

## 不同培养方法对体外诱导分化 Th17 细胞的影响

张 新, 费先艳, 于成功\*

(南京大学医学院附属鼓楼医院消化科, 江苏 南京 210008)

**[摘要]** 目的: Th17 细胞缺乏特异性表面标记, 难以分离纯化活细胞, 通过调整细胞因子浓度和不同培养方法, 以获得高纯度 Th17 细胞亚群。方法: 选用 C57BL/6J 小鼠脾脏获得单个核细胞, 磁珠分选获得 CD4<sup>+</sup>、CD44<sup>-</sup> Naive T 细胞。建立不同 Th17 诱导培养体系, 通过流式细胞术检测获得 Th17 细胞的比例, 荧光定量 PCR 方法检测 ROR- $\gamma$ t、IL-17 mRNA 表达水平, ELISA 方法检测细胞培养上清中 IL-17 浓度, 以寻找最佳培养条件。结果: TGF- $\beta$ +IL-6+IL-23 可诱导 Th17 细胞, 但比例较低; 加入 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、anti-IFN- $\gamma$ 、anti-IL-2 可进一步提高 Th17 比例, 但后期培养呈衰减趋势; 使用 U 型 96 孔板培养 Th17 细胞明显优于 24 孔板培养, 细胞分化呈稳定上升趋势, 培养第 9 天 Th17 细胞可达(91.85  $\pm$  1.05)%。IL-17、ROR- $\gamma$ t mRNA 与 Naive T 细胞相比明显上调( $P < 0.001$ ), IFN- $\gamma$ 、IL-4、Foxp3 mRNA 表达量低( $P < 0.001$ ), 细胞培养上清液中 IL-17 浓度明显升高( $P < 0.001$ )。结论: 调整细胞因子诱导方案、缩小培养面积可不同程度提高 Th17 细胞诱导比率, 且培养面积的影响作用更为显著。

**[关键词]** Th17 细胞; Naive T 细胞; 体外诱导; 细胞因子类

**[中图分类号]** R392-3

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2016)03-335-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20160316

## Different culture methods to induce Th17 cell differentiate *in vitro*

Zhang Xin, Fei Xianyan, Yu Chenggong\*

(Department of Gastroenterology, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China)

**[Abstract]** **Objective:** As Th17 cells lack of specific surface marker, it is difficult to achieve highly purified population of Th17 cells. We sought to obtain highly purified population of Th17 cells by adjusting the concentration of cytokines and different cultivation methods. **Methods:** CD4<sup>+</sup> CD44<sup>-</sup> naive T cells were separated from C57BL/6J mice by magnetic-activated cell sorting (MACS). Different inducing systems were used for testing the effect of different cytokines and culture methods. The ratio of Th17 cells was analyzed by flow cytometry, the expressions of IL-17, ROR- $\gamma$ t, IFN- $\gamma$ , IL-4 and FoxP3 mRNA were measured by qRT-PCR method and the IL-17 concentration in cell culture supernatant was detected by ELISA. **Results:** Th17 cells were induced by TGF- $\beta$ , IL-6 and IL-23, the ratio of Th17 increased by adding TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , anti-IFN- $\gamma$  and anti-IL-2. The use of U-type 96 wells plate was significantly better than the 24 wells plate in culturing Th17 cells. Th17 cells showed steady growth when cultured in U-type 96 wells plate and the ratio of Th17 cells was significantly increased[(91.85  $\pm$  1.05)%]. The expressions of IL-17 and ROR- $\gamma$ t mRNA were up-regulated compared with that of Naive T cells ( $P < 0.001$ ), however, IFN- $\gamma$ , IL-4 and Foxp3 mRNA were decreased( $P < 0.001$ ). The concentration of IL-17 in cell culture supernatant was significantly increased( $P < 0.001$ ). **Conclusion:** The regulated method can generate a highly purified population (>90%) of Th17 cells.

**[Key words]** Th17 cells; naive T cells; induction *in vitro*; cytokines

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(03):335-339]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81170359)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: chenggong\_yu@nju.edu.cn

淋巴细胞是适应性免疫系统的重要组成部分, 其中 CD4<sup>+</sup>T 辅助细胞(T helper cells, Th)是介导特异性免疫反应的主要效应细胞。传统认为, 经抗原刺激后, CD4<sup>+</sup>Th 细胞分化为 Th1、Th2 细胞亚群<sup>[1-2]</sup>, Th1 亚群对胞内病原体的清除至关重要, 而 Th2 亚

群则主要清除胞外病原体。近年来研究发现, Th17 细胞在多种自身免疫性疾病、炎症及肿瘤中发挥重要的致病作用, 已成为多种免疫相关疾病的研究重点<sup>[3]</sup>。然而 Th1、Th2、Th17 以分泌的胞内细胞因子为标记, 缺乏特异性表面标记, 无法通过流式分选或磁珠分选等传统方法获得纯度较高的活细胞亚群, 在实验研究中不能排除各亚群间的相互干扰, 极大制约了其生物学效应的研究。本研究通过调整细胞因子浓度、培养方法, 旨在建立简易、可行的 Th17 细胞高效诱导培养体系。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

SPF 级 C57BL/6J 小鼠 10 只(雄性, 6~8 周龄, 体重 19~21 g), 饲养于南京鼓楼医院动物实验中心。

AIMV 培养基、胎牛血清(Gibco 公司, 美国), Naive T 细胞磁珠分选试剂盒、分选柱、红细胞裂解液(Miltenyi Biotec 公司, 美国), CD3、CD28 单克隆抗体、FITC-CD4、APC-CD25、PE-IFN- $\gamma$ 、PE-IL-4、PE-IL-17(eBioscience 公司, 美国), 重组人转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )、重组小鼠 IL-6、IL-23(R&D 公司, 美国), TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ (Peprotech 公司, 美国), anti-IFN- $\gamma$ 、anti-IL-2(BioXCELL 公司, 美国), leukocyte activation cocktail with BD GolgiPlug、固定/破膜试剂盒(BD Biosciences 公司, 美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 磁珠分选小鼠脾脏 CD4<sup>+</sup>、CD44<sup>+</sup>Naive T 细胞

取 2 只小鼠脾脏, 获取单个核细胞悬液, 计数后取  $1 \times 10^8$  个细胞用于磁珠分选。细胞以 400  $\mu$ L 分选缓冲液重悬, 按磁珠分选试剂盒说明书进行 Naive T 细胞分选, 分选得到的细胞离心后用含 10%FBS 的完全培养基调整密度至  $1 \times 10^6$  个/mL, 进行后续培养。

#### 1.2.2 流式细胞术检测 Naive T 细胞纯度

分选后取  $1 \times 10^6$  个 Naive T 细胞至流式管, 并取未染色细胞为对照, 离心后以流式缓冲液重悬至 100  $\mu$ L, 加入 FITC-CD4 1  $\mu$ L, PE-CD62L 0.5  $\mu$ L, 避光孵育 20 min, 流式缓冲液清洗 2 次后重悬至 300  $\mu$ L, 上流式细胞仪检测。

#### 1.2.3 Naive T 细胞体外诱导 Th17 细胞

于磁珠分选前 1 d 以 CD3 单抗 10  $\mu$ g/mL、CD28 单抗 4  $\mu$ g/mL 包被平底 96 孔板, 4 $^{\circ}$ C 包被过夜待用; Naive T 细胞采用 4 种不同细胞因子诱导组合比较诱导效率。A 组: TGF- $\beta$  3 ng/mL, IL-6 40 ng/mL,

IL-23 30 ng/mL; B 组: TGF- $\beta$  3 ng/mL, IL-6 40 ng/mL, IL-23 30 ng/mL, TNF- $\alpha$  20 ng/mL, IL-1 $\beta$  10 ng/mL; C 组: TGF- $\beta$  3 ng/mL, IL-6 40 ng/mL, IL-23 30 ng/mL, anti-IFN- $\gamma$  10 ng/mL, anti-IL-2 5 ng/mL; D 组: TGF- $\beta$  3 ng/mL, IL-6 40 ng/mL, IL-23 30 ng/mL, TNF- $\alpha$  20 ng/mL, IL-1 $\beta$  10 ng/mL, anti-IFN- $\gamma$  10  $\mu$ g/mL, anti-IL-2 5  $\mu$ g/mL。D 组 Naive T 细胞分别接种于 24 孔板、U 型底 96 孔板培养 9 d, 于第 5 天以 CD3 单抗 10  $\mu$ g/mL、CD28 单抗 4  $\mu$ g/mL 再次刺激。U 型底 96 孔板于培养第 3 天显微镜下可见细胞“抱团现象”, 孔底可见明显细胞沉淀, 隔日换液 1 次, 小心吸取 100  $\mu$ L 培养上清, 加入新培养基, 无需离心, 分别于第 3、5、7、9 天流式检测 Th17 细胞比率。

#### 1.2.4 流式细胞术检测 Th17 细胞比率

待测样品中加入 leukocyte activation cocktail with GolgiPlug 2  $\mu$ L/mL, 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 4~6 h, 收集待测细胞至流式管, 300 r/min 离心 5 min, 小心吸去上清, 以流式缓冲液重悬至 100  $\mu$ L, 加入 FITC-CD4 1  $\mu$ L, 常温避光孵育 15~20 min, 清洗 1 次后加入 250  $\mu$ L 破膜固定剂, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 40 min, 加入破膜固定缓冲液清洗 2 次, 重悬至 50  $\mu$ L, 加入 PE-IL-17A 和 PE-IgG(同型对照)各 1  $\mu$ L, 常温避光孵育 40 min, 清洗 1 次, PBS 重悬至 300  $\mu$ L, 上流式细胞仪检测。

#### 1.2.5 荧光定量 PCR 检测

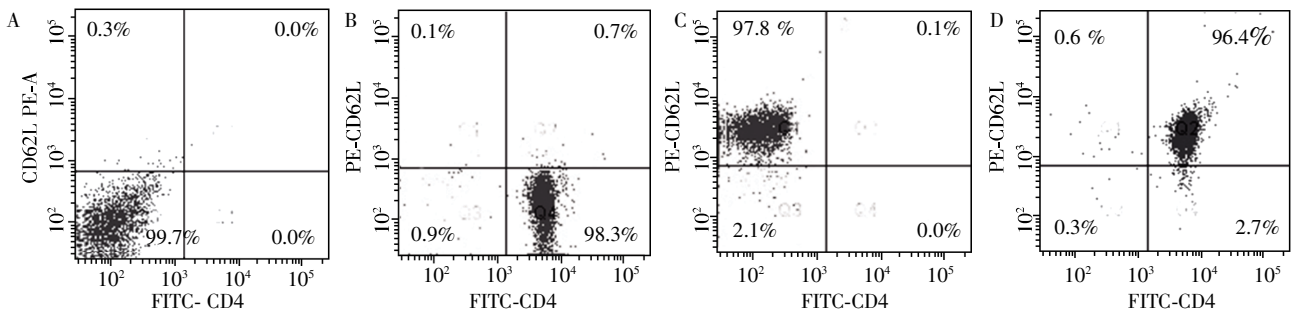
收集经 U 型底 96 孔板 TGF- $\beta$ 、IL-6、IL-23、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、anti-IFN- $\gamma$ 、anti-IL-2 诱导获得细胞, TRIzol 裂解细胞提取总 RNA, 按照 TaKaRa 逆转录试剂盒说明书提取 cDNA, 检测 IL-17、ROR- $\gamma$ t、IFN- $\gamma$ 、IL-4、FoxP3 基因 mRNA 相对表达量, 引物序列: IL-17A F 5' -AGCTTTCCTCCGCATTGA-3', R 5' -GCTCCA GAAGGCCCTCAGA-3'; ROR- $\gamma$ t F 5' -CACGGCCCT GGTTCAT-3', R 5' -GCAGATGTTCCACTCTCC TCTTCT-3'; IFN- $\gamma$  F 5' -GGTCATTACTGTCACCGC CA-3', R 5' -ACACAGTAACAGTCAGCGC-3'; IL-4 F 5' -GTTGTCATGCTGCTCTTC-3', R 5' -CTCTGTGGT GTTCTTCGT-3'; Foxp3 F 5' -TCCCAGAGTTCTTCC ACAAG-3', R 5' -TAAGGGTGGCATAGGTGAAA-3'; 内参照 GAPDH F 5' -CATGGCCTTCCGTGTTCCCTA-3', R 5' -TGTCATACTTGGCAGGTTTCT-3'。按荧光定量 PCR 试剂盒说明书进行操作, 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> 计算 mRNA 相对表达量, 结果与 Naive T 细胞 mRNA 表达量相比, 以倍数变化表示。

### 1.2.6 ELISA 方法检测培养上清中 IL-17 浓度

收集 U 型底 96 孔板培养细胞第 3、5、7、9 天培养上清,按试剂盒说明检测 IL-17 浓度。

### 1.3 统计学方法

应用 SPSS18.0 统计软件,计量资料符合正态分布,实验结果以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析(两两比较采用 SNK 法), $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。



A: 未染色对照; B: CD4<sup>+</sup>单标对照; C: CD62L<sup>+</sup>单标对照; D: CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>细胞比率。

图 1 磁珠分选 Naive T 细胞的纯度鉴定

Figure 1 Purity identification of Naive T cells by magnetic bead separation

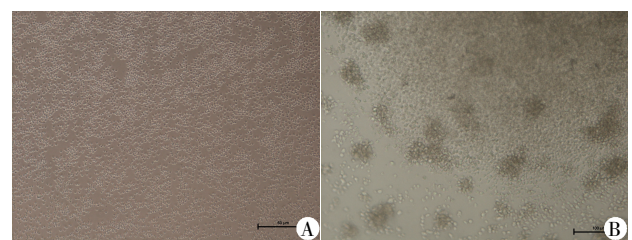
### 2.2 Naive T 细胞体外诱导培养 Th17 细胞

4 种细胞因子培养组效果比较:培养 3 d 后, A 组 Th17 细胞比率为  $(4.22 \pm 0.07)\%$ , B 组为  $(6.68 \pm 0.27)\%$ , C 组为  $(5.27 \pm 0.14)\%$ , D 组为  $(12.87 \pm 0.62)\%$ , 各组间相比差异均有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。培养 5 d 后 4 组 Th17 细胞比率均明显下降, A 组为  $(1.41 \pm 0.07)\%$ , B 组为  $(2.16 \pm 0.08)\%$ , C 组为  $(1.90 \pm 0.06)\%$ , D 组为  $(5.97 \pm 0.06)\%$ , 与培养第 3 天相比, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。综合以上结果, 在经典 TGF- $\beta$ 、IL-6、IL-23 诱导方案基础上加入 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  以及 anti-IFN- $\gamma$ 、anti-IL-2 均可提高 Th17 诱导效率, 同时加入可协同提高 Th17 比率, 但培养后期 Th17 比率呈下降趋势, 不能获得满意的诱导结果。使用 D 组诱导方案, 改用 24 孔板、U 型底 96 孔板培养 Naive T 细胞, 第 3 天 24 孔板 Th17 比率为  $(1.58 \pm 0.23)\%$ , 第 5 天下降至  $(0.53 \pm 0.13)\%$ , 呈明显下降趋势, 诱导效率不理想。U 型底 96 孔板培养 3 d 后可见细胞增殖明显, 于孔底形成细胞沉淀, 显微镜下可见细胞出现抱团现象, 24 孔板无细胞抱团现象(图 2)。流式检测 U 型底 96 孔板培养 Th17 细胞比率第 3 天为  $(14.15 \pm 0.22)\%$ (图 3A), 第 5 天上升至  $(27.28 \pm 1.23)\%$ (图 3B), 第 7 天为  $(56.30 \pm 0.66)\%$ (图 3C), 培养第 9 天 Th17 比率为  $(91.85 \pm 1.05)\%$ (图 3D), Th1 比率为  $(0.19 \pm$

## 2 结果

### 2.1 磁珠分选小鼠脾脏 Naive T 细胞纯度

Naive T 细胞特异性标记为 CD4<sup>+</sup> CD44<sup>-</sup> CD62L<sup>+</sup>, 以 CD4<sup>+</sup> CD44<sup>-</sup> 磁珠分选所获细胞以 CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> 为标记以进一步验证其纯度, 流式细胞术检测显示磁珠分选后 Naive T 细胞纯度在 95% 以上(图 1D), 提示磁珠分选纯度较高, 为后续实验的进行提供必要条件。



A: 24 孔板培养 3 d; B: U 型底 96 孔板培养 3 d, 细胞出现抱团生长。

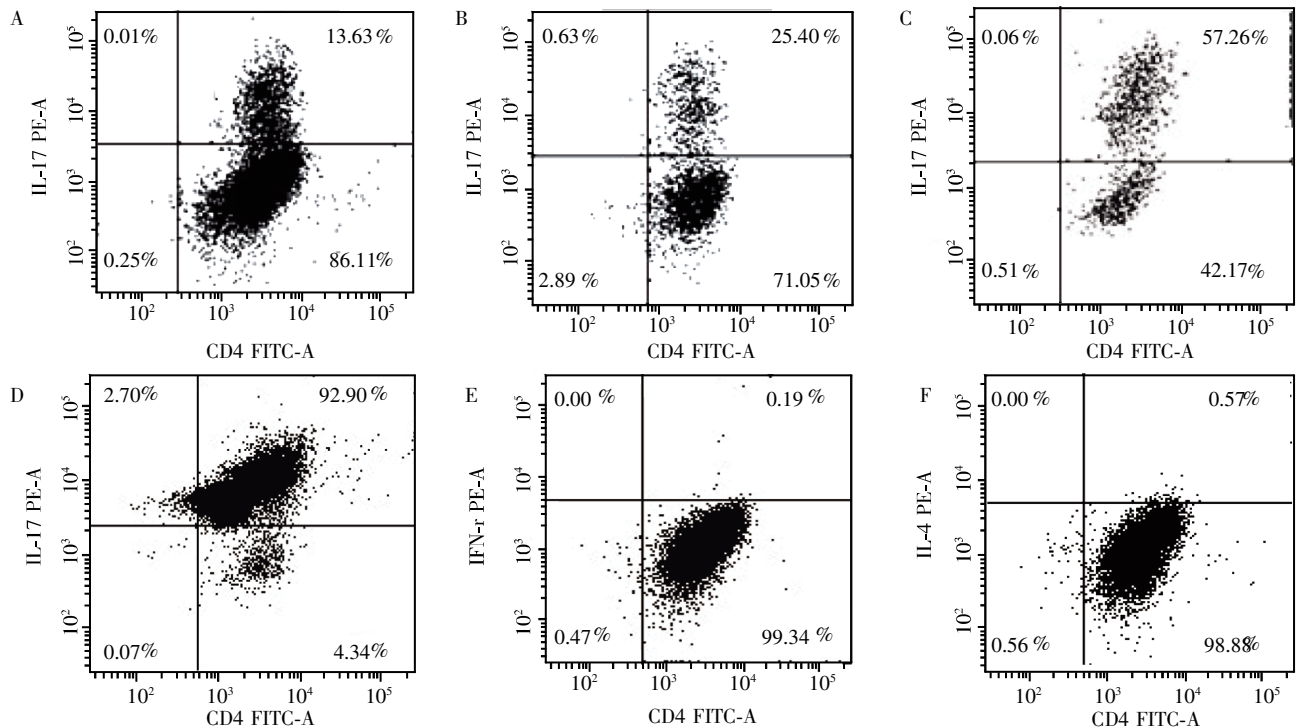
图 2 Naive T 细胞体外诱导培养 Th17 细胞 3 d 后镜下观察 ( $\times 10$ )

Figure 2 Th17 cells cultured and induced by Naive T cells *in vitro* after 3 d under microscopic observation ( $\times 10$ )

$0.57)\%$ (图 3E), Th2 比率为  $(0.57 \pm 0.08)\%$ (图 3F)。

### 2.3 荧光定量 PCR 检测 IL-17、ROR- $\gamma$ t、IFN- $\gamma$ 、IL-4、Foxp3 mRNA 表达量

收集 U 型底 96 孔板培养 9 d 所得细胞以及磁珠分选所得 Naive T 细胞, 检测 IL-17、ROR- $\gamma$ t、IFN- $\gamma$ 、IL-4、Foxp3 mRNA 相对表达量, 所得结果以诱导细胞与 Naive T 细胞 mRNA 表达量的倍数变化表示(图 4), IL-17 相对表达量为  $1\ 063.00 \pm 134.20$ , ROR- $\gamma$ t 为  $215.80 \pm 43.17$ , IFN- $\gamma$  为  $0.042 \pm 0.003$ , IL-4 为  $19.75 \pm 8.44$ , Foxp3 为  $1.13 \pm 0.23$ , IL-17 和 ROR- $\gamma$ t mRNA 表达较诱导前明显上调, IFN- $\gamma$ 、IL-4、Foxp3 mRNA 相对表达量低, 提示 Th17 细胞



A:培养第 3 天 Th17 比率;B:培养第 5 天 Th17 比率;C:培养第 7 天 Th17 比率;D:培养第 9 天 Th17 比率;E:培养第 9 天 Th1 比率;F:培养第 9 天 Th2 比率。

图 3 流式分析 U 型底 96 孔板培养结果

Figure 3 Culture results from U-type 96 wells plate by flow cytometry

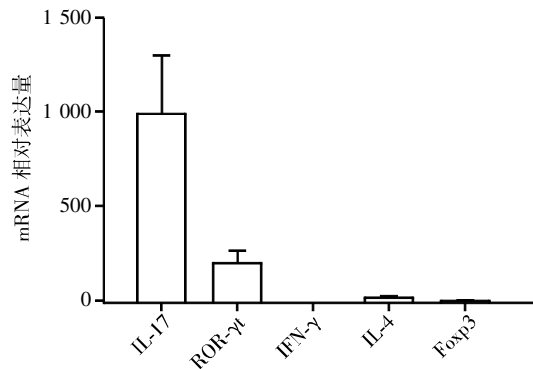


图 4 qRT-PCR 检测 U 型底 96 孔板培养 9 d 所得细胞 IL-17、ROR- $\gamma$ t、IFN- $\gamma$ 、IL-4、Foxp3 mRNA 的相对表达量  
Figure 4 Expressions of IL-17,ROR- $\gamma$ t,IFN- $\gamma$ ,IL-4 and Foxp3 mRNA were detected by qRT-PCR in the cells cultured for 9 d from U-type 96 wells plate

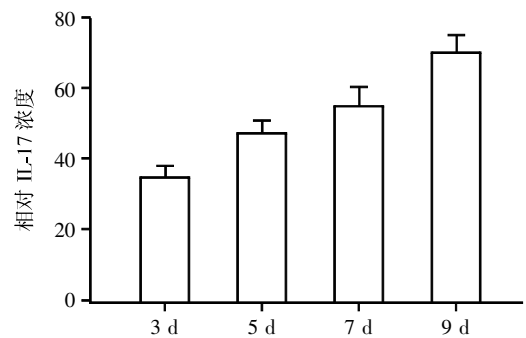


图 5 U 型底 96 孔板培养各阶段诱导细胞上清液中 IL-17 浓度的变化

Figure 5 Changes of IL-17 concentration in induced cell supernatant from U-type 96 wells plate at different stages

诱导效率高。

### 2.4 ELISA 检测细胞培养上清中 IL-17 浓度

ELISA 检测 U 型底 96 孔板培养第 3、5、7、9 天培养上清中 IL-17 浓度, 所得结果以诱导细胞与 Naive T 细胞培养上清浓度的倍数变化表示, 可见 IL-17 浓度持续增高(图 5)。

## 3 讨论

近年研究发现 Th17 细胞在自身免疫性疾病发

生发展中有重要作用,但由于 Th17 细胞缺乏特异性表面标记,检测依赖于胞内分泌细胞因子<sup>[4]</sup>,所以较难通过磁珠分选、流式分选等传统方法获得纯度较高的活细胞群,且生理状态下小鼠脾脏、血液中 Th17 细胞比例低(<1.5%),在实际研究中难以排除其他亚群的干扰,尤其对体内实验的影响更加不容忽视,所以如何获得纯度较高的 Th17 细胞群成为重要前提。

目前研究认为 Th17 细胞分化途径与 Th1、Th2 分化完全不同,细胞因子环境对 Th 细胞分化至关

重要, Th1 细胞主要分泌 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2, Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-5、IL-13, 两者分泌的细胞因子决定其主要生物学功能并可促进 Th 细胞向其分化<sup>[5]</sup>, 但以往研究证明 IL-17 并无促进 Th17 细胞分化的作用。Th17 细胞分化依赖于低浓度 TGF- $\beta$ 、IL-6, 而高浓度 TGF- $\beta$  则抑制 Th17 细胞分化。此外, IL-23 对 Th17 细胞早期分化没有影响, 但对 Th17 后期维持存活有重要作用<sup>[6]</sup>, 并对 Th17 的促炎作用非常重要<sup>[7]</sup>。也有研究认为 IL-23 对记忆性 T 细胞可产生作用, 但对 Naive T 细胞不产生作用, 故对早期分化没有显著影响, 但抗体中和 IFN- $\gamma$  时除外<sup>[8]</sup>。TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  不仅可促进 Th17 体外分化<sup>[9]</sup>, 有报道白塞氏病患者中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  可引起 Th17 细胞比率升高, 而健康者则无此影响<sup>[10]</sup>。以往研究证明, Th1、Th2 亚群分泌的细胞因子 IFN- $\gamma$ 、IL-4 可以明显抑制 Th17 细胞分化, 抗体中和或基因敲除 IFN- $\gamma$ 、IL-4 后 Th17 细胞比率有所升高<sup>[8, 11]</sup>。尽管 IL-2 对淋巴细胞分化增殖尤为重要, 但会抑制 Th17 细胞分化, 抗体中和或基因敲除 IL-2 相关基因可抑制 Th1、Th2、Treg 亚群生长, 相反可促进 Th17 细胞亚群增殖<sup>[9, 12]</sup>。综合以往研究发现, Th17 细胞分化受多种因素影响, 这也意味着各亚群间相互影响不容忽视。

本研究通过调整细胞因子环境、培养面积等条件明确不同培养方案对 Th17 细胞诱导分化的影响, 并通过优化培养条件最终获得高纯度 Th17 细胞群。本研究进一步证实在经典 TGF- $\beta$ 、IL-6、IL-23 诱导方案基础上, 加入 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 anti-IFN- $\gamma$ 、anti-IL-2 可提高 Th17 细胞诱导比率, 同时加入可协同提高 Th17 细胞分化比率, 但 Th17 细胞分化比率仍较低, 且长期培养呈逐渐衰退趋势。由于淋巴细胞正常生长需要较高细胞密度, 细胞状态良好情况下呈“抱团生长”, 但提高细胞密度却会导致相对营养不足、细胞因子作用相对减弱, 并不能有效提高 Th17 细胞诱导效率, 而 U 型底培养板却可在较低的细胞密度下实现淋巴细胞聚集, 且培养过程中无需离心, 仍然保持细胞原有的聚集状态, 所以在相同细胞密度、细胞因子浓度下, U 型底 96 孔板诱导培养则具有明显优势, 细胞增殖快、Th17 细胞比率高, 呈逐渐上升趋势, Th17 细胞比率于培养第 9 天可达 90% 以上, 流式检测 Th1、Th2 亚群比例低, 提示 IFN- $\gamma$ 、IL-2 单抗抑制作用较理想。荧光定量 PCR 也进一步证明 ROR- $\gamma$ t、IL-17 mRNA 表达量明显升高。

综上所述, 本研究建立了简单、高效的 Th17 细胞诱导培养体系, 为今后免疫学研究提供了技术基础。

#### [参考文献]

- [1] Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells; different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties [J]. *Annu Rev Immunol*, 1989, 7(1): 145-173
- [2] Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes [J]. *Nature*, 1996, 383(663): 787-793
- [3] Bettelli E, Korn T, Oukka M, et al. Induction and effector functions of TH17 cells [J]. *Nature*, 2008, 453(7198): 1051-1057
- [4] Streeck H, Cohen KW, Jolin JS, et al. Rapid ex vivo isolation and long-term culture of human Th17 cells [J]. *J Immunol Methods*, 2008, 333(1/2): 115-125
- [5] Maggi E, Parronchi P, Manetti R, et al. Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the *in vitro* development of human Th1 and Th2 clones [J]. *J Immunol*, 1992, 148(7): 2142-2147
- [6] Stockinger B, Veldhoen M. Differentiation and function of Th17 T cells [J]. *Curr Opin Immunol*, 2007, 19(3): 281-286
- [7] Dong C. T-H 17 cells in development; an updated view of their molecular identity and genetic programming [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(5): 337-348
- [8] Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages [J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(11): 1123-1132
- [9] Leveque L, Deknuydt F, Bioley G, et al. Interleukin 2-mediated conversion of ovarian cancer-associated CD4<sup>+</sup> regulatory T cells into proinflammatory interleukin 17-producing helper T cells [J]. *J Immunother*, 2009, 32(2): 101-108
- [10] Shimizu J, Takai K, Takada E, et al. Possible association of proinflammatory cytokines including IL1 $\beta$  and TNF $\alpha$  with enhanced Th17 cell differentiation in patients with Behcet's disease [J/OL]. *Clin Rheumatol*, 2015, [2016-01-19]. <http://Link.springer.com/article/10.1007%2Fs10067-015-2966-2>
- [11] Sandoghchian Shotorbani S, Zhang Y, Baidoo SE, et al. IL-4 can inhibit IL-17 production in collagen induced arthritis [J]. *Iran J Immunol*, 2011, 8(4): 209-217
- [12] Laurence A, Tato CM, Davidson TS, et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation [J]. *Immunity*, 2007, 26(3): 371-381

[收稿日期] 2015-11-17