论著·军事医学

曲古抑菌素A通过重塑CD4⁺T细胞免疫稳态缓解大肠杆菌感染性炎症

夏 雨[1],余 静[1],陈代琦[1,2],刘国昌[1],王 韵[3],严 军[1] [1]陆军军医大学大坪医院特殊环境战伤防治研究室,创伤与化学中毒全国重点实验室,重庆;[2]西南交通大学生命科学与工程学院,四川成都;[3]陆军军医大学(第三军医大学)基础医学院细胞生物学教研室,重庆

[**摘要**] **目的** 探讨曲古抑菌素A(trichostatin A, TSA)调控CD4⁺T细胞亚群在大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)感染性炎症中的作用。**方法** 采用完全随机设计,将8周龄、雄性小鼠(体质量22~25 g)分为(n=16):对照组(DMSO组)、感染组(DMSO+*E. coli*组)及干预组(*E. coli*+TSA组),其中*E. coli*+TSA组根据TSA不同浓度分为2.5、5.0、10.0 mg/kg 3个亚组。腹腔注射3×10⁸ CFU/mL *E. coli*,构建感染模型,并在TSA干预不同时间点(12、24、48、96 h)取材。通过生存率观察、体质量监测、小肠组织病理染色、ELISA、转录组测序、流式细胞术以及RT-qPCR等手段,评估TSA对*E. coli*感染性炎症的疗效及与CD4⁺T细胞亚群的关系。**结果** 与DMSO+*E. coli*组相比,5.0 mg/kg TSA可显著提高感染小鼠的生存率,抑制体质量下降,改善小肠病理损伤,降低感染24 h小鼠血清中肿瘤坏死因子-α水平(P<0.000 1),提升白细胞介素-10水平(P<0.05)。转录组结果表明5.0 mg/kg TSA干预24 h后可以影响调控FoxO、Th17、Th1/2等T细胞分化的信号通路,同时流式细胞术和RT-qPCR结果显示相较于DMSO+*E. coli*组,5.0 mg/kg TSA能下调感染96 h后小鼠Th17细胞标志分子RORγt表达,同时明显上调Treg细胞标志分子Foxp3表达(P<0.05)。**结论** TSA可能是通过调控CD4⁺T细胞朝向Treg亚群分化同时抑制其向Th17亚群分化,从而抑制促炎因子释放来缓解细菌感染性炎症疾病。

[**关键词**] 曲古抑菌素A;CD4⁺T细胞;大肠杆菌;感染性炎症

[**中图法分类号**] R378.21;R976;R977.3 [**文献标志码**] A

Trichostatin A attenuates *E. coli*-induced inflammation by modulating CD4⁺T cell homeostasis

XIA Yu[1], YU Jing[1], CHEN Daiqi[1,2], LIU Guochang[1], WANG Yun[3], YAN Jun[1] [1]Department of Special War Wound, State Key Laboratory of Trauma and Chemical Poisoning, Daping Hospital, Army Medical University, Chongqing; [2]School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu, Sichuan; [3]Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role of trichostatin A (TSA) in regulating CD4⁺T cell subpopulations during *Escherichia coli (E. coli)* inflammatory infections. **Methods** Male mice (8 weeks old,

[**基金项目**] 重庆市自然科学基金面上项目(CSTB2023NSCQ-MSX0014);陆军军医大学(第三军医大学)研究生科研创新项目(yjscx2024s09);陆军军医大学(第三军医大学)人才扶持计划(2019)

[**通信作者**] 王 韵,E-mail: yunwang@tmmu.edu.cn
严 军,E-mail: 13883092250@163.com

2097-0927/Copyright © 2025, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

引用格式:夏雨,余静,陈代琦,等. 曲古抑菌素A通过重塑CD4⁺T细胞免疫稳态缓解大肠杆菌感染性炎症[J]. 陆军军医大学学报,2025,47(21):2591-2601. DOI:10.16016/j.2097-0927.202507014.

Citation: XIA Y, YU J, CHEN D Q, *et al*. Trichostatin A attenuates *E. coli*-induced inflammation by modulating CD4⁺T cell homeostasis[J]. J Army Med Univ, 2025, 47(21): 2591-2601. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202507014.

weighing 22~25 g) were randomly divided into 3 groups (n=16): a dimethyl sulfoxide (DMSO) control group, an infection group (DMSO+*E. coli*), and an intervention group (*E. coli*+TSA). *E. coli* was administered *via* intraperitoneal injection at a concentration of 3×10^8 CFU/mL to establish an infection model. The *E. coli*+TSA group was further subdivided into 3 subgroups based on different TSA concentrations (2.5, 5.0, 10.0 mg/kg). Then the samples were collected at different time points (12, 24, 48, 96 h) after TSA intervention. The efficacy of TSA in treating *E. coli*-induced inflammatory responses and its relationship with $CD4^+$T cell subsets were evaluated by survival rate observation, body weight monitoring, histopathological staining for small intestine, ELISA detection, transcriptomics sequencing, flow cytometry and RT-qPCR analysis. **Results** Compared with the *E. coli* group, 5 mg/kg TSA significantly increased survival rate, suppressed body weight loss, improved pathological damage in the small intestinal, reduced serum TNF-α level in 24 h after infection (P<0.0001), and elevated IL-10 level (P<0.05). Transcriptomic analysis revealed that 5 mg/kg TSA intervention for 24 h modulated the T cell differentiation signaling pathways, including those regulating FoxO, Th17, and Th1/2. Flow cytometry and RT-qPCR results showed that compared to the *E. coli* group, 5 mg/kg TSA down-regulated the expression of the Th17 cell marker RORγt in mice 96 h after infection while significantly up-regulated the expression of the Treg cell marker Foxp3 (P<0.05). **Conclusion** TSA may alleviate bacterial infectious inflammatory diseases by regulating the differentiation of $CD4^+$T cells toward the Treg subset while simultaneously inhibiting their differentiation toward the Th17 subset, thereby suppressing the release of proinflammatory cytokines.

[**Key words**] trichostatin A (TSA); $CD4^+$T cells; *Escherichia coli*; infectious inflammation

Supported by the General Program Natural Science Foundation of Chongqing (CSTB2023NSCQ-MSX0014), the Graduate Research Innovation Project of Army Medical University (Third Military Medical University) (yjscx2024s09) and the Talent Support Program of Army Medical University (Third Military Medical University) (2019). Corresponding authors: WANG Yun, E-mail: yunwang@tmmu.edu.cn; YAN Jun, E-mail: 13883092250@163.com

细菌感染是全球范围内影响人群健康的重要原因,其中大肠埃希菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)致死率位居前列[1]。*E. coli*作为一种常见的肠道条件致病菌,正常情况下与人类共生,维护肠道微生态平衡[2]。然而,当机体免疫力下降或细菌数量异常增多时,*E. coli*将引发感染性炎症,导致机体免疫失衡,引起一系列疾病,如胃肠炎、结肠炎等[3-4],严重影响人们生活质量甚至危及生命。

T细胞是机体重要的适应性免疫细胞之一,可分为$CD4^+$T细胞和$CD8^+$T细胞,在维持机体免疫平衡和防止自身免疫疾病中发挥着重要作用[5-6]。细菌感染发生后,树突状细胞(dendritic cell, DC)通过抗原递呈使初始T细胞(naïve T cell, Th0)分化形成多种$CD4^+$T细胞亚群,包括辅助性T细胞(helper T cell, Th)1、Th2、调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)和Th17等,参与免疫应答,尤其是Treg的作用不容忽视。研究表明,在细菌感染初期,Treg能够通过分泌抑制性细胞因子如白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)和转化生长因子β(transforming growth factor-β, TGF-β)来抑制Th1和Th17的活化,从而减轻炎症反应[7-8]。在细菌感染后期,Treg的作用则更为复杂,既要继续抑制过度免疫反应,又要促进免疫记忆的形成[9-13]。尽管包括Treg在内的$CD4^+$T细胞在感染导致的免疫失衡中起着重要作用,但现有研究仍不清楚调控其功能的关键因子。

曲古抑菌素A(trichostatin A, TSA)是一种有效的组蛋白脱乙酰酶(histone deacetylase, HDAC)抑制剂和抗真菌抗生素。近年来,越来越多的研究表明,TSA能够通过多种途径调控细胞凋亡、细胞周期等生物学过程,从而影响肿瘤和炎症性疾病的进展[14-16];CUI等[17]发现TSA可通过增强细胞自噬,促进巨噬细胞向抗炎M2表型极化,从而减轻多种微生物引起的脓毒症期间的炎症反应;胡晓兰等[18]研究发现TSA预处理后能显著降低LPS诱导的巨噬细胞中肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、IL-1β等促炎因子的生成并降低TLR4的表达。此外,TSA还被发现能够影响多种$CD4^+$T细胞亚群的活性[19]。但TSA是否对$CD4^+$T细胞亚群分化具备调控作用尚不清楚。

本研究将探讨TSA对*E. coli*感染性炎症的治疗作用及与$CD4^+$T细胞亚群之间的关系,为细菌感染性炎症的治疗提供实验依据和新策略。

1 材料和方法

1.1 实验动物与菌株

C57BL/6野生型(wild type,WT)雄性小鼠购自陆军特色医学中心实验动物中心,所有小鼠在无特定病原体(specific pathogen free,SPF)条件下饲养,正常喂食水和饲料。采用完全随机设计,将8周龄、雄性小鼠(体质量22~25 g)分为(n=16):对照组(DMSO组)、感染组(DMSO+*E. coli*组)及干预组(*E. coli*+TSA组),其中*E. coli*+TSA组根据TSA不同浓度分为2.5、5.0、10.0 mg/kg 3个亚组;*E. coli*由陆军军医大学基础医学院微生物教研室惠赠。各组采用完全随机设计挑选8只用于观测小鼠生存率;剩余用于后续建模取材实验。本实验获陆军军医大学实验动物福利伦理审查委员会批准(AMUWEC20237369)。

1.2 实验试剂

TSA购自上海碧云天生物技术公司;DMSO购自美国MCE公司;PBS、RPMI 1640培养基购自武汉博士德生物工程有限公司;TNF-α和IL-10 ELISA试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;TRIzol Reagent、Primer Script RT reagent Kit with gDNA Eraser和SYBR Premix Ex *Taq* Ⅱ购自日本TaKaRa公司;引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成;红细胞裂解液购自北京天根生化科技(北京)有限公司;多聚甲醛购自北京索莱宝科技有限公司;LB固体和液体培养基购自上海碧云天生物技术公司;0.9%生理盐水购自四川科伦药业股份有限公司;Biotin-Antibody Cocktail和Anti-Biotin Mirobeads购自德国Miltenyi公司;胎牛血清购自以色列BI公司;三抗(青霉素、链霉素和两性霉素B)购自上海达特希尔生物科技公司;70 μm细胞筛网购自无锡耐思生物科技股份有限公司;细胞因子刺激试剂盒(500X)购自美国Invitrogen公司;APC-TGF-β、PerCP/Cy5.5-IL-17、FITC-CD4及相应染料的同型对照均购自美国Biolegend公司;Fixation/Permeabilization solution和Perm/Wash buffer购自美国eBioscience公司。

1.3 生存率观察

建模前称量各组小鼠体质量,建模后正常喂食水和饲料。每隔1小时观察各组小鼠生存状况,每天称量各组小鼠体质量并记录,连续观察14 d。

1.4 *E. coli*感染模型的建立及取材

接种环勾取菌液涂板至预先配置好的LB固体培养皿中,倒置放于37 ℃孵箱内,过夜;挑取培养皿中的单菌落2~4个放入装有20 mL LB液体培养基的50 mL离心管内,在37 ℃下以200 r/min摇床过夜;以3 000 r/min离心10 min,弃上清,加入5 mL生理盐水吹打混匀重悬;取200 μL菌液于96孔板内,检测600 nm波长条件下的光密度[OD(600)]值;根据测量结果加入适量生理盐水稀释至3×10^8 CFU/mL浓度待用。

预先使用无菌0.9%生理盐水配置2%DMSO,然后以DMSO为溶剂,分别配置2.5、5.0、10.0 mg/kg TSA。造模前称量各组小鼠体质量,*E. coli*+TSA组按各组每只10 μL/g腹腔注射TSA,DMSO组和DMSO+*E. coli*组腹腔注射等体积2%DMSO,随后立即腹腔注射200 μL *E. coli*(*E. coli*+TSA组和DMSO+*E. coli*组),正常喂食水和饲料。分别于12、24、48、96 h时间点取各组小鼠眼眶血、小肠组织(无菌PBS冲洗干净,取盲肠上方15 cm处一小段肠组织放入多聚甲醛中固定用于病理染色)、周围淋巴结(腹股沟、腋窝、颈部)、脾组织,加入无菌PBS放入细胞网筛中,1 mL注射器尾杆研磨后收集,以4 ℃ 2 000 r/min离心10 min,弃上清,视红细胞量,加入红细胞裂解液处理3 min,以4 ℃ 2 000 r/min离心10 min,弃上清,加入TRIzol裂解。

1.5 小肠组织病理染色

按1.4方法建模和取材,将各组固定24 h以上的小肠组织经流水过夜,然后依次经50%、70%、80%、95%、95%、100%、100%酒精梯度进行脱水,氯仿透明2 h,浸石蜡1 h(石蜡Ⅰ和石蜡Ⅱ共2次),然后进行包埋、切片、染色、封片,显微镜观察组织病理结果并拍照。

1.6 ELISA法检测细胞因子水平

按1.4方法建模和取材,取各组小鼠眼眶血,室温静置30 min。以4 ℃ 3 000 r/min离心10 min,吸取上清黄色澄清液体(即血清),采用ELISA法检测血清中TNF-α和IL-10的水平。

1.7 $CD4^+$T细胞收集和转录组测序

按1.4方法建模,根据实验结果确认最佳*E. coli*菌液体积和TSA最佳剂量。在最佳*E. coli*菌液体积感染小鼠及TSA最佳剂量干预后,取各组小鼠周围淋巴结(腹股沟、腋窝、颈部)、脾组织,加入无菌PBS放入细胞网筛中,利用1 mL注射器尾杆研磨后收集细胞。经裂红离心计数后的细胞按照每1×10^7个细胞10 μL标准加入适量Biotin-Antibody Cocktail,4 ℃避光孵育10 min,按1×10^7个细胞30 μL标准加入RMPI 1640(89%RPMI 1640+10%胎牛血清+1%三抗),再按每1×10^7个细胞20 μL标准加入适量Anti-Biotin Mirobeads混匀,4 ℃避光孵育15 min。加入适量RMPI 1640混匀,离心后按照每1×10^8个细胞500 μL RMPI 1640标准制成悬液备用。预加入3 mL RMPI 1640润湿分选柱,将细胞悬液过柱3次,最终获得$CD4^+$T细胞。由杭

州联川生物公司进行转录组测序，分析测序结果，确定CD4⁺T细胞亚群发生明显变化的各类免疫细胞。

1.8　RT-qPCR检测CD4⁺T细胞亚群基因表达

按1.4方法建模和取材，根据前述实验结果确定的TSA最佳剂量和最佳作用时间，RT-qPCR检测各组小鼠周围免疫器官（淋巴结和脾组织）中Foxp3、RORγt的相对表达，验证转录组测序结果。

1.9　流式细胞术分析

按1.4方法建模，根据前述确定最佳剂量的TSA干预后，在96 h时取各组小鼠周围淋巴结和脾组织，研磨后离心裂红，计数重悬，每组分装1 mL培养基至1.5 mL EP管内，按试剂盒说明书每管内加入2 μL细胞因子刺激试剂（500X）；涡旋混合，在37 ℃、5%CO_2培养4~6 h。细胞孵育后，以2 000 r/min离心10 min去上清；每孔内加入200 μL大鼠血清，混匀后室温封闭20 min；加入FITC-CD4抗体冰浴20 min；加入适量PBS洗涤后2 000 r/min离心10 min去上清；各管加入100 μL Fixation/Permeabilization solution试剂，混匀过夜；第2天用1 mL 1×BD Perm/Wash buffer洗2次（2000 r/min，10 min，弃上清）；每管加入200 μL大鼠血清，混匀后室温封闭20 min；按组别每管加入1 μL抗体（APC-TGF-β；PerCP/Cy5.5-IL-17）；冰浴20 min，加入1 mL 1×BD Perm/Wash buffer洗1次，混匀，以2 000 r/min离心10 min，弃上清，每管各加入500 μL 1×BD Perm/Wash buffer/PBS，混匀送检。

1.10　统计学分析

所有结果采用GraphPad Prism 10.1.2软件进行统计和作图，计量资料用$\bar{x}\pm s$表示。不同组别之间采用单因素方差分析，$P<0.05$表示差异具有统计学意义。生存率分析采用Log-rank检验方法。

2　结果

2.1　TSA提升*E. coli*感染小鼠生存率和体质量

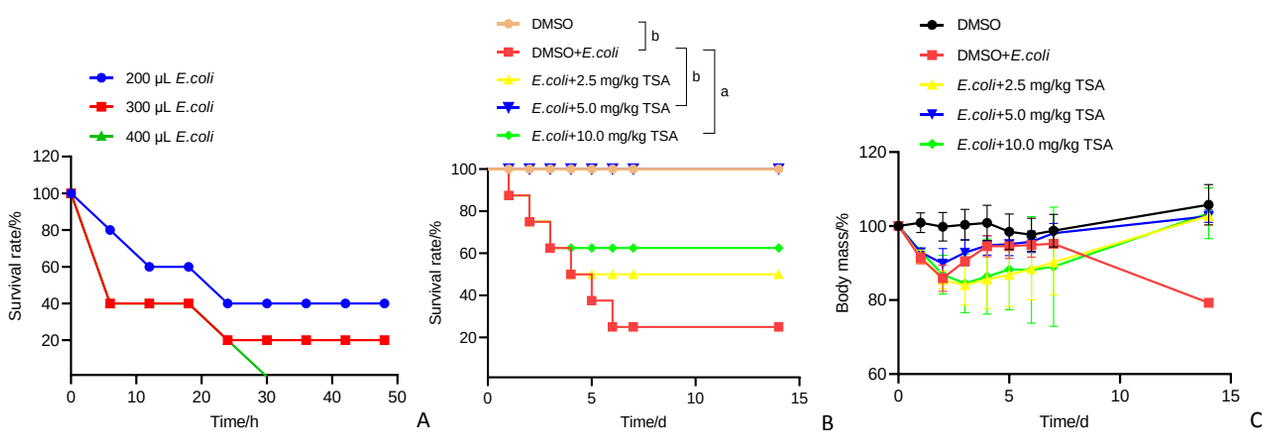
通过向小鼠腹腔注射不同剂量体积的3×10^8 CFU/mL *E. coli*，发现注射剂量200 μL菌液后小鼠死亡率为50%~60%，低于其它剂量（图1A）。故后续实验均选择该注射剂量。与DMSO+*E. coli*组相比，*E. coli*+TSA组生存率明显提高，其中5.0 mg/kg TSA组小鼠在感染后14 d内全部存活（图1B）。尽管在建模后2 d内，DMSO+*E. coli*组和*E. coli*+TSA组（含不同浓度TSA亚组）体质量均大幅度下降，但*E. coli*+TSA组感染后第14天均恢复至与DMSO组无明显差异（图1C）。

2.2　TSA减轻*E. coli*感染小鼠小肠组织损伤

相较于DMSO组，DMSO+*E. coli*组小肠绒毛受损严重、萎缩并伴随肠绒毛上皮脱落坏死，12和48 h可见明显的肠绒毛水肿，绒毛固有层与绒毛上皮细胞分离，组织间隙变大；此外感染后12 h，DMSO+*E. coli*组小肠可见明显出血，24 h出现炎性细胞浸润；干预组（*E. coli*+TSA）可减轻小肠受损情况，改善出血和炎性因子浸润，小肠绒毛恢复正常（图2）。采用不同剂量TSA干预后，小肠病理均得到改善，但仍有绒毛倒伏等情况。与2.5和10.0 mg/kg TSA干预相比，采用5.0 mg/kg TSA干预，小肠病理状态恢复最佳（图3）。

2.3　TSA改变*E. coli*感染小鼠TNF-α和IL-10表达水平

根据生存率结果，选择TSA剂量为5.0 mg/kg进行



A: Optimal concentration gradient of *E. coli*; B: Survival rate among groups in the infection model; C: Body mass of each group. a: $P<0.05$, b: $P<0.01$

图1　TSA对*E. coli*感染小鼠生存率和体质量的影响（n=8）

Figure 1　Effects of TSA on survival rate and body mass in *E. coli*-infected mice (n=8)

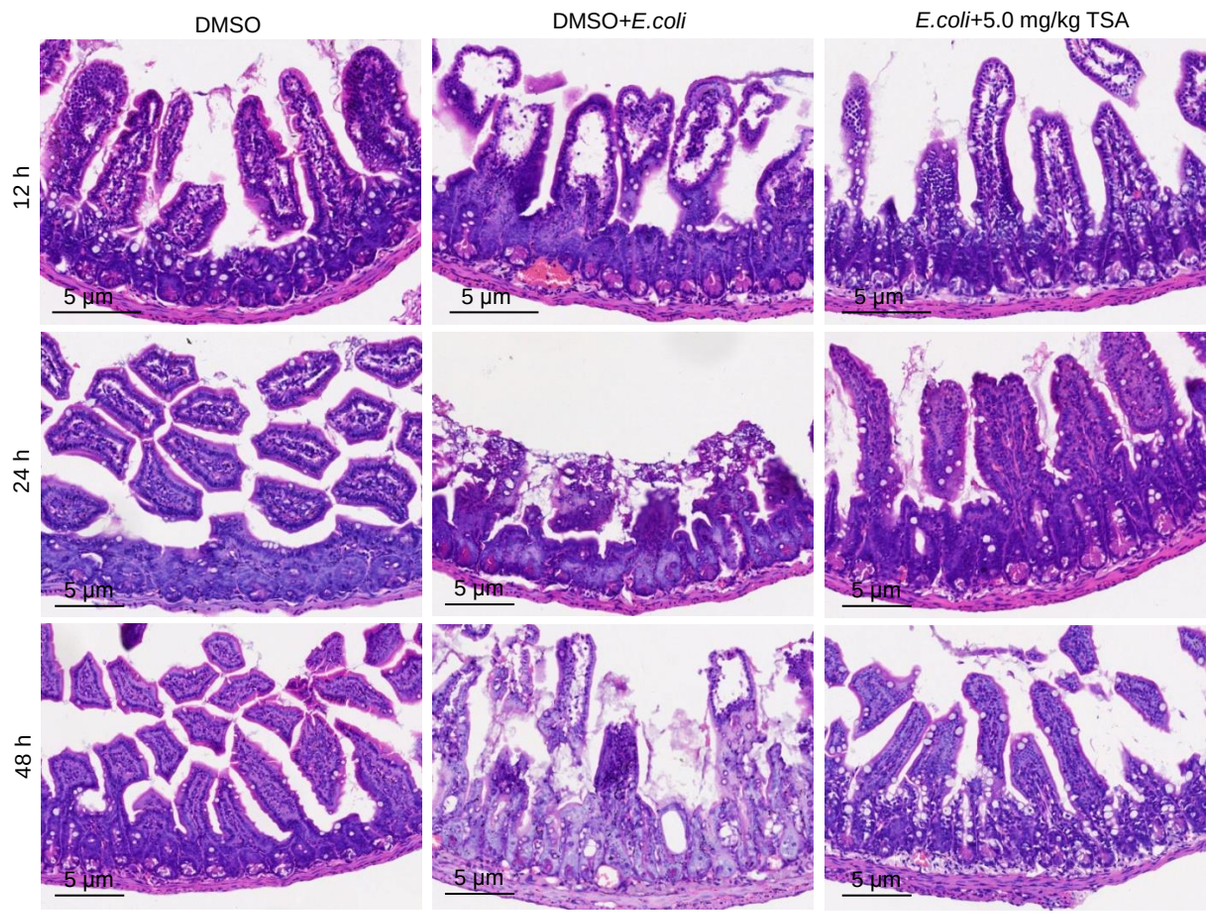


图2 5.0 mg/kg TSA影响*E. coli*感染小鼠12、24、48 h后小肠组织病理的时效实验

Figure 2 Time-course observation on the effect of 5.0 mg/kg TSA intervention on small intestinal histopathological injury in *E. coli*-infected mice at 12, 24, and 48 h post-infection

时效实验,分别于12、24、48 h时间点取各组血清进行ELISA检测。血清检测结果显示,12和24 h时DMSO+*E. coli*组TNF-α和IL-10水平均显著高于DMSO组($P<0.000\ 1$),其中感染后24 h,*E. coli*+5.0 mg/kg TSA组TNF-α水平明显低于DMSO+*E. coli*组($P<0.000\ 1$),并且伴随着IL-10水平的显著升高($P<0.05$,图4)。基于以上结果,选择感染后24 h时间点进行量效实验,采用2.5、5.0、10.0 mg/kg TSA干预,ELISA检测感染后24 h各组血清炎性因子分泌水平。结果发现,DMSO+*E. coli*组血清TNF-α显著高于DMSO组和*E. coli*+TSA组($P<0.000\ 1$);其中5.0 mg/kg TSA干预24 h后血清中TNF-α水平均较2.5、10.0 mg/kg TSA干预低,而血清IL-10水平5.0 mg/kg TSA组明显高于10.0 mg/kg TSA干预($P<0.05$,图5)。

2.4 TSA调控*E. coli*感染小鼠$CD4^+$T细胞分化基因表达

根据前述实验结果,以*E. coli*菌液(3×10^8 CFU/mL)剂量为200 μL造模,TSA干预浓度为5.0 mg/kg,感染24 h后取DMSO组、DMSO+*E. coli*组和*E. coli*+5.0 mg/kg TSA组周围淋巴结和脾组织进行研磨,而后收集细胞,并通过磁珠富集$CD4^+$T细胞进行转录组测序。结果显示,组内相关性好,组间差异显著(图6A~B)。TNF-α和IL-10等基因表达趋势与前期ELISA结果一致,同时KEGG通路富集图可以看出,TSA干预后可以影响调控FoxO、Th17、Th1/2等T细胞分化的信号通路(图6C~D)。

2.5 TSA调控*E. coli*感染小鼠$CD4^+$T细胞亚群

为了进一步检测TSA是否影响了$CD4^+$T细胞各亚群比例的变化,小鼠*E. coli*感染建模和5.0 mg/kg TSA处理后96 h,取小鼠淋巴结和脾组织的混合细胞进行流式细胞分析。结果显示在$CD4^+$T细胞中*E. coli*+5.0 mg/kg TSA组TGF-β表达高于DMSO+*E. coli*组;而IL-17表达低于DMSO+*E. coli*组(图7),表明$CD4^+$T细胞亚群中可能出现Treg细胞比例增多,而Th17细胞比例降低。

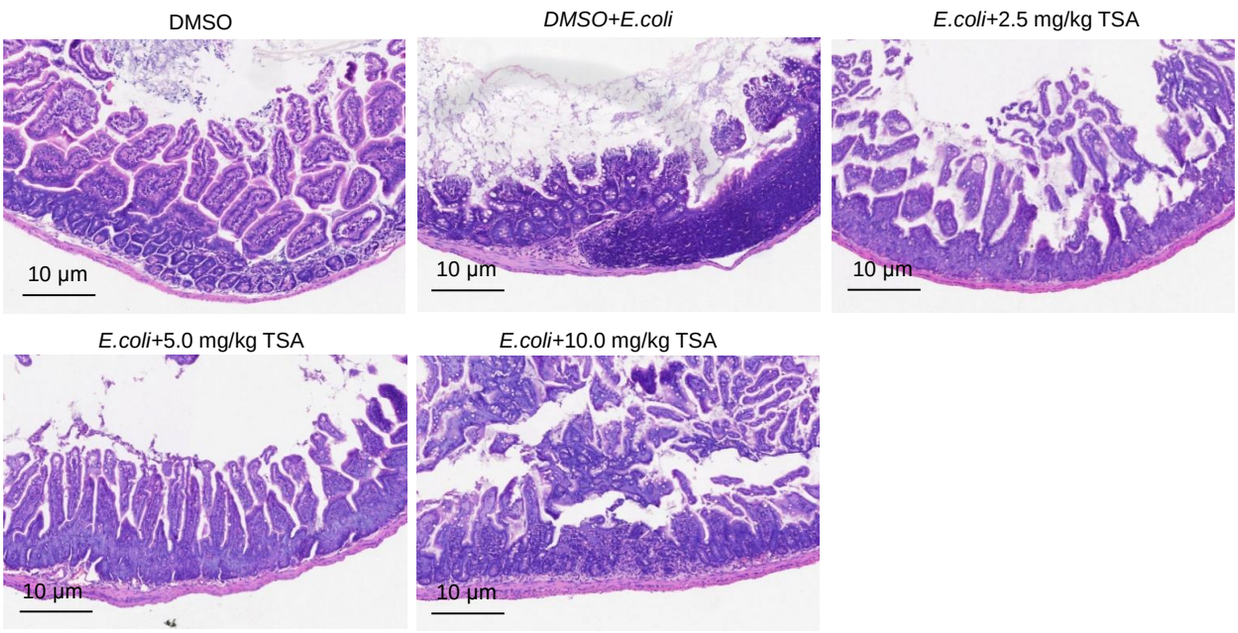
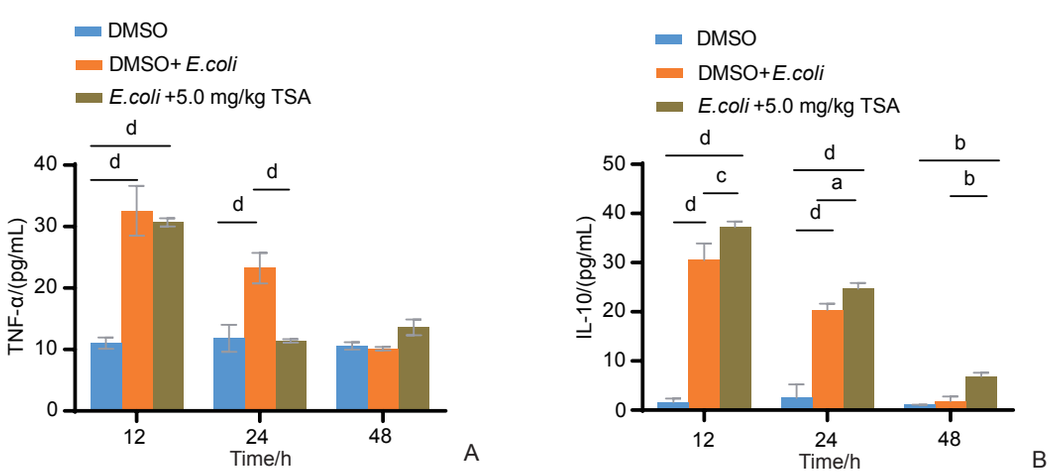


图3 2.5mg/kg、5.0 mg/kg、10.0 mg/kg TSA影响*E. coli*感染小鼠24 h后小肠组织病理的量效实验

Figure 3 Dose-effect relationship of TSA (2.5, 5.0, 10.0 mg/kg) on small intestinal histopathological injury in *E. coli*-infected mice at 24 h post-infection

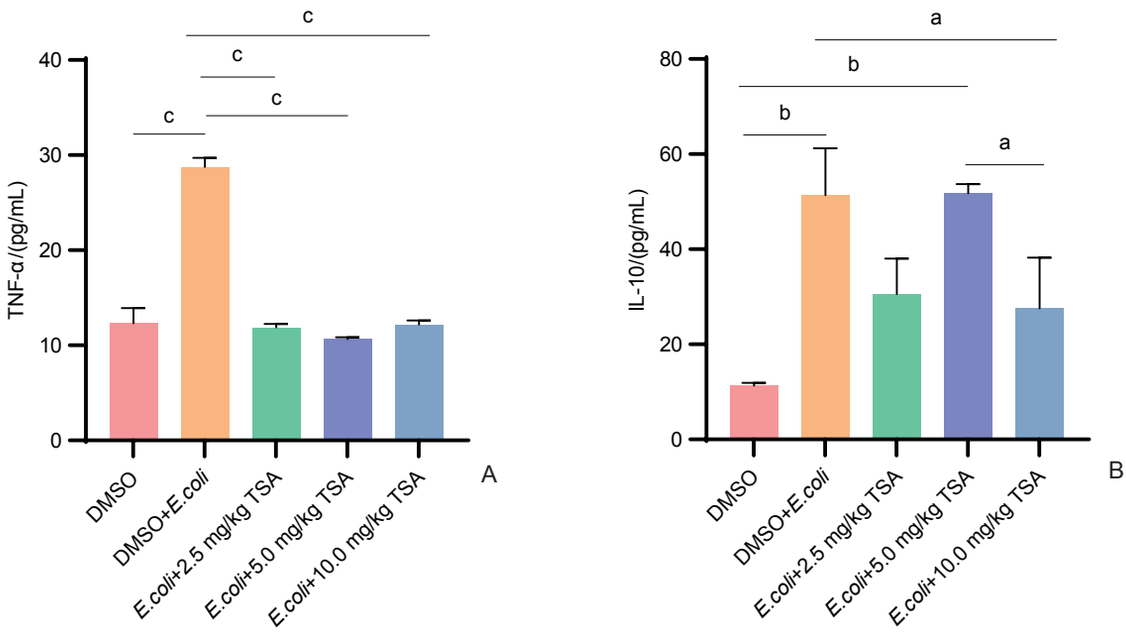


a: P<0.05, b: P<0.01, c: P<0.001, d: P<0.000 1

图4 5.0 mg/kg TSA影响*E. coli*感染小鼠12、24、48 h后TNF-α(A)和IL-10(B)分泌水平的时效实验(n=8)

Figure 4 Time-dependent study of TNF-α (A) and IL-10 (B) secretion levels in mice infected with *E. coli* at 12, 24 and 48 h after 5.0 mg/kg TSA intervention (n=8)

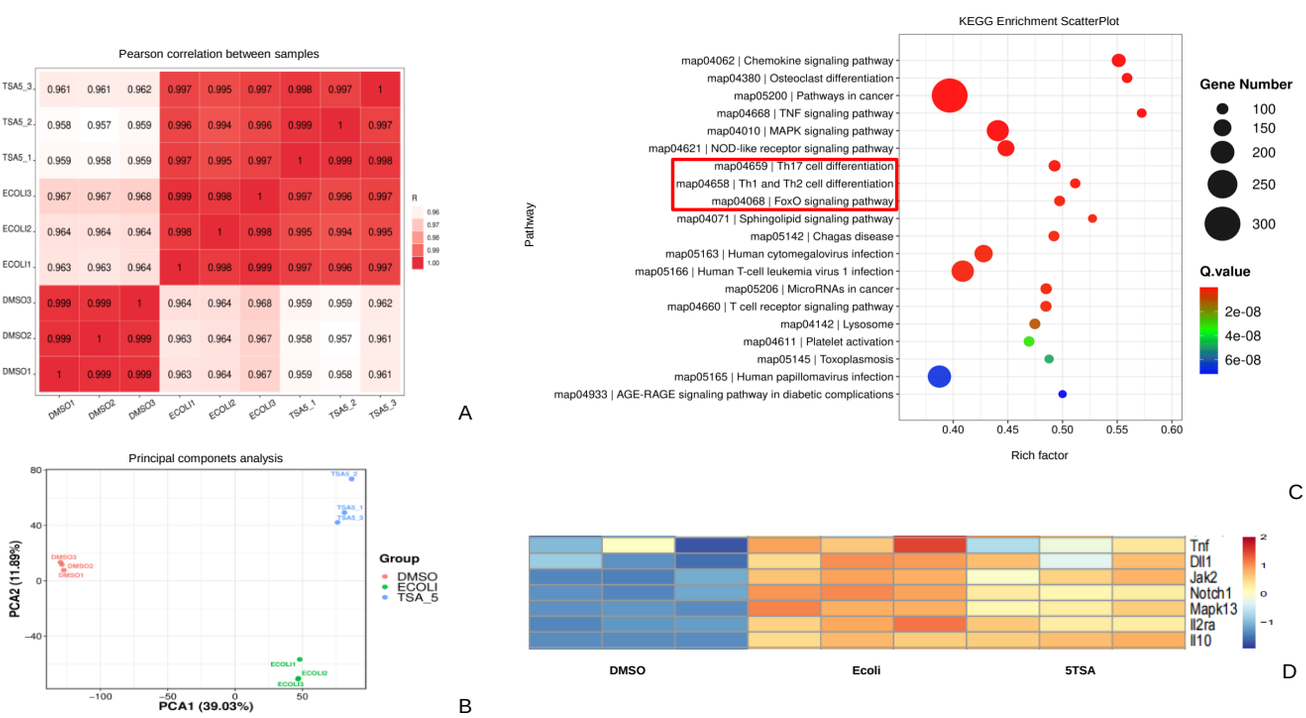
根据前述实验结果,利用RT-qPCR检测5.0 mg/kg TSA处理后各组小鼠*E. coli*感染12、24、48、96 h后的$CD4^+T$细胞亚群基因表达情况。结果如图8显示,12 h时DMSO+*E. coli*组Foxp3表达水平高于DMSO组(P<0.000 1),24、48、96 h时均低于DMSO组(P<0.000 1),而12、24、96 h时*E. coli*+5.0 mg/kg TSA组Foxp3表达水平均高于DMSO+*E. coli*组(P<0.05),与流式细胞检测结果一致,TSA处理增加了Treg细胞比例。与DMSO组相比,DMSO+*E. coli*组和*E. coli*+5.0 mg/kg TSA组的RORγt表达在12、24、48 h均降低,但差异不具有统计学意义;96 h时DMSO+*E. coli*组和*E. coli*+5.0 mg/kg TSA组的RORγt表达显著增加(P<0.000 1);但*E. coli*+5.0 mg/kg TSA组RORγt表达低于DMSO+*E. coli*组,提示感染引起Th17细胞比例升高,而TSA起到降低Th17细胞比例,发挥调节$CD4^+T$细胞亚群平衡的作用。



a: P<0.05, b: P<0.01, c: P<0.000 1

图5 2.5、5.0、10.0 mg/kg TSA影响*E. coli*感染小鼠24 h后TNF-α(A)和IL-10(B)分泌水平的量效实验(n=8)

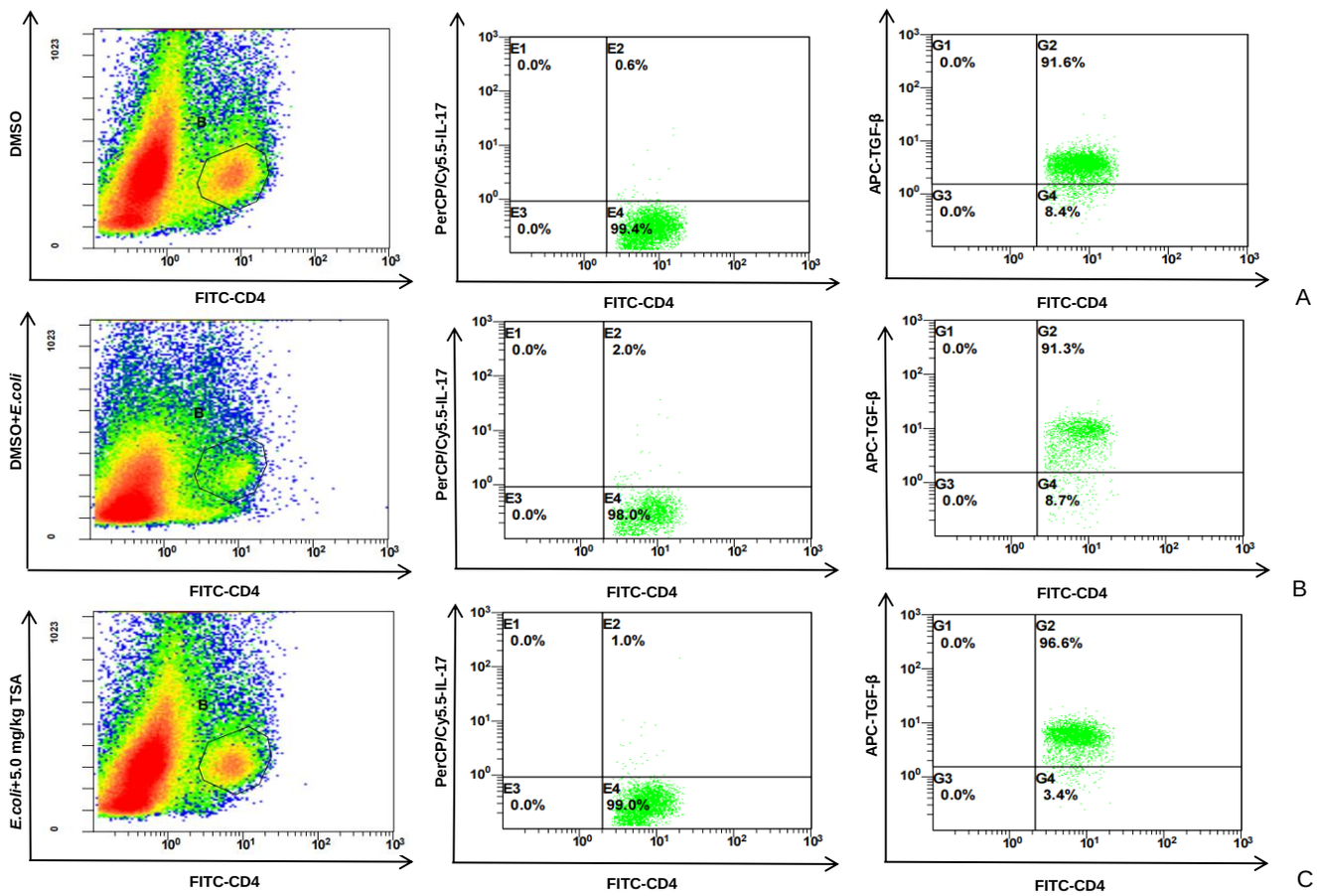
Figure 5 Dose-response study of TSA (2.5, 5.0, 10.0 mg/kg) on TNF-α (A) and IL-10 (B) secretion levels in mice infected with *E. coli* at 24 h after infection (n=8)



A: Correlation analysis between samples; B: Principal component analysis (PCA); C: Scatter plot of KEGG pathway enrichment analysis ontop 20 KEGG cellular processes; D: Heatmap of partially differentiated genes between groups

图6 TSA影响*E. coli*感染小鼠CD4$^+$T细胞作用的转录组测序结果

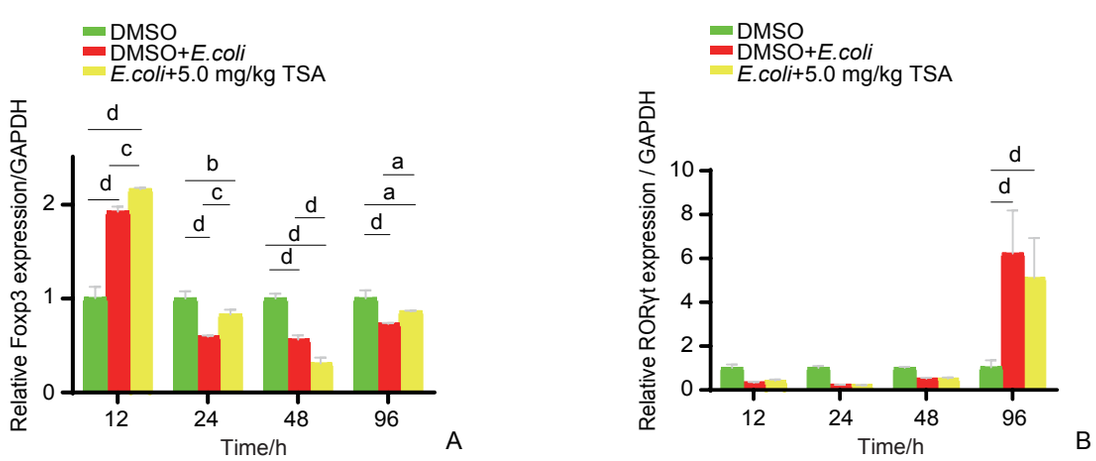
Figure 6 Transcriptome sequencing results showing TSA's effect on *E. coli*-infected mouse CD4$^+$T cells



A~C: Changes in the proportions of $CD4^+$T cell subpopulations in the DMSO, DMSO+*E. coli*, and *E. coli*+5.0 mg/kg TSA groups

图7 5.0 mg/kg TSA影响*E. coli*感染小鼠96 h后$CD4^+$T细胞亚群平衡

Figure 7 Effect of 5.0 mg/kg TSA on $CD4^+$T cell subpopulation balance in *E. coli*-infected mice at 96 h after infection



A and B: Relative mRNA expression levels of Foxp3 (A) and RORγt (B). a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, c: $P<0.001$, d: $P<0.0001$

图8 5.0 mg/kg TSA影响*E. coli*感染小鼠12、24、48、96 h后$CD4^+$T细胞亚群基因mRNA表达检测(n=8)

Figure 8 mRNA Expression of $CD4^+$T cell subsets in mice infected with *E. coli* at 12, 24, 48 and 96 h after 5.0 mg/kg TSA intervention (n=8)

3 讨论

本研究围绕全球常见病原菌感染对机体造成的严重后果,以*E. coli*引发的感染性炎症为例,在前期工作基础上,探讨TSA对*E. coli*感染小鼠预后的影响,并从免疫学角度阐释其作用机制,可为细菌感染性炎症的治疗策略提供实验依据和新思路。

3.1 *E. coli*引发的感染性炎症与免疫失衡

*E. coli*是临床上消化系统疾病最常见的致病菌,亚型众多且具有复杂多样的性质,随着临床药物的滥用,其不断从非致病性演变为高致病性,引起严重疾病的爆发[20]。致病性*E. coli*感染是全球细菌感染发病率和死亡率的重要诱因,其病理核心在于宿主免疫反应的失衡[2-4]。细菌感染会启动机体先天免疫和适应性免疫的应答,经DC抗原递呈作用,使Th0分化为多种$CD4^+$T细胞亚群,如Th1、Th2、Treg、Th17等,通过多种免疫平衡如Treg-Th17、Th1-Th2、Treg-Th1等发挥作用。不同$CD4^+$T细胞亚群发挥的作用各不相同。例如,作为适应性免疫细胞的重要角色之一,Treg在*E. coli*感染免疫中扮演着复杂的“双刃剑”作用:OKEKE等[21]发现Treg能下调炎症免疫反应并帮助维持免疫平衡,即使在非致命性大肠杆菌感染中,Treg的耗竭也会导致死亡,并伴随血清中促炎细胞因子水平的升高;SHA等[22]发现大肠杆菌LF82感染可加剧小鼠结肠炎症,破坏肠道黏膜屏障,增加肠道黏膜通透性,并加剧Th17-Treg失衡和肠道菌群紊乱。因此,挖掘调控包括Treg在内的$CD4^+$T细胞亚群功能的关键药物可能是有效治疗*E. coli*感染的新路径。

3.2 TSA与炎症反应和免疫细胞功能

TSA相关研究多集中在表观遗传学领域。近年来,越来越多的研究显示,TSA与炎症反应关系密切,而且可能参与了对机体免疫细胞功能的调控。本团队前期工作发现,TSA能够抑制脂多糖(lipopolysaccharides,LPS)刺激淋巴细胞的分泌功能,其机制可能与新型转录因子Musculin(MSC)、IL-17和IL-22的表达变化有关[23]。另有研究发现,TSA能增加Treg数量,阻止Treg向Th17转分化[24-25]。新近研究还发现,TSA具有抗炎抗菌的作用:LI等[26]发现TSA与丁酸盐一样能明显抑制炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)中性粒细胞产生促炎细胞因子、趋化因子和钙卫蛋白。

本研究发现,5.0 mg/kg TSA能够显著提高*E. coli*感染小鼠生存率,有效缓解*E. coli*感染导致的体质量下降,显著改善小肠肠道病理损伤。这些保护效应与炎症状态的改善直接相关,也与前述文献报道一致。另外,TSA干预(尤其5 mg/kg)在*E. coli*感染关键期(即感染后24 h)能显著降低血清中的促炎因子TNF-α水平,明显提升抗炎因子IL-10水平。由于IL-10是维持免疫稳态、限制过度炎症的关键因子,主要由Treg等免疫细胞分泌,而Treg是$CD4^+$T细胞的重要亚群之一。该结果提示,TSA的抗炎作用机制有可能与包括Treg在内的$CD4^+$T细胞亚群有关。

3.3 TSA通过调控$CD4^+$T细胞亚群改善*E. coli*感染小鼠预后

作为HDAC抑制剂,TSA可能通过改变染色质构象(如增加Foxp3基因位点的组蛋白乙酰化水平),解除对Foxp3基因的转录抑制,从而促进Foxp3的表达和Treg的功能[13,19]。本研究通过转录组测序和RT-qPCR检测发现,TSA对$CD4^+$T细胞分化具有明显调控作用,特别是对Treg的激活。*E. coli*感染96 h后,5.0 mg/kg TSA干预可显著上调脾组织和周围淋巴结(腹股沟、腋窝、颈部)中Treg关键转录因子Foxp3的mRNA表达水平,并伴随着RORγt(Th17标志转录因子)表达的下调。Foxp3是Treg发育和功能执行的核心调控因子,其表达水平直接决定了Treg的免疫抑制能力[5-7],Th17细胞在介导细菌感染,尤其是肠道炎症中扮演着促炎角色,TSA可能通过抑制Th17的分化,协同Treg的增强,即TSA可能通过调控Treg-Th17平衡促进炎症消退和组织修复。RT-qPCR检测发现,在感染早期即48 h以前,DMSO+*E. coli*组和*E. coli*+5.0 mg/kg TSA组Foxp3(除12 h时)和RORγt的表达都明显低于DMSO组,可能由于细菌感染后引起机体内T细胞分化需要时间;在感染时长达96 h时,RORγt在*E. coli*+5.0 mg/kg TSA组和DMSO+*E. coli*组的表达均显著高于DMSO组,且*E. coli*+5.0 mg/kg TSA组表达水平低于DMSO+*E. coli*组;而96 h时Foxp3在*E. coli*+5.0 mg/kg TSA组表达高于DMSO+*E. coli*组;96 h流式细胞检测结果也与RT-qPCR结果趋势一致。这提示在感染中后期,TSA可能是通过调控$CD4^+$T细胞朝向Treg亚群分化同时抑制其向Th17亚群分化,从而抑制促炎因子释放来缓解细菌感染性炎症疾病。在感染后24 h,*E. coli*+5.0 mg/kg TSA组小鼠状态明显优于DMSO+*E. coli*组,可能是由于在感染急性期,TSA还参与调控巨噬细胞、树突状细胞等先天免疫细胞分泌炎性因子所致。

3.4 不足与展望

本研究仅完成了小鼠在体实验。体内因素错综复杂,虽然在反映TSA缓解*E. coli*引发的感染性炎症方面能够得到科学有效结果,但在机制探讨中,未能

简化干扰因素,尚无法阐释$CD4^+$T细胞亚群在此过程中的精准作用。因此,在未来的工作中,开展体外实验,尤其是通过体外定向诱导实验来确定$CD4^+$T细胞亚群的动态分化和转分化过程仍是必要的。

细菌感染性疾病的防控始终是全球范围面临的重要卫生课题[27]。本研究发现,5.0 mg/kg TSA能够对*E. coli*感染小鼠小肠肠道病理起保护作用,抑制炎症反应,修复小肠损伤,改善预后,其机制可能与TSA可调控$CD4^+$T细胞亚群(尤其是Treg-Th17平衡)有关。本研究揭示了TSA在抗菌抗炎方面的新作用,可为其在炎症与免疫领域的机制探讨奠定基础,促进细菌感染性疾病的防治进程。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] IKUTA K S, SWETSCHINSKI L R, ROBLES AGUILAR G, *et al*. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019[J]. Lancet, 2023, 400(10369): 2221-2248. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)02185-7.

[2] DE VOS W M, TILG H, VAN HUL M, *et al*. Gut microbiome and health: mechanistic insights[J]. Gut, 2022, 71(5): 1020-1032. DOI: 10.1136/gutjnl-2021-326789.

[3] LLOYD-PRICE J, ARZE C, ANANTHAKRISHNAN A N, *et al*. Multi-omics of the gut microbial ecosystem in inflammatory bowel diseases[J]. Nature, 2019, 569(7758): 655-662. DOI: 10.1038/s41586-019-1237-9.

[4] SCHIRMER M, GARNER A, VLAMAKIS H, *et al*. Microbial genes and pathways in inflammatory bowel disease[J]. Nat Rev Microbiol, 2019, 17(8): 497-511. DOI: 10.1038/s41579-019-0213-6.

[5] NUSSBAUM L, CHEN Y L, OGG G S. Role of regulatory T cells in psoriasis pathogenesis and treatment[J]. Br J Dermatol, 2021, 184(1): 14-24. DOI: 10.1111/bjd.19380.

[6] PALOMARES O, ELEWAUT D, IRVING P M, *et al*. Regulatory T cells and immunoglobulin E: a new therapeutic link for autoimmunity?[J]. Allergy, 2022, 77(11): 3293-3308. DOI: 10.1111/all.15449.

[7] SAITO T, NISHIKAWA H, WADA H, *et al*. Two $FOXP3^+CD4^+$T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers[J]. Nat Med, 2016, 22(6): 679-684. DOI: 10.1038/nm.4086.

[8] BRINKHOFF A, SIEBERICHS A, ENGLER H, *et al*. Pro-inflammatory Th1 and Th17 cells are suppressed during human experimental endotoxemia whereas anti-inflammatory IL-10 producing T-cells are unaffected[J]. Front Immunol, 2018, 9: 1133. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01133.

[9] SUVAS S, ROUSE B T. Treg control of antimicrobial T cell responses[J]. Curr Opin Immunol, 2006, 18(3): 344-348. DOI: 10.1016/j.coi.2006.03.005.

[10] SABBAGH P, KARKHAH A, NOURI H R, *et al*. The significance role of regulatory T cells in the persistence of infections by intracellular bacteria[J]. Infect Genet Evol, 2018, 62: 270-274. DOI: 10.1016/j.meegid.2018.05.001.

[11] GLAUBITZ J, WILDEN A, FROST F, *et al*. Activated regulatory T-cells promote duodenal bacterial tra nslocation into necrotic areas in severe acute pancreatitis[J]. Gut, 2023, 72(7): 1355-1369. DOI: 10.1136/gutjnl-2022-327448.

[12] ROSENBLUM M D, GRATZ I K, PAW J S, *et al*. Response to self antigen imprints regulatory memory in tissues[J]. Nature, 2011, 480(7378): 538-542. DOI: 10.1038/nature10664.

[13] AZEVEDO R I, MINSKAIA E, FERNANDES-PLATZGUMMER A, *et al*. Mesenchymal stromal cells induce regulatory T cells *via* epigenetic conversion of human conventional CD4 T cells *in vitro*[J]. Stem Cells, 2020, 38(8): 1007-1019. DOI: 10.1002/stem.3185.

[14] DAHIYA A, AGRAWALA P K, DUTTA A. Mitigative and anti-inflammatory effects of Trichostatin A against radiation-induced gastrointestinal toxicity and gut microbiota alteration in mice[J]. Int J Radiat Biol, 2023, 99(12): 1865-1878. DOI: 10.1080/09553002.2023.2242929.

[15] SU Q, REN Y H, LIU G W, *et al*. Trichostatin A relieves anxiety-and depression-like symptoms in APP/PS1 mice[J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1333235. DOI: 10.3389/fphar.2024.1333235.

[16] GÜVEN M, TAŞPıNAR F, DENIZLER-EBIRI F N, *et al*. The antagonistic effects of temozolomide and trichostatin a combination on MGMT and DNA mismatch repair pathways in Glioblastoma[J]. Med Oncol, 2023, 40(8): 223. DOI: 10.1007/s12032-023-02079-6.

[17] CUI S N, CHEN Z Y, YANG X B, *et al*. Trichostatin A modulates the macrophage phenotype by enhancing autophagy to reduce inflammation during polymicrobial sepsis[J]. Int Immunopharmacol, 2019, 77: 105973. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.105973.

[18] 胡晓兰, 张晓, 李倩, 等. 曲古抑菌素A对脂多糖诱导的巨噬细胞炎症细胞因子、Toll样受体4表达及核因子-κB乙酰化的影响[J]. 生理学报, 2012, 64(6): 651-656. DOI: 10.13294/j.aps.2012.06.001.
HU X L, ZHANG X, LI Q, *et al*. Effects of trichostatinAon the expressions of inflammatory cytokines and toll-like receptor 4 and the acetylation of nuclear factor-κB induced by lipopolysaccharide in macrophage[J]. Acta Physiol Sin,

2012, 64(6): 651-656. DOI: 10.13294/j.aps.2012.06.001.

[19] DOÑAS C, FRITZ M, MANRÍQUEZ V, *et al*. Trichostatin A promotes the generation and suppressive functions of regulatory T cells[J]. Clin Dev Immunol, 2013, 2013: 679804. DOI: 10.1155/2013/679804.

[20] NESTA B, PIZZA M. Vaccines against *Escherichia coli*[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2018, 416: 213-242. DOI: 10.1007/82_2018_111.

[21] OKEKE E B, OKWOR I, MOU Z R, *et al*. $CD4^+CD25^+$regulatory T cells attenuate lipopolysaccharide-induced systemic inflammatory responses and promotes survival in murine *Escherichia coli* infection[J]. Shock, 2013, 40(1): 65-73. DOI: 10.1097/SHK.0b013e318296e65b.

[22] SHA S M, ZENG H, GAO H J, *et al*. Adherent-invasive *Escherichia coli* LF82 aggravated intestinal inflammation in colitis mice by affecting the gut microbiota and Th17/Treg cell differentiation balance[J]. Arch Microbiol, 2023, 205(6): 218. DOI: 10.1007/s00203-023-03570-4.

[23] 刘一佳, 余静, 张伟, 等. 曲古抑菌素A抑制小鼠周围淋巴结细胞分泌功能[J]. 第三军医大学学报, 2020, 42(3): 253-258. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201909174.
LIU Y J, YU J, ZHANG W, *et al*. Inhibitory role of trichostatin A in secretion function of mouse peripheral lymph node cells[J]. J Third Mil Med Univ, 2020, 42(3): 253-258. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201909174.

[24] YAMAMOTO R, SAITO M, SAITO T, *et al*. Treg expansion with trichostatin A ameliorates kidney ischemia/reperfusion injury in mice by suppressing the expression of costimulatory molecules[J]. Transpl Immunol, 2020, 63: 101330. DOI: 10.1016/j.trim.2020.101330.

[25] SUGIMOTO K, ITOH T, TAKITA M, *et al*. Improving allogeneic islet transplantation by suppressing Th17 and enhancing Treg with histone deacetylase inhibitors[J]. Transpl Int, 2014, 27(4): 408-415. DOI: 10.1111/tri.12265.

[26] LI G F, LIN J, ZHANG C, *et al*. Microbiota metabolite butyrate constrains neutrophil functions and ameliorates mucosal inflammation in inflammatory bowel disease[J]. Gut Microbes, 2021, 13(1): 1968257. DOI: 10.1080/19490976.2021.1968257.

[27] 刘佳为, 王渊, 徐静, 等. 277例糖尿病足感染病原微生物分布及耐药性分析[J]. 陆军军医大学学报, 2024, 46(23): 2655-2660.
LIU J W, WANG Y, XU J, *et al*. Distribution and drug resistance of pathogenic microorganisms in 277 cases of diabetic foot infection[J]. J Army Med Univ, 2024, 46(23): 2655-2660.

(**收稿**:2025-07-03;**修回**:2025-10-21)

(编辑 邓强庭)