·基础研究·

n-3多不饱和脂肪酸对NOD小鼠T细胞的免疫调节作用

李 琳[1],李晓曦[2],毕欣芸[3],刘珊珊[4],戴一凡[1*]

[1]南京医科大学江苏省异种移植重点实验室,[2]免疫学系,江苏 南京 211166;[3]广东工业大学生物医药学院,广州 番禺 510006;[4]青岛市妇女儿童医院检验科,山东 青岛 266000

[摘 要] **目的**:探讨n-3多不饱和脂肪酸(n-3 poly unsaturated fatty acid,n-3 PUFA)对NOD小鼠T细胞免疫学功能的影响。**方法**:取野生型Balb/c小鼠和已出现典型的Ⅰ型糖尿病症状的NOD小鼠脾脏细胞,磁珠分选后获得小鼠$CD4^+$ T细胞,将其分为4组:野生型小鼠为Wild type组;NOD小鼠分为未处理组、二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid,DHA)处理组、二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid,EPA)处理组。DHA、EPA处理24 h,PMA和Ionomycin刺激活化后,采用CCK-8法检测T细胞增殖、流式细胞仪检测Th1/Th2极化、ELISA法检测T细胞细胞因子的分泌水平变化。**结果**:DHA、EPA对T细胞增殖具有显著抑制作用,促进NOD小鼠Th2细胞分化,抑制Th1细胞分化,经ELISA检测,DHA和EPA能够抑制T细胞IL-6、IL-17的分泌。**结论**:n-3多不饱和脂肪酸通过抑制T细胞增殖,平衡Th1/Th2比例和抑制IL-6、IL-17的分泌,对NOD小鼠的T淋巴细胞起到免疫抑制作用。

[关键词] n-3多不饱和脂肪酸;T细胞;NOD小鼠

[中图分类号] R392.12 [文献标志码] A [文章编号] 1007-4368(2019)12-1707-05

doi:10.7655/NYDXBNS20191201

The immunoregulation effect of n-3 polyunsaturated fatty acids on T cells in NOD mice

Li Lin[1],Li Xiaoxi[2],Bi Xinyun[2],Liu Shanshan[3],Dai Yifan[1*]

[1]Jiangsu Key Laboratory of Xenotransplantation,[2]Department of Immunology,Nanjing Medical University,Nanjing 211166;[3]School of Biomedical and Pharmaceutical Science,Guangdong University of Technology,Guangzhou 510006;[4]Department of Laboratory,Women and Children's Hospital of Qingdao,Qingdao,266000,China

[**Abstract**] **Objective**: This study aims to observe the effects of n-3 poly unsaturated fatty acids (n-3 PUFA) on immunological functions of T cells in NOD mice. **Methods**: Spleen cells were separated from Balb/c WT mice and NOD mice. The $CD4^+$ T cells were obtained from magnetic bead separated spleen cells and divided into four groups: wild type group, NOD mice untreated group(control), NOD mice treated with (docosahexaenoic acid, DHA) and (eicosapentaenoic acid, EPA) groups. The NOD mice T cells were treated with EPA and DHA respectively for 24 h. After the stimulation and activation of PMA and Ionomycin, the viability of T cells was tested by CCK-8 kit, the differentiation of Th cells was analyzed by flow cytometer, and the secretion of inflammatory cytokines was measured by ELISA Kits. **Results**: EPA and DHA could inhibit the viability of T cells from NOD mice, suppress the naive T cells' differentiation into Th1 cells, balance the ratio of Th1 and Th2, and down-regulate the secretion of IL-6 and IL-17. **Conclusion**: n-3 PUFAs could suppress some immune functions of T cells by inhibiting their viability, regulating the Th1/Th2 polarization and inhibiting the secretion of IL-6 and IL-17.

[**Key words**] n-3 PUFAs; T cell; NOD mice

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(12): 1707-1711]

n-3多不饱和脂肪酸(n-3 poly unsaturated fatty acid,n-3 PUFA)是人体的必需脂肪酸之一,二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid,EPA)和二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid,DHA)是n-3 PUFA的2种活性形式。EPA和DHA均参与细胞结构的组成和物质代谢,影响细胞膜的结构及某些代谢产物的变化,进而影响细胞功能[1]。目前,多数研究表明用n-

[基金项目] 国家自然科学基金(81570402,81874144)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:daiyifan@njmu.edu.cn

3 PUFA培养一些细胞如淋巴细胞，能显著改变细胞膜磷脂构成，从而增加膜流动性；n-3 PUFA融入到T淋巴细胞的脂质双分子层中，可以显著改变T淋巴细胞膜的组成、流动性和膜上受体的空间构象，进而影响T细胞功能分子的合成和细胞功能[2]。多项流行病学研究表明，n-3 PUFA能够显著降低幼儿Ⅰ型糖尿病发病率[3-5]。n-3 PUFA可通过修复胰岛b细胞显著缓解NOD小鼠的发病程度[6]。补充n-3 PUFA可抑制肝切除术后的促炎细胞因子产生，从而加快肝功能的恢复[7]。在临床实践中，n-3 PUFA对类风湿性关节炎、溃疡性结肠炎等多种自体免疫性疾病具有一定治疗作用，可以缓解上述疾病的病程进展，这些研究均提示n-3 PUFA对Ⅰ型糖尿病和自身免疫病具有积极意义[8-9]，但是其抵抗炎症的相关机制尚未阐明。因此，本研究以Ⅰ型糖尿病模型动物NOD小鼠的T细胞为研究对象，通过研究n-3 PUFA对T细胞免疫功能的影响，探讨其对Ⅰ型糖尿病预防治疗作用的生物学机制。

1　材料和方法

1.1　材料

4~6周的雌性NOD小鼠购自上海斯莱克实验动物公司，动物实验符合南京医科大学动物伦理委员会的规定并被授权。HPLC级DHA、EPA（Sigma公司，美国）；细胞计数试剂盒CCK8 Kit（同仁化学公司，日本）；CD4 T cell isolation Kit（Invitrogen公司，美国）；CD4-FITC、IL-4-APC、IFN-g-APC单克隆荧光抗体（BD pharmingen公司，美国）；IL-6、IL-17 ELISA试剂盒（北京凯国生物公司）。

1.2　方法

1.2.1　NOD小鼠的饲养

NOD小鼠饲养于洁净动物房，12 h白天和12 h黑夜交替，小鼠可自由饮水摄食。雌性NOD鼠通常在12~14周自发呈现典型的Ⅰ型糖尿病症状，选择雌性小鼠8周时开始每天定时监测随机血糖，随机血糖连续2周超过11 mmol/L认为NOD小鼠发生自身免疫和Ⅰ型糖尿病。后续实验中选择野生型Balb/c小鼠和发病NOD小鼠为研究对象。

1.2.2　无菌脾脏单个细胞悬液的制备

脱颈椎处死小鼠，75% 酒精放置10 min；在超净工作台内取小鼠脾脏；放入无菌PBS中，用镊子拉碎；1 mg/mL胶原酶D在37 ℃下消化30 min，并在最后10 min加入含有终浓度10 mmol/L EDTA的PBS；反复吹打消化后的组织块，100目的不锈钢筛网过滤，除去组织和团块；4 ℃、300 *g* 离心5 min，洗去胶原酶D；加入预冷至4 ℃的红细胞裂解液，充分混匀振荡，4 ℃静置5 min；4 ℃、300 *g* 离心5 min，去上清；适量无菌PBS重悬。

1.2.3　T淋巴细胞的分离

将10^8个脾脏单个细胞重悬于200 mL磁珠专用PBS，加入anti-mouse CD4抗体磁珠，混匀，4 ℃孵育15 min；磁珠专用PBS在4 ℃、300 *g* 离心10 min，去上清；以磁珠分离柱（LS）对细胞进行分选，得到磁珠标记阳性的细胞群；以适量PBS重悬该细胞群，4 ℃、300 *g* 离心10 min，去上清；流式细胞仪检测T细胞纯度。分离纯化后的T细胞，分为4组进行相关实验：野生型Balb/c小鼠Wide type组，空白对照组（Control组），50 mmol/L EPA组和50 mmol/L DHA组；EPA和DHA处理T细胞时间为24 h。

1.2.4　T细胞增殖活力检测（CCK-8法）

将各组细胞悬液浓度调整为2×10^5个/mL，每孔100 mL均匀接种于96孔板中，每组细胞设6个重复孔；37 ℃、CO_2培养箱中培养72 h后，每孔加入CCK-8试剂10 mL，37 ℃、CO_2培养箱继续孵育6 h；Bio-Tek酶标仪检测450 nm处的光吸收值。

1.2.5　T淋巴细胞的活化

静息状态Th细胞分化为Th1和Th2能力弱，体外检测到的Th1和Th2细胞信号低。因此，选择刺激素PMA和Ionomycin协同活化T细胞。无菌脾脏单个细胞悬液或者纯化的T细胞悬液制备完成后，添加50 ng/mL PMA和1 mg/mL Ionomycin刺激4~6 h备用。

1.2.6　流式细胞术检测Th1/Th2细胞的极化

经活化的各组细胞在培养的最后5 h加入终浓度为1.7 mg/mL的monensin；将各组细胞转移到标准流式管中，每管10^5个细胞，设3个重复管；1 mL 4%多聚甲醛固定20 min；CD4-FITC抗体标记T细胞表面CD4分子后，加入1 mL破膜剂，室温孵育30 min，加入抗小鼠IFN-g、IL-4荧光单克隆抗体标记细胞内因子，4 ℃孵育后PBS洗3次；1%多聚甲醛固定，流式细胞仪进行检测分析。

1.2.7　ELISA法测定细胞因子水平

收集分组细胞培养上清液，每组至少3复孔。取出酶标板，依照次序分别加入50 mL的标准品于空白微孔中，加入50 mL样品于空白微孔中，然后加入10 mL的生物素标记液，在标准品孔和样品孔中加入100 mL的酶标记液，37 ℃孵育反应60 min，洗5次，每次静置10~20 s，每孔加入底物100 mL，37 ℃

下避光孵育反应15 min；每孔加入50 mL终止液，终止反应。酶标仪上以波长450 nm测定各孔的吸光度值。实验重复3次，取其平均值。

1.3　统计学方法

采用SPSS17.0统计学软件，数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，组间比较采用单因素方差分析(One-way Anova)。$P < 0.05$为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　n-3 PUFA对T细胞增殖的影响

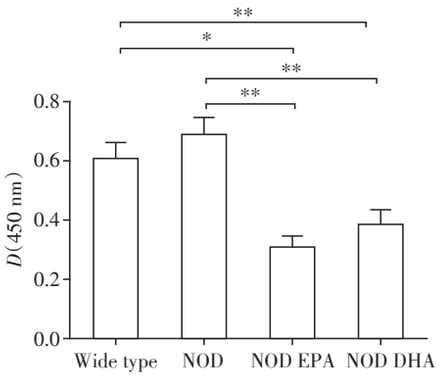
磁珠分离小鼠脾脏$CD4^+$ T细胞后，EPA(50 mmol/L)和DHA(50 mmol/L)处理NOD小鼠$CD4^+$ T细胞24 h，CCK-8试剂检测各组细胞活力。CCK-8被细胞内脱氢酶生物还原后生成的橙色甲臜染料能够溶解在组织培养基中，生成的甲臜量与活细胞数量成正比。结果表明，与野生型小鼠相比，发病NOD鼠$CD4^+$ T细胞增殖活力略高于野生型小鼠，而EPA和DHA能够抑制发病NOD鼠$CD4^+$ T的增殖活力，并且具有统计学意义(图1)。结果提示，n-3 PUFA对NOD小鼠$CD4^+$ T细胞的增殖活力均具有显著抑制作用。

2.2　n-3 PUFA对Th1、Th2细胞亚群及其比例的调控作用

T淋巴细胞亚群分化及其功能改变对Ⅰ型糖尿病中炎症发展至关重要，是导致胰周炎、胰岛炎的主要影响因素[10-11]。根据$CD4^+$T细胞发育、功能及分泌细胞因子的作用不同，主要分为Th1、Th2亚群。在一定条件下，Th1、Th2细胞亚群之间平衡可以互相转化，从而使机体的免疫效应和免疫抑制处于精细而复杂的平衡状态[1]。多项研究表明，Th1/Th2比例过分极化是造成胰腺局部自身免疫启动和自身免疫炎症的关键因素[12]。体外采用50 mmol/L EPA、DHA分别处理NOD小鼠脾脏淋巴细胞24 h后收集各组细胞，采用FITC-anti-CD4 mAb和APC-anti-IFN-γmAb标记Th1细胞，FITC-anti-CD4 mAb和APC-anti-IL-4 mAb标记Th2细胞，流式细胞仪检测Th1、Th2亚群变化(图2)。与对照组相比，EPA和DHA能够显著促进Th2细胞亚群的分化，下调Th1/Th2比例，促进Th2型细胞因子IL-4的胞内表达。上述结果提示，n-3 PUFAs可能通过抑制Th1/Th2比例严重偏向Th1，促进Th2细胞分化，增加抑制性细胞因子IL-4分泌缓解Ⅰ型糖尿病的炎症表型。

2.3　n-3 PUFA对T淋巴细胞分泌细胞因子水平的影响

多项研究表明NOD小鼠血清中IL-2、IFN-g、IL-6、IL-17等炎性因子分泌水平升高，给予IL-4、IL-10等抑制性细胞因子治疗后，具有拮抗上述炎症因子缓解胰岛炎症的作用。因此，为了更全面地分析n-3 PUFA对Ⅰ型糖尿病相关炎症分子的影响，磁珠分离NOD鼠脾脏$CD4^+$ T细胞，体外用50 mmol/L DHA、EPA处理24 h后，检测细胞培养上清中上述细胞因子的分泌水平(图3)。与对照组相比，EPA、DHA均能显著下调T细胞IL-6、IL-17分泌水平；结合前述n-3 PUFA调控Th细胞胞内因子的结果，说明n-3 PUFA对T细胞胞内外的多种炎症及抑炎因子都具有显著抑制或者促进作用，从而参与缓解Ⅰ型糖尿病的炎症水平。



两组比较，$^*P < 0.05$；$^{**}P < 0.01$。

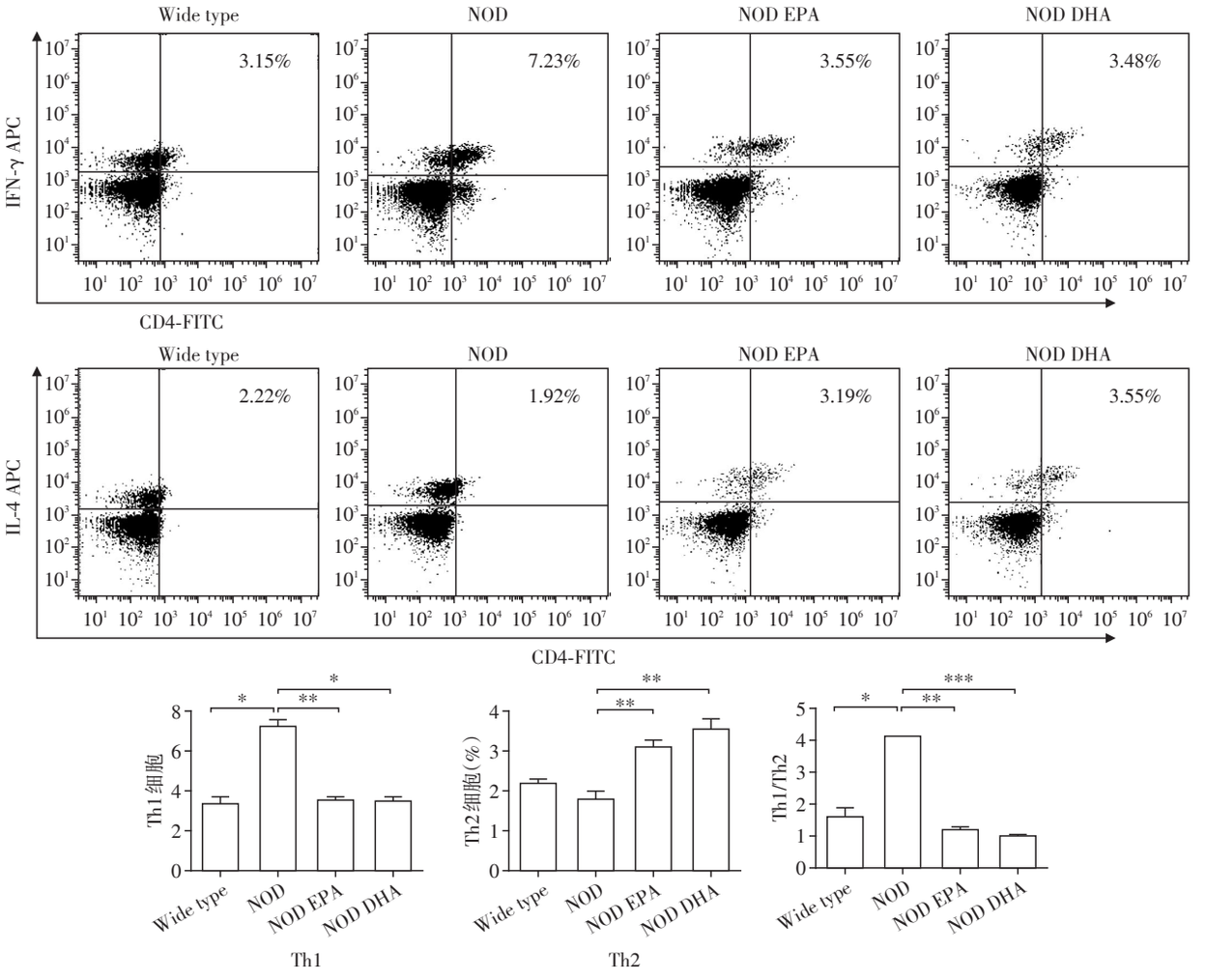
图1　n-3 PUFA对NOD小鼠T细胞增殖活力的影响

Figure 1　Effect of n-3 PUFA on the proliferation of T cells in NOD mice

3　讨　论

本研究主要探讨了n-3 PUFA对NOD小鼠$CD4^+$ T细胞亚群增殖、分化、相关细胞因子分泌的调控作用。实验结果表明，n-3 PUFA在体外抑制T细胞增殖；下调Th1细胞比例，上调Th2细胞比例，抑制初始T细胞过度偏向Th1亚群分化，使二者比例趋于平衡；同时，体外EPA、DHA处理NOD小鼠T细胞后发现，n-3 PUFA下调IL-6、IL-17等促炎因子分泌水平，这些结果提示，n-3 PUFA对NOD小鼠T细胞的免疫学功能具有一定抑制作用，从而对缓解NOD小鼠中T细胞介导的自身免疫炎症具有积极意义。

细胞移植实验证明，$CD4^+$ T细胞，尤其是$CD4^+$ Th1细胞，是NOD鼠Ⅰ型糖尿病发生的效应细胞。Nepom研究小组发现，4~6周的NOD鼠T细胞有向Th1转化的趋势，这可以从胰岛浸润T细胞所分泌的细胞因子类型区别[13]。4~6周NOD雌性鼠，胰岛浸润T细胞分泌的IFN-γ/IL-4比值增高，意味着胰岛炎症的发生，相反，雄性NOD鼠胰岛浸润T细胞



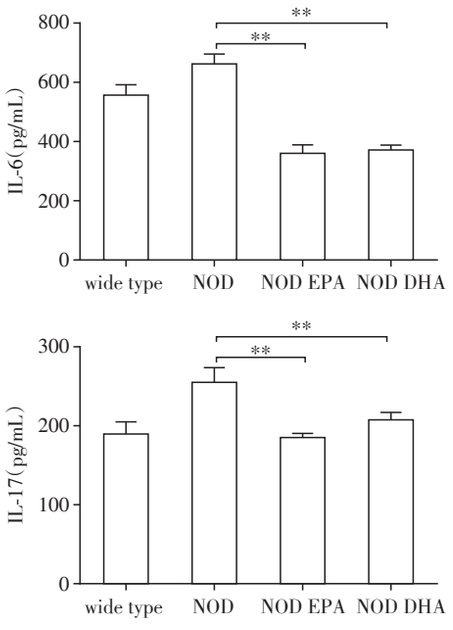
两组比较，$^{*}P < 0.05$；$^{**}P < 0.01$。

图2　n-3 PUFA对Th1/Th2细胞分化的影响

Figure 2　Effect of n-3 PUFA on the differentiation of Th1/Th2 cells

分泌的IL-4/IFN-γ比值却增高，而且一旦IL-4表达增加，胰岛炎造成的破坏很小，Ⅰ型糖尿病发病率低[14]。对照本研究结果，实验中分离的NOD小鼠T细胞在未经干预的情况下，Th1细胞比例显著高于野生型正常小鼠，处于Th细胞分化的异常状态，体外EPA和DHA处理后，可增加Th2细胞比例，下调Th1细胞比例，在体外起到有效抑制幼稚T细胞向Th1细胞分化的作用。因此，n-3 PUFA可能通过上述机制起到缓解NOD小鼠炎症发展的作用，但是其对NOD小鼠胰岛炎和Ⅰ型糖尿病的预防和治疗效果，还需进一步体内实验数据的积累。

近年来，Th17细胞在自身免疫病发病过程中的作用受到越来越多的关注，Th17细胞与多种自身免疫病的发生、发展有关，主要分泌IL-17、IL-6等细胞因子，具有很强的促炎症作用，可进一步促进Th1细胞、巨噬细胞等的活化，增加IFN-γ、IL-2等Th1型细胞因子的分泌[15]。动物实验中亦发现在NOD鼠中Th17细胞亚群明显增高并且血清学水平发现IL-17高表达[16]。Joseph等[10]研究发现Ⅰ型糖尿病儿童外周血中Th17细胞数量上升，但是糖尿病模型鼠外周血中IL-17被中和后，能够延缓其病情发展。Kenneth等的研究表明，EPA显著抑制LPS诱导的或者PEG2诱导的巨噬细胞活化后TNF-α、IL-6等炎性因子的分泌[11]。本研究通过体外实验发现，EPA和DHA对NOD小鼠IL-6、IL-17等促炎因子分泌水平也具有显著下调作用。有研究表明，Th1型细胞因子IL-2、IFN-γ、IL-6等加剧Th细胞向Th1方向分化，另一方面，在这些因子的作用下，$CD8^{+}$ T细胞、吞噬细胞也可活化为具有直接吞噬杀伤作用的效应细胞，形成非特异性的破坏胰岛细胞的正反馈反应[17]。因此，抑制上述炎症因子分泌也是有效控制Ⅰ型糖尿病发展的重要手段。本研究结果证明EPA和DHA体



两组比较，$^{*}P<0.05$；$^{**}P<0.01$。

图3　n-3 PUFAs对CD4⁺ T细胞分泌细胞因子的影响

Figure 3　Effect of n-3 PUFAs on cytokines secretion in CD4⁺ T cells

外能够抑制IL-6、IL-17的分泌水平，提示其对NOD小鼠发展的胰岛炎具有一定治疗作用，但是在体内更复杂的生理微环境下，EPA和DHA对于细胞因子网络的影响，还需要进一步的实验证实。

综上所述，作为参与Ⅰ型糖尿病的主要免疫细胞，T细胞介导的免疫机制参与胰周炎、胰岛炎的发生发展。本实验从细胞水平上探讨了n-3 PUFA中的EPA及DHA对T细胞免疫学相关功能的影响，将加深和完善对n-3 PUFA免疫抑制作用机制的理解，在一定程度上解释了n-3 PUFA在Ⅰ型糖尿病及其他自体免疫性疾病中的有益作用，为临床自身免疫病治疗过程中营养支持物的选择应用提供理论依据。

[参考文献]

[1] DeFilippis AP, Sperling LS. Understanding omega-3′s[J]. Am Heart J, 2006, 151(3): 564-570

[2] Akhtar Khan N. Polyunsaturated fatty acids in the modulation of T-cell signalling[J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2010, 82(4-6): 179-187

[3] Stene LC, Joner G. Use of cod liver oil during the first year of life is associated with lower risk of childhood-onset type 1 diabetes: a large, population-based, case-control study[J]. Am J Clin Nutr, 2003, 78(6): 1128-1134

[4] Boucher A. Diabetes in children. interview by carol nichols[J]. Aust Nurs J, 2008, 16(1): 33

[5] Landgraf-Leurs MMC, Drummer C, Fröschl H, et al. Pilot study on ω-3 fatty acids in type I diabetes mellitus[J]. Diabetes, 1990, 39(3): 369-375

[6] Bi X, Li F, Liu S, et al. ω-3 polyunsaturated fatty acids ameliorate type 1 diabetes and autoimmunity[J]. J Clin Invest, 2017, 127(5): 1757-1771

[7] Wu Z, Qin J, Pu L, Omega-3 fatty acid improues the dinical outcomes of hepatectomized patients with hepotitis B vincs (HBV) - associated hopatocellalar carcinoman [J]. JBR, 2012, 26(6): 395-399

[8] Gan RW, Demoruelle MK, Deane KD, et al. Omega-3 fatty acids are associated with a lower prevalence of autoantibodies in shared epitope-positive subjects at risk for rheumatoid arthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2017, 76(1): 147-152

[9] Yum HW, Kang JX, Hahm KB, et al. Constitutive ω-3 fatty acid production in fat-1 transgenic mice and docosahexaenoic acid administration to wild type mice protect against 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 487(4): 847-855

[10] Nepom GT, Ehlers M, Mandrup-Poulsen T. Anti-cytokine therapies in T1D: concepts and strategies[J]. Clin Immunol, 2013, 149(3): 279-285

[11] 卢　斌，卢大儒，邹大进. 白细胞介素10基因对非肥胖糖尿病鼠1型糖尿病发病率的影响[J]. 中国临床康复，2005，9(3)：98-99

[12] Delong T, Wiles T A, Baker R L, et al. Pathogenic CD4 T cells in type 1 diabetes recognize epitopes formed by peptide fusion[J]. Science, 2016, 351(6274): 711-714

[13] Delong T, Wiles TA, Baker RL, et al. Pathogenic CD4 T cells in type 1 diabetes recognize epitopes formed by peptide fusion[J]. Science, 2016, 351(6274): 711-714

[14] Walker LSK, von Herrath M. CD4 T cell differentiation in type 1 diabetes[J]. Clin Exp Immunol, 2016, 183(1): 16-29

[15] Ferraro A, Socci C, Stabilini A, et al. Expansion of Th17 cells and functional defects in T regulatory cells are key features of the pancreatic lymph nodes in patients with type 1 diabetes[J]. Diabetes, 2011, 60(11): 2903-2913

[16] Martin-Orozco N, Chung Y, Chang SH, et al. Th17 cells promote pancreatic inflammation but only induce diabetes efficiently in lymphopenic hosts after conversion into Th1 cells[J]. Eur J Immunol, 2009, 39(1): 216-224

[17] Coppieters KT, Dotta F, Amirian N, et al. Demonstration of islet-autoreactive CD8 T cells in insulitic lesions from recent onset and long-term type 1 diabetes patients[J]. J Exp Med, 2012, 209(1): 51-60

[收稿日期]　2019-03-09