· 原 著 ·

雷帕霉素促进哮喘调节性T细胞分化及功能的机制

金华良, 周 燕, 王利民

浙江大学医学院附属杭州市第一人民医院呼吸科, 浙江 杭州 310006

[摘 要] **目的:**探讨雷帕霉素对哮喘调节性T细胞体外分化的作用及机制。**方法:**采用卵蛋白致敏、激发制备哮喘模型。采用超高速流式细胞分选仪收集哮喘小鼠和正常小鼠的脾CD4⁺CD25⁻T细胞,进一步分为三组,其中模型对照组予转化生长因子β(TGF-β)、白介素(IL)-2,雷帕霉素组予TGF-β、IL-2的同时用雷帕霉素(终浓度为500 nmol/L)进行干预。采用流式细胞仪检测调节性T细胞水平和CD4⁺CD25⁻T细胞增殖情况;采用蛋白质印迹法测定哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合体(mTORC)1/2通路相关蛋白S6、Akt磷酸化水平。**结果:**与模型对照组比较,雷帕霉素组调节性T细胞比例增加,CD4⁺CD25⁻T细胞增殖水平降低,mTORC1/2信号通路下游S6、Akt磷酸化水平降低(均P<0.05)。**结论:**雷帕霉素可促进调节性T细胞的分化及功能,其在一定程度上与抑制mTORC1/2信号通路相关。

[关键词] 哮喘;雷帕霉素;调节性T细胞;哺乳动物雷帕霉素靶蛋白;分化;增殖;体外实验
[中图分类号] R562.2 **[文献标志码]** A

The mechanism of rapamycin in promoting asthmatic regulatory T cell differentiation and function *in vitro*

JIN Hualiang, ZHOU Yan, WANG Limin (Department of Respiratory Medicine, Affiliated Hangzhou First People's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310006, China)

Corresponding author: WANG Limin, E-mail: lemonwlm@163.com, <https://orcid.org/0000-0003-0624-2177>

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of rapamycin in promoting asthmatic regulatory T cell differentiation *in vitro*. **Methods:** Asthma model was prepared by sensitization and challenge of ovalbumin in mice. Spleen CD4⁺CD25⁻T cells were sorted from the asthmatic mice and normal mice by ultrahigh speed flow cytometer, and

收稿日期:2021-06-23 接受日期:2021-08-30 网络预发表日期:2021-10-21

基金项目:浙江省自然科学基金(LY19H290011);国家自然科学基金(81403247);中国博士后科学基金(2016M601982)

第一作者:金华良,副主任医师,主要从事慢性气道炎症性疾病的机制及中药干预研究;E-mail:jinhualiang2008@126.com; <https://orcid.org/0000-0001-5263-8258>

通信作者:王利民,主任医师,硕士生导师,主要从事慢性气道炎症性疾病的机制研究;E-mail:lemonwlm@163.com; <https://orcid.org/0000-0003-0624-2177>

divided into three groups. Transforming growth factor- β and interleukin-2, or combined with rapamycin (final concentration of 500 nmol/L) were given in the model group or the rapamycin group. The levels of Treg cells and $CD4^+CD25^-$ T cells were detected by flow cytometry. The phosphorylation level of downstream proteins of S6 and Akt in the mTORC1/2 signaling pathway were examined by Western blotting. **Results:** Compared with the model group, the differentiation level of Treg cells in the rapamycin group was significantly increased, the proliferation level of $CD4^+CD25^-$ T cells was decreased, and the phosphorylations of the mTORC1/2 substrates, S6 protein and Akt were decreased (all $P < 0.05$). **Conclusion:** Rapamycin can promote the differentiation and function of Treg cells via inhibition of the mTORC1/2 signaling pathway.

[**Key words**] Asthma; Rapamycin; Regulatory T cell; Mammalian target of rapamycin; Differentiation; Proliferation; *In vitro* experiment

[J Zhejiang Univ(Med Sci), 2021, 50(5): 621-626.]

[**缩略语**] 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR); mTOR 复合体(mTOR complex, mTORC); 白介素(interleukin, IL); 别藻蓝蛋白(allophycocyanin, APC); 藻红蛋白(phycoerythrin, PE); 异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC); 叉头状转录因子P亚组(forkhead box P, Foxp); 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH); 转化生长因子(transforming growth factor, TGF)

调节性T细胞是一类具有免疫调节功能的T细胞亚群,可抑制效应T细胞的增殖和活化,从而维持自身免疫耐受^[1]。持续性慢性气道炎症是哮喘重要的发病机制,调节性T细胞可抑制Th2细胞等效应T细胞的增殖和活化,对控制哮喘气道炎症具有重要作用^[2]。研究发现,哮喘患者调节性T细胞水平及功能显著降低^[3],因此促进调节性T细胞分化从而上调其水平可能是治疗哮喘的可行途径。

调节性T细胞分化的调节机制尚未阐明,目前认为mTOR信号通路在其中发挥重要作用。研究发现,大剂量雷帕霉素在体外可同时抑制mTORC1和mTORC2信号,促进调节性T细胞的增殖及分化^[4]。本团队前期研究发现,雷帕霉素在体内可改善哮喘模型气道炎症,降低IL-4等Th2细胞因子表达,其作用与抑制mTORC1信号通路相关,而对mTORC2信号通路无抑制作用,推测雷帕霉素对mTOR信号通路的不同作用可能与其剂量相关^[5]。本研究基于mTOR信号通路,拟从细胞水平进一步探讨雷帕霉素对调节性T细胞分化的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

8周龄健康Balb/c雌性小鼠10只(体重20~22 g)由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供。卵蛋白(V级)和乙酰甲胆碱为美国Sigma公司产品;雷帕霉素为美国Gene Operation公司产品;ImjectTM明矾佐剂为美国Thermo Fisher公司产品;1640培养基为美国Gibco公司产品;小鼠流式抗体APC-CD4抗体、PE-CD25抗体及FITC-Foxp3抗体为美国eBioscience公司产品;mTOR信号通路抗体磷酸化S6核糖体蛋白抗体(Ser235/236)、S6核糖体蛋白抗体、磷酸化Akt(Ser473)、Akt及GAPDH内参抗体为美国CTS公司产品。超高速流式细胞分选仪及流式细胞检测仪为美国Beckman公司产品;小鼠哮喘造模雾化仪器(Boy Sx 085G3005)为德国PARI公司产品。

1.2 建立哮喘模型

将6只Balb/c雌性小鼠于实验第0天腹腔及皮下分别注射致敏液各0.1 mL(含卵蛋白40 μ g、ImjectTM明矾佐剂0.05 mL、等渗氯化钠溶液

0.15 mL),第7天重复致敏。第14天起用1%的卵蛋白等渗氯化钠溶液雾化吸入激发,每日1次,每次30 min,连续1周。正常小鼠采用等渗氯化钠溶液替代卵蛋白雾化。

1.3 流式细胞术分选CD4⁺CD25⁻T细胞

取正常小鼠和哮喘模型小鼠,采用2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,无菌取脾(哮喘模型小鼠6只,正常小鼠4只),用弯剪将脾脏剪成小块,加入1640培养基制成细胞悬液,用淋巴细胞分离液分离后取中间白雾层,洗涤,300×g离心5 min,沉淀后PBS重悬,细胞计数。取2×10⁷个脾淋巴细胞,加入80 μL PBS、10 μL PE-CD25抗体和10 μL APC-CD4抗体,混合均匀后4℃避光孵育30 min,300×g离心10 min,弃上清液;加入1 mL PBS,300×g离心10 min,弃上清液;加入400 μL含2%胎牛血清的PBS,混匀细胞;使用超高速流式细胞分选仪收集CD4⁺CD25⁻T细胞。

1.4 细胞分组及干预

将哮喘模型小鼠脾脏来源的CD4⁺CD25⁻T细胞加入到CD3单抗预先包被的96孔板,同时加入CD28单抗(终浓度1 μg/mL)、50 μmol/L β-巯基乙醇、100 U/mL青-链霉素、10%胎牛血清、1640培养基,将细胞分为三组分别进行干预处理:①空白对照组,仅加入PBS;②模型对照组,加入TGF-β(终浓度为5 ng/mL)和IL-2(终浓度为500 U/mL);③雷帕霉素组,加入TGF-β(终浓度为5 ng/mL)、IL-2(终浓度为500 U/mL)和雷帕霉素(终浓度为500 nmol/L)。

1.5 流式细胞术检测调节性T细胞水平

各组细胞培养1周后,取5×10⁵个细胞,分别加入80 μL PBS、10 μL PE-CD25抗体和10 μL APC-CD4抗体,混合均匀后4℃避光孵育30 min;300×g离心10 min后弃上清液;加入1 mL破膜固定液,300×g离心10 min后弃上清液,加入10 μL FITC-Foxp3抗体;室温避光孵育60 min后,加入破膜固定液洗涤及PBS重悬,使用流式细胞仪检测。

1.6 流式细胞术检测CD4⁺CD25⁻T细胞增殖

用2.5 μmol/L羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯(CFSE)标记正常小鼠脾脏来源的CD4⁺CD25⁻T细胞,并在96孔板上培养(1×10⁵/孔),加入CD3单抗(终浓度为10 μg/mL)和CD28单抗(终浓度为1 μg/mL),按照1:1比例加入

1.4节中各组细胞悬液(1×10⁶/mL)共培养。37℃下孵育1周,使用流式细胞仪测定各组CD4⁺CD25⁻T细胞增殖情况。

1.7 蛋白质印迹法测定S6及Akt磷酸化水平

将哮喘模型小鼠脾脏来源的CD4⁺CD25⁻T细胞加入24孔板,按照1.4节分组培养,1周后收集细胞,加入预冷的细胞裂解液裂解5 min,15 000×g离心10 min,取上清液进行BCA定量。取等量蛋白样品上样,采用10%的SDS-PAGE电泳凝胶恒压120 V分离约1.5 h,用转印系统将蛋白转至聚偏二氟乙烯膜,室温封闭2 h。剪膜后分别用磷酸化S6核糖体蛋白抗体(1:1000)、S6核糖体蛋白抗体(1:1000)、磷酸化Akt(1:1000)、Akt(1:1000)4℃孵育过夜。加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温与膜孵育1 h,TBST缓冲液洗涤3次,电化学发光法曝光后洗片,扫描后用Quantity One灰度分析软件进行光密度计算,以磷酸化目的蛋白条带灰度值与总蛋白灰度值的比值作为磷酸化目的蛋白相对表达量。

1.8 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析。正态分布的计量数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用Dunnett-*t*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脾CD4⁺CD25⁻T细胞分选结果

流式细胞术分选正常小鼠和哮喘模型小鼠脾脏来源的CD4⁺CD25⁻T细胞代表图谱见图1,图中右下象限的细胞为选取的CD4⁺CD25⁻T细胞。

2.2 雷帕霉素对调节性T细胞分化比例的影响

空白对照组、模型对照组和雷帕霉素组调节性T细胞比例分别为(1.14±0.06)%、(16.21±0.32)%和(19.54±1.58)%,其中雷帕霉素组调节性T细胞比例较空白对照组和模型对照组高(均 $P < 0.05$)。见图2。结果提示,雷帕霉素可促进调节性T细胞分化。

2.3 雷帕霉素对调节性T细胞抑制CD4⁺CD25⁻T细胞增殖的影响

空白对照组、模型对照组和雷帕霉素组CD4⁺CD25⁻T细胞增殖水平分别为(82.27±2.75)%、(72.97±2.33)%和(54.63±3.03)%,其中雷帕霉素组CD4⁺CD25⁻T细胞增殖水平低于空

白对照组和模型对照组(均 $P<0.05$)。见图3。结果提示,雷帕霉素可促进调节性T细胞免疫功能,增强对 $CD4^+CD25^-$ T细胞增殖的抑制作用。

2.4 雷帕霉素对 $CD4^+CD25^-$ T细胞S6、Akt磷酸化表达水平的影响

与模型对照组比较,雷帕霉素组mTORC1/2信号通路下游S6和Akt磷酸化水平均降低(均

$P<0.05$),见图4、表1。结果提示,雷帕霉素可抑制脾 $CD4^+CD25^-$ T细胞mTORC1/2信号通路。

3 讨论

本研究采用哮喘模型小鼠脾 $CD4^+CD25^-$ T细胞,探讨了雷帕霉素对 $CD4^+CD25^-$ T细胞分化为调节性T细胞的作用及机制,结果提示大剂量的雷帕

图1 流式细胞术分选正常小鼠和哮喘模型小鼠脾脏来源 $CD4^+CD25^-$ T细胞结果

Figure 1 $CD4^+CD25^-$ T cells were separated by flow cytometry from spleen of normal mice and asthmatic model mice

图2 流式细胞术测定各组调节性T细胞分化比例

Figure 2 The differentiation ratio of $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ regulatory T cells in each group determined by flow cytometry

CFSE:羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯。

图3 流式细胞术测定各组调节性T细胞增殖结果

Figure 3 The function of regulatory T cells in each group determined by flow cytometry

图 4 各组脾CD4⁺CD25⁻ T细胞S6、Akt磷酸化水平电泳图

Figure 4 Electrophoretogram of phosphorylation of S6 and Akt protein in spleen CD4⁺CD25⁻ T cells

表 1 各组CD4⁺CD25⁻ T细胞S6、Akt磷酸化表达水平比较

Table 1 The phosphorylation levels of S6 and Akt protein in each group

(x̄ ± s)			
组 别	n	磷酸化S6/S6	磷酸化Akt/Akt
空白对照组	3	3.062 ± 0.233	0.473 ± 0.024
模型对照组	3	2.358 ± 0.314	0.350 ± 0.008
雷帕霉素组	3	0.929 ± 0.122*	0.179 ± 0.002*

与模型对照组比较, *P<0.05.

霉素(500 nmol/L)可促进哮喘调节性T细胞分化,同时经雷帕霉素分化后的调节性T细胞可以抑制CD4⁺CD25⁻ T细胞增殖。此外,本文资料证实雷帕霉素对哮喘调节性T细胞的分化作用可能是基于同时抑制mTORC1和mTORC2信号通路。

T淋巴细胞亚群失衡是哮喘气道炎症持续的重要机制,调节性T细胞可维持免疫稳态,对控制效应T细胞介导的气道炎症尤为关键。而CD4⁺CD25⁻ 初始T细胞可在一定条件下分化为调节性T细胞。因此,通过促进调节性T细胞分化,上调其水平对控制哮喘气道炎症具有重要意义。目前认为,mTOR信号通路与调节性T细胞分化及增殖密切相关。mTOR为进化上高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,相对分子质量为289 000,通过形成mTORC1和mTORC2两种复合物在细胞内传递信号^[6]。激活mTORC1信号通路可促进下游核糖体蛋白S6激酶磷酸化,而激活mTORC2信号通路则促进Akt磷酸化^[7]。mTOR信号通路主要调控细胞的生长、增殖及代谢,对T细胞分化具有重要调节作用;mTORC1促进Th1和Th17细胞

分化,mTORC2促进Th2细胞分化,而同时阻断mTORC1和mTORC2信号通路则诱导产生Foxp3⁺调节性T细胞^[8]。

雷帕霉素是mTOR信号通路的抑制剂,但对mTORC1和mTORC2信号通路的作用尚未完全阐明。既往研究发现,大剂量雷帕霉素在体外可促进调节性T细胞的增殖和分化,并促进其抑制功能^[9];mTOR^{-/-} 初始T细胞可在未加入TGF-β和IL-2等促分化细胞因子的情况下分化为调节性T细胞,因此推测其机制可能与雷帕霉素同时抑制mTORC1和mTORC2信号通路相关^[10]。本团队前期通过研究雷帕霉素对哮喘模型气道炎症的体内干预机制发现,雷帕霉素(4 mg/kg)可通过抑制mTORC1信号通路改善哮喘气道炎症,但对mTORC2信号通路无显著抑制作用^[5,11]。雷帕霉素对mTORC1和mTORC2信号通路的作用尚存在争议,可能与雷帕霉素的剂量或体内外作用差异相关。本文资料提示,雷帕霉素(500 nmol/L)可显著促进哮喘模型小鼠脾CD4⁺CD25⁻ T细胞向调节性T细胞分化和增殖,并证实雷帕霉素可显著抑制CD4⁺CD25⁻ T细胞S6、Akt磷酸化水平,表明雷帕霉素可通过抑制mTORC1和mTORC2信号通路促进调节性T细胞分化。

为验证分化后的调节性T细胞的免疫抑制功能,本研究进一步探讨了调节性T细胞对CD4⁺CD25⁻ T细胞增殖的抑制作用。本文资料表明,调节性T细胞经雷帕霉素处理后对CD4⁺CD25⁻ T细胞增殖具有更显著的抑制作用,可能与雷帕霉素促进CD4⁺CD25⁻ T细胞向调节性T细胞分化从而导致调节性T细胞比例增高有关。但雷帕霉素是否存在对调节性T细胞功能的调节作用,尚需深入研究。

总之,本研究通过体外干预哮喘模型小鼠脾CD4⁺CD25⁻ T细胞,证实雷帕霉素可促进调节性T细胞分化,且分化后的调节性T细胞具有免疫抑制功能,可为雷帕霉素的临床转化提供依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] OHKURA N, KITAGAWA Y, SAKAGUCHI S. Development and maintenance of regulatory T cells[J]. *Immunity*, 2013, 38(3): 414-423.

[2] LIN C L, HUANG H M, HSIEH C L, et al. Jagged1-

- expressing adenovirus-infected dendritic cells induce expansion of Foxp3⁺ regulatory T cells and alleviate T helper type 2-mediated allergic asthma in mice[J]. *Immunology*, 2019, 156(2): 199-212.
- [3] HARTL D, KOLLER B, MEHLHORN A T, et al. Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4⁺CD25^{hi} regulatory T cells in pediatric asthma[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2007, 119(5): 1258-1266.
- [4] SHI G, LI D, REN J, et al. mTOR inhibitor INK128 attenuates dextran sodium sulfate-induced colitis by promotion of MDSCs on Treg cell expansion[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(2): 1618-1629.
- [5] 金华良, 王利民, 王娇莉, 等. 雷帕霉素对哮喘缓解期小鼠模型气道炎症的作用[J]. *浙江医学*, 2017, 39(11): 860-864.
- JIN Hualiang, WANG Limin, WANG Jiaoli, et al. Effects of rapamycin on airway inflammation in mice with asthma during remission[J]. *Zhejiang Medicine*, 2017, 39(11): 860-864. (in Chinese)
- [6] KIM J, GUAN K L. mTOR as a central hub of nutrient signalling and cell growth[J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(1): 63-71.
- [7] CHEN C J, SGRITTA M, MAYS J, et al. Therapeutic inhibition of mTORC2 rescues the behavioral and neurophysiological abnormalities associated with Pten-deficiency[J]. *Nat Med*, 2019, 25(11): 1684-1690.
- [8] DELGOFFE G M, POLLIZZI K N, WAICKMAN A T, 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.
- [9] HU M, HAWTHORNE W J, NICHOLSON L, et al. Low-dose interleukin-2 combined with rapamycin led to an expansion of CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ regulatory T cells and prolonged human islet allograft survival in humanized mice[J]. *Diabetes*, 2020, 69(8): 1735-1748.
- [10] DELGOFFE G M, KOLE T P, ZHENG Y, et al. The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment[J]. *Immunity*, 2009, 30(6): 832-844.
- [11] JIN H, WANG L, LI B, et al. Astragaloside IV ameliorates airway inflammation in an established murine model of asthma by inhibiting the mTORC1 signaling pathway[J]. *Evid-Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017: 4037086.

[本文编辑 沈 敏 余 方]

· 学术动态 ·

周民研究员团队研发溶葡萄球菌酶微球用于耐药细菌性肺炎的靶向治疗和预防

浙江大学转化医学研究院和浙江大学医学院附属第二医院周民研究员团队在细菌性肺炎靶向治疗研究方面取得了进展,相关研究论文“Lung targeting lysostaphin microspheres for methicillin-resistant staphylococcus aureus pneumonia treatment and prevention”(https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.1c06460)近期在线发表于《美国化学会:纳米》(*ACS Nano*)。

研究人员设计了具有良好生物相容性和可降解性的羟基乙酸共聚物载药微球,用于实现肺部靶向递送溶葡萄球菌酶以改善细菌性肺炎患者预后。研究结果显示,该体系在体外有较强的抗游离细菌和抗生物膜的能力,可以有效降低细菌毒力因子的表达,提高生物膜对宿主中性粒细胞的敏感性。在细菌性肺炎小鼠模型中,治疗性或预防性尾静脉注射后,抗菌微球可以有效地聚集到肺部,在感染部位持续释放溶葡萄球菌酶,提高患病小鼠存活率,减少肺内细菌负荷,降低肺部炎症损伤,形成预防生物膜进而使细菌性肺炎演变成慢性感染。研究结果显示,设计的溶葡萄球菌酶抗菌微球具有较大的临床转化潜力,是一种用来靶向治疗和预防细菌性肺炎的有效技术手段。

博士研究生林秀慧、何健为论文第一作者。研究得到了国家自然科学基金、浙江省重点研发计划、现代光学仪器国家重点实验室等支持。