doi:10.11659/jjssx.12E017037

·基础研究·

OVA 特异性免疫治疗对哮喘小鼠 IL-23/Th17 轴的影响及机制研究

钟世民,范文婷,胡 琦,曾 靖,陈志强,邵 辉,胡 影,汪金玉,廖 伟 [陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院儿科,重庆 400038]

[摘 要] **目的** 腹部皮下注射大剂量卵白蛋白(OVA)建立小鼠哮喘免疫治疗模型,探讨 IL-23/Th17 轴在小鼠哮喘模型经皮免疫治疗过程中的作用。**方法** 选择 18 只 BALB/c 小鼠为建模研究对象,按随机数字表法分为 3 组:空白对照组、哮喘对照组和哮喘免疫治疗组,每组 6 只小鼠。哮喘免疫治疗组予 10 μg OVA 于 0、7 d 腹腔注射致敏,21 ~ 27 d 持续 1 周予 1 mg OVA 腹部皮下注射诱导免疫耐受,35 ~ 41 d 予 1% OVA 雾化激发;哮喘对照组在 21 ~ 27 d OVA 皮下注射等量生理盐水,其余处置同哮喘免疫治疗组;空白对照组采用等量生理盐水致敏及激发。50 d 予 10% OVA 加强激发 1 次。末次激发 24 h 内检测气道反应性;收集支气管肺泡灌洗液(BALF)计数细胞总数及细胞分类计数;ELISA 法检测血清 OVA 特异性 IgE、BALF 中 IL-5、IFN-γ、IL-23、IL-10 的表达;HE 染色观察肺组织病理改变;流式细胞仪检测各组脾、肺组织 Treg、Th17 细胞比例;q-PCR 检测肺组织转录因子。**结果** 哮喘免疫治疗组气道反应性、BALF 中嗜酸性粒细胞计数、IL-23 水平及血清 OVA 特异性 IgE 水平明显低于哮喘对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);而 BALF 中 IFN-γ 水平与哮喘对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$);同时 HE 染色发现哮喘免疫治疗组肺组织炎症较哮喘对照组明显减轻;流式细胞技术检测发现外周血 Treg 细胞百分比明显高于哮喘对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);q-PCR检测肺组织转录因子表明免疫治疗组 Foxp3 明显高于哮喘对照组,而 RORγt 明显低于哮喘对照组,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 大剂量 OVA 特异性免疫治疗能够减轻哮喘小鼠气道慢性炎症反应,同时引起 Th17 细胞下降伴随 IL-23 表达降低;其机制可能与纠正肺部 IL-23/Th17 轴有关。

[关键词] 卵清蛋白;小鼠模型;支气管哮喘;免疫耐受;IL-23;Th17;TGF-β1

[中图分类号] R562.2+5 [文献标识码] A [收稿日期] 2017-12-13

Study on influence of OVA specific immunotherapy on IL-23/Th17 axis of a mouse asthma model and its mechanism

ZHONG Shi-min, FAN Wen-ting, HU Qi, ZENG Jing, CHEN Zhi-qiang, SHAO Hui, HU Ying, WANG Jin-yu, LIAO Wei [Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Army Medical University (Thrid Military Medical University), Chongqing 400038, China]

Abstract: Objective To establish a mouse model of immune treatment of asthma through subcutaneous injection with high dose of ovalbumin (OVA) in the abdomen and investigate the role of IL-23/Th17 axis response in its mechanism. **Methods** With a random number table method, 18 female BALB/c mice were divided into 3 groups (normal control group, asthma group and asthmatic immune tolerance model group), with 6 mice in each group. The mice in the asthmatic immune tolerance model group were sensitized with 10 μg OVA by intraperitoneal injection in the abdomen on day 0 and day 7. The mice in the model group induced immune tolerance with 1 mg OVA by subcutaneous injection in the abdomen every day for a week (day 21 to day 27). Both the model group and asthma control group were challenged with 1% OVA on day 35 to day 41. The mice in the normal control group were challenged with the equal amount of saline. On the 50th day, each group were sforzando challenged once with 10% OVA. The airway reactivity was detected at 24 after the last challenge. The enhanced pause (Penh) was measured to evaluate the airway responsiveness with a lung functional instrument. Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected to count the total cells and eosinophils, and the cytological studies were conducted. The OVA-specific IgE in peripheral blood, and the IL-5, IFN-γIL-23, IL-10 in BALF were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The lung tissue was obtained to perform histological analysis by HE staining. The percentagea of Treg and Th17 cells in spleen and lung tissue were calculated by the flow cytometry (FCM). Then the expression of transcription factors was detected by q-PCR. **Results** For the asthmatic immune tolerance model group, the airway responsiveness, the cell count of eosinophilic granulocytes in BALF, the levels of IL-23 and OVA-specific IgE in the serum were significantly lower than the asthma group and the difference is of statistical significance ($P<0.05$), while the difference in the IFN-γlevel in BALF compared with the asthma group is of no statistical significance ($P<0.05$). The transcription factor of lung tissue detected with q-PCR showed Foxp3 in the asthmatic immune tolerance model group was significantly higher than the asthma group, while RORγt was significantly lower than the

[基金项目] 国家自然科学基金(81570022)

[通信作者] 廖 伟, E-mail: liaowei01@163.com

asthma group($P>0.05$) and the differences were of statistical significance($P<0.05$). **Conclusion** Large dose of OVA specific immunotherapy can alleviate the chronic inflammatory response of asthmatic mice, and the decrease of Th17 cells associated with the expression of IL-23 was decreased. The mechanism may be related to the correction of the lung Il-23 /Th17 axis.

Keywords: ovalbumin; mouse model; bronchial asthma; immune tolerance; IL-23; Th17; TGF-β1

支气管哮喘(哮喘)是一种影响到全球所有年龄组的严重疾病[1],其以气道高反应性为主要表现的变态反应性疾病,可能存在 Th2 细胞活化亢进的免疫学异常、辅助性 T 细胞(Th)亚群功能失衡,近年发现 Th17 细胞及调节性 T 细胞(regulatory T cell,Treg)在支气管哮喘的发病中也占重要地位。哮喘特异性免疫治疗(allergen-SIT)是目前唯一针对其病因的有效的预防、治疗手段[2],SIT 治疗是可以改变过敏性疾病病程的主要方法之一[3]。目前认为,SIT 哮喘治疗的主要机制可能是诱导机体外周抗原特异性免疫耐受的形成[4]。Th17 细胞在哮喘的呼吸道炎症中发挥着极其重要作用,IL-23 在 Th17 细胞增殖和稳定中起着重要作用,有研究已证实 IL-23/Th17 轴在支气管哮喘的发病中起着重要作用[5-7]。由此我们推测,在 SIT 治疗免疫应答过程中,DC 摄取抗原并提呈信号给 T 淋巴细胞,导致 IL-23/Th17 轴变化参与了 SIT 免疫治疗的过程,而且这一过程与 SIT 治疗效率相关,由于口服耐受与皮下特异性免疫治疗(SCIT)的免疫应答场所、应答细胞及免疫应答过程均可能不同,而 SCIT 是目前临床上应用最广泛,最主要的免疫疗法[8-9]。为进一步研究 SIT 的机制,我们建立大剂量卵白蛋白(ovalbumin,OVA)皮下注射建立 SCIT 治疗哮喘模型,通过检测气道高反应性(AHR)、气道炎症及血清 IgE 水平等情况,证实建立免疫治疗模型成功,并发现在免疫治疗组中,Treg 细胞比例明显增高,IL-23 表达水平降低,而 Th17 细胞比例明显降低,这为通过调控 IL-23/Th17 细胞途径的分化来增强 SIT 治疗效果提供了新的治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 18 只清洁级 BALB/c 雌性小鼠,6~8 周龄,质量 16~20 g,由北京华阜康生物科技有限公司提供,采用随机数字法分成 3 组:哮喘免疫治疗组、哮喘对照组、空白对照组 3 组,每组 6 只。

1.1.2 主要试剂及设备 由美国 Sigma 公司提供鸡卵白蛋白;Mouse Th2 Cell Multi-Color Flow Cytometry Kit、氢氧化铝[$Al(OH)_3$]由美国 R&D 公司 Catalog Number: FMC012 提供; Flow XTM Mouse Regulatory TCell Multi-Color Flow Cytometry Kit 由美国 R&D 公司 Catalog Number: FMC022; 德国百瑞 Pari-Master 雾化器,可以雾化颗粒直径大小为 0.5~0.5 μm;美国宝特公司的标准酶标仪;德林诊断产品有限公司的自动平衡离心机;日本 Olympus 公司的光学显微镜;流式细胞仪购自美国 BectonDickinson 公司。

1.2 方法

1.2.1 建立哮喘小鼠免疫治疗模型 哮喘小鼠免疫模型建立按文献[10]进行(图 1)。哮喘免疫治疗组在 0、7 d 予溶于 100 μL 无菌生理盐水的 OVA 10 μg + $Al(OH)_3$ 2.25 mg 混合液,予腹腔注射致敏 BALB/c 小鼠,予大剂量 OVA(Ⅴ级)皮下注射[含 1 mg OVA + $Al(OH)_3$ 2 mg 的生理盐水 200 μL]21~27 d 持续 7 d(注:预实验中小鼠对 1 mg OVA 可完全耐受,无严重或致死性过敏反应发生,故用 1 mg OVA 行皮下免疫治疗);在 35~41 d 采用 1% OVA 雾化激发。10% OVA 在 50 d 加强激发 1 次。在 0、7 d 予哮喘对照组 OVA 10 μg + $Al(OH)_3$ 2.25 mg 溶于 100 μL 无菌性生理盐水混合液,采取腹腔注射致敏 BALB/c 小鼠,21~27 d给予等量生理盐水皮下注射,35~41 d 予 1% OVA 雾化激发,50 d 予 10% OVA 加强激发 1 次。空白对照组予等量生理盐水和生理盐水雾化激发、加强激发。所有动物在末次激发后观察活体反应及气道反应性 24 h 后并于 50 d 处死、解剖。

1.2.2 检测气道反应性 末次激发各组小鼠后检测 24 h 内气道反应性,检测小鼠自主呼吸在小鼠清醒状态下采取体积描述法,然后待检测的小鼠以倍增质量浓度(3.125、12.5、50 ng/mL)的乙酰胆碱(Ach)雾化 3 min,然后休息 2 min,连续记录读数 5 min 并取各组数据平均值,气道高反应性水平均以相应 Ach 浓度激发下的增强呼吸间歇(enhanced pause,Penh)值来反映,Penh:PEP/PIP × pause。

1.2.3 BALF 细胞计数及肺部组织学分析 末次激发各组小鼠 24 h 后,麻醉采用腹腔注射 1.5% 戊巴比妥钠,摘除各组小鼠眼球放血收集血清,保存在 -80 ℃待检。采取颈椎脱位处死,然后暴露颈部,插入静脉留置针并分离各小鼠气管,注入 1 mL PBS 至灌洗区,然后反复灌洗 5 次后,抽吸各组小鼠的支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid,BALF)逐一注入离心

管中计量(回吸率在80%为合格),4 ℃、1 500 r/min离心10 min后,收集好上清液保存到-80 ℃备用。沉淀细胞重悬后用计数板计数细胞。剩余细胞涂片,HE染色,在光学显微镜下进行各种细胞分类计数。将处死的小鼠开胸取出肺组织盛入4%多聚甲醛瓶中固定,酒精脱水,石蜡包埋、切片,HE染色,采用显微镜观察小鼠肺组织中的支气管及其细支气管的周围炎症、支气管血管周围的炎症、肺泡周围组织炎症的病理特点。

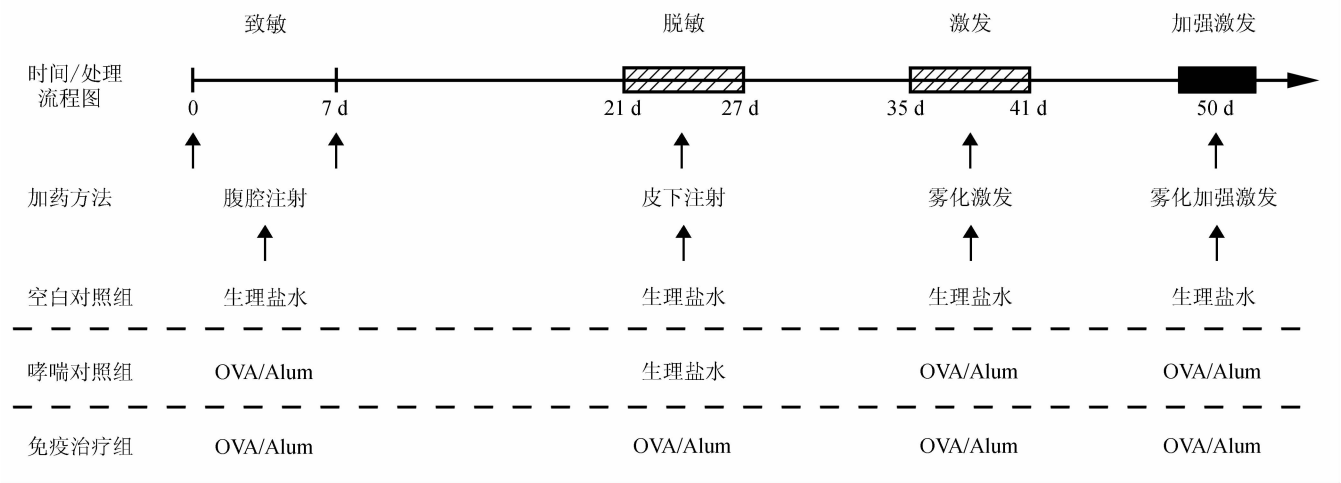


图1 哮喘免疫治疗模型的建立

1.2.4 ELISA 血清OVA特异性IgE检测;BALF中IL-5、IFN-γ、IL-10检测(检测参照试剂盒说明书进行)。

1.2.5 流式细胞技术检测脾、肺组织Treg、Th17细胞比例 根据文献[11],无菌取小鼠脾,捣碎,于40 μm金属网过滤,收集细胞用冷RPMI-1640洗涤细胞2次,加入红细胞裂解液,离心500 g 2 min,去上清液,用含10% FBS的RPMI-1640培养液混匀,在37 ℃、5% CO_2 下培养满12 h后,离心去除上清,加入含10% FBS的RPMI-1640培养液后,按使用说明加入FITC标记的抗小鼠CD4抗体,然后固定、加入打孔剂,分别加入Foxp3-PE和RORγt-PE的抗体,随后用FACS检测。取用于观察肺组织学检测的剩余肺叶组织,机械捣碎,用3 mgU/mL胶原酶(collagenase D)37 ℃,消化2 h,将消化的肺组织用RPMI 1640培养液重悬,用70 μm尼龙筛过滤细胞后用红细胞裂解液去除红细胞,37 ℃、5% CO_2 的环境中培养满12 h后,离心后去上清液,先后加入含10% FBS的RPMI-1640培养液及FITC标记后的抗小鼠CD4抗体,然后固定、加入打孔剂,分别加入PE标记抗鼠Foxp3抗体及PE标记的抗鼠IL-17抗体,之后用FACS检测。用PBMC 1×10^6 个,2 mL Flow Cytometry Staining Buffer洗细胞1次,在blocking IgG避光4 ℃孵育10 min后阻断细胞,各管细胞中加入10 μL CD4-FITC、10 μL CD25-APC antibodies或同型对照的对应的避光4 ℃孵育30 min。采用预冷的1×PBS洗涤细胞2次,在1×FoxP3 Fixation Buffer细胞重悬4 ℃孵育30 min。采用预冷的1×FoxP3 Permeabilization and Wash Buffer洗涤细胞2次,然后各管细胞加入10 μL FoxP3 antibody或rabbit IgG-PE isotype 4 ℃孵育30 min。用预冷的1×FoxP3 Permeabilization and wash Buffer反复洗涤细胞2次,最后予流式细胞仪检测。

1.2.6 q-PCR检测肺组织转录因子 用q-PCR技术检测剩余肺组织中Foxp3、RORγt表达水平。采用RNAzol试剂Trizol法提取肺组织总RNA,根据试剂盒说明书逆转录合成cDNA,反转录使用using oligo(dT18)引物,q-PCR用Quanti Fast SYBR Green PCR Kit(QIAGEN,Germany)、ABI Step One Plus System(Applied Biosystems,USA)。反应条件:95 ℃预变性5 s,95 ℃变性10 s,60 ℃退火10 s,72 ℃延伸10 s,扩增40个循环;95 ℃变性5 s,65 ℃延伸60 s,97 ℃酶瞬间灭活;40 ℃冷却10 s。数据用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法分析基因表达相对定量,使用β-actin作为内参照,最后用基因表达与内参照的比值表示。引物序列如下:Foxp3 5'-GGCCCTTCTCCAGGACAGA-3';5'-GGCATGGGCATCCACAGT-3' RORγt 5'-TGCGACTGGAGGACCTTCTA-3';5'-TCACCTCCTCCCGTGAAAAG-3' β-actin 5'-GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3';5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'

1.3 统计学分析

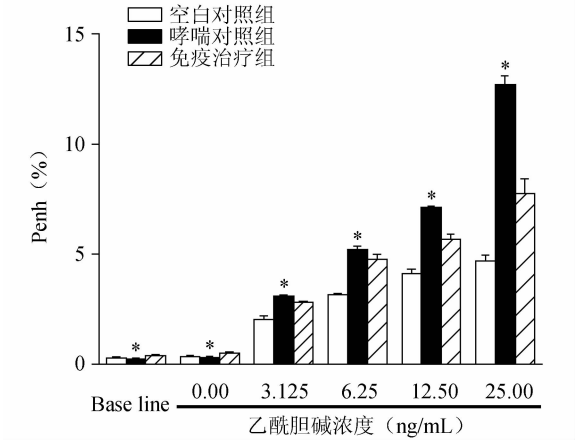
所得计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用SPSS 13.0统计软件行分析。多组间的样本量采用单因素方差分析,两组间样本比较采用 t 检验。$P<0.05$

为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大剂量 OVA SCIT 免疫治疗抑制致敏哮喘小鼠气道高反应性

在 50 d 末次激发后 24 h 内检测呼吸道反应性,先于清醒状态测定各组小鼠基础 Penh 值,随之采用不同 Ach 浓度激发,分别记录在质量浓度为 3.125、12.5、25 ng/mL时对应的 Penh 值,然后雾化 3 min,休息 2 min,连续记录 5 min,将所得各组数值取其平均值。各组实验小鼠随吸入 Ach 浓度的逐渐增加,各自的气道反应性也逐渐增高,但是各组气道反应性增加的幅度比不相同,Ach 的浓度从 3.125 ng/mL 开始升至 25 ng/mL,哮喘对照组较哮喘免疫治疗组的气道反应性明显增高,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 2。



*:与其他两组比较,$P<0.05$

图 2 各组小鼠吸入不同浓度乙酰胆碱时呼吸道反应性的变化

2.2 大剂量皮下 OVA SCIT 哮喘免疫治疗减轻气道炎症反应

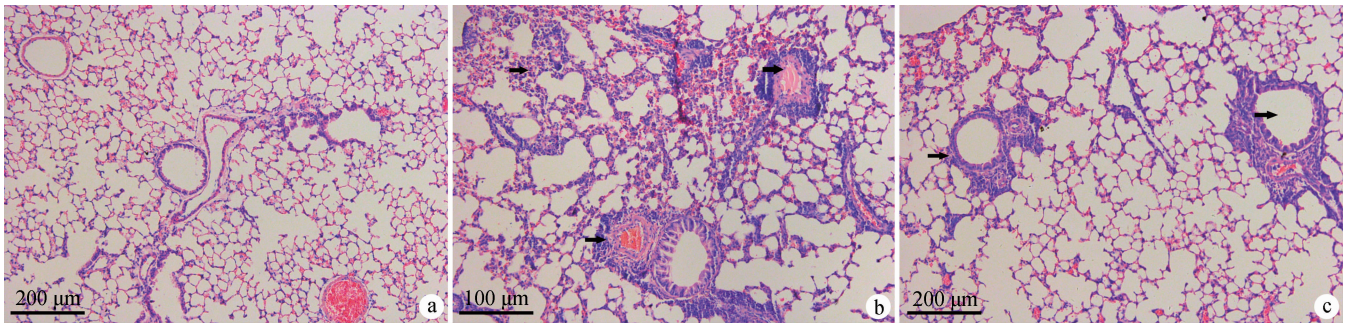
大剂量 OVA SCIT 免疫治疗降低 BALF 中炎症细胞数。50 d 收集各组实验小鼠的 BALF,离心,重悬细胞,计数细胞总数及 HE 染色计数细胞分类数量。与哮喘对照组比较,空白对照组细胞总数及嗜酸性粒细胞计数明显增多,差异有统计学意义($P<0.05$);免疫治疗组中 BALF 的细胞总数,嗜酸性细胞(EC)及淋巴细胞(LC)较哮喘对照组降低,差异有统计学意义($P<0.05$);中性粒细胞计数较哮喘对照组差异有统计学意义,见表 1。

表 1 各组小鼠 BALF 中细胞总数及炎症细胞计数($n=6$, $\times10^6$ng/mL)

组别	细胞总数	嗜酸性粒细胞	淋巴细胞	中性粒细胞
空白对照组	75.83±8.21*	26.00±5.22*	35.67±4.41*	5.67±1.97*
哮喘对照组	207.33±15.63	69.17±11.02	106.17±7.31	32.33±3.61
免疫治疗组	128.17±11.48*	40.00±3.90*	55.67±5.24*	11.50±1.87*

*:与哮喘对照组比较,$P<0.05$

大剂量皮下 OVA 免疫治疗减轻肺组织炎症细胞浸润。相比空白对照组,哮喘小鼠组见肺组织各支气管下,血管周围明显出现炎症改变,肺泡管腔内及肺间质可见嗜酸性粒细胞,支气管的管腔内可见较多黏液栓,可见较多炎性细胞浸润,血管壁水肿充血,上皮细胞明显脱落坏死;哮喘小鼠免疫治疗组较哮喘对照组的炎症反应明显减轻(图 3)。结果表明,SIT 治疗针对轻中度哮喘早期治疗,可以避免朝重度哮喘发展。并且可减轻气道重塑。



a:空白对照组;b:哮喘对照组;c:免疫治疗组

图 3 各组小鼠肺组织病理变化(HE 染色)

2.3 大剂量 OVA SCIT 免疫治疗降低血清 OVA 特异性 IgE 及调节 BALF 炎症因子分泌

50 d 处死各组小鼠,取每组小鼠 BALF 及外周血标本,进行检测 BALF 中 IL-5、IFN-γ、IL-10 及血清 OVA 特异性 IgE 浓度(按试剂盒说明进行)。结果显示,空白对照组与哮喘对照组相比较,BALF 中的 IL-10 浓度升高,而 IL-5 浓度降低,血清 OVA 特异性 IgE 浓度降低,差异有统计学意义($P<0.05$);哮喘对照组与哮喘免疫治疗组比较:BALF 中 IL-10 浓度降低,而 IL-17A、IL-5、IL-6 及血清 OVA 特异性 IgE 浓度均升高,

差异有统计学意义($P<0.05$)。INF-γ 在哮喘对照组与哮喘免疫治疗组差异有统计学意义($P<0.05$),见表2。本研究发现 IL-10、IL-17A 均有改变,说明 Treg、Th17 参与 SIT 免疫机制。

表2 各组小鼠 BALF 中细胞因子及血清 OVA 特异性 IgE 浓度($n=6$)

组别	空白对照组	哮喘对照组	免疫治疗组
IL-5(pg/mL)	19.23±3.27*	516.28±21.18	74.71±6.13*
INF-γ(pg/mL)	98.55±17.63*	202.33±12.66	180.73±28.98*
IL-10(pg/mL)	155.17±8.75*	80.67±34.55	230.50±9.44*
IgE($\times10^3$ng/mL)	156.72±11.14*	711.16±33.95	422.00±6.60*
IL-17A(pg/mL)	20.37±4.02*	95.10±2.90	35.02±5.00*
IL-6(pg/mL)	8.92±1.80*	39.62±2.86	17.89±1.88*
IL-23(pg/mL)	1.920±0.20	2.868±0.12	2.618±0.12

*:与哮喘对照组比较,$P<0.05$

2.4 大剂量 OVA SCIT 免疫治疗改变肺组织及脾 Th17 及 Treg 细胞比例

50 d 处死小鼠后,取出各组小鼠脾组织及肺组织进行流式细胞仪检测 Treg 占 Th17 细胞的百分率,检测结果示哮喘免疫治疗组 Treg/Th17 细胞百分率明显高于哮喘对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图4。

2.5 免疫治疗大剂量 OVA 调节肺组织 Th17 和 Treg 转录因子的表达

50 d 处死小鼠,取各组小鼠剩余肺组织标本q-PCR 检测 Foxp3、RORγt 表达水平。结果表明,在 Th17 及 Treg 细胞关键转录因子水平发现,免疫治疗组肺组织 CD4+RORγt+T 细胞及 CD4+Foxp3+T 细胞与哮喘对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$),见表3。

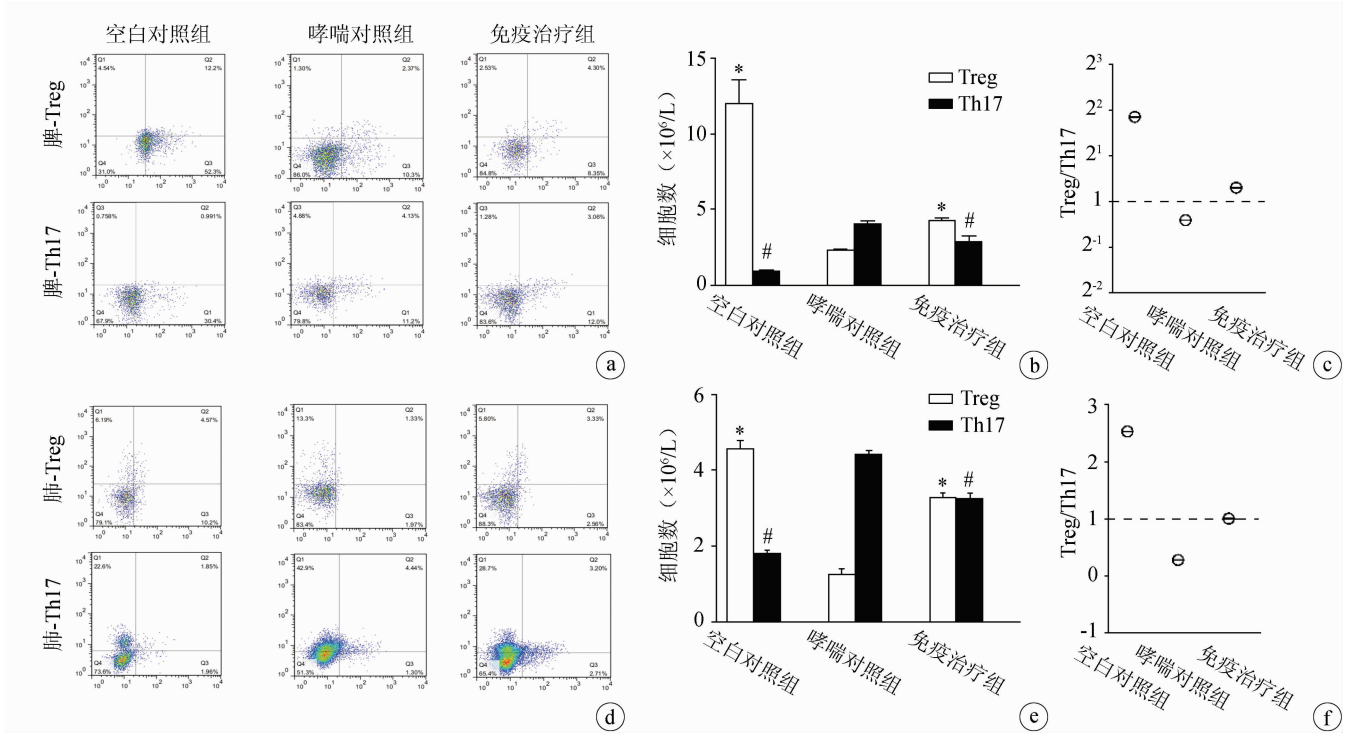
表3 q-PCR 检测各组小鼠肺组织 Th17 和 Treg 转录因子的表达($n=6$)

组别	mRNA Foxp3+/β-actin	mRNA RORγt+/β-actin
空白对照组	5.95±0.23*	0.46±0.04*
哮喘对照组	2.18±0.07	3.06±0.09
免疫治疗组	3.18±0.08*	1.75±0.14*

*:与哮喘对照组比较,$P<0.05$

2.6 相关性分析

血清 IL-23 和脾的 Th17 细胞百分率呈正相关($n=18$,$r=0.908$,$P<0.05$);血清 IL-23 和肺 Th17 细胞百分率呈正相关($n=18$,$r=0.922$,$P<0.05$)。大剂量 OVA 免疫治疗引起的 Th17 细胞下降伴随 IL-23 表达的降低。这与在支气管哮喘的免疫发病机制的研究中发现其中 IL-23/Th17 轴起重要作用的相关研究相一致。已有临床研究证实,收集到的支气管哮喘患者的肺泡灌洗液、痰液或血清液中,Th17 细胞及其细胞因子均明显升高,以及 Th17 细胞的数量及IL-17A的表达水平与呼吸道高反应性及疾病的严重程度呈正相关[12]。



a:脾流式细胞仪检测结果;b:脾 Treg 和 Th17 细胞数;c:脾 Treg/Th17 比值;d:肺流式细胞仪检测结果;e:肺 Treg 和 Th17 细胞数;f:肺 Treg/Th17 比值 *:与哮喘对照组 Treg 细胞数比较,$P<0.05$;#:与哮喘组 Th17 细胞数比较,$P<0.05$

图 4 流式细胞仪检测各组小鼠肺及脾组织 Treg 及 Th17 细胞比例

3 讨论

支气管哮喘是辅助性 T 细胞(T helper cell,Th cell)调节的气道慢性炎症性疾病,Th1/Th2 的失衡曾被认为是哮喘的发病机制。目前认为,除 Th1/Th2 的失衡外,其他的免疫学原理在解释控制哮喘及过敏的发病中具有非常重要的价值,其中通过外周抗原诱导机体特异性免疫耐受形成的机制,这个免疫机制可能是支气管哮喘特异性 SIT 免疫治疗的比较重要机制之一,但至今其机理未完全阐明。

其中 CD4 + 调节性 T(Th)细胞在哮喘中扮演着重要的角色,Th17 细胞是新近在 CD4 + T(Th)细胞中的一个新发现的亚群,Th17 细胞主要分泌 IL-17A,通过刺激气道上皮细胞和炎性细胞,导致机体释放各种炎症介质参与支气管哮喘气道炎症反应[12-14]。临床研究中发现,收集到的支气管哮喘患者的外周血液中的单核细胞内,Th17 细胞及其受体 CCR6 数量均有明显升高,IL-23 通过作用于这些激活状态的 Th17 细胞从而促使支气管哮喘患者症状加重[15]。已证实,Th17 细胞参与介导气道中性粒细胞炎症过程并与哮喘严重程度相关,此外也与哮喘的嗜酸性粒细胞密切相关[16-17]。在气道炎症模型中已得到证实,IL-17 皮下注射可使口服致耐受治疗缓解的气道炎症加重[18]。

IL-23 是 IL-12 细胞因子家族的一个新成员,IL-23 不参加初始 T 淋巴细胞的分化,是 Th17 细胞增殖和功能稳定的重要因子[19],IL-23 主要通过参与 Thl7 细胞分泌 IL-17A 和 IL-17F 的过程而导致气道炎症加重[20]。IL-23 的主要在 Th17 细胞的稳态及扩增上起作用,同时主要参与到 Th17 细胞的中性粒细胞性气道的炎症,同时可促进以 Th2 细胞为主的嗜酸性粒细胞呼吸道炎症[21]。有研究指出,支气管哮喘患者体内的 IL-23 对 Th17 细胞的活化以及记忆性 Th17 细胞的产生起到极其关键作用[22-23],据此有学者推测在支气管哮喘和重度支气管哮喘(severe bronchial asthma,SBA)中 Thl7 细胞的活化以及 IL-23/Th17 轴参与了疾病的发生和发展。

本研究中哮喘小鼠血清中 IL-23 、IL-17A 浓度均高于哮喘小鼠免疫治疗组,这与国内外研究结果基本相一致。另外有研究发现,哮喘患者血清中 IL-23 水平升高,故哮喘免疫治疗可能是通过抑制 IL-23/Th17 轴及 Th17 细胞活化而达到控制支气管哮喘。近年来,大量临床资料表明,哮喘特异性免疫治疗的主要机制很有可能是通过有效降低哮喘患者的呼吸道的反应性,从而逐渐减少相关治疗药物的剂量[9]。目前经气道雾化吸入糖皮质激素是支气管哮喘的主要治疗方式,但吸入激素目前不能完全治愈某些重度支气管哮喘,只是部分控制哮喘的症状。目前认为,哮喘的免疫治疗是针对哮喘的病因治疗之一,哮喘免疫治疗模型国内外均有相应报道,我们根据不同的哮喘小鼠的免疫功能状态,本研究以通过大剂量 OVA 皮下注射建立了哮喘小鼠免疫治疗模型,得出了哮喘小鼠免疫治疗是 IL-23/Th17 轴和 Th17 细胞的受到抑制的结果。本研究结果显示:小鼠哮喘免疫治疗组大剂量予皮下注射 OVA 后,哮喘小鼠的呼吸道的反应性、BALF 中的嗜酸性粒细胞计数、IL-23、IL-17 水平及血清 OVA 特异性 IgE 水平明显低于哮喘对照组,Th2 细胞因子IL-5 百分比明显低于哮喘组;流式细胞技术检测发现外周血 Treg/Th17 细胞百分比明显高于哮喘对照组,说明 IL-23、Th17、Treg 细胞参与 SIT 免疫机制,通过对肺、脾解剖,发现肺组织及脾组织发现 CD4 + FOXP3 + Treg 及 Th17 细胞有差异,且脾及肺的 Th17 细胞都与血清 IL-23 呈正相关,其哮喘免疫治疗作用机制可能是通过抑制 IL-23/Th17 细胞途径而发挥作用。在本研究中哮喘小鼠的血清中 IL-23、IL-17A 的浓度均高于免疫治疗组,这与国内外结果研究基本一致。Li 等[21]在 OVA 哮喘免疫治疗中发现,沉默的 IL-23 基因以降低哮喘患者 IL-17A 进而减轻呼吸道的炎症。与目前的一些临床研究发现一致,支气管哮喘患者的 IL-23 血清水平是明显升高的[24-25]。

综上所述,本实验研究显示腹部皮下大剂量 OVA 注射建立了哮喘小鼠免疫治疗模型,结果发现 CD4 + FOXP3 + Treg 及 IL-10、IL-23,IL-17A 参与哮喘小鼠免疫耐受的形成。但目前对 CD4 + T 细胞亚群与 IL-23/Th17 轴间的调节机制,Th2 细胞与 IL-23/Th17 轴在由变应原诱导的慢性炎症中起主导作用的是哪一种细胞,Th2 细胞免疫反应由 IL-23 如何调节、IL-23 能否直接作用于 Thl 细胞免疫反应从而调控哮喘等[26],随着哮喘的免疫治疗进一步深入研究,在哮喘的作用机制中,IL-23/Th17 轴的研究可能会为研究支气管哮喘的病因及免疫治疗提供新的靶点及方法。

[参考文献]

[1] Becker AB, Abrams EM. Asthma guidelines: the Global Initiative for Asthma in relation to national guidelines[J]. Curr Opin Allergy Clin Immunol,2017,17(2):99 - 103. doi:10.1097/ACI.0000000000000346.

[2] Papadopoulos NG, Arakawa H, Carlsen KH, et al. International consensus on(ICON) pediatric asthma[J]. Allergy,2012,67(8):976 - 997. doi:10.1111/j.1398 - 9995.2012.02865.x.

[3] Jutel M, Agache I, Bonini S, et al. International consensus on allergy immunotherapy[J]. J Allergy Clin Immunol, 2015, 136(3): 556 - 568. doi: 10.1016/j.jaci.2015.04.047.

[4] Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens[J]. World Allergy Organ J, 2015, 8(1): 17. doi: 10.1186/s40413 - 015 - 0063 - 2.

[5] Peng J, Yang XO, Chang SH, et al. IL-23 signaling enhances Th2 polarization and regulates allergic airway inflammation[J]. Cell Res, 2010, 20(1): 62 - 71. doi: 10.1038/cr.2009.128.

[6] Wakashin H, Hirose K, Maezawa Y, et al. IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2008, 178(10): 1023 - 1032. doi: 10.1164/rccm.200801 - 086OC.

[7] Wang YH, Wills-Karp M. The potential role of interleukin-17 in severe asthma[J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2011, 11(5): 388 - 394. doi: 10.1007/s11882 - 011 - 0210 - y.

[8] Chelladurai Y, Suarez-Cuervo C, Erekosima N, et al. Effectiveness of subcutaneous versus sublingual immunotherapy for the treatment of allergic rhinoconjunctivitis and asthma: a systematic review[J]. J Allergy Clin Immunol Pract, 2013, 1(4): 361 - 369. doi: 10.1016/j.jaip.2013.04.005.

[9] Ring J, Gutermuth J. 100 years of hyposensitization: history of allergen-specific immunotherapy(ASIT)[J]. Allergy, 2011, 66(6): 713 - 724. doi: 10.1111/j.1398 - 9995.2010.02541.x.

[10] 胡 琦,钟世民,汪金玉,等. 皮下注射大剂量卵白蛋白诱导小鼠哮喘免疫耐受模型的建立及机制初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2016, 38(12): 1404 - 1409. doi: 10.16016/j.1000 - 5404.201602024.

[11] Park SY, Jing X, Gupta D, et al. Peptidoglycan recognition protein 1 enhances experimental asthma by promoting Th2 and Th17 and limiting regulatory T cell and plasmacytoid dendritic cell responses[J]. J Immunol, 2013, 190(7): 3480 - 3492. doi: 10.4049/jimmunol.1202675.

[12] 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. doi: 10.1111/cea.12119.

[13] Deng Y, Chen W, Zang N, et al. The antiasthma effect of neonatal BCG vaccination does not depend on the Th17/Th1 but IL - 17/IFN-γ balance in a BALB/c mouse asthma model[J]. J Clin Immunol, 2011, 31(3): 419 - 429. doi: 10.1007/s10875 - 010 - 9503 - 5.

[14] Kudo M, Melton AC, Chen C, et al. IL-17A produced by αβ T cells drives airway hyper-responsiveness in mice and enhances mouse and human airway smooth muscle contraction[J]. Nat Med, 2012, 18(4): 547 - 554. doi: 10.1038/nm.2684.

[15] Wong CK, Lun SW, Ko FW, et al. Activation of peripheral Th17 lymphocytes in patients with asthma[J]. Immunol Invest, 2009, 38(7): 652 - 664. doi: 10.1080/08820130903062756.

[16] Wilson RH, Whitehead GS, 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 - 730. doi: 10.1164/rccm.200904 - 0573OC.

[17] Choy DF, Hart KM, Borthwick LA, et al. TH2 and TH17 inflammatory pathways are reciprocally regulated in asthma[J]. Sci Transl Med, 2015, 7(301): 129 - 301. doi: 10.1126/scitranslmed.aab3142.

[18] Kawakami H, Koya T, Kagamu H, et al. IL-17 eliminates therapeutic effects of oral tolerance in murine airway allergic inflammation[J]. Clin Exp Allergy, 2012, 42(6): 946 - 957. doi: 10.1111/j.1365 - 2222.2012.04006.x.

[19] Taherian M, Razavi AR, Izad M, et al. The role of interleukin-23 in stability of in vitro T helper-17 cells[J]. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2014, 13(2): 131 - 137.

[20] McGeachy MJ, Cua DJ. The link between IL-23 and Th17 cell-mediated immune pathologies[J]. Semin Immunol, 2007, 19(6): 372 - 376. doi: 10.1016/j.smim.2007.10.012.

[21] Li Y, Hua S. Mechanisms of pathogenesis in allergic asthma: role of interleukin-23[J]. Respirology, 2014, 19(5): 663 - 669. doi: 10.1111/resp.12299.

[22] Chen Y, Langrish CL, McKenzie B, et al. Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis[J]. J Clin Invest, 2006, 116(5): 1317 - 1326. doi: 10.1172/JCI25308.

[23] Haines CJ, Chen Y, Blumenschein WM, et al. Autoimmune memory T helper 17 cell function and expansion are dependent on interleukin - 23[J]. Cell Rep, 2013, 3(5): 1378 - 1388. doi: 10.1016/j.celrep.2013.03.035.

[24] Ciprandi G, Cuppari C, Salpietro A, et al. Serum IL-23 in asthmatic children[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2012, 26(1 Suppl): S53 - S61.

[25] Ciprandi G, Cuppari C, Salpietro AM, et al. Serum IL-23 strongly and inversely correlates with FEV1 in asthmatic children[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2012, 159(2): 183 - 186. doi: 10.1159/000336418.

[26] Kim BJ, Lee S, Berg RE, et al. Interleukin-23 (IL-23) deficiency disrupts Th17 and Th1-related defenses against Streptococcus pneumoniae infection[J]. Cytokine, 2013, 64(1): 375 - 381. doi: 10.1016/j.cyto.2013.05.013.

(编辑:周小林)