

小鼠鼻腔滴入重组人乳铁蛋白对变应性鼻炎的作用及其机制

房瑞平 高红艳 王晓丽 杨晓萍 李莉

摘要 目的 研究小鼠鼻腔滴入重组人乳铁蛋白对变应性鼻炎的防治作用,并探讨其可能的分子机制。**方法** 采用卵清蛋白建立 BALB/c 小鼠变应性鼻炎动物模型,用苏木素-伊红,高碘夫稀,肥大细胞染色方法分析鼻黏膜嗜酸性粒细胞,杯状细胞和肥大细胞浸润的情况。用荧光定量 RT-PCR 和酶联免疫方法检测小鼠鼻腔中 T 淋巴细胞亚群转录因子和细胞因子以及乳铁蛋白基因和蛋白的表达水平。用 Spearman 分析鼻腔中的乳铁蛋白表达水平和嗜酸性粒细胞的相关性。**结果** 与正常小鼠相比,嗜酸性粒细胞,杯状细胞和肥大细胞的数量, Th2、Th17、Treg 基因和蛋白表达水平在变应性鼻炎小鼠鼻腔显著增加($P < 0.05$),但是在卵清蛋白激发前和激发后鼻腔给予重组人乳铁蛋白后均显著减少($P < 0.05$)。Th1 相关基因和蛋白表达水平在正常小鼠和模型小鼠之间差异无统计学意义,但是给予重组人乳铁蛋白治疗后明显上调($P < 0.05$)。与正常小鼠相比,内源性乳铁蛋白的基因和蛋白表达水平在变应性鼻炎小鼠鼻腔显著下调($P < 0.05$),但是给予重组人乳铁蛋白治疗后明显上调($P < 0.05$)。Spearman 相关分析显示乳铁蛋白表达水平和嗜酸性粒细胞数量呈负相关($r = -0.920$, $P < 0.05$)。**结论** 内源性乳铁蛋白在变应性鼻炎小鼠鼻腔中表达下调,该蛋白表达不足可能与变应性鼻炎的发生和发展相关。外源性乳铁蛋白抑制了小鼠变应性鼻炎的炎症,其机制可能与增强了内源性乳铁蛋白的表达,促进了 Th1 细胞活性和抑制 Th2 以及 Th17 细胞反应有关。

关键词 变应性鼻炎 乳铁蛋白 嗜酸性粒细胞 细胞因子 T 细胞

中图分类号 R76 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.03.039

Effect of Intranasal Administration Recombinant Human LF and Its Underlying Mechanisms on AR in BALB/c Mice. Fang Ruiping, Gao Hongyan, Wang Xiaoli, et al. Department of ENT, Xi'an Children's Hospital, Shaanxi 710003, China

Abstract Objective To study the effect of intranasal administration recombinant human (rh) LF and its underlying mechanisms on AR in BALB/c mice. **Methods** BALB/c mice were used to establish allergic rhinitis which was induced by ovalbumin. The infiltration of eosinophils, goblet cells, and mast cells in nasal mucosa was examined by hematoxylin&eosin, periodic acid-Schiff, mast cell staining, respectively. The expression levels of T-subsets related transcription factors and cytokines and lactoferrin mRNA and protein in the nasal mucosa were detected using real time RT-PCR and enzyme-linked immunosorbent assay among controls and allergic rhinitis, respectively. The method of Spearman was used to analyzed the relationship between lactoferrin expression and the number of eosinophils. **Results** We found that the number of eosinophils, goblet cells, and mast cells, as well as mRNA and protein expression of type 2 helper T (Th2), Th17, and regulatory T (Treg) cells in the nasal cavity, were significantly up-regulated in AR mice compared with the controls ($P < 0.05$). Conversely, administration of rhLF prior to or after intranasal ovalbumin challenge markedly down-regulated these same parameters ($P < 0.05$). Th1-specific mRNA and protein expression in the nasal cavity of the controls was not different from that in AR mice, but expression significantly increased with rhLF treatment ($P < 0.05$). The mRNA and protein expression of endogenous LF in the nasal cavity was significantly down-regulated in AR mice compared with the controls ($P < 0.05$). However, after rhLF treatment, endogenous LF mRNA and protein expression was significantly upregulated ($P < 0.05$). There was a negative correlation between the number of inflammatory cells and lactoferrin expression levels ($r = -0.920$, $P < 0.05$). There was a negative correlation between the number of eosinophils and lactoferrin expression levels ($r = -0.920$, $P < 0.05$). **Conclusion** The expression levels of lactoferrin mRNA and protein were obviously decreased in mice of allergic rhinitis. It indicates that lactoferrin may be involved in the pathogenesis of allergic rhinitis. Exogenous rhLF inhibited allergic inflammation in AR mice, most likely by promoting the endogenous LF expression and skewing T cells to a Th1 but not a Th2 and Th17 phenotype in the nasal mucosa.

作者单位:710003 陕西,西安市儿童医院耳鼻喉科(房瑞平、王晓丽、杨晓萍、李莉),麻醉科(高红艳)

通讯作者:高红艳,电子信箱:xafangruiping@163.com

Key words Allergic rhinitis; Lactoferrin; Eosinophils; Cytokines; T - cell subsets

变应性鼻炎是以T细胞亚群失衡、嗜酸性粒细胞和肥大细胞浸润等为主要病理特征的病变,其中T细胞亚群在免疫应答中发挥核心作用。CD4⁺T细胞亚群根据它们的表型和功能特性可分为I型辅助性T细胞(Th1),Th2,以及调节性T细胞(Treg)。这些效应T细胞亚群调节变应性疾病主要是通过分泌特异性细胞因子如IFN-γ、IL-5、IL-17、IL-10和TGF-β1,也可以通过分泌其他的非特异性的细胞因子如TNF-α等^[1,2]。国外一项研究发现变应性鼻炎患者血清中乳铁蛋白的水平较正常人降低,并且和疾病的严重程度呈正相关,这提示外周血乳铁蛋白表达不足可能参与了变应性鼻炎的发生和发展^[3]。通过给予外源性的乳铁蛋白,以补充内源性乳铁蛋白的分泌不足,能否逆转变应性鼻炎的进程,国内外还没有进行相关的研究和报道。鉴于乳铁蛋白具有抗炎和免疫调节的性能,以及能调节生理和病理条件下Th1和Th2免疫反应,通过小鼠变应性鼻炎动物模型调查其在变应性反应中可能的调节作用,探讨其潜在效应机制。

材料与方法

1. 材料:(1)实验动物和实验分组:5~6周龄SPF级BALB/c小鼠(20~27g)购自笔者医院实验动物中心。40只雄性小鼠随即分为正常对照组、模型组、预防组和治疗组,每组10只小鼠。饲养条件:每笼5只,室温20~28℃,相对湿度40%~80%,噪声<60db。所有使用动物都按照笔者医院动物管理和使用委员会相关原则来实验。(2)主要试剂:卵清蛋白(OVA)购自美国Sigma公司;苏木素和伊红染液购自上海碧云天生物技术有限公司;Trizol购自美国Invitrogen公司;DEPC购自武汉谷歌生物技术有限公司;引物购自上海生物有限工程公司设计并合成;DNA Marker I购自北京天根生化科技有限公司;ELISA检测试剂盒购自武汉博士德生物有限公司;Rever Tra Ace RT Kit购自日本Toyobo公司;Rever Tra Ace qPCR Kit购自日本Toyobo公司;SPSS Statistics 19.0购自美国IBM公司;重组人乳铁蛋白购自美国PeproTech公司;肥大细胞试剂盒购自福州迈新生物技术公司。

2. 方法:(1)小鼠变应性鼻炎模型的建立:40只雄性小鼠随机分为正常对照组(A组)和模型组(B组),乳铁蛋白激发前24h给予预防组(C组),乳铁

蛋白激发后6h给予治疗组(D组),每组10只小鼠。参照文献方法用卵清蛋白(ovlbumin, OVA)进行变应原致敏和激发,建立小鼠变应性鼻炎模型^[4]。(2)鼻腔灌洗:正常对照组和模型组随机选择5只小鼠。小鼠先用1%戊巴比妥钠50mg/kg行腹腔麻醉注射。在小鼠深度麻醉后行颈部气管切开,用1ml注射器(针尖磨圆钝)从气管的开口沿着前鼻孔的方向插入到后鼻孔。每个鼻孔轻轻灌注1ml无菌生理盐水中,5天后,从前鼻孔收集灌洗液。然后将收集的鼻腔灌洗液以12000r/min速度离心10min,将所得上清储存于-20℃冰箱中,以备酶联免疫吸附法(ELISA)检测其中乳铁蛋白的浓度。细胞因子的检测方法为ELISA。鼻腔灌洗实验完成后,处死小鼠。(3)鼻腔灌洗液细胞因子测量:用于检测鼻腔灌洗液中乳铁蛋白浓度的酶联免疫吸附测定试剂盒购自中国武汉博士德生物技术有限公司,均为检测小鼠用。ELISA试剂盒的检测敏感度<2pg/ml。操作方法严格按照试剂盒提供的说明书来进行,本实验采用双抗体夹心法。(4)组织处理和HE染色:鼻黏膜组织病理学改变分别用苏木素-伊红染色显示嗜酸性粒细胞,高碘稀夫染色显示杯状细胞和黏液细胞,肥大细胞染色显示浸润肥大细胞。每个小鼠选择鼻腔解剖结构相似切片(连续4张)进行观察分析,嗜酸性粒细胞以每平方毫米鼻黏膜固有层内细胞个数表示(N/mm²),取4个高倍视野的平均值。杯状细胞以每mm基膜上杯状细胞个数表示(N/mm),肥大细胞以每高倍视野下肥大细胞个数表示(N/HP)。(5)总RNA提取和实时定量RT-PCR:在解剖显微镜下,用微型有齿镊子剥离小鼠鼻黏膜,将其立即置于5ml匀浆器中研磨,直至肉眼无明显组织团块。取2μl RNA直接在分光光度计上测RNA浓度,并将所有待测样品RNA浓度全部调整到0.5μg/μl,-70℃保存。检测目的基因的表达水平,按照以前报道的方法^[4]。目的基因相对表达数据的分析计算用ABI 7500序列检测系统软件(Applied Biosystems)上自带的2-ΔΔCT法自动完成。

3. 统计学方法:采用SPSS 19.0统计软件分析,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组结果先用非参数的Kruskal-Wallis检验,如果差异有统计性意义,然后用Mann-Whitney U进行两两比较。用Spearman相关分析鼻腔中的乳铁蛋白表达水平和嗜酸性粒细胞

的相关性,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 鼻腔重组的乳铁蛋白对鼻黏膜中浸润的嗜酸性粒细胞数量的影响:HE染色证实模型组小鼠鼻黏膜中有明显的嗜酸性粒细胞。该细胞主要位于黏膜固有层,少数分布在上皮之间,胞质染成红色。此外还可见淋巴细胞和单核细胞等其他炎性细胞。正常

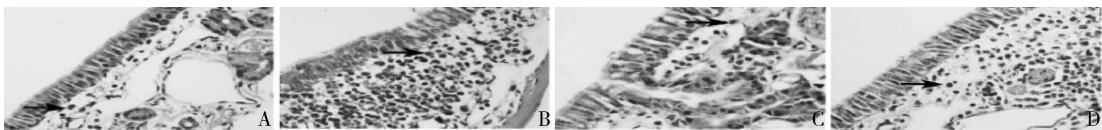


图1 鼠鼻黏膜HE染色结果($\times 400$)

A. 对照组;B. 模型组;C. 预防组;D. 治疗组

表1 各组嗜酸性粒细胞数量($/\text{mm}^2$)

组别	<i>n</i>	嗜酸性粒细胞
对照组	5	5.29 ± 0.50
模型组	5	$92.35 \pm 8.24^*$
预防组	5	$35.78 \pm 3.29^{*\#}$
治疗组	5	$54.68 \pm 5.21^{*\#}\Delta$

与对照组相比,^{*} $P < 0.05$;与模型组相比,[#] $P < 0.05$;与预防组相比,^{\Delta} $P < 0.05$

对照组小鼠黏膜固有层仅有极少数散在分布的嗜酸性粒细胞。和正常对照组相比,模型组小鼠鼻黏膜中嗜酸性粒细胞显著增加,伴有相对较多的淋巴细胞和单核细胞等,另外有少许上皮损伤($P < 0.05$)。鼻腔滴入重组的乳铁蛋白后,小鼠鼻黏膜中嗜酸性粒细胞明显减少,重组的乳铁蛋白激发前滴入较激发后滴入效果更加明显($P < 0.05$,图1,表1)。

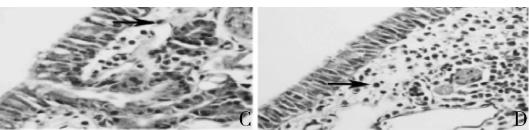


图2 4组小鼠鼻黏膜PAS染色结果($\times 400$)

A. 对照组;B. 模型组;C. 预防组;D. 治疗组

表2 4组小鼠鼻黏膜杯状细胞数量($/\text{mm}^2$)

组别	<i>n</i>	杯状细胞
对照组	5	7.08 ± 0.68
模型组	5	$26.84 \pm 2.35^*$
预防组	5	$12.89 \pm 1.34^{*\#}$
治疗组	5	$19.08 \pm 1.86^{*\#}\Delta$

与对照组相比,^{*} $P < 0.05$;与模型组相比,[#] $P < 0.05$;与预防组相比,^{\Delta} $P < 0.05$

细胞的数量:杯状细胞胞质染成紫红色。正常对照组小鼠黏膜上皮仅有极少数散在分布的杯状细胞。和正常对照组相比,模型组小鼠鼻黏膜中杯状细胞不仅数量显著增加,而且胞质明显增生肥厚,部分杯状细胞呈现典型的高脚杯状($P < 0.05$)。鼻腔滴入重组的乳铁蛋白后,小鼠鼻黏膜中杯状细胞明显减少,而且重组的乳铁蛋白激发前滴入较激发后滴入效果更加明显($P < 0.05$,图2,表2)。

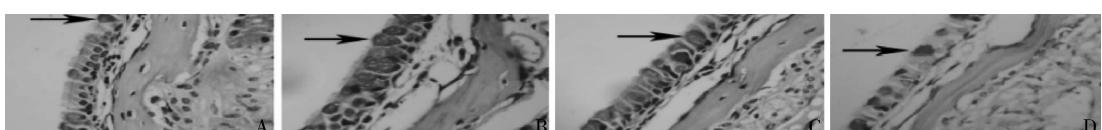


图3 4组小鼠鼻黏膜肥大细胞染色结果($\times 400$)

A. 对照组;B. 模型组;C. 预防组;D. 治疗组

表3 4组小鼠鼻黏膜肥大细胞数量($/\text{mm}^2$)

组别	<i>n</i>	肥大细胞
对照组	5	7.08 ± 0.68
模型组	5	$26.84 \pm 2.35^*$
预防组	5	$12.89 \pm 1.34^{*\#}$
治疗组	5	$19.08 \pm 1.86^{*\#}\Delta$

与对照组相比,^{*} $P < 0.05$;与模型组相比,[#] $P < 0.05$;与预防组相比,^{\Delta} $P < 0.05$

肥大细胞的数量:肥大细胞胞质染成深紫色。正常对照组小鼠黏膜上皮下仅有极少数散在分布的肥大细胞。和正常对照组相比,模型组小鼠鼻黏膜中肥大细胞显著增加,细胞质内颗粒明显增多,而且堆积的肥大细胞多分布在嗅觉神经纤维和血管周围($P < 0.05$)。鼻腔滴入重组的乳铁蛋白后,小鼠鼻黏膜中肥大细胞明显减少,而且重组的乳铁蛋白激发滴入较激发后滴入效果更加明显($P < 0.05$,图3,表3)。

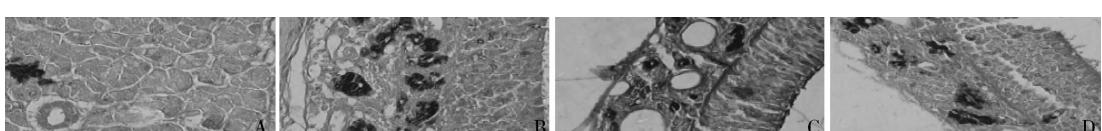


图4 4组小鼠鼻黏膜肥大细胞染色结果($\times 400$)

A. 对照组;B. 模型组;C. 预防组;D. 治疗组

表 3 4 组小鼠鼻黏膜肥大粒细胞数量 (/mm²)

组别	n	肥大粒细胞
对照组	5	3.96 ± 0.35
模型组	5	26.79 ± 2.15 *
预防组	5	5.05 ± 0.48 * #
治疗组	5	10.59 ± 1.02 * # Δ

与对照组相比, * P < 0.05; 与模型组相比, # P < 0.05; 与预防组相比, Δ P < 0.05

4. 鼻腔重组的乳铁蛋白对鼻腔中不同细胞因子的效果: 和正常对照组相比, 鼻腔灌洗液中 IFN - γ

表 4 4 组小鼠鼻腔灌洗液中细胞因子表达水平 (pg/ml)

组别	IFN - γ	IL - 5	IL - 10	IL - 17	TGF - β1	LF
对照组	16.79 ± 1.59	7.25 ± 0.70	38.79 ± 3.69	6.28 ± 0.60	66.84 ± 6.36	46.37 ± 4.52
模型组	27.05 ± 2.52 *	31.54 ± 3.28 *	84.96 ± 8.22 *	18.39 ± 1.65 *	141.25 ± 12.39 *	32.59 ± 3.08 *
预防组	40.28 ± 3.86 * #	9.56 ± 0.94 * #	42.56 ± 4.08 * #	7.25 ± 0.71 * #	78.26 ± 7.51 * #	72.12 ± 7.03 * #
治疗组	36.22 ± 3.42 * # Δ	18.96 ± 1.75 * # Δ	61.29 ± 6.06 * # Δ	13.88 ± 1.25 * # Δ	116.89 ± 10.28 * # Δ	39.89 ± 3.84 * # Δ

与对照组相比, * P < 0.05; 与模型组相比, # P < 0.05; 与预防组相比, Δ P < 0.05

5. 鼻腔重组的乳铁蛋白对鼻黏膜中 T 细胞细胞因子和转录因子的不同效应: 小鼠鼻黏膜中 Th1 相关的细胞因子和转录因子 (IFN - γ 和 T - bet) 在正常对照组和模型组表达相似, 但是经过鼻腔重组的乳铁蛋白的治疗后进一步上调, 而且激发前给予效果更加明显 (P < 0.05)。和正常对照组相比, Th2 相关的细胞因子和转录因子 (IL - 5 和 GATA - 3), Th17 相关的细胞因子和转录因子 (IL - 17 和 ROR - c), Treg 相关

水平在模型组显著上调, 经过鼻腔重组的乳铁蛋白的治疗后进一步上调, 而且激发前给予效果更加明显 (P < 0.05)。和正常对照组相比, 小鼠鼻腔灌洗液中细胞因子 IL - 5、IL - 10、IL - 17 和 TGF - β1 水平在模型组显著上调, 但经过鼻腔重组的乳铁蛋白的治疗后明显下降, 而且激发前给予抑制效果更加明显 (P < 0.05)。与上述因子相反, 和正常对照组相比, 鼻腔灌洗液中乳铁蛋白表达水平在模型组显著下调, 经过鼻腔重组的乳铁蛋白的治疗后表达上调, 而且激发前给予促进作用更加明显 (P < 0.05, 表 4)。

表 5 小鼠鼻黏膜中 T 细胞细胞因子和转录因子基因的表达水平

组别	IFN - γ	T - bet	IL - 5	GATA - 3	IL - 17	ROR - c	IL - 10	Foxp3	TGF - β1	LF
对照组	1.18 ± 0.10	1.16 ± 0.10	1.01 ± 0.10	1.25 ± 0.12	1.02 ± 0.10	1.00 ± 0.10	1.03 ± 0.10	1.18 ± 0.12	0.98 ± 0.08	1.18 ± 0.11
模型组	1.42 ± 0.12 *	1.51 ± 0.14 *	4.02 ± 0.38 *	6.75 ± 0.62 *	3.89 ± 0.36 *	6.02 ± 0.58 *	3.68 ± 0.34 *	1.79 ± 0.16 *	4.84 ± 0.46 *	0.57 ± 0.05 *
预防组	2.88 ± 0.26 * #	2.84 ± 0.25 * #	0.88 ± 0.06 * #	1.95 ± 0.18 * #	2.29 ± 0.20 * #	2.05 ± 0.18 * #	2.59 ± 0.24 * #	1.06 ± 0.10 * #	1.01 ± 0.10 * #	1.62 ± 0.15 * #
治疗组	1.77 ± 0.16 * # Δ	2.45 ± 0.22 * # Δ	1.82 ± 0.17 * # Δ	4.66 ± 0.43 * # Δ	2.96 ± 0.25 * # Δ	3.89 ± 0.36 * # Δ	2.08 ± 0.18 * # Δ	1.43 ± 0.12 * # Δ	1.15 ± 0.11 * # Δ	1.14 ± 0.12 * # Δ

与对照组相比, * P < 0.05; 与模型组相比, # P < 0.05; 与预防组相比, Δ P < 0.05

6. 相关性分析: 小鼠鼻黏膜中嗜酸性粒细胞和不同 T 细胞亚群的转录因子表达水平的 Spearman 相关性分析。小鼠鼻黏膜中嗜酸性粒细胞和 Th2 转录因子 GATA - 3 的表达水平呈正相关并且差异有统计学意义 ($r = 0.947, P < 0.05$)。和 Th17 转录因子 ROR - c 的表达水平呈现正相关并且差异有统计学意义 ($r = 0.935, P < 0.05$)。和 Treg 转录因子 Foxp3 的表达水平呈现正相关并且差异有统计学意义 ($r = 0.683, P < 0.05$)。和 Th1 转录因子 T - bet 的表达水平不相关 ($r = 0.084, P > 0.05$)。

的细胞因子和转录因子 (IL - 10、Foxp3 和 TGF - β1) 在模型组明显上调, 但经过鼻腔重组的乳铁蛋白的治疗后明显下降, 而且激发前给予抑制效果更加明显 (P < 0.05)。和正常对照组相比, 鼻腔鼻黏膜中乳铁蛋白表达水平在模型组显著下调, 经过鼻腔重组的乳铁蛋白的治疗后表达上调, 而且激发前给予促进作用更加明显 (P < 0.05, 表 5)。

讨 论

重组乳铁蛋白在卵清蛋白激发前鼻腔给入时, 可以预先和致敏的淋巴细胞表面的乳铁蛋白受体结合, 抑制敏感的淋巴细胞的活化及 IL - 5 和 IL - 17 等炎性因子的释放, 因而进一步减轻炎症程度。相反, 当重组乳铁蛋白在卵清蛋白激发后鼻腔给入时, 活化的 Th2 和 Th17 细胞释放大量的炎性因子促进炎症级联反应, 但是乳铁蛋白对这些已经释放出的炎性介质没有抑制作用。此外, 呼吸道上皮也存在乳铁蛋白受体, 可以抑制金属氧化物导致的气道氧化性损伤。乳

铁蛋白可以通过和活化的淋巴细胞以及气道上皮细胞上的乳铁蛋白受体调节鼻黏膜免疫反应,但是这需要通过检测小鼠鼻黏膜上乳铁蛋白受体的表达情况进一步证实。

变应性鼻炎是一种适应性免疫反应性疾病。CD4⁺T 细胞在免疫应答中发挥核心和关键作用。既往研究普遍认为变应性鼻炎是 Th1 和 Th2 比例失衡而以 Th2 为主的变应性疾病^[5,6]。Th1 主要分泌 IFN-γ 介导细胞免疫反应,而 Th2 主要通过分泌 IL-4、IL-5 和 IL-13 等细胞因子介导体液免疫反应,而且体内和体外研究均证实 Th1 和 Th2 细胞在功能上相互抑制^[7-9]。笔者当前研究发现 Th1 (IFN-γ 和 T-bet) 基因表达在模型组比正常对照组有轻微上调,但是没有明显差异,这和以前研究结果一致。Th2 在促进变应性炎症方面发挥了中心作用,其机制包括诱导 B 细胞产生特异性的 IgE,肥大细胞和嗜酸性粒细胞分化,迁移到外周血,并浸润外周组织。IL-5 在炎症后期发挥重要作用。和嗜酸性粒细胞不同,肥大细胞主要是在过敏性炎症阶段起作用。肥大细胞一旦激活,将会释放出多种大量的炎性介质,包括组胺、白三烯、前列腺素 D₂,促进血管渗透性,鼻腔溢液增加^[10]。

但是近来研究发现,IL-17 还促进了变应性疾病的发生和发展,并与糖皮质激素抵抗激素密切相关^[11]。和以前研究结果相似,笔者当前研究发现,嗜酸性粒细胞和肥大细胞数量在小鼠变应性鼻炎鼻黏膜中均显著增加,并且和 Th2 和 Th17 有关的细胞因子的表达呈正相关。经过重组的乳铁蛋白治疗后嗜酸性粒细胞明显减少。减少的嗜酸性粒细胞可能和下调的 IL-5 和 IL-17 细胞因子表达有关^[12]。笔者的研究也表明,与正常小鼠相比,IL-17 和 TGF-β1 基因的表达在变应性鼻炎小鼠显著增加。然而, Th17 和乳铁蛋白之间的关系以前还没有相关研究和报道。笔者首次发现乳铁蛋白显着降低 Th17 细胞 (IL-17 和 ROR-C) 基因的表达,但乳铁蛋白下调 IL-17 的具体机制并不清楚,可能通过与 Th17 细胞上乳铁蛋白受体来实现,但这需要进一步研究证实。

组成 CD4⁺T 细胞亚群之一的调节性 T 细胞 (Treg),表达特定的转录因子 Foxp3,通过分泌抑制性细胞因子 IL-10 或者 TGF-β1 调节黏膜局部的 Th1、Th2 和 Th17 的功能,在预防免疫激活和下调全身以及组织特异性自身免疫性疾病和炎性病变等黏膜病变中起着至关重要的作用。Treg 可以分为自然

发生和诱导发生两种形式,前者在胸腺形成,后者在外周组织在 IL-10 或者 TGF-β1 的刺激下诱导生成^[13]。虽然最初认为 IL-10 主要由 Th2 分泌,可以抑制 Th1 的分化和发展。但是随后的研究发现,IL-10 与 IL-5、IL-13 等其他 Th2 细胞因子的功能显著不同。IL-10 最重要的功能是诱导调节性 T 细胞的形成,进而抑制炎症和免疫反应^[13,14]。更为重要的是,变应性鼻炎患者外周血减少的是诱导形成的 Treg,而不是自然发生的 Treg^[14]。在当前的研究中,笔者发现 IL-10 和 Foxp3 的基因表达在变应性鼻炎小鼠中显著上调,但是经过重组的乳铁蛋白治疗后明显下调,这提示乳铁蛋白在体内可以抑制调节性 T 细胞的表达。笔者的研究结果和以前体外实验结构一致,即调节性 T 细胞对乳铁蛋白非常敏感,高浓度的乳铁蛋白抑制调节性 T 细胞的表达,而低浓度的乳铁蛋白不抑制调节性 T 细胞的表达^[10]。下调的 IL-10 水平可能和抑制的 Th2 和 Treg 功能有关,因为它们均是 IL-10 的重要来源。此外,笔者进一步发现小鼠变应性鼻炎鼻黏膜中嗜酸性粒细胞数量和 Treg 表达成正相关,表明炎症局部增加的 Treg 有助于减轻炎性反应。

树突状细胞 (DC) 在诱导 T 细胞的免疫反应中发挥了重要的作用,是启动初始免疫反应的最重要的抗原递呈细胞 (APC)。但是树突状细胞抗原递呈的能力,依赖于它们的活化和成熟状态。而乳铁蛋白可以诱导由成熟的单核细胞分化而来的 MoDCs 表型和功能的成熟。由于抗原递呈细胞在诱导免疫方面的重要作用,而乳铁蛋白可以促进抗原递呈细胞迁移、募集、成熟,抑制调节性 T 细胞,这表明乳铁蛋白可以加强抗原特异性免疫反应。的确,小鼠同时给予乳铁蛋白与抗原卵清蛋白可以增强小鼠特异性免疫反应,主要产生抗原特异性的 IFN-γ,同时下调 IL-4 和 IL-10 的表达^[10]。此外,笔者还进一步研究了重组乳铁蛋白(外源性的重组乳铁蛋白)对变应性鼻炎小鼠鼻腔乳铁蛋白(内源性的重组乳铁蛋白)表达的影响。乳铁蛋白有两种存在形式,即分泌型 (sLF, 存在体液中) 和细胞内型 (DeltaLF)。基因芯片研究提示乳铁蛋白这两种存在形式在免疫调节,细胞生长和分化等方面有不同的信号途径,提示它们的功能不同^[15]。笔者研究发现,与正常小鼠相比,两种形式的乳铁蛋白(腔灌洗液中和黏膜中)在变应性鼻炎小鼠中的表达均明显下降,但是经乳铁蛋白治疗后均显著提高。这表明外源性乳铁蛋白可以诱导内源性的乳铁蛋白

表达,但其机制需要进一步研究。

综上所述,变应性鼻炎是以 Th2 细胞和 Th17 细胞混合反应为特点的免疫反应,伴随 Th1 相对不足。鼻腔局部给予外源性的乳铁蛋白减轻了变应性鼻炎小鼠的鼻腔炎症。外源性的乳铁蛋白不仅上调了内源性乳铁蛋白的表达,而且使变应性鼻炎鼻黏膜局部 T 细胞免疫反应由 Th2 和 Th17 为主向 Th1 细胞反应转化。由于其抑制特性,乳铁蛋白可能在未来作为一种新的变应性鼻炎的预防和治疗策略。

参考文献

- 1 Quan SH, Zhang YL, Han DH, et al. Contribution of interleukin 17A to the development and regulation of allergic inflammation in a murine allergic rhinitis model [J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2012, 108 (5): 342–350
- 2 Mo JH, Kang EK, Quan SH, et al. Anti-tumor necrosis factor-α treatment reduces allergic responses in an allergic rhinitis mouse model [J]. Allergy, 2011, 66(2): 279–286
- 3 Choi GS, Shin SY, Kim JH, et al. Serum lactoferrin level as a serologic biomarker for allergic rhinitis [J]. Clin Exp Allergy, 2010, 40(3): 403–410
- 4 Mo JH, Kang EK, Quan SH, et al. Anti-tumor necrosis factor-α treatment reduces allergic responses in an allergic rhinitis mouse model [J]. Allergy, 2011, 66(2): 279–286
- 5 娄鸿飞,付玉静,王成硕,等.脐带血 Th1/Th2 细胞失衡与母亲变应性鼻炎及婴幼儿特应性皮炎的相关性研究 [J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2014,5:390–394
- 6 刘卫卫,王洪琴,李健,等.外源性 IL-10 对变应性鼻炎大鼠 Th 细胞和 Th17 细胞相关因子表达的影响 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2014,11:839–843
- 7 肖二彬,赵宝建,张驰,等.脂肪间充质干细胞可调节变应性鼻炎 T 细胞的免疫状态 [J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(10): 1373–1381
- 8 李林格,冯娟,胡斌,等.实验变应性鼻炎模型小鼠构建以及与 Th1/Th2 失衡的相关性 [J]. 中国组织工程研究, 2015, 40: 6515–6519
- 9 Lu Y, Sjostrand M, Malmhall C, et al. New production of eosinophils and the corresponding TH1/TH2 balance in the lungs after allergen exposure in BALB/c and C57BL/6 mice [J]. Scand J Immunol, 2010, 71(3): 176–185
- 10 Siracusa MC, Kim BS, Spergel JM, et al. Basophils and allergic inflammation [J]. J Allergy Clin Immunol, 2013, 132(4): 789–801
- 11 Quan SH, Zhang YL, Han DH, et al. Contribution of interleukin 17A to the development and regulation of allergic inflammation in a murine allergic rhinitis model [J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2012, 108 (5): 342–350
- 12 Ouyang YH, Miyata M, Hatushika K, et al. TGF-β signaling may play a role in the development of goblet cell hyperplasia in a mouse model of allergic rhinitis [J]. Allergol Int, 2010, 59(3): 1–7
- 13 Josefowicz SZ, Nieuwland RE, Kim HY, et al. Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation [J]. Nature, 2012, 482(7385): 395–399
- 14 Han D, Wang C, Lou W, et al. Allergen-specific IL-10-secreting type I T regulatory cells, but not CD4(+)CD25(+)Foxp3(+)T cells, are decreased in peripheral blood of patients with persistent allergic rhinitis [J]. Clin Immunol, 2010, 136(2): 292–301
- 15 Kim B, Kang S, Kim SJ. Genome-wide pathway analysis reveals different signaling pathways between secreted lactoferrin and intracellular delta-lactoferrin [J]. PLoS One, 2013, 8(1): e55338

(收稿日期:2016-08-16)

(修回日期:2016-08-25)

不同血液净化方式对中分子及小分子物质的清除效果研究

聂丽敏 闫康 张国欣 刘娜 殷玉棉 薛兰芬

摘要 目的 观察不同血液净化方式对中分子尿毒症毒素 β_2 -微球蛋白 (β_2 -MG)、甲状旁腺素 (PTH) 等的清除效果,为临床合理选择尿毒症患者血液净化方式提供依据。**方法** 研究是 64 例在笔者医院进行血液净化治疗的尿毒症患者,同时根据血液净化方式的差异进行分组:单纯血液透析组 (HD, n = 30), 血液透析合并血液灌流组 (HD + HP, n = 15), 血液透析滤过组 (HDF, n = 19)。采集治疗前后患者血清,ELISA 法检测 β_2 -MG、PTH 水平以评价不同净化方式对中分子尿毒症毒素的清除率;

作者单位:050011 石家庄市第一医院肾内科(聂丽敏、张国欣、刘娜、殷玉棉、薛兰芬);050011 石家庄市第三医院心功能室(闫康)
通讯作者:薛兰芬,主任医师,电子信箱:814320413@qq.com