

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.01.014

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.01.014>

## 过敏性鼻炎鼠模型中调节性B细胞比例变化及意义

顾兆伟<sup>1</sup>, 王韞秀<sup>2</sup>, 赵鹤<sup>1</sup>, 曹志伟<sup>1</sup>

(中国医科大学附属盛京医院 1. 耳鼻咽喉科; 2. 医疗保险工作部, 沈阳 110004)

**[摘要]** 目的: 探讨调节性B细胞(regulatory B cell, Breg细胞)在过敏性鼻炎(allergic rhinitis, AR)鼠模型鼻黏膜中比例变化及意义。方法: 16只BALB/C小鼠随机分为两组, 每组8只。AR组使用卵清蛋白来构建AR鼠模型, 对照组使用生理盐水替代。收取两组小鼠鼻黏膜组织, 采用流式细胞术检测两组小鼠鼻黏膜中Breg细胞的比例。结果: 在AR组与对照组小鼠鼻黏膜中均检测到Breg细胞, 并且AR组中Breg细胞比例( $1.15\% \pm 0.20\%$ )低于对照组( $2.30\% \pm 0.46\%$ ), 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论: Breg细胞比例下降在AR的发病中起重要作用。

**[关键词]** 过敏性鼻炎; 调节性B细胞; 鼠模型

## Expression and significance of regulatory B cells in the murine model of allergic rhinitis

GU Zhaowei<sup>1</sup>, WANG Yunxiu<sup>2</sup>, ZHAO He<sup>1</sup>, CAO Zhiwei<sup>1</sup>

(1. Department of Otorhinolaryngology; 2. Department of Medical Insurance, China Medical University Affiliated Shengjing Hospital, Shenyang 110004, China)

**Abstract** **Objective:** To investigate the expression and significance of the proportion of regulatory B cells (Breg) in the murine model of allergic rhinitis. **Methods:** Sixteen BALB/C mice were randomly divided into two groups, the allergic rhinitis group and control group, with 8 mice in each group. Murine model of allergic rhinitis was constructed with ovalbumin, the use of saline as control group. The proportion of Breg cells in nasal mucosa of the two groups were measured by flow cytometry. **Results:** The Breg cells can be detected in the allergic rhinitis group and the control group. The Breg proportion in allergic rhinitis group ( $1.15\% \pm 0.20\%$ ) was lower than that in the control group ( $2.30\% \pm 0.46\%$ ), and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The decreasing of Breg cell proportion plays an important role in the pathogenesis of allergic rhinitis.

**Keywords** allergic rhinitis; regulatory B cells; murine model

收稿日期 (Date of reception): 2016-09-27

通信作者 (Corresponding author): 曹志伟, Email: caozw2008@aliyun.com

基金项目 (Foundation item): 国家自然科学基金青年项目 (81200730), 辽宁省自然科学基金项目 (2014021047), 辽宁省教育厅科学研究项目 (LK201601), 沈阳市科技局项目 (F15-199-1-41)。This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81200730), Natural Science Foundation of Liaoning Province (2014021047), Liaoning Province Ministry of Education Scientific Study Project (LK201601), Science and Technology Bureau of Shenyang City (F15-199-1-41), P. R. China.

调节性B细胞, 即B调细胞(regulatory B cell, Breg细胞), 是一类可以调节机体内免疫反应的B细胞亚群, 该类细胞可通过分泌白介素10(IL-10)、转化生长因子 $\beta$ (TGF- $\beta$ )等具有调节功能的细胞因子, 或通过由CD40或B7(CD80或CD86)所介导的细胞与细胞直接接触的方式来实现其调节功能, 该类细胞对免疫反应的调节作用主要体现在其对T细胞分化以及增殖选择性地促进或抑制方面<sup>[1]</sup>。

过敏性鼻炎(allergic rhinitis, AR)是耳鼻咽喉科常见疾病, Th2反应在AR发病中起重要作用<sup>[2-3]</sup>。AR中Breg细胞的相关研究尚属空白, 且鉴于有研究<sup>[4-6]</sup>显示Breg细胞对Th2反应具有抑制作用, 推测Breg细胞在AR发生发展过程中起负性调节的作用。故此本研究构建AR鼠模型, 检测鼠鼻黏膜中Breg细胞比例, 进而探讨其在AR中的可能作用。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

6~8周龄SPF级雄性BALB/C小鼠, 体重18~20 g, 共计16只, 购于北京华阜康生物科技股份有限公司; 鸡卵清蛋白(ovalbumin, OVA)购于美国Sigma-Aldrich公司; 氢氧化铝粉购于天津市大茂化学试剂厂。

### 1.2 构建 AR 鼠模型

将16只小鼠随机分为两组, 每组8只。AR组中, 100  $\mu$ g OVA及2 mg氢氧化铝粉加入0.1 mL生理盐水中, 混匀, 分别于第0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14天进行腹腔注射, 自第15天开始至第25天每日使用50  $\mu$ g OVA溶于10  $\mu$ L生理盐水中, 对小鼠进行滴鼻, 每侧鼻孔10  $\mu$ L。对照组(control组)使用生理盐水替代腹腔注射以及滴鼻。

### 1.3 模型评价

#### 1.3.1 症状学计分

激发后, 模型小鼠会出现喷嚏、挠鼻、流涕等症状。根据计分标准进行计分: 末次滴鼻后观察30 min, 喷嚏: 1~3个计为1分, 4~10个计为2分, 11个及以上计为3分; 挠鼻: 轻摩擦鼻子几次计为1分, 抓挠鼻面部不止计为2分, 到处擦磨计为3分; 流涕: 鼻涕流至前鼻孔计为1分, 超过前鼻孔计为2分, 流涕满面计为3分。使用叠加法记录总分, 总分超过5分者即为构建模型成功。

#### 1.3.2 病理学诊断

在末次激发后2 h处死两组小鼠, 之后随机选取每组4只小鼠, 将整个头部放置乙醇甲醛混合固定液中固定, 随后放置5%甲酸中脱钙4周, 然后进行包埋制成蜡块、2  $\mu$ m厚度切片。进行苏木素-伊红(HE)染色, 镜检。镜下可见AR组鼻黏膜肿胀, 伴有嗜酸粒细胞浸润, 而control组未见明显黏膜肿胀以及嗜酸性粒细胞浸润, 从而说明构建模型成功(图1)。

### 1.4 流式细胞仪检测 Breg 细胞比例

取每组剩余4只小鼠鼻黏膜, 制备成单细胞悬液。使用50 ng/mL PMA(Sigma-Aldrich公司), 1  $\mu$ g/mL 离子霉素(Sigma-Aldrich公司), 10  $\mu$ g/mL 莫能霉素(美国, BD Biosciences)37  $^{\circ}$ C下培养6 h。加入异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记CD19抗体(BD Biosciences)以及固定破膜液(美国, eBioscience), 使用藻红素(PE)标记IL-10抗体(BD Biosciences)胞内染色, 设同型对照管。使用BD FACSCanto II流式细胞仪(BD Biosciences)进行细胞检测, 使用FlowJo7.6进行数据分析。

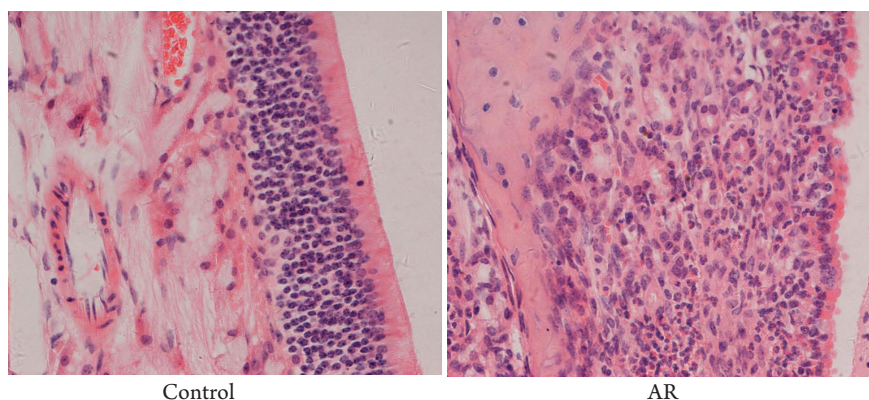


图1 对照组、过敏性鼻炎组HE染色结果( $\times 400$ )

Figure 1 HE stains of the AR group and the control group ( $\times 400$ )

### 1.5 统计学处理

使用SPSS13.0进行统计学分析, 数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 组间比较采用Mann-Whitney *U* 检验,  $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 症状学计分

小鼠末次滴鼻后观察30 min, 发现AR组小鼠均出现喷嚏、挠鼻、流涕等症状, 以叠加法记录总分, AR组中每只小鼠计分均 $>5$ , 计分为

$7.13\pm 0.64$ 表明构建AR模型成功。control组小鼠偶尔出现喷嚏、挠鼻、流涕等症状, control组中每只小鼠计分均 $<5$ , 计分 $2.13\pm 0.64$ 。两组症状学计分差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。

### 2.2 小鼠鼻黏膜中 Breg 细胞比例

使用流式细胞术检测到AR组以及control组中小鼠鼻黏膜中均有Breg细胞的存在, 且AR组中Breg细胞比例低于control组( $1.15\pm 0.20\%$ 与 $2.30\pm 0.46\%$ ), 两组间差异具有统计学意义( $P<0.05$ , 图2)。

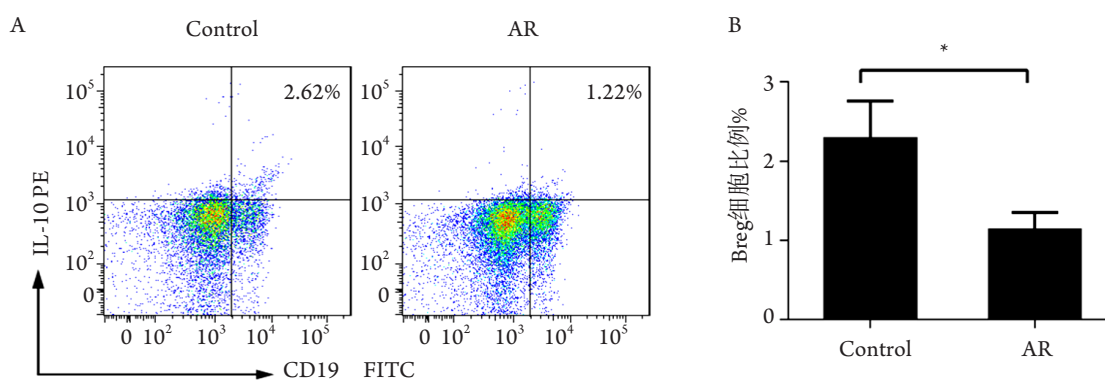


图2 流式细胞术分析过敏性鼻炎组和对照组鼠黏膜中Breg细胞比例

Figure 2 Proportion of Breg cells in nasal mucosa of the AR group and the control group analysed by flow cytometry

(A) AR组以及control组代表性结果, 右上象限中的数据代表的是Breg细胞的比例; (B) AR组以及control组统计图。\* $P<0.05$ 。

(A) Data are presented as representative results of AR group and control group and the numbers in the upper right quadrant are the proportion of Breg cell; (B) statistical graph of the AR group and the control group. \* $P<0.05$ .

## 3 讨论

AR主要是一种Th2细胞因子介导的鼻腔炎症, 伴有鼻黏膜嗜酸粒细胞和肥大细胞浸润以及血清抗原特异性IgE水平的升高<sup>[7]</sup>。Th2反应中的效应细胞因子IL-4, IL-5和IL-13是嗜酸粒细胞增多的经典调质, 此能显著影响Th2炎症反应通路的因素成为目前研究的一个热点<sup>[8]</sup>。

有研究<sup>[9]</sup>显示在小鼠Th2细胞介导的慢性肠炎模型中, 抗原中的某种糖脂类物质可与Breg细胞表面的CD1d相结合促使Breg细胞产生大量的IL-10, 而IL-10通过上调IL-1及活化STAT3的方式来抑制Th2细胞介导的免疫反应。但B细胞缺乏的小鼠模型中引入野生型小鼠B细胞后, 会激发寄生虫感染组织中表达高水平IL-4, 从而诱导Th2细胞免疫反应, 活化嗜酸性细胞, 促使寄生虫的排出; 然而

阻断产IL-10B细胞后发诱导Th1细胞免疫反应, 抑制Th2细胞反应, 致使嗜酸性细胞活化减少, 寄生虫排出减少<sup>[10]</sup>。故此认为Breg细胞是正性调节还是负性调节作用与其所处微环境有关, 但都是趋向对机体相对有利的免疫状态。

我们构建AR鼠模型, 使用流式细胞术检测到AR鼠黏膜中存在Breg细胞, 并且其在AR中的比例要低于正常小鼠, 提示Breg细胞在AR发生发展过程中起负性调节的作用。Breg细胞的增多可能会抑制Th2反应, 抑制AR的症状。

随着新的Th细胞亚群以及Treg的出现, 它们在AR中的作用得到重视, 除了Th2反应升高以外, AR伴有Th17, Th9反应的升高, Treg反应受抑制。

在产IL-10的B细胞缺乏的关节炎小鼠模型中Foxp3的表达量下降, Foxp3<sup>+</sup>Treg的细胞数下降,

而Th1和Th17的水平升高, 移植野生型小鼠Breg前体细胞后, 发现Treg细胞增多, 而Th1及Th17水平下降, 炎性反应得到抑制, 说明产IL-10的B细胞能够负性调节Th1及Th17所介导的免疫反应<sup>[11]</sup>。相比于Treg细胞, 人们还不太明确Breg细胞在对过敏原诱导耐受方面的作用, 但是, 有趣的是Breg细胞不仅能够通过IL-10直接作用来诱导耐受, 还可以通过诱导Treg细胞来间接诱导耐受<sup>[6]</sup>。

本实验虽首次明确AR鼠模型中鼻黏膜中Breg细胞的含量, 但在基因水平上对Breg细胞的研究较少, Breg细胞特异性转录因子、细胞组织来源等认识仍极为有限, Breg细胞与Th众亚群之间的关系如何, 如何调节, Breg细胞到底扮演了何种角色有待于进一步研究证实, 故此Breg在AR中作用的研究还有很长的一段旅程。随着Breg细胞的深入研究, 必然会提高人们对AR发病机制的认识, 并为AR的靶向治疗提供理论依据。

## 参考文献

1. 王萌, 曹志伟. 调节性B细胞在变应性疾病中对T细胞免疫的调节作用及其调节因素[J]. 临床与病理杂志, 2015, 35(6): 1137-1143.  
WANG Meng, CAO Zhiwei. Regulatory function on T cell immunity of regulatory B cell and its regulating factors in allergic diseases[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2015, 35(6): 1137-1143.
2. Wang SB, Deng YQ, Ren J, et al. Exogenous interleukin-10 alleviates allergic inflammation but inhibits local interleukin-10 expression in a mouse allergic rhinitis model[J]. BMC Immunol, 2014, 15: 9.
3. Wang SB, Deng YQ, Ren J, et al. Lactoferrin administration into the nostril alleviates murine allergic rhinitis and its mechanisms[J]. Scand J Immunol, 2013, 78(6): 507-515.
4. van de Veen W, Stanic B, Yaman G, et al. IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses[J]. J Allergy Clin Immunol, 2013, 131(4): 1204-1212.
5. Stanic B, van de Veen W, Wirz OF, et al. IL-10-overexpressing B cells regulate innate and adaptive immune responses[J]. J Allergy Clin Immunol, 2015, 135(3): 771-780.e8.
6. Braza F, Chesne J, Castagnet S, et al. Regulatory functions of B cells in allergic diseases[J]. Allergy, 2014, 69(11): 1454-1463.
7. Skoner DP. Allergic rhinitis: definition, epidemiology, pathophysiology, detection, and diagnosis[J]. J Allergy Clin Immunol, 2001, 108(1 Suppl): S2-S8.
8. Paul WE, Zhu J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified?[J]. Nat Rev Immunol, 2010, 10(4): 225-235.
9. Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, et al. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation[J]. Immunity, 2002, 16(2): 219-230.
10. Ronet C, Hauyon-La Torre Y, Revaz-Breton M, et al. Regulatory B cells shape the development of Th2 immune responses in BALB/c mice infected with Leishmania major through IL-10 production[J]. J Immunol, 2010, 184(2): 886-894.
11. Carter NA, Vasconcellos R, Rosser EC, et al. Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells[J]. J Immunol, 2011, 186(10): 5569-5579.

本文引用: 顾兆伟, 王韞秀, 赵鹤, 曹志伟. 过敏性鼻炎鼠模型中调节性B细胞比例变化及意义[J]. 临床与病理杂志, 2017, 37(1): 75-78. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.01.014

**Cite this article as:** GU Zhaowei, WANG Yunxiu, ZHAO He, CAO Zhiwei. Expression and significance of regulatory B cells in the murine model of allergic rhinitis[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2017, 37(1): 75-78. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.01.014