

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230761

· 论 著 ·

## 迷走神经刺激对急性呼吸窘迫综合征大鼠 Th17 和 Treg 相关蛋白及炎症因子的影响

张欣, 贾功伟, 虞乐华, 程黎\*

重庆医科大学附属第二医院健康医学中心, 重庆 400010

**[摘要]** **目的** 在脂多糖 (LPS) 诱导的急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 模型大鼠中, 探讨迷走神经刺激 (VNS) 对辅助性 T 细胞 17 (Th17) 和调节性 T 细胞 (Treg) 相关蛋白及炎症因子的调控作用。**方法** 将 30 只 SD 大鼠随机分为对照组、LPS 组和 LPS+VNS 组, 每组 10 只。LPS 组和 LPS+VNS 组大鼠通过鼻腔滴注 2 mg/kg LPS 构建 ARDS 模型。LPS+VNS 组于鼻腔滴注 LPS 6 h 后暴露左侧颈部迷走神经, 给予电压 5 V、频率 5 Hz、脉冲宽度 2 ms 的电刺激, 持续 10 min。电刺激 2 h 后取双肺及脾组织进行检测。检测指标包括肺部病理学变化、肺湿干比、支气管肺泡灌洗液 (BALF) 总蛋白含量、BALF 中炎症因子水平、肺及脾组织中 Treg 转录蛋白叉头框蛋白 P3 (Foxp3) 和 Th17 转录蛋白维甲酸受体相关孤儿受体  $\gamma$  (Roryt) 表达。**结果** 与对照组相比, LPS 组大鼠肺泡壁明显变厚、炎症细胞浸润到肺泡腔, BALF 总蛋白含量增高 ( $P<0.01$ ), 肺湿干比增高 ( $P<0.01$ ), BALF 中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-17、IL-10 表达升高 (均  $P<0.01$ ), 肺和脾组织中 Foxp3 和 Roryt 蛋白表达上调; 与 LPS 组相比, LPS+VNS 组大鼠肺组织病理表现减轻, 肺湿干比下降 ( $P<0.05$ ), BALF 总蛋白含量降低 ( $P<0.05$ ), BALF 中 IL-6 和 IL-17 降低 (均  $P<0.05$ )、IL-10 升高 ( $P<0.01$ ), 肺及脾组织中 Foxp3 蛋白表达上调、Roryt 蛋白表达下调。**结论** VNS 可能通过调控大鼠肺和脾组织 Th17 和 Treg 相关蛋白表达进而调控炎症因子水平, 减轻 LPS 诱导的 ARDS 病理改变。

**[关键词]** 急性呼吸窘迫综合征; 迷走神经电刺激; 炎症因子; 辅助性 T 细胞; 调节性 T 细胞

**[引用本文]** 张欣, 贾功伟, 虞乐华, 等. 迷走神经刺激对急性呼吸窘迫综合征大鼠 Th17 和 Treg 相关蛋白及炎症因子的影响 [J]. 海军军医大学学报, 2024, 45(5): 544-551. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230761.

### Effects of vagus nerve stimulation on Th17- and Treg-related proteins and inflammatory factors in rats with acute respiratory distress syndrome

ZHANG Xin, JIA Gongwei, YU Lehua, CHENG Li\*

Health Medical Center, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of vagus nerve stimulation (VNS) on T helper cell 17 (Th17)- and regulatory T cell (Treg)-related proteins and inflammatory factors in lipopolysaccharide (LPS)-induced acute respiratory distress syndrome (ARDS) rats. **Methods** Thirty SD rats were randomly divided into control group, LPS group and LPS+VNS group, with 10 rats in each group. The ARDS model was established by nasal instillation of 2 mg/kg LPS into SD rats in LPS group and LPS+VNS group. In LPS+VNS group, after LPS nasal instillation for 6 h, the left cervical vagus nerve was exposed and stimulated under 5 V, 5 Hz, 2 ms for 10 min. Tissues of lung and spleen were examined after 2 h. The indicators included lung pathological changes, lung wet to dry ratio, total protein content in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), inflammatory factor levels in BALF, and expression of forkhead box protein P3 (Foxp3, a transcription protein of Treg) and retinoic acid-related orphan receptor  $\gamma$  (Roryt, a transcription protein of Th17) in the lung and spleen. **Results** Compared with the control group, the alveolar wall of rats in LPS group was significantly thickened, inflammatory cells infiltrated into the alveolar space; the total protein content of BALF was significantly increased ( $P<0.01$ ); lung wet to dry ratio was significantly

[收稿日期] 2023-12-25 [接受日期] 2024-02-27

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金 (81900079), 重庆市自然科学基金面上项目 (cstc2020jcyj-msxmX0238), 重庆医科大学附属第二医院“宽仁英才”项目, 重庆市中青年医学高端人才项目. Supported by National Natural Science Foundation of China for Young Scholars (81900079), General Program of Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2020jcyj-msxmX0238), “Kuanren Yingcai” Project of The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, and Chongqing Young and Middle-aged Medical High-end Talent Program.

[作者简介] 张欣, 硕士生. E-mail: 2021110393@stu.cqmu.edu.cn

\*通信作者 (Corresponding author). Tel: 023-63693239, E-mail: chengli@hospital.cqmu.edu.cn

increased ( $P<0.01$ ); the expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17 and IL-10 was significantly increased in BALF (all  $P<0.01$ ); and the expression of Foxp3 and Ror $\gamma$ t was up-regulated in the lung and spleen. Compared with LPS group, the pathological manifestations of rats were alleviated in LPS+VNS group; the lung wet to dry ratio, the total protein content of BALF, and the levels of IL-6 and IL-17 in BALF were significantly decreased (all  $P<0.05$ ); the level of IL-10 in BALF was significantly increased ( $P<0.01$ ); and the expression of Foxp3 was up-regulated, while the expression of Ror $\gamma$ t was down-regulated in the lung and spleen. **Conclusion** VNS may regulate the expression of inflammatory factors by regulating Th17- and Treg- related proteins in the tissues of lung and spleen in rats, thereby alleviating the pathological changes of LPS-induced ARDS.

[ **Key words** ] acute respiratory distress syndrome; vagus nerve stimulation; inflammatory cytokines; T helper cell; regulatory T cell

[ **Citation** ] ZHANG X, JIA G, YU L, et al. Effects of vagus nerve stimulation on Th17- and Treg-related proteins and inflammatory factors in rats with acute respiratory distress syndrome[J]. Acad J Naval Med Univ, 2024, 45(5): 544-551. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230761.

急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 是临床常见的危重症, 病死率高达 46%<sup>[1]</sup>。ARDS 临床表现为进行性呼吸窘迫和顽固性低氧血症, 其本质是各种病因诱导机体产生免疫应答及炎症反应, 进而损伤肺实质细胞。ARDS 发病机制以复杂和失调的炎症为特征, 涉及一系列免疫细胞 (包括巨噬细胞、淋巴细胞亚群、树突状细胞) 及细胞因子网络<sup>[2]</sup>。尽管炎症是一种重要的防御反应, 可以消除有害物质, 但过度炎症反应可能导致细胞、组织和器官损伤。因此, 调控原发病导致的机体免疫应答和炎症反应是 ARDS 治疗中渴望突破的重点。辅助性 T 细胞 17 (T helper cell 17, Th17) 和调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 是一对重要的免疫调节细胞, 是初始 CD4<sup>+</sup> T 细胞在相应转录因子和不同细胞因子作用下分化成的不同亚群, 在炎症反应发展过程中, Th17 的过度生成和激活可归因于高炎症损伤, 而 Treg 是具有抗炎功能的炎症抑制细胞, 两者不仅参与 ARDS 的炎症病理过程, 其介导的免疫应答还影响 ARDS 的炎症反应程度<sup>[3-4]</sup>。Th17/Treg 平衡的走向预示了疾病发展的程度, 在 ARDS 中 Th17/Treg 比值升高代表更高的死亡率和更差的预后<sup>[5-6]</sup>。

近年来, 迷走神经介导的抗炎机制受到关注。迷走神经是最长的脑神经, 支配包括肺、脾在内的大部分外周器官。迷走神经刺激 (vagus nerve stimulation, VNS) 是一种新型的物理治疗方法, 通过在颈迷走神经周围放置电极或经皮刺激颈迷走神经分支发挥抗炎和镇痛等治疗作用<sup>[7]</sup>。研究发现, VNS 可通过激活胆碱能抗炎通路 (cholinergic anti-

inflammatory pathway, CAIP) 来调控促炎细胞因子释放, 促进巨噬细胞向抗炎表型 M2 型转化, 从而减轻 ARDS 的肺损伤<sup>[8]</sup>。Th17 可以通过正反馈调控细胞因子释放<sup>[9-10]</sup>, 有趣的是, 这些细胞因子与 CAIP 调控的细胞因子有很大部分重叠。因此, 我们猜测 VNS 可以调控 ARDS 中 Th17 及 Treg 相关蛋白和炎症因子的表达。本研究通过脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导 ARDS 大鼠模型, 选取肺和脾两个靶器官, 探究 VNS 对 Th17 及 Treg 相关蛋白表达及炎症因子水平的影响, 揭示 VNS 减轻肺损伤的作用机制, 为临床防治 ARDS 提供参考。

## 1 材料和方法

1.1 实验动物和主要试剂 30 只 SPF 级雄性 SD 大鼠 (6~8 周龄) 购于重庆医科大学实验动物中心 [动物生产许可证号: SCXK (渝) 2022-0016]。大鼠自由进水、摄食, 饲养环境温度 22~24 °C、相对湿度为 40%~60%、明暗周期 12 h/12 h。本研究通过重庆医科大学实验动物伦理委员会批准。

LPS 购于美国 MCE 公司, 叉头框蛋白 P3 (forkhead box protein P3, Foxp3) 抗体、GAPDH 抗体购于武汉三鹰生物技术有限公司, 维甲酸受体相关孤儿受体  $\gamma$ t (retinoic acid-related orphan receptor  $\gamma$ t, Ror $\gamma$ t) 抗体购于沈阳万类生物科技有限公司, HRP 标记的羊抗兔二抗购于北京中杉金桥生物技术有限公司, 所有 ELISA 检测试剂盒均购于武汉博士德生物工程有限公司, BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、RIPA

强效细胞裂解液、SDS-PAGE 上样缓冲液、无蛋白快速封闭液购于上海雅酶生物医药科技有限公司, ECL 发光液购于上海碧云天生物技术有限公司, PVDF 膜购于美国 Millipore 公司。

1.2 ARDS 模型构建与 VNS 干预 将 30 只大鼠随机分对照组、LPS 组和 LPS+VNS 组, 每组 10 只。按 Li 等<sup>[8]</sup>所述方法构建 ARDS 模型和进行 VNS 干预。LPS 组和 LPS+VNS 组大鼠经腹腔注射 1% 戊巴比妥钠麻醉后, 经鼻腔滴注 2 mg/kg LPS, 同时将左侧颈部迷走神经暴露出来, 以纱布覆盖创面。LPS+VNS 组大鼠在鼻腔滴注 LPS 6 h 后给予 VNS 干预, 所采用的 VNS 治疗仪为华佗牌电子针疗仪 SDZ-V, 刺激参数为电压 5 V、频率 5 Hz、脉冲宽度 2 ms, 持续 10 min。LPS 组不进行 VNS。干预 2 h 后取样检测。

1.3 肺组织病理变化检测 取大鼠肺叶用 3.7% 多聚甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 切成厚度为 5  $\mu\text{m}$  的切片, 常规 H-E 染色, 在光学显微镜下观察。在每个切片中随机选择 10 个高倍镜视野 (200 $\times$ ) 进行组织学评价。

1.4 肺湿干比 (wet to dry ratio, W/D) 检测 取大鼠左肺测量湿重, 然后在 60  $^{\circ}\text{C}$  烘箱干燥 72 h 后测量得到干重。计算 W/D, 评价肺水肿程度。

1.5 支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 总蛋白含量检测 取无菌生理盐水 2 mL 灌洗大鼠肺 3 次, 收集 BALF。在 4  $^{\circ}\text{C}$  下, 将 BALF 以 800 $\times g$  离心 10 min 后留上清液, 用 BCA 试剂盒测定 BALF 上清液中的总蛋白浓度。

1.6 BALF 中炎症因子水平检测 取 BALF 在 4  $^{\circ}\text{C}$  下以 800 $\times g$  离心 10 min, 保存上清液。根据 ELISA 试剂盒说明书检测 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-17 和 IL-10 的水平。

1.7 肺和脾组织 Foxp3、Roryt 蛋白表达检测

1.7.1 蛋白质印迹法 取 20 mg 大鼠肺组织或脾组织, 加入适当体积的裂解液 (含 1% 蛋白酶及磷酸酶抑制剂) 于冰上提取总蛋白, BCA 法测定蛋白质浓度, 按比例加入上样缓冲液, 煮沸变性。取 30  $\mu\text{g}$  蛋白质样品, 经 SDS-PAGE 分离后转移到 PVDF 膜上, 经无蛋白快速封闭液室温封闭 30 min 后, 将膜放置于相应的一抗中, 于 4  $^{\circ}\text{C}$  摇床孵育过夜。第 2 天, 将膜用 TBST 漂洗 3 次、每次 8 min, 加入

相应的二抗室温孵育 1 h, 再用 TBST 漂洗 3 次、每次 8 min, 滴加 ECL 发光液进行曝光显影。用 ImageJ 软件分析蛋白条带的灰度值并计算相对表达量 (目的蛋白与内参蛋白灰度值的比值)。

1.7.2 免疫组织化学染色 将肺组织及脾组织石蜡包埋、切片 (厚度为 5  $\mu\text{m}$ )、脱蜡、水化, 用柠檬酸钠缓冲液处理, 然后在室温下用 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理 15 min 以阻断内源性过氧化物, 用 3% 牛血清白蛋白溶液处理 30 min 以减少非特异性结合。然后滴加一抗在 4  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 16 h, 滴加二抗在 37  $^{\circ}\text{C}$  下洗涤和孵育 1 h, 用 DAB 染色, 苏木精复染。切片经脱水、清除、密封后, 在显微镜下观察, 分析相对染色强度。

1.8 统计学处理 采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计学分析。呈正态分布的计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 并运用 Tukey 法进行两两比较。检验水准 ( $\alpha$ ) 为 0.05。

## 2 结果

2.1 各组大鼠肺部病理改变情况 肺组织 H-E 染色结果 (图 1A) 显示, LPS 组大鼠肺泡壁明显变厚, 炎症细胞浸润到肺泡腔; LPS+VNS 组大鼠上述病理表现较 LPS 组减轻。肺 W/D 及 BALF 总蛋白含量检测结果 (图 1B、1C) 显示, 与对照组相比, LPS 组大鼠出现了明显的肺水肿, BALF 中总蛋白增多 (均  $P<0.01$ ); 与 LPS 组相比, LPS+VNS 组大鼠肺水肿减轻, BALF 中总蛋白减少 (均  $P<0.05$ )。上述结果表明 LPS 诱导的大鼠 ARDS 模型构建成功, 而 VNS 能缓解 LPS 诱导的大鼠肺部病理改变。

2.2 各组大鼠 BALF 中炎症因子水平 与对照组相比, LPS 组大鼠 BALF 中促炎因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-17 水平增高 (均  $P<0.01$ ), TNF- $\alpha$  水平增高但差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); 抗炎因子 IL-10 水平也高于对照组 ( $P<0.01$ )。与 LPS 组相比, LPS+VNS 组大鼠 BALF 中 IL-6、IL-17 水平降低 (均  $P<0.05$ ), IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平降低但差异无统计学意义 (均  $P>0.05$ ), IL-10 水平进一步增高 ( $P<0.01$ )。以上结果表明 VNS 能抑制 LPS 诱导的大鼠 BALF 中促炎因子的升高, 促进抗炎因子的表达。见表 1。

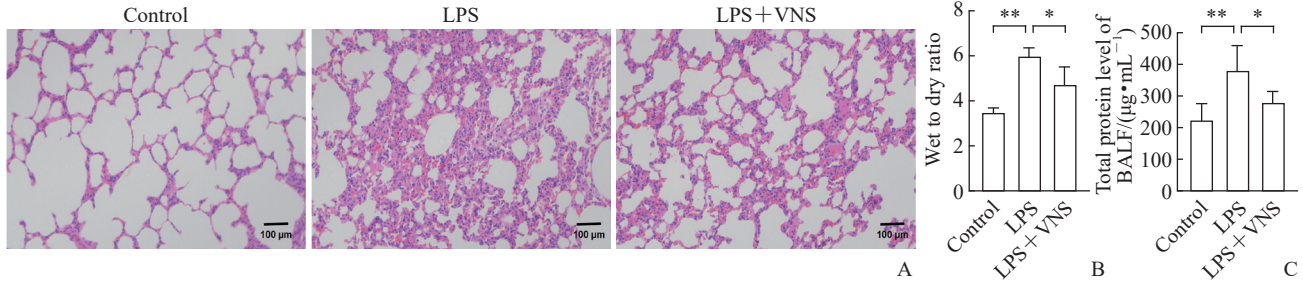


图1 各组大鼠肺部病理改变

Fig 1 Pathological changes of rat lungs in each group

A: Hematoxylin-eosin staining; B: Wet to dry ratio; C: Total protein level of BALF. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .  $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$ . LPS: Lipopolysaccharide; VNS: Vagus nerve stimulation; BALF: Bronchoalveolar lavage fluid.

表1 各组大鼠BALF中炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-17、IL-10水平比较

Tab 1 Comparison of levels of inflammatory factors TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, and IL-10 in BALF of rats in each group

Group	(pg · mL <sup>-1</sup> ), $n = 10$ , $\bar{x} \pm s$				
	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-17	IL-10
Control group	168.3 ± 21.9	100.7 ± 5.3	2 078.0 ± 271.6	190.2 ± 26.5	154.4 ± 21.0
LPS group	199.5 ± 10.6	316.5 ± 26.5**	4 342.0 ± 603.3**	336.8 ± 49.9**	308.4 ± 48.5**
LPS+VNS group	186.6 ± 16.4	238.2 ± 55.0	2 567.0 ± 262.1 $\Delta\Delta$	225.3 ± 23.7 $\Delta$	461.3 ± 62.2 $\Delta\Delta$

\*\* $P < 0.01$  vs control group;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs LPS group. BALF: Bronchoalveolar lavage fluid; TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor  $\alpha$ ; IL: Interleukin; LPS: Lipopolysaccharide; VNS: Vagus nerve stimulation.

2.3 各组大鼠肺组织中Foxp3及Roryt蛋白的表达 蛋白质印迹法检测结果显示,与对照组相比,LPS组大鼠肺组织中Treg转录蛋白Foxp3表达增加( $P < 0.01$ ),Th17转录蛋白Roryt表达也增加但差异无统计学意义( $P > 0.05$ );与LPS组相比,LPS+VNS组大鼠肺组织中Foxp3蛋白表达进一步增加,Roryt蛋白表达则降低(均 $P < 0.05$ )。免疫组织化学染色检测结果显示,与对照组相比,LPS组大鼠肺组织中Foxp3蛋白表达增加但差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),Roryt蛋白表达增加( $P < 0.05$ );与LPS组相比,LPS+VNS组大鼠肺组织中Foxp3蛋白表达进一步增加( $P < 0.01$ ),Roryt蛋白表达降低但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。上述结果提示,VNS能进一步促进LPS诱导的大鼠肺组织中Foxp3蛋白的表达,但会下调LPS诱导的Roryt表达增加。见图2。

2.4 各组大鼠脾组织中Foxp3及Roryt蛋白的表达 蛋白质印迹法检测结果显示,与对照组相比,LPS组大鼠脾组织中Foxp3和Roryt蛋白表达增加(均 $P < 0.05$ );与LPS组相比,LPS+VNS组大鼠脾组织中Foxp3蛋白表达进一步增加( $P < 0.05$ ),Roryt蛋白表达降低( $P < 0.01$ )。免疫组织化学染色检测结果与蛋白质印迹法检测结果一

致,与对照组相比,LPS组大鼠脾组织中Foxp3蛋白和Roryt蛋白表达增加(均 $P < 0.01$ );与LPS组相比,LPS+VNS组大鼠脾组织中Foxp3蛋白表达进一步增加( $P < 0.05$ ),Roryt蛋白表达降低( $P < 0.05$ )。上述结果提示,VNS在大鼠脾组织和肺组织中的作用相同,能促进LPS诱导的大鼠脾组织中Foxp3蛋白表达、抑制Roryt蛋白表达,调控Th17及Treg相关蛋白变化。见图3。

### 3 讨论

ARDS是一种肺部急性、弥漫性、炎症性损伤,其发病机制涉及一系列炎症免疫细胞,包括巨噬细胞、淋巴细胞亚群、树突状细胞等<sup>[11-12]</sup>。过度炎症反应会导致细胞、组织和器官损害,一般认为炎症过程失控的触发是ARDS发展的关键,因此,免疫系统调节炎症反应的机制是目前ARDS研究的重点。近年研究发现,连接神经系统和免疫系统的CAIP在各种疾病中显示出抗炎作用<sup>[8]</sup>。烟碱样乙酰胆碱受体 $\alpha 7$ ( $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor,  $\alpha 7nAChR$ )是CAIP的靶点,广泛表达于免疫细胞(包括CD4<sup>+</sup>T细胞)表面<sup>[11]</sup>,其在ARDS初始炎症反应阶段的重要作用已经得到证实<sup>[13-14]</sup>。

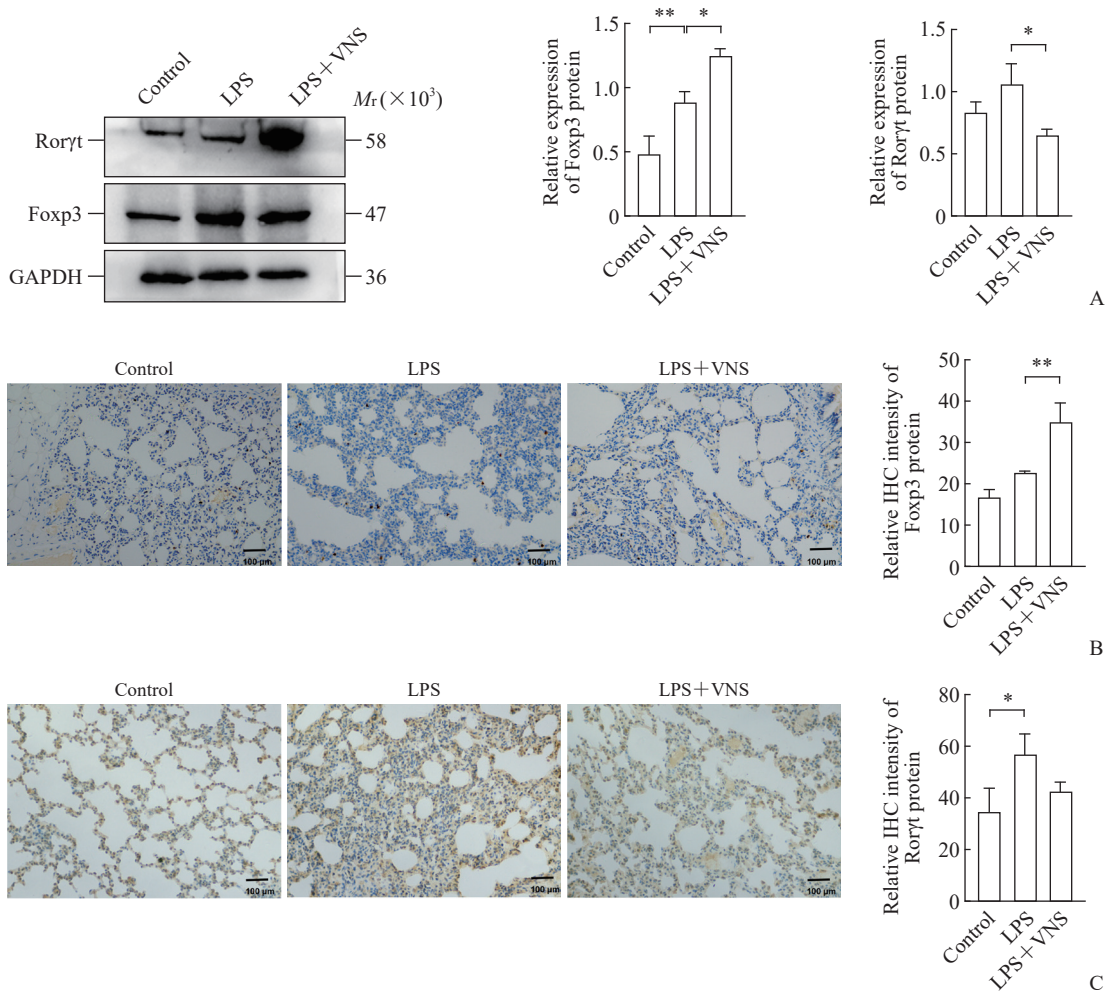


图2 各组大鼠肺组织中 Foxp3 和 Rorγt 蛋白的表达情况

Fig 2 Expression of Foxp3 and Rorγt proteins in lung tissues of rats in each group

A: The Foxp3 and Rorγt proteins were detected by Western blotting; B: The Foxp3 protein was detected by IHC staining; C: The Rorγt protein was detected by IHC staining. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .  $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$ . Foxp3: Forkhead box protein P3; Rorγt: Retinoic acid-related orphan receptor γt; LPS: Lipopolysaccharide; VNS: Vagus nerve stimulation; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; IHC: Immunohistochemistry.

Th17 和 Treg 参与了 ARDS 发展过程中失控的炎症反应, 其中 Th17 是导致肺部炎症级联反应的炎症细胞。有证据表明, Th17 的过度生成和激活可归因于高炎症损伤, 它是促炎因子 IL-17 的主要分泌来源, 也可激活 IL-1、IL-6、TNF-α、IL-8 等促炎因子<sup>[15]</sup>。IL-17 过表达或聚集在肺内可导致一系列炎症因子的级联反应, 募集各类炎症因子如 TNF-α、TNF-β 等进入气管, 阻断 IL-17 可有效减缓 LPS 诱导的肺损伤<sup>[16]</sup>。与 Th17 不同的是, Treg 具有抗炎功能, 在缓解或治疗急性肺损伤和 ARDS 中发挥核心作用<sup>[17]</sup>。研究表明 Treg 可以限制效应 T 细胞的功能, 而效应 T 细胞可以控制感染或介导炎症损伤<sup>[18]</sup>。Treg 释放的 IL-10 是抗炎因子。

IL-10 可以抑制巨噬细胞产生的促炎因子, 具有强大的免疫调节和抗炎作用<sup>[19]</sup>。因此, 对 Th17/Treg 的调控可能成为治疗 ARDS 的靶点<sup>[20]</sup>。本研究结果显示, 采用 LPS 诱导 ARDS 模型后, 大鼠肺组织发生病理性改变, 出现了明显肺水肿, 大量炎症细胞和炎症因子渗透进肺泡腔, Th17 转录蛋白 Rorγt 和 Treg 转录蛋白 Foxp3 上调, 表明 LPS 诱导大鼠 ARDS 模型后 Th17/Treg 失调, 导致炎症因子级联式增加, 加重了肺损伤。

迷走神经是自主神经的组成部分之一, 它作为输入和输出的载体, 整合了内感受器信息及一系列自适应和调节反馈信息。VNS 是一种物理治疗, 具有作用迅速、安全、不良反应少等特点<sup>[21]</sup>, 目前

在临床上已被应用于偏头痛、部分发作癫痫、难治性抑郁症等的治疗<sup>[22]</sup>。新兴的研究正在将 VNS 的潜在用途拓展到其他神经系统疾病。在 ARDS 领域,前期研究已证明 VNS 可以通过作用于 CAIP 和信号转导及转录激活蛋白 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 抑制促炎细胞因子的产生,从而减弱炎症反应<sup>[8]</sup>。乙酰胆碱作为神经节前和神经节后迷走传出神经的神经递质,可刺激烟碱受体抑制促炎细胞因子的释放,其中

$\alpha 7nAChR$  对于迷走神经抑制炎症反应至关重要<sup>[8]</sup>。这种由迷走神经、迷走神经末梢分泌的乙酰胆碱和受体  $\alpha 7nAChR$  组成的迷走神经抗炎反射被称为 CAIP<sup>[23]</sup>。VNS 可以激活和增强 CAIP 的活性,减轻炎症反应<sup>[24]</sup>。本研究发现 VNS 可减少 LPS 诱导的大鼠 ARDS 模型 BALF 中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 等促炎细胞因子的产生,减轻肺组织病理学改变,这些都是 VNS 降低 ARDS 炎症反应的重要机制。VNS 调控信号通路的具体机制还需要进一步研究。

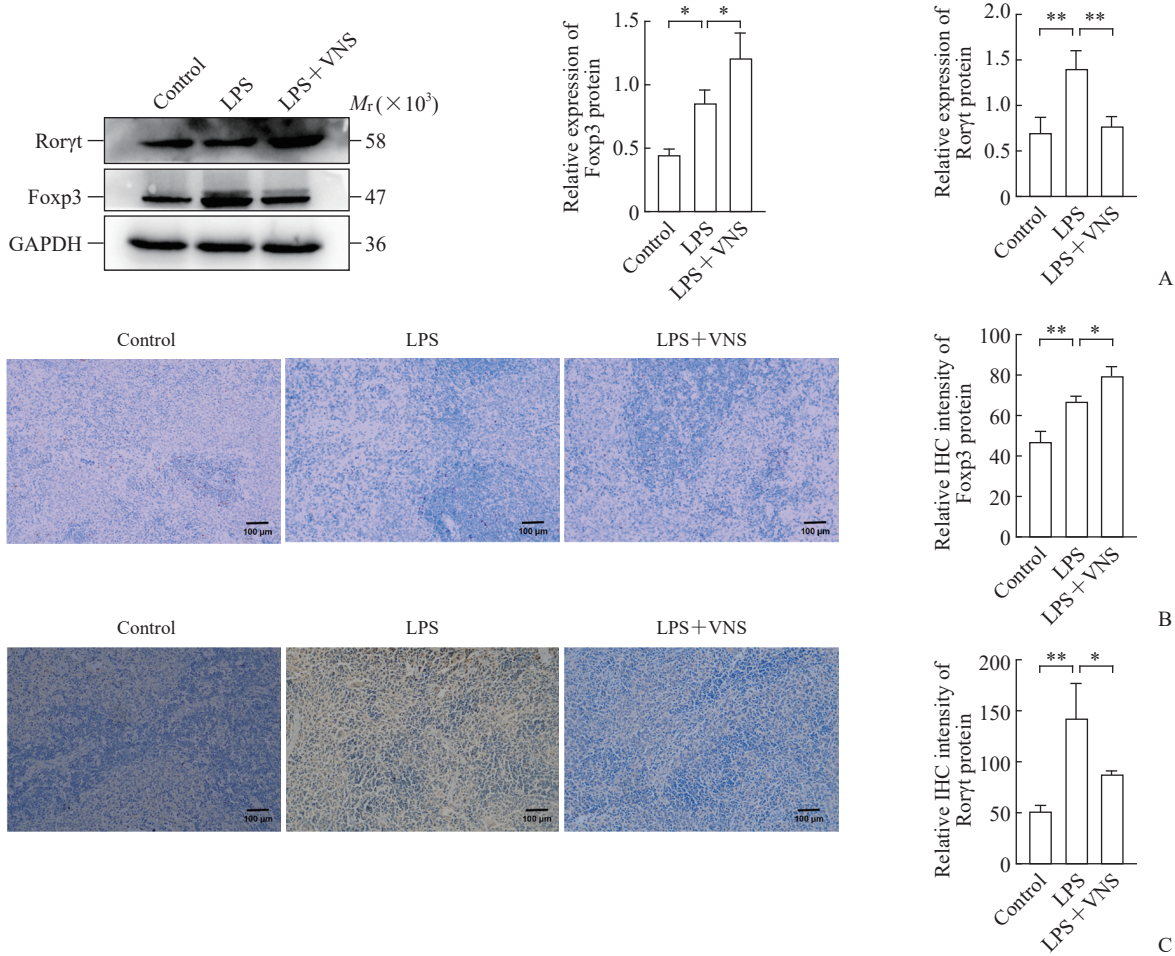


图3 各组大鼠脾组织中 Foxp3 和 Rorγt 蛋白的表达情况

Fig 3 Expression of Foxp3 and Rorγt proteins in spleen tissues of rats in each group

A: The Foxp3 and Rorγt proteins were detected by Western blotting; B: The Foxp3 protein was detected by IHC staining; C: The Rorγt protein was detected by IHC staining. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .  $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$ . Foxp3: Forkhead box protein P3; Rorγt: Retinoic acid-related orphan receptor  $\gamma$ ; LPS: Lipopolysaccharide; VNS: Vagus nerve stimulation; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; IHC: Immunohistochemistry.

LPS 可引起大鼠一系列炎症反应,脾脏是最大的外周免疫器官,含有的大量免疫细胞如巨噬细胞、T 细胞、树突状细胞等可分泌一系列炎症因子,这些炎症因子可快速引起全身性炎症反应,在

ARDS 中起着重要作用<sup>[25]</sup>。同时脾也是 CAIP 的重要中间环节, Dhawan 等<sup>[26]</sup>利用胆碱乙酰转移酶转基因小鼠开展研究,在小鼠脾脏中鉴定出胆碱能免疫细胞。本研究结果显示, VNS 可下调 ARDS 大

鼠脾中 Th17 转录因子 Ror $\gamma$ t 的表达,上调 Treg 转录因子 Foxp3 的表达,与肺组织中情况相同。考虑到脾脏是一个含有淋巴细胞的主要次级淋巴组织,我们猜测 CAIP 可以改变大鼠脾脏中 CD4<sup>+</sup> T 细胞亚群的比例,进而可能改变肺中 T 细胞亚群的百分比。这种变化最终降低了全身炎症反应,减轻了 ARDS 大鼠的肺损伤。这一过程还需要进一步证实,其具体机制也需要进一步研究。

本研究存在以下不足之处:(1) ARDS 发病机制复杂,涉及的信号通路众多,本研究仅从 VNS 对 Th17 及 Treg 相关蛋白的作用入手探讨,具有局限性。(2) 由于 VNS 干预方式的局限性,本研究仅进行了体内实验,仅采用了 VNS 的 1 个治疗参数,治疗时间也仅有 10 min,缺乏更长时间的刺激及不同设置参数之间效果的比较,也未设置切除迷走神经的组别进行对照。(3) 本研究仅观察了 VNS 对大鼠肺和脾组织 Th17、Treg 相关蛋白及炎症因子的影响,没有对特异性通路如 CAIP 通路进行阻断或激活,无法验证其分子机制。在后续的研究中,我们将对 CAIP 通路进行特异性激活或抑制,同时增加不同 VNS 参数组别和切除迷走神经组别,进一步深入探讨 VNS 作用于 Th17 及 Treg 缓解 ARDS 炎症及病理表现的机制。

#### [参考文献]

- [1] GORMAN E A, O'KANE C M, MCAULEY D F. Acute respiratory distress syndrome in adults: diagnosis, outcomes, long-term sequelae, and management[J]. *Lancet*, 2022, 400(10358): 1157-1170. DOI: 10.1016/s0140-6736(22)01439-8.
- [2] BERNARD G R, ARTIGAS A, BRIGHAM K L, et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994, 149(3 Pt 1): 818-824. DOI: 10.1164/ajrccm.149.3.7509706.
- [3] BOS L D J, WARE L B. Acute respiratory distress syndrome: causes, pathophysiology, and phenotypes[J]. *Lancet*, 2022, 400(10358): 1145-1156. DOI: 10.1016/s0140-6736(22)01485-4.
- [4] CHEN L, YANG J, ZHANG M, et al. SPP1 exacerbates ARDS via elevating Th17/Treg and M1/M2 ratios through suppression of ubiquitination-dependent HIF-1 $\alpha$  degradation[J]. *Cytokine*, 2023, 164: 156107. DOI: 10.1016/j.cyto.2022.156107.
- [5] CHENG L, JIAO Y, JIANG W, et al. IL-33 deficiency attenuates lung inflammation by inducing Th17 response and impacting the Th17/Treg balance in LPS-induced ARDS mice via dendritic cells[J]. *J Immunol Res*, 2022, 2022: 9543083. DOI: 10.1155/2022/9543083.
- [6] YU Z X, JI M S, YAN J, et al. The ratio of Th17/Treg cells as a risk indicator in early acute respiratory distress syndrome[J]. *Crit Care*, 2015, 19(1): 82. DOI: 10.1186/s13054-015-0811-2.
- [7] COURTIES A, BERENBAUM F, SELAM J. Vagus nerve stimulation in musculoskeletal diseases[J]. *Joint Bone Spine*, 2021, 88(3): 105149. DOI: 10.1016/j.jbspin.2021.105149.
- [8] LI S, QI D, LI J N, et al. Vagus nerve stimulation enhances the cholinergic anti-inflammatory pathway to reduce lung injury in acute respiratory distress syndrome via STAT3[J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7(1): 63. DOI: 10.1038/s41420-021-00431-1.
- [9] OGURA H, MURAKAMI M, OKUYAMA Y, et al. Interleukin-17 promotes autoimmunity by triggering a positive-feedback loop via interleukin-6 induction[J]. *Immunity*, 2008, 29(4): 628-636. DOI: 10.1016/j.immuni.2008.07.018.
- [10] CAMPOREALE A, POLI V. IL-6, IL-17 and STAT3: a holy trinity in auto-immunity?[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2012, 17(6): 2306. DOI: 10.2741/4054.
- [11] NAKAMURA Y, INOUE T. Neuroimmune communication in the kidney[J]. *JMA J*, 2020, 3(3): 164-174. DOI: 10.31662/jmaj.2020-0024.
- [12] UMBRELLO M, FORMENTI P, BOLGIAGHI L, et al. Current concepts of ARDS: a narrative review[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 18(1): 64. DOI: 10.3390/ijms18010064.
- [13] MIOSSEC P, KOLLS J K. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2012, 11(10): 763-776. DOI: 10.1038/nrd3794.
- [14] ZHANG X, WEI X, DENG Y, et al. Mesenchymal stromal cells alleviate acute respiratory distress syndrome through the cholinergic anti-inflammatory pathway[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 307. DOI: 10.1038/s41392-022-01124-6.
- [15] SHI Y, WEI B, LI L, et al. Th17 cells and inflammation in neurological disorders: possible mechanisms of action[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 932152. DOI: 10.3389/fimmu.2022.932152.
- [16] DING Q, LIU G Q, ZENG Y Y, et al. Role of IL-17 in LPS-induced acute lung injury: an *in vivo* study[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(55): 93704-93711. DOI: 10.18632/oncotarget.21474.
- [17] ZHANG Z T, XIE K, LUO R J, et al. Dexmedetomidine alleviates acute lung injury by promoting Tregs differentiation via activation of AMPK/SIRT1 pathway[J]. *Inflammopharmacology*, 2023, 31(1): 423-

438. DOI: 10.1007/s10787-022-01117-5.
- [18] 卓爱萍,王袁,杨雨涛,等. 过继转移过表达Pellino-1的调节性T细胞对自身免疫性早发性卵巢功能不全小鼠卵巢功能的修复作用[J]. 海军军医大学学报, 2023, 44(4):409-417. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20220346.  
ZHUO A P, WANG Y, YANG Y T, et al. Repairing effect of adoptive transfer of regulatory T cells overexpressing Pellino-1 on ovarian function of mice with autoimmune premature ovarian insufficiency[J]. Acad J Naval Med Univ, 2023, 44(4): 409-417. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20220346.
- [19] BROCKMANN L, TRAN A, HUANG Y, et al. Intestinal microbiota-specific Th17 cells possess regulatory properties and suppress effector T cells via c-MAF and IL-10[J]. Immunity, 2023, 56(12): 2719-2735.e7. DOI: 10.1016/j.immuni.2023.11.003.
- [20] LIU Y J, TANG B, WANG F C, et al. Parthenolide ameliorates colon inflammation through regulating Treg/Th17 balance in a gut microbiota-dependent manner[J]. Theranostics, 2020, 10(12): 5225-5241. DOI: 10.7150/thno.43716.
- [21] THOMPSON S L, O'LEARY G H, AUSTELLE C W, et al. A review of parameter settings for invasive and non-invasive vagus nerve stimulation (VNS) applied in neurological and psychiatric disorders[J]. Front Neurosci, 2021, 15: 709436. DOI: 10.3389/fnins.2021.709436.
- [22] CAPILUPI M J, KERATH S M, BECKER L B. Vagus nerve stimulation and the cardiovascular system[J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2020, 10(2): a034173. DOI: 10.1101/cshperspect.a034173.
- [23] WANG W, XU H, LIN H, et al. The role of the cholinergic anti-inflammatory pathway in septic cardiomyopathy[J]. Int Immunopharmacol, 2021, 90: 107160. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.107160.
- [24] BONAZ B, PICQ C, SINNIGER V, et al. Vagus nerve stimulation: from epilepsy to the cholinergic anti-inflammatory pathway[J]. Neurogastroenterol Motil, 2013, 25(3): 208-221. DOI: 10.1111/nmo.12076.
- [25] KHO W, VON HAEFEN C, PAESCHKE N, et al. Dexmedetomidine restores autophagic flux, modulates associated microRNAs and the cholinergic anti-inflammatory pathway upon LPS-treatment in rats[J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2022, 17(1/2): 261-276. DOI: 10.1007/s11481-021-10003-w.
- [26] DHAWAN S, DE PALMA G, WILLEMZE R A, et al. Acetylcholine-producing T cells in the intestine regulate antimicrobial peptide expression and microbial diversity[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2016, 311(5): G920-G933. DOI: 10.1152/ajpgi.00114.2016.

[本文编辑] 尹 茶