

# IL-17 在单纯疱疹性角膜基质炎小鼠中表达的变化

张胜男, 孙超, 胡媛, 夏丽坤

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30772394);中国辽宁省自然科学基金资助项目(No. 20072091);中国辽宁省科技攻关计划资助项目(No. 2007225018);中国沈阳市科学技术计划资助项目(No. 1091171-1-02)

作者单位:(110004)中国辽宁省沈阳市,中国医科大学附属盛京医院眼科

作者简介:张胜男,女,在读硕士研究生,研究方向:角膜屈光手术、角膜病、青光眼。

通讯作者:夏丽坤,女,教授,研究主向:角膜屈光手术、角膜病、青光眼. xialk@sj-hospital.org

收稿日期:2011-04-25 修回日期:2011-07-25

## Study on the expression of IL-17 on murine herpetic stromal keratitis

Sheng-Nan Zhang, Chao Sun, Yuan Hu, Li-kun Xia

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (No. 30772394); Natural Science Foundation of Liaoning Province, China (No. 20072091); Program for Tackling Key Problems in Science and Technology of Liaoning Province, China (No. 2007225018); Science and Technology Plan Foundation of Shenyang City, China (No. 1091171-1-02)

Department of Ophthalmology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

**Correspondence to:** Li-Kun Xia. Department of Ophthalmology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. xialk@sj-hospital.org

Received:2011-04-25 Accepted:2011-07-25

## Abstract

• **AIM:** To investigate the expression of IL-17 in herpes stromal keratitis(HSK).

• **METHODS:** HSK models were established with inoculating herpes simplex virus type 1(HSV-1) KOS strain at  $1.0 \times 10^6$  plaque forming unit to corneas of 35 BALB/c mice. The another 5 normal BALB/c mice served as the control group. Immunohistochemistry was performed using polyclonal antibodies to detect the expression of IL-17 in corneal sections. By flow cytometry, the expression of IL-17 surface protein on  $CD4^+$  T cells in murine peripheral blood was evaluated on the 1-3 days, 7, 10, 14, 21, 28 days after corneal inoculation with HSV-1. Corneal changes were observed under slit-lamp microscope to examine the histopathological changes of corneas.

• **RESULTS:** The expression of IL-17 was visible on HSK mice corneal fibroblasts, epicytes and inflammatory cells.

Absent staining for IL-17 was seen in the normal sample and negative control sample. The expression of IL-17 in the lymphocytes were harvested from the peripheral blood by flow cytometric analysis. On HSK mice inflammatory cells in stroma significantly increased and the degree of corneal opacity became significantly severe. The intensity of IL-17 expression was significantly positively correlated with the inflammation of HSK ( $r = 0.609, P < 0.01$ ).

• **CONCLUSION:** IL-17 is overexpressed in corneal and peripheral blood of HSK mice, indicating that IL-17 may contribute to the inflammatory responses of the eye in HSK.

• **KEYWORDS:** IL-17; keratitis; herpetic

Zhang SN, Sun C, Hu Y, *et al.* Study on the expression of IL-17 on murine herpetic stromal keratitis. *Guji Yanke Zazhi( Int J Ophthalmol)* 2011;11(9):1514-1517

## 摘要

**目的:**研究 IL-17 在小鼠单纯疱疹性角膜基质炎模型中的表达。

**方法:**将  $1.0 \times 10^6$  空斑单位的单纯疱疹病毒 1 型 KOS 毒株接种于 BALB/c 鼠的角膜上,建立 HSK 动物模型。免疫组织化学染色观察 IL-17 在角膜中的表达。分别取正常小鼠及接种病毒后的第 1~3, 7, 10, 14, 21, 28d, 用毛细管取小鼠的左眼眼眶静脉窦血 1mL, 分离淋巴细胞, 行荧光抗体染色, 用流式细胞仪检测 IL-17 阳性的  $CD4^+$  T 细胞的表达。在裂隙灯显微镜下观察角膜的变化, 检查角膜的组织学病理改变。

**结果:**实验组中, 角膜和外周血均有 IL-17 表达。实验组角膜基质内炎性细胞、角膜混浊程度非常严重。IL-17 的表达与 HSK 小鼠炎症表现的严重程度成正相关( $r = 0.609, P < 0.01$ )。

**结论:**IL-17 在 HSK 小鼠模型中呈高表达, 且 IL-17 在 HSK 的发病过程中起一定作用。

**关键词:**IL-17; 角膜炎; 疱疹性

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2011.09.006

张胜男, 孙超, 胡媛, 等. IL-17 在单纯疱疹性角膜基质炎小鼠中表达的变化. 国际眼科杂志 2011;11(9):1514-1517

## 0 引言

单纯疱疹病毒 1 型(herpes simplex virus type 1, HSV-1)引起的角膜基质炎(herpes stromal keratitis, HSK)是人类主要的致盲性眼病之一, 是一种由  $CD4^+$  T 细胞介导的免

疫病理性疾病<sup>[1,2]</sup>。最近的研究发现,IL-17在许多自身免疫性疾病中的表达量明显增加,并且在疾病的发生、发展过程中发挥了重要的作用,提示IL-17在HSK中可能起到类似的作用。本研究采用BALB/c鼠的HSK模型<sup>[3]</sup>,观察在HSK中IL-17的表达,为进一步研究IL-17在HSK中的作用机制奠定基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 高神经毒力的HSV-1 KOS毒株由中国疾病预防控制中心病毒所提供,滴度为每升含 $1.0 \times 10^6$ 空斑单位(plaque forming unit, PFU)。生产和检测病毒的细胞为非洲绿猴肾细胞(VERO)。培养VERO的营养液为含50mL/L胎牛血清、青霉素、链霉素的DMEM(美国Gibco公司)。选用4~6wk,体质量18~21g的雌性BALB/c鼠(中国医科大学动物实验室提供)45只,按随机数字表法分为正常对照组(5只)与实验组(40只)。一抗工作液IL-17多克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司。SP超敏试剂盒购自福州迈鑫生物技术公司。PBS和DAB显色剂购自北京中杉公司。淋巴细胞分离液、APC标记的抗小鼠CD4抗体和PE标记的抗小鼠IL-17抗体、PE标记的IgG<sub>2</sub>A同型对照抗体,均购自eBioscience公司。

**1.2 方法** 将小鼠麻醉后置于显微镜下,用1号无菌针头交叉划伤右眼角膜上皮层呈“#”字形,将5 $\mu$ L含有 $1.0 \times 10^6$ PFU病毒的DMEM滴于鼠的右眼角膜表面,同时轻轻按摩鼠睑<sup>[3]</sup>,建立HSK模型。分别于鼠角膜接种HSV-1后第1~3,7,10,14,21,28d,用裂隙灯显微镜检查角膜改变,评估角膜基质炎的标准(0~4分)。0分:角膜基质清晰透明;1分:角膜基质稍混浊;2分:角膜基质中度混浊,可透见后部虹膜特征;3分:角膜基质重度混浊,但仍可判断瞳孔缘的位置;4分:角膜基质完全混浊,失去后部特征<sup>[4]</sup>。

**1.2.1 HE染色观察角膜组织形态变化** 于HSV感染后第10d,取鼠右眼球,用40g/L甲醛液固定,石蜡包埋,常规HE染色,显微镜下检查。

**1.2.2 免疫组织化学染色检测IL-17的表达** 在第1~3,7,10,14,21,28d取角膜常温固定24h后常规包埋,4 $\mu$ m连续切片,然后以SP法染色。常规脱蜡和水化组织片后,用30mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>孵育10min,以灭活内源性过氧化物酶。4 $^{\circ}$ C下兔抗小鼠IL-17多克隆抗体一抗工作液(与PBS稀释倍数为1:400)孵育过夜,PBS洗涤后,加以生物素标记的羊抗兔IgG二抗工作液,室温下放置30min。PBS洗涤后,加以链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶溶液室温下放置30min,用卵白素-生物素-过氧化物酶复合物和DAB染色,阳性细胞呈棕黄色,苏木素复染后封片。用0.01mol/L PBS代替一抗孵育,作为阴性对照。光学显微镜下观察并照相。

**1.2.3 流式细胞学检查CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>T细胞阳性率** 分别取正常小鼠以及角膜接种病毒后第1~3,7,10,14,21,28d小鼠,用毛细管取小鼠的左眼眼眶静脉窦血1mL,置于EDTA抗凝的采血管中,充分混匀。每个时间点取5只鼠的外周血,常规法分离淋巴细胞,用PBS调整细胞浓度至 $1 \times 10^6$ 。每只鼠提取的淋巴细胞分装入2只1.5mL的Eppendorf管中,各100 $\mu$ L,向各管中分别加入相应荧光抗

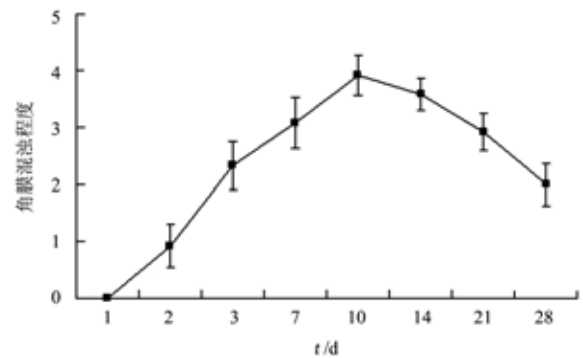


图1 裂隙灯观察不同时间点的HSK小鼠的平均角膜混浊程度。

体;第1管中依次加入1 $\mu$ L APC标记的抗小鼠CD4抗体(CD4-APC)和PE标记的IgG<sub>2</sub>A同型对照抗体(PE-IgG<sub>2</sub>A),第2管中依次加入1 $\mu$ L APC标记的抗小鼠CD4抗体和PE标记的抗小鼠IL-17抗体(IL-17-PE)。第1管为第2管的阴性对照;震荡混匀后室温避光静置15min,PBS洗涤2遍,以400 $\mu$ L PBS重悬振匀,应用FACS Calibur流式细胞仪(美国Becton-Dickinson公司),用Cell Quest软件进行检测和分析,确定CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>T细胞阳性率。

统计学分析:采用SPSS 17.0统计学软件进行统计分析。HSK小鼠各个时间点IL-17蛋白表达量的分析采用单因素方差分析(ANOVA)。HSK小鼠角膜混浊程度评分与IL-17阳性表达评分间的相关性采用Spearman秩相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 小鼠角膜混浊程度** 小鼠角膜接种HSV-1后,裂隙灯观察不同时间点的平均角膜混浊程度,第10d角膜混浊程度最明显,炎症反应最重,平均得分3.9分。第10d后角膜混浊程度逐渐减轻(图1)。

**2.2 角膜组织形态学观察** 正常小鼠角膜上皮层完整,基质层无水肿,无炎性细胞浸润(图2A)。HSV-1病毒感染后第10d角膜上皮层完整,基质层高度水肿增厚,有大量炎性细胞浸润,主要由淋巴细胞、单核细胞和中性粒细胞构成,可见新生血管生成(图2B)。

**2.3 IL-17在HSK小鼠角膜组织中的表达** 阴性对照组中未见IL-17表达(图3A)。而在正常对照组,上皮层中及内皮层中可见IL-17阳性表达(图3B)。实验组中组织切片可见小鼠角膜基质层炎性细胞、角膜成纤维细胞、上皮层及内皮层中IL-17呈阳性表达,第10d最为明显(图3C)。

**2.4 IL-17蛋白在小鼠外周血CD4<sup>+</sup>T细胞上的表达** 在小鼠感染HSV-1病毒后,各个时间点IL-17蛋白在小鼠外周血CD4<sup>+</sup>T细胞表达均有上升,在第3d时表达量最高,第3d后逐渐下降(图4A),1,2,3,7,10,14,21,28d的表达与0d比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。感染HSV-1病毒后的小鼠,相对于第0d(0.42%)在第3d IL-17蛋白有较高的表达(3.52%),见图4B。HSK小鼠角膜混浊程度与IL-17蛋白在外周血中的表达量相关性结果显示,HSK小鼠临床表现严重程度与IL-17表达量呈正相关( $r = 0.609, P < 0.01$ )。

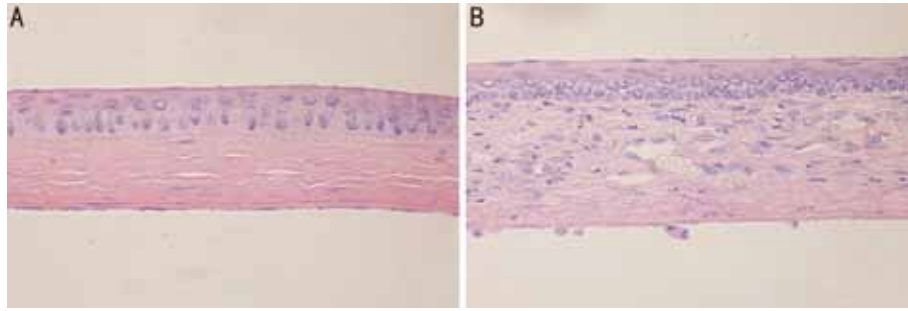


图2 小鼠角膜组织形态学变化(HE×400) A:正常组;B:感染病毒后第10d的HSK组。

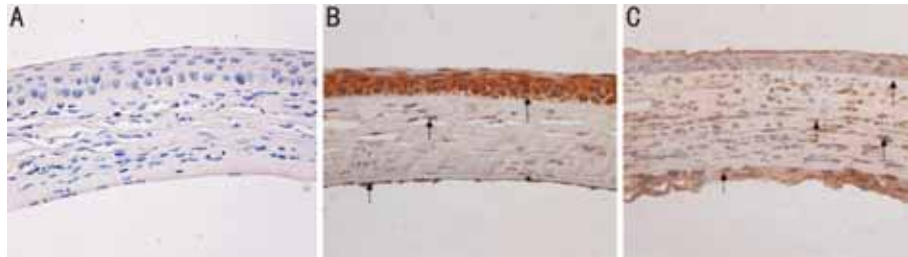


图3 IL-17在小鼠角膜中的表达(SP×400) A:阴性对照组;B:正常对照组;C:感染病毒后第10d的HSK组。

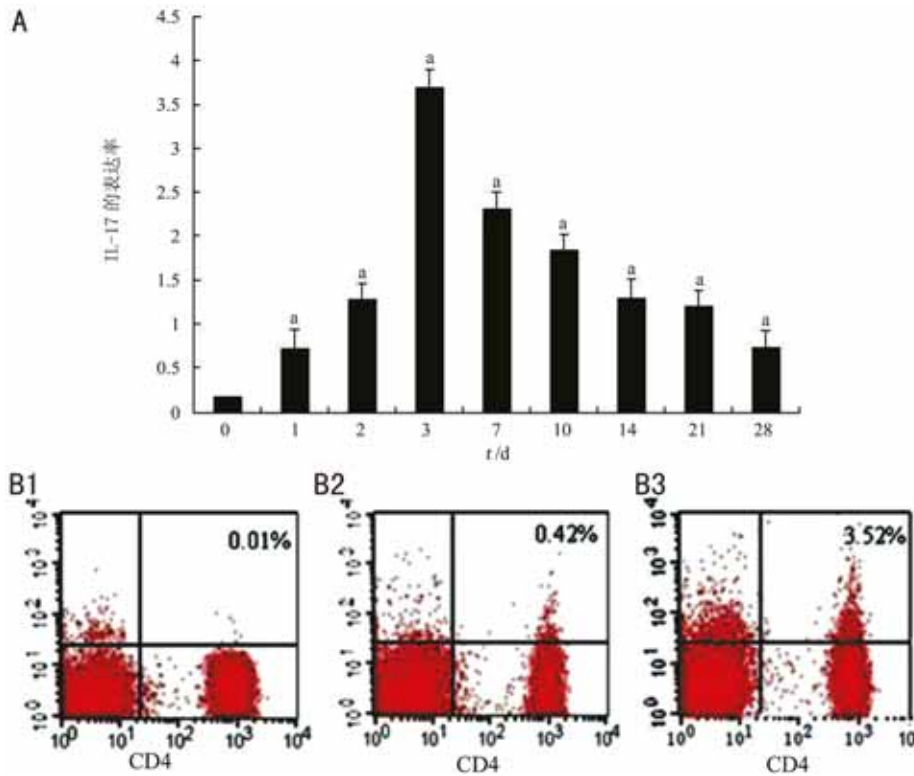


图4 IL-17在感染HSV-1的小鼠的外周血CD4<sup>+</sup>T细胞上的表达 A:各时间点表达的百分数;B1:同型对照组的IL-17的表达;B2:3d IL-17的表达;B3:10d IL-17的表达。

### 3 讨论

IL-17家族由A-F 6个成员组成(IL-17A-F)<sup>[5]</sup>。IL-17又称IL-17A,最初被认为主要是由效应和记忆性CD4<sup>+</sup>T细胞产生,最近研究发现IL-17主要由一种新的CD4<sup>+</sup>T细胞Th17细胞分泌。IL-17是一种致炎细胞因子,可以促进T细胞的激活和刺激成纤维细胞、内皮细胞、巨噬细胞、上皮细胞产生多种致炎因素(包括IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , 粒细胞集落刺激因子、前列腺素E<sub>2</sub>、金属蛋白酶和化学增殖素等),导致炎症的发生<sup>[5,6]</sup>。IL-17与多种致炎因子产生协同作用,促进T淋巴细胞、B淋巴细胞增生分化,产生抗体,加重炎症反应。已有实验研究证明,IL-17在类风湿

关节炎、系统性硬化系统性红斑狼疮、血管炎银屑病、多发性硬化、肾病综合征、克罗恩病和溃疡性结肠炎等免疫性疾病中的表达量与病程病情关系密切<sup>[7-9]</sup>。

研究表明IL-17蛋白在实验性自身免疫性葡萄膜炎(EAU)大鼠模型中呈高表达,IL-17阳性表达在EAU的发病过程中起一定作用<sup>[10]</sup>。Langrish等将致病抗原髓鞘蛋白脂蛋白(proteolipid protein, PLP)致敏的CD4<sup>+</sup>T细胞在体外经IL-23刺激后,这些细胞产生了大量IL-17,这些产生IL-17的细胞过继转移给受鼠可以导致受鼠发生严重的实验性自身免疫性脑炎(experimental autoimmune encephalitis, EAE),而抗IL-17抗体可以部分抑制EAE的

发生。同样,在对胶原介导的关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)的研究中,接受胶原蛋白免疫后,IL-17 缺陷的小鼠或 IL-17 中和治疗均会使其关节炎减轻,而 IL-17 的高表达则会加重关节病变<sup>[11]</sup>。

HSK 是 HSV-1 介导的以免疫炎症反应和细胞效应共同作用为特征的角膜疾病。我们的研究结果显示,IL-17 在复发性 HSK 小鼠模型的角膜成纤维细胞、上皮细胞、上皮细胞、基质层中的炎症细胞均有表达。在 HSK 小鼠模型的外周血中,IL-17 的表达明显升高,并在感染的早期(第 3d)达到高峰。IL-17 在外周血中 CD4<sup>+</sup> T 细胞中的表达与疾病严重程度呈正相关。目前的研究表明,IL-17 在人类 HSK 的角膜中有表达,通过对人类角膜成纤维细胞的刺激调节各种化学因子的分泌<sup>[12]</sup>。因此,IL-17 的表达和可能炎症反应的严重程度有关。

T 淋巴细胞是小鼠 HSK 模型导致组织破坏性基质层炎症的主要参与细胞<sup>[13]</sup>,CD4<sup>+</sup> T 细胞介导了单纯疱疹病毒性角膜基质炎<sup>[14]</sup>。IL-17 在炎症反应中有着重要的作用,特别是在宿主免疫的感染性疾病以及过敏和自身免疫反应中<sup>[15]</sup>。IL-17 在 HSK 模型中呈高表达,并且表明 IL-17 在 HSK 的发病过程中起一定作用。因此,IL-17 有望成为未来 HSK 抗病毒治疗的新靶点。

#### 参考文献

- 1 Kaye S, Choudhary A. Herpes simplex keratitis. *Prog Retin Eye Res* 2006;25(4):355-380
- 2 Inoue Y. Immunological aspects of herpetic stromal keratitis. *Semin Ophthalmol* 2008;23(4):221-227
- 3 Xia L, Zhang S, Zhou J, et al. A crucial role for B and T lymphocyte attenuator in preventing the development of CD4<sup>+</sup> T cell-mediated herpetic stromal keratitis. *Mol Vis* 2010;16:2071-2083

- 4 Croft M. The evolving crosstalk between co-stimulatory and co-inhibitory receptors: HVEM-BELTA. *Trends Immunol* 2005;26(6):292-294
- 5 Kemper C, Chan AC, Green JM, et al. Activation of human CD4<sup>+</sup> cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature* 2003;421(6921):388-392
- 6 Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol* 2006;13(2-4):143-157
- 7 Kirkham BW, Lassere MN, Edmonds JP, et al. Synovial membrane cytokine expression is predictive of joint damage progression in rheumatoid arthritis: a two-year prospective study (the DAMAGE study cohort). *Arthritis Rheum* 2006;54(4):1122-1231
- 8 Fujino S, Andoh A, Bamba S, et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2003;52(1):65-70
- 9 唐碧霞,张烜,唐福林. IL-17 与自身免疫性疾病关系的研究进展. *基础医学与临床* 2008;28(1):94-97
- 10 梁亮,王红,彭晓燕,等. IL-17 在实验性自身免疫性葡萄膜炎大鼠模型眼部的表达. *眼科研究* 2010;28(4):315-318
- 11 Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, et al. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14(2):155-174
- 12 Molesworth-Kenyon SJ, Yin R, Oakes JE, et al. Lausch. IL-17 receptor signaling influences virus-induced corneal inflammation. *J Leukoc Biol* 2008;83(2):401-408
- 13 Thomas J, Rouse BT. Immunopathogenesis of herpetic ocular diseases. *Immunol Res* 1997;16(4):375-386
- 14 Banerjee K, Biswas PS, Kumaraguru U, et al. Protective and pathological roles of virus-specific and bystander CD8<sup>+</sup> T cells in herpetic stromal keratitis. *J Immunol* 2004;173(12):7575-7583
- 15 Paunovic V, Carroll HP, Vandenbroeck K, et al. Signalling, inflammation and arthritis: crossed signals: the role of interleukin (IL)-12, -17, -23 and -27 in autoimmunity. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47(6):771-776