

B 细胞转录激活因子、 维甲酸相关孤儿核受体 γt 对急性哮喘小鼠气道炎症的影响

陈菊屏,原淑莉,张 明,王文军,范贤明

(泸州医学院附属医院呼吸内二科,四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 探讨 B 细胞转录激活因子(BATF)、白细胞介素-17 及维甲酸孤儿核受体 γt (ROR γt)对急性哮喘小鼠气道炎症的影响。方法 (1)将 24 只健康雌性 BALB/c 小鼠随机分为生理盐水对照组(NS 组)、哮喘模型组(AS 组)、地塞米松治疗组(DEX 组),每组 8 只。第 0、7、14 天,AS 组、DEX 组小鼠用卵清蛋白(OVA)抗原液腹腔内注射致敏,NS 组用等体积生理盐水腹腔内注射。第 21 天起,NS 组超声雾化吸入生理盐水,AS 组、DEX 组超声雾化吸入 2%的 OVA 液,均为每天 1 次,每次 40 min,连续 5 d。每次雾化前 30 min,DEX 组以地塞米松 1.0 mg/kg 腹腔注射,NS 组、AS 组则以等体积的生理盐水腹腔注射。末次雾化结束 24 h 后,各组小鼠留取肺组织标本进行检测。结果 (1)肺组织切片显示:NS 组肺组织无明显炎症反应,AS 组及 DEX 组均存在炎症反应,且 AS 组炎症反应明显高于 DEX 组。(2)免疫组化结果显示:AS 组肺组织 BATF、IL-17、ROR γt 的表达明显高于 NS 组、DEX 组($P<0.05$);DEX 组肺组织 IL-17、BATF、ROR γt 的表达较 AS 组明显降低($P<0.05$)。 (3) 肺组织 BATF 的表达与 BALF 中白细胞(WBC)总数及中性粒细胞(NEU)计数、嗜酸性粒细胞(EOS)计数呈正相关($r=0.487、0.531、0.515, P<0.05$);肺组织 BATF 的表达与 IL-17、ROR γt 的表达呈正相关($r=0.502、0.493, P<0.05$);肺组织 IL-17 的表达与 ROR γt 的表达呈正相关($r=0.536, P<0.05$)。结论 (1)急性哮喘小鼠肺组织中 BATF、IL-17、ROR γt 表达上调。(2)地塞米松可能是通过下调 BATF、IL-17、ROR γt 的表达而减轻气道炎症性损害。

【关键词】 支气管哮喘;白细胞介素 17;B 细胞转录激活因子;维甲酸孤儿核受体 γt ;气道炎症

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2015)07-0937-04

Effects of B cell activating transcription factor, retinoic acid-related orphan nuclear receptor γt on acute airway inflammation in asthmatic mice. CHEN Ju-ping, YUAN Shu-li, ZHANG Ming, WANG Wen-jun, FAN Xian-min. The 2nd Department of Respiratory Medicine, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan, CHINA

【Abstract】 **Objective** To study the role of the B cell activating transcription factor (BATF), IL-17 and the retinoic acid-related orphan nuclear receptor (ROR γt) in acute airway inflammation of asthmatic mice. **Methods** (1) Twenty-four healthy female BALB/c mice were randomly divided into the normal saline group (NS group), the asthma group (AS group), and the dexamethasone group (DEX group), with 8 mice in each group. On days 0, 7 and 14, ovalbumin (OVA) fluid was injected into the abdominal cavity of the mice in AS group and DEX group, and normal saline was injected into the abdominal cavity of the mice in NS group. From the 21st day, the mice in NS group were inhaled normal saline with 40 minutes of ultrasonic atomization once a day for five consecutive days, while the mice in AS group and DEX group were inhaled 2% OVA solution in the same way. The mice in DEX group were given intraperitoneal injection of dexamethasone (1.0 mg/kg) at 30 minutes before the inhalation each time, and the mice in other groups were given the normal saline group in the same way. 24 hours after the final inhalation, mice were collected the lung tissue samples for testing. **Results** (1) According to lung tissue sections, lung tissue in NS group had no significant inflammation, while the lung tissue in AS and DEX groups showed inflammation response. AS group's inflammatory response was higher than DEX group's. (2) Immunohistochemistry results showed the expression of BATF, IL-17 and ROR γt in AS group were higher than that in NS group and DEX group ($P<0.05$), and the expression in DEX group was significantly lower than the AS group ($P<0.05$). (3) The expression of BATF in lung tissue was positively correlated with the count of WBC, NEU and EOS in the BALF differently ($r=0.487, 0.531, 0.515, P<0.05$). The expression of BATF in lung tissue was positively correlated with the one of ROR γt and IL-17 differently ($r=0.502, 0.493, P<0.05$). The expression of IL-17 in lung tissue was positively correlated with the one of ROR γt ($r=0.536, P<$

0.05). **Conclusion** (1) The expression of BATF, IL-17 and ROR γ t in AS group's lung tissue was increased significantly. (2) Dexamethasone could down-regulate the expression of BATF, IL-17 and ROR γ t in asthmatic mice, which would improve airway inflammatory.

【Key words】 Bronchial asthma; IL-17; B cell activating transcription factor (BATF); Retinoic-acid-related orphan nuclear receptor (ROR γ t); Airway inflammation

支气管哮喘(Bronchial asthma,简称哮喘)是呼吸系统的常见疾病,由多种细胞和细胞组份参与,气道炎症及气道高反应性(AHR)为其重要特征^[1]。哮喘的确切发病机制尚未阐明;糖皮质激素类药物在哮喘治疗方面作用显著,但其作用途径亦不甚明确。B细胞活化转录因子(BATF)、白细胞介素-17(IL-17)、维甲酸相关核孤儿受体 γ t(Retinoic acid-related orphan receptor, ROR γ t)近年研究较多的炎症因子,本研究以哮喘模型小鼠为研究对象,观察BATF、IL-17、ROR γ t与哮喘及地塞米松之间的关系,进一步探讨哮喘的发病机制及对哮喘治疗的可能途径。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及哮喘动物模型的制备 24只SPF级健康雌性BALB/c小鼠,6~8周龄,体重15~18g,购自重庆腾鑫比尔实验动物销售有限公司,按照随机数字表法随机分为生理盐水对照组(NS组)、哮喘模型组(AS组)、地塞米松治疗组(DEX组),每组8只。AS组、DEX组小鼠分别于第0、7、14天用卵清蛋白(OVA,美国Sigma公司)原液100 μ g加1mg氢氧化铝及生理盐水配置成200 μ l混悬液,4 $^{\circ}$ C冰箱放置30min后腹腔内注射致敏,NS组用等量0.9%的生理盐水进行腹腔注射。第21天开始AS组、DEX组小鼠分别置于自制的30cm \times 40cm \times 40cm大小的透明封闭箱内,以2%的OVA超声雾化吸入30~40min,每天1次,连续5d,NS组则予以等量生理盐水同频次雾化^[2]。DEX组于每次雾化前30min,予以地塞米松1.0mg/kg(湖北顶辉化工有限公司)腹腔注射,NS组、AS组则予以等体积生理盐水腹腔注射,时间同上。

1.2 支气管肺泡灌洗液(BALF)的收集及检查 各组小鼠末次激发结束24h后,分别予戊巴比妥钠(40mg/kg)腹腔注射麻醉,用1ml注射器行气管插管,注入37 $^{\circ}$ C生理盐水0.5ml,反复抽吸肺泡灌洗液(BALF),重复3次,回收率均在80%以上,离心BALF取上清转移到EP管中,-20 $^{\circ}$ C冰箱保存待检。光学显微镜下进行白细胞(WBC)、中性粒细胞(NEU)及嗜酸性粒细胞(EOS)计数。

1.3 小鼠肺组织病理切片、染色及BATF、IL-17、ROR γ t表达的检测 取右肺组织制备病理切片,HE(苏木素-伊红)染色,光镜下观察肺组织病理学

变化。使用免疫组织化学法检测左肺组织IL-17、BATF、ROR γ t的表达。石蜡包埋组织,常规脱蜡、切片,抗原修复后行内源性过氧化物酶封闭,分别加IL-17A兔抗人多克隆抗体(购于北京博奥森生物有限公司)、BATF兔抗人多克隆抗体(购于NOVUS BIOLOGICALS)及ROR γ t兔抗人多克隆抗体(购于北京博奥森生物有限公司)过夜,加二抗(bs-0360R试剂盒,购于北京博奥森生物有限公司),按试剂盒说明步骤操作。以普通光镜观察切片,胞浆呈棕褐色或棕黄色为阳性。利用彩色图文分析系统进行图像分析及数据采集,随机测量每高倍镜视野下积分吸光度(IA),以IA的值反映切片中阳性物质的表达水平。

1.4 统计学方法 全部数据采用SPSS17.0软件进行统计分析,计量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,相关分析采用双变量相关分析,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠哮喘模型的气道炎症改变

2.1.1 各组小鼠肺组织形态学改变 NS组小鼠肺组织镜下可见支气管管腔光滑、规则,气道上皮完整,黏膜皱襞低平,管壁平滑肌较薄,管腔内未见明显分泌物。AS组支气管管腔狭窄,管壁增厚,多处气道上皮断裂、脱落,气道黏膜增生肥厚,纤毛结构紊乱,较多炎症细胞浸润,肺泡间隔增厚明显,管腔内可见大量黏液堆积;DEX组的上述表现较AS组减轻,但较NS组明显。

2.1.2 各组小鼠BALF中WBC总数、PMN计数及EOS计数比较 与NS组比较,AS组及DEX组BALF中白细胞总数、中性粒细胞数及嗜酸性粒细胞数明显增多($P<0.01$);DEX组BALF中白细胞总数、中性粒细胞数及嗜酸性粒细胞数较AS组明显减少($P<0.01$),见表1。

表1 各组小鼠BALF中WBC总数、NEU及EOS计数比较($\bar{x}\pm s, \times 10^6/\text{ml}$)

组别	只数	WBC	NEU	EOS
NS组	8	4.88 \pm 1.25	0.88 \pm 0.84	1.13 \pm 0.84
AS组	8	20.50 \pm 0.93 ^a	5.25 \pm 0.89 ^a	6.00 \pm 0.93 ^a
DEX组	8	9.25 \pm 1.04 ^{ab}	2.88 \pm 0.84 ^{ab}	2.50 \pm 0.93 ^{ab}

注:^a表示与NS组比较, $P<0.01$;^b表示与AS组比较, $P<0.01$ 。

2.2 各组小鼠肺组织 BATF、IL-17、ROR γ t 的表达 镜下可见 AS 组、DEX 组小鼠支气管上皮细胞及肺泡上皮细胞显示 IL-17、BATF、ROR γ t 表达的阳性颗粒明显多于 NS 组;与 AS 组比较,DEX 组显示 IL-17、BATF、ROR γ t 表达的阳性颗粒明显减少(如图 1);积分吸光度分析提示差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

2.3 相关性分析 肺组织 BATF 的表达与 BALF 中 WBC 总数及 NEU 计数、EOS 计数呈正相关($r = 0.487、0.531、0.515, P < 0.05$);肺组织 BATF 的表达

表 2 各组小鼠肺组织 BATF、IL-17 和 ROR γ t 的表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	BATF	IL-17	ROR γ t
NS	8	10.00 \pm 5.13	35.50 \pm 8.60	31.13 \pm 11.30
AS	8	27.75 \pm 9.10 ^a	81.75 \pm 17.30 ^a	79.75 \pm 18.45 ^a
DEX	8	17.88 \pm 7.06 ^{ab}	49.38 \pm 9.15 ^{ab}	45.25 \pm 8.51 ^{ab}

注:^a表示与 NS 组比较, $P < 0.05$;^b表示与 AS 组比较, $P < 0.05$ 。

与 IL-17、ROR γ t 的表达呈正相关($r = 0.502、0.493, P < 0.05$);肺组织 IL-17 的表达与 ROR γ t 的表达呈正相关($r = 0.536, P < 0.05$)。

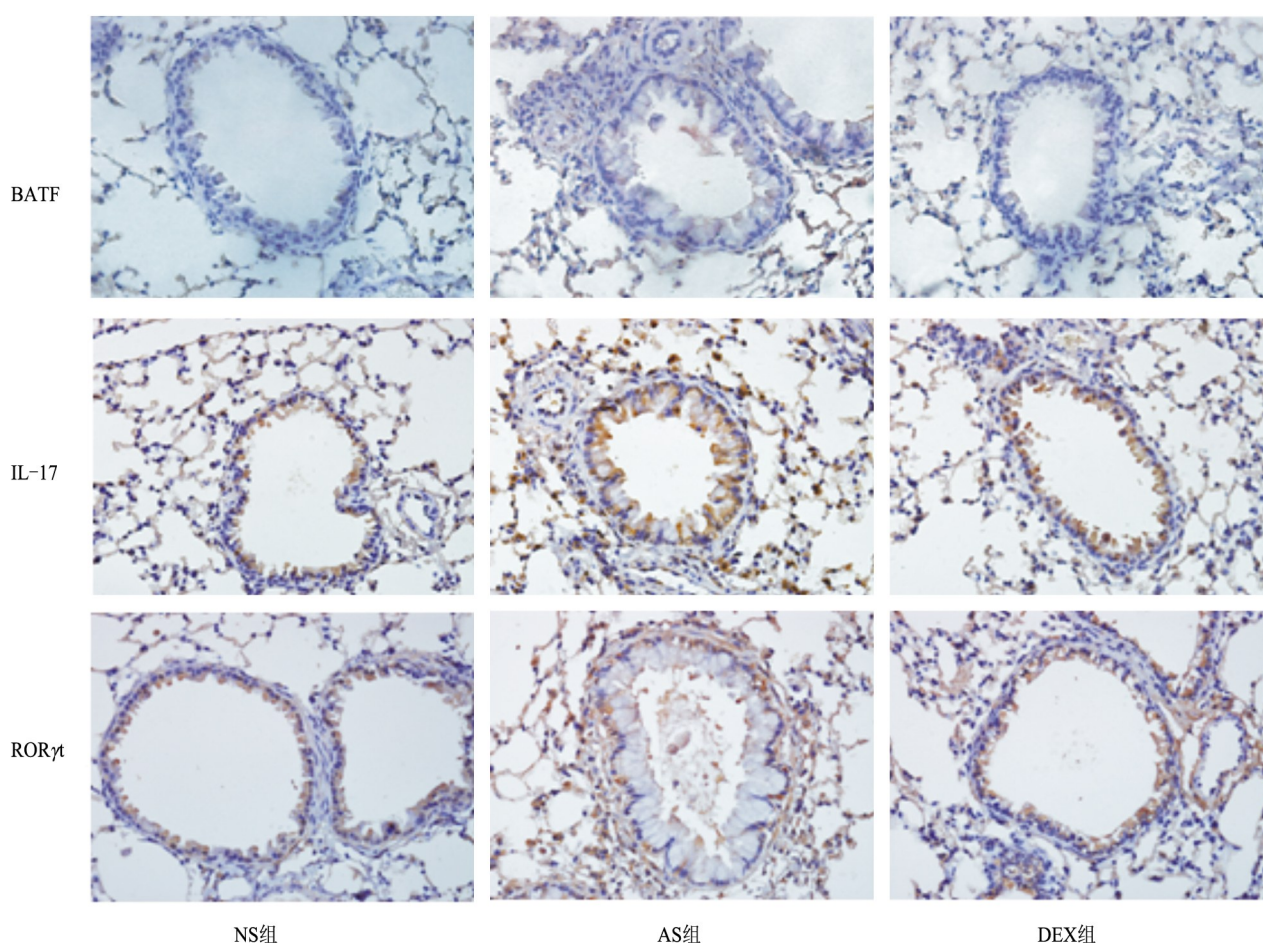


图 1 NS 组、AS 组和 DEX 组小鼠肺组织 BATF、IL-17 及 ROR γ t 免疫组化染色($\times 400$)

3 讨论

哮喘是一种炎症性疾病,炎症细胞及相关细胞因子参与其中。糖皮质激素是目前临床用于控制哮喘急性发作、延长哮喘缓解周期最重要的药物之一,其治疗哮喘的主要作用是抑制哮喘的气道炎症、气道黏液高分泌及气道高反应。本研究发现,AS 组小鼠气道炎症表现明显,BALF 中炎症细胞明显增多,伴随 BATF、IL-17、ROR γ t 表达显著增加,说明 BATF、IL-17、ROR γ t 参与了哮喘气道炎症的发生、发展。而在 DEX 组,肺组织的气道炎症表现较哮喘组明显减

轻,BALF 中炎症细胞亦减少,同时伴有 BATF、IL-17、ROR γ t 表达显著下降,说明当 BATF、IL-17、ROR γ t 受到抑制时,气道炎症会随之减轻,进一步表明炎症因子 BATF、IL-17、ROR γ t 确实有促进哮喘发病的作用。

B 细胞转录激活因子(B cell activating transcription factor, BATF)是碱性亮氨酸拉链转录因子,属于激活蛋白 1 (AP-1) 超家族中的一员^[3]。BATF 与气道炎症密切相关。BATF(+/+)小鼠可被 OVA 致敏出现气道高反应、黏液分泌增加、IgE 水平增高及气道肥

大细胞增多,而BATF(-/-)小鼠表现则相反^[4]。BATF表达增多导致儿童哮喘病理生理反应增加,阻断BATF表达可改善哮喘儿童病理生理反应。BATF可调节淋巴细胞和肥大细胞参与的哮喘免疫应答。研究表明,BATF受IL-6调控,继而影响Th17细胞,从而致哮喘发生发展。另有研究也证实BATF可致Th17生成增加^[5]。进一步的研究表明BATF激活可致ROR γ t表达增加,从而促进Th17分化致哮喘发展。上述研究与本试验相一致。

孤儿核受体家族是核受体超家族中较独特的成员,没有确定的配体^[6],能通过调节基因参与免疫、炎症反应。视黄酸相关孤儿核受体(ROR γ t)是孤儿核受体的一种,是Th17的转录因子。哮喘发生时,Th17细胞在气道大量聚集并产生IL-17。研究发现哮喘发生时,ROR γ t增高,Th17亦增高,伴随IL-17产生增多,同时哮喘病理生理反应亦明显。当ROR γ t表达受到抑制时,Th17数量亦下降,伴随IL-17减少,同时哮喘病理生理反应亦得到控制^[7-8]。与本实验所得结果一致。

IL-17是一种强大的炎症因子,主要由Th17细胞产生^[9-10]。在哮喘的表达明显增高,IL-17能刺激成纤维细胞、上皮及内皮细胞释放IL-6、IL-8、前列腺素E2(PGE2)、基质金属蛋白酶MMP、细胞间粘附分子(ICAM-1)。研究发现,哮喘患者气道IL-17增加,可诱导成纤维细胞刺激Th17细胞生成更多的IL-17。在儿童哮喘患者气道亦发现Th17及ROR γ t表达增加。另有研究发现,烟曲霉诱发气道高反应的小鼠所表达的IL-17是增加的,而不能诱发起气道高反应的小鼠所表达的IL-17是明显减少的^[11]。蟑螂变应原介导的哮喘中IL-17的表达亦增高^[12]。因此,IL-17参与了气道高反应及哮喘的发生,与本实验相吻合。

急性哮喘小鼠肺组织中BATF、IL-17、ROR γ t表达上调,且三者的表达一致。地塞米松可能是通过下调BATF、IL-17、ROR γ t的表达而减轻气道炎症性损

害及哮喘症状,最终达到抑制气道炎症的效果。BATF、IL-17、ROR γ t参与了哮喘的发生发展,针对BATF、IL-17、ROR γ t靶向药物将是我们研究治疗哮喘的又一个新的方向。

参考文献

- [1] Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary [J]. Eur Respir J, 2008, 31(1): 143-178.
- [2] 沈华浩,王萃莉. 支气管哮喘小鼠模型应用评价[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2005, 28(4): 284-286.
- [3] Zullo AJ, Benlagha K, Bendelac A, et al. Sensitivity of NK1. 1-negative NKT cells to transgenic BATF defines a role for activator protein-1 in the expansion and maturation of immature NKT cells in the thymus [J]. J Immunol, 2007, 178: 58-66.
- [4] Schraml BU, Hildner K, Ise W, et al. The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)-17 differentiation [J]. Nature, 2009, 460: 405-409.
- [5] O'Shea JJ, Steward-Tharp SM, Laurence A, et al. Signal transduction and Th17 cell differentiation [J]. Microbes Infect, 2009, 11: 599-611.
- [6] Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression [J]. Physiol Rev, 2001, 81(3): 1269.
- [7] Diveu C, McGeachy MJ, Boniface K, et al. IL-27 blocks RORc expression to inhibit lineage commitment of Th17 cell [J]. Immunol, 2009, 182(9): 5748-5756.
- [8] Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells [J]. Cell, 2006, 126(6): 1121-1133.
- [9] Korn T, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-17 and Th17 cells [J]. Annu Rev Immunol, 2009, 27: 485-517.
- [10] Ochs HD, Oukka M, Torgerson TR. Th17 cells and regulatory T cells in primary immunodeficiency diseases [J]. Allergy Clin Immunol, 2009, 123: 977-983.
- [11] Fukahori S, Matsuse H, Tsuchida T, et al. Clearance of *Aspergillus fumigatus* is impaired in the airway in allergic inflammation [J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2014, 113(2): 180-186.
- [12] Gao P, Zhou Y, Xian L, et al. Functional effects of TGF- β_1 on mesenchymal stem cell mobilization in cockroach allergen-induced asthma [J]. J Immunol, 192(10): 4560-4570.

(收稿日期:2014-10-21)