

# 雷帕霉素对肺间质纤维化大鼠 辅助性 T 细胞亚群平衡变化的影响

徐芳 黄莺 万勇

(武汉市第一医院呼吸内科, 湖北 武汉 430022)

**【摘要】** 目的 探讨雷帕霉素对肺纤维化过程中辅助性 T 细胞(Th 细胞)平衡变化的影响。方法 将 15 只 SD 大鼠按随机数字表法分为对照组、模型组、雷帕霉素组,每组 5 只。经气管内注入博莱霉素 5 mg/kg 复制大鼠肺纤维化模型,对照组气管内注入生理盐水 1.25 mL/kg;雷帕霉素组于制模后 3 d 灌胃雷帕霉素  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,连续 10 d。制模后 28 d 处死动物,取肺组织进行病理学观察,用 Ashcroft 评分评估肺纤维化程度;免疫组化法检测肺组织中  $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )、白细胞介素(IL-4、IL-17)的表达;流式细胞仪检测外周血 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>调节性 T 细胞的比例。**结果** 雷帕霉素组肺纤维化程度较模型组明显减轻,Ashcroft 评分明显降低(分:  $2.92 \pm 0.64$  比  $5.76 \pm 1.76$ ,  $F=16.276$ ,  $P=0.080$ )。肺组织 IL-4 及 IL-17 表达量(A 值)在模型组最高( $4789.0 \pm 1014.6$ ,  $19139.0 \pm 2433.3$ ),其次是雷帕霉素组( $3547.0 \pm 953.8$ ,  $10380.0 \pm 2352.4$ ),对照组表达量最低( $1627.0 \pm 914.8$ ,  $4419.0 \pm 923.6$ );IFN- $\gamma$  表达量(A 值)在对照组最高( $9956.0 \pm 1172.6$ ),雷帕霉素组其次( $7487.0 \pm 998.4$ ),模型组最低( $6054.0 \pm 1045.2$ ),组间两两比较差异均具有统计学意义(均  $P < 0.01$ )。与对照组和模型组比较,雷帕霉素组 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> 细胞占 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 和淋巴细胞的比例均明显升高[分别为( $57.36 \pm 8.84$ )% 比 ( $41.28 \pm 5.91$ )%、( $34.52 \pm 4.56$ )%;( $4.77 \pm 0.48$ )% 比 ( $3.15 \pm 0.37$ )%、( $3.14 \pm 0.28$ )%;( $1.97 \pm 0.22$ )% 比 ( $1.24 \pm 0.17$ )%、( $1.44 \pm 0.29$ )%, 均  $P < 0.05$ ];CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> 细胞占 CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 和淋巴细胞的比例也明显升高[( $73.92 \pm 7.69$ )% 比 ( $33.44 \pm 4.46$ )%、( $49.14 \pm 11.38$ )%;( $1.73 \pm 1.05$ )% 比 ( $0.46 \pm 0.15$ )%、( $0.71 \pm 0.42$ )%;( $0.31 \pm 0.20$ )% 比 ( $0.09 \pm 0.04$ )%、( $0.14 \pm 0.09$ )%, 均  $P < 0.05$ ]。模型组仅 CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> 细胞占 CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 细胞的比例较对照组明显升高[( $49.14 \pm 11.38$ )% 比 ( $33.44 \pm 4.46$ )%,  $P < 0.05$ ]。**结论** 肺纤维化中存在 Th1/Th2、Th17/Treg 失衡及向 Th2、Th17 偏移;雷帕霉素具有抑制肺纤维化的作用,可能通过促进 Treg 细胞及纠正 Th1/Th2 失衡实现。

**【关键词】** 雷帕霉素; 博莱霉素; 肺纤维化; 免疫反应; 辅助性 T 细胞

**Effect of rapamycin on the balance of T helper cell subsets in rats with pulmonary fibrosis** Xu Fang, Huang Ying, Wan Yong. Department of Respiratory Diseases, Wuhan First Hospital, Wuhan 430022, Hubei, China  
Corresponding author: Huang Ying, Email: 29657017@qq.com

**【Abstract】 Objective** To study the effect of rapamycin on the balance of T helper cell subsets in rats with pulmonary fibrosis. **Methods** Fifteen male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into control group, model group and rapamycin group, with 5 rats in each group. Pulmonary fibrosis model was reproduced by using the method of intratracheal instillation of bleomycin (5 mg/kg). Control group was treated by intratracheal instillation of saline (1.25 mL/kg) to obtain the negative control. The rats of the rapamycin group were given rapamycin ( $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) by gastric perfusion for consecutive 10 days beginning on the 3rd day after intratracheal instillation of bleomycin. On the 28th day all rats were sacrificed, and the peripheral blood and the lung tissues were harvested. The lung tissue was observed. And the severity of pulmonary fibrosis in rats was assessed by Ashcroft score. The lung tissues were performed using immunohistochemical staining to detect the expression of  $\gamma$ -interferon (IFN- $\gamma$ ) and interleukins (IL-4, IL-17). Flow cytometry was used to detect the percentages of CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells. **Results** The severity of pulmonary fibrosis was improved in rats of rapamycin group compared with that of model group, and the Ashcroft score was decreased ( $2.92 \pm 0.64$  vs.  $5.76 \pm 1.76$ ,  $F = 16.276$ ,  $P = 0.080$ ). The expression levels of IL-4 and IL-17 (A value) in model group were the highest ( $4789.0 \pm 1014.6$ ,  $19139.0 \pm 2433.3$ ), followed by those of the rapamycin group ( $3547.0 \pm 953.8$ ,  $10380.0 \pm 2352.4$ ), and the least was found in the control group ( $1627.0 \pm 914.8$ ,  $4419.0 \pm 923.6$ ). The expression levels of IFN- $\gamma$  (A value) in control group were the highest ( $9956.0 \pm 1172.6$ ), followed by those of the rapamycin group ( $7487.0 \pm 998.4$ ), and the least was found in the model group ( $6054.0 \pm 1045.2$ ). There were significantly differences in above parameters among three groups (all  $P < 0.01$ ). Compared with the control group and model group, the percentages of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> cells, and lymphocytes were significantly increased in rapamycin group [( $57.36 \pm 8.84$ )% vs. ( $41.28 \pm 5.91$ )%, ( $34.52 \pm 4.56$ )%; ( $4.77 \pm 0.48$ )% vs. ( $3.15 \pm 0.37$ )%, ( $3.14 \pm 0.28$ )%; ( $1.97 \pm 0.22$ )% vs. ( $1.24 \pm 0.17$ )%, ( $1.44 \pm 0.21$ )%, all  $P < 0.05$ ], and the percentages of

CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells in CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> cells, and lymphocytes were also significantly increased in rapamycin group [(73.92 ± 7.69)% vs. (33.44 ± 4.46)%, (49.14 ± 11.38)%; (1.73 ± 1.05)% vs. (0.46 ± 0.15)%, (0.71 ± 0.42)%; (0.31 ± 0.20)% vs. (0.09 ± 0.04)%, (0.14 ± 0.09)%], all  $P < 0.05$ ]. The percentage of CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells in CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> in model group was significantly higher than that in control group [(49.14 ± 11.38)% vs. (33.44 ± 4.46)%,  $P < 0.05$ ]. **Conclusions** T helper cell subsets are imbalanced in pulmonary fibrosis rats. Rapamycin can prevent bleomycin-induced pulmonary fibrosis, and its antifibrotic effect maybe the promotion of proliferation and function of regulatory T cells and imbalance regulation of T helper cell subsets.

**【Key words】** Bleomycin; Rapamycin; Pulmonary fibrosis; Immune reaction; T helper cell

获得性免疫是高等动物体内非常重要的一种免疫反应,这种免疫反应是由 CD4<sup>+</sup> 的辅助性 T 细胞(Th 细胞)来实现的。幼稚的 CD4<sup>+</sup> Th 细胞与不同的初始抗原相互作用,接受不同的信号刺激,接触不同的抗原因子分化成不同的亚型<sup>[1]</sup>。目前公认的 4 种亚型有 Th1、Th2、Th17 及 CD4CD25Foxp3 调节性 T 细胞(Treg),分别分泌不同细胞因子来发挥其功能。如 Th1 细胞主要分泌  $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ ), Th2 细胞主要分泌白细胞介素-4(IL-4), Th17 细胞主要分泌 IL-17。Th 细胞通过分泌不同细胞因子作为细胞间信号传递分子,影响相应的病理生理过程,包括自身的分化过程。正常情况下, Th1/Th2、Th17/Treg 处于动态平衡状态,这种平衡为机体高效率地调配各个免疫细胞及免疫分子来完成免疫反应提供了基础条件。研究显示,肺纤维化中存在 Th1/Th2 失衡及 Th2 优势<sup>[2]</sup>,但对 Th17/Treg 的平衡关系研究较少。

雷帕霉素是一种属于大环内酯类的新型免疫抑制药物<sup>[3]</sup>,一般通过与雷帕霉素靶蛋白 mTOR 结合,阻断效应型 T 细胞的增殖。对 Treg 细胞则是通过增强外周和胸腺幼稚 T 细胞 Foxp3 的表达,起到扩增 Treg 细胞的作用<sup>[4]</sup>。那么雷帕霉素是否具有确切的抗肺纤维化作用,其对 Th 细胞的影响如何?本研究以 IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-17 分别代表 Th1、Th2、Th17 类细胞因子,采用流式细胞仪检测 Treg 细胞,探讨在肺纤维化发病过程中 Th 细胞的平衡关系及雷帕霉素对其的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂和主要药品:** 免疫组化一抗抗体 IL-17、IFN- $\gamma$ 、IL-4(美国 Santa Cruz 公司),抗兔二抗(丹麦 DAKO 公司)。流式抗体 CD4-异硫氰酸荧光素(FITC)、CD8-FITC、CD25-藻红蛋白(PE)、Foxp3-PE-Cy5、Foxp3 染色缓冲液(美国 eBioscience 公司)。博莱霉素(每支 4 mg,天津太和制药有限公司,批号 081102),雷帕霉素(每支 100 mg,上海源叶生物科技公司,批号 53123-88-9)。

**1.2 实验动物及分组:** 选取 15 只健康 SPF 级雌性 SD 大鼠,体质量 180 ~ 200 g,购自武汉大学动物中心,动物合格证号:4200593400。按随机数字表法分为对照组、模型组、雷帕霉素组,每组 5 只。

**1.3 动物模型制备和处理:** 采用气管内注入博莱霉素 5 mg/kg 制备大鼠肺纤维化模型,对照组气管内注入生理盐水 1.25 mL/kg。雷帕霉素组制模后第 3 日给予 1 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> 雷帕霉素灌胃<sup>[5]</sup>,连续 10 d。各组大鼠于术后 7 d 内给予颈部切口碘伏消毒,每日 1 次,防止感染发生。

**1.4 观察指标及方法:** 于制模后 28 d 处死大鼠,取左肺下叶相同部位的肺组织进行常规包埋切片,取外周血 3 mL 行流式细胞仪检测。

**1.4.1 病理学观察:** 取肺组织,常规石蜡切片、苏木素-伊红(HE)染色、固定,光镜下观察肺间质厚度及纤维化范围。参照 Ashcroft 评分评估肺纤维化的程度。

**1.4.2 免疫组化检测:** 用免疫组化法检测 IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-17 在肺组织内的表达。切片常规脱蜡,梯度乙醇水化,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 min × 2 次;微波抗原修复(92 °C 10 min),冷却后,切片用 PBS 冲洗 2 次,每次 3 min;3% 过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)处理 10 min,灭活内源性酶,蒸馏水冲洗 3 次,每次 2 min;5% 牛血清白蛋白室温下封闭 1 h,加入一抗,湿盒中 37 °C 孵育 45 min, PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;加入二抗 37 °C 孵育 45 min, PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察。以胞质内出现棕黄色颗粒为阳性反应,阴性对照除细胞核染成蓝色外,胞质内无棕黄色反应物。每张切片选取 5 个肺间质相似视野,400 倍光镜下测量,通过 Image-pro plus 分析软件根据免疫组化阳性着色的深浅及其阳性面积范围计算视野下的积分吸光度(A)值,取平均值进行统计。

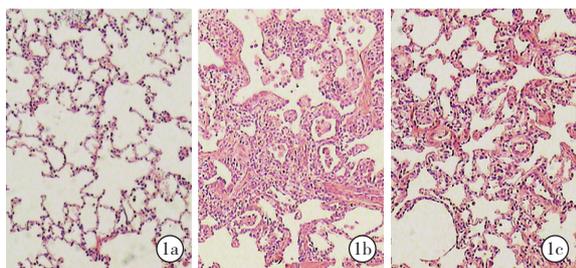
**1.4.3 流式细胞仪检测:** 根据前向散射角(FCS)及侧向散射角(SSC)确定淋巴细胞群。以 CD4<sup>+</sup> 细胞

设定门 N。在 CD4<sup>+</sup> 细胞中选取 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 双阳性细胞,设定双门 L2。以门 L2 选取 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> 三阳性细胞。通过设定,分析 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> 的细胞比例。同理,以此类推分析 CD8<sup>+</sup> 淋巴细胞群的比例<sup>[6]</sup>。

**1.5 统计学分析:** 使用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。进行方差齐性检验,如方差不齐,采用 Kruskal-Wallis *H* 法进行统计学分析,数据满足方差齐性,采用单因素方差分析。各组间两两比较使用 LSD-*t* 检验。数据以均数 ± 标准误( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ )表达, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

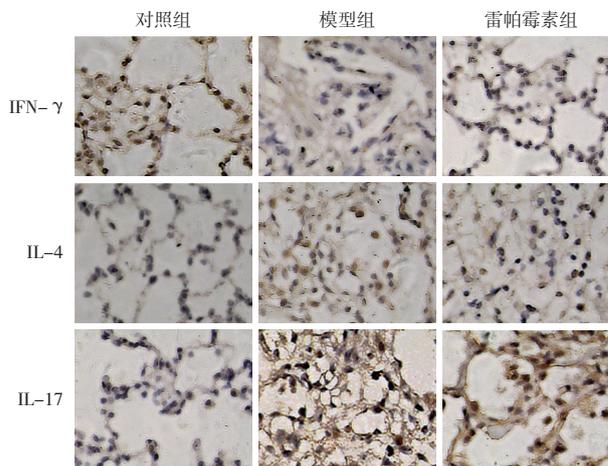
**2.1 肺组织病理学改变(图 1):** 对照组肺组织未见明显异常病理改变;模型组肺泡间隔增宽,肺泡大小不均匀,终末小气道周边炎性细胞浸润,同时伴有纤维化形成,以支气管周边区域较为明显。雷帕霉素组炎性细胞浸润及纤维化形成较模型组明显减轻。Ashcroft 评分(分)显示,模型组评分明显高于对照组(5.76 ± 1.76 比 0.28 ± 0.45,  $F = 12.645$ ,  $P = 0.009$ );雷帕霉素组评分(2.92 ± 0.64 比 5.76 ± 1.76,  $F = 16.276$ ,  $P = 0.080$ )明显低于模型组。



①: 对照组; ②: 模型组; ③: 雷帕霉素组

**图 1 雷帕霉素对肺纤维化大鼠肺组织病理学改变的影响 (HE 染色 低倍放大)**

**2.2 肺组织免疫组化(表 1; 图 2):** IL-4 及 IL-17 表达量在模型组最高,其次是雷帕霉素组,对照组最低;与此相反,IFN- $\gamma$  表达量在模型组最低,对照



**图 2 雷帕霉素对肺纤维化大鼠肺组织中 IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-17 表达的影响(免疫组化 高倍放大)**

组最高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。

**2.3 流式细胞仪检测结果(表 2):** 模型组 CD4<sup>+</sup> 细胞占淋巴细胞的比例、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 细胞占 CD4<sup>+</sup> 细胞的比例、CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> 细胞占 CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 的比例均较对照组明显升高(均  $P < 0.05$ )。雷帕霉素组 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> 细胞占 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 细胞、CD4<sup>+</sup> 细胞和淋巴细胞的比例均较对照组和模型组明显升高(均  $P < 0.05$ ), CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> 细胞占 CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 细胞、CD8<sup>+</sup> 细胞和淋巴细胞的比例均较对照组和模型组明显增高(均  $P < 0.05$ )。

**3 讨论**

研究显示, Th 细胞参与了肺纤维化病变中胶原沉积过程<sup>[7]</sup>。一直以来认为肺纤维化中存在 Th1/Th2 失衡及向 Th2 偏移的优势<sup>[2, 8]</sup>。正常情况下, Th1 产生 IL-2、IFN- $\gamma$ 、肿瘤坏死因子(TNF)等多种细胞因子; Th2 产生 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13 等细胞因子,这两类细胞因子表达的正常调节由 Th1/Th2 功能的相互平衡决定<sup>[9]</sup>。研究显示,在感染、创伤等应激状态下, Th1 细胞功能普遍降低,而 Th2 细胞功能明显提高,出现 Th1 向 Th2 漂移<sup>[10-11]</sup>。研究显示,肺纤维化中以 IL-4 为代表的 Th2 细胞可扩大炎症反应,进一步引起肺结构重塑;

而 Th1 细胞来源的因子如 IFN- $\gamma$ 、IL-2 等在体外可抑制肺成纤维细胞增生,减少胶原生成<sup>[8]</sup>。本研究的模型组 IFN- $\gamma$ /IL-4 比值减少,提示向

**表 1 雷帕霉素对肺纤维化大鼠肺组织 IFN- $\gamma$ 、IL-4、IFN- $\gamma$ /IL-4、IL-17 表达的影响( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ )**

组别	动物数(只)	IFN- $\gamma$ (A 值)	IL-4 (A 值)	IFN- $\gamma$ /IL-4	IL-17 (A 值)
对照组	5	9956.0 ± 1172.6	1627.0 ± 914.8	6.1 ± 2.3	4419.0 ± 923.6
模型组	5	6054.0 ± 1045.2 <sup>a</sup>	4789.0 ± 1014.6 <sup>a</sup>	1.3 ± 1.0	19139.0 ± 2433.3 <sup>a</sup>
雷帕霉素组	5	7487.0 ± 998.4 <sup>b</sup>	3547.0 ± 953.8 <sup>b</sup>	2.1 ± 1.7	10380.0 ± 2352.4 <sup>b</sup>
<i>F</i> 值		19.813	9.342	0.467	42.358
<i>P</i> 值		0.008	0.034	0.046	0.007

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$

表 2 雷帕霉素对肺纤维化大鼠外周血 T 细胞亚群和 Treg 细胞的影响 ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ )

组别	动物数 (只)	CD4 <sup>+</sup> 比例 (%)	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> 比例 (%)	CD4 <sup>+</sup> Treg 比例 (%)	CD4 <sup>+</sup> Treg/CD4 <sup>+</sup> 比例 (%)	CD4 <sup>+</sup> Treg/L 比例 (%)	CD8 <sup>+</sup> 比例 (%)	CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> 比例 (%)	CD8 <sup>+</sup> Treg 比例 (%)	CD8 <sup>+</sup> Treg/CD8 <sup>+</sup> 比例 (%)	CD8 <sup>+</sup> Treg/L 比例 (%)
对照组	5	39.24±2.12	7.66±0.63	41.28±5.91	3.15±0.37	1.24±0.17	19.96±4.30	1.38±0.41	33.44±4.46	0.46±0.15	0.09±0.04
模型组	5	45.52±3.03 <sup>a</sup>	9.20±1.10 <sup>a</sup>	34.52±4.56	3.14±0.28	1.44±0.21	19.78±2.36	1.66±1.35	49.14±11.38 <sup>a</sup>	0.71±0.42	0.14±0.09
雷帕霉素组	5	41.36±3.74	8.44±1.28	57.36±8.84 <sup>ab</sup>	4.77±0.48 <sup>ab</sup>	1.97±0.22 <sup>ab</sup>	18.06±1.61	2.32±1.46	73.92±7.69 <sup>ab</sup>	1.73±1.05 <sup>ab</sup>	0.31±0.20 <sup>ab</sup>
F/H 值		5.510	2.744	15.408	29.676	17.821	0.011	0.846	29.943	5.135	3.717
P 值		0.020	0.104	0.008	0.008	0.009	0.917	0.453	0.009	0.024	0.055

注：与对照组比较，<sup>a</sup>P<0.05；与模型组比较，<sup>b</sup>P<0.05

Th2 细胞亚型偏移，与上述论点相符。

近年来，另一种 Th 细胞 Th17 的发现弥补了 Th1/Th2 模型的不足，Treg 和 Th17 细胞的平衡成为研究新焦点。Th17 细胞是一类在 IL-23 诱导下分泌 IL-17 的独立 Th 细胞亚群<sup>[12]</sup>，与其他传统 3 个亚群相比具有不同的细胞生物学功能，参与宿主防御、介导自身免疫性疾病和变态炎症反应<sup>[13]</sup>。Treg 细胞主要介导免疫抑制反应，通过抑制促炎因子〔如 IL-2、IL-10、转化生长因子- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ )〕、T 淋巴细胞毒性相关抗原 4 (CTLA-4) 和 Foxp3 等的生成<sup>[14]</sup>，进而促进 Th1/Th2 的漂移。研究显示，在创伤及感染中，Treg 细胞的抑制功能降低，T 淋巴细胞增殖受抑<sup>[15]</sup>。有学者认为，Th17 增加及 Treg 细胞数量、功能不足存在于许多自身免疫性疾病，如类风湿关节炎、哮喘、荨麻疹等<sup>[16]</sup>，在肺纤维化中是否存在 Th17/Treg 失衡及其机制研究较少。Liu 等<sup>[17]</sup>在二氧化硅诱导的鼠纤维化模型中，应用抗 CD25 抗体去除 Treg 细胞可以明显增加 IFN- $\gamma$  的表达，延缓纤维化过程中的 Th2 反应，表明 Treg 细胞在二氧化硅诱导的肺损伤炎症过程中可以明显抑制 Th1 反应。另外，在特发性肺纤维化 (IPF) 患者中 Treg 细胞功能的缺陷可能导致 Th2 细胞反应失控，或者直接导致 Th2 极化，促使纤维化的发生<sup>[18-19]</sup>。本研究结果发现，模型组大鼠发生明显肺纤维化，其 IL-17 表达增高，Treg 细胞所占比例却无明显增高，虽然 CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3 细胞占 CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 细胞的比例较对照组高，但总的数量与对照组差异无统计学意义，提示模型组在 Th17 细胞功能、数量明显上升的同时，Treg 功能和数量较 Th17 细胞相对下降，说明肺纤维化中 Th17/Treg 失衡及向 Th17 细胞亚型偏移。

实验证明，雷帕霉素作为免疫抑制剂，对体内多种 T 细胞具有抑制增殖的作用，目前已经广泛应用于多种自身免疫性疾病和器官移植后抗排斥反应

的治疗<sup>[20-21]</sup>，其作用机制是通过与雷帕霉素靶蛋白 mTOR 结合，阻断效应型 T 细胞增殖<sup>[22]</sup>。本研究发现，雷帕霉素组大鼠肺组织炎性细胞浸润及纤维化程度较模型组明显减轻，Ashcroft 评分较模型组明显降低，说明雷帕霉素有抑制大鼠肺纤维化的作用。

国外研究发现，对 PI3K、Akt、mTOR 通路信号关键分子的阻断可以增强外周和胸腺幼稚 T 细胞 Foxp3 的表达水平<sup>[4]</sup>。本研究雷帕霉素组 CD4<sup>+</sup>Treg 和 CD8<sup>+</sup>Treg 细胞的比例也较对照组和模型组明显升高，说明雷帕霉素通过与雷帕霉素靶蛋白 mTOR 结合，提高了 Treg 的数量，并通过提高 Treg 的数量和功能抑制肺纤维化病情发展；雷帕霉素组较模型组 IFN- $\gamma$  增高，IL-4 下降，IFN- $\gamma$ /IL-4 增高，提示雷帕霉素有纠正 Th1/Th2 失衡的作用，但具体机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines [J]. Cell, 1994, 76(2): 241-251.
- [2] Homer RJ, Elias JA, Lee CG, et al. Modern concepts on the role of inflammation in pulmonary fibrosis [J]. Arch Pathol Lab Med, 2011, 135(6): 780-788.
- [3] Kahan BD, Camardo JS. Rapamycin: clinical results and future opportunities [J]. Transplantation, 2001, 72(7): 1181-1193.
- [4] Ogino H, Nakamura K, Iwasa T, et al. Regulatory T cells expanded by rapamycin in vitro suppress colitis in an experimental mouse model [J]. J Gastroenterol, 2012, 47(4): 366-376.
- [5] Yoshizaki A, Yanaba K, Yoshizaki A, et al. Treatment with rapamycin prevents fibrosis in tight-skin and bleomycin-induced mouse models of systemic sclerosis [J]. Arthritis Rheum, 2010, 62(8): 2476-2487.
- [6] 万勇, 张念, 李剑平, 等. 调节性 T 细胞与 Th17 细胞的失衡及其对大鼠肺纤维化的影响 [J]. 华中科技大学学报 (医学版), 2013, 42(2): 161-166.
- [7] 胡萍, 高占成. 博来霉素致小鼠肺纤维化模型的动态演变及其发生机制 [J]. 中华危重急救医学, 2006, 18(8): 474-478.
- [8] Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis [J]. J Pathol, 2008, 214(2): 199-210.
- [9] 张在其, 梁仁, 黄建明, 等. 小青龙汤对哮喘小鼠肺组织 Th1/Th2 作用的实验研究 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11(6): 368-371.
- [10] 傅强, 崔乃强, 邵伟, 等. 急性出血坏死性胰腺炎小鼠辅助性 T 细胞亚群 1/2 的变化规律及中药干预作用研究 [J]. 中国中

- 西医结合急救杂志, 2006, 13(4): 214-217.
- [11] 孙成栋, 刘斯, 李真, 等. 医院获得性肺炎重症患者辅助性 T 细胞亚群和降钙素原变化及相关性分析 [J]. 中华危重病急救医学, 2012, 24(2): 100-102.
- [12] Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy [J]. Curr Opin Immunol, 2007, 19(6): 652-657.
- [13] Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation [J]. Immunity, 2008, 28(4): 454-467.
- [14] 陆俊杰, 葛志军, 戴吉. 脓毒症患者外周血调节性 T 细胞变化及其临床意义 [J]. 中华危重病急救医学, 2013, 25(4): 242-243.
- [15] 戴新贵, 姚咏明, 艾宇航. 脓毒症大鼠调节性 T 细胞凋亡对辅助性 T 细胞漂移的影响及血必净注射液的干预作用 [J]. 中华危重病急救医学, 2009, 21(3): 135-138.
- [16] Roncarolo MG, Battaglia M. Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans [J]. Nat Rev Immunol, 2007, 7(8): 585-598.
- [17] Liu F, Liu J, Weng D, et al. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells depletion may attenuate the development of silica-induced lung fibrosis in mice [J]. PLoS One, 2010, 5(11): e15404.
- [18] Kotsianidis I, Nakou E, Bouchliou I, et al. Global impairment of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 179(12): 1121-1130.
- [19] Trujillo G, Hartigan AJ, Hogaboam CM. T regulatory cells and attenuated bleomycin-induced fibrosis in lungs of CCR7-/- mice [J]. Fibrogenesis Tissue Repair, 2010, 3: 18.
- [20] Ozdemir BH, Ozdemir AA, Erdal R, et al. Rapamycin prevents interstitial fibrosis in renal allografts through decreasing angiogenesis and inflammation [J]. Transplant Proc, 2011, 43(2): 524-526.
- [21] Bridle KR, Popa C, Morgan ML, et al. Rapamycin inhibits hepatic fibrosis in rats by attenuating multiple profibrogenic pathways [J]. Liver Transpl, 2009, 15(10): 1315-1324.
- [22] Julien LA, Roux PP. mTOR, the mammalian target of rapamycin [J]. Med Sci (Paris), 2010, 26(12): 1056-1060.

(收稿日期: 2014-08-13)

(本文编辑: 李银平)

## • 读者 • 作者 • 编者 •

## 本刊对离心操作描述的有关要求

表示离心加速作用时, 可以重力加速度 ( $g$ ) 的倍数形式表达, 例如:  $6000 \times g$  离心 10 min; 或者以  $r/min$  描述, 但此时需在给出离心机转速的同时给出离心半径, 例如: 离心半径 8 cm, 12000  $r/min$  离心 10 min。

## 本刊对文后参考文献著录格式的要求

《中国中西医结合急救杂志》参考文献的著录格式, 基本参照 GB/T 7714-2005《文后参考文献著录规则》执行。采用顺序编码制著录, 依照文献在文中出现的先后顺序用阿拉伯数字标出, 并将序号置于方括号中, 排列于文后。尽量避免引用摘要作为参考文献。引用文献 (包括文字和表达的原意) 务必请作者与原文核对无误。日文汉字请按日文规定书写, 勿与汉字及简化字混淆。同一文献作者不超过 3 人全部著录; 超过 3 人可以只著录前 3 人, 后依文种加表示“等”的文字 (如西文加“, et al”, 日文加“, 他”)。作者姓名一律姓氏在前, 名字在后, 外国人的名字采用首字母缩写形式, 缩写名后不加缩写点; 不同作者姓名之间用“, ”隔开, 不用“和”、“and”等连词。引用日期、获取和访问途径为联机文献必须著录的项目。书籍出版项中的出版地 (者) 有多个时, 只著录第一出版地 (者)。出版项中的期刊名称, 中文期刊用全称; 外文期刊名称用缩写, 以 Index Medicus 中的格式为准。每条参考文献均须著录起止页码。著录格式示例如下。

- 1 期刊著录格式: 主要责任者. 题名 [文献类型标志]. 刊名, 年, 卷 (期): 起页 - 止页.
- 2 图书著录格式: 主要责任者. 题名 [文献类型标志]. 版本项 (第 1 版不著录). 出版地: 出版者, 出版年: 引文起页 - 止页.
- 3 会议论文集 (集) 著录格式: 主要责任者. 题名 [文献类型标志]. 出版地: 出版者, 出版年: 引文起页 - 止页.
- 4 析出文献著录格式: 析出文献主要责任者. 析出文献题名 [文献类型标志] // 专著、会议文献主要责任者. 专著、会议题名. 版本 (第 1 版不著录). 出版地: 出版者, 出版年: 析出文献起页 - 止页.
- 5 学位论文著录格式: 论文作者. 题名 [文献类型标志]. 学位授予单位所在城市: 学位授予或论文出版单位, 年份.
- 6 专利文献著录格式: 专利申请者或所有者. 专利题名: 专利国别, 专利号 [文献类型标志]. 公告日期或公开日期. 获取和访问路径.
- 7 标准 (包括国际标准、国家标准、行业标准等) 著录格式: 主要责任者. 标准编号 标准名称 [文献类型标志]. 出版地: 出版者, 出版年. 注: 标准编号与标准名称之间留 1 个汉字的空隙.
- 8 报纸文章著录格式: 主要责任者. 题名 [文献类型标志]. 报纸名, 出版日期 (版次). 获取和访问路径.
- 9 电子文献著录格式: 主要责任者. 题名 [文献类型标志 / 文献载体标志, 是必选著录项目]. 出版地: 出版者, 出版年 (更新或修改日期) [引用日期]. 获取和访问途径.
- 10 待发表材料: 对于已明确被杂志接受的待发表文献, 可以标明期刊及年代, 其后标注: 待发表, 或 In press.
- 11 以电子版优先发表的文献著录格式: Kurth T, Gaziano JM, Cook NR. Unreported financial disclosures in a study of migraine and cardiovascular disease [J/OL]. JAMA, 2006, 296: E1 [2006-09-08]. <http://jama.ama-assn.org/cgi/data/296/3/283/DC1/1> [published online ahead of print July 18, 2006].