

雷公藤甲素通过 IL-10/Th17 细胞调节哮喘小鼠气道炎症^{*}

华中科技大学同济医学院附属武汉市中西医结合医院 王爱利 王蓓蓓 罗光伟^{*}, 武汉 430022

摘要 目的:探索雷公藤甲素对哮喘小鼠外周血白细胞介素-10(IL-10)、辅助性 T17(Th17)细胞及气道炎症的影响。方法:32只雌性 BALB/c 小鼠随机分为对照组、哮喘组、雷公藤甲素组、地塞米松组,每组8只。对照组给予生理盐水致敏与激发,哮喘组给予卵清蛋白(OVA)致敏及激发,雷公藤甲素组在每次激发前给予 40 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 雷公藤甲素腹腔注射干预,地塞米松组在每次激发前给予 1 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 地塞米松腹腔注射干预。最后一次激发24 h后收集各组小鼠肺泡灌洗液进行细胞分类计数,检测外周血细胞因子 IL-10、外周血 CD4 + 淋巴细胞中 Th17 细胞比例,对肺组织进行 HE 染色,评估小鼠气道炎症的变化。结果:哮喘组小鼠 IL-10 浓度明显低于对照组, Th17 细胞比例明显高于对照组,且肺泡灌洗液细胞总数、嗜酸性粒细胞计数、中性粒细胞计数、气道周围炎症评分均明显高于对照组(均 $P < 0.01$)。雷公藤甲素组及地塞米松组 IL-10 浓度较哮喘组明显升高, Th17 细胞比例较哮喘组明显下降,且肺泡灌洗液细胞总数、嗜酸性粒细胞计数、中性粒细胞计数、气道周围炎症评分明显低于哮喘组(均 $P < 0.05$),而雷公藤甲素组及地塞米松组之间上述指标比较差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。结论:雷公藤甲素可能通过 IL-10 对 Th17 细胞的调节作用减轻气道周围炎症,为哮喘的临床治疗提供新的靶点。

关键词 哮喘; 雷公藤甲素; IL-10; Th17 细胞; 气道炎症

中图分类号 R562.2⁺5

文献标识码 A

DOI 10.11768/nkjwzzzz20190421

Regulatory effect of triptolide on airway inflammation in asthmatic mice via IL-10/Th17 cells WANG Ai-li, WANG Bei-bei, LUO Guang-wei^{*}. Wuhan Hospital of Traditional Chinese & Western Medicine, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

Abstract Objective: To investigate the effects of triptolide on IL-10, Th17 cells in peripheral blood and airway inflammation in asthmatic mice. Methods: Thirty-two female BALB/c mice were randomly divided into four groups with 8 in each group. Mice in control group were treated with saline, those in asthmatic group were sensitized and challenged with OVA, those in triptolide group were sensitized and challenged with OVA and given triptolide (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ every day) intraperitoneally prior to the challenge, and those in dexamethasone group received dexamethasone (1 mg/kg every day) intraperitoneally before challenge. The BALF of each group was collected 24 h after the final OVA challenge for cells sorting and counting. The levels of IL-10 in peripheral blood and percentage of Th17 cells from peripheral blood CD4 + T lymphocytes were detected by ELISA and flow cytometry respectively. The HE staining of lung tissue was performed to evaluate the airway inflammation. Results: The IL-10 level was significantly lower, and the percentage of Th17 cells was significantly higher in asthmatic group than those in control group ($P < 0.01$). The HE staining of lung tissue indicated that the total cell number, and number of eosinophils and neutrophils in the BALF of asthmatic group were significantly greater than those in control group ($P < 0.01$). Treatment with triptolide or dexamethasone greatly reduced the percentage of Th17 cells, increased IL-10 concentration and decreased cell sorting counts in BALF and airway inflammation scores. For indexes mentioned above, no significant differences between triptolide group and dexamethasone group were observed ($P > 0.05$). Conclusions: Triptolide may alleviate airway inflammation in asthmatic mice through the regulation of IL-10 on Th17 cells, providing a new target for the clinical treatment of asthma.

Key words Asthma; Triptolide; IL-10; Th17 cells; Airway inflammation

支气管哮喘(简称哮喘)是一种慢性气道炎症性疾病,以可逆性气流受限及气道高反应为特征,其

发病机制由多种细胞,包括嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、T 淋巴细胞、中性粒细胞、肥大细胞和树突状细胞及最近发现的恒定型自然杀伤 T 细胞(invariant nature killer T cell, iNKT 细胞)、辅助性 T 细胞 17(Th17 细胞)、调节性 T 细胞(regulatory

^{*}基金项目:武汉市卫计委项目(No:WZ16D05)

^{*}通信作者:罗光伟, E-mail: Whyyy191@sina.com

cell, Treg 细胞) 及各种炎症介质共同参与^[1-3]。过敏性哮喘是最常见的哮喘表型, 它的定义常通过对环境过敏原过敏, 及过敏原暴露与临床症状的关联性来确定^[4], 在过敏性哮喘的发病机制中, IL-17 是引起气道高反应的重要致病因子^[2], 可以募集中性粒细胞在气道聚集, 与重症哮喘或难治性哮喘有关^[5,6], 而 Th17 细胞亚群是 IL-17 分泌的重要来源。IL-10 是炎症反应的调节因子, IL-10 主要通过抗原提呈细胞 (antigen presenting cell, APC) 间接地对 T 细胞反应进行调节。最近研究表明, 在肠道炎症中, IL-10 可以直接调节 Th17 细胞亚群^[7], 但是在哮喘中 IL-10 是否可通过调节 Th17 细胞亚群发挥炎症调节作用尚未明确。在王敏等^[8]研究中发现, 雷公藤甲素 (Triptolide TP, 又叫雷公藤内酯醇) 可以通过抑制外周血单核细胞分泌 IL-17, 从而减轻哮喘气道炎症。本研究探讨 TP 对哮喘小鼠模型 IL-10、Th17 细胞及气道炎症的影响。

材料与方法

主要试剂及仪器 卵清蛋白 (OVA) (grade V, Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo. USA), TP (上海源叶生物科技有限公司), IL-17、IL-10 Elisa 试剂盒及苏木素-伊红染色剂 (武汉博士德生物工程有限公司), 10% 水合氯醛、肝素钠、FITC Rat Anti-Mouse CD4 (美国 BD 公司)、PE Rat Anti-Mouse IL-17A (美国 BD 公司), 流式细胞仪 LSR II (美国 BD 公司)。

哮喘模型建立及给药干预 哮喘小鼠模型制作: 第 0、7、14 天, 小鼠腹腔内注射 OVA 致敏液 200 μ L (OVA 100 μ g, 氢氧化铝凝胶 100 μ L) 致敏, 第 21~27 天 200 μ g OVA 溶液雾化激发, 见图 1。

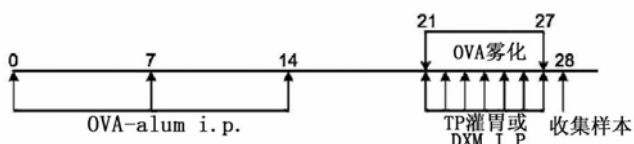


图1 哮喘小鼠模型及药物干预方法(OVA-al μ m 卵清蛋白氢氧化铝凝胶; i.p. 腹腔注射; DXM 地塞米松; TP 雷公藤甲素)

干预分组: SPF 级健康雌性 BALB/c 小鼠 32 只, 6~8 周, 体重 16~22 g, 随机分成 4 组, 每组 8 只: 对照组用生理盐水致敏、激发; 哮喘组用 OVA 致敏、激发; TP 干预组 (TP 组) 每次激发前 1 h 腹腔注射 TP 40 μ g/(kg·d); 地塞米松干预组 (DXM 组) 每次激发前 1 h 腹腔注射地塞米松 1 mg/(kg·d)。

肺泡灌洗液细胞分析 小鼠肺泡灌洗液获取参

照先前的实验方法^[9], 每次 0.8 mL 经 4℃ 预冷的 PBS 行双侧肺灌洗 3 次, 200 g, 4℃, 离心 5 min, 3 次灌洗液细胞沉淀通过细胞计数板计数细胞总数, 将细胞浓度调制 1×10^6 /mL, 取 200 μ L 细胞溶液行迪夫快速染色 (Diff-quick) 及显微镜下取 10 个视野行细胞分类计数。

细胞因子检测 小鼠经 10% 水合氯醛 (6 mL/kg) 腹腔注射麻醉后, 用经肝素浸润的 1 mL 空针获取眼球后外周血 100 μ L, 离心 10 min, 2 500 转/min, 取上清, 测定血清中 IL-17、IL-10 的水平, 根据 Elisa 试剂盒操作说明进行。

肺组织学检测 肺泡灌洗后, 剪开胸壁, 右肺肺门处结扎, 将 200 μ L 10% 中性多聚甲醛经 2 mL 注射器针头 (去掉尖端部分) 插入主支气管, 膨胀左肺, 沿左肺门处结扎, 取下左肺置于 10% 多聚甲醛中固定 24 h, 然后石蜡包埋, 沿着左肺长轴切取 5 μ m 厚的切片, 然后脱蜡, 切片用苏木精-伊红 (HE) 染色。气道周围炎症严重程度通过评分指数评定^[10]。

流式细胞学检测 最后一次激发 24 h 后从小鼠眼球后获取外周血 100 μ L, 使用红细胞裂解液充分裂解, 磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 洗涤 2 次, 使用佛波酯 (PMA)、离子霉素 (Ionomycin)、布雷非德菌素 A (BFA) 刺激细胞, 调节终浓度分别为 50 ng/mL、750 ng/mL、5 μ g/mL, 用 FITC 标记的抗小鼠 CD4 抗体进行表面抗原染色, 经固定破膜后, 用 PE 标记的抗小鼠 IL-17A 抗体及其相匹配的同型对照抗体进行细胞内因子染色, 避光染色 30 min 后通过 BD LSRII 流式细胞仪 (美国 BD 公司生产) 进行上机检测。

统计学处理 通过 GraphPad Prism 5 进行统计绘图。计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 2 组间比较, 采用独立样本 *t* 检验, 3 组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 有显著性差异时进一步运用 S-N-K 法进行两两比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

哮喘小鼠气道炎症及 IL-10、Th17 细胞比例变化 哮喘组肺泡灌洗液细胞总数、嗜酸性粒细胞 (EOS) 及中性粒细胞计数 (NEU) 均明显高于对照组 ($P < 0.05$), 见表 1。HE 染色显示哮喘组小鼠气道周围明显炎症细胞浸润, 支气管壁明显增厚, 黏液腺增生, 见图 2。哮喘组小鼠 IL-10 浓度较对照组明显下降 (均 $P < 0.05$)。哮喘组 Th17 细胞比例较对照组明显升高 [(7.73 ± 1.85) vs (0.78 ± 0.25) , $P < 0.05$]。

表1 哮喘组与对照组肺泡灌洗液细胞分类计数比较

($\times 10^4/\text{mL}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	细胞总数	EOS	NEU
对照组	1.18 ± 0.03	0.28 ± 0.02	0.37 ± 0.04
哮喘组	$20.70 \pm 0.54^*$	$12.03 \pm 0.27^*$	$2.03 \pm 0.14^*$

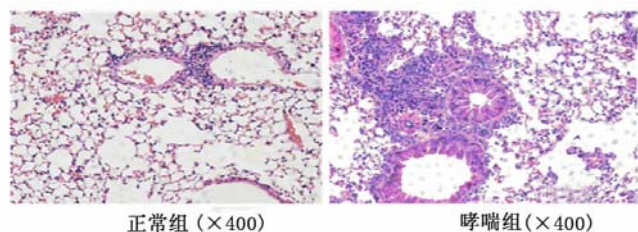
注:与对照组比较, $^*P < 0.05$ 

图2 哮喘组与对照组小鼠气道炎症 HE 染色结果

TP 对哮喘小鼠细胞因子 IL-10、IL-17 的影响 TP 组及 DXM 组外周血 IL-10 浓度均较哮喘组明显升高 [$(86.29 \pm 15.23) \text{ pg/mL}$ vs $(38.14 \pm 8.89) \text{ pg/mL}$; $(86.59 \pm 40.71) \text{ pg/mL}$ vs $(38.14 \pm 8.89) \text{ pg/mL}$, 均 $P < 0.05$], 且 TP 组与 DXM 组间比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 3。此外, TP 组 IL-17 浓度较哮喘组明显下降 [$(143.2 \pm 62.6) \text{ pg/mL}$ vs $(240.1 \pm 15.87) \text{ pg/mL}$, $P < 0.05$]。

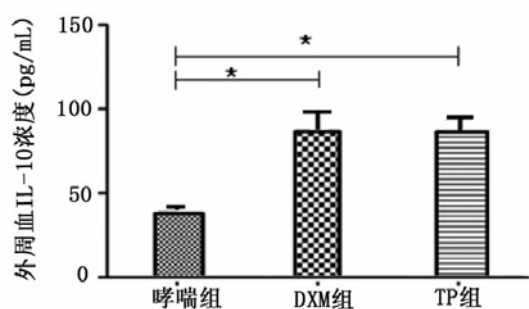
注:与哮喘组比较, $^*P < 0.05$

图3 3组外周血 IL-10 浓度比较

TP 对哮喘小鼠 Th17 细胞比例的影响 流式细胞学检测外周血 CD4 + T 淋巴细胞中 Th17 细胞比例结果示, TP 组及 DXM 组 Th17 细胞比例均较哮喘组明显下降 [(3.58 ± 2.56) vs (7.73 ± 1.85) , (2.90 ± 0.78) vs (7.73 ± 1.85) , $P < 0.05$], 且 TP 组与 DXM 组间比较, 差异无明显统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 4。

TP 对哮喘小鼠气道炎症的影响 肺组织病理切片 HE 染色结果显示, 经 TP 及 DXM 干预后气道周围炎症细胞浸润均明显减少, 支气管壁增厚及黏液腺增生均明显减轻, 见图 5。TP 组及 DXM 组气道周围炎症评分均较哮喘组下降 [(1.6 ± 0.55) vs (2.75 ± 0.50) , (1.4 ± 0.55) vs (2.75 ± 0.50) , 均 $P < 0.05$], 而 TP 组及 DXM 组间气道周围炎症评分

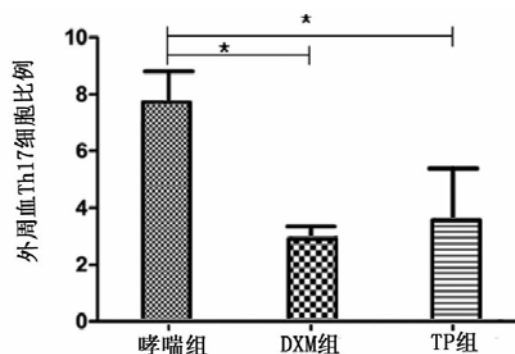
注:与哮喘组比较, $^*P < 0.05$

图4 3组外周血 Th17 细胞比例比较

比较, 差异无明显统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 6A。经 TP 及 DXM 干预后肺泡灌洗液细胞总数、嗜酸性粒细胞及中性粒细胞计数明显低于哮喘组 (均 $P < 0.05$), 而 TP 组及 DXM 组间比较, 差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 见图 6B。

讨论

在哮喘小鼠模型中, 哮喘小鼠肺泡灌洗液及病理组织结果同对照组比较均提示气道周围炎症明显增加, 并伴随外周血 IL-10 下降、Th17 细胞比例上升。通过 TP 或 DXM 干预后, IL-10 浓度均明显上升, Th17 细胞比例均明显下降, 且病理组织显示气道周围炎症均明显减轻。而 TP 与 DXM 组间上述指标比较, 差异均无明显统计学意义。提示 TP 可减轻哮喘气道炎症, 可能通过 IL-10 调节 Th17 细胞在哮喘小鼠中的比例来发挥治疗作用。

IL-10 是一种重要的炎症抑制因子, 来源于多种细胞, 包括单核细胞、巨噬细胞、肥大细胞、T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、树突状细胞^[11]。有研究表明在哮喘患者血清 IL-10 水平较非哮喘者明显下降, IL-17 水平较非哮喘者明显升高^[12], 与本实验结果一致。TP 是从雷公藤中分离出来的新型二萜三环氧氧化物, 是雷公藤抗炎和免疫调节作用的重要成分, 它可通过抑制外周血单核细胞分泌 IL-17, 从而减轻哮喘气道炎症^[8]。本研究中 TP 或 DXM 干预后 IL-10 浓度均明显升高, 且伴随 Th17 细胞比例明显下降及气道周围炎症明显减轻。提示在哮喘小鼠模型中 IL-10 信号对 Th17 细胞具有调节作用, TP 可能通过 IL-10 对 Th17 细胞的调节作用减轻气道周围炎症。

Th17 细胞是 CD4 + 细胞的一个亚群, IL-23、ROR α 分别是促进 Th 细胞向 Th17 细胞分化的重要因子及必须转录因子^[13,14], 在 p-Stat3、ROR α (维 A 酸相关孤儿受体 α) 的共同作用下, ROR α (维 A 酸

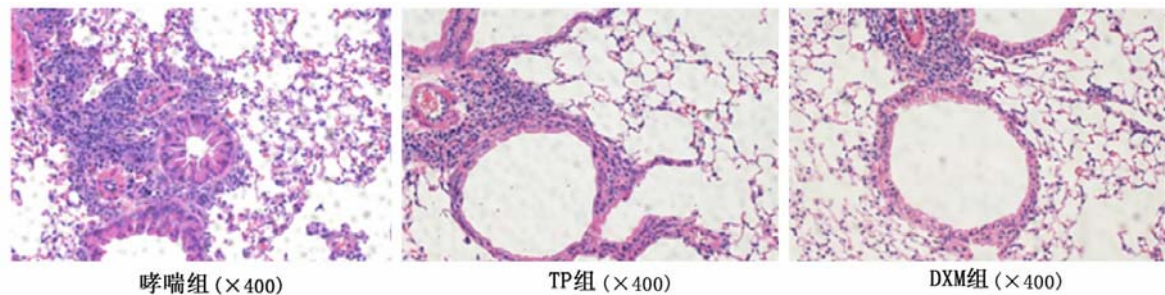
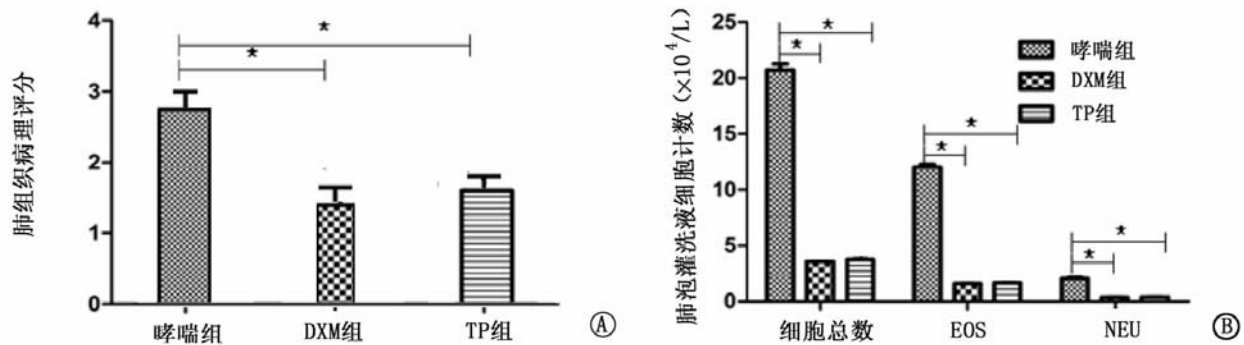


图5 各实验组小鼠气道炎症HE染色结果



注:与哮喘组比较,* $P < 0.05$

图6 各实验组小鼠肺组织病理评分及肺泡灌洗液细胞分类计数比较

相关孤儿受体 α)可诱导Th17细胞主要细胞因子IL-17表达^[15]。在我们先前的研究中证实了哮喘小鼠中Th17细胞可通过CCL2/CCR2途径向气道周围聚集,且伴随气道炎症的加重^[9]。研究表明,IL-10可通过多种机制发挥对Th17细胞的调节作用。CD4 + Foxp3-产IL-10的Tr1细胞和CD4 + Foxp3 + Treg细胞均可通过IL-10依赖的方式调控Th17的分化^[16]。此外,产IL-10的B细胞也可通过IL-10的介导作用降低ROR α (维A酸相关孤儿受体 α)的表达来抑制Th17细胞分化^[17]。IL-10还可通过对巨噬细胞的直接作用,下调IL-23的表达,从而影响Th17细胞的增殖^[18],更深入的机制将在进一步的实验中进行探究。

参考文献

- O'Brien TF, Bao K, Dell'Aringa M, et al. Cytokine expression by invariant natural killer T cells is tightly regulated throughout development and settings of type-2 inflammation [J]. *Mucosal Immunol*, 2016, 9 (3): 597-609.
- Barczyk A, Pierzchala W, Sozanska E. Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine [J]. *Respir Med*, 2003, 97 (6): 726-733.
- Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of asthma [J]. *Nat Immunol*, 2015, 16 (1): 45-56.
- Schatz M, Rosenwasser L. The allergic asthma phenotype [J]. *J allergy Clin Immunol Pract*, 2014, 2 (6): 645-648.
- Al-Ramli W, Prefontaine D, Chouiali F, et al. T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, 123 (5): 1185-1187.
- 姜龙, 夏丽霞, 兰芬, 等. 重症哮喘的研究进展 [J]. *内科急危重症杂志*, 2017, 23 (5): 424-428.
- Kamanaka M, Huber S, Zenewicz LA, et al. Memory/effector (CD45RB(10)) CD4 T cells are controlled directly by IL-10 and cause IL-22-dependent intestinal pathology [J]. *J Exp Med*, 2011, 208 (5): 1027-1040.
- 王敏, 姚欣, 黄茂. 雷公藤甲素对外周血单个核细胞白介素17A分泌的影响 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2010, 30 (3): 316-318.
- Wang AL, Wang ZY, Cao Y, et al. CCL2/CCR2-dependent recruitment of Th17 cells but not Tc17 cells to the lung in a murine asthma model [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2015, 166 (1): 52-62.
- Price MM, Oskeritzian CA, Falanga YT, et al. A specific sphingosine kinase 1 inhibitor attenuates airway hyperresponsiveness and inflammation in a mast cell-dependent murine model of allergic asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, 131 (2): 501-511.
- Ogawa Y, Duru EA, Ameredes BT. Role of IL-10 in the Resolution of Airway Inflammation [J]. *Curr Mol Med*, 2008, 8 (5): 437-445.
- Raeiszadeh Jahromi S, Mahesh PA, Jayaraj BS, et al. Serum levels of IL-10, IL-17F and IL-33 in patients with asthma: a case-control study [J]. *J Asthma*, 2014, 51 (10): 1004-1013.
- Hoeve MA, Savage ND, de Boer T, et al. Divergent effects of IL-12 and IL-23 on the production of IL-17 by human T cells [J]. *Eur J Immunol*, 2006, 36 (3): 661-670.
- Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17 + T helper cells [J]. *Cell*, 2006, 126 (6): 1121-1133.
- 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.
- Huber S, Gagliani N, Esplugues E, et al. Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3- and Foxp3 + regulatory CD4 + T cells in an interleukin-10-dependent manner [J]. *Immunity*, 2011, 34 (4): 554-565.
- Yang M, Deng J, Liu Y, et al. IL-10-producing regulatory B10 cells ameliorate collagen-induced arthritis via suppressing Th17 cell generation [J]. *Am J Pathol*, 2012, 180 (6): 2375-2385.
- Husain AN, Siddiqui MT, Holmes EW, et al. Analysis of risk factors for the development of bronchiolitis obliterans syndrome [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, 159 (3): 829-833.

(2018-07-28 收稿 2018-10-29 修回)