

# 体外小鼠 nuocyte 细胞中 IL-13 的干预促进 CD4<sup>+</sup> T 细胞向 CD4<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> 细胞的分化

蔺 林<sup>△</sup> 陈 峥 戴 飞 魏瑾瑾 汤欣玥

(复旦大学附属华山医院北院耳鼻咽喉头颈外科 上海 201907)

**【摘要】 目的** 探讨体外小鼠 nuocyte 细胞中 IL-13 的干预对 CD4<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> 细胞的分化的影响。**方法** 用卵清蛋白(ovalbumin,OVA)建立小鼠变应性鼻炎(allergic rhinitis,AR)模型( $n=6$ ),正常组注射生理盐水( $n=6$ )。计数 AR 小鼠的打喷嚏、挠鼻次数,分离、提纯并体外培养小鼠鼻相关淋巴组织(nasal-associated lymphoid tissue, NALT)中的 nuocyte 细胞;构建针对小鼠 IL-13 的 shRNA,并用慢病毒将 IL-13 shRNA 转染体外培养的 AR 小鼠 nuocyte 细胞,分别检测转染前后培养基中 nuocyte 细胞在鼠重组(recombinant,rm)IL-33 作用下分泌 IL-13 和 IL-10 的浓度;获取 AR 小鼠外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells,PBMCs)并分离出 CD4<sup>+</sup> T 细胞进行体外培养,然后将体外培养的 nuocyte 细胞加入上述小鼠 CD4<sup>+</sup> T 细胞培养基共培养,检测 CD4<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> 细胞所占 CD4<sup>+</sup> T 细胞的百分比。**结果** 小鼠 AR 模型打喷嚏和挠鼻次数较正常小鼠显著增多,OVA 诱导 NALT 来源的小鼠 nuocyte 细胞被鉴定为 CD3CD4CD8CD19CD11bCD11cFcεR1(lineage)<sup>-</sup> ICOS<sup>+</sup>,AR 小鼠的 nuocyte 细胞数较正常小鼠显著增多,携带有 IL-13 shRNA 的慢病毒成功转染到体外培养的 nuocyte 细胞。转染前经 rmIL-33 的刺激,培养基中 IL-13 和 IL-10 的浓度均升高,差异具有统计学意义;转染后培养基中 IL-13 的含量无明显增多,而 IL-10 含量明显增多,转染前后 IL-13 和 IL-10 的浓度差异具有统计学意义,IL-13 浓度降低,IL-10 浓度升高,而且转染后 CD4<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> 细胞占 CD4<sup>+</sup> T 细胞的百分比也增加,差异具有统计学意义。**结论** 体外小鼠 nuocyte 细胞中 IL-13 的干预可能促进 CD4<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> 细胞的分化。

**【关键词】** nuocyte 细胞; CD4<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> 细胞; 变应性鼻炎(AR); 鼻相关淋巴组织(NALT); 白介素(IL); 小鼠

**【中图分类号】** R765 **【文献标识码】** A **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2019.03.006

## Intervention of IL-13 in nuocytes promotes differentiation of CD4<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> cells from CD4<sup>+</sup> T cells *in vitro*

LIN Lin<sup>△</sup>, CHEN Zheng, DAI Fei, WEI Jin-jin, TANG Xin-yue

(Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Huashan Hospital North, Fudan University, Shanghai 201907, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the influence of intervention of IL-13 in nuocytes on differentiation of CD4<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> cells *in vitro*. **Methods** Mice allergic rhinitis (AR) models ( $n=6$ ) were established using ovalbumin (OVA), mice of control were injected with normal saline ( $n=6$ ). Numbers of sneezing and nasal rubbing were counted. Nuocytes were sorted and purified from the mouse nasal-associated lymphoid tissue (NALT), and the cells from AR mice NALT were cultured *in vitro*. Lentivirus vectors that encoded small hairpin RNA (shRNA) against IL-13 gene were established and administered into nuocytes cultures. Then, IL-13 and IL-10 were examined before and after transfection of nuocytes in response to recombinant (rm) IL-33. After that, mice peripheral blood

国家自然科学基金面上项目(81371076);上海申康医院发展中心郊区医院临床能力建设项目(SHDC12015905);复旦大学附属华山医院北院启动基金(HSBY2016005)

<sup>△</sup>Corresponding author E-mail:linlinhsn@aliyun.com

mononuclear cells (PBMCs) were obtained, and CD4<sup>+</sup> T cells were sorted and purified from PBMCs, and cultured *in vitro*. Finally, NALT-derived nuocytes were co-cultured with CD4<sup>+</sup> T cells, and the percentage of CD4<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> cells in CD4<sup>+</sup> T cells was evaluated. **Results** Numbers of sneezing and nasal rubbing were all increased in mice AR models compared with normal mice. OVA induced NALT-derived nuocytes were identified as CD3CD4CD8CD19CD11bCD11cF $\epsilon$ R1 (lineage)<sup>-</sup> ICOS<sup>+</sup>. Nuocyte number was increased in AR mice compared with normal ones. Lentivirus vectors that carried shRNA against IL-13 gene were established successfully, and transfected into cultured nuocytes *in vitro*. In response to rmIL-33, concentrations of IL-13 and IL-10 were all increased statistically before transfection. After transfection, IL-13 was not increased statistically, while IL-10 was elevated significantly after transfection. The concentrations of IL-13 and IL-10 before and after transfection were statistically changed. IL-13 concentration was decreased while IL-10 concentrations was increased. Furthermore, the percentage of CD4<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> cells was also increased statistically after nuocytes transfection. **Conclusions** Intervention of IL-13 in nuocytes might promote differentiation of CD4<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> cells from CD4<sup>+</sup> T cells *in vitro*.

**【Key words】** nuocytes; CD4<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> cells; allergic rhinitis (AR); nasal-associated lymphoid tissue (NALT); interleukin (IL); mouse

\* This work was supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81371076), the Suburb Tertiary Hospital Clinical Capacity Building Project of Shanghai Shenkang Hospital Development Center (SHDC12015905) and Initial Fund of Huashan Hospital North, Fudan University (HSBY2016005).

变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)是由变应原诱导、免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)-E介导、Th2细胞促发发生于鼻腔黏膜的变态反应性炎症。在AR发病的各种信号通路中, Th2细胞(适应性免疫的关键细胞)合成和释放的Ⅱ型细胞因子白介素(interleukin, IL)-4、IL-5、IL-9和IL-13等起着枢纽的作用<sup>[1]</sup>。大量研究证实,无论是适应性免疫还是固有免疫,都在AR的发病机制中起着重要作用<sup>[2]</sup>。

固有淋巴样细胞(innate lymphoid cells, ILCs)是固有免疫的关键细胞, nuocyte细胞属于Ⅱ型(IL2Cs)中的一种。该细胞是在对小鼠寄生虫免疫的研究中发现的。nuocyte细胞在IL-25和/或IL-33的作用下,可在小鼠寄生虫模型的肠系膜淋巴结和脾脏中大量增殖,产生和释放Ⅱ型细胞因子如IL-5、IL-13等,尤其是IL-13,也能产生少量IL-10<sup>[3]</sup>。随后的研究发现, nuocyte细胞在小鼠哮喘模型的肺组织中也出现增殖,并可以直接导致支气管的高反应性,其诱发机制主要是通过释放大量IL-13而增加了支气管黏膜的炎症反应所致<sup>[4]</sup>。IL-5可以趋化和激活嗜酸性粒细胞(eosinophil, Eos)<sup>[5]</sup>, IL-13可以促进杯状细胞的增生和黏膜下腺体的分泌,还能诱发气道的高反应性<sup>[6]</sup>。

我们前期的研究显示, nuocyte细胞在卵清蛋白(ovalbumin, OVA)诱导建立的AR小鼠模型的鼻相关淋巴组织(nasal-associated lymphoid tissue, NALT)中出现增殖,并发现将体外培养的OVA诱导NALT来源的nuocyte细胞过继转移给小鼠后,可以加剧AR小鼠鼻腔黏膜的变应性炎症<sup>[7]</sup>,这种作用也是通过nuocyte细胞产生和释放IL-5和IL-13而诱发的。目前大多数关于nuocyte细胞的研究重心都放在这两种细胞因子上,而对于该细胞分泌的IL-10及其可能的作用研究甚少。本研究旨在探讨体外小鼠nuocyte细胞中IL-13的干预对CD4<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup>细胞分化的影响。

## 材 料 和 方 法

**实验动物** 健康雌性BALB/c小鼠(SPF级)12只, 6~8周龄, 购自中科院上海实验动物中心, 由复旦大学上海医学院实验动物科学部代养。本研究获得复旦大学实验动物科学部动物福利和伦理小组的批准(伦理号: 201808001Z)。实验动物随机分为2组, 每组6只。

**动物模型的建立** 按照已经出版的建模方法<sup>[8]</sup>,

以浓度为 0.5 mg/mL 的 OVA(美国 Sigma 公司)和 20 mg/mL 的  $\text{Al}(\text{OH})_3$  生理盐水溶液共 0.2 mL 对小鼠进行腹腔注射致敏,致敏 3 次,每周 1 次(第 1、8 和 15 天),然后用浓度为 40 mg/mL 的 OVA 生理

盐水溶液 0.02 mL 滴入小鼠鼻孔进行激惹,每天 1 次(第 22 天至 29 天),共 8 次,即为 AR 小鼠;对照组只用生理盐水(正常组)(图 1)。打喷嚏和挠鼻次数在最后一次激惹结束后 10 min 进行计数。

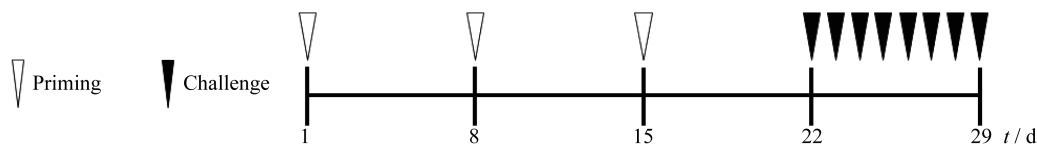


图 1 AR 小鼠模型的建模步骤

Fig 1 Protocols of AR mice models

**小鼠 NALT 和外周血单个核细胞的获取** 处死小鼠,去掉其前牙和面颊部肌肉,由硬腭后半部边缘以细针头小心获取 NALT 组织,并将该组织放入添加了 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 RPMI 1640 培养基中,然后将其通过 70  $\mu\text{m}$  Falcon 细胞筛网滤过,并用三羟甲基氨基甲烷-氯化铵缓冲液(0.83%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  和 20 mmol/L Tris/Cl)裂解红细胞;AR 小鼠外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)的获取采用常规摘除小鼠眼球法。

**nuocyte 细胞的获取** NALT 细胞悬液在 4  $^{\circ}\text{C}$  温度和  $200 \times g$  离心 10 min 后进行流式细胞仪检测。根据多项相关研究所证实的 nuocyte 细胞膜表面分子表达的特点即  $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD8}^-\text{CD19}^-\text{CD11b}^-\text{CD11c}^-\text{Fc}\epsilon\text{R1}^-(\text{lineage})^-\text{ICOS}^+$  进行设门,细胞用 200  $\mu\text{L}$  流式细胞液(1%牛血清白蛋白溶液和 0.1% PBS 溶液)洗涤,并与兔血清在室温下共培养 5 min 以封闭  $\text{Fc}\gamma$ ,然后再用流式细胞液洗涤 3 次,将细胞调成浓度为  $1 \times 10^8/\text{mL}$ ,分别用 50  $\mu\text{L}$  结合了荧光素异硫氰酸酯-葡聚糖的一抗(抗  $\text{CD3}$ 、 $\text{CD4}$ 、 $\text{CD8}$ 、 $\text{CD19}$ 、 $\text{CD11b}$ 、 $\text{CD11c}$ 、 $\text{Fc}\epsilon\text{R1}$  的抗体,美国 MyBioSource 公司或美国 BioLegend 公司)在 4  $^{\circ}\text{C}$  温度下染色 30 min,随后用结合了藻红蛋白的单克隆抗体(抗 ICOS 的抗体,美国 MyBioSource 公司)再染。再次洗涤,并与结合了生物素的 50  $\mu\text{L}$  兔抗小鼠的二抗 IgG 共培养,随后加入 50  $\mu\text{L}$  结合了链霉亲和素的藻红蛋白(丹麦 Dako 公司),对照组只用与上述抗体同型的一抗染色。样品用装备了 ACS DIVA 软件系统(美国 BD Biosciences 公司)的 LSR II 型流式细胞仪进行分析,并用 FlowJo version 10 进行数据输出。

**nuocyte 细胞体外培养和 rmIL-33 干预** nuocyte 细胞分离、提纯后调成  $6 \times 10^7/\text{mL}$  浓度,

并在含有 10% FBS、1% 青霉素/链霉素、0.1%  $\beta$ -巯基乙醇、10 ng/mL 小鼠重组(recombinant, rm) IL-7(美国 MyBioSource 公司)和 10 ng/mL 小鼠 rmIL-33(美国 MyBioSource 公司)的 RPMI 培养基中体外培养 6 天。然后收集 nuocyte 细胞,重新加入 100 ng/mL 小鼠 rmIL-33(美国 MyBioSource 公司)培养 3 天,ELISA 法检测细胞上清液中 IL-13 和 IL-10 的浓度。

**IL-13 shRNA 慢病毒的构建及转染** IL-13 shRNA 序列的选择和含有该序列慢病毒的构建均由生工生物工程(上海)股份有限公司提供,用 293T 细胞包装慢病毒,以 PANC 细胞检测慢病毒转染效率,4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)作为核染色的空白对照,构建完成后,将其以  $1 \times 10^9$  TU/mL 的滴度加入 nuocyte 细胞培养基进行转染,3 天后,用 ELISA 法检测培养基上清液中 IL-13 和 IL-10 的浓度。

具体方法分别按照小鼠 IL-13 和 IL-10 ELISA 试剂盒(美国 MyBioSource 公司)所规定的步骤进行。

**$\text{CD4}^+$  T 细胞的获取** 小鼠  $\text{CD4}^+$  T 细胞的分离、提纯按照相关试剂盒 EasySep<sup>TM</sup> Mouse  $\text{CD4}^+$  T Cell Isolation Kit(加拿大 STEMCELL 公司)所规定的步骤进行,该方法获得的  $\text{CD4}^+$  T 细胞得率高、纯度高,方便下一步实验;将分选出的  $\text{CD4}^+$  T 细胞调成浓度  $5 \times 10^5/\text{mL}$  并移入 T 细胞培养基(1640, 10% FBS, 1% 青霉素-链霉素, 50  $\mu\text{mol/L}$   $\beta$ -巯基乙醇, 100 U/mL IL-2)中体外培养 6 天,然后把 nuocyte 细胞加入  $\text{CD4}^+$  T 细胞培养基中,共培养 3 天,检测  $\text{CD4}^+$  IL10<sup>+</sup> 细胞占  $\text{CD4}^+$  T 细胞的百分比。

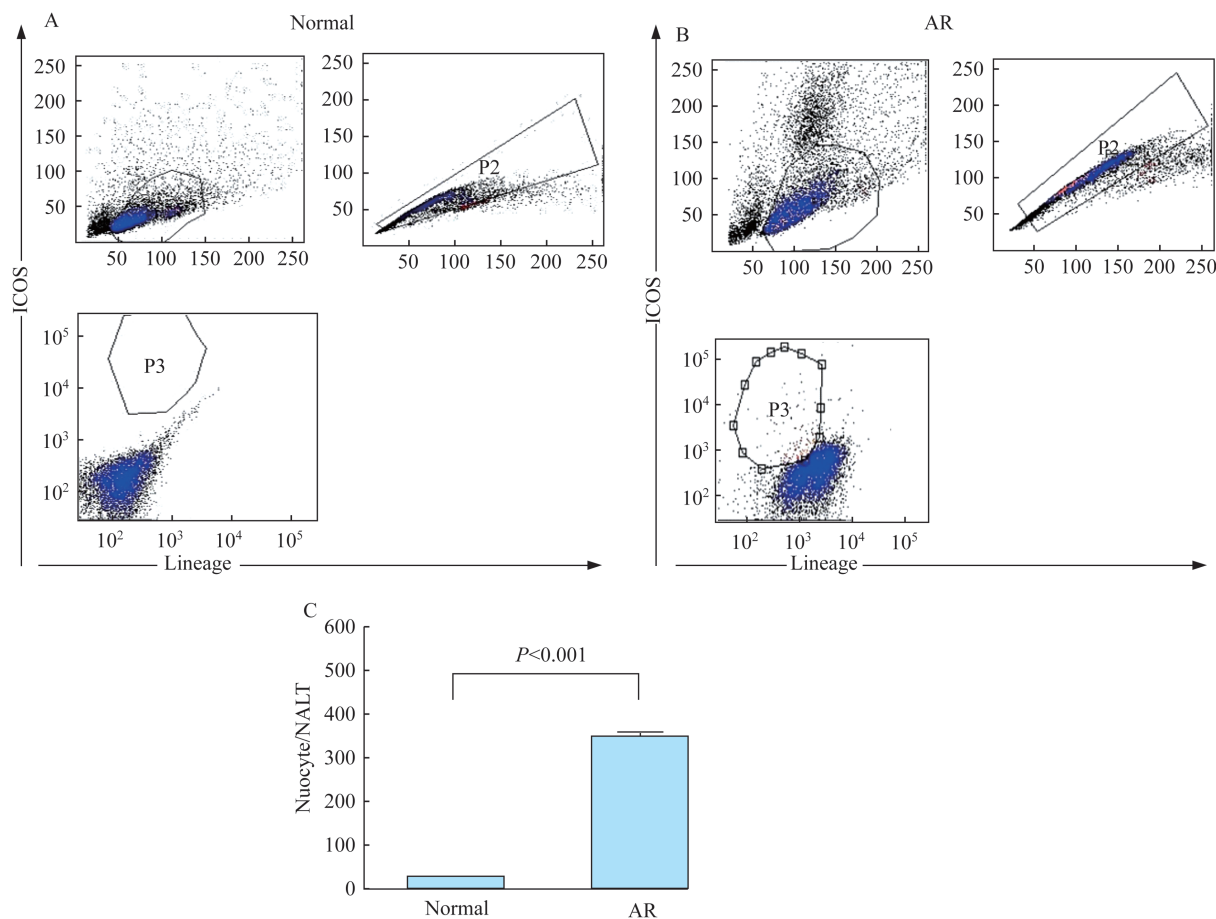
**$\text{CD4}^+$  IL10<sup>+</sup> 细胞的检测** 流式细胞仪检测  $\text{CD4}^+$  IL10<sup>+</sup> 细胞占  $\text{CD4}^+$  T 细胞的百分比,方法和

步骤同上述“nuocyte 细胞的获取”,一抗分别用结合了 FITC 的抗 CD4 抗体和结合了 PE 的抗 IL-10 抗体,所得数据用 FlowJo 10 进行分析。

**统计学分析** 采用 GraphPad Prism 6 统计软件分析所得数据。因数据经检验呈正态分布,而样本量又较小,所以组内差异的比较采用  $t$  检验,组间差异的比较采用方差分析。本试验中数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### AR 小鼠模型的建立 小鼠采用经典方式建



A: NALT nuocytes from normal mice; B: NALT nuocytes from AR mice; C: Comparison of nuocytes numbers in normal and AR mice. AR: Allergic rhinitis.

图 2 小鼠 AR 模型的 NALT 中 nuocyte 细胞的流式细胞仪分析

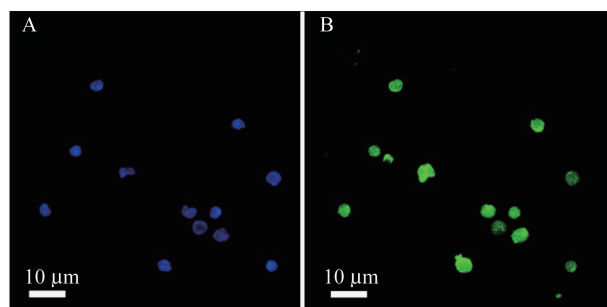
Fig 2 Flow cytometry analysis of NALT nuocytes from AR mice models

**nuocyte 细胞的转染率** IL-13 shRNA 慢病毒转染 nuocyte 细胞的效率以分析绿色荧光蛋白在转染的 PANC 细胞中的表达量来评估,感染复数设置为 10, IL-13 shRNA 的转染率为 98.28%; IL-13 的

模, OVA 腹腔内致敏, OVA 及其佐剂鼻内激惹(图 1)。末次激惹后 10 min, 分别计数小鼠打喷嚏和挠鼻次数, 发现 AR 组与正常组比较, 差异具有统计学意义, AR 模型明显超过正常小鼠 ( $t = 54.44, P < 0.0001$ ;  $t = 33.75, P < 0.0001$ )。提示 AR 小鼠模型建立成功。

**nuocyte 细胞的鉴定** 建模后, 用流式细胞仪设门技术, 分选、提纯 NALT 中 nuocyte 细胞。nuocyte 细胞被鉴定为 CD3CD4CD8CD19CD11bCD11cFcεR1 (lineage)<sup>-</sup> ICOS<sup>+</sup> (图 2A 和 B), 而且 AR 小鼠的 nuocyte 细胞数较正常小鼠显著增多(图 2C)。

转录抑制率以分析其 mRNA 在 PANC 细胞中的含量来评估, 当感染复数设置为 10 时, IL-13 shRNA 的抑制率为 90.5%。nuocyte 细胞的转染定性评估见图 3A 和 3B。



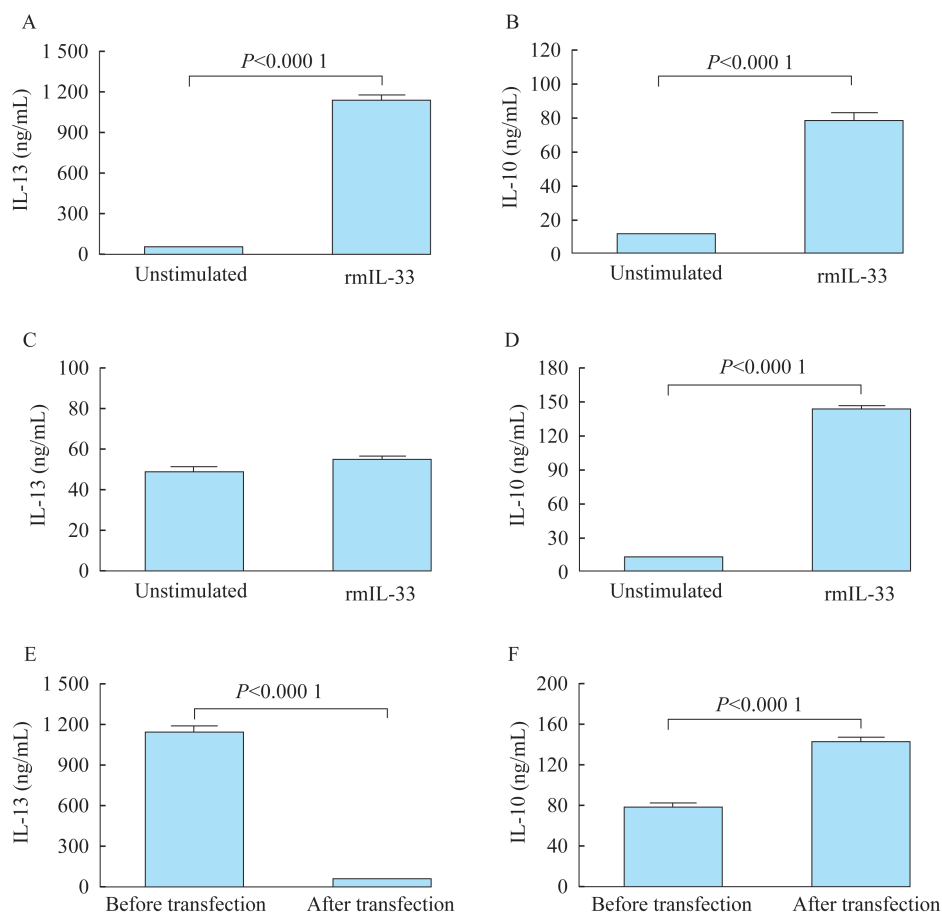
A: Blank control, blue fluorescence indicated DAPI staining ( $\times 400$ ); B: Positive staining of nuocytes, green fluorescence indicated transfection of nuocytes by lentivirus with IL-13 shRNA ( $\times 400$ ).

图3 IL-13 shRNA 慢病毒转染 nuocyte 细胞

Fig 3 Transfection of nuocytes by lentivirus with IL-13 shRNA

nuocyte 细胞对 rmIL-33 的反应 nuocyte 细胞的特点是合成和释放 II 型细胞因子如 IL-13, 也可以释放少量的抑制性细胞因子 IL-10。为了检测 OVA

诱导 NALT 来源的 nuocyte 细胞是否具有其相应的功能, 我们用 ELISA 法检测体外培养的此种细胞是否分泌 IL-13 和 IL-10, 以及是否受 IL-13 shRNA 慢病毒转染的影响。结果发现, 转染前 rmIL-33 干预后体外培养 of 细胞大量释放 IL-13 和 IL-10, IL-13 与 IL-10 浓度均显著高于干预前, 差异有统计学意义 ( $t = 22.62, 11.93, P$  均  $< 0.0001$ , 图 4A、B)。这证明 OVA 诱导产生的 nuocyte 细胞具有其正常的功能。而转染后, rmIL-33 干预后体外培养的 nuocyte 细胞释放 IL-13 没有明显升高, 与干预前相比较, 其浓度差异无统计学意义 (图 4C) ( $t = 1.67, P = 0.14$ ), 而 IL-10 的浓度干预后显著高于干预前 (图 4D) ( $t = 30.45, P < 0.0001$ )。转染前 IL-13 的浓度明显高于转染后 (图 4E) ( $t = 22.54, P < 0.0001$ ), IL-10 的浓度明显低于转染后 (图 4F) ( $t = 9.29, P < 0.0001$ ), 差异均有统计学意义。



A: Concentration of IL-13 in the cultures before transfection; B: Concentration of IL-10 in the cultures before transfection; C: Concentration of IL-13 in the cultures after transfection; D: Concentration of IL-10 in the cultures after transfection; E: Comparison of concentration of IL-13 in the cultures before and after transfection; F: Comparison of concentration of IL-10 in the cultures before and after transfection.

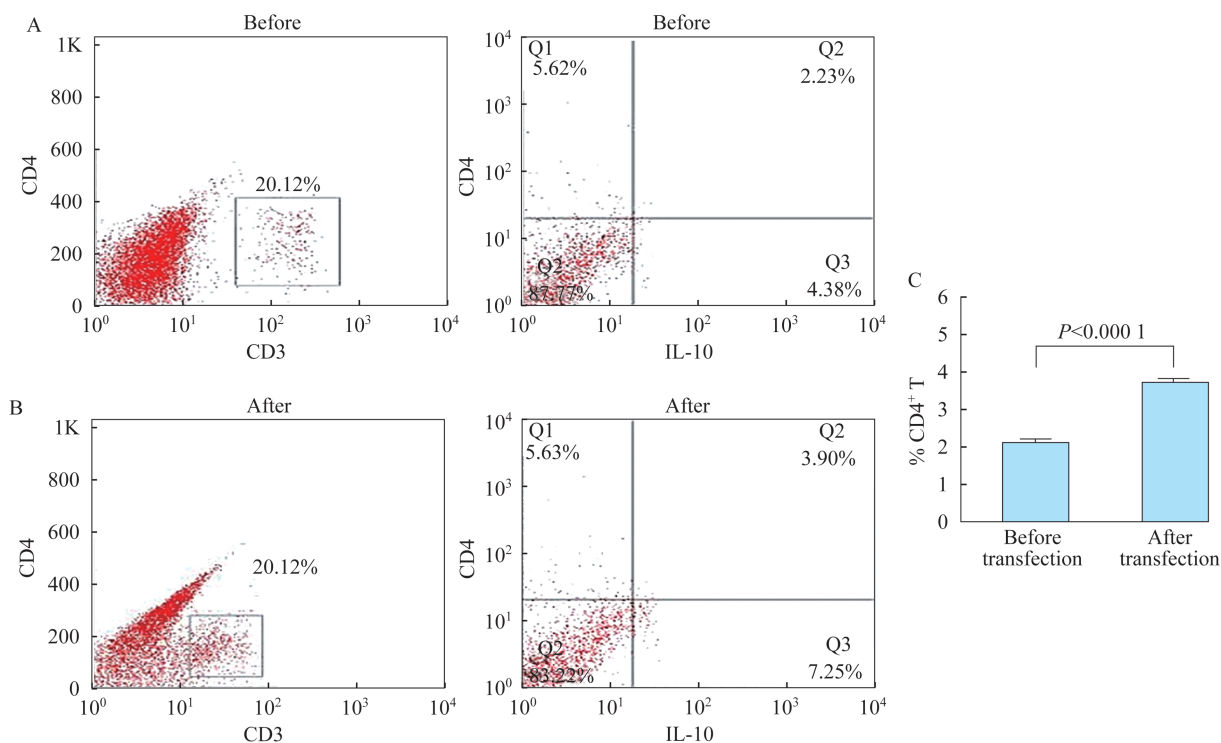
图4 转染前后 AR 小鼠 NALT 来源的 nuocyte 细胞对 rmIL-33 干预后的反应

Fig 4 Response of NALT-derived nuocytes to rmIL-33 before and after transfection



**nuocyte 细胞对 CD4<sup>+</sup> T 细胞的诱导** 为了证实 nuocyte 细胞对 CD4<sup>+</sup> T 细胞的诱导作用及是否受 IL-13 shRNA 慢病毒转染的影响,我们将转染前后 NALT 来源的该细胞与 CD4<sup>+</sup> T 细胞培养基进行体外共培养,结果发现 CD4<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> 细胞所占 CD4<sup>+</sup> T

细胞百分比发生变化(图 5A 和 5B),转染后的 nuocyte 细胞共培养后,CD4<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> 细胞百分比明显升高( $t = 10.00, P < 0.0001$ )(图 5C)。这表明, nuocyte 细胞受 IL-13 shRNA 慢病毒转染的影响,促进 CD4<sup>+</sup> T 细胞向 CD4<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> 细胞的分化。



A: Flow cytometry analysis of CD4<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> cells in the cocultures before transfection, Q2 area indicated CD4<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> cells; B: Flow cytometry analysis of CD4<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> cells in the cocultures after transfection; C: Comparison of percentage of CD4<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> cells in total CD4<sup>+</sup> T cells before and after transfection.

图 5 nuocyte 细胞对 CD4<sup>+</sup> T 细胞的诱导

Fig 5 Induction of CD4<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> cells from CD4<sup>+</sup> T cells by nuocytes

## 讨 论

变态反应性炎症中适应性免疫系统 Th2 细胞是 II 型细胞因子如 IL-4、IL-5、IL-9 和 IL-13 的主要来源,但越来越多的研究证实,固有免疫系统 ILC2s 也可以产生这类细胞因子,并诱发 Eos 局部的浸润、肥大细胞的增殖、杯状细胞的增生和分泌的病理改变<sup>[9]</sup>。还有研究表明,IL-13 可直接导致呼吸道高反应, Th2 细胞并非是该细胞因子的主要来源, ILC2s 才是<sup>[10]</sup>。有学者按照 ILC 的特点和功能将其分为 3 型: ILC1s、ILC2s 和 ILC3s, 每型都有相应的细胞种类。 nuocyte 细胞属于 II 型; ILC2s 还包括自然辅助细胞和固有辅助细胞 II 型, 虽然这些细胞

种类不同,但它们共同的特点都是表达 IL-25 受体 (IL-17BR) 和 IL-33 受体 (T1/ST2), 均可在 IL-25 和 IL-33 的作用下产生炎症介质 IL-5 和 IL-13<sup>[11]</sup>。变态反应性炎症状态下, IL-25 和 IL-33 主要由呼吸道上皮细胞产生<sup>[12]</sup>, 虽然它们属于不同的细胞因子家族, 但却具有上述类似的细胞反应<sup>[13]</sup>。大量研究证实, 这两种细胞因子可以诱导 II 型免疫反应, 用 IL-25 和/或 IL-33 干预后, 会产生大量 II 型细胞因子如 IL-5 和 IL-13, 并导致局部相应的病理改变<sup>[14-15]</sup>。

nuocyte 细胞除了分泌 II 型细胞因子促进炎症反应外, 也可以产生和释放少量 IL-10。目前关于 nuocyte 细胞的研究重心大都放在 IL-5 和 IL-13 两种细胞因子上, 而对于该细胞分泌的 IL-10 及其可

能的作用研究甚少。但该细胞既然释放 IL-10,可能就会有相应的功能,而 IL-10 又有诱导 CD4<sup>+</sup> T 细胞向 CD4<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> 细胞分化的作用,因此我们课题组假设 nuocyte 细胞来源的 IL-10 可能会影响 T 辅助细胞向 CD4<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> 细胞的分化。本研究即是初步探讨体外小鼠 nuocyte 细胞中 IL-13 的干预是否会影响 IL-10 的产生和释放,并进一步探讨后者对 CD4<sup>+</sup> T 细胞向 CD4<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> 细胞分化可能造成的影响。

本研究中,用 OVA 建模后,小鼠打喷嚏和挠鼻次数明显增加,说明 AR 小鼠模型建立成功。我们选择 AR 小鼠 NALT 中的 nuocyte 细胞,是因为炎症状态下的该细胞数目不仅增多(本研究中也显示 AR 小鼠的 nuocyte 细胞数较正常小鼠显著增多),而且处于激活状态,方便对其功能进行研究。获得了 AR 小鼠的 nuocyte 细胞后,在体外对其功能进行了检测,发现其在转染前受到小鼠 rmIL-33 的干预后大量释放 IL-13,并释放少量的 IL-10,说明该细胞功能正常。随后,我们构建了 IL-13 shRNA,并以慢病毒为载体体外转染到 nuocyte 细胞中,以抑制 IL-13 基因在该细胞中的表达。我们没有直接用 IL-13 基因敲除小鼠,因为 IL-13<sup>-/-</sup> 小鼠建模不成功会对研究造成较大影响(数据尚未发表),而携带有 IL-13 shRNA 的慢病毒转染稳定,且只影响 nuocyte 细胞产生和释放 IL-13 的功能,结果更客观与可靠。结果发现,nuocyte 细胞经转染后,rmIL-33 的干预没有使 nuocyte 细胞释放 IL-13 的浓度升高,与干预前相比较,IL-13 的浓度差异不具有统计学意义,但分泌 IL-10 的浓度差异具有统计学意义,干预后显著高于干预前。IL-13 的浓度变化转染前明显高于转染后,差异具有统计学意义,IL-10 的浓度变化转染前明显低于转染后,差异也具有统计学意义。这说明,nuocyte 细胞中 IL-13 基因转录的阻滞可以使抑制性细胞因子 IL-10 的产生和释放增加,可能在两种细胞因子的基因序列之间有某种联系,目前其机制尚不清楚。我们又将转染前后的 nuocyte 细胞加入体外培养的 CD4<sup>+</sup> T 细胞中,以评估该细胞对 CD4<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> 细胞的分化是否有诱导作用。结果发现 CD4<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> 细胞所占 CD4<sup>+</sup> T 细胞百分比发生变化,转染后的 nuocyte 细胞共培养后 CD4<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> 细胞百分比明显升高。这表明该细胞受 IL-13 shRNA 慢病毒转染的影响,IL-13 释放量减少,而 IL-10 释放量增加,后者可通过其位于 CD4<sup>+</sup> T 细胞上的相应受体,调节该细胞向 CD4<sup>+</sup>

IL10<sup>+</sup> 细胞的分化<sup>[16]</sup>。

nuocyte 细胞也可以产生和释放 IL-5,但其量甚微,该细胞的主要特点是产生 IL-13,并在局部组织(如肠道和肺组织)中实施相应功能<sup>[3-4]</sup>,所以本研究中未检测 IL-5,而 IL-13 shRNA 的作用是否也会影响 IL-5 的产生,后者浓度的改变是否也会诱导 CD4<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> 细胞比例增加,尚待进一步研究。

CD4<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> 细胞可通过产生和分泌 IL-10 抑制局部的炎症反应,就 AR 或哮喘等呼吸道的变态反应性炎症而言,该细胞通过释放 IL-10,后者通过其受体激活抑制气道炎症的通路,从而减轻鼻黏膜或支气管黏膜的变应性炎症<sup>[17]</sup>。因此,可以考虑设计某种药物或其他相关治疗方法,通过抑制 nuocyte 细胞中 IL-13 基因的转录表达,从而增加 IL-10 的产生和释放,在直接抑制炎症反应的同时,诱导 CD4<sup>+</sup> T 细胞向 CD4<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> 细胞转化,后者再释放 IL-10,继续抑制局部的炎症。

本研究发现体外小鼠 nuocyte 细胞中 IL-13 基因的干预可以促进 CD4<sup>+</sup> T 细胞向 CD4<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> 细胞的分化,但 IL-13 浓度的降低与 IL-10 的释放增多之间是否存在某种调控机制,以及 IL-13 shRNA 是否会直接影响 IL-10 的表达,尚待进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] DULLAERS M, DE BRUYNE R, RAMADANI F, *et al.* The who, where, and when of IgE in allergic airway disease[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2012, 129(3): 635-645.
- [2] MATSUSHITA K, KATO Y, AKASAKI S, *et al.* Proallergic cytokines and group 2 innate lymphoid cells in allergic nasal diseases[J]. *Allergol Int*, 2015, 64(3): 235-240.
- [3] NEILL DR, WONG SH, BELLOSI A, *et al.* Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity[J]. *Nature*, 2010, 464(7293): 1367-1370.
- [4] BARLOW JL, BELLOSI A, HARDMAN CS, *et al.* Innate IL-13-producing nuocytes arise during allergic lung inflammation and contribute to airways hyperreactivity[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2012, 129(1): 191-198. e1-4.
- [5] DURHAM SR, YING S, VARNEY VA, *et al.* Cytokine messenger RNA expression for IL-3, IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor in the nasal mucosa after local allergen provocation: relationship to tissue eosinophilia[J]. *J Immunol*, 1992, 148(8): 2390-2394.

(下转第 337 页)