

CD4⁺ IL-9⁺ T 细胞在实验性动脉粥样硬化中的作用

明婷婷, 丁绍威, 胡超杰, 张翠萍, 伍权, 李庆

摘要 目的 探讨 CD4⁺ IL-9⁺ T 细胞 (Th9) 在载脂蛋白 E 基因敲除 (ApoE^{-/-}) 小鼠动脉粥样硬化模型中表达变化及意义。方法 8 周龄 ApoE^{-/-} 小鼠高脂饮食饲养, 同周龄 C57BL/6 对照小鼠普通饮食饲养, 至 32 周龄后, 测定血清中血脂含量; 小鼠心脏主动脉根部石蜡切片, 常规 HE 染色, 观察动脉粥样硬化斑块的组织学特点; 流式细胞术检测脾脏 Th9 细胞表达; ELISA 法测定血清白介素 (IL)-9 和氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 的浓度。结果 32 周龄时, ApoE^{-/-} 小鼠血脂水平升高, 主动脉根部出现明显脂质斑块, 其脾脏 Th9 细胞表达率、血清 IL-9 和 ox-LDL 浓度均明显高于同周龄 C57BL/6 小鼠 ($P < 0.01$)。Th9 表达率、IL-9 浓度与 ox-LDL 浓度均呈显著正相关性 ($P < 0.01$)。结论 Th9 细胞及其分泌的 IL-9 在动脉粥样硬化发生中发挥重要作用, Th9 细胞可成为动脉粥样硬化发病机制研究和干预治疗的重要靶点。

关键词 Th9 细胞; 白细胞介素-9; 动脉粥样硬化; ApoE^{-/-} 小鼠

中图分类号 R 392.12

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)06-0824-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.06.010

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是一种严重危害人类健康的疾病, 病因复杂。目前认为 AS 是一种慢性炎症性疾病, 炎症反应在 AS 的发生发展中发挥重要作用, 其进程涉及多种免疫细胞, 特别是 CD4⁺ T 淋巴细胞^[1]。Th9 细胞是一种新发现的 CD4⁺ T 细胞亚群^[2-3], 体外实验显示在转化生长因子-β (transforming growth factor-β, TGF-β) 和白介素 (interleukin, IL)-4 联合刺激下, 分泌大量 IL-9。Th9 细胞在多种炎症疾病中发挥重要作用^[4-5], 然而在实验性 AS 中的作用研究甚少。该研究采用载脂蛋白 E 基因敲除 (ApoE^{-/-}) 小鼠建立 AS 模型, 分析 Th9/IL-9 在小鼠 AS 模型中的表达变化, 探讨 Th9 细胞在 AS 发生中的作用, 为防治 AS 寻求新的靶

点。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组处理 16 只 8 周龄雄性 ApoE^{-/-} 小鼠购自北京华阜康实验动物有限公司; 16 只 8 周龄雄性 C57BL/6 对照小鼠由安徽医科大学实验动物中心提供。小鼠体重 (24 ± 2) g, 饲养于安徽医科大学实验动物中心 SPF 级动物房内。高脂饲料 (普通饲料中加入 1.3% 胆固醇、0.3% 胆盐、16.7% 猪油等) 购自上海普路腾生物科技有限公司。ApoE^{-/-} 小鼠给予高脂饮食, C57BL/6 小鼠给予普通饮食, 两种小鼠均饲养至 32 周龄, 处死后取外周血、脾脏、主动脉等检测有关指标。

1.2 实验试剂和器材 佛波醇乙酯、离子霉素和莫能霉素均购自美国 Alexis 公司; 异硫氰酸荧光素 (isothiocyanate, FITC) 标记的抗小鼠 CD4 单抗 (克隆号 RM4-5)、藻红蛋白 (phycoerythrin, PE) 标记的抗小鼠 IL-9 单抗 (克隆号 eBioRM9A4)、固定和改变细胞膜渗透性试剂盒 (FIX&PERM Cell Permeabilization Kit) 均购自美国 eBioscience 公司; 小鼠细胞因子 IL-9 和氧化低密度脂蛋白 (oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL) ELISA 试剂盒购自美国 TSZ 公司; 小鼠淋巴细胞分离液购自天津通宝达生物技术有限公司。

1.3 血样的采集及血脂测定 小鼠经戊巴比妥麻醉后行眼眶采血, 分离血清, 采用全自动生化仪 (AU2700, 日本 Olympus 公司) 检测血清中总胆固醇 (total cholesterol, TC)、三酰甘油 (triglyceride, TG) 和低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein, LDL) 水平。

1.4 主动脉采集及苏木精-伊红 (HE) 染色 小鼠麻醉采血后处死, 剖开胸腹腔用 1640 培养基冲洗干净, 分离肝、肺、小肠及肾等脏器, 取出心脏和主动脉, 剪下 1~2 cm 连接心脏的血管, 用 PBS 漂洗后, 在显微镜下去除动脉表面的结缔组织和脂肪组织, 然后将动脉放入 4% 多聚甲醛中固定。常规石蜡包埋, 切片后行 HE 染色。

1.5 CD4⁺ IL-9⁺ T 细胞表型检测

1.5.1 脾单个核细胞的分离和培养 小鼠麻醉采

2017-02-05 接收

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (编号: 81472018); 安徽省自然科学基金面上项目 (编号: 1408085MH145)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院中心实验室, 合肥 230001

作者简介: 明婷婷, 女, 硕士研究生;

李庆, 男, 副教授, 副主任技师, 硕士生导师, 责任作者,

E-mail: liqing-2001@163.com

血后处死,取出脾脏,研磨过滤,用淋巴细胞分离液分离脾细胞悬液中的单个核细胞,再用含10%胎牛血清的1640培养基重悬细胞并调整细胞密度为 10^9 个/L。将调整好密度的单个核细胞接种于24孔板,然后加入刺激剂佛波醇乙酯(25 $\mu\text{g/L}$),离子霉素(1 mg/L)和莫能霉素(1.7 mg/L),终体积为1 ml,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养5 h后收取细胞,然后1 200 r/min离心5 min,弃上清液,加入CD4-FITC,室温下避光孵育15 min,固定破膜后加入IL-9-PE,室温下避光孵育15 min后上BD Canto II型流式细胞仪检测。

1.5.2 流式细胞仪检测 检测前常规对流式细胞仪进行光流路质量调控和荧光补偿,使仪器各项指标在质量控制允许值范围。检测时首先根据前向和侧向散射光信号对淋巴细胞群进行设门,再对 CD4^+ T淋巴细胞进行顺序设门,每份标本获取设门内细胞在10 000个以上,数据分析使用Diva软件。

1.6 细胞因子检测 应用ELISA试剂盒检测血清中IL-9和ox-LDL浓度,酶标仪测其在450 nm波长处光密度值。每个标本设复孔并设置空白对照和阴性对照以保证检测结果的可靠性。

1.7 统计学处理 所有实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS 17.0进行统计学分析,行正态性和方差齐性检验,组间比较采用 t 检验,两变量之间的相关分析采用Pearson相关分析。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠血脂的变化 8周龄ApoE $^{-/-}$ 小鼠TC和TG水平高于C57BL/6小鼠($P < 0.01$, $P < 0.05$)。32周龄ApoE $^{-/-}$ 小鼠TC、TG和LDL水平显著升高,与C57BL/6小鼠相比,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表1。

表1 各组小鼠血脂水平比较($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	LDL (mmol/L)
8周龄			
C57BL/6	2.38 \pm 0.23	0.80 \pm 0.12	0.13 \pm 0.05
ApoE $^{-/-}$	9.93 \pm 1.44**	1.06 \pm 0.18*	0.14 \pm 0.04
32周龄			
C57BL/6	2.30 \pm 0.21	0.85 \pm 0.13	0.11 \pm 0.03
ApoE $^{-/-}$	30.90 \pm 2.21**	2.26 \pm 0.16**	9.92 \pm 1.62**

与同周龄C57BL/6小鼠比较:* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 各组小鼠动脉HE染色 HE染色显示:8周龄ApoE $^{-/-}$ 小鼠和C57BL/6小鼠动脉内膜完好,染色均匀,32周龄ApoE $^{-/-}$ 小鼠动脉壁可见明显的向腔内突起的脂质斑块,斑块内可见大量炎性细胞以及泡沫细胞浸润。见图1。

2.3 各组小鼠脾脏Th9细胞表达水平的变化 流式细胞术检测结果显示8周龄两组小鼠Th9细胞表达率差异无统计学意义,32周龄ApoE $^{-/-}$ 小鼠Th9细胞表达率明显升高,与C57BL/6小鼠相比,差异有统计学意义($t = 15.072$, $P < 0.01$)。见表2、图2。

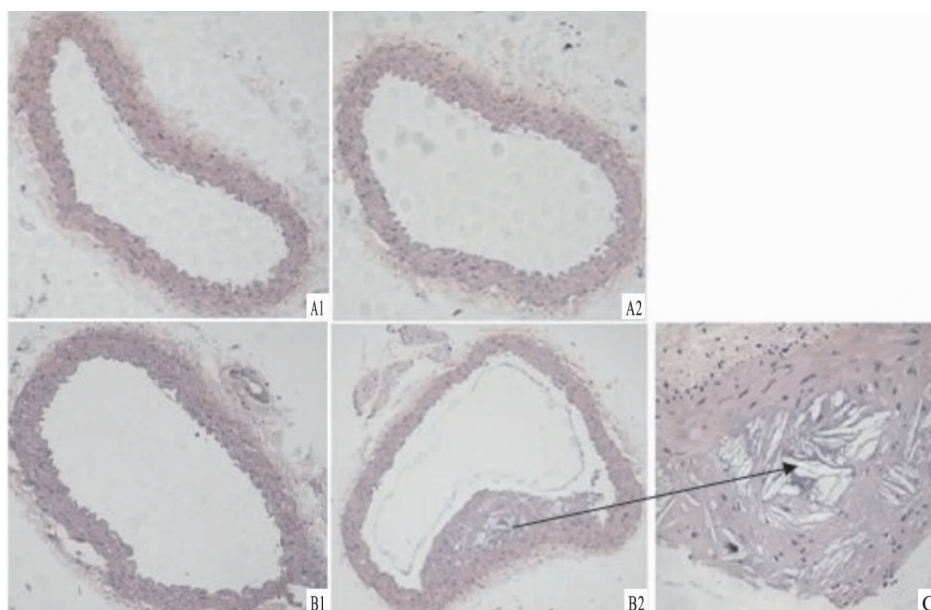


图1 各组小鼠动脉壁HE染色结果

A: C57BL/6小鼠; B: ApoE $^{-/-}$ 小鼠; 1: 8周龄; 2: 32周龄; A1、A2、B1、B2: $\times 100$; C: 局部粥样斑块 $\times 400$

表2 各组小鼠脾脏 Th9 细胞表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

小鼠周龄	CD4 ⁺ IL-9 ⁺ / CD4 ⁺ T 细胞 (%)	
	C57BL/6	ApoE ^{-/-}
8 周	0.72 ± 0.09	0.81 ± 0.10
32 周	0.76 ± 0.12	2.97 ± 0.40**

与同周龄 C57BL/6 小鼠比较: ** $P < 0.01$

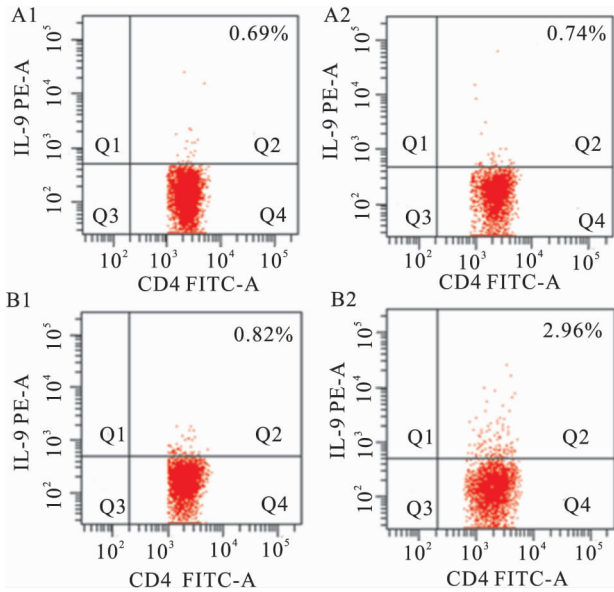


图2 各组小鼠脾脏 Th9 细胞表达流式图

A: C57BL/6 小鼠; B: ApoE^{-/-}; 1: 8 周龄; 2: 32 周龄

2.4 各组小鼠血清 IL-9 和 ox-LDL 浓度的变化

ELISA 法检测结果显示: 8 周龄 ApoE^{-/-} 小鼠的 IL-9 浓度与 C57BL/6 小鼠相比, 差异无统计学意义。32 周龄 ApoE^{-/-} 小鼠的 IL-9 浓度与 C57BL/6 小鼠相

比显著增加, 差异有统计学意义 ($t = 8.889, P < 0.01$)。8 周龄 ApoE^{-/-} 小鼠的 ox-LDL 浓度与 C57BL/6 小鼠相比, 差异无统计学意义。32 周龄 ApoE^{-/-} 小鼠的 ox-LDL 与 C57BL/6 小鼠相比显著增加, 差异有统计学意义 ($t = 15.767, P < 0.01$)。见表 3。

表3 各组小鼠血清 IL-9 和 ox-LDL 浓度比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	IL-9 (ng/L)	ox-LDL (μg/L)
8 周龄		
C57BL/6	121.90 ± 20.72	252.80 ± 27.79
ApoE ^{-/-}	130.93 ± 17.25	278.89 ± 17.77
32 周龄		
C57BL/6	125.10 ± 16.72	243.05 ± 18.60
ApoE ^{-/-}	221.66 ± 25.73**	439.78 ± 29.99**

与同周龄 C57BL/6 小鼠比较: ** $P < 0.01$

2.5 相关性分析 ApoE^{-/-} 小鼠血清 IL-9 浓度与 ox-LDL 浓度呈显著正相关性 ($r = 0.885, P < 0.01$), 脾脏 Th9 细胞表达率与血清 ox-LDL 浓度呈显著正相关性 ($r = 0.928, P < 0.01$)。见图 3。

3 讨论

AS 是慢性炎症性疾病, 活化的 T 淋巴细胞参与 AS 整个过程^[1]。CD4⁺ T 细胞分为 Th1、Th2、Th17 和 Treg 细胞等亚群。各种 T 淋巴细胞亚群所起的作用不同, 先前研究^[6-8]表明 Th1 细胞和 Th17 细胞促进 AS 发展, Th2 细胞和 Treg 细胞则可减轻 AS 进展。

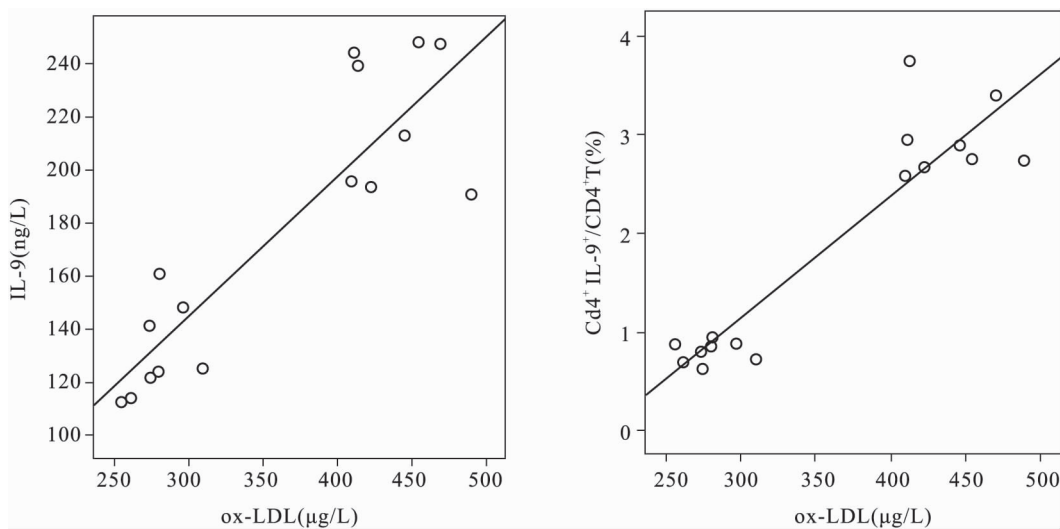


图3 ApoE^{-/-} 小鼠 Th9 表达率、IL-9 浓度与 ox-LDL 浓度相关性分析

Th9 细胞是 CD4⁺ T 细胞亚群的新成员,其发挥生物学作用主要通过分泌的炎症因子 IL-9。目前,对 Th9 细胞的研究主要集中在炎症性疾病方面。有研究^[9]显示 Th9 细胞与过敏性哮喘的发生相关。Ciprandi et al^[10]也发现, Th9 细胞参与了特应性皮炎的发病。另外, Th9 细胞还被认为是一些自身免疫性疾病的新的治疗靶点^[11-12]。此外, Lin et al^[13]发现在急性冠脉综合征患者外周血中, Th9 细胞表达与对照组无明显差异,但其血浆 IL-9 水平以及其特异性转录因子 PU. 1 mRNA 的水平高于对照组,提示 Th9 细胞有可能参与急性冠脉综合征的发生发展。Gregersen et al^[14]也发现在冠状动脉与颈动脉粥样硬化患者的体内血浆 IL-9 水平升高。但是 Th9 细胞在实验性 AS 发生中的作用研究甚少。

本研究结果显示 ApoE^{-/-}小鼠 8 周龄时血脂水平已高于同周龄 C57BL/6 小鼠, 32 周龄时增高更为显著,而高脂血症是 AS 形成的重要早期阶段。ApoE^{-/-}小鼠在 8 周龄时,动脉内膜光滑完整, Th9 细胞表达率和血清 IL-9 水平较低,与同周龄 C57BL/6 小鼠相比无明显差异。32 周龄时, ApoE^{-/-}小鼠动脉壁形成了明显的脂质斑块,斑块内可见到泡沫细胞浸润, Th9 细胞表达率和血清 IL-9 浓度显著升高,提示 AS 发生中存在 Th9 细胞的激活。

ox-LDL 由 LDL 发生氧化修饰形成,通过多种机制在 AS 的多个环节发挥重要作用,是 AS 发生的关键因子。ApoE^{-/-}小鼠 32 周龄 ox-LDL 浓度明显上升, Th9 表达率、IL-9 浓度与 ox-LDL 浓度均呈显著正相关性,以上结果进一步表明 Th9 与 AS 的发生密切相关。Zhang et al^[15]体外实验还发现 IL-9 可促进 STAT3 磷酸化,进而使小鼠动脉内皮细胞血管细胞黏附分子-1 表达增加。AS 病因复杂,但最主要的发病原因是泡沫细胞的形成与沉积, Th9 细胞是否可以促进巨噬细胞吞噬 ox-LDL 形成泡沫细胞有待于进一步研究。

综上所述,在 AS 模型中, Th9 细胞和 IL-9 表达上调,且与 ox-LDL 浓度呈显著正相关性,提示 Th9 细胞及 IL-9 在 AS 发生中发挥重要作用。Th9/IL-9 可能为 AS 发病机制的研究和干预提供新靶点。

参考文献

[1] Laurat E, Poirier B, Tupin E, et al. *In vivo* downregulation of T helper cell 1 immune responses reduces atherogenesis in apoli-

poprotein E-knockout mice[J]. *Circulation* 2001, 104(2):197-202.

[2] Veldhoen M, Uytendhoeve C, van Snick J, et al. Transforming growth factor-beta reprograms the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset[J]. *Nat Immunol* 2008, 9(12):1341-6.

[3] Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, et al. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells[J]. *Nat Immunol*, 2008, 9(12):1347-55.

[4] Wilhelm C, Hirota K, Stieglitz B, et al. An IL-9 fate reporter demonstrates the induction of an innate IL-9 response in lung inflammation[J]. *Nat Immunol* 2011, 12(11):1071-7.

[5] Ding X, Cao F, Cui L, et al. IL-9 signaling affects central nervous system resident cells during inflammatory stimuli[J]. *Exp Mol Pathol* 2015, 99(3):570-4.

[6] Kim J D, Lee S H, Seo E H, et al. Role of Th1 and Th17 cells in the development and complexity of coronary artery disease: comparison analysis by the methods of flow cytometry and SYNTAX score[J]. *Coron Artery Dis* 2015, 26(7):604-11.

[7] Cardilo-Reis L, Gruber S, Schreier S M, et al. Interleukin-13 protects from atherosclerosis and modulates plaque composition by skewing the macrophage phenotype[J]. *EMBO Mol Med* 2012, 4(10):1072-86.

[8] Potekhina A V, Pylaeva E, Provatorov S, et al. Treg/Th17 balance in stable CAD patients with different stages of coronary atherosclerosis[J]. *Atherosclerosis* 2015, 238(1):17-21.

[9] Chang H C, Sehra S, Goswami R, et al. The transcription factor PU. 1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation[J]. *Nat Immunol* 2010, 11(6):527-34.

[10] Ciprandi G, De Amici M, Giunta V, et al. Serum interleukin-9 levels are associated with clinical severity in children with atopic dermatitis[J]. *Pediatr Dermatol*, 2013, 30(2):222-5.

[11] Li H, Nourbakhsh B, Cullimore M, et al. IL-9 is important for T-cell activation and differentiation in autoimmune inflammation of the central nervous system[J]. *Eur J Immunol*, 2011, 41(8):2197-206.

[12] Nalleweg N, Chiriac M T, Podstawa E, et al. IL-9 and its receptor are predominantly involved in the pathogenesis of UC[J]. *Gut*, 2015, 64(5):743-55.

[13] Lin Y Z, Wu B W, Lu Z D, et al. Circulating Th22 and Th9 levels in patients with acute coronary syndrome[J]. *Mediators Inflamm* 2013, 2013:635672.

[14] Gregersen I, Skjelland M, Holm S, et al. Increased systemic and local interleukin 9 levels in patients with carotid and coronary atherosclerosis[J]. *PLoS One* 2013, 8(8):e72769.

[15] Zhang W, Tang T, Nie D, et al. IL-9 aggravates the development of atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice[J]. *Cardiovasc Res* 2015, 106(3):453-64.

网络出版时间: 2017-5-20 11:13 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170520.1113.011.html>

高浓度葡萄糖对膀胱癌 T24 细胞增殖及 β -catenin 表达的影响

何小龙¹, 钟珍教¹, 何笑云², 朱海琴³, 徐方明¹, 高漓¹, 张天禹¹, 蒋雷鸣¹

摘要 目的 探讨高浓度葡萄糖对膀胱癌 T24 细胞增殖的影响,并探讨其可能的作用机制。方法 用含 10% FBS 的 DMEM 培养液体外培养膀胱癌 T24 细胞,将细胞分为 5 组:空白组(5.5 mmol/L 葡萄糖)、对照组(5.5 mmol/L 葡萄糖 + 25 mmol/L 甘露醇)、高糖组(10、20、30 mmol/L 葡萄糖)。采用 MTT 法及克隆形成实验检测高浓度葡萄糖对膀胱癌 T24 细胞增殖的影响;通过实时定量 PCR 检测膀胱癌 T24 细胞 β -catenin mRNA 的表达水平;通过 Western blot 法检测高浓度葡萄糖对膀胱癌 T24 细胞 β -catenin 蛋白表达的影响。结果 MTT 法及克隆形成实验结果显示,高浓度葡萄糖显著促进膀胱癌 T24 细胞的增殖($P < 0.01$);Western blot 检测

结果显示,高浓度葡萄糖促进 T24 细胞 β -catenin 蛋白的表达。实时定量 PCR 检测结果显示,高浓度葡萄糖促进 T24 细胞 β -catenin mRNA 的表达。结论 高浓度葡萄糖明显促进膀胱癌 T24 细胞的增殖,并促进 T24 细胞 β -catenin 蛋白和其 mRNA 的表达,该作用机制可能与 β -catenin 表达上调有关。

关键词 高糖环境;膀胱癌;增殖;T24; β -catenin

中图分类号 R 737.14

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)06-0828-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.06.011

2017-03-04 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81360377、81660425);广西自然科学基金重点项目(编号:2015jjDA40034);桂林医学院大学生创新创业训练计划项目(编号:201610601040)

作者单位:桂林医学院附属医院¹ 泌尿外科、² 内分泌科,桂林 541004

³ 萍乡市人民医院神经外科,萍乡 337000

作者简介:何小龙,男,硕士研究生;

高漓,男,副主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:

40407864@qq.com

膀胱癌是我国泌尿外科临床上最常见的恶性肿瘤之一。在欧美,膀胱癌发病率居男性恶性肿瘤的第 4 位,其发病率和病死率均位于我国泌尿生殖系统肿瘤的第 1 位^[1]。肿瘤的转移是一个复杂、多因素、多步骤的过程,不仅取决于肿瘤细胞自身的特性,而且还涉及到肿瘤细胞与肿瘤外周微环境的相互影响。本课题组前期研究^[2]证实酸性微环境明显促进前列腺癌细胞 PC-3 的侵袭和迁移。

多项研究^[3-4]显示,高血糖可以增加包括膀胱

Role of CD4⁺ IL-9⁺ T cells in experimental atherosclerosis

Ming Tingting, Ding Shaowei, Hu Chaojie, et al

(The Central Laboratory of Medical Research Center,

The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the expression and significance of CD4⁺ IL-9⁺ T cells (Th9) in atherosclerosis model of ApoE^{-/-} mice. **Methods** ApoE^{-/-} mice aged 8 weeks were fed with high fat and their age-matched C57BL/6 control mice were fed with normal diet. The mice were examined at the age of week 8 and week 32. Blood lipid levels in serum were detected. Paraffin sections of aortic root were used to observe the histological features of atherosclerotic plaques by HE staining. The frequencies of Th9 cells in spleen were measured by flow cytometry. The concentrations of interleukin(IL)-9 and oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) in the serum were detected by ELISA assay. **Results** At the age of week 32, the aortic root of ApoE^{-/-} mice appeared obvious lipid plaques, Th9 cells frequencies and IL-9 concentrations were significantly higher than those of age matched C57BL/6 mice ($P < 0.01$). Th9 cells frequencies and IL-9 concentration were positively correlated with ox-LDL concentration ($P < 0.01$). **Conclusion** Th9 cells and IL-9 play an important role in the occurrence of atherosclerosis. Th9 cells may become important target of mechanism research and treatment intervention for atherosclerosis.

Key words Th9 cells; IL-9; atherosclerosis; ApoE^{-/-} mice