

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2018.20180166

胸腺肽 $\alpha 1$ 对 C57BL/6 结节病肉芽肿模型小鼠的疗效分析

毛凯来, 李 兵*

海军军医大学附属长征医院呼吸内科, 上海 200003

[摘要] **目的:**探讨胸腺肽 $\alpha 1$ ($T\alpha 1$)对结节病肉芽肿的作用。**方法:**将 25 只 C57BL/6 小鼠随机分为 2 组:模型组 15 只,空白对照组 10 只。模型组用分枝杆菌过氧化歧化酶多肽 A (superoxide dismutase A, Sod A) 诱导结节病;空白对照组给予等剂量的磷酸盐缓冲液(PBS)。建模开始第 22 天,每组随机取 5 只小鼠处死。第 22~35 天,将模型组剩余的 10 只小鼠随机分为模型组和给药组,每组 5 只。给药组每天给予 10 μg $T\alpha 1$ 腹腔注射;模型组、空白对照组每天给予 0.5 mL PBS 腹腔注射。建模开始第 36 天,处死小鼠,评价肺、淋巴结的组织学改变;免疫组化法检测肉芽肿中 $CD4^+$ T 细胞和巨噬细胞的改变;流式细胞术检测外周血辅助性 T 细胞(Th1)、Th2、Th17、调节性 T 细胞(Treg)、CD4/CD8,并采用 ELISA 法检测血浆、肺组织匀浆中白细胞介素 17A(IL-17A)、IL-10 水平。**结果:**模型组小鼠可见肉芽肿性变,肉芽肿中存在巨噬细胞和 $CD4^+$ T 细胞浸润;给药组组织病理学改善。给药组、模型组小鼠外周血 Th1 及 Th17 比例升高($P<0.05$);各组外周血中 Treg 比例、Th2 比例及 CD4/CD8 水平差异无统计学意义。模型组小鼠血浆 IL-10 水平降低($P<0.05$);模型组小鼠血浆 IL-17A 水平升高($P<0.05$)。3 组小鼠肺组织 IL-10 含量差异无统计学意义;模型组小鼠肺组织 IL-17A 含量升高($P<0.05$)。**结论:** $T\alpha 1$ 能减轻结节病肉芽肿小鼠病情, $T\alpha 1$ 的治疗效应可能与降低结节病肉芽肿小鼠中较高水平的 Th17 相关,但结论尚须验证。

[关键词] 结节病; $T\alpha 1$;Th17;Treg**[中图分类号]** R 593.9 **[文献标志码]** A

Effect of thymosin alpha 1 on C57BL/6 model mice with sarcoidosis granuloma

MAO Kai-lai, LI Bing*

Department of Respiratory Medicine, Changzheng Hospital, Navy Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of thymosin alpha 1 ($T\alpha 1$) on the sarcoidosis granuloma. **Methods:** Twenty-five C57BL/6 mice were randomly divided into 2 groups; 15 in model group and 10 in blank control group. Mice in the model group were treated with superoxide dismutase A, whereas mice in the blank control group were treated with PBS of the same volume. Twenty-two days after the establishing of the model, 5 mice in each group were randomly selected and sacrificed. Twenty-two to 35 days after the establishing of the model, the remaining 10 mice in the model group were further randomly divided into two groups, 5 in the model group and 5 in the administration group, mice in the drug group was given an intraperitoneal injection of 10 μg $T\alpha 1$ every day, and mice in the model group and the blank control group were given a intraperitoneal injection of 0.5 mL PBS every day. On the 36th day; mice were sacrificed, the histologic changes of the lung and lymph node were evaluated; $CD4^+$ T cells and macrophages in granuloma were detected by immunohistochemistry; the levels of Th1, Th2, Th17, Treg, and CD4/CD8 in peripheral blood were detected by flow cytometry; and the cytokines IL-17A and IL-10 in lung homogenate and plasma were analyzed by ELISA. **Results:** Mice in the model group showed granulomatous changes, and the macrophage specific antigen macrophage and $CD4^+$ T were positive in the granuloma. The histopathological changes improved in the administration group. The levels of Th1 and Th17 in peripheral blood of both treatment group and model group were higher than the control group ($P<0.05$). There was no significant difference in the levels of Treg, Th2, or CD4/CD8 ratio in peripheral blood among all groups. The plasma IL-10 level of the mice in the model group was lower than that in the control group ($P<0.05$); plasm IL-17A level of the mice in the model groups was higher than that in the control group ($P<0.05$). There was no significant difference in the lung-tissue IL-10 level among all groups; the lung-tissue IL-17A level of the mice in the model group was higher than that in the control group ($P<0.05$). **Conclusions:** $T\alpha 1$ has a therapeutic effect on sarcoidosis mice, which might be related to the downregulation of the Th17 level, while the results need to be approved.

[Key Words] sarcoidosis; $T\alpha 1$;Th17;Treg**[收稿日期]** 2018-02-23**[接受日期]** 2018-03-28**[基金项目]** 上海市科学技术委员会基金项目(134119a0100). Supported by Project of Shanghai Municipal Science and Technology Commission (134119a0100).**[作者简介]** 毛凯来, 硕士生, 住院医师. E-mail: qqmaokailai@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81885333; E-mail: bing_li1962@163.com

结节病是一种以非干酪性上皮样肉芽肿为病理表现、全身多系统受累的疾病,以肺脏和胸部淋巴结受累最常见。结节病目前尚无根治性治疗方法,糖皮质激素仍是首选药物,但长期使用糖皮质激素可引起严重不良反应。因此,有待研发新的治疗结节病的药物。

胸腺肽 $\alpha 1$ (T $\alpha 1$)是由胸腺上皮细胞和胸腺内分泌细胞产生的活性多肽。其作为免疫调节剂,已被广泛用于病毒性肝炎、肿瘤、重症感染等多种疾病的治疗^[1-3]。研究^[4]表明,结节病与1型T辅助细胞(Th1)免疫反应明显相关。本研究以分枝杆菌过氧化氢歧化酶多肽A(superoxide dismutase A, Sod A)诱导肺结节病小鼠模型,给予其T $\alpha 1$ 治疗,通过病理学、T细胞亚群及相关细胞因子的检测,初步探讨T $\alpha 1$ 对结节病小鼠的治疗效果及可能的机制,为结节病的药物治疗提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料及来源 选择25只雌性、6~8周龄C57BL/6小鼠(购自第二军医大学动物实验中心),体质量18~22 g, SPF级。注射用胸腺法新(日达仙)购自第二军医大学长征医院药房。Sod A(Gen Bank 序列号: DQ768096)由上海强耀生物科技有限公司采用固相肽合成法合成,纯度>90%(高效液相色谱法)。不完全弗氏佐剂(incomplete Freund's adjuvant, IFA)购自美国Sigma公司。小鼠CD3-per CP、CD4-FITC、CD8-Cy5.5、CD25-PE、Foxp3-FITC、IL-17-Cy5.5、IL-4 PE和IFN- γ APC抗体购自美国Biolgend公司。

1.2 动物模型的制备 25只C57BL/6小鼠适应性饲养7 d后按随机数字表法分为2组:模型组15只、空白对照组10只。第1天:模型组每只给予50 μ g Sod A与IFA 0.25 mL混合液皮下注射;空白对照组给予0.5 mL磷酸盐缓冲液(PBS)皮下注射。第14天:模型组给予50 μ g Sod A与6 000粒琼脂糖珠(溶于0.5 mL PBS, Sod A与琼脂糖珠共价偶联)尾静脉注射;空白对照组给予PBS 0.5 mL尾静脉注射。第22天:每组随机取5只小鼠,用6%水合氯醛0.2 mL腹腔注射麻醉后,脱颈白法处死。

1.3 T $\alpha 1$ 干预治疗 第22~35天,将模型组剩余的10只小鼠随机分为2组,模型组5只、给药组5只。给药组每天给予10 μ g T $\alpha 1$ 腹腔注射;模型组、空白对照组每天给予0.5 mL PBS腹腔注射。第36天:小鼠经6%水合氯醛0.2 mL腹腔注射后,用脱

颈白法处死。

1.4 一般情况及组织学观察 每日观察小鼠的进食、活动、毛发等一般情况。在第22、36天处死、解剖小鼠后,观察其肺脏及肺门淋巴结改变,用摘眼球法留取外周血。取出淋巴结及肺,4%多聚甲醛固定,脱水、石蜡包埋、切片,苏木精-伊红(H-E)染色观察。免疫组化检测T细胞CD4⁺抗原和巨噬细胞标志抗原Mac-2表达。

1.5 外周血中T细胞亚群及CD4/CD8检测 用摘眼球法取小鼠外周血,将外周血单核细胞(PBMC)从血液中分离出来,用佛波酯(PMA, 50 ng/mL)、离子霉素(1 μ g/mL)、BFA(3 μ g/mL)和莫能菌素(1.4 μ g/mL)刺激5 h,进行染色标记。用流式细胞仪检测Th17、调节性T细胞(Treg)、Th1、Th2、CD4、CD8。

1.6 肺组织匀浆和血浆中白细胞介素10(IL-10)、IL-17A水平检测 取小鼠相同部位的肺组织,剪碎,加入1 mL 0.9%氯化钠液,在匀浆器中研磨,制成肺组织匀浆,1 500 r/min($r=225$ mm),离心10 min,取上清。采用多因子流式细胞术检测匀浆上清和血浆中的IL-17A、IL-10水平。

1.7 统计学处理 采用SPSS 20.0软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较用单向方差分析,两组间比较采用LSD- t 检验。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 一般情况及组织观察 小鼠在实验过程中无死亡,进食、毛发、活动情况无显著差别。造模完成后(第22天):模型组小鼠肺门淋巴结肿大、质稍硬、活动度可、与周围组织无粘连,肺有肉眼可见的颗粒样改变;空白对照组小鼠无明显淋巴结肿大,肺无明显异常。给药完成后(第36天):给药组小鼠肺门淋巴结肿大、质稍硬、活动度可、与周围组织无粘连,肺稍许粗糙;模型组小鼠肺门淋巴结肿大和肺表现与给药组相似;空白对照组无明显异常(图1)。

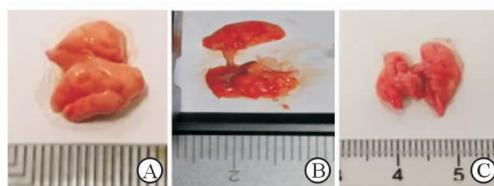


图1 开始建模后第36天小鼠肺组织外观

A:空白对照组;B:模型组;C:给药组

2.2 H-E染色结果 第22天:模型组小鼠肺组织

H-E 染色显示,大量淋巴细胞浸润,形成多个大小不等的以类上皮细胞为中心、淋巴细胞围绕的非干酪性肉芽肿;空白对照组小鼠肺泡、肺间质结构正常,未见淋巴细浸润及肉芽肿(图 2),说明模型成功建立。

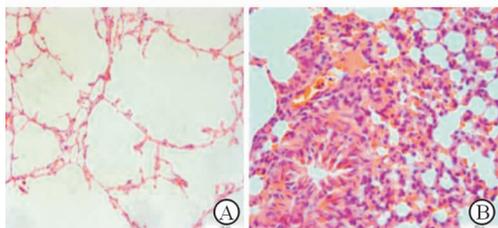


图 2 开始建模后第 22 天小鼠肺组织 H-E 染色结果

A:空白对照组;B:模型组. Original magnification: $\times 100$

第 36 天:H-E 染色显示,模型组肺组织中可见大量淋巴细胞浸润及多个大小不等的肉芽肿;给药组肺组织中可见淋巴细胞浸润及肉芽肿,但较模型组改善;空白对照组肺泡、肺间质结构正常,未见淋巴细浸润及肉芽肿(图 3)。

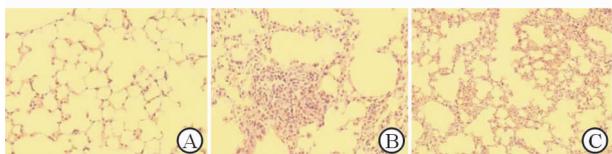


图 3 开始建模后第 36 天小鼠肺组织 H-E 染色结果

A:空白对照组;B:模型组;C:给药组. Original magnification: $\times 100$

2.3 免疫组化结果 模型组小鼠肉芽肿中心巨噬细胞特异性抗原 Mac-2 表达阳性、周围 $CD4^+$ T 细胞阳性(图 4)。

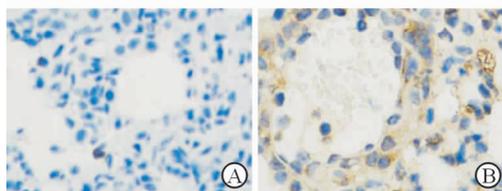


图 4 模型组小鼠肉芽肿中 Mac-2 表达及周围 $CD4^+$ T 细胞分布情况

A:Mac-2;B:CD 4^+ T 细胞. Original magnification: $\times 400$

2.4 外周血中 Th1、Th2、Th17、Treg 及 $CD4/CD8$ 水平 模型组及给药组外周血中 Th1、Th17 百分比均显著高于空白对照组($P < 0.05$),Th2 比例与空白对照组差异无统计学意义;各组间外周血中 $CD4/CD8$ 及 Treg 比例差异无统计学意义(图 5)。

2.5 血浆和肺组织匀浆中细胞因子 IL-10、IL-17A 水平 模型组血浆 IL-10 水平低于空白对照组($P < 0.05$);给药组与空白对照组、模型组血浆 IL-10 水平差异无统计学意义。模型组血浆 IL-17A 浓度高于空白对照组($P < 0.05$);给药组与空白对照组、模型组血浆 IL-17A 水平差异无统计学意义。3 组间肺组织 IL-10 水平差异无统计学意义。模型组肺组织 IL-17A 水平高于空白对照组($P < 0.05$);给药组与空白对照组、模型组肺组织 IL-17A 差异无统计学意义(图 6)。

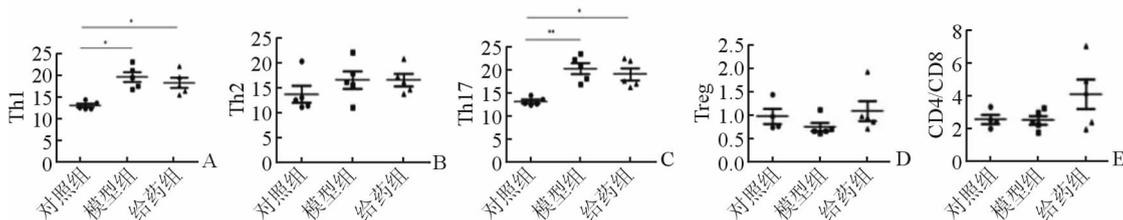


图 5 外周血 Th1、Th2、Th17、Treg、CD4/CD8 比较

* $P < 0.05$; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

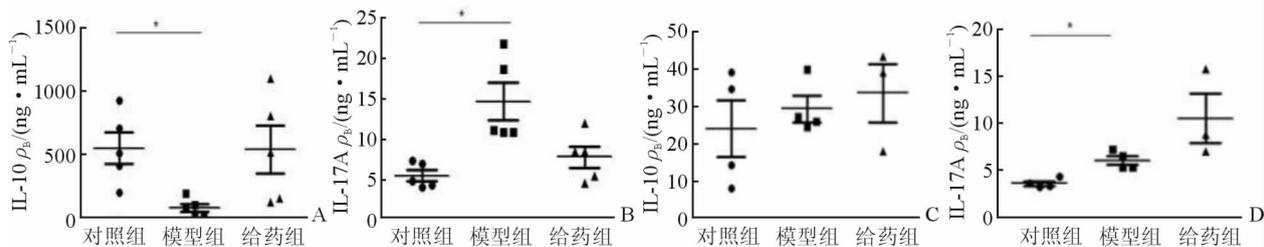


图 6 血浆和肺组织中细胞因子 IL-17A、IL-10 水平

A:血浆中 IL-10 水平;B:血浆中 IL-17A 水平;C:肺组织匀浆中 IL-10 水平;D:肺组织匀浆中 IL-17A 水平. * $P < 0.05$; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

结节病的病因和发病机制目前尚不清楚。一

般认为,结节病是在遗传、环境、感染等因素的综合影响下出现的以细胞免疫功能失调为主的免疫异常状态。研究^[5]表明,结节病与 Th1 型免疫反应相

关。而 Sod A 从结节病患者病灶中分离而来,与患者 Th1 型免疫反应相关。Swaisgood 等^[6]用人工合成的 SodA 作为免疫原成功诱导建立了肺结节病肉芽肿小鼠模型。这一模型的病理组织形态、免疫反应特点与人类结节病肉芽肿类似。

Th17 是 CD4⁺ T 细胞一种亚型。IL-17 是其重要效应细胞。IL-17 包含 6 个亚型(IL-17A~F),其中以 IL-17A 的生物学作用最为突出^[7]。Treg 是具有免疫调节功能的一种 CD4⁺ T 细胞亚群,主要分泌 IL-10、转化生长因子-β(TGF-β),在维持免疫耐受、调节自身免疫中起重要作用^[8]。研究认为,结节病患者中,Th17 分化增强^[9-11],而 Treg 的变化则不明确^[9-13]。

本研究参考 Swaisgood 等^[6]的方法,成功构建了 C57BL/6 小鼠结节病肉芽肿模型。结果发现,模型组 Th1 增加,外周血 Th17 增加,血浆和肺组织匀浆中 IL-17A 水平升高,而外周血 Treg 比例和肺组织内 IL-10 水平无明显变化。本研究中 Th17 变化情况与研究^[9-11]结果。有研究^[12]认为,结节病患者 Treg 增加,外周血及支气管肺泡灌洗液(BALF)中 Treg 比例升高;而 Idali 等^[13]发现,结节病患者 BALF 中 Treg 细胞相关基因(FoxP3、IL-10、TGF-β)的表达下降。上述研究中 Treg 水平不一致的原因可能为:(1)一般以 Foxp3 为 Treg 的特异性标志无,但有少部分 Treg 为 Foxp3 阴性,且 Foxp3 亦表达于 CD8⁺ T 细胞;(2)结节病涉及的免疫反应复杂,个体免疫状态也有差别。

Tα1 是在 1966 年由 Goldstein 在小牛胸腺中分离纯化而来^[14]。作为胸腺肽 α 家族的一员,其是由胸腺上皮细胞和胸腺内分泌细胞产生的高度保守的活性肽,可通过多种机制作用于免疫系统。Tα1 可以促进 T 细胞的成熟,提高 T 细胞产生特定细胞因子的能力,增加 Treg 细胞比例^[15],已被广泛用于多种疾病的治疗,如肿瘤、重症感染、病毒性肝炎等^[1-3]。目前鲜见 Tα1 在结节病治疗中应用的报道。本研究对结节病模型小鼠进行 Tα1 治疗,发现给药组小鼠肺部病理改变较模型组小鼠改善,但两组小鼠外周血 Th17、Treg、IL-17A 水平及肺组织 IL-17A、IL-10 水平差异无统计学意义,可能与本研究中小鼠数量较少、Tα1 治疗时间较短有关。其具体的调节机制和药物量效关系以及临床药物实验还有待进一步研究。

综上所述,本研究结果表明,C57BL/6 结节病肉芽肿模型小鼠 Th17 增加。Tα1 对结节病肉芽肿模型小鼠有一定的疗效,其 Tα1 可能通过下调 Th17 水平达到治疗效果,但因样本量少等原因未得出有意义的结论,尚须加大样本量进一步研究。

参考文献

- [1] GUO Y, CHANG H, LI J, et al. Thymosin alpha 1 suppresses proliferation and induces apoptosis in breast cancer cells through PTEN-mediated inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *Apoptosis*, 2015,20(8):1109-1121.
- [2] CAMERINI R, GARACI E. Historical review of thymosin alpha 1 in infectious diseases[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2015,15 Suppl 1:S117-S127.
- [3] WU X, JIA J, YOU H. Thymosin alpha-1 treatment in chronic hepatitis B[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2015,15 Suppl 1:S129-S132.
- [4] PRASSE A, GEORGES C G, BILLER H, et al. Th1 cytokine pattern in sarcoidosis is expressed by bronchoalveolar CD4⁺ and CD8⁺ cells [J]. *Clin Exp Immunol*, 2000,122(2):241-248.
- [5] ALLEN S S, EVANS W, CARLISLE J, et al. Superoxide dismutase A antigens derived from molecular analysis of sarcoidosis granulomas elicit systemic Th-1 immune responses [J]. *Respir Res*, 2008,9: 36.
- [6] SWAISGOOD C M, OSWALD-RICHTER K, MOELLER S D, et al. Development of a sarcoidosis murine lung granuloma model using Mycobacterium superoxide dismutase A peptide [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011,44(2):166-174.
- [7] IWAKURA Y, ISHIGAME H, SAIJO S, et al. Functional specialization of interleukin-17 family members [J]. *Immunity*, 2011,34(2):149-162.
- [8] KATOH H, ZHENG P, Liu Y. FOXP3: Genetic and epigenetic implications for autoimmunity[J]. *J Autoimmun*, 2013,41:72-78.
- [9] SAKTHIVEL P, BRUDER D. Mechanism of granuloma formation in sarcoidosis[J]. *Curr Opin Hematol*, 2017, 24(1):59-65.
- [10] BROOS C E, HENDRIKS R W, KOOL M. T-cell immunology in sarcoidosis: disruption of a delicate balance between helper and regulatory T-cells[J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2016, 22(5):476-483.
- [11] MORTAZ E, REZAYAT F, AMANI D, et al. The roles of Th1, Th17 and regulatory T cells in the pathogenesis of sarcoidosis [J]. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2016, 15(4): 334-339.
- [12] MIYARA M, AMOURA Z, PARIZO C, et al. The immune paradox of sarcoidosis and regulatory T cells[J]. *J Exp Med*, 2006,203(2):359-370.
- [13] IDALI F, WAHLSTRÖM J, MÜLLER-SUUR C, et al. Analysis of regulatory T cell associated forkhead box P3 expression in the lungs of patients with sarcoidosis[J]. *Clin Exp Immunol*, 2008,152(1):127-137.
- [14] GOLDSTEIN A L, GOLDSTEIN A L. From lab to bedside: emerging clinical applications of thymosinα1[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2009, 9(5):593-608.
- [15] YANG X, QIAN F, HE H Y, et al. Effect of thymosin alpha-1 on subpopulations of Th1, Th2, Th17, and regulatory T cells (Tregs) in vitro[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2012,45(1): 25-32.