

他克莫司对白癜风小鼠 Th17/Treg 细胞平衡及黑素细胞丢失的影响

王小媛, 王颖娟*, 康 乐

宝鸡市中心医院 皮肤科, 陕西 宝鸡 721000

摘要: 目的 探究他克莫司对白癜风小鼠辅助性 T17 (Th17) /调节性 T (Treg) 细胞平衡和黑素细胞丢失的影响。方法 将小鼠随机分为对照组、模型组和他克莫司低、中、高剂量组 (涂抹 10、50、100 mg 0.03 % 他克莫司软膏), 使用松香/蜡混合物对小鼠背部相同位置进行脱毛, 大小为 2 cm × 2 cm, 将其分为两部分: 用药区域与非用药区域, 面积 1:1。除对照组外, 于小鼠背部用药区均匀涂抹 50 mg 40% 莫诺苯宗软膏, 每天 1 次, 连续 90 d, 制备白癜风模型。莫诺苯宗涂抹 30 d 后开始于相同位置涂抹他克莫司软膏, 2 种药膏涂抹时间间隔 7 h, 他克莫司软膏每天早晚各涂抹 1 次, 连续用药 60 d。肉眼观察小鼠皮毛脱色情况并进行脱色评分, 通过反射式共聚焦显微镜 (RCM) 观察小鼠皮肤黑素细胞和黑色素的分布, 取小鼠皮损进行苏木精-伊红染色 (HE) 和马松染色 (MF) 对基底层黑素细胞和含黑色素的毛囊进行计数, 通过流式细胞术测定小鼠外周血中 Th17 和 Treg 淋巴细胞的比例, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测外周血白细胞介素-17 (IL-17)、IL-22 和叉头型基因 p3 (Foxp3) 的含量。结果 与对照组比较, 白癜风模型组小鼠用药区皮毛明显脱色, 脱色评分显著升高 ($P < 0.05$), 皮损处色素明显缺失; 含黑色素的毛囊和黑素细胞显著减少 ($P < 0.05$); Th17/Treg 淋巴细胞比例显著升高 ($P < 0.05$); 血清 IL-17、IL-22 水平显著上升, Foxp3 水平显著降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 他克莫司各组小鼠皮毛脱色情况明显改善, 脱色评分显著降低 ($P < 0.05$), 皮损处可见色素分布及黑素细胞; 含黑色素的毛囊和黑素细胞显著增多 ($P < 0.05$); Th17/Treg 淋巴细胞比例显著降低 ($P < 0.05$); IL-17、IL-22 水平显著降低, Foxp3 水平显著升高 (均 $P < 0.05$)。结论 他克莫司可调控白癜风小鼠 Th17/Treg 淋巴细胞平衡, 抑制其黑素细胞丢失。

关键词: 他克莫司; 白癜风; Th17/Treg 细胞; 皮损; 黑素细胞

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2022) 02-0294-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.02.013

Effect of tacrolimus on Th17/Treg cell balance and melanocyte loss in vitiligo mice

WANG Xiaoyuan, WANG Yingjuan, KANG Le

Department of Dermatology, Baoji Central Hospital, Baoji 721000, China

Abstract: Objective To investigate the effect of tacrolimus on the balance of helper T17 (Th17)/regulatory T (Treg) cells and the loss of melanocytes (MC) in vitiligo mice. **Methods** The mice were divided into control group, model group and tacrolimus Low, medium and high dose groups (10, 50, 100 mg 0.03% tacrolimus ointment). Rosin/wax mixture was used to remove hair from the same position on the back of mice, with a size of 2 cm × 2 cm, which was divided into two parts: drug area and non-drug area, with an area of 1:1. Except for the control group, the vitiligo model was prepared by evenly applying 50 mg 40% Monobenzone ointment on the back of mice, once a day for 60 days. 30 d after monobenzone was applied, tacrolimus ointment was applied at the same position at an interval of 7 h. Tacrolimus ointment was applied once every morning and evening for consecutive 60 d. The decolorization of mouse hair was observed and evaluated by naked eyes, the distribution of melanocytes and melanin in mouse skin was observed by reflection confocal microscopy (RCM), the melanocytes in the basal layer and the hair follicles containing melanin were counted by hematoxylin eosin staining (HE) and Masson's staining (MF), the number of CD4⁺ interleukin (IL)-17⁺ T cells and CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T cells in peripheral blood of mice were measured by flow cytometry, the contents of IL-17, IL-22 and forkhead box P3 (Foxp3) in peripheral blood were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Compared

收稿日期: 2021-06-25

基金项目: 陕西省重点研发计划项目 (2017SF-153)

第一作者: 王小媛 (1981—), 女, 副主任医师, 研究方向为皮肤疾病诊治。Tel: 18609173611 E-mail: veb403@163.com

*通信作者: 王颖娟 (1981—), 女, 硕士研究生, 副主任医师, 研究方向为皮肤性病学。Tel: 18109177708 E-mail: 554618722@qq.com

with control group, the skin in test area of mice in the vitiligo model group was significantly decolorized, and the pigmentation of skin lesions was lost, the hair follicles containing melanin and melanocytes decreased significantly, the percentage of Th17/Treg lymphocytes increased significantly, the contents of IL-17 and IL-22 increased significantly, the content of Foxp3 decreased significantly (all $P < 0.05$). Compared with vitiligo model group, the decolorization of the skin of tacrolimus groups was significantly improved, the distribution of melanin and melanocytes were observed in the lesion, the hair follicles containing melanin and melanocytes increased significantly, the percentage of Th17/Treg lymphocytes decreased significantly, the contents of IL-17 and IL-22 decreased significantly, the content of Foxp3 increased significantly (all $P < 0.05$). **Conclusion** Tacrolimus can regulate Th17/Treg lymphocyte balance and inhibit melanocyte loss in vitiligo mice.

Key words: tacrolimus; vitiligo; Th17/Treg cells; skin lesions; melanocytes

白癜风为色素脱失性皮肤病,表现为皮肤黏膜色素脱失,患病导致的损容严重影响患者的身心健康,同时该病还常常伴有自身免疫性疾病,如糖尿病、风湿性关节炎等^[1-2]。目前关于白癜风的发病机制有多个学说,其中自身免疫学说占重要地位。该学说认为,患者体内的体液、细胞免疫存在异常,T淋巴细胞特异性免疫可导致黑素细胞(melanocyte, MC)损伤,最终表现为患者皮损处呈现乳白色^[3-5]。研究报道,辅助性T17(helper T17, Th17)细胞及其分泌的白细胞介素17(interleukin-17, IL-17)、IL-22等多种细胞因子在白癜风发病中起促进作用^[6]。Th17淋巴细胞少量分泌的IL-21还可以促使原始T淋巴细胞向Th17淋巴细胞分化,抑制其向调节性T(regulatory T, Treg)淋巴细胞分化^[7]。Treg淋巴细胞具有抑制T淋巴细胞活化的作用,可诱导免疫耐受,并且天然性Treg淋巴细胞表型CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺中叉头型基因P3(forkhead box p3, Foxp3)可促进原始T淋巴细胞向Treg淋巴细胞分化,抑制Th17淋巴细胞的增殖与活化^[8-9]。因此,Th17/Treg细胞的平衡对于自身免疫病的发展和结局具有重要作用。研究报道,免疫抑制剂例如他克莫司可活化白癜风患者毛囊和真皮黑素细胞前体,对白癜风起到一定治疗作用^[10-11],但其作用机制相关报道较少。本研究通过建立白癜风小鼠模型,探究他克莫司的治疗作用以及对Th17/Treg细胞平衡和黑素细胞丢失的影响。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级C57BL/6小鼠60只,体质量(15±2)g,雌雄各半,购自北京维通利华实验动物技术有限公司上海分公司,生产许可证号SCXK(沪)2017-0011。实验动物使用符合实验动物管理条例,经动物伦理委员会批准,批准文号IACUC-(20180110)。

1.2 药物及主要试剂

0.03%他克莫司软膏购自安斯泰来制药(中国)

有限公司,货号为J726850,规格每支10 g(0.03%);莫诺苯宗、离子霉素和(12-)-十四酸佛波酯(-13-)乙酸盐(PMA)购自美国Sigma公司;HE染色液、MF染色试剂盒和小鼠外周血单个核细胞分离液试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;Brefeldin A Solution(1 000×)、FITC anti-mouse CD4、PE anti-mouse IL-17A、PE/Cy5 anti-mouse CD25和PE anti-mouse Foxp3购自美国Biolegend公司;IL-17、IL-22和Foxp3 ELISA试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司。DMEM培养基购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.3 主要仪器

多孔细胞培养板和单通道移液器购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;反射式共聚焦显微镜(reflectance confocal microscopy, RCM)购自美国Lucid公司;普通光学显微镜购自德国Leica公司;低温高速离心机和流式细胞仪购自德国Eppendorf公司;酶标仪购自美国Bio-Rad公司。

2 方法

2.1 模型制备及分组

将小鼠随机分为对照组、模型组及他克莫司低、中、高剂量(10、50、100 mg)组,每组12只,雌雄各半。使用松香/蜡混合物对小鼠背部相同位置进行去毛,大小为2 cm×2 cm,作为受试区域,将其分为两部分:用药区域与非用药区域,面积1:1。对照组:于小鼠背部用药区均匀涂抹0.5 mL蒸馏水;模型组:于小鼠背部用药区均匀涂抹50 mg 40%莫诺苯宗软膏^[12],每天1次,连续用药90 d。用药区于15 d左右时出现点状脱色,30 d左右时呈现片状脱色,并且小鼠未用药区域也开始出现脱色情况,60 d时皮损持续扩大并融合在一起。停药后,对小鼠脱色部位颜色及面积连续观察15 d,小鼠脱色稳定,提示模型构建成功。他克莫司各组:小鼠背部用药区域均匀涂抹50 mg 40%莫诺苯宗软膏,每天1次,于莫诺苯宗涂抹30 d后开始于相同位置涂抹

10、50、100 mg 0.03 %他克莫司软膏,两种药膏涂抹时间间隔7 h,他克莫司软膏每天早晚各涂抹1次,连续用药60 d。

2.2 脱色评分

评估停药后小鼠脱色情况^[13],脱色部位包括2个区域:用药区域和非用药区域,每区域5分,每只小鼠10分。评分标准:脱色面积为0,记0分;0<脱色面积≤10%,记1分;10%<脱色面积≤25%,记2分;25%<脱色面积≤50%,记3分;50%<脱色面积≤75%,记4分;75%<脱色面积≤100%,记5分。

2.3 RCM观察黑素细胞和黑色素的分布

RCM实时观察并拍照各组活体小鼠用药区皮肤内黑素细胞和黑色素分布。各组选择同一区域进行观察。

2.4 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色

麻醉处死小鼠后立即剪取用药区皮损皮肤,裁为1 cm×1 cm大小,进行包埋、切片。将组织切片脱蜡并烘烤,经苏木精溶液、伊红溶液染色,脱水透明后树脂封片。显微镜下观察并计数含黑色素毛囊的个数,计算黑色素毛囊比例。

黑色素毛囊比例=含黑色素毛囊的个数/视野内毛囊总数

2.5 马松(masson-fontana, MF)染色

取组织切片进行脱蜡,经固定、洗涤、MF染色后,脱水通透并树脂封片。显微镜下观察并计数基底黑素细胞的数量。

2.6 收集小鼠外周血以及外周血单个核细胞的分离

小鼠处死前股动脉取血,部分离心后收集血清,于-80℃保存备用。剩下的外周血加入等体积稀释液混匀,再将其小心转移至已有等体积淋巴细胞分离液的试管中,4℃、1 500 r·min⁻¹离心15 min,管中可见明显分层,吸取中间位置的白膜层(外周血单个核细胞)至新管,无菌磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤细胞2次,4℃、1 500 r·min⁻¹离心15 min收集细胞。

2.7 流式细胞术检测 CD4⁺IL-17⁺ T 细胞和 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T 细胞

将密度为1×10⁶·mL⁻¹的单个核细胞悬液接种于24孔板,加入10 μL PMA(5 μg·mL⁻¹)、10 μL 离子霉素(100 μg·mL⁻¹)、1 μL Brefeldin A,细胞培养箱中孵育5 h,胰酶消化后收集细胞,试剂盒流式缓冲液

洗涤2次并重悬为1×10⁶·mL⁻¹。取100 μL至流式管,加入1 μL CD4-FITC抗体,混匀后避光孵育30 min,经固定和透化后,加入5 μL IL-17A-PE抗体避光孵育30 min,流式缓冲液洗涤并重悬为400 μL,上样流式细胞仪检测Th17细胞。取100 μL密度为1×10⁶·mL⁻¹的单个核细胞悬液至流式管,加入1 μL CD4-FITC抗体和1 μL CD25-PE/Cy7抗体,混匀后避光孵育30 min,经固定透化,加入5 μL Foxp3-PE抗体避光孵育30 min,缓冲液洗涤并重悬为400 μL,上样流式细胞仪检测Treg细胞。

2.8 酶联免疫吸附实验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测 IL-17、IL-22 和 Foxp3 含量

取1 mL密度为1×10⁶·mL⁻¹的单个核细胞悬液,4℃、1 500 r·min⁻¹离心15 min收集细胞,细胞裂解液裂解细胞,4℃、2 000 r·min⁻¹离心15 min,取上清用于Foxp3蛋白检测;取-80℃保存的血清用于IL-17和IL-22的检测。操作严格按照试剂盒说明书进行。

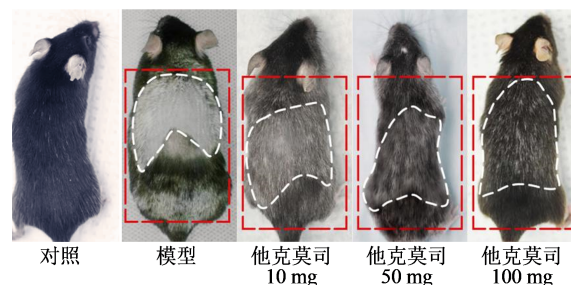
2.9 统计学分析

数据采用SPSS 23.0软件进行统计学分析,各组实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较则采用SNK-*q*检验。

3 结果

3.1 他克莫司对小鼠皮毛脱色的影响

结果如图1、表1所示,与对照组比较,模型组皮毛脱色明显,小鼠皮毛脱色评分显著升高($P < 0.05$);他克莫司各组皮毛脱色情况显著改善,白癜风小鼠的皮毛脱色评分显著降低($P < 0.05$)。



红色框为小鼠总脱毛区,白色框为用药区域。因小鼠活泼度很高,涂完药在垫料中乱拱打滚,导致用药区域不规则。red box is total depilation area of mice, and white box is medication area. Due to high activity of mouse, drug was rolled in cushion, resulting in irregular area of medication.

图1 他克莫司对小鼠皮毛脱色的影响

Fig. 1 Effect of tacrolimus on decolorization of mouse's fur

表1 他克莫司对小鼠皮毛脱色的影响($\bar{x}\pm s, n=12$)Table 1 Effect of tacrolimus on decolorization of mouse's fur($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量/mg	脱色评分	
		用药区	非用药区
对照	—	0.00±0.00	0.00±0.00
模型	—	5.00±0.00*	2.46±0.38*
他克莫司	10	1.67±0.50 [#]	1.42±0.21 [#]
	50	1.42±0.47 [#]	1.08±0.23 [#]
	100	1.33±0.43 [#]	0.86±0.15 [#]

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ * $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group

3.2 他克莫司对小鼠黑素细胞和黑色素分布的影响

RCM观察结果如图2所示,对照组小鼠受试区色素分布正常,黑素细胞折光强;白癜风模型组小鼠皮损处色素缺失,折光几乎不可见;他克莫司各组小鼠皮损处可见色素分布以及树突状的活化黑素细胞。

HE、MF组织染色结果如图3和表2所示,对照组小鼠含黑色素的毛囊、黑素细胞分布均匀,排列整齐;与对照组较,白癜风模型组小鼠黑色素毛囊比例和黑素细胞数显著降低($P<0.05$);他克莫司各组黑色素毛囊比例和黑素细胞数显著高于模型组($P<0.05$),且呈剂量相关性。

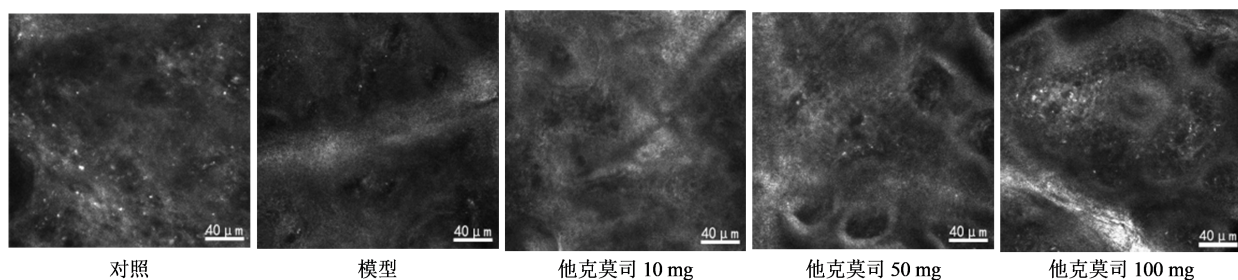
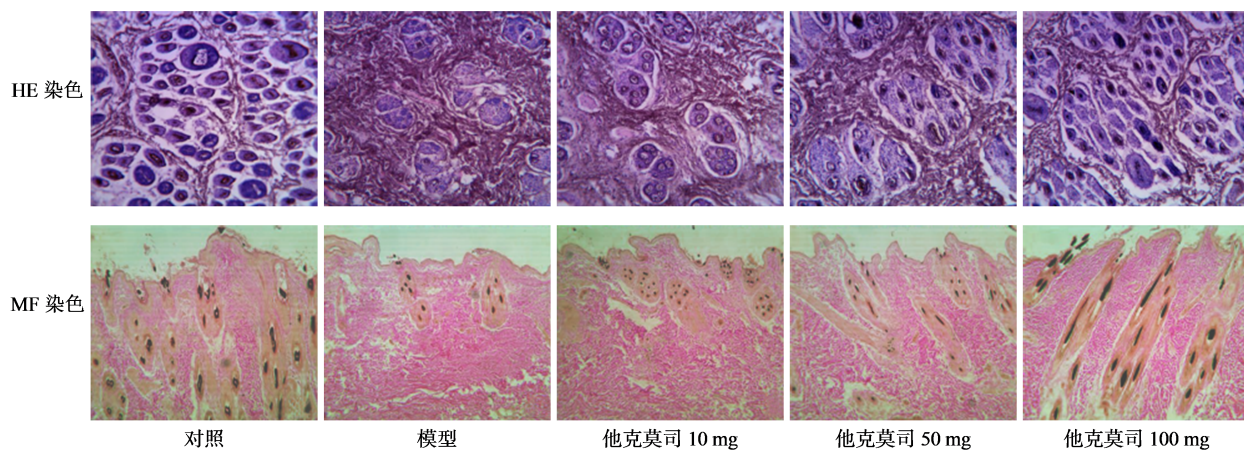


图2 RCM结果

Fig. 2 Result of RCM

图3 他克莫司对含黑色素的毛囊(HE染色)以及黑素细胞(MF染色)的影响($\times 100$)Fig. 3 Effect of tacrolimus on melanin-containing hair follicles (HE staining) and melanocytes (MF staining) ($\times 100$)表2 他克莫司对黑色素毛囊比例以及黑素细胞数量的影响($\bar{x}\pm s, n=12$)Table 2 Effect of tacrolimus on proportion of melanin hair follicles and number of melanocytes ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量/mg	黑色素毛囊比例/%	黑素细胞个数
对照	—	83.55±14.23	85.13±7.16
模型	—	7.60±3.43*	5.35±4.24*
他克莫司	10	37.42±8.44 [#]	41.03±5.36 [#]
	50	46.81±11.73 [#]	50.82±10.43 [#]
	100	52.66±12.45 [#]	65.07±9.15 [#]

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ * $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group

3.3 他克莫司对Th17/Treg淋巴细胞平衡的影响

结果如图4、表3所示,白癜风模型组Th17淋巴细胞比例显著高于对照组($P<0.05$),而Treg淋巴细胞比例显著低于对照组($P<0.05$),Th17/Treg显著高于对照组;他克莫司各组Th17淋巴细胞比例显著低于模型组($P<0.05$),Treg淋巴细胞比例显著高于模型组($P<0.05$),Th17/Treg显著低于模型组($P<0.05$),且呈剂量相关性。

3.4 他克莫司对IL-17、IL-22和Foxp3表达的影响

结果如表4所示,与对照组比较,模型组IL-17、

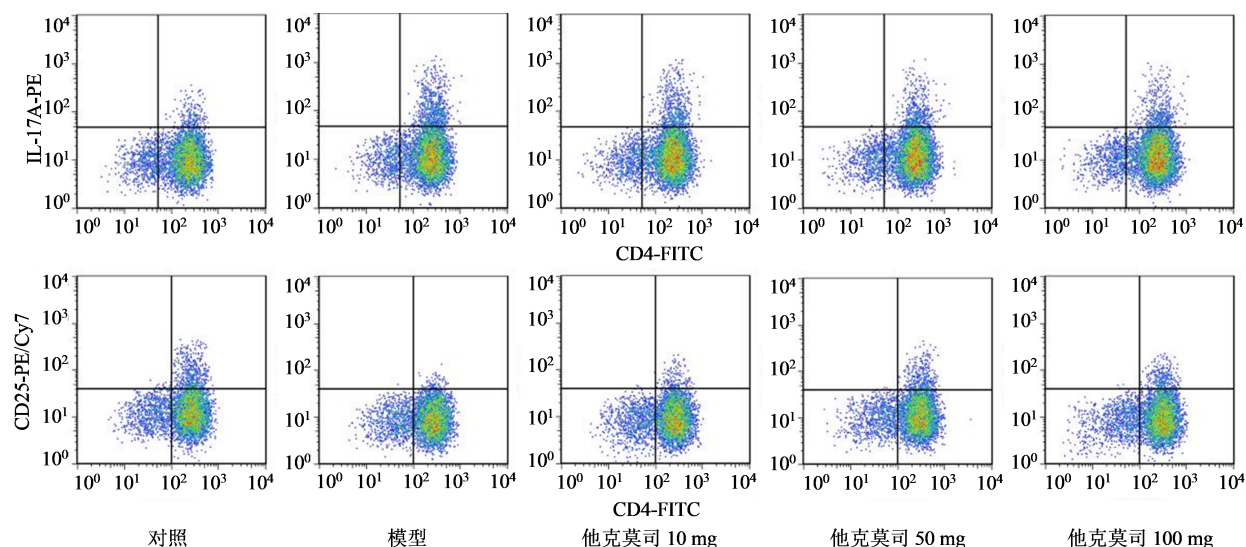


图4 各组Th17和Treg淋巴细胞的比例

Fig. 4 Ratio of Th17 and Treg lymphocytes in each group

表3 各组Th17和Treg淋巴细胞的比例($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 3 Ratio of Th17 and Treg lymphocytes in each group ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/mg	Th17/%	Treg/%	Th17/Treg
对照	—	0.59±0.10	0.77±0.15	0.76±0.03
模型	—	1.38±0.21*	0.08±0.02*	17.27±1.64*
他克莫司	10	1.03±0.14 [#]	0.26±0.07 [#]	4.02±0.53 [#]
	50	0.90±0.15 [#]	0.47±0.12 [#]	1.95±0.46 [#]
	100	0.83±0.13 [#]	0.62±0.13 [#]	1.31±0.25 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group

IL-22含量显著上升($P < 0.05$), Foxp3含量显著降低($P < 0.05$); 与白癜风模型组比较, 他克莫司各组IL-17、IL-22含量显著降低($P < 0.05$), Foxp3含量显著升高($P < 0.05$)。

4 讨论

目前, 白癜风的发病机制尚未完全明晰, 缺乏针对性的治疗策略。其中, 自身免疫学说认为白癜

风是因机体免疫系统紊乱, 导致黑素细胞被破坏, 进而引发皮肤色素脱失。本研究采用40%莫诺苯宗软膏建立白癜风小鼠模型, 模型组与对照组比较, 小鼠背部脱毛区皮毛发生明显脱色变白现象, 皮损处含黑色素的毛囊个数以及黑素细胞数量明显减少, 表明成功建立白癜风小鼠模型。他克莫司是一种免疫抑制剂, 有研究报道, 局部使用他克莫司可加速白癜风的修复^[14]。本研究结果显示, 他克莫司各组相较于白癜风模型组, 小鼠背部受试区毛发脱色情况明显改善, 皮损处含黑色素的毛囊数及黑素细胞数也明显增多, 提示他克莫司可抑制白癜风小鼠黑素细胞丢失, 改善毛发脱色。

Th17细胞为CD4⁺ Th淋巴细胞亚群, 可特异性分泌IL-17和少量分泌IL-21及IL-22, 参与诱导自身免疫。其中IL-22可与IL-17协同作用, 增强炎症反应, 对组织造成损伤; IL-21可促使原始T淋巴细胞向Th17淋巴细胞分化。研究报道, 活动性白癜风外周血滤泡辅助T淋巴细胞亚群存在失衡^[15]。

表4 他克莫司对IL-17、IL-22和Foxp3表达的影响($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 4 Effect of tacrolimus on expression of IL-17, IL-22 and Foxp3 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/mg	血清IL-17/(pg·mL ⁻¹)	血清IL-22/(ng·mL ⁻¹)	单个核细胞Foxp3/(pg·mL ⁻¹)
对照	—	32.26±7.55	12.53±3.34	189.56±38.16
模型	—	94.56±18.24*	27.16±4.06*	85.23±16.76*
他克莫司	10	75.56±14.13 [#]	19.55±3.25 [#]	121.33±20.73 [#]
	50	52.98±9.22 [#]	16.97±2.76 [#]	149.77±29.16 [#]
	100	40.76±6.86 [#]	15.63±2.88 [#]	167.81±31.25 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group

Zhen等^[16]研究发现,非节段性白癜风患者外周血中Th17的百分比和绝对数均显著高于健康对照组,并且患者血清中IL-17A表达水平明显升高,表明Th17淋巴细胞在细胞免疫导致的白癜风发展中起重要作用。Treg淋巴细胞在机体免疫自稳和免疫耐受中发挥重要作用^[17],其*Foxp3*基因可与孤儿核受体和外显子2共同作用,抑制IL-17 mRNA转录,从而抑制Th17淋巴细胞增殖,并促进原始T淋巴细胞向Treg淋巴细胞分化^[18]。Giri等^[19]研究发现,白癜风患者体内CD25和*Foxp3*蛋白表达显著降低,Treg淋巴细胞功能缺失。本研究结果显示,与对照组比较,白癜风模型组小鼠Th17淋巴细胞明显增多,Treg淋巴细胞明显减少,Th17/Treg细胞平衡被打破,呈现为向Th17偏移,其分泌的炎症细胞因子IL-17和IL-22表达增加,*Foxp3*表达下调,与临床报道一致^[16,19]。另有研究报道,他克莫司联合二甲双胍可通过调节Treg淋巴细胞和Th17淋巴细胞失衡从而降低小鼠移植物抗宿主病的严重程度^[20]。本研究中,相较于白癜风模型组,他克莫司各组小鼠Th17淋巴细胞明显减少,Treg淋巴细胞明显增多,Th17/Treg细胞比值显著降低,逐渐趋于正常水平,Th17细胞相关IL-17和IL-22表达下调,Treg细胞相关*Foxp3*表达上调,提示他克莫司具有维持白癜风小鼠Th17/Treg细胞平衡的作用。

他克莫司可调节白癜风小鼠体内Th17/Treg细胞平衡,抑制黑素细胞的丢失,可有效治疗白癜风。本研究仅初步对他克莫司在白癜风小鼠体内的作用机制进行探讨,更加深入地研究还需后续实验探索。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Kovacs D, Bastonini E, Ottaviani M, et al. Vitiligo skin: Exploring the dermal compartment [J]. *J Invest Dermatol*, 2018, 138(2): 394-404.
- [2] Silpa-Archa N, Pruksaekanan C, Angkoolpakdeekul N, et al. Relationship between depression and quality of life among vitiligo patients: A self-assessment questionnaire-based study [J]. *Clin Cosmet Investig Dermatol*, 2020, 13: 511-520.
- [3] Boniface K, Taïeb A, Seneschal J. New insights into immune mechanisms of vitiligo [J]. *G Ital Dermatol Venereol*, 2016, 151(1): 44-54.
- [4] Das D, Akhtar S, Kurra S, et al. Emerging role of immune cell network in autoimmune skin disorders: An update on *Pemphigus*, vitiligo and psoriasis [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2019, 45: 35-44.
- [5] Czarnowicki T, Krueger J G, Lebwohl M, et al. 052 Vitiligo is characterized by multi-axis T-cell activation in blood [J]. *J Invest Dermatol*, 2018, 138(5): S9.
- [6] Sushama S, Dixit N, Gautam R K, et al. Cytokine profile (IL-2, IL-6, IL-17, IL-22, and TNF- α) in vitiligo-New insight into pathogenesis of disease [J]. *J Cosmet Dermatol*, 2019, 18(1): 337-341.
- [7] Kato H, Perl A. Blockade of treg cell differentiation and function by the interleukin-21-mechanistic target of rapamycin axis via suppression of autophagy in patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2018, 70(3): 427-438.
- [8] Jiang H, Xin S J, Yan Y M, et al. Abnormal acetylation of FOXP3 regulated by SIRT-1 induces Treg functional deficiency in patients with abdominal aortic aneurysms [J]. *Atherosclerosis*, 2018, 271: 182-192.
- [9] Liu Q, Wang X, Liu X S, et al. Use of polymeric nanoparticle platform targeting the liver to induce treg-mediated antigen-specific immune tolerance in a pulmonary allergen sensitization model [J]. *ACS Nano*, 2019, 13(4): 4778-4794.
- [10] Rokni G R, Golpour M, Gorji A H, et al. Effectiveness and safety of topical tacrolimus in treatment of vitiligo [J]. *J Adv Pharm Technol Res*, 2017, 8(1): 29-33.
- [11] Hu W T, Xu Y P, Ma Y Y, et al. Efficacy of the topical calcineurin inhibitors tacrolimus and pimecrolimus in the treatment of vitiligo in infants under 2 years of age: A randomized, open-label pilot study [J]. *Clin Drug Investig*, 2019, 39(12): 1233-1238.
- [12] 王天晶, 李里, 张婷, 等. 莫诺苯宗联合咪喹莫特对C57BL6小鼠白癜风造模的作用研究 [J]. *皮肤性病诊疗学杂志*, 2018, 25(6): 321-324.
- [13] Wang T J, Li L, Zhang T, et al. Effect of monobenzone combined with imiquimod to the C57BL6 mice vitiligo [J]. *J Diagn Ther Derm Venereol*, 2018, 25(6): 321-324.
- [14] 李情, 祝逸平, 许爱娥. 茶多酚、吡美莫司、他克莫司外用对莫诺苯宗诱导白癜风样模型小鼠的疗效比较 [J]. *中华皮肤科杂志*, 2015, 48(1): 41-44.
- [15] Li Q, Zhu Y P, Xu A E. Comparison of topical application of tea polyphenol versus pimecrolimus versus tacrolimus for the treatment of monobenzone-induced vitiligo-like depigmentation in a mouse model [J]. *Chin J Dermatol*, 2015, 48(1): 41-44.
- [16] Ju H J, Lee J H, Kim G M, et al. Accelerated repigmentation of vitiligo after an irritant reaction following occlusion dressing with topical tacrolimus [J]. *Eur J Dermatol*, 2018, 28(3): 388-390.
- [17] Jacquemin C, Taieb A, Boniface K, et al. Imbalance of

- peripheral follicular helper T lymphocyte subsets in active vitiligo [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2019, 32 (4): 588-592.
- [16] Zhen Y, Yao L, Zhong S X, et al. Enhanced Th1 and Th17 responses in peripheral blood in active non-segmental vitiligo [J]. *Arch Dermatol Res*, 2016, 308(10): 703-710.
- [17] Serra P, Santamaria P. Nanoparticle-based approaches to immune tolerance for the treatment of autoimmune diseases [J]. *Eur J Immunol*, 2018, 48(5): 751-756.
- [18] Xie M X, Wang J Z, Gong W, et al. NF- κ B-driven miR-34a impairs Treg/Th17 balance via targeting Foxp3 [J]. *J Autoimmun*, 2019, 102: 96-113.
- [19] Giri P S, Dwivedi M, Begum R. Decreased suppression of CD8⁺ and CD4⁺ T cells by peripheral regulatory T cells in generalized vitiligo due to reduced NFATC1 and FOXP3 proteins [J]. *Exp Dermatol*, 2020, 29(8): 759-775.
- [20] Lee S K, Choi J Y, Cho M L, et al. Metformin combination with tacrolimus attenuate gvhd severity in mice by modulating treg and Th17 imbalance [J]. *Transplantation*, 2020, 104(S3): S160.

【责任编辑 兰新新】