ B: 2 个组中 IL-17 mRNA 的相对表达量比较 与对照组比较, $^a P < 0.05$ C: 2 个组中 T-bet mRNA 的相对表达量比较 2 个组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$) D: 2 个组中 IFN- γ mRNA 的相对表达量比较 2 个组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$) 注: ROR: 维甲酸相关核孤儿受体; IL: 白细胞介素; T-bet: T 盒 21 转录因子; IFN- γ : γ 干扰素

3 讨论

葡萄膜炎是临床上常见的难治性致盲眼病, 其发病机制主要与自身免疫系统紊乱相关。目前, 研究人类自身免疫性后葡萄膜炎最理想的动物模型是 EAU, 其病变部位主要在视网膜和葡萄膜。长期以来, 人们认为在 EAU 的发病过程中, 主要致病性 T 细胞亚群是

Th1 细胞, 它主要分泌的细胞因子是 IFN- γ , 但最新研究认为能够特异性分泌 IL-17 的 Th17 细胞在 EAU 中起着更为重要的作用^[9-10]。近年来, 在自身免疫性疾病中关于 Th17 细胞分化的报道较多, 但其中有关 TLR7 如何影响抗原特异性 Th17 细胞的研究较少, 尤其对 TLR7 在 EAU 中影响 IRBP₁₋₂₀-特异性 Th17 细胞的作用机制还未见报道。本研究结果发现, 在 EAU 中 TLR7 可以通过 BMDCs 促进 IRBP₁₋₂₀-特异性 Th17 细胞的分化。

TLR7 在自身免疫性疾病中调控 Th17 细胞的作用机制非常复杂, 目前已报道的一些研究认为, TLR7 的活化能够刺激 DCs 分泌炎症细胞因子, 使初始 T 细胞向不同的 T 细胞亚群分化, 增强免疫反应, 从而导致自身免疫性疾病的发生或加重, 如 TLR7 激动剂 loxoribine 可以通过人单核细胞来源的树突状细胞 (monocyte-derived dendritic cells, MoDCs) 上调 TLR7 的表达, 并促进 IL-23、IL-12 等炎症细胞因子的产生。当 MoDCs 与 T 细胞共培养后, 产生的 IL-17 及 IFN- γ 增多, 提示 TLR7 表达的上调可以诱导人 MoDCs 成熟, 并提高其促使初始 T 细胞向 Th1 及 Th17 细胞极化的能力^[15]。Yu 等^[16] 研究认为, 浆细胞样树突状细胞 (plasmacytoid dendritic cells, PDCs) 在 TLR7 活化后可以促进 Th17 细胞的分化以及增强记忆性 Th17 细胞的效应。本实验研究结果与上述结论基本一致, 但 Vultaggio 等^[17] 研究认为, 在小鼠哮喘模型中, TLR7 激动剂 SA-2 能够下调 Th17 及 Th2 细胞的反应, 推测 SA-2 可以作为一个对抗过敏的新型疫苗配方。这种研究结果的差异可能是因为研究中针对的实验对象的不同, 选用的 TLR7 激动剂以及激动剂作用的方法、部位、时间的长短等不同所导致的。

Th17 细胞的分化依赖于局部微环境, 尤其是 DCs 及其他细胞活化分泌的特定细胞因子, 如 TGF- β 、IL-6、IL-1 β 、IL-23、IL-21 等的调节^[18-19]。TGF- β 是一种多效性的细胞因子, 高浓度的 TGF- β 活化 CD4⁺T 细胞分化为 Treg 细胞, 但低浓度的 TGF- β 可以在炎症细胞因子, 如 IL-6 的存在下, 共同促进 Th17 细胞的分化^[20-21]。本研究结果显示, 体外培养的高纯度 BMDCs 经 CL097 刺激后, IL-6 的表达显著增高, 而 TGF- β 的表达显著降低, 表明 TLR7 激动剂 CL097 干预后的 BMDCs 产生的高水平 IL-6 可能与低水平 TGF- β 协同作用, 从而刺激 Th17 细胞的分化。记忆性 Th17 细胞增生和 IL-17 的产生主要依赖于 IL-23 和 IL-1 β ^[22], 本研究结果显示 IL-23 及 IL-1 β 的表达均有不同程度的升高。由此本研究推测 BMDCs 经 CL097 处理后产生

的高表达 IL-23 及 IL-1 β 已经具备维持 Th17 细胞稳定并促使其产生效应因子的能力。该结果与 Stoppelenburg 等^[23] 研究认为 TLR7 的活化能够促进人类,尤其是新生儿 DCs 分泌与 Th17 细胞极化相关的细胞因子的结果相符,提示 CL097 处理组的 BMDCs 可能可以通过分泌与 Th17 细胞极化相关的细胞因子,影响局部微环境,从而有利于 Th17 细胞的分化。

转录因子在 T 细胞亚群的分化过程中起着非常关键的作用。Th1 细胞的转录因子是 T-bet,而调控 Th17 细胞分化的特征性转录因子是 ROR γ t,它与特异性效应因子 IL-17 的表达和分泌密切相关^[24]。Wei 等^[25] 研究证明,TLR2 激动剂 PGN 处理 BMDCs 后与 IRBP₁₋₂₀-特异性 T 细胞共培养,可以促进与 Th17 细胞相关基因,如 ROR γ t 的表达,从而增强 EAU 中 Th17 细胞的活性。本实验结果发现,IRBP₁₋₂₀-特异性 T 细胞与 CL097 处理组的 BMDCs 共培养后,Th17 细胞相关的 ROR γ t 和 IL-17 在基因水平的相对表达量显著升高,而与 Th1 细胞相关基因 *T-bet* 和 *IFN- γ* 在基因水平上的相对表达量无明显变化;同时,流式细胞仪的结果分析表明经 CL097 干预后,Th17 细胞比例显著高于对照组,而 Th1 细胞比例无明显变化。上述结果表明,CL097 处理组的 BMDCs 不仅可以促进与 Th17 细胞相关基因的表达,而且能够促进 Th17 细胞的分化,但与 Th1 细胞相关基因的表达以及 Th1 细胞的分化无明显关系。

本实验探讨了体外培养的 BMDCs 中 TLR7 活化对 IRBP₁₋₂₀-特异性 Th17 细胞的影响及机制,但 TLR7 的激动剂除 CL097 外,还有 R837、loxoribine 等,他们对 EAU 中 Th17 细胞的作用如何,以及 CL097 干预后的 BMDCs 在 EAU 模型鼠的体内对 Th17 细胞是否有影响,CL097 通过哪些信号通路影响 BMDCs,将来又是否可以通过抑制 TLR7 的活化来缓解 EAU 的发病等,这些问题我们正在研究中。

参考文献

- Uyanga E, Patil AM, Eo SK. Prophylactic and therapeutic modulation of innate and adaptive immunity against mucosal infection of herpes simplex virus [J]. Immune Netw, 2014, 14 (4) : 187-200. doi: 10.4110/in.2014.14.4.187.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors [J]. Annu Rev Immunol, 2003, 21 : 335-376. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126.
- Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, et al. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101 (15) : 5598-5603. doi: 10.1073/pnas.0400937101.
- Mazzoni A, Segal DM. Controlling the Toll road to dendritic cell polarization [J]. J Leukoc Biol, 2004, 75 (5) : 721-730. doi: 10.1189/jlb.1003482.
- Lombardi V, Van Overtvelt L, Horiot S, et al. Human dendritic cells stimulated via TLR7 and/or TLR8 induce the sequential production of IL-10, IFN- γ , and IL-17A by naive CD4⁺ T cells [J]. J Immunol, 2009, 182 (6) : 3372-3379. doi: 10.4049/jimmunol.0801969.
- Wang CQ, Cruz-Inigo AE, Fuentes-Duculan J, et al. Th17 cells and activated dendritic cells are increased in vitiligo lesions [J/OL]. PLoS One, 2011, 6 (4) : e18907 [2014-06-10]. http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0018907. doi: 10.1371/journal.pone.0018907.
- Nakae S, Nambu A, Sudo K, et al. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice [J]. J Immunol, 2003, 171 (11) : 6173-6177. doi: 10.4049/jimmunol.171.11.6173.
- Nakae S, Saijo S, Horai R, et al. IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100 (10) : 5986-5990. doi: 10.1073/pnas.1035999100.
- Peng Y, Han G, Shao H, et al. Characterization of IL-17⁺ interphotoreceptor retinoid-binding protein-specific T cells in experimental autoimmune uveitis [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48 (9) : 4153-4161. doi: 10.1167/iovs.07-0251.
- 李洋, 崔彦, 毕宏生, 等. 白细胞介素-2 与白细胞介素-23 对小鼠类结合蛋白特异性 T 细胞向 Th1、Th17 分化的诱导及致病性研究 [J]. 中华眼科杂志, 2013, 49 (3) : 224-229. doi: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.
- Katt J, Schwinge D, Schoknecht T, et al. Increased T helper type 17 response to pathogen stimulation in patients with primary sclerosing cholangitis [J]. Hepatology, 2013, 58 (3) : 1084-1093. doi: 10.1002/hep.26447.
- van der Fits L, Mourits S, Voerman JS, et al. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis [J]. J Immunol, 2009, 182 (9) : 5836-5845. doi: 10.4049/jimmunol.0802999.
- Caspi RR. Experimental autoimmune uveoretinitis in the rat and mouse [J/OL]. Curr Protoc Immunol, 2003, Chapter 15 : Unit 15.6 [2014-06-24]. http://online.library.wiley.com/doi/10.1002/0471142735.im1506s53/full. doi: 10.1002/0471142735.im1506s53.
- Nian H, Liang D, Zuo A, et al. Characterization of autoreactive and bystander IL-17⁺ T cells induced in immunized C57BL/6 mice [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53 (2) : 897-905. doi: 10.1167/iovs.11-8297.
- Dzopalic T, Dragicvic A, Vasilijic S, et al. Loxoribine, a selective Toll-like receptor 7 agonist, induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells and stimulates their Th-1- and Th-17-polarizing capability [J]. Int Immunopharmacol, 2010, 10 (11) : 1428-1433. doi: 10.1016/j.intimp.2010.08.010.
- Yu CF, Peng WM, Oldenburg J, et al. Human plasmacytoid dendritic cells support Th17 cell effector function in response to TLR7 ligation [J]. J Immunol, 2010, 184 (3) : 1159-1167. doi: 10.4049/jimmunol.0901706.
- Vulliamgi A, Nencini F, Pratesi S, et al. The TLR7 ligand 9-benzyl-2-butoxy-8-hydroxy adenine inhibits IL-17 response by eliciting IL-10 and IL-10-inducing cytokines [J]. J Immunol, 2011, 186 (8) : 4707-4715. doi: 10.4049/jimmunol.1002398.
- Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor ROR γ [J]. Nat Immunol, 2008, 9 (6) : 641-649. doi: 10.1038/ni.1610.
- Steinman RM, Hawiger D, Liu K, et al. Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance [J]. Ann N Y Acad Sci, 2003, 987 : 15-25. doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb06029.x.
- Zhou L, Lopes JE, Chong MM, et al. TGF- β -induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing ROR γ function [J]. Nature, 2008, 453 (7192) : 236-240. doi: 10.1038/nature06878.
- Betelli 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.
- Sutton C, Brereton C, Keogh B, et al. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis [J]. J Exp Med, 2006, 203 (7) : 1685-1691. doi: 10.1084/jem.20060285.
- Stoppelenburg AJ, de Roock S, Hennis MP, et al. Elevated Th17 response in infants undergoing respiratory viral infection [J]. Am J Pathol, 2014, 184 (5) : 1274-1279. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.01.03.
- Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells [J]. Cell, 2006, 126 (6) : 1121-1133. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.035.
- Wei R, Dong L, Xiao Q, et al. Engagement of TLR2 enhances IL-17 autoreactive T cell responses via p38 MAPK signaling in dendritic cells (DCs) [J]. Clin Exp Immunol, 2014, 178 (2) : 353-363. doi: 10.1111/cei.12405.

(收稿日期: 2014-10-24)

(本文编辑: 尹卫靖)