DOI:10.16016/j.2097-0927.202204021

Notch1 在新生期小鼠肺炎链球菌感染诱导 Th1/Th2 失衡

王艺颖,简 鼎,朱 琳,张瀚之,李媛媛,陈诗懿,张光莉,罗征秀 400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院呼吸科,国家儿童健康与疾病临床医学研究中心,儿童发育与疾病教育部重点实验室,儿科学重庆市重点实验室,儿童感染免疫重庆市重点实验室

[**摘要**] **目的** 研究 Notch1 信号通路在新生期小鼠肺炎链球菌感染诱导 Th1/Th2 失衡中的作用。**方法** 12 只 1 周龄 Balb/c 新生小鼠分为 3 组($n=4$):新生期肺炎链球菌肺炎(*Streptococcus pneumoniae* pneumonia,S. pp)组、新生期肺炎链球菌肺炎 Notch1 抑制组[S. pp+DAPT(γ 分泌酶抑制剂)]和对照组。S. pp 组、S. pp+DAPT 组小鼠鼻腔滴注 10 μL 含有 1×10^7 cfu 肺炎链球菌的悬液,对照组同期滴注等量 PBS。小鼠感染肺炎链球菌后第 7 天,S. pp+DAPT 组鼻腔滴注 0.3 mg/kg 的 Notch1 抑制剂 DAPT,S. pp 组和对照组鼻腔滴注等量 PBS。小鼠发育至 6 周(成年),检测气道反应性,收集支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid,BALF)行细胞分类计数,肺组织 HE 染色病理切片观察组织病理变化;Western blot 检测肺组织 Notch1 蛋白水平;RT-PCR 检测肺组织 *T-bet*、*GATA*3 mRNA 水平;流式细胞术检测肺组织 Th1、Th2 细胞水平并分析 Th1/Th2 比率。**结果** S. pp+DAPT 组 Notch1 蛋白表达显著低于 S. pp 组(0.23±0.09 *vs* 1.94±0.78,$P<0.01$)。S. pp+DAPT 组 BALF 细胞总数、中性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞计数均明显低于 S. pp 组($P<0.01$);肺组织中细支气管周围炎症(0.55±0.17 *vs* 1.52±0.27,$P<0.01$)、血管周围炎症(0.05±0.10 *vs* 0.88±0.25,$P<0.01$)、肺间质炎症评分(0.18±0.35 *vs* 1.57±0.25,$P<0.01$)、肺部 *GATA*3 mRNA 表达(19.11±9.79 *vs* 177.56±65.95,$P<0.01$)、Th2 细胞水平[(0.16±0.02)% *vs* (0.28±0.04)%,$P<0.01$]也显著低于 S. pp 组;而 *T-bet* mRNA 表达、Th1 细胞水平与 S. pp 组比较差异无统计学意义($P>0.05$),Th1/Th2 比值较 S. pp 组明显增加(14.67±2.60 *vs* 7.89±0.82,$P<0.01$)。S. pp+DAPT 组小鼠吸入 3.125~50 mg/mL 浓度乙酰甲胆碱激发后,气道反应性较 S. pp 组显著降低($P<0.01$)。**结论** 新生期肺炎链球菌肺炎可能通过激活 Notch1 信号诱导 Th1/Th2 失衡,促进气道高反应性及气道炎症形成。

[**关键词**] 肺炎链球菌肺炎;Notch;Th1/Th2;新生期小鼠

[**中图法分类号**] R378.12; R392.13; R563.1 [**文献标志码**] A

Notch1 induces Th1/Th2 imbalance in neonatal mice with *Streptococcus pneumoniae* infection

WANG Yiying, JIAN Ding, ZHU Lin, ZHANG Hanzhi, LI Yuanyuan, CHEN Shiyi, ZHANG Guangli, LUO Zhengxiu Department of Respiratory Medicine, National Clinical Research Center for Child Health and Disorders, Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education, Chongqing Key Laboratory of Child Infection and Immunity, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role of Notch1 signaling pathway in Th1/Th2 imbalance induced by neonatal *Streptococcus pneumoniae* pneumonia (S. pp) infection. **Methods** Twelve Balb/c

[**基金项目**] 重庆市自然科学基金(cstc2020jcyj-msxmX0677);儿童发育疾病研究教育部重点实验室基础研究一般项目(GBRP-202112)

[**通信作者**] 罗征秀,E-mail:luozhengxiu816@163.com

2097-0927/Copyright © 2022, 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/)

neonatal mice (1 week old) were randomly divided into neonatal S. pp group, neonatal S. pp with Notch1 inhibition treatment group (S. pp+DAPT, a γ-secretase inhibitor) and mock-infected control group (control group) ($n=4$). The S. pp group and the S. pp+DAPT group were infected with 1×10^7 CFU of *S. pneumoniae* in 10 μL of PBS intranasally, while the control group received equivalent PBS. In 7 d after infection, the S. pp+DAPT groups were given 0.3 mg/kg DAPT by nasal instillation, and the S. pp and the control groups were instilled equivalent PBS. In 5 weeks after infection, airway hyperresponsiveness (AHR) was evaluated by invasive body plethysmography system. Differential cell counts in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were analyzed. HE staining was used to observe the histopathological changes of the lung tissue. Western blotting was used to detect the protein expression of Notch1 protein, and RT-PCR to measure the mRNA levels of *T-bet* and *GATA*3. And the percentages of Th1 and Th2 cells in the lung tissue were determined by flow cytometry and Th1/Th2 ratio was calculated. **Results** Notch1 expression was significantly lower in the S. pp+DAPT group than the S. pp group (0.23±0.09 *vs* 1.94±0.78, $P<0.01$). The total cell count and counts of neutrophils, monocytes and lymphocytes in the BALF from the S. pp+DAPT group were remarkably lower than those in the S. pp group ($P<0.01$). The S. pp+DAPT mice had obviously lower histologic scores of pulmonary peribronchiolitis, pulmonary perivasculitis and pulmonary alveolitis in lung tissue than the S. pp group (0.55±0.17 *vs* 1.52±0.27, $P<0.01$; 0.05±0.10 *vs* 0.88±0.25, $P<0.01$; 0.18±0.35 *vs* 1.57±0.25, $P<0.01$). The mRNA level of *GATA*3 and percentage of Th2 cells were significantly lower in the S. pp+DAPT group than the S. pp group [19.11±9.79 *vs* 177.56±65.95, $P<0.01$; (0.16±0.02)% *vs* (0.28±0.04)%, $P<0.01$]. While the mRNA level of *T-bet* and percentage of Th1 cells were similar between the 2 groups. The S. pp+DAPT group had significantly higher Th1/Th2 when compared with the S. pp group (14.67±2.60 *vs* 7.89±0.82, $P<0.01$). The AHR in the S. pp+DAPT group mice was significantly decreased when inhaled different concentrations of acetylcholine (3.125~50 mg/mL) as compared with the S. pp group ($P<0.01$). **Conclusion** Neonatal S. pp may induce Th1/Th2 imbalance by activating Notch1 signal, and thus promote airway hyperreactivity and airway inflammation.

[**Key words**] *Streptococcus pneumoniae* pneumonia; Notch; Th1/Th2; neonatal mice

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2020jcyj-msxmX0677) and the Basic Research Project of Key Laboratory of Child Development Disease of Ministry of Education (GBRP-202112). Corresponding author: LUO Zhengxiu, E-mail: luozhengxiu816@163.com

肺炎链球菌是儿童社区获得性呼吸道感染的第一位细菌病原体。流行病学资料表明,出生后早期呼吸道肺炎链球菌感染增加后续喘息性疾病发病风险[1-2]。我们前期研究发现,新生期感染肺炎链球菌可致 Balb/c 小鼠 Th1/Th2 失衡,诱导气道高反应性(airway hyperresponsiveness, AHR)形成和哮喘发生[3-4]。Th1/Th2 失衡通过其相关细胞因子水平变化对外周免疫反应进行调节,在气道炎症、气道重塑形成中起着重要作用[5-6],但新生期肺炎链球菌感染诱导 Th1/Th2 失衡的机制并未完全清楚。

Notch 信号是一种进化高度保守的细胞间信号级联,由 4 种不同的 Notch 跨膜受体(Notch1、Notch2、Notch3、Notch4)和 5 种配体组成,Notch 受体与配体结合后被 γ 分泌酶裂解,导致 Notch 受体胞内结构域断裂诱导下游效应物转移[7]。体内研究发现 Notch1 可促进 *GATA*3 基因表达,诱导 Th2 细胞分化;同时还可降低 *T-bet* 表达,抑制 Th1 细胞分化,诱导 Th1/Th2 失衡形成[8-9]。Th1/Th2 失衡哮喘小鼠模型 Notch1 蛋白水平明显增加,利用 γ 分泌酶抑制剂{N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-l-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester,DAPT}抑制 Notch1 信号通路可降低哮喘小鼠肺部 Th2 类细胞因子产生,纠正 Th1/Th2 失衡,减轻气道炎症和 AHR[10-11]。新生期肺炎链球菌感染诱导 Th1/Th2 失衡及 AHR 形成是否与 Notch1 信号活性有关尚不清楚。因此,本研究在前期研究基础上进一步探讨 Notch1 信号通路对新生期小鼠肺炎链球菌感染 Th1/Th2 水平及 AHR 的影响,以期阐明新生期肺炎链球菌感染引起 Th1/Th2 水平失衡促进哮喘发生的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级孕晚期 Balb/c 雌鼠 3 只,购自重庆医科大

学实验动物中心,饲养于独立换气系统,空气过滤,饲料、饮用水及垫料均消毒后定期于超净台内进行更换,恒定室温(22~25 ℃)、湿度(50%~65%),光照 10~12 h/d。饲料和饲养水均经过消毒处理,实验操作均在超净工作台内进行。

1.2 实验动物模型建立

孕晚期 Balb/c 雌鼠生产新生小鼠 12 只,分为 3 组:对照组、新生期肺炎链球菌肺炎(*Streptococcus pneumoniae* pneumonia,S. pp)组、新生期肺炎链球菌肺炎 Notch1 抑制(S. pp+DAPT)组。采用 1 周龄的 Balb/c 新生小鼠建立非致死性肺炎链球菌肺炎模型,参照课题组前期研究方法并进一步改进[12-14],即鼻腔缓慢滴注肺炎链球菌悬液 1×10^7 cfu/10 μL,对照组同期鼻腔滴注无菌 PBS 10 μL。根据课题组前期结果:新生期 Balb/c 小鼠感染肺炎链球菌后 7 d 肺部细菌已被清除[15],在小鼠肺炎链球菌感染后第 7 天,S. pp+DAPT 组按小鼠体质量鼻腔滴注 DAPT(0.03 mg/kg,MedChem Express, USA)抑制 Notch1 信号[10],S. pp 组和对照组同期鼻腔滴注等量无菌 PBS。在小鼠 6 周龄(进入成年期)收集各组小鼠标本进行相关检测,肺炎链球菌标准株 D39 由重庆医科大学医学检验、临床检验诊断学教育部重点实验室惠赠。

1.3 小鼠气道反应性测定

各组小鼠 6 周龄时,利用不同浓度乙酰甲胆碱溶液(0、3.125、6.25、12.5、25、50 mg/mL)雾化 3 min,以激发小鼠气道高反应,休息 2 min 后,采用法国 EMKA 体积描记法肺功能仪检测小鼠气道反应性[15]。

1.4 流式细胞术检测肺组织 Th1、Th2 水平

实验方法参照本课题组前期研究[3],气道反应性检测后置于笼内休息 3~6 h,各组小鼠用过量水合氯醛麻醉处死,取全肺组织剪碎,制成单细胞悬液,孵箱孵育,加入荧光标记抗体 Hamster anti-mouse CD3e-Pecy7(1∶100,BD Biosciences, USA)、Rat anti-mouse CD8a-FITC(1∶100,BD Biosciences,USA)避光孵育,加 Rat anti-mouse IL-4-APC(1∶100,BD Biosciences,USA)、Rat anti-mouse IFN-γ-PerCPcy5.5(1∶100,BD Biosciences, USA)室温避光孵育,加入 200 μL PBS 混匀,于流式细胞仪(FACSClibur, BD Biosciences)上机检测。

1.5 支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)标本收集及检测

参照本课题组前期研究方法收集 BALF[16],6 周龄小鼠用过量水合氯醛处死后,立即行气管插管,夹闭左主支气管后,对右肺进行无菌 PBS 液支气管肺泡灌洗,0.5 mL/次,共 3 次(总回收率>80%),离心后下层细胞沉渣涂片行瑞姬氏染液染色,油镜下观察细胞形态,分类计数中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞和嗜酸性粒细胞数量。

1.6 Western blot 检测小鼠肺组织中 Notch1 蛋白表达

取小鼠右肺冻存于-80 ℃冰箱内,取肺组织约 100 mg,用含有 1% PMSF 的 RIPA 研磨提取全蛋白,按 30 μg/孔上样量在 8% SDS-PAGE 中分离,采用半干法转染将蛋白转至 PVDF 膜上,快速封闭液封闭,4 ℃分别孵育一抗 Notch1 兔单克隆抗体(1∶1 000,zenbio,China)及 β-actin 鼠多克隆抗体(1∶1 000,北京中杉金桥)过夜,孵育二抗 1 h,采用 ECL 进行显影,采用 Image Lab 软件统计目的条带灰度值。

1.7 肺组织炎症病理学检查

取小鼠完整左肺,先置于 4%多聚甲醛内浸泡固定,后梯度酒精脱水、石蜡包埋,沿肺组织横切面石蜡切片(厚度为 4 μm),烤箱烘干后二甲苯脱蜡,HE 染色,再经酒精、二甲苯脱水透明,用树胶封片,光镜下采集图像,参照文献[17-18]对气管细支气管周围炎症、血管周围炎症和肺间质炎症进行组织炎症病理半定量评分。

1.8 RT-PCR 检测小鼠肺组织中 *T-bet*、*GATA*3 mRNA 表达

取-80 ℃冰箱内冻存小鼠右肺组织,获取匀浆后采用总 RNA 提取试剂盒(Solarbio, China)提取总 RNA,以总 RNA 中的 mRNA 作为模板,采用反转录试剂盒(TaKaRa, Japan)合成 cDNA,以 cDNA 为模板进行目的基因和内参基因 *GAPDH* 的 PCR 扩增,经过变性、退火、延伸后检测每组小鼠肺组织中 *T-bet*、*GATA*3 的表达水平。基因引物序列为:*T-bet* 正向引物 5′-GCCTACCAGAACGCAGAGAT-3′,反向引物 5′-AGCAGTTGACAGTTGGGTCC-3′;*GATA*3 正向引物 5′-CTCGGCCATTCGTACATGGAA-3′,反向引物 5′-GGATACCTCTGCACCGTAGC-3′;*GAPDH* 正向引物 5′-CAGCGACACCCACTCCTCCACCTT-3′,反向引物 5′-CATGAGGTCCACCACCCTGTTGCT-3′。

1.9 统计学分析

采用 Graphpad Prism 8.0 分析不同组别小鼠气道反应性、肺组织 Th1 和 Th2 细胞水平、BALF 细胞分类计数、Notch1 蛋白表达水平、肺组织炎症病理评分、*T-bet* 和 *GATA*3 mRNA 表达水平,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

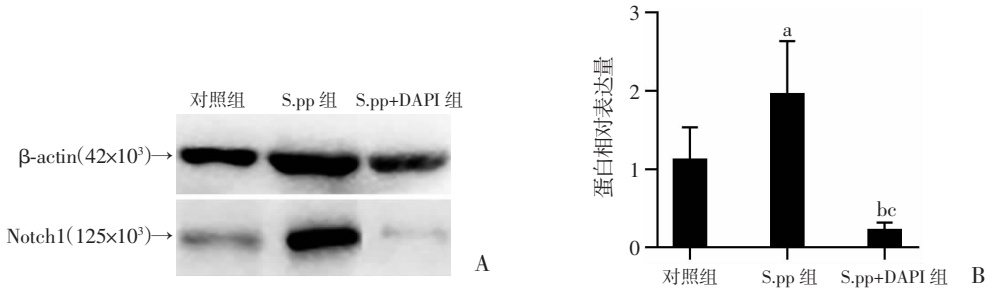
2　结果

2.1　鼻腔滴注 DAPT 抑制新生期肺炎链球菌肺炎后小鼠肺组织 Notch1 蛋白表达

Western blot 结果显示,S. pp 组小鼠发育至成年期,肺组织中 Notch1 蛋白表达水平显著高于对照组($P<0.05$,图 1)。S. pp+DAPT 组小鼠发育至成年期时,肺组织 Notch1 蛋白水平较 S. pp 组、对照组均显著降低($P<0.01$,图 1)。提示新生期肺炎链球菌感染促进肺组织 Notch1 蛋白表达,鼻腔滴注 DAPT 能成功抑制肺炎链球菌感染后 Notch1 蛋白表达。

2.2　阻断 Notch1 对新生期肺炎链球菌肺炎后小鼠 BALF 细胞分类计数的影响

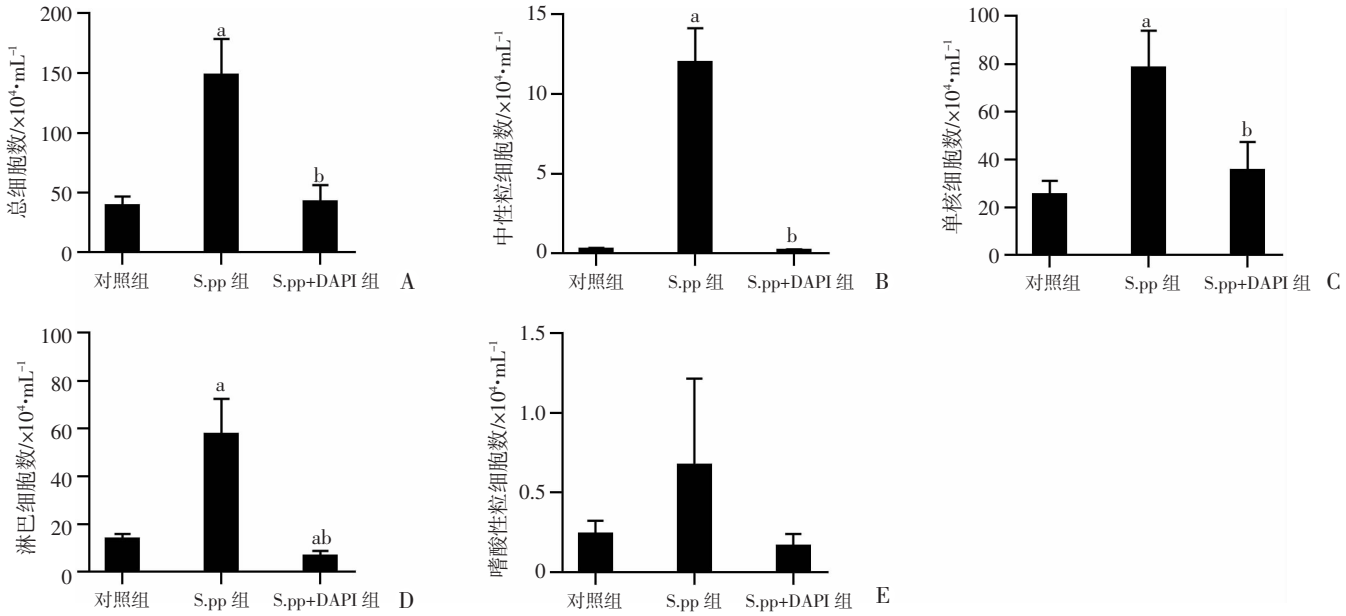
收集各组小鼠 BALF 行细胞分类计数(图 2)。结果显示:S. pp 组小鼠细胞总数、中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞计数均显著高于对照组。S. pp+DAPT 组小鼠 BALF 细胞总数、中性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞计数均明显低于 S. pp 组($P<0.01$)。提示阻断 Notch1 能明显减少新生期肺炎链球菌肺炎后小鼠气道炎症细胞浸润。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较;c:$P<0.01$,与 S. pp 组比较

A:Western blot 检测各组小鼠肺组织中 Notch1 蛋白的表达;B:各组小鼠肺组织中 Notch1 蛋白相对表达量分析($n=4,\bar{x}\pm s$)

图 1　鼻腔滴注 DAPT 对新生期肺炎链球菌肺炎后小鼠肺组织 Notch1 蛋白的影响



a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.01$,与 S. pp 组比较

A:总细胞数;B:中性粒细胞数;C:单核细胞数;D:淋巴细胞数;E:嗜酸性粒细胞

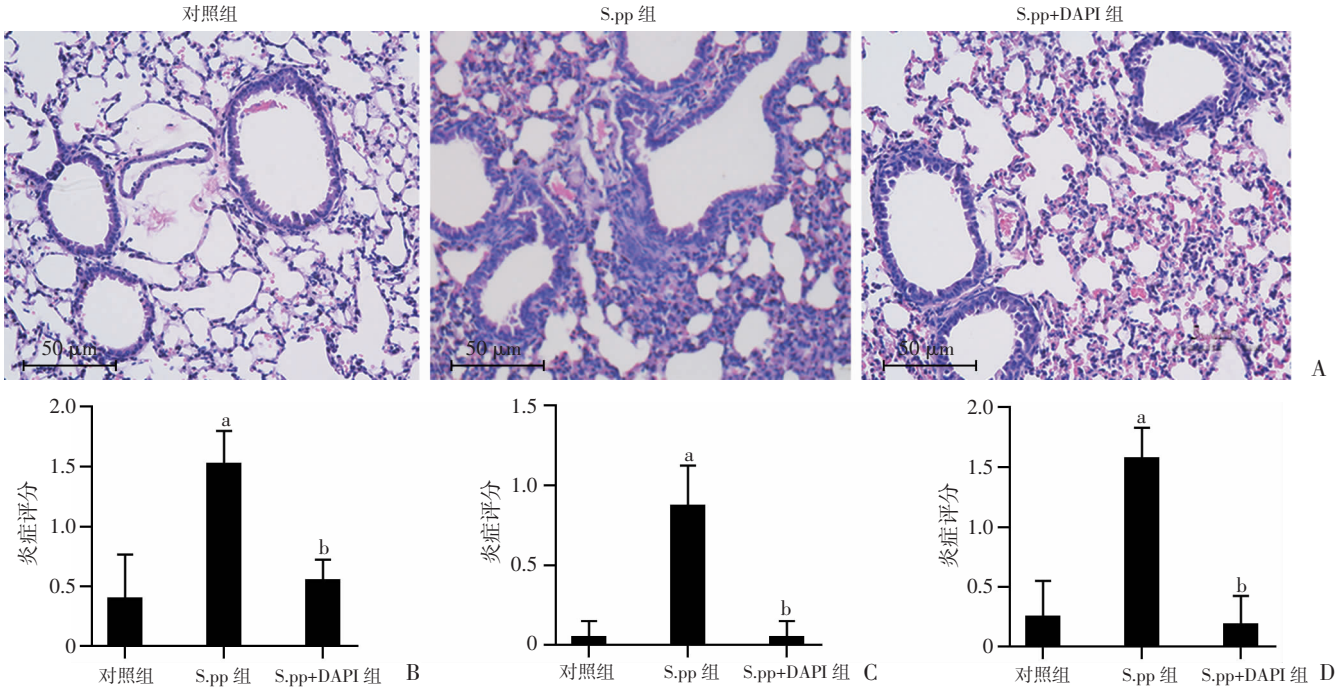
图 2　各组小鼠支气管肺泡灌洗液细胞总数和分类计数($n=4,\bar{x}\pm s$)

2.3 阻断 Notch1 对新生期肺炎链球菌肺炎后小鼠肺组织病理的影响

HE 染色观察各组小鼠肺组织病理情况及组织炎症病理评分(图 3)。结果显示:S. pp 组气管细支气管周围炎症、血管周围炎症及肺间质炎症评分均显著高于对照组($P<0.01$);S. pp+DAPT 组气管细支气管周围炎症、血管周围炎症及肺间质炎症评分显著低于 S. pp 组($P<0.01$),与对照组比较差异无统计学意义。提示本研究建立的非致死性新生期肺炎链球菌肺炎小鼠模型成功,同时显示阻断 Notch1 能减轻新生期肺炎链球菌肺炎后小鼠肺组织炎症。

2.4 阻断 Notch1 对新生期肺炎链球菌肺炎后小鼠肺组织 *T-bet*、*GATA3* mRNA 表达的影响

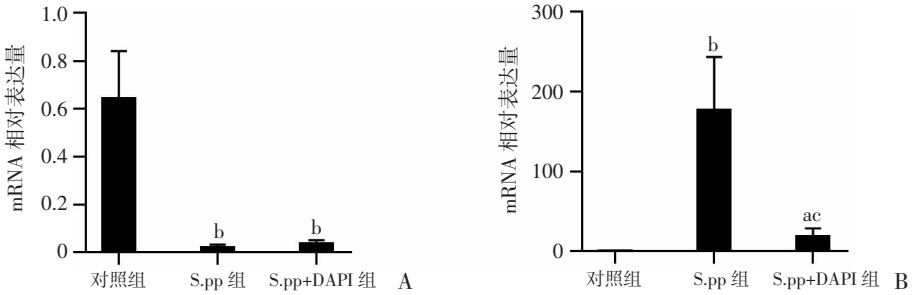
RT-PCR 检测各组小鼠肺组织 *T-bet*、*GATA3* mRNA 的表达水平(图 4)。结果显示:S. pp 组 *T-bet* mRNA 表达显著低于对照组($P<0.01$),*GATA3* mRNA 表达明显高于对照组($P<0.01$);S. pp+DAPT 组 *T-bet* mRNA 表达与 S. pp 组比较差异无统计学意义,但显著低于对照组($P<0.01$),*GATA3* mRNA 表达在 S. pp+DAPT 组明显低于 S. pp 组($P<0.01$),但明显高于对照组($P<0.05$)。提示阻断 Notch1 能明显抑制新生期肺炎链球菌肺炎后小鼠肺组织 GATA3 mRNA 表达。



a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.01$,与 S. pp 组比较

A:小鼠肺组织病理改变(HE ×200);B:气管细支气管周围炎症评分;C:血管周围炎症评分;D:肺间质炎症评分

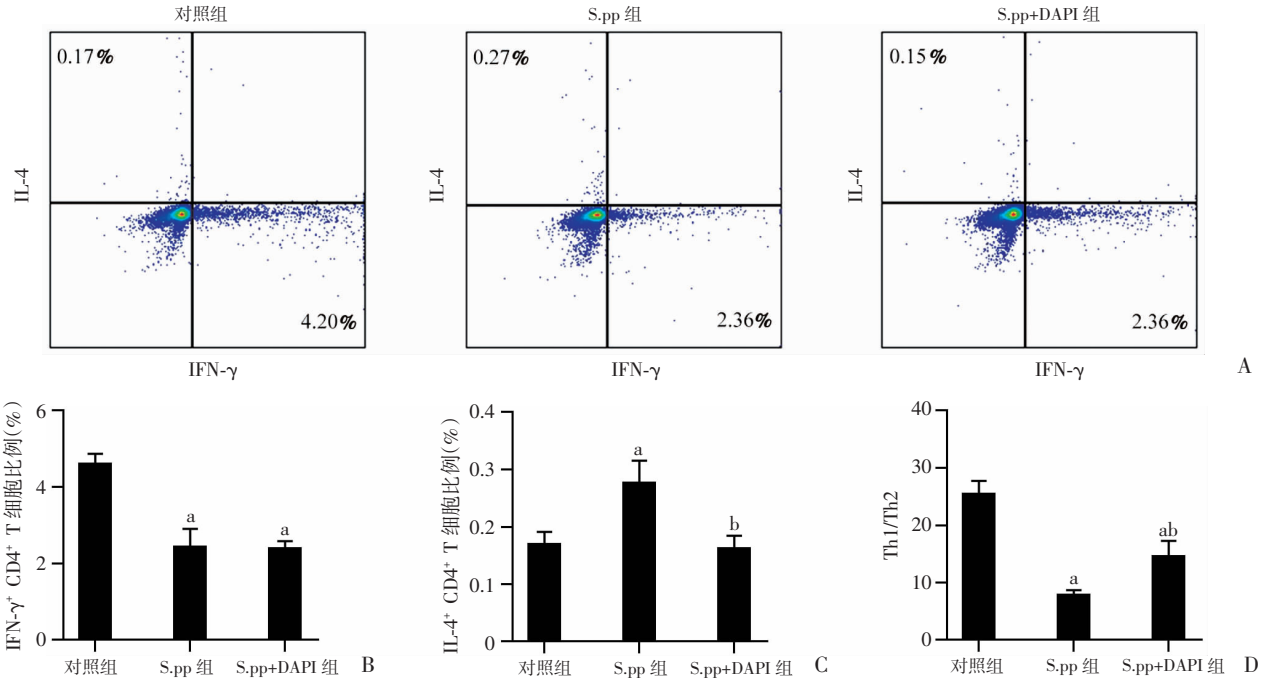
图 3 各组小鼠肺组织病理学观察及炎症评分($n=4,\bar{x}\pm s$)



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较;c:$P<0.01$,与 S. pp 组比较

A:*T-bet* mRNA 相对表达量;B:*GATA3* mRNA 相对表达量

图 4 各组小鼠肺组织 *T-bet*、*GATA3* mRNA 表达水平比较($n=4,\bar{x}\pm s$)



a:P<0.01,与对照组比较;b:P<0.01,与 S. pp 组比较

A:各组小鼠肺组织 Th1、Th2 细胞流式图;B:Th1 细胞比例;C:Th2 细胞比例;D:Th1/Th2 细胞比值

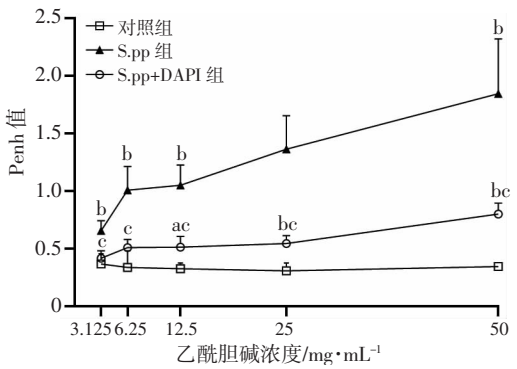
图 5 各组小鼠肺组织 Th1、Th2 细胞比例及 Th1/Th2 比值比较(n=4,$\bar{x}\pm s$)

2.5 阻断 Notch1 对新生期肺炎链球菌肺炎后小鼠肺组织 Th1、Th2 细胞水平的影响

流式细胞术检测各组小鼠肺组织中 Th1、Th2 细胞水平并分析 Th1/Th2 比值(图 5)。结果显示:S. pp 组 Th1 细胞水平显著低于对照组,Th2 细胞水平明显高于对照组,Th1/Th2 比值显著低于对照组,差异均有统计学意义(P<0.01)。阻断 Notch1 表达后,S. pp+DAPT 组小鼠肺组织 Th1 细胞水平与 S. pp 组比较差异无统计学意义,但显著低于对照组(P<0.01);S. pp+DAPT 组小鼠肺组织 Th2 细胞水平明显低于 S. pp 组(P<0.01),而与对照组比较差异无统计学意义;S. pp+DAPT 组小鼠肺组织 Th1/Th2 比值较 S. pp 组显著增加(P<0.01)。提示阻断 Notch1 能显著抑制新生期肺炎链球菌肺炎后小鼠肺组织 Th2 细胞表达,部分逆转 Th1/Th2 失衡。

2.6 阻断 Notch1 对新生期肺炎链球菌肺炎后小鼠气道反应性的影响

体积描记法检测各组小鼠雾化吸入不同浓度乙酰甲胆碱后的气道反应性(图 6)。结果显示:吸入乙酰甲胆碱浓度为 3.125、6.25、12.5、25、50 mg/mL 时,S. pp 组小鼠气道反应性较对照组均显著增高;阻断 Notch1 后 S. pp+DAPT 组小鼠吸入上述浓度乙酰甲胆碱的气道反应性较 S. pp 组明显降低,S. pp+DAPT 组小鼠吸入乙酰甲胆碱浓度为 12.5、25、50 mg/mL 时气道反应性明显高于对照组,在乙酰甲胆碱较低浓度 3.125、6.25 mg/mL 时差异无统计学意义。提示阻断 Notch1 能明显降低新生期肺炎链球菌肺炎后小鼠气道高反应性。



a:P<0.05,b:P<0.01,与对照组比较;c:P<0.01,与 S. pp 组比较

图 6 各组小鼠气道反应性比较(n=4,$\bar{x}\pm s$)

3 讨论

哮喘是一种以慢性气道炎症、气道高反应性为特征的异质性疾病[19]。尽管哮喘病因及发病机制尚未完全清楚,但 Th1/Th2 失衡是公认的哮喘发生机制[10]。

Th1 和 Th2 细胞是由 Th0 发育而来的 $CD4^+$T 细胞亚群,生理状态下,Th1/Th2 可维持动态平衡,异常刺激可诱导 Th1/Th2 失衡,进而诱导免疫异常相关疾病发生[20]。我们前期研究结果显示,新生期 Balb/c 小鼠感染肺炎链球菌诱导成年期肺组织 Th1/Th2 失衡,促进 AHR 及慢性气道炎症形成[3]。

Notch 信号通路是一种高度进化保守的细胞信号通路,调节胚胎和成人组织细胞增殖、分化,与 AHR 形成和炎症细胞分化密切相关[11]。动物实验研究发现 RSV 感染诱导 AHR 与慢性气道炎症形成,伴随小鼠肺部 Notch1 水平显著增加[21]。Notch1 通路经 γ 分泌酶水解后引起下游效应,本研究发现新生期感染肺炎链球菌后,Balb/c 小鼠肺部 Notch1 水平显著增加,小鼠气道反应性明显增加、气道炎症细胞浸润显著增多;而感染后鼻腔滴注 DAPT 阻断 Notch1 表达,小鼠吸入不同浓度乙酰甲胆碱后气道反应性均较感染组明显降低,气道炎症细胞浸润显著减少,提示新生期肺炎链球菌感染诱导 AHR 形成及气道炎症细胞浸润与 Notch1 活化相关。

体内研究发现 Notch1 与初始 $CD4^+$T 细胞、树突状细胞等细胞表面不同配体结合后,在 IL-4、IFN-γ 等不同细胞因子影响下,诱导 *T-bet*、*GATA*3 等不同转录因子表达,最终诱导不同 $CD4^+$T 细胞亚型分化而发挥作用[8,22]。Th1 和 Th2 效应 $CD4^+$T 细胞分化分别由转录因子 *T-bet* 和 *GATA*3 调控。临床及动物实验显示,Th1/Th2 平衡紊乱可诱导气道炎症、粘蛋白高分泌、AHR 和气道重塑[21,23-24]。动物实验发现 Notch1 对 $CD4^+$Th1 和 $CD4^+$Th2 细胞分化具有重要作用[25-26]。本研究发现新生期肺炎链球菌肺炎小鼠肺部 *T-bet* mRNA 和 Th1 细胞显著减少,*GATA*3 mRNA 和 Th2 细胞显著增加,新生期肺炎链球菌感染诱导 Th1/Th2 失衡;DAPT 阻断 Notch1 通路后,小鼠肺组织 *T-bet* mRNA 和 Th1 细胞水平无显著改变,而 *GATA*3 mRNA 和 Th2 细胞显著减少,Th1/Th2 失衡部分改善。提示新生期肺炎链球菌感染后阻断 Notch1 信号主要抑制小鼠肺部 $CD4^+$Th2 细胞表达,部分逆转 Th1/Th2 失衡,改善 AHR 及气道炎症细胞浸润。阻断 Notch1 信号后 Th1/Th2 未完全恢复正常水平,可能与该感染模型对 Th2 分化影响更显著以及其他因子如 Runx、IRF4、STAT 等参与 Th1、Th2 细胞分化有关[27]。

综上所述,新生期小鼠肺炎链球菌肺炎激活 Notch1 信号通路诱导肺部 Th1/Th2 失衡,抑制 Notch1 表达可部分逆转 Th1/Th2 失衡,减轻气道高反应性及气道炎症细胞浸润。

参考文献:

[1] KATZ S E, WILLIAMS D J. Pediatric community-acquired pneumonia in the United States: changing epidemiology, diagnostic and therapeutic challenges, and areas for future research[J]. Infect Dis Clin North Am, 2018, 32(1): 47-63. DOI:10.1016/j.idc.2017.11.002.

[2] VISSING N H, CHAWES B L K, BISGAARD H. Increased risk of pneumonia and bronchiolitis after bacterial colonization of the airways as neonates[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2013, 188(10): 1246-1252. DOI:10.1164/rccm.201302-0215OC.

[3] 田琴琴, 刘茹, 陈云秀, 等. 新生期肺炎链球菌肺炎对成年期肺组织免疫状态及气道高反应的影响[J]. 免疫学杂志, 2015, 31(12): 1051-1055. DOI:10.13431/j.cnki.immunol.j.20150221.
TIAN Q Q, LIU R, CHEN Y X, *et al*. The impact of neonatal pneumococcal pneumonia on adult lung immune status and airway hyperresponsiveness in mice[J]. Immunol J, 2015, 31(12): 1051-1055. DOI:10.13431/j.cnki.immunol.j.20150221.

[4] YANG B H, LIU R, YANG T, *et al*. Neonatal *Streptococcus pneumoniae* infection may aggravate adulthood allergic airways disease in association with IL-17A[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0123010. DOI:10.1371/journal.pone.0123010.

[5] LARCHÉ M, ROBINSON D S, KAY A B. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2003, 111(3): 450-463; quiz464. DOI:10.1067/mai.2003.169.

[6] ELIAS J A, ZHU Z, CHUPP G, *et al*. Airway remodeling in asthma[J]. J Clin Invest, 1999, 104(8): 1001-1006. DOI:10.1172/JCI8124.

[7] RADTKE F, FASNACHT N, MACDONALD H R. Notch signaling in the immune system[J]. Immunity, 2010, 32(1): 14-27. DOI:10.1016/j.immuni.2010.01.004.

[8] AMSEN D, ANTOV A, JANKOVIC D, *et al*. Direct regulation of Gata3 expression determines the T helper differentiation potential of Notch[J]. Immunity, 2007, 27(1): 89-99. DOI:10.1016/j.immuni.2007.05.021.

[9] PEI J X, TANG Z H, ZANG G Q, *et al*. Blockage of Notch1 signaling modulates the T-helper (Th)1/Th2 cell balance in chronic hepatitis B patients[J]. Hepatol Res, 2010, 40(8): 799-805. DOI:10.1111/j.1872-034X.2010.00680.x.

[10] KANG J H, KIM B S, UHM T G, *et al*. Gamma-secretase inhibitor reduces allergic pulmonary inflammation by modulating Th1 and Th2 responses[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 179(10): 875-882. DOI:10.1164/rccm.200806-893OC.

[11] HU C P, LI Z F, FENG J T, *et al*. Glucocorticoids modulate Th1 and Th2 responses in asthmatic mouse models by inhibition of Notch1 signaling[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2018, 175(1/2): 44-52. DOI: 10.1159/000485890.

[12] 杨婷, 罗征秀, 符州, 等. 新生期小鼠非致死性肺炎链球菌感染模型的建立[J]. 中国生物制品学杂志, 2012, 25(7): 905-908. DOI: 10.13200/j.cjb.2012.07.114.yangt.026.
YANG T, LUO Z X, FU Z, *et al*. Establishment of neonatal mouse model of non-lethal *Streptococcus* pneumonia infection[J]. Chin J Biol, 2012, 25(7): 905-908. DOI: 10.13200/j.cjb.2012.07.114.yangt.026.

[13] LIN J J, PARK P, LI H, *et al*. *Streptococcus pneumoniae* elaborates persistent and prolonged competent state during pneumonia-derived sepsis[J]. Infect Immun, 2020, 88(4): e00919-e00919. DOI: 10.1128/IAI.00919-19.

[14] 孔潇, 彭欣, 李媛媛, 等. 新生期肺炎链球菌肺炎对小鼠肺组织结构和功能的影响[J]. 解放军医学杂志, 2021, 46(6): 574-579. DOI: 10.11855/j.issn.0577-7402.2021.06.07.
KONG X, PENG X, LI Y Y, *et al*. Effects of neonatal *Streptococcus pneumoniae* pneumonia on lung structure and function of mice[J]. Med J Chin PLA, 2021, 46(6): 574-579. DOI: 10.11855/j.issn.0577-7402.2021.06.07.

[15] ZHANG L Q, GAO H, YANG T, *et al*. Infant 7-valent pneumococcal conjugate vaccine immunization alters young adulthood $CD4^+$ T cell subsets in allergic airway disease mouse model[J]. Vaccine, 2014, 32(18): 2079-2085. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.02.013

[16] 姜小丽, 杨宝辉, 杨婷, 等. 肺炎链球菌感染小鼠早期肺组织细胞因子变化研究[J]. 免疫学杂志, 2013, 29(6): 484-489. DOI: 10.13431/j.cnki.immunol.j.20130104.
JIANG X L, YANG B H, YANG T, *et al*. The dynamic change of cytokines in lung tissues of mice in the early phase of *Streptococcus pneumoniae* infection[J]. Immunol J, 2013, 29(6): 484-489. DOI: 10.13431/j.cnki.immunol.j.20130104.

[17] PEEBLES JR R S, SHELLER J R, COLLINS R D, *et al*. Respiratory syncytial virus infection does not increase allergen-induced type 2 cytokine production, yet increases airway hyperresponsiveness in mice[J]. J Med Virol, 2001, 63(2): 178-188. DOI: 10.1002/1096-9071(20000201)63: 2178: AID-JMV1013>3.0.CO;2-O.

[18] DENG Y, CHEN W, ZANG N, *et al*. The antiasthma effect of neonatal BCG vaccination does not depend on the Th17/Th1 but IL-17/IFN-γ balance in a BALB/c mouse asthma model[J]. J Clin Immunol, 2011, 31(3): 419-429. DOI: 10.1007/s10875-010-9503-5.

[19] LAMBRECHT B N, HAMMAD H, FAHY J V. The cytokines of asthma[J]. Immunity, 2019, 50(4): 975-991. DOI: 10.1016/j.immuni.2019.03.018.

[20] ZHANG Y, ZHANG Y G, GU W P, *et al*. Th1/Th2 cell's function in immune system[J]. Adv Exp Med Biol, 2014, 841: 45-65. DOI: 10.1007/978-94-017-9487-9_3.

[21] QIN L, QIU K Z, HU C P, *et al*. Bronchial epithelial cells promote the differentiation of Th2 lymphocytes in airway microenvironment through jagged/Notch-1 signaling after RSV infection[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2019, 179(1): 43-52. DOI: 10.1159/000495581.

[22] AMSEN D, BLANDER J M, LEE G R, *et al*. Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different Notch ligands on antigen-presenting cells[J]. Cell, 2004, 117(4): 515-526. DOI: 10.1016/s0092-8674(04)00451-9.

[23] CUI Z L, HAN F F, PENG X H, *et al*. YES-associated protein 1 promotes adenocarcinoma growth and metastasis through activation of the receptor tyrosine kinase Axl[J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2012, 25(4): 989-1001. DOI: 10.1177/039463201202500416.

[24] SUN J, KRAWCZYK C J, PEARCE E J. Suppression of Th2 cell development by Notch ligands Delta1 and Delta4[J]. J Immunol, 2008, 180(3): 1655-1661. DOI: 10.4049/jimmunol.180.3.1655.

[25] AUDERSET F, SCHUSTER S, COUTAZ M, *et al*. Redundant Notch1 and Notch2 signaling is necessary for IFNγ secretion by T helper 1 cells during infection with *Leishmania major*[J]. PLoS Pathog, 2012, 8(3): e1002560. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002560.

[26] GU W, XU W G, DING T, *et al*. Fringe controls naïve $CD4^+$ T cells differentiation through modulating Notch signaling in asthmatic rat models[J]. PLoS One, 2012, 7(10): e47288. DOI: 10.1371/journal.pone.0047288.

[27] ZHANG Y, ZHANG Y G, GU W P, *et al*. TH1/TH2 cell differentiation and molecular signals[J]. Adv Exp Med Biol, 2014, 841: 15-44. DOI: 10.1007/978-94-017-9487-9_2.

(收稿:2022-04-02;修回:2022-06-23)
(编辑 栗 嘉)