

17 β -雌二醇抑制星形胶质细胞趋化 Th17 细胞的机制

邱伟, 徐文, 李蕊, 戴永强, 王玉鸽, 孙晓渤, 陆正齐, 胡学强*

(中山大学附属第三医院神经病学科, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】本研究旨在明确 17 β -E2 能否通过阻断星形胶质细胞表达抗原提呈相关分子(MHC II、CD80 和 CD86)和抑制细胞因子分泌, 从而抑制其对 Th17 细胞的趋化作用。【方法】原代培养的小鼠星形胶质细胞分为 5 组: 未处理组、IFN- γ (20 ng/mL)处理组、IFN- γ (20 ng/mL)+17 β -E2(0.28 ng/mL)处理组、IFN- γ (20 ng/mL)+17 β -E2(2.75 ng/mL)处理组和 IFN- γ (20 ng/mL)+17 β -E2(27.50 ng/mL)处理组。Western blotting 检测未处理组和 IFN- γ (20 ng/mL)处理组星形胶质细胞 ER α 和 ER β 表达。免疫荧光检测各处理组星形胶质细胞 MHC II 表达。流式细胞术检测各处理组星形胶质细胞 MHC II 及协同刺激分子表达。ELISA 检测各组星形胶质细胞分泌 IL-17 和 TGF- β 情况。趋化实验检测各处理组星形胶质细胞条件培养基体外趋化 Th17 细胞的能力。【结果】IFN- γ 诱导星形胶质细胞 ER α 表达上调, 对 ER β 表达无明显影响。不同浓度 17 β -E2 处理均明显降低星形胶质细胞 MHC II 及协同刺激分子的表达。27.50 ng/mL 浓度的 17 β -E2 可抑制 IFN- γ 活化星形胶质细胞产生 IL-17, 而对 TGF- β 无明显影响。2.75 ng/mL 浓度的 17 β -E2 可抑制 IFN- γ 活化星形胶质细胞趋化 Th17 细胞。【结论】本研究的结果表明 17 β -E2 可能部分通过抑制炎症活化的星形胶质细胞表达 MHC II、CD80、CD86 及分泌炎症因子抑制对 Th17 细胞的趋化作用。

关键词: 17 β -雌二醇; 星形胶质细胞; MHC II; IL-17

中图分类号: R392.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2014)05-0702-08

17 β -E2 Inhibits Th17 Cells Migration by IFN- γ Activated Astrocytes

QIU Wei, XU Wen, LI Rui, DAI Yong-qaing, WANG Yu-ge, SUN Xiao-bo, LU Zheng-qi, HU Xue-qiang*

(The Third Affiliated Hospital of Sun Yet-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objective】 The current study was designed to determine whether 17 β -E2 decrease Th17 cell migration by inhibiting MHC II expression and cytokines secretion (focus on IL-17 and TGF- β) in astrocytes. 【Methods】 Primary astrocyte cultures were treated as follows: untreated, treat with IFN- γ (20 ng/mL) alone or in combination with 0.28 ng/mL, 2.75 ng/mL, 27.50 ng/mL 17 β -E2 for 36 h. ER α and ER β expression in astrocytes with different treatment were detected by western blotting. MHC II expression were analyzed by immunofluorescence and flow cytometry. Co-stimulatory molecules expression were analysed by flow cytometry. IL-17 and TGF- β secretion were examined by ELISA. Th17 cells migration was detected by transwell assay. 【Results】 IFN- γ induce the expression of ER α , but not ER β . 17 β -E2 treatment at different concentrations from 0.28 ng/mL to 27.50 ng/mL significantly decreased MHC II and co-stimulatory molecules expression in IFN- γ activated astrocytes. 17 β -E2 at 27.50 ng/mL significantly inhibited IL-17 production in IFN- γ activated astrocytes, but had no effect on TGF- β secretion. 17 β -E2 at 2.75 ng/mL decreased Th17 cells migration by IFN- γ activated astrocytes. 【Conclusions】 These data demonstrate that 17 β -E2 decreases Th17 cells migration partially via inhibiting MHC II expression and IL-17 secretion in IFN- γ activated astrocytes.

Key words: 17 β -E2; astrocyte; MHC II; IL-17

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2014, 35(5): 702-709]

收稿日期: 2014-05-16

基金项目: 中山大学高校基本业务费青年教师培育项目(12ykpy36); 中山大学附属第三医院杰出青年后备人才培养计划基金

作者简介: 邱伟, 博士, 副教授, E-mail: qw9406@gmail.com; * 通信作者: 胡学强, 博士, 教授, E-mail: huxueqiangzssy@qq.com

多发性硬化(multiple sclerosis, MS)是一种青壮年较常见的中枢神经系统(central nervous system, CNS)自身免疫性炎性疾病。尽管MS的免疫调节治疗已有长足的进展,但接受治疗的患者仍可能出现复发及病情恶化,因此依然需要研究改善MS预后的新药物。大量的临床研究表明雌激素(estrogen, E2)有治疗MS的潜在价值^[1]。近来一些研究发现,星形胶质细胞雌激素受体 α (estrogen receptor α , ER α)信号通路在E2对MS理想动物模型—实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalopathy, EAE)的神经保护作用中起到关键作用^[2]。探索星形胶质细胞介导的E2神经保护作用机制将为E2及其衍生物应用于以MS为代表的神经系统免疫性疾病的神经保护治疗提供理论基础。炎性细胞,如Th17细胞,在CNS浸润是MS及EAE发病过程的重要环节^[3]。既往研究发现E2可以抑制EAE炎性细胞的CNS浸润^[4],然而具体机制尚不十分清楚。星形胶质细胞对于MS及EAE炎症细胞CNS浸润具有重要意义^[5]。它可能通过以下机制调节炎症细胞的CNS浸润:炎性活化后(如经过IFN- γ 刺激)的星形胶质细胞表达主要组织相容性复合体II类分子(major histocompatibility complex class II, MHC II)和协同刺激分子,提呈抗原给CD4⁺和CD8⁺T细胞^[6-7],并促进其增殖分化;同时星形胶质细胞在炎性条件下分泌多种细胞因子,包括IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-17^[5,8],驱动免疫反应向Th1, Th17等免疫反应方向移动^[9-10]。上述两方面协同作用使增殖活化的T细胞进一步释放炎症因子及趋化因子,促进更多的包括Th17在内的炎性细胞侵入CNS^[11]。基于此,本研究旨在通过体外实验探讨17 β -E2对星形胶质细胞对Th17细胞中枢趋化作用的影响,明确17 β -E2能否通过阻断星形胶质细胞表达抗原提呈相关分子(MHC II、CD80和CD86)和抑制细胞因子分泌,从而抑制炎症细胞的CNS浸润。

1 材料与方 法

1.1 星形胶质细胞原代培养及干预

C57BL/6乳鼠(1-2 d)由中山大学实验动物中心提供。750 mL/L酒精浸泡小鼠5 mins,取出大脑皮质并切成小块。1.25 g/L胰蛋白酶37 $^{\circ}$ C消化

10~15 min,以含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养基终止消化。巴氏吸管吹打解离组织,200目筛网机械过滤。离心后,将细胞重新悬于含有100 mL/L胎牛血清的DMEM-F12培养基,置于75 cm²细胞培养瓶37 $^{\circ}$ C,体积分数5% CO₂培养箱培养。当细胞基本融合后(第8天),将培养瓶置于摇床37 $^{\circ}$ C,200转12 h进行纯化。待细胞再次融合后消化转移到共聚焦皿或细胞培养板进行胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)免疫荧光鉴定及后续实验。预实验结果显示GFAP阳性细胞>95%,符合实验要求。星形胶质细胞分为如下处理组:未处理组,IFN- γ (20 ng/mL)处理组,IFN- γ (20 ng/mL)+17 β -E2(0.28 ng/mL),IFN- γ (20 ng/mL)+17 β -E2(2.75 ng/mL)和IFN- γ (20 ng/mL)+17 β -E2(27.50 ng/mL)处理组,处理时间36 h。17 β -E2购自SigmaAldrich(St Louis, MO, USA)。重组IFN- γ 购于PeproTech(Rocky Hill, NJ, USA)。

1.2 免疫荧光

细胞经40 g/L多聚甲醛固定30 min,0.3% TritonX-100透化20 min,2%BSA封闭20 min。小鼠抗小鼠MHC II抗体(1:50, Abam(Hong Kong) Ltd, New Territories, HK)和兔抗小鼠GFAP抗体(1:100, Santa cruz, California, USA)分别标记MHC II分子和GFAP,4 $^{\circ}$ C孵育过夜。随后标记抗小鼠(Alexa Fluor 555; 1:200, Abcam)和抗兔(Dylight[®] 488; 1:400, Abcam)荧光二抗。使用Zeiss LSM 510共聚焦显微镜(Carl Zeiss, Jena, Germany)拍照, Image-Pro Plus软件(Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA)计算平均荧光强度。

1.3 流式细胞检测

纯化的星形胶质细胞接种于6孔板(1 \times 10⁶细胞/孔),100 mL/L胎牛血清的DMEM-F12,37 $^{\circ}$ C,体积分数为5%CO₂培养箱培养24 h。洗涤细胞,每孔加入不含血清的DMEM-F12培养基,将细胞分为5个处理组(如前所述),然后将细胞用胰蛋白酶消化和收集。细胞用FITC-MHC II、APC-CD86,和PE-CD80流式抗体标记,阴性对照用相应的同型对照抗体标记。BD FACS Calibur流式细胞仪检测^[12]。流式检测数据用Flow Jo Software Ver. 7.6(Trustees of Leland Stanford Jr. University, Tree Star, Inc)分析。

1.4 免疫印迹

纯化的星形胶质细胞接种于6孔板(1 \times 10⁶细

胞/孔), 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM-F12, 37 °C, 体积分数 5%CO₂ 培养箱培养 24 h。洗涤细胞 2 次, 在培养瓶中加入含有蛋白酶及制剂的裂解缓冲液裂解细胞提取蛋白。经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 后, 电转移至聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene difluoride, PVDF)。5% 脱脂牛奶, 0.05% 吐温 20 的三磷酸盐缓冲液 (TBS-T) 封闭。抗小鼠 ER α , ER β 一抗 (Santa cruz) 4 °C 孵育过夜, β -actin 为内参蛋白。次日, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (Calbiochem, San Diego, CA, USA)。然后加入过氧化物酶标记链霉亲和素和底物用于检测。Image-Pro Plus 软件 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) 分析蛋白条带灰度值。

1.5 酶联免疫吸附试验

收集不同细胞处理组培养上清液, 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 法检测上清液中细胞因子 (IL-17 和 TGF- β) 的水平。ELISA 检测试剂盒购自 Bender (Coatesville, PA, USA)。具体步骤参照试剂盒说明书进行。检测结果用 pg/mL 表示。

1.6 小鼠 Th17 细胞体外极化及趋化实验

将 C57BL/6 小鼠断颈处死, 取脾脏分离小鼠脾细胞悬液。磁珠分选法分离小鼠 CD4+CD62L+T 细胞 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)。用含 anti-CD3 Abs (2 μ g/mL, eBioscience, San Diego, CA, USA) 的 PBS 溶液 37 °C 包被 6 孔板板底 2 h, 将上述分离的小鼠 CD4+CD62L+T 细胞以 5×10^5 /mL 种于事先包被好 anti-CD3 Abs 的 6 孔板中, 加入 anti-CD28 Abs (5 μ g/mL, eBioscience), human TGF- β (5 ng/mL, PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA), IL-6 (20 ng/mL, PeproTech), IL-23 (10 ng/mL, PeproTech), anti-IFN- γ (10 μ g/mL, BD Biosciences, CA, USA), anti-IL-4 (10 μ g/mL, BD Biosciences) 37 °C 5% CO₂ 细胞培养箱培养 96 h 促进 CD4+CD62L+T 细胞向 Th17 方向极化。

原代培养的 C57BL/6 乳鼠星形胶质细胞分为以下 4 组: 未处理组; IL-1 β (100 U/mL) 处理组; IL-1 β (100 U/mL)+17 β -E2 (2.75 ng/mL) 处理组; IL-1 β (100 U/mL)+17 β -E2 (2.75 ng/mL)+ICI182, 780 (ER 受体拮抗剂) (60.67 ng/mL) 处理组。处理 48 h。收集不同处理组细胞培养上清 (即条件培养基)。取 Transwell 24 孔板 (3 μ m, Corning, NY,

USA), 上室放入总数 4×10^5 个 Th17 细胞 (不含血清 RPMI1640 培养基细胞悬液 200 μ L, 细胞密度 2×10^6 个/mL), 下室放对照无血清培养基及星形胶质细胞条件培养基 500 μ L。37 °C 放置 4 h; 迁移至下室的 Th17 细胞进行流式细胞计数。

1.7 统计分析

数据用均数 \pm 标准差表示, SPSS 16 软件 (SPSS Inc., Chicago, USA) 分析。组间比较采用 *t* 检验 (two-tailed student *t* test 或 方差分析 (one way ANOVA))。P < 0.05 值被认为具有统计学差异。

2 结 果

2.1 IFN- γ 激活的星形胶质细胞 ER α 表达增加

IFN- γ 诱导 ER α 的表达上调 (蛋白条带灰度值: 1.0 ± 0.1 vs. 1.5 ± 0.1 , P < 0.05), 然而对 ER β 的表达没有影响 (P > 0.05, 图 1)。

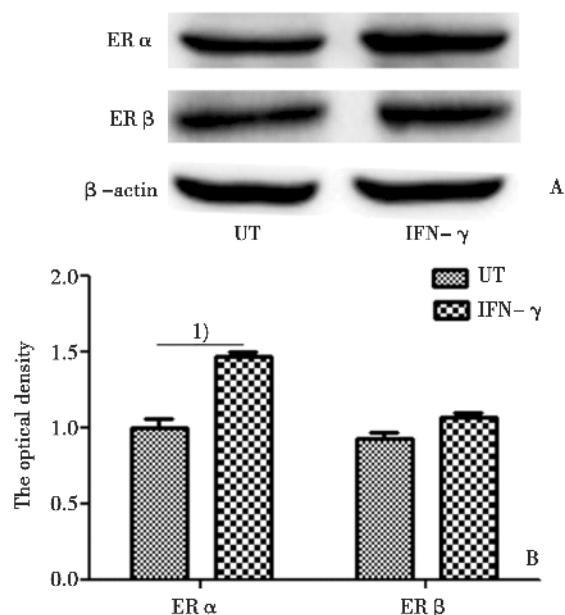


图 1 不同处理组星形胶质细胞 ER α 和 ER β 表达

Fig.1 ER α and ER β expression in astrocytes with different treatments for 36 h

UT: untreated. 1) P < 0.05 represent the statistical significance in the two-tailed student *t* test. (n = 3; IFN- γ : 20 ng/mL)

2.2 17 β -E2 抑制活化星形胶质细胞趋化 Th17 细胞

与未处理组相比, IFN- γ (20 ng/mL) 处理组星

表 1 不同星形胶质细胞处理组 Th17 细胞趋化实验结果

Table 1 Th17 cell transwell migration assay in control and different conditioned media		Cell number		
	UT	IFN-γ	IFN-γ+17β-E2	IFN-γ+17β-E2+I
The first time	5 760	10 836	7 658	8 831
The second time	4 822	15 963	8 254	18 004
The third time	9 194	20 689	6 418	16 836
$\bar{x} \pm s$	6 592 ± 2 302 ¹⁾	15 829 ± 4 928 ¹⁾²⁾	7 443 ± 937 ²⁾³⁾	14 557 ± 4 993 ³⁾

UT: untreated, I:ICI 182 780. 1) $P < 0.05$ for the comparison between UT and IFN-γ groups in one way ANOVA, 2) $P < 0.05$ for the comparison between IFN-γ and IFN-γ+17β-E2 groups, 3) $P < 0.05$ for the comparison between IFN-γ+17β-E2 and IFN-γ+17β-E2+I groups. $n = 3$

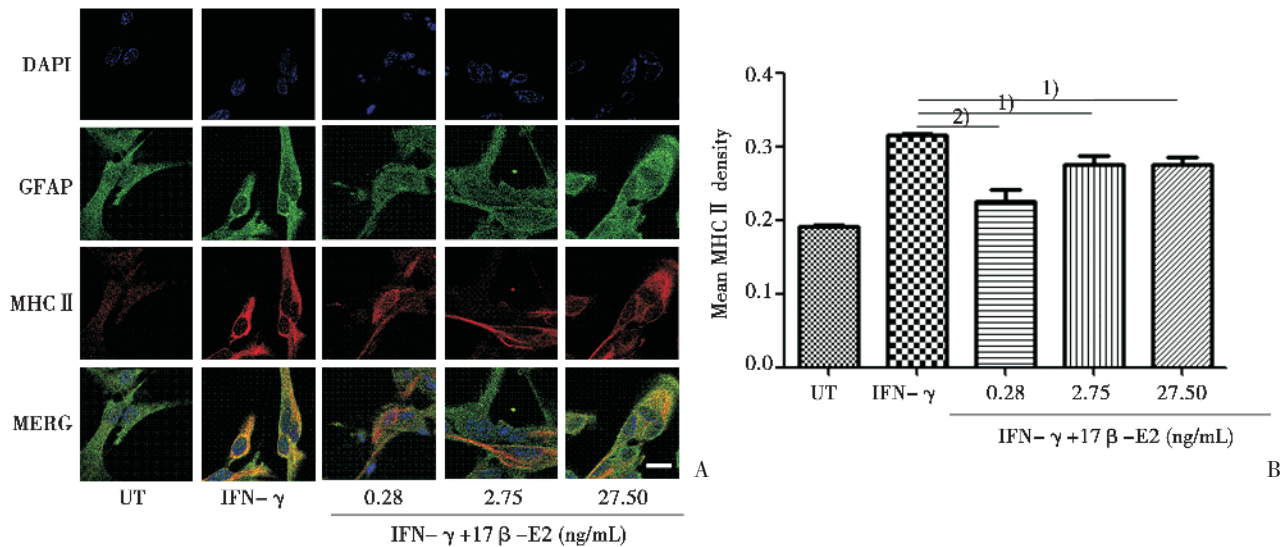


图 2 免疫荧光显示 17β-E2 抑制星形胶质细胞 MHC II 表达

Fig.2 Immunofluorescence showing that 17β-E2 decreases astrocytic MHC II expression in vitro

A: Immunofluorescence staining for GFAP and MHC II in astrocytes with different treatments for 36h (IFN-γ: 20 ng/mL) (Bar = 10 μm). B: Semi-quantitative measurement of mean fluorescence intensity of MHC II showing that 17β-E2 decreases astrocytic MHC II and co-stimulatory molecules expression in vitro. UT: untreated. 1) $P < 0.05$ and 2) $P < 0.01$ represent the statistical significance in one way ANOVA. ($n = 3$)

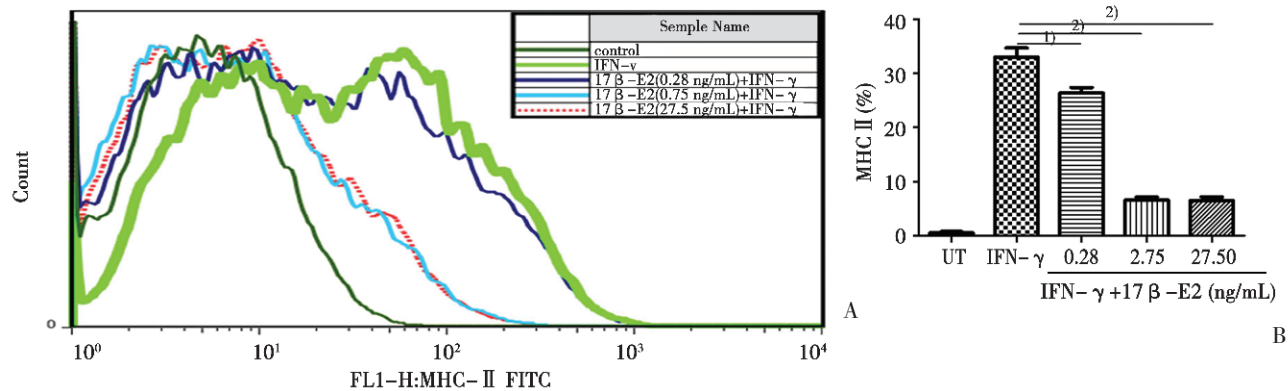


图 3 流式细胞检测显示 17β-E2 抑制星形胶质细胞 MHC II 的表达

Fig.3 Flow cytometry analysis showing that 17β-E2 decreases astrocytic MHC II and co-stimulatory molecules expression in vitro

A and B: MHC II expression in astrocytes with different treatments for 36h (IFN-γ: 20ng/mL). UT: untreated. 1) $P < 0.05$ and 2) $P < 0.01$ represent the statistical significance in one way ANOVA. ($n = 3$)

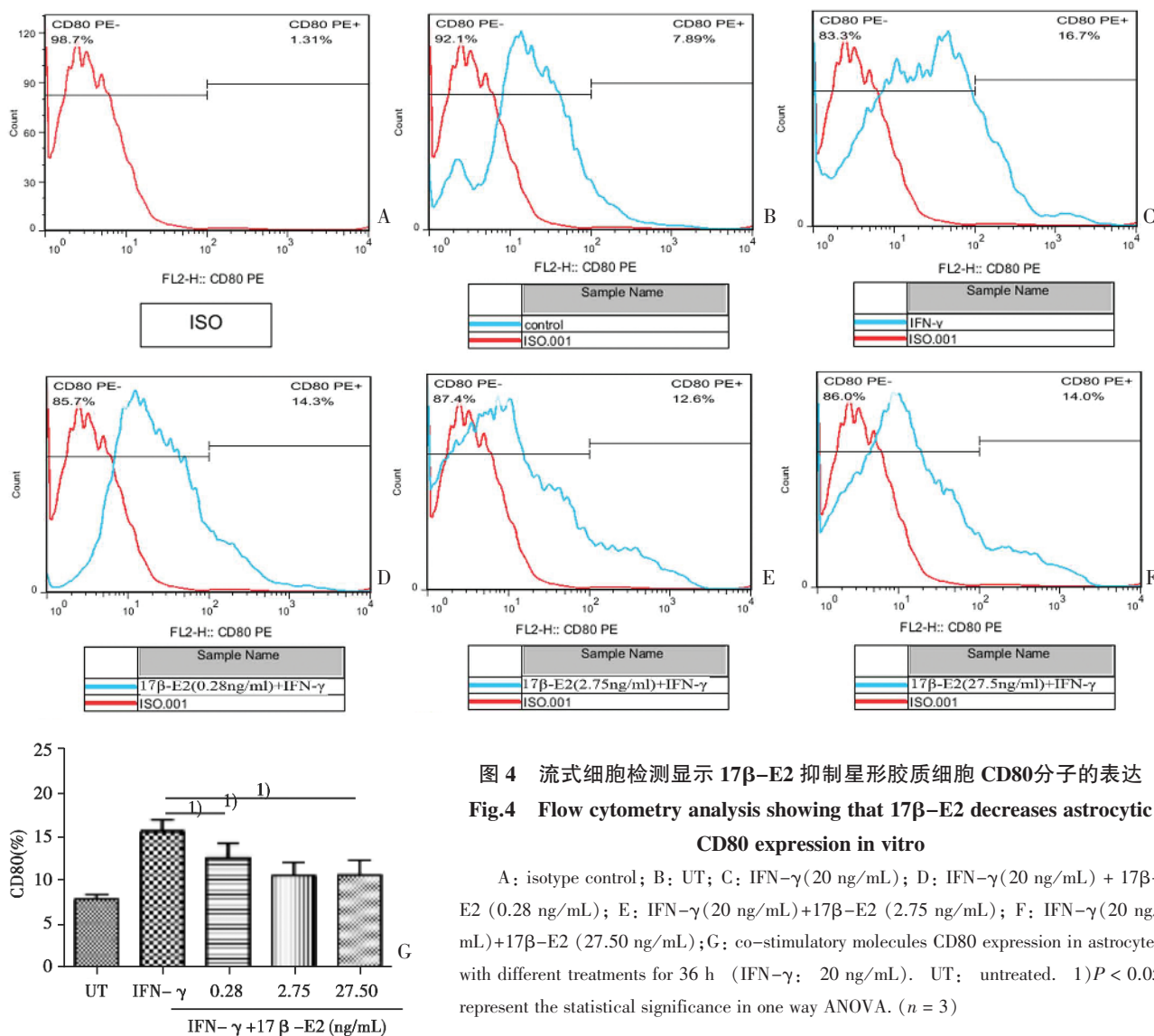


图 4 流式细胞检测显示 17 β -E2 抑制星形胶质细胞 CD80 分子的表达
Fig.4 Flow cytometry analysis showing that 17 β -E2 decreases astrocytic CD80 expression in vitro

A: isotype control; B: UT; C: IFN- γ (20 ng/mL); D: IFN- γ (20 ng/mL) + 17 β -E2 (0.28 ng/mL); E: IFN- γ (20 ng/mL)+17 β -E2 (2.75 ng/mL); F: IFN- γ (20 ng/mL)+17 β -E2 (27.50 ng/mL); G: co-stimulatory molecules CD80 expression in astrocytes with different treatments for 36 h (IFN- γ : 20 ng/mL). UT: untreated. 1) $P < 0.05$ represent the statistical significance in one way ANOVA. ($n = 3$)

形胶质细胞条件培养基趋化到下室的 Th17 细胞增多, 17 β -E2(2.75 ng/mL)抑制活化星形胶质细胞趋化 Th17 细胞, ER 受体拮抗剂 ICI 182 780 可抑制 17 β -E2 的抑制作用(表 1)。

2.3 17 β -E2 降低体外培养的星形胶质细胞 MHC II 及共刺激因子表达

预实验检测 IFN- γ (20 ng/mL)处理星形胶质细胞 24、36 和 48 h MHC II 表达的情况,发现 36 h MHC II 的表达最多(数据未显示)。免疫荧光显示,未处理组的星形胶质细胞几乎不表达 MHC II。IFN- γ (20 ng/mL)刺激 36 h 可诱导星形胶质细胞表达 MHC II。不同浓度(0.28 ng/mL-27.50 ng/mL)的 17 β -E2 治疗可明显降低 IFN- γ 活化的星形胶质细胞表达 MHC II。IFN- γ + 17 β -E2(0.28 ng/mL)组、IFN- γ + 17 β -E2 (2.75 ng/mL)组和

IFN- γ + 17 β -E2(27.50 ng/mL)星形胶质细胞表达 MHC II 的平均荧光强度分别为 0.26 ± 0.03 、 0.28 ± 0.02 和 0.28 ± 0.02 , 明显低于 IFN- γ 组 (0.32 ± 0.00 , 图 2)。

流式细胞检测结果证实 IFN- γ 可以诱导星形胶质细胞表达 MHC-II 类分子。此外,IFN- γ 还可诱导星形胶质细胞协同刺激分子 CD80 和 CD86 表达上调。不同浓度(0.28 ~ 27.50 ng/mL)的 17 β -E2 治疗可明显降低星形胶质细胞 MHC II, CD80 和 CD86 的表达(图 3 ~ 5),各组 MHC II, CD80 和 CD86 的表达结果见表 2。

2.4 17 β -E2 抑制活化星形胶质细胞分泌 IL-17

如图 6 所示,与未处理组相比,IFN- γ (20 ng/mL)处理组星形胶质细胞分泌 IL-17 水平显著增加 [$(17.05 \pm 2.14$ vs. $11.44 \pm 0.80)$ pg/mL, $P < 0.05$], 17 β -E2

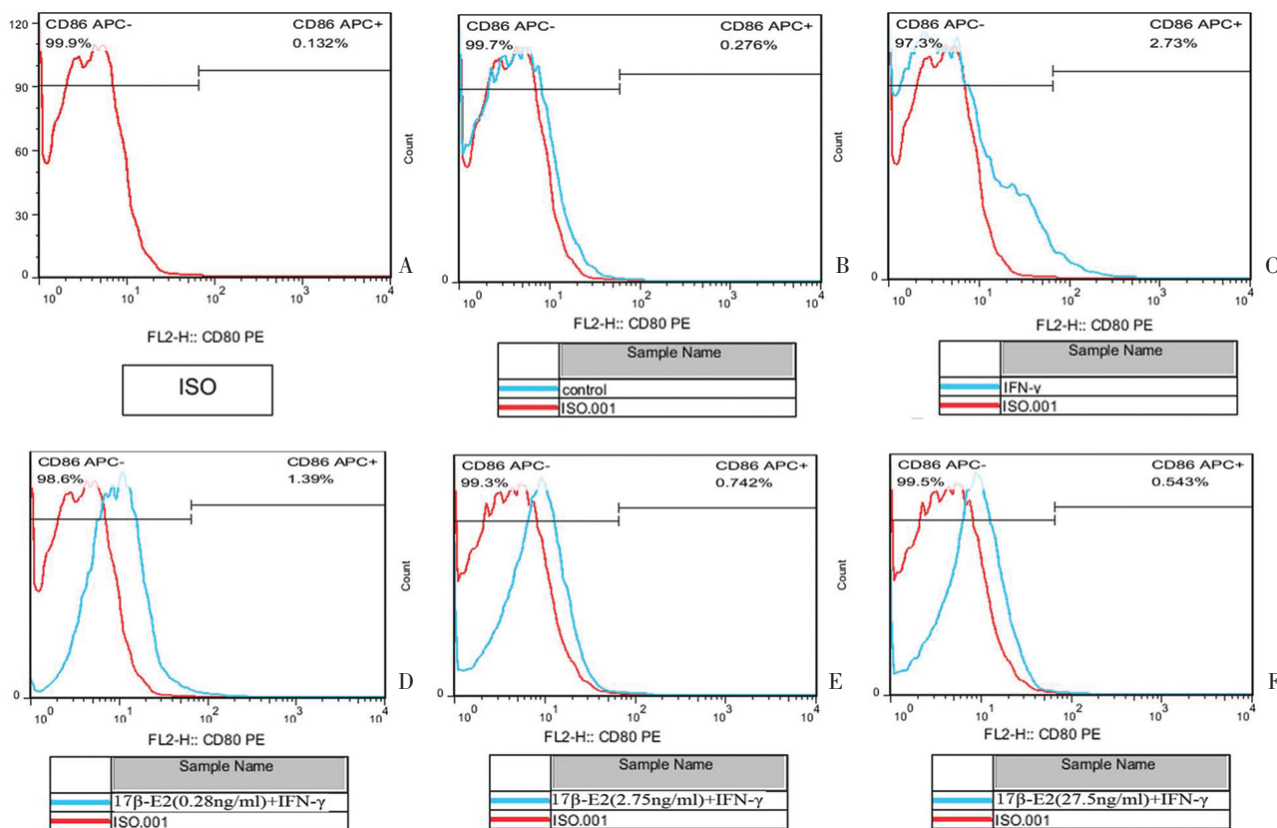


图 5 流式细胞检测显示 17β-E2 抑制星形胶质细胞 CD86 分子的表达

Fig.5 Flow cytometry analysis showing that 17β-E2 decreases astrocytic MHC II and co-stimulatory molecules expression in vitro

A: isotype control; B: UT; C: IFN-γ(20 ng/mL); D: IFN-γ(20 ng/mL) + 17β-E2 (0.28 ng/mL); E: IFN-γ(20 ng/mL) + 17β-E2 (2.75 ng/mL); F: IFN-γ (20 ng/mL) + 17β-E2 (27.5 ng/mL); G: co-stimulatory molecules CD86 expression in astrocytes with different treatments for 36 h (IFN-γ; 20 ng/mL). UT: untreated. 1) $P < 0.05$ and 2) $P < 0.01$ represent the statistical significance in one way ANOVA. ($n = 3$)

表 2 不同星形胶质细胞处理组 MHC II、CD80 和 CD86 的表达

Table 2 MHC, CD80, and CD86 expression in astrocytes with different treatments for 36 h

	UT	IFN-γ(20 ng/mL)	IFN-γ(20 ng/mL)+17β-E2 (ng/mL)		
			0.28 ng/mL	2.75 ng/mL	27.50 ng/mL
MHC II (%)	0.5 ± 0.3	33.0 ± 2.8	26.4 ± 1.8	6.6 ± 0.9	6.5 ± 1.2
CD80(%)	7.9 ± 0.9	15.6 ± 2.3	12.3 ± 3.3	10.5 ± 2.8	11.2 ± 3.6
CD86(%)	0.3 ± 0.0	2.2 ± 0.5	1.4 ± 0.3	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.2

UT: untreated.($n = 3$)

(27.50 ng/mL) 治疗显著逆转这种效应 (11.44 ± 0.80 vs. 17.05 ± 2.14 , $P < 0.05$)。不同处理的星形胶质细胞培养上清液的 TGF-β 水平无明显差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

本研究初步探讨了 17β-E2 对活化的星形胶

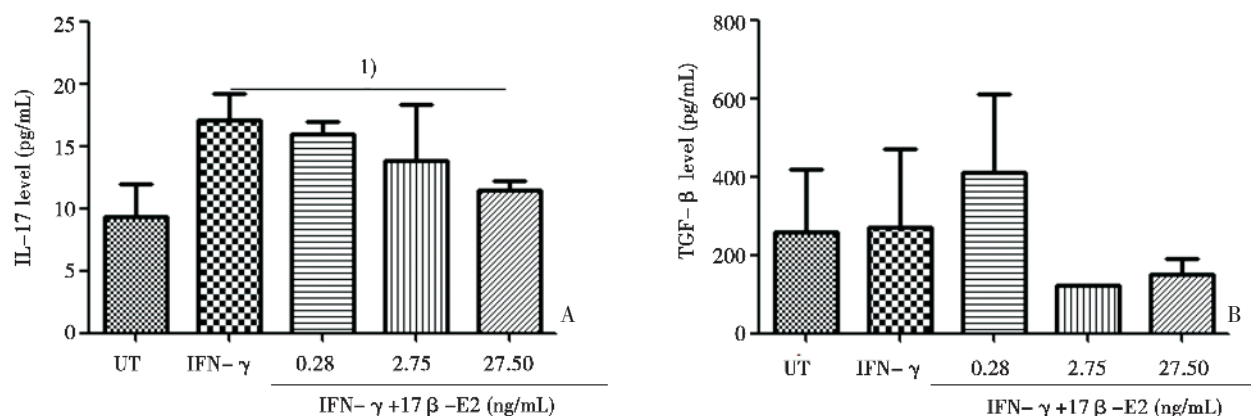


图 6 不同处理组星形胶质细胞分泌 IL-17 和 TGF-β 情况。

Fig.6 IL-17 and TGF-β production in astrocytes with different treatments for 36 h (IFN-γ: 20 ng/mL)

A: IL-17 levels in different astrocyte culture supernatants; B: TGF-β levels in different astrocyte culture supernatants. UT: untreated. 1) $P < 0.05$ represent the statistical significance in one way ANOVA. ($n = 3$)

质细胞对 Th17 细胞的趋化作用, 以及 MHC II 分子的表达及细胞因子分泌的作用。

与以往的研究相一致^[13], 我们证实星形胶质细胞表达 ERα 和 ERβ。此外, 我们还发现, IFN-γ 可诱导星形胶质细胞 ERα 表达上调, 而不影响但 ERβ 的表达。这一发现支持星形胶质细胞 ERα 是 E2 介导免疫调节的有效靶点, 炎性因子 IFN-γ 刺激上调 ERα 对 E2 介导免疫调节提供正反馈作用。

我们验证了 17β-E2 对星形胶质细胞对趋化 Th17 细胞功能的影响。趋化实验显示适当浓度的 17β-E2 (2.75 ng/mL) 可以抑制炎症活化的星形胶质细胞趋化 Th17 细胞。我们推测这一抑制作用可能由于 17β-E2 减少炎症活化星形胶质细胞表达 MHC II、CD80、CD86 分子及分泌炎性细胞因子, 从而使得 CNS 中 T 细胞的活化受到抑制, 不能产生更多的促炎因子及趋化因子诱导后续的炎症细胞, 如 Th17 细胞的招募。

星形胶质细胞可在体内外表达 MHC II 和协同刺激分子^[14], 并能够在 EAE 疾病后期发挥抗原提呈作用, 促进炎症反应^[14]。与以往的研究相一致^[6, 14], 我们的数据表明, 激活的星形胶质细胞表达 MHC II 和协同刺激分子。此外, 我们首次报道 17β-E2 可抑制星形胶质细胞 MHC II 和协同刺激分子的表达, 并可能进一步抑制星形胶质细胞抗原提呈功能及淋巴细胞活化作用。17β-E2 抑制星形胶质细胞 MHC II 表达的分子机制尚不清楚。IFN-γ 活化的星形胶质细胞 MHC II 的表达受 II

类转录激活因子 (class II transcriptional activator, CIITA) 调节^[15-16]。因此我们推测 17β-E2 可能通过抑制 CIITA 表达及其转录水平降低 MHC II 的表达, 需进一步的实验来验证这一假说。

体外研究表明 E2 (或其类似物) 可以降低脂多糖激活的星形胶质细胞产生 IL-6, IL-10 和 TNF-α^[9, 17], 我们的研究提供了更多 E2 影响星形胶质细胞细胞因子 (IL-17 和 TGF-β) 产生的证据。虽然 IL-17 分泌很大程度上与 T 细胞相关, 然而最近一项研究在 MS 尸检病理组织中发现星形胶质细胞亦产生此类细胞因子^[8]。IL-17 在一些自身免疫性疾病中可促进中性粒细胞的募集, 趋化因子的产生及树突状细胞的成熟^[18]。我们的研究发现, IFN-γ 刺激后的小鼠星形胶质细胞分泌 IL-17 增加, 17β-E2 (27.50 ng/mL) 则可以显著抑制 IL-17 的分泌。TGF-β 在自身免疫性疾病中具有免疫抑制作用。TGF-β 在 IL-2 辅助作用下能增加 T 细胞 Foxp3 表达及 Treg 细胞的比例, 促进免疫耐受^[19]。已往一些研究发现 17β-E2 可促进星形胶质细胞分泌 TGF-β^[20]。但与这些研究不同, 我们没有发现 17β-E2 会增加 IFN-γ 活化星形胶质细胞 TGF-β 的产生。这种差异可能是由于本研究和既往研究中星形胶质细胞活化状态不同 (本研究的星形胶质细胞是经 IFN-γ 活化的, 而既往研究中的星形胶质细胞是静息状态下的)。因此, 我们推测 17β-E2 对星形胶质细胞 TGF-β 产生的促进作用在炎症环境中可能受到抑制。

综上所述, 本研究的初步结果表明 17 β -E2 可能部分通过抑制炎症活化的星形胶质细胞表达 MHC II、CD80、CD86 及分泌炎症因子抑制对 Th17 细胞的趋化作用。这些发现揭示了 E2 免疫调节新的作用机制, 有助于我们更好地理解 E2 治疗 CNS 炎症性疾病的药理作用并提示活化的星形胶质细胞可能是 MS 治疗的新靶点。诚然, 我们的初步研究尚有一定的不足, 后续研究将进一步探讨是否 17 β -E2 抑制星形胶质细胞表达抗原提呈相关分子及炎症细胞因子可以直接导致 Th17 细胞趋化能力下降。

参考文献:

- [1] Soldan SS, Alvarez Retuerto AI, Sicotte NL, et al. Immune modulation in multiple sclerosis patients treated with the pregnancy hormone estriol [J]. *J Immunol*, 2003, 171(11): 6267-6274.
- [2] Spence RD, Hamby ME, Umeda E, et al. Neuroprotection mediated through estrogen receptor-alpha in astrocytes[J]. *Proc Natl Acad of Sci USA*, 2011, 108(21): 8867-8872.
- [3] Sallusto F, Impellizzeri D, Basso C, et al. T-cell trafficking in the central nervous system [J]. *Immunological reviews*, 2012, 248(1): 216-227.
- [4] Lelu K, Delpy L, Robert V, et al. Endogenous estrogens, through estrogen receptor alpha, constrain autoimmune inflammation in female mice by limiting CD4+ T-cell homing into the CNS[J]. *European journal of immunology*, 2010, 40(12): 3489-3498.
- [5] Nair A, Frederick TJ, Miller SD. Astrocytes in multiple sclerosis: a product of their environment[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(17): 2702-2720.
- [6] Chastain EM, Duncan DS, Rodgers JM, et al. The role of antigen presenting cells in multiple sclerosis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1812(2): 265-274.
- [7] Kort JJ, Kawamura K, Fugger L, et al. Efficient presentation of myelin oligodendrocyte glycoprotein peptides but not protein by astrocytes from HLA-DR2 and HLA-DR4 transgenic mice [J]. *J Neuroimmunol*, 2006, 173(1-2): 23-24.
- [8] Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis[J]. *Am J Pathol*, 2008, 172(1): 146-155.
- [9] Dong Y, Benveniste EN. Immune function of astrocytes [J]. *Glia*, 2001, 36(2): 180-190.
- [10] Constantinescu CS, Tani M, Ransohoff RM, et al. Astrocytes as antigen-presenting cells: expression of IL-12/IL-23[J]. *J Neurochem*, 2005, 95(2): 331-340.
- [11] Yamazaki T, Yang XO, Chung Y, et al. CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells [J]. *Journal of immunology*, 2008, 181(12): 8391-8401.
- [12] Maecker HT, Trotter J. Flow cytometry controls, instrument setup, and the determination of positivity[J]. *Cytometry A*, 2006, 69(9): 1037-1042.
- [13] Al-Bader MD, Malatiali SA, Redzic ZB. Expression of estrogen receptor α and β in rat astrocytes in primary culture: effects of hypoxia and glucose deprivation[J]. *Physiol Res*, 2011, 60(6): 951-960.
- [14] Yang JF, Tao HQ, Liu YM, et al. Characterization of the interaction between astrocytes and encephalitogenic lymphocytes during the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice[J]. *Clin Exp Immunol*, 2012, 170(3): 254-265.
- [15] Stuve O, Youssef S, Slavin AJ, et al. The role of the MHC class II transactivator in class II expression and antigen presentation by astrocytes and in susceptibility to central nervous system autoimmune disease [J]. *J Immunology*, 2002, 169(12): 6720-6732.
- [16] Jarosinski KW, Massa PT. Interferon regulatory factor-1 is required for interferon-gamma-induced MHC class I genes in astrocytes[J]. *J Neuroimmunol*, 2002, 122(1-2): 74-84.
- [17] Cerciat M, Unkila M, Garcia-Segura LM, et al. Selective estrogen receptor modulators decrease the production of interleukin-6 and interferon-gamma-inducible protein-10 by astrocytes exposed to inflammatory challenge in vitro[J]. *Glia*, 2010, 58(1): 93-102.
- [18] Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity [J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(4): 345-350.
- [19] Mirshafiey A, Mohsenzadegan M. TGF- β as a promising option in the treatment of multiple sclerosis [J]. *Neuropharmacology*, 2009, 56(6-7): 929-936.
- [20] Dhandapani KM, Wade FM, Mahesh VB, et al. Astrocyte-derived transforming growth factor- β mediates the neuroprotective effects of 17 β -estradiol: involvement of nonclassical genomic signaling pathways [J]. *Endocrinology*, 2005, 146(6): 2749-2759.