



嗜碱性粒细胞在胶原诱导性关节炎模型小鼠 Th1/Th2 应答失衡中的作用

陈秋华¹, 唐培¹, 谢彤¹, 吴平¹, 兰巧芬¹, XIAO Hai-yan², 潘庆军¹

(1. 广东医学院附属医院, 广东, 湛江 524001; 2. Georgia Regents University, Cancer Center, Augusta, GA 30912, USA)

【摘要】 目的 探讨嗜碱性粒细胞在胶原诱导性关节炎模型小鼠 Th1/Th2 失衡中的作用。方法 取 4~6 周龄 C57/BL6 小鼠, 经初次和 3 周后二次背部和足底多点胶原免疫, 建立胶原诱导性关节炎小鼠模型。分别在建模(初次免疫)前、建模后 1、3、6 和 9 周眶静脉采血和采集淋巴结细胞, 利用流式细胞术对嗜碱性粒细胞数量和表达 IL-4 的比例检测, ELISA 方法检测血清 IL-4 和 IFN- γ 水平, 并对模型进行评分。结果 成功建立关节炎小鼠模型; 模型建立后 1 周 CIA 模型小鼠血清 IFN- γ /IL-4 水平的比值显著低于建模前和对照组小鼠, 提示以 Th2 应答为主, 同时外周血中嗜碱性粒细胞的数量和表达 IL-4 的比例显著高于对照组; 而建模后 6 和 9 周 CIA 模型小鼠血清 IFN- γ /IL-4 水平的比值显著高于对照组, 提示以 Th1 应答为主, 同时外周血中嗜碱性粒细胞的数量与对照组比较有降低的趋势。结论 嗜碱性粒细胞可能通过影响 Th1/Th2 应答失衡参与 CIA 模型小鼠的发病。

【关键词】 嗜碱性粒细胞; 胶原; 关节炎; Th1/Th2

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 06-0007-05

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2014. 006. 002

Role of basophils in the imbalance of Th1/Th2 response in collagen-induced arthritis in mice

CHEN Qiu-hua¹, TANG Pei¹, XIE Tong¹, WU Ping¹, LAN Qiao-fen¹, XIAO Hai-yan², PAN Qing-jun¹

(1. Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Guangdong Zhanjiang 524001, China;

2. Georgia Regents University, Cancer Center, Augusta, GA 30912, USA)

【Abstract】 Objective To investigate the role of basophils in the imbalance of Th1/Th2 response in mouse models of collagen-induced arthritis(CIA). **Methods** 4-6-weeks old C57/BL6 mice were immunized with collagen at multiple points on the back and foot twice (0 and 3 weeks) to establish a mouse model of collagen-induced arthritis. Blood samples were collected before the first immunization and 1, 3, 6 and 9 weeks after immunization, and cells from lymph nodes were collected. Flow cytometry and ELISA were employed to detect the levels of basophils and IL-4, and the joint swelling was scored. **Results** Mouse model of CIA was successful established. The ratio of IL-4/IFN- γ of the CIA group was significantly lower than that in the mice before CIA modeling and the control group, indicating a Th2-dominant response. At the same time, the peripheral basophils counting and percentage of IL-4 positive basophils of the CIA group were significantly higher than those of the control group. While, the IL-4/IFN- γ ratio of the CIA group was significantly higher than that of the control group, indicating a Th1-dominant response. The peripheral basophils counting of the CIA group was

[基金项目] 广东省自然科学基金(S2013010011568)和湛江市科技攻关项目(NO.2013B01086)资助。

[作者简介] 陈秋华(1984-)男,住院医师,主要研究风湿性疾病。

[通讯作者] 潘庆军(1978-)男,博士,讲师,主要研究抗感染免疫和自身免疫性疾病。

slightly lower than that of the control group. **Conclusion** Basophils may participate in the development of CIA in mouse models through affecting the imbalance of Th1/Th2 response.

【Key words】 Basophils; Rheumatoid arthritis; Collagen-induced arthritis; Th1/Th2 imbalance; Lymph nodes; Mice

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以慢性关节炎症为主要特征的自身免疫性疾病,其临床表现和预后呈高度异质性,易反复发作,致残率较高,目前尚无较好的根治方法。RA 发病机制虽尚未完全解析,但辅助性 T 细胞(Th1/Th2)应答失衡在 RA 发病中的重要作用已被广泛认知^[1]。然而,导致 RA 患者 Th1/Th2 失衡的原因及机制尚不清楚,因此,深入研究 RA 发病中 Th1/Th2 失衡的原因及机制将有助于 RA 的防治。

嗜碱性粒细胞参与过敏反应已被熟知^[2],近年有关嗜碱性粒细胞在天然免疫、获得性免疫、免疫平衡调节等方面的研究取得了长足的进展和令人瞩目的成就。在免疫调节方面,嗜碱性粒细胞表面表达高水平的 IgE 受体 FcεRI,通过与抗原特异 IgE 交联,或其他的活化途径,能产生 Th2 型细胞因子如 IL-4 和 IL-13,介导 Th0 向 Th2 细胞分化^[3,4],而 Th2 型增强体液免疫应答。因此,嗜碱性粒细胞可通过增强 Th2 应答和削弱 Th1 应答而影响 Th1/Th2 平衡,进而参与多种自身免疫性疾病的发病过程,但至今,在 RA 方面研究极少。

胶原诱导性关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)是最常用的类风湿性关节炎动物模型。由于其重复性好、易于界定、并被证实对类风湿性关节炎新疗法的发展有用而被广泛接受。

基于此,本文采用经典的胶原诱导性关节炎小鼠模型,探讨嗜碱性粒细胞在胶原诱导性关节炎小鼠模型 Th1/Th2 失衡中的作用。有望为 RA 的发病机制和临床防治提供线索。

1 材料和方法

1.1 动物和实验材料

SPF 级 5~6 周 C57/BL6 雄性小鼠,体重(15~18)g,购自广东省医学实验动物中心(粤监证字 2008A055,合格证号 0045725),饲养在广东医学院实验动物中心[SYXK(粤)2010-0063],25℃ 12 h 昼夜节律、55%湿度的饲养箱环境,喂养商品饲料和灭菌自来水。

牛 II 型胶原(Type II collagen)和弗氏完全和不完全佐剂购自美国 Sigma-Aldrich 公司。小鼠 IFN-γ

和 IL-4 ELISA 试剂盒购自武汉博士德公司。红细胞裂解液、染色液、固定通透液、抗小鼠 CD49B-FITC、IgE-PE 抗体和 APC-IL-4 抗体购自美国 Biolegend 公司。其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 胶原诱导性关节炎小鼠模型的建立:依照参考文献[5],将牛 II 型胶原(Type II collagen)溶解于 0.05 mol/L 冰醋酸中,浓度为 2 g/L,将溶解的胶原与弗氏完全佐剂等体积混合,在冰浴中使用匀浆器充分乳化。模型组小鼠 6 只,对照组 6 只。免疫时,在小鼠背部和尾根部多点皮内注射 0.1 mL 乳剂(含 100 mg 胶原和 200 mg 结核分支杆菌)。首次免疫后 3 周行第二次免疫,方法同第一次(佐剂换为弗氏不完全佐剂),避开初次免疫部位,进行加强免疫。同时,对照组用 CFA 与 0.05 mol/L 冰醋酸等体积充分乳化后按上述方法进行免疫及 21 天加强免疫,制备胶原诱导性关节炎小鼠模型。

1.2.2 小鼠外周血和淋巴结组织采集和检测:分别在建模(初次免疫)前、建模后 1 周、3、6 和 9 周眶静脉采血,肝素抗凝,并进行指标检测。同时进行关节肿胀的评分。

淋巴结细胞的制备参考[6]将 C57/BL6 小鼠断髓处死,无菌分离双侧颌下、腋窝、锁骨下、腹股沟浅表和肠系膜淋巴结,去掉被膜,于 200 目尼龙网筛研磨过滤,于 4℃ 下 200 r/min 离心 8 min 收集细胞,4℃ 下 PBS(0.05 mol/L, pH 7.2)洗涤 2 次,重悬后流式检测。

1.2.3 ELISA 检测血清 IFN-γ 和 IL-4:分别在建模(初次免疫)前、建模后 1 周、建模后 8 周眶静脉采血,300 r/min 离心 15 min,收集上清液,−20℃ 冻存,检测备用。用 ELISA 方法检测血清 IL-4 和 IFN-γ 水平。

1.2.4 流式细胞术检测外周嗜碱性粒细胞:分别在建模(初次免疫)前、建模后 1 周、建模后 8 周眶静脉采血,利用流式细胞术对外周血和淋巴结组织中嗜碱性粒细胞数量和表达 IL-4 的比例检测。具体为:取 200 μL 抗凝血,分别加入抗小鼠 CD49B-FITC 和 IgE-PE 抗体,室温孵育 30 min,加入红细胞裂解液,室温避光 15 min,300 r/min 离心 5 min,再

用染色液重悬洗涤一次,再加入固定和透膜液 10 min,离心去除固定和透膜液,染色液重悬后加入抗小鼠 APC-IL-4 抗体进行胞内染色 15 min,加入染色液离心洗涤 2 次,最后将标记的细胞重悬 200 μ L 染色液上流式检测,CD49b 和 IgE 双阳性为嗜碱性粒细胞,再计算 IL-4 阳性的嗜碱性粒细胞占总嗜碱性粒细胞的比例。

1.3 统计学方法

所有数据都采用 SPSS 13.0 分析,用均数 $\pm$ 标准差表达。对照组和模型组检测指标比较使用两独立样本 t 检验 (Independent Student's t -test), $P < 0.05$ 认为差异有显著性。

2 结果

2.1 胶原诱导性关节炎小鼠模型的建立

初次免疫后 3 周 (既第 21 天) 左右小鼠关节开始出现肿胀,起初为两后足红肿,逐渐延伸到前足和尾部,第 42 天左右肿胀达到最高,而后逐渐减轻。小鼠毛色、精神状态和粪便等在 21 d 前无显著变化,21 d 后 CIA 组小鼠开始出现被毛松弛,行动迟缓,关节肿胀明显,少数小鼠可见局部足爪轻度溃疡 (图 1)。小鼠关节肿胀的评分见表 1。



Controls (对照组) CIA model (CIA模型组)

图 1 对照组和 CIA 模型组小鼠后足初次免疫后第 42 天肿胀情况

Fig.1 Swelling of the hind feet of a control mouse and CIA model mouse at 42 days after primary immunization.

2.2 血清 IFN- γ 和 IL-4 的比值

CIA 模型小鼠诱导早期,既初次免疫后 1 周和 3 周,血清 IFN- γ /IL-4 水平的比值显著低于对照组 (图 2),提示 Th2 应答失衡。而 CIA 模型小鼠诱导中晚期,既初次免疫后 6 周和 9 周,血清 IFN- γ /IL-4 的比值显著高于对照组 (图 2),提示以 Th1 应答为主。

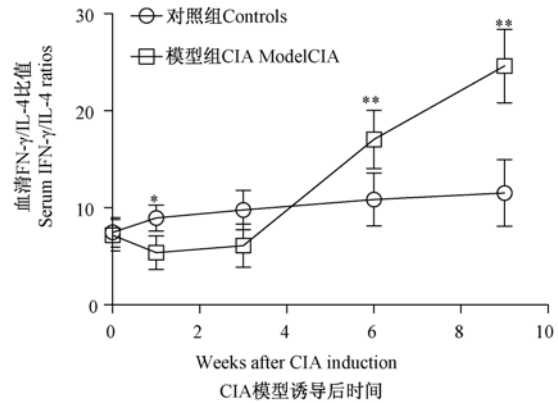


图 2 CIA 模型组和对照组小鼠血清 IFN- γ /IL-4 水平的比值的变化情况 (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)

Fig.2 Changes of the serum IFN- γ /IL-4 ratios of the mice in the control and CIA model groups.

(* , $P < 0.05$; ** , $P < 0.01$)

2.3 流式细胞术检测外周嗜碱性粒细胞数量和活化情况

CIA 模型小鼠诱导早期,既初次免疫后 1 周和 3 周,外周嗜碱性粒细胞数量显著高于对照组 (图 3A)。而 CIA 模型小鼠诱导中晚期,既初次免疫后 6 周和 9 周,外周嗜碱性粒细胞 IL-4 阳性的百分比显著高于对照组 (图 3B)。

2.4 流式细胞术检测淋巴结组织中嗜碱性粒细胞

CIA 模型小鼠诱导早期,既初次免疫后 1、3、6 和 9 周,淋巴结组织中可检测到嗜碱性粒细胞,对照组小鼠则无 (图 4)。

表 1 小鼠关节肿胀的评分

Tab.1 Scores of the joint edema of the mice

组别 Groups	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	42 d
对照组 Control	2.2 $\pm$ 0.7	2.5 $\pm$ 1.1	2.7 $\pm$ 1.0	3.1 $\pm$ 1.3	3.2 $\pm$ 1.1	3.5 $\pm$ 1.2
CIA 模型组 CIA model	2.5 $\pm$ 0.4	2.9 $\pm$ 1.3	3.6 $\pm$ 1.4 *	5.4 $\pm$ 1.2 *	7.3 $\pm$ 1.4 **	5.1 $\pm$ 1.6 *

(* , $P < 0.05$; ** , $P < 0.01$)

评分标准:对小鼠足爪炎症进行评分。评分标准为:无红肿为 0 分;足小趾关节红肿为 1 分;趾关节、足距均红肿为 3 分;踝关节以下均红肿为 4 分,包括踝关节在内的全部足爪红肿。每只小鼠评分的最高分为 12 分。

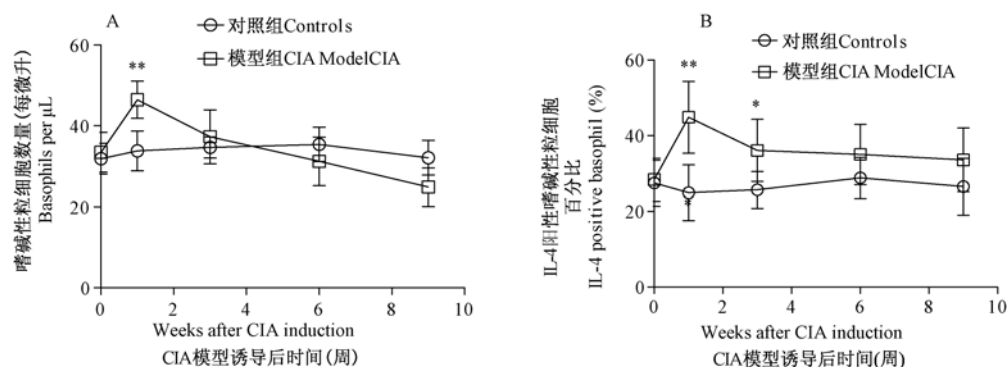


图3 CIA模型组和对照组小鼠外周嗜碱性粒细胞数量和活化变化情况(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)

Fig.3 Changes of the amount and activation of peripheral basophils in the mice of the control and CIA model groups. (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)

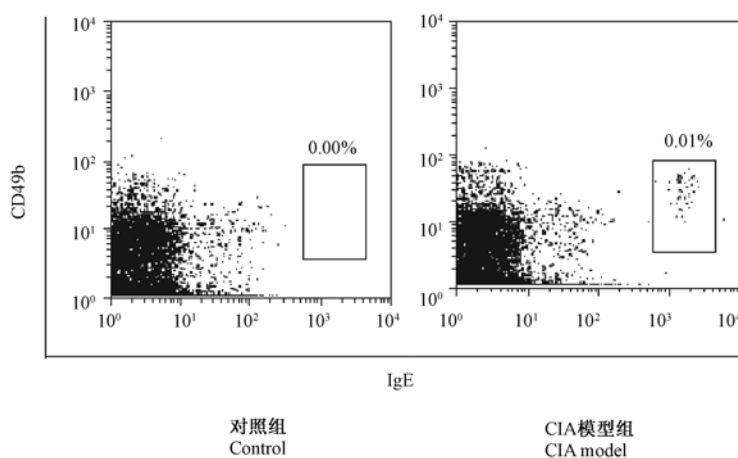


图4 流式检测 CIA模型组和对照组小鼠淋巴结组织中嗜碱性粒细胞

Fig.4 Flow cytometry analysis of basophils from lymph nodes of the mice of control and CIA model mice.

3 讨论

RA 患者 Th1/Th2 应答失衡模式的研究发现, Th1/Th2 型细胞因子的产生在 RA 疾病的早期和晚期不同,提示在不同发病期可能存在 Th1/Th2 应答失衡模式的改变。在 RA 发病早期外周血单个核细胞中以 Th2 应答为主,而长期慢性 RA 则以 Th1 应答为主^[1]。而且,在 RA 出现临床关节病变的最早期,在滑膜和滑膜液中呈现短暂的以 Th2 为主的细胞因子谱(IL-4 和 IL-13 等),而显著缺乏 Th1 型细胞因子(IFN- γ 等),这可决定早期滑膜炎发展成 RA 而不是非类风湿持久性滑膜炎^[7]。在 1 例成年 RA 患者活动期滑膜中首先发现以 Th2 应答为主,而外周单个核细胞中以 Th1 应答为主,而后滑膜中发展为以 Th0 和 Th1 应答为主,且与 RA 炎症相关^[8]。提示,在 RA 患者外周血和关节滑膜液中 Th1/Th2 应答失衡的模式,在不同病期可能会发生转换。

嗜碱性粒细胞通过 IgE 高亲和力受体 Fc ϵ RI 与 IgE-抗原复合物交联,可诱导嗜碱性粒细胞活化进而释放炎症介质而介导组织损伤。RA 患者高滴度的 IgE 抗体主要以免疫复合物形式存在^[9],在外周血和关节液中可检测到包含 IgE 抗体的循环免疫复合物(IgE-CIC)^[10-12],且 IgE-CIC 阳性的 RA 患者疾病活动度高于阴性的 RA 患者^[13],IgE-CIC 可活化炎症效应细胞,如肥大细胞、中性粒细胞和单核细胞等^[14,15],促进 RA 疾病进展。瓜氨酸化蛋白和 IgE 型抗瓜氨酸化蛋白抗体(ACPA)形成的免疫复合物可通过 Fc ϵ RI 受体交联活化 RA 患者嗜碱性粒细胞^[16]。提示在 RA 中 IgE 型免疫复合物可能介导嗜碱性粒细胞活化,其介导的嗜碱性粒细胞的活化在 RA 发病中的作用有待进一步研究。

另外,本模型选用的是 C57/BL6 小鼠,在天然免疫中以 Th1 应答为主,而 BALB/c 则以 Th2 应答为主^[17],基于本项目中 Th1/Th2 应答与 CIA 模型诱

导密切相关,而嗜碱性粒细胞是影响 Th1/Th2 应答,特别是 Th2 应答的关键细胞,故研究嗜碱性粒细胞在胶原诱导性关节炎模型小鼠 Th1/Th2 应答失衡中的作用时,要考虑 C57/BL6 小鼠和 BALB/c 不同背景的可能影响。

临床上关于 RA 患者嗜碱性细胞的研究报道比较少,一个以 800 例 RA 患者为主的研究发现,RA 患者外周血嗜碱性粒细胞数量显著减少,且处于活化状态(以脱颗粒为活化标志)^[18]。而另外一个以 16 例儿童 RA 患者为主的报道发现,幼年 RA 患者(juvenile rheumatoid arthritis, JRA)外周血嗜碱性粒细胞数量以增多为主(11/16)^[19]。但目前,幼年类风湿性关节炎(JRA)现已更名为幼年特发性关节炎(juvenile idiopathic arthritis, JIA)研究例数较少。另外根据临床经验,我们推测,可能与 JRA 患儿确诊时大部分处于发病的早期,而成年 RA 患者确诊时大部分处于发病的中晚期相关,有待进一步研究。

综上,嗜碱性粒细胞可能在 CIA 模型小鼠 Th1/Th2 应答失衡中发挥了作用,进而参与其发病过程。但 CIA 模型小鼠嗜碱性粒细胞活化和外周减少的机制,以及调控嗜碱性粒细胞数量和活化对 CIA 模型小鼠疾病进展的影响有待进一步深入研究,该研究有望为阐明 RA 发病机制和针对 RA 发病中 Th1/Th2 失衡的干预治疗提供新的线索。

参考文献:

- [1] Schulze-Koops H, Kalden JR. The balance of Th1/Th2 cytokines in rheumatoid arthritis [J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2001, 15(5):677-691.
- [2] 潘庆军, 刘渊, 富宁. 嗜碱性粒细胞在过敏和免疫反应中的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2009, 23(1):25-28.
- [3] Charles N, Watford WT, Ramos HL, et al. Lyn kinase controls basophil GATA-3 transcription factor expression and induction of Th2 cell differentiation [J]. Immunity, 2009, 30:533-543.
- [4] Sokol CL, Barton GM, A. G. Farr AG, et al. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses [J]. Nat Immunol, 2008, 9:310-318.
- [5] Campbell IK, Hamilton JA, Wicks IP. Collagen-induced arthritis in C57BL/6 (H-2b) mice: new insights into an important disease model of rheumatoid arthritis [J]. Eur J Immunol, 2000, 30:1568-1575.
- [6] 梁兆端, 曾耀英, 黄秀艳, 等. 芹菜素对小鼠 T 淋巴细胞体外增殖、细胞周期和凋亡的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2008, 24(4):337-340.
- [7] Raza K, Falciani F, Curnow SJ, et al. Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin [J]. Arthritis Res Ther, 2005, 7(4):R784-795.
- [8] Aarvak T, Chabaud M, Thoen J, et al. Changes in the Th1 or Th2 cytokine dominance in the synovium of rheumatoid arthritis (RA): a kinetic study of the Th subsets in one unusual RA patient [J]. Rheumatology (Oxford), 2000, 39(5):513-522.
- [9] Millauer N, Zuercher AW, Miescher SM, et al. High IgE in rheumatoid arthritis (RA) patients is complexed with anti-IgE autoantibodies [J]. Clin Exp Immunol, 1999, 115(1):183-188.
- [10] De Clerck LS, Struyf NJ, Bridts CH, et al. Activation of inflammatory cells by immune complexes containing IgE in serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis: a study using flow cytometric analysis [J]. Ann Rheum Dis, 1991, 50(6):379-382.
- [11] Van Offel JF, De Clerck LS, Kersschot IE. Cholesterol crystals and IgE-containing immune complexes in rheumatoid pericarditis [J]. Clin Rheumatol, 1991, 10(1):78-80.
- [12] De Clerck LS, Struyf NJ, Bridts CH, et al. IgE-containing immune complexes in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis [J]. Clin Rheumatol, 1990, 9(2):176-81.
- [13] Bartholomew JS, Evanson JM, Woolley DE. Serum IgE anti-cartilage collagen antibodies in rheumatoid patients [J]. Rheumatol Int, 1991, 11(1):37-40.
- [14] Sokol CL, Barton GM, Farr AG, et al. A mechanism for the initiation of allergen-induced helper type 2 responses [J]. Nat Immunol, 2008, 9(3):310-318.
- [15] Athreya BH, Moser G, Raghavan TE. Increased circulating basophils in juvenile rheumatoid arthritis. A preliminary report [J]. Am J Dis Child, 1975, 129(8):935-937.
- [16] Schuerwegh AJ, Ioan-Facsinay A, Dorjée AL, et al. Evidence for a functional role of IgE anticitrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(6):2586-2591.
- [17] Watanabe H, Numata K, Ito T, et al. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains [J]. Shock, 2004, 22(5):460-466.
- [18] 高恩, 相家伦. 嗜碱性粒细胞用于类风湿性关节炎活动性的诊断 [J]. 国外医学(临床生物化学与检验学分册), 1986, 03:40.
- [19] Athreya BH, Moser G, Raghavan TE. Increased circulating basophils in juvenile rheumatoid arthritis. A preliminary report [J]. Am J Dis Child, 1975, 129(8):935-937.

[修回日期]2014-03-17