

论著 · 实验研究

新生期卡介苗接种对实验性哮喘小鼠肺 Th17 细胞和 IL-17 的影响

陈伟超¹ 刘恩梅¹ 邓昱¹ 何云¹ 陈杰华¹ 李欣² 刘玮²

(1. 重庆医科大学附属儿童医院呼吸中心; 2. 重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所, 重庆 400014)

[摘要] **目的** 通过实验性哮喘小鼠模型探讨新生期卡介苗(bacillus Calmette-Guérin, BCG)接种对肺Th17细胞和 IL-17 的影响。**方法** 新生期小鼠分3组:对照组,卵白蛋白组(OVA),BCG干预组(BCG/OVA)。除对照组外,其余两组均给予OVA致敏和激发。观察支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中细胞总数及分类,ELISA法检测BALF中IFN- γ 、IL-17含量,流式细胞术检测肺Th17细胞。**结果** 两哮喘组BALF中细胞总数、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞比例均明显高于对照组,而BCG/OVA组上述细胞均显著低于OVA组。两哮喘组BALF中IFN- γ 水平明显低于对照组,IL-17显著高于对照组,同时BCG/OVA组IL-17水平明显低于OVA组。流式细胞术显示,两哮喘组Th17细胞比例均明显高于对照组,但两哮喘组间差异无统计学意义。**结论** Th17细胞/IL-17在实验性哮喘小鼠发病中起作用,新生期BCG接种可抑制气道IL-17的产生,其抑制的IL-17可能并非主要由Th17细胞产生,而来源于其他细胞。

[中国当代儿科杂志,2010,12(8):650-653]

[关键词] 卡介苗;哮喘;Th17细胞;IL-17;新生小鼠
[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)08-0647-04

Impact of neonatal bacillus Calmette-Guerin vaccination on lung Th17 cells and IL-17 in murine asthma model

CHEN Wei-Chao, LIU En-Mei, DENG Yu, HE Yun, CHEN Jie-Hua, LI Xin, LIU Wei. Department of Respiratory Medicine, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China (Liu E-M, Email:emliu186@hotmail.com)

Abstract: Objective To study the impact of neonatal bacillus Calmette-Guerin (BCG) vaccination on lung Th17 cells and IL-17 in murine asthma model. **Methods** Neonatal BALB/c mice were divided into three groups: control, OVA and BCG/OVA groups. BCG was administered in the BCG/OVA group on postnatal day 2 or 3. Except the control group, the mice in the other two groups were sensitized and undergone OVA challenge. Inflammatory cell numbers and morphological identification of leucocytes in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were measured by light microscopy. Cytokine IFN- γ and IL-17 levels in BALF were measured using ELISA. The percentage of lung Th17 cells were assayed by flow cytometry. **Results** There was significantly larger number of total cells, lymphocytes, eosinophils and neutrophils in BALF in the OVA and BCG/OVA groups compared with the control group. The number or percentage of those cells in the BCG/OVA group was lower than that in the OVA group. The level of IL-17 in BALF was significantly higher in the OVA and the BCG/OVA groups compared with the control group, while the level of IFN- γ was lower. The OVA group had higher level of IL-17 than the BCG/OVA group. The mice in the OVA and the BCG/OVA groups had a higher percentage of Th17 cells in lungs compared with the control group, but there were no significant differences in the percentage of Th17 cells between the OVA and the BCG/OVA groups. **Conclusions** Th17 cells and IL-17 play roles in the pathogenesis of asthma. BCG vaccination can reduce the level of IL-17 in BALF and the reduced IL-17 may be mainly from other IL-17-producing cells in the lungs, not Th17 cells. [Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (8):650-653]

Key words: Bacillus Calmette-Guerin; Asthma; Th17 cell; IL-17; Neonatal mice

[收稿日期]2010-01-04;[修回日期]2010-01-29
[基金项目]国家自然科学基金(NSFC30972698)、重庆市自然科学基金(CSTC2007BA5013)、教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目(NCET-06-0775)资助。
[作者简介]陈伟超,男,硕士研究生。
[通信作者]刘恩梅,主任医师,教授。

支气管哮喘是儿童最常见的气道慢性炎症。在过去几十年,支气管哮喘的患病率明显增加,尤其是在经济发达国家,我国小儿患病率也呈明显的上升趋势。

目前哮喘的发病机制仍不十分清楚。传统观点认为 Th1/Th2 细胞失衡在哮喘发病中有重要作用。近年来,随着对 Th 细胞新亚群 Th17 细胞及其分泌的细胞因子 IL-17 的不断深入研究,人们发现 Th17 细胞可以诱导气道嗜酸性粒细胞及中性粒细胞炎症^[1-2],它们在哮喘发病中有重要作用。

有研究证明结核菌素反应强度与特异性疾病存在负相关^[3]。卡介苗(BCG)及其有效成分可诱导 IFN- γ 的产生,减轻气道高反应性和减少黏液产生^[4-5],本课题组前期通过研究实验性哮喘小鼠模型发现新生期接种 BCG 可减轻肺脏炎症和气道高反应性,对哮喘有保护作用^[6]。

小鼠自身免疫性脑脊髓炎模型证实脑内感染 BCG 可降低中枢神经系统 Th17 细胞比例和 IL-17 水平^[7],说明 BCG 对 Th17 细胞有抑制效应。

因此本课题组认为抑制肺 Th17 细胞和 IL-17 水平可能是实现 BCG 对哮喘保护的一种途径。本研究旨在探讨新生期接种 BCG 对实验性哮喘小鼠肺 Th17 细胞和 IL-17 的影响。

1 材料和方法

1.1 动物分组

清洁级 BALB/c 小鼠购自重庆医科大学实验动物中心,饲养于专用消毒饲养盒内,恒定室温,过滤空气,饲料、水皆经消毒处理,更换饲料等操作均在超净台内进行。新生 BALB/c 乳鼠分 3 组:①对照组(Control),新生期(生后 2~3 d)皮下注射 BCG 溶媒液(不含 BCG)20 μ L,生后 4 周和 6 周时均给予单纯明矾佐剂(不含 OVA)腹腔和双肩部皮下多点注射,7 周时给予连续 10 d 的 PBS 雾化吸入;②卵白蛋白组(OVA),新生期皮下注射 BCG 溶媒液,4 周和 6 周时均给予 OVA 明矾佐剂腹腔和双肩部皮下多点致敏,7 周时给予连续 10 d 的 5% OVA 雾化吸入激发;③BCG 干预组(BCG/OVA),新生期皮下注射 BCG(成都生物制品研究所)20 μ L(1×10^5 CFU),OVA 致敏和激发同 OVA 组。

1.2 OVA 致敏和激发

OVA 组和 BCG/OVA 组小鼠分别在第 4 周和第 6 周(间隔 2 周)给予两次 OVA 明矾致敏佐剂 200 μ L 腹腔和双肩部皮下多点注射,第 7 周即第 2

次致敏后 1 周给予 5% OVA 激发液高频雾化吸入进行激发,每天 1 次,每次 30 min,连续 10 d。对照组给予单纯明矾佐剂(不含 OVA)致敏,PBS 雾化吸入激发,时间过程同哮喘组。

1.3 支气管肺泡灌洗

小鼠麻醉处死,仰卧位固定,用留置针进行气管插管,冷 PBS 灌洗,每次 0.5 mL,共 1 mL,灌洗液细胞计数后离心,上清液 -80℃ 保存备细胞因子检测,细胞沉渣瑞氏染色进行分类计数。

1.4 细胞因子含量检测

ELISA 方法检测小鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)中 IFN- γ 、IL-17 细胞因子,操作按试剂盒(IFN- γ ,北京四正柏;IL-17,Bender)说明书进行。

1.5 Th17 细胞检测

用 PBS 从小鼠右心室灌注,去除肺血管血液,离体肺组织(不含肺外淋巴结)剪碎后在 5 mL 含 1.0% 胎牛血清,125 U/mL 胶原蛋白酶 I(Sigma-Aldrich),60 U/mL DNA 酶 I(Sigma-Aldrich)和 60 U/mL 透明质酸酶 I(Sigma-Aldrich)的 PBS 中 37℃ 孵育 1 h,用 300 目不锈钢网制成单细胞悬液,37℃,5% CO₂ 条件下,与 50 ng/mL PMA(Sigma-Aldrich),500 ng/mL 离子霉素(Sigma-Aldrich)及 GolgiPlug(Sigma-Aldrich)在含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中共同孵育 4~6 h。孵育后的细胞加荧光标记的抗体,表面分子加 Rat-anti-mouse CD3:PEcy5(BD Biosciences),Rat-anti-mouse CD4:FITC(BD Biosciences),IL-17 的检测用 Cytofix/Cytoperm(BD Biosciences)打孔后加 Rat-anti-mouse IL-17:PE(BD Biosciences)。标记后的细胞上流式细胞仪型(FACSCLibur, BD Biosciences)检测。

1.6 统计学分析

运用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用 One-way ANOVA 分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BALF 中细胞计数和分类

结果如表 1 所示,正常小鼠 BALF 中主要为巨噬细胞和淋巴细胞,尤以前者为主,而嗜酸性粒细胞和中性粒细胞含量很少。OVA 组小鼠 BALF 中细胞总数、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞比例均明显高于对照组($P < 0.01$),说明 OVA 组小鼠气道炎症明显。BCG/OVA 组小鼠同对照组相比,细

胞总数、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞比例均明显增高 ($P < 0.05$), 仍表现为气道炎症。但是 BCG/OVA 组细胞总数、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞比例均明显低于 OVA 组, 而巨噬细胞比例则显著增

高 ($P < 0.01$), 提示 BCG 抑制了哮喘小鼠气道淋巴细胞、嗜酸性粒细胞和中性粒细胞的浸润, 减轻了气道炎症。

表 1 BALF 中细胞总数和白细胞分类 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	细胞总数 ($\times 10^4/\text{mL}$)	白细胞分类			
			淋巴细胞 (%)	嗜酸性粒细胞 (%)	中性粒细胞 (%)	巨噬细胞 (%)
对照组	8	121 $\pm$ 34	31 $\pm$ 5	0.24 $\pm$ 0.36	3.1 $\pm$ 2.7	64 $\pm$ 4
OVA 组	8	387 $\pm$ 113 ^a	49 $\pm$ 12 ^a	12.29 $\pm$ 4.33 ^a	27.2 $\pm$ 11.3 ^a	9 $\pm$ 7 ^a
BCG/OVA 组	8	259 $\pm$ 76 ^{a,c}	24 $\pm$ 12 ^c	4.13 $\pm$ 3.47 ^{b,c}	13.0 $\pm$ 5.2 ^{b,c}	54 $\pm$ 13 ^{b,c}
F 值		21.45	12.54	29.33	21.71	91
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

a: 与对照组比较, $P < 0.01$; b: 与对照组比较, $P < 0.05$; c: 与 OVA 组比较, $P < 0.01$

2.2 BALF 中细胞因子的检测

与对照组相比, 两哮喘组 IFN- γ 水平均明显降低 ($P < 0.01$), IL-17 水平均显著升高。BCG/OVA 组与 OVA 组相比, IL-17 水平明显下降 ($P < 0.05$), IFN- γ 则差异无统计学意义 (表 2)。

2.3 肺 Th17 细胞的检测

两哮喘组小鼠肺 CD3⁺CD4⁺IL-17⁺ (Th17) 细胞比例均明显高于对照组 ($P < 0.01$), 但两哮喘组之间差异无统计学意义 (图 1, 图 2)。

表 2 BALF 中细胞因子含量 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	鼠数	IFN- γ	IL-17
对照组	8	461 $\pm$ 128	421 $\pm$ 184
OVA 组	8	154 $\pm$ 73 ^a	2 969 $\pm$ 1 375 ^a
BCG/OVA 组	8	229 $\pm$ 174 ^a	1 746 $\pm$ 1 050 ^{b,c}

a: 与对照组比较, $P < 0.01$; b: 与对照组比较, $P < 0.05$; c: 与 OVA 组比较, $P < 0.05$

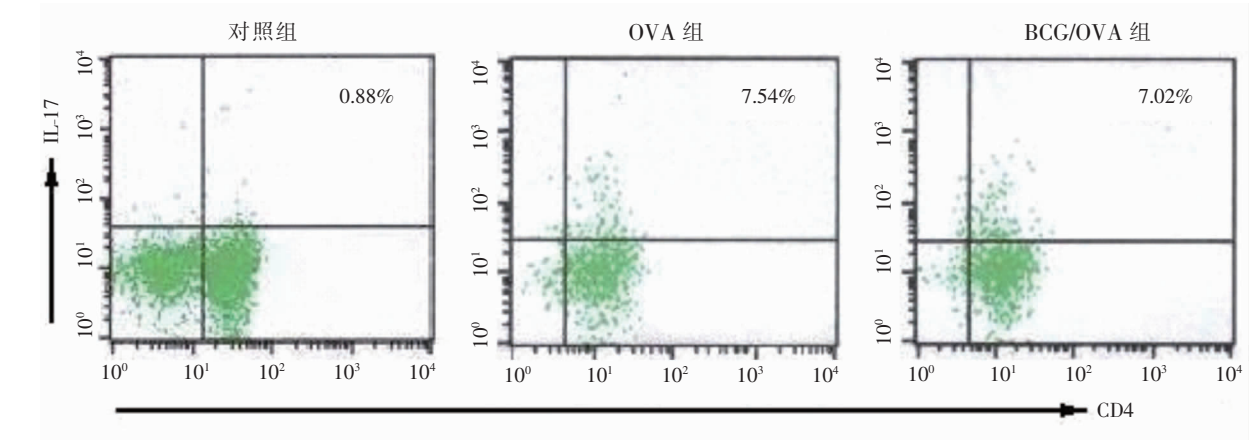


图 1 小鼠 ($n = 8$) 肺 Th17 细胞流式图

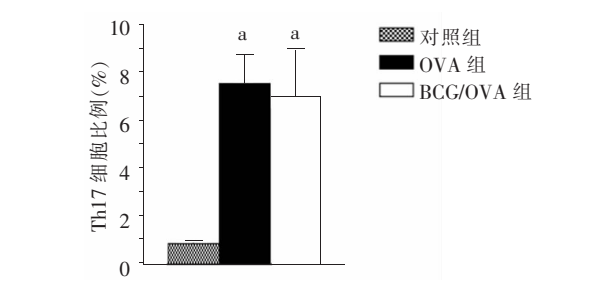


图 2 小鼠 ($n = 8$) 肺 Th17 细胞比较 a: 与对照组比较, $P < 0.01$ 。

3 讨论

2000 年 Infante-Duarte 等^[8]首次证明 Th17 细胞是不同于 Th1、Th2 的新的 Th 细胞亚群。除 IL-17 (又称 IL-17A) 外, Th17 细胞还能分泌 IL-17F、IL-21、IL-22, 参与机体自身免疫性疾病、宿主防御等方面的应答^[9]。

据报道, 哮喘患者的肺、痰液、BALF、血清中均

发现 IL-17 mRNA 和/或蛋白的增加,IL-17 水平和哮喘患者气道高反应性的严重程度相关^[10],其对哮喘有作用的直接证据是哮喘患者外周血单个核细胞(PBMCs)在体外用粉尘螨刺激后产生 IL-17,而非哮喘患者则无 IL-17 产生^[11]。本研究显示,哮喘组小鼠肺组织中 Th17 细胞百分率显著高于对照组,其 BALF 中 IL-17 也明显高于对照组,支持 Th17 细胞及 IL-17 在哮喘的发病中起作用。

通过 BCG/OVA 组与 OVA 组的比较显示新生儿期接种 BCG 后,哮喘小鼠气道 IL-17 水平降低,细胞总数、嗜酸性粒细胞和中性粒细胞比例均显著降低,气道炎症减轻。有研究发现 IL-17A^{-/-}小鼠在 OVA 激发后其嗜酸性粒细胞数量减少^[1],也有动物实验表明气道在过敏原激发后,中性粒细胞和气道高反应性的增加伴随着 IL-17 水平的增高^[2],中和 IL-17 后,肺中性粒细胞募集可减少^[12],这些提示 IL-17 可能通过促进气道嗜酸性粒细胞和/或中性粒细胞的浸润而加重气道炎症。BCG 对哮喘有保护作用除了增强 Th1 效应外,还可能通过降低 IL-17 产生,减轻气道炎症而实现。

Cruz 等^[13]通过对 IFN- γ 基因敲除小鼠的研究发现 IFN- γ 可抑制 IL-17 产生。进一步体外实验发现:IFN- γ 改变了骨髓树突细胞的细胞因子应答,促进了 IL-12 的产生而降低了 IL-23。IL-23 作用于 Th17 细胞可增强并维持其分泌 IL-17。本研究 BCG/OVA 组小鼠 BALF 中 IFN- γ 水平较 OVA 组增高而 IL-17 却明显减低,推测 BCG 抑制哮喘小鼠气道 IL-17 产生即可能通过以上途径所致,具体机制尚需进一步研究。

本研究还发现:虽然 BCG/OVA 组小鼠 BALF 中 IL-17 水平要明显低于 OVA 组,但对应的肺组织 Th17 细胞的百分比却没有明显下降。这就提示新生儿期接种 BCG 抑制气道的 IL-17 可能并非主要由 Th17 细胞产生,而是来源于其他细胞。

除了 Th17 细胞可以产生 IL-17 外,CD8⁺ T 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、巨噬细胞等均可产生 IL-17^[8,14]。研究发现在 OVA 诱导的小鼠变应性哮喘模型中,IL-17 主要来自于肺泡巨噬细胞,并非 Th17 或者其他细胞^[14]。各种产生 IL-17 的细胞在哮喘发病中的地位及具体机制目前仍不清楚,BCG 对其有何具体作用,还需进一步深入探讨。

综上所述,本研究支持 Th17 细胞及 IL-17 在哮喘发病中起作用,并且证明新生儿期 BCG 接种可以减轻实验性哮喘小鼠气道炎症细胞浸润,抑制 IL-17 的产生,其抑制的 IL-17 可能并非主要由 Th17 细胞

产生,而来源于其他细胞。各种产生 IL-17 细胞在哮喘发病中的作用尚未明了,明确 BCG 接种对其有何具体影响,这对理解 BCG 对哮喘保护作用及开发预防哮喘的疫苗有重要意义,值得进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, Sudo K, Iwase M, Homma I, 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):375-387.
- [2] Wilson RH, Whitehead GS, Nakano H, Free ME, Kolls JK, Cook DN. Allergic sensitization through the airway primes Th17-dependent neutrophilia and airway hyperresponsiveness[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 180(8):720-730.
- [3] Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, Hopkin JM. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder[J]. *Science*, 1997, 275(5296):77-79.
- [4] Hopfenspirger MT, Agrawal DK. Airway hyperresponsiveness, late allergic response, and eosinophilia are reversed with mycobacterial antigens in ovalbumin-prensensitized mice[J]. *J Immunol*, 2002, 168(5):2516-2522.
- [5] Yang X, Fan Y, Wang S, Han X, Yang J, Bilenki L, et al. Mycobacterial infection inhibits established allergic inflammatory responses via alteration of cytokine production and vascular cell adhesion molecule-1 expression[J]. *Immunology*, 2002, 105(3):336-343.
- [6] 李睿,刘恩梅,杨锡强,王莉佳.卡介苗新生儿期接种和呼吸道合胞病毒感染对小鼠实验性哮喘的联合作用[J]. *中华儿科杂志*, 2006, 44(6):420-424.
- [7] Lee J, Reinke EK, Zozulya AL, Sandor M, Fabry Z. Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guérin infection in the CNS suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis and Th17 responses in an IFN-gamma-independent manner[J]. *J Immunol*, 2008, 181(9):6201-6212.
- [8] Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, Kamradt T. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells[J]. *J Immunol*, 2000, 165(11):6107-6115.
- [9] Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells[J]. *Nature*, 2008, 453(7198):1051-1057.
- [10] Hung LY, Velichko S, Huang F, Thai P, Wu R. Regulation of airway innate and adaptive immune responses: the IL-17 paradigm[J]. *Crit Rev Immunol*, 2008, 28(4):269-279.
- [11] Hashimoto T, Akiyama K, Kobayashi N, Mori A. Comparison of IL-17 production by helper T cells among atopic and nonatopic asthmatics and control subjects[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2005, 137(Suppl 1):51-54.
- [12] Hellings PW, Kasran A, Liu Z, Vandekerckhove P, Wuyts A, Overbergh L, 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.
- [13] Cruz A, Khader SA, Torrado E, Fraga A, Pearl JE, Pedrosa J, et al. Cutting edge: IFN-gamma regulates the induction and expansion of IL-17-producing CD4 T cells during mycobacterial infection[J]. *J Immunol*, 2006, 177(3):1416-1420.
- [14] Song C, Luo L, Lei Z, Li B, Liang Z, Liu G, et al. IL-17-producing alveolar macrophages mediate allergic lung inflammation related to asthma[J]. *J Immunol*, 2008, 181(9):6117-6124.

(本文编辑:黄 榕)