

N-乙酰半胱氨酸对哮喘模型小鼠 nTreg/Th17 失衡影响的研究^①

劳传君,唐汉庆^②,王有科,李强,谢振锋,蒋玉洁,黄致敬

(右江民族医学院,广西 百色 533000 E-mail:48029843@qq.com)

摘要:目的 观察 N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)对哮喘模型小鼠自然调节性 T 细胞(natural regulatory T cells, nTreg)/辅助性 T 细胞 17 (T helper cell 17, Th17) (nTreg/Th17)失衡的影响,并探讨其起效机制。方法 50 只 6 周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠随机分为对照组、模型组、NAC 低剂量组、NAC 中剂量组、NAC 高剂量组 5 个组,每组 10 只。模型组、NAC 低剂量组、NAC 中剂量组、NAC 高剂量组采用卵清蛋白致敏及激发制备哮喘小鼠模型,并制备 T 细胞悬液。NAC 低剂量组、NAC 中剂量组、NAC 高剂量组小鼠分别按照 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重给予 NAC 灌胃(浓度 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$),每天 1 次,7 d 为 1 个疗程,治疗 1 个疗程。疗程结束后,RT-PCR 法检测叉状头螺旋转录因子 3(forkhead helix transcription factor 3, FOXP3) mRNA、维 A 酸相关孤独受体(retinoid-related orphan receptor γt , ROR γt) mRNA 表达水平;ELISA 法检测白细胞介素 17 (interleukin 17, IL-17)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)、白细胞介素 6(interleukin 6, IL-6)、白细胞介素 10(interleukin 10, IL-10)水平;苏木精-伊红染色法观察肺组织病理形态变化。结果 和对照组比较,模型组 IL-17、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平均升高而 IL-10 水平降低,FOXP3 mRNA 相对表达量下降而 ROR γt mRNA 相对表达量升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);和模型组比较,NAC 中剂量组、NAC 高剂量组 IL-17、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平均降低而 IL-10 水平升高,FOXP3 mRNA 相对表达量升高而 ROR γt mRNA 相对表达量下降,差异均有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论 NAC 促进 FOXP3 基因表达,减少 ROR γt 基因表达,抑制 Th17 的分化,纠正 nTreg/Th17 失衡是 NAC 在哮喘治疗中缓解炎症的作用环节之一。

关键词:哮喘;乙酰半胱氨酸;自然调节性 T 细胞;辅助性 T 细胞

中图分类号: R562.25 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2017)06-0440-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2017.06.004

Research on the effects of N-acetylcysteine on nTreg/Th17 imbalance in mice model of asthma

Lao Chuanjun, Tang Hanqing, Wang Youke, Li Qiang, Xie Zhenfeng, Jiang Yujie, Huang Zhijing

(Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China

E-mail:4802843@qq.com)

Abstract: **Objective** To explore the effects of N-acetylcysteine (NAC) on natural regulatory T cells (nTreg)/T helper cell 17 (Th17) imbalance in mice model of asthma and to discuss its therapeutic mechanism.

Methods Six weeks old with SPF grade BALB/c mice were randomly divided into 5 groups; a control group, a model group, a NAC low-dose group, a NAC middle-dose group and a NAC high-dose group, with 10 mice in each group. Mouse asthma models of the model group, of the NAC low-dose group, of the NAC middle-dose group and of the high-dose group were established with ovalbumin (OVA) sensitization and stimulating, and T cell suspensions were prepared. The low-dose, middle-dose, high-dose groups were intragastrically administered with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ NAC according to body weights of 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, of 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and of 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively, once a day for a treatment course of seven days. After a therapeutic course was finished, we detected the expressions of forkhead helix transcription factor 3 (FOXP3) mRNA and retinoid-related orphan receptor γt (ROR γt) mRNA by the method of RT-PCR, the IL-17, TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 levels were detected by the method of ELISA and the lung tissue morphological features were observed by hematoxylin-eosin staining.

Results Compared with the control group, in the model group the levels of IL-17, of TNF- α , of IL-1 β , of IL-6 and the expression of ROR γt mRNA increased while the IL-10 level and the FOXP3 mRNA expression reduced, there were all statistically significant differences ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Compared with the model group, in the NAC middle-dose group and the NAC high-dose group the IL-17, TNF- α , IL-1 β , IL-6 levels and

① 基金项目:广西自然科学基金青年基金资助项目(2015GXNSFB139159)

② 通信作者, E-mail: phdtanghanqing@163.com

the expression of ROR γ t mRNA reduced while the level of IL-10 and the expression of FOXP3 mRNA increased, there were all statistically significant differences ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusion** NAC enhances the expression of FOXP3 mRNA while reduces the expression of ROR γ t mRNA and inhibits the differentiation of Th17, then, the nTreg/Th17 balance is recovered, which is one of the possible therapeutic mechanisms for NAC in treatment of asthma.

Key words: asthma; acetylcysteine; natural regulatory T cells; T helper cell 17

哮喘的发生机制复杂,哮喘的发生发展涉及 CD4⁺T 细胞网络的多个亚群,已有研究表明辅助性 T 细胞如 Th1、Th2、Th17 在哮喘的发生中起重要作用,其中 Th1/Th2 失衡被认为是哮喘发生和进展的重要免疫学基础^[1],这已受到重视并得到了较为深入研究。然而近来研究表明自然调节性 T 细胞(natural regulatory T cells, nTreg)在哮喘的发生中作用也不可忽视, nTreg 和辅助性 T 细胞 17(T helper cell 17, Th17)的交互影响及作用为哮喘的炎症机制研究提供了新的切入途径^[2]。nTreg、Th17 以及各自相应的转录因子叉状头转录因子 3(forkhead helix transcription factor 3, FOXP3)和维 A 酸相关孤独受体(retinoid-related orphan receptor γ t, ROR γ t)在哮喘中的水平及表达并对相关炎症因子白细胞介素 17(interleukin 17, IL-17)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)、白细胞介素 6(interleukin 6, IL-6)或抗炎因子白细胞介素 10(interleukin 10, IL-10)的影响需要进一步研究,以推进哮喘炎症机制研究的深入。N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)是一种强抗氧化剂,已有较多报道其抗氧化作用对于炎症有缓解作用^[3-6],针对支气管哮喘、慢性阻塞性肺疾病、肺纤维化、急性肺损伤等肺疾病的治疗均显示一定的疗效。但其治疗作用机制仍未引起广泛注意,本研究工作首先建立哮喘小鼠模型,采用 NAC 作为治疗干预手段,观察其对 nTreg、Th17 及其特异性转录因子和炎症因子表达水平的影响,探讨其抗氧化作用在哮喘治疗中对炎症的缓解环节。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与药物 IL-17、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10 ELISA 试剂盒(武汉博士德生物有限公司);NAC 颗粒(国药准字 H20000472,海南赞邦制药有限公司);卵清蛋白(OVA)(Sigma 公司, U. S. A);FOXP3 基因引物、ROR γ t 基因引物(北京中杉金桥公司)。

1.1.2 主要仪器 紫外分光光度仪(DU530 型,美国 Beckman 公司);PCR 仪(7900HT 型,美国 ABI 公司);全自动流式细胞仪(FACSCANTO II 型,美国 BD 公司);多功能酶标仪(MK3 型,美国 Thermo Lab-system 公司);凝胶成像系统(chemidoc XRS 型,美国伯乐);病理图像分析软件系统(德国 Leica)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及处理 6 周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠,体质量(21.1 \pm 1.5) g,本院科学实验中心提供,许可证编号:SCXK(京)2016-0004。动物常规饲养于 SPF 级动物实验室。随机分为对照组、哮喘模型组(模型组)、NAC 低剂量组、NAC 中剂量组、NAC 高剂量组 5 组,每组 10 只。根据文献报道方法^[7]建立小鼠支气管哮喘模型。模型组、NAC 低剂量组、NAC 中剂量组、NAC 高剂量组第 1 d、4 d、7 d、10 d、13 d 腹腔注射混悬液(氢氧化铝 400 μ g 和 OVA 100 μ g,浓度为 50 μ g/L),每天 1 次,每次 1 ml,第 14 d 造模成功。第 14 d 起给予各组雾化吸入 OVA 液 50 μ l(0.1 mol/L PBS 稀释 OVA 1 mg),每次 30 min,每天 1 次,连续激发 1 周,对照组以等量生理盐水代替。模型组连续激发 1 周,不作特殊处理;NAC 低剂量组、NAC 中剂量组、NAC 高剂量组在激发前 1 h 以 NAC(浓度 50 μ g/ml)分别按照 50 μ g/kg、100 μ g/kg、200 μ g/kg 灌胃;每天 1 次,各组以 7 d 为 1 个治疗或干预疗程,治疗 1 个疗程,治疗结束后第 1 d 取材备检。

1.2.2 指标检测 ①肺组织形态学观察。取小鼠右肺组织 4%多聚甲醛固定 24 h,常规石蜡包埋,切片厚度 3~4 μ m,60 $^{\circ}$ C 烘烤 30 min,二甲苯、梯度乙醇脱水,苏木精-伊红(HE)染色,树胶固定封片,光镜拍摄观察支气管病理形态变化。②管腔狭窄率测量^[8]。用图像分析软件测量细支气管的外管腔面积(S_1)、内管腔面积(S_2)、阻塞面积(S_3),计算管腔狭窄率(S)。计算公式: $S = (S_1 - S_2 + S_3) / S_1 \times 100\%$ 。③IL-17、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10 水平及 FOXP3、ROR γ t 表达检测。无菌操作下取小鼠脾组织,制备脾细胞悬液,用 T 细胞纯化柱分离小鼠脾脏 T 淋巴细胞,配成 5×10^5 /ml 细胞悬液。将悬液经流式细胞仪分选出 nTreg 和 CD4⁺T 细胞,将分选到的细胞测定纯度和浓度后分别配成 1×10^5 /ml 细胞悬液,加入细胞培养板。培养 72 h 后,收集 nTreg、CD4⁺T 细胞孔上清液,按照说明书操作,ELISA 法检测 IL-10、IL-17、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6。

Real-Time PCR 法检测 nTreg 中转录因子 FOXP3 和 Th17 细胞中转录因子 ROR γ t 的表达,以 β -actin 为内对照,PCR 扩增反应产物经过凝胶电泳分析系统,获得目的基因灰度值。以相对表达量表示,计算公式:目的基因 mRNA 的相对表达量 = 目的基因

灰度值/ β -actin 基因灰度值。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示。多组间均数比较采用单因素方差分析。检验方差齐性,方差齐时采用 LSD 检验;方差不齐时采用 Dunnett-t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组肺组织形态观察 对照组支气管黏膜内皮连续、平滑、完整、层次清楚,无炎症渗出、无分泌物;模型组小鼠支气管黏膜层增厚、管腔狭窄、有渗出物、炎细胞浸润;NAC 低剂量组黏膜层仍有增厚;NAC 中剂量组渗出物减少;NAC 高剂量组支气管管壁结构较完整,黏膜炎症渗出,病变减轻。见图 1。

2.2 管腔狭窄率、IL-17、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-10

水平检测结果 和对照组比较,模型组管腔狭窄率、IL-17、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平均升高而 IL-10 水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);和模型组比较,NAC 中剂量组、NAC 高剂量组 IL-17、TNF- α 、IL-1 β 水平均降低而 IL-10 水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),以 NAC 高剂量组降低明显。见表 1。

2.3 FOXP3 mRNA、ROR γ t mRNA 相对表达量检测结果 和对照组比较,模型组 FOXP3 mRNA 相对表达量下降而 ROR γ t mRNA 相对表达升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);和模型组比较,NAC 高剂量组 FOXP3 mRNA 相对表达量升高而 ROR γ t mRNA 相对表达量下降,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 2。

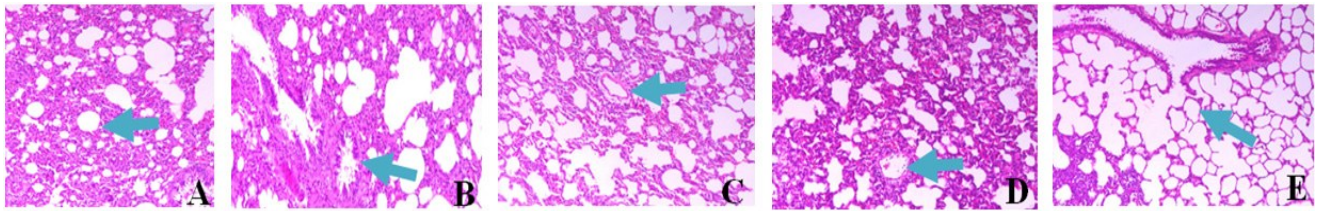


图 1 各组肺组织病理形态表现($\times 200$)

A: 对照组;B: 模型组;C: NAC 低剂量组;D: NAC 中剂量组;E: NAC 高剂量组

图中箭头所示支气管黏膜层

表 1 各组管腔狭窄率、IL-17、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	管腔狭窄率 (%)	IL-17 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
对照组	—	0.21 \pm 0.02	0.71 \pm 0.06	45.36 \pm 5.26	1.01 \pm 0.12	239.36 \pm 10.03	182.22 \pm 13.26
模型组	—	0.68 \pm 0.08 ^a	3.12 \pm 1.86 ^b	167.24 \pm 10.22 ^b	12.33 \pm 2.38 ^b	429.65 \pm 13.26 ^a	72.56 \pm 6.35 ^b
NAC 低剂量组	50	0.48 \pm 0.06	2.29 \pm 0.98	150.03 \pm 9.64	4.55 \pm 1.18 ^c	395.21 \pm 12.01	96.47 \pm 8.24
NAC 中剂量组	100	0.46 \pm 0.05	1.21 \pm 0.86 ^c	103.35 \pm 8.54 ^c	4.12 \pm 0.86 ^c	364.22 \pm 11.21	128.01 \pm 9.27 ^c
NAC 高剂量组	200	0.35 \pm 0.04 ^c	1.02 \pm 0.22 ^d	64.15 \pm 7.52 ^d	1.22 \pm 0.32 ^d	255.48 \pm 10.36 ^c	172.56 \pm 11.06 ^d

注:与对照组比较:a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$;与模型组比较:c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$

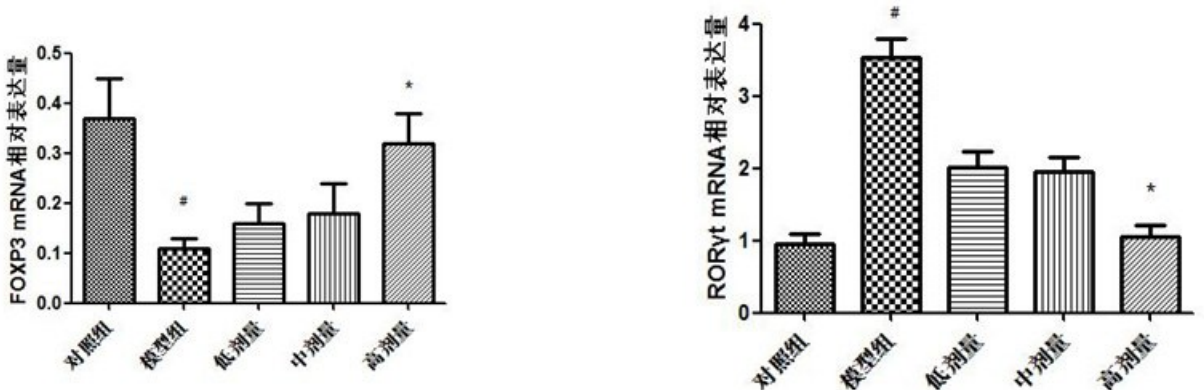


图 2 各组 FOXP3 mRNA、ROR γ t mRNA 相对表达量比较

注:与对照组比较:# $P < 0.01$ 。与模型组比较:* $P < 0.01$

3 讨论

CD4⁺T细胞的多个亚群在免疫、炎症反应中的功能受到重视,参与了哮喘的发生和发展。Th1、Th2、Th17、nTreg亚群以及相应的转录因子和分泌的炎症因子表达水平为哮喘炎症机制的研究提供了方向。其中Th1/Th2亚群失衡是造成哮喘发病的免疫学基础并已得到了较为深入的研究,而近年来认为nTreg/Th17亚群也存在平衡机制,其平衡对于缓解哮喘气道炎症反应也有重要作用,是研究的又一个方向。因此,CD4⁺T细胞亚群失衡是哮喘发病的重要因素,恢复各亚群的平衡为缓解哮喘病情提供了思路。

nTreg在抑制主动免疫及维持免疫耐受中起关键作用,研究^[9]表明nTreg能抑制Th1、Th2的活化或增殖,对于Th1/Th2平衡具有调控作用。动物实验研究也表明哮喘小鼠的nTreg通过抑制初始CD4⁺T细胞转化为Th2细胞和抑制分化成熟的Th2产生细胞因子两种途径参与调节Th1/Th2平衡。nTreg的分化受到FOXP3的调控,FOXP3的表达反映了nTreg的水平和功能活性。临床研究观察到哮喘患者免疫耐受功能降低、气道的持续炎症与FOXP3 mRNA表达降低相关^[10]。

Th17作为较近发现的CD4⁺T细胞亚群,在哮喘炎症反应中的作用受到关注,Th17分泌IL-17,刺激气管上皮细胞、内皮细胞以及其他炎性细胞分泌TNF- α 、IL-1 β 和IL-6,诱导中性粒细胞和巨噬细胞向炎症区域移动,引发炎症反应、造成炎性损伤、加重哮喘病情^[11]。ROR γ t是Th17的特异性转录因子,促进初始CD4⁺T细胞转化为Th17,诱导Th17分泌IL-17,参与Th17引发的炎症反应病理过程。ROR γ t基因表达和IL-17水平与哮喘的严重程度呈正相关。nTreg通过分泌特异性的抗炎细胞因子IL-10,抑制ROR γ t表达、Th17初始分化和IL-17分泌,保持nTreg/Th17亚群平衡状态^[12]。

NAC具有很强的抗氧化作用,在哮喘炎症反应中,能减少中性粒细胞在气管腔的浸润,抑制气管的炎症损伤。研究表明NAC还能活化nTreg,调节nTreg/Th17失衡^[13],在肺疾病的临床和实验研究中都得到了广泛的应用。

本研究分子指标检测的结果表明,模型组的IL-17、TNF- α 、IL-1 β 和IL-6水平均升高而IL-10水平降低,提示哮喘存在炎症因子水平升高而抗炎因子水平下降的状况,同时,模型组FOXP3 mRNA相对表达量下降而ROR γ t mRNA相对表达升高,反映哮喘nTreg/Th17亚群的失衡状态,采用NAC干预治疗后,改善了哮喘肺组织的病理变化,同时,促进FOXP3基因表达,减少ROR γ t基因表达,抑制Th17的分化,进而引起IL-17分泌减少及炎症因子的分泌、释放减少

从而缓解哮喘气道炎症。推测这可能是NAC在哮喘治疗中缓解炎症的作用环节。本实验研究也表明,NAC的此种作用与剂量有关,高剂量的NAC作用比较明显,提示在临床上如要获得较好的疗效,可能需要考虑NAC的剂量问题。另外,NAC对于nTreg/Th17亚群平衡的影响,可能只是其对CD4⁺T细胞亚群网络影响的一部分,因此,相关机制仍然需要更多的研究。

参考文献:

- [1] Lloyd CM, Hawrylowicz CM. Regulatory T cells in asthma [J]. *Immunity*, 2009, 31(3): 438-449.
- [2] Liu Z, Kim J, Sypek JP, et al. Gene expression profiles in human nasal polyp tissues studied by means of DNA microarray [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2004, 114(4): 783-790.
- [3] 朱蓉,洪永青,白冲. N-乙酰半胱氨酸对支气管哮喘小鼠模型肺脏树突状细胞功能的影响 [J]. *江苏医药*, 2009, 35(11): 1327-1329.
- [4] 刘勇. N-乙酰半胱氨酸对老年慢性阻塞性肺疾病患者免疫功能及细胞因子的影响 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2017, 26(17): 1880-1882.
- [5] 徐静. 大剂量N-乙酰半胱氨酸治疗特发性肺间质纤维化的效果研究 [J]. *当代医药论丛*, 2017, 15(5): 45-46.
- [6] 于洋,周锦. N-乙酰半胱氨酸对肾缺血再灌注致肺损伤氧化应激及炎症反应的影响 [J]. *解剖科学进展*, 2017, 23(1): 24-26.
- [7] Lee CM, Chang JH, Moon DO, et al. Lycopene suppresses ovalbumin-induced airway inflammation in a murine model of asthma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 374(2): 248-252.
- [8] 李铮. 电针背三针对哮喘大鼠气道重塑模型TGF- β 1/Smad3信号通路的调控 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.
- [9] 陈军浩,张葵. 天然调节T细胞与诱导调节T细胞的生物学特性 [J]. *现代生物医学进展*, 2012, 12(2): 389-392.
- [10] Vale-Pereira S, Todo-Bom A, Geraldine L, et al. FoxP3, GATA-3 and T-bet expression in elderly asthma [J]. *Clin Exp Allergy*, 2011, 41(4): 490-496.
- [11] Jiang H, Wu X, Zhu H, et al. FOXP3⁺ Treg/Th17 cell imbalance in lung tissues of mice with asthma [J]. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2015, 8(3): 4158-4163.
- [12] Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99(24): 15524-15529.
- [13] Qing-yang Liu, Yong-ming Yao, Yan Yu, et al. Astragalus Polysaccharides Attenuate Postburn Sepsis via Inhibiting Negative Immunoregulation of CD4⁺CD25(high) T Cells [J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e19811.

收稿日期: 2017-11-07; 修回日期: 2017-12-11