

甲磺司特通过抑制 GATA3 介导的 Th2 细胞分化治疗肺纤维化

刘畅^{1,2}, 刘姗姗¹, 李云炫³, 花芳¹, 吕晓希^{1*}

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050; 2. 首都儿科研究所附属儿童医院, 北京 100020;
3. 中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要: 肺纤维化是威胁人类健康的慢性呼吸系统炎性疾病。肺部组织局部的免疫微环境调控了纤维化疾病进程。本研究观察了甲磺司特抗肺纤维化疗效及其生物学机制。甲磺司特是辅助性 T 细胞 2 (T helper 2, Th2) 细胞因子抑制剂, 用于临床支气管哮喘的治疗, 但其是否能用于慢性肺纤维化的治疗及抑制 Th2 细胞因子释放的生物学机制并不清晰。通过体内及体外研究发现, 甲磺司特可以显著抑制多次博来霉素损伤所致慢性肺纤维化发病, 改善肺功能, 减少肺部胶原沉积。同时甲磺司特通过抑制 Th2 细胞分化, 显著减少 Th2 型细胞因子释放, 但并不影响辅助性 T 细胞 1 (T helper 1, Th1) 细胞分化及 Th1 型细胞因子释放。进一步研究显示甲磺司特通过抑制信号传导及转录激活蛋白 5 (signal transducer and activator of transcription 5, STAT5) 及哺乳动物雷帕霉素靶标 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 的磷酸化, 下调 GATA 结合蛋白 3 (GATA-binding protein 3, GATA3) 的表达及活性抑制 Th2 细胞分化。肺部过表达 GATA3 可以翻转甲磺司特的抗肺纤维化疗效。本实验所有动物实验均通过中国医学科学院药物研究所伦理审查委员会审查。本研究不仅阐释了甲磺司特的药理学作用机制, 还为临床抗肺纤维化药物治疗提供了新的选择。

关键词: 博来霉素; 免疫; 细胞因子; Th2 型细胞; 呼吸系统炎性疾病

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)11-2977-08

Suplatast tosilate attenuates pulmonary fibrosis by inhibiting the GATA3 induced Th2 differentiation

LIU Chang^{1,2}, LIU Shan-shan¹, LI Yun-xuan³, HUA Fang¹, LÜ Xiao-xi^{1*}

(1. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. Drug Clinical Trial Institution, Children's Hospital, Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China; 3. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Pulmonary fibrosis (PF) is a chronic respiratory inflammation disease that threatens human health. The topical immune microenvironment of lung tissue regulates progression of fibrosis. In this study, the efficacy and molecular mechanism of suplatast tosilate (ST) against PF were observed. ST is a T helper 2 (Th2) cytokine inhibitor for clinical treatment of bronchial asthma. But whether it can be applied to therapy of chronic PF and the biomechanism of ST inhibiting Th2 cytokine release are not clear. Using *in vivo* and *in vitro* experiments, we found that ST can significantly suppress the pathogenesis of chronic PF induced by multiple bleomycin injury, improve the lung function, and decrease the deposition of collagen in lung tissue. In addition, ST decreases Th2 cytokine releasing through restraining Th2 cell differentiation in the meantime, but did not influence the T helper 1 (Th1) cell differentiation and Th1 cytokine releasing. Further studies showed that ST inhibits Th2 cell differentiation by

收稿日期: 2021-07-02; 修回日期: 2021-08-20.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82173875); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2021-1-12M-026).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-83165034, E-mail: lvxiaoxi@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0984

down-regulating GATA-binding protein 3 (GATA3) expression and activity through inhibiting the phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) and mammalian target of rapamycin (mTOR). The excessive expression of GATA3 in lungs can reverse the anti-PF effect of ST. All procedures involving animal treatment were approved according to the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences. Our research not only clarifies the pharmacological mechanism of ST, but also provides a new selection for clinical anti-PF drug therapy.

Key words: bleomycin; immune; cytokine; Th2 cell; respiratory inflammatory disease

肺纤维化是由多种病因所导致的肺上皮损伤及大量细胞外基质沉积所致病理改变。肺纤维化存在于多种慢性呼吸系统性疾病发病过程中,如肺炎、哮喘和慢性阻塞性肺病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 等^[1]。肺纤维化患者通常临床预后不佳,特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 患者在诊断后中位生存时间仅为3~5年^[2]。在肺纤维化发病过程中,内、外致病源造成肺泡上皮损伤的同时也会引发免疫细胞生物学功能变化。受损组织免疫微环境的改变可诱导多种免疫细胞极化方向的改变,包括T细胞、巨噬细胞等。CD4⁺ T细胞是调节机体免疫微环境的重要细胞组成部分,辅助性T细胞1 (T helper 1, Th1) 及其细胞因子干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ) 及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 已被证实具有一定的抗纤维化功能,而辅助性T细胞2 (T helper 2, Th2) 及其细胞因子白细胞介素-4 (interleukin-4, IL-4) 和IL-6等则促进了肺纤维化发生及发展^[3]。IPF患者组支气管灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 和肺组织内IFN- γ 及IL-2的含量降低,而IL-4和IL-5表达升高^[4]。因此,调节肺组织局部,特别是纤维化部位的Th1/Th2平衡将有助于肺纤维化疾病转归。目前肺纤维化发病机制尚不清晰,临床上缺乏安全有效的治疗手段。甲磺司特 (suplatast tosilate, ST) 是日本大鹏Taiho公司开发的一种Th2细胞因子抑制剂,可明显抑制支气管壁中嗜酸性细胞的产生,临床用于治疗过敏性疾病如支气管哮喘、特应性皮炎和过敏性鼻炎^[5]。有证据表明甲磺司特可以抑制Th2型细胞因子的释放,并抑制肥大细胞增殖及活化^[6,7],但具体分子生物学机制不明。本研究观察了甲磺司特是否具有抑制肺纤维化发生及发展的药理学作用,同时分析了甲磺司特抑制Th2细胞因子释放的分子机制。本研究不仅阐述了治疗肺纤维化的干预模式,更对肺纤维化患者的临床药物治疗提供了新的理论支持。

材料与方法

试剂及仪器 博莱霉素 (bleomycin, BLM) 购自日本化药株式会社;羟脯氨酸检测试剂盒购自南京建成

生物工程技术有限公司;Masson三色染色试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。GATA3-RE Luciferase质粒购自Novus biologicals公司, TBRE-TK Luciferase质粒获得自Addgene公司。荧光定量PCR引物:T细胞内T-box (T-box expressed in T cells, T-bet): 5'-AAC CAGTATCCTGTTCCAGC-3', anti-sense: 5'-TGTCGCCACTGGAAGGATAG-3', GATA结合蛋白 (GATA-binding protein 3, GATA3): sense: 5'-CTCCTTTTGTCTCCTTTTC-3', anti-sense: 5'-AAGAGATGAGGACTGGAGTG-3'。甲磺司特由重庆植恩药业有限公司提供。小鼠GATA3过表达腺病毒购自汉恒生物公司。PCR仪和荧光定量PCR仪购自美国Bio-Rad公司;ImageQuant LAS 4000 mini成像系统购自美国通用电气公司;流式细胞分析仪购自美国BD公司。

肺纤维化动物模型 本实验所有动物实验均通过中国医学科学院药物研究所伦理审查委员会审查。雄性C57BL/6J小鼠,SPF级别,20g,6~8周龄,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司(实验动物许可证号002802)。多次博莱霉素诱导肺纤维化模型制备方法:小鼠隔夜禁食,使用三溴乙醇麻醉小鼠,气管内给予博莱霉素(1 U·kg⁻¹)。使用气管插管或滴鼻方法向气管内给予50 μ L博莱霉素^[8],并迅速旋转操作板,使博莱霉素能够均匀进入肺叶,而后直立放置5 min。整个操作在60℃左右的手术操作台进行。小鼠2周造模1次,总共6次^[9]。于最后一次造模后10天开始给予甲磺司特50 mg·kg⁻¹灌胃,连续30天后取材。过表达GATA3实验中,于最后一次造模后10天向每只小鼠气管内滴注GATA3-Ad腺病毒1 \times 10⁸ U。

小鼠肺功能检测 小鼠使用三溴乙醇麻醉后置于Flexivent小动物肺功能系统 (flexiVent, SCIREQ Inc., Montreal, Canada) 上。小鼠设定通气量为10 mL·kg⁻¹,呼吸频率为每分钟150次,小动物肺功能分析仪检测小鼠的吸气、呼气气道阻力和肺顺应性等数据,并进行数据分析。

羟脯氨酸含量检测 称量小鼠左肺湿重,匀浆后取200 μ L上清,在玻璃试管中加入550 μ L水解液,混匀后在95℃水解20 min。调节pH值后定容,使用

活性炭处理后,离心取上清。按照试剂盒说明书进行操作,测各管的吸光度,使用吸光度计算羟脯氨酸的含量,详见南京建成公司羟脯氨酸测定试剂盒说明书。

小鼠脾脏CD4⁺T细胞分离 取小鼠脾脏,通过机械分离法制备单细胞悬液,使用美天旋小鼠CD4⁺T细胞分离试剂盒分离脾脏内T细胞,具体操作见说明书。分离后的T细胞使用CD4抗体进行流式细胞术检测,CD4⁺细胞比例大于90%。

Th1及Th2细胞诱导分化 用CD3和CD28抗体包被48孔板,每孔加入 5×10^5 个细胞。在培养基中加入相应量的细胞因子进行诱导^[10]。Th1诱导剂:15 ng·mL⁻¹重组IL-12、30 U·mL⁻¹重组IL-2和5 000 ng·mL⁻¹anti-IL-4。Th2诱导剂:10 ng·mL⁻¹重组IL-4、30 U·mL⁻¹重组IL-2、2 000 ng·mL⁻¹可溶性anti-CD28,和5 000 ng·mL⁻¹anti-IFN- γ 。37 °C、5% CO₂条件培养3天后进行流式细胞术检测。

统计学分析 使用GraphPad Prism 5统计分析软件进行数据统计和计算,文中的结果采用均值(\bar{x})±标准差(standard error of mean, SEM)表示,两组之间的

均值比较采用Student's *t*检验,多于两组的组间分析使用one-way ANOVA Tukeys' multiple comparison 检验。

结果

1 甲磺司特减轻慢性肺纤维化病理改变

本研究使用多次博莱霉素(multiple bleomycin, mBLM)所诱导肺纤维化模型,观察到慢性肺纤维化小鼠肺部有大量炎性细胞浸润,同时有明显胶原沉积和纤维化病理改变(图1A)。纤维化小鼠肺部羟脯氨酸含量显著增加(图1B),肺指数明显升高(图1C)。同时肺功能测定表明慢性肺纤维化小鼠肺深吸气量(inspiratory capacity, IC)显著降低;肺动态阻力(respiratory system resistance, Rrs)显著增加;动态弹性(respiratory system elastance, Ers)显著增加;动态顺应性(respiratory system compliance, Crs)显著降低,证明小鼠肺部已经出现明显纤维化病理改变(图1D)。甲磺司特治疗30天显著减少炎性细胞浸润和细胞外基质沉积;降低肺部羟脯氨酸含量及肺重指数,明显改善小鼠肺功能(图1A~D)。以上结果表明,甲磺司特对于mBLM所致慢性肺纤维化具有较好的治疗效果。

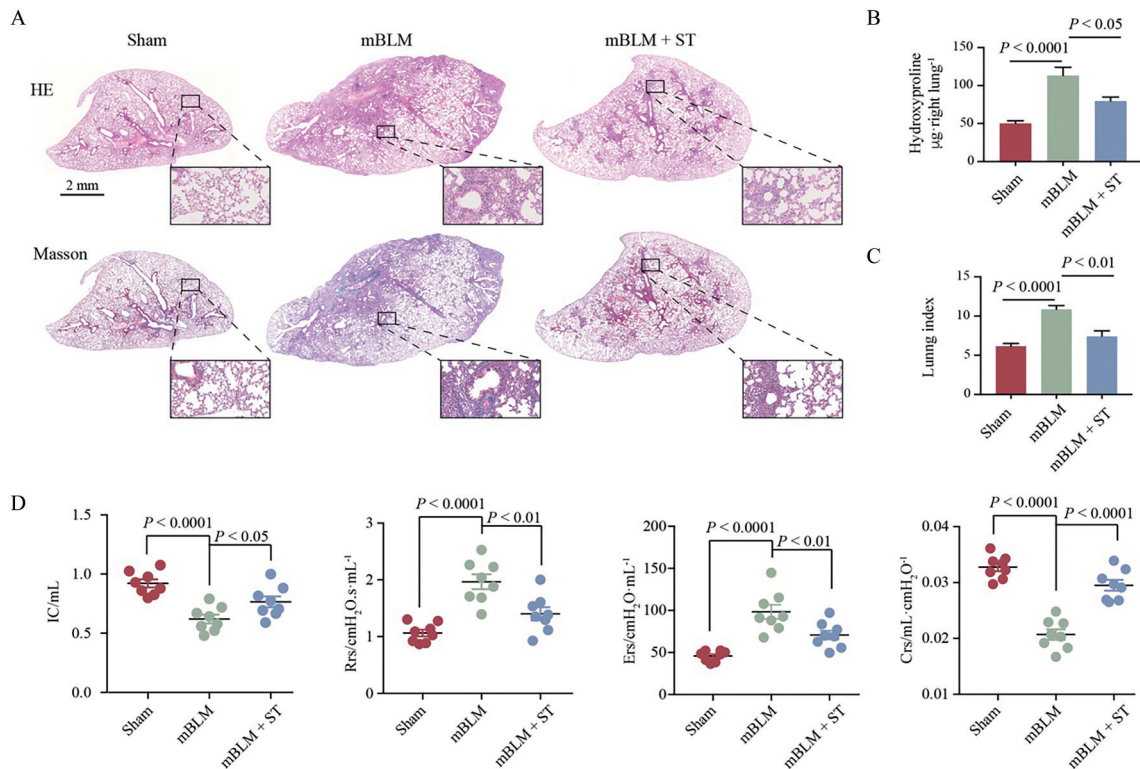


Figure 1 Suplatast tosilate (ST) attenuates pulmonary fibrosis (PF) development. A: Hematoxylin-eosin staining (HE, up) and Masson staining (down) were analyzed to evaluate the lung fibrotic changes of multiple bleomycin (mBLM)-challenged mice along with ST treatment. Scale bars, 2 mm; B, C: Hydroxyproline content (B) and lung index (C) were assessed to evaluate the PF changes; D: Pulmonary function indices including inspiratory capacity (IC), respiratory system resistance (Rrs), respiratory system elastance (Ers), and respiratory system compliance (Crs) were detected in indicated mice. $n = 8$, mean \pm SEM. Statistical significance among groups was determined by one-way ANOVA

2 甲磺司特抑制 Th2 细胞分化

以往的研究表明甲磺司特是特异性 Th2 细胞因子抑制剂。因此,本研究首先观察了小鼠肺部 CD4⁺ T 辅助细胞的极化方向。mBLM 组小鼠肺部 Th2 细胞数量显著增加,而甲磺司特治疗后 Th2 细胞比例明显降低,同时 Th1 细胞比例显著增加(图 2A)。此外, mBLM 组小鼠 BALF 内 Th1 型细胞因子 IFN- γ 量有增加趋势,而 TNF- α 量显著增加,甲磺司特治疗后 IFN- γ 水平明显提升,同时轻微增加 TNF- α 水平(图 2B)。mBLM 小鼠 BALF 内 Th2 型细胞因子 IL-4、IL-6 及 IL-13 的水平均显著上调,经甲磺司特治疗后,这些 Th2 型细胞因子数

量均明显降低(图 2C)。由于甲磺司特不仅降低了 Th2 型细胞因子含量,同时还减少了 Th2 细胞比例,因此本研究观察了甲磺司特是否能够直接抑制辅助性 T 细胞 0 (T helper 0, Th0) 向 Th2 细胞分化。通过体外诱导实验,观察到甲磺司特可以抑制 Th0 细胞向 Th2 细胞分化(图 2D),但不抑制 Th0 细胞向 Th1 细胞分化(图 2E)。这些结果说明,甲磺司特是通过抑制 Th2 细胞分化降低肺纤维化组织中 Th2 细胞因子含量的。

3 甲磺司特抑制 GATA3 表达及活性

辅助性 T 细胞的分化受到多种核因子的调控,其中 T-bet 主要介导 Th1 型细胞分化,而 GATA3 介导了

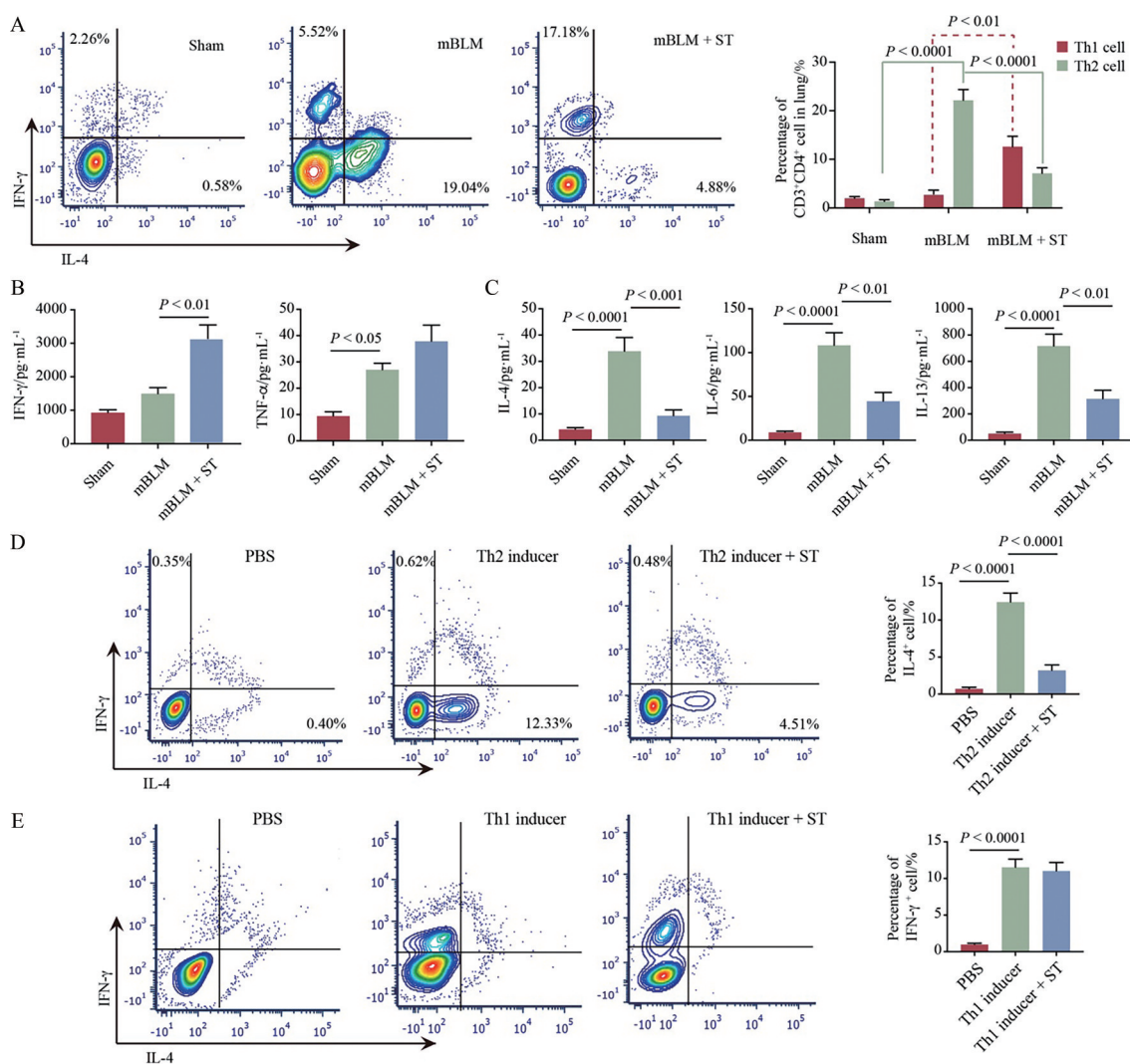


Figure 2 ST promotes T helper 1 (Th1) polarization and restrains T helper 2 (Th2) polarization. A: Flow cytometry analyses (left) and quantitative diagram (right) of Th1 and Th2 cell percentage in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) from indicated mice ($n = 6$); B: Contents of Th1 cytokines were measured in BALF ($n = 6$); C: Contents of Th2 cytokines were detected in BALF ($n = 6$); D: Th2 polarization proportion in splenic T cells was measured by flow cytometry after indicated treatment ($n = 5$, Th2 inducer: 10 ng·mL⁻¹ IL-4, 30 U·mL⁻¹ IL-2, 2 000 ng·mL⁻¹ soluble anti-CD28, and 5 000 ng·mL⁻¹ anti-IFN- γ); E: Proportion of Th1 differentiation in splenic T cells was analyzed by flow cytometry after indicated exposure ($n = 5$, Th1 inducer: 15 ng·mL⁻¹ IL-12, 30 U·mL⁻¹ IL-2, and 5 000 ng·mL⁻¹ anti-IL-4). Mean \pm SEM. Statistical significance among groups was determined by one-way ANOVA. PBS: Phosphate buffer saline; IFN- γ : Interferon- γ ; TNF- α : Tumor necrosis factor- α ; IL: Interleukin

Th2 型细胞分化。本研究发现甲磺司特可以剂量依赖性降低 Th2 型核因子 GATA3 下游的转录活性 (图 3A), 同时抑制诱导条件下的 Th2 细胞内 GATA3 的 mRNA 和蛋白水平 (图 3B、C)。但同时观察到甲磺司特并不抑制 Th1 型核因子 T-bet 结合位点 T-box 的下游转录活性及诱导条件下的 T-bet mRNA 及蛋白水平 (图 3D~F)。

4 甲磺司特抑制信号传导及转录激活蛋白 5 (signal transducer and activator of transcription 5, STAT5) 及哺乳动物雷帕霉素靶标 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号所介导的 Th2 型细胞分化

由于甲磺司特可以抑制由 IL-4 和 IL-2 所诱导的 Th2 细胞极化方向, 因此本研究进一步观察了 IL-4 及 IL-2 下游信号通路, 分析其抑制 GATA3 的分子机制。目前的研究证明, IL-4 主要通过诱导信号传导及转录激活蛋白 6 (signal transducer and activator of transcription 6, STAT6) 磷酸化活化 GATA3, 而 IL-2 主要通过 STAT5 及 mTOR 介导 GATA3 活化。本研究发现甲磺司特并不抑制 Th2 细胞内 STAT6 的磷酸化 (图 4A), 但可以显著降低 STAT5 及 mTOR 的磷酸化水平 (图 4B、

C)。因此, 甲磺司特是通过抑制 IL-2 所介导的 GATA3 阻碍 Th0 细胞向 Th2 细胞分化。

5 甲磺司特通过抑制 GATA3 治疗肺纤维化

为了进一步验证甲磺司特抗肺纤维化作用是依赖于 GATA3, 本研究在 mBLM 模型中使用甲磺司特进行药物治疗, 同时肺部给予小鼠 GATA3-Ad 后观察甲磺司特的抗肺纤维化效果。结果表明, 在小鼠肺部过表达 GATA3 后逆转了甲磺司特的抗炎、抗纤维化作用 (图 5A)。GATA3 过表达的甲磺司特治疗组肺部羟脯氨酸含量和肺重指数显著高于甲磺司特治疗组 (图 5B、C)。且 GATA3 过表达的甲磺司特治疗组小鼠肺功能也显著差于甲磺司特治疗组 (图 5D)。以上结果说明, 甲磺司特的抗肺纤维化效果是依赖于其对 GATA3 的抑制作用。

讨论

目前, 临床用于肺纤维化的药物治疗手段十分有限。早期使用激素类药物进行治疗并不能显著改善患者肺功能或改善临床结局, 证明单纯的免疫抑制并不

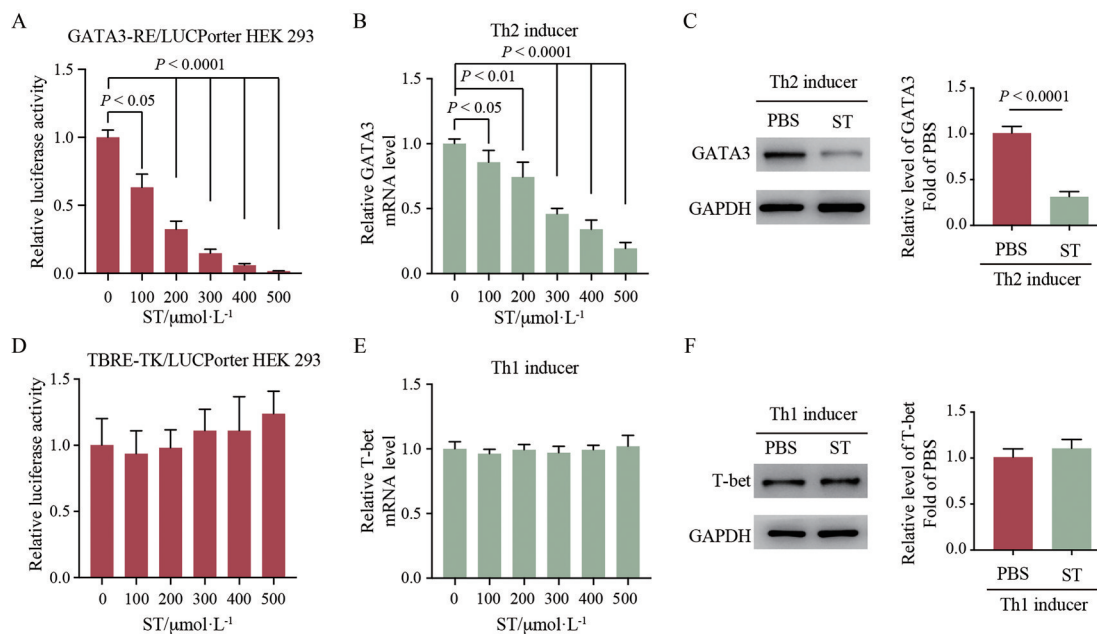


Figure 3 ST down-regulates expression of GATA-binding protein 3 (GATA3). A: HEK293 cells were transfected with GATA3-luc reporter gene plasmid. Luciferase assays were performed to evaluate the function of GATA3 after ST treatment ($n = 5$); B: The mRNA levels of GATA3 in Th2 cells with ST treatment. Th2 cells were generated from splenic T cells with Th2 inducers ($n = 6$); C: Western blot of GATA3 expression in Th2 cells after ST $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ exposure ($n = 5$); D: HEK293 cells were transfected with TBRE-TK-luc reporter gene plasmid. Luciferase assays were performed to evaluate the function of T-bet after ST treatment ($n = 5$); E: RT-PCR assays showed the mRNA levels of T-bet in Th1 cells after ST exposure. Th1 cells were differentiated from splenic T cells with Th1 inducers ($n = 6$); F: Western blot of T-bet expression in Th1 cells after ST $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ exposure ($n = 5$). Mean \pm SEM. Statistical significance between the two groups was determined by unpaired two-tailed Student's *t*-test, statistical significance among groups was determined by one-way ANOVA. Th2 inducer: $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ IL-4, $30 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ IL-2, $2\ 000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ soluble anti-CD28, and $5\ 000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ anti-IFN- γ ; Th1 inducer: $15 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ IL-12, $30 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ IL-2, and $5\ 000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ anti-IL-4

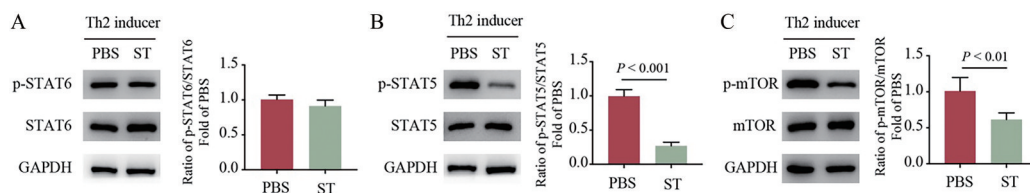


Figure 4 ST inhibits upstream signaling pathways of GATA-binding protein 3 (GATA3). A: Western blot of phosphorylated and total signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6) expression in differentiated Th2 cells with ST 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ treatment. Quantitative diagram demonstrated the ratio of p-STAT6 to STAT6 ($n = 3$); B: Western blot of phosphorylated and total signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) expression in Th2 cells after ST 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ treatment. The proportion of p-STAT5 to STAT5 was quantified ($n = 3$); C: Western blot of phosphorylated and total mammalian target of rapamycin (mTOR) expression along with ratio of p-mTOR/mTOR in differentiated Th2 cells with ST exposure ($n = 3$). Mean \pm SEM. Statistical significance between the two groups was determined by unpaired two-tailed Student's *t*-test

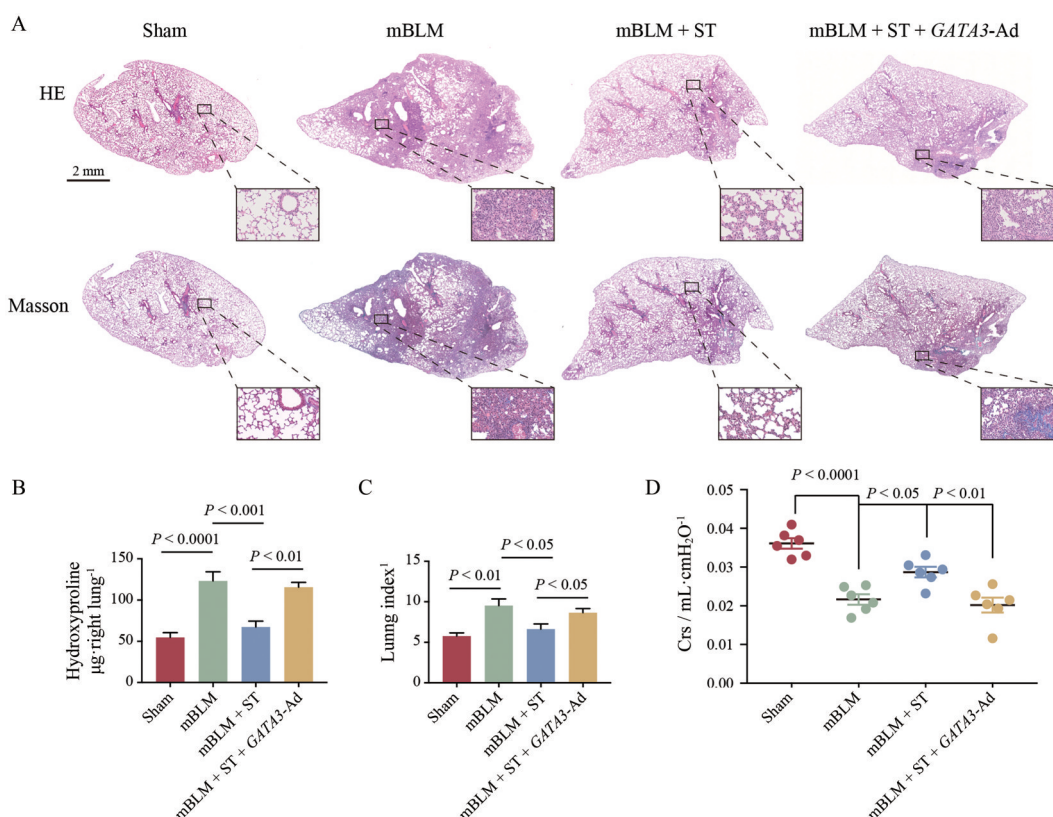


Figure 5 Overexpression of GATA3 relieves the anti-fibrosis effect of ST. A: HE (up) and Masson staining (down) were performed to evaluate the lung fibrotic changes of mBLM-exposed mice along with indicated treatment. Scale bars, 2 mm; B-D: Hydroxyproline content (B), lung index (C), and Crs (D) were assessed to evaluate the PF changes of treated mice. $n = 6$, mean \pm SEM. Statistical significance among groups was determined by one-way ANOVA

是治疗纤维化的有效策略^[11],而临床已有的针对特发性肺纤维化的药物也仅能延缓疾病进展^[12,13]。肺纤维化在疾病发病过程中伴随着长期慢性炎症,但有些免疫细胞及细胞因子是组织损伤后修复的重要基础。Th1 型细胞因子包括 IFN- γ 、IL-12、IL-2、IL-18 及肿瘤坏死因子 β (tumor necrosis factor β , TNF- β), Th2 型细胞因子包括 IL-4、IL-10、IL-13 及单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)^[14]。目前

的研究证据表明, Th1 型细胞因子参与了组织损伤后修复重建,而 Th2 型细胞因子所介导的体液免疫反应在过敏、IPF、哮喘、COPD 等疾病中占据主导地位^[15]。当机体以 Th1 型免疫反应为主导时组织可向正确方向转归,但单纯的 IFN- γ 治疗对于 IPF 患者效果并不理想^[16]。小鼠肺纤维化组织内 IL-5、MCP-1 的表达增加,而 IPF 患者的肺组织中同样伴有 IL-4、IL-5、IL-13 等 Th2 型细胞因子的增加^[3],这说明调控机体免疫平衡是

治疗肺纤维化的合理策略。

GATA3 是 GATA 家族中的一员, GATA3 在 Th0 细胞中表达较低, 而在经过外源性 IL-4 及 IL-2 诱导分化后 GATA3 的表达迅速上调^[17]。过表达 GATA3 也可诱导 Th0 细胞向 Th2 细胞分化^[18]。除此之外, GATA3 也是调节肥大细胞活化的关键核因子。IL-4 诱导的 GATA3 表达主要通过 STAT6 信号^[19], 而 IL-2 则可通过 STAT5 及 mTOR 信号通路促进 GATA3 表达^[20,21]。当 STAT6 缺失时 IL-4 诱导的 GATA3 表达受到抑制, 而本研究表明甲磺司特主要是通过抑制 IL-2 所诱导的 GATA3 表达。甲磺司特可以显著抑制 STAT5 和 mTOR 的磷酸化, 进而降低肺纤维化组织中 Th2 细胞比例。作为 Th2 型免疫反应重要转录因子, Th2 型细胞因子 IL-5 及 IL13 的启动子区域都包含了 GATA3 结合位点^[22], GATA3 也可通过染色质重组调控 IL-4 的表达, 因此 GATA3 可介导自身的正反馈调控^[23]。IL-4、IL-5 和 IL-13 三个基因位于同一个 DNA 位点上, 因此 GATA3 对于这些细胞因子的转录可能存在整体性。本研究结果显示, 甲磺司特可以抑制多种 Th2 型细胞因子释放, 这可能与 GATA3 的转录调控特异性密切相关。此外, 甲磺司特并不抑制 Th1 型免疫反应, 特别是在 mBLM 动物肺部, 甲磺司特增加了 Th1 型细胞数量, 这可能同样与 GATA3 功能相关。GATA3 不仅仅促进 Th2 细胞分化, 还可以抑制 Th0 细胞向 Th1 细胞分化, 具体的生物学机制可能为 GATA3 下调白细胞介素 12 受体 (interleukin-12 receptor, IL-12R) 的表达所致^[18], 而甲磺司特是否可以增加 CD4⁺ T 细胞表面 IL-12R 的表达需要进一步明确。

甲磺司特 (二甲基硫对甲苯磺酸盐) 是一种新型 Th2 细胞因子抑制剂, 大量证据表明, 甲磺司特不仅可以抑制 Th2 细胞因子 (IL-4、IL-5) 的合成, 还可以抑制辅助性 T 细胞、单核细胞和嗜酸性粒细胞的迁移, 减轻气道嗜酸性粒细胞炎症, 降低血清组胺和血清免疫球蛋白 E (immune globulin E, IgE) 水平; 同时抑制特异性 IgE 抗体介导的肥大细胞脱颗粒和炎性介质释放。目前, 甲磺司特用于治疗轻、中度哮喘与支气管哮喘、过敏性鼻炎、变应性皮炎和嗜酸粒细胞增多综合征等疾病。同时, 甲磺司特还被发现可以通过抑制氧化应激治疗照射所致肺纤维化, 并通过抑制巨噬细胞中 MCP-1 治疗单次 BLM 所诱导肺纤维化^[6,24]。本研究显示甲磺司特可以用于慢性肺纤维化的治疗, mBLM 模型较单次气管注射博来霉素所诱导急性肺纤维化模型更加贴近临床肺纤维化患者病理改变及病程, 且该模型不会出现自愈现象, 因此更加适合临床药物治疗评价。本研究不仅显示了甲磺司特的分子机制, 更为临

床肺纤维化患者提供了全新药物治疗的选择。

作者贡献: 刘畅负责原代 T 细胞分离培养及表型分析实验; 刘姗姗、李云炫参与动物实验及细胞实验; 花芳参与了数据分析及文献整理; 吕晓希为文章框架的构思者及负责人。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Lederer DJ, Martinez FJ. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378: 1811-1823.
- [2] Martinez FJ, Collard HR, Pardo A, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 3: 17074.
- [3] Gieseck RL, Wilson MS, Wynn TA. Type 2 immunity in tissue repair and fibrosis [J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18: 62-76.
- [4] She YX, Yu QY, Tang XX. Role of interleukins in the pathogenesis of pulmonary fibrosis [J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7: 52.
- [5] Hendeles L, Asmus M, Chesrown S. Evaluation of cytokine modulators for asthma [J]. *Paediatr Respir Rev*, 2004, 5 Suppl A: S107-S112.
- [6] Furonaka M, Hattori N, Tanimoto T, et al. Suplatast tosilate prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, 328: 55-61.
- [7] Murakami T, Yamanaka K, Tokime K, et al. Topical suplatast tosilate (IPD) ameliorates Th2 cytokine-mediated dermatitis in caspase-1 transgenic mice by downregulating interleukin-4 and interleukin-5 [J]. *Br J Dermatol*, 2006, 155: 27-32.
- [8] Lv XX, Liu SS, Li YX, et al. A simple method and the application of mouse tracheal intubation [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 1187-1192.
- [9] Cao Z, Lis R, Ginsberg M, et al. Targeting of the pulmonary capillary vascular niche promotes lung alveolar repair and ameliorates fibrosis [J]. *Nat Med*, 2016, 22: 154-162.
- [10] Flaherty S, Reynolds JM. Mouse naïve CD4⁺ T cell isolation and *in vitro* differentiation into T cell subsets [J]. *J Vis Exp*, 2015, 16: 52739.
- [11] Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research Network, Raghu G, Anstrom KJ, et al. Prednisone, azathioprine, and N-acetylcysteine for pulmonary fibrosis [J]. *N Engl J Med*, 2012, 366: 1968-1977.
- [12] Li YX, Lv XX, Liu C, et al. Pirfenidone and nintedanib inhibit the lung alveolar regeneration in chronic pulmonary fibrosis mouse [J]. *Acta Pharma Sin (药学报)*, 2020, 55: 861-867.
- [13] Ren Q, Zhang LY, Li Z. Advances in the research of anti-organ fibrosis drugs [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 2510-2528.
- [14] Zhou L, Chong MM, Littman DR. Plasticity of CD4⁺ T cell lineage differentiation [J]. *Immunity*, 2009, 30: 646-655.
- [15] Wynn TA. Fibrotic disease and the T_H1/T_H2 paradigm [J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4: 583-594.

- [16] Vu TN, Chen X, Foda HD, et al. Interferon- γ enhances the anti-fibrotic effects of pirfenidone by attenuating IPF lung fibroblast activation and differentiation [J]. *Respir Res*, 2019, 20: 206.
- [17] Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells [J]. *Cell*, 1997, 89: 587-596.
- [18] Ouyang W, Ranganath SH, Weindel K, et al. Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism [J]. *Immunity*, 1998, 9: 745-755.
- [19] Onderdijk AJ, Baerveldt EM, Kurek D, et al. IL-4 downregulates IL-1 β and IL-6 and induces GATA3 in psoriatic epidermal cells: route of action of a Th2 cytokine [J]. *J Immunol*, 2015, 195: 1744-1752.
- [20] Zhu J, Cote-Sierra J, Guo L, et al. Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation [J]. *Immunity*, 2003, 19: 739-748.
- [21] Wan YY. GATA3: a master of many trades in immune regulation [J]. *Trends Immunol*, 2014, 35: 233-242.
- [22] Kishikawa H, Sun J, Choi A, et al. The cell type-specific expression of the murine IL-13 gene is regulated by GATA-3 [J]. *J Immunol*, 2001, 167: 4414-4420.
- [23] Ansel KM, Djuretic I, Tanasa B, et al. Regulation of Th2 differentiation and IL4 locus accessibility [J]. *Annu Rev Immunol*, 2006, 24: 607-656.
- [24] Izumi Y, Nakashima T, Masuda T, et al. Suplatast tosilate reduces radiation-induced lung injury in mice through suppression of oxidative stress [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 136: 52-59.