

DOI:10.7499/j.issn.1008-8830.2013.11.022

论著·实验研究

草分枝杆菌对哮喘小鼠 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞和 Th17 细胞平衡的影响

姚斌¹ 李敏² 庞英³

(1. 四川省医学科学院 / 四川省人民医院城东病区儿科, 四川 成都 610110;

2. 四川省医学科学院 / 四川省人民医院儿科, 四川 成都 610072;

3. 四川攀枝花市妇幼保健院儿科, 四川 攀枝花 617000)

[摘要] 目的 评估早期应用草分枝杆菌 F.U.36 注射液干预治疗对哮喘小鼠 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞 (Treg) 和 Th17 细胞平衡的影响, 探讨草分枝杆菌的免疫调节作用。方法 将 30 只雌性 BALB/c 小鼠随机分为对照组、哮喘组和草分枝杆菌治疗组 (治疗组), 每组 10 只。通过注射和雾化吸入鸡卵蛋白 (OVA) 制备哮喘模型; 治疗组于第 1 次致敏前 2 周腹腔注射草分枝杆菌 F.U.36 注射液 0.57 μg, 隔日 1 次, 共 3 次; 对照组以生理盐水代替致敏液。所有小鼠于末次激发后 24 h 处死, 取小鼠左肺组织作病理切片观察炎症改变; 同时利用流式细胞仪检测各组小鼠脾单个核细胞 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞、Th17 细胞占 CD4⁺T 细胞的百分比; 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测各组小鼠血清和支气管肺泡灌洗液中细胞因子 IL-10、IL-17 的表达水平。结果 哮喘小鼠脾单个核细胞 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞百分比及 IL-10 的表达水平较对照组明显降低 ($P<0.05$), Th17 细胞的百分比及 IL-17 表达水平较对照组明显增高 ($P<0.05$); 治疗组小鼠 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞百分比及 IL-10 表达水平较哮喘组明显升高 ($P<0.05$), 而 Th17 细胞百分比及 IL-17 表达水平较哮喘组明显降低 ($P<0.05$)。结论 早期应用草分枝杆菌 F.U.36 干预性治疗哮喘小鼠, 可增加 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞的数目并促进 IL-10 的产生, 同时抑制 Th17 细胞的表达及 IL-17 的产生。 [中国当代儿科杂志, 2013, 15 (11): 1018-1022]

[关键词] 哮喘; CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞; Th17 细胞; 草分支杆菌 F.U.36; 小鼠

Effect of Mycobacterium phlei F.U.36 on balance of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and Th17 cells in asthmatic mice

YAO Bin, LI Min, PANG Ying. Department of Pediatrics, East Ward, Sichuan Academy of Medical Science & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610110, China (Li M, Email: Lmscsy@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To evaluate the effect of early intervention with Mycobacterium phlei F.U.36 injection on the balance of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and Th17 cells in asthmatic mice, and to investigate the immunomodulatory effect of Mycobacterium phlei F.U.36. **Methods** Thirty female BALB/c mice were randomly divided into three groups: normal control ($n=10$), asthma model ($n=10$) and Mycobacterium phlei F.U.36 treatment groups ($n=10$). A mouse model of asthma was prepared by injection and aerosol inhalation of chicken ovalbumin in the asthma model and Mycobacterium phlei F.U.36 treatment groups, while mice in the normal control group were given normal saline instead. The treatment group was intraperitoneally injected with Mycobacterium phlei F.U.36 (0.57 μg, once every other day) three times in the first two weeks after the first sensitization. All mice were sacrificed at 24 hours after the last challenge. Left lung tissues of these mice were obtained and made into sections for observation of inflammatory changes. The percentages of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and Th17 cells in CD4⁺ T cells among splenic mononuclear cells were determined by flow cytometry. The levels of interleukin (IL)-10 and IL-17 in serum and bronchoalveolar lavage fluid were measured using ELISA. **Results** Compared with the normal control group, the asthma model group had significantly decreased percentages of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and IL-10 levels ($P<0.05$) and significantly increased percentages of Th17 cells and IL-17 levels ($P<0.05$). Compared with the asthma model group, the Mycobacterium phlei F.U.36 treatment group had significantly increased percentages of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells

[收稿日期] 2013-02-25; [修回日期] 2013-04-17

[基金项目] 四川省卫生厅科研项目 (070089)。

[作者简介] 姚斌, 男, 硕士, 医师。

[通信作者] 李敏, 主任医师。

and IL-10 levels ($P<0.05$) and significantly decreased percentage of Th17 cells and IL-17 levels ($P<0.05$). **Conclusions** Early intervention with Mycobacterium phlei F.U.36 can promote development of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and production of IL-10 and inhibit generation of Th17 cells and production of IL-17 in asthmatic mice.

[Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(11): 1018-1022]

Key words: Asthma; CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell; Th17 cell; Mycobacterium phlei F.U.36; Mice

支气管哮喘是由多种炎症细胞(嗜酸性粒细胞、中性粒细胞和T淋巴细胞等)共同参与并介导的气道慢性炎症性疾病。T细胞的免疫失衡在哮喘气道炎症中发挥着至关重要的作用。近年来研究发现Th1/Th2平衡理论在解释哮喘发病机制中存在局限^[1],实际上哮喘患者Th1/Th2免疫失衡只是一种“表面”现象,更进一步的病因机制可能是对变应原的“免疫耐受”异常和“免疫缺陷”所致。CD4⁺CD25⁺调节性T细胞(regulatory T cells, Treg)和Th17细胞之间平衡紊乱已成为人们研究哮喘免疫机制变化的新热点;调节哮喘患者的免疫功能成为治疗哮喘更为重要的发展方向。本研究通过建立哮喘小鼠动物模型,探讨CD4⁺CD25⁺Treg与Th17细胞在哮喘发病中的变化,并观察早期应用免疫调节剂草分枝杆菌F.U.36对其的影响。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

雌性SPF级7周龄BALB/c小鼠30只,体重约24~25g,购于四川大学医学实验动物中心,饲养于四川省人民医院实验动物房。采用随机数字表法分为对照组、哮喘组和草分枝杆菌F.U.36治疗组(治疗组),每组10只,分笼饲养,喂食不含致敏原的特殊饲料。

1.2 仪器和试剂

主要实验仪器包括低速离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司);压缩雾化吸入器(台湾雅博股份有限公司);CYTOMICSF500流式细胞仪(美国BACK MAN COULTER公司);SW-CJ-2FD超净工作台(苏州净化设备厂)。主要实验试剂包括鸡卵蛋白(美国Sigma公司);氢氧化铝(分析纯,成都天成化学试剂厂);小鼠淋巴细胞分离液(天津TDB生物技术发展中心);Anti-Mouse CD4 PE-Cy5、Anti-Mouse CD25 FITC、Anti-Mouse IL-17 FITC及相应同型对照等,均购于美国eBio-science公司。

1.3 动物模型制备

参照唐晓媛等^[2]以及Sakai等^[3]提出的方法

略加调整制备哮喘动物模型,即将哮喘组小鼠分别于实验第0天和第14天给予鸡卵蛋白和氢氧化铝混合液0.2mL(含鸡卵蛋白100μg,氢氧化铝2mg)腹腔注射;第21天开始,予以2%鸡卵蛋白每天雾化吸入30min,连续雾化5d激发制备哮喘模型;治疗组于第1次致敏前2周腹腔注射草分枝杆菌F.U.36注射液(乌体林斯)0.57μg,隔日1次,共3次,余操作步骤同哮喘组;对照组则给予生理盐水代替致敏液行腹腔注射和雾化。

1.4 标本采集

末次雾化激发后24h,各组取小鼠眼球动脉血约1mL,离心收集小鼠血清,-20℃保存备用;然后引颈处死小鼠,用眼科剪在气管上小心剪一细微小口,用留置针做气管插管,PBS缓冲液500μL灌洗两次,注射器回抽灌洗液,将回抽的支气管肺泡灌洗液(BALF)离心收集上清,置于-20℃保存备用。

1.5 流式细胞仪检测CD4⁺CD25⁺Treg细胞及Th17细胞

取各组小鼠脾脏,剪成1~2mm大小的小块置于不锈钢细胞筛上研磨、过滤,加入小鼠淋巴细胞分离液,以密度梯度离心法分离制备脾组织单个核细胞悬液。流式细胞仪检测各组CD4⁺CD25⁺Treg细胞以及Th17细胞占CD4⁺T细胞的百分率。

1.6 肺组织病理切片的制备

取小鼠左肺,4%多聚甲醛溶液固定2d,经脱水与透明、石蜡包埋、切片、苏木精-伊红(HE)染色,观察肺组织形态结构及炎症情况。

1.7 血清和BALF中的IL-10及IL-17的检测

参照试剂盒说明书进行。

1.8 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件对数据进行统计学分析。先对各组数据进行正态性检验和方差齐性检验,若符合正态性分布或方差齐时,计量资料以均数±标准差($\bar{x}±s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较行SNK-*q*检验;若不符合正态分布或方差不齐,可经数据转换后再进行方差分析和*q*检验。双变量间的相关性分析采用直线相关分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 哮喘模型的成功建立

小鼠腹腔注射 OVA 致敏，经 OVA 雾化激发后出现烦躁不安或少动、呼吸加快甚至呼吸困难、口唇发绀、毛发竖起、反应迟钝、二便失禁等急性哮喘发作症状；治疗组上述症状明显减轻；对照组小鼠未见异常表现。肺部病理切片显示对照组肺组织结构清晰，无气道炎症表现；哮喘组细支气管及血管周围均可见以嗜酸性粒细胞、淋巴细胞增多为主的炎性细胞浸润，支气管管壁增厚，管腔狭窄，部分细支气管上皮细胞脱落不完整；治疗组气道炎症表现较哮喘组明显减轻。见图 1。

2.2 各组小鼠 CD4⁺CD25⁺Treg 及 Th17 细胞的水平

哮喘组小鼠 CD4⁺CD25⁺Treg/CD4⁺T 细胞的百分比较对照组降低 ($P<0.05$)；治疗组小鼠 CD4⁺CD25⁺Treg/CD4⁺T 细胞的百分比较哮喘组小鼠增高 ($P<0.05$)，与对照组比较差异无统计学意义。而 Th17 细胞在各组的水平变化与 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞恰相反。见表 1，图 2~3。

2.3 各组 CD4⁺CD25⁺Treg/Th17 细胞比值的变化

哮喘组 CD4⁺CD25⁺Treg/Th17 细胞比值较对照组降低 ($P<0.05$)；治疗组 CD4⁺CD25⁺Treg/Th17 细胞比值较哮喘组小鼠增高 ($P<0.05$)，与对照组比较差异无统计学意义。见表 1。

2.4 各组小鼠 BALF 和血清中 IL-10 和 IL-17 的含量比较

哮喘组小鼠 BALF、血清中 IL-10 表达水平较对照组小鼠降低 ($P<0.05$)；治疗组小鼠 BALF、血清中 IL-10 表达水平较哮喘组小鼠增高 ($P<0.05$)，但仍低于对照组 ($P<0.05$)；而 BALF、血清中 IL-17 在各组的表达水平变化与 IL-10 恰相反。见表 2。

2.5 各组小鼠 CD4⁺CD25⁺Treg 与 Th17 细胞及细胞因子相关性分析

各组小鼠脾细胞悬液 CD4⁺CD25⁺Treg 与 Th17 细胞的数量呈负相关 ($r=-0.925$, $P<0.05$)。CD4⁺CD25⁺Treg/Th17 比值与 BALF 及血清中的 IL-10 表达水平呈正相关 (分别 $r=0.963$ 、 0.919 , 均 $P<0.05$)；与 BALF 及血清中 IL-17 表达水平呈负相关 (分别 $r=-0.834$ 、 -0.849 , 均 $P<0.05$)。

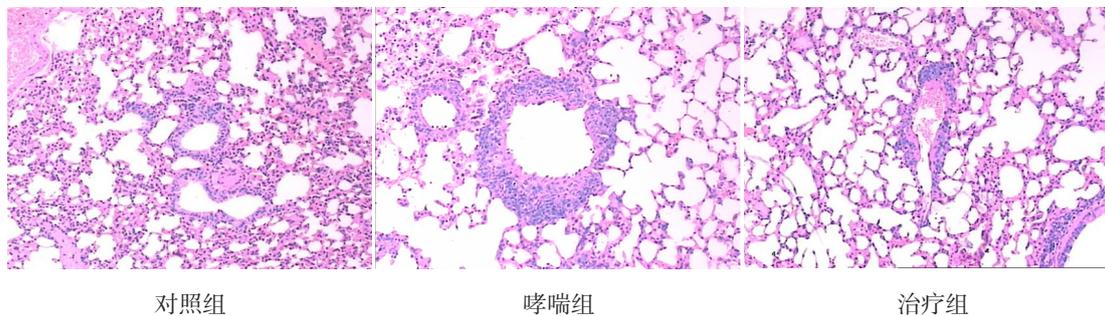


图 1 各组肺组织病理切片 (苏木精-伊红染色, $\times 100$) 对照组未见气道炎症改变;哮喘组细支气管及血管周围均可见嗜酸性粒细胞浸润;治疗组炎症较哮喘组明显减轻。

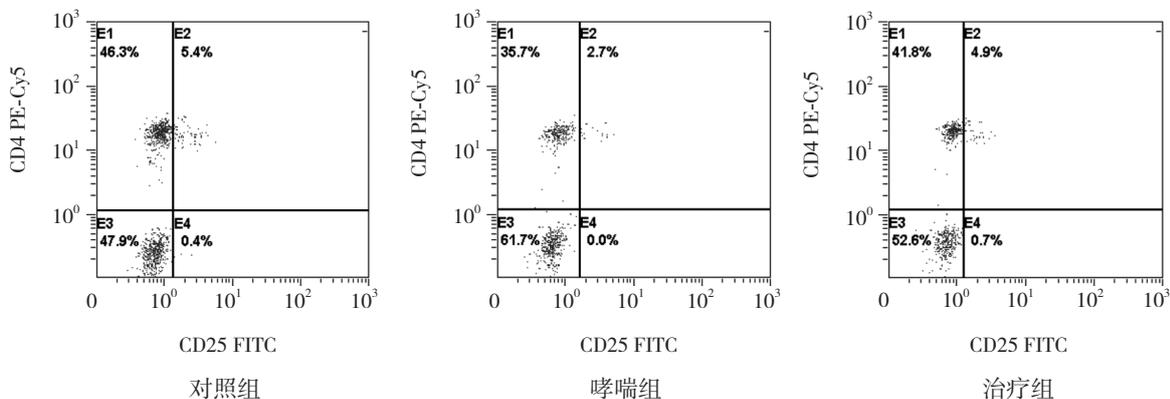


图 2 各组小鼠脾脏单核细胞 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞流式细胞分析图

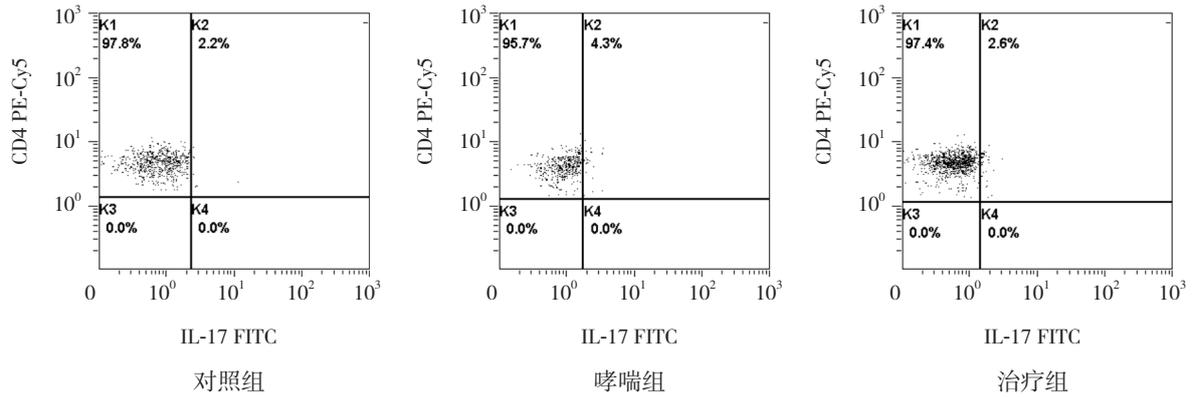


图3 各组小鼠脾脏单核细胞 Th17 细胞流式细胞分析图

表1 各组小鼠脾脏单个核细胞 CD4⁺CD25⁺Treg 及 Th17 细胞数目的变化情况 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	CD4 ⁺ CD25 ⁺ /CD4 ⁺	Th17/CD4 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺ /Th17
对照组	4.98 ± 0.36	2.56 ± 0.44	2.12 ± 0.67
哮喘组	3.11 ± 0.49 ^a	4.20 ± 0.52 ^a	0.68 ± 0.06 ^a
治疗组	5.10 ± 0.25 ^b	2.62 ± 0.37 ^b	1.94 ± 0.06 ^b
F 值	86.076	50.56	84.90
P 值	<0.05	<0.05	<0.05

a: 与对照组相比, $P < 0.05$, b: 与哮喘组相比, $P < 0.05$ 。

表2 各组小鼠 BALF 和血清中 IL-10、IL-17 水平 ($\bar{x} \pm s, \text{pg/mL}, n=10$)

组别	BALF IL-10	血清 IL-10	BALF IL-17	血清 IL-17
对照组	50.7 ± 9.6	62.5 ± 12.7	4.4 ± 0.9	9.7 ± 1.3
哮喘组	14.3 ± 3.3 ^a	14.6 ± 2.5 ^a	14.9 ± 2.9 ^a	24.4 ± 3.5 ^a
治疗组	25.0 ± 1.3 ^{a,b}	36.7 ± 5.7 ^{a,b}	8.4 ± 2.2 ^{a,b}	16.5 ± 1.9 ^{a,b}
F 值	50.456	38.475	36.242	25.564
P 值	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

a: 与对照组比较, $P < 0.05$, b: 与哮喘组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

Treg 细胞和 Th17 细胞是近年来发现的、共同来源于初始 CD4⁺T 细胞的新亚类, 在哮喘和过敏性疾病的发生和发展中起重要调节作用^[4]。通过对二者及相互间作用的研究, 使人们对哮喘的免疫学机制有了进一步的认识和理解。

Treg 细胞是维持外周免疫耐受的关键细胞, 并能介导自身抗原诱导的免疫耐受, 抑制哮喘的发病。CD4⁺CD25⁺Treg 细胞是目前研究较多的亚类, 主要通过分泌的抑制性细胞因子 IL-10、转化生长因子-β (TGF-β) 来发挥免疫抑制作用^[5]。本研究中哮喘小鼠脾脏单个核细胞 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞百分率较对照组明显降低, 血清中细胞因子 IL-10 的表达也明显降低, 与本课题组前期的研究结果一致^[6]。进一步证实了 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞及其细胞因子 IL-10 参与了哮喘的发病。Th17 细胞是由 CD4⁺ 初始 T 细胞经抗原活化后直接分化成为功能独立的 T 辅助细胞亚群。其产生的细胞因子 IL-17A、IL-17F、IL-22、IL-6 以及肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 等在自身免疫性疾病的发生发展中起着非常重要的作用。IL-17 通过促进炎症细胞因子的释放, 可促使 T 细胞诱导产生甚至扩大炎症反应, 还可在气道炎症反应过程中招募中性粒细胞, 进一步促进多种炎症细胞释放炎症因子, 加重气

道的阻塞和气道的高反应性^[7]。本研究发现哮喘模型小鼠脾脏组织悬液中 Th17 细胞占 CD4⁺T 细胞的百分率显著高于对照组, BALF、血清中 IL-17 表达水平明显升高, 提示 Th17 细胞及其分泌的细胞因子 IL-17 确实参与了哮喘的免疫调节作用, 其数目的增加和细胞因子的高表达可能是哮喘发生、发展或急性加重的原因之一。

近期研究发现, CD4⁺CD25⁺Treg 与 Th17 细胞之间在分化上互相影响、在功能上相互拮抗, 共同维持机体免疫状态的相对稳定, 使机体处于复杂的免疫平衡状态。活化 CD4⁺T 细胞在 TGF-β 作用下分化为抗炎的 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞, 而在 TGF-β 和高浓度 IL-6 都存在的情况下则分化为促炎的 Th17 细胞而抑制 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞的分化。同时, CD4⁺CD25⁺Treg 细胞还能通过分泌 TGF-β 促进 Th17 细胞的发育, 在缺乏外源性 TGF-β 并有 IL-6 存在的情况下, CD4⁺CD25⁺Treg 细胞本身也可以分化为 Th17 细胞, 反之, 抑制 Th17 细胞的产生可促进 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞的发育^[8]。本实验发现在哮喘小鼠 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞数量及相关细胞因子 IL-10 显著降低的同时, Th17 细胞及细胞因子 IL-17 显著增高, 且 CD4⁺CD25⁺Treg 和 Th17 细胞之间存在负相关关系。CD4⁺CD25⁺Treg/Th17 比值与 BALF 及血清中的 IL-10 表达水平呈正相关, 与 BALF 及血清中的 IL-17 表达水平呈负相关, 提

示哮喘小鼠在伴随 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞数量和功能的下调时出现了 Th17 细胞数量的表达增加的免疫失衡状态。初步证实小鼠哮喘发作时体内存在与 Th1/Th2 免疫失衡相类似的 CD4⁺CD25⁺Treg/Th17 免疫失衡。由此推测在 CD4⁺CD25⁺Treg/Th17 细胞之间免疫失衡也是支气管哮喘发病的重要原因。

草分枝杆菌 F.U.36 注射液（乌体林斯）主要成份是灭活的草分枝杆菌，其抗原类似于结核分枝杆菌。近年来研究发现，分枝杆菌的接种或感染可增强转录因子 Foxp3 表达，诱导 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞的增殖和活化^[9]，并抑制 IL-17 的产生^[10]。乌体林斯通过增加 Th 细胞活性，促进 Th 细胞分泌 B 细胞生长因子和分化因子，使 B 细胞增殖、分化并形成特异性抗体；进一步刺激机体产生 IL-2、IL-4、TNF- α 、 γ -干扰素（IFN- γ ）等细胞因子，促进 T 细胞增殖、分化，增强 NK 细胞活性来调节机体的特异性细胞免疫反应^[11]。基础研究发现 IFN- γ 和 IL-4 对 TGF- β 诱导 Th17 细胞的分化起抑制作用。IFN- γ 与 IL-4 抑制 TGF- β 下游信号转导蛋白 Smad3 磷酸化，使 Smad3 对 TGF- β 受体的作用被阻断，从而抑制 TGF- β 的功能^[12]。在本课题组的前期研究中已证实，哮喘组小鼠应用草分枝杆菌治疗后增加了脾脏 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞的百分率、促进了 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞的 Toll 样受体 4（toll like receptor 4, TLR4）表达，从而增强其免疫抑制功能^[13]。而本研究发现草分枝杆菌治疗组小鼠脾脏 Th17 /CD4⁺T 细胞百分比及其 IL-17 的表达较哮喘组明显降低，CD4⁺CD25⁺Treg/Th17 比值较哮喘组明显增高，故本研究认为草分枝杆菌同样可以通过上调 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞及 IL-10 表达，通过分泌 IFN- γ 和 IL-4 来抑制 Th17 细胞的分化及功能，从而下调 Th17 细胞数量及降低 IL-17 的表达，来纠正机体 CD4⁺CD25⁺Treg/Th17 的免疫失衡状态。

总之，CD4⁺CD25⁺Treg 细胞、Th17 细胞及其细胞因子 IL-10、IL-17 参与了哮喘发病过程，CD4⁺CD25⁺Treg/Th17 的免疫失衡可能是对哮喘发病机制学说的重要补充。乌体林斯作为一种免疫调节剂，早期干预性治疗哮喘小鼠，可通过纠正

CD4⁺CD25⁺Treg/Th17 的免疫失衡从而改善哮喘小鼠的免疫状态。由此推测在今后的临床工作中，若对具有患哮喘高风险因素的儿童进行有效的早期免疫干预，可能会起到避免哮喘的发病或减轻哮喘症状的目的。

[参 考 文 献]

- [1] Rutkowski R, Moniuszko T, Stasiak-Barmuta A. CD80 and CD86 expression on LPS- stimulated monocytes and the effect of CD80 and CD86 blockade on IL-4 and IFN- γ production in nonatopic bronchial asthma[J]. Arch Immunol Ther Exp, 2003, 51(6): 421-428.
- [2] 唐晓媛, 于化鹏, 邓火金, 陈新, 樊慧珍, 龚雨新. 不同剂量致敏原对小鼠哮喘模型气道反应性的影响[J]. 现代医学, 2011, 39(2): 121-125.
- [3] Sakai K, Yokoyama A, Kohno N, Hiwada K. Effect of different sensitizing doses of antigen in a murine model of atopic asthma[J]. Clin Exp Immunol, 1999, 118(1): 9-15.
- [4] Kay AB. Allergy and allergic diseases. First of two Parts[J]. N Engl J Med, 2001, 344(1): 30-37.
- [5] 朱洪志, 吴尚洁. CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞与支气管哮喘的研究[J]. 中华哮喘杂志, 2012, 6(4): 274-276.
- [6] 李敏, 宋丽, 张建波, 房俊, 李兰. 糖皮质激素对哮喘小鼠 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的作用[J]. 中国当代儿科杂志, 2008, 10(4): 527-530.
- [7] Semik-Orzech A, Barczyk A, Pierzcha W. The role of interleukin 17A in inducing neutrophilic inflammation in the pulmonary tract[J]. Pol Merkuri Lekarski, 2007, 22(129): 163-168.
- [8] Park H. Retinoic acid increases FoxP3⁺ regulatory T cells and inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF- β driven Smad3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression[J]. Nat Immunol, 2005, 6(11): 1133.
- [9] Guyot-Revol V, Innes JA, Hackforth S. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in tuberculosis patients[J]. Am J Respir Care Med, 2006, 173: 803-810.
- [10] 陈伟超, 刘恩梅, 邓昱, 何云, 陈杰华, 李欣, 等. 新生期卡介苗接种对实验性哮喘小鼠肺 Th17 细胞和 IL-17 的影响[J]. 中国当代儿科杂志, 2010, 12(8): 650-653.
- [11] 刘文娟. 乌体林斯对支气管哮喘病儿免疫功能的影响分析[J]. 中国实用医药, 2012, 7(30): 166-167.
- [12] Wahl SM, Wen J, Moutso P. TGF- β : a mobile purveyor of immune privilege[J]. Immunol Rev, 2006, 213(1): 213-217.
- [13] 庞英, 李敏, 张建波, 姚斌. 草分枝杆菌对哮喘小鼠调节性 T 细胞和 TLR4 的表达的影响[J]. 中国当代儿科杂志, 2011, 13(11): 917-920.

（本文编辑：万静）