DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.01.041


文章编号:1000-5404(2000)01-0099-01

经验与短篇

# 哮喘 CD4、CD8 T 细胞凋亡的变化

# Apoptosis of CD4, CD8 T cells in asthma

林科雄, 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)

活化的 T 细胞通过分泌 IL-3、IL-5、GM-CSF 促进嗜酸性细胞(EOS)的分化、活化、存活延长及气道内募集[1],在哮喘气道炎症的发病中起重要的调控作用。本研究采用免疫细胞化学 (ICC) S-AP 法与 3′ 末端转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记(TUNEL)双标染色,对哮喘豚鼠外周血 CD4、CD8 T 细胞凋亡进行检测,观察哮喘 T 细胞亚群凋亡的变化。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

淋巴细胞分离液为上海试剂二厂产品。小鼠抗人 CD4、CD8 单克隆抗体及 T 淋巴细胞亚群检测试剂盒购自北京中山公司。卵蛋白(OA)购自上海生化试剂公司。原位细胞凋亡试剂盒为宝灵曼公司产品。

### 1.2 哮喘豚鼠模型的制备及 PBMCs 的分离

采用 OA 致敏和激发建立豚鼠哮喘模型。体重 400~500 g 豚鼠,雌雄不分,分为正常对照组、哮喘组,每组 6 只。第 1 天腹腔内注射 2%OA 氢氧化铝凝胶 1 ml,第 8 天重复注射 1 次加强致敏,第 21 天吸入 2%OA 生理盐水激发哮喘发作,吸入前腹腔内注射苯海拉明 5 mg/kg 体重。对照组以生理盐水代替 2%OA,其余步骤不变。豚鼠激发 48 h 后抽取外周血,用淋巴细胞分离液的密度梯度离心分离外周血单个核细胞 (Peripheral blood mononuclear cells, PBMCs),涂片,4%多聚甲醛固定 30 min。

### 1.3 CD4、CD8 T 细胞凋亡检测

通过 CD4、CD8 ICC 与 TUNEL 双标染色进行检测。主要步骤如下:PBS(pH7.2)漂洗。加入小鼠抗大鼠 CD4 或 CD8 单克隆抗体(稀释度:1:100)20μl/片,37 ℃, 1 h。PBS 漂洗。加入二抗 37℃, 1 h, PBS 漂洗。加入三抗 37 ℃, 1 h, PBS 漂洗。0.1%Triton X-100, 4℃通透 2 min, PBS 漂洗。0.03%$H_2O_2$/0.01%$NaN_3$ 封闭 30 min, PBS 漂洗。加入 TUNEL 反应混合液 20 μl/片, 37 ℃反应 1 h, PBS 漂洗。加入过氧化物酶标记的抗荧光素抗体 20 μl/片, 37 ℃反应 30 min, PBS 漂洗。0.05%DAB/0.01% $H_2O_2$ 显色, PBS 漂洗。BCIP/NBT 显色。

### 1.4 记数

高倍光镜下计数双染细胞。随机选择视野,至少观察 200 个细胞以上,分别计数 CD4、CD8 T 细胞凋亡率。

### 1.5 统计学分析

CD4、CD8 T 细胞凋亡率以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用非配对 $t$ 检验。

## 2 结果

在光学显微镜下观察,单纯凋亡阳性细胞胞核被染成棕黄色,单纯 ICC 阳性细胞胞膜被染成紫蓝色,ICC 和 TUNEL 双染阳性细胞可见胞核被染成棕黄色,胞膜被染成紫蓝色。哮喘组豚鼠 CD4T 细胞凋亡率显著低于正常组($P<0.05$),而 CD8 T 细胞凋亡率与正常组差别不显著($P>0.05$)。

## 3 讨论

无论是特应性还是非特应性哮喘,气道内及外周血中活化的($CD25^+$)T 细胞增加,表达 IL-3、IL-4、IL-5、GM-CSF mRNA 增加,而且其细胞数与 EOS 数及哮喘严重程度及气道高反应性显著相关[1]。因此,CD4 T 细胞在哮喘的发病中起重要作用。通过对哮喘豚鼠外周血 CD4 T 细胞凋亡检测,我们发现哮喘豚鼠 CD4 T 细胞凋亡率显著低于正常组。在免疫系统中,活化的 T 细胞通过凋亡被清除,对维持外周 T 细胞稳态、调节免疫反应的强度和持续时间起重要作用,是机体对外源性抗原或自身抗原产生免疫耐受的重要机制之一[2]。因此,哮喘 CD4 T 细胞凋亡减少,可能反映了哮喘 CD4 T 细胞的活化增强,是哮喘免疫耐受异常的机制之一。CD8 T 细胞在一定条件下也能分泌 IL-4、IL-5 等 Th2 细胞因子[3]。从特应性患者支气管肺泡灌洗液(BALF)中制备的 CD8 T 细胞系分泌 IL-5、IL-4 显著高于非特应性哮喘患者[4]。因此,CD8 T 细胞也可能参与哮喘的发病。但我们研究结果显示,OA 诱导的哮喘豚鼠外周血 CD8T 细胞凋亡率同正常对照组相比差异不显著。所以,CD8 T 细胞与哮喘的发病的关系有待更多的研究阐明。

关键词 哮喘; T 细胞; 凋亡
中图法分类号 R329.25;R562.25 文献标识码 B

## 参考文献

[1] Haczku A. T cells and eosinophils in asthma[J]. Acta Microbiol Immunol Hung, 1998, 45(1):19—29.
[2] Critchfield J M, Racke M K, Zuniga-Pflucker J C, *et al*. T cells deletion in high antigen dose therapy of autoimmune encephalomyelitis[J]. Science, 1994, 263(5150):1 139—1 144.
[3] Jerb K, Le Gros G. The role of Th2 type $CD4^+$ T cells and Th2 type $CD8^+$ T cells in asthma[J]. Immunol Cell Biol, 1996, 74(2):206—208.
[4] Stomciu L A, Shute J, Promwong C, *et al*. Increased levels of IL-4 in $CD8^+$ T cells in atopic asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 1997, 100(3):373—378.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870946)
作者简介:林科雄(1969.5),男,贵州省织金县人,博士研究生,主治医师,主要从事哮喘气道炎症的免疫机制方面的研究,发表论文 1 篇。电话:(023)68755320
收稿日期:1999-07-21;修回日期:1999-12-29

(编辑 刘 鹏)

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