DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.16.003
第25卷第16期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 16
1408 2003年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)16-1408-03

不同浓度过敏原对哮喘小鼠T淋巴细胞产生IL-5的影响

孙 鲲,王长征 (第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037)

提 要:目的 探讨大剂量过敏原对哮喘小鼠T细胞产生IL-5的影响及其机制。方法 应用不同浓度过敏原体外处理哮喘模型小鼠T细胞,用单核细胞作抗原递呈细胞。ELISA法检测培养清中IL-5水平,并用TUNEL法检测T细胞的凋亡率。结果 ①在0~100 μg/ml卵蛋白(OVA)处理浓度级之间,哮喘组小鼠淋巴细胞产生的IL-5的水平随着处理浓度的增高而增高,但经高浓度OVA(10 mg/ml)处理后,T淋巴细胞产生的IL-5水平却较哮喘低浓度组及对照组明显降低($P<0.01$);对照组各浓度级之间则无显著差异;②不同浓度OVA处理后哮喘组T细胞的凋亡率均无明显差异。结论 大剂量过敏原可以诱导哮喘T细胞IL-5产生减少为表现的免疫耐受现象,其机制主要是诱导淋巴细胞无不反应性,而不是诱导T细胞凋亡。

关键词:哮喘;T细胞;凋亡
中图法分类号:R392.12;R392.8;R562.2+5 文献标识码:A

Effect of allergen at different concentrations on the production of IL-5 by T cells of asthmatic mice

SUN Kun, WANG Chang-zheng (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of allergen at different concentrations on the production of IL-5 by lymphocytes of mice with asthma and its mechanism. Methods The levels of IL-5 produced by T cells treated with allergen of different concentrations and monocytes as antigen-presenting cells *in vitro* were measured by ELISA and the apoptosis rate of T lymphocytes was determined by TUNEL. Results ① The administration of high dose of allergen inhibited the expression of IL-5($P<0.01$); ② There was no significant difference in apoptosis rate of T lymphocytes of mice with asthma after treatment with different concentrations of allergen. It was the same case in the control group. Conclusion High dose of allergen can down-regulate the production of IL-5 mainly by means of induction of anergy instead of apoptosis of lymphocytes.

Key words: asthma; T lymphocyte; apoptosis

特异性免疫治疗(脱敏治疗,SIT)被认为是惟一一种病因治疗哮喘的疗法,但其确切机制尚未明了。既往的研究多集中在该方法对IgE的影响上。但IgE主要介导哮喘的速发相反应,对气道的慢性变应性炎症不起重要作用。研究证明,哮喘患者具有明显的Th_1/Th_2细胞因子偏移,即Th_2细胞因子表达明显增加[1~3]。近年发现,SIT可下调$CD4^+$ T细胞的免疫功能[4],纠正Th_1/Th_2细胞的偏移[5]。但其作用机制仍不完全清楚。文献报道,大剂量过敏原诱导T细胞免疫耐受的机制可能涉及到抗原特异性的Th_2细胞克隆凋亡或不反应性。本实验利用不同浓度过敏原在体外条件下处理哮喘小鼠T细胞,观察各浓度处理组IL-5产生的情况和T细胞的凋亡情况,旨在探讨大剂量过敏原诱导哮喘T淋巴细胞免疫耐受的基本机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂

鸡卵蛋白系Sigma公司产品,淋巴细胞分离液为上海试剂二厂产品,ELISA试剂盒购自美国,TUNEL试剂盒系Roche公司产品。

1.2 实验动物模型与分组

健康雌性BALB/c小鼠60只,4~6周龄,体质量21.3~23.6 g,由本校实验动物中心提供,随机分为两组:①实验组:分别于第1、13天予OVA/$Al(OH)_3$混合液0.1 ml腹腔注射[内含OVA 10 μg,$Al(OH)_3$ 1 mg],第21~29天每天予2%OVA生理盐水溶液雾化吸入激发30 min或直至出现哮喘样发作时为止。②对照组:用生理盐水替代OVA腹腔注射及激发。每组30只

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170403)
作者简介:孙 鲲(1975—),女,辽宁省大连市人,博士研究生,主治医师,主要从事哮喘免疫机制方面的研究。电话:(023)68755320
收稿日期:2002-09-12;修回日期:2003-02-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

小鼠, 分 5 个处理浓度级, 每浓度级用 6 只小鼠。

1.3　小鼠脾脏单个核细胞的分离

在最后一次激发结束 24 h 后, 将小鼠脱颈椎致死, 开腹无菌取脾, 常规分离单个核细胞。2 000 r/min 离心洗涤 2 次后, 用含 10% Fbs 的 RPMI1640 培养液 5 ml 重悬。将此细胞悬液加至玻璃培养皿中, 置 5% CO_2、37 ℃细胞培养箱中培养 2 h 后取出, 用尖吸管轻轻吹打细胞悬液, 使淋巴细胞吹脱, 吸出悬液, 用细胞刮刀将吸附在平皿表面的单核细胞刮离, 洗涤后用 RPMI1640 完全培养基调细胞浓度为 4×10^5/ml。尼龙毛柱法提纯 T 淋巴细胞, 调细胞浓度为 1×10^6/ml。

1.4　不同浓度 OVA 体外处理

96 孔培养板内加入两实验组 T 细胞 5×10^4/ml, 单核细胞 2×10^4/ml(共 0.1 ml), 再分别加入终浓度为 0.1 μg/ml、10 μg/ml、100 μg/ml、10 mg/ml 的 OVA 生理盐水溶液, 空白对照组以 0.1 ml 生理盐水替代加入。每浓度组均设三复孔。置培养板于 5% CO_2、37 ℃细胞培养箱中培养 72 h 后, 取上清液测其 IL-5 水平; 收集细胞行 TUNEL 染色检测 T 细胞的凋亡情况。

1.5　ELISA 法测定 IL-5 水平

按照说明书步骤进行。加 100 μl 标准对照、待测样品和空白对照(样品稀释液)到已包被好的培养板孔内, 37 ℃孵育 90 min; 洗板, 每孔加入 50 μl 抗体, 混合 30 s, 37 ℃孵育 60 min; 洗板, 每孔加入 50 μl 抗体, 混合 30 s, 37 ℃孵育 60 min; 洗板, 每孔加入 50 μl 抗体, 混合 30 s, 37 ℃孵育 60 min; 洗板, 用 50 μl 终止液终止显色, 10 min 内用酶标仪在 450 nm 波长处测定光密度值。

1.6　TUNEL 法检测 T 细胞凋亡

按照说明书步骤进行。收集培养板中的细胞, 4%多聚甲醛固定, 0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min, 3 次。

0.1% Triton X-100, 4 ℃通透 2 min。PBS 漂洗 5 min, 3 次。0.03% H_2O_2/0.01%NaN_3 封闭 30 min。PBS 漂洗 5 min, 3 次。加入由末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)、脱氧三磷酸核苷(dNTP)和荧光素标记的脱氧三磷酸尿苷(dUTP)组成的 TUNEL 反应混合液 20 μl/片, 37 ℃反应 1 h。PBS 漂洗 5 min, 3 次。加入过氧化物酶(POD)标记的抗荧光素抗体 20 μl/片, 37 ℃反应 30 min。PBS 漂洗 5 min, 3 次。0.05% DAB/0.01% H_2O_2 显色, 光镜下控制显色深浅。苏木精复染。脱水, 透明, 封片。计数: 在高倍光镜下随机选择视野, 计数 1 000 个细胞, 计算凋亡率。

1.7　统计学处理

用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 t 检验、单因素方差分析和 χ^2 检验。

2　结果

2.1　不同浓度 OVA 对T 细胞 IL-5 产生的影响

随着 OVA 浓度升高, 哮喘组 IL-5 的水平亦明显升高, 至 100 μg/ml 处理浓度级时 IL-5 水平达最高, 但在 10 mg/ml OVA 处理浓度级, T 细胞产生的 IL-5 水平却较其它几个低浓度组明显下降($P<0.01$), 甚至低于空白对照($P<0.01$); 对照组经不同 OVA 浓度处理后 T 细胞产生的 IL-5 水平没有改变。见表 1。

表 1　不同浓度 OVA 对淋巴细胞 IL-5 产生的影响(pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effect of OVA at different concentrations on the expression of IL-5 by lymphocytes(pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

Group	NS	Final concentration of OVA			
		0.1 μg/ml	10 μg/ml	100 μg/ml	10 mg/ml
Asthma	$108.592\pm5.69^{*\#}$	$166.73\pm8.36^{\Delta\#*}$	$272.074\pm3.49^{\Delta\#*}$	$2\,031.092\pm8.67^{\Delta\#}$	$77.195\pm4.32^{\Delta**\#}$
Control	89.031 ± 3.54	143.58 ± 2.68	117.5 ± 5.34	139.312 ± 2.65	101.38 ± 5.37

△: $P<0.01$ *vs* NS;　*: $P<0.01$,　**: $P<0.01$ *vs* asthma group treated with 100 μg/ml OVA;　#: $P<0.01$ *vs* control groups

2.2　不同浓度 OVA 对淋巴细胞凋亡的影响

各浓度处理组 T 细胞行 TUNEL 染色, DAB 显色, 呈棕黄色者即为凋亡细胞。各组分别随机计数 1 000 个细胞, 计算凋亡率。

$$\text{凋亡率}(\%)=\frac{\text{凋亡染色阳性的细胞数}}{\text{细胞总数}}\times 100\%$$

结果见表 2, 哮喘组、对照组之间凋亡率无显著差异($P>0.05$), 哮喘组、对照组内不同处理浓度级之间凋亡率亦无明显差异($P>0.05$)。

表 2　不同浓度 OVA 对 T 淋巴细胞凋亡的影响(%)

Tab 2　Effect of different concentrations of OVA on apoptosis of T lymphocytes(%)

Group	NS	Final concentration of OVA			
		0.1 μg/ml	10 μg/ml	100 μg/ml	10 mg/ml
Asthma	12.59	20.44	21.64	17.59	25.32
Control	15.27	18.36	18.68	16.33	19.63

3　讨论

哮喘的发病可以在一定程度上视为一种免疫耐受机制缺陷的疾病, 即正常人接触过敏原后机体产生免疫耐受, 不会始动哮喘的发病过程。相反, 哮喘患者接触过敏原后即可活化 Th_2 细胞, 始动哮喘发病过程。过敏原的特异性免疫治疗的经验告诉我们, 大剂量的过敏原可以导致患者对特异性过敏原在一定程度上的"免疫耐受"。所以, 我们用不同剂量过敏原处理 OVA 特异性淋巴细胞, 观察大剂量过敏原对 T 细胞 IL-5 产生的影响及机制, 了解特异性免疫治疗的作用机制, 为进一步提高免疫治疗的疗效提供理论依据。

Janssen 等[6]的研究报道肺引流淋巴结细胞予终浓度为 10 μg/ml 的 OVA 体外处理后, 其 IL-5 的产生水平达到 1 500 pg/ml。我们利用高于该浓度 1 000 倍的 OVA 体外处理哮喘小鼠脾脏 T 细胞, 结果显示, 哮喘小鼠 T 细胞培养上清中 IL-5 水平随 OVA 处理浓度的

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

增高而增高($P<0.01$)，至 100 μg/ml 浓度级达最高值。但在 10 mg/ml 的大剂量过敏原处理后哮喘 T 细胞 IL-5 的产生却较几个低浓度组显著降低($P<0.01$)，甚至低于对照组 IL-5 的基础分泌水平，此结果与 Derry 等[7] 所报道的基本一致。表明大剂量过敏原能抑制哮喘 T 细胞 IL-5 的产生，从而纠正 Th_1/Th_2 细胞因子的失衡。同时也提示，哮喘对过敏原的免疫耐受缺陷可能通过接触大剂量的过敏原进行纠正，使 T 细胞产生的 IL-5 的恢复到正常的水平。

IL-5 是 Th_2 细胞产生的代表性细胞因子，具有刺激哮喘患者骨髓的 IL-5 生成增多，趋化 Eos 在气道内的聚集，并活化 Eos，在哮喘气道炎症的发生发展中起重要作用[8]。因此，大剂量过敏原抑制 T 细胞 IL-5 产生是 SIT 治疗哮喘的机制之一。文献[9]报道，经 SIT 治疗的患者可出现抗原特异性 Th_2 淋巴细胞的凋亡现象。Th_2 的凋亡使 Th_1/Th_2 细胞的失衡得到纠正，从而导致 Th_2 细胞因子(如 IL-5)的产生减少。在本试验中，我们同时检测了 T 细胞的凋亡情况。结果显示，不同浓度过敏原处理后 T 细胞的凋亡率没有变化。其原因可能是过敏原与 T 细胞在体外培养的时间较短，T 细胞尚未发生凋亡 。而 IL-5 产生减少的原因可能是大剂量过敏原导致 T 淋巴细胞出现不反应性(Anergy)。在此情况下，抗原特异性 T 细胞虽未发生细胞凋亡，使细胞数量减少，但 T 细胞处于对变应原不反应的状态，Th_2 细胞因子生成减少。我们的实验结果给 SIT 提供了有力的理论依据。但根据免疫学基础理论，大剂量过敏原可使肥大细胞脱颗粒而诱导型变态反应，且随着抗原剂量的增高，可逐步出现 Th_2 细胞应答。我们考虑大剂量过敏原诱导 T 细胞免疫耐受的途径可能不同与上述二者有所差异。总之，大剂量过敏原应用对哮喘患者免疫耐受机制缺陷的影响还有待更深入和全面的研究来阐明。

参考文献：

[1] 王 群，林江涛，孙洪涛，等. 哮喘患者 TH 亚群的失衡及与相关细胞因子、肺通气功能改变的相关性研究[J]. 中华结核和呼吸杂志，2000，(3)：147－150.

[2] Moverare R, Elfman L, Stalenheim G, *et al*. Study of the Th_1/Th_2 balance, including IL-10 production, in cultures of peripheral blood mononuclear cells from birch-pollen-allergic patients[J]. Allergy, 2000, 55(2): 171－175.

[3] Gabrielsson S, Paulie S, Roquet A, *et al*. Increased allergen-specific Th_2 responses *in vitro* in atopic subjects receiving subclinical allergen challenge [J]. Allergy, 1997, 52(8): 860－865.

[4] Major M, Bertacco S, Piccoli M L, *et al*. Specific immunotherapy down-regulates peripheral blood CD4 and CD8 T-lymphocyte activation in grass pollen-sensitive asthma[J]. Eur Respir J, 1998, 11(6): 1263－1267.

[5] Just J, Houzel-Charavel A, Grimfeld A, *et al*. Specific immunotherapy [J]. Arch Pediatr, 1999, 6(1): 108S－113S.

[6] Janssen, Marca H, Eline H, *et al*. Opposite effects of immunotherapy with ovalbumin and the immunodominant T-cell epitope on airway eosinophilia and hyperresponsiveness in a murine of allergic asthma[J]. Am J Respir Cell Mole Biol, 1999, 21(1): 21－29.

[7] Derry C J, Harper N, Davies D H, *et al*. Important of dose of type Ⅱ collagen in suppression of collagen-induced arthritis by nasal tolerance[J]. Arthritis Rheum, 2001, 44(8): 1917－1927.

[8] Buttner C, Lun A, Splettstoesser T, *et al*. Monoclonal anti-interleukin-5 treatment suppresses eosinophil but not T-cell functions[J]. Eur Respir J, 2003, 21(5): 799－803.

[9] Guerra F, Carracedo J, Solana-Lara R, *et al*. Th_2 lymphocytes from atopic patients treated with immunotherapy undergo rapid apoptosis after culture with specific allergens[J]. J Allergen Clin Immunol, 2001, 107(4): 647－653.

(编辑 刘洪娥)

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2003)16-1410-01

一次性塑料包埋盒在石蜡组织包埋中应用的体会

Experience in using omnisette tissue cassettes as supports to embed tissue in ceresin

汤金梁，张哉根，王亚丽 (第三军医大学附属新桥医院病理科，重庆 400037)

一次性塑料包埋盒因其自身的特点在病理科已得到广泛的应用。但在使用中有时会出现组织脱落、蜡块断裂及蜡块与包埋盒分离等问题，给病理制片造成困难。现将我科室的应用体会报告如下。

1 材料与方法

材料：石蜡，病理组织，一次性塑料包埋盒，金属包埋模，镊子。

方法：①根据组织的大小选取大中小不同规格的包埋模。②包埋时的石蜡温度宜在 70～72 ℃之间。③天冷时宜将包埋模放在一个加热平台上预热，温度高于石蜡的熔点 1～2℃。

(下转 1414 页)

作者简介：汤金梁(1975－)，男，河北省唐山市人，技师，主要从事病理技术方面的研究。电话：(023)68754000-73107

收稿日期：2003-01-27；修回日期：2003-05-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net