

B 细胞转录激活因子对急性哮喘小鼠气道炎症的调控^{*}

原淑莉[#], 钟 萍, 范贤明[△], 黄成亮, 王文军, 湛晓勤, 何小鹏

四川医科大学附属第一医院 呼吸内二科 (泸州 646000)

【摘要】 目的 探讨 B 细胞转录激活因子(BATF)对急性哮喘小鼠气道炎症的调控及其与维甲酸孤儿核受体 γ t(ROR γ t)的关系。**方法** 将 24 只健康雌性 BALB/c 小鼠,随机分为生理盐水组(NS 组)、哮喘模型组(AS 组)、地塞米松治疗组(DEX 组),每组 8 只。卵清蛋白(OVA)致敏和激发建立哮喘小鼠模型。HE 染色观察小鼠小支气管及肺组织病理改变;支气管肺泡灌洗液(BALF)进行细胞计数和分类;酶联免疫吸附法(ELISA)检测 BALF 中白细胞介素-17(IL-17)蛋白的浓度;实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测肺组织中 *IL-17*、*BATF*、*ROR γ t* mRNA 的表达情况。**结果** HE 染色示 AS 组小支气管炎症细胞浸润较 NS 组多,以嗜酸性粒细胞(EOS)、中性粒细胞(PMN)及淋巴细胞为主,DEX 组小支气管炎症细胞浸润情况较 AS 组轻。AS 组、DEX 组 BALF 中白细胞(WBC)总数、EOS 及 PMN 均较 NS 组多($P<0.05$),DEX 组上述细胞数较 AS 组少($P<0.05$)。BALF 中 IL-17 蛋白浓度及肺组织 *IL-17*、*BATF*、*ROR γ t* mRNA 表达水平均为 AS 组>DEX 组>NS 组($P<0.05$)。小鼠肺组织 *BATF* 与 *IL-17*、*ROR γ t* mRNA 表达及 BALF 中 WBC、EOS、PMN 计数呈正相关(P 均 <0.05)。**结论** 在急性哮喘小鼠支气管肺组织中存在 *BATF*、*ROR γ t*、*IL-17* 表达的上调;*BATF* 可能通过与 *ROR γ t* 的协同作用调控 Th17 细胞的分化发育及分泌功能发挥对小鼠气道炎症的调控作用。

【关键词】 支气管哮喘 白细胞介素-17 B 细胞转录激活因子 气道炎症

B Cell Activating Transcription Factor Regulates Acute Airway Inflammation in Asthmatic Mice YUAN Shu-li, ZHONG Ping, FAN Xian-ming[△], HUANG Cheng-liang, WANG Wen-jun, ZHAN Xiao-qin, HE Xiao-peng. Department of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Sichuan Medical University, Luzhou 646000, China

[△] Corresponding author, E-mail: fxm129@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the regulatory effect of B cell activating transcription factor (BATF) on acute airway inflammation and its association with retinoic acid orphan nuclear receptors γ t (ROR γ t) in asthmatic mice. **Methods** 24 female BALB/c mice were randomly and equally divided into three groups ($n=8$): normal saline (NS) treated, asthma (AS) control and dexamethasone (DEX) treated. AS mice were sensitized and challenged with OVA to establish murine asthma model. Histological changes in lung tissues of the mice were observed by HE staining. Numbers of white blood cell (WBC), polymorphonuclear leukocyte (PMN) and eosinophils (EOS) in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of the mice were counted. The concentration of interleukin-17 (IL-17) in BALF was measured by ELISA. Quantitative real-time PCR (RT-PCR) was performed to assess the mRNA expressions of *BATF*, *IL-17* and *ROR γ t* in the lung tissues. **Results** The HE staining showed a higher level of inflammatory cell infiltration around the bronchi of AS mice compared with those treated with NS, predominantly in the forms of EOS, PMN and lymphocytes. The AS and DEX treated mice had higher levels of EOS, PMN, WBC and mRNA expressions of *BATF*, *IL-17* and *ROR γ t* in BALF than those treated with NS ($P<0.05$). DEX reduced the levels of EOS, PMN, WBC and IL-17 in BALF significantly ($P<0.05$). The mRNA expression of *BATF* in lung tissues of mice was positively correlated with the expression of *IL-17*, *ROR γ t* and the counts of WBC, EOS and PMN in BALF ($P<0.05$). **Conclusion** Asthmatic mice have increased expressions of *BATF*, *IL-17* and *ROR γ t* in bronchial and lung tissues. BATF can, through regulating the secretion of Th17 cells, readjust the airway inflammatory. The regulatory function may take effect through synergy with ROR γ t.

【Key words】 Asthma IL-17 BATF The airway inflammation

^{*} 四川省卫生厅资助项目(No. 120328)、四川省学术和技术带头人培养资金(川财社[2013]176号)资助

[#] 现在陕西省咸阳市中心医院呼吸与危重医学科

[△] 通讯作者, E-mail: fxm129@163.com

支气管哮喘(简称哮喘)是由多种细胞和细胞组分参与的以气道炎症、气道高反应性、黏液高分泌和气道重塑为特征的变态反应性疾病;其中,气道慢性炎症被认为是哮喘的本质^[1]。但是目前其发病机制

并未完全明确。研究发现,中性粒细胞(PMN)和辅助 T 淋巴细胞 17(Th17)及其所产生的细胞因子白细胞介素-17(IL-17)与哮喘的发生、发展密切相关;在哮喘患者的支气管肺泡灌洗液(BALF)、痰液、血清中均显示 Th17 细胞及 IL-17 水平明显升高^[2]。维甲酸孤儿核受体(ROR γ t)是控制 Th17 细胞分化发育的特异性转录因子,在 Th17 细胞高表达,可诱导编码 IL-17 基因的表达;阻断 ROR γ t 的表达,细胞不能被诱导向 Th17 分化^[3,4]。Schraml 等^[5]进行的体外培养实验发现,体外培养的 B 细胞转录激活因子(BATF)^{-/-}的 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞 IL-17 产量显著减少,引入 BATF 后 IL-17 的产量明显上升,并且 BATF^{-/-}小鼠对试验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)完全抵抗。众所周知,Th17 对 EAE 的产生有着重要的致病性作用,提示 BATF 的缺乏将导致 Th17 的增殖分化障碍。Th17、哮喘、BATF 之间的这种千丝万缕的联系,让我们大胆推论,BATF 亦在哮喘的发病过程中起重要作用。本研究通过观察正常小鼠、治疗前后的哮喘小鼠肺组织病理特征和 BATF、IL-17、ROR γ t mRNA 的表达,对 BALF 中细胞进行计数,分析小鼠肺组织 BATF 表达与炎性细胞计数、IL-17 和 ROR γ t 表达的相关性,旨在探讨 BATF 对急性哮喘小鼠气道炎症的影响及其与哮喘发病关键转录因子 ROR γ t 的关系,为临床通过转录因子途径治疗哮喘提供新的依据。

1 材料和方法

1.1 材料

实验动物为 SPF 级健康雌性 BALB/c 小鼠(重庆腾鑫比尔实验动物销售有限公司),6~8 周龄,体质量 15~18 g。卵清蛋白(OVA)(Sigma),地塞米松磷酸钠注射液(湖北顶辉化工有限公司);其余化学试剂均采用进口或国产分析纯级。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物分组及哮喘动物模型的制备 将 24 只雌性 BALB/c 小鼠随机分为生理盐水对照组(NS 组)、哮喘模型组(AS 组)、地塞米松治疗组(DEX 组),每组 8 只。AS 组、DEX 组分别于第 0、7、14 d 用 OVA 抗原液(100 μ g OVA 和 1 mg 氢氧化铝混合的生理盐水混悬液) 200 μ L 腹腔内注射致敏,第 21 d 开始以 2% OVA 超声雾化吸入 30~40 min 进行激发,每天 1 次,连续 5 d;NS 组以生理盐水代替 OVA。DEX 组于每次激发前 30 min,予以地塞米松 1.0 mg/kg 腹腔注射,AS、NS 组以等

量生理盐水同种方式注射。在造模和用药过程中观察小鼠的饮食、精神、行为等情况。

1.2.2 BALF 的细胞分类计数 各组小鼠末次激发结束 24 h 后予戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉,行气管插管,双肺注入生理盐水 0.5 mL,反复抽吸,重复 3 次,灌洗液回收率均>80%,将 BALF 置于 1.5 mL EP 管中,离心(4 $^{\circ}$ C,1 200 r/min,10 min)收集上清转移到新的 EP 管中,-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存待检;用生理盐水重悬细胞,取细胞悬液行白细胞(WBC)、嗜酸性粒细胞(EOS)、中性粒细胞(PMN)计数。

1.2.3 HE 染色和取材 行支气管肺泡灌洗后,处死小鼠。取右肺组织置于 4%(体积分数)多聚甲醛液中固定,石蜡包埋切片,HE 染色,观察肺组织的病理学变化;取左肺组织,并置于-70 $^{\circ}$ C 冰箱保存,用于 mRNA 表达的检测。

1.2.4 酶联免疫吸附法(ELISA)测定 BALF 中 IL-17 的浓度 取肺灌洗液,利用小鼠 IL-17 检测试剂盒测定 BALF 中 IL-17 的水平,严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.5 小鼠肺组织 IL-17、BATF、ROR γ t mRNA 表达水平检测 使用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)法检测肺组织 IL-17、BATF、ROR γ t mRNA 表达。处死小鼠后,首先 Trizol 法提取备用的左肺新鲜组织总 RNA,紫外分光光度计定量分析 RNA 纯度和浓度,之后使用逆转录试剂盒(美国 BIO-RAD)根据说明书要求,合成 cDNA。用 TaKaRa 两步法 RT-PCR 试剂盒,以 20 μ L 反应体系加样,按照以下步骤进行循环:95 $^{\circ}$ C 30 s 1 循环,95 $^{\circ}$ C 5 s,58 $^{\circ}$ C 34 s 共 40 循环,95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 60 s,95 $^{\circ}$ C 15 s 共 1 循环。引物由上海生工生物工程有限公司合成,引物序列为(5'-3')BATF 上游引物:GAGGAGAGAGAAGAATCGCATC,下游引物:CTGTTTCTCCAGGTCCTCACTC;IL-17 上游引物:TATCCCTCTGTGATCTGGGAAG,下游引物:ATCTTCTCGACCCTGAAAGTGA;ROR γ t 上游引物:AGTGTAATGTGGCCTACTCCT,下游引物:GCTGCTGTTGCAGTTGTTTCT。实验结果采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法分析。

1.3 统计学方法

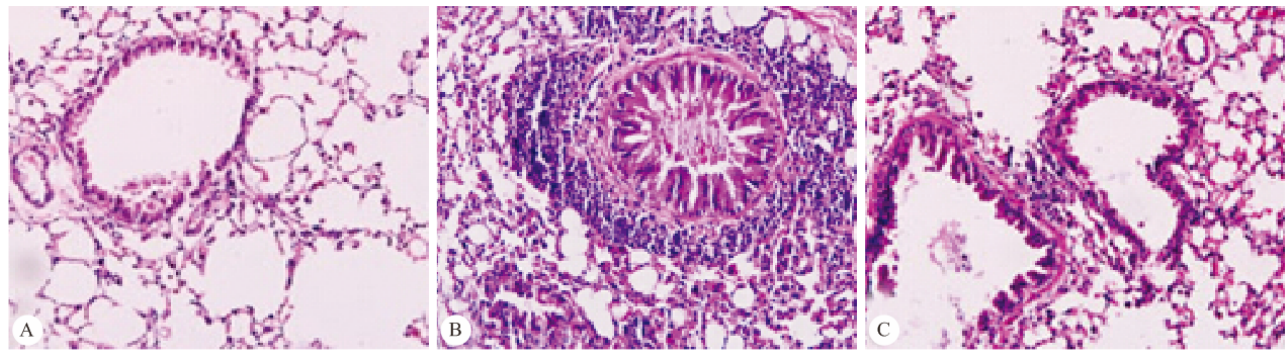
数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,组间进一步两两比较采用 *t* 检验,两变量间的相关关系用直线相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠行为学表现

AS 组小鼠激发后出现烦躁不安、抓耳挠腮打喷嚏、腹肌痉挛、呼吸急促、喘鸣、口鼻尾巴爪子轻度发绀、行动迟缓或匍匐不动等表现。与 AS 组比较，经过治疗后(DEX 组)上述表现明显减轻，NS 组仅表现为轻度惊慌。

2.2 小鼠肺组织形态学改变



附图 各组小鼠支气管肺组织病理学变化。HE ×200

Fig Pathological changes in bronchial lung tissues in the mice. HE ×200

A: NS group; B: AS group; C: DEX group

2.3 小鼠 BALF 的细胞分类计数

与 NS 组比较，AS 组、DEX 组 BALF 中 WBC 总数、EOS、PMN 均增多，差异有统计学意义($P<0.05$)；与 AS 组比较，经过治疗后(DEX 组)细胞数减少，差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 小鼠 BALF 中的 WBC 总数及 EOS、PMN 计数($\times 10^4/\text{mL}$)
Table 1 Counts of WBC, EOS and PMN in BALF of the mice ($\times 10^4/\text{mL}$)

Group	<i>n</i>	WBC	EOS	PMN
NS	8	4.88±1.25	1.13±0.84	0.88±0.84
AS	8	20.50±0.93△	6.00±0.93△	5.25±0.89△
DEX	8	9.25±1.04△▲	2.50±0.93△▲	2.88±0.84△▲

△ $P<0.05$, vs. NS group; ▲ $P<0.05$, vs. AS group

2.4 各组小鼠 BALF 中 IL-17 蛋白浓度

各组小鼠 BALF 中 IL-17 蛋白浓度(pg/mL)分别为 NS 组 0.93 ± 0.09 ，AS 组 1.18 ± 0.08 ，DEX 组 1.02 ± 0.08 。AS 组、DEX 组 BALF 中 IL-17 蛋白浓度较 NS 组增高($P<0.05$)；与 AS 组比较，经过治疗后(DEX 组)BALF 中 IL-17 蛋白浓度有所降低，差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.5 各组小鼠肺组织 IL-17、BATF、RORγt mRNA 的表达

与 NS 组比较，AS 组、DEX 组 IL-17、BATF、RORγt mRNA 表达水平增高；与 AS 组比较，经过

见附图。NS 组小鼠肺组织结构清晰，小支气管黏膜上皮完整，管腔光滑，肺泡间隔正常，基本无炎症细胞浸润；AS 组小鼠小支气管黏膜明显水肿，黏膜基底层增厚，小支气管腔极度狭窄，肺泡间隔增厚明显，小支气管、血管管周及肺泡间隔见大量炎症细胞浸润，多以 EOS、PMN、淋巴细胞为主；经过治疗后(DEX 组)小鼠小支气管管壁增厚及管腔狭窄的程度均较 AS 组减轻，管腔内分泌物显著减少，肺泡间隔清晰可见，肺组织内炎症细胞浸润情况有所改善。

治疗后(DEX 组)各指标表达水平有所降低，以上差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组小鼠肺组织 IL-17、BATF、RORγt mRNA 表达的变化 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
Table 2 Changes in expressions of IL-17, BATF and RORγt mRNA in lung tissues of the mice ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

Group	<i>n</i>	IL-17	BATF	RORγt
NS	8	1.00±0.40	1.00±0.03	0.98±0.04
AS	8	1.32±0.07△	1.23±0.06△	1.27±0.08△
DEX	8	1.23±0.09△▲	1.14±0.04△▲	1.01±0.05△▲

△ $P<0.05$, vs. NS group; ▲ $P<0.05$, vs. AS group

2.6 相关分析

经直线相关性分析显示：小鼠肺组织 BATF mRNA 的表达与 IL-17 mRNA($r=0.860$)、RORγt mRNA($r=0.934$)的表达及 BALF 中 WBC($r=0.884$)、EOS($r=0.890$)、PMN($r=0.951$)计数均呈正相关($P<0.05$)。

3 讨论

IL-17 是由 Th17 细胞分泌的具有多重功效的细胞因子，可诱导气道巨噬细胞释放 IL-1β，进一步诱导分泌 IL-6、IL-8 及 IL-11，导致气道局部炎症持久存在或不断扩大；此外 IL-17 所导致的一系列炎症反应变化对哮喘气道重构起关键作用^[6]。本研究

结果发现 AS 组 BALF 中 IL-17 浓度及肺组织 *IL-17* mRNA 表达均较 NS 组增高,这与 Zhang 等^[7]和李鸿佳等^[8]的报道一致;与 NS 组比较,AS 组小鼠气道炎症细胞浸润较多,BALF 中 WBC、EOS、PMN 均明显增高;与 AS 组比较,上述指标在治疗后降低或减轻。这从正反两面提示在哮喘急性发作期存在 IL-17 的过度表达,引起气道炎症反应及进一步扩大,导致哮喘症状持续存在。

BATF 是激活蛋白酶-1(AP-1)超家族的一员,对 Th17 细胞的分化可能起调控作用,BATF 的缺乏将会导致 Th17 细胞的增殖分化障碍。BATF^{-/-}的小鼠 T 细胞不能诱导 Th17 相关细胞因子如 ROR γ t、IL-21 等的表达分化^[5]。初始 CD4⁺ T 细胞在 TGF- β 和 IL-6 的协同作用下,通过激活 Stat3 途径诱导 ROR γ t 的表达,进而促进未致敏的 CD4⁺ T 细胞向 Th17 细胞分化。Xu 等^[9]研究显示熊果酸(UA)能通过抑制 ROR γ t 的功能降低 Th17 细胞的分化成熟,减少 IL-17 分泌。本研究结果表明,OVA 致敏/激发成功建立的急性小鼠哮喘模型中,BATF 与 ROR γ t 的表达较 NS 组高,较 DEX 组低;气道炎症反应及黏液分泌均较 NS 组强,较 DEX 组弱;IL-17 的表达及炎性细胞的表达同样较 NS 组强,较 DEX 组弱,表明 BATF 和 ROR γ t 在哮喘气道变态反应性炎症中有着至关重要的作用,这与以上研究结果一致,且刚好证实了我们的猜想。本研究还发现,AS 组肺组织 *BATF* mRNA 的表达与 ROR γ t mRNA 的表达、*IL-17* mRNA 的表达及气道炎症细胞浸润程度呈正相关性。这提示 BATF 和 ROR γ t 可通过调控 Th17 的分化发育,进而影响其关键炎症细胞、细胞因子、炎症介质的产生,从而对急性哮喘小鼠气道炎症进行调控。ROR γ t 是控制 Th17 细胞分化发育的特异性转录因子,理论上机体若完全缺乏 ROR γ t 将导致 Th17 细胞分化过程严重受损。然而,在 BATF^{-/-}的机体中 IL-17 的表达大为减少,此时就算引入大量的逆转录病毒 ROR γ t 也并不能使 IL-17 的表达完全恢复^[5,10]。而在缺乏 ROR γ t 的环境下,BATF 过度表达却能诱导出 IL-17 的产生。这个结果提示在缺乏 BATF 的条件下,ROR γ t 并不能通过诱导 BATF 的产生而促进 Th17 的分化,但是 BATF 却可以诱导 ROR γ t 的产生。由此证明 BATF 和 ROR γ t 在 IL-17 表达中这

种不可或缺的作用,可能为协同作用。本研究发现,AS 组肺组织 *BATF* mRNA 表达与 ROR γ t 及 *IL-17* mRNA 表达呈正相关,进一步提示 BATF 在急性哮喘气道炎症中的重要作用可能是通过调控 ROR γ t 的表达来实现的,这为临床通过转录因子途径治疗哮喘提供了新的理论依据。至于 BATF 和 ROR γ t 之间具体的相互调控机制,目前尚不能完全阐明,有待于我们进一步的研究和探索。

参 考 文 献

- 1 Hamid Q. Pathogenesis of small airways in asthma. *Respiration*,2012;84(1):4-11.
- 2 Bajoriuniene I, Malakauskas K, Lavinskiene S, *et al.* Th17 response to dermatophagoides pteronyssinus is related to late-phase airway and systemic inflammation in allergic asthma. *Int Immunopharmacol*,2013;17(4):1020-1027.
- 3 Diveu C, McGeachy MJ, Boniface K, *et al.* IL-27 blocks RORc expression to inhibit lineage commitment of Th17 cell. *J Immunol*,2009;182(9):5748-5756.
- 4 Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, *et al.* The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell*,2006;126(6):1121-1133.
- 5 Schraml BU, Hildner K, Ise W, *et al.* The AP-1 transcription factor batf controls T(H)-17 differentiation. *Nature*,2009;460(7253):405-409.
- 6 Schmidt-Weber CB. Th17 and Treg cells innovate the Th1/Th2 concept and allergy research. *Chem Immunol Allergy*,2008;94:1-7. doi: 10.1159/000154844.
- 7 Zhang L, Li K, Bing Ma L, *et al.* Effects and mechanism of arsenic trioxide on reversing the asthma pathologies including Th17-IL-17 axis in a mouse model. *Iran J Allergy Asthma Immunol*,2012;11(2):133-145.
- 8 李鸿佳,张才擎,于翠香等. Th17 淋巴细胞及相关细胞因子加重哮喘小鼠气道炎症. *细胞与分子免疫学杂志*,2012;28(11):1126-1128.
- 9 Xu T, Wang X, Zhong B, *et al.* Ursolic acid suppresses interleukin-17 (IL-17) production by selectively antagonizing the function of ROR γ protein. *J Biol Chem*,2011;286(26):22707-22710.
- 10 O'Shea JJ, Steward-Tharp SM, Laurence A, *et al.* Signal transduction and Th17 cell differentiation. *Microbes Infect*,2009;11(5):599-611.

(2014-07-19 收稿,2014-11-25 修回)

编辑 吕 熙