

雷帕霉素对哮喘小鼠 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞的作用

黄文军¹,张世应²,胡小平³

(¹ 武汉科技大学附属孝感市中心医院呼吸内科, 湖北 孝感 432100;² 华中科技大学同济医学院附属梨园医院药剂科, 湖北武汉 430000;³ 武汉科技大学附属孝感市中心医院检验科, 湖北 孝感 432100)

[摘要] 目的:建立哮喘小鼠动物模型并给予吸入雷帕霉素治疗,观察雷帕霉素治疗哮喘的效果及其对 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞(regulatory T cells,Treg)比例及扩增能力的影响,探讨雷帕霉素治疗哮喘的相关机制。方法:采用随机数字表法将 30 只雌性 BALB/c 小鼠分成 3 组,每组 10 只,分别为:对照组、模型组和雷帕霉素治疗组。采用 Underwood 方法对小鼠肺组织进行评分;采用流式细胞术观察小鼠外周血和肺组织中 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比例;不同浓度(50、100 nmol/L)雷帕霉素处理小鼠 CD4⁺T 细胞后,采用流式细胞术和 RT-PCR 方法分别检测 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞形成比例和 Foxp3 mRNA 表达情况,观察雷帕霉素对小鼠的影响。结果:与模型组相比,雷帕霉素治疗能够显著改善小鼠肺组织病理评分情况;雷帕霉素治疗后,与模型组相比,外周血单个核细胞和肺组织中 CD4⁺CD25⁺Treg 均显著升高 ($P<0.01$);50、100 mol/L 雷帕霉素处理小鼠 CD4⁺T 细胞后,CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比例分别为(7.47±1.84)%和(10.93±2.74)%,与对照组[(4.84±0.76)%]相比,雷帕霉素处理可显著促进 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞增殖($P<0.01$);RT-PCR 结果与流式细胞结果一致,雷帕霉素处理可显著促进 CD4⁺T 细胞中 Foxp3 的表达($P<0.01$)。结论:雷帕霉素可能通过促进 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞增殖,增加哮喘小鼠外周血和肺组织中 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比例,进而对小鼠哮喘发挥治疗作用。

[关键词] 雷帕霉素;哮喘;调节性 T 细胞;肺组织;外周血

[中图分类号] R562.2*5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)03-0307-05

doi:10.7655/NYDXBNS20170310

Effect of rapamycin on CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in asthmatic mice

Huang Wenjun¹,Zhang Shiyang²,Hu Xiaoping³

(¹Department of Respiratory Medicine,Xiaogan Central Hospital Affiliated to Wuhan University of Science and Technology,Xiaogan 432100;²Department of Pharmacy,Liyuan Hospital Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology,Wuhan 430000;³Clinical Laboratory,Xiaogan Central Hospital Affiliated to Wuhan University of Science and Technology,Xiaogan 432100,China)

[Abstract] **Objective:**To investigate the effect of inhaling rapamycin on CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (Treg) ratio and the treatment of asthma,as well as its related mechanisms,using asthmatic mice treated with inhaled rapamycin therapy. **Methods:**A total of 30 cases of BALB/c mice were random divided into three groups:the control group,the model group,and the rapamycin treatment group,each group had 10 cases. Underwood method was performed to estimate mouse lung tissue scores. CD4⁺CD25⁺ Treg cell ratios of peripheral blood and lung tissues were detected by flow cytometry. Different concentrations (50 and 100 nmol/L) rapamycin were used to treat mice CD4⁺ T cells,and CD4⁺CD25⁺ Treg cell formation ratio and Foxp3 mRNA expression were analyzed by flow cytometry and RT-PCR methods. **Results:**Compared with the model group,rapamycin treatment significantly improved lung tissue pathology score. CD4⁺CD25⁺ Treg percentage in the model group was (1.94 ± 0.37)% and (2.74±0.42)% in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and lung tissues,respectively,after rapamycin treatment,the CD4⁺CD25⁺ Treg percentage was (5.11±0.64)% and (2.74±0.42)% in PBMCs and lung tissues,respectively. After treated with different concentrations of rapamycin,CD4⁺CD25⁺ Treg ratio in the control group was (4.84 ± 0.76)%,and in the 50 nmol/L and the 100 nmol/L rapamycin groups was (7.47±1.84)% and(10.93±2.74)%,respectively. RT-PCR results were consistent with the results of flow cytometry staining,rapamycin treatment significantly promoted CD4 T cells Foxp3 expression ($P<0.01$). **Conclusion:**By promoting CD4⁺CD25⁺ Treg cell proliferation,rapamycin can increase CD4⁺CD25⁺ Treg cell ratio of peripheral blood and lung tissues in asthmatic mice,and thus exert a therapeutic effect on asthma.

[Key words] rapamycin; asthma; regulatory T cells; lung tissue; peripheral blood

[Acta Univ Med Nanjing,2017,37(03):307-311]

哮喘是由多种细胞和细胞组分参与的气道慢性炎症性疾病,以支气管高反应性、气道炎症和气道结构重塑为突出特点^[1-5]。CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)是一种具有免疫抑制功能的细胞,其在维持机体免疫平衡中具有重要作用。CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比例降低或功能丧失都将破坏机体免疫平衡,从而出现免疫炎症反应。研究显示 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞在哮喘的免疫调节中发挥重要作用^[6-8]。雷帕霉素具有较强的免疫抑制作用,可通过改变气道结构重塑和嗜酸性粒细胞分化而发挥哮喘治疗作用^[9-10]。目前关于雷帕霉素是否可通过影响 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞而发挥哮喘治疗作用还未见文献报道。本研究通过建立哮喘小鼠动物模型并给予雷帕霉素吸入治疗,观察雷帕霉素治疗哮喘的效果及其对 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞比例及扩增能力的影响,探讨雷帕霉素治疗哮喘的相关机制。

1 材料和方法

1.1 材料

BALB/c 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司,均为 6~8 月龄,雌性,体重 20~25 g,饲养于恒温控制照明的条件下(照明时间 7:30—19:30)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组

30 只 BALB/c 小鼠随机平均分成 3 组,分别为对照组(A 组)、模型组(B 组)和雷帕霉素治疗组(C 组)。A 组于实验当日和第 14 天给予 0.2 mL 的生理盐水腹腔注射,B 组和 C 组于实验当日和第 14 天给予 0.2 mL 卵清蛋白(ovalbumin, OVA)/Al(OH)₃ 混合液[含 OVA 100 μg, Al(OH)₃ 2 mg]腹腔注射,第 21 天开始激发,A 组以 2%生理盐水 20 mL 雾化 30 min, B 组和 C 组以 2% OVA/Al(OH)₃ 20 mL 雾化 30 min,持续激发 5 d, C 组分别在激发 1 d 前开始气道内给予 4 mg/kg 的雷帕霉素(生理盐水稀释)吸入,每天 1 次。雷帕霉素治疗剂量的选择依据文献报道^[9]。

1.2.2 摘眼球采血

末次激发后 24 h,采用 60 mg/kg 的 5%氯胺酮腹腔注射麻醉小鼠。待小鼠完全麻醉后,采用左手固定小鼠,绷紧小鼠头部皮肤,使其眼球突出,右手用眼科弯头镊子夹住小鼠眼球根部,摘出眼球,并立即将小鼠头部倒置,使眼眶内动静脉血流入抗凝血采集管中。

1.2.3 外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)分离方法

采用 Ficoll 分离获取小鼠 PBMC,具体方法参见文献^[11]报道。

1.2.4 分离肺组织单个核细胞

5 mL Hank's 液经右心室灌洗小鼠肺脏,取出肺组织,用眼科剪剪成碎片,通过研磨、过滤、多次洗涤获取肺组织细胞悬液,采用 Ficoll 分离获取小鼠肺组织中的单个核细胞。

1.2.5 流式细胞染色方法

采用标记不同颜色荧光的抗体组合检测 CD4⁺CD25⁺ Treg 比例,具体方法参见文献报道^[12]。抗体为 FITC-CD3、PE-CD4、Pecp5.5-CD25、APC-Foxp3。数据分析时,先圈定 CD3 细胞门,随后在 CD3 细胞门中进一步圈定 CD4 和 CD25 双阳性细胞,进一步分析 CD4 和 CD25 双阳性细胞中 Foxp3 的表达情况。

1.2.6 雷帕霉素处理 CD4⁺T 细胞方法

采用流式细胞分选获取纯度大于 90%的小鼠 CD4⁺T 细胞。获取的细胞用 0.5 mg/mL 的 CD3 活化抗体包板活化,培养基中含有 10 ng/mL IL-2 和 5 ng/mL TGF-β,并在培养基中加入不同浓度(50、100 nmol/L)的雷帕霉素对细胞进行处理。培养 7 d 后采用流式细胞术检测 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞比例。

1.2.7 RT-PCR 方法

TRIzol 提取细胞总 RNA,反转录成 cDNA。PCR 反应条件:95℃ 5 min;95℃ 10 s,60℃ 20 s,共 40 个循环。引物序列:Foxp3 上游引物 5'-CCCAGGAAAGACAGCAACCTT-3',下游引物 5'-TTCTCACAACCAGGCCACTTG-3';内参照 U6 上游引物 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3',下游引物 5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTGCAT-3'。以 2^{-ΔΔCt} 方法计算 mRNA 的相对表达量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析。多组间数据比较采用 ANOVA 法,两两比较采用 LSD-t 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠哮喘症状观察

第 1 天哮喘症状激发 2 min 后,B 组小鼠出现呼吸加快、点头呼吸等显著哮喘症状,并伴有烦躁不安和毛发竖起等表现;C 组小鼠与 B 组相比,症状明显减轻;A 组小鼠无任何症状出现。

2.2 雷帕霉素治疗效果检测

A 组小鼠肺组织病理切片染色结果显示,肺组织

小支气管及肺泡结构正常,周围无明显炎性细胞浸润;B组小鼠肺组织可见大量炎性细胞浸润,支气管内可见黏液栓,支气管平滑肌可见明显增厚,肺泡隔可见水肿、增厚;C组小鼠上述病理改变明显缓解。小鼠肺组织病理评分如表 1 结果所示。

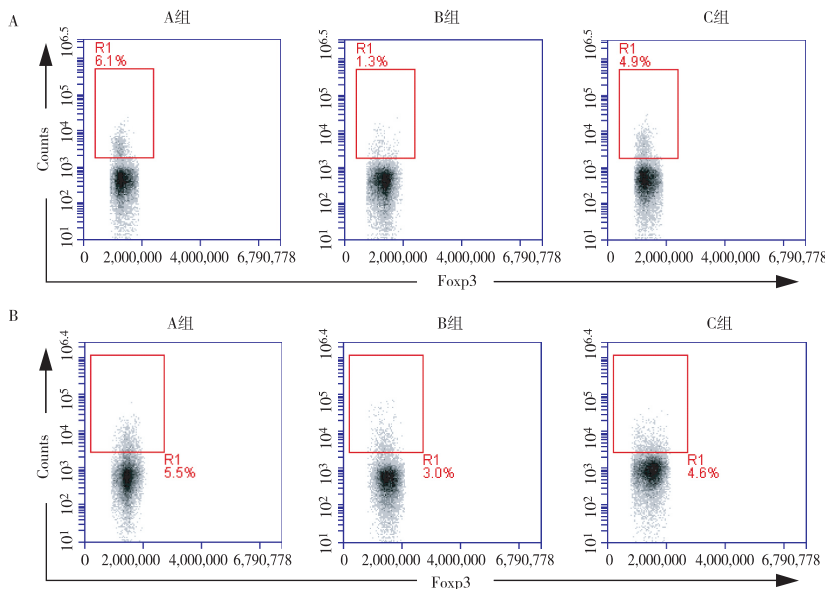
表 1 哮喘小鼠肺组织病理评分

Table 1 Pathological score of lung tissues in asthmatic mice
[分, M(Min~Max)]

组别	血管周围嗜酸性粒细胞浸润	支气管周围嗜酸性粒细胞浸润	气道上皮损伤	水肿
A组(n=10)	0(0~0)	0(0~0)	0(0~0)	0(0~1)
B组(n=10)	5(4~6)	5(3~6)	5(3~6)	4(3~5)
C组(n=10)	2(1~3)	2(1~3)	0(0~1)	1(1~0)

2.3 外周血和肺部 CD4⁺CD25⁺Treg 比例变化

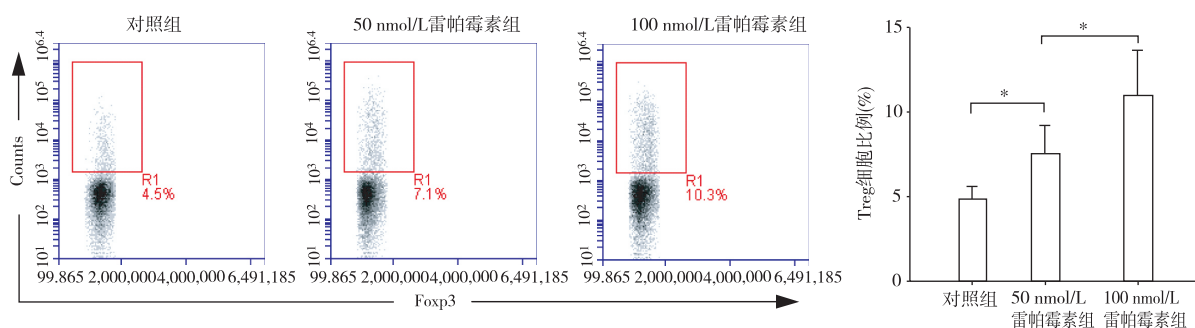
A 组 PBMC 和肺组织中 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞



A: 流式细胞术检测 3 组 PBMC 中 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比例; B: 流式细胞术检测 3 组肺组织中 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比例; C: 3 组 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比例的定量分析; 两组比较, *P<0.01 (n=10)。

图 1 流式细胞术检测外周血和肺部 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比例

Figure 1 CD4⁺CD25⁺Treg cell ratio in peripheral blood and lung tissues by flow cytometry



两组比较, *P<0.01 (n=10)。

图 2 流式细胞术检测雷帕霉素对 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞增殖的影响

Figure 2 Effects of rapamycin on the proliferation of CD4⁺CD25⁺Treg cells by flow cytometry

比例分别为 (5.89±0.75)% 和 (5.63±0.85)% , B 组 PBMC 和肺组织中 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比例分别为 (1.94±0.37)% 和 (2.74±0.42)% , C 组 PBMC 和肺组织中 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比例分别为 (5.11±0.64)% 和 (4.85±0.71)% ; 与 A 组相比, B 组 PBMC 和肺组织中 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比例均显著降低 (P<0.01), 与 B 组相比, C 组 PBMC 和肺组织中 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比例均显著升高 (P<0.01, 图 1)。

2.4 雷帕霉素对小鼠 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞扩增情况的影响

对照组 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比例为 (4.84±0.76)% , 50 nmol/L 雷帕霉素处理组 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比例为 (7.47±1.84)% , 100 nmol/L 雷帕霉素处理组 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比例为 (10.93±2.74)% , 与对照相比, 雷帕霉素处理可显著促进 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞增殖 (P<0.01, 图 2)。

2.5 雷帕霉素对 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞 Foxp3 表达的影响

A 组 Foxp3 相对表达的水平为 0.89 ± 0.24 , 50 nmol/L 雷帕霉素处理组 Foxp3 相对表达水平为 2.79 ± 0.88 , 100 nmol/L 雷帕霉素处理组 Foxp3 相对表达水平为 5.04 ± 1.26 , 与对照相比, 雷帕霉素处理可显著促进 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞中 Foxp3 的表达 ($P < 0.01$, 图 3)。

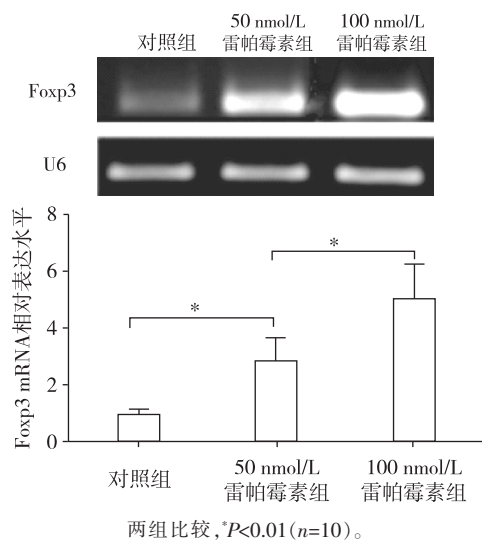


图 3 雷帕霉素对 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞 Foxp3 表达的影响
Figure 3 Effects of rapamycin on the expression of Foxp3 in CD4⁺CD25⁺Treg cells

3 讨论

哮喘是一种异质性疾病, 以气道高反应性、炎症细胞浸润、杯状细胞化生、Th2 型细胞因子水平升高和 IgE 水平升高为特点^[13-16]。尽管目前一些治疗方法, 如糖皮质激素和支气管扩张剂治疗可在部分患者中有效抑制哮喘症状, 然而并不是对所有哮喘患者都有效^[13]。对有些患者, 哮喘是一个持续性疾病, 但是对有些患者, 只有当患者暴露于季节性过敏原或其他刺激条件下时才出现哮喘症状。哮喘发作是一个主要问题, 在急诊、住院和医疗费用开销中占较高比例^[17-18]。已知雷帕霉素可通过激活 PI3K 信号通路参与调控细胞生长分化、细胞代谢和存活等多种生物学进程^[19-20]。近期研究显示雷帕霉素在 T 细胞增殖和分化中起重要作用^[21]。CD4⁺CD25⁺Treg 细胞在哮喘的免疫调节中发挥重要作用^[6-8]。郝俊等^[22]报道雷帕霉素在体外对人 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞具有扩增作用。那么雷帕霉素是否可通过影响 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞增殖和分化而发挥哮喘治疗作用还未见文献报道。

本研究通过建立哮喘小鼠动物模型并给予雷帕霉素吸入治疗, 观察雷帕霉素治疗哮喘的效果及其对 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比例及扩增能力的影响, 探讨了雷帕霉素治疗哮喘的相关机制。结果显示, 给予雷帕霉素治疗后, 与模型组比较, 小鼠肺组织炎症细胞浸润、支气管平滑肌增厚、肺泡隔水肿等病理改变明显减轻。进一步的 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比例分析结果显示, 雷帕霉素治疗后, 小鼠外周血和肺组织中 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比例显著升高, 提示雷帕霉素对哮喘具有很好的治疗作用, 该结果与文献报道一致^[9-10], 且这种治疗作用主要是通过增加外周血和肺组织中 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比例而发挥的。随后本研究观察了不同浓度(50、100 nmol/L)雷帕霉素处理小鼠 CD4⁺T 细胞后, CD4⁺CD25⁺Treg 细胞形成比例和 Foxp3 mRNA 表达情况。结果显示, 与对照组相比, 50、100 nmol/L 雷帕霉素处理组 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比例和 Foxp3 的表达均显著升高。提示雷帕霉素可通过调节 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞增殖和分化, 进而增加外周血和肺组织中 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比例, 进而发挥哮喘治疗作用。

综上所述, 本研究证实雷帕霉素可通过促进 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞增殖, 增加哮喘小鼠外周血和肺组织中 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比例, 进而对小鼠哮喘发挥治疗作用。然而在人类 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞增殖和分化中, 雷帕霉素是否具有同样的作用将是未来研究的重点之一。

[参考文献]

- [1] 刘红, 黄茂, 李涛, 等. AG490 对支气管哮喘小鼠气道重塑的干预作用及相关机制[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2011, 31(3): 301-307
- [2] 周丹阳, 曹琦, 黄茂, 等. 原花青素抑制哮喘小鼠气道炎症及气道高反应性[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2011, 31(7): 981-985
- [3] Kay AB. Asthma and inflammation[J]. J Allergy Clin Immunol, 1991, 87(5): 893-910
- [4] 曾幸坤, 郭红荣, 俞小卫, 等. 维生素 D 对原代培养哮喘大鼠气道平滑肌细胞增殖的影响[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2013, 33(8): 1070-1076
- [5] Boyce JA, Bochner B, Finkelman FD, et al. Advances in mechanisms of asthma, allergy, and immunology in 2011 [J]. J Allergy Clin Immunol, 2012, 129(2): 335-341
- [6] Eusebio M, Kuna P, Kraszula L, et al. The relative values of CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells correlate with selected lung function parameters in asthma [J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2015, 28(2): 218-226

- [7] Lu Y,Guo Y,Xu L,et al. Foxp3 regulates ratio of Treg and NKT cells in a mouse model of asthma[J]. Mol Cell Biochem,2015,403(1-2):25-31
- [8] Wei Y,Luo QL,Sun J,et al. Bu-Shen-Yi-Qi formulae suppress chronic airway inflammation and regulate Th17/Treg imbalance in the murine ovalbumin asthma model [J]. J Ethnopharmacol,2015,164(2):368-377
- [9] 延光海,金光玉,朴红梅,等. 雷帕霉素对哮喘小鼠气道重塑的影响[J]. 中国药理学通报,2013,29(7):942-946
- [10] 华雯,刘慧,夏丽霞,等. 雷帕霉素对哮喘小鼠骨髓嗜酸粒细胞祖细胞分化的影响:2011年第三十三届浙江省呼吸系病学术年会暨呼吸疾病诊治新进展学习班论文汇编[C]. 杭州:浙江大学,2011
- [11] Dai X,Wang LW,Jia XY,et al. Paeoniflorin regulates the function of human peripheral blood mononuclear cells stimulated by rhIL-1 β by up-regulating Treg expression [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol,2015,37(3):252-257
- [12] Yin S,Zhang J,Mao Y,et al. Vav1-phospholipase C- γ 1 (Vav1-PLC- γ 1) pathway initiated by T cell antigen receptor (TCR $\gamma\delta$) activation is required to overcome inhibition by ubiquitin ligase Cbl-b during $\gamma\delta$ T cell cytotoxicity[J]. J Biol Chem,2013,288(37):26448-26462
- [13] Bateman ED,Hurd SS,Barnes PJ,et al. Global strategy for asthma management and prevention:GINA executive summary[J]. Eur Respir J,2008,31(1):143-178
- [14] Hamid Q,Tulic M. Immunobiology of asthma[J]. Annu Rev Physiol,2009,71(3):489-507
- [15] Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma[J]. Nat Med,2012,18(5):673-683
- [16] Kim Y,Dekruyff H,Umetu T. The many paths to asthma:phenotype shaped by innate and adaptive immunity [J]. Nat Immunol,2010,11(7):577-584
- [17] Holgate ST. Exacerbations:the asthma paradox[J]. Am J Respir Crit Care Med,2005,172(2):941-943
- [18] Siegle JS,Hansbro N,Herbert C,et al. Airway hyperreactivity in exacerbation of chronic asthma is Independent of eosinophilic inflammation[J]. Am J Respir Cell Mol Biol,2006,35(5):565-570
- [19] Powell D,Delgoffe M. The mammalian target of rapamycin: linking T cell differentiation,function,and metabolism [J]. Immunity,2010,33(3):301-311
- [20] Reiling H,Sabatini M. Stress and mTOR signaling[J]. Oncogene,2006,25(48):6373-6383
- [21] Delgoffe GM,Pollizzi KN,Waickman AT,et al. The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2[J]. Nat Immunol,2011,12(4):295-303
- [22] 郝俊,曹园番,杨洁,等. 雷帕霉素对人 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞体外扩增的影响[J]. 现代免疫学,2013,32(5):404-411

[收稿日期] 2015-11-09

科技出版物中数字的用法

1. 凡是可以用阿拉伯数字且很得体的地方,均应使用阿拉伯数字。
2. 日期和时刻的表示。需注意年份不能简写,如 1997 年不能写成 97 年。
3. 计量或计数单位前的数字应采用阿拉伯数字;多位阿拉伯数字不能拆开转行;小数点前或后超过 4 位数(含 4 位)的应从小数点起向左或向右每 3 位空出适当间隙,不用千分撇“,”;数值的有效数字应全部写出,如“1.50、1.75、2.00”,不能写成“1.5、1.75、2”。
4. 参数与偏差范围的表示:
 - (1) 数值范围:5~10;注意 $3\times 10^3\sim 8\times 10^3$,不能写成 $3\sim 8\times 10^3$;
 - (2) 百分数范围:20%~30%,不能写成 20~30%;
 - (3) 具有相同单位的量值范围:1.5~3.6 mA 不必写成 1.5 mA~3.6 mA;
 - (4) 偏差范围:(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 不写成 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, (85 ± 2)%不能写成 $85\pm 2\%$;
5. 附带尺寸单位的量值相乘写为:50 cm \times 80 cm \times 100 cm,不能写成 50 \times 80 \times 100 cm,或 50 \times 80 \times 100 cm³。