

变应性鼻炎小鼠模型中 Helios⁺ Foxp3⁺ CD4⁺ T 细胞比例变化及意义

王 韞 秀¹, 顾 兆 伟², 赵 鹤², 曹 志 伟²

1. 中国医科大学附属盛京医院医疗保险工作部, 辽宁 沈阳 110004;

2. 中国医科大学附属盛京医院耳鼻咽喉科, 辽宁 沈阳 110004

摘要: 目的 探讨 Helios⁺ Foxp3⁺ CD4⁺ T 细胞在变应性鼻炎 (AR) 鼠模型中比例及意义。方法 8 只 Balb/c 小鼠随机分为两组, 每组 4 只。先后给予卵清蛋白 (OVA) 腹腔注射和 OVA 生理盐水滴鼻构建变应性鼻炎鼠模型作为 AR 组, 对照组采用生理盐水替代 OVA 行腹腔注射和滴鼻。取两组小鼠脾组织, 通过流式细胞术检测两组小鼠脾组织中 Helios⁺ Foxp3⁺ CD4⁺ T 细胞的比例。结果 在 AR 组与对照组小鼠脾组织中均检测到 Helios⁺ Foxp3⁺ CD4⁺ T 细胞, 并且 AR 组中 Helios⁺ Foxp3⁺ CD4⁺ T 细胞比例显著低于对照组 [(13.55 ± 0.71)% vs (16.73 ± 0.75)%, $P < 0.01$]。结论 AR 免疫调节机制中, Helios⁺ Foxp3⁺ CD4⁺ T 细胞可能具有负性调节作用, 明确变应性鼻炎 Helios⁺ Foxp3⁺ CD4⁺ T 细胞比例, 可为完善 AR 发病机理及免疫靶点治疗提供参考。

关键词: 变应性鼻炎; 小鼠; Helios⁺ Foxp3⁺ CD4⁺ T 细胞; 脾组织

中图分类号: R 765.21 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2019)02-0166-03

Changes and significance of Helios⁺ Foxp3⁺ CD4⁺ T cells proportion in mouse model of allergic rhinitis

WANG Yun-xiu*, GU Zhao-wei, ZHAO He, CAO Zhi-wei

* Department of Medical Insurance, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang, Liaoning 110004, China

Corresponding author: GU Zhao-wei, E-mail: gordon_222@aliyun.com

Abstract: Objective To explore the changes of Helios⁺ Foxp3⁺ CD4⁺ T cells proportion and significance in mouse model of allergic rhinitis. **Methods** Eight Balb/c mice were randomly divided into two groups ($n = 4$ each): experiment group (AR group, AR mice model was established by successive intraperitoneal injection of ovalbumin (OVA) and drop nose with OVA normal saline) and control group (normal saline was used instead of OVA for intraperitoneal injection or drop nose, respectively). The mice spleen tissues were taken-out, and the proportion of Helios⁺ Foxp3⁺ CD4⁺ T cells in spleen tissues was detected by flow cytometry. **Results** Helios⁺ Foxp3⁺ CD4⁺ T cells were found in mice spleen tissues in both two groups. The proportion of Helios⁺ Foxp3⁺ CD4⁺ T cells in AR group was significantly lower than that in control group [(13.55 ± 0.71)% vs (16.73 ± 0.75)%, $P < 0.05$]. **Conclusions** In the mechanism of AR immunomodulation, Helios⁺ Foxp3⁺ CD4⁺ T cells may play a negative regulatory role. Defining the proportion of Helios⁺ Foxp3⁺ CD4⁺ T cells in AR can perfect the pathogenesis of AR and provides a theoretical reference for the treatment of immune targets.

Key words: Allergic rhinitis; Mouse; Helios⁺ Foxp3⁺ CD4⁺ T cells; Spleen tissues

Fund programs: Youth Project of National Natural Science Foundation of China (81200730); Scientific Research Project of Liaoning Provincial Department of Education (LK201601); Shenyang Science and Technology Bureau Project (17-230-9-51)

在以辅助性 T 细胞 (Th) 1 或 Th2 为表型的炎症反应中, 调节性 T 细胞 (Treg) 能够抑制其效应 T 细胞, 在变应性鼻炎 (AR) 中起到重要作用^[1]。但一直

以来对 Treg 细胞的评价策略存在差异, 早期研究以 CD25 高表达来评估循环中 Treg 细胞水平^[2], 可后来研究确定一个表达转录因子 Foxp3 但缺乏 CD25 表

达的 T 细胞亚群^[3-4],证实了 CD4⁺ CD25^{hi} 细胞并不能涵盖所有的 Treg 细胞。迄今为止,Treg 最特异的标记物是 Foxp3,其表达与抑制能力有关^[5-6]。Helios 是 Ikaros 转录因子家族的一员,曾被认为特异表达于胸腺衍生的天然 CD4⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞上^[7]。Helios⁺ Foxp3⁺ 在调节自身免疫方面起着重要作用^[8-9]。有研究发现,Foxp3 和 Helios 共表达代表了 Treg 的一个关键功能阶段,现在认为 Helios 是活化 Treg 细胞的标记^[10],并证实 Helios⁺ Foxp3⁺ Treg 较 Helios⁻ Foxp3⁺ Treg 具有更多抑制特性^[11-12]。本研究构建 AR 小鼠模型,检测并探讨 Helios⁺ Foxp3⁺ CD4⁺ T 细胞比例情况及其作用。

1 材料与方法

1.1 模型建立

8 只 6~8 周龄 SPF 级雄性 Balb/c 小鼠,体重 18~20 g,随机分为 AR 组和对照组。AR 组中将 100 μg 鸡卵清蛋白(OVA)和 2 mg 氢氧化铝加入 0.1 ml 生理盐水中,混匀,分别于第 0、7、14 天给予腹腔注射,自第 21 天至第 27 天每日使用 20 μl OVA 生理盐水(50 mg/ml)滴鼻。对照组使用生理盐水替代。使用症状学以及病理学对模型进行评估^[13-14],症状学方面通过喷嚏、挠鼻、流涕进行叠加法记录总分,本研究 AR 组计分均 >5 分即建模成功,对照组均 ≤5 分;病理学方面 AR 组鼠鼻黏膜嗜酸性粒细胞浸润,鼻甲黏膜肿胀,再次印证建模成功,而对照组鼠未见明显嗜酸性粒细胞浸润以及鼻甲黏膜肿胀。

1.2 流式细胞仪检测 Helios⁺ Foxp3⁺ CD4⁺ T 细胞比例

取每组 4 只小鼠脾脏组织,制成单细胞悬液。使用 50 ng/ml 乙酸佛波酯(PMA),1 μg/ml 离子霉素,10 μg/ml 莫能霉素 37 °C 下培养 6 h。加入异硫氰酸荧光素标记的 CD4 (FITC-CD4) 抗体及固定破膜液,

使用别藻青蛋白荧光素标记的 Helios (APC-Helios) 和藻红蛋白荧光素标记的 Foxp3 (PE-Foxp3) 抗体胞内染色,设同型对照管。使用流式细胞仪进行检测,流式细胞分析软件 FlowJo software 7.6 进行分析。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 6.0 软件处理数据。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行 Mann-Whitney U 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

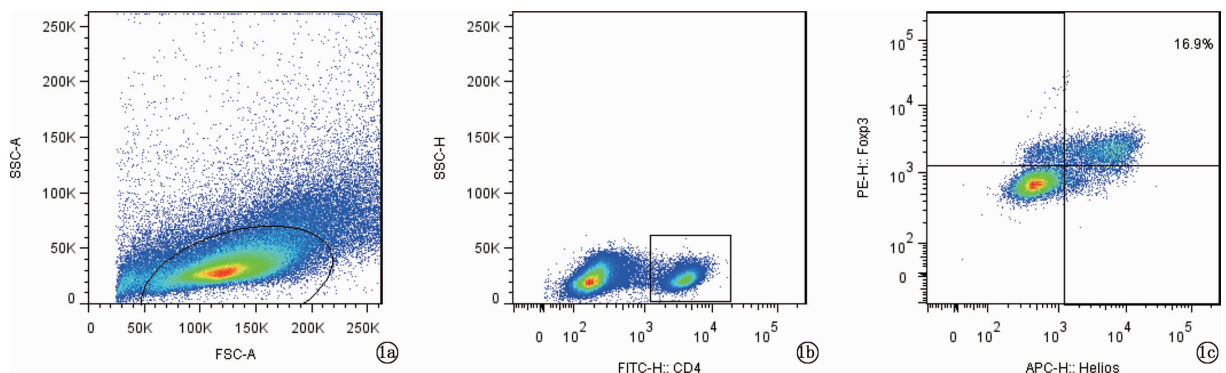
2 结果

使用流式细胞术检测到 AR 组及对照组小鼠脾中均有 Helios⁺ Foxp3⁺ CD4⁺ T 细胞的存在,且 AR 组中其细胞比例低于对照组 [(13.55 ± 0.71)% vs (16.73 ± 0.75)%],差异有统计学意义($P < 0.01$)。流式细胞术分析 AR 组和对照组鼠脾中 Helios⁺ Foxp3⁺ CD4⁺ T 细胞比例见图 1、图 2。

3 讨论

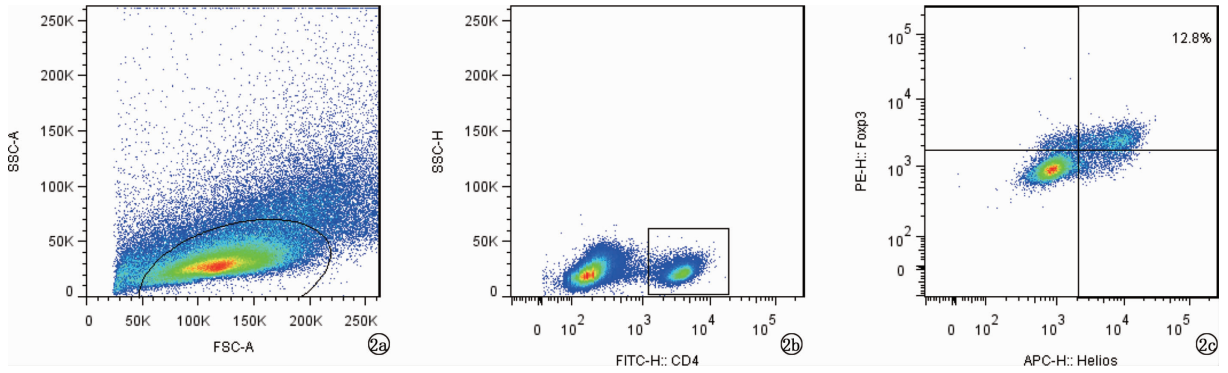
既往认为 AR 是一种主要涉及 Th2 应答并伴 Th1 相对缺乏的过敏反应性疾病^[15],但这种简单的框架模型并不能充分解释 AR 的免疫机制。近年研究提示 Th17、Th9 以及 Treg 细胞均不同程度的参与 AR 的发生发展。Foxp3 是 Treg 细胞的特异性转录因子^[16],研究发现 AR 小鼠鼻黏膜中 Foxp3 mRNA 的表达含量具有明显下降趋势^[13-14],间接提示 Treg 细胞含量的变化情况,但仍非常有必要对 AR 小鼠 Treg 细胞含量进行检测。有研究发现 AR 患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞有下降趋势^[17]。

由于 Treg 细胞评价策略的差异性,有使用 CD4⁺ CD25^{hi}, CD4⁺ Foxp3⁺, CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 来圈定 Treg 细胞,但有研究认为 Foxp3 和 Helios 共表达代表了 Treg 的一个关键功能阶段,并认为 Helios 是活化 Treg 细胞的标记^[10],并证实了 Helios⁺ Foxp3⁺ Treg 较



注:前向角散射光面积(FSC-A),侧向角散射光面积(SSC-A),侧向角散射光高度(SSC-H),异硫氰酸荧光素散射光高度(FITC-H),别藻青蛋白散射光高度(APC-H),藻红蛋白散射光高度(PE-H)。1a:圈定淋巴细胞;1b:圈定 CD4⁺ T 细胞;1c:十字门划定 Helios⁺ Foxp3⁺ CD4⁺ T 细胞;右上象限中的数据代表 Helios⁺ Foxp3⁺ CD4⁺ T 细胞比例。

图 1 流式细胞术分析对照组鼠脾中 Helios⁺ Foxp3⁺ CD4⁺ T 细胞比例



注:前向角散射光面积(FSC-A),侧向角散射光面积(SSC-A),侧向角散射光高度(SSC-H),异硫氰酸荧光素散射光高度(FITC-H),别藻青蛋白散射光高度(APC-H),藻红蛋白散射光高度(PE-H)。2a:圈定淋巴细胞;2b:圈定 CD4⁺T 细胞;2c:十字门划定 Helios⁺Foxp3⁺CD4⁺T 细胞;右上象限中的数据代表 Helios⁺Foxp3⁺CD4⁺T 细胞比例。

图 2 流式细胞术分析 AR 组鼠脾中 Helios⁺Foxp3⁺CD4⁺T 细胞比例

Helios⁻Foxp3⁺Treg 具有更多抑制特性^[11-12]。

故此,我们构建 AR 小鼠模型,使用流式细胞术检测到 AR 小鼠脾组织中存在 Helios⁺Foxp3⁺CD4⁺T 细胞,并且 AR 组中其比例要低于对照组,提示 Helios⁺Foxp3⁺CD4⁺T 细胞在 AR 发生发展过程中起着负性调节的作用。Helios⁺Foxp3⁺CD4⁺T 细胞增多可能会抑制辅助性 T 细胞(Th2)反应,抑制 AR 的症状。在 AR 免疫调节机制中,同样具有负性调节作用的调节性 B 细胞(Breg)细胞与 Treg 细胞之间具有何种联系,它们在 AR 机制中各自以及共同起到何种角色以及它们对 T 细胞分化及增殖起到何种作用有待进一步研究证实。本实验虽首次明确 AR 鼠模型中 Helios⁺Foxp3⁺CD4⁺T 细胞的含量,但其与 Th 众亚群之间的关系如何,如何调节,Helios⁺Foxp3⁺CD4⁺T 细胞到底扮演了何种角色尚待进一步研究证实,其在 AR 中的作用机制研究有待确认,不过随着 Helios⁺Foxp3⁺CD4⁺T 细胞的深入研究,必然会拓宽人们对 AR 发病机制的认识,并为 AR 的靶向治疗提供参考。

参考文献

[1] Xu G, Mou Z, Jiang H, et al. A possible role of CD4⁺CD25⁺T cells as well as transcription factor Foxp3 in the dysregulation of allergic rhinitis[J]. *Laryngoscope*, 2007, 117(5): 876-880.

[2] Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, et al. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood[J]. *J Immunol*, 2001, 167(3): 1245-1253.

[3] Yang HX, Zhang W, Zhao LD, et al. Are CD4⁺CD25-Foxp3⁺ cells in untreated new-onset lupus patients regulatory T cells[J]. *Arthritis Res Ther*, 2009, 11(5): R153.

[4] Zhang B, Zhang X, Tang FL, et al. Clinical significance of increased CD4⁺CD25-Foxp3⁺T cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus[J]. *Ann Rheum Dis*, 2008, 67(7): 1037-1040.

[5] Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺regulatory T cells[J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(4): 330-336.

[6] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3[J]. *Science*, 2003, 299(5609): 1057-1061.

[7] Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, et al. Expression of helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺T regulatory cells[J]. *J Immunol*, 2010, 184(7): 3433-3441.

[8] Alexander T, Sattler A, Templin L, et al. Foxp3⁺Helios⁺regulatory T cells are expanded in active systemic lupus erythematosus[J]. *Ann Rheum Dis*, 2013, 72(9): 1549-1558.

[9] Takatori H, Kawashima H, Matsuki A, et al. Helios enhances treg cell function in cooperation with FoxP3[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2015, 67(6): 1491-1502.

[10] Chen X, Lugt MV, Szabolcs P. Deficiency of Foxp3/Helios co-expressing regulatory T-cells correlates with clinical activity in autoimmunity[J]. *J Immunol*, 2014, 192(1): 184.

[11] Getnet D, Grosso JF, Goldberg MV, et al. A role for the transcription factor Helios in human CD4⁺CD25⁺regulatory T cells[J]. *Mol Immunol*, 2010, 47(7/8): 1595-1600.

[12] Zabransky DJ, Nirschl CJ, Durham NM, et al. Phenotypic and functional properties of Helios⁺regulatory T cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e34547.

[13] 顾兆伟,王韞秀,赵鹤,等. IL-17A 抗体抑制变应性鼻炎鼠模型中 IL-17A 及 ROR γ t 并升高 Foxp3 mRNA 表达[J]. *临床与病理杂志*, 2016, 36(12): 1986-1990.

[14] 宋辉,顾兆伟,赵鹤,等. 卵清蛋白致敏的过敏性鼻炎小鼠鼻黏膜 IL-17 mRNA/蛋白、ROR γ t、Foxp3 mRNA 表达水平的研究[J]. *免疫学杂志*, 2016, 32(1): 60-63.

[15] Malmhäll C, Bossios A, Pullerits T, et al. Effects of pollen and nasal glucocorticoid on FOXP3⁺, GATA-3⁺ and T-bet⁺ cells in allergic rhinitis[J]. *Allergy*, 2007, 62(9): 1007-1013.

[16] Wang SB, Deng YQ, Ren J, et al. Lactoferrin administration into the nostril alleviates murine allergic rhinitis and its mechanisms[J]. *Scand J Immunol*, 2013, 78(6): 507-515.

[17] 余少卿,陈英剑,章捷,等. CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞在变应性鼻炎外周血淋巴细胞中含量的研究[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2011, 25(8): 354-355.