

孕鼠接触葡萄球菌肠毒素 B 对子代新生鼠 TCR V β 8⁺ T 细胞的影响郑庆委¹, 韦莉¹, 高淑娴¹, 徐志本¹, 周平¹, 徐明珠², 陈兰兰², 邵棒², 申林³, 管俊昌¹

[摘要] 目的: 观察孕鼠接触葡萄球菌肠毒素 B (SEB) 对其子代新生鼠胸腺及外周血 TCR V β 8⁺ T 细胞的影响。方法: 在妊娠 16 d 时给予 SD 大鼠尾静脉注射 15 μ g SEB (SEB 组), 同时设立注射磷酸盐缓冲溶液对照组。孕鼠自然分娩后获取出生后 0 ~ 5 d 的子代新生鼠胸腺及外周血, 流式细胞仪检测其 TCR V β 8⁺ T 细胞比例。结果: 与对照组比较, SEB 组出生后 0 ~ 3 d 的新生鼠胸腺中 CD4⁺ V β 8⁺ T 细胞比例均减少 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$), 出生后 4 ~ 5 d 2 组差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 出生后 0 ~ 5 d, SEB 组胸腺中 CD8⁺ V β 8⁺ T 细胞比例均低于对照组 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$); 出生后 0 ~ 5 d, SEB 组 CD4⁺ V β 8⁺ 及 CD8⁺ V β 8⁺ T 细胞的绝对数均较对照组明显减少 ($P < 0.01$)。新生鼠出生后 0 ~ 5 d, SEB 组外周血 CD4⁺ V β 8⁺ T 细胞比例均较对照组明显减少 ($P < 0.01$); CD8⁺ V β 8⁺ T 细胞比例亦均较对照组减少 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$); 出生后 0 ~ 5 d, SEB 组外周血 CD4⁺ V β 8⁺ 及 CD8⁺ V β 8⁺ T 细胞绝对数均较对照组明显减少 ($P < 0.01$)。结论: 妊娠期大鼠接触 SEB 可减少子代新生鼠胸腺及外周血 TCR V β 8⁺ T 细胞, 并保留至成年期。

[关键词] 妊娠并发症; 葡萄球菌肠毒素 B; TCR V β 8⁺ T 细胞; 大鼠

[中图分类号] R 714.25 [文献标志码] A DOI: 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2017.03.001

Effect of maternal SEB administration on the TCR V β 8⁺ T cells of the offspring newborn rats

ZHENG Qing-wei¹, WEI Li¹, GAO Shu-xian¹, XU Zhi-ben¹, ZHOU Ping¹, XU Ming-zhu²,
CHEN Lan-lan², SHAO Bang², SHEN Lin³, GUAN Jun-chang¹

(1. Anhui Key Laboratory of Infection and Immunity, 2. Department of Biological Sciences,
3. Scientific Research Center, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of maternal SEB administration on the TCR V β 8⁺ T cells in the thymus and peripheral blood of offspring newborn rats. **Methods:** Pregnant rats with gestational 16 days were injected with 15 μ g SEB in 0.2 mL PBS by iv (SEB group), and the control group were treated with the same volume of PBS. The thymus and peripheral blood of newborn offspring rats after 0 to 5 days of delivery were harvested, and the levels of TCR V β 8⁺ T cells of whose were analyzed using the flow cytometry. **Results:** Compared with the control group, the percentage of CD4⁺ TCR V β 8⁺ T cells in thymus of offspring newborn rats after 0 to 3 days of delivery significantly decreased in SEB group ($P < 0.05$ to $P < 0.01$), and the difference of which in thymus of offspring newborn rats after 4 to 5 days of delivery between two groups was not statistically significant ($P > 0.05$). In the thymus of offspring newborn rats after 0 to 5 days of delivery, the percentage of CD8⁺ TCR V β 8⁺ T cells in SEB group was significantly lower than that in control group ($P < 0.05$ to $P < 0.01$), and the absolute number of CD4⁺ V β 8⁺ and CD8⁺ V β 8⁺ T cells in SEB group significantly decreased compared with the control group ($P < 0.01$). In the peripheral blood of offspring newborn rats after 0 to 5 days of delivery, the percentages of the CD4⁺ V β 8⁺ and CD8⁺ V β 8⁺ T cells, and the absolute number of CD4⁺ V β 8⁺ and CD8⁺ V β 8⁺ T cells in SEB group significantly decreased compared with the control group ($P < 0.05$ to $P < 0.01$). **Conclusions:** Maternal SEB administration during pregnancy can decrease the levels of TCR V β 8⁺ T cells in the thymus and peripheral blood of offspring newborn rats, and which can continue into adulthood.

[Key words] pregnancy complications; staphylococcal enterotoxin B; TCR V β 8⁺ T cell; rats

[收稿日期] 2016-09-22

[基金项目] 国家自然科学基金 (81571454); 安徽省高校自然科学基金项目重点项目 (KJ2015A211); 安徽省高校自然科学基金项目一般项目 (KJ2015B081by); 安徽省重点实验室 (蚌埠医学院) 开放课题 (BYKL1045ZD); 国家级大学生创新训练项目 (201510367013)

[作者单位] 蚌埠医学院 1. 感染与免疫重点实验室, 2. 生物科学系, 3. 科研中心, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 郑庆委 (1980 -), 男, 硕士, 讲师。

[通信作者] 管俊昌, 博士, 硕士研究生导师, 教授。E-mail: gjc-2003@sohu.com

葡萄球菌肠毒素 B (staphylococcal enterotoxin B, SEB) 是由金黄色葡萄球菌产生的致病物质, 既具有外毒素特性, 又具有强大激活淋巴细胞能力的超抗原特性, 其超抗原特性已成为免疫学家的研究热点^[1-3]。SEB 主要通过与其抗原递呈细胞上的 MHC-II 类分子及 T 细胞的 TCR V β 链交联结合, 导致大量 T 细胞的活化、增殖并释放大量的细胞因子。我们的前期研究^[4-6]表明, 孕鼠静脉给予 SEB 可影响新生鼠胸腺及外周血中 CD4/CD8 T 淋巴细胞亚群

的构成比例,且改变成年子代鼠胸腺及外周血中 TCR V β 8⁺ T 细胞的比例。而关于妊娠期大鼠接触 SEB 对成年子代鼠 TCR V β 8⁺ T 细胞的改变是否在新生鼠时期就已形成,目前国内外尚无报道。本研究对孕鼠静脉注射 SEB,观察其对新生鼠胸腺及外周血中 TCR V β 8⁺ T 细胞的影响,为进一步研究胎源性性疾病奠定基础及为优生优育提供实验依据。现作报道。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 SD 清洁级大鼠,雄性体质量 280 ~ 300 g,雌性 220 ~ 250 g,购于浙江省实验动物中心,许可证号为 SCXK(浙)20080033。

1.2 主要试剂和仪器 SEB(Sigma 公司);荧光标记抗体小鼠抗大 CD4-APC、CD8a-PE(eBioscience 公司)及 TCR V β 8.2/8.4-Alexa Fluor 488(Biolegend 公司);红细胞裂解液(碧云天生物技术有限公司);水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司);流式细胞仪 FACS Calibur(BD 公司);低温离心机(Sigma 公司);超净工作台(上海浦东物理光学仪器厂)。

1.3 实验处理及分组 每天 18:00 点雌雄大鼠以 1:1 合笼,次日晨用无菌棉签蘸取雌性大鼠阴道分泌物进行涂片,查见精子即认为妊娠,并记为妊娠第 1 天,将孕鼠随机分为 SEB 组及磷酸盐缓冲液(PBS)对照组,每组 10 只。在妊娠期第 16 天,SEB 组孕鼠尾静脉注射 0.2 mL 含 15 μ g SEB 的 PBS,对照组给予同等体积的 PBS。待孕鼠自然分娩后,取出生当天(0 d)及出生后 1 ~ 5 d 的新生鼠胸腺和外周血进行检测。

1.4 胸腺单细胞悬液的制备 取新生鼠胸腺放入预冷的 PBS 中洗去红细胞,然后用网搓法制备胸腺单细胞悬液,200 目不锈钢筛网过滤,PBS 洗涤 2 次,1 500 r/min 离心 5 min,即得胸腺的单细胞悬液。

1.5 外周血红细胞的溶解处理 通过断头法获取新生鼠的外周血,并用肝素钠抗凝,加入 2 mL 红细胞裂解液混匀后作用 10 min,1 500 r/min 离心 5 min,并用 PBS 洗涤 2 次,即得去除红细胞的外周血单细胞悬液。

1.6 胸腺及外周血 TCR V β 8⁺ T 细胞的检测 将制备的胸腺及外周血单细胞悬液经 1 500 r/min 离心 5 min,收集细胞并加入小鼠抗大鼠 CD4、CD8 和 TCR V β 8/8.4 荧光抗体,混匀后 4 $^{\circ}$ C 避光染色 30 min,PBS 洗涤 2 次后 2% 多聚甲醛固定,用流式细胞仪测定 TCR V β 8⁺ T 细胞,同时以阴性对照设门,Cellquest 软件获取数据,Win MDI 2.8 软件进行细胞定量分析。

1.7 统计学方法 采用方差分析和 *t*(或 *t'*) 检验。

2 结果

2.1 2 组新生鼠胸腺中 V β 8⁺ T 细胞比较 新生鼠出生后 0 ~ 3 d,SEB 组新生鼠胸腺中的 CD4⁺ V β 8⁺ T 细胞比例均低于对照组 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$);出生后 4 ~ 5 d,2 组的 CD4⁺ V β 8⁺ T 细胞比例差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。新生鼠出生后 0 ~ 5 d,SEB 组胸腺中 CD8⁺ V β 8⁺ T 细胞比例均低于对照组 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$) (见表 1)。组内方差分析显示,2 组 CD4⁺ V β 8⁺ T 细胞比例总体差异有统计学意义,均呈下降趋势 ($P < 0.01$);2 组 CD8⁺ V β 8⁺ T 细胞比例总体差异亦有统计学意义,均呈下降趋势 ($P < 0.01$) (见表 1)。出生后 0 ~ 5 d,SEB 组新生鼠胸腺中 CD4⁺ V β 8⁺ 及 CD8⁺ V β 8⁺ T 细胞绝对计数均较对照组明显减少 ($P < 0.01$) (见表 2)。

2.2 2 组新生鼠外周血 V β 8⁺ T 细胞比较 新生鼠出生后 0 ~ 5 d,SEB 组新生鼠外周血 CD4⁺ V β 8⁺ T 细胞比例均较对照组明显减少 ($P < 0.01$),CD8⁺

表 1 2 组新生鼠胸腺中 TCR V β 8⁺ T 细胞比例 (%) 比较

分组	n	出生后时间/d					F	P	MS _{组内}	
		0	1	2	3	4				5
CD4 ⁺ V β 8 ⁺ T 细胞										
对照组	4	2.53 \pm 0.72	2.32 \pm 0.17	2.57 \pm 0.22	2.50 \pm 0.10	1.50 \pm 0.27	1.41 \pm 0.09	0.114 5	10.08	<0.01
SEB 组	4	1.19 \pm 0.44	1.47 \pm 0.30	2.05 \pm 0.19	2.01 \pm 0.29	1.29 \pm 0.30	1.29 \pm 0.12	0.084 7	6.92	<0.01
<i>t</i>	—	3.18	4.93	3.58	3.19	1.04	1.60	—	—	—
<i>P</i>	—	<0.05	<0.01	<0.05	<0.05	>0.05	>0.05	—	—	—
CD8 ⁺ V β 8 ⁺ T 细胞										
对照组	4	4.01 \pm 0.52	4.57 \pm 0.14	4.98 \pm 0.42	3.57 \pm 0.28	2.51 \pm 0.61	2.33 \pm 0.26	0.164 1	28.24	<0.01
SEB 组	4	3.09 \pm 0.34	3.25 \pm 0.34	3.51 \pm 0.78	2.56 \pm 0.33	1.50 \pm 0.18	1.55 \pm 0.24	0.173 1	17.57	<0.01
<i>t</i>	—	2.96	7.18	3.32	4.67	3.18	4.41	—	—	—
<i>P</i>	—	<0.05	<0.01	<0.05	<0.01	<0.05	<0.01	—	—	—

$V\beta 8^+$ T 细胞比例亦均较对照组减少 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$) (见表 3)。组内方差分析显示, 2 组 $CD4^+ V\beta 8^+$ T 细胞比例总体差异有统计学意义, 均呈增高趋势 ($P < 0.01$); 2 组 $CD8^+ V\beta 8^+$ T 细胞比

例总体差异亦有统计学意义, 均呈先上升后下降趋势 ($P < 0.01$)。出生后 0 ~ 5 d, SEB 组外周血 $CD4^+ V\beta 8^+$ 及 $CD8^+ V\beta 8^+$ T 细胞绝对数均较对照组明显减少 ($P < 0.01$) (见表 4)。

表 2 2 组新生鼠胸腺中 TCR $V\beta 8^+$ T 细胞绝对数 ($\times 10^4$) 比较

分组	n	出生后时间/d					
		0	1	2	3	4	5
$CD4^+ V\beta 8^+$ T 细胞							
对照组	4	7.63 ± 0.63	13.96 ± 0.59	22.04 ± 0.41	28.58 ± 2.72	23.88 ± 0.89	11.91 ± 0.23
SEB 组	4	2.85 ± 0.11	6.51 ± 0.29	13.01 ± 0.43	13.00 ± 0.48	15.57 ± 0.83	8.67 ± 0.30
t	—	14.95#	22.66	30.40	11.28#	13.66	17.14
P	—	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
$CD8^+ V\beta 8^+$ T 细胞							
对照组	4	12.07 ± 1.00	27.52 ± 1.16	42.72 ± 0.79	40.77 ± 3.89	39.84 ± 1.49	19.72 ± 0.39
SEB 组	4	7.42 ± 0.29	14.39 ± 0.65	22.29 ± 0.73	16.55 ± 0.62	18.03 ± 0.96	10.45 ± 0.36
t	—	8.93	19.75	37.99	12.30#	24.61	34.93
P	—	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

#示 t' 值

表 3 2 组新生鼠外周血 TCR $V\beta 8^+$ T 细胞比例 (%) 比较

分组	n	出生后时间/d						F	P	MS _{组内}
		0	1	2	3	4	5			
$CD4^+ V\beta 8^+$ T 细胞										
对照组	4	4.60 ± 0.73	4.13 ± 0.36	4.10 ± 0.43	6.17 ± 0.36	5.73 ± 0.38	5.66 ± 0.33	15.76	<0.01	0.205 1
SEB 组	4	2.17 ± 0.70	2.58 ± 0.82	2.99 ± 0.23	4.13 ± 0.33	4.00 ± 0.53	4.49 ± 0.26	12.72	<0.01	0.278 8
t	—	4.81	3.46	4.55	8.35	5.31	5.57	—	—	—
P	—	<0.01	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	—	—	—
$CD8^+ V\beta 8^+$ T 细胞										
对照组	4	3.71 ± 0.36	4.92 ± 0.25	4.57 ± 0.27	4.72 ± 0.15	4.18 ± 0.20	3.33 ± 0.55	14.59	<0.01	0.105 0
SEB 组	4	2.61 ± 0.28	4.13 ± 0.15	3.65 ± 0.52	3.62 ± 0.38	2.85 ± 0.35	1.88 ± 0.22	23.92	<0.01	0.114 4
t	—	4.82	5.42	3.14	5.39	6.60	4.90	—	—	—
P	—	<0.01	<0.01	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01	—	—	—

表 4 2 组新生鼠外周血中 TCR $V\beta 8^+$ T 细胞绝对数 ($\times 10^2$) 比较

分组	n	出生后时间/d						F	P	MS _{组内}
		0	1	2	3	4	5			
$CD4^+ V\beta 8^+$ T 细胞										
对照组	4	8.82 ± 0.72	16.36 ± 1.04	18.63 ± 0.69	61.60 ± 2.44	25.53 ± 1.47	22.99 ± 0.91	748.54	<0.01	1.84
SEB 组	4	3.68 ± 0.22	8.98 ± 0.81	10.11 ± 0.57	27.69 ± 0.79	11.96 ± 0.93	8.04 ± 0.40	615.37	<0.01	0.45
t	—	13.65	11.20	19.04	26.44	15.60	30.08	—	—	—
P	—	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	—	—	—
$CD8^+ V\beta 8^+$ T 细胞										
对照组	4	7.12 ± 0.58	19.49 ± 1.24	20.77 ± 0.77	47.11 ± 1.87	18.63 ± 1.07	13.52 ± 0.53	609.43	<0.01	1.23
SEB 组	4	4.41 ± 0.27	14.36 ± 1.45	12.34 ± 0.69	24.25 ± 0.69	8.51 ± 0.66	3.37 ± 0.17	395.85	<0.01	0.60
t	—	8.47	5.38	16.31	22.94	16.10	36.47	—	—	—
P	—	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	—	—	—

3 讨论

超抗原 SEB 可直接与抗原递呈细胞上的 MHC II 类分子和 T 细胞上的 TCR $\text{V}\beta$ 链 (包括 $\text{V}\beta 3$ 、 $\text{V}\beta 6$ 、 $\text{V}\beta 7$ 、 $\text{V}\beta 8$ 等) 结合,从而激活大约 20% 的 T 细胞,而在啮齿类主要是作用于 TCR $\text{V}\beta 8$ 链^[7],故本实验选择 TCR $\text{V}\beta 8$ T 细胞作为研究对象。我们的前期研究^[6]已表明,孕鼠静脉注射 SEB 可改变成年子代大鼠胸腺及外周血中 TCR $\text{V}\beta 8^+$ T 细胞的比例。本研究结果显示,妊娠期母鼠静脉注射 SEB 可明显减少出生后 0~3 d 新生鼠胸腺中 $\text{CD}4^+ \text{V}\beta 8^+$ T 细胞的比例及出生后 0~5 d 胸腺中 $\text{CD}8^+ \text{V}\beta 8^+$ T 细胞的比例,且外周血中 $\text{CD}4^+ \text{V}\beta 8^+$ T 细胞及 $\text{CD}8^+ \text{V}\beta 8^+$ T 细胞的比例也表现出相似变化。这一研究结果在国内外尚为首次报道,提示孕鼠给予 SEB 可对子代新生鼠中枢免疫器官(胸腺)和外周血中的 TCR $\text{V}\beta 8^+$ T 细胞产生影响。中枢和外周的 TCR $\text{V}\beta 8^+$ T 细胞的变化趋势一致,这可能是因为 SEB 引起中枢免疫器官胸腺中 TCR $\text{V}\beta 8^+$ T 细胞的克隆清除^[8],导致中枢免疫器官中产生的 TCR $\text{V}\beta 8^+$ T 细胞比例降低,进而释放至外周的 TCR $\text{V}\beta 8^+$ T 细胞也相应减少,也有可能是因为 SEB 直接导致外周 TCR $\text{V}\beta 8^+$ T 细胞的克隆凋亡或无能^[2]所致。据卫生部新近统计,我国每年出生婴儿约 1 600 万,出生缺陷率约为 4%~6% (即每年出生缺陷儿近百万),而这些数据仅显示了可见畸形的出生缺陷。胎儿在宫内不良环境和母体异常因素影响下,原本正常发育的胚胎可在整体、器官、细胞、分子等水平发生一系列改变,这种改变有的并未造成解剖学上“可视性”的形态畸形,但会为出生后个体的健康问题埋下隐患,这即为目前医学研究领域极为关注的“健康与疾病的发育起源”(developmental origins of health and disease, DOHaD)^[9-10]。金黄色葡萄球菌是引起临床感染的一种常见病原体,尤其是垂直感染已引起妇产科工作者的广泛关注^[11-12]。SEB 是金黄色葡萄球菌的主要致病物质之一,妊娠期大鼠静脉注射 SEB 可改变成年子代大鼠胸腺及外周血中 TCR $\text{V}\beta 8^+$ T 细胞的比例^[6],本研究亦发现妊娠期大鼠接触 SEB 对新生鼠时期 TCR $\text{V}\beta 8^+$ T

细胞的比例也有类似的影响。说明妊娠期接触 SEB 种下的“病根”在新生鼠时期已形成并保留至成年期,成为胎源性疾病的起源,为我们进一步研究 SEB 与一些免疫性疾病的关系奠定了基础,也为预防妊娠期感染及优生优育提供了实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] WATSON AR, JANIK DK, LEE WT. Superantigen-induced CD4 memory T cell anergy. I. Staphylococcal enterotoxin B induces Fyn-mediated negative signaling [J]. *Cell Immunol*, 2012, 276 (1/2):16.
- [2] RELLAHAN BL, JONES LA, KRUISBEEK AM, *et al.* *In vivo* induction of anergy in peripheral $\text{V}\beta 8^+$ T cells by staphylococcal enterotoxin B [J]. *J Exp Med*, 1990, 172 (4): 1091.
- [3] LIU T, LIANG X, LI TL, *et al.* Staphylococcal enterotoxin B compromises the immune tolerant status in the airway mucosa [J]. *Clin Exp Allergy*, 2012, 42(3):375.
- [4] ZHANG T, YU FL, YANG WX, *et al.* Staphylococcal enterotoxin B administration during pregnancy imprints the increased CD4: CD8 T-cell ratio in the peripheral blood from neonatal to adult offspring rats [J]. *J Med Microbiol*, 2015, 64(1):1.
- [5] 刘从森,刘婷婷,孔晓明,等. 妊娠母鼠静脉注射葡萄球菌肠毒素 B 对胎鼠胸腺发育的影响 [J]. *蚌埠医学院学报*, 2011, 36(6):545.
- [6] 管俊昌,刘勇,孔晓明,等. 妊娠期母鼠给予葡萄球菌肠毒素 B 对成年子代 TCR $\text{V}\beta 8^+$ T 细胞的影响 [J]. *南方医科大学学报*, 2012, 32(9):1230.
- [7] PULLEN AM, MARRACK P, KAPPLER JW. The T-cell repertoire is heavily influenced by tolerance to polymorphic self-antigens [J]. *Nature*, 1988, 335(6193):796.
- [8] KAPPLER JW, ROEHM N, MARRACK P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus [J]. *Cell*, 1987, 49(2):273.
- [9] MARTÍNEZ JA, CORDERO P, CAMPIÓN J, *et al.* Interplay of early-life nutritional programming on obesity, inflammation and epigenetic outcomes [J]. *Proc Nutr Soc*, 2012, 71(2):276.
- [10] PALMER AC. Nutritionally mediated programming of the developing immune system [J]. *Adv Nutr*, 2011, 2(5):377.
- [11] MÉNDEZ S, AGULLA A, LUACES J. Vertical transmission of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Enferm Infect Microbiol Clin*, 2011, 29(1):75.
- [12] ANDREWS WW, SCHELONKA R, WAITES K, *et al.* Genital tract methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; risk of vertical transmission in pregnant women [J]. *Obstet Gynecol*, 2008, 111 (1):113.

(本文编辑 卢玉清)