

## IL-17 在哮喘小鼠模型中表达及其对肥大细胞 IL-6 分泌的影响

陈美元<sup>1,2</sup>, 徐红<sup>1</sup>, 周瑶<sup>1</sup>, 刘峰<sup>1</sup>, 赵德育<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学附属南京儿童医院呼吸科, 江苏 南京 210008; <sup>2</sup>苏州市吴江区第一人民医院儿科, 江苏 苏州 215200)

**[摘要]** 目的:研究白细胞介素(interleukin,IL)-17在哮喘小鼠模型中的表达,观察其对肥大细胞IL-6分泌的影响。方法: BALB/c小鼠随机分为对照组和哮喘组,分别用等量磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)和卵清蛋白(ovalbumin, OVA)干预,检测肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中细胞总数及嗜酸性粒细胞(eosinophils, EOS)数验证模型的成功建立。应用逆转录-聚合酶链反应法、酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测两组小鼠肺组织中IL-17 mRNA、BALF及血清中IL-17的表达差异。细胞实验分为对照组和IL-17组,分别予等量培养基和IL-17干预小鼠肥大细胞株(P815)后收集上清,用ELISA检测IL-6的水平。结果:哮喘组BALF中细胞总数及EOS计数较对照组显著升高( $P < 0.05$ ),模型建立成功。哮喘组肺组织中IL-17 mRNA、BALF及血清中IL-17表达较正常组显著升高( $P < 0.05$ )。细胞水平的研究发现IL-17组P815上清中IL-6表达较正常组显著升高( $P < 0.05$ )。结论:IL-17在OVA诱导哮喘小鼠模型中表达升高。IL-17刺激肥大细胞分泌IL-6,可能在哮喘的发病中起促进作用。

**[关键词]** 白细胞介素-17;哮喘;小鼠;肥大细胞;白细胞介素-6

**[中图分类号]** R562.2\*5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)03-363-04

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20150313

## Expression of IL-17 in asthmatic mice and its effect on release of IL-6 in mast cells

Chen Meiyuan<sup>1,2</sup>, Xu Hong<sup>1</sup>, Zhou Yao<sup>1</sup>, Liu Feng<sup>1</sup>, Zhao Deyu<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Respiratory Medicine, Nanjing Children's Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210008;

<sup>2</sup>Department of Pediatrics, the First People's Hospital of Wujiang District of Suzhou City, Suzhou 215200, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the expression of interleukin(IL)-17 in asthmatic mice and to investigate the effect of IL-17 on release of IL-6 in mast cells. **Methods:** BALB/c mice were randomly divided into control group and asthma group, and treated with equal amount of phosphate buffer solution(PBS) and ovalbumin(OVA), respectively. Mouse asthma model was validated by detecting the total number of cells and eosinophils (EOS) in bronchoalveolar lavage fluid(BALF). The expression differences between IL-17 mRNA in lung tissues and IL-17 in BALF and serum were measured by reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) in the two groups. Mouse P815 mast cells were divided into the control group and the IL-17 group, and treated with equal amount of culture medium and IL-17, respectively. The levels of released IL-6 in supernatants were detected by ELISA. **Results:** In BALF, the total number of cells and EOS in the asthma group were significantly increased than those in the control group( $P < 0.05$ ), and the model was validated. The expressions of IL-17 mRNA in lung tissues and IL-17 in BALF and serum were significantly increased in the asthma group than those in the control group ( $P < 0.05$ ). In P815 cell supernatants, the secretion of IL-6 in the IL-17 group was significantly increased than that in the control group( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The expression of IL-17 was increased in OVA-induced mouse asthma model. IL-17 may promote the process of asthma by stimulating IL-6 release by mast cells.

**[Key words]** IL-17; asthma; mouse; mast cell; IL-6

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(03):363-366]

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年项目(81200012);南京市医学科技发展项目(201108012)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhaodeyu98@126.com

支气管哮喘是呼吸系统常见的慢性炎症性疾病,其在世界大多数国家的发病率不断升高,已成为一个国际性的健康问题<sup>[1]</sup>。哮喘的发病机制相当复杂,目前尚未完全阐明。既往研究显示其与免疫功能紊乱有关<sup>[2]</sup>,特别是 Th1/Th2 细胞平衡失调理论得到了广泛认可<sup>[3]</sup>。

近年来发现了一种新促炎因子白细胞介素(interleukin, IL)-17,它是由一种新型的不同于 Th1 和 Th2 的 CD4<sup>+</sup>效应 T 细胞 Th17 细胞亚群产生,与多种免疫性疾病相关<sup>[4]</sup>。IL-17 能够作用于靶细胞,产生多种细胞活性产物,包括细胞因子、趋化因子、补体以及抗菌肽等重要物质<sup>[5]</sup>。研究发现 Th17 细胞及其细胞因子 IL-17 在中重度哮喘患者外周血中增加<sup>[6]</sup>,但其在哮喘发病中的具体机制仍不清楚。肥大细胞在哮喘的发病机制中起核心作用,既参与急性过敏反应又参与慢性过敏反应<sup>[7]</sup>。然而国内外尚无 IL-17 对肥大细胞作用及其机制研究的报道,因此本研究将观察 IL-17 在哮喘小鼠模型中的表达及其对肥大细胞 IL-6 分泌的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

清洁级雌性 BALB/c 小鼠 20 只购自南京医科大学动物中心,6~8 周龄,体重(18 ± 2)g。卵清蛋白(ovalbumin, OVA)、铝佐剂(Sigma 公司,美国),TRIzol(Life 公司,美国)。逆转录试剂盒(Roche 公司,美国)。IL-17 引物由上海生物工程有限公司设计合成。小鼠肥大细胞株 P815(中国科学院上海生命科学研究院),DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)、磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)、青链霉素和胎牛血清(中国南京维森特生物技术有限公司)。小鼠 IL-17(Peprotech 公司,美国),小鼠 IL-17 酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(上海巧伊公司,中国),小鼠 IL-6 ELISA 试剂盒(R&D 公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物分组与模型制备

随机数字表法将小鼠随机分为正常组和哮喘组。参照文献<sup>[8]</sup>,正常组用等量 PBS 代替 OVA 溶液致敏和激发。哮喘组用 OVA 溶液致敏和激发,在第 0 天及第 14 天予小鼠腹腔注射致敏剂(0.2 ml 的 PBS,含 20 μg OVA+2 mg 氢氧化铝),在第 27~30 天激发,将小鼠置于密闭容器中,予 1% OVA 溶液经空气压缩泵雾化,每天 1 次,每次 30 min,连续激发

4 d。小鼠出现烦躁不安、头面部瘙痒、抓耳挠腮、弓背为阳性反应。

#### 1.2.2 标本采集

血清标本留取:末次激发后 24 h,摘取眼球取血,约 0.7~0.8 ml,室温静置 0.5 h,以 3 000 r/min 离心 15 min 留取血清,放-80℃冰箱保存用于检测 IL-17。

肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)及肺组织标本留取:眼球取血后立即脱颈处死小鼠,打开胸腔,分离颈部气管,注入 1 ml PBS 溶液进行支气管肺泡灌洗,反复 3 次,回收率>80%,收集 BALF,进行细胞总数及嗜酸性粒细胞(eosinophils, EOS)计数和 IL-17 测定。取肺组织,-80℃冰箱保存用于检测 IL-17 mRNA。

#### 1.2.3 逆转录-聚合酶链反应法检测小鼠肺组织中 IL-17 mRNA 表达

取肺组织匀浆,用 TRIzol 试剂按试剂盒说明进行肺组织总 RNA 的提取,总 RNA 逆转录成 cDNA,将反应体系(2×SYBRGreen 12.5 μl,10 μmol/L 的 PCR 特异上下游引物各 0.75 μl,cDNA 1 μl,DEPC 水 10 μl,总体积 25 μl)加到 7500 型 PCR 仪反应孔中进行 PCR 扩增,反应条件:95℃ 5min;95℃ 20 s,55℃ 20 s,75℃ 30 s,循环 40 次。采用相对定量法计算 IL-17 mRNA 表达水平。用管家基因校正样品初始量。引物序列:IL-17 上游 5'-TCTCATCCAGCAAGAGATCC-3',下游 5'-AGTTTGGGACCCCTTACAC-3';GAPDH 上游 5'-GGGTGATGCTGGTGCTGAGTATGT-3',下游 5'-AAGAATGGGAGTTGCTGTTGAAGTC-3'。

#### 1.2.4 肥大细胞的培养与干预

P815 在含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素的 DMEM 培养基中,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。调整细胞密度至 1×10<sup>6</sup> 个/ml,接种于 6 孔板中,分为对照组及 IL-17 组,第 2 天用无血清培养基饥饿 6 h 后,分别予等量培养基和 100 ng/ml IL-17(浓度参考文献<sup>[9]</sup>)干预 P815,于 16 h 后收集上清,1 500 r/min 离心 10 min,放-20℃冰箱保存备用。

#### 1.2.5 ELISA 法检测 IL-17 及 IL-6

用小鼠 IL-17 ELISA 试剂盒检测 2 组小鼠血清及 BALF 中 IL-17,小鼠 IL-6 ELISA 试剂盒检测 P815 培养的上清液,操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

### 1.3 统计学方法

所得数据均采用 SPSS20.0 软件进行统计学处理。计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间

比较先行方差齐性检验,方差齐用  $t$  检验,方差不齐用  $t'$  检验。 $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组小鼠 BALF 中细胞总数及 EOS 计数

BALF 中细胞总数及 EOS 计数增高,为哮喘的典型病理特征<sup>[10]</sup>。本实验中对正常组和哮喘组小鼠的 BALF 进行细胞计数,结果发现哮喘组 BALF 中细胞总数及 EOS 计数较对照组显著升高( $P < 0.05$ ,图 1),表明小鼠哮喘模型建立成功。

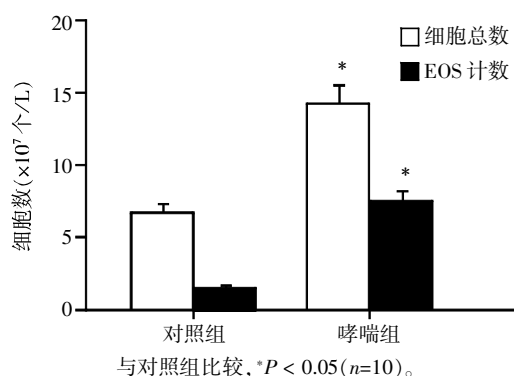


图 1 BALF 中细胞总数及 EOS 计数

Figure 1 the total number of cells and EOS in BALF

### 2.2 两组小鼠肺组织中 IL-17 mRNA 的表达差异

哮喘组肺组织中 IL-17 mRNA 表达较正常组显著升高( $P < 0.05$ ,图 2A)。

### 2.3 两组小鼠 BALF 和血清中 IL-17 的表达差异

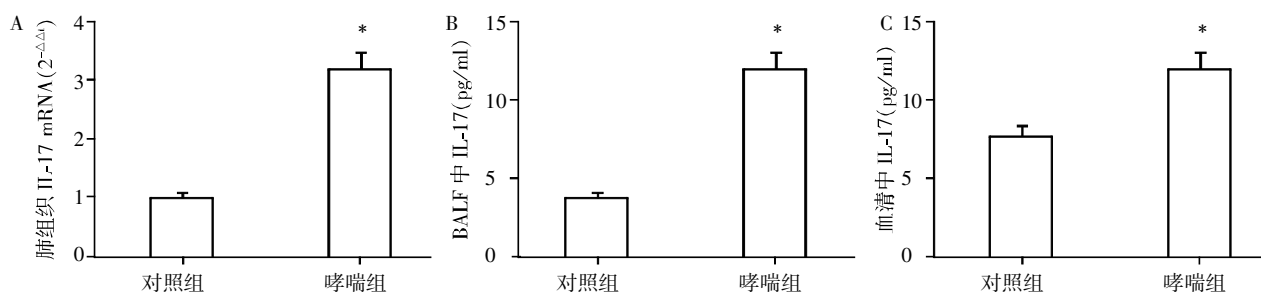
哮喘组 BALF 中 IL-17 表达较正常组显著升高( $P < 0.05$ ,图 2B)。哮喘组血清中 IL-17 表达较正常组显著升高( $P < 0.05$ ,图 2C)。

### 2.4 IL-17 对肥大细胞 IL-6 分泌的影响

细胞水平的研究发现 IL-17 组 P815 上清中 IL-6 表达较正常组显著升高( $P < 0.05$ ,图 3)。

## 3 讨论

支气管哮喘是一种免疫紊乱的变态反应性疾病,主要表现为慢性气道炎症、气道高反应性和气道重塑。IL-17 是一种主要由 Th17 细胞分泌的前炎症细胞因子。研究表明 IL-17 参与了机体多种炎症性疾病的发生、发展,特别是与类风湿性关节炎、哮喘、慢性阻塞性肺病等关系密切<sup>[11]</sup>。IL-17 可刺激内皮细胞、成纤维细胞、上皮细胞、巨噬细胞释放趋化因子、集落刺激因子、IL-1、IL-6、肿瘤坏死因子- $\alpha$  等促进炎症细胞的聚集及造成炎症损伤<sup>[12]</sup>。Cheung 等<sup>[13]</sup>研究发现 IL-17 可以介导嗜酸粒细胞,引起大量细胞因



A: 2 组小鼠肺组织中 IL-17 mRNA 表达; B: 2 组小鼠 BALF 中 IL-17 表达; C: 2 组小鼠血清中 IL-17 表达。与对照组比较, \* $P < 0.05$  ( $n=10$ )。

图 2 IL-17 在 2 组小鼠中的表达

Figure 2 The expression of IL-17 in mice of two groups

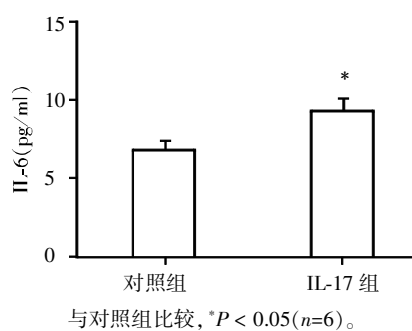


图 3 P815 上清中 IL-6 表达

Figure 3 The expression of IL-6 in P815 cell supernatants

子和化学介质释放,进而增强气道炎症。Shin 等<sup>[14]</sup>研究发现 IL-17 还可以促进中性粒细胞及嗜酸性粒细胞在气道聚集,从而参与哮喘气道炎症的发生。近年来 IL-17 与哮喘关系的研究越来越受关注。Th17 细胞及其分泌的 IL-17 作为前炎症细胞因子,对机体经典的 Th1/Th2 途径作了完善和补充。本实验研究结果发现哮喘小鼠模型肺组织中 IL-17mRNA、BALF 及血清中 IL-17 表达较正常组显著升高,提示 IL-17 参与了哮喘的发病过程。

过敏体质个体接触变应原,刺激机体产生特异性 IgE 与肥大细胞表面的 IgE 受体结合致敏,当过

敏原再次进入机体与特异性 IgE 结合,肥大细胞激活脱颗粒、释放炎性介质,引起支气管平滑肌痉挛、血管渗透性增加导致气管阻塞,由此哮喘症状出现。肥大细胞激活后释放 IL-6,在哮喘的发病中起重要作用。研究表明,IL-6 在哮喘的发病机制中起重要作用<sup>[15]</sup>,哮喘患儿血清 IL-6 水平的升高与哮喘急性发作和病情严重程度相关<sup>[16]</sup>。本研究发现 IL-17 可刺激 P815 细胞 IL-6 分泌增高,可能在哮喘的发病中起促进作用。然而 IL-17 促炎的分子机制仍不清楚,有望进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] Boulet LP, Fitzgerald JM, Levy ML, et al. A guide to the translation of the Global Initiative for Asthma (GINA) strategy into improved care[J]. *Eur Respir J*, 2012, 39(5): 1220-1229
- [2] Holt PG, Strickland DH. Interactions between innate and adaptive immunity in asthma pathogenesis; new perspectives from studies on acute exacerbations[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 125(5): 963-974
- [3] Kumar RK, Yang M, Herbert C, et al. Interferon-gamma, pulmonary macrophages and airway responsiveness in asthma[J]. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2012, 11(4): 292-297
- [4] Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> 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
- [5] Onishi RM, Gaffen SL. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease[J]. *Immunology*, 2010, 129(3): 311-321
- [6] Zhao Y, Yang J, Gao YD, et al. Th17 immunity in patients with allergic asthma [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2010, 151(4): 297-307
- [7] Bradding P. The role of the mast cell in asthma; a re-assessment[J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2003, 3(1): 45-50
- [8] Qin HB, Xu B, Mei JJ, et al. Inhibition of miRNA-221 suppresses the airway inflammation in asthma[J]. *Inflammation*, 2012, 35(4): 1595-1599
- [9] Xu G, Zhang L, Wang DY, et al. Opposing roles of IL-17A and IL-25 in the regulation of TSLP production in human nasal epithelial cells[J]. *Allergy*, 2010, 65(5): 581-589
- [10] 许长娣, 梅娟娟, 李丹, 等. microRNA 在卵清蛋白诱导的支气管哮喘小鼠模型中的表达[J]. *实用儿科临床杂志*, 2012, 27(21): 1655-1657
- [11] Aggarwal S, Gurney AL. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family[J]. *J Leukoc Biol*, 2002, 71(1): 1-8
- [12] Romagnani S, Maggi E, Liotta F, et al. Properties and origin of human Th17 cells[J]. *Mol Immunol*, 2009, 47(1): 3-7
- [13] Cheung PF, Wong CK, Lam CW. Molecular mechanisms of cytokine and chemokine release from eosinophils activated by IL-17A, IL-17F, and IL-23: implication for Th17 lymphocytes-mediated allergic inflammation [J]. *J Immunol*, 2008, 180(8): 5625-5635
- [14] Shin TS, Lee BJ, Tae YM, et al. Role of inducible nitric oxide synthase on the development of virus-associated asthma exacerbation which is dependent on Th1 and Th17 cell responses [J]. *Exp Mol Med*, 2010, 42(10): 721-730
- [15] Rincon M, Irvin CG. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases[J]. *Int J Biol Sci*, 2012, 8(9): 1281-1290
- [16] Tang XQ, Sun WP, Xu HB, et al. The changes in the levels of IL-6, IL-17, and IL-21 in the acute stage of childhood asthma[J]. *Clin Lab*, 2013, 59(11-12): 1381-1387

[收稿日期] 2014-09-01