

【实验研究】

钱丽丽 徐亚茹 胡芳 官杰 吴艳敏 王琪

【摘要】 目的 探讨辅助性 T 细胞(T helper cells,Th)1、Th17 细胞相关因子在实验性自身免疫性葡萄膜炎(experimental autoimmune uveitis,EAU)中的表达及作用。方法 取清洁级纯系健康雌性 Lewis 大鼠 40 只随机分为 EAU 组(32 只)和对照组(8 只),EAU 组用光感受器间维生素 A 类结合蛋白诱导大鼠 EAU 模型,进行临床症状评分,免疫组织化学方法检测造模后视网膜内干扰素(interferon,IFN)- γ 、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase,iNOS)、白细胞介素(interleukine,IL)-17、IL-6 的表达。ELISA 法对比分析房水中各细胞因子的变化情况。结果 EAU 模型建立成功;造模后第 14 天,视网膜损害以外层为主,视网膜内有大量炎细胞浸润,从而导致视网膜内结构紊乱,同时在视网膜的 IL-17、IL-6、IFN- γ 表达,细胞阳性率分别为 29%、48%、52%、73%。在 EAU 发病过程中,IL-17 达到高峰;IL-17 于造模后第 14 天达到最高值,变化趋势与炎症进程一致;IFN- γ 在炎症早期最高值;IL-6、IL-17、IFN- γ 与对照组相比,各时间点表达差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)。结论 辅助性 T 细胞 17 亚群参与实验性自身免疫性葡萄膜炎的发生发展。

性作用。本文通过建立实验性自身免疫性葡萄膜炎 (experimental autoimmune uveitis, EAU) 动物模型, 检测干扰素 (interferon, IFN)- γ 、诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS)、白细胞介素

(interleukine, IL)-6、IL-17 在视网膜及房水中的表达情况,探讨辅助性 T 细胞(T helper cells, Th)1、Th17 细胞相关因子调节网络在自身免疫性疾病中的意义,为研究自身免疫性疾病的发病机制,预防和治疗人类葡萄膜炎提供新思路。

1 材料与方法

1.1 研究对象 清洁级纯系健康雌性 Lewis 大鼠 40 只(北京维通利华实验动物技术有限公司),5~6 周龄,体质量 160~180 g。每只动物造模前均经裂隙灯检查双眼,排除眼病。

1.2 实验材料 光感受器间维生素 A 类结合蛋白(杭州中肽生化有限公司,中国),兔抗鼠 IFN- γ (Santa Cruz,美国),兔抗鼠 iNOS(Santa Cruz,美国),兔抗鼠 IL-6(Santa Cruz,美国),兔抗鼠 IL-17(Santa Cruz,美国),大鼠 IFN- γ 、iNOS、IL-6、IL-17 ELISA 试剂盒(TPI, Inc,美国)。

1.3 EAU 模型的建立 取 Lewis 大鼠随机分为 EAU 组(32 只)和对照组(8 只)。将卡介苗用稀释液溶解加入完全弗氏佐剂中,再将 50 μ g 光感受器间维生素 A 类结合蛋白抗原肽稀释,加入混有卡介苗的完全弗氏佐剂中充分混匀至乳剂,制成抗原混合物备用。大鼠腹腔注射 50 g \cdot L⁻¹水合氯醛,EAU 组每只大鼠左右足垫皮下各注射抗原混合物 0.1 mL,对照组每只大鼠左右足垫皮下各注射生理盐水与完全弗氏佐剂混合物 0.1 mL,同时两组大鼠每只腹腔注射 100 μ L 紫杉醇(1 μ g)。

1.4 EAU 临床评分 每天用裂隙灯显微镜进行眼部检查,依据评分标准^[1]判定发病程度:0 分:无异常症状,对光反射正常;0.5 分:虹膜血管扩张;1 分:虹膜血管充血,瞳孔收缩异常;2 分:眼前房浑浊,模糊,对光反射减弱;3 分:眼前房中度不透光,瞳孔仍然可见,对光反射迟钝;4 分:眼前房不透光,瞳孔消失,对光反射消失,眼球突出。

1.5 免疫组织化学检测 IFN- γ 、iNOS、IL-6、IL-17

采用免疫组织化学链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结法(SP 法)检测高峰期(造模后第 14 天)EAU 组和对照组眼球石蜡切片视网膜内 IFN- γ 、iNOS、IL-6、IL-17 的表达。

1.6 ELISA 法检测房水细胞因子 分别于造模后第 7、10、12、14、16、18 天抽取动物右眼房水,采用细胞因子试剂盒检测 IFN- γ 、iNOS、IL-6、IL-17 浓度。

2 结果

2.1 EAU 模型建立成功 大鼠于造模后第 7 天开始发病,表现为结膜充血,房水轻度浑浊,临床评分为(0.90 \pm 0.13)分;第 10 天、第 12 天炎症逐渐加重,临床评分分别为(1.80 \pm 0.32)分、(2.40 \pm 0.26)分;第 14 天疾病达到高峰期,表现为眼球突出、前房积脓、虹膜后粘连、瞳孔膜闭,临床评分为(3.80 \pm

0.19)分;第 16 天、第 18 天疾病开始恢复,临床评分分别为(2.90 \pm 0.52)分、(1.60 \pm 0.37)分;直到临床症状完全恢复且不复发,疾病临床表现为急性、单向型过程。EAU 组全部发病(发病率 100%),对照组无明显临床症状,说明 EAU 动物模型建立成功。

2.2 EAU 过程中视网膜内 IFN- γ 、iNOS、IL-6、IL-17 的表达 造模后第 14 天,视网膜损害以外层为主,视网膜内有大量炎细胞浸润,从而导致视网膜内结构紊乱,同时,在视网膜的视锥、视杆细胞层和神经节细胞层 iNOS、IL-17、IL-6、IFN- γ 表达,细胞阳性率分别为 29%、48%、52%、73%。

2.3 房水相关细胞因子水平与病程的关系 在 EAU 发病过程中,IL-6 于造模后第 7 天迅速升高,第 10 天达到高峰;IL-17 于造模后第 14 天达到最高值,变化趋势与炎症进程一致;IFN- γ 在炎症后期仍有升高,于造模后第 16 天达到最高值;IL-6、IL-17、IFN- γ 与对照组相比,各时间点表达差异均有统计学意义(均为 $P<0.05$)。iNOS 在炎症进程中表达有所增加,但与对照组相比,各时间点的表达差异均无统计学意义(均为 $P>0.05$)(图 1)。

Figure 1 Levels of cytokines in aqueous humor at different time after modeling 造模后不同时间房水中相关细胞因子水平

3 讨论

EAU 与人类葡萄膜炎的发病过程及临床表现极其相似,诱导 EAU 的视网膜内抗原主要包括视网膜可溶性抗原(S 抗原)、光感受器间维生素 A 类结合蛋白、视网膜抑制蛋白、视紫红质、光传感因子以及视网膜色素上皮层来源的视网膜色素上皮-65 等。本研究通过皮下注射光感受器间维生素 A 类结合蛋白抗原成功诱导了 EAU 模型,通过观察发病症状及病理学检测结果,说明 EAU 动物模型建立成功、结果稳定,为研究人类自身免疫性葡萄膜炎的致病机制及治疗策略奠定了基础。

Th1 细胞是 EAU 的主要致炎细胞群^[2],在葡萄膜炎发生中起关键作用,其标志性细胞因子为 IFN- γ ,IFN- γ 通过激活巨噬细胞和促进 MHC-II 的表达,进而促进器官特异性的自身免疫性疾病的发生^[3]。本研究显示,EAU 大鼠在炎症高峰期 Th1 细

胞反应增强,同时房水 IFN- γ 水平与炎症程度呈正相关,证实了 IFN- γ 的致病性,与文献报道一致。IFN- γ 是已知最强的 iNOS 诱导剂,在人和小鼠的 iNOS 基因启动子上均有 IFN- γ 反应元件,EAU 过程中 iNOS 在视网膜及房水中均有表达,iNOS 可催化产生内源性一氧化氮(nitric oxide, NO),NO 是细胞毒性效应分子,可在炎症性自身免疫性疾病的局部释放,并造成组织损伤,加剧 EAU 发病程度。同时,NO 也是一种重要的 Th1/Th2 平衡调节剂,它可特异性下调 Th1 型细胞因子 IL-2 和 IFN- γ ^[4],因此,推测 IFN- γ 、iNOS 与 NO 形成一个反馈环路,调节 EAU 的发生发展。

一些研究证实 Th17 在葡萄膜炎过程中同样发挥重要作用^[5]。本研究结果显示,对照组眼组织中未发现 IL-17 表达,而 EAU 组 IL-17 主要表达于神经节细胞层,房水细胞因子检测显示,在 EAU 发生、发展和消退过程中,始终伴随着 IL-17 的表达,且其表达水平与疾病进展一致,说明 IL-17 参与了 EAU 的全过程,可能在疾病的启动和维持中发挥关键作用,为 Th17 细胞参与诱导自身免疫提供了依据。在 Th17 细胞产生和分化过程中,IL-6 与 TGF- β 共同诱导 T 细胞向 Th17 细胞分化^[6]。此外,诱导产生的 Th17 细胞又可分泌 IL-6,两者之间形成正反馈^[7]。本研究显示,IL-6 在炎症初期迅速升高,能够促进和活化 T 细胞、刺激 B 细胞分化、刺激免疫球蛋白分泌、促进急性期蛋白合成和血小板产生、诱导产生其他生长因子^[8],参与炎症反应。作为机体复杂的细胞因子网络中的重要成员,动物眼内注射 IL-6 可引起实验性葡萄膜炎,拮抗 IL-6 可快速缓解炎症症状^[9]。

可见,Th1、Th17 细胞共同介导 EAU 的致病过程,但 IFN- γ 可抑制 Th17 细胞的分化,同时 IL-17 又可抑制 Th1 细胞的分化,Th1 与 Th17 细胞之间相互

交叉调节^[10],仅有 Th17 细胞并不能诱导自身免疫性疾病,还必须有 Th1 细胞的参与,二者在自身免疫性疾病发病过程中的相互作用仍需探究。Th1、Th17 细胞与 Th2、Treg 细胞共同构建立体化细胞因子调节网络^[11],维持机体免疫稳态,调节细胞因子网络的平衡,可为葡萄膜炎的预防、治疗提供有效途径。

参考文献

- 1 Agarwal RK,Caspi RR. Rodent models of experimental autoimmune uveitis[J]. *Methods Mol Med*,2004,102(3):395-419.
- 2 Caspi RR. Th1 and Th2 responses in pathogenesis and regulation of experimental autoimmune uveoretinitis[J]. *Int Rev Immunol*,2002,21(2-3):197-208.
- 3 Sugi-Ikai N,Nakazawa M,Nakamura S,Ohno S,Minami M. Increased frequencies of interleukin-2 and interferon- γ producing T cells in patients with active Behcet's disease[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,1998,39(6):996-1004.
- 4 Kolb H,Victoria KB. Nitric oxide in autoimmune disease:cytotoxic or regulatory mediator[J]. *Immunol Today*,1998,19(12):556-561.
- 5 Amadi-Obi A,Yu CR,Liu X,Mahdi RM,Clarke GL,Nussenblatt RB,*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.
- 6 Xiao S,Jin H,Korn T,Liu SM,Oukka M,Lim B,*et al*. Retinoic acid increases Foxp3 + regulatory T cells and inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF- β -driven Smad3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression[J]. *J Immunol*,2008,181(4):2277-2284.
- 7 Ma X,Reynolds SL,Baker BJ,Li X,Benveniste EN,Qin H. IL-17 enhancement of the IL-6 signaling cascade in astrocytes[J]. *J Immunol*,2010,184(9):4898-4906.
- 8 Ooi KG,Galatowicz G,Calder VL,Lightman SL. Cytokines and chemokines in uveitis:is there a correlation with clinical phenotype[J]. *Clin Med Res*,2006,4(4):294-309.
- 9 Crane LJ,Forrester JV. Th1 and Th2 lymphocytes in autoimmune disease[J]. *Crit Rev Immunol*,2005,25(2):75-102.
- 10 Teng MW,Andrews DM,McLaughlin N,von Scheidt B,Ngiow SF,Möller A,*et al*. IL-23 suppresses innate immune response independently of IL-17A during carcinogenesis and metastasis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2010,107(18):8328-8333.
- 11 王金慎,韩月芹,魏丽夏,秦道刚,杨巧芝. 急性特发性血小板减少性紫癜患儿 Th1/Th2 类细胞因子的基因表达水平[J]. 中华实用儿科临床杂志,2013,28(3):214-216.

第八届亚洲神经眼科大会——暨第四届全国神经眼科学术会议

亚洲神经眼科协会(ASNOS)于2002年在日本东京成立。由亚洲神经眼科协会每两年主办一次的亚洲神经眼科大会是一个大型国际神经眼科会议,代表了亚洲神经眼科基础研究及临床研究最高水平。历届会议都有数百名各国神经眼科专业人士进行学术交流,对国际最近神经眼科新技术及学术前沿进行介绍及讨论。亚洲神经眼科大会提供了一个国际化平台,让世界各地的参会者对前沿的神经眼科研究课题交流想法,探讨最新进展及促进未来的合作。在亚洲神经眼科大会中一个尤其出名且重要的病例讨论版块“Walsh in Asia”,选取各国出色的带病理结果的病例进行深入剖析,非常具有挑战性。

第八届亚洲神经眼科大会(ASNOS)暨第四届全国神经

眼科学术会议(CNOS)将于2015年10月22日至25日在中国北京召开。本次会议将邀请国内外著名的神经眼科、眼科、神经内科及神经外科等方面的专家到会,就神经眼科疾病在诊断学、遗传学、影像学、流行病学、低视力康复等研究领域作专题介绍及神经眼科病例讨论。

此次会议是对我国神经眼科的一次检阅,也是与国际神经眼科医师交流学习的机会,欢迎全国医师踊跃参会。大会网址:www.2015asnosc.com;大会邮箱:info@2015asnosc.com;大会联系人:王京凤,联系电话:13910114145;赖梦莹,联系电话:18600288822。

热忱期待您的参与!

第八届亚洲神经眼科大会组委会