

## 论著

文章编号:1000-5404(2013)13-1384-04

### IDO 与 Treg 在支气管哮喘小鼠中的相互作用及其意义

周丽蓉<sup>1</sup>, 张 劫<sup>2</sup>, 罗永艾<sup>1</sup> (400016 重庆, 重庆医科大学附属第一医院呼吸内科<sup>1</sup>; 400014 重庆, 重庆市第三人民医院老年科<sup>2</sup>)

**[摘要]** **目的** 探讨吲哚胺 2,3 双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO) 与 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞(Treg)之间的相关性以及在支气管哮喘发病机制中的作用。**方法** BALB/c 小鼠用随机数字表法分成对照组和哮喘组, 每组 8 只。哮喘组以鸡卵清蛋白(ovalbumin, OVA)致敏, 激发小鼠建立哮喘模型, 无创肺功能仪检测气道反应性, 支气管肺泡灌洗液(BALF)进行细胞学分析, ELISA 检测 BALF 中 INF- $\gamma$ 、IL-4、IL-10 浓度, 实时荧光定量 PCR 检测肺组织 IDO 和 Foxp3 mRNA 表达, 免疫组织化学方法检测 IDO 蛋白表达, 流式细胞仪检测 Treg 占 CD4<sup>+</sup> 细胞的百分率。**结果** 哮喘组小鼠气道反应性、BALF 中细胞总数、嗜酸性粒细胞比例及 IL-4 浓度明显高于对照组( $P < 0.01$ ); 而 INF- $\gamma$  与 IL-10 浓度、IDO 和 Foxp3 的 mRNA 表达、IDO 蛋白表达、Treg 占 CD4<sup>+</sup> 细胞的百分率明显低于对照组( $P < 0.01$ ); 对照组与哮喘组 IDO 与 Foxp3 的 mRNA 表达呈正相关( $r = 0.819, r = 0.807, P < 0.05$ ), 对照组与哮喘组 IDO 蛋白表达与 Treg 占 CD4<sup>+</sup> 细胞的百分率呈正相关( $r = 0.783, r = 0.765, P < 0.05$ )。**结论** 哮喘小鼠 IDO 和 Foxp3 表达降低, Treg 数量减少, 且 IDO 蛋白表达与 Treg 占 CD4<sup>+</sup> 细胞的百分率呈正相关, 表明 IDO 与 Treg 相互调节, 打破免疫耐受, 诱导哮喘发生。

**[关键词]** 吲哚胺 2,3 双加氧酶; 调节性 T 细胞; 支气管哮喘; 实时荧光定量 PCR; 流式细胞术

**[中图分类号]** R392.32; R345; R562.25

**[文献标志码]** A

### Interaction of indoleamine 2, 3-dioxygenase and CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell in asthmatic mice

Zhou Lirong<sup>1</sup>, Zhang Jie<sup>2</sup>, Luo Yong'ai<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Department of Respiratory Diseases, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; <sup>2</sup>Department of Geriatrics, Third People's Hospital of Chongqing, Chongqing, 400014, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the interaction and the role of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell (Treg) in a mice model of allergic bronchial asthma. **Methods** BALB/c mice were sensitized and challenged by ovalbumin (OVA). Penh were measured to evaluate the airway responsiveness by noninvasive lung functional instrument. Bronchoalveolar lavage cytology was analyzed. IFN- $\gamma$ , IL-4 and IL-10 in BALF were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA expression of IDO and Foxp3 was measured by real-time fluorescence-based quantitative PCR. The protein expression of IDO was detected by immunohistochemistry. The percentage of Treg in CD4<sup>+</sup> cells was assessed by flow cytometry. **Results** The airway responsiveness, the total cell number, the eosinophils and IL-4 in BALF of the asthmatic group significantly increased as compared with the control group ( $P < 0.01$ ). The levels of IFN- $\gamma$  and IL-10 in BALF, the mRNA expression of IDO and Foxp3, the protein expression of IDO, and the percentage of Treg in CD4<sup>+</sup> cells in the asthmatic group were significantly lower than those in the control group ( $P < 0.01$ ). The mRNA expression of IDO and Foxp3 was positively correlated with each other ( $r = 0.819, 0.807, P < 0.05$ ). The protein expression of IDO was positively correlated with the percentage of Treg in CD4<sup>+</sup> cells ( $r = 0.783, 0.765, P < 0.05$ ). **Conclusions** IDO and Treg reciprocally regulate each other, which surmounts immune tolerance and induces asthma. Therefore, IDO and Treg may play important roles in asthma.

**[Key words]** indoleamine 2,3-dioxygenase; regulatory T cell; asthma; real-time fluorescence-based quantitative PCR; flow cytometric analysis

Corresponding author: Luo Yong'ai, E-mail: luoyong'ai1942@163.com

**[通信作者]** 罗永艾, E-mail: luoyong'ai1942@163.com

**[优先出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130321.1424.035.html> (2013-03-21)

支气管哮喘是一种常见的呼吸道疾病,是机体对过敏原刺激产生的以气道高反应性为特征的变态反应性慢性炎症性疾病,目前其发病机制仍不十分清楚。吲哚胺 2,3 双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)是肝脏以外唯一可催化色氨酸沿犬尿酸途径分解代谢的限速酶,特异表达于树突状细胞(DC)、内皮细胞、成纤维细胞等<sup>[1]</sup>,使未成熟的 DC 转变成调节性 DC(iDC),对于维持 T 细胞内环境稳定和免疫耐受的起着重要作用<sup>[2-3]</sup>。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>调节性 T 细胞(Treg)是具有免疫抑制功能的细胞群,对于介导对环境过敏原的免疫耐受形成过程具有重要作用<sup>[4]</sup>。本研究通过观察 IDO 与 Treg 在支气管哮喘小鼠模型中的变化,探讨两者之间的相关关系以及在哮喘发病机制中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF 级 BALB/c 小鼠,雌性,6~8 周龄,体质量(18±2)g,购自重庆医科大学实验动物中心,用随机数字表法分成 2 组,每组 8 只,分别为对照组、哮喘组。

### 1.2 主要试剂

鸡卵清蛋白(ovalbumin, OVA, grade V)、乙酰甲胆碱(Mch)为 Sigma 公司产品,氢氧化铝[Al(OH)<sub>3</sub>]凝胶为 Thermo 公司产品,Trizol 为 Gibco 公司产品,荧光素标记的抗小鼠抗体包括藻红蛋白(PE)标记的 CD25、异硫氰基(FITC)标记的 CD4、PE-CY5.5 标记的 Foxp3、固定/破膜剂、蛋白转运抑制剂复合物均为 eBioscience 公司产品,羊抗鼠 IDO 单克隆抗体、羊抗鼠 HRP-IgG 为 Santa Cruz 公司产品,Rever Tre Ace-a-逆转录试剂盒为 TOYOBO 公司产品。

### 1.3 哮喘模型的构建

1.3.1 致敏 实验第 0、7、14 天腹腔注射致敏,哮喘组每次给予 100 μg OVA + 100 μL PBS + 100 μL Al(OH)<sub>3</sub>混悬液,对照组给予 100 μL PBS + 100 μL Al(OH)<sub>3</sub>。

1.3.2 激发 在实验第 21~27 天连续 7 d 雾化,哮喘组给予 1 μg/μL OVA-PBS 溶液激发,1 次/d,每次 30 min,对照组用 PBS 代替 OVA。

### 1.4 气道反应性测定

末次激发后 24 h,小鼠无创肺功能仪检测各浓度 Mch 激发后增强呼气间歇(Penh),Mch 浓度依次为 0.78、1.56、3.125、6.25、12.5、25、50 mg/mL,以生理盐水(NS)的 Penh 为基值,Mch 激发的 Penh/NS 激发的 Penh × 100% 以 Penh% 表示,作为气道反应性的评价指标。

### 1.5 BALF 细胞计数、分类以及 ELISA 法检测 INF-γ、IL-4、IL-10 浓度

末次激发后 48 h,处死小鼠,仰卧位固定,暴露气管,用留置针行气管插管肺泡灌洗,每次用 PBS 0.5 mL,共 4 次,记录回收量。离心,沉淀重悬后取 20 μL 计细胞总数,剩余涂片,苏木精-伊红染色,光学显微镜下进行细胞分类计数;参照 ELISA 试剂盒说明书检测上清液的细胞因子。

### 1.6 实时荧光定量 PCR 检测肺组织 IDO 和 Foxp3 的 mRNA 表达

取肺组织匀浆,Trizol 法抽提总 mRNA,逆转录反应制备 cDNA,反应体系为 20 μL,反应条件:42 °C—10 min—30 °C—20 min—99 °C—5 min—4 °C—5 min,以 cDNA 为模板进行 IDO、Foxp3 和 GAPDH mRNA 的 PCR 扩增。引物由南京金斯瑞公司合成,序列如下:IDO:上游 5'-GCCAGACAGATATATGCGGAGAA-3',下游 5'-AAGGCACTGCACGACATAGCTAC-3';Foxp3:上游 5'-GGTGGAGCGGGACTGAGT-3',下游 5'-TCCCCCTTTTCCACTACTCTATG-3';GAPDH:上游 5'-ACCCATCACCATCTTCCAGGAG-3',下游 5'-GAAGGGGCGGAGATGATGAC-3',反应体系为 20 μL,反应条件:94 °C—5 min—(94 °C—30 s—57 °C—30 s—72 °C—30 s) × 45—72 °C—10 min。根据标准曲线计算出 Ct 值,与各自内参 GAPDH 的 Ct 值校正后,得到 IDO 和 Foxp3 的 mRNA 相对表达倍数。

### 1.7 免疫组织化学方法检测肺组织 IDO 蛋白表达

取肺组织,10% 中性甲醛固定 48 h,酒精脱水,石蜡包埋,切片,加入羊抗鼠 IDO(1:200),4 °C 孵育过夜,羊抗鼠 HRP-IgG, DAB 显色。每张切片随机选择 10 个视野,用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件测定阳性部位的平均光密度,用以代表蛋白表达水平。

### 1.8 流式细胞仪检测 Treg 占 CD4<sup>+</sup>细胞的百分率

打开腹腔无菌取脾,PBS 冲洗,碾磨后 200 目筛网过滤,红细胞裂解液裂解红细胞,加入 anti-CD4-FITC, anti-CD25-PE,4 °C 避光孵育 30 min;洗涤后加入新鲜配制的固定/破膜剂,4 °C 避光孵育 45 min;洗涤 2 次后加入 anti-Foxp3-PE-cy5.5,4 °C 避光孵育 30 min,洗涤后重悬细胞,上机测定。

### 1.9 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,各区间均数比较采用单因素方差分析,当方差不齐时采用秩和检验,用 Pearson 方法进行相关分析。

## 2 结果

### 2.1 气道反应性

哮喘组小鼠雾化吸入 Mch 3.125~50 mg/mL 时 Penh% 显著高于对照组( $P < 0.01$ );Mch-Penh/Ns-Penh 最大值哮喘组为(1330.63 ± 295.94)明显高于对照组(519.83 ± 133.15)( $P < 0.01$ )。见图 1。

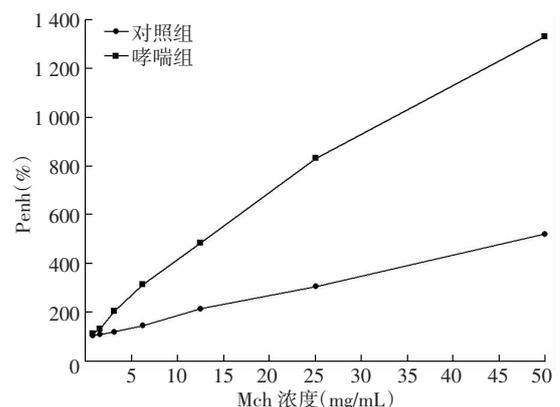


图 1 2 组小鼠不同气道反应性的比较

### 2.2 BALF 细胞计数及分类

与对照组比较,哮喘组 BALF 总数、中性粒细胞、淋巴细胞、嗜酸性细胞分类计数比例均显著性升高 ( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 2 组小鼠 BALF 中细胞总数和分类计数的变化 ( $\times 10^5 / \text{mL}, n = 8$ )

组别	细胞总数	中性粒细胞 (%)	淋巴细胞 (%)	巨噬细胞 (%)	嗜酸性细胞 (%)
对照组	1.62 ± 0.71	3.21 ± 0.97	5.56 ± 1.87	90.87 ± 11.16	0.34 ± 0.05
哮喘组	8.16 ± 2.57	10.60 ± 2.81	19.00 ± 4.39	37.44 ± 6.51	33.18 ± 6.67

### 2.3 ELISA 检测 BALF 中 INF- $\gamma$ 、IL-4、IL-10 浓度

与对照组比较,哮喘组 BALF 中 INF- $\gamma$  和 IL-10 浓度降低,而 IL-4 浓度升高,均有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 2 组小鼠 BALF 中 INF- $\gamma$ 、IL-4 和 IL-10 的浓度 ( $n = 8, \bar{x} \pm s$ )

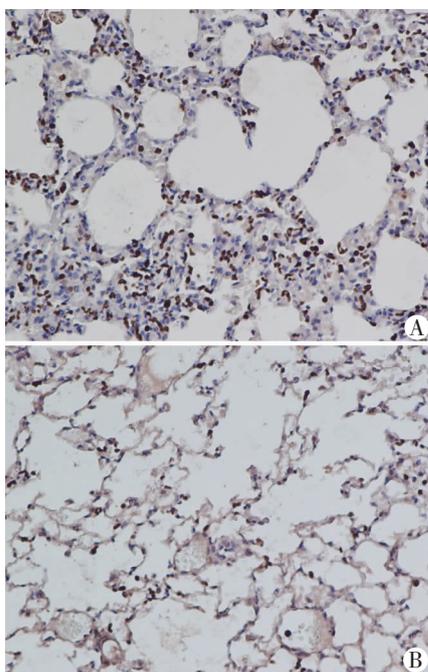
组别	INF- $\gamma$ (pg/mL)	IL-4 (ng/L)	IL-10 (pg/mL)
对照组	332.08 ± 8.95	207.42 ± 7.18	151.99 ± 6.13
哮喘组	252.79 ± 8.36	272.46 ± 8.70	121.24 ± 5.85

### 2.4 荧光定量 PCR 检测肺组织 IDO 和 Foxp3 的 mRNA 表达

哮喘组和对照组肺组织 IDO mRNA  $\Delta\text{Ct}$  值分别为 (5.93 ± 0.23) 和 (4.45 ± 0.17), 相对表达量为 1:0.35 ( $P < 0.01$ ); 哮喘组和对照组肺组织 Foxp3 mRNA  $\Delta\text{Ct}$  值分别为 (3.54 ± 0.18) 和 (2.15 ± 0.14), 相对表达量为 1:0.38 ( $P < 0.01$ )。

### 2.5 免疫组化检测肺组织 IDO 的蛋白表达

以平均光密度为指标检测的小鼠肺组织中 IDO 在蛋白水平的表达,哮喘组为 (118.43 ± 12.38), 对照组为 (279.93 ± 30.24), 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ , 图 2)。

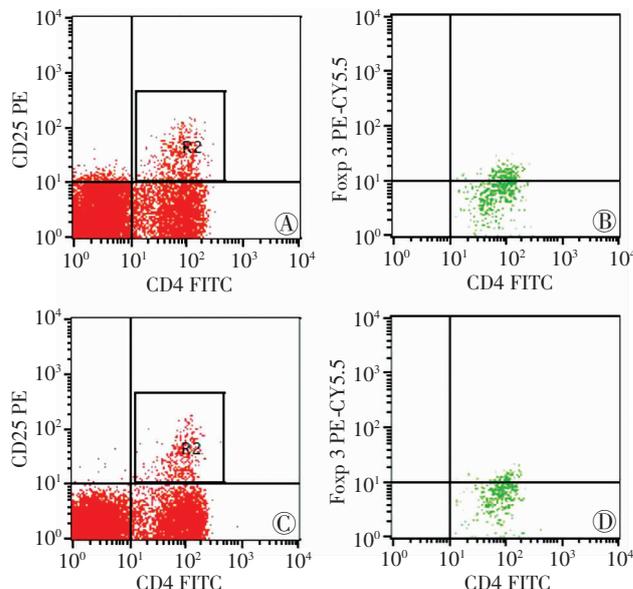


A: 对照组; B: 哮喘组

图 2 免疫组织化学染色检测 2 组小鼠肺组织中 IDO 的表达 (S-P × 200)

### 2.6 流式细胞仪检测 Treg 占 CD4<sup>+</sup> 细胞的百分率

哮喘组 Treg 占 CD4<sup>+</sup> 细胞的百分率 (2.53 ± 0.13)% 比对照组 (5.05 ± 0.26)% 明显降低 ( $P < 0.01$ , 图 3)。



A、C: CD25、CD4; B、D: Foxp3; A、B: 对照组; C、D: 哮喘组

图 3 流式细胞仪检测 2 组小鼠 Treg 占 CD4<sup>+</sup> 细胞的百分率比较

### 2.7 相关分析结果

将正常组 IDO 与 Foxp3 的 mRNA 和哮喘组 IDO 与 Foxp3 的 mRNA 的表达分别进行相关分析,  $r$  值分别为 0.819 和 0.807 ( $P < 0.05$ ), 提示 IDO 与 FOXP3 的 mRNA 表达水平呈正相关。将正常组和哮喘组的 IDO 蛋白表达与 Treg 数量分别进行相关分析,  $r$  值分别为 0.783 和 0.765 ( $P < 0.05$ ), 提示 IDO 蛋白表达与 Treg 数量呈正相关关系。

## 3 讨论

免疫耐受机制缺乏或减弱可使机体 Th2 细胞反应增强, 导致气道变态反应性炎症发生, 因此免疫耐受机制缺陷可能是支气管哮喘发生的始动因素<sup>[5]</sup>。正常气道在接触过敏源形成免疫耐受机制中 Treg 起着重要作用, Foxp3 是 Treg 特异性的标志, 其表达与 Treg 功能密切相关<sup>[6]</sup>。本研究中, 哮喘组肺组织 Foxp3 mRNA 表达降低, 流式细胞检测 Treg 占 CD4<sup>+</sup> 细胞的百分率减少, 其分泌的抑制性细胞因子 IL-10 浓度降低, 并且 Th1 细胞分泌的 IFN- $\gamma$  浓度减少, Th2 细胞分泌的 IL-4 浓度增加, 提示小鼠接触特异性过敏原后, 抗原特异性 CD4<sup>+</sup> T 细胞向 Th2 细胞偏移, 而不是向 Treg 偏移, 导致 Treg 数量减少。实验中哮喘组小鼠气道反应性明显升高, BALF 中细胞总数以及中性粒细胞、淋巴细胞、嗜酸性细胞分类计数比例显著性升高, 提示气道变应性炎症加重。由此可以推测, 小鼠接触

特异性过敏原后,抗原特异性 CD4<sup>+</sup> T 细胞不向 Treg 偏移,导致 Treg 数量减少,免疫调节功能减弱,免疫耐受缺陷,从而引起 Th1 功能减弱,Th2 功能亢进,气道反应性增加,变应性炎症加重,支气管哮喘发生。

目前认为,CTLA-4 可能是机体外周 T 细胞耐受的主要控制开关。表达 CTLA-4 的 Treg 诱导的免疫耐受机制是通过 IDO 分解代谢色氨酸而抑制激活 T 细胞分化、增殖,导致 T 细胞无能的作用实现的;且 IDO 催化分解色氨酸的产物也可抑制同种异基因 T 细胞的增殖,诱导 T 细胞凋亡,从而清除活化的抗原特异性 T 细胞克隆<sup>[7]</sup>。此外,Hill 等<sup>[8]</sup>研究显示 IDO 可能通过诱导 T 细胞向 Treg 细胞分化或者直接活化成熟的 Treg 细胞。

本研究结果显示,哮喘组小鼠肺组织 Treg 特异性的 Foxp3 mRNA 表达降低,流式细胞检测 Treg 占 CD4<sup>+</sup> 细胞的百分率减少,Treg 分泌的抑制性细胞因子 IL-10 水平降低,同时发现肺组织 IDO 的 mRNA 和蛋白表达降低。统计分析显示,Foxp3 的 mRNA 表达水平与 IDO 的 mRNA 表达水平之间呈正相关,IDO 的蛋白表达水平与 Treg 细胞数量之间呈正相关。由此我们可以推测,由于 Treg 功能减弱,数量减少,所诱导的 IDO 表达量下降,同时由于 IDO 表达量降低,CTLA-4 表达减低,不能诱导 T 细胞向 Treg 细胞分化或者活化,导致 Treg 数量进一步减少,由此形成正反馈。最终,通过色氨酸代谢机制的免疫耐受被打破,导致气道反应性增加,气道变应性炎症加重,诱导哮喘发生。

IFN- $\gamma$  及 IFN 调节因子 1 (IRF1) 是激活 IDO 的主要细胞因子<sup>[9]</sup>,可上调 IDO 表达;IL-4、IL-6 和 TGF- $\beta$  可下调 IDO 的表达<sup>[10]</sup>。本研究中,哮喘组 IFN- $\gamma$  浓度减低,IL-4 浓度增加,肺组织 IDO 的 mRNA 表达和蛋白表达降低,提示 IFN- $\gamma$  表达降低,IL-4 表达升高,可导致 IDO 表达量降低。

综上所述,IDO 与 Treg 之间存在一个调节环路,机体接触特异性过敏原后,DC 提呈抗原,抗原特异性 CD4<sup>+</sup> T 细胞不向 Treg 偏移,Treg 数量减少和功能减

弱,抑制 DC 表达 IDO,IDO 不能通过降解色氨酸诱导对外源性抗原的免疫耐受;而且 IDO 的表达下调,又抑制幼稚 T 细胞向 Treg 细胞分化;同时由于 Th1 功能减弱,Th2 功能亢进,其分泌的细胞因子 IFN- $\gamma$  等减少,IL-4 等增加,进一步下调 IDO 表达,这种反馈作用最终导致免疫耐受缺陷的形成。当气道 DC 提呈抗原时引起 T 细胞向 Th2 反应偏离,气道反应性增加,变应性炎症加重,支气管哮喘发生。这是对哮喘免疫发病机制的重要补充。

#### 参考文献:

- [1] Beutelspacher S C, Tan P H, McClure M O, *et al.* Expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) by endothelial cells: implications for the control of alloresponses[J]. *Am J Transplant*, 2006, 6(6): 1320 - 1330.
- [2] Katz J B, Muller A J, Prendergast G C. Indoleamine 2, 3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape[J]. *Immunol Rev*, 2008, 222: 206 - 221.
- [3] Lotfi R, Eisenbacher J, Solgi G, *et al.* Human mesenchymal stem cells respond to native but not oxidized damage associated molecular pattern molecules from necrotic (tumor) material[J]. *Eur J Immunol*, 2011, 41(7): 2021 - 2028.
- [4] Wing J B, Sakaguchi S. Multiple treg suppressive modules and their adaptability[J]. *Front Immunol*, 2012, 3: 178.
- [5] Robinson D S. Regulatory T cells and asthma[J]. *Clin Exp Allergy*, 2009, 39(9): 1314 - 1323.
- [6] Langier S, Sade K, Kivity S. Regulatory T cells: the suppressor arm of the immune system[J]. *Autoimmun Rev*, 2010, 10(2): 112 - 115.
- [7] Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, *et al.* CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism *in vivo*[J]. *Nat Immunol*, 2002, 3(11): 1097 - 1101.
- [8] Hill M, Tanguy-Royer S, Royer P, *et al.* IDO expands human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> regulatory T cells by promoting maturation of LPS-treated dendritic cells[J]. *Eur J Immunol*, 2007, 37(11): 3054 - 3062.
- [9] Chen W. IDO: more than an enzyme[J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(8): 809 - 811.
- [10] Wirleitner B, Neurauter G, Schrocksnadel K, *et al.* Interferon-gamma-induced conversion of tryptophan: immunologic and neuropsychiatric aspects[J]. *Curr Med Chem*, 2003, 10(16): 1581 - 1591.

(收稿:2013-01-04;修回:2013-01-30)

(编辑 邓强庭)

## 更 正

因作者疏忽,本刊 2012 年第 34 卷第 18 期 1881 - 1883 页刊发的由姚一搏等撰写的论文《<sup>1</sup>H-MRS 引导辅助伽玛刀治疗 20 例脑胶质瘤的初步观察》,未将许明辉教授作为通信作者,特此更正。

本刊编辑部