文章编号:1000-5404(2008)08-0743-03

论著

1,25-二羟维生素 D_3 处理树突状细胞在过敏性气道炎症中的作用

夏俊波,宋云熙,曾雪峰,王 彦,王长征 (第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037)

摘 要:目的 研究 1,25-二羟维生素 D_3 对树突状细胞(dendritic cells, DC)表型和功能的影响及其处理后 DC 在过敏性气道炎症中的作用。**方法** 体外扩增小鼠骨髓来源的树突状细胞,采用流式细胞术和 ELISA 检测 1,25-二羟维生素 D_3 对 DC 表型和分泌细胞因子 IL-10 和 IL-12 的影响;观察 1,25-二羟维生素 D_3 处理 DC 过继卵蛋白致敏小鼠肺组织病理特点和支气管肺泡灌洗液细胞类型。**结果** 经 1,25-二羟维生素 D_3 处理后,DC 表达 CD80 和 MHC Ⅱ 均明显降低,而 CD11c 变化不明显;分泌 IL-10 显著增加,而分泌 IL-12 显著降低。过继小鼠肺组织未见典型的哮喘样病理改变,支气管肺泡灌洗液细胞类型与空白对照组无显著差异。**结论** 1,25-二羟维生素 D_3 可抑制 DC 成熟,经其处理后 DC 过继致敏小鼠可诱导对抗原的免疫耐受,避免过敏性气道炎症的发生。

关键词: 树突状细胞;1,25-二羟维生素 D_3
中图法分类号: R392.12;R562.2;R977.24 **文献标识码:** A

Role of 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 treated dendritic cells in allergic airway inflammation

XIA Jun-bo, SONG Yun-xi, ZENG Xue-feng, WANG Yan, WANG Chang-zheng (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medicine University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the effect of 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 on the phenotype of dendritic cells (DC) and their function and the role of 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 treated DC in asthmatic airway inflammation. Methods DC were harvested by differentiating mouse borrow cells *in vitro*. The effect of 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 on phenotype of DC and their secretion of cytokines IL-10 and IL-12 was determined by flow cytometry and ELISA. Pathological changes and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cell types of OVA-sensitized mouse transferred by 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 treated DC were observed. Results After DCs were treated by 1,25-Dihydroxyvitamin D_3, the expressions of CD80 and MHC Ⅱ were decreased, whereas the expressions of CD11c were not changed. The secretion of IL-10 was increased, but that of IL-12 was decreased. Typical pathological changes of asthma were not seen in lung tissues of transferred mouse. The BALF cell types were not significantly changed as compared with blank control. Conclusion 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 inhibits DC maturation. Adoptive transfer of DCs treated with 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 into OVA-sensitized mouse induces antigen-specific immune tolerance, avoiding the onset of asthmatic airway inflammation.

Key words: dendritic cell; 1,25-Dihydroxyvitamin D_3

树突状细胞(dendritic cell, DC)是迄今发现的功能最强的抗原呈递细胞(antigen presenting cells, APC)。DC 的功能状态决定着免疫反应的发生、发展[1],即细胞免疫、体液免疫和免疫耐受。通过体外干预其生物学性状,调节其功能状态,有助于各种免疫相关疾病的治疗和预防,如过敏性疾病[2]和自身免疫性疾病。因此,DC 是免疫治疗主要的靶细胞,也是免疫治疗的主要研究对象。1,25-二羟维生素 D_3(1,25-Dihydroxyvitamin D_3, $VitD_3$)是一种开环甾体激素,可调节钙和骨的代谢,同时控制细胞的增生和分化,参与免疫调节活动。近年研究表明维生素 D_3 主要通过调节 DC 功能发挥免疫调节作用。而且有研究表明[3],正常小鼠在致敏前、致敏和激发的全过程中给予皮下注射维生素 D_3,可以使小鼠气道嗜酸性粒细胞明显减小,但是其机制还不清楚,估计 DC 是其作用的中间环节。因此,本研究旨在探讨维生素 D_3 对 DC 表型和功能的影响以及经其处理后 DC 在过敏性气道炎症中的作用,以阐明其哮喘防治中临床意义。

作者简介:夏俊波,男,四川省内江市人,博士研究生,医师,主要从事哮喘发病机制方面的研究。电话:(023)66567980
通信作者:王长征,电话:(023)68774303,E-mail: czwang@netease.com
收稿日期:2007-09-28;修回日期:2007-12-04

1 材料与方法

1.1 实验动物

BALB/c 小鼠 30 只,8 周龄,雌性,体质量 18 ~ 20 g,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂

重组小鼠粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(rmGM-CSF 公司);1,25-二羟维生素 D_3;IL-4 和 IFNγ(Sigma 公司)RPMI1640(Gibco 公司)FITC-CD80 mAb FITC-CD11c mAb 与 FITC-IgG 同型对照(eBioLegend 公司),PE-MHC Ⅱ mAb,PE-IgG 同型对照(eBioscience 公司);小鼠 IL-12 和 IL-10 ELISA 试剂盒均购自晶美公司。

1.3 骨髓来源 DC 的体外扩增

按照本实验室使用的方法进行[4],简述如下:分离小鼠骨髓细胞,将 2×10^6 个细胞重悬在 10 ml RPMI1640 培养基中,加入 200 ng GM-CSF,根据加或不加维生素 D_3(10^{-8} mol/L),分别分为 2 组,即 D3 组和对照组。于第 3 天补充等量 GM-CSF 和维生素 D_3,第 6 天和第 8 天半量换液,补充等量 GM-CSF 和维生素 D_3。2 组在第 8 天加入 μg/ml OVA。第 10 天收获细胞用于后续实验。

1.4 细胞表面标志物的流式细胞仪检测

用 100 μl 0.1 mol/L PBS 重悬新鲜制备的 DC(细胞数为 1×10^6),加入 100 μl 小鼠血清,4 ℃下置 20 min,然后分别加入 PE-MHC Ⅱ mAb 2 μg、FITC-CD80 2 μg 及 FITC-CD11c 2 μg 进行荧光标记、同型对照管中分别加入 PE 大鼠 IgG 和 FITC-仓鼠 IgG,4 ℃放置 30 min,然后加入 PBS,2 000 r/min 洗涤 3 次,重悬于 0.4 ml PBS 中,上机分析。

1.5 检测树突状细胞分泌 IL-10、IL-12

参照说明书进行,采用双抗夹心法。IL-10 检测灵敏度 62.5 pg/ml,检测范围 2 000 ~ 62.5 pg/ml;IL-12 检测灵敏度 31.25 pg/ml,检测范围 1 000 ~ 31.25 pg/ml。

1.6 1,25-二羟维生素 D_3 处理 DC 回输 OVA 致敏小鼠

分别于第 0、7、14 天经小鼠腹腔注射 OVA 10 μg 致敏小鼠;空白对照组用等量 0.01 mol/L PBS 代替。将致敏小鼠分为 3 组,每组 5 只。第 1 组,回输维生素 D_3 处理的 DC(D3 组);第 2 组,回输未用维生素 D_3 处理的 DC(DC 组);第 3 组,不回输 DC,用等量生理盐水代替(哮喘组);调整细胞数至 1.25×10^7/ml;取 80 μl 细胞悬液,经微量加液器缓慢注入;哮喘组和空白对照用等量 0.9% 生理盐水;24 h 后将小鼠单独置于 5L 密闭的容器中,以 1% OVA 进行雾化吸入激发 20 min,持续 6 d。

1.7 肺组织病理切片

各组小鼠最末次激发 24 h 后,剪取部分肺组织,经 10% 甲醛固定后切片,进行 HE 染色。

1.8 支气管肺泡灌洗(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中细胞分类和计数

各组小鼠最末次激发 24 h 后,行支气管肺泡灌洗,白细胞计数并将细胞悬液涂片后行 HE 染色,将细胞分为巨噬细胞。淋巴细胞和嗜酸性粒细胞(EOS)分别进行计数。

1.9 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,各组间两两比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 DC 细胞表面分子的检测

用 10^{-8} mol/L 1,25-二羟维生素 D_3 处理后,DC 表达 CD11c、CD80 和 MHC Ⅱ 分别为 78.90%、23.00% 和 25.63%,而未用 1,25-二羟维生素 D_3 处理 DC 表达 CD11c、CD80 和 MHC Ⅱ 分别为 77.05%、82.59% 和 80.33%。

2.2 DC 分泌细胞因子 IL-10 和 IL-12

用 10^{-8} mol/L 1,25-二羟维生素 D_3 处理后,DC 分泌 IL-10 的水平[(200.28 ± 66.49) pg/ml]显著高于对照组[(58.21 ± 15.02) pg/ml]($P<0.01$)。DC 分泌 IL-12 的水平[(150.62 ± 49.49) pg/ml]显著低于对照组[(413.29 ± 54.90) pg/ml]($P<0.01$)。

2.3 肺组织病理改变

DC 组和哮喘组肺脏体积明显增大,表面肿胀,切面有白色泡沫状渗出物,肺组织切片 HE 染色可见支气管及血管周围有大量的炎性细胞浸润,以淋巴细胞和 EOS 为主。气道多处断裂,基底膜明显增厚且形态不规则。细支气管平滑肌发生增生性肥厚。而 D3 组和空白对照组肺组织未见上述病理变化(图 1)。

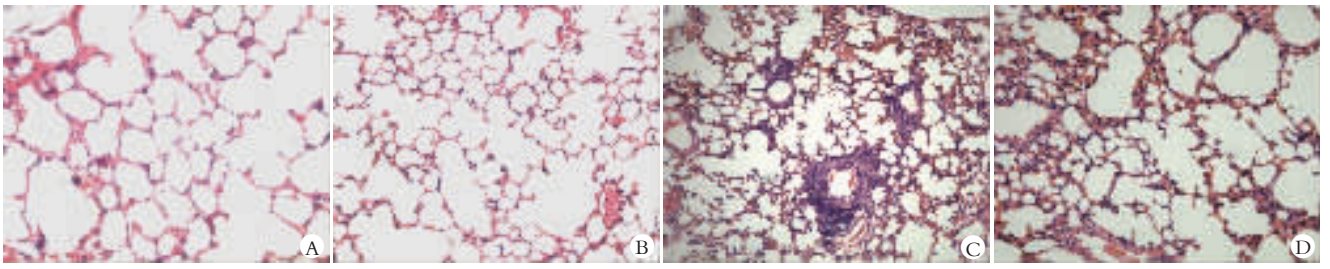
2.4 支气管肺泡灌洗液细胞分类

哮喘组 BALF 中细胞总数和 EOS 数较正常对照组显著增多($P<0.01$)。用 10^{-8} mol/L 1,25-二羟维生素 D_3 处理后 DC 过继回输致敏小鼠,用 OVA 激发后 BALF 中细胞总数和 EOS 分类均显著低于哮喘组和 DC 组($P<0.01$),与正常对照组差异不明显($P>0.05$,表 1)。

表 1 小鼠 BALF 中细胞分类计数($n=5$, $\times10^3$/L, $\bar{x}\pm s$)

组别	细胞总数	巨噬细胞	淋巴细胞	EOS
空白对照组	264.23 ± 47.88	249.61 ± 43.61	1.10 ± 0.21	0.19 ± 0.05
哮喘组	654.85 ± 119.33^{ab}	525.74 ± 135.43^{a}	1.68 ± 0.20	104.49 ± 21.50^{a}
DC 组	672.71 ± 125.56	549.65 ± 135.54	2.65 ± 0.27	111.72 ± 25.26
D_3 组	294.64 ± 46.92^{ab}	279.89 ± 48.63^{ab}	1.58 ± 0.20	0.23 ± 0.07^{ab}

a:$P<0.01$,与空白对照组比较;b:$P<0.01$,与哮喘组比较



A:空白对照组;B:D3 组;C:DC 组;D:哮喘组

图 1 小鼠肺组织病理改变 (HE ×200)

3　讨论

1，25-二羟维生素 D_3［1，25-$(OH)_2D_3$］是一种开环甾体激素，在钙和骨的代谢中起到重要作用。同时，1，25-$(OH)_2D_3$ 具有免疫调节作用。1，25-$(OH)_2D_3$ 主要通过维生素 D 受体（VDR）介导其免疫调节作用。因此，VDR 的组织特异性表达决定着 1，25 二羟维生素 D_3 的生物学作用。在大多数的免疫器官和免疫细胞中均存在 VDR 的表达，这也是 1，25-$(OH)_2D_3$ 发挥免疫调节作用的基础。

在所有的免疫细胞中，DC 是免疫反应发生、发展的关键环节。它由大量功能和表型不同的细胞组成。不同类型或成熟状态 DC 对 T 细胞可能起到完全相反的结果。成熟而且完全活化的 DC 可诱导 T 细胞反应，而不成熟 DC，由于诱导调节 T 细胞生成，可诱导 T 细胞耐受[5]。未成熟 DC 主要在外周组织，具有很强的吞噬和处理作用，因此可诱导外周 T 细胞对自身抗原产生免疫耐受。研究表明，成熟 DC 可表达 1α 羟基化酶，合成 1，25-$(OH)_2D_3$，通过旁分泌，有效的抑制周围 DC 的成熟和活化。目前 1，25-$(OH)_2D_3$ 通过抑制 DC 合成 IL-12，从而抑制 Th1 免疫反应的机制已经研究得非常透彻，但是在 Th2 免疫反应中的作用还存在争议，本研究试图从体内外实验中阐明它在 Th2 免疫介导的过敏性疾病中的作用。

本实验用 GM-CSF 诱导小鼠骨髓细胞分化为 DC，同时在培养一开始加入生理浓度 10^{-8} mol/L 1，25-$(OH)_2D_3$，第 10 天收获细胞用流式细胞仪检测表面分子 CD11c、MHC Ⅱ 和 CD80。与对照组相比，1，25-$(OH)_2D_3$ 处理组 DC 表达 MHC Ⅱ 和 CD80 明显降低，而 CD11c 变化不明显。另有实验证实 1，25-$(OH)_2D_3$ 处理后 DC 甘露糖受体和 Fcγ 受体Ⅱ表达上调且不可逆，这两种受体均可介导未成熟 DC 细胞吞噬抗原颗粒。该结果提示：1，25-$(OH)_2D_3$ 可抑制 DC 成熟，使 DC 具有 $CD11C^{high}MHC\,Ⅱ^{low}CD80^{low}$ 特征。与对照组比较，细胞培养液上清中 DC 分泌细胞因子 IL-10 水平显著增加，而 IL-12 显著降低。本研究结果提示：1，25-$(OH)_2D_3$ 可抑制 DC 成熟，促使 DC 分泌抑制性细胞因子，使其具有诱导免疫耐受的特性，为我们下一步的动物体内实验提供条件。

1，25-$(OH)_2D_3$ 在体外能抑制 DC 的成熟，使其具有免疫耐受特性，那么在体内是否也具有同样的作用呢？以往研究结果显示，1，25-$(OH)_2D_3$ 在自身免疫性疾病和同种异体移植物排斥应用中收到非常理想的临床疗效[6,7]，但是在过敏反应性疾病和哮喘中还没有应用。目前多项研究均表明过敏性哮喘是由于呼吸道微环境的改变，在多种细胞因子和炎症介质的作用下，致使 DC 的数量增多和异常活化，导致 T 淋巴细胞的过度活化（向 Th2 优势分化），因而引起哮喘的发生。那么，1，25-$(OH)_2D_3$ 是否能起到逆转哮喘 DC 的功能的作用呢。目前，还没有实验对两者直接的相互作用进行研究。我们将 1，25-$(OH)_2D_3$ 处理 DC 装载 OVA 后经支气管过继回输到 OVA 致敏小鼠支气管，再用 OVA 激发各组致敏小鼠，观察各组哮喘发生情况。正常 DC 回输组，在激发 6 d 后与哮喘组出现几乎相同的结果：小鼠肺组织细。小支气管及血管周围有大量的炎性细胞浸润，以淋巴细胞和 EOS 为主。气道黏膜杯状细胞增生，上皮多处断裂，基底膜明显增厚且形态不规则，细支气管平滑肌发生肥厚性增生，管腔狭窄，这些均符合哮喘病理学特点；而 1，25-$(OH)_2D_3$ 处理组未见上述改变，与正常对照组病理表现一致。BALF 中 EOS 计数，1，25-$(OH)_2D_3$ 处理组显著低于正常 DC 回输组和哮喘组（$P<0.01$），与正常对照组无显著差异（$P<0.01$）。由此分析：1，25-$(OH)_2D_3$ 处理 DC 在回输到小鼠支气管后能诱导抗原特异性的免疫耐受，避免过敏性气道炎症的发生，可能与其分泌 IL-10 增加和 IL-12 减少有关。我们的实验结果提示 1，25-$(OH)_2D_3$ 有可能是作为哮喘免疫治疗新的手段。

参考文献：

[1] Shortman K, Liu Y J. Mouse and human dendritic cell subtypes[J]. Nat Rev Immunol, 2002, 2(3): 151－161.

[2] 孙　鲲，林科雄，吴　奎，等. Serrate1 基因转染对小鼠树突状细胞生物学特性的影响[J]. 第三军医大学学报，2005，27(17)：1732－1734.

[3] Matheu V, Back O, Mondoc E, *et al*. 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.

[4] 夏俊波，吴　奎，孙　鲲，等. 小鼠骨髓来源的树突状细胞的体外扩增与鉴定[J]. 第三军医大学学报，2005，27(10)：942－944.

[5] Lagaraine C, Lebranchu Y. Effects of immunosuppressive drugs on dendritic cells and tolerance induction[J]. Transplanlation, 2003, 75(9 Suppl): 37S－42S.

[6] Stephan L, Bouchentouf M, Mills P, *et al*. 1, 25-dihydroxyvitamin D3 increases the transplantation success of human muscle precursor cells in SCID mice[J]. Cell Transplant, 2007, 16 (4): 391－402.

[7] Mathieu C, Jafari M. Immunomodulation by 1, 25-dihydroxyvitamin D3: therapeutic implications in hemodialysis and renal transplantation [J]. Clin Nephrol, 2006, 66 (4): 275－283.

（编辑　龙　亮）