

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.27.004

文章编号: 1005-8982(2017)27-0017-05

髓系抑制性细胞和调节性 T 细胞 在小鼠实验性结肠炎中的作用*

吕颖¹, 卢建华², 吕卓³, 段媛媛³, 刘志权², 崔美兰¹, 闫会敏¹

(河北省石家庄市第五医院 1. 临床医学研究中心, 2. 检验科, 河北 石家庄 050021;

3. 河北医科大学 研究生学院, 河北 石家庄 050017)

摘要:目的 探讨髓系抑制性细胞(MDSC)和调节性 T 细胞(Treg 细胞)在小鼠溃疡性结肠炎发生、发展过程中的作用。**方法** 使用 5%右旋葡聚糖硫酸钠(DSS)溶液复制小鼠溃疡性结肠炎模型,每日观察小鼠体重和大便状况。DSS 处理 3 和 7 d 后处死小鼠,苏木精-伊红染色法观察病理组织学变化,流式细胞仪检测脾脏和肠系膜淋巴结中 MDSC 和 Treg 细胞的表达。**结果** 模型组小鼠于造模第 4 天体重开始下降,有腹泻和血便,HE 染色结果显示小鼠结肠出现黏膜损伤及炎症表现。与对照组和造模 3 d 组比较,造模 7 d 组肠系膜淋巴结中 Treg 细胞比例增加,而 MDSC 比例降低;进一步观察 MDSC 亚群变化发现,粒细胞型 MDSC 在造模 7 d 组中比例下降,而单核细胞型 MDSC 则无改变。无论 Treg 细胞还是 MDSC,脾脏中的水平 3 组比较差异无统计学意义。**结论** 急性溃疡性结肠炎可导致 MDSC 降低和 Treg 细胞增高,可能与疾病的发生发展有关。

关键词: 溃疡性结肠炎;髓系抑制性细胞;调节性 T 细胞;免疫调控

中图分类号: R392.9

文献标识码: A

Role of myeloid-derived suppressor cells and regulatory T cells in mouse models of ulcerative colitis*

Ying Lv¹, Jian-hua Lu², Zhuo Lv³, Yuan-yuan Duan³,

Zhi-quan Liu², Mei-lan Cui¹, Hui-min Yan¹

(1. Clinical Research Center, 2. Department of Laboratory Medicine, Shijiazhuang Fifth Hospital, Shijiazhuang, Hebei 050021, China; 3. Hebei Medical University Graduate School, Shijiazhuang, Hebei 050017, China)

Abstract: Objective To investigate the role of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) and regulatory T (Treg) cells in development of ulcerative colitis. **Methods** Mouse models of ulcerative colitis were established with administration of 5% dextran sodium sulfate (DSS). Body weight and hematochezia were obtained daily. Mice were sacrificed 3 or 7 days post insult. Histological assessment of ulcerative colitis was graded with hematoxylin-eosin staining. The percentages of MDSC and Treg cells in the spleen and mesenteric lymph nodes were measured by flow cytometry. **Results** In animals treated with DSS, body weight loss, diarrhea and hematochezia were observed on the 4th day. Histological analysis revealed colonic mucosa damage and manifestation of inflammation. The amount of Treg cells was increased, whereas the amount of MDSC was decreased significantly in mesenteric lymph nodes in 7-day model group ($P < 0.05$). Further observation on the subsets of MDSC suggested that the percentage of granulocyte-like MDSC decreased in the 7-day model group ($P < 0.05$) while no significant change of monocyte-like MDSC was observed among all the groups. There was no significant difference in the amount of Treg cells or MDSC in spleen among three groups.

收稿日期: 2017-04-30

* 基金项目: 河北省自然科学基金(No: H2015106081); 河北省医学科学研究课题计划项目(No: 20150893)

[通信作者] 闫会敏, E-mail: yanhm2538@163.com; Tel: 0311-89109031

Conclusion Acute ulcerative colitis experiences decreased MDSC and increased Treg cells, which could contribute to the development of ulcerative colitis.

Keywords: ulcerative colitis; myeloid-derived suppressor cell; regulatory T cell

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种临床常见的难治性肠道疾病,因慢性迁延不愈,严重影响着人们的生活质量。虽然 UC 的发病机制尚未完全阐明,但普遍认为免疫紊乱,特别是效应性 CD4⁺T 细胞的过度激活是导致 UC 发病的重要原因之一^[1]。正常状态下,机体存在着许多具有免疫调节功能的细胞,该细胞可抑制免疫应答,在维持机体免疫稳态中发挥重要作用。髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cell, MDSC)和调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)是目前已知的两类重要免疫抑制细胞,MDSC 由一群未成熟的高度异质性细胞组成,具有广泛且强大的抑制功能,可抑制 T 细胞、B 细胞、NK 细胞和巨噬细胞等多种免疫细胞,下调炎症因子产生^[2-3];而 Treg 细胞是一群成熟的 T 细胞亚群,是机体负向调节免疫反应及维持免疫稳态的关键环节,可通过细胞间相互作用及分泌 IL-10 等抗炎症因子抑制多种细胞的活性^[4]。

MDSC 和 Treg 细胞作为机体免疫调控的重要细胞,能够诱导免疫抑制、参与介导免疫耐受,因此,推测 UC 的发生、发展可能与 MDSC 和 Treg 细胞的异常表达有关。本研究在建立小鼠急性 UC 模型的基础上,检测不同阶段小鼠脾脏和淋巴结中 MDSC 和 Treg 细胞的比例,以探讨 MDSC 和 Treg 细胞在 UC 发生发展中的可能作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

清洁级 BALB/c 小鼠[购自河北医科大学实验动物中心,许可证号:SCXK(冀)2013-1-003],右旋葡聚糖硫酸钠(dextran sulfact sodium, DSS)(购自美国 MP Biomedicals 公司),小鼠 FITC-CD4、PE-CD25、PE/Cy7-CD127、FITC-CD11b、APC-Ly6G 和 PerCP-Cy5.5-Ly6C 抗体(购自美国 BD 公司),红细胞裂解液(购自美国 Beckman Coulter 公司),FACS Canto II 流式细胞仪(购自美国 BD 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 复制小鼠急性溃疡性结肠炎模型 选取健康 BALB/c 小鼠 20 只,鼠龄 6~8 周,体重 18~22 g。将小鼠随机分为 3 组:①对照组($n=6$);②造模 3 d 组

($n=7$);③造模 7 d 组($n=8$)。其中,造模组小鼠分别自由饮用 5% DSS 溶液 3 和 7 d,以诱导溃疡性结肠炎,对照组小鼠给予蒸馏水自由饮用。实验开始前及开始后每日称重、观察大便性状和有无便血。造模结束后处死小鼠,测量大肠长度,并取结肠进行 HE 染色,分离脾脏及肠系膜淋巴结制备单细胞悬液。

1.2.2 疾病活动指数 根据小鼠体重下降程度、大便性状和便血情况,计算疾病活动指数(disease activity index, DAI)评分。见表 1。

表 1 小鼠结肠炎 DAI 评估表

分数	体重减轻率/%	粪便黏稠度	血便
0	(-)	正常(颗粒状、成形)	无
1	1~4	-	-
2	5~7	松软(糊状不黏附肛门)	粪便带血
3	8~10	-	-
4	>10	腹泻(水样、黏附肛门)	肛门带血

1.2.3 病理组织学观察 处死小鼠后,取结肠组织固定于 10%中性甲醛缓冲液,常规石蜡包埋、切片后进行常规苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色,光镜下观察病理改变。

1.2.4 脾脏和淋巴结单细胞悬液的制备 取出脾脏和肠系膜淋巴结,去除周围脂肪组织,用注射器活塞芯杆的平端在小培养皿中轻轻研磨,过 200 目细胞筛过滤,1 500 r/min 离心后弃上清,红细胞裂解液将脾脏中红细胞破除。洗涤 2 次,重悬细胞后计数,并调整细胞浓度至 1×10^7 个/ml。

1.2.5 流式细胞仪检测 MDSC 和 Treg 细胞 取 100 μ l 待测细胞,加至相应的流式管,再加入下述荧光素标记的抗体:Treg 细胞:小鼠 FITC-CD4, PE-CD25, PE/Cy7-CD127 或 MDSC: FITC-CD11b, APC-Ly6G, PerCP-Cy5.5-Ly6C 抗体。避光孵育 20~30 min 后,离心洗涤 2 次,流式细胞仪检测 MDSC 和 Treg 细胞所占比例。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,两两比较用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体重变化和 DAI 评分

对照组和造模 3 d 组小鼠饮食量及活动状态无明显改变,未见便血,造模 7 d 组小鼠在造模第 4 天开始逐渐出现大便松软或稀糊状及不同程度的血便。体重相对变化(体重 / 原始体重 × 100%)结果显示,对照组体重逐渐增加,造模 3 d 组未见改变,而造模 7 d 组自第 4 天开始体重逐渐下降,实验第 6 天和第 7 天低于对照组和造模 3 d 组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。实验第 7 日,造模 7 d 组 DAI 评分高于造模 3 d 组和对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$),大肠长度短于造模 3 d 组和对照组,差异有统计学意

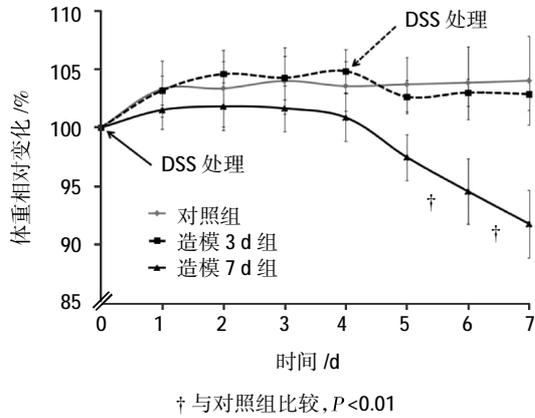


图 1 各组小鼠体重变化比较

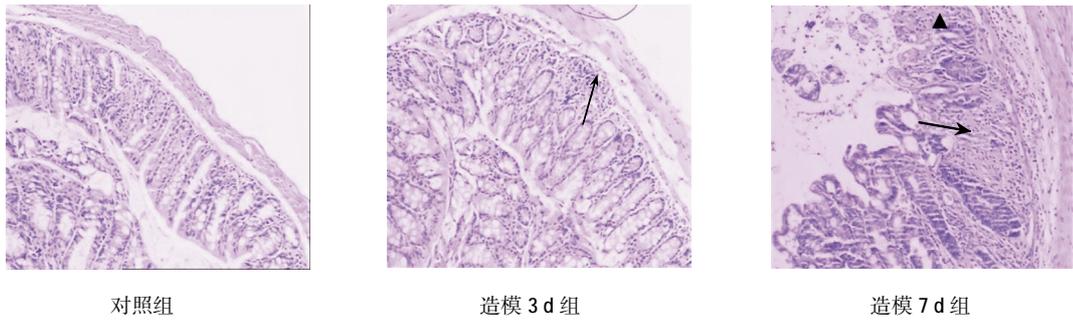


图 2 各组小鼠结肠组织病理学变化 (× 200)

表 3 各组小鼠脾脏和淋巴结中 MDSC 细胞的表达 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	脾脏			淋巴结		
	MDSC	M-MDSC	G-MDSC	MDSC	M-MDSC	G-MDSC
对照组	1.93 ± 0.56	1.00 ± 0.15	0.93 ± 0.42	0.73 ± 0.31	0.40 ± 0.23	0.33 ± 0.08
造模 3 d 组	1.77 ± 0.32	0.99 ± 0.16	0.77 ± 0.23	0.53 ± 0.12	0.25 ± 0.07	0.28 ± 0.07
造模 7 d 组	2.23 ± 1.30	1.19 ± 0.67	1.04 ± 0.64	0.45 ± 0.06 [†]	0.22 ± 0.03	0.22 ± 0.04 [†]
F 值	0.586	0.530	0.654	3.875	3.094	4.768
P 值	0.567	0.597	0.531	0.042	0.073	0.024

注:† 与对照组比较, $P < 0.05$

义($P = 0.016$ 和 0.016)。见图 1 和表 2。

表 2 各组小鼠终末结肠长度和 DAI 评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	结肠长度 /cm	DAI 评分
对照组	7.65 ± 0.62	0
造模 3 d 组	7.61 ± 0.86	2.86 ± 1.07 ¹⁾
造模 7 d 组	6.70 ± 0.48 ¹⁾²⁾	10.25 ± 1.67 ¹⁾²⁾
F 值	4.903	137.341
P 值	0.020	0.000

注:1)与对照组比较, $P < 0.05$; 2)与造模 3 d 组比较, $P < 0.05$

2.2 结肠组织病理学变化

对照组小鼠结肠黏膜上皮完整,腺体排列基本整齐,固有层和黏膜层内只有少许炎症细胞浸润;经 DSS 诱导 3 d 后,结肠黏膜腺体排列稍显紊乱,炎症细胞浸润增多;至第 7 天,结肠固有腺体减少或缺失,可见溃疡,杯状细胞减少,黏膜组织出现弥漫性炎症细胞浸润。见图 2。

2.3 各组小鼠脾脏和淋巴结中 MDSC 细胞的表达

与对照组比较,造模 3 d 组小鼠肠系膜淋巴结中 MDSC 百分数有下降趋势,但差异无统计学意义($P = 0.075$),造模 7 d 组肠系膜淋巴结中 MDSC 百分数较对照组降低,差异有统计学意义($P = 0.015$);进一步观察单核细胞样 MDSC 亚群(M-MDSC)和粒细胞样 MDSC 亚群(G-MDSC)的比例发现,造模 7 d 组

G-MDSC 百分数较对照组下降, 差异有统计学意义 ($P=0.007$)。脾脏 MDSC 及各亚群比例在 3 组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 3。

2.4 各组小鼠脾脏和淋巴结中 Treg 细胞的表达

与对照组和造模 3 d 组比较, 造模 7 d 组小鼠肠系膜淋巴结中 Treg 细胞百分率升高, 差异有统计学意义 ($P=0.003$ 和 0.002)。脾脏 Treg 细胞百分率在 3 组比较差异无统计学意义 ($P=0.426$)。见表 4。

表 4 各组小鼠脾脏和淋巴结中 Treg 细胞的表达
(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	脾脏	淋巴结
对照组	7.98 ± 1.77	8.28 ± 0.38
造模 3 d 组	8.60 ± 0.57	8.12 ± 1.19
造模 7 d 组	7.72 ± 1.35	10.55 ± 1.93 ¹⁾²⁾
F 值	0.892	8.101
P 值	0.426	0.003

注: 1) 与对照组比较, $P<0.05$; 2) 与造模 3 d 组比较, $P<0.05$

3 讨论

虽然 UC 的发病机制仍不明确, 但免疫紊乱被认为是疾病发生的重要原因之一, 多种免疫学因素与 UC 发病密切相关, 近年抑制性细胞在 UC 发病中的作用引起广泛关注。MDSC 作为独特的抑制性细胞群体, 可通过多种机制负性调控免疫应答, 在肿瘤、炎症和感染等多种疾病发生中发挥重要作用。已有研究发现, 肺癌、肝癌和乳腺癌等许多肿瘤组织中存在大量 MDSC 浸润, 参与肿瘤的免疫逃逸、免疫耐受等; 在肝脏疾病如急性肝损伤、病毒性肝炎和肝纤维化等发病过程中, MDSC 数量增多且抑制功能增强^[5-6]。本研究结果显示, 随着炎症进展, 小鼠淋巴结中 MDSC 表达逐渐减少, 提示 MDSC 与 UC 发病呈负相关。MDSC 具有免疫抑制功能, 因此, 笔者推测急性肠道炎症发生可能导致 MDSC 细胞数量减少及功能异常, 使效应性 T 细胞的过度活化, 黏膜炎症加重。

小鼠 MDSC 主要表达 CD11b 和 Gr-1, 根据 Gr-1 表位不同, 可进一步将 MDSC 分为单核细胞样 MDSC 亚群和粒细胞样 MDSC 亚群, 2 种亚群在特征、抑制功能和机制等方面均存在很大差异, 其中, M-MDSC 表达 CD11b+Ly6G+Ly6C+, 在形态上类似于单核/巨噬细胞, 主要通过上调诱导性一氧化氮合成酶、精氨酸酶以及免疫抑制因子发挥抑制作用; G-MDSC 表

达 CD11b+Ly6G+Ly6C-, 形态上类似于粒系细胞, 主要通过产生活性氧化物及与 T 细胞直接接触发挥作用^[7]。研究发现, 不同疾病对 MDSC 亚群的影响不同, YOUN 等^[8]观察 MDSC 亚群在多种荷瘤小鼠中的变化, 结果显示所有肿瘤小鼠中均存在 G-MDSC 高表达, 而 M-MDSC 仅在少数模型小鼠中增高; HOCHST 等^[9]发现, 在炎症及纤维化发生过程中, 肝脏内发生大量 M-MDSC 聚集, 而肾脏内的优势亚型则是 G-MDSC。笔者观察 2 个亚群在 UC 小鼠的表达情况, 结果显示随着炎症的进展, 淋巴结中 G-MDSC 减少, 而 M-MDSC 无变化, 提示在 UC 发病过程中, G-MDSC 可能发挥着更重要的作用。

Treg 细胞是机体发挥免疫调节功能的主要效应细胞, 可通过细胞间直接接触及分泌抑制性细胞因子等调控免疫反应, 维持免疫耐受和免疫稳态。Treg 细胞在控制肠道炎症中发挥着重要作用, 动物实验和临床研究均已证实 Treg 细胞数量或功能异常与 UC 发病密切相关, 外源性输注 Treg 细胞能通过抑制免疫应答而控制 UC 病情进展^[10-11]。本研究发现, UC 小鼠淋巴结中 Treg 细胞的比例增高, 与以前文献报道相一致^[12]。目前 Treg 细胞增高的原因尚不清楚, 可能与机体免疫平衡调节有关, 当 UC 发生时, 活性 CD4⁺T 细胞亚群(如 Th1、Th17 等)细胞升高, 为了维持机体免疫平衡, Treg 细胞也反应性升高, 但这些细胞数量的增加不足以抑制 Th1、Th17 等细胞引起的促炎反应; 另外, 增高的 Treg 细胞可能存在功能缺陷, 因此在 UC 进展过程中, 虽然 Treg 细胞数量增多, 但黏膜局部仍出现炎症表现。作为机体内 2 种重要的抑制性细胞, MDSC 与 Treg 细胞间存在着密切联系, MDSC 可通过产生 TGF- β 、IL-10 或精氨酸酶诱导 Treg 细胞, 同时 MDSC 还具有将耐受原摄取并提呈给 Treg 细胞, 促进 Treg 扩增的能力^[13-14]; 反之, Treg 细胞能够通过产生 TGF- β 调控 MDSC 的分化和功能^[15], 提示 MDSC 和 Treg 细胞变化可能具有相关性。然而本研究结果显示, 在急性 UC 发生过程中 MDSC 比例逐渐降低, 而 Treg 比例增高, 两者变化趋势并不一致, 由此可见, 溃疡性结肠炎小鼠 Treg 细胞增加并非 MDSC 诱导所致, 其具体机制有必要进一步研究和证实。

综上所述, 在 UC 发病过程中, 淋巴结 MDSC 比例下降, 而 Treg 细胞比例升高, 提示两者均与 UC 发生、发展密切相关, 如能调控 MDSC 和 Treg 细胞的分化和功能, 则可能影响 UC 的疾病进展。本结果为

进一步揭示 UC 的免疫发病机制提供实验依据,为临床治疗 UC 提供了新的靶点。

参 考 文 献:

- [1] GEREMIA A, BIANCHERI P, ALLAN P, et al. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease [J]. *Autoimmun Rev*, 2014, 13(1): 3-10.
- [2] SU Z, NI P, ZHOU C, et al. Myeloid-derived suppressor cells in cancers and inflammatory diseases: angel or demon[J]. *Scand J Immunol*, 2016, 84(5): 255-261.
- [3] Gabrilovich D I, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system [J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(3): 162-174.
- [4] ARCE-SILLAS A, ALVAREZ-LUQUIN D D, TAMAYA-DOMINGUEZ B, et al. Regulatory T cells: molecular actions on effector cells in immune regulation [J]. *J Immunol Res*, 2016 (2016): 1720827.
- [5] ZHANG H, LIU Y, BIAN Z, et al. The critical role of myeloid-derived suppressor cells and FXR activation in immune-mediated liver injury[J]. *J Autoimmun*, 2014(53): 55-66.
- [6] PALLETT L J, GILL U S, QUAGLIA A, et al. Metabolic regulation of hepatitis B immunopathology by myeloid-derived suppressor cells[J]. *Nat Med*, 2015, 21(6): 591-600.
- [7] MOVAHEDI K, GUILLIAMS M, van DEN BOSSCHE J, et al. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity[J]. *Blood*, 2008, 111(8): 4233-4244.
- [8] YOUNG J I, NAGARAJ S, COLLAZO M, et al. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice[J]. *J Immunol*, 2008, 181(8): 5791-5802.
- [9] HOCHST B, MIKULEC J, BACCEGA T, et al. Differential induction of Ly6G and Ly6C positive myeloid derived suppressor cells in chronic kidney and liver inflammation and fibrosis[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0119662.
- [10] 吴铁龙, 薛丽莉, 戴圆圆, 等. 活动期溃疡性结肠炎患者外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞与肠道炎症反应的相关性研究 [J]. *国际消化病杂志*, 2015, 35(4): 293-294.
- [11] YANG B H, HAGEMANN S, MAMARELI P, et al. Foxp3(+) T cells expressing ROR γ t represent a stable regulatory T-cell effector lineage with enhanced suppressive capacity during intestinal inflammation[J]. *Mucosal Immunol*, 2016, 9(2): 444-457.
- [12] MA Y H, ZHANG J, CHEN X, et al. Increased CD4⁺ CD45RA⁻ FoxP3 low cells alter the balance between Treg and Th17 cells in colitis mice[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(42): 9356-9367.
- [13] ZHANG C, WANG S, YANG C, et al. The crosstalk between myeloid derived suppressor cells and immune cells: to establish immune tolerance in transplantation[J]. *J Immunol Res*, 2016 (2016): 4986797.
- [14] ZHAI N, LI H, SONG H, et al. Hepatitis C virus induces MDSCs-Like monocytes through TLR2/PI3K/AKT/STAT3 signaling[J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0170516.
- [15] LEE C R, KWAK Y, YANG T, et al. Myeloid-derived suppressor cells are controlled by regulatory T cells via TGF- β during murine colitis[J]. *Cell Rep*, 2016, 17(12): 3219-3232.

(王荣兵 编辑)