

益生菌对犬异位性皮炎免疫调节机制的研究

刘欣^{1,2}, 林德贵¹

(1. 中国农业大学动物医学院, 北京 海淀 100193; 2. 北京爱康动物医院, 北京 朝阳 100026)

摘要:本试验对使用益生菌治疗的 21 只异位性皮炎犬和 9 只健康犬进行调查, 通过流式细胞术检测其外周血淋巴细胞 FoxP3 表达(即 Treg 的生成), ELISA 试剂盒检测血清 IL-10、TGF- β 、IFN- γ 和 IgE 浓度, 并比较治疗前后患犬的瘙痒程度。结果表明, 服用特殊益生菌使犬外周血淋巴细胞 FoxP3 表达升高, 血清 IL-10 和 IgE 浓度分别升高和下降。且通过提高 Treg 细胞的数量控制异位性皮炎的发病。

关键词:犬异位性皮炎; 益生菌; FoxP3; IL-10; IgE

中图分类号: S853.55

文献标识码: A

文章编号: 0529-6005(2010)04-0017-03

Immunoregulatory effect of probiotic on canine atopic dermatitis

LIU Xin^{1,2}, LIN De-gui¹

(1. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. Beijing Aikang Veterinary Hospital, Beijing 100026, China)

Abstract: The present study was designed to investigate the generation of regulatory T cells (Treg) and cytokines IL-10, TGF- β , IFN- γ and immunoglobulin E, in peripheral lymphocytes in 21 atopy canines treated with probiotics compared to 9 healthy control dogs. The results showed that the proportion of FoxP3-positive peripheral lymphocytes was significantly increased, and the concentrations of IL-10 and IgE in the serum of dogs treated with probiotics were increased and decreased as compared to controls respectively, suggesting a role of probiotics in the treatment of atopic dermatitis.

Key words: canine atopic dermatitis; probiotics; FoxP3; IL-10; IgE

Corresponding author: LIN De-gui

异位性皮炎(atopic dermatitis, AD), 是有遗传素质的炎性、瘙痒性和变态反应性皮肤病, 其临床特征与环境抗原刺激机体 IgE 产生有关^[1]。发病时会涉及多个方面的相互作用: 皮肤结构、免疫系统和生活环境。多数病例会出现靶环境抗原引起的体内抗原特异性 IgE 水平升高。

Th1/Th2 失衡学说在 AD 免疫机制中占主导地位。T 辅助细胞(Th)按其功能和分泌的细胞因子分为两群: Th1 和 Th2。Th1 细胞有抗微生物感染性; Th2 细胞能诱发 IgE 升高, 与异位性疾病密切相关。Th1 和 Th2 细胞因子可彼此抑制。另一独特亚群调节性 T 细胞即 Treg(T regulatory cell)也被发现拥有多种免疫调节和抑制功能。Treg 细胞数目异常或功能缺陷可能是异位性皮炎疾病的原因。FoxP3 是 Treg 细胞的特异性表达分子, Treg

细胞是通过其细胞因子白介素 10(IL-10)完成免疫抑制作用的, 且 IL-10 能降低组织中的 IgE 浓度^[2]。

AD 没有特异性诊断方法, 只能依据病史和症状, 以及排除其他相似疾病。瘙痒是 AD 必然存在的原发症状, 瘙痒评分可以判断病情的严重程度和治疗效果。此病无法治愈。通常选用免疫抑制剂或调节剂对其进行管理。由于此病的终生性, 药物副作用控制尤为重要。特殊益生菌用于人 AD 的管理已经初显优势, 无副作用, 且药效确实。用于犬 AD 的疗效尚无报道。本试验旨在探讨特殊益生菌对于犬 AD 的作用机理和临床效果, 从而提供兽医和动物主人管理 AD 的更多选择。

1 材料与方法

1.1 试验动物和材料 21 只犬均为临床就诊动物, 符合 AD 病史和临床症状, 并排除其他鉴别诊断。以 9 只健康犬做为对照组。患犬口服益生菌(MitoMaxSUPERTM), 每个胶囊含 10 亿菌落单位乳酸片球菌。颈静脉采血肝素钠抗凝全血约 5 mL。
1.2 分离淋巴细胞并检测表面标记 FoxP3 淋巴细胞分离液分离淋巴细胞, 24 h 内用 Rat/Mouse

收稿日期: 2009-12-31

作者简介: 刘欣(1969-), 女, 博士, 从事宠物临床皮肤病方向, E-mail: liuxin4889@126.com

通讯作者: 林德贵, E-mail: csama@sina.com.cn

Foxp3 PE (eBioscience Clone: FJK-16s, Cross-reacts with canine FoxP3) 荧光抗体染色,运用流式细胞仪检测 FoxP3 表达。流式细胞仪各项数据分析采用 APPLE 软件进行分析。

1.3 检测犬血清中 IL-10 和 IgE 的含量 使用犬 IL-10 ELISA 检测试剂盒(Quantikine™ canine IL-10 immunoassay, R&D Systems, Minneapolis, MN) 犬 IgE ELISA 检测试剂盒(ICL™ canine IgE Immunoperoxidase Assay, Immunology Consultants Laboratory)。

1.4 瘙痒评分 治疗组患犬分别在治疗前、治疗 2 周和 4 周后复查,评估瘙痒症状。瘙痒可视表现为

抓、啃、舔和蹭;分值范围 0~5 分(0 分:不痒;1 分:1~2 次/日;2 分:>2 次/日;3 分:在进食、散步和睡觉时会突然进行搔抓<2 次/日;4 分:>2 次/日;5 分:就诊时可见瘙痒。

2 结果

2.1 患犬在使用益生菌治疗 4 周前后的外周血 FoxP3 阳性淋巴细胞占总淋巴细胞的百分率(图 1),AD 犬治疗前 6.17 ± 2.87 ,略低于健康对照组 7.42 ± 2.13 ,二者之间没有统计学意义($P>0.05$)。经益生菌治疗后 FoxP3 百分率为 10.99 ± 4.69 ,极显著高于治疗前($P<0.001$),显著高于健康对照组($P<0.05$)(表 1)。

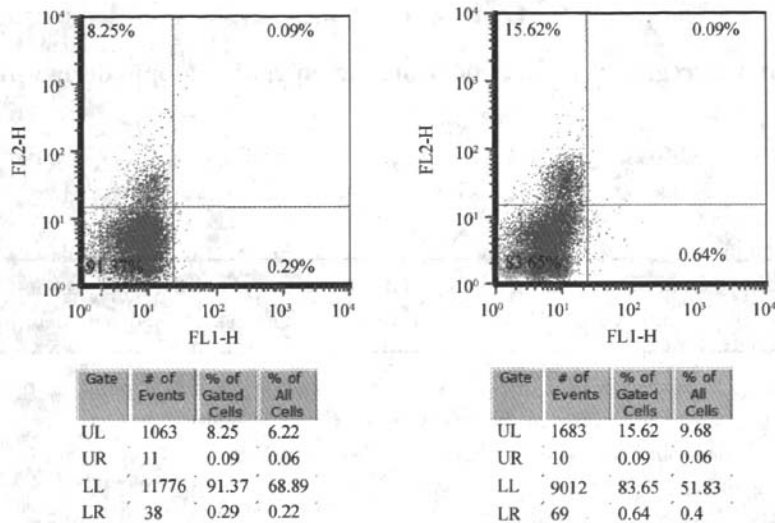


图 1 病例 20# 的治疗前(上图)、治疗后(下图)FoxP3 百分率

表 1 外周血淋巴细胞 FoxP3 百分率和血清 IL-10 浓度				
组别	n	FoxP3	IL-10(pg/mL)	
治疗前	21	6.17 ± 2.87	13.09 ± 7.36	
治疗后	21	10.99 ± 4.69	21.11 ± 6.71	
对照组	9	7.42 ± 2.13	12.23 ± 5.74	

表 2 血清 IgE 浓度和瘙痒评分				
组别	n	IgE(ng/mL)		瘙痒评分
治疗前	21	$8\ 257.57 \pm 4\ 519.93$		3.04 ± 0.47
治疗后	21	$2\ 787.71 \pm 1\ 948.74$		1.61 ± 0.80
对照组	9	$8\ 870.98 \pm 4\ 806.35$		

2.2 益生菌治疗组 4 周后血清 IL-10 浓度较对照组显著增高($P<0.001$)(表 1),瘙痒评分显著降低,差异极显著($P<0.001$)(表 2)。但是这两者之间没有相关性($r=0.084$)。

治疗前血清中 IgE 水平均较治疗组极显著降低,差异极显著($P<0.001$),(表 2);而 AD 发病组的 IgE 浓度治疗前与健康对照组几乎没有差异($P>0.05$);治疗后比对照组显著降低($P<0.05$)。

IL-10 和 IgE 的 AD 组治疗前血清浓度之间存在负相关性($P<0.05$),同样在治疗后血清浓度之间依然存在负相关性($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 本试验发现,在益生菌治疗后犬的外周血淋巴细胞的 FoxP3 表达显著增加,明显高于治疗前和健康对照组。因此认为益生菌具有免疫调节作用。

FoxP3 是调控 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞发育及启动抑制功能的总开关基因^[3]。它的表达及功能与 Treg 细胞密切相关。本试验首次使用交叉反应的鼠 FoxP3 抗体检测犬 FoxP3,用于鉴别犬体内的 Treg。研究证明,表达 FoxP3 的 CD4⁺T 细胞的功能性行为可以作为 Treg 的代表。目前认为评估 FoxP3 的表达是衡量犬 Treg 细胞数量的最佳方法^[4-5]。本试验采用流式细胞仪检测外周血淋巴细胞的 FoxP3 的表达证明,AD 犬的经过益生菌治疗后免疫机制的改变确实与 Treg 细胞的调节有关。

本试验选用乳酸片球菌符合免疫调节性益生菌

短期灌服二氢杨梅素对受损肉仔鸡肠黏膜的修复及免疫机能的影响

郭航^{1,2}, 谢鹏¹, 张敏红¹, 郑姗姗¹, 冯京海¹

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 动物营养学国家重点实验室, 北京 海淀 100193;

2. 陕西省农业工程勘察设计院, 陕西 西安 710068)

中图分类号:S859.79

文献标识码:B

文章编号:0529-6005(2010)04-0019-03

二氢杨梅素(dihydromyricetin, DMY)为 3,5,7,3,4,5,一六羟基 2,3 双氢黄酮,属于黄酮醇类化

合物。其由显齿蛇葡萄幼嫩茎叶中提取纯化而得,研究发现,二氢杨梅素在人和试验动物体内具有抗菌、抗氧化、保肝护肝^[1-2]等多种活性作用。近年来,进一步研究发现,DMY 还可增强机体免疫功能^[3-5]。肠道黏膜免疫系统具有重要的免疫功能,是机体防止感染的第一防线。该系统主要包括机械屏

收稿日期:2008-02-27

基金项目:北京市自然科学基金资助项目(6062021)

作者简介:郭航(1983-),男,硕士,研究方向为营养与免疫

通讯作者:谢鹏, E-mail: seulbird@yahoo.com.cn

的要求,而且比常见的乳酸菌和双歧杆菌等能够更好耐受低于 pH 2 的酸性胃环境。益生菌的菌体或片段被内化,从而诱导细胞因子如 TNF- α 和 IL-10 的产生,抑制促炎细胞因子和炎症细胞因子的产生,减轻异位性炎症^[6]。

3.2 比较益生菌治疗前后的瘙痒评分,发现瘙痒分值存在显著不同。说明益生菌对 AD 的瘙痒管理有明显的效果。AD 从根本上说是一个瘙痒症,显著减少瘙痒意味着益生菌对犬 AD 的改善。同时本试验发现外周血 Treg 细胞和 IL-10 的血清浓度也随之增强,说明益生菌是通过提高 Treg 细胞增殖和免疫抑制的细胞因子 IL-10 来改变犬 AD 免疫异常完成其功效的。

AD 犬治疗后的血清 IL-10 浓度显著增高。在治疗期间外周血淋巴细胞 FoxP3 数量伴随着血清 IL-10 浓度伴随性增高。在近期的研究中也发现类似现象,犬 FoxP3 增高的同时,在适当激活的细胞表面 IL-10 和 TGF- β mRNA 的表达也增强了,一旦激活细胞没有发展出 Treg 表型,则这两种细胞因子的 mRNA 也不会增强。因而血清 IL-10 浓度的显著提高也被归因为与 Treg 一样的免疫调剂现象。IL-10 有效抑制总的和特异性的 IgE,同时提高 IgG4 的制造^[7]。因此 IL-10 不仅能导致 T 细胞耐受,还能调节特异性抗体同种型。虽然总 IgE 的降低不一定与临床症状的严重性一致,但是会与 Treg 和血清 IL-10 的增高成反比^[7]。

本试验使用犬 ELISA 试剂盒检测血清 IL-10 浓度,健康犬的浓度没有随着时间变化,但是 AD 犬在治疗前后显著不同。这些结果与人的同类试验结果相似^[5],治疗能够使 Treg 的功能增强,并起着抑

制过敏性炎症的主要作用。本试验未发现患犬治疗前和健康对照组 FoxP3 表达、IL-10 和 IgE 血清浓度存在明显差异,此现象进一步证明 AD 没有诊断此病的特异性实验室指标;另一方面可以推测 AD 致病的多因素性造成复杂现象,例如皮肤结构、免疫系统和生活环境共同造成 AD 表现临床症状,而未发病的对照组未必没有以上环节的缺陷,但是因其无症状无法验证。

参考文献:

- [1] Olivry T. The ACVD task force on canine atopic dermatitis: forewords and lexicon[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2001, 81:143-146.
- [2] Taylor A, Vethagen J, Akdis C A, *et al*. T regulator cells in allergy and health: A question of allergen specificity and balance [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2004, 135:73-82.
- [3] Fontenotet J D, Gavin M A, Rudensky A Y, *et al*. FoxP3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells [J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(4):330-336.
- [4] Biller B J, Elmslie R E, Burnett R C, *et al*. Use of FoxP3 expression to identify regulatory T cells in healthy dogs and dogs with cancer [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2007, 116:69-78.
- [5] Keppel K L, Campbell F A, Zuckermann. Quantitation of canine regulatory T cell populations, serum IL-10 and allergen-specific IgE concentrations in healthy control dogs and canine atopic dermatitis patients receiving allergen-specific immunotherapy [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2008, 123:337-344.
- [6] Pessi T, Sutas Y, Hurme M, *et al*. Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG [J]. *Clin Exp Allergy*, 2000, 30 (12): 1804-1808.
- [7] Akdis C A, Blesken T, Akdis M, *et al*. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy [J]. *J Clin Invest*, 1998, 102: 98-106.