

DOI:10.7499/j.issn.1008-8830.2013.09.013

论著·临床研究

1,25-(OH)₂D₃ 抑制脂多糖诱导的脐血 CD4⁺T 细胞 IL-13 和 IL-17 的表达

钟慧 周小建 洪建国

(上海交通大学附属第一人民医院儿内科, 上海 201620)

[摘要] 目的 本研究旨在探讨生命早期脂多糖(LPS)对脐血CD4⁺T细胞白介素-13(IL-13)和白介素-17(IL-17)表达的影响及1,25-(OH)₂D₃对其表达的干预作用,为维生素D的临床合理应用及其对哮喘等变态反应性疾病的防治提供理论依据。**方法** 选取顺产的足月新生儿12例,断脐后立即取胎盘端脐静脉血50 mL,采用密度梯度离心法分离脐血单个核细胞(CBMCs),磁珠分选CD4⁺T细胞后依据不同的处理方法分为空白刺激组、LPS(10 μg/mL)单独刺激组和LPS(10 μg/mL)+1,25-(OH)₂D₃(10⁻⁸ mmol/L)共刺激组。培养72 h后采用双抗夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)和Real-Time PCR分别检测培养上清液中IL-13和IL-17水平及CD4⁺T细胞中IL-13和IL-17 mRNA表达。**结果** 与空白刺激组相比,LPS单独刺激组培养上清液中IL-13和IL-17水平及CD4⁺T细胞中IL-13和IL-17 mRNA表达水平明显升高(均 $P<0.01$),而1,25-(OH)₂D₃处理可降低其表达水平(均 $P<0.05$),但仍高于空白刺激组(均 $P<0.01$)。**结论** LPS可促进脐血CD4⁺T细胞IL-13和IL-17的表达;1,25-(OH)₂D₃对于LPS诱导的脐血CD4⁺T细胞IL-13和IL-17表达具有抑制作用,提示1,25-(OH)₂D₃可能在变应原致敏的早期发挥一定保护作用。
[中国当代儿科杂志, 2013, 15(9): 763-766]

[关键词] 脂多糖; 1,25-(OH)₂D₃; 白介素-13; 白介素-17; CD4⁺T细胞

1,25-(OH)₂D₃ inhibits lipopolysaccharide-induced expression of interleukin-13 and interleukin-17 in cord blood CD4⁺T cells

ZHONG Hui, ZHOU Xiao-Jian, HONG Jian-Guo. Department of Pediatrics, Shanghai First People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201620, China (Hong J-G, Email: hongjianguo@hotmail.com)

Abstract: Objective To study the effect of 1,25-(OH)₂D₃ on lipopolysaccharide (LPS)-induced expression of interleukin-13 (IL-13) and interleukin-17 (IL-17) in cord blood CD4⁺T cells, providing theoretical basis for clinical reasonable application of vitamin D and prevention of asthma and allergic diseases. **Methods** Mononuclear cells (MNCs) were isolated from umbilical cord blood (50 mL) of 12 normal eutocia term newborns by gravity centrifugation. CD4⁺T cells were isolated using magnetic beads, which was cultured with following three kinds of stimulus for 72 hours: natural state (blank group), LPS (10 μg/mL) stimulation alone and LPS (10 μg/mL)+1,25-(OH)₂D₃ (10⁻⁸ mmol/L) stimulation. Levels of IL-13 and IL-17 in the culture supernatant and mRNA expressions in cord blood CD4⁺T cells were detected using ELISA and real Time-PCR respectively. **Results** Compared with the blank group, levels of IL-13 and IL-17 in the culture supernatant and mRNA expression of IL-13 and IL-17 in the cord blood CD4⁺T cells increased in the LPS stimulation alone group ($P<0.01$). When co-stimulation of 1,25-(OH)₂D₃ with LPS, levels of IL-13 and IL-17 in the culture supernatant and mRNA expression of IL-13 and IL-17 in the cord blood CD4⁺T cells decreased compared with LPS-stimulated alone group ($P<0.05$), but remained higher than the blank group ($P<0.01$). **Conclusions** LPS can promote expression of IL-13 and IL-17 in cord blood CD4⁺T cells. 1,25-(OH)₂D₃ inhibits the expression of IL-13 and IL-17, suggesting that vitamin D intake may provide protective effects in the development of atopy-predisposing immune responses in early life.
[Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(9): 763-766]

Key words: Lipopolysaccharide; 1,25-(OH)₂D₃; Interleukin-13; Interleukin-17; CD4⁺T cell

[收稿日期] 2013-03-04; [修回日期] 2013-04-12

[基金项目] 上海市科学技术委员会重大项目(10D21951100)。

[作者简介] 钟慧,女,硕士研究生。

[通信作者] 洪建国,教授,主任医师。

近年来研究发现环境变应原刺激后脐带血单个核细胞(cord blood mononuclear cells, CBMCs)增殖分化及细胞因子的表达与过敏倾向有关,认为胎儿免疫系统对变应原的敏感性在免疫平衡的建立中可能发挥着重要作用,但其具体机制尚未完全清楚^[1-4]。CD4⁺T细胞被激活后,根据产生细胞因子和生物功能的不同,可分为Th1和Th2细胞亚群。其中Th2型细胞因子主要激活B细胞产生免疫球蛋白E(immunoglobulin E, IgE)和G1(immunoglobulin G1, IgG1)等抗体从而介导体液免疫反应^[5]。IL-13是一种由Th2细胞分泌的多效性细胞因子,与哮喘的发生发展有着密切联系^[6]。此外,最新发现一类不同于Th1和Th2的细胞亚群,该亚群细胞因可产生IL-17而被称为Th17细胞亚群。其中IL-17家族由A~F共6个成员组成,可诱导中性粒细胞的增殖、成熟与趋化,可能在非嗜酸性炎症反应中扮演重要角色^[7]。

1,25-(OH)₂D₃是维生素D的活性形式,除具有调控钙、磷代谢和骨稳态等作用之外,还具有重要的免疫调节功能^[8]。流行病学资料显示生命早期维生素D缺乏与后期哮喘发病存在一定相关性^[9-11]。Harvey等^[12]研究表明动物孕期维生素D缺乏可导致子代免疫器官发生形态和功能变化,并诱导T细胞分泌更多的促炎因子。因此,本研究通过检测1,25-(OH)₂D₃对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激下脐血CD4⁺T细胞IL-13和IL-17表达的影响,探讨生命早期环境变应原对哮喘相关细胞因子表达的影响及1,25-(OH)₂D₃对其的干预作用,进而为1,25-(OH)₂D₃早期防治哮喘提供理论基础。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2011年11月至2012年6月于我院顺产的足月新生儿12例,男女各6例,出生体重2500~4000 g,出生时无窒息史,Apgar评分≥8分,无胎膜早破及宫内感染史,母亲无异常妊娠史及血制品、皮质激素、抗过敏类药物、中药和免疫调节剂等药物应用史。本研究获上海交通大学附属第一人民医院伦理委员会审查并批准,所有产妇在详细了解本研究过程后均签署书面知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 CBMCs的分离 在严格无菌操作下,新生儿断脐后立即取胎盘端脐静脉血50 mL,肝素抗凝后采用PBS等体积稀释,缓慢加入淋巴细胞分离液(Cedarlane,加拿大),室温800 g离心

20 min。小心吸取中间云雾状白膜层,加入3倍体积PBS,800 g离心10 min,洗涤2次后将其悬浮于RPMI-1640培养液中,即为CBMCs悬液。

1.2.2 CBMCs活力测定及计数 取20 μL单个核细胞悬液加380 μL生理盐水混匀,从中取出180 μL加4%台盼蓝20 μL后吸管轻轻吹打,染色1~2 min后吸取1滴,加入细胞计数板内,使悬液充满计数室内进行细胞计数(死细胞着蓝色,活细胞台盼蓝染色为阴性,活性率应>95%),并用RPMI-1640培养液调成10⁷/mL备用。

1.2.3 磁珠分选CD4⁺T细胞 每10⁷个CBMCs中加入PBS 80 μL和MACS CD4磁珠20 μL(Miltenyi,德国)混匀;4~12℃避光孵育15 min,每隔2 min混匀1次;每10⁷个细胞再加入1~2 mL缓冲液洗涤细胞;4℃,300 g,10 min离心,弃上清;加入500 μL缓冲液悬浮细胞,缓慢滴入分离柱上,收集流出液至无菌离心管中;用加压注射装置将滤器中的CD4⁺T细胞滤出,用15 mL无菌离心管收集,按每10⁷个细胞再加入1~2 mL PBS洗涤细胞。

1.2.4 CD4⁺T细胞处理 用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养液充分混匀CD4⁺T细胞,接种于96孔培养板,每孔200 μL,1~4列为空白刺激组,5~8列为LPS(10 μg/mL)单独刺激组,9~12列为LPS(10 μg/mL)+1,25-(OH)₂D₃(10⁻⁸ mmol/L)共刺激组,置入37℃,5% CO₂的细胞培养箱中培养72 h。

1.2.5 培养上清液中IL-13和IL-17水平的检测

采用ELISA方法,操作步骤严格按照人IL-13、IL-17检测试剂盒(购自美国R&D公司)说明进行。

1.2.6 CD4⁺T细胞中IL-13和IL-17 mRNA表达的检测 主要试剂购自TaKaRa公司,引物由上海生物工程有限公司合成,引物序列见表1。采用Trizol法提取CD4⁺T细胞中的总RNA,SmartTM Spec plus(Bio-Rad,美国)检测所提RNA的浓度及纯度,逆转录后荧光定量PCR法检测。反应体系20 μL,包括预混cDNA 2 μL、引物4 μL、SYBR Premix Ex Taq II 10 μL、H₂O 4 μL,于Bio-Rad荧光定量PCR仪上进行PCR检测。扩增条件如下:95℃预变性30 s;95℃变性5 s,60℃复性30 s,40个循环。应用Bio-Rad软件进行分析。

1.3 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件对数据进行统计学分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,若符合正态分布和方差齐性,多组间比较则采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验,*P*<0.05为差异有统计学意义。

表 1 Real-Time PCR 引物序列

基因	引物序列 (5' → 3')
IL-13	正向引物: ATCCTCTCCTGTTGGCACTG
	反向引物: CTGGTTCTGGGTGATGTTGAC
IL-17	正向引物: TGCTACTGCTACTGCTGCTGAG
	反向引物: CCTTTTGGGATTGGTATTGGTA
β-actin	正向引物: AGCGAGCATCCCCAAAGTT
	反向引物: GGGCACGAAGGCTCATCAT

2 结果

2.1 1,25-(OH)₂D₃ 对 LPS 刺激下脐血 CD4⁺T 细胞培养上清液中 IL-13 和 IL-17 含量的影响

LPS 单独刺激组培养上清液中 IL-13 和 IL-17 水平高于空白刺激组, 差异具有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。1,25-(OH)₂D₃ 干预后其培养上清液中 IL-13 和 IL-17 水平低于 LPS 单独刺激组 (均 $P < 0.05$), 但仍高于空白刺激组, 差异具有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。见表 2。

表 2 细胞培养上清液中 IL-13 和 IL-17 水平
($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	例数	IL-13	IL-17
空白组	12	41.0 ± 3.9	18.7 ± 1.2
LPS 单刺激组	12	52.6 ± 3.4 ^a	24.5 ± 2.5 ^a
LPS+1,25-(OH) ₂ D ₃ 组	12	48.0 ± 1.4 ^{a,b}	21.7 ± 1.5 ^{a,b}
<i>F</i> 值		24.35	30.95
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

a: 与空白组比较, $P < 0.01$; b: 与 LPS 单刺激组比较, $P < 0.05$

2.2 1,25-(OH)₂D₃ 对 LPS 刺激下脐血 CD4⁺T 细胞 IL-13 和 IL-17 mRNA 表达的影响

LPS 单独刺激 CD4⁺T 细胞中 IL-13 和 IL-17 mRNA 表达水平高于空白刺激组, 差异具有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。1,25-(OH)₂D₃ 干预后 CD4⁺T 细胞中 IL-13 和 IL-17 mRNA 表达水平低于 LPS 单独刺激组 (均 $P < 0.05$), 但仍高于空白刺激组, 差异具有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。见表 3。

表 3 CD4⁺T 细胞内 IL-13 和 IL-17 mRNA 表达情况
($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	IL-13	IL-17
空白组	12	1	1
LPS 单刺激组	12	9.1 ± 0.4 ^a	3.13 ± 0.10 ^a
LPS+1,25-(OH) ₂ D ₃ 组	12	5.5 ± 0.3 ^{a,b}	1.97 ± 0.15 ^{a,b}
<i>F</i> 值		593.87	304.90
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

a: 与空白组比较, $P < 0.01$; b: 与 LPS 单刺激组比较, $P < 0.05$

3 讨论

支气管哮喘 (哮喘) 是由多种细胞 (如气道上皮细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、肥大细胞及 T 淋巴细胞等) 和细胞组分共同参与的气道慢性炎症性疾病, 其中 CD4⁺T 细胞在气道炎症中起关键作用。维生素 D 缺乏一直被认为是增加哮喘发病率的危险因素之一, 目前认为可能与维生素 D 的免疫调节功能有关, 主要机制是通过调控树突细胞 (dendritic cells, DCs) 的功能, 促进调节性 T 细胞活化从而抑制 T 细胞增殖, 尤其是 Th1 细胞, 促进 Th1/Th2 细胞平衡偏向 Th2 主导, Th2 细胞因子 IL-4、IL-10、IL-13 合成增加, 导致 IgE 合成增加, 嗜酸性粒细胞聚集、活化从而介导气道高反应和慢性炎症反应^[13]。

IL-13 是一类重要的 Th2 细胞因子, 可单独诱导产生气道高反应、嗜酸性粒细胞增多及气道粘液分泌, 从而引发哮喘症状^[14]。本研究显示, 生命早期变应原 LPS 刺激后脐血 CD4⁺T 细胞 IL-13 表达水平升高, 而 1,25-(OH)₂D₃ 干预后其表达水平明显降低。Baeke 等^[15]的体外实验证实, 1,25-(OH)₂D₃ 可直接作用于 T 细胞影响细胞因子的分泌, 也有动物研究表明在哮喘诱发的最初阶段或 Th2 细胞分化完成阶段给予 1,25-(OH)₂D₃ 可显著降低气道炎症反应和灌洗液中 IL-4 的水平^[16]。本研究结果显示 1,25-(OH)₂D₃ 对 Th2 细胞功能具有下调作用, 对哮喘的嗜酸性炎症反应具有显著抑制作用, 这与国内外许多研究结果一致^[17-18]。尽管如此, 其内在机制尚不完全清楚。研究表明阻断 DCs 上 T 细胞免疫球蛋白粘蛋白-4 (T cell immunoglobulin mucin protein-4, TIM-4) 及其受体的相互作用可抑制 Th2 细胞的分化与增殖^[19], 而栾斌等^[20]证实 1,25-(OH)₂D₃ 可下调哮喘小鼠肺内 TIM4 的表达, 这可能是其机制之一, 但仍需深入研究。

近年来, Th2 型细胞因子的治疗不能完全有效减轻哮喘的气道炎症。随着研究的深入, 人们逐渐发现哮喘发病的免疫学机制远较 Th1/Th2 失衡理论复杂。目前认为 Th17 细胞是一类新的不同于 Th1 和 Th2 的 T 细胞亚群, 其分泌的 IL-17 可以诱导气道平滑肌细胞产生 IL-8 和嗜酸细胞活化趋化因子^[21], 促使中性粒细胞广泛浸润, 而在哮喘急性发作期可见中性粒细胞浸润, 其中支气管肺泡灌洗液中也可发现大量中性粒细胞。本研究发现经 LPS 刺激的 CD4⁺T 细胞中 IL-17 表达升高, 推测在细胞分化早期抗原刺激可同时促进 Th0 向 Th2 和 Th17 分化, IL-17 可能在生命早期即参与了哮

喘发病的某些始动环节,而研究中 1,25-(OH)₂D₃ 可抑制 IL-17 的表达,可能对哮喘的中性粒细胞炎症反应具有抑制作用,提示 1,25-(OH)₂D₃ 作为一种免疫调节剂对哮喘可能具有辅助治疗作用。McKinley 等^[22] 研究提出 Th2 和 Th17 细胞均能诱导气道高反应性,但是 Th17 介导的气道炎症和气道高反应是激素耐药(或激素抵抗)的,即在激素耐药类型哮喘中 Th17 细胞的作用值得重视。

综上所述,本研究表明 LPS 可促进脐血 CD4⁺T 细胞 IL-13 和 IL-17 的表达,这种过度表达可以被 1,25-(OH)₂D₃ 抑制,提示生命早期适量补充 1,25-(OH)₂D₃ 可能在变应原致敏的特异性免疫反应中具有保护效应,为哮喘等变态反应性疾病的防治提供新的思路。

[参 考 文 献]

- [1] Thornton CA, Upham JW, Wikstrom ME, Holt BJ, White GP, Sharp MJ, et al. Functional maturation of CD4⁺CD25⁺CTLA4⁺CD45RA⁺ T regulatory cells in human neonatal T cell responses to environmental antigens/allergens[J]. *J Immunol*, 2004, 173(5): 3084-3092.
- [2] Williams TJ, Jones CA, Miles EA, Warner JO, Warner JA. Fetal and neonatal IL-13 production during pregnancy and at birth and subsequent development of atopic symptoms[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2000, 105(5): 951-959.
- [3] Smillie FI, Elderfield AJ, Patel F, Cain G, Tavenier G, Brutsche M, et al. Lymphoproliferative responses in cord blood and at one year: no evidence for the effect of in utero exposure to dust mite allergens[J]. *Clin Exp Allergy*, 2001, 31(8): 1194-1204.
- [4] Devereux G, Seaton A, Barker RN. In utero priming of allergen-specific helper T cells[J]. *Clin Exp Allergy*, 2001, 31(11): 1686-1695.
- [5] Ko SK, Jin M, Pyo MY. Inonotus obliquus extracts suppress antigen-specific IgE production through the modulation of Th1/Th2 cytokines in ovalbumin-sensitized mice[J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137(3): 1077-1082.
- [6] McKenzie AN, Culpepper JA, de Waal Malefyt R, Briere F, Punnonen J, Aversa G, et al. Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(8): 3735-3739.
- [7] Roussel L, Houle F, Chan C, Yao Y, Berube J, Olivenstein R, et al. IL-17 promotes p38 MAPK-dependent endothelial activation enhancing neutrophil recruitment to sites of inflammation[J]. *J Immunol*, 2010, 184(8): 4531-4537.
- [8] Pfeffer PE, Hawrylowicz CM. Vitamin D and lung disease[J]. *Thorax*, 2012, 67(11): 1018-1020.
- [9] Bener A, Ehlayel MS, Tulic MK, Hamid Q. Vitamin D deficiency as a strong predictor of asthma in children[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2011, 157(2): 168-175.
- [10] Carroll KN, Gebretsadik T, Larkin EK, Dupont WD, Liu Z, Van Driest S, et al. Relationship of maternal vitamin D level with maternal and infant respiratory disease[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2011, 205(3): 215e1-215e7.
- [11] Morales E, Romieu I, Guerra S, Ballester F, Rebagliato M, Vioque J, et al. Maternal vitamin D status in pregnancy and risk of lower respiratory tract infections, wheezing, and asthma in offspring. *Epidemiology*[J], 2011, 23(1): 64-71.
- [12] Harvey L, Burne TH, McGrath JJ, Eyles DW. Developmental vitamin D3 deficiency induces alterations in immune organ morphology and function in adult offspring[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010, 121(1-2): 239-242.
- [13] Borges MC, Martini LA, Rogero MM. Current perspectives on vitamin D, immune system, and chronic diseases[J]. *Nutrition*, 2011, 27(4): 399-404.
- [14] Ingram JL, Kraft M. IL-13 in asthma and allergic disease: Asthma phenotypes and targeted therapies[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2012, 130(4): 829-842.
- [15] Baeke F, Korf H, Overbergh L, van Etten E, Verstuyf A, Gysemans C, et al. Human T lymphocytes are direct targets of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in the immune system[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010, 121(1-2): 221-227.
- [16] Topilski I, Flaishon L, Naveh Y, Harmelin A, Levo Y, Shachar I. The anti-inflammatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on Th2 cells in vivo are due in part to the control of integrin-mediated T lymphocyte homing[J]. *Eur J Immunol*, 2004, 34(4): 1068-1076.
- [17] Sloka S, Silva C, Wang J, Yong VW. Predominance of Th2 polarization by vitamin D through a STAT6-dependent mechanism[J]. *J Neuroinflammation*, 2011, 8(1): 56-66.
- [18] Matheu V, Back O, Mondoc E, Issazadeh-Navikas S. Dual effects of vitamin D-induced alteration of TH1/TH2 cytokine expression: enhancing IgE production and decreasing airway eosinophilia in murine allergic airway disease[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2003, 112(3): 585-592.
- [19] Zhao CQ, Li TL, He SH, Chen X, An YF, Wu WK, et al. Specific immunotherapy suppresses Th2 responses via modulating TIM1/TIM4 interaction on dendritic cells[J]. *Allergy*, 2010, 65(8): 986-995.
- [20] 栾斌, 王亚哲, 张艳丽, 谷惠茹, 李彦玲, 赵杰. 1,25-(OH)₂D₃ 对哮喘小鼠肺内 TIM4 表达的影响[J]. *中国当代儿科杂志*, 2013, 15(1): 67-70.
- [21] Bullens DM, Truyen E, Coteur L, Dilissen E, Hellings PW, Dupont LJ, et al. IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx?[J]. *Respir Res*, 2006, 7(1): 135-142.
- [22] McKinley L, Alcorn JF, Peterson A, Dupont RB, Kapadia S, Logar A, et al. TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice[J]. *J Immunol*, 2008, 181(6): 4089-4097.

(本文编辑: 周勇)