

再灌注模型大鼠谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、一氧化氮合酶(NOS)、SOD 含量,并降低 MDA 表达水平^[13]。土鳖虫能增强缺血再灌注后脑组织中 SOD 和谷胱甘肽(GSH)含量并降低 MDA 的含量^[14]。白芍总苷可以通过提高 GRP78 的表达水平减轻心肌缺血再灌注损伤^[15]。桂枝蒸馏液可以通过降低心肌脂质过氧化物生成并提高 SOD 活力减轻离体灌流鼠心肌缺血再灌注损伤。TNF- α 、IL-10、ICAM-1 等指标主要反映炎症状态,GSH-Px、NOS、SOD、MPO、MDA 等指标主要反映氧化应激状态,caspase-3、Bax mRNA 等指标主要反映细胞凋亡状态。本结果表明,糖痛方可以通过降低肢体缺血再灌注后糖尿病大鼠血浆、肝、肾组织 ICAM-1 和 MPO 的表达水平减轻肝肾组织损伤。结合以往研究结果,其保护作用机制与降低肝肾组织氧化应激、炎症和细胞凋亡密切相关。

参考文献

- 1 安英,杨宁江,李强,等.灯盏花素预适应对大鼠肢体缺血再灌注肝损伤的保护作用[J].实用医学杂志,2013,29(4):543-545
- 2 廉稳,门秀丽,赵利军,等.缺血后处理对大鼠肢体缺血再灌注后肾组织的保护作用[J].中外医学研究,2013,11(19):1-3
- 3 任春久,张瑶,崔为正,等.氧化应激在 2 型糖尿病发病机制中的作用研究进展[J].生理学报,2013,65(6):664-673
- 4 Alipour M, Gholami MR, Jafari AI, et al. Intraperitoneal aminoguanidine improves sciatic nerve ischemia-reperfusion injury in male sprague-dawley rats[J]. Cell Mol Neurobiol, 2011, 31(5): 765-773
- 5 Wang Y, Schmeichel AM, Iida H, et al. Ischemia-reperfusion injury causes oxidative stress and apoptosis of Schwann cell in acute and

- chronic experimental diabetic neuropathy[J]. Antioxid Redox Signal, 2005, 7(11-12): 1513-1520
- 6 冷梅,李红,王晋军,等.肢体缺血再灌注损伤的防治[J].光明中医,2013,28(6):1218-1219
- 7 林庆宾,张俐. CAM-1 在脊髓缺血再灌注损伤中的作用进展[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2009, 17(12): 68-70
- 8 陈宜方,桂定坤,陈建国,等.黄芪水煎剂对肾缺血再灌注损伤大鼠肾小管细胞凋亡的影响[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(6): 1293-1295
- 9 殷涛,毕旭东,庞世刚,等.黄芪对大鼠肝缺血再灌注损伤的影响[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(8): 1368-1371
- 10 陈晚平,杨尽晖,李珂,等.姜黄素对肝缺血再灌注损伤保护作用的研究[J]. 中国普通外科杂志, 2010, 19(1): 37-40
- 11 年建华,陆逸庭,黄华平,等.姜黄素对大鼠肾缺血再灌注损伤及 HIF-1 α 表达的影响[J]. 浙江中西医结合杂志, 2012, 22(12): 943-945
- 12 高伟,肖永庆.川芎内酯 A 预处理对大鼠离体心脏缺血再灌注所致血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(18): 1448-1451
- 13 盛艳梅,孟宪丽,李春雨,等.川芎挥发油对大鼠大脑皮层神经细胞体外存活及脑缺血再灌注损伤的影响[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(3): 536-538
- 14 贺卫和,曾嵘,成细华.土鳖虫提取液对脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2008, 24(4): 43-44
- 15 郭道华,韦颖梅,王小静,等.白芍总苷对大鼠心肌缺血再灌注损伤保护作用及对 GRP78 表达的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010, 8(5): 556-558

(收稿日期:2014-02-22)

(修回日期:2014-03-24)

使用链脲佐菌素造模对 1 型糖尿病大鼠调节性 T 细胞的影响

高永亮 卢觅佳 杨红忠 黄敏聪 宣尧仙

摘要 **目的** 研究使用链脲佐菌素造模 1 型糖尿病大鼠发病机制与调节性 T 细胞(regulatory T cells, Tregs)数量和功能变化的关系。**方法** 使用链脲佐菌素(streptozocin, STZ)对健康 SD 大鼠造模,分别选取造模成功大鼠和健康大鼠各 12 只,各项体征均符合成模标准后,分别选取模型和健康大鼠各 6 只(雌雄各半)解剖,取脾脏、胸腺和外周血使用流式细胞仪检测 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺(Tregs)水平状况,剩余大鼠解剖取脾脏分选 CD4⁺CD25⁺细胞后检测其免疫抑制功能。**结果** 两组大鼠脾脏、胸腺和外周血 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺水平比较无统计学差异($P>0.05$),自体 and 异体大鼠 CD4⁺CD25⁺细胞增殖率比较无统计学差异

基金项目:国家科技重大专项基金资助项目(2011ZX09301-003);浙江省重点实验室专项基金资助项目(2010F10026)

作者单位:310013 杭州,浙江省医学科学院安全性评价研究中心

通讯作者:宣尧仙,电子信箱:nndsve@mail.hz.zj.cn

($P > 0.05$)。结论 使用链脲佐菌素造模的 1 型糖尿病大鼠调节性 T 细胞数量和功能无显著变化,其发病机制与 Tregs 无直接关系。

关键词 1 型糖尿病模型 调节性 T 细胞 免疫磁珠分选技术

[中图分类号] R3 [文献标识码] A

Research of Regulatory T Cells in the Pathogenesis of Type 1 Diabetic Rats Injected with Streptozotocin. Gao Yongliang, Lu Mijia, Yang Hongzhong, et al. Center of Safety Evaluation, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Zhejiang 310013, China

Abstract Objective To research the changes of regulatory T cells in type 1 diabetic rats (using streptozotocin for modeling) and their relationship with the pathogenesis of type 1 diabetic rats. **Methods** Type 1 diabetic rat models were constructed by injection of streptozotocin (STZ) into healthy SD rats. The model ($n = 12$) and healthy ($n = 12$) rats were randomly divided into two groups as model and healthy groups. When all the signs of type 1 diabetes met the requirements, half of the rats of both groups were sacrificed to get the thymus, spleen and peripheral. All samples we got were dealt with flow cytometry to see their levels of $CD4^+CD25^+Foxp3^+$. All the remaining rats were sacrificed to get their spleens. The $CD4^+CD25^+$ T cells were isolated to detect the immunosuppressive function. **Results** No difference was found among the three groups about the levels and function of regulatory T cells ($P > 0.05$). **Conclusion** The pathogenesis of type 1 diabetic rats (using streptozotocin for modeling) has little relationship with regulatory T cells.

Key words Type 1 diabetic models; Regulatory T cells; MACS technology

1 型糖尿病被认为是一种由调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Tregs) 介导并对胰岛 β 细胞造成不可逆转破坏的代谢性疾病^[1]。对于自发性 1 型糖尿病动物模型和人的研究表明 Tregs 在疾病的发生、发展过程中很重要的作用^[2]。1995 年 Sakaguchi 等^[3]报道 $CD4^+CD25^+$ 细胞减少会导致多种自身免疫性疾病,引起了人们对于该类型细胞功能的重视。Tregs 主要包括两类:natural regulatory T cells (nTregs) 和 inducible regulatory T cells (iTregs),这两类细胞分别产生于胸腺和脾脏,它们共同发挥作用保证了机体的免疫稳态,免疫稳态被打破即 Tregs 数量或者功能失衡时会导致自身免疫性疾病的出现,如自发性 1 型糖尿病发生和 Tregs 具有相关性^[4]。使用链脲佐菌素 (streptozocin, STZ) 造模的实验性 1 型糖尿病动物模型能够出现 1 型糖尿病患者的绝大部分典型症状,广泛应用于糖尿病研究之中^[5]。但使用 STZ 造模 1 型糖尿病大鼠致病机制 Tregs 数量和功能的关系并未被完全揭示。本实验在自发性 1 型糖尿病模型与 Tregs 关系研究的基础上,对实验性 1 型糖尿病模型大鼠 Tregs 数量和功能的变化进行了研究,以探讨实验性 1 型糖尿病模型致病机制与 Tregs 数量和功能的关系。

材料与方法

1. 试剂和仪器:链脲佐菌素 (streptozocin, STZ) 购自 Sigma 公司;氯化氨溶液、柠檬酸和柠檬酸三钠购自华东医药公司;FACS 溶血素、1640 培养液、HANKS 缓冲液购自联科生物有限公司;CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学研究所;pH 计购自梅特勒-托利多公司;罗氏卓越型血糖仪和血糖试纸购自 Roche

Diagnostics GmbH 公司;流式细胞仪、破膜试剂盒 (transcription factor suit)、Anti-rat Foxp3⁺ (PE)、Anti-rat CD4⁺ (APC)、Anti-rat CD25⁺ (PE) 购自 BD 公司;酶标仪购自 BioTek 公司;大鼠 $CD4^+CD25^+$ 调节性 T 细胞提取试剂盒、MagCollect 磁性分离仪购自 R&D 公司。

2. 实验动物:试验用无特定病原体 (specific pathogen free), SPF 级 SD 大鼠 30 只,雌雄各半,6~8 周龄,体重 200~250g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司。1 型糖尿病模型大鼠采用一次性大剂量注射 60mg/ml STZ 缓冲液的方法造模。分别选取造模成功大鼠 12 只和健康大鼠 12 只。分组为模型组 12 只、健康对照组 12 只 (各组均雌雄各半)。

3. 流式细胞仪检测胸腺、脾脏和外周血 Tregs 数量:(1) 大鼠胸腺、脾脏和外周血细胞悬液制备:将大鼠麻醉后腹主动脉采血,采血后处死分别取部分胸腺和脾脏,分别放入无菌培养皿中,加入 10ml 平衡盐溶液 (HANKS) 缓冲液;将取出的胸腺和脾脏研磨,过 70 目滤网过滤转至 15ml 的离心管中;1500r/min 离心 5min,去上清后加入 5ml 氯化氨溶液,混匀后静置 10min;加入 10ml 的 PBS 缓冲液,1500r/min 离心 8min;去上清,加 15ml HANKS 缓冲液离心洗涤 1 次,弃上清,PBS 缓冲液悬浮。(2) 流式细胞仪检测:待测悬液加入胞外抗体 Anti-rat CD25⁺ (PE),2~8℃ 孵育 30min。加入 2ml Stain buffer,1500r/min 离心 5min,弃上清;加入 1ml Fix/Perm Buffer,吹散细胞,2~8℃ 孵育 40~50min。加 1ml Perm/Wash Buffer,2~8℃ 下 350×g 离心 6min,弃上清。加 2ml Perm/Wash Buffer,吹散细胞,2~8℃ 下 350×g 离心 6min,弃上清。加 80~100μl Perm/Wash Buffer,吹散细胞,加胞内抗体 Anti-rat Foxp3⁺ (PE),涡旋或振荡 10s,2~8℃ 避光孵育 40~50min。简短振荡,加 2ml Perm/Wash Buffer,350×g 离心 6min,弃上清。加 2ml Perm/Wash Buffer,350×g 离心 6min,弃上清。加 350μl PBS 缓冲液悬浮细胞,使用流式细胞仪进行检测。

4. 免疫磁珠两步法分选 CD4⁺CD25⁺ 细胞及免疫抑制功能检测: (1) 大鼠脾脏细胞悬液制备: 将大鼠麻醉处死, 无菌环境下使用高温消毒器具取部分脾脏, 放入无菌培养皿中, 加入 10ml HANKS 缓冲液; 将取出的脾脏研磨, 过 70 目滤网过滤转至 15ml 的离心管中; 1500r/min 离心 5min, 去上清后加入 5ml 氯化氨溶液, 混匀后静置 10min; 加入 10ml 的 PBS 缓冲液, 1500r/min 离心 8min; 去上清, 加 15ml HANKS 缓冲液离心洗涤 1 次, 弃上清, 用 1 × MagCollect Buffer 悬浮, 调整细胞浓度至 1 × 10⁸/ml。 (2) 免疫磁珠两步法分选 CD4⁺CD25⁺ 细胞: 待分选悬液依次进行磁性分选。首先阴性选择 CD4⁺T 细胞, 将 2 × 10⁸ 个细胞 (2ml) 转移到 5ml 试管中, 分别加入 200μl MagCollect CD4⁺T 细胞抗体和 250μl MagCollect 抗鼠 IgG 磁珠, 依次轻轻混匀, 分别在 2 ~ 8℃ 孵育 15min; 加入 550μl Buffer 轻轻混匀, 调整悬液体积至 3ml, 将试管放于磁体中静置 10min; 当试管在磁体中时用无菌移液管将上清液吸出至于一新的 5ml 试管中, 放于磁体中静置 10min; 取出上清至 15ml 离心管中, 并计数。然后阳性选择 CD4⁺CD25⁺T 细胞, 加入 Buffer 至 15ml, 1100r/min 离心 8min; 去上清, 加 100μl Buffer 混悬细胞, 转移到 5ml 试管中; 每 1 × 10⁷ 个细胞分别加 10μl 生物素标记的抗鼠 CD25 抗体和 10μl MagCollect 抗生物素磁珠, 依次在 2 ~ 8℃ 冰箱中孵育 15min; 加 Buffer 定容至 1ml, 轻轻混匀, 使溶液处于悬浮状态, 将试管放于磁体中静置 6min, 当试管在磁体中时, 用消毒的移液管吸出上清液并去除; 从磁体中取出试管, 加 1ml Buffer 混悬细胞, 重复后从磁体中取出试管, 加 1ml Buffer 混悬细胞, 此为富含 CD4⁺CD25⁺T 细胞的细胞悬液, 进行细胞计数。 (3) CD4⁺CD25⁺ 细胞免疫抑制功能检测 (CCK - 8): CD4⁺CD25⁺T 细胞和 CD4⁻T 细胞使用 30μg/ml 丝裂霉素 C 处理, 每个待测样品分为两组, 每组依照如表 1 分别依次加入所示溶液。

表 1 CCK - 8 试验各组加样流程表

CD4 ⁺ CD25 ⁺ T 细胞 (5 × 10 ³ /孔)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ T 细胞 (5 × 10 ³ /孔)
自体 CD4 ⁺ CD25 ⁻ (5 × 10 ³ /孔)	异体 CD4 ⁺ CD25 ⁻ (5 × 10 ³ /孔)
CD4 ⁻ T 细胞 (5 × 10 ⁴ /孔)	CD4 ⁻ T 细胞 (5 × 10 ⁴ /孔)
Con A (2μg/ml)	Con A (2μg/ml)

72h 后 CCK - 8 检测 CD4⁺CD25⁻T 细胞增殖情况

5. 统计学方法: 使用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析, 实验结果以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 *t* 检验进行数据分析, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 流式细胞仪检测胸腺、脾脏和外周血 Tregs 数量变化: 模型组和健康对照组大鼠胸腺、脾脏、外周血中 CD25⁺Foxp3⁺ 在 CD4⁺ 中的比例情况 (CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺), 未见统计学差异 (*P* > 0.05, 表 2 ~ 表 4, 图 1)。

表 2 大鼠胸腺 CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ 比例 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	雄鼠	雌鼠
模型组	1.647 ± 0.759	1.654 ± 0.209
健康对照组	1.515 ± 0.267	1.685 ± 0.388

表 3 大鼠脾脏 CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ 比例 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	雄鼠	雌鼠
模型组	2.367 ± 1.390	3.345 ± 1.15
健康对照组	2.533 ± 1.514	3.430 ± 1.18

表 4 大鼠外周血 CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ 比例 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	雄鼠	雌鼠
模型组	4.548 ± 1.946	6.590 ± 2.327
健康对照组	5.563 ± 1.175	5.851 ± 2.282

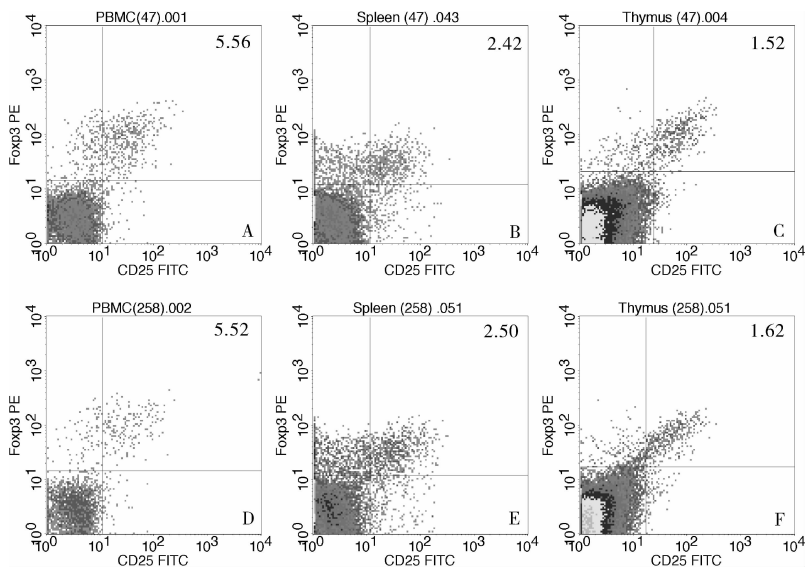


图 1 模型组大鼠外周血 (A)、脾脏 (B) 和胸腺 (C) 及健康对照组大鼠外周血 (D)、脾脏 (E) 和胸腺 (F) CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ 比例图示

2. 免疫磁珠分选 CD4⁺CD25⁺ 细胞及免疫抑制功能检测:模型组和健康对照组脾脏 CD4⁺CD25⁺ 细胞分离提取以后通过 CCK-8 细胞增殖实验 CD4⁺CD25⁻ 细胞增殖率对比来判断 CD4⁺CD25⁺ 细胞的免疫抑制功能,模型组 CCK-8 细胞增殖实验中选取的自体 and 异体 CD4⁺CD25⁻ 细胞在增殖后与健康对照组比较未见统计学差异($P>0.05$)。

表 5 CCK-8 细胞增殖实验统计 CD4⁺CD25⁻ 细胞增殖率(% , $\bar{x} \pm s$)

组别	自体 CD4 ⁺ CD25 ⁻	异体 CD4 ⁺ CD25 ⁻
模型组	102.591 ± 4.205	99.269 ± 6.288
健康对照组	100.000 ± 6.593	100.000 ± 3.143

讨 论

1 型糖尿病被认为是一种由于 Tregs 数量或者功能遭到破坏而引起的自身免疫性疾病。Tregs 被认为在维持免疫稳态、预防自身免疫疾病方面发挥重要的作用,而转录因子 Foxp3 在功能性的 Tregs 发生、维持以及发挥功能上起到关键作用^[6,7]。早期有报道称在糖尿病小鼠(NOD)外周血中占 CD4⁺ 细胞 5%~10% 的 CD4⁺CD25⁺ 会出现数量减少的现象,后续对自发性糖尿病小鼠的系列试验报道表明,Tregs 无论功能还是数量上的破坏都会导致 1 型糖尿病的发生,而 nTregs 和 iTregs 都能阻止疾病的发生^[8,9]。但对糖尿病患者外周血中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 的数量和功能研究表明,CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 的数量并未减少而是功能发生了改变,且 Tregs 数量与年龄、病程具有相关性^[10,11]。但是,对新患者(10 岁左右)的研究表明他们自身的 Tregs 的数量和功能并未发生改变^[12]。因此,自发性 1 型糖尿病和 Tregs 数量、功能的关系并未得到完全的证实,而是提示了两者具有相关性^[13]。

STZ 能够选择性破坏啮齿类动物的胰腺胰岛 β 细胞,从而使实验动物产生糖尿病。本研究首先对使用 STZ 造模后的实验性 1 型糖尿病大鼠和健康大鼠胸腺、脾脏、外周血中 Tregs 的比例进行检测。两组剩余大鼠采用免疫磁珠两步法(阴性选择和阳性选择)分选脾脏 CD4⁺CD25⁺ 细胞,并检测其对 CD4⁺CD25⁻ 细胞增殖能力的抑制作用。文献报道用免疫磁珠两步法提取分离的大鼠脾脏 CD4⁺CD25⁺ 细胞有较好的纯度(87%)和存活率(97%)^[14]。对实验动物进行 Tregs 数量和功能检测,结果表明糖尿病大鼠 Tregs 的功能和数量并未发生改变。笔者并不能完全排除随着病程的进展,模型组大鼠 Tregs 功能和数量会出现差异和改变,但根据目前 STZ 导致大鼠出现糖尿病致病机制的研究并未有明显的与 Tregs 的功能和数量变化相关的提示,模型动物本身的改变

也都是自身病程进展代偿性的结果,而不是由于注射 STZ 后对 Tregs 造成严重影响,进而激发了自身免疫过程导致实验动物出现 1 型糖尿病^[15,16]。本研究结果显示使用 STZ 造模的实验型 1 型糖尿病大鼠致病机制与 Tregs 的数量和功能无直接相关性,与自发性 1 型糖尿病模型和人患者有所区别,有助于阐明 1 型糖尿病致病机制与 Tregs 之间的关系。

参考文献

- 1 Castano L, Eisenbarth GS. Type-1 diabetes; a chronic autoimmune disease of human, mouse, and rat[J]. Annu Rev Immunol,1990, 1 (8):647-679
- 2 Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work? [J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8(7):523-532
- 3 Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Pillars article: immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases[J]. J Immunol, 1995, 155: 1151-1164
- 4 Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, et al. Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease[J]. Immunol Rev, 2006,212:8-27
- 5 Wei M, Ong L, Smith MT, et al. The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes[J]. Heart, Lung and Circulation, 2003, 12(1): 44-50
- 6 Zheng Y, Josefowicz S, Chaudhry A, et al. Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate [J]. Nature, 2010, 463(7282):808-812
- 7 Lindley S, Dayan CM, Bishop A, et al. Defective suppressor function in CD4⁺CD25⁺T-cells from patients with type 1 diabetes [J]. Diabetes,2005,54(1):92-99
- 8 Kukreja A, Cost G, Marker J, et al. Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes [J]. J Clin Invest, 2002,109(1):131-140
- 9 Angelina M, Bilate JL. Induced CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in immune tolerance[J]. Annual Review of Immunology, 2012, 30(1): 733-758
- 10 Todd B, Clive W, Kieran M, et al. No Alterations in the frequency of FOXP3⁺regulatory T-cells in type 1 diabetes[J]. Diabetes, 2007, 56(3):604-612
- 11 Thayer TC, Wilson BS, Mathews CE, et al. Use of NOD mice to understand human type 1 diabetes [J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2010, 39(3): 541-561
- 12 Marek-Trzonkowska N, Mysliwiec M, Siebert J, et al. Clinical application of regulatory T cells in type 1 diabetes[J]. Pediatric Diabetes, 2013, 14(5):322-332
- 13 Yuxia Z, Esther BS, Leonard H. Revisiting regulatory T cells in type 1 diabetes[J]. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes,2012, 19(4): 271-278
- 14 周国庆,唐琴,杨明峰,等.大鼠 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞的分选和提取[J].泰山医学院学报,2012,33(5):325-327
- 15 夏旋,翁建平.链脲佐菌素在糖尿病模型中的应用研究[J]. 国际内科学杂志,2009, 36(9): 540-543
- 16 王洪敏,钟志勇,吴庆洲,等.大鼠糖尿病模型早期病理观察指标的筛选[J]. 广东药学院学报, 2011, 27(1): 86-90

(收稿日期:2014-03-10)
(修回日期:2014-03-18)