

维生素 D 通过调控 Treg/Th17 细胞功能失衡改善肺炎链球菌诱导的慢性鼻-鼻窦炎模型的作用研究[△]

黄小荣^{1*}, 陈欣欣², 谭 晖¹, 陈伦伞^{3#}, 艾力根·阿不都热依木¹(1. 新疆维吾尔自治区人民医院耳鼻喉诊疗中心, 乌鲁木齐 830001; 2. 石河子大学医学院第一附属医院保健科, 新疆 石河子 832008; 3. 新疆维吾尔自治区人民医院医务部, 乌鲁木齐 830001)



中图分类号 R977.2⁺4 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2023)01-0009-07
DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2023.01.002

摘要 目的:探究外源性维生素 D(VitD)对肺炎链球菌诱导的慢性鼻-鼻窦炎(CRS)小鼠中调节性 T 细胞/辅助性 T 细胞 17(Treg/Th17)功能失衡的作用。方法:将 40 只雄性 C57BL/6 小鼠按随机数字表法分为对照组(Control 组)、模型组(Model 组)、维生素 D 组(VitD 组)和克拉霉素组(CLR 组),每组 10 只。除 Control 组外,其余各组小鼠均在鼻窦腔填充含肺炎链球菌菌液海绵以复制 CRS 模型,VitD 组和 CLR 组小鼠分别以 VitD₃ 溶液、克拉霉素溶液进行灌胃;21 d 后,采用酶联免疫吸附试验检测小鼠血清白细胞介素(IL)6、IL-10、IL-17、IL-23 及转化生长因子 β(TGF-β)水平,苏木精-伊红染色和过碘酸雪夫染色观察小鼠鼻窦黏膜病理变化,实时荧光定量聚合酶链反应和蛋白质印迹法检测小鼠鼻窦黏膜内维甲酸相关孤儿受体 γt(RORγt)和 Forkhead 家族转录因子 3(Foxp3)的 mRNA 及蛋白表达水平,免疫组化染色检测小鼠鼻窦黏膜内 IL-17 和 Foxp3 阳性表达,流式细胞术分析外周血中 CD4⁺IL-17A⁺和 CD25⁺Foxp3⁺细胞比例分布。结果:与 Control 组比较,Model 组小鼠血清中 IL-6、IL-17 及 IL-23 水平升高,IL-10、TGF-β 水平降低($P < 0.05$);鼻窦黏膜内发生明显病变,有大量炎症细胞浸润,杯状细胞数目增加($P < 0.05$);RORγt mRNA 和蛋白相对表达量上调,Foxp3 mRNA 和蛋白相对表达量均下调($P < 0.05$);IL-17 阳性表达率升高,Foxp3 阳性表达率降低($P < 0.05$);外周血中 CD4⁺IL-17A⁺细胞比例升高,CD25⁺Foxp3⁺细胞比例降低($P < 0.05$),差异均有统计学意义。与 Model 组比较,VitD 组和 CLR 组小鼠血清中 IL-6、IL-17 和 IL-23 水平降低,IL-10、TGF-β 水平升高($P < 0.05$);鼻窦黏膜内炎症细胞浸润减轻,杯状细胞数目减少($P < 0.05$);RORγt mRNA 和蛋白相对表达量均下调,Foxp3 mRNA 和蛋白相对表达量均上调($P < 0.05$);IL-17 阳性表达率降低,Foxp3 阳性表达率升高($P < 0.05$);外周血中 CD4⁺IL-17A⁺细胞比例降低,CD25⁺Foxp3⁺细胞比例升高($P < 0.05$),差异均有统计学意义。结论:VitD 能够改善 CRS 模型小鼠鼻窦黏膜的病理表现,减轻炎症细胞浸润,其机制可能与调控 Treg/Th17 细胞功能失衡相关。

关键词 慢性鼻-鼻窦炎;维生素 D;炎症;T 辅助 17 细胞/调节性 T 细胞功能失衡

Role of Vitamin D in Improving Chronic Rhinosinusitis Model Induced by *Streptococcus Pneumoniae* by Regulating the Imbalance of Treg/Th17 Cell Function[△]

HUANG Xiaorong¹, CHEN Xinxin², TAN Hui¹, CHEN Lunjian³, Ailigan · ABUDUREYIMU¹
(1. Otolaryngology Diagnosis and Treatment Center, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830001, China; 2. Dept. of Health Care, First Affiliated Hospital, School of Medicine, Shihezi University, Xinjiang Shihezi 832008, China; 3. Dept. of Medical Affairs, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830001, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To probe into the role of vitamin D (VitD) in improving chronic rhinosinusitis (CRS) model induced by *Streptococcus pneumoniae* by regulating the imbalance of T regulatory cells/T helper 17 cells (Treg/Th17) cell function. **METHODS:** Totally 40 male C57BL/6 mice were divided into the control group (Control), model group (Model), VitD group (VitD) and clarithromycin group (CLR) according to the random table method, with 10 mice in each group. Except for the control group, the other groups were filled with sponges containing *S. pneumoniae* in the sinus cavity to replicate the CRS model. The VitD group and CLR group were administered with VitD₃ solution and clarithromycin solution by gavage respectively. After 21 d, the levels of interleukin (IL)-6, IL-10, IL-17, IL-23 and transforming growth factor-β (TGF-β) in the serum of mice were detected by enzyme linked immunosorbent assay. Hematoxylin and Eosin staining and periodic acid-schiff staining were used to observe the

△ 基金项目:国家自然科学基金地区科学基金项目(No. 81760023)

* 副主任技师。研究方向:鼻科疾病的基础研究。E-mail:1183921@163.com

通信作者:主任医师,硕士。研究方向:外科疾病基础研究。E-mail:2696754108@qq.com

pathological changes of mucous membranes of the nasal sinuses of mice, real-time quantitative polymerase chain reaction and Western blotting were used to detect the mRNA and protein expression levels of retinoic acid-related orphan receptor γ (ROR γ t) and forkhead family transcription factor 3 (Foxp3) in the mucous membranes of the nasal sinuses of mice, immunohistochemical staining was used to detect the positive expression of IL-17 and Foxp3 in the sinus mucosa of mice, and flow cytometry was used to analyze the distribution of CD4⁺IL-17A⁺ and CD25⁺Foxp3⁺ cells in peripheral blood. RESULTS: Compared with the control group, the serum levels of IL-6, IL-17 and IL-23 in the model group increased, while the levels of IL-10 and TGF- β decreased ($P < 0.05$); obvious lesions occurred in the sinus mucosa, with a large number of inflammatory cells infiltrating, the number of goblet cells increased ($P < 0.05$); the relative expression of ROR γ t mRNA and protein was up-regulated, and the relative expression of Foxp3 mRNA and protein was down-regulated ($P < 0.05$); the positive expression rate of IL-17 increased, while the positive expression rate of Foxp3 decreased ($P < 0.05$), the proportion of CD4⁺IL-17A⁺ cells in peripheral blood increased, and the proportion of CD25⁺Foxp3⁺ cells decreased ($P < 0.05$), with statistically significant differences. Compared with the model group, the serum levels of IL-6, IL-17 and IL-23 in the VitD group and CLR group decreased, while the levels of IL-10 and TGF- β increased ($P < 0.05$); the infiltration was alleviated, and the number of goblet cells decreased ($P < 0.05$); at the same time, the relative expressions of ROR γ t mRNA and protein were down-regulated, the relative expressions of Foxp3 mRNA and protein were up-regulated ($P < 0.05$), the positive expression rate of IL-17 decreased and the positive expression rate of Foxp3 increased ($P < 0.05$), the proportion of CD4⁺IL-17A⁺ cells in peripheral blood decreased and the proportion of CD25⁺Foxp3⁺ cells increased ($P < 0.05$), with statistically significant differences. CONCLUSIONS: VitD can improve the pathological manifestations of sinus mucosa in CRS model mice and reduce inflammatory cell infiltration, and its mechanism may be related to the regulation of imbalance of Treg/Th17 cell function. KEYWORDS Chronic rhinosinusitis; Vitamin D; Inflammation; Treg/Th17 cell imbalance

慢性鼻-鼻窦炎(chronic rhinosinusitis, CRS)是一种临床常见的耳鼻喉科慢性炎症性鼻病,在世界范围内普遍存在^[1]。CRS根据组织重塑特征分为两种表型,分别为伴有鼻息肉的慢性鼻窦炎(CRSwNP)和不伴有鼻息肉的慢性鼻窦炎(CRSsNP),CRS能够发生在任何年龄段,且发病率随着年龄的增长而升高^[2]。目前,我国CRS的发病率为2%~8%,CRS患者数每年以0.3%的速度递增^[3]。然而,到目前为止,CRS的发病机制仍不清楚。虽然CRS一般不会危及生命,但会引起鼻塞、脓性鼻漏、嗅觉减少/丧失、面部压力或疼痛以及黏膜水肿等,症状可能持续12周或更长时间,给患者的身体健康、生活质量及经济均带来了沉重的负担^[4]。

维生素D(VitD)是从饮食中摄取的脂溶性维生素,也是能够通过阳光中的紫外线B照射在皮肤中内源性合成的甾体激素原。VitD作为一种强效类固醇激素的前体,可调节广泛的生理病理过程, VitD缺乏会导致多种健康问题^[5-6]。以往研究表明, VitD可能在CRS中发挥保护作用^[7-8]。然而,关于VitD改善CRS的具体作用机制尚未明确。本研究采用肺炎链球菌诱导构建小鼠CRS模型,给予VitD后观察其对模型小鼠的治疗效果,并检测调节性T细胞/辅助性T细胞17(Treg/Th17)比例及相关因子的变化,以期科学合理地治疗CRS提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验使用40只雄性C57BL/6小鼠, SPF级, 6~8周龄, 体重18~22 g, 购于新疆维吾尔自治区实验动物研究中心[SCXK(新)2021-0001], 饲养于SPF级实验动物房内, 温度控制在22~25℃, 相对湿度在45%~55%, 给予周期性光照/黑暗12 h循环, 期间自由进食及饮水。适应性饲养1周后进行实验

研究。

1.2 仪器

ELX808型酶标仪(美国Biotek公司); BX43光学显微图像分析系统(日本Olympus公司); CFX-96荧光定量聚合酶链反应(PCR)扩增检测系统(美国Bio-Rad公司); DYY-6C电泳仪(北京六一生物科技有限公司); CytoFLEX流式细胞仪(美国Beckman公司); EM-UC7冰冻切片机(德国Leica公司)。

1.3 药品与试剂

VitD₃(CAS编号: 67-97-0; 规格: 20 mg/支; 含量: 99.9%; 美国Sigma公司), 克拉霉素[批号: 562002; 规格: 0.125 g; 重庆科瑞制药(集团)有限公司]。肺炎链球菌(批号: 49619; 美国ATCC公司), 白细胞介素(IL)6(批号: KGERC003)、IL-10(批号: KGERC004)、IL-17(批号: KGERC170)、IL-23(批号: KGEHC171)及转化生长因子 β (TGF- β , 批号: KGERC107b)的酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司), 苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(批号: ZN1970-KPC, 北京百奥莱博科技有限公司), 过碘酸雪夫(PAS)染色试剂盒(批号: G1285; 北京索莱宝科技有限公司), Trizol试剂盒(批号: 15596018; 美国Invitrogen公司), PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser反转录试剂盒(批号: DRR047A)、SYBR Premix Ex TaqTM II PCR试剂盒(批号: RR820A)购自日本Takara公司, RIPA裂解液(批号: P0013B)、BCA蛋白测定试剂盒(批号: P0009)、ECL发光试剂液(批号: P0018)及DAB显色试剂盒(批号: P0202)购自碧云天生物技术研究所, 小鼠淋巴细胞分离液(批号: FL1086; 北京康瑞纳生物科技有限公司), 兔抗IL-17多克隆抗体(批号: ab9565)、兔抗Forkhead家族转录因子3(Foxp3)单克隆(批号: ab20034)、兔抗维甲酸相关孤儿受体 γ (ROR γ t)单克隆抗体(批号: ab91187)、FITC标记的

CD4 单克隆抗体(批号:ab59474)、APC 标记的 CD25 单克隆抗体(批号:ab210330)及兔抗 GAPDH 多克隆抗体(批号:ab70699)购自英国 Abcam 公司,PerCP-Cy5.5 标记的 IL-17A 单克隆抗体(批号:85-45-7177-82;美国 eBioscience 公司),PE 标记的 Foxp3 单克隆抗体(批号:orb491130;英国 Biorbyt 公司),辣根过氧化物酶标记山羊抗兔(批号:ZB2306;北京中杉金桥生物技术有限公司)。基因引物序列采用 Primer Premier 5.0 软件设计,并由中国吉玛基因公司合成。

2 方法

2.1 动物造模与分组处理

将 40 只雄性 C57BL/6 小鼠按随机数字表法分为对照组(Control 组)、模型组(Model 组)、维生素 D 组(VitD 组)和克拉霉素组(CLR 组),每组 10 只,除 Control 组外,其余各组小鼠均在鼻窦腔填充含肺炎链球菌菌液海绵制作 CRS 模型^[9]:小鼠全身消毒,腹腔注射 10%水合氯醛溶液麻醉,于鼻背正中做约 3 mm 长的切口,分离皮下组织并暴露鼻背上的鼻窦腔骨质,于两侧各打 1 个直径约 1 mm 的小孔,将医用海绵置入 6×10^8 CFU/mL 菌液中浸泡后迅速植入小孔中,进行常规缝合与消毒。接着, VitD 组小鼠按 10 ng/(kg·d)的 VitD₃ 溶液进行灌胃, CLR 组小鼠按 103 mg/(kg·d)的克拉霉素溶液进行灌胃,同时, Control 组和 Model 组小鼠均以等体积的 0.9%氯化钠溶液灌胃, 1 日 1 次,持续 21 d。

2.2 ELISA

21 d 给药结束后,各组小鼠腹主动脉采血,静置 2 h,以 4 000 r/min 低温(4 ℃)离心(离心半径 12.5 cm)10 min,获取血清,根据小鼠 ELISA 试剂盒检测各血清样本中 IL-6、IL-10、IL-17、IL-23 及 TGF- β 水平,按照试剂盒说明书测定,绘制标准曲线,计算各细胞因子水平。

2.3 HE 染色

采血后处死各组小鼠,解剖取鼻窦黏膜组织,置于 4%多聚甲醛溶液中固定 24 h,常规脱水与透明,石蜡包埋,制成厚度约 5 μ m 的组织切片,进行 HE 染色,具体步骤如下:切片脱蜡脱水,流水冲洗,浸入苏木精中染细胞核 5 min, 1%盐酸乙醇分化数秒,流水冲洗后,再浸入伊红中染细胞质 3 min,流水再次冲洗,经脱水、透明,滴加中性树胶封片,置于光学显微图像分析系统下观察鼻窦黏膜的病理学变化情况,拍摄图片。

2.4 PAS 染色

取制备的鼻窦黏膜组织石蜡切片,进行切片脱蜡及水化,浸入过碘酸溶液中处理 10 min,蒸馏水冲洗,加入 Leagene Schiff Reagent 试剂避光染色 15 min,冲洗干净后,以苏木精染细胞核 3 min, 1%盐酸乙醇分化数秒,流水冲洗返蓝,经脱水、透明,滴加中性树胶封片,通过光学显微图像分析系统观察鼻窦黏膜组织内染色情况,拍摄图片,镜下紫红色着色即为 PAS 阳性结果。

2.5 实时荧光定量 PCR

将鼻窦黏膜组织在无菌环境下剪碎并研磨,加入 Trizol 试剂,按照说明书步骤提取总 RNA,进行 RNA 浓度和纯度测定。根据反转录试剂盒说明书合成 cDNA,除去 gDNA,收集样本逆转录获得的 cDNA,采用实时荧光定量 PCR 测定各基因表达水平,内参基因为 β -actin,具体参照 SYBR Premix Ex TaqTM II PCR 试剂盒说明书制备 20 μ L 的反应体系,依次加入各试剂

与底物 cDNA,在 CFX-96 PCR 扩增仪中进行扩增,程序设置为:95 ℃ 3 min,循环 1 次;95 ℃ 12 s,62 ℃ 40 s,95 ℃ 15 s,循环 45 次。扩增后,2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算各基因的相对表达量。引物具体序列: β -actin,正向:5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3',反向 5'-TTTAATGTACAGCAGCATTTTC-3'; ROR γ t,正向:5'-TACCCTACTGAGGACAGG-3',反向 5'-CCACATTACACTGCTGGCTG-3'; Foxp3,正向:5'-TTTCACCTATGCCACCCTTATC-3',反向 5'-CATGCCGAGTAAACCAATGCTAG-3'。

2.6 蛋白质印迹法

将鼻窦黏膜组织在无菌环境下剪碎并研磨,添加 RIPA 溶液置于冰上孵育 30 min,以 12 000 r/min 低温(4 ℃)离心(离心半径 12.5 cm)30 min,吸取清液,BCA 法测定上清液即蛋白浓度,煮样 5 min,并制备 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶,取 50 μ g 的总蛋白量加入胶孔内,经过电泳分离蛋白,并转印至 PVDF 膜,以 5%脱脂奶粉作为封闭液,室温(25 ℃)封闭 1 h。加入 ROR γ t、Foxp3 多克隆抗体(均按 1:1 000 稀释),4 ℃孵育。次日,弃去原液, TBST 洗膜,加入辣根过氧化物酶标记山羊抗兔抗体(1:5 000),室温孵育,1 h 后洗膜, ECL 显影, Image ProPlus 软件分析蛋白条带灰度值,内参蛋白为 GAPDH,以目的蛋白与内参蛋白的灰度值之比作为目的蛋白相对表达量。

2.7 免疫组化染色

取制备的鼻窦黏膜组织石蜡切片,进行切片脱蜡及水化,免疫组化染色检测 Th17 细胞标志物 IL-17 和 Treg 细胞标志物 Foxp3 的表达情况。置于微波炉中修复抗原,加入内源性过氧化物酶阻断剂孵育 10 min,再以山羊血清室温封闭 30 min。根据组织切片大小,分别滴加 IL-17、Foxp3 多克隆抗体(均按 1:100 稀释),4 ℃孵育。次日,磷酸缓冲盐溶液(PBS)冲洗,甩干切片,滴加辣根过氧化物酶标记山羊抗兔抗体(1:1 000),室温孵育 30 min。PBS 冲洗干净, DAB 显色,苏木精复染,经脱水、透明后,滴加中性树胶封片,通过光学显微图像分析系统观察鼻窦黏膜组织内着色情况,拍摄图片,胞质、胞核染为棕色至棕褐色为阳性,随机选择 5 个视野,通过 Image ProPlus 软件分析积分吸光度值。

2.8 流式细胞术

采集各组小鼠外周血于肝素抗凝管,离心去除血浆,加入等体积 0.9%氯化钠溶液稀释,采用淋巴细胞分离液分离,以 1 000 r/min 低温(4 ℃)离心(离心半径 12.5 cm)30 min,留取白膜层细胞, PBS 洗涤,获得单个核细胞,以流式细胞术检测 CD25⁺Foxp3⁺ 标记的 Treg 细胞与 CD4⁺IL-17A⁺ 标记的 Th17 细胞亚群,添加适量染色缓冲液制备细胞悬液,在 100 μ L 悬液中分别加入 FITC 标记的 CD4 抗体和 APC 标记的 CD25 抗体,室温避光孵育 30 min,将细胞在固定/透化溶液中处理 30 min,加入 PerCP-Cy5.5 标记的 IL-17A 抗体和 PE 标记的 Foxp3 抗体,继续孵育 30 min, PBS 清洗后再次重悬于染色缓冲液中,流式细胞仪分析 Treg 与 Th17 细胞比例分布。

2.9 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件处理实验数据, GraphPad Prism 8.30 绘制统计图。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间数据比较以单因素方差分析,采用 LSD-*t* 检验进行组间两两数据比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠血清细胞因子水平比较

ELISA 测定结果显示, Model 组小鼠血清 IL-6、IL-17 及 IL-23 水平较 Control 组中显著升高 ($P < 0.05$), IL-10、TGF- β 水平较 Control 组则显著降低 ($P < 0.05$); 与 Model 组比较, VitD 组和 CLR 组小鼠血清 IL-6、IL-17 及 IL-23 水平显著降低, IL-10、TGF- β 水平显著升高 ($P < 0.05$), 上述差异均有统计学意义, 见表 1。

表 1 各组小鼠血清细胞因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

Tab 1 Comparison of serum cytokine levels of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	IL-6	IL-10	IL-17	IL-23	TGF- β
Control 组	8.65 \pm 0.79	17.32 \pm 1.40	5.65 \pm 0.52	7.54 \pm 0.59	156.72 \pm 13.58
Model 组	21.18 \pm 1.93*	8.72 \pm 0.75*	11.80 \pm 1.06*	32.16 \pm 3.04*	119.43 \pm 10.92*
VitD 组	10.48 \pm 0.95#	15.56 \pm 1.39#	7.71 \pm 0.64#	12.17 \pm 1.58#	139.96 \pm 12.75#
CLR 组	10.15 \pm 1.06#	14.99 \pm 1.20#	6.96 \pm 0.62#	10.96 \pm 1.04#	142.04 \pm 12.81#

注: 与 Control 组比较, * $P < 0.05$; 与 Model 组比较, # $P < 0.05$

Note: vs. Control group, * $P < 0.05$; vs. Model group, # $P < 0.05$

3.2 各组小鼠鼻窦黏膜病理变化比较

HE 染色结果显示, Control 组小鼠鼻窦黏膜组织结构完整, 上皮细胞与纤毛排列整齐, 未见炎症细胞浸润; Model 组小鼠鼻窦黏膜出现明显的病理表现, 基底层增厚, 纤毛脱落, 并伴有大量炎症细胞浸润; 相较于 Model 组, VitD 组和 CLR 组小鼠鼻窦黏膜组织结构较为清晰, 上皮细胞排列相对整齐, 坏死脱落及炎症细胞浸润现象均明显减轻, 见图 1。

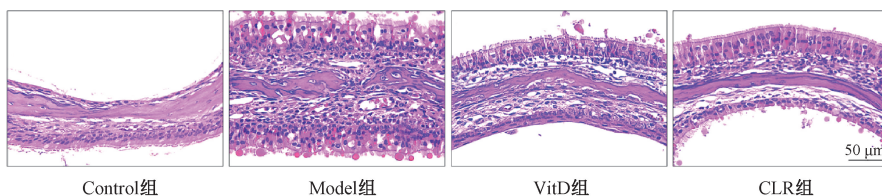
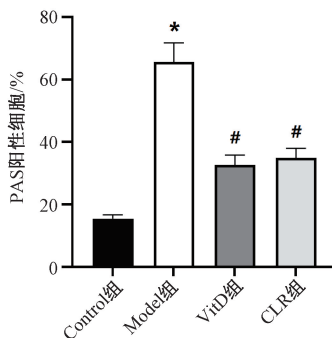
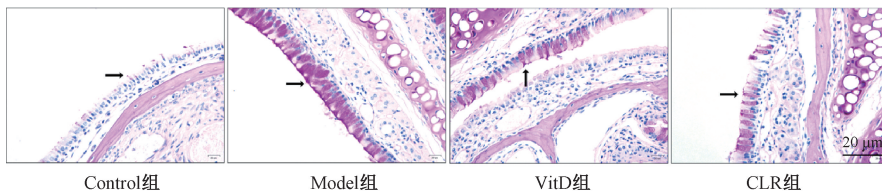


图 1 HE 染色观察各组小鼠鼻窦黏膜病理变化 ($\times 100$)

Fig 1 Pathological changes of nasal sinus mucosa of mice in each group by HE staining ($\times 100$)



与 Control 组比较, * $P < 0.05$; 与 Model 组比较, # $P < 0.05$
vs. Control group, * $P < 0.05$; vs. Model group, # $P < 0.05$

图 2 PAS 染色检测各组小鼠鼻窦黏膜内杯状细胞

Fig 2 Goblet cells in the nasal sinus mucosa of mice in each group by PAS staining

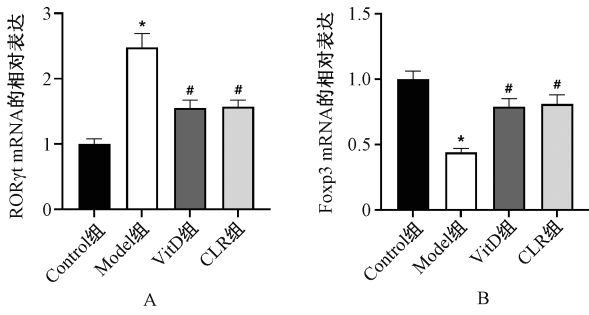
PAS 染色经镜检后显示, Control 组鼻窦黏膜下层偶见杯状细胞, 而 Model 组黏膜下层可见大量杯状细胞, 数目较 Control 组显著增多 ($P < 0.05$); VitD 组和 CLR 组的小鼠部分鼻窦黏膜有坏死脱落现象, 但较 Model 组减轻, 黏膜下层杯状细胞数目也较 Model 组显著减少 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义, 见图 2。

3.3 各组小鼠鼻窦黏膜内 ROR γ t、Foxp3 的 mRNA 和蛋白表达水平比较

各组小鼠鼻窦黏膜内 Th17 特异性转录因子 ROR γ t 与 Treg 特异性转录因子 Foxp3 的 mRNA 和蛋白表达水平测定结果显示, Model 组小鼠鼻窦黏膜内 ROR γ t mRNA 和蛋白相对表达量均显著高于 Control 组, 而 Foxp3 mRNA 和蛋白相对表达量均显著低于 Control 组 ($P < 0.05$); 与 Model 组比较, VitD 组和 CLR 组鼻窦黏膜内 ROR γ t mRNA 和蛋白相对表达量均显著下调, Foxp3 mRNA 和蛋白相对表达量均显著上调 ($P < 0.05$), 差异均有统计学意义, 见图 3—4。

3.4 各组小鼠鼻窦黏膜内 IL-17 与 Foxp3 阳性表达率比较

免疫组织化学染色检测各组小鼠鼻窦黏膜内 IL-17 与 Foxp3 表达变化, 可见均有棕色至褐色染色。与 Control 组比较, Model 组小鼠鼻窦黏膜内 IL-17 阳性表达率显著升高, Foxp3 阳性表达率显著下降 ($P < 0.05$); 与 Model 组比较, VitD 组和 CLR 组小鼠鼻窦黏膜内 IL-17 阳性表达率显著下降, 而 Foxp3 阳性表达率显著升高 ($P < 0.05$), 差异均有统计学意义, 见图 5。



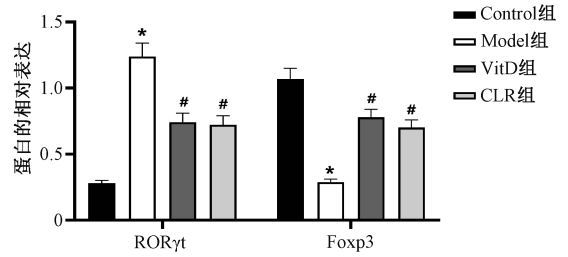
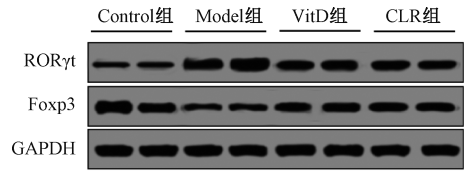
A. ROR γ t mRNA; B. Foxp3 mRNA; 与 Control 组比较, * $P < 0.05$; 与 Model 组比较, # $P < 0.05$
A. ROR γ t mRNA; B. Foxp3 mRNA; vs. Control group, * $P < 0.05$; vs. Model group, # $P < 0.05$

图 3 实时荧光定量 PCR 检测各组小鼠鼻窦黏膜内 ROR γ t 与 Foxp3 的 mRNA 表达水平

Fig 3 ROR γ t and Foxp3 mRNA expression levels in the sinus mucosa of mice in each group by real-time fluorescence quantitative PCR detection

3.5 各组小鼠外周血 CD4⁺IL-17A⁺ 与 CD25⁺Foxp3⁺ 细胞比例分布比较

流式细胞术检测各组小鼠外周血中 CD4⁺IL-17A⁺ 与 CD25⁺Foxp3⁺ 细胞比例, 结果显示, 与 Control 组比较, Model 组小鼠外周血中 CD4⁺IL-17A⁺ 细胞比例显著升高, CD25⁺Foxp3⁺ 细胞比例显著降低 ($P < 0.05$); 与 Model 组比较, VitD 组和 CLR 组



与 Control 组比较, * $P < 0.05$; 与 Model 组比较, # $P < 0.05$
vs. Control group, * $P < 0.05$; vs. Model group, # $P < 0.05$

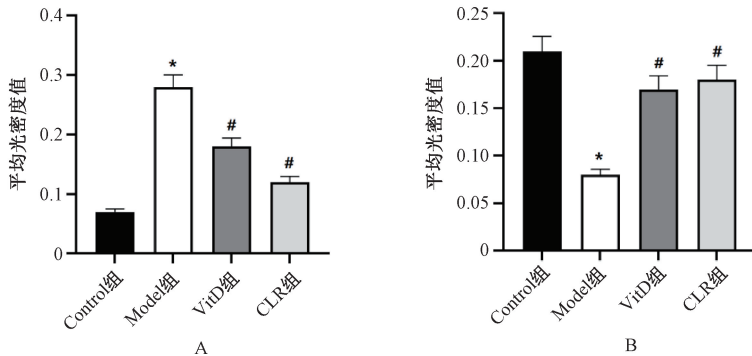
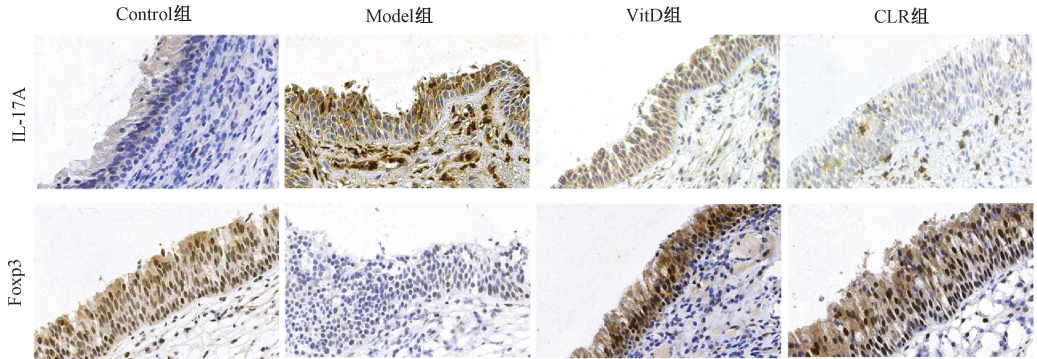
图 4 蛋白质印迹法检测各组小鼠鼻窦黏膜内 ROR γ t 与 Foxp3 的蛋白表达水平

Fig 4 Expression levels of ROR γ t and Foxp3 in the nasal sinus mucosa of mice in each group by Western blotting protein

外周血中 CD4⁺IL-17A⁺ 细胞比例均显著降低, CD25⁺Foxp3⁺ 细胞比例均显著升高 ($P < 0.05$), 差异均有统计学意义, 见图 6。

4 讨论

CRS 是一种异质性炎症性疾病, 主要病因包括鼻腔鼻窦解

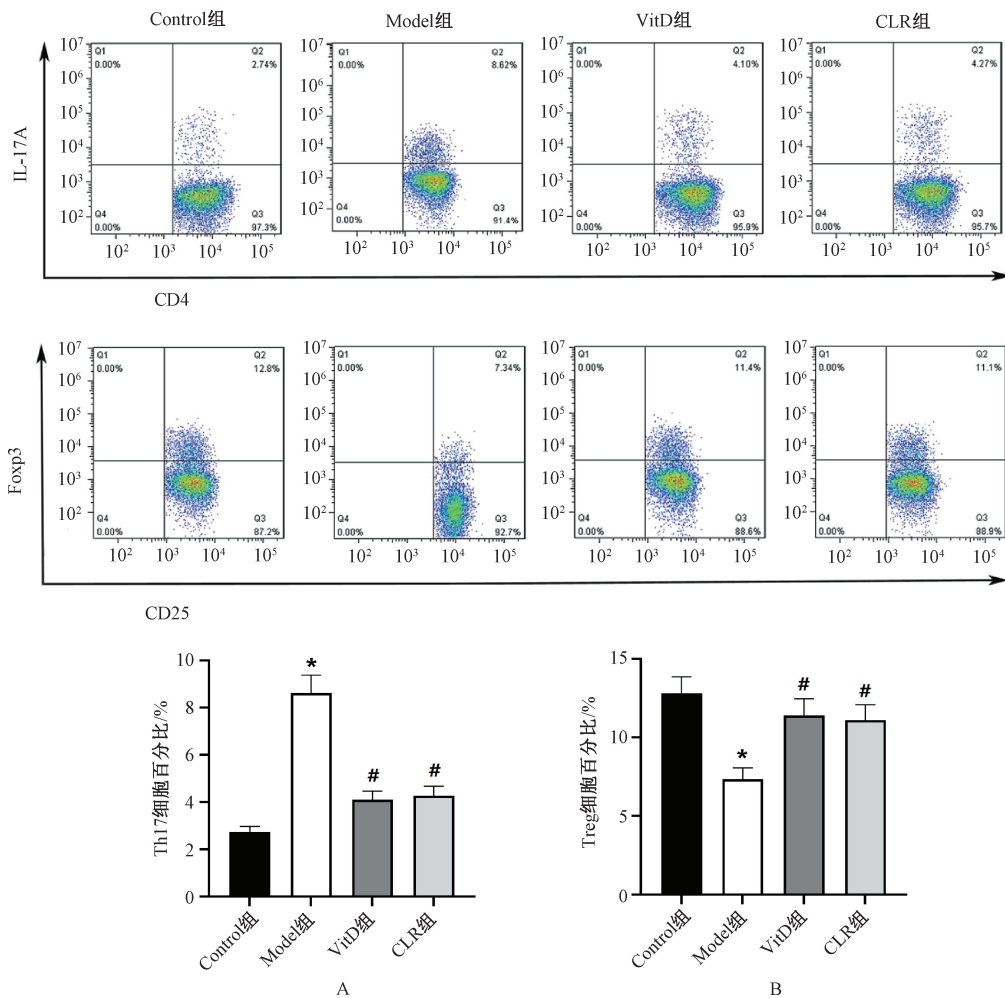


A. IL-17; B. Foxp3; 与 Control 组比较, * $P < 0.05$; 与 Model 组比较, # $P < 0.05$

A. IL-17; B. Foxp3; vs. Control group, * $P < 0.05$; vs. Model group, # $P < 0.05$

图 5 免疫组化染色检测各组小鼠鼻窦黏膜内 IL-17 与 Foxp3 表达

Fig 5 Expressions of IL-17 and Foxp3 in the sinus mucosa of mice in each group by immunohistochemical staining



A. Th17 细胞; B. Treg 细胞; 与 Control 组比较, * $P < 0.05$; 与 Model 组比较, # $P < 0.05$

A. Th17 cells; B. Treg cells; vs. Control group, * $P < 0.05$; vs. Model group, # $P < 0.05$

图 6 流式细胞术检测各组小鼠外周血 CD4⁺IL-17A⁺ 与 CD25⁺Foxp3⁺ 细胞比例

Fig 6 Ratio of CD4⁺IL-17A⁺ and CD25⁺Foxp3⁺ cells in peripheral blood of mice in each group was detected by flow cytometry

剖学因素、感染因素、免疫紊乱以及遗传,具有多种潜在的病理生理机制,因而可导致不同的治疗反应^[10]。CRS_wNP 患者的疾病严重程度和复发风险通常高于 CRS_sNP 患者。近年来,功能性鼻内窥镜手术和术前、术后药物治疗的进步大大提高了 CRS_wNP 患者的治愈率,然而,CRS_wNP 的疾病复发率仍在 40% 以上,且至少有 10% 的 CRS 患者对药物和手术治疗方案无反应,并最终发展为难治性疾病^[11]。由此可见,目前在临床实践中仍然缺乏基于 CRS 机制的有效治疗方法。

VitD 结构类似于类固醇,其受体存在于身体的大多数组织和细胞中。对 VitD 在人体中作用的深入探究发现,除了常见的促肌肉骨骼作用外, VitD 还在其他部位发挥着有益作用,并可作为一种免疫调节剂参与疾病的发生发展^[12]。VitD 缺乏与多种疾病之间存在相关性,目前也已被确定为多种慢性炎症性疾病的病因,包括炎症性肠病、多发性硬化症、过敏性鼻炎和哮喘^[13];此外,血清内低水平的 VitD 也与肺功能受损、哮喘发作频率增加以及对皮质类固醇的反应性降低有关^[14]。因此,通过补充 VitD 可对由于 VitD 缺乏引起的多种疾病起到预防或治疗作用。例如,Stanescu 等^[15]的研究结果表明,口服 VitD

补充剂对银屑病患者具有良好的治疗效果,且没有观察到明显的不良反应,由此推测,口服 VitD 补充剂可能作为银屑病的有效辅助治疗手段;Manoy 等^[16]的研究结果指出,给予骨关节炎患者补充 VitD,6 个月后血清 VitD 水平明显提高,同时可减少患者的氧化蛋白损伤,减轻当前疼痛症状,提高生活质量,并改善握力以及身体机能;Lemke 等^[17]报道,获得性 VitD 抗性为自身免疫性疾病的发展提供了一种合理的病理机制,可以通过使用大剂量 VitD 疗法对相关疾病进行治疗。本研究通过给予 CRS 小鼠补充 VitD 后,观察到小鼠鼻窦黏膜组织结构损伤减轻,杯状细胞数目减少,上皮细胞坏死脱落及炎症细胞浸润现象均明显减轻,提示 VitD 能够改善 CRS 小鼠鼻窦黏膜的病理损伤。研究表明,克拉霉素在 CRS 的治疗中可以减轻手术引起的术后炎症,促进病理黏膜恢复正常,改善症状,且不会引起免疫抑制,现已成为临床治疗 CRS 的推荐用药^[18]。基于此,本研究选择克拉霉素为阳性对照药物,初步探讨了 VitD 治疗 CRS 小鼠的可能机制。

Th17 细胞和 Treg 细胞亚群在控制炎症反应中发挥着独特的作用,驱动免疫和炎症的效应 T 细胞亚群以及抑制效应 T 细

胞以限制过度炎症反应的 Treg 细胞均是免疫反应的关键组成部分^[19]。因此, Th17 细胞和 Treg 细胞之间的平衡是调节免疫稳态的关键因素。研究表明, CRSwNP 患者的外周血单个核细胞中表现为 Th17 细胞比例升高和 Treg 细胞比例降低, 发生明显的免疫失衡现象, 这在 CRS 病程中起着关键作用^[20]。本研究同样检测到, CRS 小鼠血清中 IL-6、IL-17 及 IL-23 水平升高, IL-10、TGF- β 水平降低, 鼻窦黏膜内 ROR γ t 与 IL-17 表达升高, Foxp3 表达降低; 同时, 外周血中由 CD4⁺IL-17A⁺ 标记的 Th17 细胞比例升高, 而由 CD25⁺Foxp3⁺ 标记的 Treg 细胞比例下降, 以上结果均说明 CRS 小鼠机体中 Th17/Treg 细胞功能失衡。IL-6 能够促进 Th17 细胞的分化, IL-23 可维持 Th17 细胞的稳定成熟过程, 而 IL-17 作为 Th17 细胞分泌的主要细胞因子, 通过募集嗜酸性粒细胞并引起组织反应而参与 CRS 中鼻窦肉的特异性刺激^[21-22]。ROR γ t 是 Th17 细胞表达的特征性转录因子, 在诱导自身免疫性组织损伤和炎症中起关键作用, 与其他转录因子协同作用来诱导 IL-17 表达^[23]。Treg 细胞主要通过分泌 TGF- β 、IL-10 等抗炎细胞因子参与各种免疫疾病, 抑制免疫细胞的活性, 从而控制炎症^[24]。一方面, 天然 Treg 细胞主要在胸腺中产生; 另一方面, TGF- β 与 IL-2 共同刺激能够使幼稚 T 细胞向 Treg 细胞分化。Foxp3 是 Treg 细胞的标志物, 对于抗炎反应和维持免疫耐受至关重要, 主要通过调节 IL-10 的分泌来维持功能^[25]。本研究中, 使用 VitD 治疗 CRS 小鼠后, 其血清 IL-6、IL-17 及 IL-23 水平降低, IL-10、TGF- β 水平升高; 鼻窦黏膜内 ROR γ t 与 IL-17 表达降低, 且 Foxp3 表达升高, 外周血 CD4⁺IL-17A⁺ 标记的 Th17 细胞比例下降, CD25⁺Foxp3⁺ 标记的 Treg 细胞比例升高, 由此推测, VitD 能够调控 CRS 小鼠机体中 Treg/Th17 细胞功能失衡, 从而对其发挥保护作用。

综上所述, 通过补充外源性 VitD 可改善 CRS 模型小鼠鼻窦黏膜的组织病理学症状, 其作用机制可能与 Treg/Th17 细胞平衡及相关因子表达从而干预免疫反应有关。后续将对 CRS 小鼠相关通路进行深入研究, 进一步揭示 VitD 对 CRS 的免疫调节机制, 为临床上 CRS 的预防与治疗提供新方案。

参考文献

- [1] AMIRAPU S, BISWAS K, RADCLIFF F J, et al. Sinonasal tissue remodelling during chronic rhinosinusitis [J]. *Int J Otolaryngol*, 2021, 2021: 7428955.
- [2] 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会鼻科组, 中华医学会耳鼻咽喉头颈外科分会鼻科学组. 中国慢性鼻窦炎诊断和治疗指南 (2018) [J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2019, 54(2): 81-100.
- [3] CHANDRA R. Impact of biologic therapies on surgery for chronic rhinosinusitis with nasal polyposis [J]. *Ear Nose Throat J*, 2021, 100(8): 555-556.
- [4] RUAN J W, ZHAO J F, LI X L, et al. Characterizing the neutrophilic inflammation in chronic rhinosinusitis with nasal polyps [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 793073.
- [5] CHANG S W, LEE H C. Vitamin D and health—the missing vitamin in humans [J]. *Pediatr Neonatol*, 2019, 60(3): 237-244.
- [6] 张楠, 时鹏, 年娣. 维生素 D 在自身免疫性疾病中的研究进展 [J]. *检验医学与临床*, 2021, 18(21): 3197-3200.
- [7] ZAND V, BARADARANFAR M, VAZIRIBOZORG S, et al. Correlation of serum vitamin D levels with chronic rhinosinusitis disease severity [J]. *Iran J Otorhinolaryngol*, 2020, 32(108): 35-41.

- [8] 胡彬, 陈雪春. 维生素 D 对慢性鼻-鼻窦炎鼻内镜手术疗效的影响 [J]. *中国现代医生*, 2020, 58(29): 75-77.
- [9] JACOB A, FADDIS B T, CHOLE R A. Chronic bacterial rhinosinusitis; description of a mouse model [J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2001, 127(6): 657-664.
- [10] SAYDY N, MOUBAYED S P, DESROSIERS M. Patient perspectives on endoscopic sinus surgery for chronic rhinosinusitis [J]. *J Otolaryngol Head Neck Surg*, 2021, 50(1): 34.
- [11] WU D B, SCHNEIDER A L, WELCH K C. In-office corticosteroid placement in the management of chronic rhinosinusitis [J]. *Ear Nose Throat J*, 2021, 100(5): 314-319.
- [12] GRUBER-BZURA B M. Vitamin D and influenza-prevention or therapy? [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(8): 2419.
- [13] ZMIJEWSKI M A. Vitamin D and human health [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(1): 145.
- [14] CASTRO M, KING T S, KUNSELMAN S J, et al. Effect of vitamin D3 on asthma treatment failures in adults with symptomatic asthma and lower vitamin D levels; the VIDA randomized clinical trial [J]. *JAMA*, 2014, 311(20): 2083-2091.
- [15] STANESCU A M A, SIMIONESCU A A, DIACONU C C. Oral vitamin D therapy in patients with psoriasis [J]. *Nutrients*, 2021, 13(1): 163.
- [16] MANOY P, YUKTANANDANA P, TANAVALEE A, et al. Vitamin D supplementation improves quality of life and physical performance in osteoarthritis patients [J]. *Nutrients*, 2017, 9(8): 799.
- [17] LEMKE D, KLEMENT R J, SCHWEIGER F, et al. Vitamin D resistance as a possible cause of autoimmune diseases: a hypothesis confirmed by a therapeutic high-dose vitamin D protocol [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 655739.
- [18] SIRECI F, SPECIALE R, GALLINA S, et al. Clarithromycin in the management of chronic rhinosinusitis: preliminary results of a possible its new use [J]. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*, 2018, 70(1): 87-91.
- [19] LEE G R. The balance of Th17 versus Treg cells in autoimmunity [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(3): 730.
- [20] RAI G, DAS S, ANSARI M A, et al. TLR-2 expression and dysregulated human Treg/Th17 phenotype in *Aspergillus flavus* infected patients of chronic rhinosinusitis with nasal polyposis [J]. *Microb Cell Fact*, 2020, 19(1): 215.
- [21] LEE Y, AWASTHI A, YOSEF N, et al. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells [J]. *Nat Immunol*, 2012, 13(10): 991-999.
- [22] MCGEACHY M J, CUA D J, GAFFEN S L. The IL-17 family of cytokines in health and disease [J]. *Immunity*, 2019, 50(4): 892-906.
- [23] IVANOV I I, MCKENZIE B S, ZHOU L, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells [J]. *Cell*, 2006, 126(6): 1121-1133.
- [24] GISTERÅ A, ROBERTSON A K L, ANDERSSON J, et al. Transforming growth factor- β signaling in T cells promotes stabilization of atherosclerotic plaques through an interleukin-17-dependent pathway [J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5(196): 196ra100.
- [25] REN J, LI B. The functional stability of FOXP3 and ROR γ t in Treg and Th17 and their therapeutic applications [J]. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2017, 107: 155-189.

(收稿日期:2022-05-05 修回日期:2022-10-09)