

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.12.018

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2016.12.018

IL-17A抗体抑制变应性鼻炎鼠模型中IL-17A及ROR γ t并升高 Foxp3 mRNA表达

顾兆伟¹, 王韞秀², 赵鹤¹, 曹志伟¹

(中国医科大学附属盛京医院 1. 耳鼻咽喉科; 2. 医疗保险工作部, 沈阳 110004)

[摘要] 目的: 探讨IL-17A抗体对小鼠变应性鼻炎鼻黏膜中IL-17A、ROR γ t、Foxp3 mRNA水平的影响及意义。方法: 以卵清蛋白致敏的Balb/c小鼠变应性鼻炎模型作为实验组, 同期以生理盐水替代作为对照组, 使用IL-17A抗体治疗作为治疗组。实时定量PCR方法检测三组小鼠鼻黏膜中IL-17A、ROR γ t、Foxp3 mRNA的含量。结果: 实验组中ROR γ t以及IL-17A mRNA水平均较对照组升高($P < 0.05$), 治疗组中ROR γ t以及IL-17A mRNA的含量均低于实验组($P < 0.05$)。而实验组中Foxp3 mRNA水平较对照组下降($P < 0.05$), 治疗组中Foxp3 mRNA的含量高于实验组($P < 0.05$)。结论: IL-17A抗体抑制变应性鼻炎鼠模型中IL-17A及ROR γ t mRNA水平并升高Foxp3 mRNA表达水平。

[关键词] 变应性鼻炎; 白细胞介素17A; ROR γ t; Foxp3

IL-17A antibody inhibited the IL-17A and ROR γ t and increased Foxp3 mRNA expression in allergic rhinitis mice

GU Zhaowei¹, WANG Yunxiu², ZHAO He¹, CAO Zhiwei¹

(1. Department of Otorhinolaryngology; 2. Department of Medical Insurance, China Medical University Affiliated Shengjing Hospital, Shenyang 110004, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effect of IL-17A antibody on IL-17A, ROR γ t, Foxp3 mRNA in nasal mucosa of allergic rhinitis mice. **Methods:** BALB/C mice allergic rhinitis model was constructed with ovalbumin sensitization as the experimental group (AR group), saline was used for control group and IL-17A antibody was used for therapy group. IL-17A, ROR γ t, Foxp3 mRNA in nasal mucosa of the three groups were measured by using real-time PCR. **Results:** ROR γ t and IL-17A mRNA in AR group were significantly higher than those in control group ($P < 0.05$). The expression of ROR γ t and IL-17A mRNA in therapy group was lower than those in

收稿日期 (Date of reception): 2016-09-27

通信作者 (Corresponding author): 曹志伟, Email: caozw@aliyun.com

基金项目 (Foundation item): 国家自然科学基金(81200730); 辽宁省自然科学基金项目(2014021047); 辽宁省教育厅科学研究项目(LK201601); 沈阳市科技局项目(F15-199-1-41)。This work was supported by the National Natural Science Foundation (81200730), Natural Science Foundation of Liaoning Province (2014021047), Scientific Research Project of Liaoning Provincial Education Department (LK201601), Science and Technology Bureau of Shenyang City (F15-199-1-41), P. R. China.

AR group ($P < 0.05$). The level of Foxp3 mRNA in AR group was lower than that in the control group ($P < 0.05$), and the expression of Foxp3 mRNA in therapy group was higher than that in AR group ($P < 0.05$). **Conclusion:** IL-17A antibody inhibited the IL-17A and ROR γ t mRNA levels and increased Foxp3 mRNA expression in allergic rhinitis mice. The results of this study will help to understand the pathogenesis of allergic rhinitis, which provides a theoretical basis and a new way in the targeted therapy for allergic rhinitis.

Keywords allergic rhinitis; IL-17A; ROR γ t; Foxp3

变应性鼻炎是耳鼻咽喉科常见病、多发病, 虽然不会危及生命, 却能够对人们的工作、学习以及生活产生严重影响, 因此深入了解变应性鼻炎的发病机制, 探索可能的药物治疗就显得尤为重要。

近年来, 随着Th17和调节性T细胞(Treg细胞)的发现, 扩展了人们对变应性鼻炎发病机制的认识。Th17细胞特异性转录因子是ROR γ t^[1], 其主要分泌细胞因子IL-17A, 而Treg细胞的特异性转录因子是Foxp3^[2]。我们在前期研究^[3]中已经发现, 变应性鼻炎鼠模型鼻黏膜中存在Th17细胞的特异性转录因子ROR γ t mRNA以及IL-17A mRNA/蛋白的高表达, Foxp3 mRNA的低表达。同样有研究^[4]推断Treg/Th17比例失衡在变应性鼻炎的发生发展过程中发挥重要作用。基于IL-17A在Th17反应和/或Treg反应中可能扮演着重要的角色, 我们推测IL-17A抗体可能在变应性鼻炎发病中起到保护作用。因此, 本研究构建小鼠变应性鼻炎模型, 并使用IL-17A抗体进行治疗, 明确其对变应性鼻炎中ROR γ t, IL-17A以及Foxp3 mRNA的影响。

1 材料与方法

1.1 动物

6~8周雄性BALB/C小鼠24只, 体质量18~20 g, SPF级, 购自中国医科大学附属盛京医院, 屏障系统中饲养, 避免变应原存在, 12 h间断照明, 自由进食水。

1.2 致敏和抗原激发

将小鼠随机分为3组, 每组8只。对照组(control组): 使用生理盐水进行致敏以及激发; 实验组(AR组): 使用卵清蛋白(OVA)致敏以及激发; 治疗组(therapy组): 给予IL-17A中和抗体进行治疗。

实验组: 1 mg/mL OVA和20 mg/mL氢氧化铝生理盐水溶液0.1 mL, 分别于造模的第0、2、4、6、8、10、12、14天进行腹腔注射, 第15天起每

日用50 mg/mL OVA生理盐水溶液20 μ L进行滴鼻, 每个鼻孔10 μ L, 连续激发11 d。治疗组: 腹腔注射方案同实验组, 仅在每次OVA滴鼻前30 min使用0.5 mg/mL IL-17A抗体生理盐水溶液20 μ L滴鼻。对照组均同期使用生理盐水替代OVA进行腹腔注射以及滴鼻。

1.3 变应性鼻炎鼠模型评估

末次激发后观察30 min, 期间动物模型会出现挠鼻、喷嚏、鼻溢等症状。根据如下标准计分, 挠鼻: 鼻痒, 轻摩擦鼻几次为1分; 抓挠鼻面部不止为2分; 到处擦磨为3分。喷嚏: 1~3个为1分; 4~10个为2分; 11个以上为3分。鼻溢: 涕流到前鼻孔为1分; 超过前鼻孔为2分; 流涕满面为3分。叠加法计算总得分, 超过5分说明变应性鼻炎模型建模成功。应用该计分标准计分, 实验组均>5分, 对照组均小于5分。

1.4 病理

末次激发后2 h处死所有小鼠, 随机选取每组4只小鼠头部放入乙醇福尔马林混合固定液中固定, 之后置入5%甲酸中脱钙4周, 然后包埋成蜡块。蜡块制作完成后, 行2 μ m厚度石蜡切片。苏木精-伊红(HE)染色, 镜检, 实验组以及治疗组均有明显嗜酸性粒细胞浸润, 而对照中未见明显浸润(图1)。

1.5 RNA 提取以及实时定量 PCR

取每组剩余4只小鼠鼻黏膜, TRIzol试剂(Invitrogen, 上海)提取小鼠鼻黏膜组织细胞总RNA, 紫外分光光度测定RNA浓度及鉴定纯度。PrimeScript RT kit (Takara, 大连)将0.5 μ g总RNA反转录成cDNA。ABI 7500进行实时定量PCR检测。IL-17A、ROR γ t以及Foxp3作为目的基因, β -actin作为内参。IL-17A上游引物: TCTCTGATGCTGTTGCTGCT, 下游引物: CGTGAACGGTTGAGGTAGT; ROR γ t上游引物: AGCCTTCCCTTTCTGCACT, 下游引

物: CCATCACTTGCTGCTGTTGT; Foxp3上游引物: GCCAAGCAGAAAGATGACAG, 下游引物: TTCCAGATGTTGTGGGTGAG; β -actin上游引物: GCAGAAGGAGATTACTGCTCT, 下游引物: GCTGATCCACATCTGCTGGAA, $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法测出目的基因相对表达量。

1.6 统计学处理

所有数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 使用SPSS software 13.0进行统计学分析, 多组间比较使用Kruskal-Wallis检验, 两组间数据差异使用Mann-Whitney检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

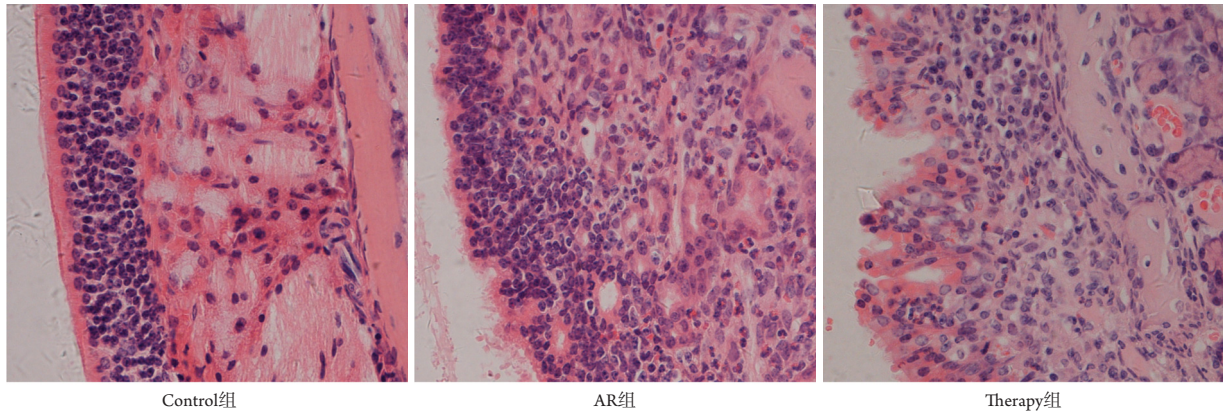


图1 对照组、实验组和治疗组HE染色结果($\times 400$)

Figure 1 HE stain of AR group, control group and therapy group ($\times 400$)

2 结果

2.1 IL-17A 抗体抑制 Th17 相关转录因子 ROR γ t 以及分泌因子 IL-17A mRNA 水平

为进一步评价IL-17A抗体对Th17应答的影响, 我们检测了Th17的转录因子ROR γ t以及IL-17A mRNA水平的变化, 实验组中ROR γ t以及IL-17A mRNA水平均较对照组升高($P<0.05$), 经过IL-17A抗体治疗后会抑制ROR γ t以及IL-17A mRNA的

含量($P<0.05$, 图2)。

2.2 IL-17A 抗体提高 Treg 相关转录因子 Foxp3 mRNA 水平

接下来我们检测IL-17A抗体对Treg细胞转录因子Foxp3 mRNA的影响, 实验组中Foxp3 mRNA的表达量较对照组下降($P<0.05$), 但经过IL-17A抗体治疗后, Foxp3 mRNA的表达量升高($P<0.05$, 图3)。提示了IL-17A抗体具有升高Foxp3 mRNA的作用。

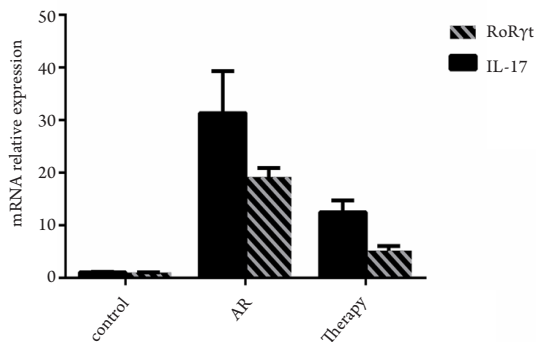


图2 对照组、实验组和治疗组IL-17A和ROR γ t mRNA的表达水平

Figure 2 Expression levels of IL-17A and ROR γ t mRNA in AR group, control group and therapy group

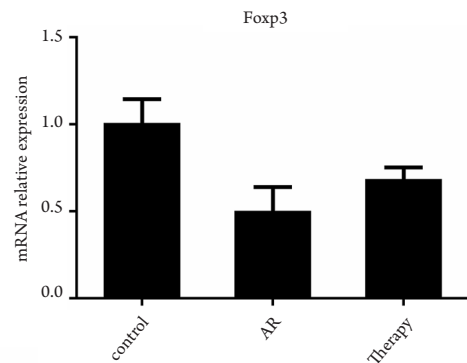


图3 对照组、实验组和治疗组Foxp3 mRNA的表达水平

Figure 3 Expression level of Foxp3 mRNA in AR group, control group and therapy group

3 讨论

在变应性鼻炎发病机制中, 长期以来认为 Th2 反应在其中起到重要作用, 而 Th1 反应贡献相对较小。随着时间的推移, 人们对 CD4⁺ T 细胞分化的理解逐渐提高, 随着 Th17 和 Treg 细胞的相继被发现, 给予了我们深入发掘变应性鼻炎发病机制的机会, Th17 细胞特异性转录因子是 ROR γ t, IL-17A 是 Th17 细胞主要分泌的细胞因子, Treg 细胞特异性转录因子是 Foxp3。有研究对变应性鼻炎患者外周血中 Th17 及 Treg 细胞的转录因子 RORC, Foxp3 mRNA 以及 IL-17 和 TGF- β 蛋白含量检测, 发现了 Foxp3 mRNA 及 TGF- β 蛋白在变应性鼻炎中要低于对照组, 而 RORC mRNA 和 IL-17 蛋白则相反, 从而推断 Treg/Th17 比例失衡在变应性鼻炎发生发展过程中起到重要作用^[4]。并且我们前期研究同样发现 ROR γ t mRNA、IL-17A mRNA/蛋白的含量在变应性鼻炎鼠模型中均升高, 而 Foxp3 mRNA 含量下降的情况^[3], 并且使用流式细胞仪检测到变应性鼻炎鼠模型中鼻黏膜 Th17 细胞含量增加, 证实了 Th17 反应在变应性鼻炎发病机制中的高表达, 由此可见 Th17-ROR γ t-IL-17A 这条链上的任何一点均有可能成为治疗变应性鼻炎的潜在靶点。

我们推测 IL-17A 抗体可能在变应性鼻炎发病中起到保护作用, 构建变应性鼻炎鼠模型, 并使用 IL-17A 抗体进行治疗干预, 从而明确 ROR γ t, IL-17A 以及 Foxp3 mRNA 的变化情况。

通过实时定量 PCR 检测, 发现变应性鼻炎鼠模型鼻黏膜中 ROR γ t 以及 IL-17A mRNA 的表达是升高的, 与前期研究结果一致, 在使用 IL-17A 抗体后它们的 mRNA 水平表达量有了明显的下降。而 Foxp3 mRNA 的含量在变应性鼻炎中是下降的, 在使用 IL-17A 抗体治疗后, 其表达量有了明显上升的趋势。

IL-6 和 IL-23 可以增强信号转导及转录激活蛋白 (STAT)3 磷酸化活性的幅度和时间, IL-1 β 则会改变 STAT3 磷酸化与 STAT5 磷酸化的比例, 进而增强 Th17 细胞分化, 而降低 Treg 细胞分化^[5]。IL-6 在变应性鼻炎中的含量是升高的^[6-7], 已有研究^[8]发现使用 IL-17A 抗体后会导致 IL-6 以及 IL-1 β 的下

降。故此, 我们推测对变应性鼻炎鼠模型进行 IL-17A 抗体治疗后, 抑制了 IL-6 以及 IL-1 β , 进而抑制 STAT3 的活化, 改变了 STAT3/STAT5 的比例, 使得 Th17 分化受到了抑制, 增强了 Foxp3 的表达, 然而 IL-17A 抗体在变应性鼻炎中的确切调控机制有待于进一步研究确定。

综上, 本研究明确了 IL-17A 抗体抑制变应性鼻炎鼠模型中 IL-17A 及 ROR γ t mRNA 水平并升高 Foxp3 mRNA 表达水平, 该研究结果将有助于深入了解变应性鼻炎发病机制, 并为变应性鼻炎的靶向治疗提供了理论依据以及新方向。

参考文献

1. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells[J]. *Cell*, 2006, 126(6): 1121-1133.
2. Wang SB, Deng YQ, Ren J, et al. Lactoferrin administration into the nostril alleviates murine allergic rhinitis and its mechanisms[J]. *Scand J Immunol*, 2013, 78(6): 507-515.
3. 宋辉, 顾兆伟, 赵鹤, 等. 卵清蛋白致敏的过敏性鼻炎小鼠鼻粘膜 IL-17 mRNA/蛋白、ROR γ t、Foxp3 mRNA 表达水平的研究[J]. *免疫学杂志*, 2016, 32(1): 60-63.
SONG Hui, GU Zhaowei, ZHAO He, et al. Expression level of IL-17 mRNA/protein, mRNA ROR γ t and Foxp3 in nasal mucosa of ovalbumin-induced allergic rhinitis mice[J]. *Immunological Journal*, 2016, 32(1): 60-63.
4. 张成, 洪苏玲, 胡国华. 变应性鼻炎患者 Treg/Th17 细胞相关转录因子及细胞因子的失衡表达[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2012, 26(5): 209-211.
ZHANG Cheng, HONG Suling, HU Guohua. The expression of Treg/Th17 cells related transcription factors and cytokines in PBMCs and plasma in patients with allergic rhinitis[J]. *Journal of Clinical Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*, 2012, 26(5): 209-211.
5. Basu R, Whitley SK, Bhaumik S, et al. IL-1 signaling modulates activation of STAT transcription factors to antagonize retinoic acid signaling and control the TH17 cell-iTreg cell balance[J]. *Nat Immunol*, 2015, 16(3): 286-295.
6. Nasiri R, Movahedi M, Amirzargar AA, et al. Association of interleukin 6 single nucleotide polymorphisms with allergic rhinitis[J]. *Int J*

- Pediatr Otorhinolaryngol, 2014, 78(9): 1426-1429.
7. Moon IJ, Hong SL, Kim DY, et al. Blocking interleukin-17 attenuates enhanced inflammation by staphylococcal enterotoxin B in murine allergic rhinitis model[J]. Acta Otolaryngol, 2012, 132 Suppl 1: S6-S12.
8. Zhang S, Huang D, Weng J, et al. Neutralization of Interleukin-17 Attenuates Cholestatic Liver Fibrosis in Mice[J]. Scand J Immunol, 2016, 83(2): 102-108.

本文引用: 顾兆伟, 王韞秀, 赵鹤, 曹志伟. IL-17A抗体抑制变应性鼻炎鼠模型中IL-17A及ROR γ t并升高Foxp3 mRNA表达[J]. 临床与病理杂志, 2016, 36(12): 1986-1990. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.12.018

Cite this article as: GU Zhaowei, WANG Yunxiu, ZHAO He, CAO Zhiwei. IL-17A antibody inhibited the IL-17A and ROR γ t and increased Foxp3 mRNA expression in allergic rhinitis mice[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2016, 36(12): 1986-1990. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.12.018

本刊常用词汇英文缩写表 (按英文字母排序)

从 2012 年第 1 期开始, 本刊对大家较熟悉的以下常用词汇, 允许直接使用缩写, 即首次出现时可不标注中文。

ABC 法	抗生物素蛋白-生物素酶复合物法	FN	纤连蛋白	NF- κ B	核因子- κ B
ACh	乙酰胆碱	GFP	绿色荧光蛋白	NK 细胞	自然杀伤细胞
AIDS	获得性免疫缺陷综合征	GSH	谷胱甘肽	NO	一氧化氮
ALT	丙氨酸转氨酶	HAV	甲型肝炎病毒	NOS	一氧化氮合酶
AngII	血管紧张素 II	Hb	血红蛋白	NS	生理氯化钠溶液
APTT	活化部分凝血活酶时间	HBcAb	乙型肝炎病毒核心抗体	PaCO ₂	动脉血二氧化碳分压
AST	天冬氨酸氨基转移酶	HBcAg	乙型肝炎病毒核心抗原	PaO ₂	动脉血氧分压
ATP	三磷酸腺苷	HBeAb	乙型肝炎病毒 e 抗体	PBS	磷酸盐缓冲液
bFGF	碱性成纤维细胞转化生长因子	HBeAg	乙型肝炎病毒 e 抗原	PCR	聚合酶链反应
BMI	体质指数	HBsAb	乙型肝炎病毒表面抗体	PI3K	磷脂酰肌醇 3 激酶
BP	血压	HBsAg	乙型肝炎病毒表面抗原	PLT	血小板
BSA	牛血清白蛋白	HBV	乙型肝炎病毒	PT	凝血酶原时间
BUN	尿素氮	HCG	人绒毛膜促性腺激素	RBC	红细胞
BUN	血尿素氮	HCV	丙型肝炎病毒	RNA	核糖核酸
CCr	内生肌酐清除率	HDL-C	高密度脂蛋白胆固醇	ROS	活性氧
CCU	心脏监护病房	HE	苏木精-伊红染色	RT-PCR	反转录-聚合酶链反应
COX-2	环氧化酶-2	HGF	肝细胞生长因子	SABC 法	链霉抗生物素蛋白-生物素酶复合物法
Cr	肌酐	HIV	人类免疫缺陷病毒	SARS	严重急性呼吸综合征
CRP	C-反应蛋白	HRP	辣根过氧化物酶	SCr	血肌酐
CT	计算机 X 线断层照相技术	HSP	热休克蛋白	SO ₂	血氧饱和度
CV	变异系数	IC ₅₀	半数抑制浓度	SOD	超氧化物歧化酶
ddH ₂ O	双蒸水	ICAM	细胞间黏附分子	SP 法	标记的链霉抗生物素蛋白-生物素法
DMSO	二甲基亚砷	ICU	重症监护病房	STAT3	信号转导和转录激活因子 3
DNA	脱氧核糖核酸	IFN	干扰素	Tbil	总胆红素
ECG	心电图	IL	白细胞介素	TC	总胆固醇
ECL	增强化学发光法	iNOS	诱导型一氧化氮合酶	TG	三酰甘油
ECM	细胞外基质	IPG	固相 pH 梯度	TGF	转化生长因子
EDTA	乙二胺四乙酸	JNK	氨基末端激酶	Th	辅助性 T 细胞
EEG	脑电图	LDL-C	低密度脂蛋白胆固醇	TLRs	Toll 样受体
EGF	表皮生长因子	LOH	杂合性缺失	TNF	肿瘤坏死因子
ELISA	酶联免疫吸附测定	LPS	内毒素/脂多糖	TT	凝血酶时间
eNOS	内皮型一氧化氮合酶	MAPK	丝裂原活化蛋白激酶	TUNEL	原位末端标记法
ERK	细胞外调节蛋白激酶	MDA	丙二醛	VEGF	血管内皮生长因子
ESR	红细胞沉降率	MMP	基质金属蛋白酶	VLDL-C	极低密度脂蛋白胆固醇
FBS	胎牛血清	MRI	磁共振成像	vWF	血管性血友病因子
FDA	美国食品药品监督管理局	MIT	四甲基偶氮唑盐微量酶反应	WBC	白细胞
FLTC	异硫氰酸荧光素	NADPH	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸	WHO	世界卫生组织