

· 论著 ·

文章编号: 1007-8738(2021)04-0295-07

## 利金方降低大鼠 Th17 细胞/CD4<sup>+</sup> T 细胞比值减轻香烟烟雾提取物引起的炎症反应

黎展华, 陈斯宁\*, 李瑞祥, 周继红, 黄文锋, 何婷婷, 冯玉青, 王浩舟, 廖丽君

(广西中医药大学附属瑞康医院呼吸内科, 广西南宁 530021)

**[摘要]** 目的 探讨利金方对香烟提取物诱导的 CD4<sup>+</sup> T 细胞向 Th17 细胞分化及对炎症的影响及作用机制。方法 分离和培养 CD4<sup>+</sup> T 细胞,分为空白对照组、香烟烟雾提取物(CSE)组、(0.25、0.5、1.0) mg/mL 利金方处理组、Janus 激酶 2(JAK2) 抑制剂 AG-490 组、信号转导子和转录激活子 3(STAT3) 抑制剂 TG-101348 组。利金方处理组和抑制剂组都是先给予相应处理后再进行 CSE 刺激。流式细胞术检测各组 CD4<sup>+</sup> T 细胞、Th17 细胞比例,ELISA 检测 CD4<sup>+</sup> T 细胞培养基中肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 17A(IL-17A) 水平;实时定量 PCR 检测 CD4<sup>+</sup> T 细胞 JAK2、STAT3、维甲酸相关孤儿核受体 $\gamma$ t(ROR- $\gamma$ t)的 mRNA 水平,Western blot 法检测 CD4<sup>+</sup> T 细胞 JAK2、磷酸化的 JAK2(p-JAK2)、STAT3、磷酸化的 STAT3(p-STAT3)、ROR- $\gamma$ t 的蛋白水平。结果 CSE 处理增加 Th17 细胞/CD4<sup>+</sup> T 细胞比值,培养基中 TNF- $\alpha$ 、IL-17A 含量;ROR- $\gamma$ t 的 mRNA 和蛋白表达增加,JAK2、STAT3 磷酸化增加。利金方处理后降低 Th17 细胞/CD4<sup>+</sup> T 细胞比值,减少 TNF- $\alpha$ 、IL-17A 分泌,抑制 ROR- $\gamma$ t 的 mRNA 和蛋白表达以及 JAK2、STAT3 的磷酸化。结论 利金方通过抑制 JAK2-STAT3-ROR- $\gamma$ t 通路降低 Th17 细胞/CD4<sup>+</sup> T 细胞比值减轻 CSE 诱导的炎症反应。

**[关键词]** 慢性阻塞性肺疾病; 利金方; CD4<sup>+</sup> T 细胞; Th17 细胞; JAK2; STAT3; 维甲酸相关孤儿核受体 $\gamma$ t(ROR- $\gamma$ t)

**[中图分类号]** R285.5, R563, R392.12, R364.5, R259 **[文献标志码]** A

DOI:10.13423/j.cnki.cjcmi.009171

## Liking Prescription reduces cigarette smoke extract-induced inflammatory response via inhibiting JAK2/STAT3/ROR- $\gamma$ t pathway to reduce Th17/CD4<sup>+</sup> T cell ratio in rats

LI Zhanhua, CHEN Sining\*, LI Ruixiang, ZHOU Jihong, HUANG Wenfeng, HE Tingting, FENG Yuqing, WANG Haozhou, LIAO Lijun

Department of Respiratory Medicine, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530021, China

\* Corresponding author, E-mail: chensining2007@163.com

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of Liking Prescription on cigarette smoke extract (CSE)-induced differentiation into Th17 cells from CD4<sup>+</sup> T cells and inflammation, and to study the possible mechanism. **Methods** CD4<sup>+</sup> T cells isolated and cultured were divided into control group, CSE group, (0.25, 0.5, 1.0) mg/mL Liking Prescription treatment group, JAK2 inhibitor AG-490 group, STAT3 inhibitor TG-1013480 group. The Liking Prescription treatment groups and the inhibitor groups were given corresponding treatments before CSE stimulation. The proportions of CD4<sup>+</sup> T cells and Th17 cells in each group were detected by flow cytometry. TNF- $\alpha$  and IL-17A in CD4<sup>+</sup> T cell culture medium were analyzed by ELISA. The expression of JAK2, STAT3 and retinoic acid-related orphan nuclear receptor $\gamma$ t (ROR- $\gamma$ t) mRNA in CD4<sup>+</sup> T cells was measured by real-time quantitative PCR. The expression of JAK2, phosphorylated JAK2 (p-JAK2), STAT3, phosphorylated STAT3 (p-STAT3) and ROR- $\gamma$ t protein in CD4<sup>+</sup> T cells were analyzed by Western blotting. **Results** CSE treatment increased the ratio of Th17 cells/CD4<sup>+</sup> T cells and the content of TNF- $\alpha$  and IL-17A in the culture medium; the expression of ROR- $\gamma$ t mRNA and protein increased; the phosphorylation of JAK2 and STAT3 increased. After treatment with Liking Prescription, the ratio of Th17 cells/CD4<sup>+</sup> T cells was reduced; the secretion of TNF- $\alpha$  and IL-17A dropped; the expression of ROR- $\gamma$ t mRNA and protein and the phosphorylation of JAK2 and STAT3 were inhibited. **Conclusion**

收稿日期: 2020-10-19; 接受日期: 2021-01-02

基金项目: 国家自然科学基金(81760853)

作者简介: 黎展华(1987-),男,广西玉林人,主治医师,硕士

Tel: 13707878450; E-mail: 690070521@qq.com

\* 通讯作者,陈斯宁, E-mail: chensining2007@163.com

Liking Prescription can reduce CSE-induced inflammatory response via inhibiting JAK2/STAT3/ROR- $\gamma$ t pathway to reduce the ratio of Th17 cells/CD4<sup>+</sup> T cells.

[Key words] COPD; Liking Prescription; CD4<sup>+</sup> T cells; Th17 cells; JAK2; STAT3; ROR- $\gamma$ t

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种慢性气道免疫炎症性疾病<sup>[1-3]</sup>。Th17细胞属于CD4<sup>+</sup>T细胞亚群,香烟烟雾提取物(cigarette smoke extract, CSE)通过刺激CD4<sup>+</sup>T细胞分化成Th17细胞并分泌白细胞介素17(interleukin 17, IL-17)、IL-21、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )等炎症因子产生炎症效应,这些炎症效应造成肺的结构性损害并最终导致COPD的发生<sup>[4-7]</sup>。Janus激酶/信号转导子与转录激活子(Janus kinase/signal transducers and activators of transcription, JAK/STAT)信号通路是调控细胞免疫炎症反应的重要通路之一,炎症因子如IL-6等与细胞膜上的酪氨酸激酶受体相结合后激活Janus激酶2(Janus kinase 2, JAK2),磷酸化的JAK2(phosphorylated Janus kinase 2, p-JAK2)进一步激活STAT3,形成磷酸化的STAT3(phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3, p-STAT3),p-STAT3进入细胞核内激活维甲酸相关孤儿核受体 $\gamma$ t(retinoic acid-related orphan receptor  $\gamma$ t, ROR- $\gamma$ t),这一信号通路激活使CD4<sup>+</sup>T细胞转化为Th17细胞<sup>[8-11]</sup>。利金方是陈斯宁教授以《医学正传》中“六君子汤”为基础,结合临床经验总结出来的治疗COPD肺气虚证患者的经验方。我们发现利金方通过下调白三烯B4(leukotriene B4, LTB4)、IL-8、TNF- $\alpha$ 从而抑制COPD大鼠模型的气道及肺部的炎症反应<sup>[12-13]</sup>。另外,利金方通过下调CD3<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>T细胞/CD8<sup>+</sup>T细胞比值、IgA、IgG、IgM从而改善COPD稳定期肺气虚证患者的细胞免疫与体液免疫功能,并且利金方联合噻托溴铵治疗能改善COPD稳定期肺气虚证患者的肺功能,减少COPD急性发作次数,提高患者的运动耐量和生活质量<sup>[14-15]</sup>。利金方改善COPD患者免疫功能的作用机制尚不清楚,因此,本研究采用体外细胞实验,探讨利金方调控炎症反应的作用以及对CD4<sup>+</sup>T细胞向Th17细胞分化的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级健康雄性Wistar大鼠30只,体质量180~200g,由长沙市天勤生物技术有限公司提供,合格证号:SCXK

(湘)2014-0010。

利金方免煎颗粒购自广西中医药大学附属瑞康医院;真龙牌香烟购自广西中烟工业有限责任公司,烟气烟碱量1.2mg,焦油含量11mg。JAK2抑制剂AG490即(E)-N-苄基-2-氰基-3-(3,4-二羟基苯基)丙烯酰胺[(E)-N-benzyl-2-cyano-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylamide]、STAT3抑制剂TG-101348即N-叔丁基-3-(5-甲基-2-(4-(2-(吡咯烷基-1-基)乙氧基)苯氨基)嘧啶-4-基氨基)苯磺酰胺[N-tert-butyl-3-(5-methyl-2-(4-(2-(pyrrolidin-1-yl)ethoxy)phenylamino)pyrimidin-4-ylamino)benzenesulfonamide]购自MedChemExpress公司;RPMI1640培养基、胎牛血清购自Gibco公司;异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的抗大鼠IL-17A单克隆抗体(IL-17A-FITC)、兔抗p-STAT3(Tyr705)多克隆抗体、小鼠抗ROR- $\gamma$ t单克隆抗体购自Thermo Fisher Scientific公司;大鼠外周血淋巴细胞分离液购自北京Solarbio公司;藻红蛋白(phycoerythrin, PE)标记的抗CD4抗体(CD4-PE)、FITC标记的小鼠抗大鼠CD3单克隆抗体(CD3-FITC)购自Becton Dickinson公司。大鼠CD4磁珠购自美天旎公司;二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)法蛋白定量试剂盒购自杭州联科生物公司;大鼠IL-17A ELISA试剂盒、大鼠TNF- $\alpha$  ELISA试剂盒购自上海江莱生物科技有限公司;辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的小鼠抗GAPDH单克隆抗体购自ProteinTech公司;兔抗JAK2单克隆抗体、兔抗p-JAK2(Tyr1007/1008)单克隆抗体、兔抗STAT3单克隆抗体、HRP标记的马抗小鼠IgG多克隆抗体、HRP标记的山羊抗兔IgG多克隆抗体购自Cell Signaling Technology公司。

### 1.2 方法

1.2.1 大鼠CD4<sup>+</sup>T细胞的分离和原代培养 解剖大鼠,取出脾脏,脾脏剪碎过筛,适当血清稀释液稀释,按照说明书使用淋巴细胞分离液分离出大鼠脾脏的淋巴细胞。按照说明书使用大鼠CD4<sup>+</sup>T细胞分离磁珠通过细胞磁珠分选法分选出CD4<sup>+</sup>T细胞,使用流式细胞术检测CD4<sup>+</sup>T细胞纯度(纯度大于90%)。分选出的CD4<sup>+</sup>T细胞用含100mL/L胎牛血清的RPMI1640培养基接种于培养瓶中,于37℃,50mL/LCO<sub>2</sub>培养箱中培养。

1.2.2 CSE 的制备及 CSE 浓度确定 参考 Li 等<sup>[16]</sup>的方法,将两支去过滤嘴香烟连接于一个抽吸装置点燃。吸入的烟雾经过入口通入 10 mL 无血清 RPMI1640 培养液中,制成悬液,滴定至 pH 在 7.4 左右。通过测量 320 nm 处悬液(A)值。悬液经 0.22 μm 微孔过滤器过滤除菌作为 CSE 原液(100%),并根据实验需要稀释成相应的浓度。本研究中使用的 CSE 浓度为 CSE 原液浓度的 0.02%。

1.2.3 利金方溶液的制备 实验用利金方煎颗粒的组成:人参 2.5 g、黄芪 4.5 g、麦冬 3 g、五味子 1 g、紫菀 4 g、川贝 3 g、蛤蚧 1 g、白术 3 g、防风 1 g、茯苓 1 g、陈皮 1 g、甘草 2 g。利金方煎颗粒溶解配制成溶液用于本研究。本研究中利金方母液剂量为 1 g/mL,利金方高剂量组使用的利金方剂量为 1 mg/mL,利金方中剂量组使用的利金方剂量为 0.5 mg/mL,利金方低剂量组使用的利金方剂量为 0.25 mg/mL。

1.2.4 细胞分组培养及处理 将大鼠 CD4<sup>+</sup> T 细胞接种于 6 孔板或 96 孔板中分为以下 7 组:空白对照组:CD4<sup>+</sup> T 细胞单纯培养,除培养基外,不进行任何处理;CSE 组:CD4<sup>+</sup> T 细胞用 0.2 mL/L 的 CSE 溶液处理 24 h;利金方低剂量组:CD4<sup>+</sup> T 细胞先用 0.25 mg/mL 的利金方处理 24 h,再用 0.2 mL/L 的 CSE 处理 24 h;利金方中剂量组:CD4<sup>+</sup> T 细胞先用 0.5 mg/mL 的利金方处理 24 h,再用 0.2 mL/L 的 CSE 处理 24 h;利金方高剂量组:CD4<sup>+</sup> T 细胞先用 1 mg/mL 的利金方处理 24 h,再用 0.2 mL/L 的 CSE 处理 24 h。JAK2 抑制剂组(AG-490 组):根据药物说明书 CD4<sup>+</sup> T 细胞先用 50 nmol/L 的 JAK2 抑制剂 AG-490 处理后,再用 0.2 mL/L 的 CSE 处理 24 h;STAT3 抑制剂组(TG-101348 组):根据说明书 CD4<sup>+</sup> T 细胞先用 50 nmol/L 的 STAT3 抑制剂 TG-101348 处理后,再用 0.2 mL/L 的 CSE 处理 24 h。

1.2.5 流式细胞术检测 CD4<sup>+</sup> T 细胞、Th17 细胞比例 收集各组细胞,根据试剂说明书使用 CD4-PE、IL-17A-FITC 孵育后,使用流式细胞分析仪检测,使用 CellQuest 软件进行分析。

1.2.6 ELISA 检测 CD4<sup>+</sup> T 细胞培养液 TNF-α 和 IL-17A 水平 收集各组细胞培养液离心后,留取各组细胞培养上清液。根据试剂盒说明书,使用 TNF-α 和 IL-17A ELISA 试剂盒检测各组细胞培养上清液中的 TNF-α 和 IL-17A 水平。

1.2.7 实时荧光定量 PCR 检测 CD4<sup>+</sup> T 细胞 JAK2、STAT3、ROR-γt 的 mRNA 表达 在检测 JAK2、STAT3、ROR-γt 的 mRNA 表达时,细胞分为空白对照组、CSE 组、低中高剂量利金方组、JAK2 抑制剂组(AG-490 组);为验证 STAT3 对 ROR-γt 表达的影响,另增加 STAT3 抑制剂 TG-101348 组检测 STAT3、ROR-γt 的 mRNA 表达量。按照相关试剂说明书裂解细胞、提取 RNA、逆转录 cDNA。JAK2 上游引物为 5'-GTAGCCCTAAGGACTTCAACA-3',下游引物为 5'-ATCTTTCGGCTTTGGAGGAC-3';STAT3 上游引物为 5'-GAAAAGGACATCAGTGGCAAGA-3',下游引物为 5'-GTAGAGGTAGACCAGTGGGGATAC-3';ROR-γt 上游引物为 5'-AGTGCAATCAAAGTGGAGCCT-3',下游引物为 5'-GAAGAAACCCTTGCATCCTTCAC-3';GAPDH 上游引物为 5'-AGCCCGGTGCTGAGTATGTC-3',下游引物为 5'-TGCCTGCTTACCACCTTCT-3'。实时荧光定量 PCR 反应体系组成:2 × SYBR® Mix 5 μL、参比染料罗丹明 X(carboxy-X-rhodamine, ROX) 0.05 μL、上下游引物各 0.5 μL、cDNA 1 μL,补充无 RNase 水至 10 μL。PCR 扩增程序:95 °C 预变性 2 min,(95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 30 s) × 40 个循环。采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 方法计算相对表达量。

1.2.8 Western blot 法检测 CD4<sup>+</sup> T 细胞 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、ROR-γt 的蛋白表达 检测 p-JAK2、JAK2、p-STAT3、STAT3、ROR-γt 的蛋白表达时,实验分为空白对照组、CSE 组、低中高剂量利金方组、JAK2 抑制剂 AG-490 组;验证 STAT3 作用时,另增加 STAT3 抑制剂 TG-101348 组。加入 RIPA 裂解液及蛋白酶抑制剂按照使用说明提取蛋白,BCA 试剂盒检测蛋白浓度,煮沸使蛋白变性,按照凝胶试剂说明书及检测指标的分子量大小,配置相应浓度的蛋白胶,上样、电泳、转膜、封闭。加兔抗 JAK2 抗体、兔抗 p-JAK2 抗体、兔抗 STAT3 抗体、兔抗 p-STAT3 抗体、小鼠抗 ROR-γt 抗体,除小鼠抗 GAPDH 抗体 1:5000 稀释外,其余抗体为 1:1000 稀释,室温摇床孵育 2 h;洗涤后,分别加 HRP 标记的马抗小鼠 IgG(1:1000)或 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(1:1000)、HRP 标记的小鼠抗 GAPDH 抗体,室温摇床孵育 1 h;ECL 化学发光显影,用 Image J 软件对目的条带进行吸光度值计算。

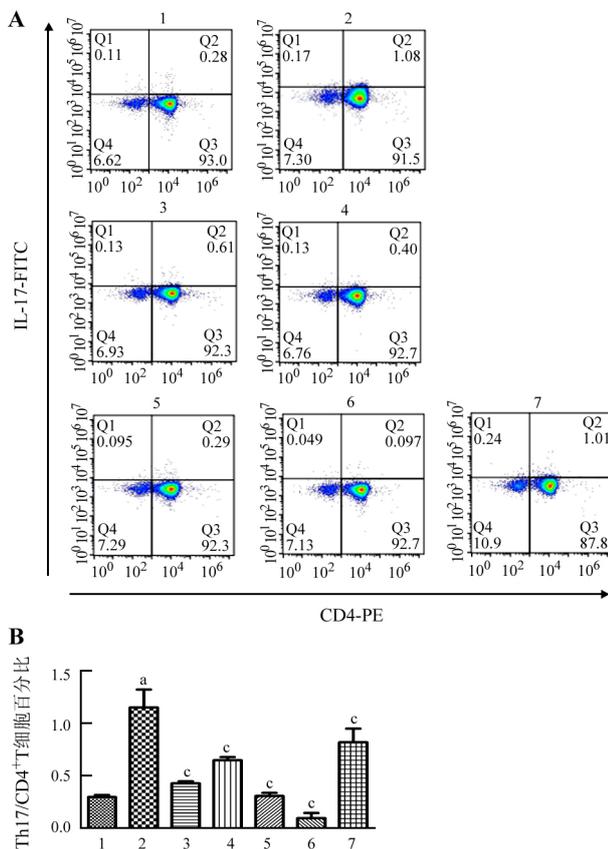
1.2.9 统计学分析 采用 SPSS22.0 和统计分析,数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,

方差不齐则采用秩和检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 利金方逆转 CSE 刺激引起的 CD4<sup>+</sup> T 细胞向 Th17 细胞分化

流式细胞仪检测结果显示: 与空白对照组相比, CSE 能明显诱导 CD4<sup>+</sup> T 细胞向 Th17 细胞分化, Th17 细胞/CD4<sup>+</sup> T 细胞比值升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。利金方低、中、高剂量组, JAK2 抑制剂组 (AG-490 组) 及 STAT3 抑制剂组 (TG-101348 组) 均能逆转 CSE 诱导的 CD4<sup>+</sup> T 细胞向 Th17 细胞分化, 使 CD4<sup>+</sup> T 细胞增多, Th17 细胞减少, Th17 细胞/CD4<sup>+</sup> T 细胞比值降低, 与 CSE 组相比, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 1)。



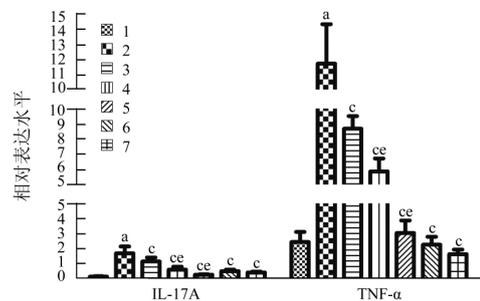
A: 流式细胞术检测 CD4<sup>+</sup> T 细胞和 IL-17A<sup>+</sup> T 细胞比例; B: Th17 细胞/CD4<sup>+</sup> T 细胞比值的半定量分析。1: 空白对照组; 2: CSE 组; 3: 利金方低剂量组; 4: 利金方中剂量组; 5: 利金方高剂量组; 6: AG-490 组; 7: TG-101348 组。\* $P < 0.05$  vs 1;  $^c P < 0.05$  vs 2。

图 1 流式细胞术检测 Th17 细胞、CD4<sup>+</sup> T 细胞比例

### 2.2 利金方处理降低 CD4<sup>+</sup> T 细胞 TNF- $\alpha$ 、IL-17A 的分泌

与空白对照组相比, ELISA 结果显示: CSE 刺激

CD4<sup>+</sup> T 细胞后, TNF- $\alpha$ 、IL-17A 的分泌明显增多, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。利金方低、中、高剂量组, JAK2 抑制剂 AG-490 组及 STAT3 抑制剂 TG-101348 组均能明显减少 TNF- $\alpha$ 、IL-17A 的分泌, 与 CSE 组相比, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。并且利金方低、中、高剂量三组中, 利金方高剂量组的 TNF- $\alpha$ 、IL-17A 分泌量最少, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 2), 呈现剂量依赖性。



1: 空白对照组; 2: CSE 组; 3: 利金方低剂量组; 4: 利金方中剂量组; 5: 利金方高剂量组; 6: AG-490 组; 7: TG-101348 组。\* $P < 0.05$  vs 1;  $^c P < 0.05$  vs 2;  $^e P < 0.05$  vs 3。

图 2 ELISA 法检测 IL-17A、TNF- $\alpha$  的表达

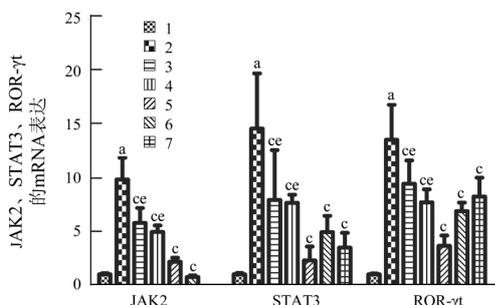
### 2.3 利金方处理逆转 CSE 刺激引起的 CD4<sup>+</sup> T 细胞 JAK2、STAT3、ROR- $\gamma$ t 的 mRNA 水平增加

与空白对照组相比, PCR 结果显示: CSE 刺激 CD4<sup>+</sup> T 细胞后 JAK2、STAT3、ROR- $\gamma$ t 的 mRNA 表达量均明显上调, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。利金方低、中、高剂量组, JAK2 抑制剂组 (AG-490 组) 及 STAT3 抑制剂组 (TG-101348 组) 均能明显降低 STAT3、ROR- $\gamma$ t 的 mRNA 表达量; 利金方低、中、高剂量组, AG-490 组能明显下调 JAK2 的表达量; 与 CSE 组相比, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。另外利金方低、中、高剂量三组中, 利金方高剂量组的 JAK2、STAT3、ROR- $\gamma$ t 的 mRNA 表达量是最低的, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 利金方中剂量组的 JAK2、STAT3、ROR- $\gamma$ t 的 mRNA 表达量较利金方低剂量组降低, 但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 图 3)。

### 2.4 利金方处理下调 ROR- $\gamma$ t 的蛋白表达并抑制 JAK2、STAT3 的磷酸化

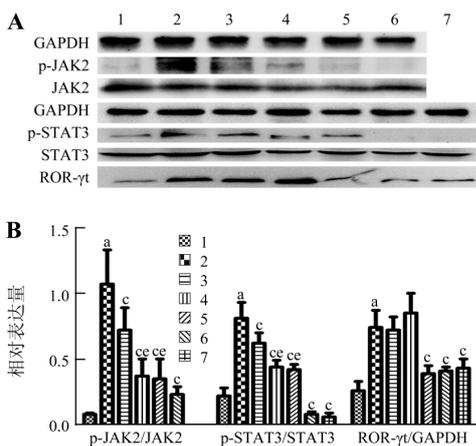
与空白对照组相比, Western blot 结果显示: CSE 刺激 CD4<sup>+</sup> T 细胞后, p-JAK2、p-STAT3、ROR- $\gamma$ t 蛋白的相对表达量明显上调, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与 CSE 组相比, 利金方低、中、高剂量组, JAK2 抑制剂 AG-490 组均能明显降低 JAK2、STAT3 的蛋白磷酸化蛋白表达, 差异有统计学意义

( $P < 0.05$ )。与 CSE 组相比, STAT3 抑制剂 TG-101348 组明显降低 STAT3 的蛋白磷酸化蛋白表达, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。另外利金方低、中、高剂量三组中, 利金方中剂量组及利金方高剂量组比利金方低剂量组的 p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 蛋白更低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与 CSE 组相比, AG-490 组、TG-101348 组、利金方高剂量组 ROR- $\gamma$ t 的蛋白表达量明显降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 图 4)。



1: 空白对照组; 2: CSE 组; 3: 利金方低剂量组; 4: 利金方中剂量组; 5: 利金方高剂量组; 6: AG-490 组; 7: TG-101348 组。\* $P < 0.05$  vs 1; <sup>^</sup> $P < 0.05$  vs 2; <sup>^</sup> $P < 0.05$  vs 5。

图 3 荧光定量 PCR 检测 JAK2、STAT3、ROR- $\gamma$ t 的 mRNA 表达



A: Western blot 法检测 CD4<sup>+</sup> T 细胞 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、ROR- $\gamma$ t 的蛋白表达; B: CD4<sup>+</sup> T 细胞 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、ROR- $\gamma$ t 的蛋白水平的半定量分析。1: 空白对照组; 2: CSE 组; 3: 利金方低剂量组; 4: 利金方中剂量组; 5: 利金方高剂量组; 6: AG-490 组; 7: TG-101348 组。\* $P < 0.05$  vs 1; <sup>^</sup> $P < 0.05$  vs 2; <sup>^</sup> $P < 0.05$  vs 3。

图 4 Western blot 法检测 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、ROR- $\gamma$ t 的蛋白表达

### 3 讨论

利金方是“六君子汤”基础上去半夏加黄芪、麦冬、五味子、紫菀、川贝、蛤蚧、防风而成。方中人

参、黄芪补益脾肺; 麦冬养阴润肺; 五味子敛肺生津; 蛤蚧纳气平喘; 白术、茯苓、陈皮健脾化痰; 川贝、紫菀润肺化痰止咳; 防风祛风解表; 甘草调和诸药。免疫失衡与 COPD 患者气道炎症反应的发生发展密切相关, Th17 细胞与 CD4<sup>+</sup> T 细胞失衡是机体免疫失衡的重要原因之一<sup>[4-7]</sup>。

在本研究中, 我们通过体外使用 CSE 刺激诱导大鼠 CD4<sup>+</sup> T 细胞产生炎症反应观察了利金方对炎症因子及大鼠 CD4<sup>+</sup> T 细胞与 Th17 细胞的影响。本研究证明利金方能使 CSE 诱导炎症反应所产生的 TNF- $\alpha$ 、IL-17A 炎症因子明显减少, 并且利金方对炎症因子的抑制具有剂量依赖性; 此外, 利金方能有效逆转 CSE 诱导的 CD4<sup>+</sup> T 细胞与 Th17 细胞比例失衡, 使 CD4<sup>+</sup> T 细胞数量增多, Th17 细胞数量减少, 即 Th17 细胞/CD4<sup>+</sup> T 细胞比值降低。本实验结果说明利金方能通过逆转 CSE 诱发的 CD4<sup>+</sup> T 细胞与 Th17 细胞比例失衡从而减轻炎症反应。

JAK/STAT 信号通路是经典的细胞信号通路之一。Ma 等<sup>[17]</sup> 研究结果显示 EB 病毒诱导基因 3 (Epstein-Barr virus-induced gene 3, EB13) 通过激活 STAT3 促进 T 细胞分化为 Th17 细胞。Shui 等<sup>[18]</sup> 研究结果显示敲除类风湿性关节炎患者外周血单核细胞的长链非编码 RNA 核富集转录本 1 (long noncoding RNA nuclear-enriched abundant transcript 1, lncRNA NEAT1) 可以使 STAT3 蛋白的表达水平下降从而抑制 CD4<sup>+</sup> T 细胞向 Th17 细胞分化。Jiang 等<sup>[19]</sup> 研究表明通过抑制 ROR- $\gamma$ t 可以抑制 CD4<sup>+</sup> T 细胞向 Th17 细胞分化。Park 等<sup>[20]</sup> 研究发现 JAK2 抑制剂 AG-490 可以通过抑制 JAK2/STAT3 途径从而抑制 IL-6 介导的 CD4<sup>+</sup> T 细胞向 Th17 细胞分化进而抑制小鼠自身免疫性关节炎模型的炎症反应。我们的研究显示 JAK2 抑制剂 AG-490 及 STAT3 抑制剂 TG-101348 均能抑制 CSE 诱导的 CD4<sup>+</sup> T 细胞向 Th17 细胞分化, 并且使炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-17A 分泌减少, 提示抑制 JAK/STAT 信号通路上部分靶点可能逆转 CD4<sup>+</sup> T 细胞向 Th17 细胞分化, 减轻炎症反应, 与 Park 等<sup>[20]</sup> 的研究结果相似。

目前有研究表明部分药物通过调控 JAK2/STAT3/ROR- $\gamma$ t 通路上的某些靶点可以抑制 CD4<sup>+</sup> T 细胞向 Th17 细胞分化。既往研究表明六味补气胶囊能通过调控 JAK/STAT 通路抑制 COPD 肺气虚证大鼠模型的  $\gamma$  干扰素 (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )、IL-6 炎

症因子表达; 在临床实验方面六味补气胶囊通过上调 COPD 患者调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Treg)、IL-4 表达, 下调 IFN- $\gamma$ 、IL-17 表达, 改善 COPD 急性加重期症状<sup>[21-22]</sup>。You 等<sup>[23]</sup> 研究发现 2, 4, 5-三甲基吡啶-3-ol 衍生物中的 6-硫脲类衍生物 BJ-2266 能通过调控 JAK/STAT 信号通路抑制 CD4<sup>+</sup> T 细胞向 1 型辅助 T (T helper type 1, Th1) 细胞及 Th17 细胞分化, 抑制 IFN- $\gamma$  和 IL-17 炎症因子的产生。刘积锋等<sup>[24]</sup> 研究发现红霉素可抑制弹性蛋白肽诱导的 CD4<sup>+</sup> T 细胞向 Th17 细胞分化, 其机制可能与红霉素抑制 ROR- $\gamma$ t 的 mRNA 表达、核因子  $\kappa$ B p65 (nuclear factor of  $\kappa$ B p65, NF- $\kappa$ B p65) 和 STAT3 蛋白的表达有关。Liu 等<sup>[25]</sup> 通过体外实验研究表明红霉素可能通过抑制 CD40/CD40 配体 (CD40/CD40 ligand, CD40/CD40L) 通路从而抑制 CSE 诱导树突状细胞调控的 CD4<sup>+</sup> T 细胞向 Th17 细胞分化。本研究证明 CSE 刺激大鼠 CD4<sup>+</sup> T 细胞后 JAK2、STAT3、ROR- $\gamma$ t 的 mRNA 表达量均明显上调, p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3、ROR- $\gamma$ t 的蛋白表达量也明显增加, 说明 CSE 通过激活 JAK2/STAT3/ROR- $\gamma$ t 通路促使 CD4<sup>+</sup> T 细胞向 Th17 细胞分化从而产生炎症反应。利金方组 JAK2、STAT3、ROR- $\gamma$ t 的 mRNA 表达量均明显下调, p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3、ROR- $\gamma$ t 的蛋白表达量也明显下降, 同时利金方也显示出与 JAK2 抑制剂 AG-490 或 STAT3 抑制剂 TG-101348 相似的调控作用, 说明利金方能够通过调控 JAK2/STAT3/ROR- $\gamma$ t 信号通路逆转 CSE 诱发的 CD4<sup>+</sup> T 细胞与 Th17 细胞比例失衡从而减轻炎症反应。

在本研究中利金方可以逆转 CSE 诱发的 CD4<sup>+</sup> T 细胞与 Th17 细胞比例失衡从而减轻炎症反应。并且利金方能够抑制 CSE 对 JAK2/STAT3/ROR- $\gamma$ t 信号通路的激活, 因此我们认为利金方能够通过靶向调控 JAK2/STAT3/ROR- $\gamma$ t 信号通路逆转 Th17 细胞/CD4<sup>+</sup> T 细胞失衡从而减轻 COPD 炎症反应。

综上所述, 本研究的成果表明, 利金方可以逆转 CSE 诱发的 CD4<sup>+</sup> T 细胞向 Th17 细胞分化, 减少炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-17 的分泌; 进一步机制研究发现利金方能够通过靶向调控 JAK2/STAT3/ROR- $\gamma$ t 信号通路逆转 Th17 细胞/CD4<sup>+</sup> T 细胞失衡从而减轻 CSE 诱导的炎症反应。JAK2/STAT3/ROR- $\gamma$ t 信号通路可能是利金方发挥免疫调节及抗炎作用的机制之一, 为利金方应用于 COPD 治疗提供了实验基础。

## 参考文献:

- [1] Singh D, Agusti A, Anzueto A, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease: the GOLD science committee report 2019 [J/OL]. *Eur Respir J*, 2019, 53(5): 1900164. DOI: 10.1183/13993003.00164-2019.
- [2] Cruz T, López-Giraldo A, Noell G, et al. Multi-level immune response network in mild-moderate chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [J/OL]. *Respir Res*, 2019, 20(1): 152. DOI: 10.1186/s12931-019-1105-z.
- [3] Norman K C, Freeman C M, Bidthanapally N S, et al. Inference of cellular immune environments in sputum and peripheral blood associated with acute exacerbations of COPD [J]. *Cell Mol Bioeng*, 2019, 12(2): 165-177.
- [4] Ito J T, Cervilha D A B, Loureno J D, et al. Th17/Treg imbalance in COPD progression: A temporal analysis using a CS-induced model [J/OL]. *PLoS One*, 2019, 14(1): e0209351. DOI: 10.1371/journal.pone.0209351.
- [5] 段敏超, 钟小宁, 黄颖, 等. 香烟烟雾暴露肺鼠肺中 Th17 细胞的变化及可能机制 [J]. *中华医学杂志*, 2011, 91(28): 1996-2000.  
Duan M, Zhong X, Huang Y, et al. Mechanisms and dynamics of Th17 cells in mice with cigarette smoke-induced emphysema [J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2011, 91(28): 1996-2000.
- [6] 刘晓君, 吴世满, 康彩云, 等. 香烟烟雾提取物致 Th17/Treg 的失衡在慢性阻塞性肺疾病发生发展中的作用与意义 [J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2014, 8(11): 61-66.  
Liu X, Wu S, Kang C, et al. The role and significance of the imbalance of Th17/Treg caused by cigarette smoke extract in development of COPD [J]. *Zhonghua Lin Chuang Yi Shi Za Zhi (Dian Zi Ban)*, 2014, 8(11): 61-66.
- [7] Crawford M P, Sinha S, Renavikar P S, et al. CD4 T cell-intrinsic role for the T helper 17 signature cytokine IL-17: Effector resistance to immune suppression [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(32): 19408-19414.
- [8] Kitabayashi C, Fukada T, Kanamoto M, et al. Zinc suppresses Th17 development *via* inhibition of STAT3 activation [J]. *Int Immunol*, 2010, 22(5): 375-386.
- [9] Chaudhry A, Rudra D, Treuting P, et al. CD4<sup>+</sup> regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner [J]. *Science*, 2009, 326(5955): 986-991.
- [10] Ivanov I I, McKenzie B S, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor ROR- $\gamma$ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> T helper cells [J]. *Cell*, 2006, 126(6): 1121-1133.
- [11] He L, Du J, Chen Y, et al. Renin-angiotensin system promotes colonic inflammation by inducing TH17 activation *via* the JAK2/STAT pathway [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2019, 316(6): G774-G784.

- [12] 陈斯宁, 黄美杏, 龙学明, 等. 利金方对慢性阻塞性肺疾病肺气虚证大鼠 IL-8 及 TNF- $\alpha$  表达的影响[J]. 中国中医急症, 2009, 18(6): 939-941.  
Chen S, Huang M, Long X, et al. Effects of Liking Prescription on IL-8, TNF- $\alpha$  expression of chronic obstructive pulmonary disease Qi deficiency syndrome rats[J]. Zhongguo Zhong Yi Ji Zheng, 2009, 18(6): 939-941.
- [13] 陈斯宁, 黄美杏, 龙学明, 等. 利金方对慢性阻塞性肺疾病大鼠 LTB4 表达及气道炎症的影响[J]. 中华中医药学刊, 2009, 7(27): 1410-1420.  
Chen S, Huang M, Long X, et al. Liking Prescription affects chronic obstructive pulmonary disease rats LTB4 expression and airway inflammation[J]. Zhonghua Zhong Yi Yao Xue Kan, 2009, 7(27): 1410-1420.
- [14] 陈斯宁, 黄美杏, 潘玲, 等. 利金方对 COPD 稳定期肺气虚证患者免疫功能影响的研究[J]. 西部中医药, 2007, 20(12): 25-26.  
Chen S, Huang M, Pan L, et al. Effect of Liking Prescription on the immune function of patients with Qi Deficiency Syndrome in stable COPD[J]. Xibu Zhong Yi Yao, 2007, 20(12): 25-26.
- [15] 陈斯宁, 谭玉萍, 李瑞祥, 等. 利金方联合噻托溴铵治疗慢性阻塞性肺疾病稳定期患者的远期疗效观察[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2016, 23(6): 577-580.  
Chen S, Tan Y, Li R, et al. The long-term effect of patients with lung qi deficiency syndrome and chronic obstructive lung disease at stable stage treated by Liking Prescription combined with tiotropium bromide[J]. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Ji Jiu Za Zhi, 2016, 23(6): 577-580.
- [16] Li M, Zhong X, He Z, et al. Effect of erythromycin on cigarette-induced histone deacetylase protein expression and nuclear factor- $\kappa$ B activity in human macrophages *in vitro* [J]. Int Immunopharmacol, 2012, 12(4): 643-650.
- [17] Ma N, Fang Y, Xu R, et al. Ebi3 promotes T-and B-cell division and differentiation *via* STAT3 [J]. Mol Immunol, 2019, 107: 61-70.
- [18] Shui X, Chen S, Lin J, et al. Knockdown of lncRNA NEAT1 inhibits Th17/CD4<sup>+</sup> T cell differentiation through reducing the STAT3 protein level[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(12): 22477-22484.
- [19] Jiang X, Dulubova I, Reisman S A, et al. A novel series of cysteine-dependent, allosteric inverse agonists of the nuclear receptor ROR- $\gamma$ t [J/OL]. Bioorg Med Chem Lett, 2020, 30(6): 126967. DOI: 10.1016/j.bmcl.2020.126967.
- [20] Park J S, Lee J, Lim M A, et al. JAK2-STAT3 blockade by AG490 suppresses autoimmune arthritis in mice *via* reciprocal regulation of regulatory T cells and Th17 cells[J]. J Immunol, 2014, 192(9): 4417-4424.
- [21] 王成阳, 李泽庚. 六味补气胶囊对 COPD 肺气虚证大鼠 JAK/STAT 通路、MMPs/TIMP 的影响[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(5): 1384-1390.  
Wang C, Li Z. Effects of Liuwei Buqi Capsule on JAK/STAT pathway, MMPs/TIMP in rat of COPD accompanied deficiency of lung qi[J]. Zhonghua Zhong Yi Yao Za Zhi, 2014, 29(5): 1384-1390.
- [22] 王成阳, 刘向国, 彭青和, 等. 六味补气胶囊对 COPD 急性加重患者 Treg 及 Th1、Th2、Th17 型细胞的影响[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(6): 1978-1981.  
Wang C, Liu X, Peng Q, et al. Effects of Liuwei Buqi Capsule on Treg and Th1, Th2, and Th17 cells in patients with acute exacerbation of COPD[J]. Zhonghua Zhong Yi Yao Za Zhi, 2014, 29(6): 1978-1981.
- [23] You Z, Timilshina M, Jeong B S, et al. BJ 2266 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis through down-regulation of the JAK/STAT signaling pathway [J]. Eur J Immunol, 2017, 47(9): 1488-1500.
- [24] 刘积锋, 钟小宁, 何志义, 等. 红霉素可抑制弹性蛋白肽诱导的 CD4<sup>+</sup> T 细胞向 Th17 细胞分化[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2015, 31(3): 289-292.  
Liu J, Zhong X, He Z, et al. Erythromycin inhibits elastin peptides-induced differentiation of CD4<sup>+</sup> T cells into Th17 cells[J]. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi, 2015, 31(3): 289-292.
- [25] Liu J, Zhong X, He Z, et al. Erythromycin suppresses the cigarette smoke extract-exposed dendritic cell-mediated polarization of CD4<sup>+</sup> T cells into Th17 cells[J]. J Immunol Res, 2020, 2020: 1387952. DOI: 10.1155/2020/1387952. eCollection 2020.