

· 论著 ·

· 基础实验 ·

CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ 调节性 T 细胞在哮喘小鼠发病中的作用*

杨慧慧 张衡 苏虹

【摘要】 目的 探讨CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺调节性T细胞(CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg)百分比的改变在哮喘小鼠发病中的作用。方法 将雌性SPF级Balb/c小鼠20只随机分为哮喘模型组、正常对照组,哮喘模型组以鸡卵白蛋白(OVA)致敏,建立模型;正常对照组以生理盐水代替OVA。分别检测小鼠外周血(PB)与肺泡灌洗液(BALF)中嗜酸性粒细胞的数量及脾脏中CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺Treg的比例。结果 哮喘组与对照组小鼠脾脏中CD4⁺CD25⁺/CD4⁺(%)、CD4⁺FOXP3⁺/CD4⁺(%)、CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺/CD4⁺(%)分别为2.50±0.12与16.64±2.11、3.92±1.23与27.72±0.15、1.34±0.25与15.60±0.62,差异均有统计学意义(P<0.05)。哮喘小鼠脾脏CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺Treg占比较正常对照组明显减少。结论 研究提示CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺Treg参与哮喘发病。

【关键词】 哮喘 调节性T细胞 FOXP3

【中图分类号】 R562.2⁺ R392.11 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-2587(2017)04-0317-04

CD4+CD25+FOXP3+ Regulatory T cells in Asthmatic Mice YANG Hui-hui, ZHANG Hen, SU Hong. Department of Epidemiology and Health Statistics, School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032

【Abstract】 Objective To observe the change of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells (Tregs) in mouse model of asthma. **Methods** A total of 20 Balb/c female SPF-class mice were randomly divided into normal control group (n=10) and asthma model group (n=10). The asthma model group was sensitized with 2% ovalbumin (OVA) by a combination of intraperitoneal injection to induce asthma. Mice of normal control group received normal saline instead of OVA in equal volume. The counts of eosinophils in peripheral blood (PB) and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were detected. The number of Tregs in mouse spleens was analyzed. **Results** The numbers of CD4+CD25+/CD4+ (%), CD4+FOXP3+/CD4+ (%), and CD4+CD25+FOXP3+/CD4+ (%) in mouse spleens in asthma and normal control groups were 2.50±0.12 vs. 16.64±2.11, 3.92±1.23 vs. 27.72±0.15, and 1.34±0.25 vs. 15.60±0.62, respectively, showing significant differences (P<0.05). **Conclusion** The proportion of CD4+CD25+FOXP3+ cells in asthma mice was decreased compared to controls, suggesting that Tregs may be involved in asthma pathogenesis.

【Key words】 Asthma Regulatory T Cell FOXP3

支气管哮喘是由免疫功能紊乱引起的一种慢性疾病,其发病机制复杂^[1]。先前研究主要认为Th2占优势的Th1/Th2失衡是哮喘发病的一个重要机制,并且成为治疗和预防哮喘的关注热点^[2],但这一理论并不能完全解释哮喘的发病。

近年来发现的调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)对哮喘发病机制进行了完善和补充,其可能通过抑制Th2型反应及嗜酸粒细胞增多而发挥效应^[3]。Treg作为一类具有负免疫调节作用的T细胞亚群,细胞表面标志物CD4⁺CD25⁺为主要细胞群^[4]。CD4⁺CD25⁺T细胞是一种天然Treg,具有免疫无反应性和免疫抑制性。但是,有研究提示CD4⁺CD25⁺T并非一定在哮喘鼠中发挥免疫抑制效应^[5]。有研究发现,来源于脊椎动物叉状头转录因子家族(forkhead box, FOX)的FOXP3,其缺陷的Scurfy小鼠不能产生有功能的Treg细胞,提示FOXP3是Tregs发育所必需的^[6]。FOXP3被认为是Treg细胞中最具特异性的表面标志分子,对Treg细胞的分化及功能发挥起到决定性作用^[7-9]。本研

DOI: 10.3969/j.issn.1671-2587.2017.04.002

*本课题受安徽省自然科学基金(No.1408085MH159)资助

作者单位:230032 合肥,安徽医科大学公共卫生学院流行病学与卫生统计学系

作者简介:杨慧慧(1989-),女,安徽淮南人,硕士,主要从事慢性病分子流行病学研究,(Tel)15256926304 (E-mail)yhh20130528@163.cm。

通信作者:苏虹,女,教授,(E-mail)suhong5151@sina.com。

究应用鸡卵白蛋白(OVA)诱导建立小鼠哮喘模型的方法,旨在探讨CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺Treg细胞在哮喘发病机制中的作用。

材料与方法

1 材料 鸡卵白蛋白(OVA, GradeV, Sigma), 氢氧化铝干粉(北京化工厂), 0.9%生理盐水(南通凯恒生物科技发展有限公司), 小鼠CD4⁺CD25⁺Treg细胞分选试剂盒、CD4⁻APC、CD25⁻PE、FOXP3⁻FITC单克隆抗体及同型对照、破膜剂、固定剂购自BioLegend公司、RPMI1640培养液(北京达科为生物技术有限公司), 超声波雾化器WH 2000型(广东粤华医疗器械有限公司), 流式细胞仪(森西科技有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组与模型制备

2.1.1 动物分组: 20只SPF级雌性Balb/c小鼠6~8周, 平均体重20g, 由安徽医科大学实验动物中心提供, 在SPF级实验室(安徽省立医院动物实验中心)普通饲料喂养。将20只小鼠随机分为2组, 每组各10只。

2.1.2 配制OVA混悬液和雾化液: 称取500 μg OVA和0.5g Al(OH)₃粉末, 溶于5ml生理盐水, 配制OVA混悬液(pH: 7.4); 另称取0.8g OVA粉末, 溶于40ml生理盐水, 配成2% OVA生理盐水溶液。

2.1.3 建模过程

2.1.3.1 Balb/c小鼠哮喘组: 参照文献^[10, 11], 将Balb/c鼠在第0(实验开始当天)、7、14天分别进行腹腔内注射OVA混悬液0.2ml, 此为抗原致敏阶段; 在第15~20天, 将小鼠放入雾化吸入箱, 通过超声波雾化器雾化吸入2% OVA生理盐水溶液(1次/d, 每次20min, 共6d), 此为雾化激发阶段(雾化动力为5L/min的压缩空气)。

2.1.3.2 Balb/c小鼠对照组: 在相应的时间, 以生理盐水代替OVA混悬液及2%OVA生理盐水溶液, 按照同样方法分别进行腹腔注射及雾化吸入。

2.2 外周血(PB)、支气管肺泡灌洗液(BALF)中嗜酸性粒细胞(EOS)计数

2.2.1 Balb/c鼠眼球放血1ml, 取20 μl抗凝血加入1ml白细胞计数液混匀, 显微镜下计数白细胞; 余下的以4℃、2000 r/min, 离心10min, 沉淀

物涂片备瑞氏-吉姆萨染色行嗜酸细胞(EOS)计数, 所有细胞计数均由一名研究者完成, 采用单盲法。

2.2.2 于主支气管下段约1cm进行右肺肺泡灌洗后 收集液体, 4℃、1500 r/min离心10min。将重悬液于血细胞计数板, 计算细胞总数; 取余下重悬液直接涂片, 瑞氏-吉姆萨染色行EOS计数。

2.3 肺组织病理切片: 采集肺组织标本用10%甲醛固定、切片、HE染色, 显微镜下观察组织病理变化。

2.4 小鼠脾脏中Treg细胞百分比的检测

2.4.1 采用颈椎脱臼法处死小鼠, 无菌条件下取出脾脏, 用200目筛网研磨, 用RPMI1640培养液过滤收集细胞悬液。取1ml细胞悬液, 加于2ml淋巴细胞分离液, 离心。收集第二层细胞, 即环状乳白色层, 以PBS洗涤2次, 每次均以1600 r/min, 离心10min, 取沉淀物进行细胞计数。

2.4.2 取1.0×10⁶个/ml分离的小鼠脾脏淋巴细胞 置于试管中; 每管加入20 μl CD4 APC/CD25 PE混合液, 震荡混匀, 室温避光孵育20min; 加入细胞染色液1ml, 250g、5min离心, 弃上清; 在染色前准备好浓度为(1×)的FOXP3 Fix/Perm buffer和FOXP3 Perm buffer工作液; 每个试管中加入1ml(1×)FOXP3 Fix/Perm, 震荡混匀, 室温下避光孵育20min, 静置, 弃上清液; 加入细胞染色缓冲液1ml, 250g、5min离心, 弃上清液; 加入1ml FOXP3 Perm buffer洗涤细胞; 在残余液体中重悬细胞, 加入1ml FOXP3 Perm buffer, 室温避光孵育15min, 静置, 弃上清; 加入100 μl 1×FOXP3 Perm buffer, 加入5 μl Alexa Fluor®488 anti-mouse FOXP3抗体或5 μl Alexa Fluor®488 anti-mouse IgG1, K同型对照置试管中, 室温避光孵育30min; 用细胞染色液洗涤2次, 并将细胞重悬置0.5ml细胞染色缓冲液中, 置FACS检测管, 上机检测CD4、CD25和FOXP3的表达情况。

3 统计学处理 应用SPSS17.0软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用t检验, P<0.05表示差异有统计学意义。采用Flow-jo 7.6软件对流式细胞检测数据进行分析。

结果

1 各组小鼠行为学改变 哮喘组小鼠出现明显的

烦躁不安，呼吸急促，腹肌抽搐，毛发竖起，大小便失禁；而生理盐水对照组小鼠无明显异常表现。

2 PB、BALF中EOS% 哮喘组PB、BALF中细胞

总数和中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞百分率均高于对照组（见表1）。

3 小鼠肺组织病理改变 与对照组比较，哮喘组肺组织结构遭到破坏，肺泡壁变粗，且可见大量

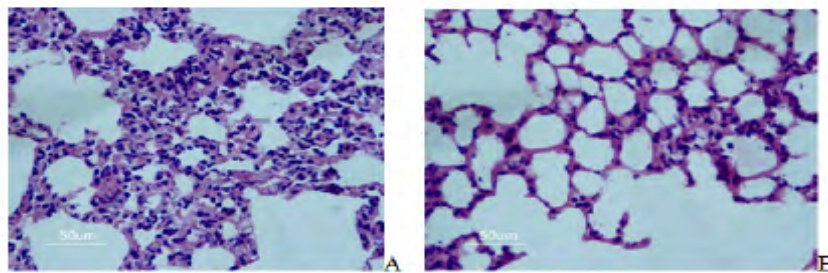
表1 PB与BALF 中细胞总数和分类细胞的比较

细胞分类	PB		t值	BALF		t值
	哮喘组	对照组		哮喘组	对照组	
白细胞总数 (×10 ⁹ /L)	3.47±0.75	2.44±0.20	11.64*	7.00±0.75	2.63±0.55	11.54*
中性粒细胞 (%)	36.44±2.36	3.47±0.22	34.08*	21.27±2.67	3.17±0.55	18.98*
嗜酸性粒细胞 (%)	34.91±2.86	0.11±0.07	29.79*	49.95±2.07	0.11±0.04	59.05*
淋巴细胞 (%)	28.65±1.99	8.28±1.06	22.16*	18.01±0.90	4.39±0.76	28.25*

*P<0.05

炎性细胞（中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和淋巴细胞）浸润；对照组肺组织结构完整清晰，周围无

炎性细胞浸润，肺泡壁结构完整，无明显的炎症改变（见图1）。

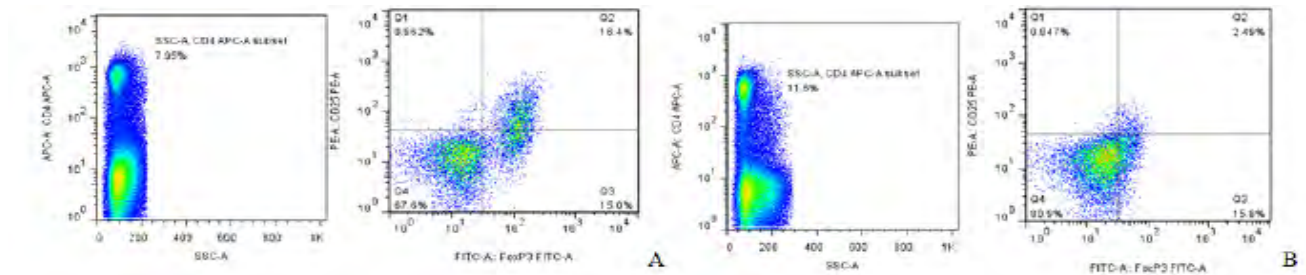


注：A：哮喘组，B：正常对照组

图1 小鼠肺组织病理学改变HE染色（400×）

4 小鼠脾脏中Treg细胞百分比的检测 哮喘组CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺/CD4⁺为2.49%，对照组CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺/CD4⁺为16.40%，两组小鼠脾脏中Treg细胞的百分比检测结果见图2。哮喘模型

组小鼠脾脏中CD4⁺CD25⁺/CD4⁺、CD4⁺FOXP3⁺/CD4⁺、CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺/CD4⁺均较正常对照组减少，差异有统计学意义（P<0.05），见表2。



注：A为对照组，B为哮喘组

图2 两组小鼠脾脏组织Treg细胞的流式检测结果

表2 两组小鼠脾脏中Treg细胞的比较

占CD4 ⁺ 比例	哮喘组 (%)	对照组 (%)	t值	P值
CD4 ⁺ CD25 ⁺	2.57±0.14	16.67±1.02	- 33.48	<0.05
CD4 ⁺ FOXP3 ⁺	4.00±0.25	27.68±0.39	- 125.10	<0.05
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺	1.37±0.07	15.52±0.68	- 55.13	<0.05

讨 论

支气管哮喘是多种细胞（包括炎性细胞、呼吸道结构细胞）和细胞组参与的、一种以呼吸道高反应性和慢性过敏性炎症为主要特征的变态反应性疾病^[1]。本研究发现，哮喘小鼠脾脏中CD4⁺CD25⁺、CD4⁺FOXP3⁺、CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺占CD4⁺细胞比例均明显下降，表明哮喘小鼠CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺Treg细胞占比降低在哮喘气道炎症的发生发展过程中发挥重要作用。

调节性T细胞最初表达为CD4⁺CD25⁺T细胞，维持体内平衡和自我免疫的耐受性^[12]。已有研究发现，CD4⁺CD25⁺T细胞不一定提示免疫抑制作用，敲除小鼠FOXP3基因后的CD4⁺CD25⁺T细胞并没有免疫活性，仅是细胞激活的标志^[6]。

FOXP3特异性表达于CD4⁺CD25⁺Treg细胞表面，与人类和鼠科动物的T细胞群的抑制功能密切相关，反映CD4⁺CD25⁺Treg细胞的水平和功能^[13, 14]。CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺Treg具有的免疫耐受功能，可以通过细胞间接触和分泌细胞因子介导免疫抑制，抑制其他活化T细胞对抗原发生活化增殖反应，也可以通过接触抑制和分泌IL-10、转化生长因子-β（TGF-β）等抑制性细胞因子及调节树突状细胞（DC）功能来维持机体的免疫耐受^[15, 16]，本研究所获结果提示CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺Treg在哮喘发病中发挥关键作用。

参 考 文 献

- 1 Kay AB. Allergy and allergic diseases. First of two parts[J]. *N Engl J Med*, 2001, 344 (1): 30-37.
- 2 Dechene L. TH1/TH2 immune response[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2002, 110 (3): 539-540.
- 3 方雪晖, 苏虹. CD4+CD25+调节性T细胞的研究进展[J]. *临床输血与检验*, 2007, 9 (4): 378-381.
- 4 Durrant DM, Metzger DW. Emerging roles of T helper subsets in the pathogenesis of asthma[J]. *Immunol Invest*, 2010, 39 (4-5): 526-549.
- 5 Borges MC, Narayanan V, Iozzo RV, et al. Deficiency of decorin induces expression of Foxp3 in CD4+CD25+T cells in a murine model of allergic asthma[J]. *Respirology*, 2015, 20 (6): 904-911.
- 6 Kasprowiec DJ, Smallwood PS, Tyznik AJ, et

al. Scurfin (Foxp3) controls T-dependent immune responses in vivo through regulation of CD4⁺T cell effector function[J]. *J Immunol*, 2003, 171 (3): 1216-1223.

- 7 Lambrecht BN, Hammad H. Asthma: the importance of dysregulated barrier immunity[J]. *Eur J Immunol*, 2013, 43 (12): 3125-3137.
- 8 Lu CH, Wu CJ, Chan CC, et al. DNA Methyltransferase inhibitor promotes human CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T lymphocyte induction under suboptimal TCR stimulation[J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 488.
- 9 Pyzik M, Piccirillo CA. TGF-β1 modulates Foxp3 expression and regulatory activity in distinct CD4+T cell subsets[J]. *J Leukoc Biol*, 2007, 82 (2): 335-346.
- 10 Palomares O, Ruckert B, Jartti T, et al. Induction and maintenance of allergen-specific FOXP3+ Treg cells in human tonsils as potential first-line organs of oral tolerance[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2012, 129 (2): 510-520, 520 e1-9.
- 11 周敏, 郭雪君, 杨敏. 支气管哮喘 BALB/c小鼠肺组织及肺 T细胞中 Notch1的表达[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2007, 27 (2): 161-164.
- 12 Yang S, Fujikado N, Kolodin D, et al. Immune tolerance. Regulatory T cells generated early in life play a distinct role in maintaining self-tolerance[J]. *Science*, 2015, 348 (6234): 589-594.
- 13 Wang LL, Tang HP, Shi GC, et al. CD39/CD73 and the imbalance of Th17 cells and regulatory T cells in allergic asthma[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 8 (5): 1432-1438.
- 14 Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, et al. Regulatory T cells and immune tolerance[J]. *Cell*, 2008, 133 (5): 775-787.
- 15 Provoost S, Maes T, van Durme YM, et al. Decreased FOXP3 protein expression in patients with asthma[J]. *Allergy*, 2009, 64 (10): 1539-1546.
- 16 Yagi H, Nomura T, Nakamura K, et al. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells[J]. *Int Immunol*, 2004, 16 (11): 1643-1656.

(收稿日期: 2017-03-19)

(本文编辑: 王虹)