

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.13.003

文章编号: 1005-8982 (2019) 13-0012-06

DAPT 对肺纤维化小鼠 Th17 细胞分化的影响 *

徐芳, 王爱利

(武汉市第一医院 呼吸科, 湖北 武汉 430022)

摘要: 目的 研究 γ -分泌酶抑制剂 DAPT 阻断 NOTCH 信号通路对博来霉素致肺纤维化动物模型 Th17 细胞分化的影响, 探索肺纤维化的发病机制。**方法** 选取 15 只昆明鼠按随机数字表法分为对照组、模型组及 DAPT 组, 每组 5 只。对照组气管注入生理盐水 (1.25 ml/kg), 其余两组注入博来霉素 (5 mg/kg) 复制肺纤维化模型。DAPT 组于模型复制次日起用 DAPT 溶液灌胃 [5 mg/(kg·d)], 隔天 1 次, 直到处死。于第 28 天处死动物, 取左肺组织行苏木精-伊红 (HE) 染色观察肺泡炎和肺纤维化程度。实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测肺组织 NOTCH 1、白细胞介素-17 (IL-17) 及 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) mRNA 的表达水平。酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测外周血 NOTCH 1、IL-17 的含量。流式细胞术检测辅助 T 细胞 17 (Th17) 的比例。**结果** 模型组肺泡炎及纤维化程度较重, DAPT 组炎症程度较模型组减轻, 纤维组织大量减少。qRT-PCR 结果显示, 模型组 NOTCH1、IL-17 和 α -SMA mRNA 的表达水平均较对照组升高 ($P < 0.05$), NOTCH 1 水平与 IL-17 呈正相关 ($P < 0.05$); DAPT 组较模型组下降 ($P < 0.05$)。ELISA 结果显示 DAPT 组的外周血 IL-17 及 NOTCH 1 含量较模型组下降 ($P < 0.05$)。流式细胞术结果显示模型组 CD3⁺ CD4⁺ IL-17⁺ 细胞数量增加 ($P < 0.05$), DAPT 组较模型组降低 ($P < 0.05$)。**结论** DAPT 阻断 NOTCH 信号通路的激活, 抑制 Th17 的分化, 减轻肺纤维化程度。

关键词: 肺纤维化; Th17 细胞; 受体, NOTCH1; 细胞分化; DAPT

中图分类号: R563

文献标识码: A

Effect of DAPT on mouse model of pulmonary fibrosis*

Fang Xu, Ai-li Wang

(Department of Respiratory Diseases, Wuhan No. 1 Hospital, Wuhan, Hubei 430022, China)

Abstract: Objective To explore effect of γ -secretase inhibitor on mouse model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **Methods** 15 mice were randomly divided into 3 groups: control group, model group and DAPT group ($n = 5$). Pulmonary fibrosis model was established by intratracheal instillation of bleomycin (5 mg/kg). Mice in control group was treated by intratracheal instillation of saline (1.25 ml/kg). Mice in DAPT group were administered with DAPT solution by gavage 5 mg/(kg·d) every two days for 28 days. Mice were sacrificed at 28th day and the pathological changes of the lung tissues were observed by HE staining. The levels of NOTCH1, IL-17 and α -SMA mRNA in lung tissues was tested by real-time quantitative qRT-PCR. The serum level of NOTCH1 and IL-17 was detected by ELISA. The proportion of splenic Th17 cells in each group was detected by flow cytometry. **Results** HE staining result showed the mice in model group experienced the most severe pulmonary fibrosis and alveolar inflammation compared with control group ($P < 0.05$), which was reversed with treatment of DAPT ($P < 0.05$). RT-PCR results showed that the levels of NOTCH1, IL-17 and α -SMA in the model group were higher than those in the control group ($P < 0.01$), which was normalized in DAPT group. Levels of NOTCH1 was positively correlated with IL-17 ($P < 0.01$), suggesting that NOTCH signaling pathway was activated in the process of pulmonary fibrosis.

收稿日期: 2019-01-11

* 基金项目: 武汉市卫计委专项基金资助项目 (No: WZ14D09)

[通信作者] 王爱利, Tel: 13667216083

ELISA result showed the serum level of NOTCH1 and IL-17 in DAPT group was significantly reduced compared with the model group ($P < 0.05$). Th17 cells in PBMC of mice increased in model group compared with control group, while that in DAPT group decreased significantly. **Conclusions** DAPT reduces pulmonary fibrosis through inhibiting the differentiation of Th17 cell.

Keywords: pulmonary fibrosis; Th17 cell; Receptor; NOTCH1; cell differentiation; DAPT

肺纤维化 (pulmonary fibrosis) 是一种病因未明、发病机制复杂的弥漫性肺部疾病^[1], 目前公认是肺损伤后过度修复导致细胞外基质过度沉积的结果。课题组前期研究显示, 肺纤维化中辅助性 T 细胞 17 (T helper cell 17, Th17) 的高表达与肺纤维化进展呈正相关^[2]。本研究发现, NOTCH 信号通路在肺纤维化中被激活, 促进成纤维细胞表型转化^[3], 加重细胞外基质的沉积。Th17 高水平分泌和表达白细胞介素-17 (Interleukin 17, IL-17) 的过程受多种信号通路的调控。有研究表明, 在小鼠和人促 Th17 细胞分化的细胞因子环境中均有 NOTCH 信号通路的活化^[4]。本研究采用 γ -分泌酶抑制剂 DAPT 阻断 NOTCH 信号通路, 探讨 NOTCH 信号通路对肺纤维化模型小鼠 Th17 细胞的影响, 为肺纤维化治疗寻找新的免疫靶向药物提供理论和实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

选取 15 只雄性昆明鼠 (批号: 42000600006205), 体重约 25 ~ 30 g, 购自武汉大学动物中心; 博来霉素 (4 mg/支, 天津太和制药有限公司, 批号: 081102), DAPT (美国 Sigma 公司), 鼠 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA)、NOTCH 1 及 IL-17 等相关抗体 (美国 Santa Crue 公司); 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (美国 R & D 公司), Quantscript RT Kit 逆转录试剂盒 (大连 TaKaRa 公司), SYBR Green/Fluorescein 试剂盒 (立陶宛 Fermentas 公司), 异硫氰酸荧光素标记的 CD3、CD4 抗体及藻红蛋白标记的 IL-17A 单克隆抗体 (美国 eBioscience 公司)。

1.2 动物模型的复制及实验分组

按随机数字表法分为 3 组: 对照组、模型组及 DAPT 组, 每组 5 只。各组小鼠用 4% 水合氯醛 (0.01 ml/g) 腹腔注射, 麻醉后固定于手术台上, 颈部气管切开注药。对照组注入生理盐水 (1.25 ml/kg) 设立阴性对照, 模型组及 DAPT 组注入博来霉素 (5 mg/kg), DAPT 组于模型复制次日起开始用 DAPT 溶液灌胃 [5 mg/(kg·d)],

隔天 1 次, 直到处死。

1.3 肺组织病理学观察

各组小鼠于模型复制第 28 天处死, 取左肺相同部位组织, 用 4% 甲醛固定, 常规病理学方法脱水、包埋、切片、HE 染色, 观察肺泡炎和肺纤维化程度。

1.4 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测肺组织中 NOTCH 1、IL-17 及 α -SMA mRNA 的表达水平

取 50 mg 大小的肺组织, 用 Trizol 法提取总 RNA。各样本取相同质量的 RNA 逆转录成 cDNA, qRT-PCR 检测 NOTCH 1、IL-17 及 α -SMA mRNA 的表达水平。反应体系中的引物均由武汉巴菲尔生物技术有限公司设计。循环参数: 95℃ 预变性 2 min, 95℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s。共 40 个循环。见表 1。

表 1 引物序列

| 基因 | 引物序列 | 长度 /bp |
|----------------|------------------------------------|--------|
| NOTCH 1 | 正向: 5'-GGGTGCTCAGGAAAATCATGTCA-3' | 257 |
| | 反向: 5'-AGTTCACAGTGGGGACCAGTAT-3' | |
| IL-17 | 正向: 5'-TCCACCGCAATGAAGACCAAA-3' | 230 |
| | 反向: 5'-CACGAAGCAGTTTGGGACCAC-3' | |
| α -SMA | 正向: 5'-GACCCAGATTATGTTTGAGACC-3' | 112 |
| | 反向: 5'-TCCAGAGTCCAGCACAATACCA-3' | |
| β -actin | 正向: 5'-CACGATGGAGGGCCGGACTCATC-3' | 240 |
| | 反向: 5'-TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT-3' | |

1.5 ELISA 检测外周血 NOTCH 1、IL-17 的含量

各组小鼠于处死日心包取血, 应用 ELISA 检测各组小鼠外周血血清中 NOTCH 1 及 IL-17 的含量。参照试剂盒说明书步骤进行操作, 最后经酶标仪在 450 nm 处读取吸光度值, 并在标准曲线上计算其浓度值。

1.6 流式细胞术检测 Th17 的比例

各组小鼠处死日心包取血 3 ml, 用小鼠淋巴细胞分离液分离外周单个核细胞。取培养后细胞悬液 100 μ l 于流式管中, 加固定液、孵育、破膜、重悬细胞,

用 CD3-FITC 抗体、CD4-FITC 抗体、IL-17-PE-A 单克隆抗体标记, 逐步挑选出 CD3⁺ CD4⁺ IL-17⁺ 3 种阳性细胞上流式细胞仪检测。

1.7 统计学方法

数据分析采用 SPSS 16.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验; 相关分析采用 Pearson 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织病理学变化

对照组肺组织肺泡间隔正常, 肺泡的连续性未受到破坏, 肺泡的直径和面积大小均匀, 大部分区域终末小气道及血管周边无明显炎症浸润表现, 未发现纤维化形成。模型组肺泡间隔增宽, 肺泡的连续性受到破坏, 肺泡大小不均匀, 终末小气道及血管周边有明

显的炎症细胞浸润, 同时伴有纤维化形成, 纤维化以支气管周边区域较为明显。DAPT 组与模型组比较, 肺组织结构比较完整, 肺组织炎症程度明显减轻, 肺泡腔内残留少量炎症细胞, 肺泡间隔明显缩小, 纤维组织明显减少。见图 1。

2.2 肺组织中 NOTCH 通路的激活对 IL-17 的影响及 DAPT 对其阻断效应

3 组 NOTCH 1 mRNA 的相对表达水平分别为 (1.023 ± 0.112)、(4.278 ± 1.021) 和 (1.876 ± 0.114), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=7.129, P=0.000$); 3 组 α -SMA mRNA 的相对表达水平分别为 (1.012 ± 0.087)、(2.378 ± 0.998) 和 (1.687 ± 0.092), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=5.448, P=0.001$); 3 组 IL-17 mRNA 的相对表达水平分别为 (1.232 ± 0.778)、(5.198 ± 1.265) 和 (2.729 ± 1.123), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=3.676, P=0.024$)。见图 2、3。

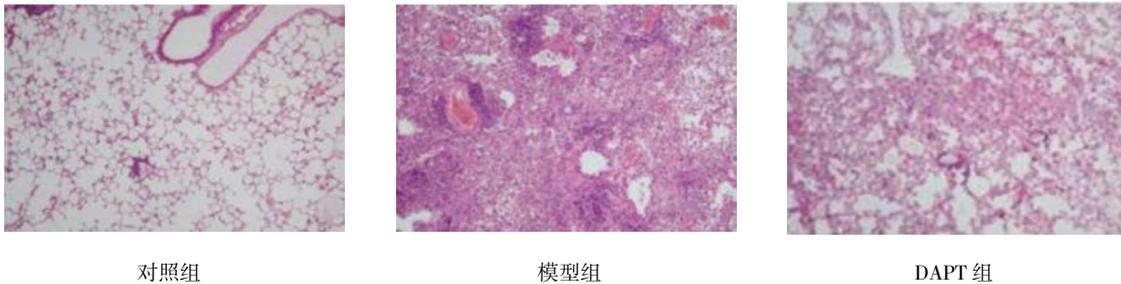


图 1 各组小鼠组织病理学改变 (HE × 200)

2.3 DAPT 对肺纤维化小鼠外周血 NOTCH 1、IL-17 表达水平的影响

3 组 NOTCH 1 和 IL-17 表达水平比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); DAPT 组外周血 IL-17 和 NOTCH 1 的表达水平较模型组下降 ($P < 0.05$)。见表 2。

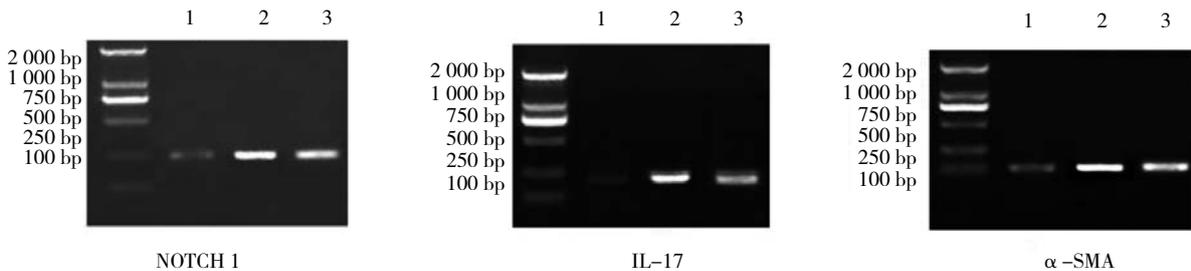
水平与 IL-17 呈正相关 ($r=0.643, P=0.031$), DAPT 组外周血 Th17 的下降与 NOTCH 1 呈正相关 ($r=0.602, P=0.033$)。

2.4 NOTCH 1 与 IL-17 的相关性

Pearson 相关分析显示, 肺组织中 NOTCH 1 mRNA

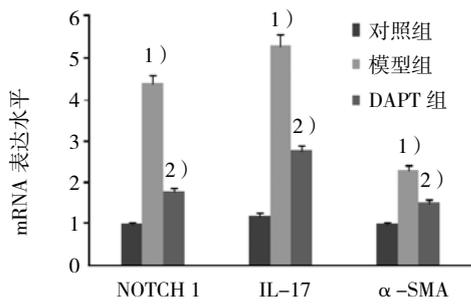
2.5 各组 Th17 比例

对照组、模型组及 DAPT 组 CD3⁺ CD4⁺ IL-17⁺ 细胞比例分别为 0.44%、19.10% 和 8.92%, 3 组比较, 差异有统计学意义 ($F=21.067, P=0.036$)。见图 4。



1: 对照组; 2: 模型组; 3: DAPT 组

图 2 肺组织中 NOTCH 1、IL-17 及 α -SMA mRNA 的表达



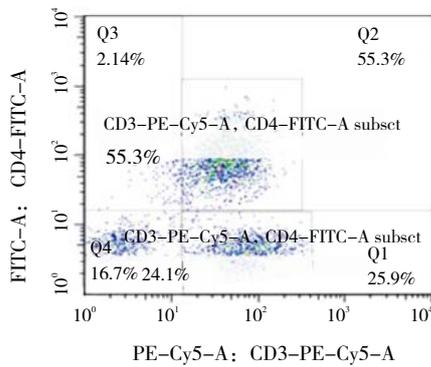
1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组比较, $P < 0.05$

图 3 各组肺组织中 NOTCH 1、IL-17 及 α-SMA mRNA 的表达水平 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

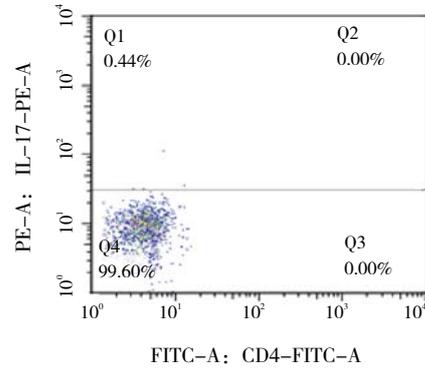
表 2 各组血清中 NOTCH 1 及 IL-17 表达水平的比较 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

| 组别 | NOTCH 1 | IL-17 |
|--------|----------------------------|----------------------------|
| 对照组 | 41.35 ± 4.23 | 23.43 ± 3.27 |
| 模型组 | 98.78 ± 5.32 ¹⁾ | 78.45 ± 4.43 ¹⁾ |
| DAPT 组 | 62.13 ± 3.89 ²⁾ | 42.00 ± 4.07 ²⁾ |
| F 值 | 15.876 | 16.253 |
| P 值 | 0.008 | 0.001 |

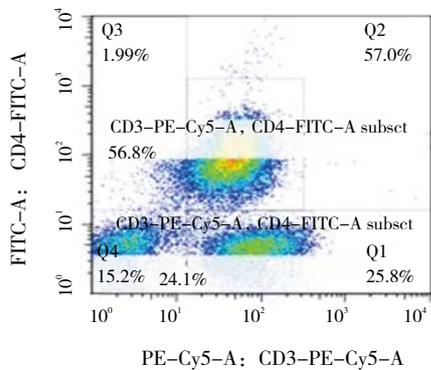
注: 1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组比较, $P < 0.05$



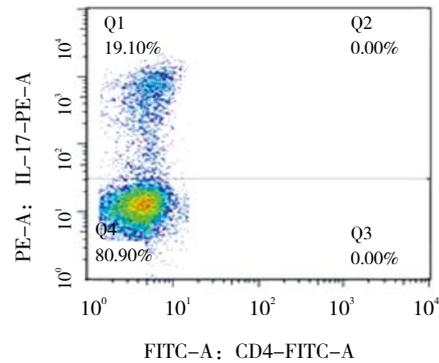
对照组 CD3⁺ CD4⁺ 细胞比例



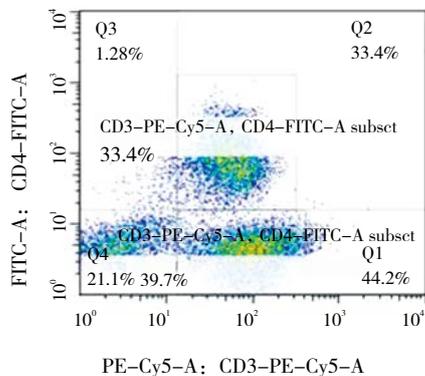
对照组 CD3⁺ CD4⁺ IL-17⁺ 细胞比例



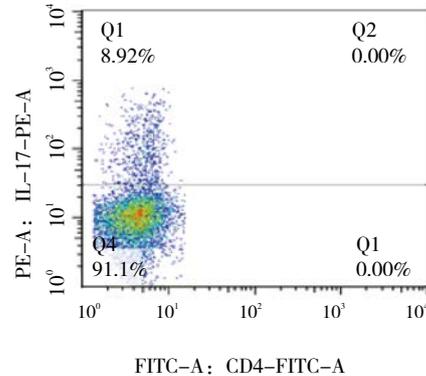
模型组 CD3⁺ CD4⁺ 细胞比例



模型组 CD3⁺ CD4⁺ IL-17⁺ 细胞比例



DAPT 组 CD3⁺ CD4⁺ 细胞比例



DAPT 组 CD3⁺ CD4⁺ IL-17⁺ 细胞比例

图 4 Th17 流式细胞分析

3 讨论

肺纤维化的发病机制不明,目前公认为肺泡上皮反复损伤与过度修复是发病的关键^[5]。反复损伤的肺泡上皮细胞一方面分泌大量的转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)、血小板衍生因子等炎症细胞因子,诱导成纤维细胞聚集及肌成纤维细胞的形成,特异性表达 α -SMA;另一方面发生上皮-间充质转化,通过以TGF- β_1 为主的多种复杂途径调控疾病的发生、发展。在炎症反应过程中,T细胞的免疫应答很关键。近年来发现的Th17/调节性T细胞(regulatory cell, Treg)在功能和分化上相互拮抗、相互调节^[6]。Th17是以分泌IL-17为特点的新型CD4⁺T淋巴细胞的亚群。当免疫系统受到外源性的刺激后,炎症细胞释放的TGF- β 和IL-6诱导CD4⁺T淋巴细胞转化成为Th17,分泌IL-17并表达ROR γ_t 。在生理状态下两者保持动态平衡维持机体正常免疫功能及自稳状态^[7],而一旦受到外界刺激后,这种平衡就发生紊乱,例如慢性阻塞性肺病患者不管是急性发作期还是缓解期都存在着CD4⁺T细胞亚群的失衡^[8]。本研究显示,模型组小鼠肺组织呈现明显纤维化表现,且外周血IL-17的含量及肺组织中IL-17的表达较对照组升高,说明IL-17活化加重肺纤维化的发生、发展。同时,CD3⁺CD4⁺IL-17⁺细胞数量增加,比例升高,提示这种平衡向Th17方向漂移。

如果能抑制Th17细胞介导的这一促炎症反应过程,在一定程度上稳定免疫内环境,可能达到抑制肺纤维化的作用。

有研究表明,NOTCH信号通路能够上调小鼠胸腺及外周Treg的数量并维持其转录因子Foxp3的表达^[9]。经典NOTCH信号通路的激活主要是通过相邻细胞间的NOTCH受体与配体的结合启动,诱导受体构型发生改变,受体的细胞外段被基质金属蛋白酶切割, γ -分泌酶裂开并释放NOTCH胞内段(NICD),进而NICD迁移到细胞核内,与下游效应蛋白CSL结合,激活NOTCH靶基因的转录^[10-11],从而发挥促进细胞增殖、抑制细胞分化等生物学功能^[12]。研究表明,NOTCH信号的激活主要取决于 γ -分泌酶的活性,DAPT能够阻断NOTCH受体活化的中心环节,使NOTCH受体分子无法进一步转变为有效的活性片段,进而完全阻断NOTCH信号通路的激活^[13]。有研究表明,在小鼠促Th17分化的细胞因子环境中存在NOTCH信号分子的活化,阻断NOTCH信号通路则明显下调

Th17细胞相关细胞因子的产生,减轻Th17细胞及其效应细胞因子IL-17A介导的炎症,且NOTCH信号能直接调控Th17细胞特异转录因子ROR γ_t 的表达^[14]。在哮喘的研究中发现,过敏性哮喘患儿外周血中IL-17含量增加,Th17/Treg细胞失调,这种变化伴随着NOTCH1的高表达,说明Th17活化与NOTCH的激活有关^[15]。

本研究模型组中NOTCH1表达增加,提示NOTCH信号通路在肺纤维化中激活,与Th17相关。用DAPT抑制NOTCH信号途径后,DAPT组IL-17的mRNA及外周血水平均降低,与NOTCH1呈正相关。上述结果表明,NOTCH信号通路的激活可能促进T细胞向Th17分化,DAPT抑制NOTCH信号则抑制Th17细胞的活化。

NOTCH信号通路较为复杂,不同的NOTCH受体和配体结合对T细胞亚型的分化及细胞因子的分泌出现不同的效应,加之NOTCH与其他信号通路间有多维调控网络,使得目前NOTCH信号通路对T细胞调控的具体机制尚存在一定的争议。COUTAZ等^[16]认为,在一般情况下,NOTCH负调节Th17细胞的分化,但机体受到外界刺激时,NOTCH能通过影响胞内细胞因子的转运而加速Th17细胞因子的释放,从而抵消原有的效应,因此认为NOTCH信号作用的发挥具有环境依赖性。而BAILIS等^[17]则认为虽然环境状态会影响基因表达的扩增,但NOTCH调控关键转录因子的能力并无改变。即使在强极化条件下,NOTCH也能直接调节T细胞分化的关键转录因子,NOTCH信号通过增强CD4⁺T细胞各亚群的环境敏感性而对其亚群产生无偏移扩增。

本研究只是初步探讨肺纤维化动物模型中NOTCH信号对Th17的影响,将进一步深入靶向研究,了解更多的肺纤维化的发病机制。

参 考 文 献:

- [1] GENG J, HUANG X, LI Y, et al. Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 contributes to phenotype transformation of fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis via multiple pathways[J]. *Exp Biol Med* (Maywood), 2016, 241(2): 157-165.
- [2] 徐芳,黄莺,万勇.雷帕霉素对肺间质纤维化大鼠辅助T细胞亚群平衡变化的影响[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2015, 22(2): 207-211.
- [3] 徐芳,刘红梅,黄莺.银杏叶提取物对特发性肺间质纤维化成纤维细胞表型转化过程中NOTCH信号通路的影响[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2016, 23(4): 417-420.
- [4] AMSEN D, HELBIG C, BACKER R A. Notch in T cell

- differentiation: all things considered[J]. Trends Immunol, 2015, 36(12): 802-814.
- [5] STELLA G M, BALESTRO E. Idiopathic pulmonary fibrosis landscapes: looking glass from pathology to therapy[J]. Minerva Med, 2015, 106(4 Suppl 3): 17-24.
- [6] GENG X, XUE J. Expression of Treg/Th17 cells as well as related cytokines in patients with inflammatory bowel disease[J]. Pak J Med Sci, 2016, 32(5): 1164-1168.
- [7] 陈燕蓉, 肖瑶, 刘彦, 等. 调节性 T 细胞及辅助性 T 细胞在慢性阻塞性肺疾病模型大鼠的表达及临床意义[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(5): 2078-2080.
- [8] 杨晶, 邝相如. CD4⁺T 细胞亚群失衡在慢性阻塞性肺疾病中的临床意义[J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25(1): 46-49.
- [9] BURGHARDT S, CLAASS B, ERHARDT A, et al. Hepatocytes induce Foxp3 regulatory T cells by Notch signaling[J]. J Leukoc Biol, 2014, 96(4): 571-577.
- [10] WANG Y, XING F Y, YE S, et al. Jagged-1 signaling suppresses the IL-6 and TGF- β treatment-induced Th17 cell differentiation via the reduction of ROR γ t/IL-17A/IL-17F/IL-23a/IL-12rb1[J]. Sci Rep, 2015, 5: 8234.
- [11] 余秀文, 曾林祥. Notch1 在肌成纤维细胞转化中的作用及表达变化[J]. 中国现代医学杂志, 2016, 26(15): 60-64.
- [12] NOWELL C S, RADTKE F. Notch as a tumour suppressor[J]. Nat Rev Cancer, 2017, 17(3): 145-159.
- [13] AUDERSET F, SCHUSTER S, FASNACHT N, et al. Notch signaling regulates follicular helper T cell differentiation[J]. J Immunol, 2013, 191(5): 2344-2350.
- [14] KEERTHIVASAN S, SULEIMAN R, LAWLOR R, et al. Notch signaling regulates mouse and human Th17 differentiation[J]. J Immunol, 2011, 187(2): 692-701.
- [15] LI C, SHENG A, JIA X, et al. Th17/Treg dysregulation in allergic asthmatic children is associated with elevated notch expression[J]. J Allergy Clin Immunol, 2017, 137(2): 1.
- [16] COUTAZ M, HURRELL B P, AUDERSET F, et al. Notch regulates Th17 differentiation and controls trafficking of IL-17 and metabolic regulators within Th17 cells in a context-dependent manner[J]. Sci Rep, 2016, 6(1): 39117-39131.
- [17] BAILIS W, YASHIRO O Y, FANG T C, et al. Notch simultaneously orchestrates multiple helper T cell programs independently of cytokine signals[J]. Immunity, 2013, 39(1): 148-159.

(张西倩 编辑)