

汤敏丹,李旭,张考苑,等.两种致敏途径诱导的过敏性气道炎症小鼠模型的免疫应答比较[J].中国比较医学杂志,2023,33(4):11-19.

Tang MD, Li X, Zhang KY, et al. Influence of two routes of sensitization of immune responses in allergic airway inflammation mouse model [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(4): 11-19.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.04.002

两种致敏途径诱导的过敏性气道炎症小鼠模型的免疫应答比较

汤敏丹¹,李旭²,张考苑²,杨婷²,卓凡²,唐思怡¹,窦侠^{2*},陈小帆^{1*}

(1.深圳北京大学香港科技大学医学中心,广东深圳 518036;2.北京大学深圳医院皮肤科,广东深圳 518036)

【摘要】目的 比较两种致敏途径诱导的过敏性气道炎症小鼠模型的免疫炎症差异,为使用过敏性气道炎症小鼠模型的研究提供参考。**方法** 建立卵清蛋白经腹腔致敏和经皮肤致敏诱导的过敏性气道炎症小鼠模型,通过 ELISA 分析小鼠血清中的总 IgE 和 OVA 特异性 IgE。支气管肺泡灌洗液细胞行瑞氏-吉姆萨染色以评估嗜酸性气道炎症。对肺组织进行苏木素伊红染色和高碘酸希夫染色以评估其组织病理学变化,肺免疫细胞进行 mRNA 测序和数据分析。**结果** 经腹腔致敏和经皮致敏诱导的过敏性气道炎症小鼠模型均表现出肺组织嗜酸性粒细胞浸润、支气管上皮杯状细胞增生、Th2 型细胞因子表达上调的炎症反应。但腹腔致敏模型系统免疫更强,经皮致敏模型局部免疫更强。哮喘相关通路如 JAK-STAT 信号通路在两个模型中均上调而 Hippo 通路仅在经皮致敏模型中下调。经皮致敏模型与金属蛋白酶、肥大细胞和嗜碱性粒细胞的关系更密切。**结论** 过敏原经腹腔和经皮肤致敏途径不同,诱导产生的过敏性气道炎症小鼠模型的免疫学表型和分子机制存在差异。

【关键词】 过敏性气道炎症;小鼠模型;致敏途径;转录组;免疫表型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 04-0011-09

Influence of two routes of sensitization of immune responses in allergic airway inflammation mouse model

TANG Mindan¹, LI Xu², ZHANG Kaoyuan², YANG Ting², ZHUO Fan², TANG Siyi¹, DOU Xia^{2*}, CHEN Xiaofan^{1*}

(1. Shenzhen Peking University-the Hong Kong University of Science and Technology Medical Center, Shenzhen 518036, China.

2. Department of Dermatology, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036)

【Abstract】 Objective To compare the differences in airway immune inflammation between two sensitization-pathway-induced allergic airway inflammation mouse models and to provide a reference for the study of allergic asthma murine models. **Methods** Murine models of allergic airway inflammation were established by intraperitoneal or epicutaneous sensitization with ovalbumin. Total IgE and OVA-specific IgE levels in mouse serum were analyzed by ELISA. Bronchoalveolar lavage fluid cells were stained with Wright-Giemsa stain to assess eosinophilic airway inflammation. Hematoxylin and eosin and periodic acid-Schiff staining were performed on lung tissue to assess histopathological changes, and lung immune cells were subjected to mRNA sequencing and data analysis. **Results** Both intraperitoneal and epicutaneous sensitization-induced allergic airway inflammation mouse models exhibited inflammatory responses, with

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(81972930);深圳市科技计划基础研究面上项目(JCYJ20190809101015502)。

【作者简介】 汤敏丹(1997—),女,在读硕士研究生,研究方向:过敏性免疫疾病小鼠模型。E-mail:tangmindan68@163.com

【通信作者】 陈小帆(1985—),女,副研究员,硕士生导师,研究方向:过敏性免疫疾病的机制。E-mail:littlecanva@163.com

窦侠(1977—),女,主任医师,硕士生导师,研究方向:过敏性皮肤病。E-mail:doudouxia@163.com * 共同通信作者

eosinophil infiltration of lung tissue, bronchial epithelial club cell hyperplasia, and upregulation of Th2-Type cytokine expression. However, systemic immunity was stronger in the intraperitoneal sensitization model, and local immunity was stronger in the epicutaneous sensitization model. Asthma-related pathways, such as the JAK-STAT signaling pathway, were upregulated in both models, whereas the Hippo pathway was downregulated only in the epicutaneous sensitization model. The epicutaneous sensitization model was more closely associated with the increase of metalloproteinases, mast cells, and basophils. **Conclusions** The different pathways of allergen intraperitoneal and epicutaneous sensitization induce different immunological phenotypes and molecular mechanisms of airway inflammation in mouse models of allergic airway inflammation.

【Keywords】 allergic immune inflammation; murine model; sensitization; transcriptome; immunophenotype

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

过敏性哮喘(简称哮喘)是全球流行最为严重的慢性呼吸道疾病,对个人和社会都造成了巨大的负担。中国肺部健康(CPH)研究组发现,2019 年我国成人哮喘总患病率为 4.2%,约有 4570 万成人罹患哮喘^[1]。动物模型是理解哮喘发病机制,探索新的治疗靶点的有效手段,同时也可用于评估新药和新疗法的安全性和有效性。1937 年,研究者首次用豚鼠进行了实验性哮喘的研究^[2]。20 世纪 90 年代初,小鼠过敏性哮喘模型成功建立^[3],并在过敏性哮喘的研究中得到了广泛的应用。

经典的过敏性哮喘小鼠模型的建立包括了致敏和激发两个阶段:腹腔注射明矾佐剂和过敏原卵清蛋白(ovalbumin, OVA)致敏,随后通过 OVA 反复雾化吸入或滴鼻的方式激发,从而诱导出以嗜酸性粒细胞浸润为特征的 Th2 型气道过敏性炎症,并伴有气道高反应性和气道重塑^[4]。这一模型的广泛应用促进了对哮喘病理生理学机制的深入了解,但该模型仍存在不足之处,如佐剂明矾在致敏阶段对免疫应答的影响、过敏原经腹腔致敏不能模拟人类哮喘的致敏途径等^[5]。为了更好地模拟临床疾病的发生发展过程,近年来,有研究者分别建立了过敏原经皮肤^[6]或经气道^[7]致敏,随后再滴鼻激发诱导的小鼠哮喘模型,并应用于哮喘的机制研究。然而,对于不同哮喘模型小鼠的免疫应答的差异,尚缺乏充分的研究数据。过敏性气道炎症是过敏性哮喘的病理生理基础,许多研究人员通过过敏性气道炎症小鼠模型来模拟急性哮喘的特征^[8]。

本研究拟采用组织病理学、分子免疫学和高通量测序数据分析的方法,比较两种不同致敏途径即经腹腔致敏和经皮肤致敏诱导的过敏性气道炎症小鼠模型的差异,为后续哮喘中过敏性气道炎症致病机制和治疗研究的动物模型的选择提供重要参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本实验选用 6 周龄 SPF 级 C57BL/6 雌鼠 15 只,体重(17±2.4)g,由江苏集萃药康生物科技有限公司提供[SCXK(苏)2020-0054],实验动物均饲养于深圳北京大学香港科技大学医学中心动物实验中心[SYXK(粤)2020-0106]。实验动物的喂养遵守《实验动物照料和使用指南》的要求,室温在 19~25℃,维持照明 12 h、黑暗 12 h 交替的昼夜光照节律。C57BL/6 小鼠随机分为腹腔致敏组、经皮致敏组和对照组,每组 5 只小鼠。全部实验内容通过北京大学香港科技大学医学中心实验动物伦理委员会审查批准[深圳北京大学香港科技大学医学中心动物实验中心 2020-03-31],并按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

MC903 (货号: 2700/10, TOCRIS, 英国); Albumin from chicken egg, OVA (货号: 9006-59-1, Sigma, 美国); 明矾佐剂 (货号: 77161, Thermo Scientific, 美国); 无菌 PBS (Gibco, 英国); 瑞士-吉姆萨染液 (货号: BA4034, BASO, 中国); Lung Dissociation Kit (货号: 130-095-927, MACS, 德国); Percoll 密度梯度分离液 (货号: 17-0891-01, GE, 美国); 组织红细胞裂解液 (货号: 420301, Biologend, 美国); 10% 中性福尔马林 (货号: PH0996, 飞净, 中国); 苏木素染液 (货号: BA4097, BASO, 中国); 伊红染液 (货号: BA4099, BASO, 中国); PAS 染液 (货号: G1281, 索莱宝, 中国); RNA 提取试剂 (货号: 82001, 贝贝生物, 中国); DEPC 水 (货号: R0022, 碧云天, 中国); PrimeScript 反转录试剂盒 (货号: RR036A, TaKaRa, 日本); SYBR® Green Supermix (货号: 439807, Bio-Rad, 美国); 小鼠 OVA-specific

IgE 试剂盒 (货号:439807, Biologend, 美国); 小鼠总 IgE 试剂盒 (货号:88-50460, Invitrogen, 美国)。

台式低温高速离心机 (Eppendorf Centrifuge 5810R, 德国); 台式小型离心机 (Eppendorf 5424, 德国); 分光光度计 (Thermo Scientific, 美国); 实时荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad CFX96, 美国); 全自动组织处理器 (美天旎, 德国); 酶标仪 (Tecan, 瑞士); 石蜡切片机 (Gilson, 美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 过敏性气道炎症小鼠模型的建立

经皮致敏诱导的过敏性气道炎症小鼠模型在 Zhang 等^[9]的基础上修改而来, 经腹腔致敏诱导的过敏性气道炎症小鼠模型建立过程参考自文献^[10]。

经皮致敏组: 腹腔注射 0.75% 戊巴比妥钠 150 μ L 麻醉小鼠, 第 0~14 天内隔日在小鼠耳部每面涂抹 10 μ L 的 MC903 溶液 (0.1 nmol/ μ L) 后每面涂抹 12.5 μ L 的 OVA 溶液 (4 mg/mL), 第 15~18 天在小鼠每侧鼻孔滴加 12.5 μ L 的 OVA 溶液 (2 mg/mL) 诱导肺部炎症, 最后一次滴鼻 24 h 后收样。

腹腔致敏组: 第 0、7、14 天腹腔注射含有 2 mg 氢氧化铝佐剂的 200 μ L OVA 溶液 (0.1 mg/mL) 致敏, 第 21~24 天在小鼠每侧鼻孔滴加 12.5 μ L 的 OVA 溶液 (2 mg/mL) 诱导肺部炎症, 最后一次滴鼻 24 h 后收样。

对照组: 第 21~24 天在小鼠每侧鼻孔滴加 12.5 μ L 的 OVA 溶液 (2 mg/mL), 最后一次滴鼻 24 h 后收样。

1.3.2 外周血抗体测定

小鼠经戊巴比妥钠麻醉后, 眼球取血获取外周血。收集到的血液静置 2 h 后, 离心取上清液, 使用 ELISA 法测定上清液中的总 IgE 和 OVA 特异性 IgE, 在 450 nm 波长下进行读数。

1.3.3 肺泡灌洗液细胞组成观察与统计

戊巴比妥钠麻醉处死小鼠后, 剪开颈部皮肤, 钝性分离出主支气管, 剪开小口, 以头皮针抽取灌洗液灌洗肺组织, 留取灌洗液经离心后取细胞沉淀重悬, 甩片制片后行瑞氏-吉姆萨染色。

1.3.4 局部肺组织石蜡切片观察

选取小鼠右肺中叶, 洗去表面血液后放入 10% 中性福尔马林固定液中固定 48 h 后进行石蜡包埋、切片后进行苏木素-伊红 (hematoxylin and eosin stain, HE) 染色和高碘酸希夫 (periodic acid shiff stain, PAS) 染色。

1.3.5 肺部免疫细胞转录组测序

取下小鼠肺组织后剪碎, 使用解离器和小鼠肺解离试剂盒解离后过滤获得单细胞悬液。单细胞悬液经 36% Percoll 溶液密度梯度离心和裂解红细胞后获取肺免疫细胞, 最后使用总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 并在华大基因进行 RNA 测序分析。

1.3.6 肺部免疫细胞差异表达基因功能分析

使用 DESeq2 包以 $FDR < 0.05$, $|\log_2 FC| > 1$ 为阈值筛选差异表达基因。使用 ClusterProfiler 软件包对差异基因进行京都基因与基因百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 富集分析和基因集富集分析 (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA)。使用 STRING 数据库, Cytoscape 软件和 cytoHubba 插件进行蛋白互作 (protein-protein interaction, PPI) 网络分析和枢纽基因的寻找。

1.3.7 肺部免疫细胞总 RNA 的荧光实时定量分析

提取的总 RNA 使用逆转录试剂盒逆转录成 cDNA, 使用 GAPDH 作为对照, IL-4、IL-5、IL-13、TNF- α 、IFN- γ 的特异性引物对 cDNA 样本进行荧光实时定量分析 (Real-time quantitative PCR, RT-qPCR)。引物序列根据文献报道^[11-15]得到, 由北京天一辉远生物科技有限公司合成, 所用引物序列如表 1 所示。

1.4 统计学方法

小鼠血清 IgE 水平、肺泡灌洗液和小鼠肺免疫细胞 RT-qPCR 数据采用 GraphPad Prism 9 进行处理, 计量资料以平均数 $\pm$ 标准误差 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 表示。两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。测序数据使用 R 软件处理, 基因表达数据使用 Wald 检验计算 *P* 值后经 FDR 校正得到

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物 Primer	引物序列 (5'-3') Primer sequence
IL-4	F: CCACGGATGCGACAAAAATCA R: ACTCTCTGTGCTTCTTCGTT
IL-5	F: GCAATGAGACGATGAGGCTTC R: GCCCCTGAAAGATTTCTCCAATG
IL-13	F: AAGGCCCCACTACGGTCT R: ATGCCACGGATGCTCTCTC
TNF- α	F: GACGTGGAAGTGGCAGAAGAG R: TGCCACAAGCAGGAATGAGA
IFN- γ	F: CAGCAACAGCAAGCGAAAAAGG R: TTTCCGCTTCTGAGGCTGGAT
GAPDH	F: AGGTCGGTGTGAACGGATTTG R: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

FDR 值,以 $FDR < 0.05$ 为差异有统计学意义。KEGG 富集分析采用超几何检验计算 P 值,经 FDR 校正后得到 Q 值,以 $Q < 0.05$ 为阈值,满足此条件的通路定义为显著富集的通路。GSEA 分析采用置换检验计算 P 值,经 FDR 校正后得到 Q 值,以 $Q < 0.05$ 为阈值,满足此条件的通路定义为显著富集的通路。

2 结果

2.1 经腹腔和经皮致敏诱导的过敏性哮喘小鼠模型血清 IgE 水平

与对照组比,腹腔致敏组和经皮致敏组小鼠血清总 IgE 水平均显著升高,但腹腔致敏组和经皮致敏组小鼠血清总 IgE 水平相比无显著性差异(图 1A)。经皮致敏组和腹腔致敏组小鼠血清中 OVA 特异性 IgE 水平与对照组比均显著升高,不同致敏组间 OVA 特异性 IgE 水平无统计学差异(图 1B)。

2.2 经腹腔和经皮致敏诱导的过敏性哮喘小鼠模型肺泡灌洗液的免疫细胞比例

对小鼠支气管肺泡灌洗液细胞进行甩片和瑞氏-吉姆萨染色,统计不同类型的免疫细胞。与对照组比,腹腔致敏组和经皮致敏组支气管肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞比例显著升高。相反,腹腔致敏组和经皮致敏组支气管肺泡灌洗液中巨噬细胞比例显著低于对照组。腹腔致敏组支气管肺泡灌洗液中淋巴细胞比例显著高于经皮致敏组和对照组,中性粒细胞在各组中的比例无显著性差异(图 2)。

2.3 经腹腔和经皮致敏诱导的过敏性哮喘小鼠模型肺组织病理学

肺组织 HE 染色可见对照组小鼠肺组织结构正常,血管和支气管周围未见炎症细胞浸润(图 3A)。腹腔致敏组血管和支气管周围可见明显炎症细胞浸润,支气管上皮杯状细胞增生,粘液分泌增加(图 3B)。经皮致敏组血管和支气管周围也可见炎症细胞浸润,浸润程度低于腹腔致敏组,但粘液分泌更多(图 3C)。以 PAS 染色评估支气管内上皮杯状细胞粘液分泌情况。对照组杯状细胞只有少量粘液分泌(图 3D),腹腔致敏组和经皮致敏组可见明显的杯状细胞粘液分泌增加(图 3E、3F),经皮致敏组可见支气管腔内充满大量粘液栓(图 3F)。

2.4 经腹腔和经皮致敏诱导的过敏性哮喘小鼠模型 Th1/Th2 型细胞因子表达

与对照组比,腹腔致敏组和经皮致敏组 Th2 型细胞因子 IL-4、IL-5、IL-13 表达水平均显著升高。

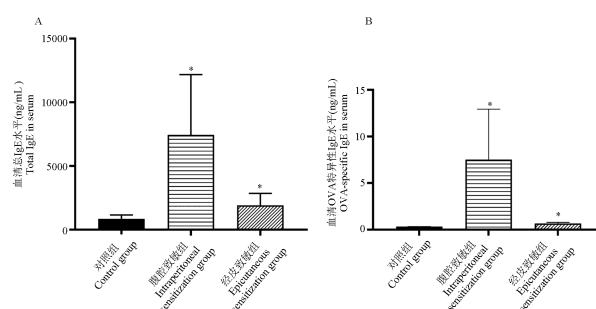
经皮致敏组 IL-4 表达水平显著高于腹腔致敏组,而两组的 IL-5、IL-13 表达差异无统计学意义。与对照组相比,腹腔致敏组和经皮致敏组 Th1 型细胞因子 TNF- α 和 IFN- γ 表达水平无统计学差异。以上结果提示两种模型肺部均呈现 Th2 型炎症(图 4)。

2.5 经腹腔和经皮致敏诱导的过敏性哮喘小鼠模型肺免疫细胞转录组测序

样本间主成分分析可发现各组内样本间表达模式差异小,相似度高,具有可重复性(图 5A)。以 $FDR < 0.05$, $|\log_2 FC| > 1$ 为标准筛选差异表达基因,比较各组的差异基因(图 5B),腹腔致敏组和对照组有 2030 个差异表达基因,其中包括 955 个上调基因和 1075 个下调基因(图 5C)。经皮致敏组和对照组有 1141 个基因差异表达基因,其中包括 887 个上调基因和 254 个下调基因(图 5D)。此外,经皮致敏组和腹腔致敏组有 1740 个差异表达基因,其中包括 1158 个上调基因和 582 个下调基因(图 5B)。与对照组相比,在两个模型中均上调的基因共计 256 个,其中 2 个在经皮致敏组上调的程度更大,61 个在腹腔致敏组上调的程度更大。与对照组相比,在两模型组中均下调的基因共计 236 个,其中 44 个在腹腔致敏组下调的程度更大(图 5B)。

2.6 经腹腔和经皮致敏诱导的过敏性哮喘小鼠模型肺免疫细胞差异基因功能分析

为揭示差异表达基因所参与的生物学通路,对显著上调的差异基因集进行 KEGG 通路富集分析和 GSEA 富集分析。与对照组相比,腹腔致敏组和经皮致敏组显著上调的基因主要参与细胞因子-细胞因子受体相互作用、趋化因子信号通路、造血细胞调控信号通路、钙信号传导和 JAK-STAT 信号通

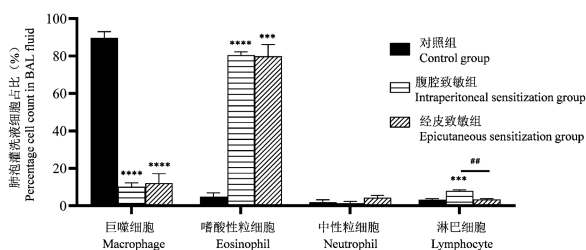


注:A:小鼠血清总 IgE 水平;B:小鼠血清 OVA 特异性 IgE 水平。与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图 1 小鼠血清 IgE 水平($\bar{x} \pm s$)

Note. A, Serum total IgE levels in mice. B, Serum OVA-specific IgE in mice. Compared with control group, * $P < 0.05$.

Figure 1 Serum IgE level in mice



注:与正常组相比, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$;与腹腔致敏组相比, ## $P < 0.01$ 。

图2 小鼠肺泡灌洗液免疫细胞比例

Note. Compared with control group, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Compared with intraperitoneal sensitization group, ## $P < 0.01$.

Figure 2 Proportion of immune cells in alveolar lavage fluid of mice

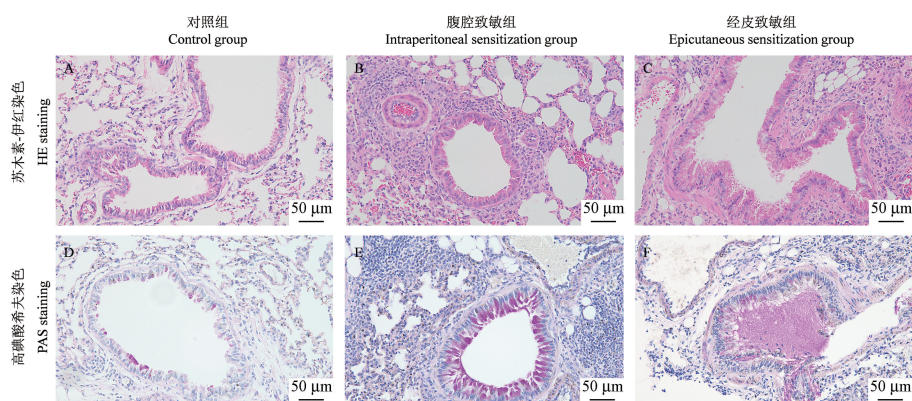
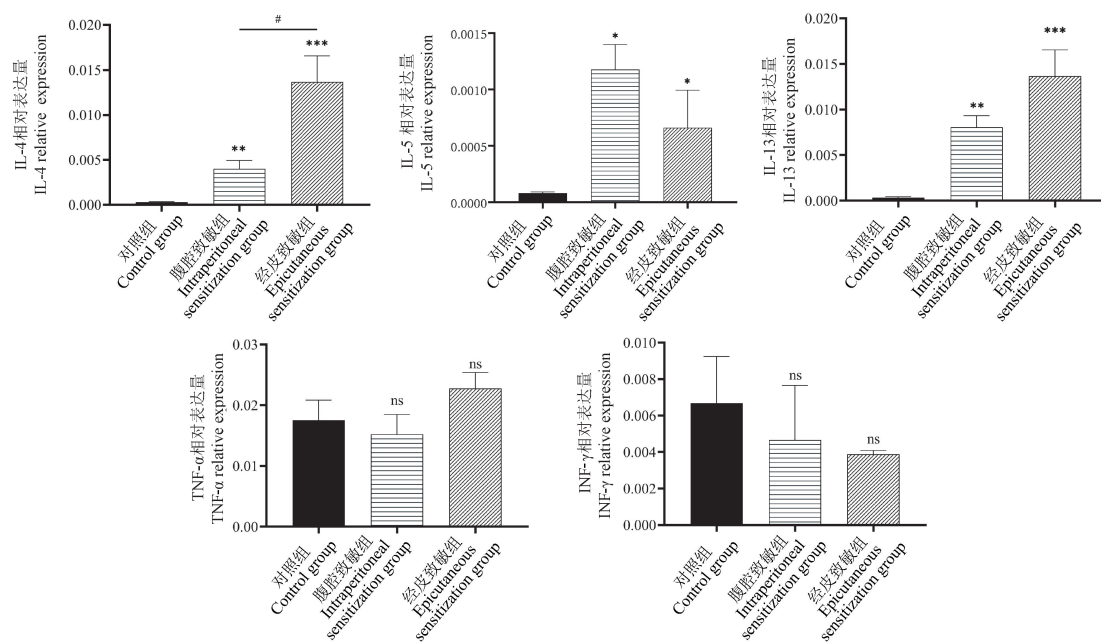


图3 小鼠肺部组织病理改变

Figure 3 Histopathological changes in the lung of mice



注:与正常组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与腹腔致敏组相比, # $P < 0.05$ 。

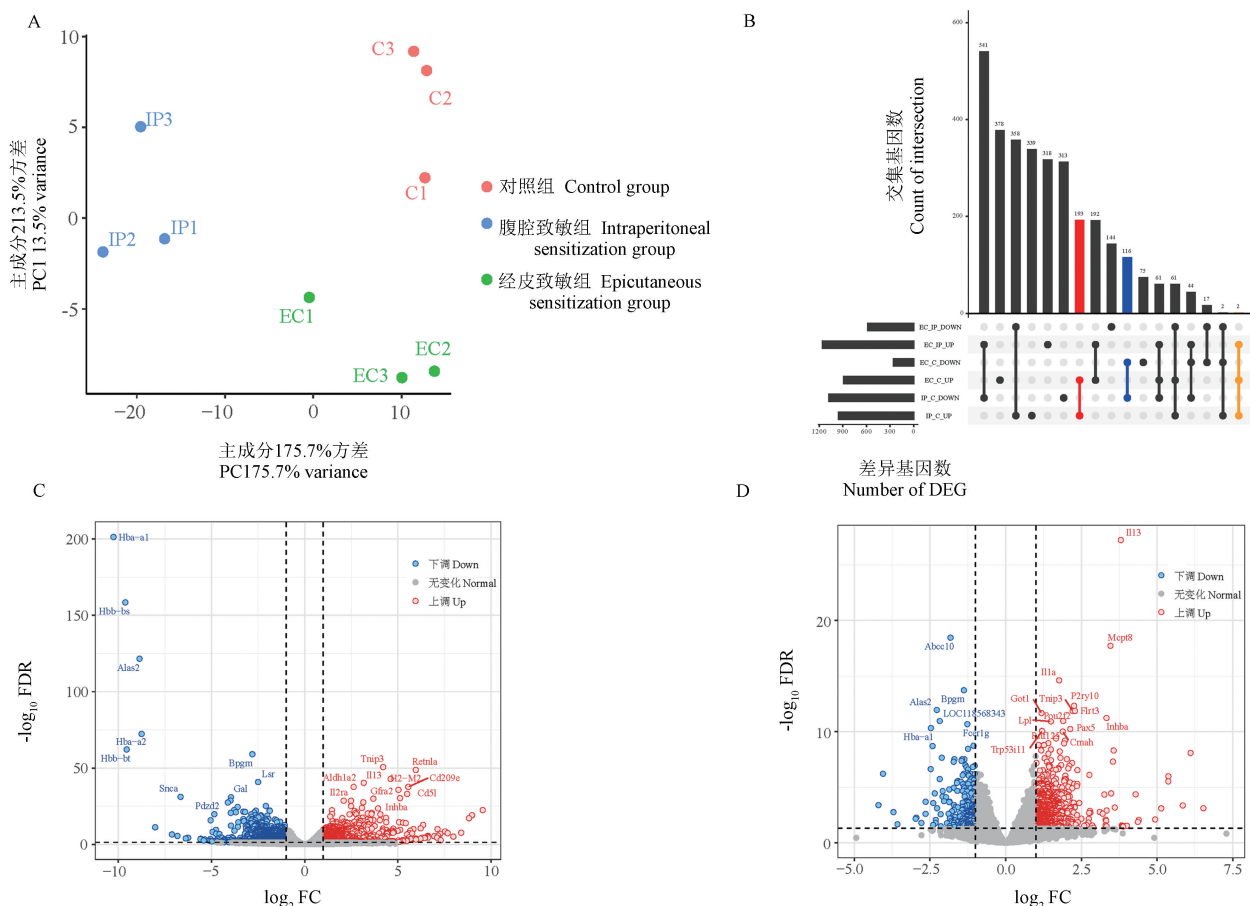
图4 小鼠肺免疫细胞 RT-qPCR ($\bar{x} \pm s$)

Note. Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Compared with intraperitoneal sensitization group, # $P < 0.05$.

Figure 4 RT-qPCR on mouse lung immune cells

路等通路(图 6A)。与腹腔致敏组相比,经皮致敏组还显示了 MAPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、TGFβ 信号通路、Rap1 信号通路、Hippo 信号通路的上调(图 6B)。

使用 $\log_2 FC \geq 2$ 为条件,筛选在差异基因集中高度上调的基因。与对照组相比,腹腔致敏组中显著上调的基因共计 314 个,经皮致敏组中显著上调的基因共计 94 个。使用蛋白质网络互作分析寻找枢纽基因构建网络关系,在腹腔致敏组中得到的枢纽基因为 *Il10*、*Il4*、*Il13*、*Il5*、*Csf2*、*Serpib2*、*Ccl11*、*Il2ra*、*Ccl2*、*Ccl7*(图 6C)。在经皮致敏组中得到的枢纽基因为 *Il6*、*Il13*、*Il4*、*Il10*、*Csf2*、*Serpib2*、*Arg1*、*Ccl17*、*Il5*、*Timp1*(图 6D)。



注: A: 样本间主成分分析; B: 差异基因数目统计, EC_IP_DOWN: 与腹腔致敏组相比, 在经皮致敏组中下调的基因; EC_IP_UP: 与腹腔致敏组相比, 在经皮致敏组中上调的基因; EC_C_DOWN: 与对照组相比, 在经皮致敏组中下调的基因; EC_C_UP: 与对照组相比, 在经皮致敏组中上调的基因; IP_C_DOWN: 与对照组相比, 在腹腔致敏组中下调的基因; IP_C_UP: 与对照组相比, 在腹腔致敏组中上调的基因。C: 腹腔致敏组与对照组差异基因火山图; D: 经皮致敏组与对照组差异基因火山图。

图 5 RNA-Seq 分析

Note. A, Principal component analysis between samples. B, Statistics of the number of differential expressed genes, EC_IP_DOWN, genes downregulated in the c sensitization group compared with the intraperitoneal sensitization group. EC_IP_UP, genes upregulated in the epicutaneous sensitization group compared with the intraperitoneal sensitization group. EC_C_DOWN, genes downregulated in the epicutaneous sensitization group compared with the control group. EC_C_UP, genes upregulated in the epicutaneous sensitization group compared with the control group. IP_C_DOWN, genes downregulated in the intraperitoneal sensitization group compared with the control group. IP_C_UP, genes upregulated in the intraperitoneal sensitization group compared with the control group. C, Volcano map of genes differentially regulated in the intraperitoneal sensitization group compared with the control group. D, Volcano map of genes differentially regulated in the epicutaneous sensitization group compared with the control group.

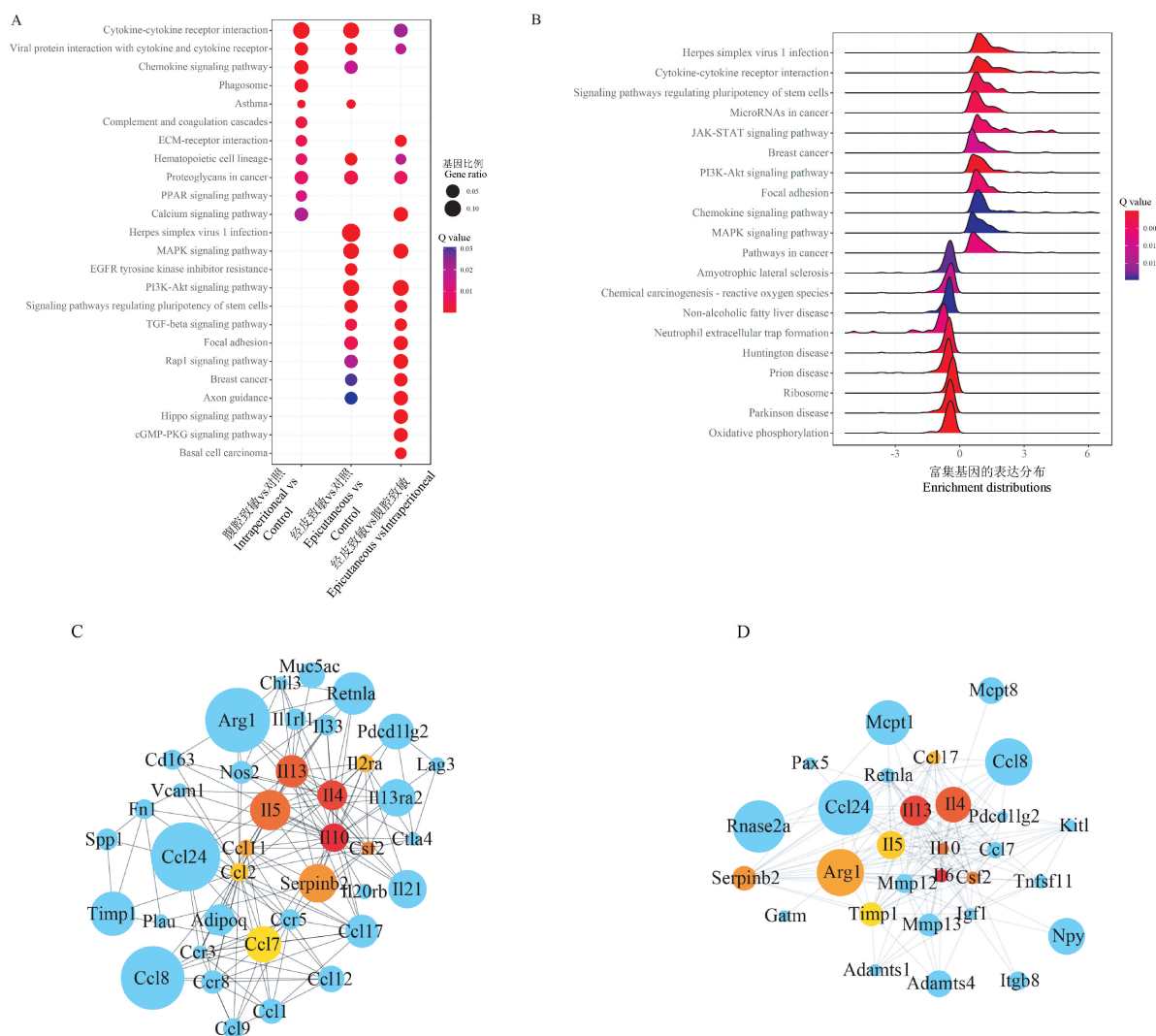
Figure 5 RNA-Seq analysis

3 讨论

小鼠模型是研究哮喘病理生理机制的重要工具。在过敏性哮喘的研究中, 可采用的小鼠模型有很多种, 制备模型使用的过敏原种类^[16], 小鼠品系^[17], 致敏途径^[18]、频率、剂量和持续时长^[19], 激发途径^[20]、频率、剂量和持续时长以及致敏时使用的佐剂^[21]等都会影响炎症反应的模式。因此, 采用不同的模型, 研究结果可能存在矛盾之处, 这就需要对各种不同的哮喘小鼠模型的免疫炎症特征进行研

究。过敏性气道炎症是过敏性哮喘的病理生理基础, 可以通过过敏性气道炎症小鼠模型的机制研究, 了解急性哮喘的分子机制。

本研究建立了 OVA 经腹腔和经皮肤两种致敏途径诱导的过敏性气道炎症小鼠模型并比较其免疫表型, 发现两种模型均呈现肺组织嗜酸性粒细胞浸润、支气管上皮杯状细胞增生、Th2 型细胞因子表达上调的炎症反应, 均可模拟人类哮喘疾病。但是两种模型的免疫应答模式有所差别。腹腔致敏组的血清 IgE 水平更高, 肺泡灌洗液中淋巴细胞浸润



注:A:各组差异上调基因富集的 KEGG 通路(展示前 15);B:经皮致敏组与对照组相比较 KEGG 通路的 GSEA 分析;C:腹腔致敏组与对照组相比显著高表达的基因的蛋白网络互作网络及枢纽基因,圆圈大小代表差异倍数,非蓝色的圆圈为枢纽基因;D:经皮致敏组与对照组相比显著高表达的基因的蛋白互作网络及枢纽基因,圆圈大小代表差异倍数,非蓝色的圆圈为枢纽基因。

图 6 基因功能富集分析和 PPI 网络分析

Note. A, Up-regulated genes KEGG enrichment analysis (top 15). B, GSEA analysis of KEGG pathway in intraperitoneal sensitization group compared with control group. C, PPI network and hub genes of genes significantly highly expressed in intraperitoneal sensitization group compared with control group, circle size represents Log_2FC , non-blue circles are hub genes. D, PPI network and hub genes of genes significantly highly expressed in epicutaneous sensitization group compared with control group, circle size represents Log_2FC , non-blue circles are hub genes.

Figure 6 Gene function enrichment analysis and PPI network analysis

更明显。经皮致敏组的 2 型细胞因子 IL-4 和 IL-13 表达水平更高,粘液分泌增多致支气管堵塞。这提示腹腔致敏模型的系统免疫反应更强,经皮致敏模型的局部免疫炎症更重。IL-4 和 IL-13 是 Th2 型炎症的主要效应细胞因子,可驱动 B 细胞产生 IgE、增强支气管高反应性、促进杯状细胞增生和粘液生成,同时也在气道上皮基底膜增厚和纤维化等方面发挥重要作用^[22]。本研究中观察到经皮致敏模型中的杯状细胞粘液高分分泌表型可能与局部组织高

水平的 IL-4 和 IL-13 相关。有研究者比较了腹腔致敏和皮下致敏对速发型过敏反应的影响,发现皮下致敏产生更强的局部气道炎症,也证明不同致敏途径诱发的系统免疫和局部免疫反应可能存在差异^[23]。“特应性进程”描述了由特应性皮炎进展为过敏性鼻炎和哮喘的过程。特应性进程的机制假设是特应性皮炎引起皮肤屏障功能异常,过敏原经皮肤致敏机体,启动后续过敏性鼻炎和哮喘的发生,因此经皮致敏是后续过敏性鼻炎风险增加的重

要窗口^[24]。经皮致敏模型能够更好地模拟临床疾病发生发展的过程,用于研究过敏性哮喘的前期发展过程以及评估易感基因在疾病发展过程中的作用更为合适。

本研究还使用生物信息学方法分析比较两模型的转录组数据,进一步探索两种模型的生物学通路和关键基因网络差异。与对照组相比,在两种模型中共同上调的大部分基因参与细胞因子及其受体间相互作用,在哮喘的发病机制研究中受到关注。其中有两个基因(*Pax5* 和 *Plcb4*) 在经皮致敏组上调的程度更大。*Pax5* 主要参与 B 细胞的激活和成熟^[25],实验研究发现前 B 细胞在过敏性气道炎症肺组织中数量增加^[26]。*Plcb4* 编码磷脂酶 C 同工酶的 $\beta 4$ 异构体,主要参与磷酸肌醇代谢、间隙连接、Wnt 信号通路、钙信号通路和趋化因子信号通路^[27]。与经典的腹腔致敏模型不同的是,在经皮致敏模型中发现了 Hippo 通路上调。有研究在哮喘患者痰液中检测到 Hippo 通路的关键蛋白表达上调^[28],而在经典的腹腔致敏模型中发现 Hippo 信号通路下调^[29]。这提示在研究 Hippo 通路与哮喘发病机制时,经皮致敏诱导的过敏性气道炎症模型可能是更好的选择。

通过蛋白质网络互作分析发现,经腹腔致敏和经皮致敏组共同的枢纽基因有 *Il10*、*Il4*、*Il13*、*Il5*,它们是哮喘 Th2 炎症调节中的关键基因。进一步分析与枢纽基因相连的其它基因,多是参与哮喘发病的重要调节分子,如 *CCL11*、*CCL24*,是嗜酸性粒细胞趋化的关键趋化因子^[30]; *Arg1*、*Chil3* 和 *Retnla* 参与巨噬细胞 M2 极化^[31],M2 巨噬细胞可进一步分泌高水平的 IL-13 和趋化因子激活 Th2 细胞和招募嗜酸性粒细胞^[32]。另外,在经皮致敏组中还发现了一些新的调节基因:金属蛋白酶基因 *Mmp12*、*Mmp13*、*Adamts1*、*Adamts4*,后续可进一步展开这些基因和相关细胞参与气道过敏性炎症的研究。经皮致敏诱导的食物过敏小鼠模型中发现,嗜碱性粒细胞分泌的 IL-4 对 Th2 极化和 IgE 介导的食物过敏起到关键作用^[33],但嗜碱性粒细胞在哮喘中作用尚未得到充分阐明^[34]。本研究发现肥大细胞和嗜碱性粒细胞相关蛋白酶基因 *Mcpt1*、*Mcpt8* 在经皮致敏组表达上调,这提示经皮致敏模型中高水平的 IL-4 可能与嗜碱性粒细胞相关,为嗜碱性粒细胞在哮喘中的研究提供了思路。过敏性哮喘患者气道中存在嗜碱性粒细胞浸润^[35]。嗜酸性粒细胞型哮喘患者痰液中

嗜碱性粒细胞增多^[36],且其数量与嗜酸性粒细胞的数量呈正相关^[37],儿童哮喘患者外周血嗜碱性粒细胞计数与嗜酸性粒细胞型哮喘相关^[38],这表明嗜碱性粒细胞与人类过敏性气道炎症的严重程度存在正相关。而研究者发现经典的腹腔致敏诱导的过敏性气道炎症模型以肥大细胞依赖的方式发展哮喘,经皮致敏模型肥大/嗜碱性粒细胞特征基因显著上调,可见使用经皮致敏模型研究肥大/嗜碱性粒细胞在过敏性气道炎症中的作用更为合适。

小鼠和人类之间存在差异,不能完美模仿人类哮喘的疾病特征,但可以选择特定的小鼠模型剖析特定基因以及环境因素的作用。在对小鼠模型缺乏充分理解的基础上盲目开展试验,容易造成资源的浪费。本研究对两种致敏途径诱导的过敏性气道炎症小鼠模型比较研究,将为研究者理解所使用的模型工具提供参考,阐述的有关通路和重要基因可为哮喘生物学研究提供新的思路,如选用经皮致敏模型研究 Hippo 通路和肥大/嗜碱性粒细胞在过敏性哮喘中的作用,以及特应性进程的发生发展机制。此外,可以选用腹腔致敏模型较为便捷地研究抗原挑战阶段的干预措施,但需谨慎地看待研究结果。

参考文献:

- [1] Huang K, Yang T, Xu J, et al. Prevalence, risk factors, and management of asthma in China: a national cross-sectional study [J]. *Lancet*, 2019, 394(10196): 407-418.
- [2] Kallós P, Pagel W. Experimentelle untersuchungen über asthma bronchiale [J]. *Acta Med Scand*, 1937, 91(3): 292-305.
- [3] Kips JC, Anderson GP, Fredberg JJ, et al. Murine models of asthma [J]. *Eur Respir J*, 2003, 22(2): 374-382.
- [4] Kung TT, Jones H, Adams GK 3rd, et al. Characterization of a murine model of allergic pulmonary inflammation [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 1994, 105(1): 83-90.
- [5] Eisenbarth SC. Use and limitations of alum-based models of allergy [J]. *Clin Exp Allergy*, 2008, 38(10): 1572-1575.
- [6] Li M, Hener P, Zhang Z, et al. Topical vitamin D3 and low-calcemic analogs induce thymic stromal lymphopoietin in mouse keratinocytes and trigger an atopic dermatitis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(31): 11736-11741.
- [7] Wilson RH, Whitehead GS, Nakano H, et al. Allergic sensitization through the airway primes Th17-dependent neutrophilia and airway hyperresponsiveness [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 180(8): 720-730.
- [8] 李泳兴, 钟鸣, 王勇, 等. 常用哮喘动物模型的建立 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(11): 97-101.
- [9] Zhang Z, Hener P, Frossard N, et al. Thymic stromal lymphopoietin overproduced by keratinocytes in mouse skin

- aggravates experimental asthma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(5): 1536–1541.
- [10] Wu J, Liu Y, Hu J, et al. Protective activity of asatone against ovalbumin-induced allergic asthma [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2020, 13(10): 2487–2494.
- [11] Liu C, Li X, Xiong F, et al. Down-regulation of MLLT1 super elongation complex subunit impairs the anti-tumor activity of natural killer cells in esophageal cancer [J]. *Immunobiology*, 2022, 227(4): 152238.
- [12] Huang MX, Yang SY, Luo PY, et al. Gut microbiota contributes to sexual dimorphism in murine autoimmune cholangitis [J]. *J Leukoc Biol*, 2021, 110(6): 1121–1130.
- [13] Wang X, Shi J, Niu Z, et al. miR-216A-3p regulates the proliferation, apoptosis, migration, and invasion of lung cancer cells via targeting COPB₂ [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2020, 84(10): 2014–2027.
- [14] Totten AH, Xiao L, Luo D, et al. Allergic airway sensitization impairs antibacterial IgG antibody responses during bacterial respiratory tract infections [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2019, 143(3): 1183–1197.
- [15] Rincon MR, Oppenheimer K, Bonney EA. Selective accumulation of Th2-Skewing immature erythroid cells in developing neonatal mouse spleen [J]. *Int J Biol Sci*, 2012, 8(5): 719–730.
- [16] Jia A, Wang Y, Sun W, et al. Comparison of the roles of house dust mite allergens, ovalbumin and lipopolysaccharides in the sensitization of mice to establish a model of severe neutrophilic asthma [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(3): 2126–2134.
- [17] Azevedo CT, Cotias AC, Arantes ACS, et al. Assessment of allergen-responsive regulatory T cells in experimental asthma induced in different mouse strains [J]. *Mediators Inflamm*, 2021, 2021: 7584483.
- [18] Arts JH, Frieke Kuper C. Approaches to induce and elicit respiratory allergy; impact of route and intensity of exposure [J]. *Toxicol Lett*, 2003, 140/141: 213–222.
- [19] Aguilar-Pimentel JA, Alessandrini F, Huster KM, et al. Specific CD8 T cells in IgE-mediated allergy correlate with allergen dose and allergic phenotype [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 181(1): 7–16.
- [20] Kim DI, Song MK, Lee K. Comparison of asthma phenotypes in OVA-induced mice challenged via inhaled and intranasal routes [J]. *BMC Pulm Med*, 2019, 19(1): 241.
- [21] Conrad ML, Yildirim AO, Sonar SS, et al. Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models [J]. *Clin Exp Allergy*, 2009, 39(8): 1246–1254.
- [22] Hammad H, Lambrecht BN. The basic immunology of asthma [J]. *Cell*, 2021, 184(6): 1469–1485.
- [23] Repa A, Wild C, Hufnagl K, et al. Influence of the route of sensitization on local and systemic immune responses in a murine model of type I allergy [J]. *Clin Exp Immunol*, 2004, 137(1): 12–18.
- [24] Dharmage SC, Lowe AJ, Matheson MC, et al. Atopic dermatitis and the atopic March revisited [J]. *Allergy*, 2014, 69(1): 17–27.
- [25] Calderón L, Schindler K, Malin SG, et al. Pax5 regulates B cell immunity by promoting PI3K signaling via PTEN down-regulation [J]. *Sci Immunol*, 2021, 6(61): eabg5003.
- [26] Samitas K, Malmhäll C, Rådinger M, et al. Precursor B cells increase in the lung during airway allergic inflammation: a role for B cell-activating factor [J]. *PLoS One*, 2016, 11(8): e0161161.
- [27] Zhang T, Song X, Liao X, et al. Distinct prognostic values of phospholipase C beta family members for non-small cell lung carcinoma [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 4256524.
- [28] Fodor LE, Gézi A, Ungvári L, et al. Investigation of the possible role of the hippo/YAP1 pathway in asthma and allergy [J]. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2017, 9(3): 247–256.
- [29] Xiao H, Zhang QN, Sun QX, et al. Transcriptomic analysis reveals a link between hippo signaling pathway and macrophages in lungs of mice with OVA-induced allergic asthma [J]. *J Inflamm Res*, 2022, 15: 423–437.
- [30] Isgrò M, Bianchetti L, Marini MA, et al. The C-C motif chemokine ligands CCL5, CCL11, and CCL24 induce the migration of circulating fibrocytes from patients with severe asthma [J]. *Mucosal Immunol*, 2013, 6(4): 718–727.
- [31] Welc SS, Wehling-Henricks M, Antoun J, et al. Differential effects of myeloid cell PPAR δ and IL-10 in regulating macrophage recruitment, phenotype, and regeneration following acute muscle injury [J]. *J Immunol*, 2020, 205(6): 1664–1677.
- [32] Saradna A, Do DC, Kumar S, et al. Macrophage polarization and allergic asthma [J]. *Transl Res*, 2018, 191: 1–14.
- [33] Hussain M, Borcard L, Walsh KP, et al. Basophil-derived IL-4 promotes epicutaneous antigen sensitization concomitant with the development of food allergy [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 141(1): 223–234.
- [34] Wakahara K, van VQ, Baba N, et al. Basophils are recruited to inflamed lungs and exacerbate memory Th2 responses in mice and humans [J]. *Allergy*, 2013, 68(2): 180–189.
- [35] Nouri-Aria KT, Irani AM, Jacobson MR, et al. Basophil recruitment and IL-4 production during human allergen-induced late asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2001, 108(2): 205–211.
- [36] Brooks CR, van Dalen CJ, Hermans IF, et al. Sputum basophils are increased in eosinophilic asthma compared with non-eosinophilic asthma phenotypes [J]. *Allergy*, 2017, 72(10): 1583–1586.
- [37] Suzuki Y, Wakahara K, Nishio T, et al. Airway basophils are increased and activated in eosinophilic asthma [J]. *Allergy*, 2017, 72(10): 1532–1539.
- [38] Leffler J, Jones AC, Hollams EM, et al. Basophil counts in PBMC populations during childhood acute wheeze/asthma are associated with future exacerbations [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 142(5): 1639–1641.

[收稿日期]2022-10-08