

环孢霉素 A 对葡萄膜炎中 IL-17⁺ 细胞的作用机制

任亚琳, 王增智, 王艳丽, 严浩

基金项目: 广东省卫生厅资助项目(No. B2010294); 深圳南山区科技局资助项目(No. 南科卫 2009015); 深圳市科技计划资助项目(No. 201102127)

作者单位: (518600) 中国广东省深圳市, 广东医学院附属南山医院眼科

作者简介: 任亚琳, 女, 博士后, 副主任医师, 研究方向: 葡萄膜炎。

通讯作者: 任亚琳. rensz2008@gmail.com

收稿日期: 2012-03-15 修回日期: 2012-04-28

Study on the mechanisms of CsA on the IL-17⁺ cells in the uveitis patients

Ya-Lin Ren, Zeng-Zhi Wang, Yan-Li Wang, Hao Yan

Foundation items: Guangdong Health Department Fund (No. B2010294); Shenzhen Nanshan Science and Technology Fund(No. 2009015); Shenzhen Science and Technology Fund(No. 201102127) Department of Ophthalmology, Nanshan Hospital Affiliated to Guangdong Medical College, Shenzhen 518600, Guangdong Province, China

Correspondence to: Ya-Lin Ren. Department of Ophthalmology, Nanshan Hospital Affiliated to Guangdong Medical College, Shenzhen 518600, Guangdong Province, China. rensz2008@gmail.com
Received: 2012-03-15 Accepted: 2012-04-28

Abstract

• **AIM:** To preliminarily discuss the mechanisms of cyclosporine(CsA) on the IL-17⁺ cells in uveitis.

• **METHODS:** Fifteen HLA-B27 uveitis patients with active uveitis were involved in this study. Blood samples were taken from these patients for analysis of IL-17. The levels of IL-17 in the supernatants of PBMCs from patients before treatment cultured without or with CsA at different concentrations were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Intracellular staining with flow cytometry was used to evaluate the expression of CD69 on the IL-17-producing cells in different groups.

• **RESULTS:** The results showed that CsA inhibited the secretion of IL-17, but it did not influence the expression of CD69.

• **CONCLUSION:** Our findings showed that one of the mechanisms of CsA on the treatment of HLA-B27 uveitis is the inhibition of the secretion of IL-17.

• **KEYWORDS:** uveitis; CsA; IL-17

Ren YL, Wang ZZ, Wang YL, et al. Study on the mechanisms of CsA on the IL-17⁺ cells in the uveitis patients. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(6):1054-1055

摘要

目的: 初步探讨环孢霉素 A (CsA) 对葡萄膜炎中 IL-17⁺ 细胞的作用机制。

方法: 抽取 HLA-B27 阳性葡萄膜炎患者外周血, 同时建立正常人为对照组, 分离外周血单核细胞, 体外培养, 并加入不同浓度 CsA, 通过 ELISA 检测不同浓度 CsA 对 IL-17 分泌的影响, 通过细胞内细胞因子染色的方法检测 CsA 对 IL-17⁺ 细胞活化的影响。

结果: CsA 可以有效抑制 IL-17 的分泌, 且随着浓度增高抑制程度增加; 但是 CsA 不影响 IL-17⁺ 细胞对 CD69 的表达。

结论: CsA 可以通过抑制 IL-17 的分泌来实现对 HLA-B27 阳性葡萄膜炎的治疗。

关键词: 葡萄膜炎; 环孢霉素 A; IL-17

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.06.12

任亚琳, 王增智, 王艳丽, 等. 环孢霉素 A 对葡萄膜炎中 IL-17⁺ 细胞的作用机制. *国际眼科杂志* 2012;12(6):1054-1055

0 引言

葡萄膜炎是常见的自身免疫性眼病, 过去人们治疗葡萄膜炎的主要方法是激素冲击疗法。近年来, 环孢霉素 A (cyclosporine, CsA) 开始逐渐用于治疗葡萄膜炎, 并收到良好的治疗效果。为此, 本研究通过将 CsA 加入 HLA-B27 阳性葡萄膜炎外周血中, 通过观察 IL-17⁺ 细胞的数量、表面特征和细胞因子的变化, 初步探讨 CsA 对 HLA-B27 阳性葡萄膜炎治疗的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料 选取 2009-01/2011-10 我院就诊的葡萄膜炎患者 15 例, 血液学检查均提示 HLA-B27⁺, 其中男 13 例, 女 2 例, 均为单眼发病, 且均有强直性脊柱炎病史, 平均年龄 34.8 岁, 患者未全身治疗前抽取外周血 10mL, 并密度梯度离心法分离外周血单核细胞(PBMCs)。同时取 15 例正常人外周血, 其中男 8 例, 女 7 例, 平均年龄 33.3 岁, 抽取外周血 10mL, 并密度梯度离心法分离 PBMCs。

1.2 方法

1.2.1 ELISA 检测细胞上清中细胞因子分泌的 IL-17 含量 按照试剂盒说明书进行实验。将患者和正常人 PBMCs 分三组, 每组 5 例: (1) 无任何处置组; (2) 同时加入 anti-CD3 (5μg/mL; eBioscience, San Diego, CA) and anti-CD28 (1μg/mL; eBioscience) 共同孵育 72h; (3) anti-CD3, anti-CD28 和 CsA (5, 50, 和 100ng/mL; 瑞士) 共同孵育 72h。然后收集细胞上清, 通过 ELISA 试剂盒 (eBioscience) 检测 IL-17 的含量。

1.2.2 流式细胞检测 CD69 在 IL-17⁺ 细胞的表达 将患者 PBMCs 分三组, 每组 5 例: (1) 无任何处置组; (2) 同时加入 20ng/mL PMA (eBioscience) 和 1μg/mL ionomycin (eBioscience) 共同孵育 6h; (3) PMA, ionomycin 和 CsA (50ng/mL, eBioscience) 共同孵育 6h。然后按照细胞内细胞因子染色的步骤, 即细胞固定, 破膜后, PE-IL-17 (eBioscience), FITC-CD69 (eBioscience), PE-cy5-CD4/8 (eBioscience) 进行细胞标记, 流式细胞仪 (BD) 检测。

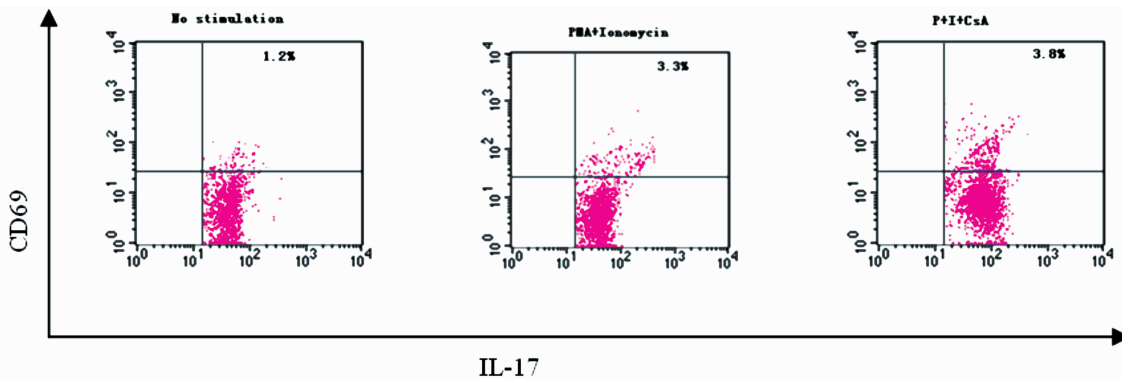


图1 CD69 在各组中 IL-17+细胞的表达。

表1 正常人和 HLA-B27 阳性葡萄膜炎患者外周血 IL-17 含量的变化 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

分组	正常人	患者
未处置组	160±13	450±11
Anti-CD3+anti-CD28	280±21	680±28
Anti-CD3+anti-CD28+不同浓度 CsA		
5ng/mL	100±5	200±12
50ng/mL	测不出	20±3
100ng/mL	测不出	测不出

统计学分析:采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验对 IL-17 的含量进行分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学分析。

2 结果

2.1 HLA-B27 阳性葡萄膜炎患者外周血 IL-17 的含量

结果显示,无论正常人还是葡萄膜炎患者,和 anti-CD3 与 anti-CD28 共同孵育的 PBMCs 分泌 IL-17 的量较无任何处置组增加 ($P < 0.05$),但是加入 CsA 后 IL-17 的量显著下降,而且随着 CsA 浓度的升高,IL-17 下降的越明显(表 1)。

2.2 流式细胞检测 CD69 在 IL-17⁺细胞的表达 结果显示,在葡萄膜炎患者中 CsA 对 CD69 在 IL-17⁺细胞的表达无任何影响(图 1)。

3 讨论

葡萄膜炎是常见的自身免疫性眼病,过去人们认为葡萄膜炎的发生主要是由 Th1 细胞介导的,IFN- γ 和 IL-6 与 TNF- α 等炎症因子在葡萄膜炎的发生、发展中起着重要作用。2007 年研究发现,分泌 IL-17 的 CD4 T 细胞(Th17 细胞)的存在是导致自身免疫性葡萄膜炎发生的主要原因^[1]。后来,研究人员在实验性自身免疫性葡萄膜炎(experimental autoimmune uveitis, EAU)动物模型中,发现除了 Th17 细胞以外,还有一群 CD8 T 细胞(Tc17 细胞),这群细胞也可以分泌 IL-17,并与广泛分布于细胞表面的 IL-17 受体结合,发挥着促进 EAU 的发生、发展的重要作用^[2]。

在临床上, CsA 最早被用于抑制器官移植后的免疫排斥反应,主要机制是干扰钙离子依赖的信号传导路径,从而干扰炎症因子的合成^[3]。近年来, CsA 开始逐渐用于治疗葡萄膜炎,并收到良好的治疗效果。

为此,本研究通过将 CsA 加入 HLA-B27 阳性葡萄膜炎外周血中,通过观察 IL-17⁺细胞的数量,表面特征和细胞因子的变化,初步探讨 CsA 对 HLA-B27 阳性葡萄膜炎治疗的可能机制。有研究发现, CsA 可以通过抑制 IL-17 治疗 VKH(小柳原田综合征)和 BD(白塞氏病),我们的研究同样发现 CsA 可以通过抑制 IL-17 治疗 HLA-B27 阳性葡萄膜炎^[1,4],而且随着 CsA 浓度的升高,对 IL-17 抑制程度增加。因此,我们推测 CsA 对 HLA-B27 阳性葡萄膜炎的治疗也通过对 IL-17 抑制这一重要途径实现。

本研究通过细胞内细胞因子染色和流式细胞术相结合的研究表明, CsA 不改变 CD69 在 IL-17 阳性细胞的表达,这一结果和 Ortize 等^[5]在 BD 的研究结果相符。我们知道 CD69 是细胞活化的一个标志,由此我们可以推测, CsA 对葡萄膜炎的治疗可能仅通过改变细胞功能而不是活化状态进行的,还需进一步的研究证明。

参考文献

- 1 Chi W, Yang P, Li B, et al. IL-23 promotes CD4⁺T cells to produce IL-17 in Vogt-Koyanagi-Harada disease. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119(5):1218-1224
- 2 Peng Y, Han G, Shao H, et al. Characterization of IL-17⁺ interphotoreceptor retinoid-binding protein-specific T cells in experimental autoimmune uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(9):4153-4161
- 3 Weischer M, Rocken M, Berneburg M. Calcineurin inhibitors and rapamycin: cancer protection or promotion? *Exp Dermatol* 2007;16(5):385-393
- 4 Chi W, Yang P, Zhu X, et al. Production of interleukin-17 in Behcet's disease is inhibited by cyclosporin A. *Molecular Vision* 2010;16(5):880-886
- 5 Ortiz AM, Garcia-Vicuna R, Sancho D, et al. Cyclosporin A inhibits CD69 expression induced on synovial fluid and peripheral blood lymphocytes by interleukin-15. *J Rheumatol* 2000;27(10):2329-2338