

[文章编号] 1674-8115(2011)07-0962-05

· 论 著 ·

不同刺激物对过敏性哮喘产妇脐血中嗜碱性粒细胞分泌 IL-4 的影响

杨 玲¹, 许以平², 姚苏杭², 熊 瑛³, 祝 捷⁴, 王克敏⁵

(1. 上海交通大学医学院附属新华医院老年科, 上海 200092; 2. 上海交通大学医学院附属仁济医院过敏中心, 上海 200127; 3. 上海交通大学医学院附属新华医院妇产科, 上海 200092; 4. 上海交通大学医学院附属仁济医院妇产科, 上海 200127; 5. 上海交通大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室, 上海 200025)

[摘要] 目的 研究不同刺激物干预对过敏性哮喘产妇新生儿脐血中嗜碱性粒细胞分泌白介素 4(IL-4)的影响。方法 将源自过敏性哮喘产妇和健康产妇的新生儿脐血分为哮喘组($n=12$)和正常对照组($n=16$),采用流式细胞术分选提纯嗜碱性粒细胞,锥虫蓝染色鉴定细胞活性。在两组提纯后的嗜碱性粒细胞中分别加入 ACM 缓冲液(阴性对照)、肽聚糖(PGN)、粉尘螨浸液及甘露醇,采用 ELISA 法测定细胞培养上清液中 IL-4 的质量浓度。结果 细胞分选结果显示:嗜碱性粒细胞纯度为 $(95.64 \pm 3.15)\%$,回收率为 $(60.22 \pm 7.18)\%$;锥虫蓝染色显示细胞活性为 $(99.4 \pm 0.89)\%$ 。与阴性对照比较,经 PGN、粉尘螨浸液和甘露醇刺激后的哮喘组细胞培养上清液中 IL-4 质量浓度显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);经 PGN 和甘露醇刺激后,哮喘组细胞培养上清液中 IL-4 质量浓度显著高于正常对照组($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。结论 PGN、粉尘螨及甘露醇可刺激过敏性哮喘产妇新生儿脐血中嗜碱性粒细胞 IL-4 的分泌增加,通过诱导辅助性 T 淋巴细胞亚群 Th2 细胞的分化,参与哮喘的发生和发展。

[关键词] 过敏性哮喘;嗜碱性粒细胞;脐血;白介素 4

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2011.07.020

[中图分类号] R562.25

[文献标志码] A

Effects of various stimuli on IL-4 release of umbilical cord blood-derived basophils from neonates of mothers with allergic asthma

YANG Ling¹, XU Yi-ping², YAO Su-hang², XIONG Ying³, ZHU Jie⁴, WANG Ke-min⁵

(1. Department of Geriatrics, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200092, China; 2. Allergy Center, Renji Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200127, China; 3. Department of Obstetrics and Gynecology, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200092, China; 4. Department of Obstetrics and Gynecology, Renji Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200127, China; 5. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Basic Medical College, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of various stimuli on interleukin-4 (IL-4) release of umbilical cord blood-derived basophils from neonates of mothers with allergic asthma. **Methods** Samples of umbilical cord blood from neonates of mothers with allergic asthma and healthy mothers were divided into asthma group ($n=12$) and normal control group ($n=16$). Basophils were sorted and purified by flow cytometry, and the cell viability was identified by trypan blue staining. The purified basophils were incubated with ACM buffer (negative control), peptidoglycan (PGN), *Dermatophagoides farinae* and mannitol respectively, and the mass concentrations of IL-4 in the supernatants of culture fluid were detected by ELISA. **Results** The result of cell sorting indicated that the purity of basophils was $(95.64 \pm 3.15)\%$, with the recovery rate of $(60.22 \pm 7.18)\%$, and trypan blue staining revealed that the cell viability was $(99.4 \pm 0.89)\%$. Compared with negative control, the mass concentrations of IL-4 in the supernatants of culture fluid significantly increased after stimulation by PGN, *Dermatophagoides farinae* and mannitol in asthma group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). After stimulation by PGN and mannitol, the mass concentrations of IL-4 in the supernatants of culture fluid in asthma group were significantly higher than those in

[基金项目] 上海交通大学医工合作课题(YC2010MS12)(Shanghai Jiaotong University Foundation, YC2010MS12)。

[作者简介] 杨 玲(1973—),女,副主任医师,博士;电子邮箱: yanglingjoy@hotmail.com。

normal control group ($P < 0.05$ and $P < 0.01$). **Conclusion** PGN, *Dermatophagoides farinae* and mannitol may stimulate the IL-4 release of umbilical cord blood-derived basophils from neonates of mothers with allergic asthma, induce differentiation of Th2 cells and participate in the pathogenesis of asthma.

[Key words] allergic asthma; basophil; umbilical cord blood; interleukin-4

动物实验^[1]证实,嗜碱性粒细胞在过敏性疾病的发病机制中起关键作用。Mukai 等^[1]研究发现嗜碱性粒细胞是慢性过敏性炎症的启动细胞。相关研究^[2]证实,肽聚糖(peptidoglycan, PGN)可增强过敏性哮喘患者嗜碱性粒细胞的释放能力;嗜碱性粒细胞上存在着相应的 Toll 样受体 2(Toll-like receptor 2, TLR2)。嗜碱性粒细胞是白介素 4(interleukin-4, IL-4)的主要来源,IL-4 对诱导 CD4⁺T 淋巴细胞转化为辅助性 T 淋巴细胞亚群 Th2 细胞具有重要作用^[3]。目前,嗜碱性粒细胞及细胞因子 IL-4 在哮喘炎症反应中的重要地位已得到众多研究者的认同。由于新生儿脐血中的嗜碱性粒细胞尚未直接受到外界抗原的刺激,是研究哮喘发病机制较为理想的材料。本研究从过敏性哮喘产妇和正常产妇的新生儿脐血中提纯嗜碱性粒细胞,研究不同刺激物(PGN、粉尘螨浸液和甘露醇)干预对嗜碱性粒细胞分泌 IL-4 的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 收集 2007 年 10 月—2008 年 12 月在上海交通大学医学院附属新华医院和仁济医院产科分娩的新生儿脐血标本 28 份,其中 12 份标本来源于哮喘产妇的新生儿脐血(哮喘组),产妇平均年龄为(29 ± 3)岁;平均孕周为(38 ± 2)周;16 份标本来源于健康产妇的新生儿脐血(正常对照组),产妇平均年龄为(30 ± 2)岁,平均孕周为(39 ± 1)周。哮喘产妇入组标准:妊娠前有哮喘反复发作史,哮喘诊断均符合 2006 年全球哮喘防治倡议(Global Initiative for Asthma,GINA)修订的哮喘诊断标准^[4];病史及皮试结果显示有尘螨过敏;妊娠期间无急性发作;未使用静脉和口服皮质类固醇激素和免疫药物治疗。健康产妇入组标准:无哮喘史;无哮喘家族史;无过敏疾病史;无其他慢性疾病史;孕期内无任何并发症。所有新生儿的父亲均无过敏疾病史,也无其他慢性疾病史。

1.1.2 主要试剂和仪器 CD45-PerCP(BD,美国); CD203c-PE(Milteny Biotec,德国);IL-4 高灵敏试剂

盒(Bender MedSystems,澳大利亚);皮肤点刺试剂盒(Allergopharma,德国);PGN(Sigma,瑞典);ELISA 高敏试剂盒(Bender MedSystems,奥地利);流式细胞仪(flow cytometry,FCM)(BD,美国)。

1.2 方法

1.2.1 脐血白细胞的获取和分离 每 10 mL 脐血加 1 mL 浓度为 0.1 mol/L 的乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)抗凝,按 5:1 加入 6% 葡聚糖,混匀,37 ℃ 水浴 30 min,沉淀红细胞。吸出富含白细胞的上清液,离心,用 pH7.2、含 10 mmol/L EDTA 的 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤 1 次,悬浮细胞。在试管中依次加入 1.065 g/mL Ficoll-泛影葡胺及上述白细胞混悬液各 4 mL;4 ℃ 下 4 000 r/min 离心 30 min;离心后吸出上层细胞,用 pH7.2、含 10 mmol/L EDTA 的 10 mmol/L 的 PBS 洗涤 2 次。

1.2.2 FCM 分选嗜碱性粒细胞 在上述所得细胞中加入 PBS/EDTA/0.5% BSA(pH7.2, 10 mmol/L EDTA, 每 1×10^7 个细胞 80 μ L),在 4 ℃ 下放置 10 min,分别加入 FcR 片段阻滞剂,CD203c-PE 和 CD45-PerCP 免疫荧光抗体标记 20 min, PBS 洗涤 1 次。分离前用 Flow-Check 荧光微球校准仪器,标本上机后,以前向角散射光(forward-angle light scatter, FSC)和侧向角散射光(side-angle light scatter, SSC)参数观察细胞形态,选取 SSC 低信号细胞,CD203c-PE⁺CD45-PerCP⁺细胞即为嗜碱性粒细胞^[5]。

1.2.3 嗜碱性粒细胞计数和培养 以阿利新蓝染色后计数细胞^[6],统计纯度和回收率;锥虫蓝染色,观察细胞的活性。提纯后的嗜碱性粒细胞用 pH7.4 的 HEPES-ACM 缓冲液洗涤 1 次,分别加入 4 种刺激物进行干预:ACM 缓冲液(阴性对照)、10 μ g/mL PGN、10 μ g/mL 粉尘螨浸液及 9% 甘露醇;用含 RPMI-1640 培养基、2% 胎牛血清、1 mmol/L Ca²⁺、0.6 mmol/L Mg²⁺、10 μ g/mL 庆大霉素的细胞培养液置于细胞培养箱中,在 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养 8 h,1 500 r/min 离心 10 min,收集上清液。

1.2.4 ELISA 法检测 IL-4 的质量浓度 采用

ELISA 高敏试剂盒检测细胞培养上清液中 IL-4 的质量浓度,严格按试剂盒说明书完成操作。

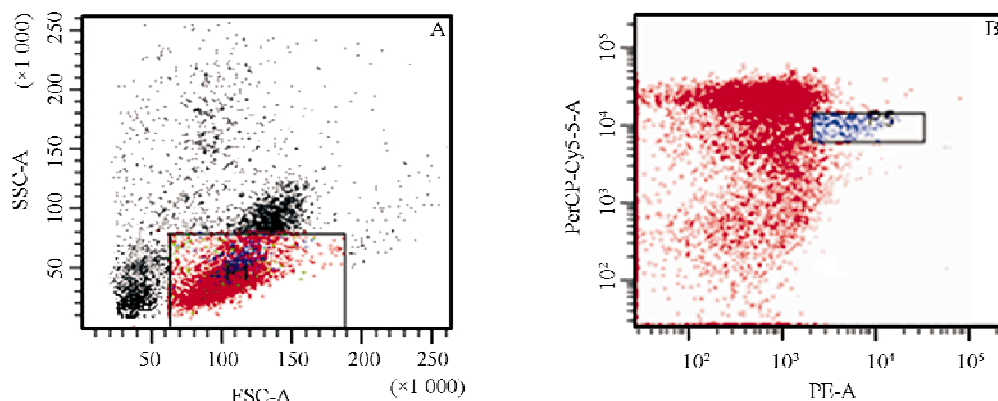
1.3 统计学方法

采用 SAS 6.12 软件进行统计学分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用团体 t 检验进行正常对照组与哮喘组嗜碱性粒细胞 IL-4 分泌的比较,采用配对 t 检验分析不同刺激物干预对嗜碱性粒细胞 IL-4 分泌的影响。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 嗜碱性粒细胞的分选结果

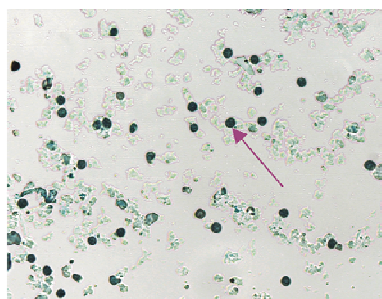
FCM 分选后,嗜碱性粒细胞纯度为 $(95.64 \pm 3.15)\%$,回收率为 $(60.22 \pm 7.18)\%$ 。锥虫蓝染色显示细胞活性为 $(99.4 \pm 0.89)\%$ 。图 1 为 FCM 分选嗜碱性粒细胞得到的分选图,图 2 为光学显微镜下阿利新蓝染色照片。



A. P1 区为 SSC 低信号细胞; B. P3 区为 CD203c-PE⁺ CD45-PerCP⁺ 细胞(嗜碱性粒细胞)。

图 1 FCM 分选嗜碱性粒细胞

Fig 1 Basophils sorted by FCM



注:红色箭头所指为嗜碱性粒细胞。

图 2 光学显微镜观察嗜碱性粒细胞 阿利新蓝染色 $\times 400$

Fig 2 Basophils observed by light microscopy Alcian blue staining $\times 400$

2.2 不同刺激物干预对嗜碱性粒细胞 IL-4 分泌的影响

ELISA 法检测结果显示:经 4 种刺激物干预后,正常对照组细胞培养上清液中 IL-4 的质量浓度比较差异无统计学意义($P > 0.05$);与阴性对照比较,经 PGN、粉尘螨浸液和甘露醇干预后的哮喘组细胞培养上清液中 IL-4 的质量浓度显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。PGN 和甘露醇干预后,哮喘组细胞培养上清液中 IL-4 的质量浓度显著高于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)(表 1)。

表 1 不同刺激物干预对嗜碱性粒细胞 IL-4 分泌的影响(pg/mL)

Tab 1 Effects of various stimuli on IL-4 release of basophils (pg/mL)

组别	阴性对照	PGN	粉尘螨浸液	甘露醇
正常对照组($n=12$)	1.31 ± 1.07	1.51 ± 1.23	1.54 ± 1.33	1.49 ± 1.29
哮喘组($n=16$)	1.22 ± 1.06	3.33 ± 2.17^{②③}	2.83 ± 2.35^{①}	3.77 ± 2.28^{②④}

① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$ 与阴性对照比较; ③ $P < 0.05$, ④ $P < 0.01$ 与正常对照组比较。

3 讨论

遗传因素与环境因素的相互作用决定了过敏性疾病的发生和发展^[7]。研究^[8]证实,儿童过敏性疾

病的发生与胎儿期免疫反应形成的初始化过程密切相关,尤其是母体子宫内环境因素的改变(如孕期抗原的暴露或感染等),均可导致儿童过敏性疾病的发生。Schönberger 等^[9]研究发现,母亲对螨变应原的

产前暴露与婴儿出生 3 d 后的血清总 IgE 存在着剂量-效应关系。有学者^[10]认为:母孕期感染对胎儿的影响可能是毒素或有机体的直接作用或对胎盘和子宫功能的间接干扰所引起,是儿童过敏性疾病的危险因素之一。及早发现易感人群和致病的危险因素,并积极采取预防措施,是降低哮喘等过敏性疾病的有效途径之一。

对于过敏性疾病发病机制的探讨,大部分集中于对 T 淋巴细胞和嗜酸性粒细胞作用的研究。近年来,有研究者^[11]观察到嗜碱性粒细胞能快速渗透到受累组织,认为它是 Th2 细胞因子介导的免疫反应中的重要效应细胞。嗜碱性粒细胞是介质组胺、白三烯 C4 (leukotriene C4, LTC4) 和 IL-4、IL-13 的主要来源^[12]。IL-4 对 Th2 细胞的活化、分化、增殖及抗凋亡等效应都具有十分重要的作用。

近年来发现嗜碱性粒细胞上有 TLR, TLR 除了在种系胚胎发育中发挥重要作用外,也与各种感染以及急性慢性炎症性疾病密切相关^[13]。目前已发现有十几种 TLR,其中 TLR2 的主要配体之一 PGN 是细菌细胞壁的成分。PGN 在革兰阳性细菌中的含量较高,而在革兰阴性细菌中的含量较低。TLR2 的配体分布较广泛,包括脂蛋白、脂多肽、脂壁酸、阿糖甘聚糖 (lipoarabinomannan, LAM)、酵母多糖及细菌的非甲基化胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤基序;此外,TLR2 还可与其他的 TLR 形成异二聚体共同识别 TLR2 配体,使得 TLR2 的识别更为广泛。有研究^[2]证明,天然免疫可以通过 TLR2 来增强变态反应,TLR2 基因产生变异是农民的孩子发生变态反应的易感因素^[14],提示在变态反应中 TLR2 起着重要的作用,但其具体作用机制尚不明确。

侯一峰等^[15]的研究结果显示:人嗜碱性粒细胞有 TLR1-4 mRNA 的表达,提示嗜碱性粒细胞可作为一种免疫细胞对病原微生物进行识别。Yamamoto 等^[16]用 PGN 作用于卵白蛋白 (ovalbumin, OVA) 致敏的小鼠,观察到鼻黏膜肥大细胞脱颗粒的现象,嗜酸性粒细胞浸润增多以及抗原特异性 Th2 细胞增加,导致小鼠过敏性鼻炎症状加重。我们对过敏性哮喘外周血实验^[2]的结果也提示,细菌成分可以激活嗜碱性粒细胞、启动过敏性炎症的发生。本研究结果也显示:新生儿脐血嗜碱性粒细胞受 PGN (TLR2 的主要配体) 刺激后 IL-4 分泌增加。尘螨所导致的过敏反应是 I 型速发型变态反应,属于 Th2 型免疫应答。Mowé 等^[17]的研究结果显示:过敏体质患者

的特异性 Th2 免疫应答显著增高,表现为过敏原特异性 Th2 细胞因子显著升高以及 Th1/Th2 细胞因子比例下降。本研究结果显示:粉尘螨浸液刺激后,哮喘组脐血嗜碱性粒细胞的 IL-4 分泌增加,而正常对照组脐血嗜碱性粒细胞的 IL-4 分泌无明显变化,提示哮喘产妇新生儿的免疫细胞在出生前可能已经暴露于母体来源的过敏原中,并且产生过敏原特异性免疫记忆反应;而甘露醇可以模拟脱水、运动性哮喘患者呼吸道局部高渗状态。哮喘产妇新生儿脐血中嗜碱性粒细胞对高渗刺激呈现高反应,易于释放其中的介质和细胞因子^[8]。

许多研究者观察到支气管哮喘有强烈的母系遗传倾向。Szepefalusi 和 Prescott 等^[18,19]的研究结果提示:胎盘是母体与胎儿接触的界面,哮喘母亲体内某些过敏原及细胞因子可通过胎盘进入胎儿血循环,使胎儿致敏,从而产生过敏原特异性的免疫记忆反应。胎儿的免疫记忆可随妊娠而发展,并且持续至出生后数月。出生后,新生儿免疫系统的成熟是一个从 Th2 优势向 Th1 优势转变的过程。如妊娠期或出生后早期接受过敏原刺激将使婴儿期 Th2 发育延迟,可能产生过敏性疾病^[17]。因而, Th1/Th2 平衡在决定新生儿是否会产生过敏性疾病中具有重要作用^[20]。

本研究结果显示:PGN、粉尘螨浸液及甘露醇均可作用于哮喘产妇脐血嗜碱性粒细胞,促使其分泌 IL-4,促进 T 淋巴细胞向 Th2 分化,导致 Th1/Th2 比值失衡,是过敏性疾病的发病机制之一。

参考文献

- [1] Mukai K, Matsuoka K, Taya C, et al. Basophils play a critical role in the development of IgE-mediated chronic allergic inflammation independently of T cells and mast cells [J]. *Immunity*, 2005, 23 (2): 191-202.
- [2] 杨玲,许以平,曹玲仙,等. 不同浓度肽聚糖、脂多糖、聚肌胞苷酸对过敏性支气管哮喘患者嗜碱性粒细胞释放能力的作用 [J]. *上海医学*, 2008, 31(12): 853-855.
- [3] Oh K, Shen T, Le Gros G, et al. Induction of Th2 type immunity in a mouse system reveals a novel immunoregulatory role of basophils [J]. *Blood*, 2007, 109(7): 2921-2927.
- [4] 2006 GINA Report, Global Strategy for Asthma Management and Prevention [S/OL]. [2007-07-20]. http://www.ginasthma.org/pdf/archived/GINA_Report_072007.pdf.
- [5] 杨玲,许以平,姚苏杭,等. 流式细胞术纯化脐血嗜碱性粒细胞 [J]. *上海医学*, 2010, 33(1): 75-77.
- [6] 许以平,胡丙熊,戴晓英,等. 一种新的嗜碱细胞直接计数法在哮喘诊断中的应用 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 1985, 8(3): 187.

- [7] 周莹,邵洁. 环境烟草烟雾与哮喘儿童气道炎症的研究进展[J]. 上海交通大学学报:医学版,2010,30(7):865-867.
- [8] Nouri-Aria KT, Irani AM, Jacobson MR, et al. Basophil recruitment and IL-4 production during human allergen induced late asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2001, 108(2):205-211.
- [9] Schönberger HJ, Dompeling E, Knottnerus JA, et al. Prenatal exposure to mite and pet allergens and total serum IgE at birth in high-risk children[J]. Pediatr Allergy Immunol, 2005, 16(1):27-31.
- [10] 许以平,王茂,朱丽君,等. 脐血细胞和白细胞介素-4含量与哮喘遗传表型关系的研究[J]. 中华医学杂志,2005,85(22):1547-1550.
- [11] MacGlashan D, Gauvreau G, Schroeder JT. Basophils in airway disease[J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2002, 2(2):126-132.
- [12] Tschopp CM, Spiegl N, Didichenko S, et al. Granzyme B, a novel mediator of allergic inflammation: its induction and release in blood basophils and human asthma[J]. Blood, 2006, 108(7):2290-2299.
- [13] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity[J]. Cell, 2006, 124(4):783-801.
- [14] Eder W, Klimecki W, Yu L, et al. Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers[J]. J Allergy Clin Immunol, 2004, 113(3):482-488.
- [15] 侯一峰,何韶衡. TLR1-TLR4 在人嗜碱性粒细胞中的表达[J]. 海南医学,2005,16(7):131-133.
- [16] Yamamoto K, Kawamura I, Ito J, et al. Modification of allergic inflammation in murine model of rhinitis by different bacterial ligands; involvement of mast cells and dendritic cells[J]. Clin Exp Allergy, 2006, 36(6):760-769.
- [17] Movérare R, Elfman L, Stålenheim G, et al. Study of the Th1/Th2 balance, including IL-10 production, in cultures of peripheral blood mononuclear cells from birch-pollen-allergic patients[J]. Allergy, 2000, 55(2):171-175.
- [18] Szepefalusi Z, Loibichler G, Pichler J, et al. Direct evidence for transplacental allergen transfer[J]. Pediatr Res, 2000, 48(3):404-407.
- [19] Prescott SL, Macaubas C, Ilt BJ, et al. Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile[J]. J Immunol, 1998, 160(10):4730-4737.
- [20] 谢龙山,余保平,谢桂珍,等. 尘螨过敏母亲对新生儿 Th1/Th2 平衡功能的影响[J]. 实用医学杂志,2005,21(13):1410-1411.
- [收稿日期] 2010-12-08 [本文编辑] 周珠凤

本刊荣获第三届中国高校优秀科技期刊奖

第三届中国高校精品·优秀·特色科技期刊奖颁奖大会于2010年11月7日在重庆市隆重举行。教育部科技司主办了这次评奖活动,共评出第三届中国高校精品科技期刊70种,优秀科技期刊120种,特色科技期刊59种。期刊评比以科技部中国科技信息研究所提供的《中国科技期刊引证报告(核心版)》的统计数据为依据,评价指标包括影响因子、总被引频次、他引总引比、基金论文比、平均引文数、被重要检索系统收录情况、论文下载率、编辑出版质量等,并首次引用了相对影响因子、相对总被引频次、离均差率等指标。

《上海交通大学学报(医学版)》荣获第三届高校优秀科技期刊奖,表明本刊在学术和编辑质量等方面达到了较高的水平。这一奖项的获得是编辑委员会专家、审稿专家、作者和编辑部成员共同努力的结果。编辑部衷心感谢广大专家、作者和读者对本刊的关心、支持和帮助,并将继续努力,不断提高本刊的质量和水平。