

论著 · 实验研究

草分枝杆菌 F. U. 36 对哮喘小鼠调节性 T 细胞和 TLR4 表达的影响

庞英¹ 李敏¹ 张剑波² 姚斌¹

(四川省医学科学院·四川省人民医院,1. 儿科, 2. 医学中心实验室,四川 成都 610072)

[摘要] **目的** 探讨早期给予草分枝杆菌 F. U. 36 注射液干预对哮喘小鼠 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞及 TLR4 表达的影响。**方法** 将雌性 BALB/c 小鼠 30 只随机分为正常对照组、哮喘组和哮喘草分枝杆菌 F. U. 36 治疗组(哮喘/Utilin 组),每组 10 只。通过注射和雾化吸入鸡卵蛋白(OVA)制备哮喘模型。哮喘/Utilin 组第一次致敏前 2 周腹腔注射草分枝杆菌 F. U. 36 注射液 0.57 μg,隔日一次,共 3 次。于末次激发后 24 h 处死。取小鼠左肺组织作病理切片观察炎症改变;同时利用流式细胞检测技术检测各组小鼠脾单个核细胞 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞占 CD4⁺T 细胞的百分率及 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞上的 TLR4 平均荧光强度。**结果** 哮喘小鼠脾单个核细胞 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞百分率明显降低($P<0.01$),但该细胞上表达的 TLR4 平均荧光强度值较正常对照组无明显差异($P>0.05$);经草分枝杆菌 F. U. 36 早期干预的哮喘小鼠脾单个核细胞 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞百分率和该细胞上表达的 TLR4 平均荧光强度较哮喘组均明显升高($P<0.01$)。**结论** 早期应用草分枝杆菌 F. U. 36 干预性治疗,可通过促进 CD4⁺CD25⁺ 细胞上 TLR4 的表达和该细胞数目的增加以纠正哮喘小鼠机体的免疫紊乱而发挥其治疗作用。

[中国当代儿科杂志,2011,13(11):917-920]

[关键词] 哮喘; CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞; Toll 样受体 4; 草分枝杆菌 F. U. 36; 小鼠
[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)11-0917-04

Effects of Mycobacterium phlei F. U. 36 on regulatory T cells and TLR4 expression in asthmatic mice

PANG Ying, LI Min, ZHANG Jian-Bo, YAO Bin. Department of Pediatrics, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China (Li M, Email: lmscsy@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To study the effects of early intervention on CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and TLR4 expression with Mycobacterium phlei F. U. 36 in asthmatic mice. **Methods** Thirty female BALB/c mice were randomly divided into three groups: control, asthma model and Mycobacterium phlei F. U. 36 treated asthma groups. Asthma was induced by sensitization and challenges with ovalbumin (OVA) in the later two groups. Mycobacterium phlei F. U. 36 was intraperitoneally injected 2 weeks before the first sensitization (0.57 μg/time, once every other day for three times) in the intervention group. After 24 hrs of the last challenge, the mice were sacrificed and the left lung tissues were obtained for the observation of lung pathological changes. Splenic mononuclear cells were isolated. The percentage of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in CD4⁺T cells and the mean fluorescence intensity of TLR4 on CD4⁺CD25⁺ T cells were detected by flow cytometry. **Results** The percentage of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the asthma model group was significantly lower than that in the control group ($P<0.01$), but the mean fluorescence intensity of TLR4 on CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells was not significantly different from the control group. The percentage of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and the mean fluorescence intensity of TLR4 on CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells increased significantly in asthmatic mice receiving Mycobacterium phlei F. U. 36 treatment compared with the asthma group ($P<0.01$). **Conclusions** Early intervention with Mycobacterium phlei F. U. 36 can increase TLR4 expression on CD4⁺CD25⁺ cells and the number of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells, and thus provides therapeutic effects in asthmatic mice.

[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13(11):917-920]

Key words: Asthma; CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells; Toll-like receptor 4; Mycobacterium phlei F. U. 36; Mice

[收稿日期]2011-05-13;[修回日期]2011-06-21
[作者简介]庞英,女,硕士,主治医师。现工作单位:攀枝花市妇幼保健院儿科,邮编 617000。
[通信作者]李敏,主任医师。

支气管哮喘(简称哮喘)的发病机制较复杂,越来越多的研究表明,哮喘是一种伴有免疫功能紊乱的全身变态反应性疾病,哮喘患者体内 Th1/Th2 偏移可能只是一种“表面”现象,其深层的原因是机体对变应原的“免疫耐受”机制异常和(或)缺陷^[1],而调节哮喘患者的免疫功能成为治疗哮喘更为重要的发展方向。CD4⁺CD25⁺调节性T细胞在免疫耐受方面发挥着重要作用,且有研究发现,CD4⁺CD25⁺调节性T细胞自身存在多种 Toll 样受体(TLR)表达,TLR 信号可以直接影响其功能^[2]。草分枝杆菌作为免疫调节剂已广泛应用于哮喘、恶性肿瘤和糖尿病等多种疾病。然而迄今未见草分枝杆菌 F. U. 36 对 CD4⁺CD25⁺调节性T细胞及 TLR4 作用的报道。本研究通过建立哮喘小鼠动物模型,探讨 CD4⁺CD25⁺调节性T细胞及该细胞上 TLR4 的表达在哮喘发病中的变化,并观察早期应用免疫调节剂草分枝杆菌 F. U. 36 对其的影响,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

SPF 级雌性 BALB/c 小鼠 30 只,6~8 周龄,体重 24.12 ± 2.94 g,购于四川大学华西实验动物中心,采用随机数字表法分为正常对照组、哮喘组和哮喘草分枝杆菌 F. U. 36 治疗组(哮喘/Utilin 组),每组 10 只,分笼饲养,喂食不含致敏原的特殊饲料。

1.2 仪器和试剂

主要实验仪器有低速离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司);压缩雾化吸入器(台湾雅博股份有限公司);CYTOMICSFC500 流式细胞仪(美国 BACK MAN COULTER 公司)等。主要实验试剂包括鸡卵蛋白(美国 Sigma 公司);氢氧化铝(分析纯,成都天成化学试剂厂);小鼠淋巴细胞分离液(天津 TDB 生物技术发展中心);Anti-Mouse CD4 PE-Cy5、Anti-Mouse CD25 PE、Anti-Mouse CD284 (TLR4) AlexaFluor 488 及相应同型对照等,购于美国 eBioscience 公司。按说明书进行操作和配制。

1.3 动物模型制备

参照沈华浩等^[3],以及 Sakai 等^[4]提出的方法略加调整制备哮喘动物模型,即分别于实验第 0 天和第 14 天给予正常对照组 0.9% 氯化钠注射液 0.2 mL 腹腔注射,哮喘组和哮喘/Utilin 组小鼠采用腹腔注射鸡卵蛋白和氢氧化铝混合液 0.2 mL (含鸡卵蛋白 100 μ g,氢氧化铝 2 mg);第 21 天开始,正常对照组用 37℃ 0.9% 氯化钠注射液每天雾

化吸入 30 min,哮喘组和哮喘/Utilin 组以 2% 鸡卵蛋白每天雾化吸入 30 min,连续雾化 5 d 激发制备哮喘模型;哮喘/Utilin 组第 1 次致敏前 2 周腹腔注射草分枝杆菌 F. U. 36 注射液(乌体林斯)0.57 μ g,隔日 1 次,共 3 次。

1.4 分离脾单个核细胞

末次激发后 24 h 处死小鼠。取出脾脏,剪成 1~2 mm 大小的小块置于不锈钢细胞筛上研磨、过滤,采用密度梯度离心法分离制备脾组织单个核细胞悬液,调节细胞浓度为 10^6 个细胞/mL,流式细胞仪检测各组 CD4⁺CD25⁺调节性T细胞占 CD4⁺T 细胞的百分率,以及 CD4⁺CD25⁺调节性T细胞上的 TLR4 平均荧光强度。

1.5 肺组织病理切片的制备

取小鼠左肺,4% 多聚甲醛溶液固定 48 h,经脱水与透明、石蜡包埋,切成 5 μ m 厚的薄片,苏木精-伊红(HE)染色,观察肺组织形态结构及炎症情况。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 18.0 统计软件对资料进行分析,实验数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析;两变量间相关性采用直线相关分析法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 哮喘模型的建立

哮喘组小鼠激发后出现了烦躁不安、抓耳或安静少动、呼吸加快加深、点头呼吸、口唇发绀、前肢缩抬、毛发竖起、二便失禁等症状,哮喘/Utilin 组上述症状明显减轻,正常对照组可见烦躁不安,但无其他上述表现。肺组织 HE 染色显示:正常对照组气道上皮完整,气道及血管周围未见炎性细胞浸润;哮喘组气道及血管周围均可见灶状的炎性细胞浸润,部分细支气管上皮脱落不完整;哮喘/Utilin 组气道及血管周围炎症较哮喘组明显减轻。见图 1。

2.2 各组脾单个核细胞 CD4⁺CD25⁺调节性T细胞百分率及 TLR4 平均荧光强度值的变化

哮喘组小鼠脾单个核细胞 CD4⁺CD25⁺调节性T细胞百分率较正常对照组明显降低($P < 0.01$),但该细胞上表达的 TLR4 平均荧光强度值较正常对照组差异无统计学意义($P > 0.05$);哮喘/Utilin 组小鼠 CD4⁺CD25⁺调节性T细胞百分率及该细胞上表达的 TLR4 平均荧光强度较哮喘组明显升高($P < 0.01$),与正常对照组比较差异无统计学意义。见表 1。

2.3 各组脾单个核细胞 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞 TLR4 平均荧光强度值与 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞百分率相关性分析

Pearson 相关分析显示,各组小鼠脾单个核细胞

CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞上 TLR4 平均荧光强度值与 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞百分率无相关性,正常对照组、哮喘组和哮喘/Utilin 组相关系数(*r*)分别为 0.282、0.365 和 0.320,均 *P* > 0.05。

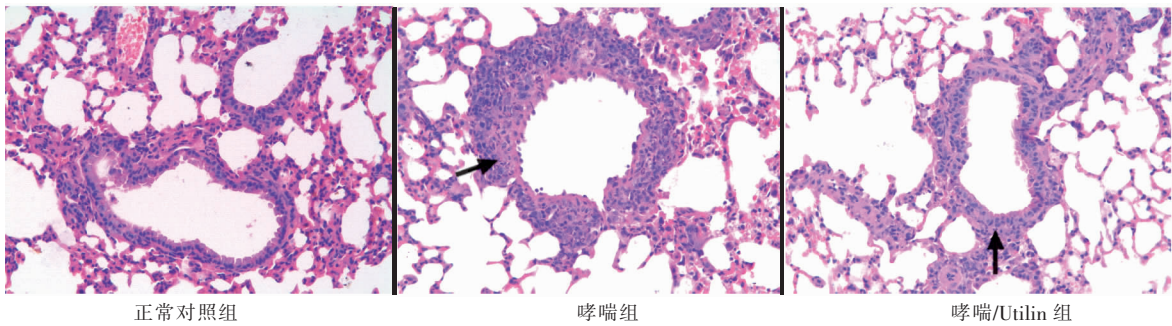


图1 肺组织病理切片(HE染色,×200) 正常对照组气道及血管周围未见炎性细胞浸润;哮喘组气道及血管周围均可见灶状的炎性细胞浸润,部分细支气管上皮脱落不完整;哮喘/Utilin组炎症较哮喘组明显减轻。箭头示气道周围的嗜酸性粒细胞。

表1 各组 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞百分率及该细胞上的 TLR4 平均荧光强度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CD4 ⁺ CD25 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	TLR4
正常对照组	10	4.98 ± 0.36	1.81 ± 0.22
哮喘组	10	3.11 ± 0.49 ^a	1.73 ± 0.18
哮喘/Utilin组	10	5.10 ± 0.25 ^b	2.13 ± 0.12 ^b
<i>F</i> 值		86.076	14.870
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01

a:与正常对照组比较,*P* < 0.01; b:与哮喘组比较,*P* < 0.01

3 讨论

哮喘是由多种炎症细胞,特别是肥大细胞、嗜酸性粒细胞和 T 淋巴细胞等共同参与的气道慢性炎症性疾病。研究发现,CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞通过细胞-细胞接触,分泌产生 IL-10、转化生长因子 β1(TGF-β1)及细胞毒性 T 细胞相关抗原-4(CTLA-4)等细胞因子、共刺激分子;局部与靶细胞竞争生长因子机制来控制和抑制其他细胞功能,进而抑制 Th1 和 Th2 细胞的分化和功能,是维持外周免疫耐受和预防自身免疫性疾病中的关键细胞^[5-6]。本研究中哮喘小鼠脾单个核细胞 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞百分率较正常对照组明显降低,与本课题组前期报道一致^[7]。进一步证实了哮喘小鼠确实存在 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞数量不足,可能减弱了对 Th2 细胞的接触性抑制作用,使 Th2 型免疫反应增强,导致机体全身和局部免疫紊乱,造成哮喘过敏性气道炎症的发生。

“卫生假说”认为,儿童早期感染和接触同胞的

机会减少,使儿童在出生后的 Th1 应答受到了抑制,而仍然呈现 Th2 应答占优势的现象是过敏性疾病发病率升高的原因^[8]。研究发现,TLR 与哮喘和过敏性疾病的关系十分密切^[9]。TLR4 作为一种模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs),通过病原体相关的分子模式(pathogen associated molecule patterns, PAMPs)参与诱导炎症因子和细胞因子产生,从而诱导树突状细胞(DC)成熟、促进 T 细胞分化和调节肥大细胞反应,在哮喘免疫和宿主保护中起重要作用^[10]。Caramalho 等^[2]发现调节性 T 细胞有 TLR4、5、7、8 表达,用 LPS 体外刺激 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞上的 TLR4,可直接诱导 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞存活和增殖反应。本研究中哮喘小鼠 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞上的 TLR4 平均荧光强度较正常对照小鼠没有明显变化,这可能是由于 TLR4 是脂多糖的主要受体,而鸡卵蛋白不是 TLR4 的配体,因此由它诱导的哮喘,虽然小鼠脾单个核细胞上 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞数目有所变化,但不能激发相应的 TLR4 的表达。提示 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞上的 TLR4 表达对鸡卵蛋白诱导哮喘的发病没有作用。

越来越多的证据表明,分枝杆菌感染可降低变应性疾病的发生。Shirakawa 等^[11]在一项流行病学调查中发现,结核分支杆菌引起的迟发型超敏反应与特异性体质呈显著的负相关,且大多数动物实验也支持分枝杆菌感染可降低变应性疾病的发生。近年来研究发现,分枝杆菌的接种或感染还可诱导 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的增殖和活化^[12-13]。草分枝杆菌 F. U. 36 主要成分是灭活的草分枝杆菌,与

结核杆菌一样同属分枝杆菌类,机体对其启动的免疫应答过程类似于结核杆菌感染的免疫反应,主要通过影响免疫应答反应而调节细胞及体液免疫功能,对哮喘有预防和治疗作用。本研究发现在鸡卵蛋白致敏前2周预先给予草分枝杆菌 F. U. 36 腹腔注射后,气道中鸡卵蛋白引起炎症反应较哮喘小鼠明显减轻,哮喘/Utilin 组小鼠脾脏 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的百分率明显增高,提示草分枝杆菌 F. U. 36 调节免疫、预防哮喘的作用可能与增加 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的数量、增强其免疫抑制功能有关。草分枝杆菌 F. U. 36 的菌体成分复杂,多种菌体成分,如肽聚糖(PGN)、脂多糖和包含非甲基化的 CpG 基序等均属于病原体相关分子模式,可被 TLR 等模式识别受体,并启动和诱导 T 细胞分化。本研究同时还发现,早期预防性注射草分枝杆菌 F. U. 36 的哮喘小鼠,其 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞上的 TLR4 平均荧光强度明显增高。提示草分枝杆菌 F. U. 36 能促进 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的 TLR4 表达,其机制可能与其菌体成分中含有的脂多糖是 TLR4 的主要配体,从而诱导了 TLR4 表达有关。本研究中哮喘/Utilin 组小鼠 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞上的 TLR4 表达与 CD4⁺CD25⁺ T 细胞的百分率无相关性,原因可能是草分枝杆菌 F. U. 36 对 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞增殖的调节,是多种菌体成分与体内多种免疫细胞共同参与的结果,而通过促进 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞上 TLR4 的表达来增加 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的数量可能只是其促进 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞数量增加的其中一个部分。

总之,CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞数目的减少,可能减弱对 Th2 细胞的接触性抑制作用,使 Th2 型免疫反应增强,造成哮喘过敏性气道炎症的发生,这可能是哮喘发病的机制之一。而 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞上的 TLR4 对鸡卵蛋白诱发哮喘小鼠的发病没有作用。草分枝杆菌作为一种免疫调节剂,可

能是通过促进 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞数量的增加及该细胞上 TLR4 的表达,激活和纠正了机体的免疫功能,从而减轻了气道的炎症,实现其治疗作用。因此,进一步研究草分枝杆菌 F. U. 36 对 TLR 与 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞在哮喘发病中的作用机制,将有助于阐明哮喘更深入的免疫发病机制。

[参 考 文 献]

[1] Tournoy KG, Provoost S, Van Hove C, Joos G. The role of immune tolerance in asthma pathogenesis[J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2006, 6(5): 437-443.

[2] Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, Zelenay S, Haury M, Demengeot J. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide[J]. J Exp Med, 2003, 197(4): 403-411.

[3] 沈华浩,王莘莉. 支气管哮喘小鼠模型应用评价[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2005, 28(4): 284-286.

[4] Sakai K, Yokoyama A, Kohno N, Hiwada K. Effect of different sensitizing doses of antigen in a murine model of atopic asthma[J]. Clin Exp Immune, 1999, 118(1): 9-15.

[5] van Oosterhout AJ, Bloksma N. Regulatory T-lymphocytes in asthma[J]. Eur Respir J, 2005, 26(5): 918-932.

[6] 王娜,孔宪明,曹兰芳. CD4⁺CD25⁺T 调节细胞及 Foxp3 在哮喘中的研究进展[J]. 实用儿科临床杂志, 2006, 21(16): 1103-1105.

[7] 李敏,宋丽,张建波,房俊,李兰. 糖皮质激素对哮喘小鼠 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的作用[J]. 中国当代儿科杂志, 2008, 10(4): 527-530.

[8] Holgate ST. The epidemic of allergy and asthma[J]. Nature, 1999, 402(6760 Suppl): B2-B4.

[9] Zhou LF, Yin KS. Toll-like receptors: function and roles in asthma[J]. Chin Med J (Engl), 2004, 117(11): 1709-1715.

[10] 苏苗赏,李昌崇. Toll 样受体与支气管哮喘免疫调控[J]. 国外医学儿科学分册, 2005, 32(2): 92-94.

[11] Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, Hopkin JM. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder[J]. Science, 1997, 275(5296): 77-79.

[12] Guyot-Revol V, Innes JA, Hackforth S, Hinks T, Lalvani A. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis[J]. Am J Respir Care Med, 2006, 173(7): 803-810.

[13] Hanekom WA. The immune response to BCG vaccination of newborns[J]. Ann N Y Acad Sci, 2005, 1062: 69-78.

(本文编辑:徐福兰)