

论著·实验研究

维生素 A 调节小鼠肠黏膜淋巴细胞免疫功能的作用

杨凌云 储波 蒋丽蓉

(上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心,上海 200127)

[摘要] 目的 探讨维生素 A 对小鼠外周血及肠黏膜 T 淋巴细胞亚群发育及肠黏膜分泌细胞因子水平的影响。方法 幼鼠共 20 只,随机分为高维生素 A 组(维生素 A 250 IU/g)及对照组(维生素 A 4 IU/g),每组 10 只,干预 3 周后应用流式细胞术测定小鼠外周血及肠黏膜 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞亚群,应用 ELISA 法测定小鼠粪便中细胞因子 IFN- γ 、IL-4、IL-17 及 IL-23 水平。结果 高维生素 A 组外周血及肠黏膜 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞水平高于对照组($P < 0.05$),粪便中 IL-4 水平高于对照组($P < 0.05$),IL-23 水平低于对照组($P < 0.05$)。结论 维生素 A 对小鼠外周血及小肠 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞发育有促进作用,可能通过调节 IL-4 及 IL-23 等细胞因子参与肠黏膜相关免疫反应。 [中国当代儿科杂志,2010,12(12):976-978]

[关键词] 维生素 A; 黏膜免疫; 调节性 T 细胞; 细胞因子; 小鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)12-0976-03

Effects of vitamin A on the immune function of intestinal mucosa lymphocytes in mice

YANG Ling-Yun, CHU Bo, JIANG Li-Rong. Shanghai Children's Medical Center, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200127, China (Chu B, Email:13901730330@139.com)

Abstract: Objective To study the effects of vitamin A on the development of T lymphocytes in peripheral blood and small intestine and on the cytokine response of intestinal mucosa in mice. **Methods** Twenty young mice were randomly fed with forage containing vitamin A 250 or 4 IU/g ($n = 10$ each). Three weeks later, the levels of CD4⁺ CD25⁺ T subsets in peripheral blood and intestinal mucosa were measured by flow cytometry. The levels of cytokines IFN- γ , IL-4, IL-17 and IL-23 in stool were measured using ELISA. **Results** The levels of CD4⁺ CD25⁺ T subsets in peripheral blood and intestinal mucosa in the 250 IU/g vitamin A group were significantly higher than those in the 4 IU/g vitamin A group ($P < 0.05$). The IL-4 level in stool increased, in contrast, the IL-23 level in stool decreased significantly in the 250 IU/g vitamin A group when compared with the 4 IU/g vitamin A group ($P < 0.05$). **Conclusions** vitamin A may promote the development of CD4⁺ CD25⁺ T lymphocytes in peripheral blood and small intestine. Moreover, it may be involved in intestinal mucosa-associated immune response by regulating cytokines IL-4 and IL-23.

[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (12):976-978]

Key words: Vitamin A; Mucosa immunity; Regulatory T cell; Cytokine; Mice

维生素 A 因其可提高婴幼儿机体抗感染能力以减少感染性疾病发病率而一直受到广泛青睐。近年来更发现维生素 A 有免疫调节的作用。多方研究指出维生素 A 及其活性衍生物可通过多种方式参与肠黏膜炎症反应及免疫耐受^[1]。其中肠道免疫效应部位为弥散性肠相关淋巴组织,包括肠上皮内淋巴细胞及固有层淋巴细胞。本实验研究不同浓度维生素 A 对小鼠肠黏膜 T 淋巴细胞亚群水平及

细胞因子 IFN- γ 、IL-4、IL-17 及 IL-23 水平的影响,探讨维生素 A 对肠黏膜免疫调节的可能作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

出生 3 周断乳清洁级健康昆明小鼠 20 只,雌雄各半,由上海斯莱克动物公司提供。置于上海交通

[收稿日期]2010-03-24; [修回日期]2010-06-06
[基金项目]上海市卫生局青年科研基金资助项目(2007Y80)。
[作者简介]杨凌云,女,硕士,住院医师。
[通信作者]储波,主治医师。

大学医学院动物实验中心饲养,随机分为高维生素A组和对照组,每组10只,组间体重差异无统计学意义。高维生素A组给予基础饲料(VAD饲料,由复旦大学附属儿科医院杨毅教授馈赠)加维生素A 250 IU/g;对照组给予基础饲料加维生素A 4 IU/g,常规饲养3周。

1.2 实验方法

1.2.1 血清维生素A浓度测定 摘小鼠眼球采血,在室温下待凝固后离心(3 000 g × 5 min),取血清,采用高效液相色谱法(HPLC)测定。

1.2.2 流式细胞术检测外周血及小肠黏膜 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞亚群水平 取50 μL小鼠抗凝静脉血,加PE-抗小鼠CD3抗体,FITC-抗小鼠CD4抗体,PE-CY5-抗小鼠CD25抗体(购于美国eBioscience公司),避光室温孵育30 min,加溶血素裂解15 min,洗涤,离心弃上清用多聚甲醛固定后上流式细胞仪,检测CD4⁺ CD25⁺ T细胞亚群水平。

取小鼠近回盲部回肠组织5 cm,纵向剖开剪碎,研磨3次 × 15 s,80 rpm取细胞悬浮液,用350目过滤膜过滤后,离心弃上清,加PE-抗小鼠CD3抗体,FITC-抗小鼠CD4抗体,PE-CY5-抗小鼠CD25抗体(购于美国eBioscience公司),避光室温孵育30 min,离心弃上清用多聚甲醛固定后上流式细胞仪,检测CD4⁺ CD25⁺ T细胞亚群水平。

1.2.3 ELISA法检测粪便细胞因子水平 取小鼠近回盲部回肠内粪便大约黄豆大小,用1 mL PBS混匀,离心取上清。采用小鼠细胞因子ELISA检测试剂盒(购于美国R&D公司),按操作说明书测定IFN-γ、IL-4、IL-17及IL-23细胞因子浓度。

1.3 统计学分析

数据均用均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用SPSS 17.0软件处理,结果分析选用两独立样本的t检验,P < 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清维生素A浓度

两组小鼠血清中维生素A浓度差异有统计学意义,高维生素A组为1.21 ± 0.26 μmol/mL,高于对照组(0.75 ± 0.08 μmol/mL),差异有统计学意义(P < 0.05),提示成功建立了动物模型。

2.2 高维生素A对外周血及肠黏膜 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞亚群水平的影响

维生素A对小鼠外周血及小肠黏膜中T淋巴细胞各亚群水平影响差异有统计学意义。高维生素

A组外周血CD4⁺ CD25⁺ T淋巴细胞水平明显高于对照组(P < 0.01)。肠黏膜CD4⁺ CD25⁺ T淋巴细胞水平亦明显高于对照组(P < 0.01)。见表1。

表1 外周血及小肠黏膜 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞亚群水平 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	鼠数	血 CD4 ⁺ CD25 ⁺ T 细胞	肠黏膜 CD4 ⁺ CD25 ⁺ T 细胞
对照组	10	1.3 ± 0.7	1.7 ± 0.7
高维生素A组	10	4.0 ± 1.9	7.0 ± 3.2
t 值		4.154	5.039
P 值		0.001	0.001

2.3 高维生素A对粪便中细胞因子水平的影响

本研究发现,高维生素A组粪便中细胞因子IL-4水平显著高于对照组(P < 0.05),而IL-23水平显著低于对照组(P < 0.05),IFN-γ与IL-17水平在高维生素A组较对照组有降低的趋势,但组间差异无统计学意义(P > 0.05)。见表2。

表2 粪便中细胞因子水平 ($\bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)

组别	鼠数	IFN-γ	IL-4	IL-17	IL-23
对照组	10	37 ± 14	57 ± 16	55 ± 19	86 ± 26
高维生素A组	10	32 ± 13	84 ± 29	47 ± 17	58 ± 23
t 值		0.828	2.578	0.992	2.551
P 值		0.418	0.018	0.333	0.019

3 讨论

近年来研究发现维生素A可通过影响T淋巴细胞亚群分化的机制进行免疫调节作用。而调节性T细胞在维持肠道免疫耐受起着关键作用^[2]。研究证明,在小鼠重症联合免疫缺陷病(SCID)模型中输注调节性T细胞能够治愈并预防重度免疫缺陷病中结肠黏膜的炎性病变^[3]。本研究通过检测小鼠外周血及肠黏膜中CD4⁺ CD25⁺ T细胞水平来研究维生素A对调节性T细胞的影响,结果显示维生素A对小鼠外周血及肠黏膜中调节性T细胞水平均有显著影响,高剂量维生素A组较对照组有明显促进作用,提示维生素A在小鼠体内有促进调节性T细胞分化的作用。值得注意的是在比较维生素A对外周血与肠黏膜调节性T细胞作用时发现,调节性T细胞提高的程度在肠黏膜更明显,这提示维生素A对肠黏膜免疫调节的影响可能较外周血更大。分

析其原因,可能与维生素 A 的体内衍生物视黄酸有关。视黄酸作为 T 细胞和 B 细胞核内视黄酸受体 (RARs)/视黄素 X 受体 (RXRs) 异二聚体的配体调节机体免疫应答,促进肠黏膜中幼稚 T 细胞向调节性 T 细胞亚群分化,使 B 细胞转化为 IgA 分泌型 B 细胞^[4]。

为研究维生素 A 对肠黏膜炎症应答的影响,本研究检测了粪便中细胞因子 IFN- γ 、IL-4、IL-17 及 IL-23 水平,发现高维生素 A 组 IL-4 水平显著高于对照组,提示高维生素 A 对 IL-4 分泌有明显促进作用;IL-23 水平在高维生素 A 组显著低于对照组,这提示高维生素 A 有抑制 IL-23 的作用。国外关于人外周血单核细胞研究也表明维生素 A 可促进 IL-4、IL-5 及 IL-13 分泌增加^[6],维生素 A 促进粪便中 IL-4 水平增高可能与其促进 CD₄⁺ T 效应细胞 Th2 分泌 IL-4 增加有关。而高维生素 A 抑制 IL-23 可能与视黄酸抑制转录因子 ROR γ t 继而抑制 IL23 表达相关^[7]。

综上所述,维生素 A 作为免疫调节剂可能促进小鼠外周血及肠黏膜调节性 T 细胞发育,可能促进肠黏膜 T 细胞向 Th2 分化,并抑制 IL-23 分泌,对肠黏膜免疫耐受及炎症反应可能有调节作用。维生素 A 的多重免疫调节将为各类自身免疫性疾病尤其肠

道炎症性疾病新治疗靶点的研究提供科学依据。

[参 考 文 献]

- [1] Strober W. Vitamin A rewrites the ABCs of oral tolerance[J]. *Mucosal Immunol*, 2008, 1(2): 92-95.
- [2] Barnes MJ, Powrie F. Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis[J]. *Immunity*, 2009, 31(3): 401-411.
- [3] Mottet C, Uhlig HH, Powrie F. Cutting edge: cure of colitis by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells[J]. *J Immunol*, 2003, 170(8): 3939-3943.
- [4] Kim CH. Roles of retinoic acid in induction of immunity and immune tolerance[J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2008, 8(4): 289-294.
- [5] Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kamada N, Chinen H, Saito R, et al. IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease [J]. *Gut*, 2008, 57(12):1682-1689.
- [6] Dawson HD, Collins G, Pyle R, Key M, Weeraratna A, Deep-Dixit V, et al. Direct and indirect effects of retinoic acid on human Th2 cytokine and chemokine expression by human T lymphocytes[J]. *BMC Immunol*, 2006, 7:27.
- [7] Xiao S, Jin H, Korn T, Liu SM, Oukka M, Lim B, et al. Retinoic acid increases Foxp3⁺ regulatory T cells and inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF-beta-driven Smad3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression[J]. *J Immunol*, 2008, 181(4):2277-2284.

(本文编辑:俞 燕)

· 消息 ·

新生儿颅脑超声诊断学习班通知

为提高对围产期脑损伤及其他中枢神经系统疾病的诊断水平,充分利用已有的医疗资源,推广颅脑超声检查诊断技术,北京大学第一医院儿科按计划于2011年3月下旬举办为期5天的新生儿颅脑超声学习班。本班属国家级教育项目,授课教师为本科及北京市著名专家教授。学习结束授予10学分。主要授课内容包括:中枢神经系统解剖;新生儿不同颅脑疾病超声诊断;新生儿颅脑疾病不同影像学检查方法比较与选择;超声见习。招收学员对象:儿科新生儿专业医师,超声专业医师及技师。学费:950元。欲参加者请与我们联系:北京大学第一医院儿科(邮编100034)王红梅、周丛乐。电话:010-83573461或83573213。E-mail:bdyy2002@163.com。如果需要,我们将寄去正式通知。

北京大学第一医院儿科