

转化生长因子- β /Smad 信号通路对急性肺损伤小鼠免疫平衡的影响

孙宏 刘显东 吕迪宇 包晓玮 白建文 唐伦先

200120 上海, 同济大学附属东方医院急诊内科

通讯作者: 唐伦先, Email: 456tlx@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.11.004

【摘要】 **目的** 探讨转化生长因子- β (TGF- β)/Smad 信号通路对急性肺损伤 (ALI) 小鼠肺组织辅助性 T 细胞 17/调节性 T 细胞 (Th17/Treg) 平衡的影响及机制。**方法** 按随机数字表法将 60 只雄性 C57BL/6 小鼠分为 3 组, 每组 20 只。白细胞介素-17 (IL-17) 预处理组先经腹腔注射抗小鼠 IL-17 单克隆抗体 200 μ g, ALI 模型组则注射 200 μ g 同型对照抗体 IgG2a; 24 h 后两组均经气管内注入脂多糖 (LPS) 4 mg/kg [溶于 30 μ L 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中] 诱导 ALI 小鼠模型, 对照组经气管内滴注 30 μ L PBS。各组于制模后 24 h 处死小鼠, 取肺组织和支气管肺泡灌洗液 (BALF)。光镜下观察肺组织病理学改变; 测定肺湿/干重 (W/D) 比值和 BALF 中蛋白含量; 用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测肺组织匀浆中 IL-6、IL-10、IL-17A 和 TGF- β 1 水平; 流式细胞仪检测肺组织中 Treg 和 Th17 细胞量; 实时定量聚合酶链反应 (PCR) 检测肺组织维甲酸相关核受体 γ t (ROR- γ t)、TGF- β 1、叉头蛋白 P3 (Foxp3)、Smad2、Smad3、Smad7 的 mRNA 表达; 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测肺组织磷酸化 Smad2/3、Smad7 (p-Smad2/3、p-Smad7) 表达。**结果** 与对照组比较, ALI 模型组肺组织可见大量炎性细胞浸润, 伴有肺泡壁间隔增厚、充血水肿/塌陷和点状出血; 肺 W/D 比值、BALF 中蛋白含量及肺组织 IL-6、IL-17A、TGF- β 1 水平、Th17/Treg 细胞比例、ROR- γ t、TGF- β 1、Foxp3、Smad2、Smad3 的 mRNA 表达明显升高, Smad7 mRNA 表达明显下降。与 ALI 模型组比较, IL-17 预处理组镜下显示, 肺损伤明显减轻; 肺 W/D 比值明显减小 (5.84 \pm 0.65 比 8.27 \pm 1.32), BALF 中蛋白含量明显降低 (g/L: 0.09 \pm 0.02 比 0.18 \pm 0.05); 肺组织 IL-6 (pg/mg: 465 \pm 105 比 1098 \pm 145)、IL-17A (pg/mg: 32 \pm 12 比 876 \pm 178)、TGF- β 1 (pg/mg: 45 \pm 10 比 96 \pm 26) 明显下降; 肺组织 Th17 细胞量 [(6.78 \pm 0.35)% 比 (11.32 \pm 1.25)%] 和 Th17/Treg 比值 (1.24 \pm 0.29 比 1.98 \pm 0.21) 明显降低; 肺组织 ROR- γ t、TGF- β 1、Smad2、Smad3 的 mRNA 表达 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 1.04 \pm 0.05 比 2.32 \pm 0.34, 2.38 \pm 0.12 比 3.48 \pm 0.31, 2.44 \pm 0.12 比 3.25 \pm 0.34, 2.36 \pm 0.09 比 2.98 \pm 0.13) 和 p-Smad2/3 (A 值: 1.78 \pm 0.25 比 2.58 \pm 0.32) 明显下降, Smad7 mRNA 表达 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 0.84 \pm 0.09 比 0.69 \pm 0.03) 和 p-Smad7 (A 值: 0.76 \pm 0.12 比 0.53 \pm 0.05) 明显升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 而 Foxp3 mRNA 表达相当 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 1.74 \pm 0.05 比 1.62 \pm 0.13, $P > 0.05$)。各组肺组织 IL-10 水平差异无统计学意义。**结论** Th17/Treg 失衡可能参与了 ALI 的发生, TGF- β /Smad 信号通路调控了 Th17/Treg 的免疫失衡。

【关键词】 急性肺损伤; 辅助性 T 细胞 17; 调节性 T 细胞; 转化生长因子- β 1; Smad

基金项目: 国家自然科学基金 (81500059); 上海市浦东新区科技发展创新基金 (PYJ2012-Y09); 上海市浦东新区卫计委优秀学科带头人附带课题 (PWRd2014-08)

Regulatory role of transforming growth factor- β /Smad pathway on immune imbalance in a mouse model of acute lung injury

Sun Hong, Liu Xiandong, Lyu Diyu, Bao Xiaowei, Bai Jianwen, Tang Lunxian

Department of Internal Emergency, East Hospital, Tongji University, Shanghai 200120, China

Corresponding author: Tang Lunxian, Email: 456tlx@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the regulatory role and its mechanism of transforming growth factor- β (TGF- β)/Smad pathway on the balance of helper T cell 17/T-regulatory cells (Th17/Treg) in a mouse model of acute lung injury (ALI). **Methods** Sixty C57BL/6 mice were divided into three groups according to randomize number table method: control group ($n = 20$), ALI model group ($n = 20$), and interleukin-17 (IL-17) antibody (Ab) pretreatment group ($n = 20$). The mice in IL-17 Ab pretreatment group were delivered 200 μ g IL-17 Ab intraperitoneally, while the ALI model group were given 200 μ g Iso-IgG2a. Both groups were challenged by 4 mg/kg lipopolysaccharides (LPS) [dissolved in 30 μ L phosphate buffer saline (PBS)] intratracheally to induce ALI. The mice in control group were given 30 μ L PBS. Twenty-four hours later, all mice were sacrificed and lung tissues and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were harvested. The pathological images were observed under light microscope, the lung wet weight/dry weight (W/D) ratio and the protein content in BALF were measured to assess the severity of lung injury. The levels of IL-6, IL-10, IL-17A and TGF- β 1 in lung homogenates were assessed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The ratio of Treg and Th17 was examined by flow cytometer. The mRNA expression levels of retinoid-related orphan nuclear receptor γ t (ROR- γ t), TGF- β 1, Foxp3, Smad2, Smad3 and Smad7 were quantitatively measured by real-

time polymerase chain reaction (PCR). The phosphates Smad2/3 and Smad7 (p-Smad2/3, p-Smad7) of lung tissues were detected by Western Blot. **Results** Compared with the control group, a large number of inflammatory cells infiltration could be observed and accompanied by alveolar septal thickening, alveolar congestion and edema/collapse and dot bleeding; the ratio of W/D, the protein levels in BALF, the concentrations of IL-6, IL-17A and TGF- β 1 in lung tissue homogenates, the ratio of Th17/Treg and the mRNA expressions of ROR- γ t, TGF- β 1, Foxp3, Smad2, and Smad3 were significantly elevated, the mRNA expression of Smad7 was significantly decreased in the ALI model group (all $P < 0.05$). Interestingly, compared with the ALI model group, the obvious reduction in the disruption of lung tissue structure and congestion were seen under light microscope; the ratio of W/D (5.84 ± 0.65 vs. 8.27 ± 1.32), the protein levels in BALF (g/L: 0.09 ± 0.02 vs. 0.18 ± 0.05), the concentrations of IL-6 (pg/mg: 465 ± 105 vs. $1\ 098 \pm 145$), IL-17A (pg/mg: 32 ± 12 vs. 876 ± 178) and TGF- β 1 (pg/mg: 45 ± 10 vs. 96 ± 26) in lung tissue homogenates were significantly decreased in IL-17 Ab pretreatment group (all $P < 0.05$). In addition, all mice with pretreatment of IL-17 Ab resulted in significantly reduced percentage of Th17 [(6.78 ± 0.35)% vs. (11.32 ± 1.25)%] and ratio of Th17/Treg (1.24 ± 0.29 vs. 1.98 ± 0.21), mRNA expressions of ROR- γ t, TGF- β 1, Smad2, and Smad 3 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 1.04 ± 0.05 vs. 2.32 ± 0.34 , 2.38 ± 0.12 vs. 3.48 ± 0.31 , 2.44 ± 0.12 vs. 3.25 ± 0.34 , 2.36 ± 0.09 vs. 2.98 ± 0.13), and the p-Smad2/3 (A value: 1.78 ± 0.25 vs. 2.58 ± 0.32) was significantly decreased, while the mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 0.84 ± 0.09 vs. 0.69 ± 0.03) and protein expression of p-Smad7 (A value: 0.76 ± 0.12 vs. 0.53 ± 0.05) was significantly up-regulated in lung tissue homogenates, the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). The mRNA expression of Foxp3 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 1.74 ± 0.05 vs. 1.62 ± 0.13 , $P > 0.05$) was similar. There were no significant differences in protein levels of IL-10 of lung tissue among all the groups. **Conclusion** The imbalance of Th17/Treg may play an important role in the immunological mechanism of ALI, which may be partially modulated by TGF- β /Smad pathway.

【Key words】 Acute lung injury; Helper T cell 17; T-regulatory cell; Transforming growth factor- β 1; Smad

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81500059); Technical Development Fund of Pudong New District in Shanghai (PYJ2012-Y09); Academic Leadership of Health Bureau of Pudong New District in Shanghai (PWRd2014-08)

急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 是由感染、创伤、中毒、输血等各种肺内/外因素导致的急性肺损伤 (ALI)。尽管呼吸支持治疗等危重病救治手段不断进步, ARDS 病死率仍高达 40% 左右^[1], 迄今为止, 其病理生理发病机制尚未完全阐明, 但无疑免疫炎症反应影响着 ARDS 的进展及预后。近来研究发现, 促炎性 CD4⁺ T 细胞亚群辅助性 T 细胞 17 (Th17) 和抑炎性调节性 T 细胞 (Treg) 间的失衡介导了许多免疫炎症性疾病的发生发展。本课题组前期通过建立失血性休克/脓毒症双打击致 ALI 小鼠模型发现, 预清除 Treg 的小鼠经双打击后肺部损伤加重, 肺组织白细胞介素-17A (IL-17A) 水平增加, 过继输入 Treg 细胞能明显减轻受体小鼠肺部损伤^[2-3], 提示 ALI 小鼠肺组织中可能存在 Th17/Treg 失衡。Treg 与 Th17 之间的关系复杂多样, 二者在功能和分化上互相遏制^[4], 但确切调控机制亟待阐明。近来研究发现转化生长因子- β (TGF- β)/Smad 信号通路在机体 Treg/Th17 分化平衡中起重要的调控作用^[5], 而有关其在 ALI 中对 Treg/Th17 平衡的调控作用鲜见报道。

本研究中通过观察脂多糖 (LPS) 诱导 ALI 模型小鼠肺组织中 Treg 和 Th17 的表达变化及其与 TGF- β /Smad 信号通路的关系, 探讨 Th17/Treg 平衡在 ALI 发病中的重要作用及可能调控机制, 为揭

示 ARDS 的免疫学发病机制并在此环节上进行治疗干预奠定基础。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型制备: 健康雄性 C57BL/6 小鼠 60 只, 10~12 周龄, 体重 28~30 g, 购自上海交通大学医学院, 动物合格证号: SYXK2015-2-0007。按随机数字表法将小鼠分为 3 组, 每组 20 只。经气管内注入 LPS 4 mg/kg [溶于 30 μ L 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中] 诱导 ALI 小鼠模型^[6], 对照组气管内滴注 30 μ L PBS。IL-17 预处理组于制模前 24 h 经腹腔注射抗小鼠 IL-17 单克隆抗体 200 μ g 进行预处理, ALI 模型组腹腔注射 200 μ g 同型对照抗体 IgG2a。

本研究得到同济大学医学部动物管理和应用委员会的许可, 动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.2 检测指标及方法: 各组小鼠于制模后 24 h 处死, 留取肺组织待检。

1.2.1 肺湿/干重 (W/D) 比值测定: 取左肺上叶组织, 吸干表面水分、清除血渍后称湿重, 60 $^{\circ}$ C 恒温干燥箱中 72 h 称干重, 计算肺 W/D 比值。

1.2.2 肺组织病理学观察: 取右肺上叶组织, 经石蜡包埋、固定、切片、苏木素-伊红 (HE) 染色后, 镜下观察肺组织病理学改变。

1.2.3 肺泡蛋白渗漏测定: 经右肺缓慢注入 0.6 mL 生理盐水后回抽, 重复 2 次, 留取支气管肺泡灌洗液

(BALF)约1 mL, 4℃离心8 min取上清,按照BCA法检测蛋白含量。

1.2.4 流式细胞仪检测肺组织 Treg、Th17 细胞比例:取左肺下叶组织,PBS调整细胞数至 1×10^9 /mL,使用荧光标记抗体进行细胞表面标记和胞内细胞因子染色[别藻蓝蛋白(APC)标记的抗小鼠CD4、藻红蛋白(PE)标记的抗小鼠叉头蛋白P3(Foxp3)和抗小鼠IL-17A均购自美国eBioscience公司],应用流式分析仪检测肺组织中Th17、Treg占CD4⁺T细胞的比例(CD4⁺IL-17A⁺/CD4⁺、CD4⁺Foxp3⁺/CD4⁺)及Th17/Treg比值。

1.2.5 肺组织细胞因子水平测定:取右下肺组织制备组织匀浆,按酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(美国R&D公司)说明书检测IL-6、IL-10、IL-17A和TGF-β1水平。

1.2.6 实时定量聚合酶链反应(PCR)检测肺组织中维甲酸相关孤儿核受体γt(ROR-γt)、TGF-β1、Foxp3、Smad2、Smad3、Smad7的mRNA表达:提取右肺组织总RNA,进行纯度鉴定并测定RNA浓度。反转录合成cDNA,以cDNA为模板进行PCR反应。反应条件:95℃变性30s,60℃退火1min,72℃延伸30s,循环40次。以2^{-ΔΔCt}法计算基因表达量。

1.2.7 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测肺组织中活化Smad2/3、Smad7的表达:取右下肺组织制备组织匀浆,提取总蛋白测蛋白含量。取20 μg蛋白样品,经电泳、转膜、封闭后依次加入兔抗鼠磷酸化Smad(p-Smad2/3、p-Smad7)一抗4℃过夜、辣根过氧化物酶(HRP)耦联的二抗室温孵育1h,含吐温20的Tris-HCl缓冲盐溶液(TBST)洗膜后加入增强化学发光(ECL)试剂,X线曝光,测定条带吸光度(A)值,与内参照3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)进行半定量分析。

1.3 统计学分析:使用GraphPad Prism 5软件统计数据,正态分布计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用非配对student t检验,多组间比较采用单因素方差

分析(one-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织病理学观察(图1):对照组肺组织结构正常;ALI模型组肺组织有大量炎性细胞浸润,肺泡壁间隔增厚、充血水肿/塌陷、点状出血;IL-17预处理组肺损伤程度较ALI模型组明显减轻。

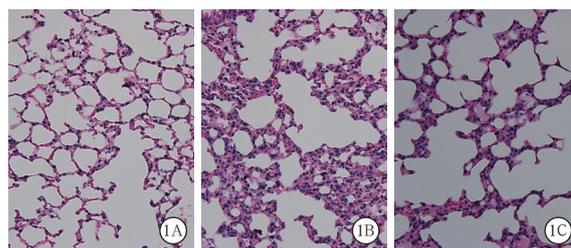


图1 光镜下观察各组小鼠肺组织病理学改变 对照组(A)肺组织结构正常;急性肺损伤(ALI)模型组(B)肺组织有大量炎性细胞浸润,肺泡明显充血,肺泡壁增厚;白细胞介素-17预处理组(C)肺组织损伤较ALI模型组明显减轻,仅见少量出血及炎性细胞浸润 HE染色 中倍放大

2.2 各组肺W/D比值、BALF中蛋白含量和肺组织细胞因子水平比较(表1):ALI模型组肺W/D比值、BALF中蛋白含量及肺组织中IL-6、IL-17A和TGF-β1水平均较对照组明显升高;IL-17预处理组上述指标则较ALI模型组明显降低(均 $P < 0.05$)。3组肺组织IL-10比较无统计学差异($P > 0.05$)。

2.3 各组肺组织Th17、Treg细胞比例比较(表2):ALI模型组CD4⁺IL-17A⁺/CD4⁺、CD4⁺Foxp3⁺/CD4⁺及Th17/Treg比值均较对照组明显升高。IL-17预处理组CD4⁺IL-17A⁺/CD4⁺和Th17/Treg比值较ALI模型组明显降低(均 $P < 0.05$);而CD4⁺Foxp3⁺/CD4⁺虽有下降趋势,但无统计学差异($P > 0.05$)。

表2 各组小鼠肺组织Th17和Treg细胞水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	CD4 ⁺ IL-17A ⁺ /CD4 ⁺ (%)	CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	Th17/Treg比值
对照组	20	3.56 ± 0.28	2.74 ± 0.21	1.32 ± 0.15
ALI模型组	20	11.32 ± 1.25 ^a	6.23 ± 1.32 ^a	1.98 ± 0.21 ^a
IL-17预处理组	20	6.78 ± 0.35 ^b	5.93 ± 0.98	1.24 ± 0.29 ^b

注:Th17为辅助性T细胞17,Treg为调节性T细胞,ALI为急性肺损伤,IL-17为白细胞介素-17;与对照组比较,^a $P < 0.05$;与ALI模型组比较,^b $P < 0.05$

表1 各组小鼠BALF中蛋白含量及肺组织W/D比值和细胞因子水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	BALF蛋白(g/L)	肺W/D比值	肺IL-6(pg/mg)	肺IL-10(pg/mg)	肺IL-17A(pg/mg)	肺TGF-β1(pg/mg)
对照组	20	0.06 ± 0.01	3.74 ± 0.22	386 ± 68	245 ± 39	167 ± 39	25 ± 8
ALI模型组	20	0.18 ± 0.05 ^a	8.27 ± 1.32 ^a	1098 ± 145 ^a	256 ± 75	876 ± 178 ^a	96 ± 26 ^a
IL-17预处理组	20	0.09 ± 0.02 ^{ab}	5.84 ± 0.65 ^{ab}	465 ± 105 ^{ab}	264 ± 68	32 ± 12 ^{ab}	45 ± 10 ^{ab}

注: BALF为支气管肺泡灌洗液,肺W/D比值为肺组织湿/干重比值,ALI为急性肺损伤,IL-17、IL-6、IL-10、IL-17A为白细胞介素-17、-6、-10、-17A,TGF-β1为转化生长因子-β1;与对照组比较,^a $P < 0.05$;与ALI模型组比较,^b $P < 0.05$

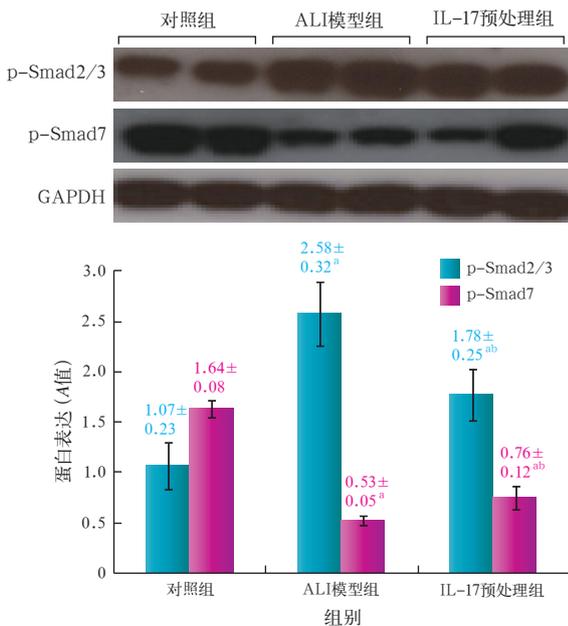
表3 各组小鼠肺组织 ROR- γ t、TGF- β 1、Foxp3、Smad2、Smad3、Smad7 的 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	ROR- γ t mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	TGF- β 1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	Foxp3 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	Smad2 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	Smad3 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	Smad7 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
对照组	20	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.02
ALI 模型组	20	2.32 ± 0.34 ^a	3.48 ± 0.31 ^a	1.62 ± 0.13 ^a	3.25 ± 0.34 ^a	2.98 ± 0.13 ^a	0.69 ± 0.03 ^a
IL-17 预处理组	20	1.04 ± 0.05 ^b	2.38 ± 0.12 ^{ab}	1.74 ± 0.05 ^a	2.44 ± 0.12 ^{ab}	2.36 ± 0.09 ^{ab}	0.84 ± 0.09 ^{ab}

注: ROR- γ t 为维甲酸核受体 γ t, TGF- β 1 为转化生长因子- β 1, Foxp3 为叉头蛋白 P3, ALI 为急性肺损伤, IL-17 为白细胞介素-17; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 ALI 模型组比较, ^b $P < 0.05$

2.4 各组肺组织 ROR- γ t、TGF- β 1、Foxp3、Smad2、Smad3、Smad7 的 mRNA 表达比较 (表 3): 与对照组比较, ALI 模型组肺组织 ROR- γ t、TGF- β 1、Foxp3、Smad2、Smad3 的 mRNA 表达均明显增加, Smad7 mRNA 表达则明显下降。而 IL-17 预处理组 ROR- γ t、TGF- β 1、Smad2 和 Smad3 的 mRNA 表达则较 ALI 模型组明显下降, Smad7 mRNA 表达明显升高 (均 $P < 0.05$); 两组间 Foxp3 mRNA 表达则差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.5 各组肺组织 p-Smad2/3、p-Smad7 的蛋白表达 (图 2): 与对照组比较, ALI 模型组肺组织 p-Smad2/3 蛋白表达明显升高, p-Smad7 明显降低。与 ALI 模型组比较, IL-17 预处理组 p-Smad2/3 蛋白表达明显降低, 而 p-Smad7 明显升高 (均 $P < 0.05$)。



注: ALI 为急性肺损伤, IL-17 为白细胞介素-17, p-Smad2/3 为磷酸化 Smad2/3, p-Smad7 为磷酸化 Smad7, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 ALI 模型组比较, ^b $P < 0.05$

图2 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测各组小鼠肺组织中活化 Smad2/3 和 Smad7 的蛋白表达

3 讨论

近年来对 ARDS 的研究发现, 免疫炎性细胞及其相关炎性介质影响着 ARDS 的进展及预后, 其中

淋巴细胞特别是 CD4⁺ T 细胞在 ARDS 发生发展中的作用尤为引人注目。

Treg 细胞是 CD4⁺ T 细胞的一类特殊分支, 它可以通过分泌抗炎细胞因子或直接接触抑制免疫细胞 (如巨噬细胞、中性粒细胞等) 产生抗炎和抑制过度免疫反应的作用, 在维持机体免疫稳态和免疫耐受中发挥着重要的作用。既往研究已经证实, Treg 细胞在促进各种原因诱导的 ALI 炎症缓解中具有重要作用^[2-3, 7-9]; 然而也有临床观察性研究发现, ARDS 患者 BALF 中 Treg 细胞量与 30 d 病死率显著相关^[10]。Th17 细胞是一种辅助性 T 细胞新亚群, 介导固有免疫和适应性免疫^[11], 具有独立的分化和发育机制。近年来研究提示, Th17/Treg 比例失衡可能参与了 ARDS 的发生发展。刘军等^[6]报道, LPS 诱导的 ALI 小鼠存在 Th1 和 Th17 细胞的极化以及相关细胞因子的过量表达; 孙学峰等^[12]研究发现, 内毒素诱导 ALI 小鼠外周血中存在 Th17/Treg 比例失衡; Yu 等^[13]研究发现, ARDS 患者外周血 Th17、Treg 细胞占 CD4⁺ T 细胞的比例以及 Th17/Treg 比值均较对照组明显升高, 且与急性生理学与慢性健康状况评分系统 II (APACHE II) 评分、序贯器官衰竭评分 (SOFA) 及肺损伤评分等呈显著正相关, 提示 Th17/Treg 比值可作为判断病情严重程度和预后的指标。本研究中通过气管内滴注 LPS 的经典方法建立 ALI 小鼠模型, 发现肺组织中 Th17、Treg 细胞比例及 Th17/Treg 比值均较对照组明显升高, 与前述研究结果一致; 但不同的是, 本研究发现肺组织局部存在 Th17/Treg 免疫失衡。进一步研究发现, 经 IL-17 抗体预处理小鼠肺部损伤明显减轻, 肺组织中炎性细胞因子 IL-6、IL-17A 和 TGF- β 1 水平明显下调。研究发现, H1N1 流感病毒感染患者外周血和 LPS 诱导 ALI 模型小鼠肺组织中 IL-17A、IL-17F 表达均明显上调^[14-15], 而 IL-17 基因敲除或 IL-17 抗体预处理能明显减轻 H1N1 流感病毒感染所致的 ALI^[14], 与本研究结果一致。表明 IL-17 抗体预处理能缓解 ALI 小鼠肺组织中 Th17/Treg 比例

失衡,减轻肺损伤。

Th17 作为促炎细胞能够分泌 IL-17 从而促进炎症反应;Treg 则能抑制 Th17 等细胞导致的炎症反应,但二者之间的具体调控机制尚待阐明。研究发现 TGF- β 在机体 Treg/Th17 分化平衡中起重要调控作用。TGF- β 通过诱导 Foxp3 表达促进 Treg 细胞的产生,从而抑制炎症反应,防止自身免疫反应^[4,16]。在感染环境下,内源性 TGF- β 与炎性介质 IL-6 或 IL-21 通过抑制 Foxp3 的表达,启动 ROR- γ t 介导的 Th17 细胞分化;之后随着 IL-6 等炎性介质水平的降低, Foxp3 表达增加,抑制 ROR- γ t 介导的 Th17 分化, Treg 的分化增强,在清除感染后将效应细胞的功能控制在合适状态^[17]。

Smads 蛋白家族在 TGF- β 信号转导途径中扮演着重要角色, Smad2/3 是 TGF- β 信号下传的第二个信号分子,属受体激活型 Smad (R-Smads),在胞质中与共同受体 Smad (Co-Smads) 协同参与信号转导。Smad7 通过抑制 Smads 复合物的形成或抑制 Smad2、Smad3 磷酸化而阻止该信号的转导过程^[18]。有研究发现, TGF- β /Smad 信号通路参与了肾间质纤维化的发生^[19];还原型谷胱甘肽可通过抑制 TGF- β 1/Smad 信号通路减轻博莱霉素致大鼠肺纤维化^[20];TGF- β /Smad 信号通路也参与了肺包虫病模型中 Th17/Treg 平衡的调控^[16]。但目前对 TGF- β /Smad 信号通路是否参与 ALI 模型肺组织中 Th17/Treg 平衡的调控鲜见报道。

本研究显示, ALI 模型组肺组织中 ROR- γ t 和 Foxp3 的 mRNA 表达较对照组明显增加,而 IL-17 预处理组 ROR- γ t 和 Foxp3 的 mRNA 表达则明显降低,与既往研究中 ROR- γ t 表达降低可使 ALI 中 Th17 分化和增殖功能受抑的结果一致^[12];进一步研究还发现, ALI 模型组肺组织中 TGF- β 1、Smad2 及 Smad3 的 mRNA 和蛋白表达均较对照组明显上调, Smad7 的 mRNA 和蛋白表达明显下调; IL-17 预处理组肺组织 ROR- γ t mRNA 表达及 TGF- β 1、Smad2、Smad3 的 mRNA 和蛋白表达均明显低于 ALI 模型组, Smad7 的 mRNA 和蛋白表达则明显高于 ALI 模型组。提示 ALI 时 TGF- β /Smad 信号通路活化,通过激活 Smad2/3、抑制 Smad7 可能启动肺组织中 ROR- γ t 介导 Th17 细胞分化,使 Th17/Treg 细胞比例失衡;而 IL-17 抗体预处理则能通过抑制 TGF- β /Smad 信号通路部分逆转这种失衡,从而减轻肺损伤。

综上,本研究显示,肺组织 Th17/Treg 失衡及其相关细胞因子介导了 ALI, TGF- β /Smad 信号通路可能参与了 ALI 早期免疫炎症反应中 Th17/Treg 免疫平衡的调控。ARDS 后期修复阶段是否存在 Th17/Treg 失衡以及 TGF- β /Smad 信号通路是否参与调控还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition [J]. JAMA, 2012, 307 (23): 2526-2533. DOI: 10.1001/jama.2012.5669.
- [2] Tang L, Bai J, Chung CS, et al. Programmed cell death receptor ligand 1 modulates the regulatory T cells' capacity to repress shock/sepsis-induced indirect acute lung injury by recruiting phosphatase SRC homology region 2 domain-containing phosphatase 1 [J]. Shock, 2015, 43 (1): 47-54. DOI: 10.1097/SHK.0000000000000247.
- [3] Tang L, Bai J, Chung CS, et al. Active players in resolution of shock/sepsis induced indirect lung injury: immunomodulatory effects of Tregs and PD-1 [J]. J Leukoc Biol, 2014, 96 (5): 809-820. DOI: 10.1189/jlb.4MA1213-647RR.
- [4] 王成阳, 刘向国, 彭青和, 等. Foxp3/Treg 与 ROR- γ t/Th17 细胞失衡在慢性阻塞性肺疾病大鼠中的作用 [J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26 (12): 860-864. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.12.003.
Wang CY, Liu XG, Peng QH, et al. Role of Foxp3/Treg and ROR- γ t/Th17 cell imbalance in rat model of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Chin Crit Care Med, 2014, 26 (12): 860-864. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.12.003.
- [5] 王华兵, 李建国. CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞 / 辅助性 T 细胞 17 在脓毒症大鼠中的作用 [J]. 中华实验外科杂志, 2015, 32 (2): 284-287. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2015.02.024.
Wang HB, Li JG. Effect of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and T helper type 17 cells in septic rats [J]. Chin J Exp Surg, 2015, 32 (2): 284-287. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2015.02.024.
- [6] 刘军, 张朋书, 贺宏丽, 等. 氯沙坦干预急性肺损伤小鼠肺 Th1 和 Th17 的作用 [J]. 中华内科杂志, 2014, 53 (10): 804-808. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0578-1426.2014.10.010.
Liu J, Zhang PS, He HL, et al. Losartan modulates T helper type 1 cells and T helper type 17 cells-mediated responses in a mouse model of lipopolysaccharide-induced acute lung injury [J]. Chin J Intern Med, 2014, 53 (10): 804-808. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0578-1426.2014.10.010.
- [7] Sun J, Han ZB, Liao W, et al. Intrapulmonary delivery of human umbilical cord mesenchymal stem cells attenuates acute lung injury by expanding CD4⁺CD25⁺ Forkhead Boxp3 (FOXP3)⁺ regulatory T cells and balancing anti- and pro-inflammatory factors [J]. Cell Physiol Biochem, 2011, 27 (5): 587-596. DOI: 10.1159/000329980.
- [8] Wang L, Zhao L, Lyu J, et al. BLT1-dependent alveolar recruitment of CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells is important for resolution of acute lung injury [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2012, 186 (10): 989-998. DOI: 10.1164/rccm.201202-0261OC.
- [9] 张方, 施毅, 李子玲, 等. foxp3 转染的 CD4⁺CD25⁺ T 细胞治疗急性肺损伤的研究 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2011, 20 (1): 17-22. DOI: 10.3870/zgzzhx.2011.01.004.
Zhang F, Shi Y, Li ZL, et al. Therapeutic study on the acute lung injury by adoptive transfer of gene foxp3-transfected CD4⁺CD25⁺ T lymphocytes [J]. Chin J Histochem Cytochem, 2011, 20 (1): 17-22. DOI: 10.3870/zgzzhx.2011.01.004.
- [10] Adamzik M, Broll J, Steinmann J, et al. An increased alveolar CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-regulatory cell ratio in acute respiratory distress syndrome is associated with increased 30-day mortality [J]. Intensive Care Med, 2013, 39 (10): 1743-1751. DOI: 10.1007/s00134-013-3036-3.
- [11] Yu JJ, Gaffen SL. Interleukin-17: a novel inflammatory cytokine that bridges innate and adaptive immunity [J]. Front Biosci, 2008, 13: 170-177. DOI: 10.2741/2667.
- [12] 孙学峰, 王健, 杨林, 等. 转录因子 ROR- γ t 对小鼠急性肺损伤 Th17/Treg 平衡的影响 [J]. 海南医学院学报, 2014, 20 (4): 440-442, 447. DOI: 10.13210/j.cnki.jhmu.20140109.060.
Sun XF, Wang J, Yang L, et al. Influence of transcription factors

ROR γ t on the balance of Th17/Treg in mice with acute lung injury [J]. J Hainan Med Univ, 2014, 20 (4): 440-442, 447. DOI: 10.13210/j.cnki.jhmu.20140109.060.

[13] Yu ZX, Ji MS, 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 : 82. DOI: 10.1186/s13054-015-0811-2.

[14] Li C, Yang P, Sun Y, et al. IL-17 response mediates acute lung injury induced by the 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus [J]. Cell Res, 2012, 22 (3): 528-538. DOI: 10.1038/cr.2011.165.

[15] You QH, Zhang D, Niu CC, et al. Expression of IL-17A and IL-17F in lipopolysaccharide-induced acute lung injury and the counteraction of anisodamine or methylprednisolone [J]. Cytokine, 2014, 66 (1): 78-86. DOI: 10.1016/j.cyto.2013.12.019.

[16] Pang N, Zhang F, Ma X, et al. TGF- β /Smad signaling pathway regulates Th17/Treg balance during Echinococcus multilocularis infection [J]. Int Immunopharmacol, 2014, 20 (1): 248-257. DOI: 10.1016/j.intimp.2014.02.038.

[17] Zhou L, Lopes JE, Chong MM, et al. TGF- β -induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing ROR γ function [J]. Nature, 2008, 453 (7192): 236-240. DOI: 10.1038/nature06878.

[18] 穆恩, 丁仁珑, 安欣, 等. 肝素通过抑制一氧化氮合酶和转化生长因子- β /Smad 信号转导途径减轻脂多糖致大鼠急性肺损伤 [J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26 (11): 810-814. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.11.009.

Mu E, Ding RY, An X, et al. Heparin attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting nitric oxide synthase and transforming growth factor- β /Smad signaling pathway [J]. Chin Crit Care Med, 2014, 26 (11): 810-814. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.11.009.

[19] 刘咏梅, 刘文军, 王文娟, 等. 益气活血中药对肾间质纤维化大鼠转化生长因子- β 、Smad2 和 Smad3 表达的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2010, 17 (5): 263-266. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2010.05.003.

Liu YM, Liu WJ, Wang WJ, et al. Effects of Chinese medicine for invigorating qi and promoting blood circulation on the expressions of transforming growth factor- β , Smad2 and Smad3 in rats with renal interstitial fibrosis [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2010, 17 (5): 263-266. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2010.05.003.

[20] 秦静, 张小强, 庞国中, 等. 还原型谷胱甘肽通过抑制转化生长因子- β 1/Smads 信号通路减轻博来霉素致大鼠肺纤维化 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2016, 23 (2): 143-146. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.02.009.

Qin J, Zhang XQ, Pang GZ, et al. Glutathione attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats by inhibiting transforming growth factor- β 1/Smads signaling pathway [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2016, 23 (2): 143-146. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.02.009.

(收稿日期: 2016-08-09)
(本文编辑: 保健媛, 李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

本刊常用不需要标注中文的缩略语

- 尿激酶 (urokinase, UK)
- 心率 (heart rate, HR)
- 每搏量 (stroke volume, SV)
- 心排量 (cardiac output, CO)
- 心排血指数 (cardiac index, CI)
- 收缩压 (systolic blood pressure, SBP)
- 舒张压 (diastolic blood pressure, DBP)
- 平均动脉压 (mean arterial pressure, MAP)
- 降钙素原 (procalcitonin, PCT)
- 血肌酐 (serum creatinine, SCr)
- 呼吸频率 (respiratory rate, RR)
- 肠内营养 (enteral nutrition, EN)
- 肠外营养 (parenteral nutrition, PN)
- 体重指数 (body mass index, BMI)
- 急性肺损伤 (acute lung injury, ALI)
- 急性肾衰竭 (acute renal failure, ARF)
- 白细胞介素 -1 (interleukin -1, IL-1)
- 尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)
- C- 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP)
- 凝血酶原时间 (prothrombin time, PT)
- 髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO)
- 白细胞计数 (white blood cell count, WBC)
- 格拉斯哥昏迷评分 (Glasgow Coma Scale, GCS)
- 重症加强治疗病房 (intensive care unit, ICU)
- 核转录因子 - κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)
- 凝血酶原活动度 (prothrombin activity, PTA)
- 间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC)
- 急性缺血性脑卒中 (acute ischemic stroke, AIS)
- 磷酸盐缓冲液 (phosphate-buffered saline, PBS)
- 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR)
- 磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI)
- 美国胸科学会 (American Thoracic Society, ATS)
- 手足口病 (hand foot and mouth disease, HFMD)
- 肿瘤坏死因子 - α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)
- 神经元特异性烯醇化酶 (neuron-specific enolase, NSE)
- 急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI)
- 压力控制通气 (pressure control ventilation, PCV)
- 社区获得性肺炎 (community acquired pneumonia, CAP)
- 急性胃肠损伤 (acute gastrointestinal injury, AGI)
- 早期目标导向治疗 (early goal-directed therapy, EGDT)
- 全心舒张期末容积 (global end-diastolic volume, GEDV)
- 支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF)
- 盲肠结扎穿孔术 (cecal ligation and perforation, CLP)
- 肺动脉楔压 (pulmonary artery wedge pressure, PAWP)
- 转化生长因子 - β (transforming growth factor- β , TGF- β)
- 呼气末正压 (positive end-expiratory pressure, PEEP)
- 国际标准化比值 (international normalized ration, INR)
- 气道持续正压 (continuous positive air pressure, CPAP)
- 呼吸机相关性肺炎 (ventilator-associated pneumonia, VAP)
- 血管外肺水指数 (extravascular lung water index, EVLWI)
- 双水平气道正压 (biphasic positive airway pressure, BiPAP)
- 呼吸机相关性肺损伤 (ventilator induced lung injury, VILI)
- 高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group protein B1, HMGB1)
- 诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS)