

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.08.007

IL-13 通过下调 Claudin-18 蛋白水平对过敏性哮喘的相关性与作用机制^{*}

李小波,王斌梁,王星钧
(浙江省台州市第一人民医院呼吸与危重症医学科 318020)

[摘要] **目的** 探讨白细胞介素(IL)-13 通过下调紧密连接蛋白-18(Claudin-18)蛋白水平对过敏性哮喘的相关性与作用机制。**方法** 将 C57BL/6 小鼠采用随机数字表法分为对照组、IL-13 抑制组、模型组,每组 12 只。采用卵清蛋白(OVA)建立过敏性哮喘模型,21 d 后取小鼠肺组织进行相关实验。采用呼吸曲线 Penh 值进行哮喘模型小鼠气道高反应性检测(AHR);采用实时荧光定量聚合链反应(RT-qPCR)测定 Claudin-18 蛋白水平,采用 ELISA 双抗夹心法测定 IL-13 与 IgE 水平,比较组间差异及相关性。**结果** 模型组的 AHR 显著高于对照组与 IL-13 抑制组($P<0.05$);模型组的 IgE 水平显著高于对照组与 IL-13 抑制组($P<0.05$);对照组与抑制组的 Claudin-18 蛋白水平显著高于模型组($P<0.05$);模型组的 IL-13 水平显著高于对照组与 IL-13 抑制组($P<0.05$);相关性分析结果显示,Claudin-18 与 IL-13、IgE、AHR 呈显著的负相关关系;进一步将数据标准化后以 Claudin-18 为因变量、IL-13 为自变量建立线性回归分析可得 $Y=-0.003X+4.021$ 。**结论** IL-13 与 Claudin-18 存在显著的负相关线性关系,并能够通过下调 Claudin-18 蛋白水平而促进过敏性哮喘气道高反应性。

[关键词] 白细胞介素-13;紧密连接蛋白-18;过敏性哮喘
[中图法分类号] R562.25 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2021)08-1296-04

Correlation and mechanism of IL-13 on allergic asthma by down-regulating Claudin-18 protein level^{*}

LI Xiaobo, WANG Binliang, WANG Xingjun
(Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Taizhou Municipal First People's Hospital, Taizhou, Zhejiang 318020, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the correlation and mechanism of IL-13 on allergic asthma by down-regulating Claudin-18 protein level. **Methods** The C57BL/6 mice were randomly divided into the control group, IL-13 inhibition group and model group by adopting the random number table method, 12 cases in each group. Ovalbumin (OVA) was used to establish the allergic asthma model, and the mouse lung tissue was taken for conducting the relevant experiments after 21 d. The airway hyperreactivity (AHR) test was conducted by adopting the respiratory curve Penh value, the relative content of Claudin-18 protein was determined by RT qPCR, and the levels of IL-13 and IgE were determined by ELISA double antibody sandwich method. The difference and correlation between the two groups were compared. **Results** AHR of the model group was significantly higher than that of the control group and IL-13 inhibition group ($P<0.05$); the IgE level of the model group was significantly higher than that of the control group and IL-13 inhibition group ($P<0.05$); the level of Claudin-18 of the control group and inhibition group was significantly higher than that of the model group ($P<0.05$); IL-13 level of model group was significantly higher than that of the control group and IL-13 inhibition group ($P<0.05$); the correlation analysis results showed that Claudin-18 had significantly negative correlation with IL-13, IgE and AHR; after further standardizing the data, Claudin-18 served as the dependent variable and IL13 as the independent variable, the established linear regression analysis could obtained $Y=-0.003X+4.021$. **Conclusion** There is a significantly negative linear correlation between

^{*} **基金项目:** 浙江省医药卫生科技计划项目(2019KY779);台州市科技计划项目(162yw05)。 **作者简介:** 李小波(1978—),硕士研究生,副主任医师,主要从事支气管哮喘的基础和临床研究。

IL-13 and Claudin-18, and IL-13 can promote airway hyperresponsiveness in allergic asthma by down-regulating the Claudin-18 protein level.

[Key words] IL-13; Claudin-18; allergic asthma

过敏性哮喘的发病机制为多种内外界因子的共同刺激下,而引发肥大细胞、嗜酸性细胞及中性粒细胞脱颗粒,进而导致气道上皮发生炎症反应、细胞增殖、黏液分泌及气道高反应性^[1-2]。过敏性哮喘于中国特别是儿童有较大基数的患病人口,过敏性哮喘由于过敏原的难发现及难避免,以及极易因超敏反应的发生而诱发阻塞性肺气肿、呼吸衰竭与骤停、心律失常、气胸和纵隔气肿等严重的并发症^[3-4]。因此,过敏性哮喘已成为危害人们特别是儿童生命健康的重要疾病。但目前对过敏性哮喘的作用机制主要停留在,由于吸入特异性或非特异性过敏原而引发的一系列细胞因子应激反应的细胞学机制及环境与遗传易感性上^[5-6]。对因气道上皮细胞结构稳定性改变而引发的一系列气道炎症、增殖、高反应及过度分泌研究较少。因此本研究试图通过对过敏性哮喘小鼠模型紧密连接蛋白-18(Claudin-18)、白细胞介素(IL)-13、IgE、气道高反应检测(AHR)的分析,探究 IL-13 通过下调 Claudin-18 蛋白水平对过敏性哮喘相关性及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料来源

健康 10 周龄 SPF 级 C57BL/6 小鼠购自温州医科大学实验动物中心;卵清蛋白(OVA)购自北京智杰方远科技有限公司;IL-13 ELISA 试剂盒、IL-13 抑制剂均购自上海西唐生物科技有限公司;IgE ELISA 试剂盒购自英国 Abcam 公司;RIzoL 试剂盒、反转录试剂盒、RT-qPCR 试剂盒均购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 哮喘建模与分组

将小鼠采用数表法随机分为对照组、IL-13 抑制组、模型组,每组 12 只。哮喘模型的建立采用 OVA,模型组与 IL-13 抑制组与第 1、14 天将 OVA(20 μg)与氢氧化铝(2 mg)加入 150 μL 生理盐水混匀后注射小鼠使其至敏。于第 1、14 天对 IL-13 组注射 20 U IL-13 抑制剂 100 μL,对照组注射等量生理盐水,第 21 天后对小鼠进行相关实验指标的测定。整个实验过程中无实验动物死亡和标本脱落。

1.2.2 AHR 水平的测定

采用呼吸曲线 Penh 值评估哮喘模型小鼠的气道反应性,用整体容积描记箱(体描箱)无创性记录呼吸曲线,推算 Penh 值并观察乙酰甲胆碱(Mch)刺激后的

变化。

1.2.3 Claudin-18 水平的测定

采用实时荧光定量聚合链反应(RT-qPCR)对 Claudin-18 蛋白水平进行检测,首先采用 Trizol 提取小鼠肺组织总 RNA 并用 50 μL 无 RNA 酶水溶解,并使用反转录试剂盒获取 cDNA 稀释后,采用 RT-qPCR 试剂盒扩增后得到扩增产物采用 2^{-ΔΔCt} 进行测定。

1.2.4 IL-13 与 IgE 水平的测定

采用 ELISA 双抗夹心法对小鼠肺组织匀浆进行测定,首先经过特异性抗原(抗体)与固相载体结合后,形成固相抗原(抗体),并与标本中特异性抗体(抗原)形成免疫复合物,在进行洗板、显色、终止等步骤后,严格遵循操作说明书执行并按照标准曲线计算浓度。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 26.0 及 GarphPad 8.0 软件包对数据与图形处理。采用 Kolmogorov-Smirnov test 与 Levene 检验数据的正态性与方差齐性;计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析;两两比较采用 *t* 检验。采用 Pearson 相关性分析与线性回归分析其互相之间的联系。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组 AHR 的比较

模型组 AHR 显著高于对照组与 IL-13 抑制组(*P* = 0.000, *F* = 7.013)。见图 1。

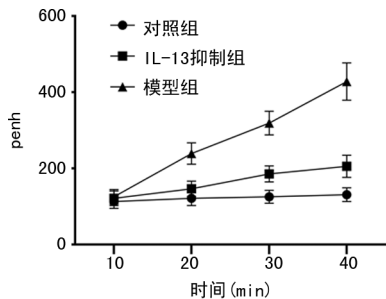


图 1 3 组 AHR 水平比较

2.2 3 组 IgE 水平比较

模型组 IgE 水平显著高于对照组与 IL-13 抑制组(*P* = 0.000, *F* = 9.224)。见图 2。

2.3 3 组 Claudin-18 蛋白水平的比较

对照组 Claudin-18 蛋白水平显著高于模型组(*P* = 0.014, *t* = 6.953)。IL-13 抑制组 Claudin-18 水平显著高于模型组(*P* = 0.032, *t* = 5.429)。见图 3。

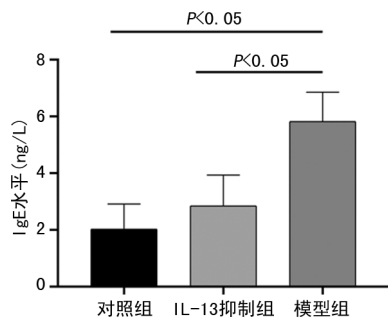


图 2 3 组 IgE 水平的比较

2.4 3 组 IL-13 水平比较

模型组 IL-13 水平显著高于对照组与 IL-13 抑制组($P=0.000,F=7.524$)。见图 4。

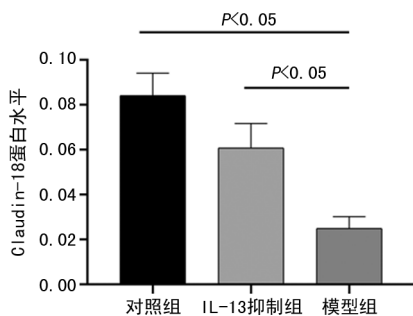


图 3 3 组 Claudin-18 水平的比较

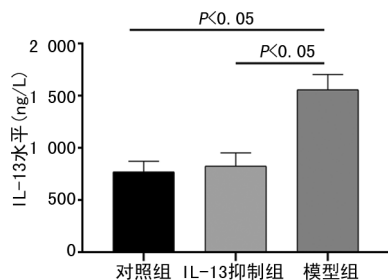


图 4 3 组 IL-13 水平的比较

2.5 AHR、IgE、IL-13、Claudin-18 相关性分析

通过对 AHR、IgE、IL-13、Claudin-18 相关性分析,结果显示 Claudin-18 与 IL-13、IgE、AHR 呈显著负相关关系;进一步将数据标准化后以 Claudin-18 为因变量、IL-13 为自变量建立线性回归分析可得 $Y=-0.003X+4.021$ 。见表 1。

表 1 AHR、IgE、IL-13、Claudin-18 相关性分析

指标	Claudin-18	
	<i>r</i>	<i>P</i>
IL-13	-0.847	0.001
AHR	-0.831	0.002
IgE	-0.721	0.013

3 讨 论

Claudin-18 相对分子质量约 22×10^3 ,为 Claudins 家族成员之一,Claudin-18 作为极化上皮细胞不

同内环境之间一个主要由渗透压支配的生物屏障成分之一,并能够通过细胞表层传递生物信息^[6-7]。其通过控制肺气道电解质及生物分子的跨膜运输,而对膜结构的稳定性起着至关重要的作用^[8-9]。动物实验证实,敲除 Claudin-18 基因后的小鼠表现出气道上皮高反应、易损伤及炎性浸润的情况显著增高^[10-11]。IL-13 为相对分子质量约 12×10^3 并由 132 个氨基酸组成的非糖基化多功能蛋白,主要来自 TH2 细胞的分泌。其主要功能为诱导 B 细胞活化产生浆细胞并释放免疫活性物质,并参与过敏性免疫球蛋白 IgE 的转化^[12-13]。IL-13 在介导过敏性哮喘的过程主要体现在其参与炎症作用机制与通过间接途径调控气道上皮细胞的稳定性,以及刺激气道黏膜细胞的增殖与黏液分泌上。临床研究显示,IL-13 不仅参与过敏性哮喘嗜酸性粒细胞的脱颗粒过程,还能通过下调 Claudin-18 相对表达水平而调控上皮细胞的物质交换与破坏细胞内环境间的生物屏障,并最终破坏气道上皮细胞的稳定性,而大量研究证实气道黏膜的稳定性与完整性与过敏性哮喘的高气道反应及严重反应存在着显著的相关性。因此,在过敏性哮喘的机制中 IL-13 一方面能通过由 DRMDL3 基因介导下上下游信号通路过度活化,致使炎症等相关的趋化因子的聚集,而引发气道平滑肌的收缩、增殖及黏液过度分泌;另一方面能通过作用于 Claudin-18 而导致气道稳定性的破坏,而引发气道高反应性的发生。

本研究通过对 3 组 AHR 的分析,结果显示模型组 AHR 显著高于对照组与 IL-13 抑制组($P<0.05$),说明 IL-13 与气道高反应性存在显著的相关性,并且通过 IL-13 抑制剂能有效地降低小鼠气道高反应性。通过对 3 组 IgE 水平的分析,结果显示模型组的 IgE 水平显著高于对照组与 IL-13 抑制组($P<0.05$),这表明过敏性哮喘模型的建立较成功,且表明通过抑制 IL-13 的水平能有效降低 IgE 的表达水平,这可能与 IL-13 能有效地促进肥大细胞、嗜酸性粒细胞的脱颗粒并刺激小鼠浆细胞产生 IgE 免疫球蛋白有关。本研究发现,对照组与抑制组的 Claudin-18 蛋白水平显著高于模型组($P<0.05$),这表明 IL-13 可能与 Claudin-18 蛋白水平存在一定的相关性,且通过抑制 IL-13 能显著提高 Claudin-18 蛋白水平。通过对 3 组 IL-13 水平的比较,模型组的 IL-13 水平显著高于对照组与 IL-13 抑制组($P<0.05$)。这与 IL-13 抑制剂的作用,与过敏性哮喘模型的炎症机制激发 IL-13 的聚集与分泌有关系。与王桂兰等^[14]研究结果相符合。本研究通过对 AHR、IgE、IL-13、Claudin-18 进行相关性分析,结果显示 Claudin-18 与 IL-13、IgE、

AHR 呈显著负相关关系;进一步将数据标准化后以 Claudin-18 为因变量、IL-13 为自变量建立线性回归分析可得 $Y=-0.003X+4.021$ 。表明 Claudin-18 与 IL-13 存在显著负相关关系。

综上所述,IL-13 与 Claudin-18 存在显著的负相关线性关系,并能够通过下调 Claudin-18 水平导致气道上皮完整性与稳定性的破坏,进而促进过敏性哮喘的气道高反应性。

参考文献

[1] YUAN W,LI L Q,CHEN Y Y,et al. Frontline Science:two flavonoid compounds attenuate allergic asthma by regulating epithelial barrier via G protein-coupled estrogen receptor:probing a possible target for allergic inflammation[J]. J Leukoc Biol,2020,108(1):59-71.

[2] LYNN K S,PETERSON R J,KOVAL M. Ruffles and spikes:control of tight junction morphology and permeability by claudins[J]. Biochim Biophys Acta Biomembr,2020,1862(9):183339..

[3] ALRUMAIHI F,ALMATROUDI A,ALLEMA ILEM K S,et al. Therapeutic effect of bil-saan,sambucus nigra stem exudate,on the ova-induced allergic asthma in mice[J]. Oxid Med Cell Longev,2020,2020:3620192.

[4] 毛祥娣,丛馨. 解析紧密连接分子 claudins 的组装方式[J]. 生理科学进展,2020,51(3):166.

[5] CASTRO M M,KIM B,GAMES P D,et al. Distribution pattern of ZO-1 and claudins in the epididymis of vampire bats[J]. Tissue Barriers,2020,8(3):1779526.

[6] ENRIQUE A O,GUSTAVO G N,GLORIA P

R,et al. Single nucleotide and copy-number variants in IL-4 and IL-13 are not associated with asthma susceptibility or inflammatory markers:a case-control study in a mexican-mestizo population[J]. Diagnostics (Basel),2020,10(5):273.

[7] HIRANUMA H,GON Y,MARUOKA S,et al. DsRNA induction of microRNA-155 disrupt tight junction barrier by modulating claudins[J]. Asia Pac Allergy,2020,10(2):e20.

[8] YAMAMOTO D,KAYAMORI K,SAKAMOTO K,et cl. Intracellular claudin-1 at the invasive front of tongue squamous cell carcinoma is associated with lymph node metastasis [J]. Cancer Sci,2020,111(2):700-712.

[9] 邹晓霞,熊学燕. 儿童过敏性哮喘和过敏性鼻炎患者血清 Tim-1 和 IgE 的表达水平及临床意义[J]. 中外医学研究,2019,17(29):67-69.

[10] 孔瑞,尹佳. 过敏性哮喘动物模型[J]. 中华临床免疫和变态反应杂志,2019,13(1):67-72.

[11] 余汉光,郑小河,张桂冬,等. IL-18、IL-13 与支气管哮喘发病关系研究[J]. 深圳中西医结合杂志,2016,26(19):15-17.

[12] 李凡,吴琦,孙昕,等. 气道上皮细胞紧密连接在小鼠哮喘中的病理学改变[J]. 天津医药,2016,44(1):23-25,129.

[13] 王懿,李天晓,邓颖,等. IL13 基因 rs1295686 多态性与北方汉族儿童哮喘易感性的关联分析[J]. 哈尔滨医科大学学报,2014,48(1):1-4.

[14] 王桂兰,鲁继荣,刘翔腾. 哮喘模型 IL-4、IL-13 与肺组织炎症指标及 STAT6 的相关性研究[J]. 临床儿科杂志,2010,28(8):772-774.