



# 血管活性肠肽调控 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg/Th17 平衡对实验性自身免疫性脑脊髓炎防治作用的影响

杨元,袁正洲,吕志宇,张淑江,李晓红,李作孝

(西南医科大学附属医院神经内科,四川 泸州 646000)

**【摘要】** 目的 探讨血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)调控 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg/Th17 平衡对防治实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)的影响。方法 60只健康雌性wistar大鼠随机分成正常对照组、EAE对照组、VIP低剂量防治组和VIP高剂量防治组。利用髓鞘碱性蛋白(MBP)+完全福氏佐剂(CFA)诱导建立EAE模型。自造模当日起,每隔一日分别对VIP低、高剂量防治组大鼠腹腔注射VIP 4 nmol/kg(0.2 mL)、16 nmol/kg(0.8 mL),正常对照组及EAE对照组注射0.8 mL生理盐水,连续10 d。观察大鼠发病情况;HE染色观察脑组织基本病理改变;流式细胞仪检测脾组织CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg、Th17细胞比例;ELISA法检测脑组织中TGF-β1、IL-17A因子含量变化。结果 与EAE对照组比较,VIP各剂量防治组大鼠发病潜伏期延长、进展期缩短,发病高峰期神经功能障碍评分(NDS)降低;HE染色显示正常对照组大鼠脑组织中未见炎细胞浸润,VIP各剂量防治组大鼠脑组织中炎细胞浸润程度较EAE组明显下降;与EAE对照组比较,VIP各剂量组大鼠脾组织中CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg细胞亚群比例升高,Th17细胞亚群比例降低,且各组间存一定的量效关系;VIP各剂量组大鼠脑组织中TGF-β1含量较EAE组明显升高,IL-17A含量较EAE组明显降低,且各组间存在一定剂量依赖关系。结论 VIP通过上调CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg细胞比例,促进TGF-β1因子分泌,同时下调Th17细胞比例,抑制IL-17A因子表达,从而减轻脑组织炎症细胞的浸润程度,发挥对EAE的防治作用。

**【关键词】** 血管活性肠肽;实验性自身免疫性脑脊髓炎;CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg/Th17;TGF-β1; IL-17A

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)11-0066-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.11.012

## The effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on the regulation of CD4 + CD25 + Treg/Th17 balance in the prevention and treatment of experimental autoimmune cerebrosplinal meningitis (EAE)

YANG Yuan, YUAN Zheng-zhou, LV Zhi-yu, ZHANG Shu-jiang, LI Xiao-hong, LI Zuo-xiao

(The department of Neurology. Affiliated Hospital of Southwest medical university, Sichuan Luzhou, 646000, China)

**【Abstract】 Objective :** To explore the effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on the regulation of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg/Th17 balance in the prevention and treatment of experimental autoimmune cerebrosplinal meningitis (EAE). **Methods** 60 healthy female Wistar rats were randomly divided into normal control group, EAE control group, VIP low-dose group and VIP high-dose group. Used of myelin basic protein (MBP) + completely adjuvant (CFA) to establish EAE model. Since building on , the low and high-dose VIP groups were with intraperitoneal injection of every other day

[作者简介]杨元,女,硕士,Email: lsh880801@163.com。

[通讯作者]李作孝,男,教授,硕士生导师,Email: lzx3235@sina.com。

respectively VIP 4 nmol/kg (0.2 mL), 16 nmol/kg (0.8 mL), normal control group and EAE group with 0.8 mL saline, 10 days in a row. Record the incubation period, progression and the peak of neurological dysfunction score (NDS) changes of rats; the pathological changes in brain at the morbidity peak of rats; the proportion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg/Th17 cells in spleen tissues with Flow cytometry; the cytokine levels of TGF- $\beta$ 1, IL-17A in brain tissue. **Results** the incubation period were extended, the progression and the peak nerve dysfunction score were shortened in VIP each dose group; In normal control group, there was no inflammatory cell infiltration in the brain tissue. The degree of infiltration of inflammatory cells in the VIP control groups were significantly lower than that in the EAE group; Compared with the EAE control group, the proportion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg cells in the spleen tissue of VIP each dose group increased, the proportion of Th17 cells decreased, and being a dose-response relationship; The cytokine levels of TGF- $\beta$ 1 in brain tissue were increased and the levels of IL-17A were reduced in VIP each dose group, being a dose-response relationship; **Conclusion** through up-regulating of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg cells, promoting the secretion of TGF- $\beta$ 1 factor and cutting the proportion of Th17 cells, inhibiting the expression of cytokines IL-17A, VIP reduced brain tissue inflammatory cell infiltration, and played a role in prevention and treatment of EAE.

**【Key words】** Vasoactive intestinal peptide; Experimental autoimmune encephalomyelitis; CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg/Th17; TGF- $\beta$ 1; IL-17A

多发性硬化(multiple Sclerosis, MS)作为一种中枢神经系统(central nervous system, CNS)的自身免疫性疾病,其病因尚不明确,各种致病因素通过破坏 Th1/Th2 细胞免疫平衡,最终导致 CNS 炎细胞浸润、白质脱髓鞘、轴突变性等病理改变<sup>[1]</sup>。随着对其动物模型实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)研究深入,越来越多的证据表明 Treg/Th17 细胞免疫失调及其分泌的 TGF- $\beta$ 1、IL-17A 因子紊乱在该疾病发病过程中发挥着更为重要的作用<sup>[2-4]</sup>。血管活性肠肽(VIP)是一种非胆碱能肾上腺能神经递质,由 28 个氨基酸残基组成,属于胰高血糖素-胰泌素家族。VIP 通过与其受体(PACAP-1, PACAP-2 等)结合,诱导免疫细胞增殖、分化,调节 Treg 细胞介导的免疫耐受、抑制炎症因子(IL-17A、NO 等)的合成及分泌,发挥抗炎及免疫调节的作用<sup>[5]</sup>。国内外有将 VIP 运用在自身免疫性疾病如类风湿关节炎(RA)的治疗报道<sup>[6-7]</sup>,但尚未阐明 VIP 在 MS 发病中对 Treg/Th17 细胞平衡的调控机制及对其分泌细胞因子的具体作用,因此本实验通过探讨 VIP 对 EAE 大鼠脑组织 TGF- $\beta$ 1、IL-17A 含量影响、脾组织中 Treg/Th17 细胞比例变化、脑组织炎细胞浸润程度的变化,为临床应用 VIP 治疗 MS 提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要实验动物、药物及器材

健康雌性 wistar 大鼠 60 只(200 ~ 250 g, 6 ~ 8 周龄)、健康豚鼠 10 只(250 ~ 300g),均购买于西南医科大学实验动物中心动物【SCXK(川)2013 - 17】;动物使用许可证:SYXK(川)2013 - 181。血管

活性肠肽(北京博奥森生物技术有限公司);完全弗氏佐剂 CFA(美国 sigma 公司产品);PBS 磷酸盐缓冲液(PH:7.2 - 7.4)(上海科兴试剂有限公司);大鼠淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品科技有限公司);FITC 标记抗鼠 CD25 (CD25-FITC)流式抗体(北京博奥森生物技术有限公司);APC 标记抗鼠 CD4 (CD4-APC)流式抗体(北京博奥森生物技术有限公司);APC 标记抗鼠 IL-17(IL-17-APC)流式抗体(北京博奥森生物技术有限公司);TGF- $\beta$ 1 ELISA、IL-17A ELISA 免疫试剂盒(广州雅怡生物科技有限公司),流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司),数显电热恒温水温箱 HH. W21. 600S(上海跃进医疗器械厂)等。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 免疫抗原的制备

断颈处死 10 只豚鼠后,在无菌条件下迅速分离出脊髓,去脊髓,称重后移入玻璃匀浆器,与等量的 0℃生理盐水混合后研磨成 50% 的全脊髓匀浆(WSCH)。将完全弗氏佐剂(CFA)与 WSCH 等体积混合,玻璃注射器抽打至油包水乳状,以滴在水面不散即为合格抗原。

#### 1.2.2 实验动物分组、制模及药物干预

将 60 只雌性 Wistar 大鼠随机分为 4 组(15 只/组):正常对照组、EAE 对照组、VIP 低剂量防治组、VIP 高剂量防治组。将免疫抗原注入 EAE 对照组、VIP 低、高剂量防治组大鼠双侧后肢足掌皮下(0.2 mL/100g)进行主动免疫,正常对照组给予等量生理盐水 + CFA。自造模当日起, VIP 低、高剂量防治组每隔一日分别腹腔注射 VIP4 nmol/kg (0.2 mL)、16

nmol/kg(0.8 mL),正常对照组及 EAE 对照组给予腹腔注射 0.8 mL NS,连续 10 d。

### 1.2.3 动态观察实验动物

自造模日起,每日早晨 10 时由同一观察者采用 Kono's 评分标准对大鼠进行神经功能障碍评分(NDS)。在发病高峰期(将连续 3 d 评分无加重、四肢瘫痪或死亡作为大鼠发病高峰期)处死 EAE 对照组, VIP 各剂量组大鼠。正常对照组未发病大鼠饲养 8 周后处死。处死各组大鼠后留取其脑组织、脾脏,分别进行 HE 染色、ELISA 检查、流式细胞检查。

### 1.2.4 检测脑组织中炎细胞浸润情况

脑组织经脱水、透明、浸蜡及石蜡包埋后,取 10  $\mu\text{m}$  厚度连续矢状位行石蜡切片,每间隔 100  $\mu\text{m}$  取片 1 张。经烘干、脱蜡后行脑组织 HE 染色、观察 CNS 中炎性细胞浸润程度。

HE 染色后对脑组织炎细胞浸润进行评分:0 分:无炎症细胞浸润;1 分:炎症细胞散在分布;2 分:血管周围聚集浸润炎症细胞;3 分:炎细胞汇集为广泛血管套,部分迁移至邻近脑实质内。

### 1.2.5 检测脾组织 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg、Th17 细胞亚群比例

#### 1.2.5.1 脾组织淋巴细胞悬液制备

(1) 在无菌条件下剖开 Wistar 大鼠腹腔、暴露脾脏,组织剪将其完整分离;

(2) 分离后的脾脏放入盛有 5 mL PBS 培养皿内,洗涤 3 次后吸至已消毒的 400 目筛网上,眼科剪迅速剪碎,在冰上用玻璃注射器内芯轻轻研磨得到脾细胞悬液,经筛网过滤后置于另一无菌培养皿内;

(3) 于一离心管内滴入脾细胞悬液,将等体积的大鼠淋巴细胞分离液滴入另一离心管内,用移液器将脾细胞悬液轻轻移入分离液的离心管,保持界面清楚;

(4) 在 24℃ 条件下离心(3000 r/min, 30 min)后,分为三层,中层云雾状为淋巴细胞层,用移液器吸取出该层细胞;

(5) PBS 液洗涤离心(1500 r/min, 5 min)后淋巴细胞 3 次;

(6) 用含 15% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基重悬淋巴细胞,吹打混匀后移入培养瓶,使用台盼蓝染色计数,保证活淋巴细胞数超过 95%。

### 1.2.5.2 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg、Th17 细胞亚群比例检测

(1) 将脾细胞悬液浓度调整为  $2 \times 10^6/\text{mL}$ ; (2) 取出 3 支 EP 管:标本检测管①、标本检测管②、对照管,各管吸入脾淋巴细胞悬液 1.5 mL; (3) 从冰箱中将 APC 标记的抗鼠 CD4 流式抗体(CD4-APC)、FITC 标记抗鼠 CD25 流式抗体(CD25-FITC) APC 标记抗鼠 IL-17 流式抗体(IL-17-APC)取出恢复室温; (4) 于标本检测管①中加入 1.5  $\mu\text{L}$  CD4-APC、1.5  $\mu\text{L}$  CD25-FITC; 于标本检测管②中加入 1.5  $\mu\text{L}$  IL-17-APC; 空白对照管内加入等量细胞悬液,分别震荡摇匀,闭光条件下置于 4℃ 冰箱内孵育 20 min; (5) 于每个 EP 管内分别加入 1 mL PBS 溶液,离心(1500 r/min, 8 min)后洗涤 2 次; (6) 于每个 EP 管内分别加入 300  $\mu\text{L}$  PBS 溶液重悬,吹打混匀; (7) 设定各通道间的荧光补偿后,通过前向及侧向散射光设定淋巴细胞群,在流式细胞仪上检测 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg、Th17 细胞亚群比例。

### 1.2.6 检测脑组织匀浆中 TGF- $\beta$ 1、IL-17A 含量变化

采用双抗体夹心(ABC-ELISA)法检测脑组织匀浆中 TGF- $\beta$ 1、IL-17A 含量。

## 1.3 统计方法

计量资料结果以  $\bar{x} \pm s$  表示;多组计量资料均数比较,当方差齐时用单因素方差分析,方差不齐时采 Kruskal-Wallis 检验;两两比较采 LSD 检验。SPSS17.0 软件包完成统计分析,  $P < 0.05$  具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠的发病情况

正常对照组大鼠未发病, EAE 对照组、VIP 各剂量组大鼠均出现不同程度的临床症状:发病大鼠先后表现为食量下降,精神萎靡,后肢无力,尾部拖地。在免疫后第 14~17 天病情症状最为典型:大鼠出现双侧后肢无力拖地、行走画圈、爬行困难、自伤后肢、精神极度衰弱、抽搐。但与 EAE 对照组比较, VIP 低、高剂量组大鼠症状明显缓解,表现为发病潜伏期时间延长、进展期时间缩短、发病高峰期 NDS 降低(表 1)。

**表 1** EAE 对照组、VIP 各剂量组大鼠发病潜伏期、进展期及高峰期神经功能障碍评分(NDS)的比较( $\bar{x} \pm s$ )

**Tab.1** The contrast on the incubation period, progress and the peak incidence neurological dysfunction scores in EAE control group and VIP each dose treatment groups

组别 (groups)	潜伏期(天) Incubation period(day)	进展期(天) Progress (day)	神经功能障碍评分 NDS(score)
EAE 对照组 EAE control group	10.34 ± 2.13	7.85 ± 1.65	4.16 ± 0.77
VIP 低剂量组 VIP low-dose group	14.17 ± 1.67*	6.20 ± 1.97*	3.75 ± 0.98 <sup>Δ</sup>
VIP 高剂量组 VIP high-dose group	20.73 ± 1.98* <sup>●</sup>	3.99 ± 1.57* <sup>○</sup>	2.59 ± 0.58* <sup>●</sup>
F	37.48	28.54	18.95
P	<0.01	<0.05	<0.01

注:与 EAE 对照组比较,\*P < 0.01、\*P < 0.05、<sup>Δ</sup>P > 0.05;与 VIP 低剂量组比较,<sup>●</sup>P < 0.01、<sup>○</sup>P < 0.05。

Note: Compared with the EAE control group, \*P < 0.01, \*P < 0.05, <sup>Δ</sup>P > 0.05; compared with the low dose group of VIP, <sup>●</sup>P < 0.01, <sup>○</sup>P < 0.05.

**表 2** EAE 对照组和 VIP 各剂量组 HE 染色病理评分( $\bar{x} \pm s$ )

**Tab.2** The HE staining pathological scores in EAE control group and VIP each dose group

组别 (Groups)	n	HE 染色病理评分(分) HE staining pathological scores(score)
EAE 对照组 EAE control group	15	2.75 ± 0.46
VIP 低剂量组 VIP low-dose group	15	2.05 ± 0.56*
VIP 高剂量组 VIP high-dose group	15	0.84 ± 0.51* <sup>▲</sup>
F		21.38
P		<0.01

注:与 EAE 对照组比较,\*P < 0.01;与 VIP 低剂量组比较,<sup>▲</sup>P < 0.01。

Note: compared with the EAE control group, \*P < 0.01; compared with the low dose group of VIP, <sup>▲</sup>P < 0.01

**2.2 各组大鼠脑组织病理变化**

正常对照组大鼠未发病,于饲养 8 周后处死,其脑组织中未见 EAE 基本病理改变;EAE 对照组及 VIP 各剂量防治组大鼠于发病高峰期处死,其各组脑组织则出现了不同程度的炎细胞浸润;炎性细胞浸润在小血管周围,部分区域呈“袖套”状改变,脑白质可见髓鞘脱失等病理改变(表 2、图 1)。

**2.3 各组大鼠脾脏 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg、Th17 细胞亚群比例**

通过流式细胞术检测各组大鼠脾脏 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg、Th17 细胞亚群比例变化。由于四组数据方差齐,将各组脾脏 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg、Th17 细胞比例采用单因素方差分析。见表 3。

**2.4 各组大鼠脑组织匀浆中 TGF-β1、IL-17A 含量变化**

VIP 各剂量组大鼠脑组织中 TGF-β1 含量较 EAE 组明显升高,IL-17A 含量较 EAE 组明显降低,且各组间存在一定剂量依赖关系(表 4)。

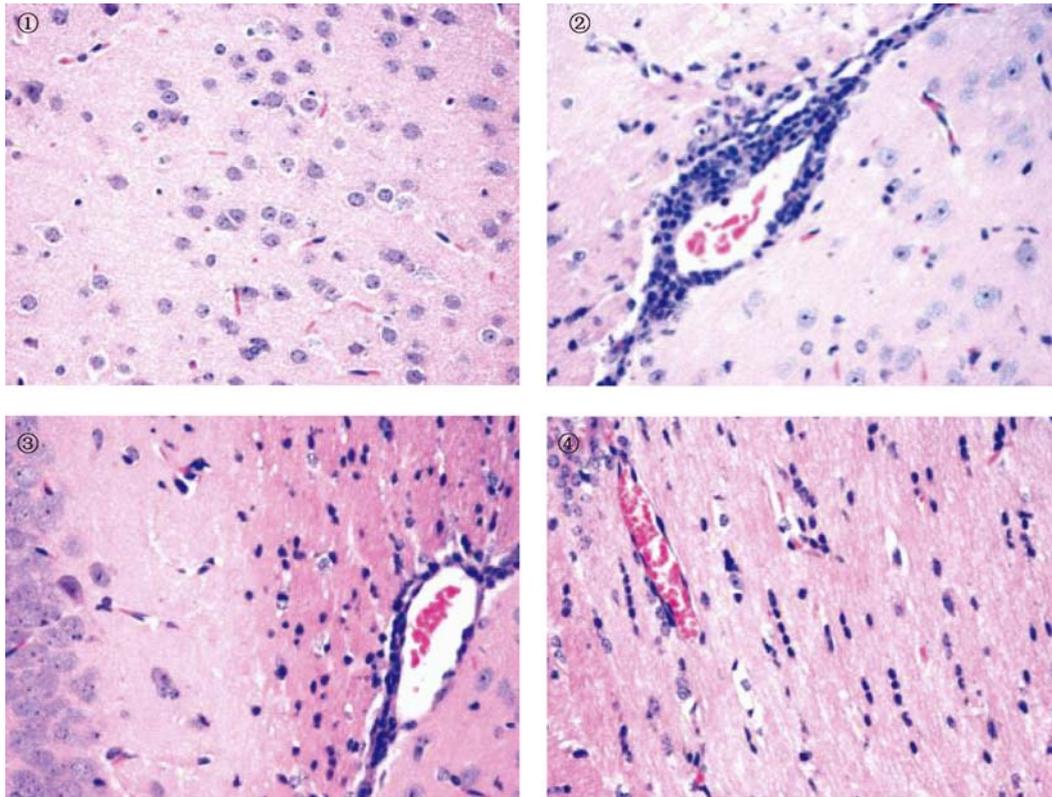
**表 3** 各剂量组大鼠脾脏 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg、Th17 细胞亚群比例( $\bar{x} \pm s, \%$ )

**Tab.3** The each group rats' CD4 + CD25 + Treg、Th17 ratio in spleen(,%)

组别(Groups)	n	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Treg(%)	Th17(%)
正常对照组 Normal control group	15	7.49 ± 1.24	0.61 ± 0.14
EAE 对照组 EAE control group	15	2.10 ± 0.62*	2.50 ± 0.12*
VIP 低剂量组 VIP low-dose group	15	4.50 ± 0.69* <sup>○</sup>	1.75 ± 0.24* <sup>●</sup>
VIP 高剂量组 VIP high-dose group	15	6.32 ± 0.82* <sup>●▲</sup>	0.59 ± 0.13* <sup>●▲</sup>
F		53.29	173.1
P		<0.01	<0.01

注:与正常对照组比较,\*P < 0.01、\*P < 0.05;与 EAE 对照组比较,<sup>●</sup>P < 0.01、<sup>○</sup>P < 0.05;与 VIP 低剂量组比较,<sup>▲</sup>P < 0.01。

Note: Compared with the normal control group, \*P < 0.01, \*P < 0.05; compared with the EAE control group, <sup>●</sup>P < 0.01, <sup>○</sup>P < 0.05; compared with the low dose group of VIP, <sup>▲</sup>P < 0.01.



①为正常对照组大鼠脑组织;②为对 EAE 对照组大鼠脑组织;③为 VIP 低剂量组大鼠脑组织;④VIP 高剂量组大鼠脑组织。

图 1 注:各组大鼠脑组织侧室旁(HE, ×40)

Note: ① brain tissues for normal control group rat; ② brain tissues for EAE control group rat;

③ brain tissue for VIP low dose group rats; ④brain tissue for VIP high dose group rats.

Fig. 1 The HE staining of brain tissue (periventricular) in each group rats(HE, ×40)

表 4 各组大鼠脑组织匀浆中 TGF-β1、IL-17A 含量变化( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 4 The content of TGF-β1、IL-17A in brain tissue of each group rats

组别 (Groups)	n	TGF-β1 (pg/ml)	IL-17A (pg/ml)
正常对照组 normal control group	15	65.66 ± 3.22	22.84 ± 3.51
EAE 对照组 EAE control group	15	18.56 ± 4.19*	78.26 ± 5.87*
VIP 低剂量组 VIP low-dose group	15	28.51 ± 3.14*●	57.49 ± 4.85*●
VIP 高剂量组 VIP high-dose group	15	50.41 ± 2.98*●▲	30.01 ± 5.59*●▲
F		78.25	101.99
P		<0.01	<0.01

注:与正常对照组比较,\* $P < 0.01$ 、\* $P < 0.05$ ;与 EAE 对照组比较,● $P < 0.01$ ;与 VIP 低剂量组比较,▲ $P < 0.01$ 。

Note: compared with the normal control group, \* $P < 0.01$ 、\* $P < 0.05$ ; compared with the EAE control group, ● $P < 0.01$ ; compared with the low dose group of VIP, ▲ $P < 0.01$ 。

### 3 讨论

Treg 细胞主要分为两类<sup>[8]</sup>:天然形成型(nTregs)与诱导生成型(iTregs)。作为 Tregs 中最为重要的一群,抗原激活的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞进入机体之后以多种方式参与免疫耐受。①接触

抑制机制<sup>[9]</sup>:CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞通过表达细胞毒性 T 细胞关联蛋白 CTLA-4、神经毡蛋白(Nrp-1)、淋巴细胞活化基因 3(LAG-3)等表面分子与效应细胞结合,抑制其成熟、减少递呈抗原、破坏细胞周期导致效应细胞凋亡;②分泌抑制性细胞因子<sup>[10]</sup>:CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞分泌高水平 TGF-

$\beta 1$ 、IL-10,可一定程度上抑制 Th1 细胞介导的免疫反应。进一步研究<sup>[11]</sup>发现 TGF- $\beta 1$  与受体(TGF- $\beta$ R)结合后,通过磷酸化下游转录因子 Smad3,从而诱导 Foxp3 基因表达。同时 TGF- $\beta 1$  通过抑制巨噬细胞、NK 细胞、T 细胞等效应细胞增生活化,抑制粘附分子等表达等,增强吞噬细胞活性和抗原提呈细胞的免疫抑制反应,协同其他抗炎因子如 IL-10 发挥免疫抑制作用<sup>[12]</sup>。

Th17 不同于 Th1、Th2 细胞,主要通过分泌一系列促炎因子 IL-17A、IL-21、IL-17F 等参与炎症过程<sup>[13]</sup>。IL-17A 作为一种具强促炎作用的炎症细胞因子,通过作用于基因靶点产生急性反应蛋白、炎症趋化因子等物质,上调 MHC-II 抗原、集落共刺激因子、及 T 细胞刺激因子、促使活化 T 细胞<sup>[14]</sup>。Peron, J. P 等<sup>[15]</sup>在 EAE 小鼠模型中发现,由 Th17 细胞高分泌的 IL-17A、IL-22 可破坏血脑屏障、激活 CNS 炎性细胞,导致 CNS 炎细胞浸润及髓鞘脱失等改变。同时 Th17 细胞高表达颗粒酶 B、与 GX-C 等趋化因子结合可杀死神经元,加重 CNS 的炎症损害,加速 EAE 的髓鞘脱失的发生发展<sup>[16]</sup>。

基于此,我们建立 EAE 模型,观察 VIP 否能在该模型体内通过调控 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg/Th17 细胞平衡及其分泌的细胞因子(TGF- $\beta 1$ 、IL-17A)水平,缓解 EAE 的病理改变及临床表现。

既往研究发现<sup>[17]</sup>,VIP 在体内外可激活 Treg 细胞,影响其分化,促进分泌负调控细胞因子 CTLA-4、IL-10 和 TGF- $\beta 1$  的作用,同时在细胞水平上增强 Treg 细胞的抑制效率,维持免疫耐受。在过继转移实验中<sup>[18]</sup>,将分泌 VIP 的 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞转移给 EAE 小鼠,能显著改善该疾病的发展进程。Yadav, M. 等<sup>[19]</sup>研究表明在自身免疫炎症反应中,VIP 可有效的抑制 CD4<sup>+</sup> T 细胞向 Th17 细胞分化,抑制 IL-17A 的分泌。Jimeno, R 等<sup>[20]</sup>在进一步机制研究中表明 VIP 主要通过受体(VPACP-1)结合后抑制蛋白激酶 A 的活性,增加 cAMP 的途径,发挥对 Th17 细胞的抑制作用。

因此,在本实验中,通过 ELISA 法检测该两类细胞分泌最具代表性的细胞因子(TGF- $\beta 1$ 、IL-17A),同时探讨 VIP 在 EAE 疾病干预过程中对该细胞因子的影响。结果显示:与 EAE 对照组比较,VIP 各剂量组大鼠脑组织匀浆中 TGF- $\beta 1$  含量均升高,且以高剂量组增高最明显,表明 VIP 可通过诱导 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞活化及分化,促进抗炎因子 TGF- $\beta 1$  分泌,从而改善 EAE 疾病进程;同时与

EAE 对照组比较,VIP 各剂量组大鼠脑组织匀浆中 IL-17A 含量明显降低,且高剂量组效果最明显,表明 VIP 在上调 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞作用的同时可下调 Th17 细胞的功能,抑制炎症因子 IL-17A 的产生,进一步阻断 EAE 发病进程。

本实验除了检测 VIP 对大鼠脑组织内免疫抑制因子 TGF- $\beta 1$ 、炎症因子 IL-17A 的影响外,同时通过流式细胞仪技术检测了各组大鼠脾脏组织中 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg、Th17 细胞亚群比例,进一步观察 VIP 对 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg/Th17 平衡调控的影响。结果显示:与 EAE 对照组比较,VIP 各剂量组大鼠脾脏组织中 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞比例明显升高,Th17 细胞比例降低,且 VIP 高剂量组变化最为明显,差异具有显著性。进一步表明:在 EAE 模型中,VIP 可通过上调 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 比例、下调 Th17 比例,维持 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg/Th17 细胞平衡,同时升高 TGF- $\beta 1$  因子含量,降低 IL-17A 因子水平,减轻炎症反应,维持中枢及外周免疫平衡,从而缓解 EAE 病理改变及临床表现。

#### 参考文献:

- [1] Popescu BF, Lucchinetti CF. Pathology of demyelinating diseases[J]. Annu Rev Pathol, 2012; 7(5):185-217.
- [2] Sharyn Tauro, Phuong Nguyen, Bofeng Li, et al. Diversification and senescence of Foxp3 + regulatory T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. Eur J Immunol, 2013, 43(5):1195-1207.
- [3] Rostami A, Ciric B. Role of Th17 cells in the pathogenesis of CNS inflammatory demyelination[J]. J Neurol Sci, 2013, 333(1-2):76-87.
- [4] Patel DD, Lee DM, Kolbinger F, et al. Effect of IL-17A blockade with secukinumab in autoimmune diseases[J]. Ann. Rheum. Dis, 2013, 72 (Suppl 2), ii116-ii123.
- [5] Gomariz, R. P, Juarranz, Y, Abad, C, et al. VIP-PACAP system in immunity: new insights for multitarget therapy[J]. Ann. N. Y. Acad. Sci, 2006,1070(1): 51-74.
- [6] Varun Sethi, Israel Rubinstein, Antonina Kuzmis, et al. Novel, Biocompatible, Disease Modifying Nanomedicine of VIP for Rheumatoid Arthritis[J]. Mol Pharm, 2013, 10(2): 728-738.
- [7] 张利群,沈建根. 重组血管活性肠肽基因质粒治疗大鼠胶原性关节炎的研究[J]. 浙江大学学报(医学版),2006,04: 403-410.
- [8] Peterson R A. Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression [J]. Toxicol Pathol, 2012, 40(2): 186-204.

(上转第 54 页)

- [ 6 ] 杨晓霞,孙世仁. Bmi-1 基因研究进展[J]. 医学综述,2016, 22(5):890-892.
- [ 7 ] Gavrilescu MM, Todosi AM, Anitei MG, *et al.* Expression of bmi-1 protein in cervical, breast and ovarian cancer [J]. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 2012, 116(4): 1112-1117.
- [ 8 ] 杨伟洪. Bmi-1、P 选择素在宫颈癌组织中的表达[J]. 白求恩医学杂志,2014,12(6):587-588.
- [ 9 ] 桂影,黄志红,王丽娟. 老年宫颈癌患者 Bmi-1 蛋白检测的临床意义[J]. 中国老年学杂志,2013,33(7):1656-1657.
- [ 10 ] Tong YQ, Liu B, Zheng HY, *et al.* Overexpression of BMI-1 is associated with poor prognosis in cervical cancer [J]. Asia Pac J Clin Oncol, 2012, 8(4): e55-e62.
- [ 11 ] Zhang X, Wang C, Wang L, *et al.* Detection of circulating Bmi-1 mRNA in plasma and its potential diagnostic and prognostic value for uterine cervical cancer [J]. Int J Cancer, 2012, 131(1): 165-172.
- [ 12 ] Min L, Dong-Xiang S, Xiao-Tong G, *et al.* Clinicopathological and prognostic significance of Bmi-1 expression in human cervical cancer [J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2011, 90(7): 737-745.
- [ 13 ] Zhang X, Wang CX, Zhu CB, *et al.* Overexpression of Bmi-1 in uterine cervical cancer: correlation with clinicopathology and prognosis [J]. Int J Gynecol Cancer, 2010, 20(9): 1597-1603.
- [ 14 ] 姚尧,邹扬. Bmi-1、p16 基因与实体瘤关系的研究进展[J]. 实用医学杂志,2009,25(18):3162-3164.
- [ 15 ] 崔学江,朱定军,韩金利,等. siRNA 干扰 BMI-1 基因对膀胱癌 EJ 细胞增殖的调控作用及其机制[J]. 中国病理生理杂志, 2011,27(8):1519-1524.
- [ 16 ] 刘霞,曹关义,程慧敏,等. Bmi-1-siRNA 对食管癌细胞株 EC9706 的影响[J]. 重庆医科大学学报,2014,39(1):8-12.
- [ 17 ] Zheng X, Wang Y, Liu B, *et al.* Bmi-1-shRNA inhibits the proliferation of lung adenocarcinoma cells by blocking the G1/S phase through decreasing cyclin D1 and increasing p21/p27 levels [J]. Nucleic Acid Ther, 2014, 24(3): 210-216.
- [ 18 ] 王艺芳,刘奔,刘纯青,等. Bmi-1-siRNA 抑制肺腺癌 SPC-A1 细胞的增殖及其机制[J]. 中国癌症杂志,2014,24(5):333-341.
- [ 19 ] 郑翔宇,朱杰,王艺芳,等. Bmi-1-siRNA 对肺腺癌 A549 细胞体内外增殖能力的影响[J]. 中国癌症杂志,2013,23(7):505-511.
- [ 20 ] Wang MC, Jiao M, Wu T, *et al.* Polycomb complex protein BMI-1 promotes invasion and metastasis of pancreatic cancer stem cells by activating PI3K/AKT signaling, an ex vivo, in vitro, and in vivo study [J]. Oncotarget, 2016, 7(8): 9586-9599.

[ 修回日期 ]2016-06-28

## ( 下接第 71 页 )

- [ 9 ] Castellani M L, Anogeanaki A, Felaco P, *et al.* IL-35, an anti-inflammatory cytokine which expands CD4 + CD25 + Treg Cells [J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2010, 24(2): 131-135.
- [ 10 ] Cross AH, Stark JL. Humoral immunity in multiple sclerosis and its animal model, experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. Immunol Res, 2005(32):85-97.
- [ 11 ] Kennard S, Liu H, Lilly B. Transforming growth factor-beta (TGF-1) down-regulates Notch3 in fibroblasts to promote smooth muscle gene expression[J]. J Biol Chem, 2008, 283(3):1324-33.
- [ 12 ] Delgado M, Robledo D, Rueda B, *et al.* Genetic association of vasoactive intestinal peptide receptor with rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2008, 58(4):1010-1019.
- [ 13 ] Youjin Lee, Amit Awasthi, Nir Yosef, *et al.* Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells[J]. Nat Immunol, 2012, 13(10): 991-999.
- [ 14 ] Xie S, Li J, Wang JH, *et al.* IL-17 activates the canonical NF-kappaB signaling pathway in autoimmune B cells of BXD2 mice to up regulate the expression of regulators of G-protein signaling 16 [J]. J Immunol, 2010, 184(5): 2289-2296.
- [ 15 ] Peron J P, Yang K, Chen M L, *et al.* Oral tolerance reduces Th17 cells as well as the overall inflammation in the central nervous system of EAE mice[J]. J Neuroimmunol, 2010, 227(1-2): 10-17.
- [ 16 ] Haile Y, Simmen KC, Pasichnyk D, *et al.* Granule-derived granzyme B mediates the vulnerability of human neurons to T cell-induced neurotoxicity [J]. J Immunol, 2011, 187(9): 4861-72.
- [ 17 ] Han Y, Yang Y, Chen Z, *et al.* Human hepatocellular carcinoma-infiltrating CD4 + CD69 + Foxp3 - regulatory T cell suppresses T cell response via membrane-bound TGF-β1 [J]. J Mol Med (Berl), 2014, 92(5):539-50.
- [ 18 ] ka AgnieszBaranowska-Bik, Jan Kochanowski, Dorota Uchman, *et al.* Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in humans with multiple sclerosis[J]. Journal of Neuroimmunology, 2013, 263(8): 159-161.
- [ 19 ] Yadav, M, Rosenbaum, J, Goetzl, E. J. Cutting edge: vasoactive intestinal peptide (VIP) induces differentiation of Th17 cells with a distinctive cytokine profile[J]. J. Immunol, 2008, 180(2), 2772-2776.
- [ 20 ] Jimeno, R, Leceta, J, Martínez, C, *et al.* Vasoactive intestinal peptide maintains the nonpathogenic profile of human th17-polarized cells [J]. Mol. Neurosci, 2014, 54(6): 512-525.

[ 修回日期 ]2016-07-28