

哮喘小鼠模型中 IL-25 表达及其对肥大细胞 IL-6 分泌的影响

徐红¹, 陈美元^{1,2}, 周瑶¹, 刘峰¹, 赵德育^{1*}

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

[摘要] 目的:探讨哮喘小鼠模型中白细胞介素(interleukin, IL)-25 的表达,研究其对肥大细胞 IL-6 分泌的影响。方法:6~8 周龄 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)或卵清蛋白(ovalbumin, OVA)致敏,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)计数验证模型的成功建立。两组小鼠肺组织中 IL-25 mRNA、BALF 及血清中 IL-25 的表达分别应用逆转录-聚合酶链反应法、酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测。小鼠肥大细胞 P815 分为对照组和 IL-25 组,分别予等量培养基和 IL-25 干预,收集细胞培养上清,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($P < 0.01$),小鼠出现呼吸频率加快、烦躁不安等表现,模型建立成功。哮喘组肺组织中 IL-25 mRNA、BALF 及血清中 IL-25 表达较正常组显著升高($P < 0.01$)。细胞水平的研究发现 IL-25 组 P815 上清中 IL-6 表达较对照组显著升高($P < 0.01$)。结论:IL-25 在 OVA 诱导哮喘小鼠模型中表达升高。IL-25 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-25;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)06-804-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20150609

Expression of IL-25 in asthmatic mice and its influence on release of IL-6 in mast cells

Xu Hong¹, Chen Meiyuan^{1,2}, Zhou Yao¹, Liu Feng¹, Zhao Deyu^{1*}

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

²Department 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)-25 in asthmatic mice and to investigate the potential influence of IL-25 on release of IL-6 in mast cells. **Methods:** BALB/c mice aged 6-8 weeks were randomly divided into the control group and the asthma group, and treated with equal amount of phosphate buffer solution(PBS) or ovalbumin(OVA), respectively. Mouse asthma model was validated by detecting the total number of cells and eosinophil cells(EOS) in bronchoalveolar lavage fluid(BALF). The expressions of IL-25 mRNA in lung tissues and IL-25 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 cells were divided into the control group and the IL-25 group, and treated with equal amount of culture medium or IL-25, respectively. The levels of released IL-6 in supernatants were detect 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 ($P < 0.01$). The mice were irritable and their breathing rate were accelerated, and the model was validated. The expressions of IL-25 mRNA in lung tissues and IL-25 in BALF and serum were significantly higher in the asthma group than those in the control group($P < 0.01$). In P815 cell supernatants, the secretion of IL-6 in the IL-25 group were significantly higher than those in the control group($P < 0.01$). **Conclusion:** The expression of IL-25 was increased in OVA-induced mouse asthma model. IL-25 may promote the process of asthma by stimulating IL-6 release from mast cells.

[Key words] IL-25; asthma; mouse; mast cell; IL-6

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(06):804-807]

[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

白细胞介素(interleukin, IL)-25 是 2001 年 Fort 等^[1]首先报道由 Th2 细胞衍生的细胞因子,是 IL-17 细胞因子家族成员之一,又称为 IL-17E,目前已发现 IL-17 家族成员主要有 6 个,分别是 IL-17A~F。其后的研究亦发现肥大细胞、嗜酸性粒细胞、肺泡巨噬细胞、内皮和上皮细胞均可产生 IL-25^[2-3]。IL-25 与 IL-17 家族中其他成员不同,其在促进 Th2 型免疫反应中起主要作用^[4]。IL-25 可诱导 Th2 型细胞因子 IL-4、IL-5、IL-13 产生促进 Th2 型免疫反应,促进 IgE 及嗜酸性粒细胞(eosinophils, EOS)增多,从而引起机体过敏性疾病^[3]。现有研究表明高水平的 IL-25 与气道炎症反应性疾病如哮喘息息相关^[5]。

支气管哮喘是全球范围内最常见的慢性呼吸道疾病,它是由多种细胞如 EOS、肥大细胞、T 细胞、中性粒细胞、气道上皮细胞等参与的气道慢性炎症性疾病。目前哮喘病因及发病机制尚不十分清楚。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。因此本研究将探讨哮喘小鼠模型中 IL-25 的表达水平及其对肥大细胞分泌功能的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

清洁级雌性 BALB/c 小鼠 20 只(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-25 引物由上海生工生物工程有限公司设计合成。小鼠 IL-25 酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(中国武汉优尔生科技股份有限公司)。小鼠肥大细胞株(P815)(中国科学院上海生命科学研究院)。DMEM 培养基、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-25(Peprotech 公司,美国),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

应用随机数字表法将小鼠随机分为对照组和哮喘组。参照文献致敏小鼠^[6],哮喘组:第 0 天及第 14 天子小鼠腹腔注射致敏剂(0.2 mL PBS 含 20 μg OVA 和 2 mg 氢氧化铝),第 27~30 天激发 4 d,将小鼠置于密闭容器中,予 1% OVA 溶液经空气压缩泵每天雾化 30 min;对照组:用等量 PBS 溶液代替 OVA 溶液致敏和激发。小鼠出现呼吸频率加快、烦躁不

安、喜聚成团、弓背抓脸、活动迟缓、反应迟钝、安静少动为阳性反应。

1.2.2 标本采集

血清标本:末次激发 24 h 后,摘取眼球取血,约 0.7~0.8 mL,室温静置 30 min,3 000 r/min 离心 15 min 留取血清,放 -80℃ 冰箱保存备用。肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)及肺组织标本: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 EOS 计数和 IL-25 测定。取肺组织, -80℃ 冰箱保存用于检测 IL-25 mRNA。

1.2.3 逆转录-聚合酶链反应法检测小鼠肺组织中 IL-25 mRNA 表达

取肺组织匀浆,肺组织总 RNA 用 TRIzol 试剂提取,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 1.00 μL, DEPC 水 10.0 μL, 总体积 25.00 μL) 加到 7500 型 PCR 仪反应孔中进行 PCR 扩增,反应条件:95℃ 5 min; 95℃ 20 s, 55℃ 20 s, 75℃ 30 s, 循环 40 次。IL-25 mRNA 表达水平采用相对定量法计算,用管家基因校正样品初始量。引物序列:IL-25 上游 5'-TGGACAGGGACTTGAATCGG-3', 下游 5'-CAGGAGTATGGCTTCCAGGGT-3'; GAPDH 上游 5'-GGGTGATGCTGGTGCTGAGTATGT-3', 下游 5'-AAGAATGGGAGTTGCTGTTGAAGZTC-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%CO₂ 的培养箱中培养。调整细胞密度至 1×10⁶ 个/mL,接种于 6 孔板中,分为对照组及 IL-25 组,第 2 天用无血清培养基饥饿 6 h 后,分别予等量培养基或 10 ng/mL IL-25(浓度参考文献 [7]) 干预 P815,16 h 后收集上清,1 500 r/min 离心 10 min,放 -20℃ 冰箱保存用于检测 IL-6。

1.2.5 ELISA 法检测 IL-25 及 IL-6

按照试剂盒说明,用小鼠 IL-25 ELISA 试剂盒检测 2 组小鼠血清及 BALF 中 IL-25,小鼠 IL-6 ELISA 试剂盒检测 P815 培养的上清液。

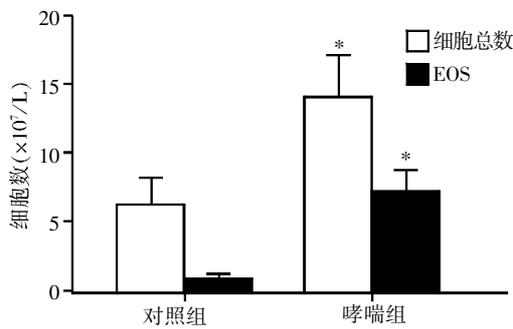
1.3 统计学方法

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* ≤ 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

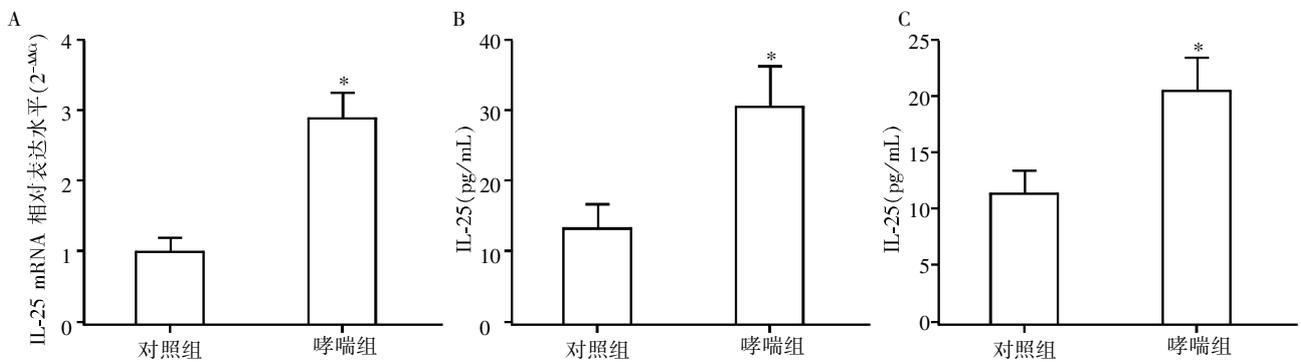
2.1 两组小鼠 BALF 中细胞总数及 EOS 计数

EOS 浸润是哮喘急、慢性炎症变化的特征性标志。本研究对对照组和哮喘组小鼠的 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 ($t = -6.858, P < 0.01; t = -12.939, P < 0.01$),加之小鼠出现呼吸频率加快、烦躁不安、喜聚成团、弓背抓脸、活动迟缓、反应迟钝、安静少动表现,哮喘模型建立成功(图 1)。



与对照组比较, * $P < 0.01 (n=10)$ 。
图 1 BALF 中细胞总数及 EOS 计数

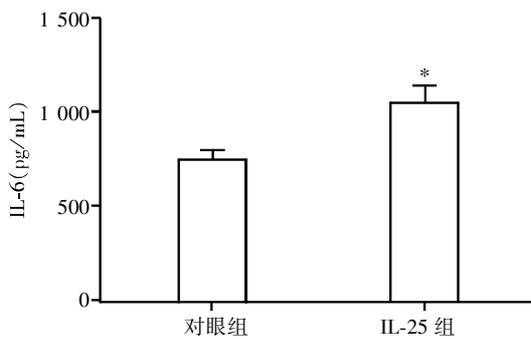
Figure 1 The total number of cells and EOS in BALF



A: 肺组织中 IL-25 mRNA 表达; B: BALF 中 IL-25 表达; C: 血清中 IL-25 表达。与对照组比较, * $P < 0.01 (n=10)$ 。

图 2 IL-25 在 2 组小鼠中的表达

Figure 2 The expression of IL-25 in mice of two groups



与对照组比较, * $P < 0.01 (n=6)$ 。

图 3 P815 上清中 IL-6 表达

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

2.2 两组小鼠肺组织中 IL-25 mRNA 的表达差异

哮喘组肺组织中 IL-25 mRNA 表达较对照组显著升高 ($t = -13.318, P < 0.01$, 图 2A),哮喘组 BALF 中 IL-25 表达较对照组显著升高 ($t = -8.043, P < 0.01$, 图 2B),哮喘组血清中 IL-25 表达较对照组显著升高 ($t = -7.725, P < 0.01$, 图 2C)。

2.3 IL-25 对肥大细胞 IL-6 分泌的影响

细胞水平的研究发现 IL-25 组 P815 上清中 IL-6 表达较对照组显著升高 ($t = -6.668, P < 0.01$, 图 3)。

3 讨论

哮喘是一种以气道高反应性和气道慢性炎症为特征的变态反应性疾病,其发病机制相当复杂,目前尚未完全阐明。既往研究认为其与免疫功能紊乱有关^[8],特别是 Th1/Th2 细胞平衡失调理论得到了广泛认可^[9]。IL-25 是一种具有广泛活性的前炎性细胞因子,可诱导 Th2 类细胞因子的产生,促进 EOS 向气道募集、黏液过度分泌、上皮细胞增生肥大,导致血清中 IgE 水平增加,引起气道高反应性,因此其在支气管哮喘发生发展的多个环节中起重要作用,是哮喘发病过程中的重要因素^[10]。Seys 等^[11]研究发现血清中高水平的 IL-25 与难以控制的哮喘及恶

化的肺功能相关。在哮喘小鼠模型中,应用抗 IL-25 单克隆抗体可以减少 IL-5、IL-13 的产生,减轻 EOS 浸润、杯状细胞增生、IgE 分泌和气道高反应性,提示 IL-25 可作为哮喘中一个新的治疗靶点^[12]。本研究结果发现哮喘小鼠模型肺组织中 IL-25 mRNA、BALF 及血清中 IL-25 表达较对照组显著升高,提示 IL-25 参与了哮喘的发病过程。

肥大细胞在炎症因子和炎症介质的刺激下通过 IgE 介导,释放已预先合成和新产生的介质如组胺、白三烯、蛋白酶以及一系列细胞因子包括 IL-6、

IL-4、TNF- α 等执行其生物学功能^[13]。IL-6 在哮喘发生发展中起重要作用,其可直接活化肥大细胞和增加 IgE 的合成^[14],亦可引起气道高反应性,腺体分泌增加,募集效应细胞,参与气道损伤和重构,支气管哮喘患者的 BALF 中 IL-6 含量明显升高^[15]。本研究发现 IL-25 可刺激 P815 细胞 IL-6 分泌增高。

综上所述,IL-25 在 OVA 诱导哮喘小鼠模型中表达升高。IL-25 刺激肥大细胞分泌 IL-6,可能在哮喘的发病中起促进作用。然而 IL-25 在哮喘中促炎的分子机制仍不清楚,有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Fort MM, Cheung J, Yen D, et al. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies *in vivo* [J]. *Immunity*, 2001, 15(6): 985-995
- [2] Reynolds JM, Angkasekwinai P, Dong C. IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2010, 21 (6): 413-423
- [3] Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, et al. Functional specialization of interleukin-17 family members [J]. *Immunity*, 2011, 34(2): 149-162
- [4] Yang Z, Grinchuk V, Urban JJ, et al. Macrophages as IL-25/IL-33-responsive cells play an important role in the induction of type 2 immunity [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e59441
- [5] Kim JY, Jeong MS, Park KY, et al. Aggravation of atopic dermatitis-like symptoms by consecutive low concentration of formaldehyde exposure in NC/Nga mice [J]. *Exp Dermatol*, 2013, 22(3): 219-221
- [6] 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
- [7] Corrigan CJ, Wang W, Meng Q, et al. T-helper cell type 2 (Th2) memory T cell-potentiating cytokine IL-25 has the potential to promote angiogenesis in asthma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(4): 1579-1584
- [8] 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): 963-972, 973-974
- [9] 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
- [10] Stock P, Lombardi V, Kohlraut V, et al. Induction of airway hyperreactivity by IL-25 is dependent on a subset of invariant NKT cells expressing IL-17RB [J]. *J Immunol*, 2009, 182(8): 5116-5122
- [11] Seys SF, Grabowski M, Adriaensen W, et al. Sputum cytokine mapping reveals an 'IL-5, IL-17A, IL-25-high' pattern associated with poorly controlled asthma [J]. *Clin Exp Allergy*, 2013, 43(9): 1009-1017
- [12] Ballantyne SJ, Barlow JL, Jolin HE, et al. Blocking IL-25 prevents airway hyperresponsiveness in allergic asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2007, 120(6): 1324-1331
- [13] Bradding P, Walls AF, Holgate ST. The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, 117(6): 1277-1284
- [14] Doganci A, Sauer K, Karwot R, et al. Pathological role of IL-6 in the experimental allergic bronchial asthma in mice [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2005, 28(3): 257-270
- [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

[收稿日期] 2015-01-28