

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00471

## 肺炎链球菌 3 型多糖对支气管哮喘小鼠气道炎症及 Treg/Th17 细胞的影响

周丽蓉, 张 劫, 罗永艾\*

重庆医科大学附属第一医院呼吸科, 重庆 400016

**[摘要]** **目的** 观察肺炎链球菌 3 型多糖(T3P)对支气管哮喘小鼠气道炎症以及 Treg/Th17 细胞的影响,探讨 T3P 对哮喘小鼠的免疫调节作用。**方法** BALB/c 小鼠随机分成对照组、哮喘组和 T3P 组,每组 8 只。哮喘组以卵清蛋白(OVA)致敏、气道激发建立哮喘模型,对照组以 PBS 代替,T3P 组在 OVA 致敏前皮下注射 T3P 进行干预。观察小鼠肺组织病理改变,对支气管肺泡灌洗液(BALF)进行细胞计数及分类,ELISA 法检测血清 OVA 特异性 IgE(OVA-IgE)以及 BALF 中白介素 4(IL-4)、干扰素  $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )、IL-10、IL-17 浓度,实时荧光定量 PCR 法检测肺组织中转录因子 *Foxp3* 和 *ROR $\gamma$ t* mRNA 表达水平,流式细胞术检测 Treg 和 Th17 细胞占 CD4<sup>+</sup> 细胞百分比。**结果** T3P 组小鼠肺组织炎症反应程度弱于哮喘组,血清 OVA-IgE、BALF 中细胞总数、嗜酸粒细胞比例以及 IL-4、IL-17 浓度均低于哮喘组( $P < 0.05$ ),IFN- $\gamma$ 、IL-10 浓度高于哮喘组( $P < 0.05$ ),小鼠肺组织 *Foxp3* mRNA 表达水平及 Treg 占 CD4<sup>+</sup> 细胞百分比均高于哮喘组( $P < 0.05$ ),*ROR $\gamma$ t* mRNA 表达水平和 Th17 细胞占 CD4<sup>+</sup> 细胞百分比均低于哮喘组( $P < 0.05$ )。哮喘组和 T3P 组小鼠肺组织 *Foxp3*-mRNA/*ROR $\gamma$ t*-mRNA 比值及 Treg/Th17 细胞比例与 BALF 中嗜酸粒细胞数量呈负相关。**结论** T3P 可以通过抑制过敏原特异性 IgE 表达调节 Th1/Th2、Treg/Th17 细胞平衡,抑制气道炎症。

**[关键词]** 3 型多糖;哮喘;调节性 T 淋巴细胞;Th17 细胞;炎症

**[中图分类号]** R 563.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)05-0471-06

### Effects of type-3-polysaccharide on airway inflammation and Treg/Th17 cells in bronchial asthmatic mice

ZHOU Li-rong, ZHANG Jie, LUO Yong-ai\*

Department of Respiratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of type-3-polysaccharide (T3P) on airway inflammation and Treg/Th17 cells in bronchial asthmatic mice, so as to explore the immunoregulation mechanism of T3P in asthmatic mice. **Methods** BALB/c mice were randomly divided into 3 groups, with 8 mice in each group. The control group received PBS treatment, the asthma group were sensitized and challenged with ovalbumin(OVA), and the T3P group received a pretreatment with T3P by subcutaneous injection before sensitization with OVA. The pulmonary histological changes were observed and differential cell counts in bronchoalveolar lavage fluid(BALF) were performed. Serum OVA-IgE and IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17 and IL-10 levels in the BALF were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The levels of *Foxp3* and *ROR $\gamma$ t* mRNA expression were measured by real-time fluorescence-based quantitative PCR. The proportions of Treg and Th17 cells in CD4<sup>+</sup> cells were assessed by flow cytometric analysis. **Results** The inflammatory degree of pulmonary tissue, serum OVA-IgE, and total cell number, proportion of eosinophils, and IL-4, IL-17 levels in BALF were significantly lower in T3P group than in the asthma group ( $P < 0.05$ ). The BALF levels of IFN- $\gamma$  and IL-10, *Foxp3* mRNA expression and proportion of Treg cells among CD4<sup>+</sup> cells were significantly higher in the T3P group than in the asthma group ( $P < 0.05$ ), while *ROR $\gamma$ t* mRNA expression and the proportion of Th17 cells among CD4<sup>+</sup> cells were significantly lower than in the asthma group ( $P < 0.05$ ). The count of BALF eosinophils was negatively correlated with the ratios of *Foxp3*-mRNA/*ROR $\gamma$ t*-mRNA and Treg/Th17 in asthma and T3P groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** T3P may inhibit airway inflammation by inhibiting OVA-IgE and regulating Th1/Th2 and Treg/Th17 cell balance in asthmatic mouse model.

**[Key words]** type-3-polysaccharide; asthma; regulatory T-lymphocytes; Th17 cells; inflammation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(5): 471-476]

**[收稿日期]** 2013-01-14 **[接受日期]** 2013-04-09

**[作者简介]** 周丽蓉, 博士生. E-mail: zhoulirong1020@163.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 023-89012605, E-mail: luoyongai1942@163.com

支气管哮喘是一种慢性气道炎症,越来越多的证据表明免疫功能紊乱在哮喘发生发展中起着重要作用。近年的研究表明,初始 CD4<sup>+</sup>T 细胞在不同的细胞因子及环境作用下可分化为 Th1、Th2、Th17 及调节性 T(Treg)细胞。Treg 细胞具有免疫抑制功能,在维持机体内环境的稳定、诱导免疫耐受方面发挥重要作用<sup>[1]</sup>;Th17 细胞主要通过分泌白介素 17(IL-17)诱导多种炎症因子及趋化因子,参与炎症反应和自身免疫反应<sup>[2]</sup>。Treg 细胞与 Th17 细胞在分化和功能上相互抑制,Treg/Th17 细胞轴和(或)功能缺陷导致的免疫平衡紊乱可能诱导哮喘等免疫性疾病的发生<sup>[3-4]</sup>。

研究发现,肺炎链球菌感染可能使哮喘患者受益,减少哮喘发作的频率,缓解患者发病的程度<sup>[5-6]</sup>。用灭活的肺炎链球菌免疫动物,能够减轻气道嗜酸粒细胞炎症和气道高反应性<sup>[7]</sup>。然而究竟是肺炎链球菌的何种抗原在抑制气道炎症中起关键作用,目前尚不清楚。本研究选取肺炎链球菌主要免疫原之一的 3 型多糖(T3P)抗原,观察其对支气管哮喘小鼠气道炎症以及 Th1/Th2、Treg/Th17 细胞应答状态的影响,探讨 T3P 对哮喘的免疫调节作用。

## 1 材料和方法

1.1 实验动物 SPF 级 BALB/c 小鼠,雌性,6~8 周龄,体质量(18±2)g,购自重庆医科大学动物中心,随机分成 3 组,每组 8 只,分别为对照组、哮喘组和 T3P 组。

1.2 主要试剂 T3P 购自丹麦 SSI 公司,鸡卵清蛋白(OVA,grade V)购自美国 Sigma 公司,氢氧化铝凝胶购自美国 Thermo 公司,TRIzol 购自美国 Gibco 公司;荧光素标记的抗小鼠抗体[藻红蛋白(PE)标记的 CD25 和 IL-17A,异硫氰酸荧光素(FITC)标记的 CD4,PE-CY5 标记的叉头状转录因子 p3(Foxp3)],固定/破膜剂、蛋白转运抑制剂复合物均购自美国 eBioscience 公司;Rever Tre Ace-a-反转录试剂盒为 ToYoBo 公司产品;干扰素  $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )、IL-4、IL-17、IL-10 以及 OVA 特异性 IgE(OVA-IgE)的 ELISA 试剂盒为美国 Assay Biotech 公司产品。

1.3 哮喘模型的构建及 T3P 免疫 实验第 0、7、14 天分别予以小鼠腹腔注射进行致敏,哮喘组和 T3P 组每次给予 100  $\mu$ g OVA + 100  $\mu$ L 磷酸盐缓冲液(PBS)+100  $\mu$ L 氢氧化铝混悬液,对照组给予 100  $\mu$ L PBS+100  $\mu$ L 氢氧化铝混悬液。实验第 21~27 天连续 7 d 雾化进行激发,哮喘组和 T3P 组给予 1  $\mu$ g/ $\mu$ L

OVA-PBS,1 次/d,每次 30 min,对照组用 PBS 代替。T3P 组小鼠在 OVA 致敏前 15 天、前 8 天、前 1 天分别予以颈背部皮下注射 20  $\mu$ g T3P 进行免疫干预。

1.4 支气管肺泡灌液(BALF)的细胞计数、分类以及血清和 BALF 中细胞因子的检测 末次激发 48 h 后,摘眼球取血,断颈处死。小鼠仰卧位固定,暴露气管,留置针行气管插管,每次用 PBS 0.5 mL 进行肺泡灌洗,共 4 次,记录回收量,光学显微镜下计算细胞总数并分类计数;检测血清(OVA-IgE)及 BALF(IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-17、IL-10)中的细胞因子浓度,参照 ELISA 试剂盒说明书进行。

1.5 H-E 染色 将肺组织用 10%中性甲醛固定,酒精脱水,常规石蜡包埋,切片进行 H-E 染色。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测肺组织 *Foxp3* 和维甲酸相关孤儿受体  $\gamma$ t(*ROR $\gamma$ t*) mRNA 表达 取小鼠肺组织匀浆,TRIzol 法抽提总 mRNA,反转录反应制备 cDNA,反应体系为 20  $\mu$ L,反应条件:42 $^{\circ}$ C 10 min $\rightarrow$ 30 $^{\circ}$ C 20 min $\rightarrow$ 99 $^{\circ}$ C 5 min $\rightarrow$ 4 $^{\circ}$ C 5 min,以 cDNA 为模板进行 mRNA 的定量 PCR 扩增。引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成,序列如下:*Foxp3*:上游 5'-GGT GGA GGC GGG ACT GAG T-3',下游 5'-TCC CCC TTT TCC ACT ACT CTA TG-3';*ROR $\gamma$ t*:上游 5'-CAC CCC ACC CTC ATT CTT TAC AC-3',下游 5'-GGG GGG ACA TGG ATC TAG CTC-3';*GAPDH*:上游 5'-ACC CAT CAC CAT CTT CCA GGA G-3',下游 5'-GAA GGG GCG GAG ATG ATG AC-3'。反应体系为 20  $\mu$ L,反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min $\rightarrow$ (94 $^{\circ}$ C 30 s $\rightarrow$ 57 $^{\circ}$ C 30 s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 30 s) $\times$ 45 个循环 $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 10 min。根据标准曲线计算出 CT 值,与各自内参 *GAPDH* 的 CT 值校正后即得  $\Delta$ CT,再计算  $\Delta\Delta$ CT,最后通过  $2^{-\Delta\Delta$ CT} 公式计算得到 *Foxp3* mRNA 和 *ROR $\gamma$ t* mRNA 的相对表达倍数。

1.7 流式细胞术检测 Treg 和 Th17 细胞占 CD4<sup>+</sup>细胞的百分比 打开腹腔无菌取脾,PBS 冲洗,碾磨后 200 目筛网过滤,红细胞裂解液裂解。将标本分为 2 份,一份加入 anti-CD4-FITC 和 anti-CD25-PE,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min;洗涤后加入新鲜配制的固定/破膜剂,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 45 min,洗涤 2 次后加入 anti-Foxp3-PE-CY5,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,洗涤后重悬细胞,上机测定;另一份加入含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基并接种于 6 孔培养板,加入佛波醇乙酯(PMA,终浓度 50 ng/mL)、离子霉素(ionomycin,终

浓度  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  培养 1 h 后,再加入 1 X 蛋白转运抑制剂复合物培养 4 h,加入 anti-CD4-FITC,  $4^\circ\text{C}$  避光孵育 30 min,洗涤后加入新鲜配制的固定/破膜剂,  $4^\circ\text{C}$  避光孵育 45 min,洗涤 2 次后加入 anti-IL-17A-PE,  $4^\circ\text{C}$  避光孵育 30 min,洗涤后重悬细胞,上机测定。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,各组间均数比较采用单因

素方差分析,当方差不齐时采用秩和检验,用 Pearson 方法进行相关分析。检验水平( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 BALF 细胞计数及分类 哮喘组 BALF 细胞总数和中性粒细胞、淋巴细胞、嗜酸粒细胞分类计数均高于 T3P 组和对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),结果见表 1。

表 1 小鼠 BALF 中细胞总数和分类计数

Tab 1 Total cell and differential cell counts in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of mice in three groups

$n=8, \bar{x} \pm s$

Group	Total cells ( $\times 10^5, \text{mL}^{-1}$ )	Differential cell count ( $\times 10^{-2}$ )			
		Neutrophili	Lymphocyte	Macrophage	Eosinophil
Control	$1.87 \pm 0.68$	$2.86 \pm 0.57$	$5.17 \pm 1.54$	$91.48 \pm 5.23$	$0.49 \pm 0.22$
Asthma	$7.46 \pm 1.83^*$	$9.85 \pm 1.86^*$	$20.38 \pm 7.18^*$	$35.14 \pm 7.15^*$	$34.63 \pm 10.37^*$
T3P	$5.62 \pm 0.92^* \Delta \Delta$	$7.53 \pm 1.72^* \Delta \Delta$	$13.56 \pm 4.42^* \Delta$	$60.10 \pm 5.87^* \Delta$	$18.81 \pm 5.42^* \Delta$

T3P: Type-3-polysaccharide. \*  $P < 0.01$  vs control group;  $\Delta P < 0.01$ ,  $\Delta \Delta P < 0.05$  vs asthma group

2.2 ELISA 法检测细胞因子 OVA-IgE、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-17、IL-10 浓度 哮喘组 OVA-IgE、IL-4、IL-17 浓度较对照组和 T3B 组升高,差异有统计学

意义( $P < 0.05$ ); IFN- $\gamma$ 、IL-10 浓度低于对照组和 T3P 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),结果见表 2。

表 2 小鼠血清中 OVA-IgE 和 BALF 中 IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-17、IL-10 的浓度

Tab 2 Levels of OVA-IgE in the serum and IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17 and IL-10 in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of mice in each group

$n=8, \bar{x} \pm s$

Group	OVA-IgE	IFN- $\gamma$	IL-4	IL-17	IL-10
	$\rho_B / (\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$	$\rho_B / (\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1})$	$\rho_B / (\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$	$\rho_B / (\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$	$\rho_B / (\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1})$
Control	$3104.61 \pm 329.33$	$330.77 \pm 31.63$	$213.17 \pm 11.16$	$138.34 \pm 12.76$	$153.45 \pm 16.27$
Asthma	$4854.18 \pm 463.85^*$	$208.41 \pm 22.43^*$	$304.44 \pm 31.58^*$	$237.41 \pm 25.65^*$	$102.29 \pm 11.30^*$
T3P	$4273.21 \pm 445.85^* \Delta$	$245.98 \pm 22.80^* \Delta$	$281.43 \pm 30.06^* \Delta$	$188.31 \pm 19.42^* \Delta$	$122.72 \pm 11.14^* \Delta \Delta$

T3P: Type-3-polysaccharide; \*  $P < 0.01$  vs control group;  $\Delta P < 0.01$ ,  $\Delta \Delta P < 0.05$  vs asthma group

2.3 H-E 染色结果 对照组小鼠支气管纤毛排列整齐,黏膜上皮完整,管腔光滑,肺泡间隔正常,未见炎症细胞浸润(图 1A)。哮喘组小鼠气道黏膜明显水肿,黏膜基层增厚,杯状细胞增多,支气管管腔狭窄,腔内大量黏液,气道黏膜层、黏膜下层、血管周围组织、肺泡壁及肺泡腔内可见大量的淋巴细胞、嗜酸粒细胞及中性粒细胞等炎症细胞浸润,以嗜酸粒细胞为主,肺泡隔显著增厚(图 1B)。T3P 组小鼠气道黏膜有少量嗜酸粒细胞等炎症细胞浸润,水肿减轻,管腔无明显缩小,肺泡间隔未见异常(图 1C)。

2.4 实时荧光定量 PCR 检测肺组织 *Foxp3* 和 *ROR $\gamma$ t* mRNA 表达 T3P 组、哮喘组和对照组肺组织 *Foxp3* mRNA  $\Delta\text{CT}$  值分别为  $3.16 \pm 0.10$ 、

$3.67 \pm 0.13$  和  $2.19 \pm 0.07$  ( $P < 0.05$ ),相对表达倍数为  $0.51 : 0.35 : 1$ ; *ROR $\gamma$ t* mRNA  $\Delta\text{CT}$  值分别为  $3.90 \pm 0.28$ 、 $2.80 \pm 0.25$  和  $4.66 \pm 0.34$  ( $P < 0.05$ ),相对表达倍数为  $1.69 : 3.61 : 1$ 。见图 2。

2.5 流式细胞术检测 Treg 和 Th17 细胞占 CD4<sup>+</sup> 细胞的百分比 哮喘组 Treg 细胞占 CD4<sup>+</sup> 细胞的百分比为  $(2.21 \pm 0.35)\%$ ,较 T3P 组 [ $(3.05 \pm 0.22)\%$ ]和对照组 [ $(5.04 \pm 0.37)\%$ ]减少 ( $P < 0.05$ ),见图 3;哮喘组 Th17 细胞占 CD4<sup>+</sup> 细胞的百分比为  $(1.72 \pm 0.19)\%$ ,较 T3P 组 [ $(1.23 \pm 0.09)\%$ ]和对照组 [ $(0.57 \pm 0.05)\%$ ]增多 ( $P < 0.05$ ),见图 4。

2.6 相关性分析 哮喘组 *Foxp3* mRNA 表达与

Treg 细胞数目、IL-10 浓度呈正相关( $r$  值分别为 0.805, 0.774,  $P$  均 $<0.05$ ); T3P 组 *Foxp3* mRNA 表达与 Treg 细胞数目、IL-10 浓度呈正相关( $r$  值分别为 0.732、0.796,  $P$  均 $<0.05$ )。哮喘组 *ROR $\gamma$ t* mRNA 表达与 Th17 细胞数目、IL-17 浓度呈正相关( $r=0.870, P<0.01; r=0.760, P<0.05$ ); T3P 组 *ROR $\gamma$ t* mRNA 表达与 Th17 细胞数目、IL-17 浓度呈正相关( $r$  值分别为 0.797、0.776,  $P$  均 $<0.05$ )。

哮喘组小鼠肺组织 *Foxp3*-mRNA/*ROR $\gamma$ t*-mRNA 和 Treg/Th17 细胞的比值与 BALF 中嗜酸粒细胞数量呈负相关( $r$  值分别为 -0.810、-0.796,  $P$  均 $<0.05$ ); T3P 组小鼠肺组织 *Foxp3*-mRNA/*ROR $\gamma$ t*-mRNA 和 Treg/Th17 细胞的比值与 BALF 中嗜酸粒细胞数量呈负相关( $r$  值分别为 -0.807, -0.790,  $P$  均 $<0.05$ )。

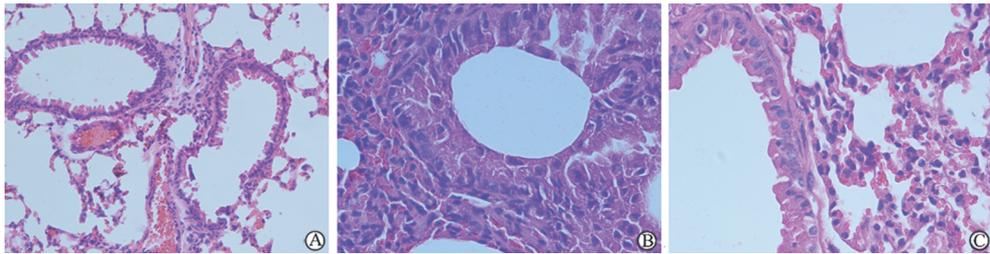


图 1 小鼠肺组织 H-E 染色病理结果

Fig 1 Pathological findings of mouse lungs in each group (H-E staining)

A: Control; B: Asthma; C: T3P (type-3-polysaccharide). Original magnification:  $\times 400$

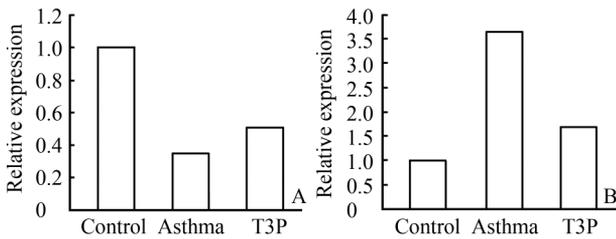


图 2 小鼠肺组织 *Foxp3*(A) 和 *ROR $\gamma$ t*(B) 的 mRNA 相对表达

Fig 2 *Foxp3*(A) and *ROR $\gamma$ t*(B) mRNA expression in lung tissues of mice in each group  
T3P: Type-3-polysaccharide

### 3 讨论

呼吸道合胞病毒、支原体、衣原体等感染可能诱发或加重支气管哮喘<sup>[8-9]</sup>, 而幽门螺杆菌、分枝杆菌等感染可能通过免疫调节作用抑制哮喘的发作<sup>[5,10]</sup>。Preston 等<sup>[7]</sup>研究发现, 在小鼠哮喘模型致敏和激发前、中、后, 将灭活的肺炎链球菌通过气道内给药进行气管内感染或治疗, 可以抑制 Th2 细胞因子产生和抗体反应, 减少嗜酸粒细胞的聚集, 抑制杯状细胞增殖, 减轻急性免疫反应, 提示肺炎链球菌有潜力调节免疫功能, 减轻气道炎症。假设只有部分肺炎链球菌成分对于抑制气道炎症是必须的, 去除菌体中具有感染侵袭力的部分, 保留具有免疫调节能力的保护性抗原, 可以简化抗原成分。因而本研究选取 T3P 抗原, 观察其对哮喘小鼠气道炎症的影响。

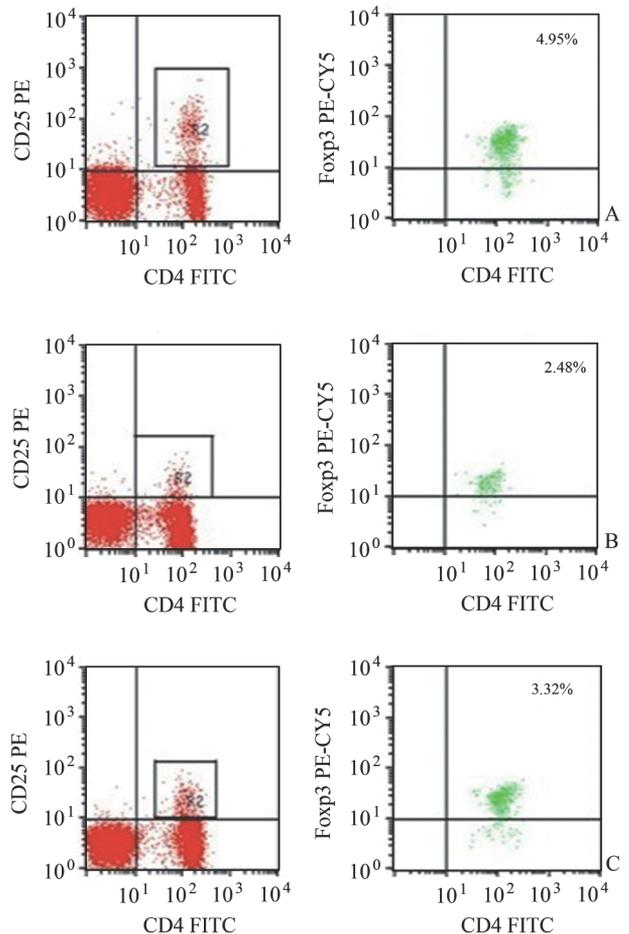


图 3 流式细胞术检测小鼠 Treg 细胞占 CD4<sup>+</sup> 细胞的百分比  
Fig 3 Flow cytometric examination of Treg cell proportions among CD4<sup>+</sup> cells in each group

A: Control; B: Asthma; C: T3P (type-3-polysaccharide)

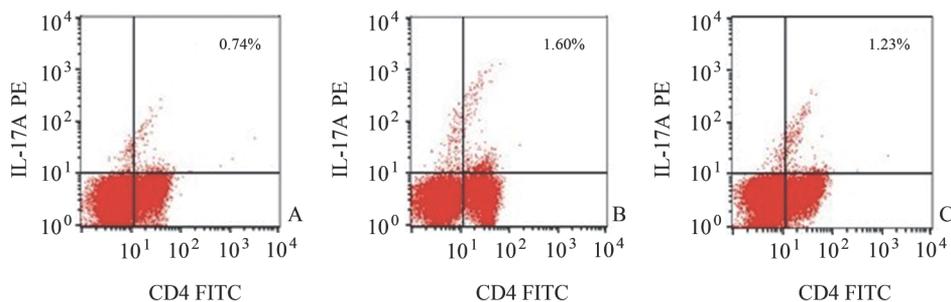


图 4 流式细胞术检测小鼠 Th17 细胞占 CD4<sup>+</sup> 细胞的百分比

Fig 4 Flow cytometric examination of Th17 cell proportions among CD4<sup>+</sup> cells in each group

A: Control; B: Asthma; C: T3P (type-3-polysaccharide)

支气管哮喘的发病机制十分复杂,经典理论认为 Th1/Th2 细胞应答的状态与哮喘的发生、发展和转归密切相关。随着对 Treg 和 Th17 细胞功能的深入研究,发现 Treg/Th17 细胞失衡与哮喘发病相关。

本研究以 OVA 致敏、激发建立 BALB/c 哮喘小鼠模型,结果显示,哮喘组小鼠 BALF 中 IL-4 浓度升高而 IFN- $\gamma$  浓度降低,血清 OVA-IgE 浓度升高,BALF 中细胞总数、嗜酸粒细胞比例增加,病理显示气道肺泡炎性浸润。IFN- $\gamma$  主要由 Th1 细胞分泌,IL-4 主要由 Th2 细胞分泌,IFN- $\gamma$  浓度降低而 IL-4 浓度升高表明哮喘组小鼠存在 Th2 免疫反应亢进而 Th1 免疫反应减弱,从而导致 OVA-IgE 表达增加,气道炎症加重。T3P 组小鼠在第 1 次致敏前用 T3P 皮下免疫进行干预,与哮喘组相比,T3P 组小鼠 BALF 中 IL-4 浓度降低,而 IFN- $\gamma$  浓度升高,OVA-IgE 浓度降低,BALF 中细胞总数、嗜酸粒细胞比例降低,气道肺泡炎症减轻,推测 T3P 可以通过调节 Th1/Th2 细胞失衡,降低 OVA-IgE 表达水平,从而使哮喘小鼠的气道炎症减轻。

Foxp3 是 Treg 细胞的特异性转录因子,其表达异常可能导致免疫抑制功能及 Treg 细胞数目异常。研究发现,过敏性疾病患者的 Treg 细胞数量会减少<sup>[11]</sup>。Treg 细胞缺陷的患者会发展成为高 IgE 水平、高嗜酸粒细胞的支气管哮喘及其他变态反应性疾病<sup>[12]</sup>。本研究中,哮喘组小鼠肺组织 Foxp3 mRNA 表达水平降低,流式细胞术检测 Treg 细胞占 CD4<sup>+</sup> 细胞的百分比减少,Treg 细胞分泌的 IL-10 浓度降低,Foxp3 mRNA 表达与 Treg 细胞数目、IL-10 浓度呈正相关,表明伴随 Foxp3 的表达降低,Treg 细胞数量减少,免疫抑制功能减弱,诱导炎症产生,促进哮喘的发生和发展。T3P 组与哮喘组比

较,伴随着肺组织 Foxp3 mRNA 表达水平升高,Treg 细胞数量亦增加,IL-10 表达水平升高,提示 T3P 能够诱导 Treg 细胞的分化和增强免疫抑制功能。

ROR $\gamma$ t 是 Th17 细胞的特异性转录因子,不仅诱导 Th17 细胞的分化和 IL-17 基因的转录,而且还参与了 Th17 细胞介导的炎症性疾病的发病过程<sup>[13-14]</sup>。动物实验表明哮喘小鼠 ROR $\gamma$ t 表达与 IL-17 水平升高有关<sup>[15]</sup>。中、重度哮喘患者 Th17 细胞及 IL-17 的表达显著高于轻度患者和正常人<sup>[16]</sup>。本研究中,哮喘组肺组织 ROR $\gamma$ t mRNA 表达增加,Th17 细胞占 CD4<sup>+</sup> 细胞的百分比增加,Th17 细胞分泌的 IL-17 浓度增加,ROR $\gamma$ t mRNA 表达与 Th17 细胞数目、IL-17 浓度均呈正相关,表明伴随着 ROR $\gamma$ t 表达水平升高,Th17 细胞数量增加,促进炎症产生,诱导哮喘的发生与发展。T3P 组与哮喘组比较,ROR $\gamma$ t mRNA 表达水平降低,Th17 细胞数量减少,IL-17 浓度降低,提示 T3P 能够抑制 Th17 细胞的分化和具有促炎功能。

Treg 和 Th17 细胞在分化过程及生物学功能方面相互拮抗、相互制约以维持体内的免疫平衡。体外研究发现,转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 通过诱导 Foxp3 外显子 2 编码序列直接与 ROR $\gamma$ t 结合,抑制 ROR $\gamma$ t 介导 IL-17A mRNA 的转录,抑制 ROR $\gamma$ t 的功能,促进 Treg 细胞的分化<sup>[17]</sup>;在炎症反应时,促炎因子 IL-6、IL-21 和 IL-23 可减轻 Foxp3 介导的对 ROR $\gamma$ t 的抑制作用而促进 Th17 细胞的分化,TGF- $\beta$  介导的 Foxp3 表达受到抑制而 ROR $\gamma$ t 的表达明显升高<sup>[18]</sup>。结合本研究结果,提示哮喘小鼠 Foxp3 表达水平降低减弱了对 ROR $\gamma$ t 表达的抑制,Treg 细胞不能正常发育,Th17 细胞逃离 Treg 细胞的免疫抑制。此外,Foxp3-mRNA/ROR $\gamma$ t-mRNA

和 Treg/Th17 细胞比值与 BALF 中嗜酸粒细胞数量呈负相关,哮喘组低于对照组,提示 Treg/Th17 细胞失衡可能导致哮喘的发生和进一步发展。T3P 组 *Foxp3*-mRNA/*RORγt*-mRNA 及 Treg/Th17 细胞比值高于哮喘组,提示 T3P 可以通过上调 *Foxp3* 表达,促进 Treg 的分化,促进 IL-10 分泌,同时下调 *RORγt* 表达,抑制 Th17 细胞分化,抑制 IL-17 分泌,调节 Treg/Th17 细胞失衡,减轻气道炎症。

总之,T3P 能够减少 BALF 中嗜酸粒细胞数量,减轻哮喘小鼠肺组织炎症反应,可能与其调节 Th1/Th2、Treg/Th17 细胞失衡,减少特异性 IgE 有关。T3P 可能用于哮喘的防治。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] Wing J B, Sakaguchi S. Multiple treg suppressive modules and their adaptability[J]. *Front Immunol*, 2012, 3: 178.
- [2] Michelsen K S, Wong M H, Ko B, Thomas L S, Dhall D, Targan S R. HMPL-004 (Andrographis paniculata extract) prevents development of murine colitis by inhibiting T-cell proliferation and TH1/TH17 responses [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2013, 19: 151-164.
- [3] 陈晋广, 赖维, 姜昱. 银屑病性关节炎患者 Th17 和 Treg 细胞的变化及意义[J]. *中国医学科学院学报*, 2012, 34: 617-620.
- [4] Ji L, Zhan Y, Hua F, Li F, Zou S, Wang W, et al. The ratio of Treg/Th17 cells correlates with the disease activity of primary immune thrombocytopenia[J]. *PLoS One*, 2012, 7: e50909.
- [5] Thorburn A N, Hansbro P M. Harnessing regulatory T cells to suppress asthma: from potential to therapy[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010, 43: 511-519.
- [6] Thorburn A N, Hansbro P M, Gibson P G. Pneumococcal vaccines for allergic airways diseases [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2009, 9: 621-629.
- [7] Preston J A, Thorburn A N, Starkey M R, Beckett E L, Horvat J C, Wade M A, et al. Streptococcus pneumoniae infection suppresses allergic airways disease by inducing regulatory T-cells[J]. *Eur Respir J*, 2011, 37: 53-64.
- [8] Cosentini R, Tarsia P, Canetta C, Graziadei G, Brambilla A M, Aliberti S, et al. Severe asthma exacerbation: role of acute Chlamdophila pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae infection[J]. *Respir Res*, 2008, 9: 48.
- [9] Sutherland E R, Martin R J. Asthma and atypical bacterial infection[J]. *Chest*, 2007, 132: 1962-1966.
- [10] Arnold I C, Dehzad N, Reuter S, Martin H, Becher B, Taube C, et al. Helicobacter pylori infection prevents allergic asthma in mouse models through the induction of regulatory T cells[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121: 3088-3093.
- [11] Robinson D S. Regulatory T cells and asthma[J]. *Clin Exp Allergy*, 2009, 39: 1314-1323.
- [12] Gambineri E, Torgerson T, Ochs H D. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2003, 15: 430-435.
- [13] Ivanov I I, McKenzie B S, Zhou L, Tadokoro C E, Lepelletier A, Lafaille J J, et al. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> T helper cells[J]. *Cell*, 2006, 126: 1121-1133.
- [14] Manel N, Unutmaz D, Littman D R. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat[J]. *Nat Immunol*, 2008, 9: 641-649.
- [15] Lim H, Kim Y U, Drouin S M, Mueller-Ortiz S, Yun K, Morschl E, et al. Negative regulation of pulmonary Th17 responses by C3a anaphylatoxin during allergic inflammation in mice[J]. *PLoS One*, 2012, 7: e52666.
- [16] Bajoriuniene I, Malakauskas K, Lavinskiene S, Jeroch J, Gasiuniene E, Vitkauskiene A, et al. Response of peripheral blood Th17 cells to inhaled Dermatophagoides pteronyssinus in patients with allergic rhinitis and asthma[J]. *Lung*, 2012, 190: 487-495.
- [17] Zhou L, Lopes J E, Chong M M, Ivanov I I, Min R, Victorica G D, et al. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function[J]. *Nature*, 2008, 453: 236-240.
- [18] Ziegler S F, Buckner J H. FOXP3 and the regulation of Treg/Th17 differentiation[J]. *Microbes Infect*, 2009, 11: 594-598.

[本文编辑] 周燕娟, 孙岩