

实验性自身免疫性葡萄膜炎小鼠 T 细胞变化的动态研究

秦力维^{1,2}, 彭秀军¹, 郭建巍³, 王桂琴¹, 高原^{1,2}, 曹利群^{1,2}

作者单位:(100048)中国北京市,海军总医院¹眼科;²海空勤体检中心眼科;³检验科

作者简介:秦力维,硕士,副主任医师,研究方向:眼底病、青光眼及眼屈光学。

通讯作者:秦力维. lwkin@sohu.com

收稿日期:2012-05-02 修回日期:2012-09-03

Dynamic study of T cells in experimental autoimmune uveoretinitis

Li-Wei Qin^{1,2}, Xiu-Jun Peng¹, Jian-Wei Guo³, Gui-Qin Wang¹, Yuan Gao^{1,2}, Li-Qun Cao^{1,2}

¹Department of Ophthalmology; ²Department of Ophthalmology, Seamen Aircrew Physical Examination Center; ³Department of Laboratory, Chinese PLA Navy General Hospital, Beijing 100048, China

Correspondence to: Li-Wei Qin. Department of Ophthalmology, Chinese PLA Navy General Hospital, Beijing 100048, China. lwkin@sohu.com

Received:2012-05-02 Accepted:2012-09-03

Abstract

• **AIM:** To investigate the dynamic changes of T cells in different stage of experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) and supply technical guide for optimal treatment protocols and curative effect evaluation of uveoretinitis.

• **METHODS:** EAU was induced in C57BL/6 mice by subcutaneous immunization of CFA+PTX+IRBP in hind limb and empennage. Peripheral blood flowcytometry was performed at 3, 7, 14, 21 and 28 days after immunization, respectively.

• **RESULTS:** After immunization with specific antigen IRBP, clinical assessment showed EAU occurred at 14 days and became severe at 21 days, but gradually relieved at 28 days. Accompanying with intraocular inflammation of EAU, both CD4⁺CD25⁺ T regular cells and CD4⁺CD3⁺ helper T cells increased. Especially, CD4⁺CD25⁺ T regular cells increased more obviously at 21 days. The number of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T regular cells had a great raising and gradually reduction after 28 days. The ratio of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ had a piecemeal increase after 3 days and reached the peak at 21 days then reduced at 28 days.

• **CONCLUSION:** The groups of CD4⁺CD25^{+/+}Foxp3⁺ T regular cells have a close relationship with the development and turnover of EAU. The groups of CD4⁺CD25^{+/+}Foxp3⁺ T regular cells provide a new thread

for clarity remission mechanism of EAU, prevention and treatment of EAU.

• **KEYWORDS:** experimental autoimmune uveoretinitis ; T cells; CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T regular cells

Citation: Qin LW, Peng XJ, Guo JW, et al. Dynamic study of T cells in experimental autoimmune uveoretinitis. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(10):1847-1850

摘要

目的:了解实验性自身免疫性葡萄膜炎(experimental autoimmune uveitis, EAU)不同进展阶段小鼠 T 细胞动态变化,对葡萄膜炎治疗方案的优化及疗效评价提供指导。
方法:用 CFA+PTX+IRBP 对 6~10 周龄雌性 C57BL/6 小鼠后肢及尾部皮下进行三点免疫建立 EAU 模型,于免疫 3, 7, 14, 21, 28d 取外周血行流式细胞术检测。

结果:用特异性抗原 IRBP 免疫后,EAU 疾病在第 14d 左右产生,在第 21d 达最高峰,以后开始逐渐缓解。随着 EAU 疾病的发生,CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞、CD4⁺CD3⁺辅助 T 细胞数量均有增加,CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞增加更为明显,CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞数量第 21d 达到高峰,第 28d 开始下降,CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ 比值从第 3d 开始逐渐增加,到第 21d 达到高峰,从第 28d 开始下降。

结论:EAU 疾病的发生和转归与 CD4⁺CD25^{+/+}Foxp3⁺Treg 细胞密切相关,CD4⁺CD25^{+/+}Foxp3⁺Treg 细胞为阐明 EAU 的缓解机制、预防和治疗人类葡萄膜炎提供了新思路。

关键词:实验性自身免疫性葡萄膜炎;T 细胞;CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2012.10.08

引用:秦力维,彭秀军,郭建巍,等.实验性自身免疫性葡萄膜炎小鼠 T 细胞变化的动态研究.国际眼科杂志 2012;12(10):1847-1850

0 引言

人类葡萄膜炎(uveitis)是一类种类繁多、病因复杂多样的眼科常见病。其病因和发病机制目前尚不完全清楚,感染、外伤、肿瘤、自身免疫反应均可引起,其中内因性葡萄膜炎是一种自身免疫性疾病或者至少是一种自身免疫参与的疾病^[1]。

实验性自身免疫性葡萄膜炎(experimental autoimmune uveitis, EAU)是一种在敏感品系动物中诱导的组织特异性自身免疫病的动物模型,其病变主要位于视网膜。EAU 在免疫学和病理学上的变化与人类的葡萄膜炎很相似,因此它是研究人类葡萄膜炎理想的动物模型^[2,3]。了

解 EAU 不同进展阶段小鼠辅助 T 细胞动态变化对葡萄膜炎治疗方案优化及疗效评价具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料 雌性 C57BL/6 小鼠(6~10 周龄)饲养于 SPF 级无菌条件下;光感受器间维生素 A 类结合蛋白 IRBP 多肽片段(interphotoreceptor retinoid-binding protein, IRBP) 1169-1191 (PTARSVGAADGSSWEGVGVVDPV) 由上海博亚生物工程公司合成;弗氏完全佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)、百日咳毒素(PTX) 购买于美国 Sigma 公司。所有的流式抗体均购自 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 EAU 模型的建立 将雌性 C57BL/6 小鼠分为 CFA+PTX+PBS(阴性对照)和 CFA+PTX+IRBP(实验组) 两组,每组 15 只,共 30 眼。实验组在鼠的后肢及尾部皮下进行三点免疫,总共注射 0.2mL 含 100 μ g IRBP(阴性对照组为 PBS)的 CFA,并经腹腔注射 0.5 μ g 纯化的百日咳毒素(PTX)作为附加的免疫佐剂。分别于免疫后 3, 7, 14, 21, 28d, 随机取两组各 3 只小鼠的外周血,分离外周血单个核细胞行流式细胞术检测。

1.2.2 EAU 模型的打分 每天进行一次眼底观察,对 EAU 的进展作出临床症状打分。无炎症为 0 分;眼内仅血管局部有白色病损为 1 分;眼内血管出现线性病损但范围不超视网膜 1/2 为 2 分;眼内血管出现线性病损且范围超过视网膜 1/2 为 3 分;眼内具有严重的视网膜、脉络膜渗出或视网膜出血为 4 分;出现视网膜下出血或视网膜脱离为 5 分。

1.2.3 外周血淋巴细胞的分离 从小鼠眼眶取血,置于含有肝素的管中,用 PBS 稀释血(1:2 稀释),混合均匀,把血慢慢加入 Ficoll 分离液中(血和分离液之比为 1:1)。在室温条件下,2200r/min, 20min 离心分离。吸取云雾层 10mL PBS 洗涤,室温,2000r/min,离心 10min,重复两次,最后把细胞重悬于 1mL PBS 中。

1.2.4 流式细胞术检测 CD4 和 CD3 与 CD25 分子的表达

CFA+PTX+IRBP(PBS)免疫小鼠后,分别于第 3, 7, 14, 21 及 28d 取外周血分离外周血单个核细胞,计数并收取细胞。调整细胞浓度为 5×10^5 /mL,加入 EP 管 100 μ L,各管中分别加入荧光标记的 CD4, CD3, CD25 单抗 3 μ L, 37 $^{\circ}$ C 标记 45min 后, PBS 洗细胞 2 次,最后用 500 μ L PBS 悬浮细胞后上机检测 CD4 与 CD3 和 CD25 分子的表达。

2 结果

2.1 EAU 模型的淋巴细胞表型检测 为了解 EAU 疾病的动态性病理变化,我们选择 $CD4^+CD25^+$, $CD4^+CD3^+$, $CD8^+CD3^+$, $CD4^+CD3^+/CD8^+CD3^+$ 等指标,用流式细胞术动态观察了 EAU 诱导后在不同的时间点各种指标的变化情况(图 1)。结果提示,在免疫后第 3d 和第 7d, $CD4^+CD25^+$ 调节性 T 细胞、 $CD4^+CD3^+$ 辅助 T 细胞、 $CD8^+CD3^+$ 细胞毒性 T 细胞数量基本没有较大的改变;从第 7d 开始, $CD4^+CD25^+$ 调节性 T 细胞、 $CD4^+CD3^+$ 辅助 T 细胞数量均开始有增加的趋势, $CD4^+CD25^+$ 调节性 T 细胞增加更为明显,到第 21d 达到高峰,从第 28d 开始下降。从第 7d 开始, $CD4^+CD3^+/CD8^+CD3^+$ 比值开始增加,到第 21d 达到高峰,从第 28d 开始下降,而对照组 $CD4^+CD3^+/CD8^+CD3^+$ 比值实验前后没有明显的改变(图 2)。

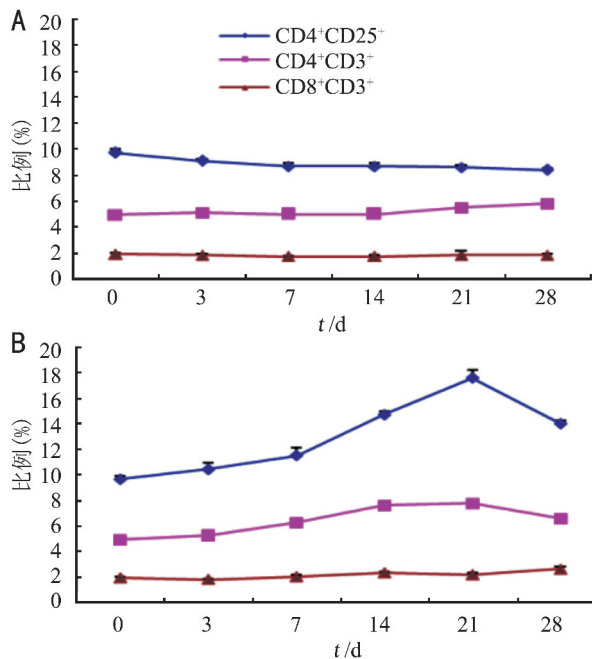


图 1 EAU 建模后不同时间段 $CD4^+CD25^+$, $CD4^+CD3^+$, $CD8^+CD3^+$ 指标的变化 A: 对照组; B: 实验组。

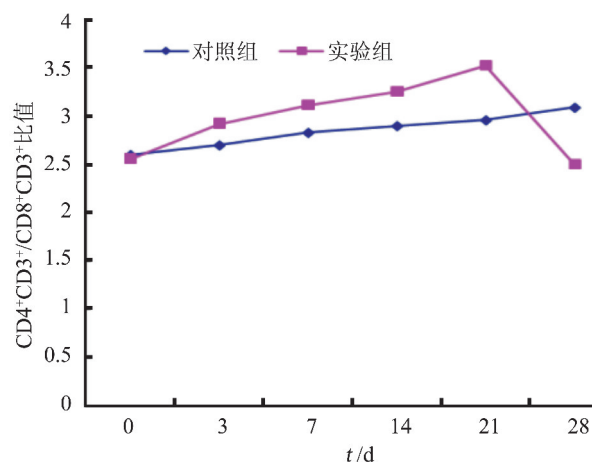


图 2 EAU 建模后不同时间段 $CD4^+CD3^+/CD8^+CD3^+$ 比值的动态变化。

与对照组相比,在免疫后第 14d,实验组 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 调节性 T 细胞数量开始有明显的增加,第 21d 达到高峰,第 28d 开始下降(图 3A)。免疫后 $CD4^+CD25^-Foxp3^+$ 调节性 T 细胞数量变化并不明显,到第 21d 达到最低点(图 3B),第 28d 开始有增加的趋势。与对照组相比,实验组 $CD4^+CD25^+Foxp3^+/CD4^+CD25^-Foxp3^+$ 比值从第 3d 开始逐渐增加,到第 21d 达到高峰,从第 28d 开始下降(图 4)。

2.2 EAU 模型的眼底镜检查 在免疫后第 3d 和第 7d, 我们观察到实验组小鼠眼睛没有任何炎症表现。EAU 临床损伤出现在第 14d, 表现为浅表血管显著瘀血扩张,眼内血管出现线性病损。免疫后第 21d, 视网膜、脉络膜有局部炎性渗出物,严重者有视网膜出血。显示出用特异性抗原 IRBP 免疫后,EAU 疾病在第 14d 左右产生,在第 21d 达最高峰,以后开始逐渐缓解。

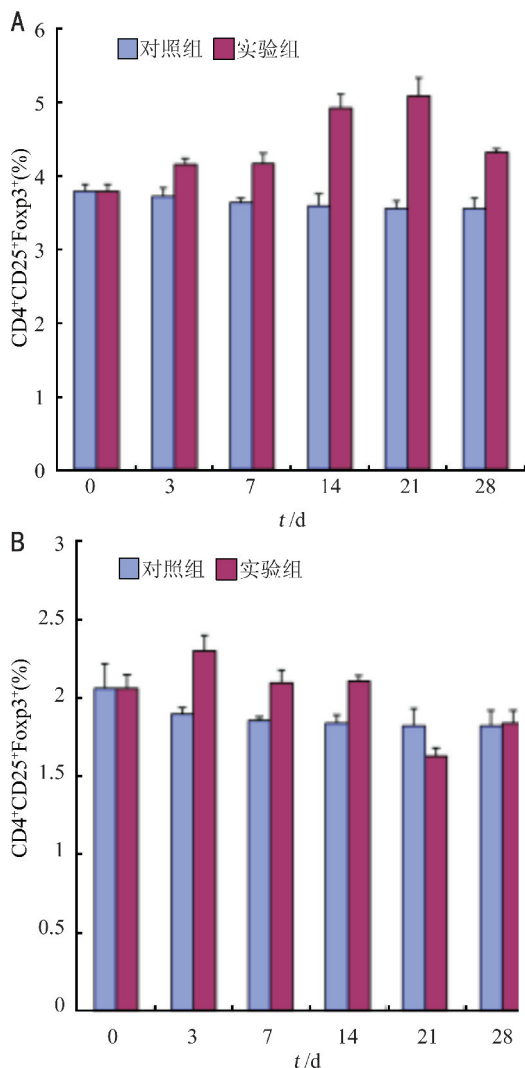


图3 EAU建模后不同时间段CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺和CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺表达的动态变化 A:CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺; B:CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺。

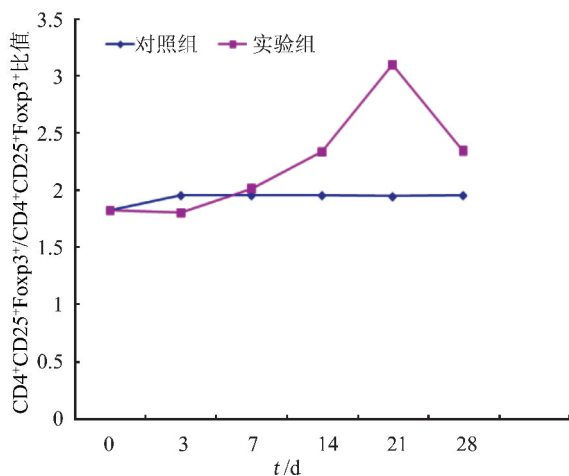


图4 EAU建模后不同时间段CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺比值的动态变化。

3 讨论

葡萄膜炎是一种眼科常见的多发疾病,常反复发作造成视力永久性损害。西方国家的失明约10%是由葡萄膜炎所致。它多发生于青壮年人,是常见的致盲性眼病之一。由于它与众多全身性自身免疫性疾病密切相

关,葡萄膜炎又是在治疗中相当棘手的眼病,因此探讨自身免疫在葡萄膜炎中的作用就显得尤为重要。

为研究葡萄膜炎的致病机制及治疗策略,已建立了一系列的动物模型,最常用的是EAU。EAU可通过对敏感型品系的动物进行抗原免疫而诱导。光感受器间维生素A类结合蛋白(IRBP)是最常用的一种抗原,在维生素A的转运过程中可能起重要作用,已在多种啮齿类动物和灵长类动物中成功建立了EAU模型^[4]。

现已有研究报道,EAU的发生与TH17及TH1有关^[5]。我们的研究结果提示:EAU建模第7d开始,随着EAU临床病理损伤的出现,CD4⁺CD25⁺调节性T细胞、CD4⁺CD3⁺辅助细胞、CD8⁺CD3⁺细胞毒T细胞等比例逐渐开始变化,具体表现为CD4⁺CD25⁺调节性T细胞、CD4⁺CD3⁺辅助T细胞数量增加,CD4⁺CD3⁺/CD8⁺CD3⁺比值增加。特别是CD4⁺CD25⁺调节性T细胞数量增加更为明显。进一步研究发现CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞数量增加明显,而CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺调节性T细胞则表现为数量下降。

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺比值增加。随着临床表现的逐渐减轻,EAU的逐渐转归,CD4⁺CD25⁺调节性T细胞、CD4⁺CD3⁺辅助T细胞、CD8⁺CD3⁺细胞毒性T细胞数量开始下降,其中CD4⁺CD25⁺调节性T细胞减低更为明显。与此同时,CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞数量开始下降,CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺调节性T细胞数量变化并不明显,但从第28d开始有增加的趋势。

CD4⁺CD25⁺T细胞在小鼠中占外周CD4⁺T细胞的5%~10%,是一种具有抑制作用的T细胞,以调控免疫应答,使机体的免疫应答保持一定的稳态^[6]。Foxp3(fork head/winged helix transcription factor 3)称叉状头/翅膀状螺旋转录因子,在调控调节性细胞的发育上起重要作用。有资料显示,用载体向天然CD4⁺T细胞导入Foxp3可以实现CD4⁺T细胞向CD4⁺CD25⁺调节性T细胞的转化,而缺乏Foxp3的CD4⁺CD25⁺调节性T细胞没有抑制功能。Fontenot等用Foxp3突变小鼠发现CD4⁺CD25⁺调节性T细胞发育缺陷,而CD4⁺CD25⁻T细胞则不受影响,异位表达Foxp3的细胞对CD4⁺CD25⁻T细胞具有抑制作用,说明Foxp3是CD4⁺CD25⁺T细胞发育和功能维持的重要调节因子^[7,8]。本实验EAU中T细胞改变中最明显的特征就是Foxp3在CD25细胞中的变化,并随着疾病的转归而改变。

目前,CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺T细胞与CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T细胞功能上的差别尚不清楚。小鼠EAU的自发缓解可能与CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg数量增多和前房相关免疫偏离(anterior chamber associated immune deviation, ACAID)有关^[9-11]。CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg数量逐渐增多充分证明了这一点,并且随着疾病的转归,CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg数量逐渐下降,与此同时CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺Treg开始有逐渐增加的趋势。

ACAID是指外源抗原或眼内抗原进入前房后,诱导出特异性非补体结合性抗体和细胞毒性T细胞的前体细胞,但是不能诱导出迟发超敏反应(delayed type

hypersensitive, DTH) 的免疫抑制现象。大量研究表明, ACAID 中 Th1 细胞介导的细胞免疫反应受到了抑制, 是由于 ACAID 诱导产生了 Treg。CD4⁺CD25⁺Treg 细胞通过释放细胞因子 IL-10 进而诱导 T 细胞发育分化为 CD8⁺Treg。CD4⁺Treg 抑制 DTH 形成, 而 CD8⁺Treg 抑制 DTH 发挥效应, 从而在不同阶段抑制 DTH。对于 EAU 而言, 皮下免疫使得抗原能够进入眼组织, 为 ACAID 的产生创造了条件, EAU 中晚期出现的 Treg 可能是通过 ACAID 机制所产生。随着 EAU 的发展, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 数量逐步增多, CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺T 细胞逐步减少, 随着 EAU 的逐渐好转, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 开始减少, 而 CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺T 细胞变化并不明显, 甚至有增加的趋势。EAU 自身炎症消退后其免疫功能的改变是否还与 CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺T 细胞有关? 这群 CD25⁻调节性 T 细胞是否也具有抑制效应性 T 细胞的功能? CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 细胞和 ACAID 或许为阐明 EAU 的缓解机制、预防和治疗人类葡萄膜炎提供了新的思路。

参考文献

- 1 孙世珉. 葡萄膜病学. 北京:北京医科大学出版社. 2002:90
- 2 Li B, Yang PZ, Zhou H, *et al.* Upre-regulation of T-bet expression in peripheral blood mononuclear cells during vovg - k ovanag Harada disease. *Br J Ophthalmol* 2005;89(11):1410-1412
- 3 Oh K, Kim YS, Lee DS. Maturation - resistant dendritic cells

- ameliorate experimental autoimmune uveoretinitis. *Immune Netw* 2011; 11(6):399-405
- 4 Cortes LM, Mattapallil MJ, Silver PB, *et al.* Repertoire analysis and new pathogenic epitopes of IRBP in C57BL/6 (H-2b) and B10. RIII (H-2r) mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(5):1946-1956
- 5 Haruta H, Ohguro N, Fujimoto M, *et al.* Blockade of interleukin-6 signaling suppresses not only th17 but also interphotoreceptor retinoid binding protein - specific Th1 by promoting regulatory T cells in experimental autoimmune uveoretinitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(6):3264-3271
- 6 Wing K, Ekmark A, Karlsson H, *et al.* Characterization of human CD25⁺CD4⁺T cells in thymus cord and adult blood. *Immunology* 2002; 106(2):190-199
- 7 Karube K, Ohshima K, Tsuchiya T, *et al.* Expression of Foxp3 a key molecule in CD4CD25 regulatory T cells, in adult T-cell leukaemia/lymphoma cells. *Br J Haematol* 2004;126(1):81-84
- 8 Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4 + CD25 + regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4(4):330-336
- 9 Niederkorn JY. See no evil, hear no evil, do no evil; the lessons of immune privilege. *Nat Immunol* 2006;7(4):354-359
- 10 Niederkorn JY, Wang S. Immune privilege of the eye and fetus: parallel universes? *Transplantation* 2005;80(9):1139-1144
- 11 Taylor AW. Ocular immune privilege. *Eye (Lond)* 2009;23(10):1885-1889