

本文引用:宋亚茹,田雪钦,赵雨欣,等.肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导蛋白8样分子2在T细胞发育过程中的表达及其对哮喘发病的潜在作用[J].新乡医学院学报,2022,39(12):1101-1106. DOI:10.7683/xyxyxb.2022.12.001.

### 【基础研究】

# 肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导蛋白 8 样分子 2 在 T 细胞发育过程中的表达及其对哮喘发病的潜在作用

宋亚茹<sup>1</sup>, 田雪钦<sup>2,3</sup>, 赵雨欣<sup>3</sup>, 宋苗苗<sup>3</sup>, 姜 珊<sup>2,3</sup>, 娄运伟<sup>2,3</sup>, 王 辉<sup>2,3</sup>

(1. 新乡医学院附属人民医院呼吸与危重症医学科二病区, 河南 新乡 453000; 2. 新乡医学院医学检验学院, 河南 新乡 453003; 3. 河南省免疫与靶向药物重点实验室, 河南 新乡 453003)

**摘要:** **目的** 探讨肿瘤坏死因子  $\alpha$  诱导蛋白 8 样分子 2 (TIPE2) 在 T 细胞发育过程中的表达及作用, 分析其在哮喘发病中的潜在作用。**方法** 选择 C57BL/6J 雌性野生型 (WT) 小鼠、C57BL/6J 雄性 TIPE2 基因敲除 (*Time2*<sup>-/-</sup>) 小鼠、C57BL/6J 雄性绿色荧光蛋白敲入 (*Time2*<sup>gfp/+</sup>) 小鼠为研究对象。取 WT 和 *Time2*<sup>gfp/+</sup> 小鼠结肠组织和胸腺组织, 获取肠道固有层淋巴细胞 (LPLs) 和胸腺细胞, 采用流式细胞术检测结肠组织 CD45<sup>-</sup> 细胞、CD45<sup>+</sup> 细胞及双阴性 (DN) T 细胞、双阳性 (DP) T 细胞、CD4<sup>+</sup> T 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞中 TIPE2 的表达。取 WT 和 *Time2*<sup>-/-</sup> 小鼠外周血、脾脏和肠系膜淋巴结, 采用流式细胞术检测外周血、脾脏和肠系膜淋巴结中 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞水平。将 10 只 *Time2*<sup>gfp/+</sup> 小鼠随机分为对照组和哮喘组, 每组 5 只。哮喘组小鼠以卵清蛋白诱导哮喘模型, 对照组小鼠以生理盐水代替卵清蛋白诱导; 采用流式细胞术检测 2 组小鼠肺泡灌洗液中 CD4<sup>+</sup> T 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞中 TIPE2 的表达。**结果** WT 和 *Time2*<sup>gfp/+</sup> 小鼠结肠组织 LPLs 中, 大部分 TIPE2<sup>+</sup> 细胞表达免疫细胞的标志分子 CD45, 几乎所有的 CD45<sup>-</sup> 基质细胞不表达 TIPE2。*Time2*<sup>gfp/+</sup> 小鼠结肠组织中基质细胞和 WT 小鼠免疫细胞中检测不到 TIPE2<sup>+</sup> 细胞。*Time2*<sup>gfp/+</sup> 小鼠胸腺组织 DN T 细胞中 TIPE2 相对表达量显著低于 CD4<sup>+</sup> T 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞 ( $t = 53.312, 8.230, P < 0.01$ ); DP T 细胞中 TIPE2 相对表达量显著低于 CD4<sup>+</sup> T 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞 ( $t = 21.094, 6.405, P < 0.001$ ); DN T 细胞中 TIPE2 相对表达量显著低于 DP T 细胞 ( $t = 7.619, P < 0.01$ ); CD4<sup>+</sup> T 细胞与 CD8<sup>+</sup> T 细胞中 TIPE2 相对表达量比较差异无统计学意义 ( $t = 1.256, P > 0.05$ )。WT 小鼠与 *Time2*<sup>-/-</sup> 小鼠外周血、脾脏和淋巴结中 CD4<sup>+</sup> T 细胞百分比比较差异无统计学意义 ( $t = 0.670, 0.128, 0.128, P > 0.05$ ); WT 小鼠与 *Time2*<sup>-/-</sup> 小鼠外周血及脾脏和淋巴结中 CD8<sup>+</sup> T 细胞百分比比较差异无统计学意义 ( $t = 1.488, 0.542, 0.255, P > 0.05$ )。哮喘组小鼠肺泡灌洗液 CD4<sup>+</sup> T 细胞中 TIPE2 相对表达量显著低于对照组 ( $t = 15.370, P < 0.001$ ); 对照组与哮喘组小鼠肺泡灌洗液 CD8<sup>+</sup> T 细胞中 TIPE2 相对表达量比较差异无统计学意义 ( $t = 0.132, P > 0.05$ )。**结论** 在 T 细胞的不同发育阶段 TIPE2 的表达水平不同; TIPE2 基因缺陷对 T 细胞的发育过程无明显影响, 可显著影响哮喘发生发展过程中 CD4<sup>+</sup> T 细胞功能。

**关键词:** 胸腺细胞;肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导蛋白8样分子2;哮喘;基因敲入

中图分类号: R562.2<sup>+</sup>5 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2022)12-1101-06

## Expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ induced protein-8-like 2 in the development of T cells and its potential roles in the pathogenesis of asthma

SONG Yaru<sup>1</sup>, TIAN Xueqin<sup>2,3</sup>, ZHAO Yuxin<sup>3</sup>, SONG Miaomiao<sup>2</sup>, JIANG Shan<sup>2,3</sup>, LOU Yunwei<sup>2,3</sup>, WANG Hui<sup>2,3</sup>

(1. Department of Respiratory and Critical Care Medicine Second Ward, the Affiliated Remin Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453000, Henan Province, China; 2. School of Laboratory Medicine, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China; 3. Henan Key Laboratory of Immunology and Targeted Drugs, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China)

**Abstract: Objective** To investigate the the expression and role of tumor necrosis factor- $\alpha$  inducible protein 8 like

**DOI:**10.7683/xyxyxb.2022.12.001

收稿日期:2022-04-13

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81971491)。

作者简介:宋亚茹(1984-),女,河南洛阳人,硕士,主治医师,研究方向:慢性呼吸道疾病。

通信作者:王 辉(1965 - ),男,河南信阳人,博士,教授,博士研究生导师,研究方向:免疫和代谢的相关研究;E-mail: wanghui@xxmu.edu.cn。

molecule 2 (TIPE2) in the development of T cells, and analyze its potential role in the pathogenesis of asthma. **Methods** C57BL/6J female wild-type (WT) mice, C57BL/6J male *Tape2*<sup>-/-</sup> mice, and C57BL/6J male *Tape2*<sup>gfp/+</sup> mice were selected as research objects. The colon tissue and thymus tissue of WT and *Tape2*<sup>gfp/+</sup> mice were taken to obtain intestinal lamina propria lymphocytes (LPLs) and thymocytes. The expression of TIPE2 in CD45<sup>+</sup> cells, CD45<sup>+</sup> cells, double negative (DN) T cells, double positive (DP) T cells, CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells was detected by flow cytometry. The levels of CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells in peripheral blood, spleen and mesenteric lymph nodes of WT and *Tape2*<sup>-/-</sup> mice were detected by flow cytometry. A total of 10 *Tape2*<sup>gfp/+</sup> mice were divided into control group and asthma group, with 5 mice in each group. Asthma model of mice was induced by ovalbumin in the asthma group, and normal saline was replace ovalbumin in mice in the control group; the expression of TIPE2 in CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells in alveolar lavage fluid of mice in the two groups was detected by flow cytometry. **Results** In the LPLs in colon tissues of WT and *Tape2*<sup>gfp/+</sup> mice, most TIPE2<sup>+</sup> cells expressed the marker of immune cells CD45<sup>+</sup>, and almost all CD45<sup>+</sup> stromal cells did not express TIPE2. TIPE2<sup>+</sup> cells were not detected in stroma cells in colon tissue of *Tape2*<sup>gfp/+</sup> mice and immune cells of WT mice. The relative expression level of TIPE2 in DN T cells was significantly lower than that in CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells in thymus of *Tape2*<sup>gfp/+</sup> mice ( $t = 53.312, 8.230; P < 0.01$ ); the relative expression level of TIPE2 in DP T cells was significantly lower than that in CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells ( $t = 21.094, 6.405; P < 0.001$ ); the relative expression level of TIPE2 in DN T cells was significantly lower than that in DP T cells ( $t = 7.619, P < 0.01$ ); there was no significant difference in the relative expression level of TIPE2 between CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells ( $t = 1.256, P > 0.05$ ). There was no significant difference in the percentage of CD4<sup>+</sup> T cells in the peripheral blood, spleen and lymph nodes between WT mice and *Tape2*<sup>-/-</sup> mice ( $t = 0.670, 0.128, 0.128; P > 0.05$ ); there was no significant difference in the percentage of CD8<sup>+</sup> T cells in the peripheral blood, spleen and lymph nodes between WT mice and *Tape2*<sup>-/-</sup> mice ( $t = 1.488, 0.542, 0.255; P > 0.05$ ). The relative expression level of TIPE2 in CD4<sup>+</sup> T cells in alveolar lavage fluid of mice in the asthma group was significantly lower than that in the control group ( $t = 15.370, P < 0.001$ ); there was no significant difference in the relative expression level of TIPE2 in CD8<sup>+</sup> T cells of alveolar lavage fluid between the control group and asthma group ( $t = 0.132, P > 0.05$ ). **Conclusion** The expression level of TIPE2 are different in the different developmental stages of T cells. TIPE2 gene deficiency does not significantly affect the development of T cells, it can significantly affect the CD4<sup>+</sup> T cells function in the pathogenesis of asthma.

**Key words:** thymocytes; tumor necrosis factor- $\alpha$  inducible protein-8-like 2; asthma; gene knocking

T 淋巴细胞是一种重要的适应性免疫细胞,在病原菌清除、病毒感染和抗肿瘤免疫过程中发挥重要作用<sup>[1-2]</sup>。T 细胞的前体细胞来源于骨髓,迁入胸腺后启动分化、经历谱系定型和选择并最终形成成熟的 T 细胞,中枢免疫器官胸腺组织中 T 细胞的发育状态对于其在外周免疫器官的分布和功能的执行至关重要。在胸腺的皮质区,非成熟的 CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> 双阴性(double negative, DN)胸腺细胞发育成 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 双阳性(double positive, DP)胸腺细胞,继而产生单阳性的 CD4<sup>+</sup> T 细胞或 CD8<sup>+</sup> T 细胞<sup>[3-4]</sup>。虽然调节 T 细胞受体(T cell receptor, TCR)信号转导的一些分子被不断地鉴定出来,但对 TCR 信号转导复合体如何调节 T 细胞发育的过程尚未完全阐明。肿瘤坏死因子  $\alpha$  诱导蛋白 8 样分子 2 (tumor necrosis factor- $\alpha$  induced protein-8-like 2, TNFAIP8L2 或 TIPE2)是高表达于免疫细胞的肿瘤坏死因子  $\alpha$  诱导蛋白 8 家族成员之一,在免疫应答和炎症反应过程中发挥重要调节作用<sup>[5]</sup>。TIPE2 负性调节 TCR 介导的信号转导和 T 细胞,包括 CD4<sup>+</sup> T 细胞和

CD8<sup>+</sup> T 细胞的活化及其诱导的免疫应答过程<sup>[6]</sup>。此外, TIPE2 作为第二信使磷酸肌醇的转运蛋白可调节磷酸肌醇依赖的信号和细胞骨架重构,在免疫细胞极化和定向趋化过程中扮演重要角色<sup>[7]</sup>。研究发现,在肿瘤免疫微环境中, TIPE2 也可调控髓系来源的抑制细胞功能,这与增加转录因子 CCAAT/增强子结合蛋白  $\beta$  (CCAAT/enhancer binding protein beta, C/EBP $\beta$ ) 水平以及阻断 C/EBP $\beta$  的磷酸化过程有关<sup>[8-9]</sup>。此外,研究发现, TIPE2 通过调节肠道菌群的生态失调影响结直肠癌的进程<sup>[10]</sup>。目前,关于 TIPE2 在 T 细胞发育过程中的表达变化尚未见报道, TIPE2 在 T 细胞发育过程中的作用尚不清楚。基于此,本研究选择已经构建成功的携带绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 基因敲入 (*Tape2*<sup>gfp/+</sup>) 小鼠以及 TIPE2 基因敲除 (*Tape2*<sup>-/-</sup>) 小鼠为研究对象,观察在 T 细胞发育过程中 TIPE2 表达水平的变化及其作用,并初步探讨 TIPE2 在卵清蛋白 (ovalbumin, OVA) 诱导的哮喘 T 细胞中的表达及其在哮喘发病过程中的潜在作用,以期研究

TIPE2 在哮喘发病机制中的作用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 5 只雌性 C57BL/6J 野生型小鼠 (wild type, WT) 购自上海南方模式生物科技股份有限公司, 6 只 C57BL/6J 背景雄性 *Tipe2*<sup>-/-</sup> 小鼠由淄博市中心医院转化医学研究中心馈赠。9 只 C57BL/6J 背景雄性 *Tipe2*<sup>gfp/+</sup> 小鼠由上海南方模式生物科技股份有限公司构建, 此荧光报告小鼠的构建策略是在 *Tipe2* 启动子下内源性的 *Tipe2* 基因被编码 GFP 的序列所取代<sup>[10]</sup>; 所有小鼠 8 ~ 12 周龄, 体质量 23 ~ 26 g。参考文献[10]方法, 将 *Tipe2*<sup>gfp/+</sup> 小鼠与 WT 小鼠杂交繁殖出 *Tipe2*<sup>gfp/+</sup> 小鼠; *Tipe2*<sup>-/-</sup> 小鼠与 WT 小鼠杂交繁殖出 *Tipe2*<sup>+/-</sup> 小鼠, 然后取 12 只 *Tipe2*<sup>+/-</sup> 自交繁殖出 *Tipe2*<sup>-/-</sup> 小鼠; WT 自交繁殖出 WT 小鼠; 取 *Tipe2*<sup>gfp/+</sup> 小鼠、*Tipe2*<sup>-/-</sup> 小鼠和 WT 小鼠用于后续实验, WT 小鼠和 *Tipe2*<sup>-/-</sup> 小鼠的性别和年龄均匹配。小鼠在河南省免疫与靶向药物重点实验室无特殊病原菌动物房里饲养和繁殖, 动物操作遵循国际及国家颁布的有关生物医学研究的伦理要求, 获新乡医学院动物伦理委员会批准。

1.2 主要试剂与仪器 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 和红细胞裂解液购自武汉赛维尔生物科技有限公司, 乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 和二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT) 购自北京索莱宝科技有限公司, OVA、胶原酶八和分散酶购自美国 Sigma 公司, RPMI 1640 培养基购自美国 Corning 公司, 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自以色列 Biological Industries 公司, 流式细胞染色使用的封闭抗体 CD16/CD32 购自美国 Biolegend 公司, 区分死细胞的染色试剂 (Fixable Aqua Dead Cell Stain) 购自美国 Invitrogen 公司, CD45 (荧光素是 Pacific Blue)、CD4 (荧光素是 PE-Cy7) 和 CD8 (荧光素是 APC-Cy7) 流式抗体购自 Biolegend 公司, 氢氧化铝佐剂购自美国 Thermo 公司; 细胞过滤器购自美国 BD Biosciences 公司, 自动细胞计数仪购自上海睿钰生物科技有限公司, 流式细胞仪购自美国 BD Biosciences 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 肠道固有层淋巴细胞 (lamina propria lymphocytes, LPLs) 分离 分别取 4 只 WT、*Tipe2*<sup>gfp/+</sup> 小鼠, 用二氧化碳 (carbon dioxide, CO<sub>2</sub>) 窒息使其安乐死后, 剖开腹腔取出结肠组织置于冰上; 先用预冷的 PBS 涮洗小鼠结肠组织去除肠道内容物, 清洗干净后剪成 1 ~ 2 cm 长的小块, 置于含 30 mmol · L<sup>-1</sup> EDTA 和 1 mmol · L<sup>-1</sup> DTT 的 Hank's

平衡盐溶液 (Hank's balanced salt solution, HBSS) 缓冲液中, 于 37 °C 恒温摇床 180 r · min<sup>-1</sup> 震荡 15 min, 室温静置 1 min 后, 吸取上清, 重复 2 次, 以去除肠道上皮细胞和肠道上皮细胞间淋巴细胞; 将剩余组织块剪碎, 置于含胶原酶八 (0.5 g · L<sup>-1</sup>) 和分散酶 (100 000 U · L<sup>-1</sup>) 的 RPMI 1640 培养基中, 37 °C 恒温消化 90 min 至组织块基本消化完全, 室温静置 1 min 后用 70 μmol · L<sup>-1</sup> 的滤器过滤除去残渣, 将收集的液体置于 40% ~ 80% Percoll 分离液中, 室温 2 500 r · min<sup>-1</sup> 离心 20 min 取中间白膜层, 然后再室温 1 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 收集的细胞沉淀即为 LPLs。

1.3.2 流式细胞术检测 LPLs 中 TIPE2 的表达 将 LPLs 细胞密度调整到 1 × 10<sup>10</sup> L<sup>-1</sup>, 每个样品取 100 μL 即 1 × 10<sup>6</sup> 个细胞置于流式管中, 4 °C 下 1 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 5 min 收集细胞, 在离心过程中根据样品总数先配置封闭抗体 CD16/CD32 (稀释比例为 1 : 200), 每个样品的反应体积为 30 μL, 置于冰上 15 min 以充分封闭细胞表面的 Fc 受体。在封闭过程中根据样品总数配置含有荧光素标记的单克隆抗体的混合液, 封闭结束后直接将预先准备好的混合液加入反应管中, 每个样品的反应体积为 50 μL, 4 °C 避光孵育 30 min。用前向角散射 (forward scatter-A, FSC-A) 和 FSC-H 去除粘连的细胞群体, 用 Fixable Aqua Dead Cell Stain 试剂区分死细胞并将死细胞从后续的分析中排除出去; 参考文献[11], 细胞充分洗涤后, 用抗体 CD45 (稀释比例 1 : 200) 4 °C 染色 30 min, 充分洗涤后, 用 FACSCanto II 流式细胞仪检测 CD45<sup>+</sup> T 细胞和 CD45<sup>-</sup> 基质细胞中的 TIPE2 平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI), 采用 Flowjo 软件分析数据, 以 MFI 代表 TIPE2 蛋白的相对表达量。

1.3.3 流式细胞术检测 *Tipe2*<sup>gfp/+</sup> 小鼠胸腺组织 DN、DP、CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞中 TIPE2 表达水平

取 4 只 *Tipe2*<sup>gfp/+</sup> 小鼠, 用 CO<sub>2</sub> 窒息使其安乐死后, 开腹、开胸, 分离胸腺组织, 置于预冷的 RPMI 1640 培养基中匀浆研磨, 经 70 μm 的细胞过滤器过滤获取单细胞悬液, 用预冷的 PBS 漂洗细胞 2 次, 最后一次收集细胞沉淀后加入 5 mL 预冷的含体积分数 2% FBS 的 PBS 溶液, 细胞充分洗涤后, 用抗体 CD4 (稀释比例 1 : 400) 和 CD8 (稀释比例 1 : 400) 混合液 4 °C 染色 30 min (标记 CD4<sup>+</sup> T 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞), 将 *Tipe2*<sup>gfp/+</sup> 小鼠胸腺中的 T 细胞以 CD4 分子和 CD8 分子分成 4 个群体, 即 DN T 细胞、DP T 细胞、CD4<sup>+</sup> T 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞, 用 FACSCanto II 流式细胞术检测 DN T 细胞、DP T 细胞、CD4<sup>+</sup> T 细

胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞中 TIPE2 的 MFI, 采用 Flowjo 软件分析数据, 以 MFI 代表 TIPE2 蛋白的相对表达量。

**1.3.4 细胞计数仪检测 WT 和 *Tipe2*<sup>-/-</sup> 小鼠不同组织中 CD4<sup>+</sup> T 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞** 分别取 5 只性别和年龄匹配的 8 ~ 12 周 WT、*Tipe2*<sup>-/-</sup> 小鼠, 从内眦处抽取外周静脉血 100  $\mu$ L, 置于 EDTA 抗凝管中备用; 然后, 用 CO<sub>2</sub> 室息使其安乐死后, 开腹、开胸, 分离胸腺、脾脏和肠系膜淋巴结, 置于预冷的 RPMI 1640 培养基中匀浆研磨, 经 70  $\mu$ m 的细胞过滤器过滤获取单细胞悬液; 在脾脏细胞中加入 5 mL 红细胞裂解液, 冰上裂解 3 min 后加入 10 mL PBS 终止裂解, 于 4  $^{\circ}$ C 下 1 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 5 min 收集细胞, 再经 70  $\mu$ m 的细胞过滤器过滤掉因红细胞碎片聚集形成的沉淀物; 胸腺和肠系膜淋巴结单细胞悬液中不需要加入红细胞裂解液。用预冷的 PBS 漂洗细胞 2 次, 最后一次收集细胞沉淀后加入 5 mL 预冷的含体积分数 2% FBS 的 PBS 溶液, 细胞充分洗涤后, 用抗体 CD4 (稀释比例 1 : 400) 和 CD8 (稀释比例 1 : 400) 混合液 4  $^{\circ}$ C 染色 30 min (标记 CD4<sup>+</sup> T 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞), 充分洗涤后, 用细胞计数仪计算每个器官得到的细胞密度, 根据所加溶液的体积计算出细胞总数, 并计算 CD4<sup>+</sup> T 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞所占百分比。

**1.3.5 流式细胞术检测对照组和哮喘组 *Tipe2*<sup>gfp/+</sup> 小鼠肺泡灌洗液细胞中 TIPE2 表达水平** 取 10 只 8 ~ 12 周龄 *Tipe2*<sup>gfp/+</sup> 雄性小鼠随机分为对照组和哮喘组, 每组 5 只。哮喘组小鼠采用 OVA 诱导哮喘模型: 将 OVA (100  $\mu$ g) 与氢氧化铝佐剂充分混合, 分别在第 0 天和第 7 天将混合物注射入 *Tipe2*<sup>gfp/+</sup> 小鼠腹腔。从第 14 天开始, *Tipe2*<sup>gfp/+</sup> 小鼠每天用 OVA (50  $\mu$ g) 滴鼻, 滴鼻的总体积是 50  $\mu$ L, 滴鼻时采用异氟烷进行瞬时麻醉直至液体全部滴完, 持续到第 17 天。对照组小鼠用生理盐水代替卵清蛋白诱导。最后一次滴鼻结束后次日, 应用 CO<sub>2</sub> 室息法使 2 组小鼠安乐死, 将 18-G 滞留针插入气管, 滞留针头伸入约一半的长度, 注射器中吸入 600  $\mu$ L 预冷的 PBS 后连接上滞留针头, 并将 PBS 全部注射入肺内, 吸出 PBS 置于 1.5 mL 离心管中, 重复上述操作, 将 2 次收集的液体合并在一起, 4  $^{\circ}$ C 下 2 500 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 5 min 收集细胞, 用细胞计数仪计算获得细胞密度和细胞总数。将细胞密度调整到 1  $\times$  10<sup>10</sup> L<sup>-1</sup>, 每个样品取 100  $\mu$ L 即 1  $\times$  10<sup>6</sup> 个细胞置于流式管中, 4  $^{\circ}$ C 下 1 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 5 min 收集细胞, 在离心过程中根据样品总数先配置封闭抗体 CD16/CD32 (稀释比例为 1 : 200), 每个样品的反应体积为 30  $\mu$ L, 置于冰上 15 min 以充分封闭细胞表面的 Fc 受体。在封

闭过程中根据样品总数配置含有荧光素标记的单克隆抗体的混合液, 封闭结束后直接将预先准备好的混合液加入反应管中, 每个样品的反应体积为 50  $\mu$ L, 4  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。用 FSC-A 和 FSC-H 去除粘连的细胞群体, 用 Fixable Aqua Dead Cell Stain 试剂区分死细胞并将死细胞从后续的分析中排除出去, 用抗体 CD4 (稀释比例 1 : 400) 和 CD8 (稀释比例 1 : 400) 混合液 4  $^{\circ}$ C 染色 30 min, 充分洗涤后, 用 FACSCanto II 流式细胞仪检测 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞中的 TIPE2 的 MFI, 采用 Flowjo 软件分析数据, 以 MFI 代表 TIPE2 蛋白的相对表达量。

**1.4 统计学处理** 应用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析。计量数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用双侧非配对 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 TIPE2 在 WT 和 *Tipe2*<sup>gfp/+</sup> 小鼠肠道组织 LPLs 中的表达** 结果见图 1。WT 和 *Tipe2*<sup>gfp/+</sup> 小鼠结肠组织 LPLs 中, 大部分 TIPE2<sup>+</sup> 细胞表达免疫细胞的标志分子 CD45, 几乎所有的 CD45<sup>-</sup> 基质细胞不表达 TIPE2。 *Tipe2*<sup>gfp/+</sup> 小鼠结肠组织中非免疫细胞基质细胞以及 WT 小鼠免疫细胞中检测不到 TIPE2<sup>+</sup> 细胞。

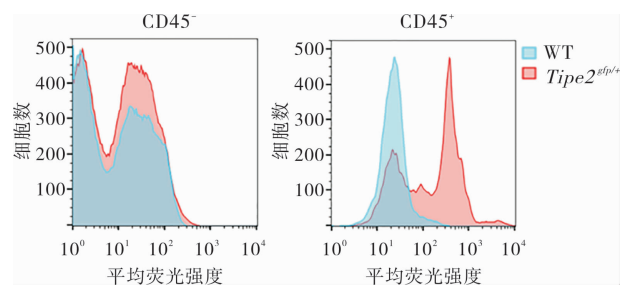


图 1 TIPE2 在 WT 和 *Tipe2*<sup>gfp/+</sup> 小鼠 LPLs CD45<sup>+</sup> 细胞和 CD45<sup>-</sup> 细胞中的表达

Fig. 1 Expression of TIPE2 in CD45<sup>+</sup> cells and CD45<sup>-</sup> cells in LPLs of WT and *Tipe2*<sup>gfp/+</sup> mice

**2.2 *Tipe2*<sup>gfp/+</sup> 小鼠胸腺组织 DN T 细胞、DP T 细胞、CD4<sup>+</sup> T 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞中 TIPE2 相对表达量比较** *Tipe2*<sup>gfp/+</sup> 小鼠胸腺组织 DN、DP、CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞中 TIPE2 相对表达量分别为 24.30  $\pm$  0.71、55.53  $\pm$  4.04、153.75  $\pm$  2.32、177.25  $\pm$  18.57。DN T 细胞中 TIPE2 相对表达量显著低于 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞, 差异有统计学意义 (*t* = 53.310、8.230, *P* < 0.01); DP T 细胞中 TIPE2 相对表达量显著低于 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞, 差异有统计学意义 (*t* = 21.090、6.405, *P* < 0.001); DN T 细胞中 TIPE2

相对表达量显著低于 DP T 细胞,差异有统计学意义 ( $t=7.619, P<0.01$ ); CD4<sup>+</sup> T 细胞与 CD8<sup>+</sup> T 细胞中 TIPE2 相对表达量比较差异无统计学意义 ( $t=1.256, P>0.05$ )。

表 1 WT 与 *Tipe2*<sup>-/-</sup>小鼠不同组织中 CD4<sup>+</sup> T 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞百分比比较

Tab. 1 Comparison of the percentages of CD4 <sup>+</sup> and CD8 <sup>+</sup> T cells in different organs between the WT and <i>Tipe2</i> <sup>-/-</sup> mice ( $\bar{x} \pm s$ )							
组别	<i>n</i>	CD4 <sup>+</sup> T 细胞			CD8 <sup>+</sup> T 细胞		
		血液	脾脏	淋巴结	血液	脾脏	淋巴结
WT	4	11.61 $\pm$ 0.37	19.28 $\pm$ 0.84	38.93 $\pm$ 1.23	6.20 $\pm$ 0.22	9.05 $\pm$ 0.52	18.45 $\pm$ 1.00
<i>Tipe2</i> <sup>-/-</sup>	4	12.32 $\pm$ 0.95	19.12 $\pm$ 0.99	37.62 $\pm$ 1.32	5.65 $\pm$ 0.30	8.69 $\pm$ 0.40	18.05 $\pm$ 1.19
<i>t</i>		0.670	0.128	0.128	1.488	0.542	0.255
<i>P</i>		>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

2.4 对照组与哮喘组小鼠肺泡灌洗液 CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD8<sup>+</sup> T 细胞中 TIPE2 相对表达量比较 结果见表 2。哮喘组小鼠肺泡灌洗液 CD4<sup>+</sup> T 细胞中 TIPE2 水平显著低于对照组,差异有统计学意义 ( $P<0.001$ ); 对照组与哮喘组小鼠肺泡灌洗液 CD8<sup>+</sup> T 细胞中 TIPE2 相对表达量比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

表 2 对照组与哮喘组小鼠肺泡灌洗液 CD4<sup>+</sup> T 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞中 TIPE2 相对表达量比较

Tab. 2 Comparison of the relative expression level of TIPE2 in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells of mice between the asthma group and control group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	TIPE2 (MFI)	
		CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>
对照组	5	455.00 $\pm$ 12.72	717.04 $\pm$ 18.03
哮喘组	5	166.80 $\pm$ 13.78	720.40 $\pm$ 17.89
<i>t</i>		15.370	0.132
<i>P</i>		<0.001	>0.05

3 讨论

自从 2008 年 TIPE2 被克隆和鉴定以来,世界上很多课题组围绕其开展了深入而细致的系统性研究。早期研究发现, TIPE2 选择性地表达于炎症组织、胸腺、脾脏、淋巴结、小肠黏膜等免疫器官和淋巴组织以及造血细胞中<sup>[6]</sup>; 此外,通过免疫组织化学检测发现, TIPE2 也表达于具有内分泌功能的组织细胞和泌尿生殖细胞<sup>[12-14]</sup>。TIPE2 属于一种细胞质蛋白,目前缺乏能够用于流式检测 TIPE2 的特异性抗体,尽管反复尝试用间接标记法进行流式染色分析,但因非特异性染色的干扰,均以失败而告终。为了能进一步明确体内表达 TIPE2 的细胞类群,采用基因敲入策略用表达 GFP 的序列取代内源性 TIPE2 的编码序列,通过基因型鉴定、蛋白印迹验证和流式

2.3 WT 与 *Tipe2*<sup>-/-</sup>小鼠不同组织中 CD4<sup>+</sup> T 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞比较 结果见表 1。WT 与 *Tipe2*<sup>-/-</sup>小鼠外周血、脾脏和淋巴结中 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞百分比比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

分析,证实构建成功<sup>[10]</sup>。本研究结果显示,在 WT 和 *Tipe2*<sup>gfp/+</sup> 小鼠结肠组织 LPLs 中,大部分 TIPE2<sup>+</sup> 细胞表达免疫细胞的标志分子 CD45,几乎所有的 CD45<sup>-</sup> 基质细胞不表达 TIPE2; *Tipe2*<sup>gfp/+</sup> 小鼠结肠组织的基质细胞(非免疫细胞)以及 WT 小鼠的免疫细胞中检测不到 TIPE2<sup>+</sup> 细胞,排除了 GFP 信号是来自肠道自发荧光的可能性,为后续研究提供了基础和保障。

功能试验证实, TIPE2 通过负性调节 TCR 介导的信号转导在适应性免疫应答过程中参与维持免疫稳态<sup>[6]</sup>。研究报道,胸腺细胞在发育和选择过程中依赖于 TCR 信号,其下游转导过程缺陷或者被干扰均能影响胸腺细胞的发育和成熟<sup>[15-17]</sup>。虽然 TIPE2 在免疫细胞中的作用已经被广泛研究,但是其在 T 细胞发育中的作用未见报道。本研究结果显示, DN T 细胞、DP T 细胞中 TIPE2 相对表达量显著低于 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞; DN T 细胞中 TIPE2 相对表达量显著低于 DP T 细胞;而 CD4<sup>+</sup> T 细胞与 CD8<sup>+</sup> T 细胞中 TIPE2 的相对表达量无明显差异;这说明,在整个 T 细胞发育和成熟过程中, TIPE2 的表达水平受到严格的动态调控, TIPE2 可能在 T 细胞发育过程中发挥一定的作用。另外,本研究结果显示, WT 和 *Tipe2*<sup>-/-</sup>小鼠外周血、脾脏和淋巴结中 CD4<sup>+</sup> T 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞比较差异无统计学意义,提示 TIPE2 可能在 T 细胞发育环节以外的生物学过程中发挥作用。

TIPE2 不影响 T 细胞的发育,但可能会影响 T 细胞的功能。已有研究证实, TIPE2 在实验性自身免疫性脑脊髓炎、实验性自身免疫性葡萄膜炎、咪喹莫特诱导的银屑病和乙型肝炎病毒的清除中发挥一定的作用,参与调节这些疾病的进程和病理的严重

程度<sup>[7,18-21]</sup>,这与 TIPE2 调节辅助 T 细胞(T helper cells,Th)1、Th17、调节性 T 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞亚群的功能相关,但是还不清楚 TIPE2 是否影响 Th2 亚群的功能。本研究结果显示,哮喘组小鼠肺泡灌洗液 CD4<sup>+</sup> T 细胞中 TIPE2 相对表达量显著低于对照组,而 2 组小鼠肺泡灌洗液 CD8<sup>+</sup> T 细胞中 TIPE2 相对表达量比较差异无统计学意义,提示 TIPE2 可能调节 CD4<sup>+</sup> T 细胞中 Th2 亚群的功能,而在哮喘发生发展过程中 Th2 细胞亚群的异常活化可导致白细胞介素-4、5、13 等细胞因子的异常分泌,从而介导哮喘的进程。

综上所述,在 T 细胞的发育过程中 TIPE2 的表达水平受到严格的调节, TIPE2 不影响 T 细胞的发育过程而影响发育成熟 T 细胞的功能,但其发挥作用的分子机制尤其是如何影响哮喘疾病进程中 Th2 细胞的功能尚不清楚,在后续研究中将从 Th2 亚群的定向分化、活化和定向迁移等方面入手研究 TIPE2 的调节功能。

**参考文献:**

[1] CHAPMAN N M,CHI H. Metabolic adaptation of lymphocytes in immunity and disease[J]. *Immunity*,2022,55(1):14-30.

[2] TUZLAK S,DEJEAN A S,IANNACONE M,*et al.* Repositioning T (H) cell polarization from single cytokines to complex help[J]. *Nat Immunol*,2021,22(10):1210-1217.

[3] ZHENG M,LI D,ZHAO Z,*et al.* Protein phosphatase 2A has an essential role in promoting thymocyte survival during selection[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2019,116(25):12422-12427.

[4] ROTHENBERG E V,MOORE J E,YUI M A. Launching the T-cell-lineage developmental programme [J]. *Nat Rev Immunol*,2008,8(1):9-21.

[5] GOLDSMITH J R,FAYNGERTS S,CHEN Y H. Regulation of inflammation and tumorigenesis by the TIPE family of phospholipid transfer proteins[J]. *Cell Mol Immunol*,2017,14(6):482-487.

[6] SUN H,GONG S,CARMODY R J,*et al.* TIPE2, a negative regulator of innate and adaptive immunity that maintains immune homeostasis[J]. *Cell*,2008,133(3):415-426.

[7] FAYNGERTS S A,WANG Z,ZAMANI A,*et al.* Direction of leukocyte polarization and migration by the phosphoinositide-transfer protein TIPE2[J]. *Nat Immunol*,2017,18(12):1353- 1360.

[8] GUS-BRAUTBAR Y,JOHNSON D,ZHANG L,*et al.* The anti-inflammatory TIPE2 is an inhibitor of the oncogenic ras [J]. *Mol Cell*,2012,45(5):610-618.

[9] YAN D,WANG J,SUN H,*et al.* TIPE2 specifies the functional polarization of myeloid- derived suppressor cells during tumorigenesis [J]. *J Exp Med*,2020,217(2):e20182005.

[10] LOU Y,SONG M,HAN M,*et al.* Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced protein 8-like 2 fosters tumor-associated microbiota to promote the development of colorectal cancer[J]. *Cancer Immunol Res*,2022,10(3):354-367.

[11] 董起杭,万里新,张凯,等. 安罗替尼联合放射治疗对食管鳞状细胞癌细胞增殖、凋亡及放射治疗敏感性的影响[J]. 新乡医学院学报,2022,39(2):106-112.

DONG Q H,WAN L X,ZHANG K,*et al.* Effect of anlotinib combined with radiotherapy on the proliferation,apoptosis and radiotherapy sensitivity of esophageal squamous cell carcinoma cells [J]. *J Xinxiang Med Univ*,2022,39(2):106-112.

[12] ZHANG G,HAO C,LOU Y,*et al.* Tissue-specific expression of TIPE2 provides insights into its function [J]. *Mol Immunol*,2010,47(15):2435-2442.

[13] LOU Y,LIU S. The TIPE (TNFAIP8) family in inflammation, immunity, and cancer[J]. *Mol Immunol*,2011,49(1/2):4-7.

[14] GU Z,CUI X,SUN P,*et al.* Regulatory roles of aumor necrosis factor- $\alpha$ -induced protein 8 like-protein 2 in inflammation, immunity and cancers; a review [J]. *Cancer Manag Res*,2020,12:12735-12746.

[15] WANG D,ZHENG M,LEI L,*et al.* Tspal is involved in late thymocyte development through the regulation of TCR-mediated signaling[J]. *Nat Immunol*,2012,13(6):560-568.

[16] IRLA M. Instructive cues of thymic T cell selection[J]. *Annu Rev Immunol*,2022,40:95-119.

[17] ROBERT P A,KUNZE-SCHUMACHER H,GREIFF V,*et al.* Modeling the dynamics of T-cell development in the thymus[J]. *Entropy (Basel)*,2021,23(4):437.

[18] CUI J,ZHANG N,LIU Y,*et al.* Microarray gene expression profiling provides insights into functions of TIPE2 in HBV-related apoptosis[J]. *Mol Immunol*,2021,131:137-143.

[19] LIU R,HE X,GENG W,*et al.* Loss of TIPE2 has opposing effects on the pathogenesis of autoimmune diseases[J]. *Front Immunol*,2019,10:2284.

[20] ZHAO L L. TIPE2 suppresses progression and tumorigenesis of the oral tongue squamous cell carcinoma by regulating FoxP3 + regulatory T cells[J]. *J Bioenerg Biomembr*,2020,52(4):279-289.

[21] SUN H,LIN M,ZAMANI A,*et al.* The TIPE molecular pilot that directs lymphocyte migration in health and inflammation[J]. *Sci Rep*,2020,10(1):6617.

( 本文编辑:周二强 )