

论著 · 实验研究

RORγt 在支气管哮喘小鼠肺组织中的表达及布地奈德对其抑制作用

卞芳芳 王军 路明 武怡

(徐州医学院附属医院儿科,江苏 徐州 221000)

[摘要] **目的** 观察布地奈德(BUD)对支气管哮喘小鼠肺组织中 Th17 细胞的特异性转录因子 RORγt 表达的影响,探讨 BUD 治疗哮喘的机制。**方法** 采用卵清蛋白(OVA)致敏方法建立支气管哮喘小鼠模型;Balb/c 雌性小鼠 30 只随机分为对照组、哮喘组、BUD 组,每组各 10 只。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)技术检测小鼠肺泡灌洗液(BALF)、血清中白细胞介素-17(IL-17)水平;对 BALF 中炎性细胞进行计数;苏木精-伊红(HE)染色评价各组小鼠气道炎症程度;逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测肺组织中 RORγt mRNA 表达水平。**结果** 哮喘组小鼠 BALF、血清中 IL-17 水平较对照组明显升高($P < 0.01$),BUD 治疗后 IL-17 水平明显降低($P < 0.01$)。肺组织中 RORγt mRNA 在哮喘组较对照组明显升高($P < 0.01$),BUP 治疗后 RORγt mRNA 水平明显降低($P < 0.01$)。哮喘组细胞总数、中性粒细胞数和嗜酸性粒细胞数均较对照组明显增多($P < 0.01$),BUD 组细胞总数、中性粒细胞数和嗜酸性粒细胞数与哮喘组比较明显减少($P < 0.01$),与对照组比较差异无统计学意义。HE 染色表明 BUD 治疗后气管炎性反应明显缓解。**结论** 哮喘小鼠 RORγt 表达水平和 IL-17 水平增高,导致哮喘小鼠的全身和局部炎症反应增强,可能是导致哮喘发生的机制之一。BUD 可通过抑制 RORγt 和 IL-17 的表达水平,发挥其免疫抑制功能而起到治疗哮喘的作用。
[中国当代儿科杂志,2012,14(8):628-631]

[关键词] RORγt;哮喘;布地奈德;IL-17;小鼠
[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2012)08-0628-04

RORγt expression in the pulmonary tissue of asthmatic mice and the inhibitory effects of budesonide

BIAN Fang-Fang, WANG Jun, LU Ming, WU Yi. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221000, China (Wu Y, Email: wuyi0885@sina.com)

Abstract: Objective To study the effect of budesonide (BUD) on RORγt expression in the pulmonary tissue of asthmatic mice and mechanisms of BUD in the treatment of asthma. **Methods** Blab/c asthmatic mouse model was induced by ovalbumin (OVA). Thirty female mice were randomly divided into three groups: control, asthmatic and BUD-treated. IL-17 levels in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and serum were measured using ELISA. Total and differential cell counts in BALF were measured. Airway inflammation was evaluated by hematoxylin and eosin staining. IL-17 mRNA and RORγt mRNA expression were measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** RORγt mRNA and IL-17 levels in the asthmatic group were significantly higher than in the control group ($P < 0.01$). BUD treatment significantly decreased RORγt mRNA and IL-17 levels compared with the asthmatic group ($P < 0.01$). Compared with the control group, total, neutrophil and eosinophil cell count in BALF increased significantly in the asthmatic group ($P < 0.01$). After BUD treatment, counts of total, neutrophil and eosinophil cells in BALF were significantly reduced ($P < 0.01$) and were similar to in the control group. Inflammatory reactions in the respiratory tract were significantly alleviated in the BUD treated group. **Conclusions** RORγt and IL-17 levels in the pulmonary tissue of asthmatic mice increase and this may be associated with the pathogenesis of asthma. BUD can inhibit RORγt and IL-17 and thus reduces lung inflammation.
[Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(8):628-631]

Key words: RORγt; Asthma; Budesonide; IL-17; Mice

[收稿日期]2012-02-16;[修回日期]2012-03-29
[作者简介]卞芳芳,女,硕士研究生。
[通信作者]武怡,主任医师。

支气管哮喘(简称哮喘)是目前儿童常见的一种呼吸道疾病,是以气道高反应性、慢性炎症性病理改变为主的气道阻塞性疾病,多种炎性细胞和炎性介质参与了其病理过程^[1-2],其中 CD4⁺ 辅助性 T 细胞在哮喘免疫应答中发挥着核心作用。Th17 细胞是 2005 年新发现的不同于 Th1 和 Th2 的另一种 CD4⁺ T 细胞亚群,其介导炎症反应、自身免疫性疾病、肿瘤和移植排斥等的发生和发展^[3]。Th17 细胞可诱导气道嗜酸性粒细胞及中性粒细胞炎症,产生气道重塑,在哮喘发病中起到重要作用^[4]。IL-17 是 Th17 细胞执行生物学功能的主要细胞因子,能通过诱导上皮细胞、内皮细胞释放前炎性细胞因子来放大炎症反应,并且间接参与了哮喘气道重构^[5]。维甲酸相关孤儿受体 γ 的胸腺异构体 (retinoic acid-related orphan receptor gamma t, ROR γ t) 是 Th17 细胞分化成熟的关键转录因子,能诱导初始 T 细胞分化成 Th17 细胞^[6]。是否可通过抑制 ROR γ t 阻止初始 T 细胞向 Th17 分化,进而减少体内 IL-17 的分泌,尚未见报道。本实验通过建立经典的哮喘小鼠动物模型,观察 Th17 细胞的两个主要效应因子 ROR γ t 和 IL-17 在哮喘发病中的变化情况,并探讨布地奈德 (BUD) 治疗后对其影响和干预作用,以期作为哮喘的发病机制及激素控制哮喘发作提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

6~8 周龄清洁级健康雌性 Balb/c 小鼠 30 只,体重 20 ± 2 g,购自中科院上海实验动物中心,随机分为对照组、哮喘组、BUD 组,每组 10 只。卵清蛋白 (OVA) V 级购自美国 Sigma 公司;氢氧化铝凝胶购自上海浦山化工公司;吸入用 BUD 混悬液 (BUD 1 mg/2 mL) 为澳大利亚 AstraZeneca 公司产品;便携式 PARI-BOY 雾化吸入器为德国 PARI 公司产品;小鼠 IL-17 ELISA 检测试剂盒为武汉博士德公司产品;RT-PCR 试剂盒、DNA 标记 (Marker) 由北京天根生化科技有限公司提供;Trizol 试剂为日本 TaKaRa 公司产品;根据 ROR γ t 和 β -actin 的基因序列,运用 Primer Premier 5.0 软件设计、Oligo 6.0 软件评价,确定其引物序列,引物由上海生物工程有限公司合成,如下所示, ROR γ t (167 bp): 上游 5'-CGCGGAGCAGACACACT-TA-3',下游 5'-CCCTGGACCTCTGTTTTGGC-3'; β -actin (540 bp): 上游 5'-CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC-3',下游 5'-GTGGGCCGCCCTAGGCACCA-3'。

1.2 建立动物模型

参照国内外提出的模型制作方法略加调整^[7-8]。哮喘组分别于第 0、7、14 天腹腔注射以生理盐水溶解的 OVA 100 μ g 和氢氧化铝凝胶 1 mg 混合液 0.2 mL 致敏,第 21 天开始将小鼠置于自制密闭容器中用空气压缩雾化器予以 20 g/L OVA 液 10 mL 雾化吸入激发,每日 1 次,共 7 d。小鼠出现烦躁不安、俯伏不动、呼吸加深加快、腹肌痉挛、二便失禁等为哮喘急性发作表现。BUD 治疗组:致敏和激发方法同哮喘模型组,每次激发前 1 h 吸入生理盐水溶解的 BUD 雾化液 5 mL (含 BUD 1 mg),每日 1 次,每次 30 min,共 7 d。对照组在对应时间点予相同剂量生理盐水腹腔注射或雾化吸入。

1.3 检测项目及方法

1.3.1 摘眼球取血 各组小鼠于末次激发后 24 h 予 10% 水合氯醛 3 mL/kg 腹腔注射麻醉,将眼周皮肤往颈后拉,使眼球突出充血,用镊子迅速夹去眼球,同时将小鼠头向下,使血液滴入试管内,37℃ 静置 30 min 后,2500 r/min,离心 15 min,收集血清,于 -80℃ 保存备用。

1.3.2 支气管肺泡灌洗液收集 用血管钳在小鼠的环状软骨上固定气管,其下做横行切口,置入连接注射器的硅胶管,每次以 0.5 mL 冷生理盐水灌洗全肺并收集支气管肺泡灌洗液 (BALF),反复回抽 3 次后收集液体。4℃、2000 r/min 离心 10 min,收集上清液储存于 -20℃ 冰箱待测细胞因子, BALF 中细胞沉淀用 PBS 重悬后充板计数细胞总数;涂片、瑞氏-姬姆萨复合染色,显微镜下进行细胞分类计数。

1.3.3 肺部标本的制备 收集 BALF 后,左肺置于 40 g/L 甲醛溶液中固定,右肺置 -80℃ 冻存。左肺组织经石蜡包埋,间隔 4 μ m 连续切片,苏木精-伊红染色观察气道炎性反应。

1.3.4 检测 BALF 及血清中细胞因子水平 IL-17 检测参照 ELISA 试剂盒说明书进行,通过标准品吸光度 (A) 值绘制标准曲线,然后计算各样本的值。

1.3.5 RT-PCR 检测肺组织中 ROR γ t mRNA 表达水平 取 100 mg 右肺组织,Trizol 试剂提取总 RNA,反转录合成 cDNA,以此为模板行 PCR 扩增。ROR γ t PCR 产物为 167 bp,产物的反应条件为:95℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 30 s,57℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,35 个循环后 72℃ 延伸 10 min。 β -actin PCR 产物为 540 bp,产物的反应条件为 95℃ 预变性 3 min;94℃ 变性 30 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,30 个循环后,72℃ 延伸 10 min。用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳,以 β -actin 为内参,比较 ROR γ t 与 β -actin 的相对吸光度值并进行半定量分析。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较行 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织病理学变化结果

哮喘组小鼠细支气管及伴行血管周围有大量炎症细胞浸润,纤维结缔组织增生,支气管黏膜增厚,

肺间质及肺泡腔内可见嗜酸性粒细胞,杯状细胞增生;对照组小鼠肺组织结构清晰,基本无炎症细胞浸润;BUD 组与哮喘组相比,支气管和血管周围炎症明显减轻,与对照组比较,无明显差异。见图 1。

2.2 BALF 中细胞总数和炎症细胞计数

哮喘组细胞总数、中性粒细胞数和嗜酸性粒细胞数均较对照组明显增多($P < 0.01$),BUD 治疗组细胞总数、中性粒细胞数和嗜酸性粒细胞数较哮喘组明显减少($P < 0.01$),与对照组比较差异无统计学意义。见表 1。

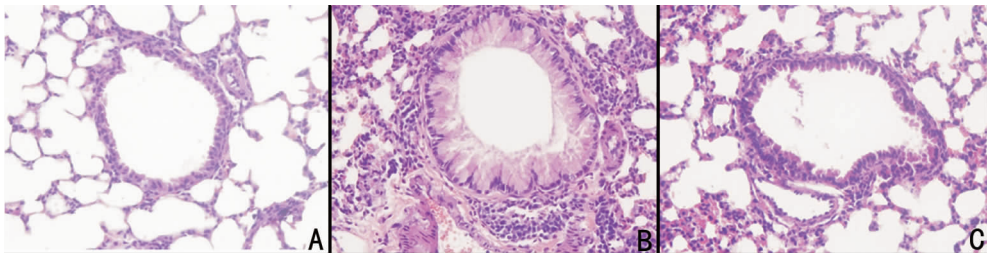


图 1 哮喘组、对照组及 BUD 治疗组小鼠肺组织病理变化(苏木精-伊红染色,×400) A:对照组,肺组织结构清晰,未见明显炎症改变;B:哮喘组,可见细支气管及伴行血管周围有以嗜酸性粒细胞增多为主的大量炎症细胞浸润,纤维结缔组织增生,支气管黏膜增厚;C:BUD 治疗组,支气管和血管周围炎症改变较哮喘组明显减轻。

2.3 肺组织 RORγt mRNA 检测结果

哮喘组、BUD 组、对照组的肺组织 RORγt mRNA 检测结果显示,哮喘组 RORγt 与 β-actin mRNA 的相对吸光度值结果较 BUD 组及对照组增高明显($P < 0.01$),而 BUD 组与对照组比较差异无统计学意义。见表 2,图 2。

2.4 血清和 BALF 中细胞因子 IL-17 测定

哮喘组血清、BALF 中 IL-17 水平明显升高,与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.01$)。BUD 组与哮喘组相比,血清、BALF 中 IL-17 水平下降($P < 0.01$),与对照组相比,差异无统计学意义。见表 2。

表 1 各组小鼠 BALF 中细胞总数和分类计数比较
($\times 10^7/L, n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	细胞总数	嗜酸性粒细胞计数	中性粒细胞计数
对照组	8.4 ± 2.0	0.01 ± 0	0.25 ± 0.11
哮喘组	24.1 ± 8.5 ^a	13.29 ± 2.35 ^a	3.27 ± 1.13 ^a
BUD 治疗组	11.7 ± 5.2 ^b	4.18 ± 1.36 ^b	0.94 ± 0.22 ^b
<i>F</i> 值	27.38	22.54	31.47
<i>P</i> 值	<0.01	<0.01	<0.01

a:与对照组比较, $P < 0.01$; b:与哮喘组比较, $P < 0.01$

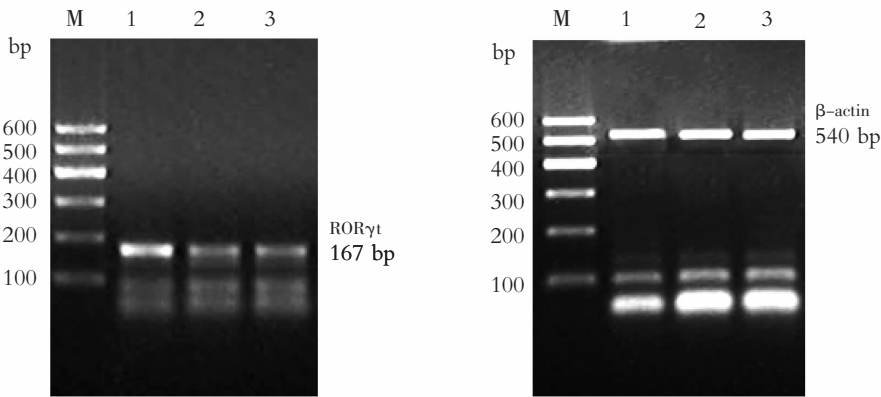


图 2 RT-PCR 方法检测哮喘、BUD 治疗组及对照组肺组织 RORγt mRNA M:Marker; 1:哮喘组; 2:对照组; 3:BUD 治疗组。

表 2 各组小鼠 BALF 和血清中 IL-17 水平比较
($n = 10, \text{ng/L}, \bar{x} \pm s$)

组别	IL-17		ROR γ t/ β -actin mRNA
	血清	BALF	
对照组	6.6 $\pm$ 2.3	5.5 $\pm$ 2.6	0.45 $\pm$ 0.16
哮喘组	27.3 $\pm$ 3.6 ^a	19.5 $\pm$ 2.2 ^a	0.84 $\pm$ 0.13 ^a
BUD 治疗组	12.0 $\pm$ 2.3 ^b	9.8 $\pm$ 1.9 ^b	0.57 $\pm$ 0.08 ^b
F 值	39.29	52.58	49.09
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

a: 与对照组比较, $P < 0.01$; b: 与哮喘组比较, $P < 0.01$

3 讨论

Th17 细胞是近年来发现的 CD4⁺T 细胞的一种新亚型^[9], 因分泌强大的促炎细胞因子 IL-17 而得名。IL-17 的主要生物学效应是促进炎症反应, 在宿主抗感染免疫中有重要作用, 其异常表达与哮喘等慢性炎症性疾病、自身免疫性疾病有着密切的关联^[10]。IL-17 能够增加成纤维母细胞黏附分子 (ICAM-1) 的表达, 使嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞等炎症细胞更易黏附于支气管上皮细胞, 并可促进中性粒细胞在局部组织中募集、浸润^[11]。本研究结果显示, 在哮喘小鼠 BALF 中 IL-17 水平增高, 中性粒细胞、嗜酸性粒细胞等炎症细胞比例增多, 气道炎症改变明显, 支持 IL-17 在介导哮喘炎症过程中起作用, 这与其他炎症疾病的研究结果^[11]一致。

ROR γ t 属于核激素受体超家族成员, 特异性分布于 CD4⁺CD8⁺ 淋巴细胞。有研究^[12]证实了 ROR γ t 在诱导 Th0 细胞分化成熟为 Th17 细胞的过程中起到重要作用, 在 Th17 极化环境的体外实验中, ROR γ t 缺陷 CD4⁺细胞 IL-17 的表达量呈显著下降; 而 ROR γ t 的过表达则足以诱导初始 CD4⁺T 细胞表达 IL-17。此外 ROR γ t 可以作为染色体重塑因子 (chromatin-remodeling factor) 开放 IL-17 基因座位, 继而使其他相关因子结合到 IL-17 启动子上^[13]。但是 ROR γ t 是直接参与 IL-17 基因转录调节还是间接作用, 目前尚不清楚。本研究显示, 在哮喘小鼠肺组织中 ROR γ t mRNA 表达水平明显高于对照组, 且 IL-17 水平较对照组增高, 病理学检测结果符合哮喘的气管炎性反应特征, 这些结果说明了 ROR γ t 作为 Th17 的特异性转录因子在哮喘的发生发展中发挥着极大的作用。

吸入性糖皮质激素是控制及治疗哮喘最为有效的药物。研究表明^[13-15]吸入糖皮质激素可抑制 NF- κ B 活性, 并通过抑制基因转录, 减少 TGF- β 的生成; 降低细胞周期蛋白 D1 及其 mRNA 水平, 直接抑制气道平滑肌细胞的增殖等。本研究中, BUD 治疗组小鼠肺组织中 ROR γ t mRNA 相对表达量与哮喘

组比较明显下降, 血清、BALF 中 IL-17 水平亦显著降低, 且肺组织病理变化显示气管炎性反应明显减轻, 提示 BUD 可以下调 ROR γ t 的活性, 减少 IL-17 的释放, 进而减轻哮喘模型病理炎性的改变。

综上, 本研究提示 ROR γ t 和 Th17 在哮喘发病中发挥着免疫应答作用, BUD 干预后可以抑制 ROR γ t 表达, 减少 IL-17 释放, 从而达到治疗哮喘的目的。相信随着分子生物学以及其他技术的应用, 对哮喘致病因素的深入研究, 将为哮喘的诊治提供更先进的理论基础。

[参 考 文 献]

[1] 陈育智. 儿童支气管哮喘[J]. 实用医学杂志, 2003, 19(7): 702-704.

[2] Kumar RK, Herbert C, Kasper M. Reversibility of airway inflammation and remodelling following cessation of antigenic challenge in a model of chronic asthma[J]. Clin Exp Allergy, 2004, 34(11): 1796-1802.

[3] Harrington LE, Hlatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages[J]. Nat Immunol, 2005, 6(11): 1123-1132.

[4] Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effect or TH17 and regulatory T cells[J]. Nature, 2006, 441(7090): 235-238.

[5] Aggarwal S, Gurney AL. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family[J]. J Leukoc Biol, 2002, 71(1): 1-8.

[6] Jetten AM. Recent advances in the mechanisms of action and physiological functions of the retinoid-related orphan receptors (RORs) [J]. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2004, 3(4): 395-412.

[7] 沈华浩, 王荏莉. 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.

[8] Sakai K, Yokoyama A, Kohno N, Hiwada K. Effect of different sensitizing doses of antigen in a murine model of atopic asthma[J]. Clin Exp Immunol, 1999, 118(1): 9-15.

[9] Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17[J]. Nat Immunol, 2005, 6(11): 1133-1141.

[10] 陈伟超, 刘恩梅, 邓昱, 何云, 陈杰华, 李欣, 等. 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[J]. 中国当代儿科杂志, 2010, 12(8): 647-650.

[11] Sun YC, Zhou QT, Yao WZ. Sputum interleukin-17 is increased and associated with airway neutrophilia in patients with severe asthma [J]. Chin Med J (Engl), 2005, 118(11): 953-956.

[12] Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelletier A, La-faille JJ, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells [J]. Cell, 2006, 126(6): 1121-1133.

[13] 胡斯明, 罗雅玲, 赖文岩. 地塞米松对哮喘小鼠肺组织中转录因子 ROR γ t mRNA 表达的干预作用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2009, 25(12): 1115-1118.

[14] 李敏, 宋丽, 张建波, 房俊, 李兰. 糖皮质激素对哮喘小鼠 CD4⁺CD25⁺调节 T 细胞的作用[J]. 中国当代儿科杂志, 2008, 10(4): 527-530.

[15] 丁敏娇, 戴元荣. 糖皮质激素防治支气管哮喘患者气道重塑的研究进展[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2005, 28(9): 656-658.

(本文编辑: 王庆红)