

地塞米松对哮喘小鼠 Th17 细胞因子 IL-17 表达的影响

胡斯明¹, 罗雅玲¹, 赖文岩², 陈培芬¹ (南方医科大学南方医院¹呼吸内科,²心内科, 广东 广州 510515)

摘要:目的 初步探讨地塞米松对哮喘小鼠肺组织中 Th17 细胞因子 IL-17 的影响及其机制。方法 采用卵清蛋白致敏方法建立支气管哮喘小鼠模型, Balb/c 小鼠 30 只随机分为对照组、哮喘组、地塞米松治疗组各 10 只。采用 ELISA 检测小鼠肺泡灌洗液、IL-17 水平; HE 染色评价各组小鼠气道炎症程度; RT-PCR 检测肺组织 IL-17、ROR γ t mRNA 表达水平。免疫组织化学方法检测肺组织 ROR γ t 蛋白表达水平。结果 哮喘组小鼠肺组织 ROR γ t、IL-17 mRNA 和蛋白水平均高于对照组 ($P<0.01$), 地塞米松治疗组 ROR γ t、IL-17 mRNA 和蛋白水平均低于哮喘组 ($P<0.05$)。结论 地塞米松可抑制哮喘小鼠肺组织 ROR γ t 表达, 阻止 Th17 的分化, 从而减少 IL-17 的分泌, 减轻哮喘气道炎症反应。

关键词: 哮喘; IL17; 地塞米松

中图分类号: R562 文献标识码: A 文章编号: 1673-4254(2009)06-1185-04

Effects of dexamethasone on intracellular expression of Th17 cytokine interleukin 17 in asthmatic mice

HU Si-ming¹, LUO Ya-ling¹, LAI Wen-yan², CHEN Pei-fen¹

¹Department of Respiratory Diseases, ²Department of Cardiology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To study the effects of dexamethasone on intracellular expression of Th17 cytokine interleukin 17 and the mechanisms in asthmatic mice. **Methods** Experimental asthma was induced by ovalbumin (OVA) sensitization in 20 in female Balb/c mice with (dexamethasone group, $n=10$) or without dexamethasone treatment (model group, $n=10$), with another 10 serving as the control group. The levels of IL-17 in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and serum of the mice were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the airway inflammation was evaluated by HE staining. The expressions of IL-17 and ROR γ t mRNA were measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and the expression of ROR γ t protein was measured by immunohistochemical staining. **Results** The levels of ROR γ t and IL-17 mRNA and protein in the asthmatic model group were significantly higher than those in the control group ($P<0.01$), and the increased expressions of ROR γ t and IL-17 mRNA and protein in the asthmatic mice were significantly reduced by dexamethasone treatment ($P<0.05$). **Conclusions** Dexamethasone can inhibit the release of IL-17 probably by inhibiting ROR γ t expression and blocking Th17 differentiation in asthmatic mice.

Key words: asthma; interleukin 17; dexamethasone

Th17 细胞是近来发现的不同于 Th1 和 Th2 的另一种 CD4⁺T 细胞的新亚型^[1], 其介导炎性反应、自身免疫性疾病、肿瘤和移植排斥等的发生和发展, 与类风湿性关节炎、哮喘^[2]、多发性硬化症等密切相关。Th17 分泌的细胞因子白介素 17(IL17)是哮喘发病相关细胞因子网络的重要成员之一, 通过诱导上皮细胞、内皮细胞等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。维甲酸相关核孤儿受体 γ t (ROR γ t)是调控 Th17 细胞分化的关键转录因子, 诱导初始 T 细胞向 Th17 分化; 在分化成熟的

Th17 细胞内 ROR γ t 特异性高表达^[3]; 糖皮质激素是目前临床应用较广且疗效确切的抗哮喘药物, 其可降低哮喘中 IL17 的表达, 而糖皮质激素是否通过对 ROR γ t 的影响来降低 IL17 表达尚未有报道, 因此, 我们拟通过动物哮喘模型观察地塞米松对转录因子 ROR γ t 在哮喘小鼠模型肺组织中表达的影响, 以期激素治疗哮喘提供进一步的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与主要试剂

清洁级, 雌性 Balb/c 小鼠 30 只, 6~8 周龄, 体重 18~20 g, 由南方医科大学实验动物中心提供及代养。鸡卵清蛋白(OVA, V 级), 为 Sigma 产品, 小鼠白细胞介素 17 (IL-17) 试剂盒为 R&D Systems 产品, Trizol 试剂为 Takara 产品, First Strand cDNA

收稿日期: 2009-02-17

作者简介: 胡斯明 (1980-), 男, 在读博士研究生, E-mail: wing0991@sina.com

通讯作者: 罗雅玲, 女, 教授, 博士生导师, E-mail: luoyaling513@yahoo.com.cn

Synthesis Kit 为东洋纺生物科技有限公司产品, Taq 酶为 Takara 公司产品, 引物均由上海英骏生物技术有限公司合成, DNA 标记(Marker)由北京天根生化科技有限公司提供, 兔抗小鼠 ROR γ t 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司; 电动雾化器为德国勃林格殷格翰公司产品, PCR 热循环仪(Biometra T1 型 PCR 仪器)为 Promega 产品, 酶标仪为 AI 产品。

1.2 方法

1.2.1 动物分组和模型制备 雌性 Balb/c 小鼠 30 只随机分为对照组、哮喘组和地塞米松治疗组, 每组 10 只。哮喘组于第 0 和 14 天腹腔 + 皮下注射 OVA 氢氧化铝混悬液 0.2 ml (含 OVA 10 μ g, AL (OH)₃ 20 mg) 致敏, 第 21 至 27 天连续 7 d, 雾化吸入 5% OVA 激发, 1 次/d, 每次 30 min; 地塞米松治疗组致敏同哮喘组, 于第 21 至 27 天雾化吸入 5% OVA 激发前 30 min 腹腔注射地塞米松 (1 mg/kg); 对照组用生理盐水代替 OVA 致敏和激发。

1.2.2 标本采集和处理 各组小鼠最后一次激发 24 h 后固定, 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 $^{\circ}$ C 静置 30 min, 收集血清, -70 $^{\circ}$ C 保存备用。小鼠仰卧, 打开胸腔, 用 22G 留置针行气管插管, 结扎右侧主支气管, 冷 PBS 灌洗 0.3 ml $\times$ 3 次, 回吸率在 80% 以上。4 $^{\circ}$ C 离心 800 r/min, 5 min, 收集上清液, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。吸取细胞沉渣, 充板计数细胞总数; 涂片, 瑞氏染色, 细胞分类计数。取左侧肺组织 4% 多聚甲醛固定, 酒精脱水, 石蜡包埋, 常规 HE 染色。

1.2.3 ELISA 法检测细胞因子水平 IL-17 检测参照试剂盒说明书进行, 通过标准品吸光度值(A 值)绘制标准曲线, 然后计算各样本的值。

1.2.4 逆转录 - 聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 IL-17 和 ROR γ t mRNA 表达水平 采用 Trizol 试剂提取总 RNA, 逆转录为互补脱氧核糖核酸(cDNA), 以此为模板行 PCR 扩增。目的基因引物序列: IL-17 (PCR 产物为 165 bp) 上游引物: 5'-TTTAACTCCCTTGCC

GCAAAA-3', 下游引物: 5'-CTTTCCTCCGCATTGACAC-3', 退火温度为 55 $^{\circ}$ C。ROR γ t (PCR 产物为 198 bp) 上游引物: 5'-AGTGTAATGTGGCCTACTCC T-3', 下游引物: 5'-GCTGCTGTTGCAGTTGTTTCT-3', 退火温度为 55 $^{\circ}$ C。 β -actin 上游引物: 5'-CGTTGACATCCGTAAAGACC-3', 下游引物: 5'-AACAGTC CGCTAGAAAGCAC-3', 退火温度为 58 $^{\circ}$ C。用 2% 琼脂糖凝胶电泳, 比较 IL-17、ROR γ t 与 β -actin 的相对吸光度值并进行半定量分析。

1.2.5 免疫组织化学检测 ROR γ t 表达水平 常规石蜡切片(厚 5 μ m), 切片脱蜡至水, 吹干, 0.01 mol/L 的 PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 3% H₂O₂ 室温孵育 10 min, 正常山羊血清室温封闭 30 min, 滴加兔抗 ROR γ t 抗体(1:100), 4 $^{\circ}$ C 过夜, 0.01 mol/L 的 PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 滴加生物素化羊抗兔 IgG, 室温孵育 2 h, 0.01 mol/L PBS 清洗 3 次共 5 min, DAB 显色, 常规脱水, 透明, 中性树胶封片。用 PBS 代替一抗做阴性对照, 结果为阴性。光镜下肺组织中出现棕褐色产物为阳性反应, 背景为蓝色。显微镜下随机选取 5 个视野, 计算每个视野阳性细胞平均数。

1.2.6 统计学处理 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS13.0 统计分析软件进行统计分析。采用单因素方差分析和多重比较对各组进行比较分析, 以 $P < 0.05$ 为显著性差异。

2 结果

2.1 肺组织病理切片

肺组织病理切片可见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, 肺间质及肺泡腔内可见嗜酸性粒细胞, 支气管管腔内可见粘液栓, 粘膜皱壁减少, 杯状细胞增生, 肺泡间隔不同程度增宽, 部分断裂, 形成肺气肿(图 1 A); 对照组小鼠肺组织细支气管和肺泡结构清晰, 基本无炎症细胞浸润(图 1 B)。地塞米松治疗组肺组织病理切片较哮喘组相比, 支气管和血管周围炎症明显减轻(图 1 C)。

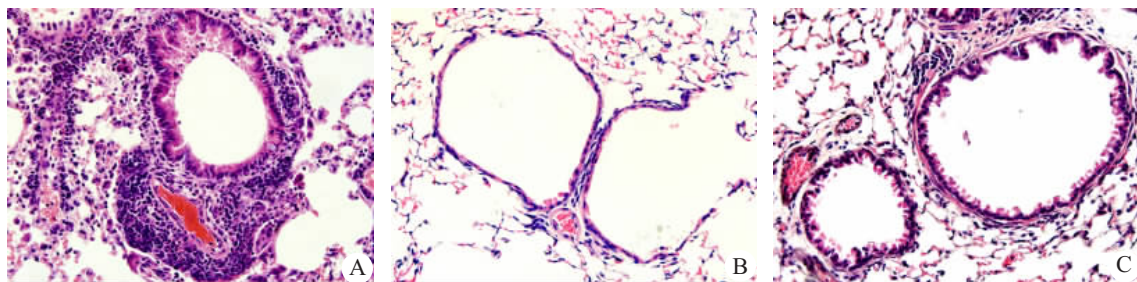


图 1 小鼠肺组织病理切片分析(HE, 原放大倍数: $\times 400$)

A: 哮喘组; B: 对照组; C: 地塞米松治疗组

2.2 支气管肺泡灌洗液(BALF)中细胞计数和分类

哮喘组总细胞、中性粒细胞、嗜酸粒细胞和淋巴细胞计数均较对照组明显增多($P<0.01$,表 1);地塞米松治疗组与哮喘组相比中性粒细胞、嗜酸粒细胞和淋巴细胞计数明显减少,差异有显著性意义($P<0.01$,表 1)。

表 1 各组小鼠 BALF 细胞总数和分类计数($\times 10^4/\text{mL}$, $\bar{x} \pm s$)

	<i>n</i>	细胞总数	嗜酸性粒细胞	中性粒细胞	淋巴细胞
哮喘组	10	23.42±4.14 [△]	10.47±3.78 [△]	1.34±0.21 [△]	9.20±1.29 [△]
地塞米松治疗组	10	12.02±2.38 [△]	3.58±0.91*	0.53±0.18 [△]	6.29±1.25*
对照组	10	7.17±1.25	0.01±0.00	0.16±0.05	4.49±0.81
<i>F</i>		56.24	28.00	68.96	21.71
<i>P</i>		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

*与对照组比较 $P<0.05$; Δ 与对照组比较 $P<0.01$; # 与地塞米松治疗组比较 $P<0.01$

2.3 血清和 BALF 中细胞因子 IL-17 测定

哮喘组 BALF、血清中 IL-17 水平明显升高,与对照组相比差异有显著性意义($P<0.01$,表 2)。地塞米松治疗组与哮喘组相比,BALF、血清中 IL-17 水平下降,差异有显著性意义($P<0.05$,表 2)。

表 2 各组小鼠肺泡灌洗液和血清中 IL-17 水平
(pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

	<i>n</i>	IL-17	
		支气管肺泡灌洗液	血清
哮喘组	10	12.01±2.86 [△] *	20.10±4.88 [△]
地塞米松治疗组	10	8.40±2.32*	10.27±2.55*
正常对照组	10	5.50±0.46	6.28±0.93
<i>F</i>		11.95	29.13
<i>P</i>		<0.01	<0.01

*与对照组比较 $P<0.05$; Δ 与对照组比较 $P<0.01$; ☆与地塞米松治疗组比较 $P<0.05$; # 与地塞米松治疗组比较 $P<0.01$

2.4 肺组织中 IL-17、ROR γ t mRNA 表达水平

IL-17、ROR γ t mRNA 表达水平在哮喘组小鼠肺组织显著高于对照组($P<0.01$,表 3),地塞米松治疗组 IL-17、ROR γ t mRNA 表达水平较哮喘组明显下降($P<0.01$,表 3)。

表 3 各组小鼠肺组织中 IL-17、ROR γ t mRNA 表达量比较(A 值, $n=10$)

	IL-17	ROR γ t
哮喘组	0.31±0.06 [△]	0.65±0.08 [△]
地塞米松治疗组	0.17±0.04*	0.54±0.07*
正常对照组	0.09±0.05	0.28±0.08
<i>F</i>	24.98	29.53
<i>P</i>	<0.01	<0.01

*与对照组比较 $P<0.05$; Δ 与对照组比较 $P<0.01$; # 与地塞米松治疗组比较 $P<0.01$

2.5 肺组织中 ROR γ t 蛋白的表达

各组小鼠肺组织切片免疫组织化学反应后均可见 ROR γ t 阳性反应的细胞,在显微镜下表现为棕黄色颗粒沉着;ROR γ t 主要表达在支气管以及血管周围淋巴细胞等细胞胞核中(图 4),与对照组比较,哮喘组阳性细胞数明显增多,表达增高($P<0.01$);地塞米松治疗组较哮喘组阳性细胞数有所下降,差异有统计学意义($P<0.01$,表 4)。

表 4 各组小鼠肺组织中 ROR γ t 阳性细胞数比较($\bar{x} \pm s$)

	<i>n</i>	ROR γ t 阳性细胞数量(%)
哮喘组	10	0.52±0.05**
地塞米松治疗组	10	0.26±0.07*
对照组	10	0.15±0.03
<i>F</i>		92.46
<i>P</i>		<0.01

*与对照组比较 $P<0.01$; # 与地塞米松治疗组比较 $P<0.01$

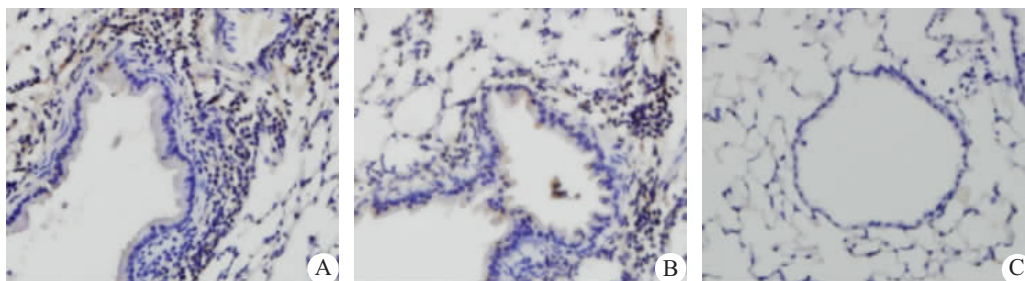


图 4 小鼠肺组织免疫组化染色分析(DAB, $\times 400$)

A: 哮喘组; B: 地塞米松治疗组; C: 正常对照组

3 讨论

研究表明在哮喘患者肺组织、痰、BALF 和血清中 IL-17 mRNA 和蛋白水平均明显增高^[4-5],并且与气道高反应程度呈正相关关系^[6]。IL-17 是 T 细胞诱导的炎症反应的早期启动因素,可诱导上皮细胞、内皮

细胞、成纤维细胞和基质细胞分泌 IL-6、IL-8、G-CSF 以及前列腺素 E2(PGE2),增强 IL-1 及肿瘤坏死因子的功能,诱导核因子- κ B 及 IL-6、IL-8 的产生,增强 ICAM-1 在细胞表面的表达,因此在炎症的发生发展过程中起促进作用^[7]。

ROR γ t 是维甲酸相关核孤儿受体家族成员之一^[8],为 Th17 分化的特异性转录因子^[3],特异性分布于 CD4⁺CD8⁺淋巴细胞^[9],受 STAT3 的调控^[10]。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,并使其它因子直接结合到 IL-17 启动子上,从而诱导初始 CD4⁺T 细胞中 IL-17 基因的转录;IL-6 和 TGF- β 的同时存在可以诱导大量 ROR γ t 的表达及随后的 IL-17 产生。在分化成熟的 Th17 细胞内 ROR γ t 特异性高表达,而且在初始 T 细胞内转入编码 ROR γ t 的逆转录病毒可诱导初始 T 细胞分化为 Th17,分泌 IL-17;相反 ROR γ t 缺失将导致 Th17 的缺乏,表明 ROR γ t 在 Th17 分化发育过程中发挥着重要作用^[3]。

本实验研究为了阐明地塞米松对 Th17 分泌 IL17 的可能作用及糖皮质激素治疗支气管哮喘的相关机制,首先建立了小鼠哮喘模型,根据病理改变证实了卵清蛋白的反复刺激成功诱发小鼠支气管哮喘模型,其主要的变化包括黏液高分泌和细支气管及伴行血管周围有大量炎症细胞浸润的发生,应用地塞米松后以上的病理改变都有明显的改善。在此模型的基础上,我们观察发现哮喘小鼠肺组织中 IL-17 异常高表达,提示正常小鼠在致敏原等刺激下,肺组织中上皮细胞、单核巨噬细胞等分泌大量 TGF- β 、IL-6;在炎症局部 TGF- β 、IL-6 的协同作用下,诱导初始 T 细胞向 Th17 分化,使 TH17 细胞大量增多^[11],分泌大量 IL-17。我们发现通过地塞米松干预后哮喘小鼠 BALF、血清中 IL-17 及肺组织中 IL-17 mRNA 水平较哮喘组明显下降,这与 Chakir J 等人的实验结果一致^[12],表明激素抑制了 IL-17 的产生。为了进一步研究在哮喘发生发展及地塞米松治疗过程中 IL-17 产生的分子机制,我们检测了哮喘小鼠发病时和地塞米松治疗后肺组织 ROR γ t 表达的改变,结果发现哮喘发病时肺组织中 ROR γ t 在 mRNA 和蛋白水平表达均增加,说明 ROR γ t 表达量的改变与哮喘的发生发展相关;地塞米松治疗在改善哮喘症状的同时降低了 ROR γ t 的表达,进而抑制了 Th17 的分化,导致淋巴

细胞分泌 IL-17 减少,这可能是地塞米松有效治疗哮喘的机制之一。

参考文献:

- [1] Harrington LE, Mangan PR, Weaver CT. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage [J]. *Curr Opin Immunol*, 2006, 18(3): 349-56.
- [2] Hashimoto T, Akiyama K, Kobayashi N, et al. 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): 51-4.
- [3] Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor ROR gamma t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells [J]. *Cell*, 2006, 126 (6): 1121-33.
- [4] 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*, 2005, 118(11): 953-6.
- [5] Bullens DM, Truyen E, Coteur L, et al. IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? [J]. *Respir Res*, 2006, 7(1): 135.
- [6] Oboki K, Ohno T, Saito H, et al. Th17 and allergy [J]. *Allergol Int*, 2008, 57(2): 121-34.
- [7] Aggarwal S, Gurney AL. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family [J]. *J Leukoc Biol*, 2002, 71(1): 1-8.
- [8] 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.
- [9] Eberl G, Littman DR. The role of the nuclear hormone receptor RORgamma in the development of lymph nodes and Peyer's patches [J]. *Immunol Rev*, 2003, 195(1): 81-90.
- [10] Laurence A, Tato CM, Davidson TS, et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation [J]. *Immunity*, 2007, 26(3): 371-81.
- [11] Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, et al. Transforming growth factor- β induces development of the TH 17 lineage [J]. *Nature*, 2006, 441(7090): 231-4.
- [12] Chakir J, Shannon J, Molet S, et al. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2003, 111(6): 1293-8.