

· 论 著 ·

不同时间变应原暴露对大鼠哮喘模型的影响

胡 艳¹, 安 芸¹, 黄 鹤², 郝洪军³, 宿 利¹, 王月丹², 刘新民⁴, 李海潮^{1Δ}

(1. 北京大学第一医院呼吸内科, 北京 100034; 2. 北京大学医学部免疫教研室; 3. 北京大学第一医院神经免疫室; 4. 北京大学第一医院老年科)

[摘 要] **目的:** 研究幼年大鼠不同时间接触卵蛋白 (ovalbumin, OVA) 对成年后气道哮喘炎症的影响及机制。**方法:** 新生 SD (Sprague Dawley) 大鼠随机分为哮喘组, 出生后第 3 天、第 7 天、第 14 天变应原接触组, 以及正常对照组。各变应原接触组分别于出生后第 3 天、第 7 天和第 14 天给予皮下注射 OVA 1 mg (含氢氧化铝凝胶 5 mg)。大鼠饲养至 6 周龄后, 除正常对照组外其他各组均经 OVA 致敏并激发为哮喘模型。观察大鼠肺组织病理改变, 计数每个细支气管上皮中黏液细胞数量。检测脾及胸腺中 CD4⁺CD25⁺T 细胞比例和叉头框 P3 (forkhead box P3, Foxp3) 转录因子 mRNA 表达水平。**结果:** 出生后第 3 天组 (2.29 ± 0.49)、出生后第 7 天组 (1.25 ± 0.46) 与哮喘组相比 (3.50 ± 0.76) 黏液细胞数量减少 ($P < 0.01$), 气道炎症明显减轻; 而出生后第 14 天组黏液细胞数未见减少 [(3.00 ± 1.16) vs (3.50 ± 0.76), $P > 0.05$]。出生后第 3 天组、第 7 天组脾中 CD4⁺CD25⁺T 细胞比例 [(13.68 ± 3.54)% vs (7.33 ± 3.39)%, $P < 0.01$; (16.65 ± 4.91)% vs (7.33 ± 3.39)%, $P < 0.01$] 和 Foxp3 mRNA 水平 [(18.46 ± 5.01) vs (5.49 ± 1.99), $P < 0.01$; (26.37 ± 4.68) vs (5.49 ± 1.99), $P < 0.01$] 与正常组比较均明显升高, 且出生后第 7 天组胸腺中 Foxp3 mRNA 表达亦增高 [(18.73 ± 3.66) vs (11.13 ± 1.75), $P < 0.01$]; 但出生后第 14 天组脾 CD4⁺CD25⁺T 细胞比例及 Foxp3 mRNA 表达与正常组比较差异均无统计学意义 [(11.04 ± 2.88)% vs (7.33 ± 3.39)%, $P > 0.05$; (8.71 ± 2.19) vs (5.49 ± 1.99), $P > 0.05$]。**结论:** 早期接触变应原对大鼠哮喘气道炎症的抑制作用存在“时间窗”现象, 其发生机制可能与诱导产生调节性 T 细胞有关。

[关键词] 哮喘; 免疫耐受; T 淋巴细胞; 卵蛋白类; 大鼠**[中图分类号]** R562.25 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2008)03-0306-04

Effect of exposure to allergen through different duration on a rat asthmatic model

HU Yan¹, AN Yun¹, HUANG He², HAO Hong-jun³, SU Li¹, WANG Yue-dan², LIU Xin-min⁴, LI Hai-chao^{1Δ}

(1. Department of Respiratory Medicine, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China; 2. Teaching Research Institute of Immunology, Health Science Center of Peking University; 3. Institute of Neuroimmunology, Peking University First Hospital; 4. Department of Geriatrics, Peking University First Hospital)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of exposure to allergen (ovalbumin, OVA) at different times in infancy on the asthmatic airway inflammation of adult rats, and its possible mechanisms. **Methods:** Newborn rats were classified as asthma model group, day 3, day 7, day 14 after birth allergen exposure groups and control group, and were injected with OVA 1 mg (containing aluminum hydroxide gel 5 mg) subcutaneously on days 3, 7 and 14 after birth respectively. When all rats were kept till six weeks old, all groups but the control group were immunized and provoked via OVA to make asthma model. The pathologic changes of lung tissue and the hyperplasia of mucous cells per bronchiole were observed. The percentage of CD4⁺CD25⁺T cells and forkhead box P3 (Foxp3) transcription factor mRNA in the splenocytes and thymocytes were also measured. **Results:** The airway inflammation alleviated significantly and number of mucous cells per bronchiole decreased significantly in day 3 group [(2.29 ± 0.49) vs (3.50 ± 0.76), $P < 0.01$] and day 7 group [(1.25 ± 0.46) vs (3.50 ± 0.76), $P < 0.01$] compared with asthma group. However, the hyperplasia of mucous cells did not alleviate significantly in day 14 group [(3.00 ± 1.16) vs (3.50 ± 0.76), $P > 0.05$]. The CD4⁺CD25⁺T cells and Foxp3 mRNA in the splenocytes increased in day 3 group [(13.68 ± 3.54)% vs (7.33 ± 3.39)%, $P < 0.01$; (18.46 ± 5.01) vs (5.49 ± 1.99), $P < 0.01$] and day 7 group [(16.65 ± 4.91)% vs (7.33 ± 3.39)%, $P < 0.01$; (26.37 ± 4.68) vs (5.49 ± 1.99), $P < 0.01$] compared with control group, so did Foxp3 mRNA in thymus in day 7 group [(18.73 ± 3.66) vs (11.13 ± 1.75), $P < 0.01$]. But neither the CD4⁺CD25⁺T cells [(11.04 ± 2.88)% vs (7.33 ± 3.39)%, $P > 0.05$] nor Foxp3 mRNA expression [(8.71 ± 2.19) vs (5.49 ± 1.99), $P > 0.05$] had a statistically significant increase in day 14 group. **Conclusion:** There exists a “time-window” for inhibiting airway inflammation by early exposure to allergen in the rat asthma model. The possible mechanism could be associated with induced generation of regulatory T cells.

KEY WORDS Asthma; Immune tolerance; Regulatory T cells; Egg proteins; Rats

近20年来哮喘发病率在全球范围呈上升趋势^[1],且在卫生条件较好的西方发达国家更为显著^[2]。因此有学者认为哮喘发病率增高与儿童期感染和与变应原接触的机会减少有关,即“卫生假说”。北京大学第一医院呼吸科实验室骆文玲等^[3]研究发现新生第1天大鼠接触变应原(卵蛋白)可抑制其成年后哮喘炎症的发生,推测变应原的早期暴露可能诱导机体产生免疫耐受。本实验通过使出生后不同日龄的大鼠接触变应原,研究变应原暴露的时间对大鼠哮喘模型的影响,并探讨调节性T细胞的变化规律,以揭示该现象形成的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物及分组 SD(Sprague Dawley)孕鼠4只,由北京大学第一医院动物实验中心提供,观察并记录孕鼠的分娩日期。为消除遗传背景的影响,将所产乳鼠30只,随机分为5组:即哮喘组(A组)、出生后第3天变应原接触组(B组)、第7天变应原接触(C组)、第14天变应原接触组(D组)、正常对照组(E组),每组6只。

1.1.2 试剂 卵蛋白(ovalbumin, OVA)购自Sigma公司,氢氧化铝凝胶购自Sigma公司,百日咳杆菌菌苗购自北京生物制品研究所,过碘酸-席夫(periodic acid-Schiff, PAS)试剂、异硫氰酸(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的抗大鼠CD4及R-藻红蛋白(R-phycoerthrin, R-PE)标记的抗大鼠CD25双标抗体、FITC标记的抗小鼠IgG1及R-PE标记的抗小鼠IgG1双标抗体购自Serotec公司,红细胞裂解缓冲液购自eBioscience公司,Trizol裂解液购自Invitrogen公司,莫洛尼氏鼠白血病病毒(moloney murine leukemia virus, M-MLV)逆转录酶购自Promega公司,引物为北京赛百盛公司合成。

1.1.3 主要仪器 FACSCalibur 流式细胞仪购自美国BD公司,7300 Real time PCR 分析仪购自美国ABI公司。

1.2 方法

1.2.1 模型制备 B, C, D组大鼠分别在出生后第3天、第7天、第14天于腹股沟区给予皮下注射OVA 1 mg(含氢氧化铝凝胶5 mg)。饲养至6周龄时,于腹股沟区分别给予A, B, C和D组皮下注射OVA 10 mg及氢氧化铝凝胶50 mg,同时腹腔注射百日咳杆菌菌苗 5×10^9 个致敏;E组给予皮下注射磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)

1 mL,腹腔内注射PBS 1 mL。致敏2周后将A, B, C, D组大鼠置于不完全封闭容器中(30 cm × 40 cm × 50 cm),用20 g/L OVA雾化吸入,20 min/次,连续7 d。E组给予PBS雾化吸入。

1.2.2 标本采集 最后一次雾化吸入后24 h内采集标本。分离肺叶,以10%(体积分数)中性甲醛固定。分离胸腺和脾,各取一半,分割为约50 mg组织,用液氮冻存,另一半制备细胞悬液。

1.2.3 肺组织标本经HE染色和PAS染色 从肺门至肺边缘处横切,取2~3 mm肺标本,进行石蜡包埋和切片。分别用HE染色和PAS染色。由2名病理科医生采用盲法阅片。

1.2.4 黏液细胞计数 普通光学显微镜400倍光镜下,选取5个直径100~200 mm的细支气管计数黏液细胞数量。计算每个细支气管上皮中黏液细胞的平均数。

1.2.5 CD4⁺CD25⁺T细胞检测 将脾和胸腺在200目尼龙网上研磨成细胞悬液,向脾细胞中加入红细胞裂解缓冲液4 mL,避光10 min,250 × g离心5 min。弃去上清,用PBS洗2次。按试剂使用说明,在100 mL(10^6 个)细胞悬液中加入FITC标记的抗大鼠CD4及R-PE标记的抗大鼠CD25双标抗体10 mL,在同型对照管加入FITC抗小鼠IgG1及R-PE抗小鼠IgG1双标抗体10 mL。室温避光孵育30 min,用PBS洗2次。用流式细胞仪检测,通过散射光信号确定淋巴细胞群,分析CD4⁺CD25⁺T细胞占CD4⁺T细胞比例。

1.2.6 Real time PCR检测Foxp3 mRNA表达水平

(1)总RNA提取及逆转录:按Trizol使用说明书提取脾及胸腺总RNA。用M-MLV逆转录酶法合成cDNA,在-20℃保存。(2)引物、探针的设计与合成:Foxp3-F 5'-CGGCCCTTTTCACCTAT-3', Foxp3-R 5'-GAACATGCGTGTGAACCAATG-3', Foxp3-TaqMan 5'-FAM-CCACCCTCATCCGATGGGCCA-3'-TAMRA; β -actin-F 5'-CCCTGGCTCCTAGCACCAT-3', β -actin-R 5'-AGAGCCACCAATCCACACAGA-3', β -actin-Taq-Man 5'-FAM-AAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGCAAGTA-3'-TAMRA。(3)标准品制作:用上述引物进行普通PCR,反应条件为95℃预变性5 min,95℃15 s,60℃1 min,共40个循环,72℃延伸7 min。用20 g/L琼脂糖凝胶电泳,切胶纯化,提取DNA。用TE缓冲液(10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, pH 8)做1:10倍比稀释,作为标准品,在-20℃保存。(4)Real time PCR:反应体系为10 × PCR缓冲液(含 Mg^{2+} 20 mmol/L)2.5 mL, 10 mmol/L三磷酸脱氧核

糖核苷酸 (deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) 0.5 mL, 上、下游引物 (各 7.5 mmol/L) 1 mL, Taq-Man[®] 探针 (5 mmol/L) 1 mL, cDNA 模板 2.5 mL, Taq DNA 聚合酶 0.25 mL, ROX 0.5 mL, 加水至 25 mL。反应条件为 95 ℃ 5 min 预变性, 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min, 40 个循环。应用 7300 System SDS software 对数据进行分析, 计算 cDNA 模板浓度, 以 Foxp3 cDNA 值/ β -actin cDNA 值作相对定量。

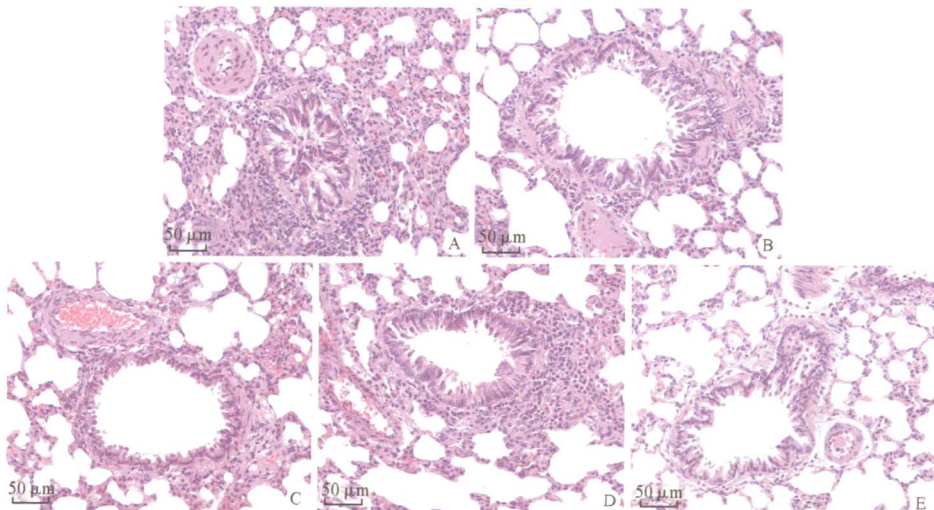
2 结果

2.1 各组大鼠肺组织病理学改变

2.1.1 HE 染色肺组织病理表现 (图 1) A 组支气

管黏膜上皮脱落明显, 支气管管壁及血管周围有大量嗜酸性粒细胞等炎性细胞浸润, 支气管腔内可见黏液栓。B 组和 C 组的肺部炎症均较哮喘组减轻, 支气管和血管周围嗜酸性粒细胞浸润明显减少。D 组的病理表现接近哮喘组。

2.1.2 黏液细胞计数 A 组黏液细胞增生明显, 细胞内可见大量红染的黏液, 平均每高倍视野每个细支气管上皮中黏液细胞数量为 (3.50 ± 0.76) 个。B 组 (2.29 ± 0.49) 和 C 组 (1.25 ± 0.46) 黏液细胞计数较哮喘组明显减少 ($P < 0.01$)。D 组黏液细胞增生程度与哮喘组比较差异无统计学意义 [(3.00 ± 1.16) vs (3.50 ± 0.76) , $P > 0.05$]。



A, asthma group; B, day 3 group; C, day 7 group; D, day 14 group; E, control group.

图 1 各组大鼠肺组织病理表现

Figure 1 The pathological manifestation of lung tissue in different rat groups

2.2 脾和胸腺中 CD4⁺CD25⁺T 细胞的比例变化 (表 1)

脾中 CD4⁺CD25⁺T 细胞占 CD4⁺T 细胞的百分比在 B 组和 C 组中明显升高, 达正常 2 倍左右; 而 D 组与正常组相比差异无统计学意义 ($P = 0.079$)。哮喘组 CD4⁺CD25⁺T 细胞在脾中比例的均值较正常组略降低, 但未达到统计学意义 ($P = 0.430$)。胸腺中 CD4⁺CD25⁺T 细胞的比例在各组中相近 ($P > 0.05$)。

2.3 脾和胸腺 Foxp3 mRNA 表达 (表 2)

与正常组比较, B、C 组脾中 Foxp3 mRNA 表达水平升高, C 组胸腺中 Foxp3 mRNA 的表达也有增高; 而 D 组脾和胸腺的 Foxp3 mRNA 表达水平与正常组相比差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠脾和胸腺中 CD4⁺CD25⁺T 细胞占 CD4⁺T 细胞比例

Table 1 The percentage of CD4⁺CD25⁺T cells among the CD4⁺T cells in spleen and thymus at different rat groups

Groups	n	Spleen	Thymus
Asthma	6	5.45 ± 1.18	28.18 ± 8.25
Day 3	6	$13.68 \pm 3.54^{*\Delta}$	33.41 ± 8.42
Day 7	6	$16.65 \pm 4.91^{*\Delta}$	29.90 ± 10.83
Day 14	6	$11.04 \pm 2.88^{\#}$	32.72 ± 7.18
Control	6	7.33 ± 3.39	28.59 ± 12.82

* $P < 0.01$, compared with control group; $^{\#} P < 0.05$, $\Delta P < 0.01$, compared with asthma group.

3 讨论

针对“卫生假说”的研究发现微生物和特殊抗原的刺激可以促进 Th1 免疫应答, 使机体在出生 2 年内由 Th2 优势转向 Th1 优势, 即发生了免疫偏移

(immune deviation)^[4],说明早期的变应原暴露对机体建立正常免疫反应起重要作用。有流行病学资料显示:早期变应原暴露易于产生保护作用,而相对晚期的暴露可能加重症状^[5]。这提示变应原暴露的时机是影响哮喘发病的另一重要因素。本实验显示:SD大鼠出生1周内接触变应原,可以减轻成年后同种变应原诱发的哮喘炎症;而在出生后2周接触变应原则基本无此作用。目前在哮喘动物模型中进行新生儿免疫耐受的研究较少,并且未关注变应原接触的时间。本研究根据前期实验结果,固定了变应原的剂量和接触方式,研究暴露时间这一单独因素对哮喘模型的影响。结果发现,早期接触变应原对哮喘的保护作用存在“时间窗”现象。

表2 各组大鼠脾脏和胸腺中 Foxp3 mRNA 的表达水平
(以 Foxp3/ β -actin 的相对值表示)

Table 2 Expression of Foxp3 mRNA in spleen and thymus at different rat groups (indicating as a relative ratio of Foxp3/ β -actin)

Groups	n	Spleen	Thymus
Asthma	6	5.57 $\pm$ 2.61	9.81 $\pm$ 2.74
Day 3	6	18.46 $\pm$ 5.01 * Δ	9.28 $\pm$ 2.22
Day 7	6	26.37 $\pm$ 4.68 * Δ	18.73 $\pm$ 3.66 * Δ
Day 14	6	8.71 $\pm$ 2.19	11.25 $\pm$ 1.14
Control	6	5.49 $\pm$ 1.99	11.13 $\pm$ 1.75

* $P < 0.05$, compared with control; $\Delta P < 0.01$, compared with asthma group.

当面对抗原刺激时 CD4⁺T 细胞是发生反应还是产生耐受,是决定哮喘是否发生的重要因素之一。T 细胞耐受的机制除了克隆清除、免疫无能等,近十几年发现了一种具有抑制功能的 T 细胞亚群,可以实现“主动”的免疫调节,称之为调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)^[6]。Treg 又可分为天然性(naturally occurring Treg, nTreg)和适应性(adaptive Treg, aTreg)两类。前者在胸腺中发育成熟后到达外周,后者由外周淋巴组织中的成熟 T 细胞经抗原刺激或由树突状细胞诱导产生。nTreg 固有表达高水平 CD25, 转录因子 Foxp3 是其发育过程中必需的,也是其特异性标志^[7]。

已有实验证明调节性 T 细胞可抑制哮喘炎症反应^[8]。Thornton 等^[9]还发现在抗原存在下培养脐带血 T 细胞,可以使 CD4⁺CD25⁺T 细胞数量相对增加,并使其获得抑制能力。因此推测早期接触变应原对哮喘模型产生的保护作用可能是通过诱导产生调节性 T 细胞实现的。本实验中正常组大鼠 CD4⁺CD25⁺T 细胞约占脾中 CD4⁺T 细胞的 7% 左右,与文献报道一致^[10]。大鼠出生 1 周内接触变应原可以使成年后脾中的 CD4⁺CD25⁺T 细胞比例

明显升高;而出生第 14 天接触变应原,这群细胞的比例则不升高。CD4⁺CD25⁺T 细胞比例的变化趋势与大鼠肺部病理表现一致。由于 CD25 也可以表达于活化的 T 细胞和记忆性 T 细胞表面。因此通过检测 Foxp3 mRNA 进一步证实 nTreg。细胞结果显示出生后第 3 天、第 7 天接触变应原均可使脾 Foxp3 mRNA 表达水平上调,并且出生后第 7 天组的胸腺 Foxp3 mRNA 表达也有增加。无论是在脾还是胸腺中,出生后第 14 天接触变应原对 Foxp3 mRNA 的表达均没有影响。提示只有在大鼠出生 1 周内接触变应原才能使 nTreg 产生增多;它不仅出现在外周免疫器官,还见于中枢免疫器官。这可能是早期变应原暴露存在“时间窗”现象的产生机制之一。第 3 天组胸腺 Foxp3 mRNA 表达并没有增加,并且脾中 CD4⁺CD25⁺T 细胞比例也较第 7 天组低,推测 nTreg 可能在出生 7 d 左右对变应原的刺激更为敏感。其具体机制以及 Treg 随生长发育的变化规律还需进一步研究。

本实验发现早期接触变应原诱导大鼠哮喘模型建立免疫耐受存在“时间窗”现象,即出生 1 周内接触变应原可能减轻成年后相同变应原诱导的哮喘炎症,出生 2 周后接触变应原则不具有该作用。“时间窗”现象的产生可能与早期变应原暴露诱导机体产生调节性 T 细胞有关。

参考文献

- [1] Cookson WO, Moffatt MF. Asthma: an epidemic in the absence of infection[J]. Science, 1997, 275:41-42.
- [2] Bonini S. The hygiene hypothesis: epidemiologic evidence[J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2005, 40 (Suppl 1): 37-38.
- [3] 骆文玲, 李海潮, 郝洪军, 等. 早期接触过敏原对大鼠哮喘模型的影响[J]. 北京大学学报(医学版), 2006, 38:159-163.
- [4] Prescott SL, Macaubas C, Holt BJ, et al. Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile[J]. J Immunol, 1998, 160: 4730-4737.
- [5] Riedler J, Eder W, Oberfeld G, et al. Austrian children living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization[J]. Clin Exp Allergy, 2000, 30:194-200.
- [6] Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells[J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3:253-257.
- [7] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor FOXP3[J]. Science, 2003, 299: 1057-1061.
- [8] Robinson DS, Larche M, Durham SR. Tregs and allergic disease[J]. J Clin Invest, 2004, 114:1389-1397.
- [9] Thornton CA, Upham JW, Wikstrom ME, 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: 3084-3092.
- [10] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains[J]. J Immunol, 1995, 155: 1151-1164.

(2007-08-27 收稿)
(本文编辑:刘淑萍)