

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

維生素 E 調控弓蟲抗原誘發之細胞免疫反應

Vitamin E Modulates Cell-Mediated Immunity Induced by Toxoplasma gondii Antigens

計畫編號：NSC 88/-2313-B-002-073

執行期限：87 年 8 月 1 日至 88 年 7 月 31 日

主持人：林大盛 執行機構及單位名稱：臺大獸醫系

一、中文摘要

細胞免疫在弓蟲感染控制上很重要，常藉 T 細胞分泌各種 cytokines 進行。一般而言，Th1 cytokines 有抑制弓蟲效果，而 Th2 cytokines 卻促使疾病嚴重化。維生素 E 為一主要的脂溶性細胞膜抗氧化物，可保護細胞免受自由基之破壞。另外，維生素 E 亦可為免疫調控物質，對維持正常的免疫功能很重要。維生素 E 對於培養的淋巴球有保護與刺激作用，但原因並非是單純的由於減低細胞膜之 lipid peroxidation。同時，維生素 E 可促使 IL-2 及 IFN- γ 之產生，為 Th1 型免疫反應之一種 immunomodulator。T 細胞產生 Th1 型 cytokines，已知是受了巨噬細胞分泌之 IL-12 所影響。目前的研究顯示，維生素 E 對維持與促進巨噬細胞功能很重要，如增進吞噬作用，與 IL-1 之分泌。另外，以維生素 E 處理過之巨噬細胞，可增進淋巴球對 mitogens 之反應。由於弓蟲保護性免疫以 Th1 型的細胞免疫反應為主，而維生素 E 作用於免疫細胞之機制除了抗氧化之一般性功能外，亦有助提升 Th1 型反應。由此推知，維生素 E 在弓蟲抗原刺激宿主免疫反應之調控上，應佔有相當重要的角色。然而，目前有關這方面的報告卻缺如。所以若能了解維生素 E 如何調控抗原誘發之細胞免疫反應 (特別是 Th1 型反應)，則將有助發展維生素 E 成為一良好的免疫注射用佐劑。

關鍵詞：維生素 E，免疫調控，細胞免疫，細胞素，弓蟲

Abstract

Cell-mediated immunity (CMI) is important in controlling Toxoplasma gondii infection frequently through the release of cytokines by T cells. In general, Th1 cytokines inhibit T. gondii proliferation and Th2 cytokines promote severity of the disease. Vitamin E (VE) is the major lipid soluble membrane antioxidant which protects the cell from the damage by free radicals. VE can act as an immunomodulator which is essential in maintaining normal immunological activity; also, VE can influence intracellular activity, though these mechanisms are not clear. VE can protect and stimulate cultured lymphocytes and this is not simply due to decrease of membrane lipid peroxidation. Also, VE is a Th1-response modulator by inducing IL-2 and IFN- γ production. The production of Th1 cytokines by T cells has been known to be affected by IL-12 from macrophages. Current studies have shown that VE is important for maintaining and enhancing macrophage activity by promoting phagocytosis and IL-1 secretion. In addition, VE-treated macrophages enhance lymphocyte response to mitogens. Because Th1-type CMI is the major protective immunity against T. gondii, and because VE promotes Th1 response in addition to its antioxidant function on immune cells, VE should play a significant role in the modulation of immune response stimulated by T. gondii antigens. However, so far no report concerning this matter has been published. Therefore, understanding the effects of VE on

modulation of antigen-induced CMI (especially Th 1 response), will help develop VE as an excellent adjuvant for immunization.

Keywords: vitamin E, immunomodulation, cell-mediated immunity, cytokines, Toxoplasma gondii

二、緣由與目的

維生素 E 為一主要的脂溶性細胞膜抗氧化物，可保護細胞免受自由基之破壞 (Packer, 1991)。因此，維生素 E 對維持正常的細胞形態、構造、與細胞內活性很重要 (Wang et al., 1996; Kuo et al., 1997)。例如，對於因運動造成的 oxidative stress 及 lipid peroxidation，維生素 E 具有保護細胞效果 (Meydani et al., 1992)。除了抗氧化功能外，維生素 E 亦可為免疫調控物質 (immunomodulator)，對維持正常的免疫功能很重要 (Meydani et al., 1990; Oonishi et al., 1995; Traber & Packer, 1995)。維生素 E 對於 in vitro 培養的淋巴球有保護與刺激作用，但原因並非是單純的由於維生素 E 減低細胞膜之 lipid peroxidation (Calder & Newsholme, 1993; Tu et al., 1995)。Patterson 等人以 malondialdehyde 促使淋巴球細胞膜之 lipid peroxidation 產生，卻發現不會影響細胞活性 (Patterson et al., 1988)。而維生素 E 不論是還原或是氧化形態，皆對 in vitro 培養的淋巴球具有刺激作用 (Corwin & Shloss, 1980)。

維生素 E 有抗老化之作用，因為維生素 E 可為 Th1 型免疫反應之一種 immunomodulator。一般說來，哺乳類及人類之免疫反應，出生之後以產生 interleukin (IL)-4，IL-10 及 IgG1 antibody 之 Th2 型反應為主；到青壯年時以產生 IL-2，interferon gamma (IFN- γ) 及 IgG2a antibody 之 Th1 型反應為主。筆者亦曾發現，貓由 19 週齡步入 20 週齡時，其受 calcium ionophore A23187/phorbol myristate acetate 刺激之淋巴球，所釋放之 IL-2 有顯著上升 (Lin, 1992)。而至年老時又以 Th2 型反應為主 (Pahlavani & Richardson, 1996; Lesourd, 1997; Shearer, 1997)。由於 Th1 型反應和細

胞免疫 (cell-mediated immunity, CMI) 有密切關係；所以，年老時 CMI 減弱，到最後連須要 T 細胞幫忙的抗體產生也會受影響，導致對疾病抵抗力顯著降低 (Lesourd, 1997)。由於維生素 E 可促使 IL-2 之產生，並可提高 concanavalin A 刺激 T 淋巴球之作用 (Meydani et al., 1990; Sakai & Moriguchi, 1997)；同時也促進 IFN- γ 之釋放 (Moriguchi et al., 1990)。因而維生素 E 有助年老者免疫反應趨向 Th1 型反應。這些例子皆不能單純的以維生素 E 之抗氧化功能解釋。

一般說來，細胞內寄生之病原，細胞免疫保護機制遠比抗體有效；因抗體只能對付細胞外游離之病原，且抗體要有足夠的力價及和病原作用時間。因此，CMI 在弓蟲防治研究上很重要 (Gazzinelli et al., 1991)。事實上，CMI 之作用，常藉 T 細胞分泌各種 cytokines 進行。T-cell cytokines 有兩大類，一為 Th1 cytokines 如 IL-2, tumor necrosis factor alpha (TNF- α) 及 IFN- γ ；一為 Th2 cytokines 如 IL-4, IL-5, IL-6 及 IL-10；二者互相拮抗 (Carter & Dutton, 1996)。一般而言，Th1 cytokines 有抑制弓蟲感染效果，而 Th2 cytokines 卻促使疾病嚴重化 (Subauste & Remington, 1993)。

證據指出，弓蟲保護性免疫以 Th1 型的細胞免疫反應為主，而維生素 E 作用於免疫細胞之機制除了抗氧化之一般性功能外，亦有助提升 Th1 型反應。由此推知，維生素 E 在弓蟲抗原刺激宿主免疫反應之調控上，應佔有相當重要的角色。然而，目前有關這方面的報告卻缺如。所以若能了解維生素 E 如何調控抗原誘發之細胞免疫反應 (特別是 Th1 型反應)，以及對免疫細胞之形態與其細胞內活性之影響，則維生素 E 將可能進一步發展成為一良好的免疫注射用佐劑。

三、結果與討論

使用 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 法來衡量細胞被刺激進而活化、分裂的程度。MTT 是種 tetrazolium salt，活細胞的粒線體可將 MTT 轉變成紫色結晶，4 小時後加

入 sodium dodecyl sulfate 及 HCl 之 solvent 以溶解紫色結晶，置於 37°C incubator。隔日以 ELISA reader (wavelength: 570 nm/690 nm) 讀其 absorbance (optical density) 值。活細胞的數目和液體顏色強度成正比關係。另外，RPMI-1640 medium 中常添加 2-mercaptoethanol 與 phenol red (為 pH indicator)。然而，2-mercaptoethanol 可刺激淋巴細胞，雖然不是很強，但可能干擾維生素 E 刺激淋巴球的結果判讀，故在調配 RPMI-1640 medium 時不加 2-mercaptoethanol。由於 phenol red 有顏色，可使 background 之 absorbance O.D. 值增加，然若扣除 background 值，則是否有 phenol red 並不影響結果。此外，維生素 E 亦可將 MTT 轉變成紫色結晶，但亦可以扣除 background 值法減少維生素 E 對結果的影響。維生素 E 溶在 1% ethanol 成 5 μ M 在有 mitogens (PHA, ConA, PWM, LPS) 存在下對 spleen cells (2.5 x 10⁵/well) 刺激效果比只有 mitogen 好。1% ethanol 不會對細胞構成傷害。是否有 adherent cells (80% 為 macrophages) 並不影響結果。以 fetal calf serum 溶解維生素 E 的效果並不好。維生素 E 本身對細胞的直接刺激效果並不顯著。

進一步想了解在有無維生素 E 的情形下，以 ELISPOT 法偵測細胞受 mitogens 的刺激是否會影響 Th1 cytokine 及 Th2 cytokine 分泌細胞的增殖。使用孔內有 nitrocellulose base 之 96 孔盤 (Mililitter HA; Millipore)。加入 50 μ l 之抗 Th1-cytokine (IL-2) 或抗 Th2-cytokine (IL-4) 之 monoclonal antibody [10 μ g/ml in phosphate- buffered saline (PBS), pH 7.4], 4°C, overnight。以無菌 PBS 洗二次，加入 200 μ l 含有 fetal calf serum 之 RPMI 1640 culture medium，置於室溫 1 hr 之後，然後加入待測之細胞 (1 x 10⁵/100 μ l/well)。培養 20 hr 後，以含有 0.05% Tween 20 之 PBS 洗二次，然後加入 50 μ l 連有 biotin 之抗 IL-2 或 IL-4 cytokines 之 monoclonal antibodies 培養 37°C, 90 分後，再洗四次，然後加入 poly-horse radish peroxidase conjugated avidin。培養 37°C, 90 分後，洗

四次，最後加入 substrate (4mg 3-amino-9-ethyl carbazole + 1ml dimethylformamide + 14ml acetic buffer, pH 5)。若細胞有 cytokines 分泌，則有呈色反應。用水沖洗以中止反應，乾燥後，以解剖顯微鏡計算呈色點數 (此即 cytokines 分泌細胞數目)。結果發現，在同時有維生素 E 與 ConA 的刺激下，平均 IL-2 反應點數為只有 ConA 組之 1.8 倍；而平均 IL-4 反應點數為只有 ConA 組之 1.3 倍。

以冰凍過死的弓蟲蟲體和其 excretory/secretory 抗原之混合 (約 10⁷-10⁸ 弓虫量) 加上完全佐劑腹腔注射免疫小鼠。二週後，再以同樣抗原加上不完全佐劑腹腔補強注射。對照組以同樣的佐劑注射，但混合 PBS。第三週，以無菌操作法取出 spleen 作成單一細胞懸浮液。以弓蟲抗原或維生素 E 加弓蟲抗原刺激細胞。培養於 CO₂ incubator, 37°C, 計 6 天，然後以 MTT 法測之。結果發現，維生素 E 加弓蟲抗原組的反應顯著的比抗原組好。在同時有維生素 E 與抗原的刺激下，平均 IL-2 反應點數為只有抗原組之 1.5 倍；而平均 IL-4 反應點數為只有抗原組之 1.2 倍。

總結：雖然維生素 E 本身對細胞的直接刺激效果並不顯著。維生素 E 在有 mitogens 或抗原存在下對 spleen cells 刺激效果比只有 mitogen 或抗原好。同時，維生素 E 有助於受刺激細胞 Th1 及 Th2 型之反應，但前者效果比後者好。

四、計畫結果自評

既然維生素 E 有助於受刺激細胞 Th1 型之反應，而細胞內感染之保護性免疫以 Th1 型的細胞免疫反應為主，所以以維生素 E 為免疫注射用佐劑將特別有助於細胞內感染之控制。

五、參考文獻

Calder, P.C. & E.A. Newsholme. 1993. Influence of antioxidant vitamins on fatty acid inhibition of lymphocyte proliferation. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 29:175-183.

- Carter L.L. & R.W. Dutton. 1996. Type 1 and Type 2: a functional dichotomy for all T-cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* 8:336-342.
- Corwin L.M. & J. Shloss. 1980. Role of antioxidants on the stimulation of the mitogenic response. *J. Nutr.* 110:2497-2505.
- Gazzinelli R.T., F.T. Hakim, S. Hieny, G.M. Shearer & A. Sher. 1991. Synergistic role of CD4 and CD8 T lymphocytes in IFN- γ production and protective immunity induced by an attenuated Toxoplasma gondii vaccine. *J. Immunol.* 146:286-292.
- Kuo J.H., H.W. Chen, R.G. Chou & C.K. Lii. 1997. Vitamin E protection of cell morphology under oxidative stress is related to cytoskeletal proteins in rat hepatocytes. *Arch. Toxicol.* 71:231-237.
- Lesourd B.M. 1997. Nutrition and immunity in the elderly: modification of immune responses with nutritional treatments. *Am. J. Clin. Nutr.* 66:478S-484S.
- Lin D.-S. 1992. Change in interleukin 2 production by lymphocytes during maturation of young cats. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 15:301-304.
- Meydani, S.N., M.P. Barklund, S. Liu, M. Meydani, R.A. Miller, J.G. Cannon, F.D. Morrow, R. Rocklin & J.B. Blumberg. 1990. Vitamin E supplementation enhances cell-mediated immunity in healthy elderly subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 52:557-563.
- Meydani, M., W. Evans, G. Handelman, R.A. Fielding, S.N. Meydani, M.A. Fiatarone, J.B. Blumberg & J.G. Cannon. 1992. Antioxidant response to exercise-induced oxidative stress and protection by vitamin E. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 669:363-364.
- Moriguchi, S., N. Kobayashi & Y. Kishino. 1990. High dietary intakes of vitamin E and cellular immune functions in rats. *J. Nutr.* 120:1096-1102.
- Oonishi, K., S. Moriguchi & Y. Kishino. 1995. The role of macrophages in increased mitogen response of rat splenic lymphocytes following in vitro incubation with vitamin E. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 41:445-453.
- Packer L. 1991. Protective role of vitamin E in biological system. *Am. J. Clin. Nutr.* 53:1050S-1055S.
- Pahlavani, M.A. & A. Richardson. 1996. The effect of age on the expression of interleukin-2. *Mech. Ageing Dev.* 89:125-154.
- Patterson, D.A., R. Rapoport, M.A.K. Patterson, B.M. Freed & N. Lempert. 1988. Hydrogen peroxide-mediated inhibition of T-cell response to mitogens is a result of direct action on T cells. *Arch. Surg.* 123:300-304.
- Sakai, S. & S. Moriguchi. 1997. Long-term feeding of high vitamin E diet improves the decreased mitogen response of rat splenic lymphocytes with aging. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 43:113-22.
- Shearer G.M. 1997. Th1/Th2 changes in aging. *Mech. Ageing Dev.* 94:1-5.
- Subauste C.S. & J.S. Remington. 1993. Immunity to Toxoplasma gondii. *Curr. Opin. Immunol.* 5:532-537.
- Traber M.G. & L. Packer. 1995. Vitamin E: beyond antioxidant function. *Am. J. Clin. Nutr.* 62(6 Suppl):1501S-1509S.
- Tu K.Y., R. Matthews & K.S. Matthews. 1995. Protective effect of vitamin E on lymphocyte growth capacity during incubation in vitro. *Mech. Ageing Dev.* 82:129-148.
- Wang S.T., J.H. Kuo, R.G. Chou & C.K. Lii. 1996. Vitamin E protection of cell morphology and protein thiols in rat hepatocytes treated with tert-butyl hydroperoxide. *Toxicol. Letters.* 89:91-98.