

维生素 D 对糖皮质激素免疫抑制模型小鼠免疫功能的影响

宋淑军 刘俊丽 徐冰心 王晓菲 王宗烨 谭小青 司少艳

【摘要】 目的 观察腹腔注射维生素 D 对小鼠免疫功能的影响。方法 采用糖皮质激素诱导的小鼠免疫抑制模型,在此基础上连续 7 d 腹腔注射 2 IU/g 或是 4 IU/g 维生素 D,于实验的第 8 天小鼠断颈处死,分别测定:小鼠体重、胸腺指数和脾脏指数;外周血 CD4⁺/CD8⁺ 比值;ConA 诱导的脾脏 T 淋巴细胞增殖能力。结果 与对照组相比,模型组小鼠体重、胸腺指数、脾脏指数、淋巴细胞 CD4⁺/CD8⁺ 比值、脾脏 T 淋巴细胞增殖能力显著降低;腹腔注射维生素 D 后,这些指标有不同程度的恢复;其中高剂量组 4 IU/g 组小鼠脾脏指数、胸腺指数、脾脏 T 淋巴细胞增殖、CD4⁺/CD8⁺ 比值显著高于模型组($P < 0.05$)。结论 腹腔注射维生素 D 能够显著增强糖皮质激素免疫抑制模型小鼠的免疫功能。

【关键词】 维生素 D; 糖皮质激素类; 免疫功能

Effects of the vitamin D on the immune function of the immunosuppressant mice induced by glucocorticoid
SONG Shu-jun, LIU Jun-li, XU Bing-xin, WANG Xiao-fei, WANG Zong-ye, TAN Xiao-qing, SI Shao-yan. Center for Special Medicine and Experimental Research, 306th Hospital of PLA, Beijing 100101, China
Corresponding author: SI Shao-yan, Email: sishy306@sohu.com

【Abstract】 Objective To study the effects of vitamin D on the immune functions of immunosuppressant mice. **Methods** Immunosuppressant mouse model was developed by glucocorticoid injection. The immunosuppressant mice were injected intraperitoneally with vitamin D (2 IU/g or 4 IU/g) for 7 days. On the day 8, the mice were weighed and killed. The thymus and spleen indexes, ratios of CD4⁺/CD8⁺ in the peripheral blood lymphocytes and proliferations of spleen T lymphocytes were assessed. **Results** Compared with control mice, the body weights, thymus and spleen indexes, the ratios of CD4⁺/CD8⁺ of lymphocytes in the peripheral bloods and proliferations of spleen T lymphocytes were decreased in immunosuppressant mice. These parameters were restored to some extent in vitamin D treated mice. Compared with immunosuppressant mice, the spleen indexes, proliferations of spleen T lymphocytes and ratios of CD4⁺/CD8⁺ were significantly increased ($P < 0.05$) in mice treated with vitamin D at high dose (4 IU/g). **Conclusion** Peritoneal injection of vitamin D can enhance the immune functions in immunosuppressant mice.

【Key words】 Vitamin D; Glucocorticoids; Immune function

1,25-二羟维生素 D₃[1,25(OH)₂D₃]是人体必需维生素,又称为骨化三醇,是维生素 D 在人体内的活化形式,除了维持体内钙环境相对稳定外,近年来发现维生素 D 作为一种细胞调节因子,参与多种细胞功能的调节,如细胞间信息的传递、细胞的增殖、分化、运动,与组织的形成、细胞免疫等。近年发现维生素 D 缺乏可能与多种免疫性疾病有关,如 1 型糖尿病^[1]、风湿性关节炎^[2]、多发性硬化症^[3]以及肠炎^[4]等多发生在纬度较高的地区。后来发现维生素 D 水平低下与自

身免疫性疾病以及感染有关^[5-6],而且多数免疫细胞表达维生素 D 受体^[7]。表明维生素 D 对免疫功能的调节起着重要的作用。但其作用机制尚不完全清楚。

材料和方法

一、试剂

1,25 二羟维生素 D 购自 Sigma 公司;地塞米松磷酸钠注射液(浙江仙琚制药股份有限公司);RPMI-1640 干粉(美国 GIBCO 公司);MTT (Amresco 公司);ConA (美国 Sigma 公司);胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);FITC 标记抗小鼠 CD3 抗体、PE 标记抗小鼠 CD4 抗体、PE-cy5 标记抗小鼠 CD8 抗体(均为美国 eBioscience 公司产品)。

二、动物

健康6~8周龄雄性ICR小鼠,购自北京大学医学部实验动物医学研究中心。

三、方法

1. 小鼠分组及给药方案: 实验组小鼠随机分为4组, 每组6只小鼠: 对照组、模型组、维生素D低剂量组(模型+2 IU/g 维生素D)和维生素D高剂量组(模型+4 IU/g 维生素D)。模型组至维生素D高剂量组于实验的第1至3天, 每天1次腹腔注射25 mg/kg地塞米松, 维生素D低剂量组和维生素D高剂量组从实验的第1天开始, 每天分别腹腔注射1次0.2 ml生理盐水稀释的维生素D, 连续7 d; 对照组和模型组从实验的第1天开始, 连续7 d注射0.2 ml生理盐水。于实验的第8天小鼠摘眼球取血, EDTA抗凝, 然后断颈处死, 无菌取脾, 检测以下的指标。

2. 小鼠体重、胸腺、脾脏大小的观察: 分别于实验前和小鼠处死前, 称量小鼠的体重, 称量小鼠胸腺和脾脏的重量, 分别用胸腺和脾脏的重量(mg)/体重(g)计算胸腺和脾脏指数。

3. 小鼠外周血CD4⁺/CD3⁺、CD8⁺/CD3⁺ T淋巴细胞比值的检测: 取50 μl抗凝血, 加2 ml溶血剂溶解红细胞, PBS洗两遍后, 加入100 μl含5%新生牛血清的1640培养基, 分别加入1 μl FITC标记抗小鼠CD3抗体、PE标记抗小鼠CD4抗体、PE-cy5标记抗小鼠CD8抗体, 室温避光孵育30 min, PBS洗两次后, 加入2%多聚甲醛0.3 ml, 流式细胞仪分析, 圈定淋巴细胞亚群后, 分析CD4⁺/CD3⁺、CD8⁺/CD3⁺ T淋巴细胞百分比, 计算CD4⁺/CD8⁺ T淋巴细胞比值。

4. 小鼠脾脏淋巴细胞增殖能力的检测: 无菌取脾, 采用载玻片磨碎, 过200目细胞筛, 制备脾细胞悬液, 离心后加入1 ml红细胞裂解液, 室温放置5~10 min, 离心, 用PBS洗两次, 用含10%新生牛血清的1640悬浮细胞, 制备浓度为1×10⁷个/ml的脾细胞悬液, 96孔板每孔加100 μl脾细胞悬液, 加100 μl ConA稀释液, 至ConA终浓度为5 μg/ml, 空白孔不加ConA, 加100 μl培养液, 培养48 h, 每孔加20 μl MTT, 培养4~6 h, 吸出上清, 加100 μl DMSO, 测定490 nm OD值, ConA孔OD值除以空白孔OD值为增殖指数。

四、统计学分析

实验结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。数据采用SPSS 17.0统计软件进行处理, 方法采用单因素方差分析及Student-t检验, 以P<0.05为差异有统计学意义。

结 果

1. 维生素D对小鼠体重、胸腺、脾脏大小的影响: 表1结果显示: 实验前各组小鼠之间体重无显著差异, 处死前模型组小鼠显著低于对照组(P=0.048); 模型组小鼠脾脏和胸腺与对照组相比呈明显萎缩状态, 脾脏指数和胸腺指数均小于对照组(P值分别为0.0017和0.0002), 模型+维生素D组小鼠脾脏和胸腺指数有所增加, 其中维生素D高剂量组小鼠的脾脏指数和胸腺指数均显著高于单纯模型组(P值分别为0.042和0.014), 而且其脾脏指数与对照组相当(P=0.799); 但小鼠胸腺指数仍显著低于对照组(P=0.002)。

2. 维生素D对小鼠外周血淋巴细胞CD4⁺/CD8⁺比值的影响: 模型组外周血淋巴细胞CD4⁺/CD8⁺比值(1.78±0.11)显著低于对照组(4.32±0.90; P=0.040), 模型+腹腔注射高剂量维生素D组小鼠淋巴细胞CD4⁺/CD8⁺比值(2.68±0.30)较模型组有一定程度的升高(P=0.017), 但仍低于对照组(P<0.05)。维生素D低剂量组CD4⁺/CD8⁺比值与模型组比较无明显变化。

3. 维生素D对小鼠脾脏淋巴细胞增殖能力的影响: 表2结果显示: 与对照组相比, 模型组小鼠淋巴细胞增殖能力显著降低(P=0.007), 经维生素D治疗后, 与模型组相比, 高剂量组小鼠的淋巴细胞增殖能力显著升高(P=0.015), 但仍低于对照组(P=0.011)。

表2 维生素D对小鼠脾脏淋巴细胞增殖能力的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	增殖指数
对照组	6	26.7±19.6
模型组	6	1.4±0.5 ^a
维生素D低剂量组	6	1.9±1.0 ^a
维生素D高剂量组	6	3.2±1.4 ^{ab}

注: 与对照组相比, ^aP<0.05; 与模型组相比, ^bP<0.05

表1 维生素D对小鼠体重、胸腺、脾脏大小的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	实验前体重(g)	处死前体重(g)	脾脏指数	胸腺指数
对照组	6	26.7±2.0	29.4±3.0	4.3±0.8	2.9±0.8
模型组	6	26.3±1.5	26.4±1.3 ^a	2.8±0.3 ^a	1.0±1.3 ^a
维生素D低剂量组	6	26.2±1.4	27.3±0.9	3.0±0.5 ^a	1.3±0.4 ^a
维生素D高剂量组	6	27.0±1.9	27.8±1.1	4.2±1.4 ^b	1.5±0.3 ^{ab}

注: 与对照组相比, ^aP<0.05; 与模型组相比, ^bP<0.05

讨 论

免疫系统具有免疫监视、免疫防御和免疫自稳的功能,在抗微生物感染和肿瘤防御中起着重要的作用。脾脏和胸腺是机体重要的免疫器官。胸腺是 T 细胞发育的场所,脾脏是最大的免疫器官,含有大量的淋巴细胞和巨噬细胞,是细胞免疫和体液免疫的中心。T、B 细胞分别是细胞免疫和体液免疫的主要效应细胞, T、B 经外周血循环到达全身各处行使免疫功能。脾脏和胸腺的质量在一定程度上能够反映机体免疫功能的强弱^[8]。

糖皮质激素对机体免疫过程的许多环节均有抑制作用,糖皮质激素诱导的免疫抑制模型广泛用于免疫活性的研究。胡宇池等^[9]采用地塞米松造模形成免疫抑制动物模型,在此模型上口服胶原蛋白 0.4、0.8 和 1.6 g 胶原蛋白/kg 体重,结果显示口服 0.8 和 1.6 g 胶原蛋白/kg 体重能够显著提高小鼠的胸腺指数和脾脏指数,提高血浆中溶菌酶含量,增强正常脾脏总超氧化物歧化酶(SOD)活力。王平等^[10]采用泼尼松诱导的小鼠免疫抑制模型,经口服给予来源于暹罗鳄骨及磷甲、牛羊骨、鱼鳞的胶原蛋白,结果显示 0.6 和 1.2 g 胶原蛋白/kg 体重均能提高小鼠淋巴细胞增殖能力及巨噬细胞吞噬功能。

本研究结果显示:与对照组相比,地塞米松诱导的模型组小鼠胸腺、脾脏发生明显萎缩,胸腺、脾脏指数显著降低,ConA 诱导的 T 淋巴细胞增殖能力显著降低,表明我们成功建立了免疫抑制模型。经腹腔注射维生素 D 2 或 4 IU/g 体重后,这些指标均有恢复趋势,其中维生素 D 高剂量组小鼠脾脏指数、脾淋巴细胞的增殖功能、胸腺指数均显著高于模型组,其中脾脏指数显著高于模型组的同时,与对照组无显著差异。表明腹腔注射维生素能够增强小鼠的免疫功能,4 IU/g 的维生素 D 能够使脾脏指数恢复到正常水平。而胸腺的萎缩和 T 淋巴细胞的增殖能力可能恢复需要较长的时间或较大剂量的维生素 D 的使用。

T 淋巴细胞分为 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞 2 个亚群,CD4⁺ T 细胞主要是辅助性 T 细胞(Th),CD8⁺ T 细胞包括杀伤性 T 细胞(Tc)和抑制性 T 细胞(Ts)。在正常情况下,CD4/CD8 比值维持动态平衡,以保持机体免疫功能稳定。当比值上升时表示在机体内的免疫应答中正调节占优势,而比值下降甚至比例倒置时,则表明机体处于免疫功能低下甚至免疫抑制状态,CD4/CD8 比值是反映细胞免疫平衡与否的敏感指标。通常情况下免疫功能低下的艾滋病患者^[11]和肿瘤患者^[12-13]外周血 CD4/CD8 比值降低,甚至倒置。本研

究结果显示:模型组小鼠外周血 CD4/CD8 比值低于对照组,经腹腔注射维生素 D 4 IU/g 后 CD4/CD8 比值有一定程度的回升,但仍未恢复到对照组的水平,表明维生素 D (4 IU/g)使小鼠由免疫抑制状态得到部分恢复。在今后的研究中,可以考虑适当延长治疗时间或是与其他免疫调节剂联合应用可能有助于免疫功能的恢复。

综上所述,维生素 D 能够使免疫抑制模型小鼠的免疫功能有所恢复。维生素 D 水平变化对 T 细胞影响的作用机制尚不清楚。科学家发现维生素 D 是免疫防御系统活化的一个关键,Geisler 教授等发现体内 T 细胞,在接触到入侵的感染病原时,并不会立刻反应,而必须在这些 T 细胞表面的维生素 D 受体分子接触到足量的维生素 D 时,免疫机制才会启动。通过维生素 D 活化的 T 细胞,会分裂出两种细胞,一种是杀伤 T 细胞,另一种则是辅助 T 细胞^[14]。辅助型 T 细胞(Th)是 1,25(OH)₂D 的主要靶细胞,1,25(OH)₂D 能抑制 Th 细胞的增殖,调节细胞因子的产生。初始 Th 细胞被抗原活化后转化为 Th1 和 Th2 细胞两个亚群,Th1 细胞主要分泌 IL-2, IFN γ 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α),介导细胞免疫,Th2 细胞主要分泌 IL-3、IL-4、IL-5 和 IL-10,介导体液免疫^[15]。维生素 D 提高免疫功能的作用机制有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Sloka S, Grant M, Newhook LA. The geospatial relation between UV solar radiation and type 1 diabetes in Newfoundland. *Acta Diabetol*, 2010, 47: 73-78.
- [2] Vieira VM, Hart JE, Webster TF, et al. Association between residences in U. S. northern latitudes and rheumatoid arthritis: a spatial analysis of the Nurses' Health Study. *Environ Health Perspect*, 2010, 118: 957-961.
- [3] Hogancamp WE, Rodriguez M, Weinschenker BG. The epidemiology of multiple sclerosis. *Mayo Clin Proc*, 1997, 72: 871-878.
- [4] Khalili H, Huang ES, Ananthakrishnan AN, et al. Geographical variation and incidence of inflammatory bowel disease among US women. *Gut*, 2012, 61: 1686-1692.
- [5] Greer RM, Portelli SL, Hung BS, et al. Serum vitamin D levels are lower in Australian children and adolescents with type 1 diabetes than in children without diabetes. *Pediatr Diabetes*, 2012, 14: 31-41.
- [6] Ginde AA, Mansbach JM, Camargo CA Jr. Association between serum 25-hydroxyl vitamin D level and upper respiratory tract infection in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch Intern Med*, 2009, 169: 384-390.
- [7] Joseph RW, Bayraktar UD, Kim TK, et al. Vitamin D receptor upregulation in all-reactive human T cells. *Hum Immunol*, 2012, 73: 693-698.
- [8] Lu Y, Zhang H. Effects of electroacupuncture on T-lymphocytes, spleen index, thymus index and lymphopoiesis levels in strenuous exercise-induced stress rats (in Chinese). *Zhen Ci Yan Jiu*, 2012, 37: 136-139.
- [9] 胡宇池, 李谨谨, 郭杨浏, 等. 暹罗鳄胶原蛋白对小鼠免疫功能的调节作用. *中国现代药物应用*, 2012, 6: 133-134.
- [10] 王平, 宗桂珍, 李德凤. 三种动物胶原蛋白对小鼠免疫功能的调节作用. *中国中医药现代远程教育*, 2011, 9: 118-119.

- [11] Monteiro P, Perez I, Laguno M, et al. Dual therapy with etravirine plus raltegravir for virologically suppressed HIV-infected patients: a pilot study. *J Antimicrob Chemother*, 2013.
- [12] 冉立峰, 杨炜. 不同营养方式对老年食管癌患者术后免疫功能的影响. *免疫学杂志*, 2013, 29: 681-684.
- [13] Wang WJ, Tao Z, Gu W, et al. Variation of Blood T Lymphocyte Subgroups in Patients with Non- small Cell Lung Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14: 4671-4673.
- [14] Kongsbak M, Schjerling P, Olgaard K, et al. Vitamin D controls T cell antigen receptor signaling and activation of human T cells. *von Essen MR, Nat Immunol*, 2010, 11: 344-349.
- [15] Kongsbak M, Levring TB, Geisler C, et al. The vitamin d receptor and T cell function. *Front Immunol*, 2013, 4: 148.

(收稿日期: 2013-11-07)

(本文编辑: 戚红丹)

宋淑军, 刘俊丽, 徐冰心, 等. 维生素 D 对糖皮质激素免疫抑制模型小鼠免疫功能的影响[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7(23): 10802-10805.

