

李彬,甘德堃,王璐璐. 和厚朴酚通过 Notch 信号通路抑制慢性阻塞性肺疾病小鼠免疫失衡并提供肺保护作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 86-93.

Li B, Gan DK, Wang LL. Honokiol inhibits immune imbalance and provides lung protection in mice with chronic obstructive pulmonary disease through the Notch signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 86-93.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 04. 012

和厚朴酚通过 Notch 信号通路抑制慢性阻塞性肺疾病小鼠免疫失衡并提供肺保护作用

李 彬*, 甘德堃, 王璐璐

(河南省中医院肺病科, 郑州 450002)

【摘要】 目的 探讨和厚朴酚(HNK)对慢性阻塞性肺疾病(COPD)小鼠免疫失衡及肺功能的影响,并考察 Notch 信号通路是否介导该过程。**方法** 将 30 只 6~8 周龄雄性 BALB/c 小鼠随机分为 3 组:正常对照组(Normal)、COPD 组和 COPD+HNK 组,每组 10 只。通过香烟烟雾诱导 COPD 小鼠模型,然后对 COPD+HNK 组小鼠隔日腹腔注射 HNK(10.00 mg/kg),共 30 d。采用法国 EMKA GYD-003 型动物肺功能测试系统检测吸气峰流速(PIF)和呼气峰流速(PEF)。苏木精-伊红(HE)染色评价肺组织病理变化。用流式细胞仪检测小鼠脾 T 细胞 Th1/Th2 和 Th17/Treg 亚群的比值。Western blot 检测 T 细胞中 Notch 1/2/3/4、Hes1、Hes5 和 Hey1 的蛋白表达。采用 ELISA 法检测小鼠血清 IFN- γ 、IL-4、IL-17 和 IL-10 水平。**结果** 与 COPD 组相比,COPD+HNK 组小鼠的 PIF 和 PEF 均显著升高($P<0.05$)。COPD+HNK 组小鼠肺组织病变较 COPD 组减轻,炎性细胞浸润减少,肺泡数增多,肺泡腔缩小。与 COPD 组相比,COPD+HNK 组小鼠的 Th1 百分比、Th1/Th2 比值、Th17 百分比和 Th17/Treg 比值均显著降低($P<0.05$)。与 COPD 组相比,COPD+HNK 组小鼠脾 T 细胞中的 Notch1、Notch2、Notch3、Notch4、Hes1、Hes5、Hey1 的蛋白相对表达量均显著降低($P<0.05$)。与 COPD 组相比,COPD+HNK 组小鼠血清中的 IFN- γ 和 IL-17 水平均显著降低($P<0.05$),而 IL-4 和 IL-10 水平显著升高($P<0.05$)。**结论** 和厚朴酚通过抑制 COPD 小鼠脾 T 细胞 Notch 信号通路的激活,进而纠正了 COPD 小鼠 Th1/Th2 和 Th17/Treg 细胞的失衡,从而改善了肺功能。

【关键词】 和厚朴酚;慢性阻塞性肺疾病;Notch 信号通路;免疫失衡;肺功能

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 04-0086-08

Honokiol inhibits immune imbalance and provides lung protection in mice with chronic obstructive pulmonary disease through the Notch signaling pathway

LI Bin*, GAN Dekun, WANG Lulu

(Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Department of Pulmonary Disease, Zhengzhou 450002, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of honokiol (HNK) on immune imbalance and lung function in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) mice and to investigate whether the Notch signaling pathway mediates this process. **Methods** BALB/c mice (male, 6~8 weeks old) were randomly divided into three groups: normal control group (Normal), COPD group and COPD+HNK group ($n = 10$ mice per group). A mouse model of COPD was induced by cigarette smoke, and HNK (10 mg/kg) was intraperitoneally injected into the COPD+HNK group every other day for 30

【基金项目】 河南省中医药科学研究专项(2019JDZX069)。

【作者简介】 李彬(1988—),男,硕士,研究方向:中西医结合防治呼吸系统疾病。E-mail:347359469@qq.com

days. The French EMKA GYD-003 animal lung function test system was used to detect the peak inspiratory flow rate (PIF) and peak expiratory flow rate (PEF). Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to evaluate the pathological changes of lung tissue. Flow cytometry was used to detect the ratio of Th1/Th2 and Th17/Treg subgroups of mouse spleen T cells. Western blot was used to examine the protein expression of Notch 1/2/3/4, Hes1, Hes5 and Hey1 in T cells. ELISA was used to detect the levels of serum IFN- γ , IL-4, IL-17 and IL-10 in mice. **Results** The PIF and PEF of the COPD+HNK group mice were significantly increased compared with result in the COPD group ($P<0.05$). In addition, the lung tissue lesions of the mice in the COPD+HNK group were reduced, the inflammatory cell infiltration was reduced, the number of alveoli increased and the alveolar cavity was reduced compared with result in the COPD group. Compared with the COPD group, the COPD+HNK group mice showed significantly reduced Th1 percentage, Th1/Th2 ratio, Th17 percentage and Th17/Treg ratio ($P<0.05$). In addition, the relative expression levels of Notch1, Notch2, Notch3, Notch4, Hes1, Hes5 and Hey1 in the spleen T cells of the COPD+HNK group mice were significantly reduced ($P<0.05$). The levels of IFN- γ and IL-17 in the serum of the COPD+HNK group were significantly reduced ($P<0.05$), while the levels of IL-4 and IL-10 were significantly increased ($P<0.05$). **Conclusions** HNK inhibits activation of the Notch signaling pathway of T cells in the spleen of COPD mice, thereby correcting the imbalance of Th1/Th2 and Th17/Treg cells in COPD mice and improving lung function.

【Keywords】 honokiol; chronic obstructive pulmonary disease; Notch signaling pathway; immune imbalance; lung function

慢性阻塞性肺疾病(COPD)是一种以不完全可逆的气流受限为特征的肺部疾病^[1-2]。最近的研究发现,COPD 患者存在 T 细胞亚群失衡的免疫紊乱。T 细胞亚群执行以 Th1 和 Th17 为主的获得性免疫反应,这种免疫反应可导致 COPD 慢性炎症的持续和扩大,加速气道重塑,这与 COPD 的发病机制和病情加重有关^[3]。杨鑫娜等^[4]报道,Notch 信号通路可调节 COPD 患者 Th1/Th2 和 Th17/Treg 的免疫失衡,参与 COPD 的发病机制。和厚朴酚(honokiol, HNK, C₁₈H₁₈O₂)是从厚朴或凹叶厚朴树皮中提取的一种双酚类化合物,在中国和日本的传统医药中有广泛的应用,多用于治疗血栓性中风、治疗焦虑和胃肠道症状,并且还具有心脏保护作用、抗微生物作用、抗炎作用、抗血管生成作用和抗血管生成作用^[5-7]。最近的研究报道和厚朴酚能显著抑制哮喘小鼠嗜酸性粒细胞浸润,减轻气道炎症,抑制炎性细胞因子的产生,这些结果提示和厚朴酚可能是治疗肺哮喘相关疾病的候选药物^[8]。然而,目前尚无文献报道和厚朴酚在 COPD 中的应用效果。因此,本研究旨在揭示和厚朴酚是否可改善 COPD 小鼠免疫平衡并提供肺保护作用,并进一步探讨 Notch 信号通路是否介导和厚朴酚对 COPD 的治疗机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

30 只 6~8 周龄无特定病原体(SPF)雄性

BALB/c 小鼠购自凯学生物科技(上海)有限公司[SCXK(沪)2020-0005],平均体重(20±2)g。所有小鼠于温度(22±1)℃、湿度(50±5)%、光照/黑暗周期 12 h/12 h 的 SPF 级实验室内饲养,饲养室位于河南中医药大学实验动物中心[SYXK(豫)2020-0004],不限制食物和水。本研究由河南省中医院动物实验伦理委员会批准(IACUC:20200013),实验研究过程中做到了 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

和厚朴酚(货号 SND-287)购自滁州仕诺达生物科技有限公司;香烟购自河南安阳卷烟厂;苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(货号 C0105M)购自碧云天生物技术有限公司;异硫氰酸荧光素(FITC)标记的 CD3 抗体(货号 LM-10498R-FITC)购自上海联迈生物工程有限公司;RPMI-1640(货号 PM150110A)购自上海雅吉生物科技有限公司;藻红蛋白-花青苷 5(PE/CY5)标记的 CD4 抗体(货号 100409)、藻红蛋白(PE)标记的 IL-4(货号 504103)、FITC 标记的 IFN- γ (货号 505805)、PE 标记的 Foxp3(货号 364703)和 FITC 标记的 IL-17A(货号 512303)购自美国 Bio Legend 公司;Notch 1(货号 ab52627)、Notch 2(货号 ab245325)、Notch 3(货号 ab23426)、Notch 4(货号 ab184742)、Hes1(货号 ab119776)、Hes5(货号 ab194111)、Hey1(货号 ab154077)和 β -actin(货号 ab8227)一抗购自英国 Abcam 公司;辣根过氧化物酶偶联 IgG 二抗(货号 ZB-2306)购自北京中杉金桥生物科技有限公司;IFN- γ (货号

439007)、IL-4(货号 EA-2510)、IL-17(货号 HIL-17A-175)和 IL-10(货号 EA-2513)ELISA 试剂盒购自深圳市达科为生物技术股份有限公司。

GYD-003 型动物肺功能测试系统购自法国 EMKA 公司;CytoFLEX 流式细胞仪购自美国贝克曼库尔特公司;BP121S 电子天平购自德国赛多利斯公司;动物恒温系统 ALC-HTP 购自上海奥尔科特生物科技有限公司;Nanodrop 2000 紫外分光光度计、MK3 酶标仪购自美国 Thermo 公司;Mini P-4 垂直电泳槽、电泳仪、电转仪购自美国 Bio-Rad 公司;Western blot 显影仪购自德国 QUANTUM 公司;Leica RM2235 石蜡切片机购自德国 Leica 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 COPD 模型制备

将小鼠随机分为 3 组:正常对照组(Normal)、COPD 组和 COPD+HNK 组,每组 10 只。将 COPD 组和 COPD+HNK 组小鼠置于 50 cm、30 cm、35 cm 的有机玻璃盒子进行香烟烟雾诱导(焦油量:14 mg,烟气烟碱量:1.1 mg),每天吸烟 4 次(4 支,45 min),间隔 1 h,连续 90 d。从造模第 61 天开始,COPD+HNK 组隔日腹腔注射和厚朴酚(HNK,10.00 mg/kg),至第 90 天。和厚朴酚的使用剂量参考文献^[9-10]进行设置,前文献中和厚朴酚的使用剂量为 2~16 mg/kg,因此本文将的剂量设置为 10.00 mg/kg。

1.3.2 肺功能测试

治疗完成后,采用法国 EMKA GYD-003 型动物肺功能测试系统检测吸气峰流速(PIF)和呼气峰流速(PEF)。

1.3.3 肺组织病理形态学观察

治疗完成后,采用颈椎脱臼法处死小鼠。取小鼠肺组织,置于 10%多聚甲醛溶液中固定。石蜡包埋,切片,然后进行苏木精-伊红(HE)染色,检测方法严格按照制造商说明书进行。

1.3.4 小鼠脾 T 细胞分离

在无菌条件下,取小鼠脾,研磨后在 200 目滤网上滤过,制成单细胞悬液,缓慢加入小鼠淋巴细胞分离液中,以 2500 r/min 离心 20 min。吸取中间层淋巴细胞,调整细胞数至每毫升 1×10^6 个,加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记的 CD3 抗体,流式细胞仪检测总 T 细胞(CD3⁺T)纯度。

1.3.5 CD4⁺T 细胞亚群检测

使用 RPMI-1640 调整脾 T 淋巴细胞浓度为每

毫升 1×10^6 个,细胞中加入藻红蛋白-花青苷 5 (PE/CY5)标记的 CD4 抗体。然后,用 4%多聚甲醛固定细胞。分别加入膜裂解剂、藻红蛋白(PE)标记的 IL-4、FITC 标记的 IFN- γ 、PE 标记的 Foxp3 和 FITC 标记的 IL-17A。用流式细胞仪检测 Th1、Th2、Th17 和 Treg 的表达,计算 Th1/Th2 和 Th17/Treg 亚群的比值。

1.3.6 Western blot

提取小鼠 T 淋巴细胞总蛋白,用 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 50 μ g 蛋白样品。将蛋白质转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,室温下用 5%脱脂牛奶封闭膜 30 min。然后将膜与 Notch 1/2/3/4(1:500 稀释)、Hes1(1:1000 稀释)、Hes5(1:500 稀释)、Hey1(1:2000 稀释)和 β -actin(1:1000 稀释)4℃孵育过夜。然后将膜与辣根过氧化物酶偶联 IgG 二抗(1:2000 稀释)在室温下孵育 2 h,ECL 显影。 β -actin 作为内参蛋白,将目标蛋白的灰度值标准化为 β -actin 的灰度值。

1.3.7 血清 IFN- γ 、IL-4、IL-17 和 IL-10 水平检测

采集小鼠静脉血,分离血清。采用 ELISA 法严格按照试剂盒说明书检测小鼠血清 IFN- γ 、IL-4、IL-17 和 IL-10 水平。

1.4 统计学方法

所有实验数据用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。每组数据均以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)。多重比较采用最低显著性差法(LSD-*t*)。 $P < 0.05$ 说明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 和厚朴酚对 COPD 小鼠肺组织病理变化的影响

通过 HE 染色评价各组小鼠肺组织病理变化(图 1)。Normal 组小鼠肺组织结构基本完整,未见明显病理改变。COPD 组小鼠肺泡间隔内可见炎性细胞浸润,终末细支气管远端气腔膨胀,间隙变窄,肺泡数明显减少,肺泡腔扩张,肺泡壁破裂,符合 COPD 的病理学表现。COPD+HNK 组小鼠肺组织病变较 COPD 组减轻,炎性细胞浸润减少,肺泡数增多,肺泡腔缩小。

2.2 和厚朴酚对 COPD 小鼠肺功能的影响

HE 染色结果显示,小鼠肺组织形态符合 COPD 的病理学表现,表明建模成功。通过吸气峰流速

(PIF)和呼气峰流速(PEF)评价各组小鼠肺功能,如图2所示,与Normal组相比,COPD组小鼠的PIF和PEF均显著降低($P<0.05$)。与COPD组相比,COPD+HNK组小鼠的PIF和PEF均显著升高($P<0.05$)。说明和厚朴酚能改善COPD模型小鼠的肺功能。

2.3 和厚朴酚对 COPD 小鼠 T 细胞亚群的影响

各组小鼠 T 细胞亚群分布如图3所示,与Normal组相比,COPD组小鼠的Th1百分比、Th1/Th2比值、Th17百分比和Th17/Treg比值均显著升高($P<0.05$),而Treg百分比和Th2百分比无显著变化($P>0.05$)。与COPD组相比,COPD+HNK组小鼠的Th1百分比、Th1/Th2比值、Th17百分比和Th17/Treg比值均显著降低($P<0.05$)。这些结果说明和厚朴酚可改善COPD小鼠T细胞亚群。

2.4 和厚朴酚对 COPD 小鼠 T 细胞 Notch 信号通路的影响

通过 Western blot 检测各组小鼠脾 T 细胞中

Notch 信号通路的蛋白表达(图4),结果显示,与Normal组相比,COPD组小鼠脾T细胞中的Notch1、Notch2、Notch3、Notch4、Hes1、Hes5、Hey1的蛋白相对表达量均显著升高($P<0.05$)。与COPD组相比,COPD+HNK组小鼠脾T细胞中的Notch1、Notch2、Notch3、Notch4、Hes1、Hes5、Hey1的蛋白相对表达量均显著降低($P<0.05$)。这些结果说明和厚朴酚抑制了COPD小鼠T细胞中的Notch信号通路。

2.5 和厚朴酚对 COPD 小鼠血清细胞因子的影响

通过 ELISA 法检测各组小鼠血清细胞因子水平(图5),结果显示,与Normal组相比,COPD组小鼠血清中的IFN- γ 和IL-17水平均显著升高($P<0.05$),而IL-4和IL-10水平显著降低($P<0.05$)。与COPD组相比,COPD+HNK组小鼠血清中的IFN- γ 和IL-17水平均显著降低($P<0.05$),而IL-4和IL-10水平显著升高($P<0.05$)。说明和厚朴酚影响了COPD小鼠血清细胞因子的分泌。

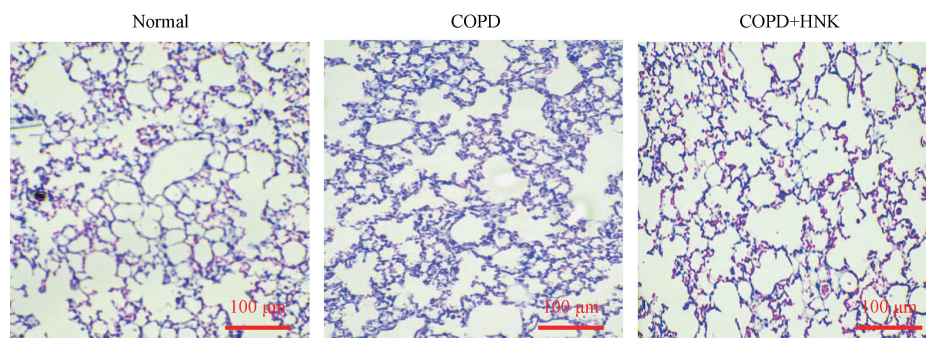
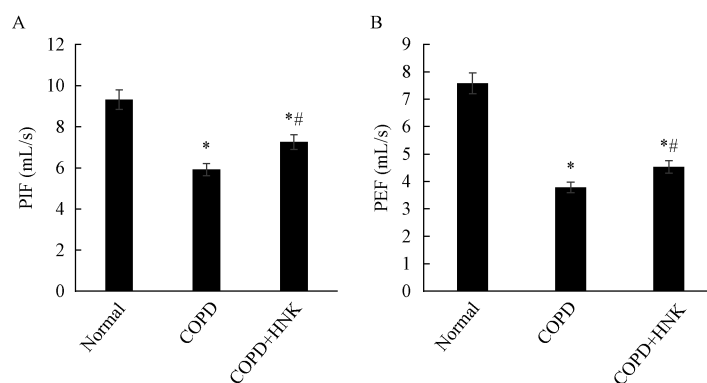


图1 各组小鼠肺组织的 HE 染色

Figure 1 HE staining of lung tissue of mice in each group

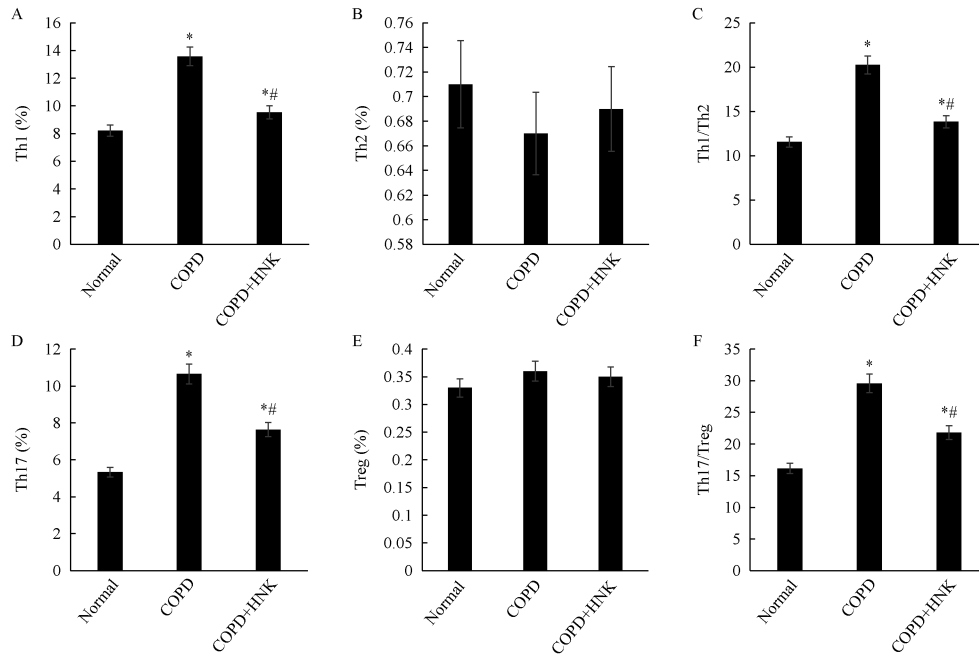


注:A:吸气峰流速(PIF);B:呼气峰流速(PEF)。与正常组相比,* $P<0.05$;与COPD组相比,# $P<0.05$ 。

图2 和厚朴酚对 COPD 小鼠肺功能的影响

Note. A, Peak inspiratory flow(PIF). B, Peak expiratory flow(PEF). Compared with normal group, * $P<0.05$. Compared with COPD group, # $P<0.05$.

Figure 2 Effect of honokiol on the lung function of COPD mice

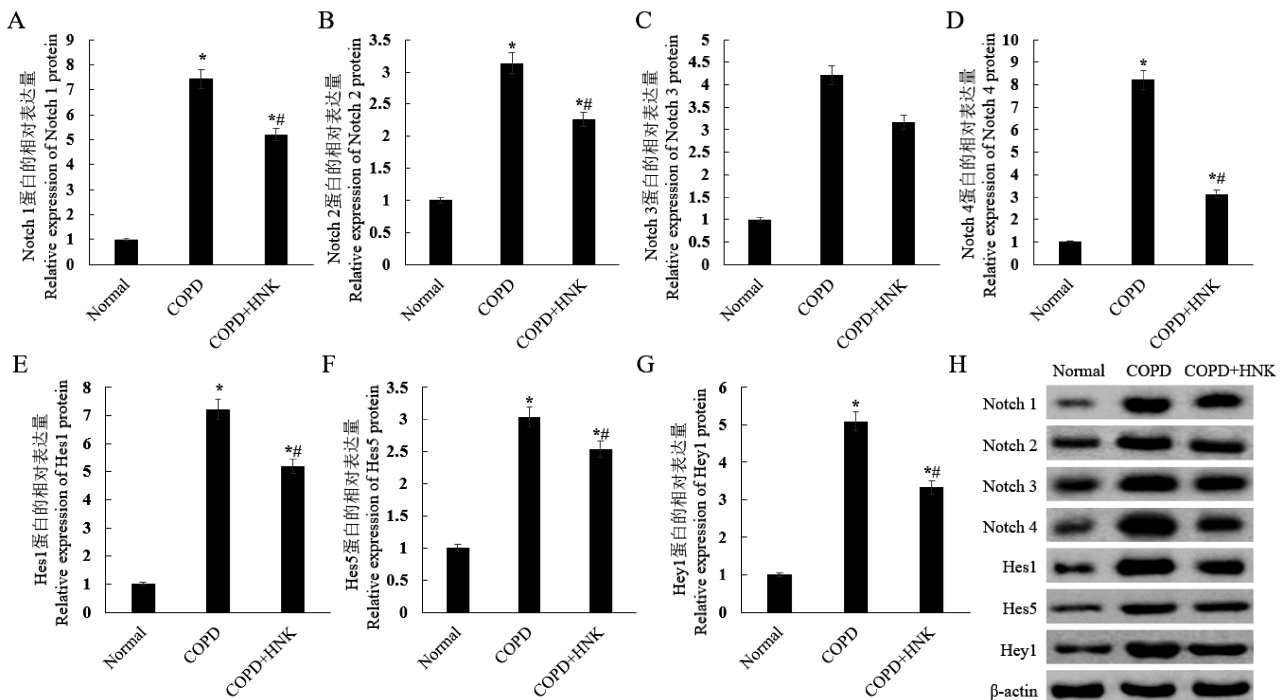


注:A:小鼠脾 Th1 百分比;B:Th2 百分比;C:Th1/Th2 比值;D:Th17 百分比;E:Treg 百分比;F:Th17/Treg 比值。与正常组相比, * $P < 0.05$;与 COPD 组相比, # $P < 0.05$ 。

图 3 和厚朴酚对 COPD 小鼠 T 细胞亚群的影响

Note. A, Mouse spleen Th1 percentage. B, Th2 percentage. C, Th1/Th2 ratio. D, Th17 percentage. E, Treg percentage. F, Th17/Treg ratio. Compared with normal group, * $P < 0.05$. Compared with COPD group, # $P < 0.05$.

Figure 3 Effect of honokiol on T cell subsets in COPD mice

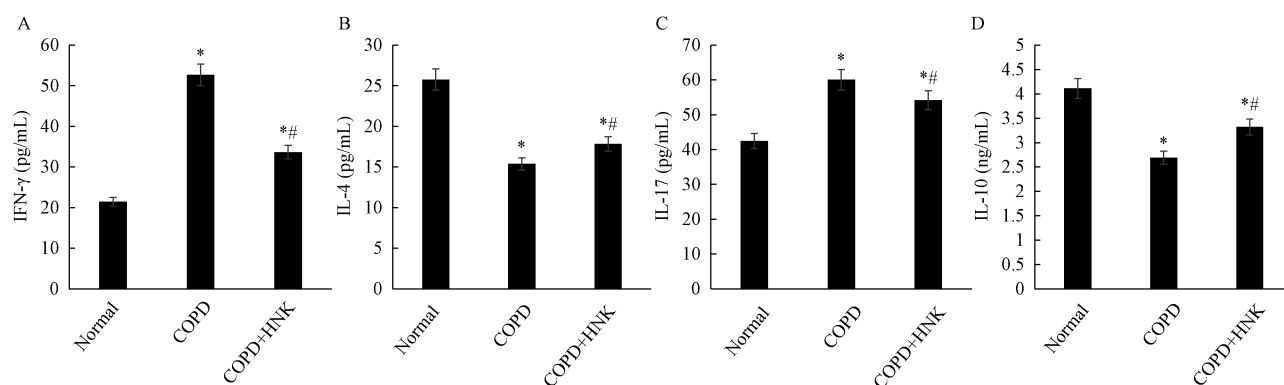


注:A~G:小鼠脾 T 细胞中 Notch1、Notch2、Notch3、Notch4、Hes1、Hes5、Hey1 的蛋白相对表达量;H:蛋白质印迹代表条带。与正常组相比, * $P < 0.05$;与 COPD 组相比, # $P < 0.05$ 。

图 4 和厚朴酚对 COPD 小鼠 T 细胞 Notch 信号通路的影响

Note. A~G, Relative expression of Notch1, Notch2, Notch3, Notch4, Hes1, Hes5, Hey1 in mouse spleen T cells in sequence. H, Western blot representative band. Compared with normal group, * $P < 0.05$. Compared with COPD group, # $P < 0.05$.

Figure 4 Effect of honokiol on the Notch signaling pathway of T cells in COPD mice



注: A~D: 依次为小鼠血清 IFN- γ 、IL-4、IL-17、IL-10 水平。与正常组相比, * $P<0.05$; 与 COPD 组相比, # $P<0.05$ 。

图 5 和厚朴酚对 COPD 小鼠血清细胞因子的影响

Note. A~D, Levels of mouse serum IFN- γ , IL-4, IL-17 and IL-10 in sequence. Compared with normal group, * $P<0.05$. Compared with COPD group, # $P<0.05$.

Figure 5 Effect of honokiol on serum cytokines in COPD mice

3 讨论

和厚朴酚最初是从厚朴或凹叶厚朴树皮中提取的具有抗衰老、抗氧化、抗炎和抗肿瘤等作用的一种双酚类化合物。据报道,和厚朴酚通过激活 Akt 介导的胆碱能神经元存活通路改善快速老化 SAMP8 小鼠衰老相关的学习和记忆损伤^[11]。和厚朴酚通过减少 ROS 的产生而减轻大鼠脑缺血再灌注损伤^[12]。在肾缺血/再灌注损伤 (I/R) 模型中,与 I/R 组相比,和厚朴酚预处理降低炎症标志物如肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-6 (IL-6) 的表达水平^[13]。此外,和厚朴酚在多种癌细胞中显示出强大的抗肿瘤活性^[14-15]。本研究中,和厚朴酚显著升高 COPD 小鼠的 PIF 和 PEF,并且 HE 染色也显示和厚朴酚减轻了香烟烟雾诱导的肺组织病理变化,说明和厚朴酚能改善 COPD 模型小鼠的肺功能。其他学者报道和厚朴酚对哮喘也具有良好的治疗作用^[8],因此,和厚朴酚在治疗肺部疾病方面可能具有较高的潜力。

T 淋巴细胞介导的过度免疫反应在 COPD 的发生和发展中起着重要作用,并且这些细胞的数量随着气流限制的增加和肺气肿的加重而增加^[16]。T 淋巴细胞可以分化为 Th1 或 Th2 细胞,具体取决于它们产生的细胞因子类型。目前,许多研究发现 COPD 存在 Th1 介导的免疫应答,表现为 IFN- γ (Th1 细胞因子) 水平升高,IL-4 (Th2 细胞因子) 水平降低,Th1/Th2 失衡^[17]。另外,IL-17/Treg 的平衡是维持免疫系统稳定和避免过度免疫反应的重要因素。最近的研究发现 COPD 患者也存在 Th17/

Treg 失衡,表现为 IL-17 (Th17 细胞因子) 分泌增加,IL-10 (Treg 细胞因子) 分泌减少^[18]。本研究中,和厚朴酚显著降低了 COPD 小鼠的 Th1 百分比、Th1/Th2 比值、Th17 百分比和 Th17/Treg 比值,显著降低 IFN- γ 和 IL-17 水平,而升高 IL-4 和 IL-10 水平,纠正了 Th1/Th2 和 Th17/Treg 细胞失衡。Th1 细胞主要分泌 IL-2、IFN- γ 和 TNF- α ^[19]。Th2 细胞主要分泌 IL-4,刺激 B 淋巴细胞增殖产生 IgG 和 IgE,并介导体液免疫^[20]。此外,高水平的 IL-4 可通过激活自然杀伤 T 细胞^[21]。大量的文献均证实,Th2 细胞分泌的细胞因子在减轻炎症方面发挥着重要作用。结合本研究结果可知,和厚朴酚可使 COPD 小鼠体内 Th1 细胞向 Th2 细胞漂移,从而抑制了 Th1/Th2 细胞失衡引起的过度炎症反应。IL-17 是中性粒细胞炎症的关键启动子。既往研究报道 COPD 患者 IL17 水平升高,这可能导致中性粒细胞募集和浸润到炎症部位,最终通过刺激肺微血管内皮细胞产生 CXCL8 (IL-8)、E-选择素、血管细胞粘附分子-1 和细胞间粘附分子-1,从而加重 COPD^[22]。IL-17 可诱导急性炎症、募集 Th17 细胞并激活 Th1 细胞以促进细胞免疫反应。IL-10 是 B 淋巴细胞的经典刺激物,它通过抑制核因子 κ B (一种关键的炎症转录因子) 的表达来抑制 Th1 细胞产生 TNF- α 、IL-2 和 IFN- γ ^[23]。因此,抑制 IL-17 的表达并增加 IL-10 的表达可通过多种途径来抑制炎症。本研究结果说明,和厚朴酚抑制了 COPD 小鼠 IL-17 的表达并增加 IL-10 的表达,从而使 Th17 细胞向 Treg 细胞漂移,进而抑制了 Th17/Treg 细胞失衡引起的过度炎症反应。另外,Wang 等^[24]发现 COPD 患者 Th17 和

调节性 T 细胞 (Treg) 失衡,血清 IL-6 和 IL-17 水平升高,与用力肺活量 (FVC)、第一秒用力呼气量 (FEV1)、FEV1/FVC 值降低密切相关,这些变化与 COPD 患者病情严重程度相关。总之,和厚朴酚通过纠正 Th1/Th2 和 Th17/Treg 细胞失衡,进而改善了 COPD 小鼠的肺功能。

Notch 信号通路是一个高度保守的信号转导通路,包括 4 个同源受体 Notch1/2/3/4 和 5 个配体 Delta1/3/4 和 Jagged1/2,它们表达在 T 细胞和多个成熟免疫细胞表面,参与 T 细胞的分化^[25]。在 Notch 受体与配体结合后,下游的靶基因被激活以抑制分化调节因子的表达,最终影响细胞的分化、增殖和凋亡^[26]。Laky 等^[27]发现抗原提呈细胞表面的 Delta 样 4 (DLL4) 与 CD4/T 细胞表面的 Notch 受体结合,增加 IL-2 的分泌,调节适应性免疫反应。Notch1 受体的激活可以调节 Th17 细胞分化^[28]。杨鑫娜等^[4]报道,Notch 信号通路可调节 COPD 患者 Th1/Th2 和 Th17/Treg 的免疫失衡,参与 COPD 的发病机制。Notch 配体 DLL1 和 DLL4 可以诱导 Th1 细胞分化,抑制 Th2 细胞分化,促进 CD4⁺T 细胞分泌 IFN- γ ,并下调 IL-4 和 IL-13 水平^[25]。在 CD4⁺T 细胞的早期激活过程中,Notch 受体已经被激活,并且可以启动 Th17 细胞中的基因转录^[29]。抑制 Notch 信号可以降低外周血中 Th17 细胞的百分比,导致 Th17/Treg 比值降低,进而减弱 Th17 细胞介导的免疫应答,增强 Treg 细胞的免疫抑制功能^[30]。另外,Notch 受体通过细胞间相互作用和配体结合,以及通过 γ -分泌酶的酶解激活下游靶基因 Hes 和 Hey 家族,这两个基因共同参与了 T 细胞的激活、增殖和分化。本研究中,Notch 信号通路在 COPD 小鼠体内被激活,这是 Th1 和 Th17 介导的促炎性免疫紊乱的主要原因。然而,和厚朴酚显著降低了 COPD 小鼠脾 T 细胞中的 Notch1、Notch2、Notch3、Notch4、Hes1、Hes5、Hey1 的蛋白表达。结果表明,和厚朴酚通过抑制 T 细胞 Notch 信号通路的激活降低了 COPD 小鼠 Th1/Th2 和 Th17/Treg 的比例,从而减少血清 IFN- γ 和 IL-17 的分泌,并促进 IL-4 和 IL-10 的分泌。

综上所述,本研究表明香烟烟雾诱导的 COPD 小鼠模型存在 Th1/Th2 和 Th17/Treg 细胞失衡。而和厚朴酚通过抑制 COPD 小鼠脾 T 细胞 Notch 信号通路的激活,进而纠正了 COPD 小鼠 Th1/Th2 和 Th17/Treg 细胞的失衡,从而改善了肺功能。

参考文献:

- [1] 曾宗鼎,邢崇浩,郑辉才,等. 血浆 miR-145 及 miR-183 对慢性阻塞性肺疾病患者的预后评估价值 [J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(10): 1246-1250.
- [2] 周利航,王导新. 慢性阻塞性肺疾病急性加重患者 PGRN 的水平变化及临床意义 [J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(22): 2769-2773.
- [3] Jin Y, Wan Y, Chen G, et al. Treg/IL-17 ratio and Treg differentiation in patients with COPD [J]. PLoS One, 2014, 9(10): e111044.
- [4] 杨鑫娜,刘晓菊,赵兰婷,等. Notch 信号通路在慢性阻塞性肺疾病免疫失衡中的作用及机制研究 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2016, 39(11): 881-885.
- [5] Rauf A, Patel S, Imran M, et al. Honokiol: An anticancer lignan [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 107: 555-562.
- [6] Sarica A, Kirika N, Romeo M, et al. Safety and toxicology of magnolol and honokiol [J]. Planta Med, 2018, 84(16): 1151-1164.
- [7] Zhang B, Wang PP, Hu KL, et al. Antidepressant-like effect and mechanism of action of honokiol on the mouse lipopolysaccharide (LPS) depression model [J]. Molecules, 2019, 24(11): 2035.
- [8] Hong T, Min H, Hui Z, et al. Oral administration of honokiol attenuates airway inflammation in asthmatic mouse model [J]. Pak J Pharm Sci, 2018, 31(4): 1279-1284.
- [9] 郝庆红,陈冠华,冯雅琪,等. 和厚朴酚延缓小鼠衰老作用研究 [J]. 河北农业大学学报, 2008, 31(6): 87-90.
- [10] 郝庆红,陈冠华,冯雅琪,等. 和厚朴酚对 D-半乳糖衰老模型小鼠抗氧化作用的研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(6): 798-800.
- [11] Matsui N, Takahashi K, Takeichi M, et al. Magnolol and honokiol prevent learning and memory impairment and cholinergic deficit in SAMP8 mice [J]. Brain Res, 2009, 1305: 108-117.
- [12] Liou KT, Shen YC, Chen CF, et al. Honokiol protects rat brain from focal cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting neutrophil infiltration and reactive oxygen species production [J]. Brain Res, 2003, 992(2): 159-166.
- [13] Yu Y, Li M, Su N, et al. Honokiol protects against renal ischemia/reperfusion injury via the suppression of oxidative stress, iNOS, inflammation and STAT3 in rats [J]. Mol Med Rep, 2016, 13(2): 1353-1360.
- [14] Banik K, Ranaware AM, Deshpande V, et al. Honokiol for cancer therapeutics: A traditional medicine that can modulate multiple oncogenic targets [J]. Pharmacol Res, 2019, 144: 192-209.
- [15] Wang Y, Liu Z, Liu Q, et al. Honokiol suppressed pancreatic cancer progression via miR-101/Mcl-1 axis [J]. Cancer Manag Res, 2020, 12: 5243-5254.
- [16] Brusselle GG, Joos GF, Bracke KR. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease [J].

- Lancet, 2011, 378(9795): 1015–1026.
- [17] 王成阳, 李泽庚. 慢性阻塞性肺病大鼠肺功能降低与 Th1/Th2 极化, STAT4/6 表达的关系 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(12): 1233–1236, 1241.
- [18] Gu XY, Chu X, Zeng XL, et al. Effects of PM2.5 exposure on the Notch signaling pathway and immune imbalance in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Environ Pollut, 2017, 226: 163–173.
- [19] Hansen G, Berry G, DeKruyff RH, et al. Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation [J]. J Clin Invest, 1999, 103(2): 175–183.
- [20] van Oosterhout AJ, Motta AC. Th1/Th2 paradigm: not seeing the forest for the trees? [J]. Eur Respir J, 2005, 25(4): 591–593.
- [21] Tsao CC, Tsao PN, Chen YG, et al. Repeated activation of lung invariant NKT cells results in chronic obstructive pulmonary disease-like symptoms [J]. PLoS One, 2016, 11(1): e0147710.
- [22] Zhang L, Cheng Z, Liu W, et al. Expression of interleukin (IL)-10, IL-17A and IL-22 in serum and sputum of stable chronic obstructive pulmonary disease patients [J]. Copd, 2013, 10(4): 459–465.
- [23] Leon-Cabrera S, Arana-Lechuga Y, Esqueda-León E, et al. Reduced systemic levels of IL-10 are associated with the severity of obstructive sleep apnea and insulin resistance in morbidly obese humans [J]. Mediators Inflamm, 2015, 2015: 493409.
- [24] Wang H, Ying H, Wang S, et al. Imbalance of peripheral blood Th17 and Treg responses in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. Clin Respir J, 2015, 9(3): 330–341.
- [25] Mochizuki K, He S, Zhang Y. Notch and inflammatory T-cell response: new developments and challenges [J]. Immunotherapy, 2011, 3(11): 1353–1366.
- [26] Tilley AE, Harvey BG, Heguy A, et al. Down-regulation of the notch pathway in human airway epithelium in association with smoking and chronic obstructive pulmonary disease [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 179(6): 457–466.
- [27] Laky K, Evans S, Perez-Diez A, et al. Notch signaling regulates antigen sensitivity of naive CD4⁺ T cells by tuning co-stimulation [J]. Immunity, 2015, 42(1): 80–94.
- [28] Keerthivasan S, Suleiman R, Lawlor R, et al. Notch signaling regulates mouse and human Th17 differentiation [J]. J Immunol, 2011, 187(2): 692–701.
- [29] Amsen D, Helbig C, Backer RA. Notch in T cell differentiation: all things considered [J]. Trends Immunol, 2015, 36(12): 802–814.
- [30] Yu S, Liu C, Li L, et al. Inactivation of Notch signaling reverses the Th17/Treg imbalance in cells from patients with immune thrombocytopenia [J]. Lab Invest, 2015, 95(2): 157–167.

[收稿日期]2021-07-14

综述:成年后海马神经发生与阿尔茨海默病的神经再生治疗

阿尔茨海默氏病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种神经退行性疾病,是导致老年痴呆的最常见原因。然而,目前尚无能够终止 AD 病程进展的治疗药物和方法。其中部分原因可能与老年 AD 患者脑内神经网络退变的不可逆性有关。通过诱导神经元新生补偿神经元丢失以及重塑退变的神经网络,有望成为 AD 治疗的新方向。

来自遵义医科大学基础药理教育部重点实验室的研究者对 AD 与海马神经发生的研究进展进行了回顾。尽管成年海马神经元新生 (adult hippocampal neurogenesis, AHN) 数目有限,但数目不多的新生神经元仍然可以赋予海马神经环路极高的可塑性,并在学习-记忆/遗忘、情绪等功能调控中发挥重要作用。文中对目前 AD 患者和大/小鼠中 AHN 改变的相关研究进行了总结和分析,指出尽管在 AD 前中期海马神经发生可能呈现数量上的短暂增多,但在中后期 AHN 整体呈现为减少。虽然内源性 AHN 在数量、范围和新生神经元类型等方面具有较大局限性,促进 AHN 对于 AD 的预防和治疗仍可能具有一定意义。同时, AHN 也可以作为一个简单易得、稳定且最接近 AD 患者大脑实际情况的模型,用以研究和测试其他的 AD 促神经再生治疗方法。

此外,本文还回顾了通过细胞移植以及诱导胶质细胞重编程两种手段诱导 AD 脑内神经再生相关研究进展,分析了其在补偿神经元丢失和重塑退变神经网络以治疗阿尔茨海默病存在广阔前景,以及在诱导神经新生效率、特异性及安全性等方面尚存在的较多问题和可能的研究方向。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊 (*Animal Models and Experimental Medicine*, 2022, 5(1): 3–14. <https://doi.org/10.1002/ame2.12212>)。