

· 论 著 ·

人外周血初始 CD4⁺ T 细胞向 Th17 细胞分化条件研究

王颖莹¹, 潘涛², 贾凡³, 黄媛³, 张伟³

(1. 中国人民解放军总医院南楼门诊部住院病案管理科, 北京 100853; 2. 碧海欧(上海)贸易有限公司, 上海 200021; 3. 军事医学科学院附属三〇七医院检验科, 北京 100071)

摘要:目的 探讨细胞因子水平对人外周血初始 CD4⁺ T 细胞向辅助性 T 细胞 17(Th17 细胞)分化的影响。方法 选取人外周血单个核细胞分选初始 CD4⁺ T 细胞,在转化生长因子(TGF)-β 存在下,以白细胞介素(IL)-1β 和 IL-23 系列水平刺激其向 Th17 细胞分化。以流式细胞术检测 IL-17A⁺ 细胞比例,以荧光定量聚合酶链式反应(PCR)检测 IL-17A、IL-17F、维 A 酸相关孤独受体(ROR)γt、RORα 和 IL-23R 等相关因子表达水平。**结果** 初始 CD4⁺ T 细胞经细胞因子刺激,IL-17A⁺ 细胞比例显著升高(0.2%~1.0%),同时 IL-17A 等相关因子表达均显著增高,差异有统计学意义($P < 0.05$),但 IL-1β 和 IL-23 系列水平刺激没有出现显著的量效关系,差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 现有条件可成功诱导人外周血初始 CD4⁺ T 细胞向 Th17 细胞分化,但分化效率不高,提高 IL-1β 和 IL-23 水平未显著提升分化效率,具体原因亟待进一步探索。

关键词:人初始 CD4⁺ 细胞; 辅助性 T 细胞 17; 分化条件; 细胞因子**DOI:**10.3969/j.issn.1672-9455.2017.07.015 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)07-0948-04

Study on the differentiation conditions for human peripheral blood naive CD4⁺ cells differentiating to Th17 cells

WANG Yingying¹, PAN Tao², JIA Fan³, HUANG Yuan³, ZHANG Wei³

(1. Department of Inpatients Medical Records Management, Outpatient Department, West Division of General Hospital of PLA, Beijing 100853, China; 2. Stemcell Technologies China Co. LTD, Shanghai 200021, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Affiliated 307 Hospital, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract: **Objective** To investigate the influence of cytokines levels on the differentiation of human peripheral blood naive CD4⁺ T cells to Th17 cells. **Methods** Human naive CD4⁺ T cells were isolated from human peripheral blood mononuclear cells(PBMC), then differentiated to Th17 cells by the stimulation of IL-1β and IL-23 series levels under the existence of TGF-β. The proportion of IL-17A⁺ cells was measured with flow cytometry. The expression levels of Th17 cell related factors, including IL-17A, IL-17F, RORγt, RORα and IL-23R, were determined with the fluorescent quantitative PCR. **Results** The proportion of IL-17A⁺ cells was significantly increased by the cytokine stimulation on human naive CD4⁺ T cells (from 0.2% to about 1.0%), meanwhile the expression levels of IL-17A related cytokines were significantly elevated, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). However, the stimulation of IL-1β and IL-23 series levels did not show significant dose-effect relation, the difference had no statistical significance ($P > 0.05$). **Conclusion** The human peripheral blood naive CD4⁺ T cells could be successfully induced to differentiate to Th17 cells under the existing condition. But the differentiation efficiency is not high. Increasing the IL-1β and IL-23 levels does not apparently increase the differentiation efficiency, and its specific reasons are urgently needed to be further investigated.

Key words: human naive CD4⁺ T cells; Th17 cells; differentiation conditions; cytokines

CD4⁺ 辅助 T 细胞在激活后可分化为不同亚型的效应 T 细胞,除了经典的辅助性 T 细胞(Th)1、Th2 之外,近来发现了数种其他亚型的效应细胞,如 Th9、Th17、Th21、调节性 T 细胞(Treg 细胞)等^[1-2],这些细胞亚型的诱导分化条件有各自的特点,其中诱导所用细胞因子类型起到主要的定向分化作用,例如初始 CD4⁺ T 细胞在白细胞介素(IL)-12 和干扰素(IFN)-γ 共同刺激下,最终分化为 Th1 细胞;而在 IL-4 和 IL-33 刺激下则分化为 Th2 细胞,其他亚型细胞也有类似状况^[3]。但初始 CD4⁺ T 细胞的种属差异可能会对诱导所用细胞因子类型产生重大影响,如 Th17 细胞的诱导分化中,小鼠源性细胞的分化条件较为有效和稳定,因此文献多采用小鼠来源细胞进行诱导分化;而人源性细胞的诱导条件没有定论,且分化效率也不高,亟待进一步探索。本研究在文献基础上,以不同水平的细胞因子探索人初始 CD4⁺ T 细胞向 Th17 细胞分化的条件^[4-5],现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 人浓缩白细胞由军事医学科学院附属三〇七

医院全军采供血中心提供,采用人淋巴细胞分离液 Ficoll-Paque(美国 GE 公司),初始 CD4⁺ T 细胞分离试剂盒、人 T Cell Activation/Expansion Kit、MACSmix Tube Rotator(德国美天旎公司),RPMI 1640(美国 Hyclone 公司),活性炭处理胎牛血清(以色列 Biowest 公司),rhIL-1β、rhIL-23、hTGF-1(美国 R&D system),PMA 和 Ionomycin(美国 Sigma 公司),Monocin、PE-抗-hIFN-γ、FITC-抗-hIL-17A、FITC-抗-hCD4、PE-抗-hCD45RA(美国 ebioscience 公司),Saponin(美国 Alfa 公司)、Trizol(美国 Invitrogen 公司)、M-MLV 逆转录酶、SYBR Premix Ex Taq II、50bp DNA Marker(大连 Takara 公司),流式细胞仪(美国 BD 公司 FACScalibur)、Real-time 聚合酶链式反应(PCR)仪(美国 AppliedBiosystem 公司 ABI7300)。PCR 引物由 Invitrogen 合成,序列见表 1。

1.2 方法

1.2.1 初始 CD4⁺ T 细胞分离

严格按试剂盒说明进行操作。简要过程如下:人浓缩白细胞(离体 8 h 内)加入磷酸盐缓冲液[PBS, 含 10 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)]稀释 2~4

倍;将稀释过的浓缩白细胞小心加入到 15 mL Ficoll-Paque 上,400 r/min 离心 35 min,取出外周血单个核细胞(PBMC)层;加入 PBS 300 r/min 离心 10 min 洗涤 PBMC;洗涤 1~2 次。计数,取 1×10^8 细胞加入 0.4 mL 纯化缓冲液[PBS+2 mmol/L EDTA+0.5%牛血清清蛋白(BSA)]重悬细胞,再加入 100 μ L Naive CD4⁺ T Cell Biotin-Antibody Cocktail II 混匀,4 $^{\circ}$ C 放置 10 min。加入 10~20 mL 纯化缓冲液 300 r/min 离心 10 min,去上清。加入 0.8 mL 纯化缓冲液和 200 μ L Anti-Biotin MicroBeads 混匀 4 $^{\circ}$ C 放置 15 min;加入 10~20 mL 纯化缓冲液 300 r/min 离心 10 min,去上清。加入 0.5 mL 纯化缓冲液重悬细胞,以 LS 柱分选获得初始 CD4⁺ T 细胞。

表 1 PCR 引物合成序列

引物名称	引物序列	产物长度(bp)	
hIL-17A	Up-Stream primer	atccacctcaccctggaatctc	161
	Down-Stream primer	gcaggaccaggatctcttctgt	
hIL-17F	Up-Stream primer	ccagcgcggtttccatgctc	130
	Down-Stream primer	gatgacgcccaagtctctaca	
hIL-23R	Up-Stream primer	ttccatctctacagggcacctta	134
	Down-Stream primer	tccagttcgggaatgatctgtt	
hRORc	Up-Stream primer	acttttcggagatgagattgc	213
	Down-Stream primer	tttccacatgctggctacaca	
hRORa	Up-Stream primer	ccatgcaagatctgtggagaca	165
	Down-Stream primer	caccgcggttaaagatgatgt	
hHPRT1	Up-Stream primer	gctttccttggtcaggcagta	144
	Down-Stream primer	cttctacgattccctccatc	

1.2.2 初始 CD4⁺ T 细胞纯度鉴定 取待鉴定细胞 1×10^6 个,按抗体使用说明加入抗-hCD4-FITC、抗-hCD45RA-PE 抗体,加入 staining buffer (PBS+0.2%BSA+0.09%NaN₃)调整为 100 μ L 每管,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。staining buffer 洗涤 2 次,每管加入 500 μ L staining buffer,流式细胞术检测分析。

1.2.3 细胞诱导分化及培养 取新分离细胞加入 RPMI-1640 培养基[含 2 mmol/L 谷氨酰胺,1%(v/v)非必需氨基酸,1%(v/v)丙酮酸钠,青霉素 100 U/mL 和链霉素 100 mg/mL,10%(v/v)活性炭处理的胎牛血清],将细胞密度调整至 6×10^5 细胞/mL,加入激活磁珠(标记抗-CD2、抗-CD3、抗-CD28),接种于 24 孔板。分化刺激细胞因子水平:转化生长因子(TGF)- β 5 ng/mL,IL-1 β 10~50 ng/mL,IL-23 10~50 ng/mL。37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养,3 d 后半量换液,继续培养至 5 d。空白对照组除了不加细胞因子之外,其余处理同于诱导组。

1.2.4 胞内细胞因子流式细胞术分析 培养 5 d 的细胞加入 10 ng/mL 丙二醇甲醚醋酸酯(PMA)、Ionomycin(750 ng/mL)和 Monensin(2 μ mol/L),37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养 5 h。收集细胞,调整细胞数量至 1×10^6 细胞每管,PBS 洗一遍,加入 4%多聚甲醛 4 $^{\circ}$ C 固定 30 min,洗去多聚甲醛,加入 0.5% Saponin 通透液,4 $^{\circ}$ C 透化处理细胞 20 min,洗去通透液,加入 FITC-抗-hIL-17 和 PE-抗-hINF- γ ,并加入 0.5% Saponin 通透液调整体系至 100 μ L,4 $^{\circ}$ C 避光放置 30 min。用 0.1% Saponin 通透液洗涤两遍,重悬细胞进行流式分析。所收集数据以 Cell Quest 软件进行分析。

1.2.5 荧光定量 PCR 检测 Th17 细胞相关基因的表达。培养 5 d 的细胞加入 PMA(10 ng/mL)、Ionomycin(750 ng/mL)和 Monensin(2 μ mol/L),37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养 24 h。Trizol 裂解细胞并提取总 RNA,2 μ L 总 RNA 与 50 pmol/ μ L Oligo(dT) 1 μ L 混合加焦碳酸二乙酯(DEPC)水调整至 15 μ L,

70 $^{\circ}$ C 变性 5 min,立即置冰上 2 min;加入 5 \times Reaction buffer 5 μ L,dNTP(10 mmol/L)1.25 μ L,0.5 μ L RNA 酶抑制剂(40 U/ μ L),DEPC 水 2.25 μ L,M-MLV 反转录酶(200 U/ μ L)1 μ L,经 42 $^{\circ}$ C 60 min 反应,反转录成 cDNA。荧光定量 PCR 在 ABI7300 定量 PCR 仪中完成,反应体系为:80 ng cDNA、上下游引物混合物共 2 μ L,12.5 μ L SYBR Green Premix II,5 μ L ROX reference Dye、9 μ L ddH₂O,总体积为 25 μ L,反应条件为:95 $^{\circ}$ C 30 s;95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 31 s,40 个循环。内参参为 HPRT1。

1.3 统计学处理 PCR 所收集数据先后以内参照 HPRT1 和空白对照组标准化后进行统计分析,标准化公式:(1) Δ CT=Ct Target-Ct HPRT1;(2) $\Delta\Delta$ Ct= Δ Ct Target- Δ Ct Blank;(3)Relative expression= $2^{-\Delta\Delta$ CT}。组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 初始 CD4⁺ T 细胞纯度 人 PBMC 经抗体结合和磁性标记分离后,所得细胞用 FITC-抗-hCD4 和 PE-抗-hCD45RA 抗体进行流式检测,结果显示分选所得初始 CD4⁺ T 细胞纯度达到 97%以上,说明成功分选初始 CD4⁺ T 细胞。见图 1。

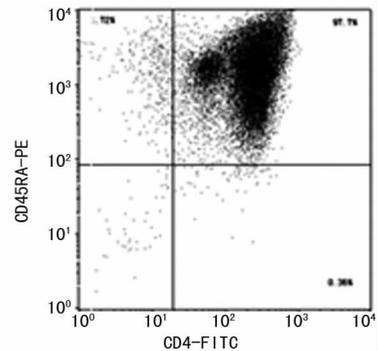


图 1 人初始 CD4⁺ T 细胞纯度检测

2.2 成功诱导初始 CD4⁺ T 细胞分化为 IL-17A⁺ 细胞 人初始 CD4⁺ T 细胞在抗-CD2、抗-CD3、抗-CD28 磁珠与 IL-1 β (10 ng/mL)、IL-23(10 ng/mL)、TGF- β (5 ng/mL)共刺激下培养 5 d 后,流式细胞检测发现,IL-17A⁺ 细胞由空白对照组的 0.2% 以下增加到诱导组的 1.0% 左右,少数可达到 1.2% 左右,见图 2。此外,Real-time 荧光定量 PCR 结果显示,诱导组细胞所表达的 Th17 特征性细胞因子 IL-17A 和 IL-17F 的 mRNA 水平,比空白对照组分别升高约 4 倍和 10 倍,IL-23R mRNA 水平表达也增加了约 10 倍;Th17 细胞分化特征性转录因子维 A 酸相关孤独受体(ROR) γ T 和 ROR α mRNA 表达较对照组分别升高约 30 倍和 10 倍,与空白对照组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 3,表明 IL-1 β 、IL-23 和 TGF- β 能显著促进 Th17 细胞相关因子的表达。

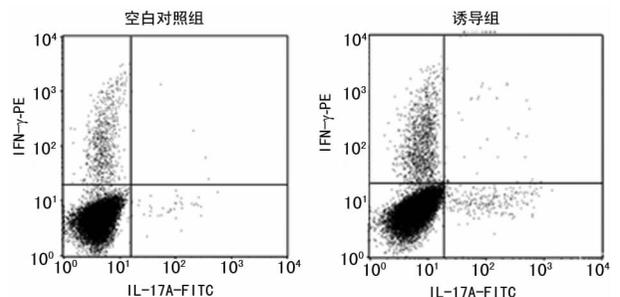
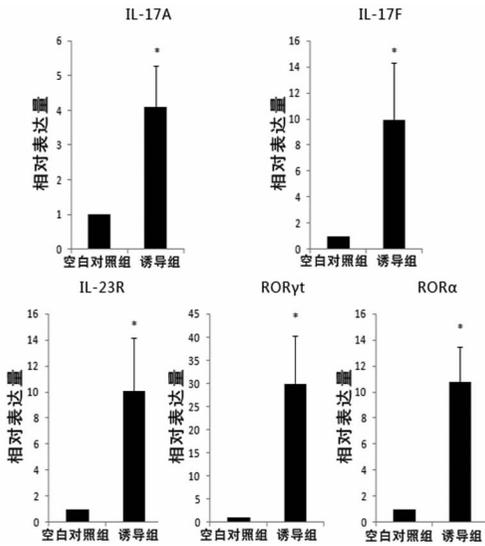


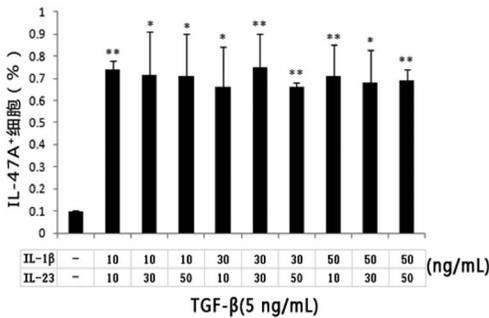
图 2 IL-1 β 、IL-23 和 TGF- β 诱导人初始 CD4⁺ T 细胞分化为 IL-17A⁺ 细胞



注: n=3; 与 Blank 对照组比较, * P<0.05。

图 3 IL-1β、IL-23 和 TGF-β 促进 Th17 细胞相关因子的表达

2.3 未发现 IL-1β 和 IL-23 对诱导分化存在量效关系 在抗-CD2、抗-CD3、抗-CD28 激活磁珠与 TGF-β(5 ng/mL) 存在条件下, 设置 IL-1β(10~50 ng/mL) 和 IL-23(10~50 ng/mL) 水平梯度。培养 5 d 后对细胞进行流式分析, 结果显示 IL-1β 和 IL-23 各水平组合与空白对照组比较, 均能显著提高表达 IL-17A 细胞的比例, 差异有统计学意义 (P<0.05), 但各水平组合之间的诱导效率比较差异无统计学意义 (P>0.05)。表明 10~50 ng/mL 的 IL-1β 和 IL-23 对 Th17 细胞分化诱导没有显著的剂量效应。见图 4。



注: n=3; 与空白对照组比较, * P<0.05, ** P<0.01。

图 4 不同水平 IL-1β 和 IL-23 的诱导效率

3 讨 论

长期以来, 效应性 CD4+ T 细胞被大体分为 Th1 细胞和 Th2 细胞, 其中 Th1 细胞主要参导细胞免疫和迟发性超敏性炎症反应等, 而 Th2 则可辅助 B 细胞分化为抗体分泌细胞, 参与体液免疫应答。随着研究的深入, 具有不同免疫功能特点的多种细胞亚型已陆续被发现^[1]。其中, Th17 细胞即是一类比较重要的效应细胞, 在抗感染和清除病原体方面有重要作用, 同时也参与多种自身免疫疾病的发病过程。近期发现, Th17 细胞还可能与糖尿病、肿瘤免疫等有密切关系^[2-3]。

在相关研究中, 为了获得比较单一的细胞类型, 多采用特定细胞因子对初始 CD4+ T 细胞加以诱导, 获得相应的效应细胞亚型。目前, 多数细胞亚型的分化条件已得到充分探索, 有较好的分化效率, 例如以 IL-12 和干扰素 (IFN)-γ 共同刺激初始 CD4+ T 细胞, 使细胞的转录因子 stat4、T-bet 依次活化, 最终分化为 Th1 细胞; 而 IL-4 和 IL-33 则可激活 stat6 和 gata3,

诱导分化 Th2 细胞; TGF-β 和 IL-4 则激活转录因子 IRF4 和 PU-1, 促进 Th9 细胞分化; 而 IL-6 和肿瘤坏死因子 (TNF)-α 激活 AhR, 促进 Th22 细胞分化; IL-6 和 IL-21 则可诱导活化 BCL-6, 进而促进滤泡性辅助性 T 细胞 (Tfh 细胞) 分化; 在 TGF-β 刺激下, 转录因子 Foxp3 被活化, 并分化为 Treg 细胞^[4-5]。

但是, 并非所有亚型细胞的分化条件都被充分探明, 本研究主要关注的人 Th17 细胞诱导分化条件即是如此。多篇文献表明^[5-6], 小鼠初始 CD4+ T 细胞在 TGF-β、IL-6 及 IL-23 共同作用下, 可激活 stat3 和 RORγt, 进而诱导出较高比例的 IL-17A+ 细胞; 也有文献报道, 用 IL-21 和 TGF-β 共同刺激同样可起到诱导作用。但是人源性初始 CD4+ T 细胞的诱导条件无定论, 有文献先后报道 IL-6+IL-1β、IL-23+IL-1β、TGF-β+IL-23+促炎性细胞因子、TGF-β+IL-21 等多种诱导方法^[5,7-8], 但都难以企及鼠源性细胞的分化效果 (可达 30% 以上)^[9]。

在仔细研究既有文献基础上, 本研究采用人初始 CD4+ T 细胞作为研究对象, 确定以 IL-1β、TGF-β 和 IL-23 作为主要诱导因子, 以不同的组合来探索人初始 CD4+ T 细胞向 Th17 细胞分化的条件, 结果发现, 3 种细胞因子的组合确实可以显著诱导 IL-17A+ 细胞的产生, 相应的关键转录因子 RORγt 和 RORα、细胞因子 IL-17A 和 IL-17F、IL-23R 等表达都显著升高, 但其分化效率 (1% 左右) 确实远远不如鼠初始 CD4+ T 细胞的分化效率, 也不如人 CD4+ T 细胞的分化效率 (5%~20%)^[7,10]。而国内相关文献多数用 PBMC 或 CD4+ T 细胞来进行 Th17 细胞的分化研究, 而很少用初始 CD4+ T 细胞来诱导^[10-12], 可能与上述状况有一定关系。Littman 等^[6]使用成人外周血初始 CD4+ T 细胞进行诱导, 分化效率也在 1% 左右; 而 Volpe 等^[8]使用人脐带血初始 CD4+ T 细胞进行诱导, 分化效率达 3% 以上, 但这一分化率的差异是否由孕产妇特殊体内环境所致, 尚有待探索。

既往文献报道表明^[5,7,13], TGF-β 对鼠源性 Th17 细胞分化有比较肯定的促进作用, 而对人性 Th17 细胞分化的影响, 初期部分文献认为没有促进作用, 但后来文献发现了较为肯定的促进作用, 且作用水平已得到优化; IL-1β 为人性细胞分化所特有的, IL-23 则对 Th17 细胞的稳定和扩增起重要作用, 但这两者的使用剂量对 Th17 细胞分化的影响则未见报道。因此, 为探索能否通过提高细胞因子水平来提升分化效率, 笔者针对 IL-1β 和 IL-23 设置了一系列水平梯度 (10~50 ng/mL), 结果发现提高这 2 种细胞因子水平并未显著改变分化效率, 说明人初始 CD4+ T 细胞定向分化为 IL-17A+ 细胞过程中, 细胞因子的类型比水平更为重要, 现有细胞因子水平 (10 ng/mL IL-1β、10 ng/mL IL-23、5 ng/mL TGF-β) 足以产生诱导效应, 也提示在人初始 CD4+ T 细胞中, 现有条件下只有较少一部分可以被诱导分化, 可能存在某种未知的抑制机制或效应, 局限了可诱导分化的细胞比例。

综上所述, 人外周血初始 CD4+ T 细胞在现有条件下, 确实可在体外向 Th17 细胞方向分化, 但其分化效率相对较低, 很大程度上限制了体外研究的开展。其具体原因尚不明瞭: 可能是初始 CD4+ T 细胞内部存在一定的不均质性, 只有部分细胞可被目前所用的细胞因子诱导; 可能是在分化过程中, 发生了反馈性抑制等情况; 可能是因为最佳诱导因子尚未被发现; 可能与初始 CD4+ T 细胞的来源有关。为此, 亟待开展进一步研究, 以探明并克服这一未知的局限因素。

参考文献

[1] Hirahara K, Nakayama T. CD4+ T-cell (下转第 953 页)

在治疗后 4 d 最高,提示此时患者的颅脑组织炎性反应水平达到最高值,这与既往临床研究治疗后 4 d 患者易发生严重脑水肿等并发症的情况相一致。同时,本研究显示在任意时间点,轻度颅脑损伤患者的 3 种炎性因子水平均低于中重度颅脑损伤患者,表明 3 种炎性因子水平与病情严重程度存在相关性,可能随颅脑损伤的加重而不断增加。

综上所述,炎性因子 IL-1 β 、IL-6 和 IL-18 在颅脑损伤患者体内的表达代表患者病情的严重程度,是评价颅脑损伤早期炎性反应损伤程度的重要指标之一,能为患者尽早治疗疾病争取时间,具有重要的临床应用价值,值得推广。

参考文献

[1] 李天泉,张伟,周恩瑜. 开放性颅脑损伤的临床特点及预后因素分析[J]. 中国现代医学杂志,2015,25(17):89-93.
 [2] 李育平,张恒柱,余磊,等. 纳洛酮治疗急性重症颅脑损伤的 Meta 分析[J]. 中华神经外科疾病研究杂志,2014,13(3):204-208.
 [3] Frugier T, Morganti-Kossmann MC, O'Reilly D, et al. In situ detection of inflammatory mediators in post mortem human brain tissue after traumatic injury[J]. J Neurotrauma, 2010, 27(3):497-507.
 [4] 梁敏,汤树洪. 创伤性颅脑损伤中白细胞介素的研究进展[J]. 医学综述,2013,19(20):3689-3692.
 [5] Adams H, Koliass AG, Hutchinson PJ. The Role of Surgical Intervention in Traumatic Brain Injury[J]. Neurosurg Clin N Am, 2016, 27(4):519-528.
 [6] McGinn MJ, Povlishock JT. Pathophysiology of Traumatic Brain Injury[J]. Neurosurg Clin N Am, 2016, 27(4):397-407.
 [7] 王红鑫,刘志雄,刘劲芳. 盐酸纳美芬对急性创伤性颅脑

损伤患者脑保护作用的临床研究[J]. 国际神经病学神经外科学杂志,2014,41(2):110-114.
 [8] 刘旭. 颅脑损伤治疗的进展研究[J]. 中国实用神经疾病杂志,2011,14(17):89-91.
 [9] 买买提江·卡斯木,拜合提尼沙·吐尔地,石鑫,等. 营养代谢支持与调节对老年重症颅脑损伤患者的影响[J]. 中国老年学杂志,2012,32(21):4622-4624.
 [10] 黄富,肖华. 脑损伤昏迷患者预后评估的研究进展[J]. 临床神经外科杂志,2012,9(4):247-249.
 [11] Tsai YD, Liliang PC, Cho CL, et al. Delayed neurovascular inflammation after mild traumatic brain injury in rats[J]. Brain Inj, 2013, 27(3):361-365.
 [12] Denes A, Thornton P, Rothwell NJ, et al. Inflammation and brain injury: acute cerebral ischaemia, peripheral and central inflammation[J]. Brain Behav Immun, 2010, 24(5):708-723.
 [13] 杨梦心,何柯新,麦静雯. 颅脑损伤患者血清 3 项水平的变化及意义[J]. 检验医学与临床,2014,11(13):1813-1815.
 [14] Ziebell JM, Morganti-Kossmann MC. Involvement of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines in the pathophysiology of traumatic brain injury[J]. Neurotherapeutics, 2010, 7(1):22-30.
 [15] Helmy A, De Simoni MG, Guilfoyle MR, et al. Cytokines and innate inflammation in the pathogenesis of human traumatic brain injury[J]. Prog Neurobiol, 2011, 95(3):352-372.

(收稿日期:2016-10-13 修回日期:2016-12-07)

(上接第 950 页)

subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm[J]. Int Immunol, 2016, 28(4):163-171.
 [2] Walker L, Herrath M. CD4⁺ T cell differentiation in type 1 diabetes[J]. Clin Exp Immunol, 2016, 183(1):16-29.
 [3] Guéry L, Hugues S. Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity [J]. Biomed Res Int, 2015, 2015:314620.
 [4] Wang C, Collins M, Kuchroo VK. Effector T cell differentiation; are master regulators of effector T cells still the masters[J]. Curr Opin Immunol, 2015, 37:6-10.
 [5] Schmitt N, Ueno H. Regulation of human helper T cell subset differentiation by cytokines[J]. Curr Opin Immunol, 2015, 34:130-136.
 [6] Littman DR, Rudensky AY. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation[J]. Cell, 2010, 140(6):845-858.
 [7] Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor Ror γ mat[J]. Nat Immunol, 2008, 9(6):641-649.

[8] Volpe E, Servant N, Zollinger R, et al. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses[J]. Nat Immunol, 2008, 9(6):650-657.
 [9] Korn T, Bettelli E, Gao W, et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells[J]. Nature, 2007, 448(7152):484-487.
 [10] 刘积锋,钟小宁,何志义,等. 红霉素可抑制弹性蛋白肽诱导的 CD4⁺ T 细胞向 Th17 细胞分化[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2015,31(3):289-292.
 [11] 邵红伟,杨海林,梁春梅,等. 不同培养环境对 PMBC 中 Treg 和 Th17 细胞分化的影响[J]. 中国免疫学杂志,2015,31(7):874-878.
 [12] 刘文宣,杨磊,张晓琳,等. 伊洛前列素对 Th17 细胞分化的调节作用及其机制[J]. 免疫学杂志,2016,32(1):1-6.
 [13] 罗丽君,徐成高,侍晓云. Th17 细胞的研究进展及与人类疾病的关系[J]. 武警医学,2015,26(10):1059-1061.

(收稿日期:2016-12-28 修回日期:2017-01-24)