

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2013.01.010

食物过敏与正常小鼠 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞的差异性研究

程 茜, 陈玉梅

(重庆医科大学附属儿童医院儿童保健科, 重庆 400014)

【摘要】目的:比较食物过敏(food allergy, FA)小鼠与正常小鼠模型 CD4⁺CD25⁺调节性 T(regulatory T, Treg)细胞数量及功能差异。**方法:**4~6 周龄 SPF 级无鸡蛋喂养 Balb/c 雌鼠随机分为 2 组, 每组 8 只。分别为卵清蛋白(ovalbumin, OVA)致敏组和正常对照组。采用流式细胞术分析其脾脏单个核细胞悬液中 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞的数量变化; 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测 OVA 致敏组与正常对照组血清白介素 10(interleukin-10, IL-10)和转化生长因子-β1(transforming growth factor-β1, TGF-β1)水平。**结果:**OVA 组 CD4⁺CD25⁺T 淋巴细胞的百分比低于正常对照组($P<0.05$), 并且叉状头转录因子 3 阳性(forkhead transcription factor3⁺, Foxp3⁺)CD4⁺CD25⁺Treg 细胞的百分比显著低于正常对照组($P<0.01$); OVA 组 IL-10 低于正常对照组($P<0.05$), TGF-β1 水平显著低于正常对照组($P<0.01$)。**结论:**FA 小鼠与正常小鼠调节性 T 细胞的数量和功能存在差异。

【关键词】食物过敏; 调节性 T 细胞; 细胞因子

【中国图书分类法分类号】R392.12

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-06-10

Differences of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells between food allergy mice and normal mice

CHENG Qian, CHEN Yumei

(Department of Child Health Care, the Children's Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To compare the quantities and functions of CD4⁺CD25⁺ regulatory T(Treg) cells between food allergy mice model and normal mice model. **Methods:** SPF Balb/c female mice of 4~6 weeks on egg-free diet were randomly divided into ovalbumin (OVA) group ($n=8$) and normal control group ($n=8$). Quantitative changes of CD4⁺CD25⁺ Treg cells in the spleen mononuclear cell suspension were analyzed by flow cytometry. Levels of serum interleukin-10(IL-10) and transforming growth factor-β1(TGF-β1) in OVA mice and normal control mice were detected by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). **Results:** Percentage of CD4⁺CD25⁺ Treg cells in OVA group was lower than that in normal control group($P<0.05$), and percentage of forkhead transcription factor3⁺(Foxp3⁺)CD4⁺CD25⁺ Treg cells in OVA group was significantly lower in OVA group than in normal control group($P<0.01$). Levels of IL-10 and TGF-β1 were lower in OVA group than in normal control group($P<0.05$) ($P<0.01$). **Conclusions:** There are differences in quantities and functions of Treg cells between food allergy and normal mice.

【Key words】 food allergy; regulatory T cells; cytokine

对肠道免疫耐受动物模型的研究发现, 调节性 T(regulatory T, Treg)细胞在保持肠道内环境的稳定, 维持 Th1/Th2 平衡方向有重要的作用, 为此本课题组建立小鼠食物过敏模型, 了解食物过敏(food allergy, FA)与正常小鼠 Treg 细胞的差异。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验动物 Balb/c 小鼠, 由重庆医科大学实验动物中心提供。

作者介绍: 程 茜, Email: chq95@126.com,

研究方向: 肠道益生菌与免疫和营养的关系。

基金项目: 重庆市教委科学技术研究资助项目(编号: KJ090312)。

1.2 主要试剂

小鼠转化生长因子-β1(transforming growth factor-β1, TGF-β1)购自美国 R&D 公司, 小鼠白介素 10(interleukin-10, IL-10)酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自北京四正柏生物科技有限公司。

1.3 分组和 FA 动物模型的建立

将 16 只小鼠随机分成两组, 分别为卵清蛋白(ovalbumin, OVA)致敏组和正常对照组。参照文献[1]制作 FA 动物模型: OVA 组小鼠第 1 天用含 10 μg OVA(grade V)及 1 mg Al(OH)₃ 的无菌生理盐水 0.5 ml 腹腔注射, 进行基础致敏; 第 15 天对其腹腔再次注射只含 10 μg OVA(grade V)的生理盐水 0.5 ml 强化致敏; OVA(grade II)生理盐水溶液 0.4 ml (OVA 浓度 250 g/L)对 OVA 组进行隔天灌胃直至第 42 天激发肠道过敏反应; 正常对照组小鼠分别在第 1 天和第 15 天腹腔注射 0.5 ml 生理盐水, 实验第 20 天起以等量生理盐水灌胃至第 42 天。观察临床表现、取小肠做组织病理形态学检查。

1.4 血清 OVA 特异性 IgE、IL-10 和 TGF- β 1 测定

造模第 42 天,摘眼球取血按试剂盒说明进行血清 OVA 特异性 IgE、IL-10 和 TGF- β 1 测定。

1.5 流式细胞仪测定脾脏单个核细胞悬液 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞

无菌取脾处理后得单个核细胞悬液,24 h 内用流式细胞仪(FACS Caliber,BD 公司)检测,Cell Quest 软件分析数据。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计分析软件包进行统计学处理。计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示;两组间比较用独立样本 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧),以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FA 小鼠模型的建立

OVA 隔日激发 3~4 次后,可见 OVA 致敏组小鼠在灌喂 OVA 20~30 min 内,大部分 (7/8) 出现不同程度的烦躁不安,排出糊状或水样便,之后在每次激发后上述小鼠均会出现持续 1~2 h 左右的急性腹泻现象,其余时段则为正常大便;小鼠平均体重增长为 (2.84 ± 0.64) g,较正常对照组小鼠 (4.94 ± 1.06) g 明显降低 ($P < 0.05$)。

小肠组织切片 HE 染色可见 OVA 组固有层血管充血肿胀,绒毛上皮细胞出现局灶性坏死、脱落,小肠绒毛固有层出现淋巴细胞、浆细胞等炎症细胞浸润;正常对照组小鼠小肠组织形态结构完整,无明显炎症改变 (图 1、图 2)。

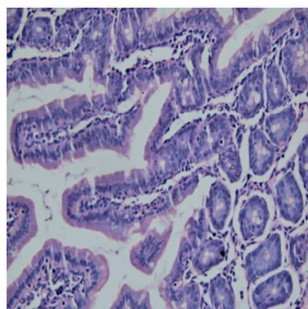


图 1 光镜下 FA 小鼠空肠组织 (HE, 200 $\times$)

Fig.1 Jejunum tissues of OVA mice under light microscope (HE, 200 $\times$)

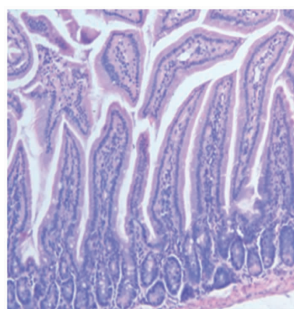


图 2 光镜下正常小鼠空肠组织 (HE, 200 $\times$)

Fig.2 Jejunum tissues of normal mice under light microscope (HE, 200 $\times$)

ELISA 法检测小鼠血清中 OVA 特异性 IgE 水平 (A 值),其中 OVA 组 sIgE (0.81 ± 0.05) 较正常对照组 (0.61 ± 0.04) 明显增高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 Treg 细胞数量

流式细胞仪检测小鼠脾脏单个核细胞悬液结果显示:OVA 组 FA 小鼠脾脏单个核细胞悬液中 CD4⁺CD25⁺T 细胞占 CD4⁺T 细胞含量低于正常对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);叉状头转录因子 3 阳性细胞 (forkhead transcription factor 3⁺, Foxp3⁺) (Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺Treg 细胞) 占 CD4⁺CD25⁺

T 细胞含量与正常对照组相比显著降低 ($P < 0.05$) (表 1, 图 3~6)。

表 1 各组小鼠 CD4⁺CD25⁺T 细胞、Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺Treg 细胞的含量 ($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab.1 Numbers of CD4⁺CD25⁺T cells and Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺regulatory T cells in spleen of mice in each group ($\bar{x} \pm s, \%$)

分组	例数 (只)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ T 细胞	Foxp3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg 细胞
正常对照组	8	14.76 $\pm$ 0.97 ^a	12.33 $\pm$ 1.83 ^a
OVA 组	8	11.89 $\pm$ 1.26	8.80 $\pm$ 1.37

注:a,与 OVA 组比较, $P < 0.05$

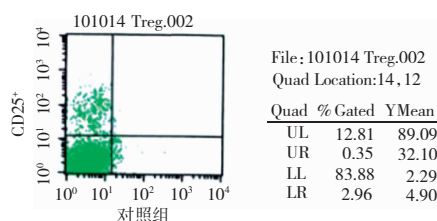


图 3 OVA 组小鼠脾细胞悬液中 CD4⁺CD25⁺T 细胞 FACS 图
Fig.3 FACS of CD4⁺CD25⁺T cells in spleen of Balb/c mice (OVA group)

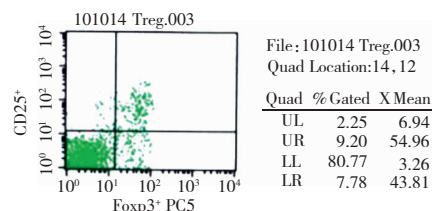


图 4 OVA 组小鼠脾细胞悬液中 Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺Treg 细胞 FACS 图

Fig.4 FACS of Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺Treg cells in spleen of Balb/c mice (OVA group)

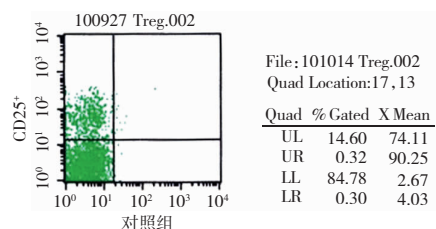


图 5 正常对照组小鼠脾细胞悬液中 CD4⁺CD25⁺T 细胞 FACS 图
Fig.5 FACS of CD4⁺CD25⁺T cells in spleen of Balb/c mice (normal control group)

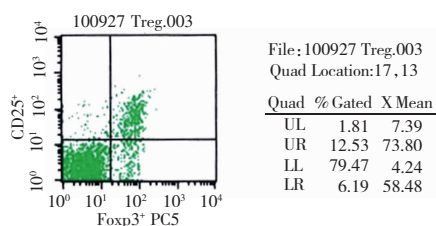


图 6 正常对照组小鼠脾细胞悬液中 Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺Treg 细胞 FACS 图

Fig.6 FACS of Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺Treg cells in spleen of Balb/c mice (normal control group)

2.3 细胞因子测定

OVA 组小鼠血清 IL-10 水平低于正常对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);TGF- β 水平显著低于正常对照组($P<0.05$) (表 2)。

表 2 各组小鼠血清 IL-10、TGF- β 的水平 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Serum levels of IL-10 and TGF- β in each group ($\bar{x} \pm s$)

分组	例数 (只)	IL-10 (pg/ml)	TGF- β (pg/ml)
正常对照组	8	70.96 $\pm$ 3.05 ^a	111.05 $\pm$ 7.25 ^a
OVA 组	8	59.86 $\pm$ 3.59	90.82 $\pm$ 8.10

注:a,与 OVA 组比较, $P<0.05$

3 讨论

越来越多的研究提出,Treg 细胞对 Th1/Th2 平衡有调控作用。Mubeccel Akdis 等用新鲜纯化的 γ 干扰素、IL-4、IL-10 诱导抗原特异性 CD4⁺T 细胞产生时发现:当无害抗原作用于健康人时,以 Treg 细胞亚群为优势,作用于过敏患者时却以 Th2 细胞为主。健康和过敏患者体内 3 类抗原特异性 Th 细胞亚群比例的不同决定过敏性疾病的发生,其优势亚群的改变可能与过敏性疾病进一步发展或恢复相关。CD4⁺CD25⁺Treg 细胞是目前研究最多的一种亚型。当低剂量食物抗原被抗原提呈细胞吞噬后,机体肠系膜淋巴结或派氏结中的初始 CD4⁺T 细胞分化为 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞,产生口服耐受。口服耐受被打破或诱导失败会导致 FA 等变态反应性疾病发生。近年来研究表明^[2-4],其数目及功能的异常亦与过敏性疾病密切相关。

本实验表明,OVA 组致敏小鼠脾脏单个核细胞悬液中 CD4⁺CD25⁺T 细胞所占 CD4⁺细胞比例比正常小鼠下降,且 Foxp3 阳性细胞(Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺Treg 细胞)占 CD4⁺CD25⁺T 细胞含量显著降低,与黄煌等^[5]结果相似。Treg 细胞发挥负向调节作用时必须要有细胞激活过程中调控基因表达的 Foxp3。Foxp3 发生突变,则 CD4⁺CD25⁺细胞分化即受阻,出现自身免疫和变态反应失调综合征,临床可以表现为严重湿疹、FA、嗜酸性粒细胞增多和 IgE 水平升高。临床研究中也有研究者^[6]发现,哮喘等过敏性疾病患者体内 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞数量减少。

IL-10 和 TGF- β 都是具有免疫抑制作用的细胞因子,二者抑制效应广泛。IL-10 可通过阻断共刺激分子 CD2 和 CD28 提供的共刺激信号,来阻止效应性 T 细胞的活化;抑制树突状细胞(dendritic cells,DCs)的成熟致 T 细胞免疫耐受;下调成熟 DCs

和单核细胞上的主要组织相容性复合体 II 和共刺激分子配体的表达;抑制肥大细胞的脱颗粒,从而使促炎性因子释放减少;促使 B 细胞产生的抗体 IgE 向 IgA 或 IgG4 转换等作用机制来抑制效应性 T 细胞对过敏原的增殖反应和细胞因子的产生;TGF- β 也被认为可以通过抑制免疫细胞因子的产生,抑制免疫效应细胞的增生和活化以及诱导活化的效应 T 细胞凋亡而发挥抗炎作用,从而减轻过敏反应。此外,TGF- β 对维持 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞数量、功能以及 Foxp3 表达有重要意义^[7]。本次实验显示,FA 小鼠中 IL-10 和 TGF- β 水平较正常小鼠低。

本研究推测,FA 时 Treg 细胞功能可能存在缺陷,分泌的细胞因子不足以调控炎症反应,是导致 FA 的重要原因。Treg 细胞在正常和 FA 小鼠体内的数目和功能的差异值得进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 白 枫,黎海芪.黄褐毛忍冬皂苷对卵清蛋白致敏小鼠的抗过敏作用[J].第四军医大学学报,2008,29(15):1395-1398.
- [2] Bai F,Li H Q.The anti-allergic effect of fulvotomentoside on ovalbumin sensitized mice[J].J Forth Mil Med Univ,2008,29(15):1395-1398.
- [3] Saito M,Nagasawa M,Takada H,et al.Defective IL-10 signaling in hyper-IgE syndrome results in impaired generation of tolerogenic dendritic cells and induced regulatory T cells[J].J Exp Med,2011,208(2):235-249.
- [4] Saurer L,Mueller C.T cell-mediated immunoregulation in the gastrointestinal tract[J].Allergy,2009,64(4):505-519.
- [5] Karimi K,Inman M D,Bienenstock J,et al.Lactobacillus reuteri-induced regulatory T cells protect against an allergic airway response in mice[J].Am J Respir Crit Care Med,2009,179(3):186-193.
- [6] 黄 煌,郑鹏远,罗 予,等.食物过敏对小鼠肠道屏障功能及 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的影响[J].世界华人消化杂志,2008,16(17):1932-1937.
- [7] Huang H,Zheng P Y,Luo Y,et al.The effect of food allergy on function of intestinal barrier and number of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells of mice[J].World Chinese Journal of Digestology,2008,16(17):1932-1937.
- [8] 罗征秀,刘恩梅,邓 兵,等.Foxp3 表达与 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞在儿童哮喘发病中的作用[J].中华儿科杂志,2006,44(4):267-271.
- [9] Luo Z X,Liu E M,Deng B,et al.The effect of expression of Foxp3 and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell on asthma of children[J].Chinese Journal of Pediatrics,2006,44(4):267-271.
- [10] Gilbert R S,Kobayashi R,Sekine S,et al.Functional transforming growth factor- β receptor type II expression by CD4⁺T cells in Peyer's patches is essential for oral tolerance induction[J].PLoS One,2011,6(11):e27501.

(责任编辑:关蕴良)