

Let-7e-5p 对变应性鼻炎小鼠 Treg/Th17 细胞失衡的影响*

闫智永, 张爽, 唐桥斐**
(沈阳医学院附属第二医院 耳鼻喉科, 辽宁 沈阳 110002)

[摘 要] 目的: 探讨 *let-7e-5p* 对变应性鼻炎 (AR) 小鼠调节性 T 细胞 (Treg)/辅助性 T 细胞 17 (Th17) 失衡的影响。方法: 12 只 BALB/c 小鼠, 3 只为正常组, 余 9 只小鼠采用卵清蛋白 (OVA) 和氢氧化铝 [Al(OH)₃] 建立 AR 模型后随机均分为模型组 (仅造模)、*let-7e-5p* 激动剂对照组 (鼻内滴注 *let-7e-5p* agomir 阴性对照) 及 *let-7e-5p* 激动剂组 (鼻内滴注 *let-7e-5p* agomir); 采用行为学评分考察各组小鼠的过敏症状, 酶联免疫吸附法检测各组小鼠血清免疫球蛋白 E (IgE)、白细胞介素 17-A (IL-17A) 和白细胞介素-10 (IL-10) 水平, HE 染色观察各组小鼠鼻黏膜组织学变化, 采用实时荧光定量 PCR 检测各组小鼠鼻黏膜组织 *let-7e-5p* 的表达、蛋白印迹法检测 ROR γ t 和 Foxp3 蛋白的表达, 采用流式细胞术检测各组小鼠外周血 CD4⁺ Foxp3⁺ Treg 和 CD4⁺ IL-17A⁺ Th17 细胞亚群变化。结果: 模型组小鼠较正常组的行为学评分、血清 IgE 及 IL-17A 水平明显增高、IL-10 水平明显降低 ($P < 0.01$), *let-7e-5p* 激动剂组较模型组的行为学评分、IgE 及 IL-17A 水平明显下降、IL-10 水平明显升高 ($P < 0.01$); 同模型组比较, *let-7e-5p* 激动剂组小鼠鼻黏膜基层结构清晰, 炎性细胞浸润明显减少; 模型组小鼠鼻黏膜组织 *let-7e-5p* 基因的表达较正常组减少, *let-7e-5p* 激动剂组则较模型组升高 ($P < 0.05$); 模型组小鼠鼻黏膜组织 ROR γ t 蛋白表达较正常组增加、Foxp3 蛋白表达减少, *let-7e-5p* 激动剂组小鼠鼻黏膜组织 ROR γ t 蛋白表达较模型组减少、Foxp3 蛋白表达增加 ($P < 0.05$); 模型组小鼠较正常组外周血中 CD4⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞亚群比例明显降低, CD4⁺ IL-17A⁺ Th17 细胞亚群比例明显升高 ($P < 0.01$); *let-7e-5p* 激动剂组小鼠较模型组的 CD4⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞亚群比例显著升高, CD4⁺ IL-17A⁺ Th17 细胞亚群比例明显降低 ($P < 0.01$)。结论: *Let-7e-5p* 可能通过调节 AR 小鼠 Foxp3 和 ROR γ t 蛋白的表达, 介导 Treg/Th17 细胞平衡, 减轻炎症反应, 从而改善 AR 小鼠鼻部过敏症状。

[关键词] 小鼠; 变应性鼻炎; *let-7e-5p* 基因; 辅助性 T 细胞 17; 调节性 T 细胞; 1 型辅助性 T 细胞; 2 型辅助 T 细胞

[中图分类号] R765.21 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2096-8388(2020)05-0544-08

DOI:10.19367/j.cnki.2096-8388.2020.05.008

Effect of *Let-7e-5p* on the Imbalance of Treg/Th17 Cells in Mice with Allergic Rhinitis

YAN Zhiyong, ZHANG Shuang, TANG Qiaopei
(Department of Otolaryngology, the Second Affiliated Hospital of Shenyang Medical College, Shenyang 110002, Liaoning, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of *Let-7e-5p* on imbalance of regulatory cells (Treg)/helper T cells (Th17) in mice with allergic rhinitis (AR). **Methods:** 12 BALB/c mice, 3 mice in the normal group, and the remaining 9 mice were treated with ovalbumin (OVA) and aluminum hydroxide [Al(OH)₃] to establish the AR model. They were randomly divided into the model group (for modeling only), the *let-7e-5p* agonist control group (intranasal infusion of *let-7e-5p* agomir negative control) and the *let-7e-5p* agonist group (intranasal infusion of *let-7e-5p* agomir). The

*[基金项目] 辽宁省科学技术计划项目 (2018225020); 沈阳医学院科技基金项目 (20182038)
** 通信作者 E-mail: javawriter@163.com

behavioral score was used to investigate the allergic symptoms of the mice in each group. Serum Immunoglobulin E (IgE), IL-17A and IL-10 levels in each group were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The pathological characteristics of the nasal mucosal tissues of the mice in each group were observed by HE staining. The *let-7e-5p* of the nasal mucosal tissues of the mice in each group was detected by real-time fluorescence quantitative PCR, and the expression of ROR γ t and Foxp3 in the nasal mucosal tissues of the mice in each group was detected by western blot. Changes in CD4⁺ Foxp3⁺ Treg and CD4⁺ IL-17A⁺ Th17 subsets in peripheral blood of each group were detected by flow cytometry. **Results:** Compared with the normal group, the behavioral scores, serum IgE and IL-17A levels of mice in the model group significantly increased, and IL-10 levels significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the behavioral scores, IgE and IL-17A levels of the *let-7e-5p* agonist group significantly decreased, and the IL-10 levels significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the basal structure of the nasal mucosa tissues in the *let-7e-5p* agonist group was clear, and the infiltration of inflammatory cells was significantly reduced. The expression of *let-7e-5p* gene in the nasal mucosa of mice in the model group was decreased compared with that in the normal group. Compared with the normal group, the expression of ROR γ t protein increased and Foxp3 protein decreased in mouse nasal mucosa of model group. Compared with the model group, the expression of ROR γ t protein decreased and the expression of Foxp3 protein increased significantly in mouse nasal mucosa of *let-7e-5p* agonist group. The subsets of CD4⁺ Foxp3⁺ Treg cells in peripheral blood of mice in the model group were significantly lower than those in the normal group, and the subsets of CD4⁺ IL-17A⁺ Th17 cells were significantly higher ($P < 0.01$). The proportion of CD4⁺ Foxp3⁺ Treg subsets in the *let-7e-5p* agonist group was significantly higher than that in the model group, and the proportion of CD4⁺ IL-17A⁺ Th17 subsets was significantly lower ($P < 0.01$). **Conclusion:** *let-7e-5p* may mediate Treg/Th17 cell balance by regulating the expression of Foxp3 and ROR γ t proteins and reduce the inflammatory response, thereby improving the nasal allergy symptoms of AR mice.

[**Key words**] mice; allergic rhinitis (AR); *let-7e-5p* gene; T helper cell 17 (Th17); regulatory T cells (Treg); T helper cells1 (Th1); T helper cells2 (Th2)

变应性鼻炎 (allergic rhinitis, AR) 是一种过敏性疾病, 主要症状体征表现为打喷嚏、瘙痒、鼻漏、鼻塞和鼻充血^[1]。近年 AR 患病率呈现逐年上升趋势, 已成为世界性重大公共卫生问题^[2]。以往观点认为 2 型辅助 T 细胞 (T helper cells2, Th2) 的流入和分化是 AR 发生和加重的重要因素^[3]。伴随免疫学研究的快速发展, 经典的 1 型辅助性 T 细胞 (T helper cells1, Th1)/Th2 构架失衡理论在 AR 中的作用不断受到新的挑战^[4]。有研究发现增强 Th1 应答并不能减轻 Th2 介导的 AR 反应, 表明 AR 的发病机制不能简单用 Th1/Th2 免疫失衡来解释^[5]。近年的研究表明, 辅助性 T 细胞 17 (T helper cell 17, Th17) 和调节性 T 细胞 (regulatory cells, Treg) 与 AR 发生密切相关, 提示 Treg/Th17 细胞失衡在 AR 进展中发挥重要作用^[6]。以往研

究表明 MicroRNAs (miRNAs) 是 AR 潜在生物标志物, 参与 AR 发病机制^[7]。最近 Suojalehto 等^[8]研究发现 miRNA-*let-7e-5p* 在 AR 患者鼻黏膜组织中低表达。此外, *let-7e-5p* 还可通过调节 Th1 和 Th17 细胞分化参与自身免疫性脑脊髓炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) 的发生进展^[9], 但 *let-7e-5p* 是否通过调节 Treg/Th17 细胞失衡参与 AR 进展有待研究。因此本研究拟建立 BALB/c 小鼠 AR 模型, 探讨 *let-7e-5p* 对 Treg/Th17 细胞失衡的影响, 进一步阐明 AR 发病机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 6~8 周龄 SPF 级雄性 BALB/c 小鼠 12 只, 体质量 16~18 g, 购买于辽宁长生生物

科技股份有限公司[合格证号 SCXK(辽)2015 - 0001], 给予普通饲料喂养, 饮用蒸馏水, 标准动物实验条件下适应性饲养 1 周。

1.1.2 药品和主要试剂 卵清蛋白(ovalbumin, OVA)购自美国 Sigma 公司, 苏木精购自中国索莱宝公司, 曙红 Y 购自中国上海生工生物, 二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒、电化学发光(electrochemical luminescent, ECL)液、全蛋白提取试剂盒、十二烷基硫酸钠(Sodium dodecyl sulfate, SDS) - 聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)快速制备试剂盒、羊抗兔免疫球蛋白 G(immunoglobulin G, IgG) - 辣根过氧化物酶(horseradish Peroxidase, HRP)、内参抗体 β -肌动蛋白(β -actin)及叉头状螺旋转录因子 3(fork-head box p3, Foxp3)抗体购自中国沈阳万类生物, 预染蛋白分子量标准购自加拿大 Fermentas 公司, 维甲酸相关核孤儿受体 γ t(retinoic acid-related orphan nuclear receptor γ t, ROR γ t)抗体购自美国 Affinity 公司, 小鼠免疫球蛋白 E(immunoglobulin E, IgE)酶联免疫吸附(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒和白细胞介素 17A(interleukin 17A, IL-17A)ELISA 试剂盒购自中国联科生物公司, 小鼠白细胞介素 10(interleukin 10, IL-10)ELISA 试剂盒购自中国武汉优尔生公司, 藻红蛋白(phycoerythrin, PE)标记的分化群 4(cluster of differentiation 4, CD4)抗体、别藻蓝蛋白(allophycocyanin, APC)标记的 IL-17A 抗体及异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的 Foxp3 抗体购自美国 Thermo 公司, *let-7e-5p* 激动剂(agomir)及阴性对照由中国吉玛基因公司合成。

1.1.3 主要仪器 SW-CJ-2FD 超净工作台购自中国苏州净化, NW10LVF 超纯水系统购自香港 Heal Force 公司, RM2235 石蜡切片机购自德国 Leica 公司, QH01-9030A 电热恒温鼓风干燥箱购自中国上海精宏实验设备公司, DP73 显微镜拍照系统购自日本 OLUMPUS 公司, Exicycler 96 荧光定量 PCR 仪购自韩国 BIONEER 公司, NANO 2000 紫外分光光度计购自美国 Thermo 公司, DYY-7C 电泳仪购自中国北京六一仪器厂, ELX-800 酶标仪购自美国 BIOTEK 公司, NovoCyte 流式细胞仪购自美国艾森生物。

1.2 方法

1.2.1 造模及分组 12 只 BALB/c 小鼠适应性

喂养 1 周, 取 3 只作为正常组, 不造模; 余 9 只小鼠采用随机数字表法均分为模型组、*let-7e-5p* 激动剂对照组及 *let-7e-5p* 激动剂组, 9 只小鼠建立 AR 模型: 实验第 1、7 及 14 d 腹腔注射含 OVA 25 μ g 和氢氧化铝[Al(OH)₃] 2 mg 的生理盐水混悬液 200 μ L 对小鼠进行基础致敏, 第 21 天开始自前鼻孔给予含 3% OVA 的生理盐水按 20 μ L/鼻孔进行局部激发、连续 14 d(即第 21 ~ 34 天); 激发致敏第 28 ~ 34 天, 于 OVA 激发前 3 h 向 *let-7e-5p* 激动剂组小鼠鼻腔内按 10 μ L/鼻孔滴入 5 μ mol/L *let-7e-5p* agomir, *let-7e-5p* 激动剂对照组小鼠鼻腔内滴入相同剂量 agomir 阴性对照片段。正常组和模型组小鼠于相同时间点给予等体积生理盐水。与行为学观察结束后各组小鼠眼眶静脉取血, 腹腔注射过量戊巴比妥钠(150 mg/kg)处死小鼠, 取鼻黏膜组织。

1.2.2 行为学观察及评分 各组小鼠于第 34 天鼻腔致敏 30 min 内观察抓挠鼻子、打喷嚏次数及鼻涕出现的轻重程度, 参照文献[10]对小鼠过敏症状进行评分, 即喷嚏 1 ~ 3 个为 1 分, 4 ~ 10 个为 2 分, 超过 11 个为 3 分; 爪偶有挠鼻为 1 分, 爪反复挠鼻为 2 分, 爪挠鼻面不止和到处摩擦为 3 分; 鼻涕流至前鼻孔周围为 1 分, 超过鼻前孔为 2 分, 鼻涕流满面为 3 分。以叠加法记录总分, 总分范围 1 ~ 9 分, 总分超过 5 分说明建模成功。

1.2.3 ELISA 法检血清 IgE 和炎性因子 采集各组小鼠静脉血 1 mL/只, 凝集 30 min, 4 $^{\circ}$ C、5 000 r/min 离心 10 min, 收集血清, 采用 ELISA 法检测小鼠血清中 IgE、IL-17A 及 IL-10 水平变化, 按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.4 苏木精 - 伊红染色(hematoxylin-eosin staining, HE)染色 取各组小鼠鼻黏膜组织于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h, 常规脱钙、透蜡、包埋、切片、水化, 苏木素染色 5 min, 1% 盐酸酒精分化 3 s, 伊红染液浸泡 3 min, 脱水、透明、封片, 于 200 \times 显微镜下观察拍照。

1.2.5 实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测 *let-7e-5p* 采用总 RNA 提取试剂(TRIpure)提取各组小鼠鼻黏膜样本总 RNA, 反转录得到 cDNA; NCBI 上查找 *let-7e-5p* 和 U6 序列, 采用 Primer5 设计引物(上海生工合成); 以 cDNA 为模板, 在荧光定量 PCR 仪上进行扩增, 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min、94 $^{\circ}$ C 变性 10 s、60 $^{\circ}$ C 退火 20 s 及 72 $^{\circ}$ C 延伸

30 s,40 个循环;采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算样本 *let-7e-5p* 相对表达量。见表 1。

表 1 Real-time PCR 引物序列
Tab. 1 Primer sequences of Real-time PCR

| 基因名称 | 引物序列/(5'-3') | 引物长度/bp |
|------------------|----------------------------|---------|
| <i>let-7e-5p</i> | 上游: TGAGGTAGGAGGTTGTATAGTT | 22 |
| | 下游: GCAGGGTCCGAGGTATTC | 18 |
| U6 | 上游: CGCAAGGATGACACGCAAAT | 20 |
| | 下游: GCAGGGTCCGAGGTATTC | 18 |

1.2.6 蛋白印迹法 (Western blot) 检测鼻黏膜组织 ROR γ t 和 Foxp3 蛋白 根据各组小鼠鼻黏膜组织样本的质量和体积加入 RIPA 裂解液,静置 5 min,4 ℃ 条件下 12 000 r/min 离心 10 min,收集上清得到蛋白抽提物,采用二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法测定蛋白浓度,制备蛋白上样液,取等量蛋白点样,SDS-PAGE、转膜,浸入脱脂奶粉封闭 1 h,4 ℃ 过夜孵育一抗,洗膜、37 ℃ 孵育一抗 45 min,ECL 底物发光,扫描胶片,用凝胶图像处理系统分析目标条带灰度值,计算 ROR γ t 和 Foxp3 蛋白相对表达量。

1.2.7 流式细胞术分析外周血 CD4⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞和 CD4⁺ IL-17A⁺ Th17 细胞百分比 采集各组

小鼠外周血,采用淋巴细胞分离液分离单个核细胞,制备细胞悬液,PBS 清洗 2 次,加 CD4/IL-17A 抗体 0.125 μ g,孵育 30 min,加 Foxp3 抗体 1 μ g 于室温避光孵育 30 min,同时设置同型对照,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清、收集细胞,PBS 清洗后加入流式染色液重新悬浮细胞,流式细胞仪分析 CD4⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞和 CD4⁺ IL-17A⁺ Th17 细胞百分比。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,计量资料采用均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间差异采用单因素方差分析,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 行为学评分和血清 IgE、IL-17A 及 IL-10 水平 与正常组比较,模型组小鼠行为学评分和血清 IgE、IL-17A 水平明显增高,IL-10 水平明显降低,差异均有高度统计学意义 ($P < 0.01$);与模型组比较,*let-7e-5p* 激动剂组小鼠行为学评分、IgE 和 IL-17A 水平明显下降,IL-10 水平明显升高,差异均有高度统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 各组小鼠行为学评分和血清 IgE、IL-17A 及 IL-10 水平 ($\bar{x} \pm s$)
Tab. 2 Behavioral scores and levels of serum IgE, IL-17A and IL-10 of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 评分 | IgE/(μ g/L) | IL-17A/(ng/L) | IL-10/(ng/L) |
|-------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 正常组 | 1.33 \pm 0.58 | 22.25 \pm 2.35 | 17.22 \pm 1.95 | 68.97 \pm 7.18 |
| 模型组 | 7.33 \pm 0.58 ⁽¹⁾ | 179.63 \pm 20.16 ⁽¹⁾ | 38.54 \pm 4.76 ⁽¹⁾ | 32.30 \pm 3.86 ⁽¹⁾ |
| <i>let-7e-5p</i> 激动剂对照组 | 7.00 \pm 1.00 | 186.80 \pm 19.24 | 41.57 \pm 5.34 | 35.67 \pm 4.03 |
| <i>let-7e-5p</i> 激动剂组 | 4.00 \pm 0.00 ⁽²⁾ | 38.01 \pm 4.14 ⁽²⁾ | 20.76 \pm 2.42 ⁽²⁾ | 60.78 \pm 7.79 ⁽²⁾ |

注: ⁽¹⁾ 与正常组比较, $P < 0.01$; ⁽²⁾ 与模型组比较, $P < 0.01$ 。

2.2 鼻黏膜组织病理学特征

光学显微镜下观察发现,正常组小鼠鼻黏膜组织结构完整,上皮细胞排列整齐,未见增厚和炎性细胞浸润;模型组小鼠鼻黏膜基层层明显增厚,并伴有大量炎性细胞浸润,上皮结构紊乱;同模型组比较,*let-7e-5p* 激动剂组小鼠鼻黏膜组织基底结构清晰,炎性细胞浸润明显减轻,上皮细排列相对整齐。见图 1。

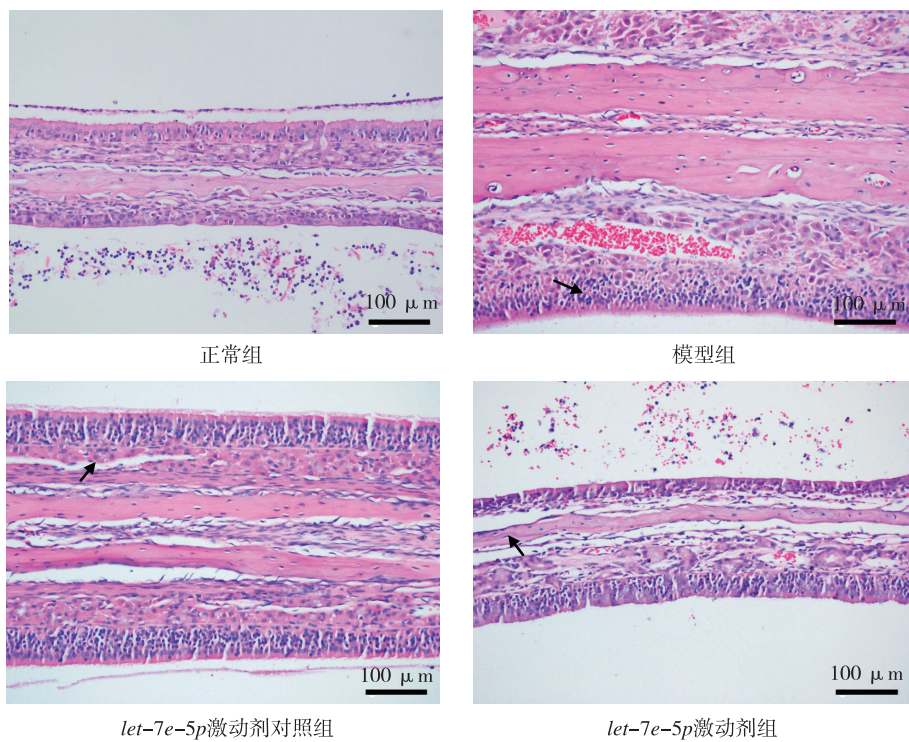
2.3 鼻黏膜组织 *let-7e-5p* 基因表达

Real-time PCR 检测结果显示,与正常组比较,模型组小鼠鼻黏膜组织中 *let-7e-5p* 基因的表达减

少,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与模型组比较,*let-7e-5p* 激动剂组小鼠鼻黏膜组织中 *let-7e-5p* 基因的表达升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2。

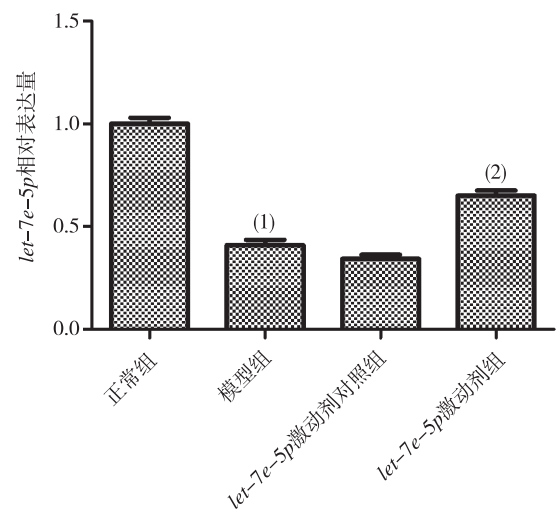
2.4 鼻黏膜组织 ROR γ t 和 Foxp3 蛋白表达

Western blot 检测结果显示,与正常组比较,模型组小鼠鼻黏膜组织中 ROR γ t 蛋白的表达增加,Foxp3 蛋白的表达减少,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);同模型组比较,*let-7e-5p* 激动剂组小鼠鼻黏膜组织 ROR γ t 蛋白的表达减少,Foxp3 蛋白的表达明显增加 ($P < 0.05$)。见图 3。



注:箭头表示炎症细胞。
图 1 各组小鼠鼻黏膜组织 HE 染色(200 ×)

Fig.1 HE staining of mice nasal mucosa in each group (200 ×)



注: ⁽¹⁾与正常组比较 $P < 0.05$; ⁽²⁾与模型组比较, $P < 0.05$ 。
图 2 各组小鼠鼻黏膜组织 *let-7e-5p* 基因的表达

Fig.2 Expression of *let-7e-5p* gene in nasal mucosal tissues of mice in each group

2.5 外周血 CD4⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞和 CD4⁺ IL-17A⁺ Th17 细胞百分比

流式细胞术检测结果显示,与正常组比较,模型组小鼠外周血中 CD4⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞亚群比例明显降低 ($P < 0.01$), CD4⁺ IL-17A⁺ Th17 细胞

亚群比例明显升高 ($P < 0.01$);与模型组比较, *let-7e-5p* 激动剂组 CD4⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞亚群比例显著升高, CD4⁺ IL-17A⁺ Th17 细胞亚群比例明显降低,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 3、图 4。

表 3 各组小鼠外周血淋巴细胞 CD4⁺ Foxp3⁺ Treg 和 CD4⁺ IL-17A⁺ Th17 细胞亚群比较 ($\bar{x} \pm s$)

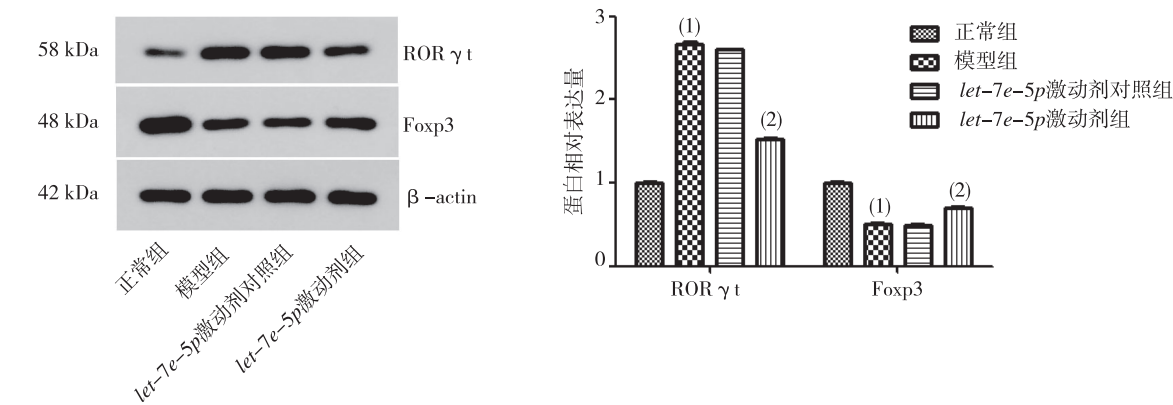
Tab.3 Changes of CD4⁺ Foxp3⁺ Treg and CD4⁺ IL-17A⁺ Th17 subsets in peripheral blood of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ | CD4 ⁺ IL-17A ⁺ |
|-------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| | Treg/% | Th17/% |
| 正常组 | 13.85 ± 1.63 | 6.07 ± 0.82 |
| 模型组 | 7.37 ± 1.09 ⁽¹⁾ | 13.49 ± 1.37 ⁽¹⁾ |
| <i>let-7e-5p</i> 激动剂对照组 | 7.23 ± 0.82 | 12.86 ± 1.34 |
| <i>let-7e-5p</i> 激动剂组 | 12.98 ± 1.56 ⁽²⁾ | 6.78 ± 0.88 ⁽²⁾ |

注: ⁽¹⁾与正常组比较, $P < 0.01$; ⁽²⁾与模型组比较, $P < 0.01$ 。

3 讨论

AR 是一种常见的由 IgE 介导的鼻变态反应性疾病,临床症状主要表现为鼻痒、打喷嚏、流清涕和



注: (1) 与正常组比较 $P < 0.05$; (2) 与模型组比较, $P < 0.05$ 。

图 3 各组小鼠鼻黏膜组织 RORγt 和 Foxp3 蛋白的表达 (Western blot)

Fig. 3 Expression of RORγt and Foxp3 in nasal mucosa of mice in each group (Western blot)

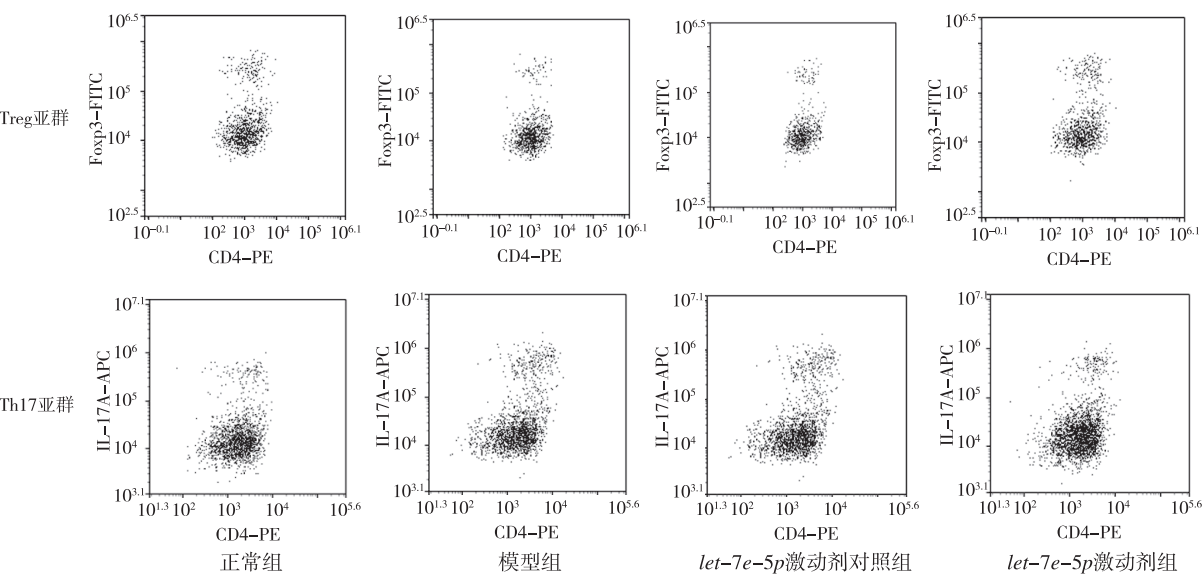


图 4 各组小鼠外周血淋巴细胞 CD4⁺Foxp3⁺Treg 和 CD4⁺IL-17A⁺Th17 细胞亚群的流式结果

Fig. 4 Flow diagram of CD4⁺Foxp3⁺Treg and CD4⁺IL-17A⁺Th17 subgroup in peripheral blood of mice in each group

鼻塞。AR 虽然不直接威胁患者生命,但严重影响患者的生活、学习和工作^[11]。目前临床治疗方法主要包括避免接触过敏原、药物治疗和免疫治疗^[12]。然而,针对 AR 预防和治疗的药物研究进展缓慢,免疫治疗仍是临床实践中最有效的治疗手段^[13]。因此,迫切需要挖掘 AR 发病机制,探明新型分子靶点,开发治疗 AR 的新方法。本研究为避免雌激素对实验数据产生影响,以获得更加稳定的数据,仅选用雄性 BALB/c 小鼠作为实验对象。OVA 致敏建立 AR 小鼠模型,与生理盐水对照组比较,模型组小鼠鼻部摩擦、打喷嚏和流涕喷率增加,行为学评分显著增高 ($P < 0.01$),类似临床

AR 表现,同时血清 IgE 的表达明显升高 ($P < 0.01$),说明 AR 小鼠模型建立成功。

MicroRNAs (miRNAs) 是一类长度约为 22 个核苷酸 (nt) 的非编码 RNA,通过结合靶 mRNA 的 3'-UTR 区在转录后水平发挥作用,导致基因降解或翻译抑制^[14]。miRNAs 在干细胞自我更新和多能性、器官发生、细胞周期、心血管疾病和肿瘤发生等多种过程中发挥重要作用^[15]。研究表明,miRNAs 在过敏性气道炎症反应中发挥重要调控作用^[16],一些 miRNAs 亦被发现参与 AR 的不同方面:如 miR-375 作用于 Janus 激酶 2 (Janus kinase 2, JAK2) - 信号转导及转录活化因子 3 (signal trans-

ducers and activators of transduction 3, STAT3) 通路, 抑制鼻黏膜细胞凋亡, 改善 AR 症状^[17]; *miR-487b* 通过调节白介素 33 (interleukin 33, IL-33)/肿瘤发生抑制蛋白 2 (suppression of tumorigenicity 2, ST2) 信号通路降低血清 IgE 水平, 减轻 AR 小鼠鼻部过敏症状^[18]; *miR-199-3p* 通过调节 DNA 甲基转移酶 3A (DNA methyltransferase 3A, Dnmt3A)-STAT3 信号通路促进炎症因子 IFN- γ 和 TNF- α 释放, 将 *miR-199-3p* 沉默后小鼠搔鼻和打喷嚏次数明显减少^[19]。说明 miRNAs 在 AR 发病中扮演重要角色。

MiR-let-7 家族在动物物种中高度保守, 调控细胞增殖和分化^[20]。有文献报道, *let-7e-5p* 沉默导致促炎因子释放增加, 炎症反应增强^[21]。Li 等^[22]研究证实, *let-7e-5p* 在 AR 患者中的水平下降, 通过靶向细胞因子信号抑制分子 4 (suppressor of cytokine signaling 4, SOCS4) 调节 Janus 激酶 1 (Janus kinase 1, JAK1)/STAT3 信号活性抑制 AR 小鼠炎症反应。提示 *let-7e-5p* 参与 AR 的发生和进展。本研究采用 Real-time PCR 技术分析 AR 小鼠鼻黏膜组织, 发现 *let-7e-5p* 的表达较正常组减少 ($P < 0.05$), 与前人研究结果一致^[8]。为了进一步探讨 *let-7e-5p* 调控 AR 进展的具体分子机制, 本研究给予 AR 小鼠鼻腔内滴入 *let-7e-5p* 激动剂 agomir, 证实 *let-7e-5p* 过表达显著降低小鼠行为学评分和血清 IgE 水平, 抑制炎症细胞浸润鼻黏膜组织, 改善小鼠鼻部过敏症状 ($P < 0.01$), 说明 *let-7e-5p* 抑制 AR 进展。

经典免疫学说认为 Th1 和 Th2 细胞失衡是 AR 发生的免疫学基础, 生理状态下 Th1 和 Th2 相互制衡, 维持平衡稳态, 病理条件下, 细胞平衡被破坏, Th2 细胞百分比增加, Th1 细胞百分比减少, 导致免疫反应异常^[23-24]。然而伴随研究的不断深入, 人们发现 AR 的一些临床实验结果并不能完全用 Th1/Th2 失衡来解释^[5]。Th17 和 Treg 细胞是近年发现的在免疫耐受方面发挥重要作用的一类细胞, Th17 和 Treg 细胞在功能上互相拮抗, 从而维持机体免疫状态相对稳定^[25]。越来越多的研究证实, Th17/Treg 细胞平衡与 AR 的发生存在关联, 可能是对 Th1/Th2 学说的重要补充^[26]。如 Salmani 等^[27]研究发现, 给予 AR 患者进行快速免疫治疗后, Foxp3 蛋白的表达显著升高; AR 小鼠经桔皮素 (tangeretin) 治疗后, CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg 细胞数量明显增加, 并伴随神经源性位点缺口同系物蛋白 1 (neurogenic locus notch homolog protein 1,

Notch1)/Jagged1 通路活性下降^[28]。由此可见, 调控 Treg/Th17 失衡可以增强 AR 小鼠免疫耐受功能。本研究分析了 *let-7e-5p* 激动剂 agomir 对 AR 小鼠 Treg/Th17 平衡状态的影响, 结果显示, 模型组 Treg 细胞亚群较正常组明显减少, Th17 细胞亚群增加, *let-7e-5p* agomir 显著减少 Th17 细胞亚群, 增加 Treg 细胞亚群 ($P < 0.01$)。此外, 与正常组比较, 模型组 ROR γ t 表达及血清 IL-17A 水平升高, Foxp3 表达及 IL-10 水平下降 ($P < 0.01$), 而采用 *let-7e-5p* agomir 干预后, 上述指标的表达趋势相反。

综上所述, *let-7e-5p* 在小鼠中可能通过调节 Foxp3 和 ROR γ t 的表达, 介导 Treg/Th17 细胞平衡, 减轻炎症反应, 改善 AR 小鼠鼻部过敏症状。

4 参考文献

- [1] TESTA D, DIB M, NUNZIATA M, et al. Allergic rhinitis and asthma assessment of risk factors in pediatric patients: a systematic review [J]. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology, 2020, 129: 109759.
- [2] MENG Y, WANG C, ZHANG L. Recent developments and highlights in allergic rhinitis [J]. Allergy, 2019, 74 (12): 2320 - 2328.
- [3] ZHU Y Q, LIAO B, LIU Y H, et al. MicroRNA-155 plays critical effects on Th2 factors expression and allergic inflammatory response in type-2 innate lymphoid cells in allergic rhinitis [J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2019, 23 (10): 4097 - 4109.
- [4] YANG J, ZHONG W, XUE K, et al. Epigenetic changes: an emerging potential pharmacological target in allergic rhinitis [J]. International Immunopharmacology, 2019, 71: 76 - 83.
- [5] REISINGER J, TRIENDL A, KUCHLER E, et al. IFN- γ -enhanced allergen penetration across respiratory epithelium augments allergic inflammation [J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2005, 115 (5): 973 - 981.
- [6] JIAO W E, WEI J F, KONG YG, et al. Notch signaling promotes development of allergic rhinitis by suppressing foxp3 expression and Treg cell differentiation [J]. International Archives of Allergy and Immunology, 2019, 178 (1): 33 - 44.
- [7] LIU W, OUYANG H, ZENG Q, et al. Decreased Treg-derived miR-181a and miR-155 correlated with reduced number and function of Treg cells in allergic rhinitis children [J]. European Archives of Otorhinolaryngology,

- 2019,276(4):1089–1094.
- [8] SUOJALEHTO H, TOSKALA E, KILPELAINEN M, et al. MicroRNA profiles in nasal mucosa of patients with allergic and nonallergic rhinitis and asthma [J]. International Forum of Allergy & Rhinology, 2013, 3(8):612–620.
- [9] GUAN H, FAN D, MRELASHVILI D, et al. MicroRNA *let-7e* is associated with the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. European Journal of Immunology, 2013, 43(1):104–114.
- [10] XIAO L, JIANG L, HU Q, et al. MicroRNA-133b Ameliorates allergic inflammation and symptom in murine model of allergic rhinitis by targeting *nlrp3* [J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2017, 42(3):901–912.
- [11] SIKORSKA-SZAFLIK H, SOZANSKA B. Quality of life in allergic rhinitis childrens and their parents' perspective in polish urban and rural population [J]. Health and Quality of Life Outcomes, 2020, 18(1):64.
- [12] UNAL D. Effects of perennial allergen immunotherapy in allergic rhinitis in patients with/without asthma: a-randomized controlled real-life study [J]. International Archives of Allergy and Immunology, 2020, 181(2):141–148.
- [13] KAPOOR Y, KUMAR K. Structural and clinical impact of anti-allergy agents: An overview [J]. Bioorganic Chemistry, 2020, 94:103351.
- [14] WANG L, YANG X, LI W, et al. MiR-202-5p/*matn2* are associated with regulatory T-cells differentiation and function in allergic rhinitis [J]. Human Cell, 2019, 32(4):411–417.
- [15] HUANG C K, KAFERT-KASTING S, THUM T. Preclinical and clinical development of noncoding RNA therapeutics for cardiovascular disease [J]. Circulation Research, 2020, 126(5):663–678.
- [16] GAO Y, YU Z. MicroRNA16 inhibits interleukin 13 induced inflammatory cytokine secretion and mucus production in nasal epithelial cells by suppressing the IkappaB kinase beta/nuclear factorkappaB pathway [J]. Molecular Medicine Reports, 2018, 18(4):4042–4050.
- [17] WANG T, CHEN D, WANG P, et al. *miR-375* prevents nasal mucosa cells from apoptosis and ameliorates allergic rhinitis via inhibiting *jak2/stat3* pathway [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018, 103:621–627.
- [18] LIU H C, LIAO Y, LIU C Q. *miR-487b* mitigates allergic rhinitis through inhibition of the *IL-33/ST2* signaling pathway [J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2018, 22(23):8076–8083.
- [19] CUI X, GUO Y, WANG Q, et al. *MiR-199-3p-dnmt3a-stat3* signalling pathway in ovalbumin-induced allergic rhinitis [J]. Experimental Physiology, 2019, 104(8):1286–1295.
- [20] JIANG S. A regulator of metabolic reprogramming: microRNA *let-7* [J]. Translational Oncology, 2019, 12(7):1005–1013.
- [21] ILIOPOULOS D, HIRSCH HA, STRUHL K. An epigenetic switch involving NF-kappaB, *lin28*, *let-7* microRNA, and IL-6 links inflammation to cell transformation [J]. Cell, 2009, 139(4):693–706.
- [22] LI L, ZHANG S, JIANG X, ET AL. MicroRNA-*let-7e* regulates the progression and development of allergic rhinitis by targeting suppressor of cytokine signaling 4 and activating Janus kinase 1/signal transducer and activator of transcription 3 pathway [J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2018, 15(4):3523–3529.
- [23] BUI T T, KWON D A, CHOI D W, et al. Rosae multiflorae fructus extract and its four active components alleviate ovalbumin-induced allergic inflammatory responses via regulation of Th1/Th2 imbalance in BALB/c rhinitis mice [J]. Phytomedicine, 2019, 55:238–248.
- [24] ZHU X, WANG X, WANG Y, et al. Exosomal long non-coding RNA GAS5 suppresses Th1 differentiation and promotes Th2 differentiation via downregulating *znf2* and *t-bet* in allergic rhinitis [J]. Molecular Immunology, 2020, 118:30–39.
- [25] TAKEUCHI Y, HIROTA K, SAKAGUCHI S. Impaired T cell receptor signaling and development of T cell-mediated autoimmune arthritis [J]. Immunological Reviews, 2020, 294(1):164–176.
- [26] WANG Y, HOU X R, LI L H, et al. Acupoint injection improves allergic rhinitis by balancing Th17/Treg in allergic rhinitis rats [J]. Zhen Ci Yan Jiu, 2019, 44(4):276–281.
- [27] SALMANI A, MOHAMMADI M, FARID H R, et al. A significant increase in expression of *foxp3* and *IL-17* genes in patients with allergic rhinitis underwent accelerated rush immunotherapy [J]. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 2019, 22(9):989–996.
- [28] XU S, KONG YG, JIAO W E, et al. Tangeretin promotes regulatory T cell differentiation by inhibiting notch1/jagged1 signaling in allergic rhinitis [J]. International Immunopharmacology, 2019, 72:402–412.

(2020-03-17 收稿, 2020-05-15 修回)
中文编辑: 严征; 英文编辑: 冉海勇