网络出版时间:2021-6-11 15:55 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210611.0928.011.html

# 基于 CB2 受体活化探讨 CD4$^+$ T 细胞分化缓解中性粒细胞大鼠哮喘模型的作用机制

莫濡冰,黄琳惠,蒙 冲,蔡兴俊

**摘要** **目的** 分析 JTE-907(大麻素类 CB2 受体反向激动剂)对中性粒细胞大鼠哮喘模型的治疗效果,并通过观察其对 CD4$^+$ 幼稚 T 细胞分化影响来确定 CB2 受体活化的潜在治疗机制。**方法** 采用大鼠脾脏分离的 T 淋巴细胞 Th 系特异性分化系统分析 JTE907 对 T 细胞亚型分化的影响。通过 qRT-PCR 检测 Tbx21、Gata3、白介素(IL)-9、维甲酸受体相关孤儿受体(ROR)-C、FoxP3、CNR2 mRNA 表达。将 40 只动物随机分为 4 组($n=10$):正常对照组、模型组、JTE-907 低剂量组(JTE-907-L,腹腔注射 5 mg/kg)和 JTE-907 高剂量组(JTE-907-H,20 mg/kg)。除正常对照组外,其他组的大鼠建立中性粒细胞性哮喘模型。采用 ELISA 试剂盒检测血清中 OVA 特异性 IgE 和 BALF 中细胞因子水平,流式细胞术检测脾脏中 Th17 和 Treg 细胞百分比,Western blot 检测肺组织中 RORγt、Foxp3 和 STAT5 蛋白的表达。**结果** qRT-PCR 结果显示,JTE907 在所有测试浓度下诱导 FoxP3 和 CB2 受体的表达。OVA 致敏和 LPS 刺激后,模型组大鼠血清中 OVA-sIgE 水平上调($P<0.05$),并且 BALF 中中性粒细胞数和干扰素(IFN)-γ、肿瘤坏死因子(TNF)-α、IL-17 和 IL-5 水平增加($P<0.05$)。JTE-907 治疗逆转了上述变化($P<0.05$)。此外,与模型组相比,JTE-907 治疗组大鼠脾脏中 Th17/Treg 比例降低($P<0.05$)以及肺组织中 RORγt 蛋白水平降低($P<0.05$),而 Foxp3 蛋白和 STAT5 的磷酸化水平增加($P<0.05$)。**结论** CB2 受体的激活对 Th-17 介导的中性粒细胞哮喘大鼠有一定的保护作用,其作用机制包括改善 Th17/Treg 平衡以及调节其各自的细胞因子水平。

**关键词** CB2 受体;中性粒细胞;大鼠;Th17/Treg;哮喘
**中图分类号** R 562
**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2021)07-1057-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.07.011

CD4$^+$ T 淋巴细胞(CD4$^+$ T)在哮喘发病中起重要作用。许多研究[1]表明,Th2 介导的免疫反应增强是哮喘临床症状的主要原因,尤其是嗜酸性粒细胞浸润。然而,最近几项研究[2-3]表明,中性粒细胞(而非嗜酸性粒细胞)是持续或急性加重哮喘患者的主要炎性细胞类型。此外,越来越多的研究[4]表明哮喘是一种高度异质性疾病;需要研究中性粒细胞在哮喘中的作用,以确定治疗哮喘期间中性粒细胞气道炎症的其他选择。CB2 受体是 G 蛋白偶联受体家族的成员,主要在免疫系统的细胞中表达,并且其表达水平在 T 细胞活化过程中增加[5]。此外,CB2 受体是 T 细胞亚群形成所必需的。由于 CB2 与免疫调节作用有关,因此,其被认为是炎症性疾病的可能治疗靶点[6]。目前,CB2 激动剂可作为治疗炎性疾病的潜在药理学工具,如类风湿关节炎、动脉粥样硬化、结肠炎等[7]。有研究[8]表明,CB2 的保护活性取决于滑膜组织,T 淋巴细胞以及肠神经元中表达的 CB2 受体。然而,关于 CB2 受体活化在缓解中性粒细胞型哮喘中作用的报告较少。该研究通过构建中性粒细胞大鼠哮喘模型,分析了 JTE-907(大麻素类 CB2 受体反向激动剂)对疾病的治疗效果,并通过观察其对 CD4$^+$ 幼稚 T 细胞分化影响来确定 CB2 受体活化的潜在治疗机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** SD 大鼠(无特定病原体等级,4 周龄)购自北京斯贝福生物技术有限公司,许可证号:SCXK-(京)2016-0002,雄性。大鼠在 SPF 条件下[温度:(25±0.5)℃,湿度:(55±5)%,12 h/12 h 明暗循环]饲养,并提供无菌食物和水。从 SD 大鼠的脾脏中分离出 CD4$^+$ T 细胞。通过使用 Dynabeads™ Mouse Pan B 清除 B 细胞,随后用 Naïve CD4$^+$ T 细胞大鼠分离试剂盒对 B 缺失的细胞部分进行阴性选择。加入抗 CD3e(5 μg/ml)和抗 CD28(1 μg/ml)抗体激活 CD4$^+$ 细胞 6 d,然后加入特定的细胞因子和抗体混合物用于诱导 Th 细胞亚型的极化:Th1 分化加入白介素(interleukin,IL)-12(10 ng/ml)和 Anti-IL-4(5 μg/ml),Th2 分化加入 IL-4(10 ng/ml)和 Anti-IL-12(5 μg/ml),Th9 分化加入 IL-4(10 ng/ml)、转化生长因子(transforming growth fac-

2021-03-05 接收
基金项目:国家自然科学基金(编号:81860007)
作者单位:海南省人民医院呼吸科,海口 570311
作者简介:莫濡冰,女,硕士,主治医师;
蔡兴俊,男,硕士,主任医师,责任作者,E-mail:ygy190909@163.com

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

tor,TGF)-β(10 ng/ml)和 Anti-IL-12(5 μg/ml),Th17 分化加入 IL-6(10 ng/ml)、TGF-β(10 ng/ml)、Anti-IL-4(5 μg/ml)和 Anti-IL-12(5 μg/ml),Treg 分化加入 TGF-β(10 ng/ml)、Anti-IL-4(5 μg/ml)和 Anti-IL-12(5 μg/ml)。同时,加入或不加入 JTE907[溶解在二甲亚砜(DMSO)中至终浓度 $10^{-3}$ mol/L,并在细胞培养基中稀释至实验浓度 $10^{-8}$、$10^{-7}$ 或 $10^{-6}$ mol/L]与细胞一起培养 6 d,获得分化的 T 细胞亚型。

**1.1.2 试剂与仪器** Dynabeads™ Mouse Pan B 购自美国 Invitrogen 公司,Naïve $CD4^+$ T 细胞大鼠分离试剂盒购自美国 Miltenyi 公司,JTE907 购自英国 R&D Systems 公司,RNeasy Plus Micro Kit、高容量 cDNA 反转录试剂盒均购自美国 Qiagen 公司,TaqMan 基因表达预混液购自美国 Applied Biosystem 公司,RNA 引物购自美国 Thermo fisher 公司,OVA(鸡卵清蛋白)、LPS 购自美国 Sigma-Aldrich 公司,气道炎症评估 ELISA 试剂盒购自美国 R&D Systems 公司,大鼠 OVA 特异性 IgE ELISA 试剂盒购自厦门慧嘉生物科技有限公司,RIPA 裂解缓冲液购自北京 Solarbio 公司。7300 qRT-PCR 系统购自美国 Applied Biosystem 公司,FACS CantoTM II 流式细胞仪购自美国 BD Biosciences 公司,FlowJo 7.6.1 软件购自美国 Tree Star 公司。

**1.2 实时定量 PCR** 使用 RNeasy Plus Micro Kit 进行 RNA 分离。使用高容量 cDNA 反转录试剂盒将总 RNA 转换为 cDNA。所有 qRT-PCR 反应均使用 7300 qRT-PCR 系统进行,扩增使用 TaqMan 基因表达预混液进行。使用以下引物检测 RNA 表达:Tbx21、Gata3、IL-9、ROR-C、FoxP3、CNR2 和管家基因 18S rRNA。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行 qRT-PCR 分析。

**1.3 模型建立和实验分组** 将 40 只动物随机分为 4 组($n=10$):对照组、模型(Model)组、JTE-907 低剂量组(JTE-907-L,腹腔注射 5 mg/kg)和 JTE-907 高剂量组(JTE-907-H,20 mg/kg)。除正常对照组外,其他组的大鼠在实验方案的第 0 和 7 天分别通过 2 次腹膜内注射 10 mg OVA(鸡卵清蛋白)和鼻腔滴入 0.1 μg LPS。从第 15 天起,将大鼠放入密闭室 35×25×15($cm^3$)中,连续 3 周(30 min/次和 1 次/2 d)暴露于 2% OVA 的气溶胶中。在用 OVA 雾化刺激前 2 h,JTE-907 组每天 1 次通过腹腔注射给药对大鼠进行不同浓度的 JTE-907 治疗。其余组腹腔注射生理盐水。

**1.4 标本采集** 在最后一次 OVA 激发后 24 h 内,每只大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛,剂量为 4 mg/kg。用玻璃毛细管从眼后丛取血样并离心,血清在液氮中快速冷冻,并在 -80 ℃下储存。将大鼠胸腔切开,切断气管上部并插管。常规收集的支气管肺泡灌洗液(BALF),并在 400 r/min 下离心 10 min,并将上清液保存在 -80 ℃下备用。将 BALF 沉淀物重悬于 PBS 中以进行细胞涂片,获得白细胞计数。收集 BALF 后,从右肺切下肺组织用于组织学分析。其余的肺组织样品用于蛋白质提取。

**1.5 血清 OVA 特异性 IgE 测定** 使用大鼠 OVA 特异性 IgE ELISA 试剂盒进行 OVA 特异性 IgE 测量。

**1.6 气道炎症评估** 使用血细胞仪测定细胞总数。BALF 细胞涂片用 Gimsa 染色,以确定细胞计数差异。通过 ELISA 试剂盒分析 BALF 中干扰素(interferon,IFN)-γ、IL-5、IL-17、IL-10 和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factors,TNF)-α 的水平。

**1.7 组织学分析** 大鼠肺组织在 4% 多聚甲醛中固定 3 d,石蜡包埋。切片(5 μm)用常规组织学技术进行 HE 染色,在观察病理和结构变化。

**1.8 流式细胞术** 计算大鼠脾脏的 T 细胞悬液,制备成细胞 $10^6$ 个/ml,用 FITC-anti-CD4、APC-anti-CD25 抗体染色 30 min,然后固定和渗透,再用 PE-抗 Foxp3,PE-抗 IL-17A 抗体染色 1 h。在 FACS CantoTM Ⅱ流式细胞仪进行分析,并用 FlowJo 7.6.1 软件处理结果。

**1.9 Western blot 分析** 采用 RIPA 裂解缓冲液从肺组织中提取蛋白质。将含有 20 μg 蛋白质的样品在 10% 的 SDS-PAGE 凝胶上分离并转移到 PVDF 膜上。在室温下用 5% 脱脂牛奶封闭膜 2 h,然后用相应的主要抗体:RORγt(1∶4 000稀释)、Foxp3(1∶2 000稀释)、STAT5(1∶2 000稀释)、p-STAT5(1∶1 000稀释)和 GAPDH(1∶5 000稀释)在 4 ℃下培养过夜。最后用 HRP 结合的二级抗体(1∶5 000稀释)孵育 2 h,用 ECL 试剂显影。

**1.10 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 软件进行数据统计分析。单因素方差分析各组间 Th 特异性转录因子的表达、OVA-sIgE 水平、BALF 细胞、肺组织的炎症评分、BALF 中细胞因子水平和肺组织中 Th17 和 Treg 转录因子表达的统计学意义,Tukey 检验各组间的显著性。$P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 CB2 受体参与 $CD4^+$ T 细胞分化** qRT-PCR

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

分析显示,JTE907 不能诱导 Tbx21(图 1A)、IL-9(图 1B)、GATA3(图 1C)和 ROR-C(图 1D)的转录。相反,JTE907 在所有测试浓度下诱导 FoxP3 的转录(图 1E)。在此背景下,该研究还通过 qRT-PCR 分析了 CB2 受体的表达,结果显示 JTE907 处理在所有测试浓度下上调了 CNR2 表达(图 1F)。

**2.2 JTE-907 对血清 OVA 特异性 IgE 水平及 BALF 细胞变化的影响** OVA 致敏和 LPS 刺激后,模型组大鼠血清中 OVA-sIgE 水平上调。相反,JTE-907 治疗组降低了大鼠血清中 OVA-sIgE 水平(图 2A)。对照组 BALF 细胞总数为 $14.27\times10^4$ 个,仅有少量嗜酸性粒细胞和少量中性粒细胞($2.39\times10^4$)。模型组 BALF 中肺细胞总数($36.2\times10^4$)、中性粒细胞($9.26\times10^4$)和嗜酸性粒细胞($6.57\times10^4$)增多。经 JTE-907 处理的小鼠的总细胞数减少($23.68\times10^4$),并且 JTE-907 还减少了中性粒细胞($5.3\times10^4$)、嗜酸性粒细胞($3.09\times10^4$)和巨噬细胞($9.49\times10^4$)的绝对数量(图 2B)。

**2.3 JTE-907 对气道炎症的抑制作用** 为了获得炎症细胞浸润到组织中的证据,在最后一次 OVA 刺激后通过 HE 染色对大鼠肺切片进行分析。与对照组相比,模型组的大鼠支气管周围和血管周围结缔组织的炎性细胞数量增加,表明炎症细胞渗入肺组织($t=6.712$,$P<0.001$)。相反,在以 5 和 20 mg/kg 的浓度给药时,JTE-907 处理降低了炎症细胞的浸润($t=4.829$、$5.547$,$P=0.006$)(图 3)。为探讨 JTE-907 对细胞因子产生的影响,用 ELISA 法检测了 BALF 中细胞因子水平。与正常对照组的大鼠相比,模型组大鼠 BALF 中的炎性细胞水平要高得多。与模型组相比,JTE-907 治疗组大鼠 BALF 中 IFN-γ、TNF-α、IL-17 和 IL-5 水平降低($P<0.05$),并且 IL-10 水平升高($P<0.05$)(图 4)。

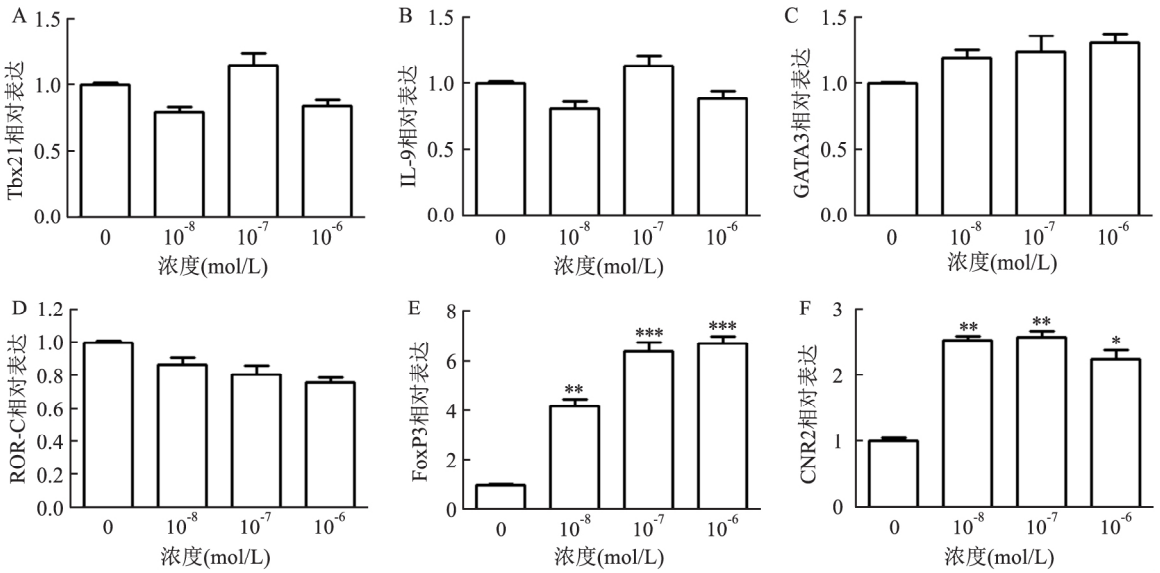



**图 1 qRT-PCR 检测 JTE907 调节 Th 特异性转录因子的表达**

A: Tbx21; B: IL-9; C: GATA3; D: ROR-C; E: FoxP3; F: CB2 受体(CNR2);与对照组比较:$^*P<0.05$,$^{**}P<0.01$,$^{***}P<0.001$

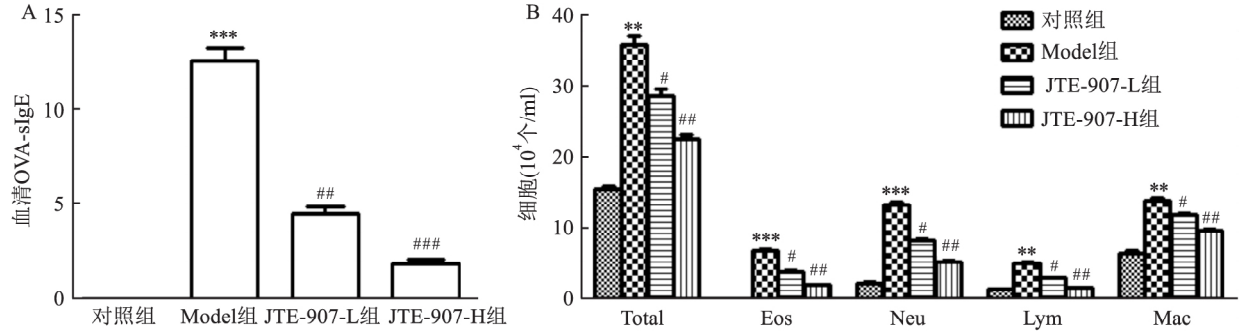



**图 2 JTE-907 的体内治疗对中性粒细胞哮喘的发展的影响**

A: 使用 ELISA 试剂盒确定血清中的 OVA-sIgE 水平; B: JTE-907 对 BALF 中细胞[嗜酸性粒细胞(Eos)、中性粒细胞(Neu)、淋巴细胞(Lym)和巨噬细胞(Mac)]变化的比较,Total 为总细胞;与对照组比较:$^{**}P<0.01$,$^{***}P<0.001$;与 Model 组比较:$^{\#}P<0.05$,$^{\#\#}P<0.01$,$^{\#\#\#}P<0.001$

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

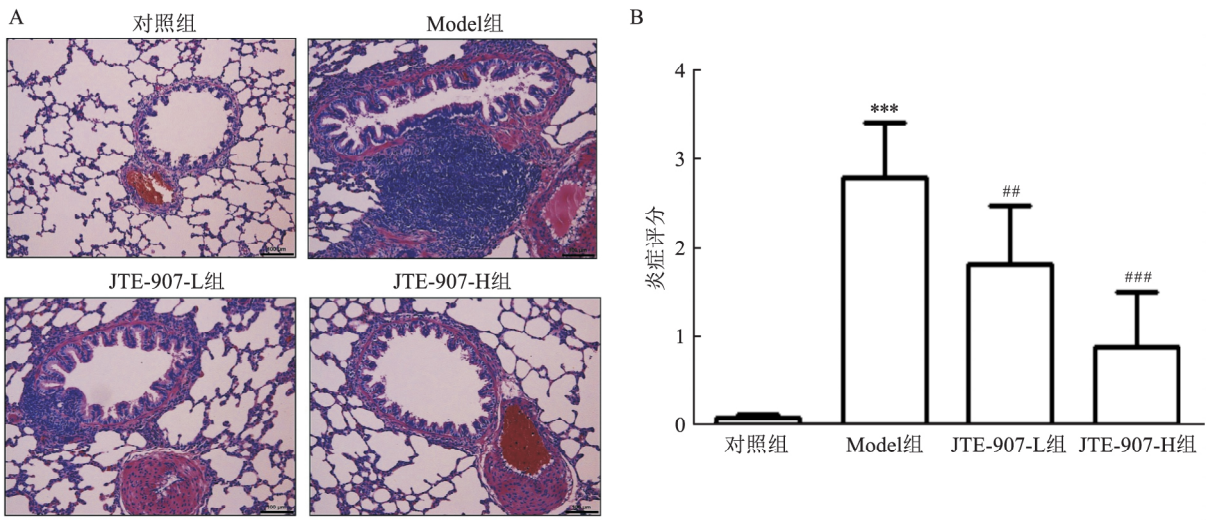



**图3 JTE-907 抑制了肺组织中炎症细胞的募集**

A: 苏木精和曙红(HE)对大鼠肺组织染色 ×200; B: 各组肺组织的炎症评分; 与对照组比较: $^{***}P<0.001$; 与 Model 组比较: $^{\#\#}P<0.01$, $^{\#\#\#}P<0.001$

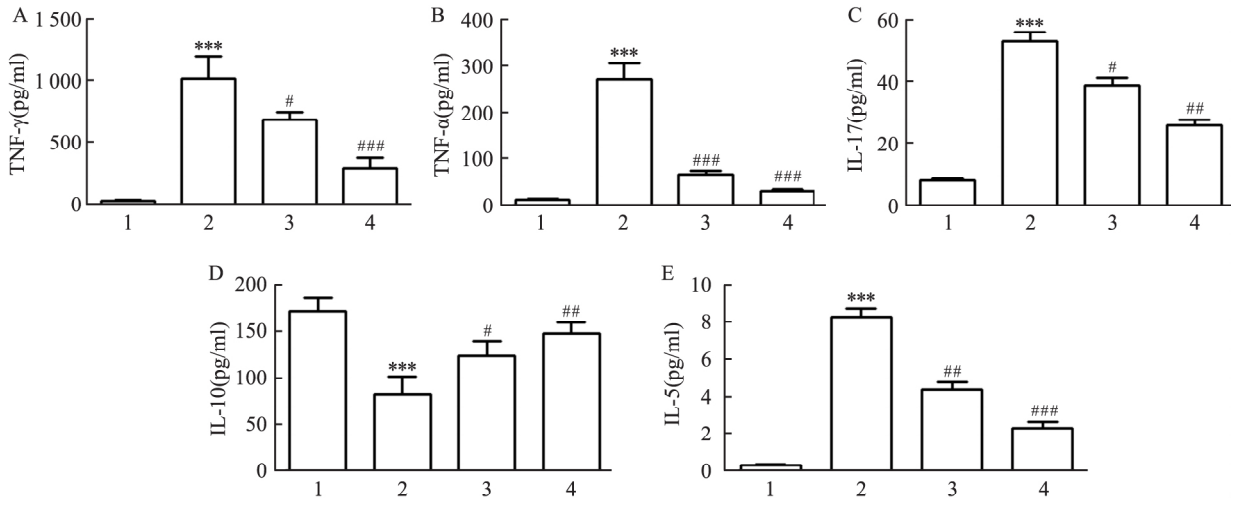



**图4 ELISA 试剂盒检测 JTE907 对 BALF 中细胞因子水平影响**

A: IFN-γ; B: TNF-α; C: IL-17; D: IL-10; E: IL-5; 1: 对照组; 2: Model 组; 3: JTE-907-L 组; 4: JTE-907-H 组; 与对照组比较: $^{***}P<0.001$; 与 Model 组比较: $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$, $^{\#\#\#}P<0.001$

**2.4 JTE907 对中性粒细胞哮喘模型大鼠脾脏的 Th17/Treg 平衡的影响** 为了解 JTE-907 是如何通过调节中性粒细胞哮喘模型大鼠的 T 细胞反应来发挥治疗效果，该研究探讨了 JTE-907 治疗对大鼠脾脏中 Th17 和 Treg 细胞失衡的影响。与正常对照组相比，模型组大鼠脾脏中 Th17/Treg 比例要高得多($t=4.915$, $P=0.005$)。与模型组相比，JTE-907 治疗组大鼠脾脏中 Th17/Treg 比例降低($t=3.071$、$2.659$, $P=0.028$、$0.035$)(图5)。这些结果表明，JTE-907 治疗可以通过恢复 Th17/Treg 细胞的平衡来减轻大鼠的哮喘。

**2.5 JTE907 调节中性粒细胞哮喘模型大鼠肺组织中 Th17 和 Treg 转录因子表达** 转录因子 RORγt 和 Foxp3 分别在 Th17 和 Treg 细胞的分化和功能中起关键作用。为了确定 JTE907 对 RORγt 和 Foxp3 表达的影响，该研究评估了大鼠肺组织中 RORγt 和 Foxp3 的蛋白水平。如图6所示，与正常对照组相比，模型组大鼠中 RORγt 蛋白水平增加($P<0.05$)和 Foxp3 蛋白水平降低($P<0.05$)。JTE-907 处理抑制了 RORγt 蛋白水平($P<0.05$)，并增加了 Foxp3 蛋白水平($P<0.05$)。这些结果表明 JTE-907 处理可恢复中性粒细胞哮喘模型大鼠肺组织中 Th17/Treg 细胞的平衡。

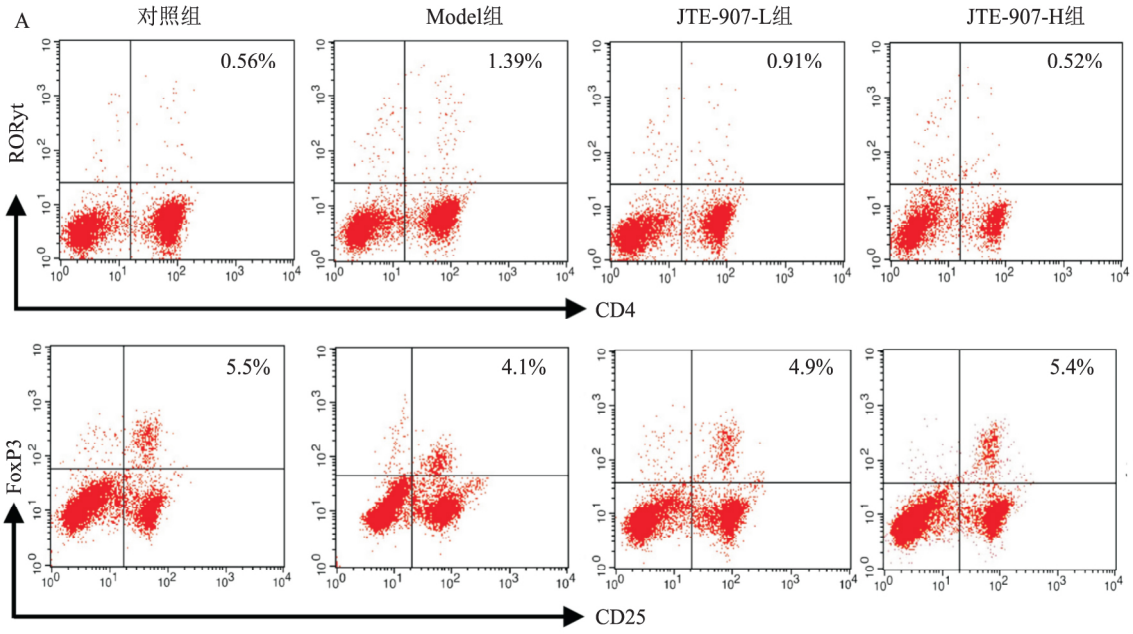
STAT5 激活对于 Treg 细胞的分化和维持以及

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

抑制 Th17 细胞的分化至关重要。因此,研究分析了大鼠肺组织中 STAT5 和 p-STAT5 的蛋白水平。结果显示,模型组大鼠肺组织中 STAT5 的磷酸化水平降低($P<0.05$),而 JTE-907 处理增加了 STAT5 的磷酸化水平($P<0.05$)(图 6)。结果表明 JTE907 可以增强 STAT5 的磷酸化,这可能有助于其对 Th17/Treg 平衡的调节作用。

## 3 讨论

已知在中性粒细胞性哮喘中,Th17 细胞介导的免疫反应在该疾病中起重要作用[9-10]。Wilson et al[11]研究表明Th17反应可促进气道中性粒细胞



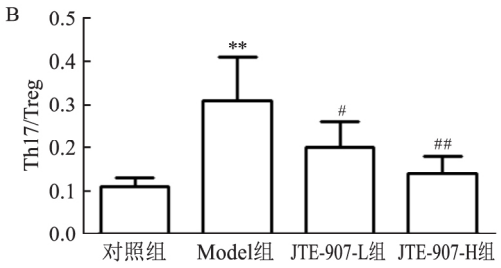




**图 5 JTE907 对中性粒细胞哮喘模型大鼠脾脏的 Th17/Treg 平衡的影响**

A: 脾脏 $CD4^+$ T 细胞上 T 细胞亚群的代表性流式细胞仪数据; B: Th17/Treg 的比例; 与对照组比较: $^{**}P<0.01$; 与 Model 组比较: $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$

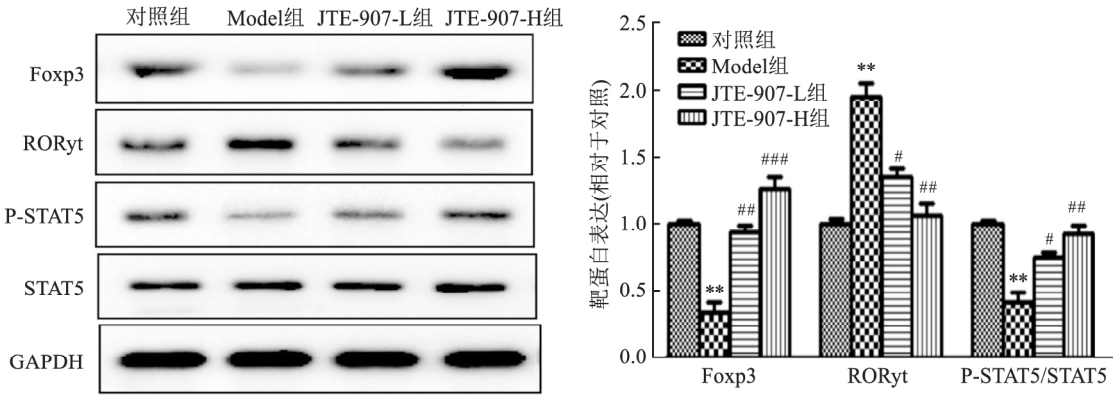



**图 6 JTE907 对肺组织中 Th17 和 Treg 转录因子表达的影响**

与对照组比较: $^{**}P<0.01$; 与 Model 组比较: $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$, $^{\#\#\#}P<0.001$

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

增多和急性气道高反应性。低剂量 LPS 可增强 Th17 介导的反应,导致 IL-17 等细胞因子的释放和中性粒细胞的浸润。最近一项研究[12]表明,与对照哮喘患者相比,哮喘患者痰中 IL-5 和 IL-17A mRNA 过度表达,并且 Th17 极化异常与哮喘患者的激素敏感性和严重程度密切相关。因此,更好地了解中性粒细胞哮喘的发病机制和 Th17 极化的发展将有助于目前类固醇不敏感或严重哮喘的治疗。在目前的研究中,采用 OVA 致敏和 LPS 刺激后,大鼠出现典型的 Th17 免疫反应过度激活和 IL-5 上调的病理改变,表明中性粒细胞哮喘动物模型建立成功。

在几种炎症模型中,CB2 信号传导抑制促炎细胞因子的产生以及白细胞募集到炎症部位,从而降低疾病进展,例如在 EAE、脊髓损伤和应激诱导的神经炎症中[13]。目前,已有研究[14]表明通过 CB2 受体导致免疫抑制的机制包括诱导凋亡、抑制增殖、抑制促炎性细胞因子和诱导 Treg 细胞。由于其在治疗炎症和自身免疫疾病中的潜在应用价值,因此,选择特异性激活 CB2 受体化合物治疗可能对中性粒细胞性哮喘有用。JTE907 作为 CB2 的反向激动剂,具有较高的特异性;JTE907 在啮齿动物模型中具有抗炎、抗过敏特性[15]。该研究表明通过腹腔注射 JTE907 治疗对大鼠的哮喘具有保护作用,表现在 BALF 中的炎症细胞总数和中性粒细胞百分比降低,并且 T 细胞因子(IFN-γ、IL-5、IL-17)以及中性粒细胞相关的炎症介质 TNF-α 降低,而抗炎细胞因子 IL-10 水平升高。因此,该研究推测 JTE907 通过调节 $CD4^+$ 幼稚 T 细胞向效应 T 细胞的分化来减弱炎症细胞的浸润。

研究进一步探讨了 CB2 受体活化对 $CD4^+$ T 细胞分化影响。在体外实验中,JTE907 能够诱导 $CD4^+$ 幼稚 T 细胞向 Treg 细胞分化。但是,它不会诱导其他亚型的 T 细胞分化,例如 Th1、Th2、Th9 和 Th17 细胞。众所周知,Treg 细胞功能紊乱在多种炎症和自身免疫性疾病中起着重要作用;因此,JTE907 可能在治疗以 Treg 细胞失调为特征的疾病方面具有巨大的潜力[2]。此外,在体内试验中模型组大鼠脾脏和肺组织中 Th17/Treg 比例比正常组高得多。近年来,研究[16]表明 Th17/Treg 失衡在中性粒细胞性哮喘的炎症诱导和维持中具有重要作用。与 JTE907 对细胞因子谱的调节作用一致,它降低 Th17 细胞比例,增加 Treg 细胞百分率,从而恢复了 Th17/Treg 的平衡。此外,该研究还表明了 JTE907 可以增强 STAT5 的磷酸化。据报道,STAT5 可以直接结合 Foxp3 基因诱导 Treg 细胞的发育和维持,也可以直接结合 RORγt 基因抑制 Th17 相关基因的转录[17]。因此,JTE907 对 Th17/Treg 平衡的调节作用可能与增强 STAT5 的磷酸化有关。

综上所述,CB2 受体的激活对 Th-17 介导的中性粒细胞哮喘大鼠有一定的保护作用,其作用机制包括改善 Th17/Treg 平衡以及调节其各自的细胞因子水平。此外,STAT5 的激活可能是 JTE907 对 Th17/Treg 失衡调节作用的潜在机制。

## 参考文献


[1] 王 丹,杨 丹,王小虎,等. 支气管哮喘发病中的固有免疫机制[J]. 中华结核和呼吸杂志,2018,41(3):228-31.

[2] 张 伟,涂敏芳,邓焕华. 转录因子 ROR-γt 与 Th17 介导的中性粒细胞性哮喘[J]. 中国免疫学杂志,2018,34(9):1366-71.

[3] 张兰英,陈 杰,张 奕,等. 慢性阻塞性肺疾病患者肺组织中树突状细胞、辅助性 T 细胞 17/调节性 T 细胞的表达及其意义[J]. 中华内科杂志,2019,58(2):125-32.

[4] 李亭亭,柯越海,程洪强,等. 中性粒细胞在哮喘中作用的研究进展[J]. 浙江大学学报(医学版),2016,45(5):544-9.

[5] Spiller K, Bi G, He Y, et al. Cannabinoid CB1 and CB2 receptor mechanisms underlie cannabis reward and aversion in rats[J]. Br J Pharmacol, 2019, 176(9):1268-81.

[6] Soethoudt M, Stolze S C, Westphal M, et al. Selective photoaffinity probe that enables assessment of cannabinoid CB2 receptor expression and ligand engagement in human cells[J]. J Am Chem Soc, 2018, 140(19): 6067-75.

[7] Fechtner S, Singh A K, Ahmed S, et al. Role of cannabinoid receptor 2 in mediating interleukin-1β-induced inflammation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts[J]. Clin Exp Rheumatol, 2019, 37(6):1026-35.

[8] Gui H, Liu X, Liu L, et al. Activation of cannabinoid receptor 2 attenuates synovitis and joint distruction in collagen-induced arthritis[J]. Immunobiology, 2015, 220(6): 817-22.

[9] 张桐茂,刘 炜,孔德颖. 南葶苈子中的指标成分槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖基-7-O-β-D-龙胆双糖苷对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺部免疫功能调节机制研究[J]. 中草药,2019,50(4):121-8.

[10] Li W, Geng L, Liu X, et al. Recombinant adiponectin alleviates abortion in mice by regulating Th17/Treg imbalance *via* p38MAPK-STAT5 pathway[J]. Biol Reprod, 2019, 100(4):1008-17.

[11] Wilson R H, Whitehead G S, Nakano H, et al. Allergic sensitization through the airway primes Th17-dependent neutrophilia and airway hyperresponsiveness[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 180(8): 720-30.

[12] Seys S, Grabowski M, Adriaensen W, et al. Sputum cytokine mapping reveals an 'IL-5, IL-17A, IL-25-high' pattern associated with poorly controlled asthma[J]. Clin Exp Allergy, 2013, 43


(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(9): 1009 – 17.

[13] Kong W, Li H, Tuma R F, et al. Selective CB2 receptor activation ameliorates EAE by reducing Th17 differentiation and immune cell accumulation in the CNS [J]. Cell Immunol, 2014, 287(1): 1 – 17.

[14] Huang Z, Zheng Y, Li N, et al. Protective effects of specific cannabinoid receptor 2 agonist GW405833 on concanavalin A-induced acute liver injury in mice [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2019, 40(11): 1404 – 11.

[15] Marini P, Cascio M G, King A, et al. Characterization of cannabinoid receptor ligands in tissues natively expressing cannabinoid CB2 receptors [J]. Br J Pharmacol, 2013, 169(4): 887 – 99.

[16] Zhang F, Huang G, Hu B, et al. Recombinant HMGB1 a box protein inhibits Th17 responses in mice with neutrophilic asthma by suppressing dendritic cell-mediated Th17 polarization [J]. Int Immunopharmacol, 2015, 24(1): 110 – 8.

[17] Sadati Z A, Motedayyen H, Sherkat R, et al. Comparison of the percentage of regulatory T cells and their p-STAT5 expression in allergic and non-allergic common variable immunodeficiency patients [J]. Immunol Invest, 2019, 48(1): 52 – 63.

# Study on the mechanism of CD4$^+$ T cell differentiation in alleviating neutrophil asthma rat model based on CB2 receptor activation

Mo Rubing, Huang Linhui, Meng Chong, et al

(*Dept of Respiratory, Hainan Provincial People's Hospital, Haikou* 570311)

**Abstract** ***Objective*** To evaluate the therapeutic value of JTE-907 (cannabinoid CB2 receptor reverse agonists) in a model of neutrophilic asthma, and to determine the potential therapeutic mechanism of CB2 receptor activation by observing its effect on the differentiation of CD4$^+$ naïve T cells. ***Methods*** In order to study the effect of JTE907 on the differentiation of T cell subtypes, used an *in vitro* system of Th lineage-specific differentiation of naïve CD4$^+$ T lymphocytes isolated from the rat spleen. The expression of Tbx21, Gata3, interleukin (IL)-9, ROR-C, FoxP3, CNR2 mRNA was detected by qRT-PCR. 40 rats were divided randomly into four experimental groups with 10 animals each: normal control group, model group, JTE-907 low-dose group (JTE-907-L, intraperitoneal injection of 5 mg/kg) and JTE-907 high Dose group (JTE-907-H, 20 mg/kg). Except for the normal control group, rats at other three groups were established neutrophil asthma models. The concentration of serum OVA-specific IgE and BALF cytokine was detected by ELISA. The percentage of Th17 and Treg cells in spleen was analyzed by flow cytometry, and the expression of RORγt, Foxp3 and STAT5 protein in lung tissue was detected by Western blot. ***Results*** qRT-PCR analysis showed that JTE907 induced the expression of FoxP3 and CB2 receptors at all the concentrations tested. After OVA sensitization and LPS stimulation, the level of OVA-sIgE in the model group increased ($P < 0.05$), and the number of neutrophils and the levels of interferon (IFN)-γ, tumor necrosis factors (TNF)-α, IL-17 and IL-5 in BALF significant increased ($P < 0.05$). JTE-907 treatment significantly reversed the above changes ($P < 0.05$). In addition, compared with the model group, the ratio of Th17/Treg in spleen of JTE-907 treatment group significantly decreased ($P < 0.05$), and the level of RORγt protein in lung tissue significantly decreased ($P < 0.05$), while the levels of Foxp3 and p-STAT5 significantly increased ($P < 0.05$). ***Conclusion*** The activation of CB2 receptor has a protective effect in rat with Th-17 mediated neutrophilic asthma. The mechanism of JTE907 effect involves improving Th17/Treg balance, as well as regulating their respective cytokine levels.

**Key words** CB2 receptor; neutrophil; rat; Th17/Treg; asthma

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net