

卡介菌-多糖核酸对哮喘小鼠淋巴细胞 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞的影响



扫码阅读电子版

姜华¹ 赖克方² 南岩东¹ 金发光¹

¹空军军医大学唐都医院呼吸与危重症医学科, 西安 710038; ²广州医科大学第一附属医院 广州呼吸健康研究院 510120

通信作者: 赖克方, Email: klai@163.com

【摘要】 目的 探讨卡介菌多糖核酸 (BCG-PSN) 对哮喘小鼠淋巴细胞 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞 (CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞) 数量及功能的影响。方法 选择 Balb/c 小鼠, 以卵白蛋白致敏激发建立小鼠哮喘模型, 分为对照组、哮喘组、BCG-PSN 干预组。BCG-PSN 剂量为 20 μg/只, 体积为 60 μl, 在致敏前 7 d 腹腔注射干预, 对照组同时给予相同剂量的生理盐水作对照, 末次激发后 48 h 对小鼠进行有创肺功能检测, 以乙酰甲胆碱各浓度激发时肺阻力 (R_L) 表示。并收集支气管肺泡灌洗液 (BALF), 涂片后 HE 染色, 计数其中的嗜酸粒细胞 (EOS), 取各组小鼠脾脏淋巴细胞, 体外培养 72 h 后流式细胞仪检测 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞/CD4⁺ T 细胞, Real-time PCR 检测脾脏淋巴细胞 foxp3 及 CTLA-4 基因的表达量, 酶联免疫吸附试验法检测脾脏淋巴细胞上清液中白细胞介素-10 (IL-10)、转化生长因子 β (TGF-β) 的含量。结果 (1) BCG-PSN 干预可明显降低哮喘小鼠的气道反应性和气道炎症。(2) 哮喘组 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞/CD4⁺ T 细胞比例 (3.71 ± 2.20)% 明显低于正常组 (6.44 ± 1.16)% (P < 0.01), BCG-PSN 组 (6.75 ± 1.63)% 与哮喘组相比差异有统计学意义 (P < 0.01)。(3) 哮喘组小鼠脾脏淋巴细胞 foxp3 mRNA、CTLA-4 mRNA 的表达量明显低于正常组, BCG-PSN 干预可显著提高 foxp3 mRNA、CTLA-4 mRNA 的表达。(4) 哮喘小鼠脾脏淋巴细胞上清中 IL-10、TGF-β 的含量明显少于正常组。BCG-PSN 组 IL-10 含量为 (210.32 ± 88.23) ng/L, 显著高于哮喘组 (114.41 ± 73.58) ng/L (P < 0.05)。BCG-PSN 组 TGF-β 含量为 (487.66 ± 32.57) ng/L, 显著高于哮喘组 (97.76 ± 23.58) ng/L (P < 0.01)。结论 BCG-PSN 可增加 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞数量及功能, 具体机制可能通过促进 IL-10、TGF-β 等抑制性细胞因子的分泌, 及 CTLA-4 介导的细胞-细胞接触抑制机制诱导免疫耐受, 从而降低哮喘小鼠的气道反应性和气道炎症。

【关键词】 卡介菌多糖核酸; 哮喘; 支气管; 调节性 T 细胞

基金项目: 空军军医大学唐都医院科技创新发展基金 (2016JCYJ015)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2019.12.001

Effects of bacillus calmette-guerin polysaccharide nucleotide on CD4⁺ CD25⁺ Treg in lymph of asthmatic mouse model

Jiang Hua¹, Lai Kefang², Nan Yandong¹, Jin Faguang¹

¹Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, Tangdu Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an 710038, China; ²The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou Institute of Respiratory Health, Guangzhou 510120, China

Corresponding author: Lai Kefang, Email: klai@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of bacillus calmette-guerin polysaccharide nucleotide (BCG-PSN) on quantity and function of CD4⁺ CD25⁺ Treg in lymph of asthmatic mouse model. **Methods** Balb/c mice were sensitized by ovalbumin to establish the asthmatic mouse model. The mice of control group received saline at every time point. A pretreatment of 20 μg/60 μl of BCG-PSN by intraperitoneal injection were done at 7 days before the first sensitization. Bronchial hyper responsiveness (BHR), eosinophil (EOS)% in broncho alveolar lavage fluid (BALF) were

examined 48 hours after the final challenge. Proportion of spleen CD4⁺CD25⁺Treg cells/CD4⁺ cells was measured by flow cytometry. Foxp3 and CTLA-4 expression in spleen lymphocytes was analyzed with RT and real-time PCR. IL-10, TGF- β levels in the cultures spleen lymphocytes supernatant were examined with ELISA. **Results** (1)BCG-PSN intervention significantly decreased airway inflammation and airway hyperresponsiveness in asthmatic mice. (2) The percentage of CD4⁺CD25⁺Treg cells/CD4⁺ (3.71 \pm 2.20)% in the asthma group was significantly lower than that in the normal group (6.44 \pm 1.16)% ($P < 0.01$), there was significant difference between the BCG-PSN group (6.75 \pm 1.63)% and the asthma group. (3)The expression of foxp3 mRNA and CTLA-4 mRNA in spleen lymphocytes of asthmatic mice was significantly lower than that in normal mice. (4)The intervention of BCG-PSN significantly increased the expression of CTLA-4 mRNA and foxp3 mRNA. The levels of IL-10 and TGF- β in the spleen lymphocyte supernatant of asthmatic mice were significantly less than those in normal mice. The level of IL-10 in BCG-PSN group was (210.32 \pm 88.23) ng/L which was significantly higher than that in asthma group (114.41 \pm 73.58) ng/L, and the level of TGF- β in BCG-PSN group (487.66 \pm 32.57) ng/L was significantly higher than that in the asthma group (97.76 \pm 23.58) ng/L ($P < 0.01$). **Conclusions**

BCG-PSN can increase immune tolerance on asthmatic mice by promoted the quantity and function of CD4⁺CD25⁺Treg. The specific mechanism may be that BCG-PSN promote the cell-cell contact inhibition mediated by CTLA-4 and stimulated the secretion of inhibited cytokines IL-10, TGF- β .

【Key words】 Bacillus calmette-guerin polysaccharide nucleotide; Asthma, bronchial; Treg cell

Fund program: Science and Technology Innovation Development Fund of Tangdu Hospital of Air Force Military Medical University (2016JCYJ015)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2019.12.001

卡介菌多糖核酸 (bacillus calmette-guerin polysaccharide nucleotide, BCG-PSN) 是 BCG 经过灭活后制成的一种免疫制剂, 具有多种免疫活性^[1-2], 通过动物模型及临床观察均证实其对支气管哮喘 (哮喘) 有一定的防治作用^[3-5], 但其具体作用机制尚不清楚。CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞 (CD4⁺CD25⁺Treg) 具有免疫无能性和免疫抑制性的一类细胞, 尤其是 CD4⁺CD25⁺foxp3⁺T 细胞与哮喘诱导免疫耐受密切相关^[6], 本研究通过观察 BCG-PSN 对哮喘小鼠脾脏淋巴细胞中 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞数量及功能的影响, 为其防治哮喘提供详实的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 Balb/c 小鼠 (购自广东省实验动物中心) 5~6 周龄, 体质量 16~18 g, 雌性。饲养在广州呼吸疾病研究所 SPF 级动物房。卵清白蛋白 (ovalbumin, OVA) 为美国 Sigma 公司产品, 佐剂 Al (OH)₃ 为美国 Sigma 公司产品。BCG-PSN 购自医院药房 (国药准字 92S020100, 中国湖南斯奇生物制药有限公司生产)。小鼠有创肺功能仪为美国 Buxco 公司产品。

1.2 主要试剂 RPMI 1640 培养基、胎牛血清 FCS 均购自 GIBCO 公司, EZ-Sep™ Mouse 1 \times 淋巴细胞分离液购自深圳达科为公公司, FITC 标记的

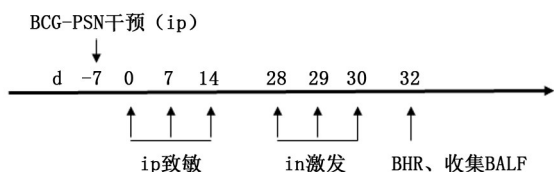
抗 CD4 抗体、PE 标记的抗 CD25 抗体、PE-cy5 标记的抗 foxp3 抗体、PE 标记的抗 CTLA-4 抗体及同型对照均购自美国 eBioscience 公司, IL-10、转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自德国 Bender 公司, Trizol 抽提试剂购自美国 Invitrogen 公司, real-time 试剂盒 (DDR037, DDR041) 购自日本 Takara 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 动物致敏、激发 研究分为对照组、哮喘组和 BCG-PSN 干预组。每组各 10 只小鼠, 以 OVA 首次致敏为第 0 天, 在第 0、7、14 天时腹腔注射 OVA (0.01% OVA, 0.2 ml/只) 致敏, 第 28、29、30 天给予 OVA (0.4% OVA, 50 μ l/只) 滴鼻激发, 1 次/d。正常组在每次给药时间点给予相应剂量的生理盐水。BCG-PSN 干预剂量为 20 μ g/只, 体积为 60 μ l, 首次致敏前 7 d 腹腔注射干预, 动物造模干预流程图 1。

1.3.2 气道反应性检测 气道反应性检测各组在末次激发后 48 h, 用美国 Buxco 公司的有创气道阻力与肺顺应性检测系统检测小鼠的肺阻力 (lung resistance, R_L), 测定 10 μ l 倍增浓度的乙酰甲胆碱 (methacholine, Mch) 雾化激发后 R_L 的变化,

激发浓度由低到高,依次为 0、3.12、6.25、12.50、25.00和50.00 g/L,记录各浓度级 Mch 激发下的 R_L 平均值。当前激发浓度肺阻力/生理盐水时肺阻力的比值 (R_L/NS) 作为小鼠气道反应性的评价指标。Han 等^[7]报道,本研究评价气道反应性包括以下两个方面:(1)与哮喘组相比可以显著降低气道反应性 ($P < 0.05$) 的激发浓度;(2)气道反应性升高为基值 2 倍时的 Mch 激发浓度,值越小,气道敏感性越高。



注:BCG-PSN 为卡介菌多糖核酸;BHR 为支气管高反应性;BALF 为支气管肺泡灌洗液;ip 为腹腔注射 20 μ g 卵清白蛋白 (0.01%卵清白蛋白,0.2 ml/只)致敏;in 为滴鼻 200 μ g 卵清白蛋白激发

图1 研究中动物致敏、激发、BCG-PSN 干预流程

1.3.3 BALF 中 EOS% 分析 在实验流程第 32 天,小鼠行气道反应性检测后麻醉,仰卧位,行气管插管,以 0.8 ml PBS 灌洗 3 次,回收率在 80% 以上。4 $^{\circ}$ C, 1 500 \times g 离心 10 min,沉淀涂片并行 HE 染色,连续计数 200 个细胞并计其中 EOS 的个数,计算 EOS 百分比。

1.3.4 小鼠脾淋巴细胞悬液的制备 小鼠无菌取脾,在 60 mm 培养皿中加入 3 ml EZ-SepTM Mouse 1 \times 淋巴细胞分离液,按照说明书制备脾脏淋巴细胞悬液,加入 RPMI1640 培养液,台盼蓝染色证实活细胞 $> 95\%$,计数约为 2×10^7 /ml, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 孵箱孵育 72 h。

1.3.5 ELISA 检测脾淋巴细胞悬液 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞/CD4⁺T 细胞比例 取上述悬液 200 μ l (细胞总数约 1×10^6 个),加入 CD4-FITC 及 CD25-PE 同型对照及抗体,室温,避光孵育 30 min,加入 2 ml 1 \times PBS,重悬混匀,2 000 \times g 离心 10 min,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,洗涤后缓冲液重悬细胞后 ELISA 上机检测。

1.3.6 Realtime-PCR 检测 脾脏淋巴细胞中 foxp3 mRNA 及 CTLA-4 mRNA 的表达 取前述所得脾淋巴细胞,按照 Trizol 说明书提取 RNA,稀释 50 倍后经紫外分光光度计测 260 nm OD 值,计算 RNA 浓度,按照说明书采用一步法进行逆转录反应,获得 cDNA,以此为模板进行 real-time-PCR 反应,各个反应物引物:按参考文献 [8-9],

foxp3 上游引物:5'-CCCAGGAAAGACAGC-AACCTT-3',下游引物:5'-TTCTCACAAACCA-GGCCACTTG-3';CTLA-4 上游引物:5'-GGG-CTGGGTCTTTACTCATTTT-3',下游引物:5'-CTTCCTGTGGCATTAACTTTGTGT-3'。反应体系:以 94 $^{\circ}$ C 10 min,94 $^{\circ}$ C 15 s,56 $^{\circ}$ C 20 s,72 $^{\circ}$ C 15 s 的方式循环 45 次,最后 55 $^{\circ}$ C 记录熔解曲线,采用 2^{- Δ C_t} 方法计算 foxp3、CTLA-4 基因的表达水平。

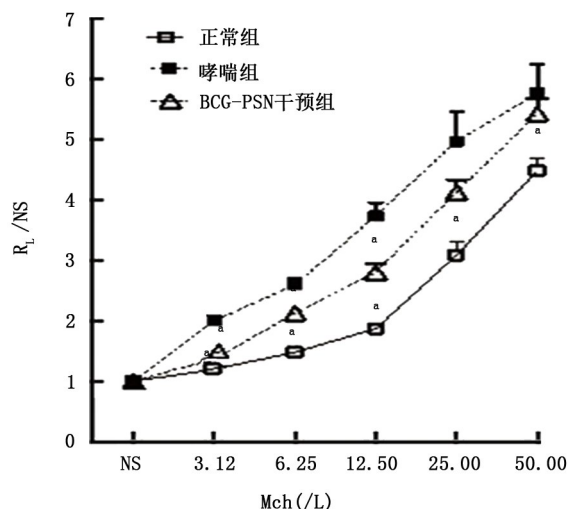
1.3.7 ELISA 检测脾淋巴细胞上清液中 IL-10 和 TGF- β 的含量 具体操作见相应说明书。

1.3.8 统计学分析 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用 SPSS 13.0 进行单因素方差分析,方差齐用最小显著差异法 (LSD),当方差不齐时用 Tamhane's T2 法或采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 气道反应性

2.1.1 R_L/NS 哮喘组在 Mch 各个激发浓度 3.12、6.25、12.50、25.00 和 50.00 g/L R_L/NS 均明显高于正常组,说明该模型小鼠具备气道高反应性,BCG-PSN 干预组在 Mch 激发浓度为 3.12、6.25、12.50 g/L 时可显著降低 R_L/NS ,见图 2、表 1。



注: R_L/NS 为当前激发浓度肺阻力/生理盐水时肺阻力的比值;Mch 为乙酰甲胆碱;BCG-PSN 为卡介菌多糖核酸;与哮喘组比较,* $P < 0.05$

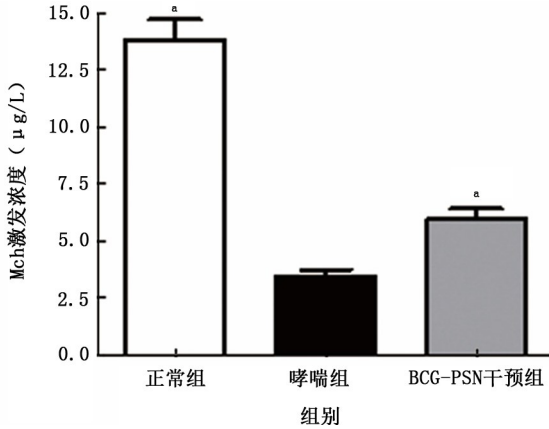
图2 BCG-PSN 腹腔注射干预对哮喘小鼠 R_L/NS 的影响

2.1.2 气道反应性升高为基值 2 倍时的 Mch 激发浓度 正常组明显高于哮喘组,说明造模小鼠气道敏感性高,BCG-PSN 干预组 Mch 激发浓度为 (12.61 ± 5.33) g/L,与哮喘组 (7.73 ± 2.69) g/L 相比,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),见图 3。

表1 BCG-PSN腹腔注射干预对哮喘小鼠 R_L/NS 的影响 (g/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Mch 激发浓度				
		3. 12	6. 25	12. 50	25. 00	50. 00
正常组	10	119.34±8.45 ^a	148.10±17.56 ^a	186.54±21.96 ^a	309.06±72.26 ^a	447.84±70.21 ^a
哮喘组	10	199.76±29.13	259.10±35.91	373.24±71.56	497.24±153.68	576.24±153.57
BCG-PSN 干预组	10	136.44±12.73 ^a	212.59±26.56 ^a	280.26±45.11 ^a	411.94±68.56	542.89±81.30

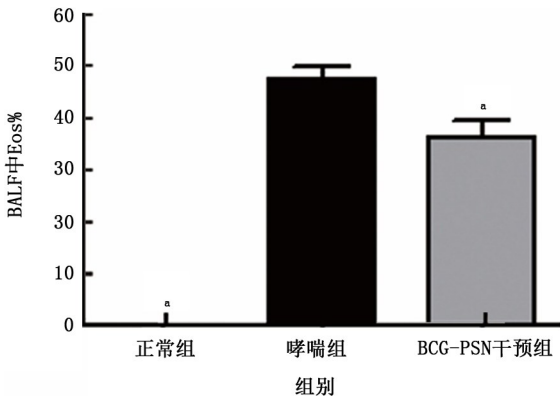
注： R_L/NS 为当前激发浓度肺阻力与生理盐水激发时肺阻力的比值；Mch为乙酰甲胆碱；BCG-PSN为卡介菌多糖核酸；与哮喘组比较，^a $P < 0.05$



注：BCG-PSN为卡介菌多糖核酸；与哮喘组比较，^a $P < 0.01$

图3 各组气道反应性升高为基值2倍时的Mch激发浓度

2.1.3 气道炎症 哮喘小鼠BALF中EOS (47.61±6.91)%，明显高于正常组 (0.19±0.03)%，说明造模小鼠具备高EOS为特征的气道炎症。BCG-PSN干预组BALF中EOS占 (36.28±10.01)%，与哮喘组相比，差异有统计学意义 ($P < 0.01$)，见图4。

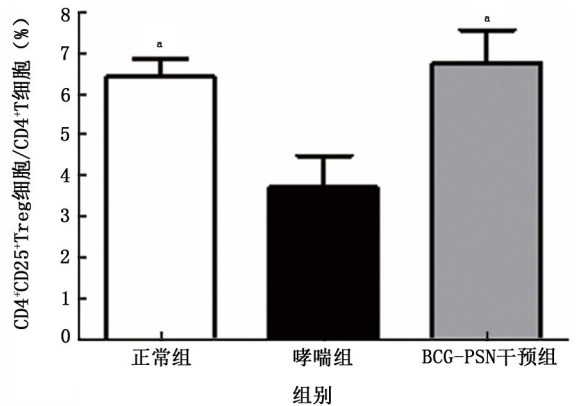


注：EOS%为嗜酸粒细胞占细胞总数的百分比；BALF为支气管肺泡灌洗液；BCG-PSN为卡介菌多糖核酸；与哮喘组比较，^a $P < 0.01$

图4 BCG-PSN对哮喘小鼠BALF中EOS%的影响

2.1.4 BCG-PSN对哮喘小鼠脾脏淋巴细胞CD4⁺CD25⁺Treg细胞数量的影响 哮喘组CD4⁺CD25⁺Treg细胞/CD4⁺T细胞比例 (3.71 ±

2.19)%明显低于正常组 (6.44±1.16)% ($P < 0.01$)，BCG-PSN干预组为 (6.75±1.63)%与哮喘组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$)，见图5。



注：BCG-PSN为卡介菌多糖核酸；与哮喘组比较，^a $P < 0.01$

图5 BCG-PSN对哮喘小鼠脾脏淋巴细胞CD4⁺CD25⁺Treg细胞/CD4⁺T细胞比例的影响

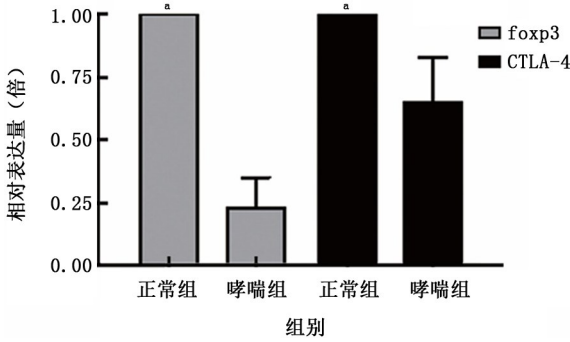
2.1.5 BCG-PSN对哮喘小鼠脾脏淋巴细胞foxp3 mRNA及CTLA mRNA的影响

2.1.5.1 哮喘组foxp3 mRNA及CTLA mRNA的相对表达量 哮喘组小鼠脾脏淋巴细胞foxp3 mRNA的表达量仅为正常组的 (0.23±0.21)倍，而CTLA-4mRNA的表达量为正常组 (0.65±0.31)倍，提示哮喘组小鼠脾脏淋巴细胞foxp3 mRNA及CTLA mRNA表达明显降低，见图6。

2.1.5.2 BCG-PSN干预对哮喘小鼠脾脏淋巴细胞foxp3 mRNA、CTLA-4 mRNA的影响 BCG-PSN干预组小鼠脾脏淋巴细胞foxp3 mRNA表达量是哮喘组的 (1.82±0.76)倍，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，CTLA-4 mRNA表达量是哮喘组的 (1.66±0.57)倍，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，见图7。

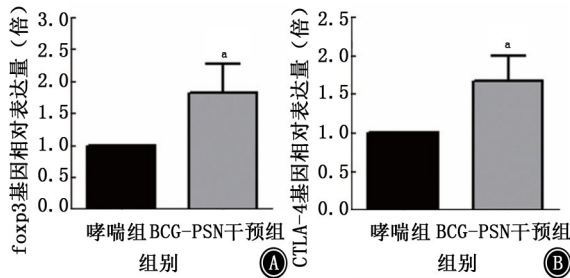
2.1.6 BCG-PSN干预对哮喘小鼠脾脏淋巴细胞上清液IL-10、TGF-β的影响 哮喘小鼠脾脏淋巴细胞上清中IL-10、TGF-β的含量明显少于正常组。BCG-PSN组IL-10含量为 (210.32±88.23) ng/L，显著高于哮喘组 (114.41±73.58) ng/L ($P <$

0.05)。BCG-PSN 组 TGF-β 含量为 (487.66 ± 32.57) ng/L, 显著高于哮喘组 (97.76 ± 23.58) ng/L (P < 0.01), 见表 2。



注: BCG-PSN 为卡介菌多糖核酸; 与哮喘组比较, ^aP < 0.01

图 6 哮喘组与正常组小鼠脾脏淋巴细胞 Foxp3 mRNA 及 CTLA-4 mRNA 的表达



注: BCG-PSN 为卡介菌多糖核酸; 与哮喘组比较, ^aP < 0.05

图 7 BCG-PSN 干预对哮喘小鼠脾脏淋巴细胞 foxp3 mRNA (A)、CTLA-4 mRNA (B) 的影响

表 2 BCG-PSN 干预对哮喘小鼠 IL-10 及 TGF-β 的影响 (ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IL-10	TGF-β
正常组	10	218.91 ± 53.91 ^a	549.66 ± 261.41 ^b
哮喘组	10	114.41 ± 73.58	97.76 ± 23.58
BCG-PSN 干预组	10	210.32 ± 88.23 ^a	487.66 ± 32.57 ^b

注: BCG-PSN 为卡介菌多糖核酸; TGF-β 为转化生长因子-β; 与哮喘组比较, ^aP < 0.05, ^bP < 0.01

3 讨论

哮喘是由多种细胞及细胞组分参与的气道慢性炎症性疾病, 以气道高反应性和气道炎症为重要特征, 可自然缓解或经治疗后缓解, 发病率呈增高趋势^[10-12]。2006 年亚太哮喘见解与现实第 2 阶段调查结果显示, 亚太地区哮喘患者只有 2.5% 达到哮喘控制^[13], CD4⁺CD25⁺Treg 细胞是一种具有免疫抑制及免疫调节作用的细胞, 具有独特的作用方式和功能特征, 有可能在哮喘等变态反应性疾病和一些自身免疫性疾病的发病中起重要作用^[14-15], 大

量动物试验证实 BCG^[16-19] 通过 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞防治哮喘, 但完整的 BCG 因其成分复杂, 且副作用大, 无法直接用于临床, BCG-PSN 是 BCG 经热酚法去除蛋白后提取 BCG-PSN, 配以灭菌生理盐水制成的以多糖成分为主的一种非特异免疫调节剂, 多个研究^[2-5] 证实其对哮喘有保护作用, 但具体作用机制仍未明确。

通过研究证实哮喘小鼠 CD4⁺CD25⁺T 细胞数量明显低于正常组, 说明哮喘小鼠体内的 CD4⁺CD25⁺Treg 的确存在数量上的缺陷, Fontenot 等^[20] 发现, 高表达 foxp3 的转基因小鼠 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞数量明显增加, foxp3 敲除小鼠活化的 CD4⁺细胞增多, 却缺乏独立的 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞, 因而导致自身免疫性疾病的发生, 此后多个研究^[21-22] 表明 foxp3 是调控 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞发育及启动抑制功能的关键因子。通过 real-time-PCR 测定了哮喘小鼠脾脏淋巴细胞中 foxp3 基因的表达水平, 发现该基因的表达仅为正常组的 23% 左右, 提示哮喘小鼠体内还存在着 CD4⁺CD25⁺Treg 的功能缺陷。BCG-PSN 干预可明显提高 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞/CD4⁺T 细胞比例, 上调哮喘小鼠 foxp3 mRNA 的表达水平。因此说明 BCG-PSN 干预显著增加 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞数量和功能。

CD4⁺CD25⁺Treg 细胞可通过 CTLA-4 介导的细胞接触依赖机制发挥其免疫抑制功能, 从而阻止哮喘的发生。CTLA-4 是 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞上膜分子, 是 T 细胞活化所需的协同刺激分子 CD28 的同源异构体, CTLA-4 对效应性 T 细胞的 B7-1 分子的亲和力比 CD28 更强, 抑制效应性 T 细胞的增殖和活化, 从而调节哮喘等疾病的免疫失衡^[23-24]。说明 CTLA-4 对于诱导 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞的抑制功能是十分重要的; 研究结果显示哮喘组 CTLA-4mRNA 的水平为正常组的 65% 左右, 说明哮喘小鼠存在 CTLA-4mRNA 低表达, 而 BCG-PSN 干预组的 CTLA-4mRNA 表达水平与哮喘组相比明显增高, 说明 BCG-PSN 可上调 CTLA-4mRNA 的表达, 并通过 CTLA-4 介导的细胞-细胞接触抑制从而对哮喘小鼠产生保护作用。

此外 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞也可通过分泌细胞因子 (IL-10、TGF-β) 而介导抑制效应^[25]。研究显示哮喘组中 IL-10 及 TGF-β 的分泌水平明显低于正常组, BCG-PSN 干预组的 IL-10 及 TGF-β 的分泌水平明显高于哮喘组, 说明 BCG-PSN 可能通过分泌抑制性细胞因此 IL-10 及 TGF-β 从而产

生对哮喘小鼠的保护作用。同时,除了 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞外,机体内还存在着一类能分泌 IL-10 的 Tr1 (抑制由 Th1 介导的自身免疫反应的 T 细胞)^[26] 和能分泌 TGF-β 的 Th3^[27]。因此,本实验 IL-10 和 TGF-β 可能是多来源的,提示可能 BCG-PSN 还可通过其他机制如树突状细胞、Tr1、Th3 等发挥免疫调节作用。

综上所述,BCG-PSN 干预可增加哮喘小鼠 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞数量及功能,具体可能通过促进 IL-10、TGF-β 等抑制性细胞因子的分泌及 CTLA-4 介导的细胞-细胞接触抑制机制诱导免疫耐受,从而降低哮喘小鼠的气道反应性和气道炎症。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Wang HL, Ma N. Effect of BCG-PSN adjuvant therapy on Th1/Th2 immune response in bronchial asthma children[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2016, 9(2): 2555-2560.
- [2] 罗光燕,蓝楠,王孝芸,等.卡介菌核酸多糖注射液对哮喘小鼠气道炎症和肺部抗菌肽表达影响与机制研究[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2013, 7(21): 9633-9637. DOI: 10. 3877/ cma. j. issn. 1674-0785. 2013. 21. 055.
- [3] 姜华,赖克方,沈璐,等.卡介菌多糖核酸(BCG-PSN)对哮喘小鼠气道炎症和气道反应性的影响[J]. *国际呼吸杂志*, 2010, 30(7): 409-413. DOI: 10. 3760/ cma. j. issn. 1673-436X. 2010. 07. 008.
- [4] 褚明慧.孟鲁司特钠联合卡介菌多糖核酸治疗小儿变异性哮喘的效果观察[J]. *中国当代医药*, 2016, 23(5): 23-25.
- [5] Li J, Luo DF, Li SY, et al. Efficacy of intramuscular BCG polysaccharide nucleotide on mild to moderate bronchial asthma accompanied with allergic rhinitis: a randomized, double blind, placebo-controlled study [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2005, 118(19): 13-21.
- [6] Kinoshita T, Baatjes A, Smith SG, et al. Natural regulatory T cells in isolated early responders compared with dual responders with allergic asthma[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2014, 133(3): 696-703. DOI: 10. 1016/ j. jaci. 2013. 08. 025.
- [7] Han ER, Choi IS, Choi HG, et al. Therapeutic effects of mycobacterial secretory proteins against established asthma in BALB/c mice[J]. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2012, 4(4): 214-221. DOI: 10. 4168/ aair. 2012. 4. 4. 214.
- [8] Sharma S, Yang SC, Zhu L, et al. Tumor cyclooxygenase-2/ prostaglandin E2-dependent promotion of FOXP3 expression and CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cell activities in lung cancer [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(12): 5211-5220.
- [9] Kelchtermans H, De Klerck B, Mitera T, et al. Defective CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell functioning in collagen-induced arthritis: an important factor in pathogenesis, counter-regulated by endogenous IFN-gamma[J]. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7(2): R402-R415. DOI: 10. 1186/ ar1500.
- [10] Akinbami LJ, Moorman JE, Liu X. Asthma prevalence, health care use, and mortality: United States [J]. *Natl Health Stat Report*, 2011(32): 1-14.
- [11] 王文雅,林江涛,苏南,等.2010-2011年北京地区14岁及以上人群支气管哮喘患病率调查[J]. *中华医学杂志*, 2013, 93(18): 1383-1387. DOI: 10. 3760/ cma. j. issn. 0376-2491. 2013. 18. 006.
- [12] 苏楠,林江涛,刘国梁,等.我国8省市支气管哮喘患者控制水平的流行病学调查[J]. *中华内科杂志*, 2014, 53(8): 601-606. DOI: 10. 3760/ cma. j. issn. 0578-1426. 2014. 08. 006.
- [13] Wong GW, Kwon N, Hong JG, et al. Pediatric asthma control in Asia: phase 2 of the Asthma Insights and Reality in Asia-Pacific (AIRIAP2) survey [J]. *Allergy*, 2013, 68(4): 524-530. DOI: 10. 1111/ all. 12117.
- [14] Shi YH, Shi GC, Wan HY, et al. Coexistence of Th1/Th2 and Th17/Treg imbalances in patient with allergic asthma [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2011, 124(13): 1951-1956.
- [15] Chauhan A, Singh M, Agarwal A, et al. Correlation of TSLP, IL-33, and CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ T regulatory (Treg) in pediatric asthma [J]. *J Asthma*, 2015, 52(9): 868-872. DOI: 10. 3109/ 02770903. 2015. 1026441.
- [16] Gouveia ACC, Braga FG, Mota M, et al. Enhanced expression of PD-L1 and IFN-γ on dendritic cells is associated with BCG-induced Th2 inhibition [J]. *Cytokine*, 2017, 99: 163-172. DOI: 10. 1016/ j. cyto. 2017. 09. 005.
- [17] Spitz C, Winkels H, Burger C, et al. Regulatory T cells in atherosclerosis: critical immune regulatory function and therapeutic potential [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(5): 901-922. DOI: 10. 1007/ s00018-015-2080-2.
- [18] Gong P, Li Y, Tan YP, et al. Pretreatment with inactivated bacillus calmette-guerin increases CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell function and decreases functional and structural effects of asthma induction in a rat asthma model [J]. *Artif Organs*, 2016, 40(4): 360-367. DOI: 10. 1111/ aor. 12566.
- [19] Kim YJ, Kim HJ, Kang MJ, et al. Bacillus Calmette-Guérin Suppresses Asthmatic Responses via CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells and Dendritic Cells [J]. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2014, 6(3): 201-207. DOI: 10. 4168/ aair. 2014. 6. 3. 201.
- [20] Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells [J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(4): 330-336. DOI: 10. 1038/ ni904.
- [21] Lambrecht BN, Hammad H. Asthma: the importance of dysregulated barrier immunity [J]. *Eur J Immunol*, 2013, 43(12): 3125-3137. DOI: 10. 1002/ eji. 201343730.
- [22] Lu CH, Wu CJ, Chan CC, et al. DNA Methyltransferase Inhibitor Promotes Human CD4⁺ CD25⁺ hFOXP3⁺

- Regulatory T Lymphocyte Induction under Suboptimal TCR Stimulation[J]. Front Immunol, 2016, 7:488.
- [23] Hou TZ, Qureshi OS, Wang CJ, et al. A transendocytosis model of CTLA-4 function predicts its suppressive behavior on regulatory T cells [J]. J Immunol, 2015, 194 (5): 2148-2159. DOI:10.4049/jimmunol.1401876.
- [24] Sage PT, Paterson AM, Lovitch SB, et al. The coinhibitory receptor CTLA-4 controls B cell responses by modulating T follicular helper, T follicular regulatory, and T regulatory cells [J]. Immunity, 2014, 41 (6): 1026-1039. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.12.005.
- [25] Palomares O, Martin-Fontecha M, Lauener R, et al. Regulatory T cells and immune regulation of allergic diseases: roles of IL-10 and TGF-beta [J]. Genes Immun, 2014, 15(8):511-520. DOI:10.1038/gene.2014.45.
- [26] Roncarolo MG, Gregori S, Bacchetta R, et al. Tr1 cells and the counter-regulation of immunity: natural mechanisms and therapeutic applications [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2014, 380:39-68. DOI:10.1007/978-3-662-43492-5_3.
- [27] Weiner HL. Oral tolerance: immune mechanisms and the Generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells [J]. Microbes Infect, 2001, 3(11):947-954.

(收稿日期:2018-06-17)

· 简讯 ·

实用无创机械通气技术进修班招生简介

北京朝阳医院呼吸与危重症医学科(西区)

无创正压机械通气的临床应用日趋广泛,从早期用于治疗阻塞性睡眠呼吸暂停综合征(OSAS)逐步扩展至治疗多种急性呼吸衰竭,在慢性呼吸衰竭的机械通气治疗中无创通气已居于主导地位。目前,国内多数医院在呼吸科、ICU、急诊科、心脏科等开展了无创通气治疗,取得一定疗效,但长期以来关于无创通气的一些基本问题仍困扰着临床,如:何种呼吸机可用于无创通气、为何上机后患者的血 CO₂ 反而更高、患者无法耐受无创通气怎么办……,成为制约无创通气进一步规范、普及应用的重要因素。

北京朝阳医院呼吸与危重症医学科-北京呼吸疾病研究所在国内较早开展无创通气,是国内无创通气多中心研究的牵头单位(中华结核和呼吸杂志,2005,28:680-684;中华结核和呼吸杂志,2006,29:13-17),对无创通气的教学具有丰富经验。现以北京朝阳医院呼吸与危重症医学科(西区)为教学基地,举办无创机械通气专项进修班,时间安排为4个月的短期进修,教学安排为前半程在ICU进行理论学习和临床见习、后半程在呼吸病房由带教老师指导完整管理无创机械通气患者,通过理论与实践相结合的强化培训使进修生在短期内初步规范掌握无创通气的临床应用。

招生范围:临床工作中需开展无创机械通气,具有一定呼吸衰竭治疗经验的医生。

招生时间:每年招收3期,每期4个月,分别于6月、10月、2月开学。

报名方式:(1)在朝阳医院网站(<http://www.bjcyh.com.cn/>)首页左下方“最新下载”或在朝阳呼吸支持技术学院网站(<http://www.cycrst.com/index.asp>)“培训专区”下载《进修申请表》。(2)填写《进修申请表》,封面进修科目栏填写“呼吸与危重症医学科(西区)”,第三页进修科目要求栏填写“无创机械通气的临床应用”。(3)将《进修申请表》邮寄至:北京市石景山区京原路5号北京朝阳医院(西区)ICU朱剑收100043,请在信封上注明“无创通气进修”。我们会及时与您联系,我们的联系电话010-51718872。