DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.02.028
第24卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 2
2002年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2002

文章编号:1000-5404(2002)02-0181-03

论著

雷公藤对致敏小鼠T细胞活化及其IL-5 mRNA表达的影响

程晓明,王长征,钱桂生 (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 探讨致敏小鼠T淋巴细胞活化与IL-5 mRNA表达间的关系及雷公藤内酯醇(TP)的影响。方法 采用卵蛋白(OVA)致敏的方法建立模型;运用免疫细胞化学与原位杂交双染法(ICC/ISH)观察活化的T淋巴细胞(CD25)与IL-5 mRNA表达的相关性及TP、地塞米松(DM)的影响;同时就TP的作用与DM相比较。结果 致敏小鼠T淋巴细胞CD25与IL-5 mRNA表达均显著高于正常对照组($P<0.01$)。CD25/IL-5 mRNA双染结果显示:$CD25^+/IL\text{-}5\ mRNA^+$ T淋巴细胞显著高于正常对照组($P<0.01$),$CD25^-/IL\text{-}5\ mRNA^-$T淋巴细胞显著低于正常对照组($P<0.01$),$CD25^+/IL\text{-}5\ mRNA^-$及$CD25^-/IL\text{-}5\ mRNA^+$T淋巴细胞与正常对照组间无显著差异($P>0.05$)。经TP、DM处理后,致敏小鼠T淋巴细胞CD25与IL-5 mRNA表达均显著低于致敏组($P<0.01$)。CD25/IL-5 mRNA双染结果显示:$CD25^+/IL\text{-}5\ mRNA^+$ T淋巴细胞显著低于致敏组($P<0.01$),$CD25^-/IL\text{-}5\ mRNA^-$ T淋巴细胞显著高于致敏组($P<0.01$),而$CD25^+/IL\text{-}5\ mRNA^-$及$CD25^-/IL\text{-}5\ mRNA^+$T淋巴细胞与致敏组间无显著性差异($P>0.05$)。TP组与DM组间无显著性差异($P>0.05$)。结论 IL-5 mRNA表达与T淋巴细胞活化关系密切。TP、DM抑制T淋巴细胞活化可能是其抑制IL-5产生的机制之一。

关键词:雷公藤内酯醇;T淋巴细胞;IL-5;活化;哮喘
中图法分类号:R282.71;R392.12;R562.25 文献标识码:A

Inhibition of T lymphocytes activation and IL-5 mRNA expression in sensitized mice by triptolide

CHENG Xiao-ming, WANG Chang-zheng, QIAN Gui-sheng (Institute of Respiratory Diseases, PLA, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To explore the relationship between activated T lymphocytes (CD25) and expression of IL-5 mRNA in sensitized mice, and the effects of triptolide (TP). **Methods** The peritoneal injection and inhalation of ovalbumin (OVA) were used to establish the sensitized BALB/c mouse model. Immunocytochemistry and *in situ* hybridization (ICC/ISH) were used in combination to explore the relation between CD25 and expression of IL-5 mRNA in T lymphocytes, and to compare the effects of TP and dexamethasone (DM). **Results** CD25 and IL-5 mRNA were expressed more intensely in T lymphocytes in sensitized mice than those in normal controls ($P<0.01$): $CD25^+/IL\text{-}5\ mRNA^+$ expression in T lymphocytes in sensitized mice was higher than that in normal controls ($P<0.01$): $CD25^-/IL\text{-}5\ mRNA^-$ expression in T lymphocytes in sensitized mice was lower than that in normal controls ($P<0.01$): $CD25^+/IL\text{-}5\ mRNA^-$ expression and $CD25^-/IL\text{-}5\ mRNA^+$ expression in T lymphocytes in sensitized mice had those in normal controls ($P<0.05$). CD25 expression and IL-5 mRNA expression in T lymphocytes were significantly lowered beause of the treatment with TP groups or DM: $CD25^+/IL\text{-}5\ mRNA^+$ expression in T lymphocytes in TP groups or DM groups was lower than that in sensitized groups ($P<0.01$); $CD25^-/IL\text{-}5\ mRNA^-$ expression in T lymphocytes in TP groups or DM groups was higher than that in sensitized groups ($P<0.01$); $CD25^+/IL\text{-}5\ mRNA^-$ and $CD25^-/IL\text{-}5\ mRNA^+$ expressions in T lymphocytes in TP or DM groups showed sensitized groups ($P<0.05$). However, there was no signiticant difference in $CD25^+$ IL-5 $mRNA^+$ expression, $CD25^+/IL\text{-}5\ mRNA^-$ expression, and $CD25^+/IL\text{-}5\ mRNA^-$ expression and $CD25^-/IL\text{-}5\ mRNA^+$ expression between TP and DM treatment. **Conclusion** Expression of IL-5 mRNA is highly related to the activation of T lymphocytes. Inhibition of T lymphocytes activation by TP or DM may be one of the mechanisms by which they inhibits the production of IL-5.

Key words: triptolide; T lymphocyte; interleukin-5; activation; asthma

辅助性T淋巴细胞(Th)根据其分泌的细胞因子大致分为T辅助细胞Ⅰ型(Th_1)和Ⅱ型(Th_2)两个亚类。其中,活化的Th_2类细胞是产生IL-5的主要来源,而IL-5是诱导嗜酸性粒细胞(EOS)在骨髓内分化、成熟及在组织内定位、活化中起关键作用的细胞因子[1]。因此,活化的Th_2类淋巴细胞在哮喘发病机制中起重要的调控作用。雷公藤内酯醇(TP)能抑制T淋巴细胞增殖及活化,并能减少哮喘豚鼠肺组织IL-5 mRNA的表达[2]。因此,可以推测TP减少IL-5 mRNA表达的作用可能与其抑制T淋巴细胞活化有关。本研究通过对致敏小鼠活化T淋巴细胞(CD25)与IL-5 mRNA表达相关性的观察,探讨TP对T淋巴细胞活化和IL-5 mRNA表达的影响,同时就TP的作用机制与地塞米松(DM)进行比较。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

TP购自南京皮肤病研究所,DM、卵蛋白(OVA)为Sigma公司产品,大鼠抗小鼠CD25单克隆抗体(mAb)购自Pharmingen公司,3′末端Dig标记试剂盒为B.M.公司产品,免疫细胞化学染

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870946)
作者简介:程晓明(1973-),女,安徽省淮南市人,博士研究生,医师,主要从事哮喘方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68755320
收稿日期:2001-02-16;修回日期:2001-08-23

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

色S-P试剂盒购自北京中山公司。

1.2 致敏小鼠模型的建立

4~6周健康BALB/c小鼠(第三军医大学实验动物中心)24只,雌雄不限,体重16~20 g,分为正常对照组、致敏组、TP处理组及DM处理组。采用OVA致敏和激发的方法建立致敏模型[3]。正常对照组以生理盐水代替OVA致敏和激发,TP、DM处理组分别于每次激发前1 h经腹腔注射TP 40 μg/kg体重,DM 10 mg/kg体重。最后一次激发后24 h再给药1次。

1.3 T淋巴细胞的分离及鉴定

1.3.1 T淋巴细胞的分离 采用尼龙毛柱法分离小鼠脾脏T淋巴细胞。将细胞悬液涂于预先用DEPC水处理的涂有粘附剂的玻片上,4%多聚甲醛(PFA)固定30 min,-70 ℃冰箱保存备用。

1.3.2 T淋巴细胞的鉴定 运用α-醋酸萘酯酶染色法将T、B淋巴细胞分辨开。

1.4 IL-5寡核苷酸探针的合成及标记

由上海生物工程公司合成IL-5寡核苷酸探针:5′TCT CAA AGA ACC ACA TTA CTT GTG GCT CAC 3′。运用3′末端转移法标记地高辛。

1.5 ICC染色

参照试剂盒说明,略加修改,采用AEC显色系统。

结果判定:400×光镜下随机选择视野,观察200个细胞,计数$CD25^+$T淋巴细胞数。

1.6 ISH

参照蔡文琴等[4]介绍的方法。采用NBT/BCIP显色系统。设两种阴性对照:①杂交前用RNase A 100 μg/ml预处理细胞涂片,37 ℃,1 h;②加未标记的探针进行反应。所有操作步骤与其他样本相同。

结果判定:400×光镜下随机选择视野,观察200个细胞,计数杂交阳性的T淋巴细胞数。

1.7 ISH与ICC双染法

参照蔡文琴等[4]介绍的方法,略加修改,主要步骤如下:0.1 mol/L甘氨酸漂洗5 min,0.3% TritonX-100漂洗10 min,4% PFA固定5 min,1.33%三乙醇胺-0.25%醋酸酐(体积比),漂洗10 min,2×SSC 37 ℃漂洗30 min,每片滴加探针杂交液20 μl,探针浓度为1 ng/μl(1∶1 000),置4×SSC湿盒内,37 ℃孵育过夜,3%H_2O_2室温封闭20 min,每片滴加Dig-AP抗体溶液25 μl(1∶1 000)和CD25 mAb溶液25 μl(1∶200)的混合液,置湿盒内,37 ℃孵育3 h,转入4 ℃孵育过夜,每片滴加生物素标记的IgG溶液25 μl(1∶100),37 ℃孵育1 h,每片滴加S-P溶液25 μl(1∶100),37 ℃孵育1 h,AEC显色20 min,缓冲液Ⅱ冲洗,每片滴加NBT/BCIP显色液50 μl,湿盒内暗处室温显色,缓冲液Ⅲ冲洗终止反应,水溶性封片剂封片。

结果判定:1 000×光镜下随机选择视野,观察200个细胞,分别计数$CD25^+$/IL-5 $mRNA^+$、$CD25^+$/IL-5 $mRNA^-$、$CD25^-$/IL-5 $mRNA^+$及$CD25^-$/IL-5 $mRNA^-$T淋巴细胞数。

1.8 统计学分析

各组间比较采用非配对计量资料t检验。

2 结果

2.1 T淋巴细胞纯度鉴定结果

光学显微镜下观察,可见T淋巴细胞着色较深,其细胞浆内有黑红色、不规则的颗粒沉积,而B淋巴细胞胞浆内无着色颗粒。经细胞计数,T淋巴细胞的纯度>96%,见图1。

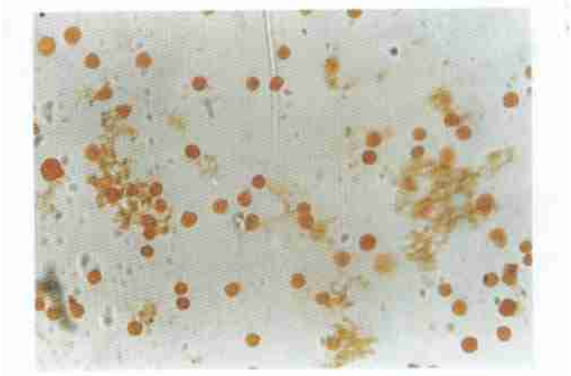


图1 致敏小鼠脾脏T淋巴细胞 (α-醋酸萘酯酶染色×400)

Fig 1 T lymphocytes of spleens in sensitized mice (×400)

2.2 TP、DM对T淋巴细胞CD25表达的作用

光学显微镜下观察,可见表达CD25的T淋巴细胞被染成红色,染色部位位于细胞膜。致敏组表达CD25的T淋巴细胞与正常对照组比较显著增加($P<0.01$),经TP、DM处理后,表达CD25的T淋巴细胞与致敏组比较显著降低($P<0.01$),TP组与DM组间差异不显著($P>0.05$),见表1。

2.3 TP、DM对T淋巴细胞IL-5 mRNA表达的作用

光学显微镜下观察,可见表达IL-5 mRNA的T淋巴细胞被染成蓝色,染色部位位于细胞浆。致敏组可见T淋巴细胞IL-5 mRNA表达较正常对照组显著增加($P<0.01$),经TP、DM处理后,T淋巴细胞IL-5 mRNA表达较致敏组显著减少($P<0.01$),但仍显著高于正常对照组($P<0.01$),TP组与DM组间无显著差异($P>0.05$),见表1。

表1 TP、DM对致敏小鼠T淋巴细胞CD25 IL-5 mRNA表达的作用(%,$\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Expression of CD25 IL-5 mRNA in T lymphocytes in sensitized mice by treatment with triptolide or dexamethasone(%,$\bar{x}\pm s$)

Group	Control	Sensitized	TP	DM
$CD25^+$	8.8±3.3	66.7±9.4△	18.6±5.5#	14.2±4.6#
IL-5 mRNA	8.5±2.6	59.1±9.5△	17.8±4.3#	17.0±5.1#

△: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.01$ *vs* sensitized group

2.4 TP、DM对T淋巴细胞CD25/IL-5 mRNA表达的作用

光学显微镜下观察,可见$CD25^+$T淋巴细胞被染成红色,染色部位位于细胞膜;IL-5 $mRNA^+$T淋巴细胞被染成蓝色,染色部位位于细胞浆;$CD25^+$/IL-5 $mRNA^+$T淋巴细胞胞膜部位被染成红色,细胞浆部位被染成蓝色或蓝紫色;$CD25^-$/IL-5 $mRNA^-$T淋巴细胞细胞浆与细胞膜部位均不着色。

致敏组可见$CD25^+$/IL-5 $mRNA^+$T淋巴细胞较正常对照组显著增加($P<0.01$),$CD25^-$/IL-5 $mRNA^-$T淋巴细胞较正常对照组显著减少($P<0.01$),而$CD25^+$/IL-5 $mRNA^-$和$CD25^-$/IL-5 $mRNA^+$T淋巴细胞与正常对照组比较差异不显著($P>0.05$)。经TP、DM处理后,$CD25^+$/IL-5 $mRNA^+$T淋巴细胞较致敏组显

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

著减少($P<0.01$), $CD25^-$/IL-5 $mRNA^-$ T 淋巴细胞较致敏组显著增加($P<0.01$), 而 $CD25^+$/IL-5 $mRNA^-$ 和 $CD25^-$/IL-5 $mRNA^+$ T 淋巴细胞与致敏组比较差异不显著($P>0.05$)。TP 组与 DM 组比较, $CD25^+$/IL-5 $mRNA^+$、$CD25^+$/IL-5 $mRNA^-$、$CD25^-$/IL-5 $mRNA^+$ 及 $CD25^-$/IL-5 $mRNA^-$ T 淋巴细胞均差异不显著($P>0.05$), 见表 2, 图 2。

表 2　TP、DM 对致敏小鼠 T 淋巴细胞 CD25/IL-5 mRNA 表达的作用(%, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Expression of CD25/IL-5 mRNA in T lymphocytes in sensitized mice by treatment with triptolide or dexamethasone(%, $\bar{x}\pm s$)

	$CD25^-$/IL-5 $mRNA^-$	$CD25^+$/IL-5 $mRNA^-$	$CD25^-$/IL-5 $mRNA^+$	$CD25^+$/IL-5 $mRNA^+$
Control	85.5±4.3	6.1±2.8	5.7±2.7	2.8±1.4
Sensitized	25.3±10.7△	6.7±3.6	10.2±4.7	57.8±11.3△
TP	72.4±7.3#	5.8±1.5	6.9±2.7	14.9±6.9#
DM	76.4±7.5#	5.9±3.6	6.7±4	11.0±2.2#

△: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.01$ *vs* sensitized group

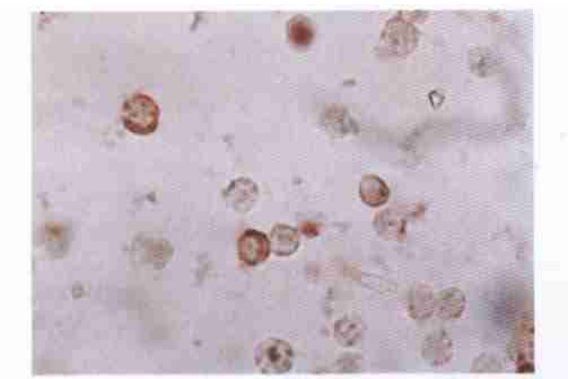


图 2　致敏小鼠 T 淋巴细胞 CD25/IL-5 mRNA 表达　(ICC/ISH × 1 000)

Fig 2　Expression of CD25/IL-5 mRNA in T lymphocytes in sensitized mice　(ICC/ISH × 1 000)

3　讨论

静止的 T 淋巴细胞经抗原或丝裂原激活后合成 IL-2 及 IL-2 受体(IL-2R)[5]。IL-2 是刺激 T 淋巴细胞增殖、活化的主要生长因子。IL-2R 由 α、β 和 γ 三种亚基构成, α 亚基(CD25)主要表达在活化的 T 淋巴细胞表面, 静止的 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞和活化的自然杀伤细胞(NK)均不表达 CD25[6]。因此, CD25 被作为活化 T 淋巴细胞的标志。活化的 T 淋巴细胞可产生一系列细胞因子, 其中活化的 Th2 类细胞($CD25^+$/$CD4^+$, $CD25^+$/$CD8^+$)通过产生 IL-5、IL-4 等细胞因子参与哮喘发病过程。

T 淋巴细胞活化后产生 IL-5 主要是通过两条途径实现的, 即外来抗原与 T 细胞受体(TCR)结合途径和 IL-2 与 IL-2R 结合途径, 他们分别激活相应的细胞内信号通路, 调控 IL-5 基因的转录和翻译过程[7]。GC 通过抑制细胞因子 IL-2 的产生及抑制 IL-2R 的合成而抑制 T 淋巴细胞的增殖与活化, 表现为 T 淋巴细胞表面抗原 CD25 的表达降低。低浓度的 GC 即可抑制 TCR 诱导的 IL-5 分泌[8], 说明 GC 可通过抑制 T 淋巴细胞活化而抑制 IL-5 的分泌。TP 也能抑制 T 淋巴细胞的增殖、活化及 IL-2 的产生; 同时, TP 能抑制 T 淋巴细胞 IL-5 mRNA 的表达[2]。因此, 我们通过用 CD25 细胞免疫化学及 IL-5 mRNA 原位杂交双染的技术观察 T 淋巴细胞活化与 IL-5 mRNA 表达的关系。

本研究结果显示, 致敏小鼠 T 淋巴细胞 CD25 的表达显著增加, IL-5 mRNA 的表达显著增加, 且 $CD25^+$/IL-5 $mRNA^+$ T 淋巴细胞也显著增加。由于活化的 T 淋巴细胞($CD25^+$)和 IL-5 mRNA 表达的增加呈一致性, 而 $CD25^-$/IL-5 $mRNA^+$ T 淋巴细胞很少, 清楚地表明 IL-5 mRNA 主要由活化的 T 淋巴细胞表达, 进一步证实了活化的 T 淋巴细胞在哮喘发病机制中的重要作用。经 DM、TP 处理后, 表达 CD25 及 IL-5 mRNA 的 T 淋巴细胞均显著减少, $CD25^+$/IL-5 $mRNA^+$ T 淋巴细胞显著减少, 而 $CD25^-$/IL-5 $mRNA^-$ T 淋巴细胞显著增多, 说明 TP 可抑制 T 淋巴细胞活化, 进而减少其 IL-5 mRNA 表达, 与 DM 有相似的作用。同时, 本实验结果显示, 致敏组、TP 组及 DM 组中 $CD25^-$/IL-5 $mRNA^+$ 和 $CD25^+$/IL-5 $mRNA^-$ T 淋巴细胞与正常对照组比较无显著差异, 提示正常的 T 淋巴细胞就有部分处于活化状态, T 淋巴细胞有基础 IL-5 mRNA 表达, 且 DM、TP 对这类细胞无明显作用。总之, TP 可抑制 T 淋巴细胞活化, 进而抑制其 IL-5 mRNA 表达, 但 TP 抑制 T 淋巴细胞活化的机制尚不清楚; 并且 TP 对活化的 T 淋巴细胞表达 IL-5 mRNA 的抑制作用是通过单一抑制 IL-2—IL-2R 途径, 抑或既抑制 IL-2—IL-2R 途径, 又抑制外来抗原-TCR 途径, 其机制亦尚需进一步研究。

参考文献:

[1] 王长征. IL-5 在嗜酸性粒细胞生成和组织分布中的作用[J]. 国外医学: 输血及血液学分册, 1994, 17(5): 276—279.

[2] 王春霞, 王长征, 金远林, 等. 哮喘豚鼠 IL-5、IL-3 mRNA 表达及雷公藤影响的研究[J]. 中国实验临床免疫学杂志, 1998, 10(2): 107—110.

[3] 程晓明, 王长征, 李淑平, 等. 哮喘致敏小鼠模型的建立及脾脏 $CD4^+$ T 细胞的分离[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(3): 369—370.

[4] 蔡文琴, 王伯弢 主编. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1994. 406, 429—430.

[5] Smith K A. Interleukin-2: inception, Impact, and implications[J]. Science, 1988, 240(4 856): 1 169—1 176.

[6] Godfrey D I, Zlotnik A. Control points in early T-cell development[J]. Immunol Today, 1993, 14(11): 547—553.

[7] Mori A, Suko M, Tsuruoka N, *et al*. Allergen—specific human T cell clones produce IL-5 upon stimulation with Th1 cytokine, IL-2[J]. Int Arch Allergy Immunol, 1995, 107(1~3): 220—222.

[8] Mori A, Kaminuma O, Suko M. Two distinct pathways of interleukin-5 synthesis in allergen-specific human T-cell clones are suppressed by glucocorticoids[J]. Blood, 1997, 89(8): 2 891—2 900.

(编辑　王　红)

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