

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.29.016

1,25-(OH)₂D₃ 对哮喘小鼠体内髓系抑制细胞及气道炎症的影响

陶秋影,雷瑞瑞,王亚哲,韩影,王祯,陈茜

(河南省驻马店市中心医院儿内科 463000)

[摘要] **目的** 通过对哮喘小鼠进行研究,建立其气道重塑模型,同时运用 1,25-二羟基维生素 D₃[1,25-(OH)₂D₃]进行干预,哮喘小鼠脾脏内及外周血髓系抑制细胞(MDSCs)水平及气道壁厚度的改变进行检测,分析 1,25-(OH)₂D₃ 对 MDSCs 及气道炎症的影响,从而了解其在哮喘发病机制的作用。**方法** 选取 30 只 BALB/c 系小鼠,雌性、健康、8 周龄,将其随机分为 3 组,分别为哮喘组,对照组及 1,25-(OH)₂D₃ 干预组,通过卵清蛋白致敏、激发建立哮喘模型。取肺组织进行 HE 染色,比较小鼠气道壁厚度;收集各组小鼠外周血及脾脏细胞,采用流式细胞技术方法测定其 CD11b⁺Gr1⁺ MDSCs 细胞的比例。**结果** 哮喘组小鼠气道发生典型气道重塑的改变,小鼠体内 MDSCs 均较对照组、1,25-(OH)₂D₃ 干预组下降;1,25-(OH)₂D₃ 干预组较哮喘组气道重塑有所改善,MDSCs 较对照组、哮喘组升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 1,25-(OH)₂D₃ 可能对于哮喘的发作起到一定的治疗的作用,其可能通过对于 MDSCs 的水平上调来发挥作用,使得气道的炎症得以减轻,同时能够对气道重塑进行改善。

[关键词] 哮喘;小鼠,近交 BALB C;骨化三醇;髓系抑制细胞 MDSCs;气道重塑

[中图分类号] R562.2+5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)29-4077-03

Effect of 1,25-(OH)₂D₃ on the level of MDSCs and airway inflammation in lung of asthmatic mice

Tao Qiuying, Lei Ruirui, Wang Yazhe, Han Ying, Wang Zhen, Chen Qian

(Department of Pediatrics, the Central Hospital of Zhumadian, Zhumadian, Henan 463000, China)

[Abstract] **Objective** To study the establishment of airway remodeling model, while the use of 1,25-(OH)₂D₃ to intervene in the asthmatic mice spleen and peripheral blood myeloid suppressor cells (myeloid-derived suppressor cells, MDSCs) level and changes in airway wall thickness were detected. It aims to analyze the 1,25-(OH)₂D₃ MDSCs and influence on airway inflammation, to understand its role in the pathogenesis of asthma. **Methods** Totally 30 female mice(BALB/c strain) were randomly divided into control group, asthmatic group and asthmatic 1,25-(OH)₂D₃ group and built asthmatic mouse model. The pulmonary histological difference indicative of respiratory tract remodeling among groups were observed via HE staining. The proportion of MDSCs within the peripheral blood and spleen was tested by flow cytometry. **Results** Typical respiratory tract remodeling were found in asthmatic group with which MDSCs in the peripheral blood and spleen reduced, asthmatic 1,25-(OH)₂D₃ group comparatively increased, there had significant difference($P < 0.05$). **Conclusion** 1,25-(OH)₂D₃ may play a role in asthma attacks for a certain treatment, it may by regulation for MDSCs levels come into play, so that airway inflammation can be reduced, at the same time be able to airway remodeling improvement.

[Key words] asthma; mice, inbred BALB C; calcitriol; myeloid-derived suppressor cells; airway remodeling

支气管哮喘病症的成因是非常复杂的,其是多种细胞因子及多种的炎症细胞和呼吸道结构细胞共同作用的结果,其病变特征也较多,主要是以气道慢性炎症、气道高反应性(airway hyperresponsiveness, AHR)、可逆性气道阻塞为主要表现,可引起反复的咳嗽、喘息、胸闷^[1]。目前其发病机制复杂,影响因素众多。近年来,髓系抑制细胞(myeloid derived suppressor cells, MDSCs)一种在肿瘤免疫中研究较多,具有负向调节机制的细胞,国外小鼠实验研究表明 MDSCs 在哮喘发病中同样起重要调节作用^[2]。1,25-(OH)₂D₃ 是维生素 D₃ 的活性代谢产物,目前认为它不仅是微量元素,还是激素和免疫调节剂。体外研究证实 1,25-二羟基维生素 D₃[1,25-(OH)₂D₃]能够延缓气道高反应和呼吸道重塑的发生^[3],但是尚不清楚其作用的机制。在本研究中,主要是对哮喘小鼠气道重塑模型进行建立,同时在腹腔内注射 1,25-(OH)₂D₃,对于注射后的哮喘小鼠的气道重塑的情况进行观察,观察其改善情况及其体内的 MDSCs 变化,从而试图了解 1,25-(OH)₂D₃ 在哮喘发病中作用,为哮喘的治疗寻找新的靶点,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 30 只雌性、健康、8 周龄的 BALB/c 系小鼠,体重(20±3)g,于华中科技大学同济医学院实验动物中心购买,许可证号:SCXK(鄂)2010-0007;卵清蛋白(OVA)、1,25-(OH)₂D₃(美国 Sigma 公司);FACS Calibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司);FITC 标记鼠抗人 CD11b, PE 标记鼠抗人 Gr1 抗体(美国 BD 公司);HE 染色试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及哮喘模型的制备 将 30 只小鼠分成 3 组,每组有 10 只,分别是对照组、哮喘组以及 1,25-(OH)₂D₃ 干预组,在实验前对各组的小鼠进行饲养,时间为 1 周,然后进行实验。哮喘组,致敏阶段:在此阶段将抗原混合液 0.2 mL,分别于第 1、8、15 天注射到小鼠的腹腔中,该抗原混合液包含生理盐水和 10%氢氧化铝分别为 0.05 mL 和 0.15 mL 及 OVA 50 μg;激发阶段:该阶段从第 22 天开始,激发的方式是吸入 1% OV,每天 1 次,每次持续 30 min,一共进行两周,从而实现哮喘

气道模型的重塑。干预措施:在进行雾化激发前的 0.5 h 进行生理盐水的注射,注射量 0.1 mL。1,25-(OH)₂D₃ 干预组:混合液的注入及雾化的吸入与哮喘组相同。干预措施:在进行雾化激发前的 30 min 进行 1,25-(OH)₂D₃ 混合液的注射,注射量 0.1 mL^[5],从而实现对其的干预治疗。对照组:在各个阶段的操作与上述的操作相同,注射的溶液均用生理盐水来代替相应的混合液。

1.2.2 小鼠外周血收集 在模型制作成功以后,对各组的小鼠进行摘眼球取血,将所采集的血液加入到有肝素的管子中。将小鼠的血样分成 3 份,均进行染色。在每 1 份的样本中均加入 30 μL 血及荧光标记的抗 Gr1 和抗 CD11b 抗体,在室温的环境下进行 10 min 的染色。同时加入 100 μL 的红细胞裂解液,同样室温下裂解 10 min,加入两次 1 mL PBS 洗两遍后再加入 0.5 mL,而后通过 FACS Calibur 型流式细胞仪对其进行检测。

1.2.3 小鼠脾脏收集 在模型制作成功以后,将其处死取其脾脏。用预冷的 PBS 进行洗涤后进行研磨和过滤,而后收集细胞的悬液进行离心处理(1 500 r/min, 5 min)除去上清液后用 15 mL PBS 进行洗涤,而后加入红细胞分解液 1 mL,将其置于 4 °C 环境放置 5 min,继续用 10 mL PBS 进行洗涤,洗涤两次,调整细胞的体积,然后进行计数,将其分成 3 份进行染色。在每份的样本中加入 1×10⁶ 个细胞,而后分别加入荧光标记的抗 Gr1 以及抗 CD11b 抗体,在 4 °C 避光的环境下进行 15 min 染色,而后继续用 PBS 进行冲洗,两遍,而后加入 PBS 0.5 mL, FACS Calibur 流式细胞仪检测。

1.2.4 肺组织收集 在雾化结束后 1 d 以内对小鼠运用乙醚

进行麻醉,将其在操作台上进行固定,使得其组织及心脏得以暴露,将其气管剪断取出其心脏以及右肺组织,置于甲醛溶液中,在避光的环境下放置 48 h 以上。运用石蜡进行包埋,进行切片,厚度为 3 μm,同时运用 HE 进行染色。

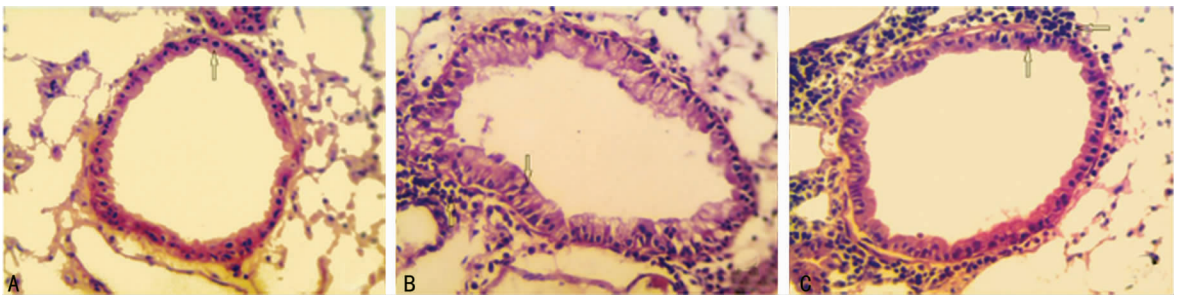
1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 进行统计学分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用单因素方差分析,检验方法为 LDS 方法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 小鼠造模过程中的表现 反复给予致敏及激发后,1,25-(OH)₂D₃ 干预组及哮喘组的小鼠均出现典型喘息发作,可能会出现呼吸困难及口鼻周发绀等状况。进行多次的激发,两组小鼠出现活动、进食减少,活力明显降低,体质量下降。然而 1,25-(OH)₂D₃ 干预组哮喘的情况出现了明显的减缓。对照组未出现明显的不适。

2.2 病理形态学表现 在光学显微镜下进行观察:哮喘组其气管壁出现了增厚及受损,气管腔变窄,平滑肌层出现增厚,同时出现了上皮细胞及杯状细胞的脱落及增生,无论是支气管还是血管周围炎性细胞的浸润都增多,这说明分泌了大量的黏液。1,25-(OH)₂D₃ 干预组也出现了上述的变化,但是都有所缓解的。对照组气管壁的结构完整,光滑,上皮细胞较为整齐,未出现杯状细胞的发生,气道壁正常。将其支气管壁厚度进行比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1,图 1。

2.3 MDSCs 流式细胞检测结果 哮喘组 MDSCs 较对照组、1,25-(OH)₂D₃ 干预组下降;1,25-(OH)₂D₃ 干预组 MDSCs 较对照组、哮喘组升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1,图 2、3。



A: 对照组; B: 哮喘组; C: 1,25-(OH)₂D₃ 干预组。

图 1 小鼠肺组织支气管壁 HE 染色(×400)

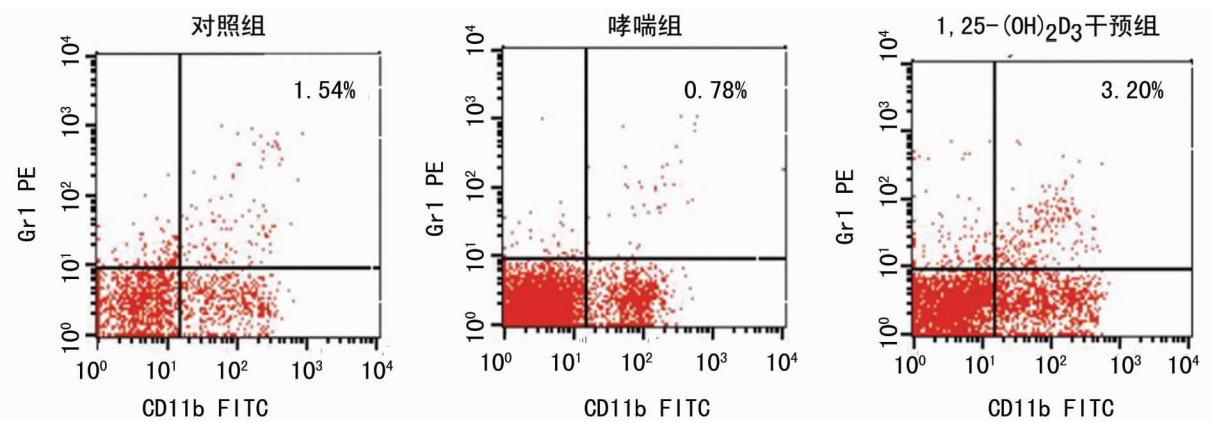


图 2 3 组小鼠外周血 CD11b⁺Gr1⁺ MDSCs 比例比较

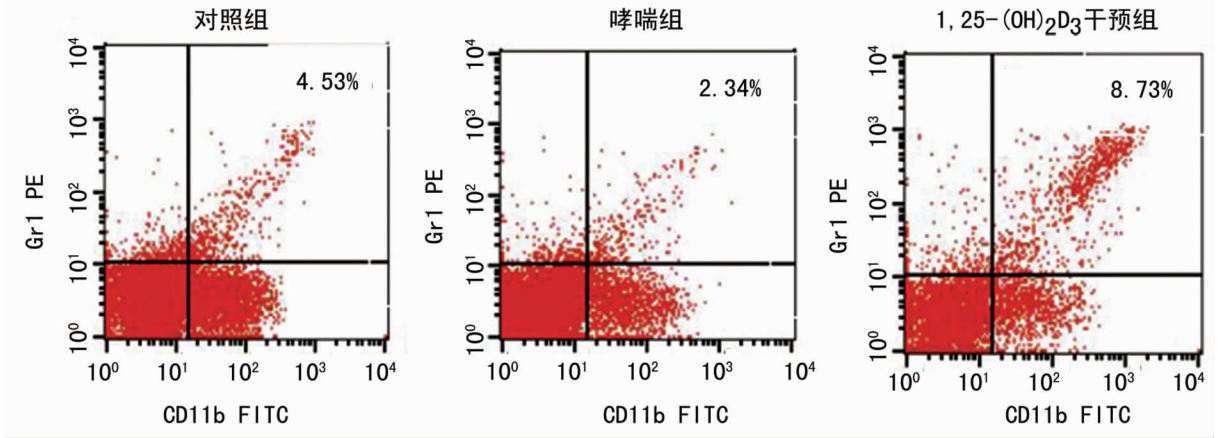


图 3 3 组小鼠脾脏中 CD11b⁺ Gr1⁺ MDSCs 比例比较

表 1 3 组小鼠气道壁厚度、MDSCs 比例($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	气道壁厚度 (μm)	PB- MDSCs(%)	SP- MDSCs(%)
对照组	45.69 \pm 14.65	1.33 \pm 0.25	4.53 \pm 1.04
哮喘组	158.78 \pm 17.35 ^a	0.78 \pm 0.25 ^a	2.37 \pm 0.98 ^a
1,25-(OH) ₂ D ₃ 干预组	84.75 \pm 18.19 ^{ab}	3.17 \pm 0.24 ^{ab}	8.74 \pm 2.49 ^{ab}
F	90.37	89.37	99.72
P	0.000	0.000	0.000

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与哮喘组比较; PB: 外周血; SP: 小鼠脾脏。

3 讨论

MDSCs 是近年来在肿瘤免疫中研究较多具有一种负向调节机制的细胞, 研究证实免疫学机制在支气管哮喘具有重要作用, 许多研究发现 MDSCs 参与炎症反应、哮喘气道重塑。Deshane 等^[4]通过研究致敏小鼠, 认为 MDSCs 能够对于肺部的炎症及气道的高反应性起到非常重要的介导作用。Sinha 等^[5]通过用 GR-1 抗体来阻止小鼠体内 MDSCs 的增殖, 发现小鼠体内 Th2 转化受到了明显的抑制; MDSCs 还可通过分泌 IL-10 等细胞因子使机体由 Th1 型免疫反应转为对免疫耐受的 Th2 型^[6], 由此可见 MDSCs 可通过调节 Th1/Th2 平衡来发挥炎症反应, 这点与哮喘免疫机制相吻合。本实验哮喘小鼠体内 MDSCs 明显低于对照组, 由此可以推测 MDSCs 参与小鼠哮喘发病, 且哮喘小鼠体内存在 MDSCs 低水平状态。

1,25-(OH)₂D₃ 是维生素 D₃ 的活性代谢产物, 目前认为其不仅是微量元素, 同时也存在激素及免疫的调节, 但是对于其调节的特性来说尚不是非常的清楚^[7-9]。VDR 介导在 1,25-(OH)₂D₃ 的免疫学效应中发挥较大的作用。VDR 与维生素 D 受体结合后发挥生物学效应, 维生素 D 受体多样性被发现与以 T 辅助淋巴细胞发展失衡有关的免疫系统代谢病有关^[12]。但体内外研究发现, 树突状细胞是 1,25-(OH)₂D₃ 最主要作用目标^[13], 其能够使得树突状细胞未成熟化, 同时能够使得 IL-10 和 IL-12 的分泌增加和降低, 从而减轻哮喘炎症反应。另外 1,25-(OH)₂D₃ 可选择性抑制 Th1 细胞的活性, 促使 Th1/Th2 细胞平衡打破, 偏向 Th2 细胞分化, 减少其细胞因子的分泌, 这正好与哮喘免疫机制相吻合。本实验向哮喘小鼠体内干预注射 1,25-(OH)₂D₃ 后, 小鼠的哮喘的发作与哮喘组相比明显的减缓, 其气管壁受损的厚度及程度也是如此, 同时无

论是平滑肌层增生程度还是杯状细胞化生程度都是低于哮喘组, 这说明 1,25-(OH)₂D₃ 能够对于哮喘气道的炎症起到减缓的作用。本实验还发现经 1,25-(OH)₂D₃ 干预小鼠体内 MDSCs 明显高于对照组, 提示 1,25-(OH)₂D₃ 可能通过上调 MDSCs 水平发挥其免疫抑制的作用, 从而减轻哮喘气道炎症。

目前关于 MDSCs 免疫逃逸在哮喘中的机制逐渐受到重视, 本研究首次测定 1,25-(OH)₂D₃ 干预后哮喘小鼠体内 MDSCs 的变化, 推断 1,25-(OH)₂D₃ 可能通过上调 MDSCs 水平发挥免疫抑制的作用, 为哮喘治疗提供新的思路。

参考文献

- [1] WHO/NHLBI workshop report. National heart lung and blood institute[S]. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Revised, 2006.
- [2] Arora M, Poe SL, Oriss TB, et al. TLR4/MyD88⁺ induced CD11b⁺ Gr-1⁺ int F4/80⁺ non-migratory myeloid cells suppress Th2 effector function in the lung[J]. Mucosal Immunol, 2011, 4(1):124.
- [3] Song Y, Qi H, Wu C. Effect of 1,25-(OH)₂D₃ on passively sensitized human airway smooth muscle cells[J]. Respirol, 2007, 12(4):486-494.
- [4] Deshane J, Zmijewski JW, Luther R, et al. Free radical-producing myeloid-derived regulatory cells: potent activators and suppressors of lung inflammation and airway hyperresponsiveness[J]. Soc Muc Immunol, 2011, 4(5):503-518.
- [5] Sinha P, Clements VK, Bunt SK, et al. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response[J]. J Immunol, 2007, 179(2):977-983.
- [6] Cuenca G, Delano MJ, Kelly-Scumpia KM, et al. A paradoxical role for myeloid-derived suppressor cells in sepsis and trauma[J]. Mol Med, 2011, 17 (3/4):281-292.
- [7] Brehm JM, Celedn JC, Soto-Quiros ME, et al. Serum vitamin D levels and markers of severity of childhood asthma in Costa Rica[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 179:765-771.
- [8] Devereux G, Lit onjua AA, Tu rner SW, et al. Maternal vitamin D in take during pregnancy and(下转第 4082 页)

管新生,切断肿瘤血供,有望成为肿瘤靶向治疗的一个新途径^[9]。VEGF 是最重要的促血管生长因子之^[10],在血管生成过程中起关键性的调节作用^[11],可由多种肿瘤细胞分泌,是目前已知的作用最强、特异性最高的血管生长因子,其作用包括增加血管通透性、促进血管内皮增生、增强内皮细胞抗凋亡和刺激体外培养的内皮细胞的迁移等,这些作用促进了肿瘤细胞生长和新生血管的形成^[12]。

本课题组前期研究已证实茶多酚体外能明显抑制鼻咽癌细胞增殖,且抑制作用呈浓度依赖关系^[13]。本实验中,对照组裸鼠移植瘤生长迅速,而给药组肿瘤生长缓慢,高浓度组的抑瘤率为 47.66%(与对照组比较, $P < 0.05$),提示高浓度茶多酚具有抑制人鼻咽癌细胞 HONE1 荷瘤裸鼠移植瘤生长的作用。为了进一步明确茶多酚抑制鼻咽癌分子机制,本研究观察茶多酚对鼻咽癌移植瘤组织 VEGF 表达的作用,荧光定量 PCR 及 Western blot 法分别观察茶多酚作用后移植瘤 VEGF 在 mRNA 及蛋白水平上的表达变化,结果表明,与对照组比较,茶多酚可明显下调 VEGF 的 mRNA 和蛋白表达水平,呈浓度依赖性,其中高剂量组变化明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。由此推断,茶多酚能够抑制鼻咽癌肿瘤生成,可能通过转录水平抑制 VEGF mRNA 表达,减少 VEGF 产物,从而抑制肿瘤血管生成等作用有关。

综上所述,本实验表明茶多酚对人鼻咽癌 HONE1 裸鼠皮下移植瘤具有显著的生长抑制作用,为茶多酚应用于鼻咽癌的临床药物治疗提供依据,有望减少鼻咽癌放化疗不良反应,改善患者生活质量。但这些功能在鼻咽癌的防治上仍未得到证明,是其今后在抗鼻咽癌研究的方向,由于目前缺乏完整的对茶多酚的毒理学研究,并且对其组成成分未能充分分离提纯,大大限制了茶多酚研究,这也是今后研究的重点方向。

参考文献

[1] Chou J, Y C Lin, J Kim, et al. Nasopharyngeal carcinoma—review of the molecular mechanisms of tumorigenesis[J]. *Head Neck*, 2008, 30(7): 946-963.

[2] Leung TW, Wong VY, Tung SY. Stereotactic radiotherapy for locally recurrent nasopharyngeal carcinoma[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2009, 75(3): 734-741.

[3] Stangl V, Dreger H, Stangl K, et al. Molecular targets of tea polyphenols in the cardiovascular system[J]. *Cardiovasc Res*, 2007, 73(2): 348-358.

[4] Mnich CD, Hoek KS, Virkki LV, et al. Green tea extract reduces induction of p53 and apoptosis in UVB-irradiated human skin independent of transcriptional controls[J]. *Exp Dermatol*, 2009, 18(1): 69-77.

[5] 王岳飞, 梁善珠, 张士康, 等. 茶多酚抗辐射剂安全毒理学研究[J]. *茶叶科学*, 2011, 31(5): 405-410.

[6] 袁东杰, 魏媛媛, 徐志文. 茶多酚抑制鼻咽癌及辐射防护作用的研究进展[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2014, 28(4): 281-284.

[7] 韩军, 南克俊, 赵新汉. 抗肿瘤药物研究方法学[M]//廖子君, 南克俊, 韩军. 现代肿瘤治疗药理学. 西安: 世界图书出版西安公司, 2002: 8.

[8] Niu G, Chen X. Vascular endothelial growth factor as an anti-angiogenic target for cancer therapy[J]. *Curr Drug Targets*, 2010, 11(8): 1000-1017.

[9] Shojaei F. Anti-angiogenesis therapy in cancer: current challenges and future perspectives[J]. *Cancer Lett*, 2012, 320(2): 130-137.

[10] Kristensen TB, Knutsson ML, Wehland M, et al. Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Therapy in Breast Cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(12): 23024-23041.

[11] Hayes DF, Miller K, Sledge G. Angiogenesis as targeted breast cancer therapy[J]. *Breast*, 2007, 16 Suppl 2: S17-19.

[12] Aita M, Fasola G, Defferrari C, et al. Targeting the VEGF pathway: antiangiogenic strategies in the treatment of non-small cell lung cancer[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2008, 68(3): 183-196.

[13] 孙文忠, 魏媛媛, 曾曼丽, 等. 海带多糖和茶多酚对鼻咽癌细胞 HONE1 和 CNE2 增殖的影响[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2013, 27(8): 425-428.

(收稿日期: 2015-04-17 修回日期: 2015-06-02)

(上接第 4079 页)

early childhood wheezing [J]. *Am J Clin Nutr*, 2007, 85: 853-859.

[9] Agrawal T, Gupta GK, Agrawal DK. Vitamin D deficiency decreases the expression of VDR and prohibitin in the lungs of mice with allergic airway inflammation[J]. *Exp Mol Pathol*, 2012, 93(1): 74-81.

[10] Geldmeyer-Hilt K, Heine G, Hartmann B, et al. 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ impairs NF- κ B activation in human naive B cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 407(4): 699-702.

[11] Chen Y, Kong J, Sun T, et al. 1, 25-dihydroxyvitamin D₃

suppresses inflammation-induced expression of plasminogen activator inhibitor-1 by blocking nuclear factor- κ B activation[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2011, 507(2): 241-247.

[12] 李飞, 高金明. 维生素 D、维生素 D 受体与支气管哮喘[J]. *中华哮喘杂志*, 2010, 4(1): 38-43.

[13] Dickie LJ, Church LD, Coulthard LR, et al. 1, 25(OH)2D3 down-regulates intra-cellular Toll-like receptor 9-induced IL-6 production in human monocytes[J]. *Rheumatology*, 2010, 49(8): 1466-1471.

(收稿日期: 2015-04-10 修回日期: 2015-08-15)