

尘螨疫苗免疫治疗下调哮喘小鼠气道 IL-17 的表达^{*}

吕 勤¹, 杨小猛², 肖小军², 陈 思², 杨平常², 刘志刚², 张 敏^{1△} (1. 深圳大学第一附属医院 呼吸内科 518035; 2. 深圳大学过敏反应和免疫学研究所 518060)

【摘要】 目的 探讨尘螨疫苗免疫治疗对尘螨过敏性哮喘小鼠气道 IL-17 表达的影响。**方法** 24 只 BAL B/c 小鼠随机分为正常对照组(A 组)、哮喘对照组(B 组)和尘螨疫苗治疗组(C 组), 每组 8 只。A 组小鼠始终采用生理盐水处理; B、C 组小鼠采用尘螨过敏原经腹腔建立尘螨过敏性哮喘小鼠模型后, B 组采用生理盐水治疗, C 组采用粉尘螨疫苗治疗。治疗 7 d 后采用尘螨粗提液雾化激发 B、C 组小鼠, 末次激发 24 h 后取小鼠肺组织采用 HE 染色观察炎症反应变化, 取小鼠气道采用免疫组化法分析 IL-17 浓度, 取小鼠脾细胞培养上清液采用 ELISA 法测定 IL-17 浓度。**结果** 光镜下可见 B 组小鼠肺组织结构紊乱、充血及水肿, 有大量炎性细胞浸润, 而 A、C 组小鼠肺组织未见明显病理变化。B 组小鼠气道 IL-17 表达明显高于 A、C 组小鼠。同时 B 组小鼠脾细胞培养上清液 IL-17 浓度显著高于 A、C 组小鼠 ($P < 0.01$), 而 A、C 组小鼠脾细胞培养上清液 IL-17 浓度差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 尘螨疫苗免疫治疗可降低尘螨过敏性哮喘小鼠气道 IL-17 的表达, 减轻尘螨过敏性哮喘小鼠气道炎症反应。

【关键词】 尘螨疫苗; 免疫治疗; 哮喘; IL-17

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.20.002 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)20-2974-02

Dust mite vaccine immunotherapy down-regulate the level of IL-17 in asthma mice^{*} LYU Qin¹, YANG Xiao-meng², XIAO Xiao-jun², CHEN Si², YANG Ping-chang², LIU Zhi-gang², ZHANG Min^{1△} (1. Department of Respiratory Medicine, First Affiliated Hospital of Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518035, China; 2. Allergies and Immunology Institute, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of dust mite vaccine immunotherapy on the level of IL-17 in asthma mice. **Methods** 24 BAL B/c mice were randomly divided into the control group (group A), asthma group (group B) and dust mite vaccine treatment group (group C), with 8 mice in each group. Group A were treated by normal saline. Group B and C received intraperitoneal injection of dust mite allergen to establish dust mite allergic asthma mice model. Group B were treated by normal saline. Group C were treated by dust mite vaccine. Group B and C were stimulated by allergens extracted from whole house dust mite after 7 d treatment. 24 h after the last challenge, lung tissue were obtained to observe the inflammatory changes using HE staining; airway were obtained to analyze the level of IL-17 using immunohistochemical method; splenocytes were obtained and cultured, and the level of IL-17 in the supernatant were tested using ELISA. **Results** Lung tissues in group B showed structural disorder, congestive and edema, inflammatory cells infiltration at light microscopy level, but lung tissues in group A and C showed little pathological changes. IL-17 expression in airway in group B was higher than those in group A and C significantly. Meanwhile, the levels of IL-17 in the supernatant in group B were higher than those in group A and C obviously ($P < 0.01$); and there was no significant difference between group A and C ($P > 0.05$). **Conclusion** Dust mite immunotherapy vaccine might lessen airway inflammation in dust mite allergic asthma mice through down-regulating the expression of IL-17 in airway in asthma mice.

【Key words】 dust mite vaccine; immunotherapy; asthma; IL-17

白细胞介素 17(IL-17)是近年来发现的主要由 CD4⁺ T 细胞分泌的细胞因子, 是一种较强的前炎性细胞因子, 也是炎症反应的微调因子。IL-17 是哮喘等过敏性疾病相关细胞因子网络的重要成员之一, 在 T 细胞激活、气道的中性粒细胞募集及活化、气道高反应等方面具有重要作用, 参与了气道炎症反应及气道重塑。IL-17 在哮喘的发生、发展中发挥重要作用, IL-17 可以加重哮喘小鼠模型的气道高反应性和气道炎症^[1], 而 IL-17 基因缺陷的小鼠则不易诱发哮喘^[2]。粉尘螨变应原是诱导哮喘和其他过敏反应疾病中最重要的变应原之一^[3-4], 尘螨疫苗免疫治疗是目前唯一对因治疗过敏哮喘的有效方法, 而尘螨疫苗免疫治疗对哮喘患者气道 IL-17 表达的影响尚不

清楚, 本研究拟建立粉尘螨过敏性哮喘小鼠模型, 并采用尘螨疫苗免疫治疗, 研究尘螨疫苗免疫治疗对哮喘小鼠模型气道 IL-17 表达的调节作用, 从而为治疗哮喘提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料 BAL B/c 小鼠(雌性, 4~6 周龄, SPF 级)购自广东省实验动物中心, 饲养于深圳大学医学院 SPF 级动物实验室。小鼠 IL-17 检测试剂盒购自美国 Biolegend 公司(ELISA 法), 小鼠 IL-17 单克隆抗体购自美国 Santa 公司, 免疫组化通用试剂盒购自日本 DAKO 公司, HE 染色试剂盒购自珠海贝索公司。

1.2 方法

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81300028、31328014); 广东省高等学校国际暨港澳台科技合作创新平台项目(2012gjhz0009); 广东省深圳市科技计划项目(JCYJ20120613173913654、JCYJ20130329110735981、JCYJ20120613173233810)。

作者简介: 吕勤, 女, 硕士, 主治医师, 主要从事呼吸内科基础与临床研究。 △ 通讯作者, E-mail: sysu_microbiology@126.com。

1.2.1 粉尘螨粗蛋白的提取 将研钵、匀浆器洗净烘干备用。称取-20℃保存的粉尘螨 4 g,倒入研钵中,用液氮充分研磨成粉末,转移到匀浆器中,加入 5 mL PBS 缓冲液和适量的蛋白酶抑制剂,冰上操作,充分匀浆 2 h,然后 4℃下搅拌 2 h。4℃条件下 12 000 r/min 离心 5 min,吸取中间层蛋白,避免吸到最上层的脂质和沉淀。再按照上述方法离心 2~3 次,直到溶液完全澄清。用二喹啉甲酸(BCA)法测定蛋白浓度,经 0.22 μm 的无菌滤膜过滤,以去除杂质和细菌,-80℃保存备用。

1.2.2 粉尘螨过敏性鼻炎小鼠模型的建立及实验方案 将 24 只 BAL B/c 小鼠随机分成正常对照组(A 组)、哮喘对照组(B 组)和尘螨疫苗治疗组(C 组),每组 8 只。A 组始终采用生理盐水处理,B、C 组小鼠于第 0、7、14 天每只腹腔注射 200 μL 致敏液(含尘螨粗蛋白 50 μg、氢氧化铝佐剂 2 mg)致敏。第 28 天后,B 组用生理盐水 200 μL 代替致敏液,C 组用粉尘螨疫苗 100 μg+2 mg 氢氧化铝佐剂,腹腔注射,每 2 d 注射 1 次,连续 8 次。1 周后,B、C 组小鼠置于自制小鼠雾化吸入箱中,以 10 μg/mL 尘螨粗提液(以 PBS 稀释)雾化吸入激发,每天雾化 30 min,连续雾化 7 d,观察并记录小鼠哮喘发作情况。

1.2.3 气道高反应性测定 小鼠最后一次激发 24 h 后开始试验,将 3 组实验小鼠分别装入 4 个相同容器内,首先用 PBS 雾化吸入 4 个容器中,用于测量基础增强呼吸间歇(Penh)值作为气道反应性变化的指标;再依次雾化吸入 6.25、12.5、25、50、100 mg/mL 醋甲胆碱,每次雾化吸入后 5 min 记录 1 次 Penh 值,每 2 个浓度的检测之间有 1 个短暂的间歇,使呼吸强度回到基线水平。以 PBS 激发的 Penh 值为基础值,绘制不同醋甲胆碱浓度激发下 Penh 值的变化百分比曲线,观察 Penh 值的变化。

1.2.4 气道和肺部病理变化及 IL-17 浓度分析 取气道和右肺中叶于 4%多聚甲醛(含 1%DEPC)中固定 48 h,石蜡包埋,切片(厚度 3 μm)。HE 染色法观察病理变化,严格按免疫组化试剂盒说明书观察 IL-17 浓度变化。

1.2.5 脾细胞培养上清液 IL-17 浓度的测定 无菌条件下取出小鼠脾脏,过无菌的 200 目滤网,用 RPMI-1640 不完全培养基重悬脾细胞,加入 EDTA-NH₄Cl 红细胞裂解液,离心收集脾细胞。然后再用含 100 mg/L 胎牛血清、100 U/L 青霉素及 100 mg/L 链霉素的 RPMI-1640 培养基重悬脾细胞制成脾细胞悬液,24 孔培养板培养脾细胞,每孔加 2 mL,细胞密度为 5×10⁶/孔,加入刀豆蛋白(每孔 200 μg)刺激脾细胞,同时设立阴性对照组,恒温培养箱培养 72 h,收集培养液,4℃条件下 1 500 r/min 离心 5 min,取上清液,严格按试剂盒说明书操作,观察 IL-17 浓度变化。

1.3 统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用成组设计的 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义,统计学软件为 SPSS13.0。

2 结 果

2.1 3 组小鼠气道高反应性比较 当醋甲胆碱浓度大于或等于 25 mg/mL 时,随醋甲胆碱浓度升高,3 组小鼠 Penh 值均不断升高;B 组气道高反应性均显著高于 A 组(*P*<0.01)和 C 组(*P*<0.01);C 组 Penh 值均略高于 A 组,但差异无统计学意义(*P*>0.05)。见图 1。

2.2 3 组小鼠气道和肺部病理变化比较 A 组切片结构完整清晰,支气管纤毛排列整齐,无水肿和炎性渗出,气管和血管周围未见炎性细胞浸润(图 2A);B 组肺组织切片肺泡网状结构消失,结构紊乱、管腔内炎性渗出增多,周围有大量炎性细胞浸润,肺组织有明显水肿和损伤(图 2B);C 组肺组织基本恢复网状结构,较哮喘组完整,支气管周围炎性细胞浸润较 B 组明显

减少,C 组水肿及炎性渗出亦明显减少(图 2C)。

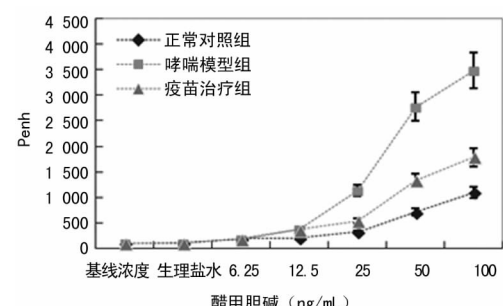


图 1 3 组小鼠气道高反应性比较

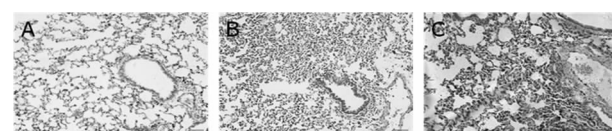
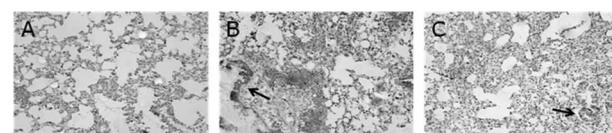


图 2 3 组小鼠气道和肺部病理变化比较
小鼠肺组织 HE 染色图

2.3 3 组小鼠气道和肺组织 IL-17 浓度比较 图 3 中 A、B、C 分别为 A 组、B 组、C 组小鼠气道和肺组织的免疫组化图,由图 3 可见,B 组小鼠 IL-17 浓度明显高于 A 组,经尘螨疫苗治疗后,C 组小鼠气道 IL-17 表达明显减弱。



注:箭头所示为 IL-17 表达阳性。

图 3 3 组小鼠气道和肺组织 IL-17 浓度免疫组化图

2.4 3 组小鼠脾细胞培养上清液 IL-17 浓度比较 A、B、C 组小鼠脾细胞培养上清液 IL-17 浓度分别为(48.27±4.14)、(85.13±2.36)、(51.21±2.32) pg/mL。B 组显著高于 A 组(*t*=21.878,*P*<0.01)和 C 组(*t*=28.990,*P*<0.01);C 组略高于 A 组,但差异无统计学意义(*t*=1.752,*P*>0.05)。

3 讨 论

过敏性哮喘是一种以肺部嗜酸性粒细胞浸润、黏液过度分泌、对特异性抗原产生气道高反应性为特征的慢性气道炎性疾病^[5],其主要病理特征为气道炎症、气道高反应性和气道重塑。IL-17、IL-4、IL-10 等多种细胞因子参与过敏性哮喘的进程,影响哮喘发生和发展,贯穿疾病始终。其中 IL-17 通过募集中性粒细胞、巨噬细胞浸润及诱导黏液分泌等参与哮喘的病理过程,促进炎症反应,与哮喘的加重密切相关^[6]。IL-17 是一种主要由 CD4⁺ T 细胞、嗜酸性粒细胞等分泌的前炎性细胞因子,参与机体多种炎症疾病的发生和发展,特别是与肺部感染、哮喘等疾病有着密切的关系,IL-17 可以通过促进气道组织纤维化进而引起呼吸道重塑,促进哮喘的发生、发展。

尘螨疫苗是目前唯一对因治疗哮喘的有效药物,用于治疗儿童过敏性哮喘,全身不良反应发生率相对较低,安全性较高,有临床实用价值^[7],而尘螨疫苗免疫治疗对哮喘患者气道 IL-17 表达的影响尚不清楚。本研究采用尘螨粗蛋白和氢氧化铝佐剂按常规方法构建哮喘小鼠模型,使用尘螨疫苗进行免疫治疗并测定气道高反应性,结果发现 B 组气道高反应性均显著高于 A 组和 C 组,而经尘螨疫苗治疗的 C 组小鼠的哮喘症状如烦躁不安、毛发竖起、呼吸加快加深等均有所改善,提示本研究成功建立了尘螨过敏性鼻炎小鼠模型,尘螨疫苗对哮喘有效且可以降低气道高反应性。

有研究显示,IL-17 在哮喘中发挥着重要(下转第 2978 页)

及沉淀裂解法抽提血清 miRNA,发现经典的 Trizol 法能够有效提取到血清 miRNA 并且通过调整血清与 Trizol 试剂的比例可满足实验的要求;蛋白酶 K 消化+Trizol 法并未提高提取效率并且操作时间稍长。miRNA 主要以蛋白复合体的形式存在,提高 miRNA 提取效率的关键是使 miRNA 从蛋白复合体上解离下来,依据该特点本研究尝试使用临床提取核酸用的核酸沉淀液及核酸提取液抽提血清 miRNA,实验结果证实该方法不适用于血清 miRNA 的提取。经荧光定量 PCR 检测,三种方法提取物中,内参 Cel-miR-39-3p 的 Ct 值无明显差异,说明三种抽提方法均能有效保留加入的内参^[14-15]。本研究成功地利用 Trizol 法、蛋白酶 K 消化+Trizol 法提取到血清 miRNA,并且 Trizol 法提取效果相对更好,利用荧光定量 PCR 进行检测的结果能满足实验要求。

参考文献

- [1] Lee RC,Feinbaum RL,Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*[J]. *Cell*,1993,75(5):843-854.
- [2] Macfarlane LA,Murphy PR. MicroRNA: biogenesis, function and role in cancer[J]. *Curr Genomics*,2010,11(7):537-561.
- [3] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. *Cell*,2009,136(2):215-233.
- [4] Esquela-Kerscher A,Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*,2006,6(4):259-269.
- [5] Cortez MA,Welsh JW,Calin GA. Circulating microRNAs as noninvasive biomarkers in breast cancer[J]. *Recent Results Cancer Res*,2012,195:151-161.
- [6] Chen X,Ba Y,Ma L,et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases[J]. *Cell Res*,2008,18(10):997-1006.

- [7] Wang J,Zhang KY,Liu SM,et al. Tumor-associated circulating microRNAs as biomarkers of cancer[J]. *Molecules*,2014,19(2):1912-1938.
- [8] Shen J,Stass SA,Jiang F. MicroRNAs as potential biomarkers in human solid tumors[J]. *Cancer Lett*,2013,329(2):125-136.
- [9] Cortez MA,Bueso-Ramos C,Ferdin J,et al. MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers[J]. *Nat Rev Clin Oncol*,2011,8(8):467-477.
- [10] Grasedieck S,Scholer N,Bommer M,et al. Impact of serum storage conditions on microRNA stability[J]. *Leukemia*,2012,26(11):2414-2416.
- [11] Mraz M,Malinova K,Mayer J,et al. MicroRNA isolation and stability in stored RNA samples[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2009,390(1):1-4.
- [12] Mitchell PS,Parkin RK,Kroh EM,et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2008,105(30):10513-10518.
- [13] 赵德尧,杜权,郭江峰,等. 血浆 microRNA 提取技术优化[J]. *浙江理工大学学报*,2010,27(4):595-599.
- [14] Kroh EM,Parkin RK,Mitchell PS,et al. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR)[J]. *Methods*,2010,50(4):298-301.
- [15] Arroyo JD,Chevillet JR,Kroh EM,et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2011,108(12):5003-5008.

(收稿日期:2015-03-06 修回日期:2015-06-12)

(上接第 2975 页)

作用,IL-17 表达水平与气道高反应性和临床严重程度有关^[8-10];卵清蛋白致敏性支气管哮喘小鼠肺组织中 IL-17 mRNA 和蛋白水平均高于正常小鼠^[11]。本研究发现 B 组小鼠脾细胞培养上清液中 IL-17 浓度较 A 组和 C 组均显著升高,而 C 组小鼠脾细胞培养上清液中 IL-17 浓度与 A 组相近,同时肺组织病理及免疫组化结果亦证实尘螨疫苗治疗后的 C 组小鼠气道和肺组织 IL-17 浓度显著低于 B 组,提示 IL-17 在哮喘发生和发展中起着重要作用,尘螨疫苗免疫治疗可能通过降低 IL-17 的表达减轻哮喘炎症反应及气道高反应性。

参考文献

- [1] Mizutani N,Nabe T,Yoshino S. IL-17A promotes the exacerbation of IL-33-induced airway hyperresponsiveness by enhancing neutrophilic inflammation via CXCR2 signaling in mice[J]. *J Immunol*,2014,192(4):1372-1384.
- [2] Choi JP,Kim YS,Tae YM,et al. A viral PAMP double-stranded RNA induces allergen-specific Th17 cell response in the airways which is dependent on VEGF and IL-6[J]. *Allergy*,2010,65(10):1322-1330.
- [3] Sade K,Roitman D,Kivity S. Sensitization to *Dermatophagoides*, *Blomia tropicalis*, and other mites in atopic patients[J]. *J Asthma*,2010,47(8):849-852.
- [4] 陈代雄,周平坤,冉丕鑫,等. 屋尘螨和粉尘螨主要变应原的筛选和分析[J]. *中国热带医学*,2009,9(2):232-234.

- [5] Schulze J,Voss S,Zissler U,et al. Airway responses and inflammation in subjects with asthma after four days of repeated high-single-dose allergen challenge[J]. *Respir Res*,2012,13(3):224-233.
- [6] Iwakura Y,Ishigame H,Saijo S,et al. Functional specialization of interleukin-17 family members[J]. *Immunity*,2011,34(2):149-162.
- [7] 柴若楠,林小平,谢华,等. 阿罗格尘螨疫苗治疗儿童哮喘安全性评价[J]. *临床军医杂志*,2012,40(2):428-430.
- [8] Barczyk A,Pierzchala W,Sozańska E. Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine[J]. *Respir Med*,2003,97(6):726-733.
- [9] Albano GD,Di Sano C,Bonanno A,et al. Th17 immunity in children with allergic asthma and rhinitis: a pharmacological approach[J]. *PLoS One*,2013,8(4):e58892.
- [10] Chien JW,Lin CY,Yang KD,et al. Increased IL-17A secreting CD4⁺ T cells, serum IL-17 levels and exhaled nitric oxide are correlated with childhood asthma severity[J]. *Clin Exp Allergy*,2013,43(9):1018-1026.
- [11] 胡斯明,罗雅玲,赖文岩,等. 地塞米松对哮喘小鼠 Th17 细胞因子 IL-17 表达的影响[J]. *南方医科大学学报*,2009,29(6):1185-1188.

(收稿日期:2015-03-25 修回日期:2015-07-02)