

· 论 著 ·

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2007 )04-0347-05

## 多药耐药性人绒毛膜癌裸鼠皮下移植瘤模型的建立及其生物学特性

李 卓,徐 珊\*,朱利群,徐昌芬,张 燕,仇黎丽(南京医科大学 江苏省生殖医学重点实验室,南京 210029)

[ 摘 要 ] 目的: 建立一种耐药性稳定的人绒毛膜癌裸鼠皮下移植瘤模型 JAR/VP16/nude, 为研究体内肿瘤耐药机制和逆转药物的筛选奠定实验基础。方法: 将人绒毛膜癌多药耐药细胞系 JAR/VP16 接种于裸鼠左侧腋窝皮下, 观察成瘤情况及肿瘤生长特性; 利用光镜、电镜对移植瘤进行组织学和超微结构观察; 逆转录-聚合酶链反应( RT-PCR )检测多药耐药基因 *mdr1* mRNA 的表达; 流式细胞术( FCM )分析细胞内罗丹明 123( Rhodamine123, Rh123 )的滞留情况。结果: 裸鼠移植瘤模型构建成功率为 98.39% , 8 ~ 10 d 开始成瘤, 15 ~ 20 d 瘤体长径达 1.0 ~ 1.5 cm; H-E 染色及透射电镜观察发现瘤组织形态及细胞超微结构与人绒毛膜癌耐药细胞 JAR/VP16 相似; RT-PCR 和 FCM 检测表明移植瘤组织 *mdr1* mRNA 表达阳性, 且对 Rh123 有显著的外排作用。结论: 以 JAR/VP16 细胞建立的耐药性绒毛膜癌裸鼠移植瘤模型, 保持了耐药性人绒毛膜癌细胞 JAR/VP16 的组织学特征和多药耐药性, 为耐药性人绒毛膜癌耐药机制和逆转的研究提供了理想的动物模型。

[ 关键词 ] 多药耐药; 绒毛膜癌; 裸鼠; 移植瘤

[ 中图分类号 ] R73-35 [ 中图分类号 ] A

## Establishment of multidrug resistant model of human choriocarcinoma in nude mice and its biological characteristics

LI Zhuo, XU Shan\*, ZHU Li-qun, XU Chang-fen, ZHANG Yan, QIU Li-li ( Key Laboratory of Reproductive Medicine of Jiangsu Province, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China )

[ Abstract ] **Objective:** To establish a multidrug resistant ( MDR ) model of human choriocarcinoma using nude mice [ BALB/c( nu/nu ) ], so as to provide evidence for studying MDR mechanism and for screening of the reversal drugs *in vivo*. **Methods:** MDR human choriocarcinoma JAR/VP16 cells of tumors were subcutaneously injected into the left armpit of nude mice. The tumor forming in mice and growth characteristics of tumors were observed. The morphologic characteristics of tumors were observed under light and transmission electron-microscope. *Mdr1* mRNA expression and intracellular rhodamine123 ( Rh123 ) retention were determined by RT-PCR and FCM, respectively. **Results:** Successful tumor forming was achieved in 98.39% of animals. Tumors began to form on 8 - 10 days and their diameter reached 1.0 - 1.5 cm on 15 - 20 days. H-E staining and transmission electron microscope revealed that the formed tumors had the same morphological characteristics as parent JAR/VP16 cells. Meanwhile, the tumor cells in nude mice expressed high level of *mdr1* mRNA and had reduced Rh123 retention compared with JAR cells. **Conclusion:** The subcutaneous xenograft model in nude mice has the morphological and biological characteristics of multidrug resistant human choriocarcinoma, which paves a way for studying the mechanism of MDR human choriocarcinoma and for studying the reversal of MDR.

[ Key words ] multidrug resistance; choriocarcinoma; nude mice; transplant tumor

[ Chin J Cancer Biother, 2007, 14( 4 ): 347-351 ]

人绒毛膜癌是一种好发于育龄期女性的恶性滋养细胞肿瘤, 临床治疗以化疗为主。但近年来多药耐药的出现大大降低了化疗敏感性, 是绒癌化疗失败的主要原因<sup>[1-2]</sup>。探讨多药耐药的产生机制、筛选有效的耐药逆转剂和逆转方法, 已成为临床治疗耐药性绒癌的热点问题, 而这些问题研究均有赖于建立合适的实验动物模型。有关人绒毛膜癌裸鼠皮下移植瘤模型的建立近年来国内外已有数例报道,

但具体造模方法、接种部位、接种细胞种类和数量及成瘤情况等都很不一致<sup>[3-6]</sup>。为了建立一种耐药性

[ 基金项目 ] 江苏省高校自然科学基金资助项目( 06KJB360067 )。Supported by the Natural Science Foundation of Higher Education of Jiangsu Province( No. 06KJB360067 )

[ 作者简介 ] 李 卓( 1982- ), 女, 陕西省延安市人, 硕士研究生, 主要从事女性生殖医学方面的研究。E-mail: lizhuo721@yahoo.com.cn

\* Corresponding author. E-mail: xushan@njmu.edu.cn

稳定的动物模型,为体内进行人绒毛膜癌耐药特性的研究和逆转药物的筛选提供基础,本课题选用人绒毛膜癌耐药细胞系 JAR/VP16 构建人绒毛膜癌裸鼠移植瘤模型,并对其生物学特性进行了初步研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

RPMI 1640 细胞培养液及胶原酶 I 型均购自美国 GIBCO 公司;新生牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;胰蛋白酶及罗丹明 123 均购自美国 SIGMA 公司;RNA 提取试剂盒(Trizol Reagent Kit)购自美国 INVITROGEN 公司;cDNA 合成试剂盒及 PCR 扩增试剂盒均购自美国 PROMEGA 公司。

### 1.2 细胞系与实验动物

人绒毛膜癌 JAR 细胞系由中科院上海细胞生物研究所提供;人绒毛膜癌耐药细胞系 JAR/VP16 为本室自建,系采用常规化疗药依托泊苷(VP16)浓度梯度递增法对 JAR 细胞系诱导 14 个月并经克隆筛选建成<sup>[7]</sup>。JAR 细胞置于 RPMI 1640 培养液,37 ℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养,JAR/VP16 细胞于上述培养液中加终质量浓度为 1.0 μg/ml VP16 以维持耐药性,实验前 2 周脱药培养。

BALB/c(nu/nu)裸鼠,雌性,4~6 周龄,共 62 只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[实验动物合格证号为 SCXK(京)2002-0001],无特定病原体(SPF)环境下饲养。

### 1.3 裸鼠皮下移植瘤模型的建立

取对数生长期的 JAR/VP16 细胞,0.25% 胰酶消化制备单细胞悬液,收集后 1 000 × g 离心 5 min,洗涤,重悬于无血清 RPMI 1640 培养液,计数并调整细胞密度为 2.5 × 10<sup>7</sup> 个/ml。1 ml 注射器吸取悬液,无菌条件下接种于裸鼠左侧腋窝皮下,每只鼠注射 0.2 ml。观察瘤体,直径达 1.0 cm 以上者认定裸鼠移植瘤模型构建成功,命名为 JAR/VP16/nude。接种完毕后,隔日观察荷瘤鼠的精神、活动度、对外界刺激的反应、饮食、排便及体重等变化;记录成瘤时间,计算成瘤率,观察移植瘤形态、质地及活动度。成瘤后隔日用游标卡尺测量瘤结节的长径(a)、短径(b),按体积公式( $V = a \times b^2 / 2$ )计算肿瘤体积,求其平均值并绘制移植瘤体积生长曲线。

### 1.4 移植瘤的解剖学和组织学检查

颈椎脱臼法随机处死荷瘤鼠,分别取移植瘤及心、脑、肺、肾、肝脏、阴道等主要器官组织,以 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋后切片,厚 4 μm,H-E 染色,光镜观察,了解局部浸润和远处器官转移情况。

取新鲜瘤组织,2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双固定,常规脱水、包埋、超薄切片、染色,JEM 1010 透射电镜观察。

### 1.5 RT-PCR 检测多药耐药基因 *mdr1* mRNA 表达

按 Trizol 一步法分别提取 JAR、JAR/VP16 和 JAR/VP16/nude 的总 RNA。自行设计 PCR 引物,序列为:上游 5'-ACT GAG CCT GGA GGT GAA GA-3';下游 5'-CCA CCA GAG AGC TGA GTT CC-3'(376 bp)。内参照采用  $\beta$ -actin 基因,引物序列为:上游 5'-ACA CTG TGC CCA TCT ACG ACC-3';下游 5'-AGG GGC CGG ACT CGT CAT AGA-3'(248 bp)。以 RNA 为模板进行逆转录,再以 cDNA 为模板,在特异性引物引导及 Taq DNA 聚合酶催化下,对特定的目的靶序列进行扩增。扩增条件为:94 ℃ 预变性 5 min,变性、退火、延伸所需温度及时间分别为 94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 60 s,共 30 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min。取 10 μl PCR 产物,在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳(100 V,30 min),紫外透射仪下拍照,凝胶图像分析仪进行表达分析。

### 1.6 FCM 检测细胞内 Rh123 的滞留情况

无菌条件下取新鲜瘤组织,胶原酶消化法制备单细胞悬液,与体外培养的 JAR、JAR/VP16 细胞一并调整密度为 1.0 × 10<sup>6</sup>/ml,加入 5 μg/ml Rh123,37 ℃ 避光孵育 1 h,1 500 × g 离心 5 min,弃上清,PBS 清洗 2 次并制备活细胞悬液,以未经 Rh123 处理者作为空白对照,流式细胞术检测(激发波长 488 nm,接收波长 575 nm)。

### 1.7 统计学处理

数据分析使用 SPSS 11.5 软件,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 绒毛膜癌皮下移植瘤的生长情况

接种次日起肉色皮丘渐趋扁平,第 8~10 天接种部位陆续出现淡蓝色粟粒样结节,直径 0.2~0.5 cm 不等,均未见自发消退现象。接种后 15~20 d 瘤体长径达 1.0~1.5 cm,成瘤率 98.39%(61/62)。瘤结节活动度好,随着体积不断增大,质地由韧变软。荷瘤鼠早期体重渐增,状态良好;接种约 20 d 后,逐渐出现精神萎靡,皮肤皱缩,拒食,消瘦,活动力、对外界刺激的反应力下降等。加喂无菌熟鸡蛋,饮水中加 10% 复方氨基酸后,情况较前略好转。但后期随着恶病质的发展,裸鼠陆续衰竭死亡(图 1)。

### 2.2 移植瘤组织学及超微结构特点

皮下移植瘤呈圆形、椭圆形或分叶状,表面光滑

或呈结节状,可见丰富的皮下新生血管网,故覆盖其上的皮肤多呈紫红色。瘤表覆以一层薄的纤维结缔组织包膜,与周围组织边界清晰,无黏连。瘤体直径大于 2.0 cm 时中央多有破溃出血,切面可见液化坏死灶及大量暗红色淤血。

H-E 染色可见瘤组织内新生血管丰富,滋养细胞增生活跃,呈巢状或不规则团块状排列。与形态规则的敏感细胞 JAR 相比,移植瘤细胞大小不等,核大、深染,核质比增大,核仁明显,可见核异形性及核分裂相,同体外培养的 JAR/VP16 细胞形态较一致(图 2)。其他组织器官尚未见肿瘤转移灶。

体外培养的 JAR 细胞形态规则、胞质丰富、染色均一。与之相比,裸鼠移植瘤细胞呈椭圆形或不规则形,表面可见微绒毛。胞质富含内质网、核糖体,线粒体嗜肿胀、消失,部分细胞内可见脂滴。细胞核大、不规则,核膜界清,核仁明显,与 JAR/VP16 细胞相似(图 2)。

### 2.3 RT-PCR 检测裸鼠移植瘤的耐药表型

RT-PCR 结果表明,JAR/VP16/nude 与 JAR/VP16 细胞中 *mdr1* 的相对表达量分别为(  $0.318 \pm 0.013$  )和(  $0.307 \pm 0.016$  ),两者无显著差异(  $P > 0.05$  );而敏感细胞 JAR 中 *mdr1* mRNA 表达呈阴性。表明裸鼠移植瘤接种成功后仍保留 JAR/VP16 细胞的多药耐药基因表型(图 3)。

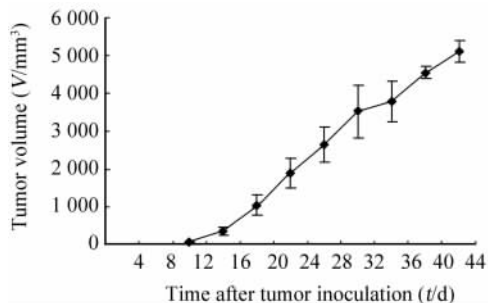


图 1 接种后 JAR/VP16 耐药移植瘤的生长  
Fig. 1 Growth of MDR JAR/VP16 cells after transplantation

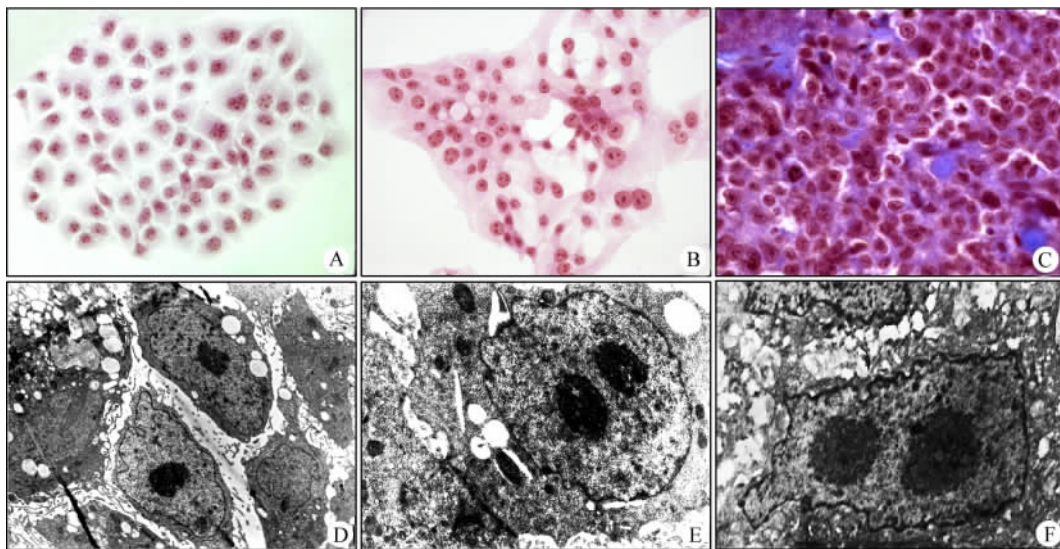


图 2 人绒毛膜癌裸鼠皮下移植瘤与体外细胞的形态学比较

Fig. 2 Morphological comparison between human choriocarcinoma xenograft tissues, JAR and JAR/VP16 cells

A, B, C: Microscopic observation by H-E stained(  $\times 400$  ); D, E, F: Ultrastructure observation by transmission electron-microscope( D:  $\times 3\ 000$ ; E:  $\times 8\ 000$ ; F:  $\times 8\ 000$  ); A, D: JAR cells; B, E: JAR/VP16 cells; C, F: Xenografts in nude mice

### 2.4 FCM 分析裸鼠移植瘤细胞对 Rh123 的泵出效果

经 Rh123 处理 1 h 后, JAR 细胞内相对荧光强度最高, 达 2 170. 61。JAR/VP16 和 JAR/VP16/nude 细胞内相对荧光强度远低于敏感细胞, 分别为 157. 44 和 123. 31, 图中两者曲线几乎重合(图 4)。

## 3 讨论

裸鼠是一种先天性 T 淋巴细胞免疫缺陷的实验动物。其近交系的特点, 极大地减少了个体差异, 是构建肿瘤模型较理想的载体, 且大量研究表明, 裸鼠人癌移植瘤是目前人体外最接近人类肿瘤的整体实验模型。自 1969 年 Rygaard 和 Povlsen<sup>[8]</sup> 首次将人结肠癌在裸鼠体内移植成功以来, 迄今大多数人类恶性肿瘤均可移植于裸鼠。

多药耐药是肿瘤化疗失败的主要原因。过去

20 多年中,国内外学者利用肿瘤耐药细胞系在体外对多药耐药机制进行了深入研究,并已筛选出许多肿瘤耐药逆转剂<sup>[9-10]</sup>。但由于体外和体内研究尚存在一定的差异,因此直接在动物体内建立多药耐药模型对于体内研究其机制及其逆转有重大意义。

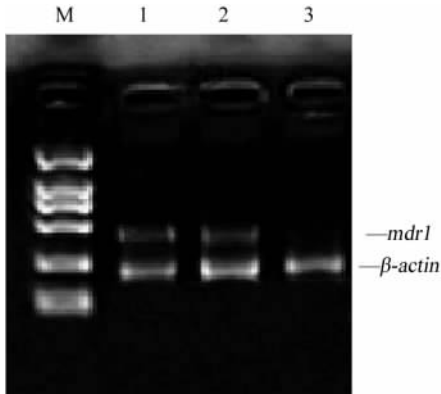


图3 移植瘤组织和体外培养细胞中 *mdr1* mRNA 的表达

Fig.3 Expression of *mdr1* mRNA in transplanted tumors and cultural cells *in vitro*

M:DNA Marker; 1:JAR/VP16/nude; 2:JAR/VP16; 3:JAR

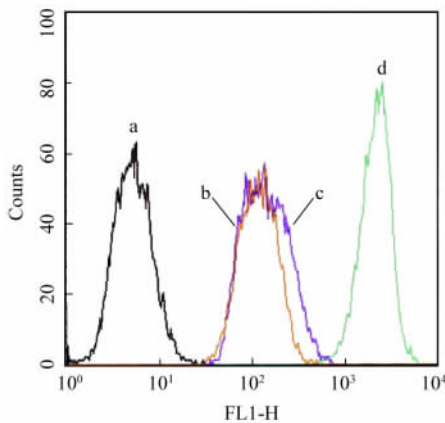


图4 各组细胞中 Rh123 滞留的差异

Fig.4 Rh123 retention in different groups

a:Control; b:Rh123 fluorescence intensity in the JAR/VP16 cells after 1 h of Rh123 exposure; c:Rh123 fluorescence intensity in the JAR/VP16/nude cells after 1 h of Rh123 exposure; d:Rh123 fluorescence intensity in the JAR cells after 1 h of Rh123 exposure

尽管近年来也有文献涉及人绒毛膜癌动物模型的制备,但具体造模方法、模型特征等报道大都不一致。为了给耐药性人绒毛膜癌的体内研究提供基础,给本室已完成的 JAR/VP16 细胞耐药机制研究及体外耐药逆转剂筛选<sup>[11]</sup>提供相应的体内实验条件,本实验采用简便易行的皮下接种细胞悬液法,选取血供丰富、皮肤张力小、易成瘤的腋窝为接种部

位,利用耐药性绒癌 JAR/VP16 细胞系,制备裸鼠移植瘤模型。细胞接种后 8 ~ 10 d 即陆续开始成瘤,移植瘤生长稳定,且生长速度较文献报道的其他肿瘤快。其原因可能系 Grummer 等<sup>[12]</sup>提出的恶性滋养细胞具有强侵袭性,能侵犯瘤周的裸鼠血管组织,与之交通并形成大量新生血管,从而获取充足的营养。但本模型中尚未观察到远处组织器官的转移行为,其原因可能为肿瘤生长环境的改变(皮下)影响了其早期转移特性<sup>[13]</sup>;加之肿瘤转移过程复杂,需经历原发灶增殖、游走、侵袭和远隔器官组织再生等一系列步骤,而由于裸鼠自身的免疫缺陷,实验中瘤体的快速增长易导致恶病质,使荷瘤鼠生存期缩短,未及发生远处转移,已消耗致死。

Rh123 为肿瘤多药耐药基因 *mdr1* 所编码的 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)的底物,同时又具有荧光,因此可通过流式细胞术检测细胞内 Rh123 的滞留量来反映 P-gp 的功能,进而体现细胞的耐药程度<sup>[14-15]</sup>。本实验中经 Rh123 处理 1 h 后,JAR 细胞内荧光很强,而 JAR/VP16 和 JAR/VP16/nude 细胞内荧光强度都远低于 JAR 细胞。说明 JAR 细胞膜上无或仅有极少量的 P-gp,只能将少量 Rh123 排出胞外;而移植瘤细胞和耐药细胞的胞膜上由于 P-gp 的大量积聚,通过其特有的“泵机制”有效地将进入细胞内的药物排出胞外,从而使细胞表现出耐药性。此结果为验证 JAR/VP16 裸鼠移植瘤模型仍具有耐药特性提供了间接证据。

形态学观察还表明裸鼠移植瘤保持了人绒毛膜癌的组织学特性,RT-PCR 检测结果又进一步证实该模型保留了 JAR/VP16 细胞多药耐药基因的表达性。总之,该模型操作简便,创伤性小,肿瘤表浅便于观察治疗,稳定可靠,易于重复,是较理想的多药耐药性人绒毛膜癌生物学模型,为研究绒癌的多药耐药机制及其逆转奠定了实验基础。

## [参考文献]

- [1] 石一复,陈利友. 耐药和复发性妊娠滋养细胞肿瘤的预防和治疗[J]. 中华妇产科杂志, 2001, 36(9): 575-576.
- [2] Lurain JR, Nejad B. Secondary chemotherapy for high-risk gestational trophoblastic neoplasia[J]. Gynecol Oncol, 2005, 97(2): 618-623.
- [3] Shiu SY, Xi SC, Xu JN, et al. Inhibition of malignant trophoblastic cell proliferation *in vitro* and *in vivo* by melatonin[J]. Life Sci, 2000, 67(17): 2059-2074.
- [4] 冯凤芝, 向阳, 崔竹梅, 等. 转导人肿瘤坏死因子  $\alpha$  基因对耐药性绒毛膜癌裸鼠移植瘤耐药性的逆转作用[J]. 中华妇产科杂志, 2003, 38(5): 294-297.
- [5] 李娟清, 石一复, 胡东晓, 等. 人绒癌裸鼠移植瘤模型的建立

- 及其生物学特征[J]. 中国实验诊断学, 2004, 8(6): 588-590.
- [6] Cole LA, Dai D, Butler SA, *et al.* Gestational trophoblastic diseases: I. Pathophysiology of hyperglycosylated hCG[J]. *Gynecol Oncol*, 2006, 102(2): 145-150.
- [7] 徐珊, 朱利群, 罗莉, 等. 人绒毛膜癌JAR/VP16多药耐药细胞株的建立及相关基因表达检测[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2006, 26(7): 485-490.
- [8] Sun FX, Tang ZY, Lui KD, *et al.* Establishment of a metastatic model of human hepatocellular carcinoma in nude mice via orthotopic implantation of histologically intact tissues[J]. *Int J Cancer*, 1996, 66(2): 239-243.
- [9] 徐珊, 徐昌芬. 肿瘤多药耐药性发生机制及中药逆转作用的研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2006, 13(6): 404-411.
- [10] Teodori E, Dei S, Scapecchi S, *et al.* The medicinal chemistry of multidrug resistance (MDR) reversing drugs[J]. *Farmaco*, 2002, 57(5): 385-415.
- [11] 朱利群, 徐珊, 罗莉, 等. 马鞭草有效成分对人绒毛膜癌耐药细胞株JAR/VP16的逆转作用研究[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2007, 27(5): 419-423.
- [12] Grummer R, Donner A, Winterhager E. Characteristic growth of human choriocarcinoma xenografts in nude mice[J]. *Placenta*, 1999, 20(7): 547-553.
- [13] Fujihara T, Sawada T, Hirakawa K, *et al.* Establishment of lymph node metastatic model for human gastric cancer in nude mice and analysis of factors associated with metastasis[J]. *Clin Exp Metastasis*, 1998, 16(4): 389-398.
- [14] Ludescher C, Thaler J, Drach D, *et al.* Detection of activity of P-glycoprotein in human tumour samples using rhodamine123[J]. *Br J Haematol*, 1992, 82(1): 161-168.
- [15] Iida A, Tomita M, Idota Y, *et al.* Improvement of intestinal absorption of P-glycoprotein substrate by D-tartaric acid[J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2006, 21(5): 424-428.
- [收稿日期] 2007-07-08 [修回日期] 2007-08-11  
[本文编辑] 韩丹

## · 科技动态 ·

### IL-21 通过自分泌途径诱导 Th17 分化

Th17 细胞, 又称炎症辅助 T 细胞(Th1), 能够分泌 IL-17、IL-17F 和 IL-22 等, 是近年来新发现的 T 细胞亚群, 在组织炎症反应中发挥重要作用。目前研究表明 IL-6 和 TGF- $\beta$  能够诱导 Th17 细胞分化, IL-23 能够促进其 IL-17 分泌。在这一过程中, STAT3 和 ROR $\gamma$  是 Th17 分化的关键性转录因子。论文作者通过体内外实验证明, IL-21 不仅是 Th17 细胞分泌的特征性细胞因子之一, 而且通过自分泌途径在 Th17 的分化中发挥重要作用, 是炎症性疾病的又一重要的药物作用靶点。

作者首先通过对 Th1、Th2 和 Th17 细胞的基因表达谱做了比较分析, 发现 IL-17 和 IL-21 mRNA 的表达在 Th17 细胞要远远高于其他辅助 T 细胞, 推测 Th17 细胞也可能分泌 IL-21。体外实验分别用 IL-6、TGF- $\beta$ 、IL21 单独或者联合刺激天然 Th 细胞, 发现是 IL-6 上调了 IL-21mRNA 的表达, TGF- $\beta$  没有类似作用; 同时 IL-21 也能够上调 IL-21 基因的表达, 提示 IL-21 的自分泌调节作用; 进一步运用 IL-6 基因敲除小鼠, 通过体内实验证实 IL-6 在诱导 Th17 细胞分泌 IL-21 过程中发挥重要作用; 为了研究 STAT3 和 ROR $\gamma$  两种转录因子是否参与 IL-21 的诱导分泌过程, 作者分别运用 STAT3 和 ROR $\gamma$  基因缺陷小鼠重复上述实验, 结果显示 STAT3 基因缺失的 Th17 细胞在 IL-6 和 TGF- $\beta$  刺激后不能上调 IL-21 表达, 而 ROR $\gamma$  基因缺失与野生型无明显差异。故 IL-6 能够诱导 Th17 细胞分泌 IL-21, 此过程是 STAT3 依赖, 而 ROR $\gamma$  非依赖性的。

作者进而研究了 IL-21 在 Th17 细胞分化产生中的作用。在体外, IL-21 单独作用就可以诱导少量 Th17 细胞产生, 与 TGF- $\beta$  协同刺激后能够大幅度增加 Th17 数量, 同时上调 IL-23R 和 ROR $\gamma$  的表达; IL-21 能够诱导 IL-6 缺失 T 细胞 Th17 的分化, 提示 IL-21 可能作用于 IL-6 的下游, 并且能够取代 IL-6 诱导 Th17 分化; 同时在 STAT3 或者 ROR $\gamma$  基因缺失情况下, IL-21 均不能诱导 Th17 的分化, 说明在 IL-21 诱导 Th17 细胞分化过程中, STAT3 和 ROR $\gamma$  都是必须的。

在上述实验的基础上, 作者进一步应用 IL-21 缺陷小鼠研究该细胞因子是否是 Th17 细胞分化必不可少的因素。实验证实, 在体外 IL-6 和 TGF- $\beta$  不能够刺激 IL-21 缺陷 T 细胞向 Th17 分化, 相反, foxp3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞数量明显增加, 加入外源性 IL-21 后能够部分恢复 Th17 的比例; 同样, 在野生型 T 细胞向 Th17 细胞分化体系中加入抗 IL-21 抗体或者 IL-21R 拮抗剂后也能够抑制 Th17 细胞的产生; 体内实验也得到同样的结果, 从而证明 IL-21 在 Th17 细胞产生过程中发挥不可替代的作用。

以往研究表明, Th17 细胞的产生是一些自身免疫性疾病的主要发病因素, 研究人员发现在 EAE 发病小鼠中枢神经系统中存在大量分泌 IL-17 的 CD4<sup>+</sup> T 细胞。作者证明 IL-21 缺陷小鼠 EAE 的发病率明显低于野生型, 出现症状的时间也明显延迟, 说明 IL-21 缺陷小鼠是 EAE 抵抗的; 同时检测到该小鼠中枢神经系统浸润的 CD4<sup>+</sup> T 细胞主要分泌 IFN- $\gamma$ 、不分泌 IL-17; 以上结果提示 IL-21 的缺失抑制 Th17 细胞形成, 从而保护小鼠抑制 EAE 发生。

综上所述, IL-6 通过 STAT3 诱导 Th17 细胞分泌 IL-21, 自分泌的 IL-21 通过 STAT3 上调 ROR $\gamma$ , 诱导 T 细胞进一步向 Th17 细胞的分化。IL-21 基因缺陷小鼠对 EAE 的抵抗提示 IL-21 可以作为一些自身免疫性疾病治疗的药物靶点。IL-21 可以调节 B、T 和 NK 细胞的增殖、分化和功能, 提示 Th17 细胞的免疫调控功能有待深入研究。