论著

文章编号:1000-5404(2013)13-1376-03

构建以Th17应答为主致气道中性粒细胞增高的小鼠哮喘模型

赵 燕[1],冉雪梅[1],黄 毅[2],程晓明[2],王长征[2],王导新[1] (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院呼吸内科[1];400037 重庆,第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室[2])

[摘要] **目的** 建立一种Th17应答增强致气道炎症以中性粒细胞浸润为主的哮喘动物模型。**方法** 卵蛋白(ovalbumin,OVA)和内毒素(lipopolysaccharide,LPS)联合致敏构建新哮喘模型。末次激发24 h后行肺功能测定,评估气道高反应性(airway hyperresponsiveness,AHR)。肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid,BALF)分类计数气道炎症细胞比例,肺组织切片HE染色观察病理改变。Q-PCR检测肺组织Th1、Th2和Th17细胞偏移情况。**结果** OVA和LPS联合致敏可以诱发更剧烈的AHR。BALF分类计数显示嗜酸性粒细胞(EOS)和中性粒细胞(NEU)比例分别为(16.09±4.42)%和(28.63±8.89)%。病理学观察可见明显的哮喘样炎症改变。Q-PCR结果显示单独OVA致敏肺内T细胞主要向Th2方向偏移,联合致敏以向Th17方向偏移为主。**结论** 成功构建以Th17应答占优势、肺内炎症以中性粒细胞浸润为主的哮喘动物模型。

[关键词] 哮喘;动物模型;Th17应答;气道炎症;中性粒细胞
[中图法分类号] R-332; R392.8; R562.25 [文献标志码] A

Establishment of Th17-mediated allergic asthma mouse model with increased neutrophils around airways

Zhao Yan[1], Ran Xuemei[1], Huang Yi[1], Cheng Xiaoming[2], Wang Changzheng[2], Wang Daoxin[1] ([1]Department of Respiratory Diseases, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; [2]Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To establish a Th17-mediated allergic asthma mouse model with increased neutrophils around airways. **Methods** Ovalbumin (OVA) and lipopolysaccharide (LPS) were applied for sensitization to establish the new allergic asthma mouse model. Airway hyperresponsiveness (AHR) was evaluated at 24 h after the last airway challenge. The subtypes and numbers of inflammatory cells in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were counted. The pathological changes of lung tissues were observed by HE staining. Q-PCR was applied to detect the shift of Th1, Th2 and Th17 cells in lung tissues. **Results** OVA and LPS combined sensitization induced strong AHR response. Neutrophils (28.63±8.89)% and eosinophils (16.09±4.42)% were the main subtypes of inflammatory cells in BALF, and the lung tissues presented obvious asthmatic pathological changes. Q-PCR results indicated that naive T cells mainly shifted to Th2 cells when the mice were sensitized by OVA alone, while those mainly shifted to Th17 cells when the mice were sensitized by OVA combined with LPS. **Conclusion** The Th17-mediated allergic asthma mouse model with neutrophils as major inflammatory cells around airways was successfully established.

[**Key words**] asthma model; Th17-mediated response; airway inflammation; neutrophil

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81070018). Corresponding author: Wang Daoxin, E-mail:wangdaoxin1@163.com, Cheng Xiaoming, E-mail:cxmb5420021@yahoo.com

支气管哮喘是一种由多种细胞和细胞组分参与的气道炎症性疾病。Th1/Th2应答反应的失衡在哮喘的发病中起了很重要的作用,目前临床上用于治疗哮喘的药物也以针对Th2强应答为主。Th17是一类新型T辅助细胞,是IL-17的主要来源。施宇衡等[1]发现支气管哮喘患者有外周血Th17细胞及IL-17水平升高,中重度患者升高水平显著。随着对哮喘人群Th17细胞及IL-17水平认识的不断提高,需要动物研究来深入探讨它们在哮喘发病机制中的作用。传统哮喘动物模型是以各种过敏原刺激小鼠产生Th2应答,诱导嗜酸性粒细胞的浸润、反应。本研究旨在建立以Th17应答为主型哮喘动物模型,为进一步探讨中性粒细胞

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81070018)
[通信作者] 王导新,E-mail:wangdaoxin1@163.com
程晓明,E-mail:cxmb5420021@yahoo.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130425.1325.018.html(2013-04-25)

性哮喘的发病机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

6～8 周龄雌性 BALB/c 鼠 36 只，清洁级，体质量 16～20 g，由第三军医大学实验动物中心提供。卵蛋白（ovalbumin，OVA）、内毒素（lipopolysaccharide，LPS）、乙酰胆碱均购自美国 Sigma 公司，$Al(OH)_3$ 凝胶购自塞尔默公司。Q-PCR 试剂购自美国罗氏公司。雾化器购自德国百瑞 Pari-Master，雾化颗粒直径为 0.5～5 μm。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立 实验动物分为 3 组，每组 12 只。①Th17 模型组：在实验的第 0、6 天致敏。给予 4% 水合氯醛 0.1 mL/10 g 麻醉小鼠后固定，用镊子夹出舌头使其歪向一侧，沿咽喉壁缓慢滴加 PBS 混合液（含 OVA 100 μg 和 LPS 0.1 μg）50 μL，同时腹腔注射 $Al(OH)_3$ 混悬液（含 OVA 100 μg）200 μL。在实验的第 13 天给予 1% OVA 雾化吸入 1 h，连续 3 d。OVA 激发后老鼠出现烦躁、抓耳、打喷嚏等症状。②Th2 模型组：在实验的第 0、6 天只是腹腔注射 $Al(OH)_3$ 混悬液（含 OVA 100 μg）200 μL 致敏，不需叠加气道给药。在实验的第 13 天给予 1% OVA 雾化吸入 1 h，连续 3 d。③对照组：用等量 PBS 液替代致敏和激发给药。

1.2.2 支气管肺泡灌洗 在肺功能测定 24 h 后随机数字表法每组选取 6 只鼠，以 4% 水合氯醛麻醉，打开胸腔，用腰麻导管做气管置管，行支气管肺泡灌洗，共 3 次，每次入量为 1 mL，回收率 80%～90% 为合格标本，计细胞总数。离心后以 20 μL PBS 重悬细胞沉淀后涂片，Wright-Giemsa 染色，油镜下至少计数 200 个细胞做分类计数：嗜酸性粒细胞（EOS）、中性粒细胞（NEU）。

1.2.3 气道高反应性（airway hyperresponsiveness，AHR）测定 在末次激发 24 h 后用 emka 小鼠肺功能仪行 AHR 测定，调节通气流量为 0.5 mL。以生理盐水作基线对照。乙酰胆碱浓度梯度为 3、6、12、25 mg/mL。分 4 个乙酰胆碱浓度测定 Penh 值（R），并与对照组比较计算增长倍数：[R（测）－R（基）]/R（基）。

1.2.4 肺组织病理学观察 剪取小鼠左侧肺叶置于 10% 多聚甲醛溶液中，脱水后以石蜡包埋，切片，HE 染色。德国 LEICA DMIRB 荧光倒置显微镜成像。

1.2.5 Q-PCR 检测 随机数表法每组选取 6 只鼠，取右下肺做匀浆，行定量聚合酶链式反应（Q-PCR）检测核转录因子 T-bet、GATA-3、RORγt 表达水平，反映 Th1、Th2、Th17 细胞偏移情况。相关引物及反应条件为：T-bet：正义链 5′-CAACCAGCACCAGACAGAGAT-3′，反义链 5′-ACCAAGACCACATCCACAAAC-3′，产物长度 126 bp；GATA-3：正义链 5′-CCAGGCAAGATGAGAAAGAGTG-3′，反义链 5′-ATAGGGCGGATAGGTGGTAATG-3′，产物长度 149 bp；RORγt：正义链 5′-TTCAGTATGTGGTGGAGTTTGC-3′，反义链 5′-AAAAAGACTGTGTGGTTGTTGG-3′，产物长度 151 bp；退火温度均为 60 ℃。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 17.0 统计软件对所有数据进行统计学分析，各组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组小鼠 BALF 细胞分类计数

与对照组比较，两种哮喘模型 BALF 细胞总数、嗜酸性粒细胞和中性粒细胞均升高，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。与 Th2 模型组比较，Th17 模型组中性粒细胞比例升高，嗜酸性粒细胞降低，差异有统计学意义（$P<0.01$）。见表 1。

表 1 各组小鼠 BALF 细胞分类计数比较（$n=6$，$\bar{x} \pm s$）

组别	细胞总数（$\times 10^4$）	嗜酸性粒细胞（%）	中性粒细胞（%）
对照组	9.49 ± 1.86	0.00 ± 0.00	1.34 ± 0.12
Th2 模型组	23.54 ± 3.23[a]	28.22 ± 4.94[a]	13.42 ± 1.45[a]
Th17 模型组	34.26 ± 3.22[ab]	16.09 ± 4.42[ab]	28.63 ± 8.89[ab]

a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与 Th2 模型组比较

2.2 不同乙酰胆碱浓度下各组小鼠气道高反应性

与 Th2 模型组比较，Th17 模型组在浓度 12 mg/mL 时已有显著的气道高反应性。在浓度 25 mg/mL 时气道高反应性更显著，差异有统计学意义（$P<0.05$）。

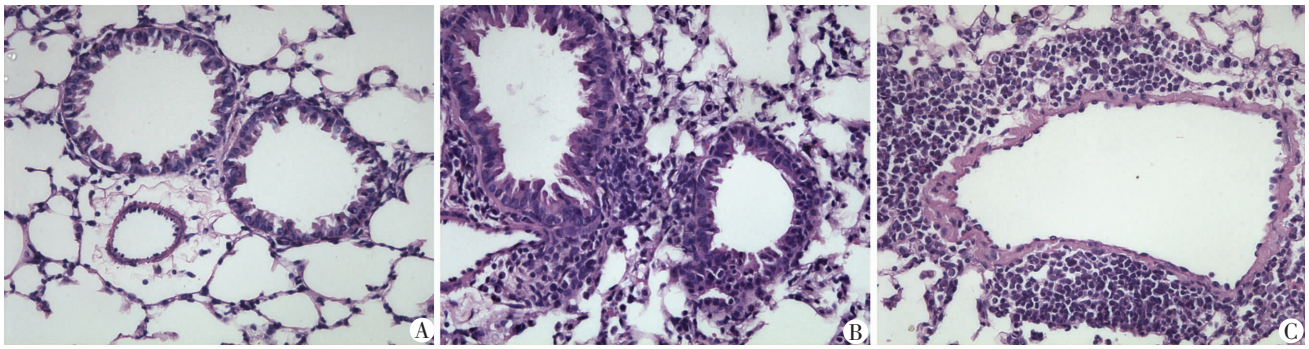
表 2 不同乙酰胆碱浓度各组小鼠肺功能 Penh 值增长倍数比较（$n=12$，$\bar{x} \pm s$）

组别	0 mg/mL	3 mg/mL	6 mg/mL	12 mg/mL	25 mg/mL
对照组	0	0.07 ± 0.04	0.46 ± 0.35	0.63 ± 0.42	1.06 ± 0.41
Th2 模型组	0	0.10 ± 0.14	0.54 ± 0.41	1.16 ± 0.44	2.78 ± 0.67[a]
Th17 模型组	0	0.72 ± 0.74	1.52 ± 1.08	2.43 ± 1.37[a]	5.80 ± 1.46[ab]

a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.05$，与 Th2 模型组比较

2.3 各组小鼠肺组织病理学观察

与对照组比较，Th2 模型组与 Th17 模型组均见气道、小血管周围及肺泡间质中性粒细胞和嗜酸性粒细胞等炎症细胞明显浸润。见图 1。



A：对照组；B：Th2 模型组；C：Th17 模型组

图 1 各组小鼠肺组织气道炎症病理学观察 （HE ×400）

2.4 Q-PCR 检测各组小鼠肺组织 Th1、Th2、Th17 细胞偏移情况

以对照组 Ct 值为比较基准，计算 Th1、Th2、Th17 细胞各自的细胞核转录因子 T-bet、GATA-3、RORγt 基因表达倍数。与对照组比较，Th2 模型组小鼠摄取抗原后，肺部静息型 T 细胞主要向 Th2 细胞分化，并诱导嗜酸性粒细胞活化。Th17 模型组小鼠气道滴加 LPS 为佐剂的抗原液可以影响 T 细胞分化：静息型 T 细胞向 Th2 细胞分化减少，向 Th17 细胞方向偏移增加，并活化中性粒细胞为主要效应细胞。见表3。

表3 Q-PCR 检测各组小鼠肺组织3种效应 T 细胞核转录因子表达（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	T-bet	GATA-3	RORγt
对照组	1	1	1
Th2 模型组	0.97±0.01	2.29±0.12[a]	1.52±0.56
Th17 模型组	0.81±0.04[ab]	1.82±0.18[ab]	3.07±0.77[ab]

a：$P<0.05$，与正常对照组比较；b：$P<0.01$，与 Th2 模型组比较

3 讨论

以往学者发现 Th1/Th2 应答反应的失衡，尤其是 Th2 应答反应的增强并通过分泌 IL-4、IL-5 等细胞因子诱导嗜酸性细胞浸润，是哮喘发病的重要因素。Douwes 等[2]发现多达 50% 的患者肺部嗜酸性粒细胞浸润不明显，甚至无嗜酸性粒细胞检出。随着对哮喘炎症的认识不断加深，现在认为哮喘发病机制复杂，具有明显的异质性[3]。2009 版的哮喘防治指南（GINA）首次将“表型”的定义引入，并基于诱导痰炎症细胞分类提出非嗜酸细胞性哮喘，相应的病理表现是气道内中性粒细胞增多。

Th17 细胞是新发现的效应性 T 细胞，其分化是通过核转录因子 RORγt 和 RORα 的共同作用来完成的[4]。有学者认为激活 STAT-3 途径可上调 RORγt 的表达，诱导 Th0 细胞向 Th17 细胞方向偏移[5]。因此，我们选择 RORγt 作为 Q-PCR 检测 Th17 细胞表达的标志。

目前，国内外学者均在哮喘患者中发现 Th17 细胞增加[1,6]。IL-17 主要由 Th17 细胞分泌，IL-17 基因敲除鼠不能复制出哮喘模型，并且 IL-17 单抗治疗可有效抑制小鼠气道高反应性[7-8]。这说明 Th17 应答增强也是哮喘可能的发病机制。许多学者提出，IL-17 主要是在以中性粒细胞浸润为主的重症哮喘和激素抵抗型哮喘中起作用[9]。Fossiez 等[10]在 1996 年的时候就已经提出 IL-17 可以调节中性粒细胞的增殖、成熟和趋化。

本研究结果显示，采用 LPS 联合 OVA 同时致敏，可以复制出以 Th17 应答为主的哮喘模型。OVA 腹腔致敏可诱导静息型 T 细胞向 Th2 细胞分化，气道滴加 LPS 和 OVA 混合液可诱导静息型 T 细胞向 Th17 细胞偏移。BALF 分类结果显示，加用 LPS 致敏可以活化肺内中性粒细胞，气道炎症主要以中性粒细胞的浸润为主，嗜酸性粒细胞占其次；病理结果也表明支气管周围以 NEU 和 EOS 为主的炎症细胞浸润明显，符合哮喘病理改变。与 Th2 模型组比较，Th17 模型组有更明显的气道高反应性。我们推测，中性粒细胞浸润是诱发和加剧气道高反应性的一个重要原因，但二者的具体关系还需要更深入的研究。Q-PCR 结果表明，在气道致敏使中性粒细胞活化增加的同时，静息型 T 细胞以向 Th17 细胞偏移为主。我们认为，正是 Th17 细胞诱导了中性粒细胞活化并趋化其致肺组织发挥效应。

我们的模型初步构建成功，可用于进一步研究 Th17 细胞在哮喘 AHR 中的地位、在哮喘中如何发挥作用及这类细胞在哮喘中的调控机制，并可为临床寻找针对中性粒细胞哮喘有效的药物治疗提供稳定的动物实验平台。

参考文献：

[1] 施宇恒，时国朝，万欢英，等. 过敏性哮喘患者外周血 Th17 细胞及 IL-17 水平的变化[J]. 诊断学理论与实践，2010，9(5)：473－476.

[2] Douwes J，Gibson P，Pekkanen J，*et al*. Non-eosinophilic asthma：importance and possible mechanisms[J]. Thorax，2002，57(7)：643－648.

[3] Fajt M L，Wenzel S E. Asthma phenotypes in adults and clinical implications[J]. Expert Rev Respir Med，2009，3(6)：607－625.

[4] Yang X O，Pappu B P，Nurieva R，*et al*. Helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma[J]. Immunity，2008，28(1)：29－39.

[5] Chaudhry A，Rudra D，Treuting P，*et al*. $CD4^+$ regulatory T cells control Th17 responses in a Stat3-dependent manner[J]. Science，2009，326(5955)：986－991.

[6] Pene J，Chevalier S，Preisser L，*et al*. Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes[J]. J Immunol，2008，180(11)：7423－7430.

[7] Nakae S，Komiyama Y，Nambu A，*et al*. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice，causing suppression of allergic cellular and humoral responses[J]. Immunity，2002，17(3)：375－378.

[8] Hellings P W，Kasran A，Liu Z，*et al*. Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma[J]. Am J Respir Cell Mol Biol，2003，28(1)：42－50.

[9] Green R H，Brightling C E，Woltmann G，*et al*. Analysis of induced sputum in adults with asthma：identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids[J]. Thorax，2002，57(10)：875－879.

[10] Fossiez F，Djossou O，Chomarat P，*et al*. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines[J]. J Exp Med，1996，183(6)：2593－2603.

（收稿：2013-03-15；修回：2013-04-24）

（编辑 邓强庭）