

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.31.003

文章编号: 1005-8982 (2018) 31-0014-05

## 布地奈德对哮喘小鼠 IL-17 表达的影响

张艳霞, 王文革

(中国人民解放军空军总医院 儿科, 北京 100142)

**摘要: 目的** 探讨白细胞介素 17 (IL-17) 在哮喘小鼠发病机制中的作用, 布地奈德控制哮喘的作用机制与 IL-17 表达的关系。**方法** 24 只 4 周龄清洁级雌性 BALB/c 小鼠, 随机分为正常组、哮喘组及布地奈德组, 每组 8 只。以卵清蛋白 (OVA) 致敏、激发复制哮喘小鼠模型。采用雾化吸入的方法给予哮喘小鼠布地奈德混悬液治疗。模型复制成功后, 取其肺组织行病理切片观察肺组织病理变化, 并行实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR), 测定肺组织中 IL-17 mRNA 的表达。取支气管肺泡灌洗液 (BALF) 行酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测 IL-17 细胞因子的水平。**结果** 哮喘组气道中炎症细胞浸润、BALF 中 IL-17 表达、肺组织中 IL-17 mRNA 表达与正常组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 哮喘组均增高。经布地奈德雾化吸入干预后, 布地奈德组气道中炎症细胞、BALF 中 IL-17 的表达、肺组织中 IL-17 mRNA 表达与哮喘组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 布地奈德组低于哮喘组。**结论** IL-17 在哮喘小鼠中的表达升高, 抑制小鼠中 IL-17 的表达, 是布地奈德控制哮喘的作用机制之一。

**关键词:** 哮喘; 布地奈德; 白细胞介素 17; 气道炎症

**中图分类号:** R-332; R562.25

**文献标识码:** A

## Effect of Budesonide on IL-17 expression level in asthmatic mice

Yan-xia Zhang, Wen-ge Wang

(Department of Pediatrics, Air Force General Hospital of PLA, Beijing 100142, China)

**Abstract: Objective** To explore the role of IL-17 in the pathogenesis of asthmatic mice, and the relationship between the action mechanism of Budesonide controlling asthma and the expression level of IL-17. **Methods** Twenty-four female BALB/c mice at the age of 4 weeks were randomly divided into a control group, an asthma group and a Budesonide group, and each group had 8 mice. The mouse model of asthma was made by sensitization with ovalbumin (OVA). The asthmatic mice were treated with Budesonide suspension by atomization inhalation. After the success of the model, the pathological changes of the lung tissues were observed, and the expression level of IL-17 mRNA in the lung tissues was determined by qRT-PCR. The IL-17 level in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was detected by ELISA. **Results** Compared with the control group, inflammatory cell infiltration in the airway of the asthma group and the expression level of IL-17 in BALF and IL-17 mRNA in the lung tissues were significantly higher ( $P < 0.05$ ). After intervention with Budesonide atomization inhalation, the inflammatory cell infiltration in the airway and the expression level of IL-17 in BALF and IL-17 mRNA in the lung tissues in the Budesonide group were lower than those in the asthma group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** The expression level of IL-17 is elevated in asthmatic mice. Inhibiting the expression level of IL-17 in mice is one of the mechanisms of Budesonide for asthma control.

**Keywords:** asthma; Budesonide; IL-17; airway inflammation

收稿日期: 2018-04-18

支气管哮喘(简称哮喘)是由各种炎症细胞和细胞组分参与的气道慢性炎症疾病,其发病机制极为复杂,目前尚未完全清楚。哮喘病理变化主要包括 3 种特征性表现:气道慢性炎症、气流受阻及气道高反应,其中气道慢性炎症被认为是哮喘的本质。近年研究发现<sup>[1]</sup>在各种免疫反应如自身免疫、宿主防御病原体及炎症反应中,白细胞介素 17(IL-17)均参与其免疫调节机制。IL-17 可以介导中性粒细胞、嗜酸性粒细胞等炎症细胞在气道中聚集,加重哮喘的气道炎症,从而参与哮喘的发生、发展,也可以抑制炎症,在哮喘的气道中起负性调节作用。目前 IL-17 在哮喘中起促炎还是抑炎的作用尚未明确。吸入性糖皮质激素(inhaled corticosteroids, ICS)可以减少细胞因子及炎症细胞在气道中的聚集、浸润<sup>[2]</sup>,是长期控制哮喘的有效药物,其中布地奈德为其代表性药物<sup>[3]</sup>。目前关于布地奈德治疗哮喘作用机制的研究主要涉及通过干预 IL-1、IL-10、IL-5、IL-23 等细胞因子的表达,而对 IL-17 表达影响的研究较少。本研究利用哮喘小鼠模型,研究哮喘小鼠中 IL-17 的表达,经布地奈德干预后,哮喘小鼠 IL-17 表达的变化。进而探讨 IL-17 在哮喘发病机制中的作用以及布地奈德控制哮喘的作用机制与 IL-17 的关系。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要试剂和仪器

布地奈德混悬液(1 mg/2 ml, LOT320888)购自上海阿斯利康制药有限公司,十二水硫酸铝钾(237086)、卵清蛋白(Ovalbumin, OVA, A5253 ~ 250 g, 纯度 ≥ 98%)购自美国 Sigma 公司, HE 及 AB-PAS 染色试剂盒购自武汉谷歌生物公司,酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) IL-17 试剂盒购自美国 eBioscience 公司, Trizol 购自美国 Invitrogen 公司,氯仿、异丙醇、无水乙醇均购自天津市永大化学试剂有限公司, DEPC 水购自北京索莱宝科技有限公司, TIAN Script RT KIT、Super Real Pre Mix Plus (SYBR Green)均购自天根生化科技(北京)有限公司。压缩空气式雾化机购自江苏鱼跃医疗设备股份有限公司。引物序列由上海生物工程技术有限公司设计。

### 1.2 实验动物

SPF 级雌性 BALB/c 小鼠 24 只,4 周龄,体重(13 ± 1) g,购自北京斯贝福实验动物科技有限公司

[SCXK(京)2016-0004],小鼠饲养于中国人民解放军总医院第一附属医院(304 医院)实验动物房。其余实验于中国人民解放军空军总医院临床航空医学实验室完成。

### 1.3 模型复制

复制哮喘小鼠模型,参考文献[4-5]并加以改进。小鼠适应性饲养 1 周后,经随机数表法分为正常组、哮喘组及布地奈德组,每组 8 只。哮喘组与布地奈德组每只小鼠分别于饲养的第 8、15、22 天腹腔注射 OVA 致敏液 0.2 ml[(内含十二水硫酸铝钾 1 mg, OVA 100 μg, 磷酸盐缓冲液(PBS) 0.2 ml)]致敏。正常组小鼠腹腔只注射 PBS。哮喘组及布地奈德组分别自饲养的第 29 天开始以 5%OVA 溶液雾化激发,正常组以 PBS 雾化吸入,1 次/d,30 min/次,连续激发 14 d 后,布地奈德组在 5% OVA 激发前 30 min 给予布地奈德混合液 4 ml(布地奈德混悬液 1 mg/2 ml、生理盐水 2 ml)雾化吸入 30 min。正常组及哮喘组小鼠均同时给予等量的生理盐水。

### 1.4 取材

小鼠末次给予 OVA、布地奈德混悬液雾化吸入后,禁食 24 h,24 h 后用 1%戊巴比妥腹腔注射麻醉,引颈处死后,切开颈部及胸部皮肤,逐层分离组织,充分暴露气管及双肺,于气道的上段做一横切口,以 21 G 的注射器针头做气管插管并固定,结扎右肺,将 0.3 ml 的 PBS 溶液缓慢灌注左肺并缓慢回抽灌洗液,重复灌洗 3 次,回收率为 80%。将收集的支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)以 1 500 r/min,4℃离心 10 min,回收上清液置入 -80℃冰箱冷冻保存。取右肺 -80℃冰箱冷冻保存。

### 1.5 小鼠肺组织病理切片的制备

收取 BALF 后,分离小鼠右肺,取约为 1.5 cm × 1.5 cm × 0.2 cm 大小的肺组织,将其浸润于 4%多聚甲醛中固定 48 h,石蜡包埋,行小鼠肺组织切片,厚度约 3 μm,行 AB-PAS 及 HE 染色,显微镜下观察小鼠肺组织中性粒细胞、嗜酸性粒细胞等炎症细胞浸润情况,同时观察支气管管腔狭窄、气道中杯状细胞增生等典型的哮喘病理学改变。对各组肺组织进行病理学分级评分<sup>[6-7]</sup>,0 分:无炎症细胞;1 分:少许炎症细胞;2 分:炎症细胞形成环状,层厚为 1 个细胞;3 分:大量分布均匀的炎症细胞,或炎症细胞形成环状,层厚为 2 ~ 4 个细胞;4 分:大量炎症细胞聚集成团,

或炎症细胞成环状,层厚 >4 个细胞。

### 1.6 BALF 中 IL-17 表达水平的检测

采用 ELISA 检测 BALF 中 IL-17 的表达水平,具体操作步骤按照试剂盒说明书进行,每个样本和标准品均设 2 个复孔。

### 1.7 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测小鼠肺组织中 IL-17 的表达

IL-17 正向引物 5'-AAGGCAAATACGGTGGTG TG-3',反向引物 3'-CGCTGAGGAAGTGGGAAAAG-5'。所有 cDNA 样品分别配置 qRT-PCR 反应体系。实验操作过程按产品说明书进行:在反应管内依次加入 2× Super Real Pre Mix Plus (10 μl)、正向引物 (10 μmol) (0.6 μl)、反向引物 (10 μmol) (0.6 μl)、cDNA (100 ng)、50× ROX Reference Dye Δ (0.4 μl),以 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 将反应体系调至 20 μl。将溶液混合后,短暂离心,将制备好的标准品和检测样本上机进行 PCR 反应。PCR 反应条件为 95℃ 15 min; 95℃ 10 s, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 40 个循环。

### 1.8 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件,计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,符合方差齐性及正态分布的采用单因素方差分析,不符合的进行 Tamhane's 检验,组间比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 OVA 激发后小鼠的行为表现

哮喘组以及布地奈德组小鼠激发后均出现不同程度的呼吸急促、喘息、烦躁不安、腹肌痉挛、搔鼻及站立不稳等阳性行为,短时间内可自行缓解。其中布地奈德组的哮喘症状较哮喘组症状明显减轻。正常组未见明显的异常表现。

### 2.2 各组小鼠肺组织病理改变

HE 染色中正常组小鼠气道黏膜未见明显的炎症细胞浸润,气管腔光滑,肺泡腔内未见炎症分泌物,无肺泡壁变薄。哮喘组小鼠气道黏膜层可见明显的炎症细胞浸润,以中性粒细胞、嗜酸性粒细胞增生为主,黏膜上皮细胞肿胀,肺泡腔内可见炎症细胞浸润,肺泡壁变薄,气道管腔变窄。经布地奈德雾化吸入后,布地奈德组小鼠气道黏膜可见炎症细胞浸润,黏膜上皮细胞仍有轻微的增厚,但与哮喘组小鼠相比明显减轻,气道管腔狭窄缓解(见图 1)。AB-PAS 染色中正常组小鼠气道上皮未见杯状细胞,气道平滑肌及基底膜未增厚,哮喘组小鼠气道上皮可见明显的杯状细胞,气道平滑肌及基底膜明显增厚,经布地奈德干预后,布地奈德组小鼠气道上皮仍可见杯状细胞,但比哮喘组相比明显较少,气道平滑肌增厚明显减轻(见图 2)。

### 2.3 各组小鼠肺组织病理学炎症评分比较

各组小鼠肺组织病理学炎症评分,正常组为

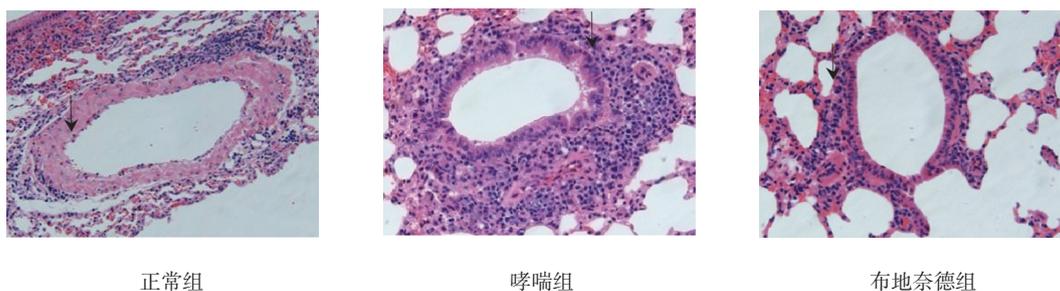


图 1 各组小鼠肺组织病理切片图 (HE × 400)

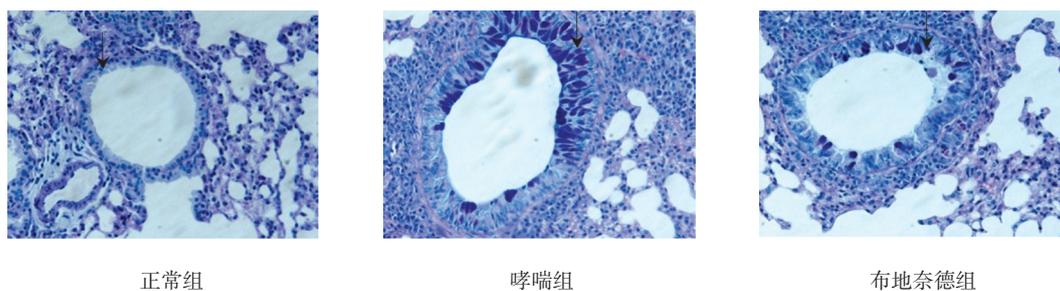


图 2 各组小鼠肺组织病理切片图 (AB-PAS × 400)

( $0.000 \pm 0.000$ ), 哮喘组为 ( $3.625 \pm 0.518$ ), 布地奈德组为 ( $1.750 \pm 0.463$ ), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=105.903, P=0.000$ ); 进一步两两比较显示, 与正常组比较, 哮喘组小鼠肺组织炎症评分增高 ( $t=19.811, P=0.000$ ); 与正常组比较, 布地奈德组小鼠肺组织炎症评分增高 ( $t=10.693, P=0.000$ ); 与哮喘组比较, 布地奈德组小鼠肺组织炎症评分降低 ( $t=-6.355, P=0.000$ )。

## 2.4 各组小鼠 BALF 中 IL-17 细胞因子的表达比较

ELISA 法检测各组 BALF 中 IL-17 表达, 正常组为 ( $12.175 \pm 4.322$ ) pg/ml, 哮喘组为 ( $58.750 \pm 10.026$ ) pg/ml, 布地奈德组为 ( $29.522 \pm 8.900$ ) pg/ml, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=67.020, P=0.000$ ); 进一步两两比较显示, 与正常组比较, 哮喘组中 IL-17 表达升高 ( $t=12.496, P=0.000$ ); 与正常组

比较, 布地奈德组小鼠中 IL-17 的表达升高 ( $t=6.252, P=0.000$ ); 与哮喘组比较, 布地奈德组中 IL-17 的表达降低 ( $t=-6.848, P=0.000$ )。

## 2.5 各组小鼠肺组织中 IL-17 mRNA 的表达比较

qRT-PCR 目的基因的扩增曲线, 见图 3。qRT-PCR 目的基因的熔解曲线, 见图 4。

qRT-PCR 检测各组小鼠肺组织中 IL-17 mRNA 表达, 正常组为 ( $0.935 \pm 0.152$ ) pg/ml, 哮喘组为 ( $6.898 \pm 1.559$ ) pg/ml, 布地奈德组为 ( $3.613 \pm 0.681$ ) pg/ml, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=73.390, P=0.000$ ); 进一步两两比较显示, 与正常组比较, 哮喘组中 IL-17 mRNA 表达升高 ( $t=11.671, P=0.000$ ); 与正常组比较, 布地奈德组小鼠中 IL-17 mRNA 的表达升高 ( $t=11.619, P=0.000$ ); 与哮喘组比较, 布地奈德组中 IL-17 mRNA 的表达降低 ( $t=-5.372, P=0.000$ )。

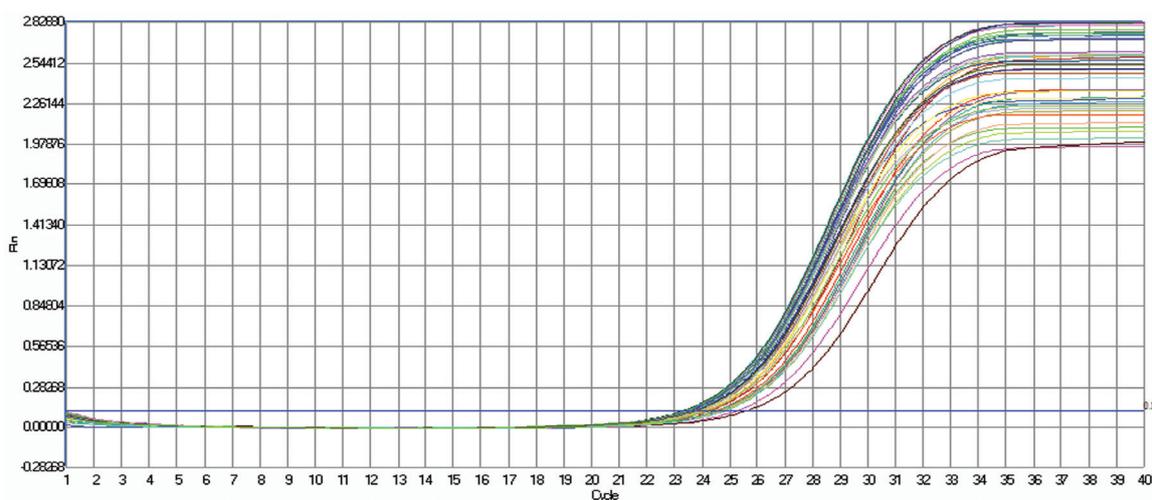


图 3 目的基因的扩增曲线

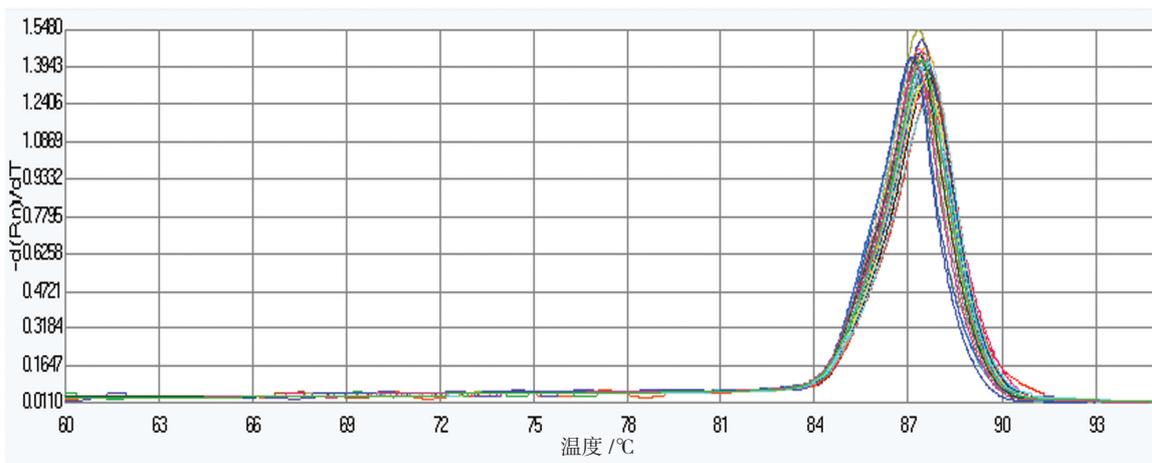


图 4 目的基因的熔解曲线

### 3 讨论

Th17 细胞是近年来新发现的一种新型的 CD4<sup>+</sup>T 细胞,一种独立于 Th1 和 Th2 以外的辅助性 T 细胞。其特征性细胞因子为 IL-17 和 IL-17F, IL-17F 主要在黏膜防御反应中起作用<sup>[8]</sup>。IL-17 不仅可参与肿瘤、免疫性疾病,而且还与许多炎症疾病有关。研究显示<sup>[9]</sup> IL-17 可以通过肿瘤坏死因子、IL-1 的协同作用,放大炎症效应,进而参与哮喘等炎症疾病的发生、发展。IL-17 具有很强的募集中性粒细胞以及促进多种细胞释放炎症因子的作用<sup>[10]</sup>。哮喘是一种气道慢性炎症,有研究证明在哮喘患者肺组织、BALF、痰和血清中 IL-17 表达明显增高<sup>[11-12]</sup>。但是 IL-17 在哮喘的肺组织中起抑制炎症的作用。本研究发现,哮喘小鼠 BALF 中 IL-17 的表达及肺组织中 IL-17 mRNA 表达较正常组均增高,并且哮喘组的气道中嗜酸性粒细胞及中性粒细胞与正常组比较有所增多,杯状细胞亦增多。进一步说明 IL-17 与哮喘的发生发展有着密不可分的关系。

ICS 是目前应用最广泛也是最有效的长期控制、预防哮喘发作的首选药物,其治疗哮喘的作用已成为国际共识<sup>[13]</sup>,其中布地奈德是 ICS 中最常用的一种,抗炎效果好,雾化吸入的布地奈德可以局部、直接作用于气道黏膜<sup>[14]</sup>,局部抗炎作用强,可以有效地减少全身不良反应,更好地控制哮喘患者的气道炎症及降低呼吸道阻力,进而缓解哮喘患者的呼吸困难、喘息等症状,以及缩短咳嗽持续的时间。本研究发现哮喘组小鼠的 BALF 中 IL-17 表达及肺组织中 IL-17 mRNA 表达均升高,气道中炎症细胞及杯状细胞增多,经布地奈德干预治疗后,降低哮喘小鼠肺中 IL-17 的表达,以及气道中炎症细胞减少。本研究提示 IL-17 在哮喘的发生、发展中有一定的作用,而布地奈德的干预可以降低 IL-17 的表达,减少炎症细胞在气道中聚集,减轻哮喘小鼠肺部气道炎症。

综上所述,致敏小鼠在反复的抗原激发后,哮喘组小鼠的气道中炎症细胞聚集,杯状细胞增多,炎症评分较正常组、布地奈德组均高, BALF 中 IL-17 表达及肺组织中 IL-17 mRNA 表达均升高。而经布地奈德干预后,与哮喘组比较,哮喘小鼠的气道炎症减轻,炎症评分降低, BALF 中 IL-17 表达及肺组织中 IL-17

mRNA 表达降低。本实验结果表明, IL-17 可以促进炎症细胞在气道中聚集,引起气道炎症,参与哮喘的发生、发展,同时也表明布地奈德可抑制 IL-17 的合成、分泌,从而减轻气道炎症,进一步揭示抑制 IL-17 分泌是布地奈德控制哮喘的作用机制之一。

#### 参 考 文 献:

- [1] KORN T, BETTELLI E, OUKKA M, et al. IL-17 and Th17 Cells[J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 485-517.
- [2] ZAINUDIN B. Steroid therapy in obstructive airway diseases[J]. *Respirology*, 1997, 2: 17-31.
- [3] PARK S, CHUNG H S, SHIN D, et al. Adenovirus-mediated Foxp3 expression in lung epithelial cells reduces airway inflammation in ovalbumin and cockroach-induced asthma model[J]. *Exp Mol Med*, 2016, 48(9): e249.
- [4] 陈晓红, 钟南山, 张卫东, 等. 布地奈德对哮喘小鼠气道重塑及 JAK1/STAT6 表达的影响 [J]. *中华医学杂志*, 2007, 87(23): 1627-1632.
- [5] 刘家齐, 赵正晓, 魏颖, 等. 芍药苷对哮喘模型小鼠气道炎症趋化因子及受体的干预作用 [J]. *中国实验动物学报*, 2016, 24(5): 460-464.
- [6] HENDERSON W J, TANG L O, CHU S J, et al. A role for cycsteinyll leukotrienes in airway remodeling in a mouse asthma model[J]. *Am J ReirCrit Care Med*, 2002, 165(1): 108-106.
- [7] 金华良, 王利民, 罗清莉, 等. 淫羊藿对哮喘大鼠气道高反应性的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(23): 169-173.
- [8] IWAKURA Y, ISHIGAME H, SAIJO S, et al. Functional specialization of interleukin-17 family members[J]. *Immunity*, 2011, 34(2): 149-162.
- [9] KRAMER J M, CAFFEN S L. Interleukin-17: A new paradigm in inflammation, autoimmunity, and therapy[J]. *Journal of Periodontology*, 2007, 78(6): 1083-1093.
- [10] 王萍, 韩波. 温肺止咳汤对支气管哮喘患儿外周血 IL-17 和肺功能的影响 [J]. *山东医药*, 2011, 51(11): 69-70.
- [11] SUN Y C, ZHOU Q T, YAO W Z. Sputum interleukin-17 is increased and associated with airway neutrophilia in patients with severe asthma[J]. *Chin Med J*, 2005, 118(11): 953-956.
- [12] BULLENS D M, TRUYEN E, COTEUR L, et al. IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients linking T cell driven inflammation and granulocytic influx[J]. *Respir Res*, 2006, 7(1): 135.
- [13] PAPAPOPOULOS N G, ARAKAWA H, CARLSEN K H, et al. International consensus on (ICON) Pediatric asthma[J]. *Allergy*, 2012, 67(8): 976-997.
- [14] 徐秀珍, 刘黎明. 小儿毛细支气管炎和婴幼儿哮喘治疗的新进展 [J]. *国外医学妇幼保健分册*, 1997, 8(3): 124-125.

(张蕾 编辑)