

## 呼吸道菌群失调加重小鼠过敏性呼吸道炎症反应

王学坤, 龙云, 张宗义, 王森林, 张梦媛, 王鹏程  
(暨南大学医学院微生物与免疫学系, 广东广州 510632)

**摘要:**【目的】探讨呼吸道菌群失调对小鼠过敏性呼吸道疾病发病的影响。【方法】C57BL/6 雌性小鼠给予万古霉素雾化吸入 10 d 后处死, 应用 16S rRNA 高通量测序技术分析支气管肺泡灌洗液(BALF)菌群组成, 探索建立小鼠呼吸道菌群失调模型的方法。建模成功后, 应用相同的方法建立小鼠呼吸道菌群失调模型, 在此基础上, 通过腹腔注射致敏及雾化吸入卵清蛋白(OVA)激发, 诱导小鼠过敏性呼吸道炎症反应, 计数擦鼻频率, 检测 BALF 中细胞总数及嗜酸性粒细胞百分比, 肺组织病理分析炎症反应及杯状细胞增生情况, ELISA 法检测血清中 IgE 水平, BALF 中 IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-5 水平, 血清、BALF 及肠组织中 IL-33 水平, 从而分析呼吸道菌群失调对过敏性呼吸道炎症反应的影响。【结果】万古霉素雾化吸入使小鼠呼吸道 *Bradyrhizobium*、*Sphingopyxis*、*Cupriavidus*、*Pelomonas* 等菌属增加, 而 *Akkermansia* 及 *Prevotella\_6* 等菌属显著降低, 发生明显的菌群失调。利用此动物模型进一步研究发现, 呼吸道菌群失调加重了卵清蛋白诱导的过敏性呼吸道炎症反应, 表现为擦鼻频率增加, BALF 中细胞渗出增加、嗜酸性粒细胞百分比增高, 肺组织炎症及杯状细胞增生加重, 血清中 IgE 水平增加。另外, 与卵清蛋白组相比, 菌群失调联合卵清蛋白组小鼠 BALF 中 Th1 型细胞因子 IFN- $\gamma$  水平降低, Th2 型细胞因子 IL-4、IL-5 水平升高, 发生更为严重的 Th1/Th2 平衡失调; BALF 中 IL-33 水平增加, 而血清及肠组织中 IL-33 水平差异无统计学意义, 表明呼吸道菌群失调仅影响局部 IL-33 的产生。【结论】应用万古霉素雾化吸入成功建立了小鼠呼吸道菌群失调模型。呼吸道菌群失调可能通过增加局部 IL-33 产生, 激活 Th2 及固有样淋巴细胞(ILC), 诱发 Th1/Th2 平衡失调, 从而促进过敏性呼吸道疾病发病。

**关键词:** 呼吸道菌群失调; 16S rRNA 高通量测序; 过敏性呼吸道炎症; 细胞因子

**中图分类号:** R318.13, R392.8

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1672-3554(2017)03-0350-09

## Airway Dysbacteriosis Exacerbated Murine Airway Allergic Inflammation

WANG Xue-kun, LONG Yun, ZHANG Zong-yi, WANG Sen-lin, ZHANG Meng-yuan, WANG Peng-cheng  
(Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Corresponding to: WANG Peng-cheng; E-mail: twangpc@jnu.edu.cn

**Abstract:** 【Objective】 To investigate the effects of airway dysbacteriosis on the development of murine allergic airway diseases (AAD). 【Methods】 Female C57BL/6 mice were nebulized with Vancomycin for 10 days and then were sacrificed. The bacterial population in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were evaluated using 16S rRNA high-throughput sequencing technology, exploring the method of establishing an airway dysbacteriosis mouse model. After the mouse model was established successfully, airway dysbacteriosis mouse models were established by the same method, and based on that, the mice were sensitized and challenged with ovalbumin (OVA) to induce airway allergic inflammation. The frequency of nasal rubbing behaviors per mice was counted; the total cell number and eosinophil relative abundance in BALF were evaluated; the lung tissue inflammation and goblet cell metaplasia were assessed according to histopathological features; and the IgE level in serum, IFN- $\gamma$ , IL-4 and IL-5 levels in BALF, and IL-33 levels in serum, BALF and intestine tissue were measured by ELISA. 【Results】 Nebulization of Vancomycin increased *Bradyrhizobium*, *Sphingopyxis*, *Cupriavidus*, *Pelomonas*, and decreased *Akkermansia* and *Prevotella\_6* in airway, inducing significant airway dysbacteriosis. Using the animal model, further study found that airway dysbacteriosis exacerbated OVA-induced airway allergic inflammation.

收稿日期: 2016-11-14

基金项目: 广东省自然科学基金(2014A030313370); 暨南大学科研培育与创新基金(21615420)

作者简介: 王学坤, 硕士研究生, 研究方向: 菌群及呼吸系统疾病, E-mail: wangxuekun0526@163.com; 王鹏程, 通信作者, 副教授, 硕士生导师, E-mail: twangpc@jnu.edu.cn

tion, including increased nasal rubbing frequency, higher serum IgE level, more total cell count especially eosinophil infiltration, more serious lung tissue inflammation and goblet cell metaplasia. Additionally, compared to OVA group, mice in Dysbacteriosis and OVA group had significantly increased level of Th2 cytokine IL-4 and IL-5, and significantly decreased Th1 cytokine IFN- $\gamma$  in BALF, which revealed that mice in Dysbacteriosis and OVA group had more remarkable Th1/Th2 imbalance. Furthermore, IL-33 level showed a significant increase in BALF, but didn't change in serum or intestine tissue in Dysbacteriosis and OVA group compared to OVA group. Indicating that airway dysbacteriosis may only affect the local production of IL-33. 【Conclusions】 An airway dysbacteriosis mouse model was established by Vancomycin nebulization successfully. Airway dysbacteriosis may activate innate lymphoid cells (ILC) and Th2 cell by inducing local IL-33 secreting, which leads to the imbalance of Th1/Th2, and in turn promotes the development of AAD.

**Key words:** airway dysbacteriosis; 16S rRNA high-throughput sequencing technology; airway allergic inflammation; cytokine  
[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2017, 38(3): 350-358]

过敏性呼吸道疾病包括过敏性鼻炎与过敏性哮喘等,调查显示,全球过敏性鼻炎患者达3亿,过敏性鼻炎患者达4亿,而近40年来其患病率持续上升,已逐渐成为全世界的一种公共卫生难题<sup>[1-2]</sup>。过敏性呼吸道疾病发病率的上升与诸多因素有关,如吸烟、大气污染、环境过敏原、肥胖与饮食、微生物感染等。1989年“卫生假说”指出个体生命早期过少的微生物暴露将增加其罹患花粉热的风险<sup>[3]</sup>,这引起研究者对共生菌的重视并对其进行广泛研究。Tina Herbst等<sup>[4]</sup>应用卵清蛋白建立小鼠过敏性呼吸道炎症模型,发现与无特定病原微生物(specific pathogen-free, SPF)小鼠相比,无菌(germ-free, GF)小鼠淋巴细胞及嗜酸性粒细胞渗出增多,而与SPF小鼠共养定植共生菌后,这种改变可恢复,提示共生菌群对调节过敏性呼吸道炎症起重要作用。目前,对肠道菌群的研究最广泛,研究发现,肠道共生菌对于维持呼吸道正常的免疫反应具有重要作用,肠道菌群失调可促进机体罹患过敏性呼吸道疾病<sup>[5]</sup>;另外,相关研究还发现呼吸道发生过敏反应后,肠道菌群也发生了改变;这提示肺-肠轴的存在,且两者相互作用<sup>[6]</sup>。呼吸道菌群作为一种局部因素,可能对呼吸道免疫反应及呼吸道相关疾病产生更直接的影响甚至发挥更重要的调控作用,但由于呼吸道可培养细菌量少,一些生长条件苛刻的细菌难以培养,很大程度上限制了对于呼吸道菌群的研究。近年来,16S rRNA高通量测序等非培养依赖性技术的开展为呼吸道菌群的研究提供了有力的工具。研究者发现健康对照者与哮喘患者呼吸道菌群组成并不相同<sup>[7]</sup>,即使在哮喘患者中,激素敏感型与激素抵抗型患者呼吸道菌群组成亦存在差异<sup>[8]</sup>,这提示呼吸道菌群与过敏性呼吸道疾病存

在一定相关性。然而,呼吸道菌群对过敏性呼吸道疾病的影响及其机制至今仍不清楚。本实验利用万古霉素雾化吸入建立小鼠呼吸道菌群失调模型,探索呼吸道菌群失调对卵清蛋白诱导的过敏性呼吸道炎症反应的影响,从而为过敏性呼吸道疾病发病及其免疫病理学机制的研究提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

42只3~4周SPF级C57BL/6雌性小鼠购于广东省动物中心,并于暨南大学实验动物中心SPF环境中饲养。所有实验符合暨南大学动物实验伦理学规定。

### 1.2 主要试剂与仪器

盐酸万古霉素购自美国Amresco公司;卵清蛋白(ovalbumin, OVA)购自美国Sigma公司;瑞氏-吉姆萨、苏木精-伊红(Hematoxylin-Eosin staining, HE)染液及过碘酸雪夫(Periodic Acid-Schiff stain, PAS)染液购自武汉谷歌生物科技有限公司;DNA提取试剂盒购自天根公司;ELISA试剂盒购自欣博盛公司;PCR试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司;DNA凝胶回收试剂盒购自美国AXY-GEN公司;Leica Qwin图像信号采集与分析系统购自德国LEICA公司;GeneAmp<sup>®</sup> 9700型PCR仪购自美国ABI公司;色谱柱购自日本nacalai tesque公司;Aglient 1100型高效液相色谱仪购自美国安捷伦公司;雾化器购自德国PARI公司。

### 1.3 实验方法

1.3.1 呼吸道菌群失调模型建立方法 14只小鼠随机分为菌群失调组 and 对照组2组,每组各7只。将菌群失调组小鼠置于8 L特制透明雾化箱内,

予0.2 g/L盐酸万古霉素雾化吸入,每次30 min,每日2次,对照组小鼠给予等量生理盐水,第10日末次雾化结束2 h后,小鼠经戊巴比妥钠麻醉,眼眶取血,收集血清,应用高效液相色谱分析法测定血清药物浓度。将小鼠置于75%乙醇中消毒后固定,暴露气管,在气管环甲膜处剪一“V”型小口,朝气管隆突方向置入顶端磨平并带有细胶管的7号注射器针头,进针约0.5 cm后细线固定,连接1 mL注射器,将0.6 mL无菌生理盐水缓慢注入气管,停留30 s后将生理盐水缓慢回抽,重复灌洗3次,最后将生理盐水全部抽出,约0.4~0.5 mL,重复以上步骤3次,收集双肺支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)。将收集的BALF及粪便用于16S rRNA高通量测序,用以评估呼吸道菌群失调模型建立成功与否。

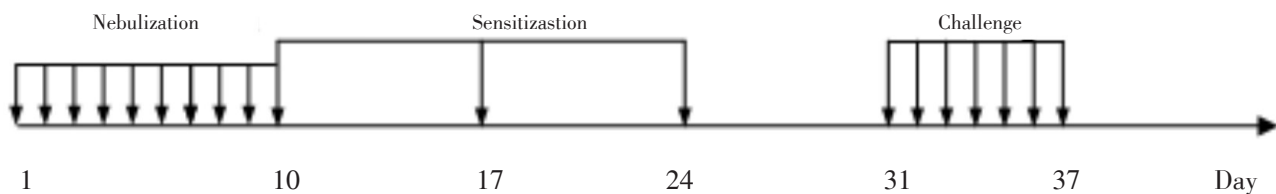
**1.3.2 实验动物分组及过敏性呼吸道炎症模型建立** 将实验中的另外28只小鼠随机分为A组(菌群失调联合卵清蛋白组)、B组(菌群失调组)、C组(卵清蛋白组)和D组(对照组)共4组(图1),每组各7只。

实验第1~10日,A组(菌群失调联合卵清蛋白组)和B组小鼠(菌群失调组)以1.3.1中的方法给予万古霉素雾化吸入,诱发呼吸道菌群失调,C组(卵清蛋白组)和D组(对照组)小鼠给予等量生理盐水;实验第10、17、24日,A组(菌群失调联合卵清蛋白组)和C组(卵清蛋白组)小鼠分别给予腹腔注射致敏液(100  $\mu$ g OVA及4 mg氢氧化铝溶于200  $\mu$ L生理盐水中)致敏,并于第31~37日给予50 mg/mL OVA雾化吸入激发,每次30 min,每

日1次,此过程中B组(菌群失调组)和D组(对照组)分别给予等量生理盐水腹腔注射及雾化吸入(图1)。末次雾化吸入最后10 min,观察A、B、C、D 4组小鼠的精神状态、毛发、呼吸等状况,并双盲计数每只小鼠擦鼻频率<sup>[9]</sup>。

实验第38日将四组小鼠处死取材。小鼠经戊巴比妥钠麻醉后,眼眶取血,收集血清,用于细胞因子检测;将小鼠置于75%乙醇中消毒后固定,暴露气管,在气管环甲膜处置入7号注射器针头并固定,剪开胸腔,暴露右肺,分离右侧支气管并用3号小动物动脉夹将其夹闭,连接1 mL注射器,注入0.4 mL无菌生理盐水重复灌洗3次,最后将生理盐水全部抽出,约0.2~0.3 mL,重复以上步骤3次,收集左侧BALF。左侧BALF离心后,收集上清液用于细胞因子检测,细胞沉渣用100  $\mu$ L预冷PBS重悬混匀后,取10  $\mu$ L加于细胞计数板上,光学显微镜下进行总细胞计数。另取20  $\mu$ L细胞悬液滴于载玻片上,涂片,自然干燥后,瑞氏-吉姆萨染色。计算200个总细胞中嗜酸性粒细胞的百分比。右肺组织用于HE染色及PAS染色;肠组织用于细胞因子检测。

**1.3.3 16S rRNA高通量测序及生物学分析** 为评估呼吸道菌群失调模型建立成功与否,将1.3.1中14只小鼠的BALF 12 000 $\times$ g离心30 min后收集沉渣。提取BALF沉渣及粪便样本中DNA,针对菌群16S rRNA基因V3-V4区进行PCR扩增,扩增引物为338F:5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3',806R:5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3',产物大小为468 bp。PCR扩增程序:95  $^{\circ}$ C预变性5 min;



Mice were divided into 4 groups randomly. A: Dysbacteriosis + OVA group, mice were nebulized with Vancomycin, sensitized and challenged with OVA; B: Dysbacteriosis group, mice were nebulized with Vancomycin, sensitized and challenged with OVA; C: OVA group, mice were nebulized with NS, sensitized and challenged with OVA; D: Control group, mice were nebulized, sensitized and challenged with NS. Mice were nebulized with Vancomycin to induce airway dysbacteriosis, and based on that, the mice were sensitized and challenged with OVA to induce airway allergic inflammation. NS: normal saline.

图1 实验分组及动物模型建立方法

Fig.1 The experimental groups and the animal model establishment method

95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, BALF 采用 30 个循环, 粪便样本采用 27 个循环; 72 °C 延伸 10 min。每个样品 2 个重复, 将同一个样本的扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 使用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒 (AXYGEN 公司) 切胶回收, Tris-HCl 洗脱。PCR 产物应用 Illumina PE300 平台测序。对原始数据进行过滤处理, 得到优化序列, 对序列进行归类操作, 通过归类操作, 将序列按照 97% 相似性分归为许多小组, 一个小组就是一个 OTU (Operational Taxonomic Units, OTU)。然后在去除嵌合体序列后进行 OTU 聚类分析, 对 OTU 的代表序列作分类学分析, 基于 OUT 分类学分析在门及属水平进行群落组成分析及 LEfSe 分析。LEfSe 即 linear discriminant analysis (LDA) effect size, 是一种发现差异显著物种的运算方法, 分析在 <http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy> 上进行, LDA 值 < 2 视为差异物种<sup>[10]</sup>。

1.3.4 高效液相色谱分析法 (high performance liquid chromatograph, HPLC) 检测血清万古霉素药物浓度 制备 200 mg/L 万古霉素储备液, 将万古霉素储备液加入正常小鼠血清形成 5 个标准浓度血清 (0.25, 0.5, 1, 2, 4 mg/L)。分别取 90  $\mu$ L 空白血清、标准血清及样本, 加入 10% 硫酸锌 10  $\mu$ L, 涡旋 30 s, 12 000 $\times$ g 离心 10 min, 取 30  $\mu$ L 上清液加入自动加样器中。色谱仪: Agilent DAD 检测器; 色谱柱: nacalai tesque 5C18-MS-II (4.6ID  $\times$  250 mm); 流动相: 磷酸二氢钾 (0.05 mol/L PH 3.2)-乙腈 (91:9); 流量: 1 mL/min; 柱温: 35 °C; 进样量: 30  $\mu$ L; 检测波长: 紫外检测器 230 nm。以标准血清药物质量浓度为横坐标, 药物吸收峰面积为纵坐标, 进行线性回归分析, 作为呼吸道菌群失调建模小鼠血清药物浓度测定的标准曲线。

1.3.5 肺组织病理切片观察 将 A、B、C、D 四组小鼠处死取材后, 右肺组织置于 40 g/L 多聚甲醛溶液中固定至少 24 h, 石蜡包埋后切片 4 ~ 5  $\mu$ m, 行 HE 染色及 PAS 染色。根据肺组织 HE 染色支气管周围炎症细胞渗出情况进行计分, 即无炎症细胞渗出为 0 分, 少量细胞渗出为 1 分, 渗出细胞形成单层细胞环为 2 分, 渗出细胞形成 2 ~ 4 层细胞环为 3 分, 渗出细胞形成大于 4 层细胞环为 4 分; 根据肺组织 PAS 染色阳性细胞占整个气管细胞百分比进行计分, 即无阳性细胞为 0 分, 阳性细胞 < 25% 为 1 分, 阳性细胞 25% ~ 50% 为 2 分, 阳性

细胞 50% ~ 75% 为 3 分, 阳性细胞 > 75% 为 4 分<sup>[11]</sup>; 每只小鼠至少取 3 个不同视野进行双盲计分。

1.3.6 细胞因子检测 ELISA 法检测血清中 IgE 水平, BALF 中 IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-5 水平, 血清、BALF 及肠组织上清液中 IL-33 水平, 具体方法参照欣博盛公司试剂盒提供的实验步骤进行操作。肠组织上清液制备: 60 ~ 100 mg 肠组织中加入 1 mL PBS, 匀浆, 4 °C 下 12 000 $\times$ g 离心 20 min, 取上清液检测。BCA 法测定上清液中总蛋白浓度, 以 ELSA 法检测到的 IL-33 浓度除以总蛋白浓度, 求得每克蛋白中 IL-33 的量。

#### 1.4 统计学方法

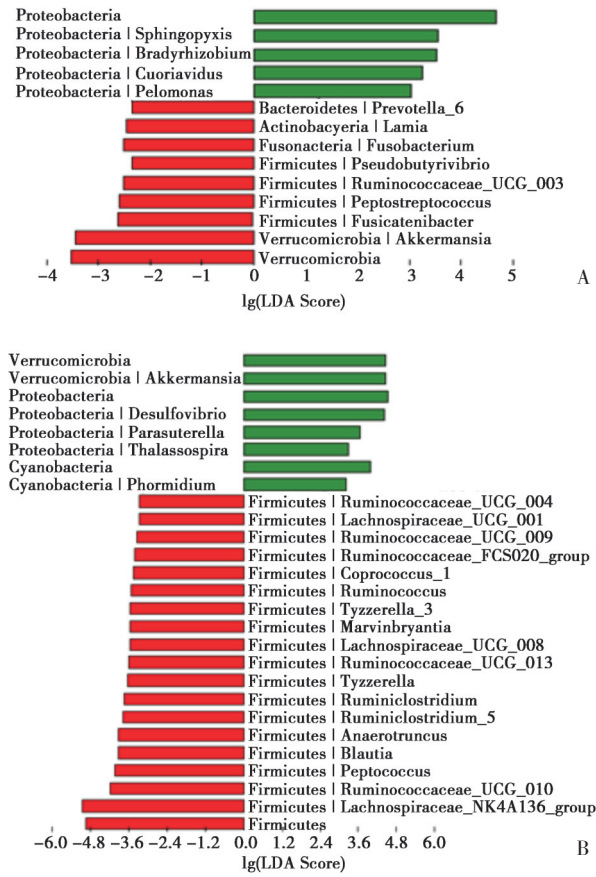
实验所有数据均采用 SPSS13.0 软件进行分析。根据 Levene 方差齐性检验, 多组间的比较采用双因素方差分析或 Kruskal-Wallis 非参数检验, 两组独立样本均数的比较采用 *t* 检验或 Mann-Whitney 非参数检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 呼吸道菌群失调模型菌群分布分析及血清万古霉素浓度检测

我们利用 16S rRNA 通量测序技术, 对小鼠 BALF 中菌群 DNA 进行测序并经 LEfSe 分析发现, 在门水平, 菌群失调组相比对照组变形菌显著增加, 疣微菌显著减少; 在属水平, 变形菌的增加主要与 *Bradyrhizobium*、*Sphingopyxis*、*Cupriavidus*、*Pelomonas* 等 4 类菌的增加有关, 疣微菌的减少与 *Akkermansia* 的减少有关, 另外, 厚壁菌门的 *Fusicatenibacter*、*Peptostreptococcus*、*Pseudobutyrvibrio*、*Ruminococcaceae\_UCG\_003* 等 4 个菌属及拟杆菌门的 *Prevotella\_6* 菌属显著降低 (图 2A)。我们同时对肠道菌群 DNA 进行测序分析发现, 在门水平, 菌群失调组相比对照组疣微菌、变形菌及蓝藻细菌显著增加, 厚壁菌明显减少; 在属水平, 疣微菌的增加与 *Akkermansia* 增加有关, 变形菌的增加与 *Desulfovibrio*、*Parasutterella*、*Thalassospira* 等 3 个菌属的增加有关, 蓝藻细菌的增加与 *Phormidium* 增加有关, 而厚壁菌的减少与 *Lachnospiraceae\_NK4A136* 等 20 个菌属的减少有关 (图 2B)。

我们应用高效液相色谱分析仪对血清药物浓度进行检测, 发现万古霉素吸收峰在 13.465



A: Histogram of the LDA scores computed for airway bacteria between the Control and Dysbacteriosis group. B Histogram of the LDA scores computed for intestinal bacteria between the Control and Dysbacteriosis group. The histogram identifies the clades detected as statistically and biologically differential explain the greatest differences between communities. Enriched bacterial communities in Dysbacteriosis group are in green, and enriched bacterial communities in Control group are in red.

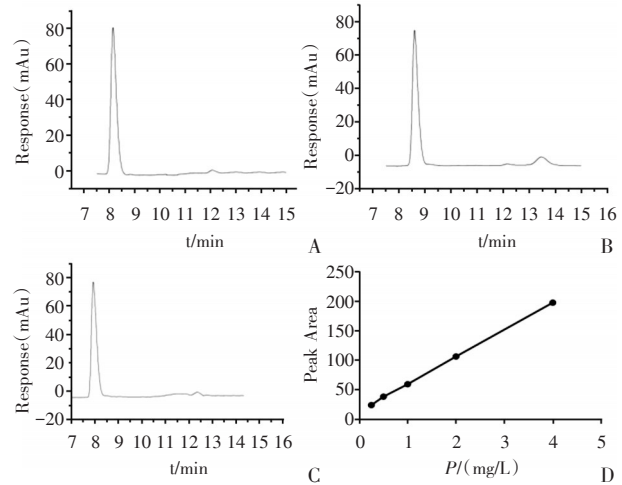
图2 LefSe分析在门及属水平发生改变的菌群

Fig.2 Changed bacterial communities at Phylum level and Genus level using LefSe

min(图3A,B)。以药物质量浓度为横坐标,药物吸收峰面积为纵坐标,进行直线回归分析,血清万古霉素浓度在0.25-4.00 mg/L范围内,与吸收峰面积呈直线关系(图3D),而利用本方法在菌群失调组小鼠血清样本中均未检测出万古霉素(图3C)。

2.2 呼吸道菌群失调联合卵清蛋白处理小鼠出现更为严重的过敏性呼吸道炎症反应

经两因素方差分析,卵清蛋白处理可致小鼠擦鼻频率增加( $P = 0.000$ )、血清IgE水平提高( $P = 0.000$ )、肺组织炎症反应加重( $P = 0.000$ );而呼吸道菌群失调与卵清蛋白处理具有交互作用,

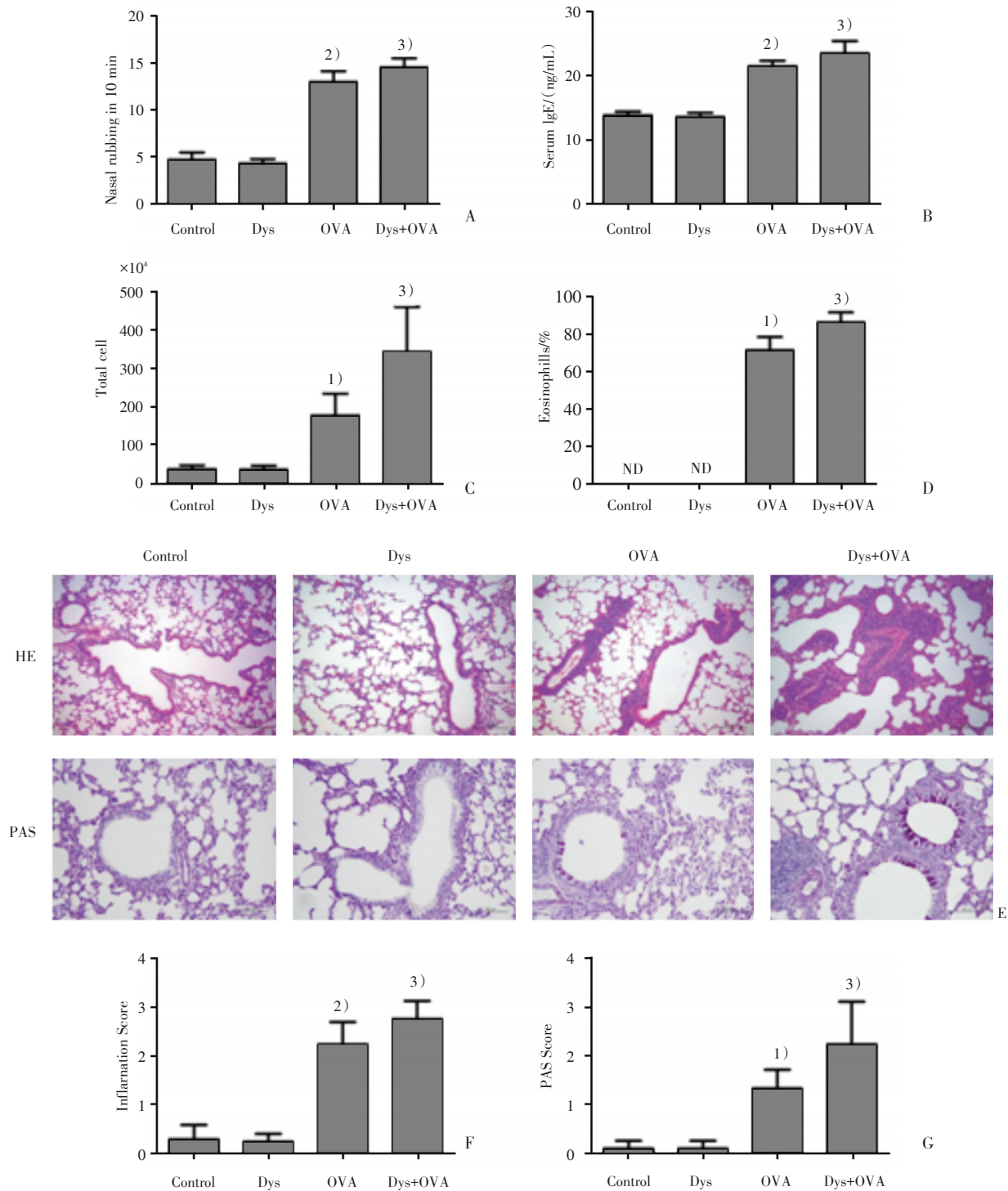


A: Blank serum; B: 4 mg/L standard serum; C: Sample; D: Correlation analysis of Vancomycin concentration and HPLC peak area,  $R^2 = 0.9998$ ,  $Y = 13.145 + 46.346X$ ,  $P < 0.001$ .

图3 万古霉素HPLC色谱图及万古霉素质量浓度与HPLC吸收峰面积相关性分析曲线

Fig.3 HPLC Chromatogram of Vancomycin and correlation analysis of Vancomycin concentration and HPLC peak area

可进一步增加小鼠擦鼻频率( $P = 0.006$ )、升高血清IgE水平( $P = 0.015$ )并加重肺组织炎症反应( $P = 0.036$ )。经Kruskal-Wallis非参数检验分析,肺泡灌洗液细胞总数( $P = 0.000$ )、嗜酸性粒细胞百分比( $P = 0.000$ )及肺组织PAS染色计分( $P = 0.000$ )在对照组、菌群失调组、卵清蛋白组及菌群失调联合卵清蛋白组4组间的差异均具有统计学意义。经t检验或Mann-Whitney非参数检验进一步比较两两之间的差异,发现与对照组相比,卵清蛋白组小鼠精神倦怠、毛发紊乱、腹式呼吸,擦鼻频率增加( $P = 0.000$ ;图4A),血清IgE水平提高( $P = 0.000$ ;图4B),肺泡灌洗液细胞总数增加( $P = 0.002$ ;图4C),细胞分类嗜酸性粒细胞比例增加( $P = 0.001$ ;图4D),肺组织出现明显的炎症反应( $P = 0.000$ ;图4E,F)及肺组织PAS染色计分增加( $P = 0.001$ ;图4F,G),表明卵清蛋白组小鼠存在严重的过敏性呼吸道炎症反应。而与卵清蛋白组相比,菌群失调联合卵清蛋白组小鼠发生更严重的过敏性呼吸道炎症反应,擦鼻频率增加( $P = 0.018$ ;图4A),血清IgE水平提高( $P = 0.028$ ;图4B),肺泡灌洗液细胞总数增加( $P = 0.009$ ;图4C),细胞分类嗜酸性粒细胞比例增加( $P = 0.004$ ;图4D),肺组织炎症反应加重( $P = 0.037$ ;图4E,F)及肺组织PAS染色



A: Frequency of nasal rubbing, main effect of OVA:  $F = 780, P = 0.000$ ; interaction effect of Dysbacteriosis and OVA:  $F = 9.046, P = 0.006$ ; B: IgE level in serum, main effect of OVA:  $F = 416.556, P = 0.000$ ; interaction effect of Dysbacteriosis and OVA:  $F = 6.831, P = 0.015$ ; C: Total cell counts in BALF,  $\chi^2 = 22.066, P = 0.000$ ; D: Eosinophils relative abundance in BALF,  $\chi^2 = 25.601, P = 0.000$ ; E: lung histology HE stain reflecting the severity and localization of inflammation and lung histology PAS stain reflecting the severity of goblet cell hyperplasia (HE,  $\times 200$ ; PAS,  $\times 200$ ). F: lung histology inflammation score, main effect of OVA:  $F = 301.329, P = 0.000$ ; interaction effect of Dysbacteriosis:  $F = 4.915, P = 0.036$ ; G: lung histology PAS score,  $\chi^2 = 22.541, P = 0.000, n = 7$ . 1):  $P < 0.05$  vs Control; 2):  $P < 0.001$  vs Control; 3):  $P < 0.05$  vs OVA; ND: not detected; Dys: Dysbacteriosis.

图4 呼吸道菌群失调对小鼠过敏性呼吸道炎症的影响

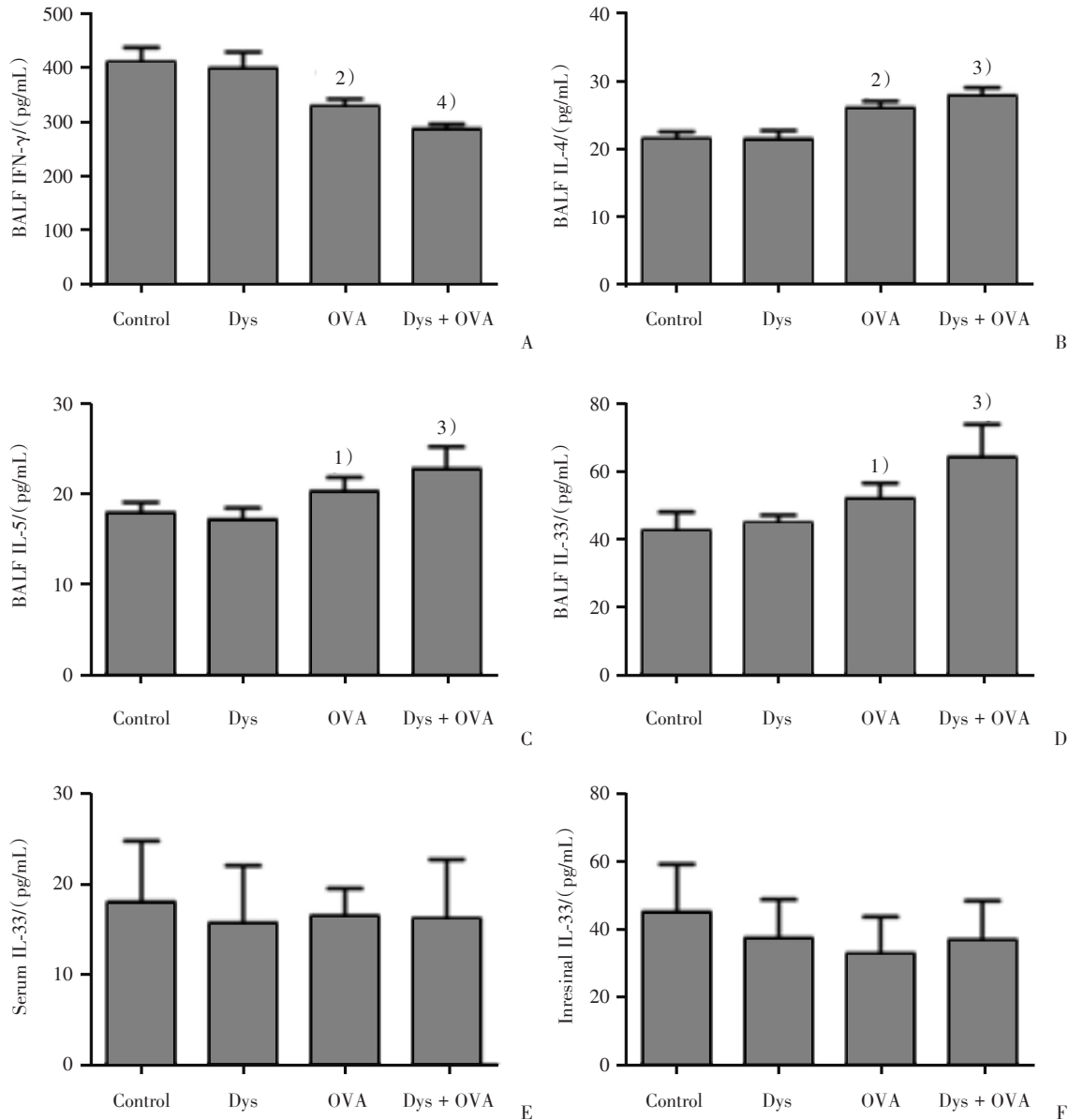
Fig.4 Effects of airway dysbacteriosis on murine airway allergic inflammation

计分升高( $P = 0.037$ ;图 4F,G),差异具有统计学意义。

### 2.3 呼吸道菌群失调联合卵清蛋白处理小鼠细胞因子水平发生更明显的改变

经两因素方差分析,卵清蛋白处理致小鼠 BALF 中 IFN- $\gamma$  水平降低( $P=0.000$ ),IL-4( $P <$

$0.001$ )、IL-5( $P < 0.001$ )及 IL-33( $P < 0.001$ )水平升高;呼吸道菌群失调与卵清蛋白处理具有交互作用,可进一步降低 BALF 中 IFN- $\gamma$  水平( $P = 0.049$ ),升高 BALF 中 IL-4( $P = 0.044$ )、IL-5( $P = 0.019$ )及 IL-33( $P = 0.043$ )水平,差异具有统计学意义。经  $t$  检验进一步比较两两之间的差异,发现与对照组



A: Level of IFN- $\gamma$  in BALF, main effect of OVA:  $F = 65.461$ ,  $P = 0.000$ ; interaction effect of Dysbacteriosis and OVA:  $F = 4.287$ ,  $P = 0.049$ ; B: Level of IL-4 in BALF, main effect of OVA:  $F = 159.879$ ,  $P = 0.000$ ; interaction effect of Dysbacteriosis and OVA:  $F = 4.737$ ,  $P = 0.044$ ; C: Level of IL-5 in BALF, main effect of OVA:  $F = 39.104$ ,  $P = 0.000$ ; interaction effect of Dysbacteriosis and OVA:  $F = 6.376$ ,  $P = 0.019$ ; D: Level of IL-33 in BALF, main effect of OVA:  $F = 38.395$ ,  $P = 0.000$ ; interaction effect of Dysbacteriosis and OVA:  $F = 4.547$ ,  $P = 0.043$ ; E: Level of IL-33 in serum; F: Level of IL-33 in intestine tissue;  $n = 7$ . 1):  $P < 0.05$  vs Control; 2):  $P < 0.001$  vs Control; 3):  $P < 0.05$  vs OVA; 4):  $P < 0.001$  vs OVA; Dys: Dysbacteriosis.

图5 呼吸道菌群失调对细胞因子水平的影响

Fig.5 Effects of airway dysbacteriosis on cytokine levels

相比,卵清蛋白组 BALF 中 IFN- $\gamma$  水平降低 ( $P < 0.001$ ; 图 5A), IL-4 及 IL-5 水平升高 ( $P < 0.001$ ;  $P = 0.007$ ; 图 5B, 5C), 发生 Th1/Th2 平衡失调; 而与卵清蛋白组相比, 菌群失调联合卵清蛋白组 BALF 中 IFN- $\gamma$  水平显著降低 ( $P < 0.001$ ; 图 5A), IL-4 ( $P = 0.009$ ; 图 5B) 及 IL-5 ( $P = 0.044$ ; 图 5C) 水平显著升高, 发生更为严重的 Th1/Th2 平衡失调。另外, 与卵清蛋白组相比, 菌群失调联合卵清蛋白组 BALF 中 IL-33 水平显著升高 ( $P = 0.011$ ; 图 5D), 但血清及肠组织中 IL-33 水平各组间差异无统计学意义 (图 5E, F)。

### 3 讨论

诸多研究证实过敏性呼吸道疾病高发与菌群失调存在相关性, 动物模型在相关研究中发挥重要的桥梁作用。但目前为止, 合适的呼吸道菌群失调模型尚未建立, 这也是呼吸道菌群相关研究受限的重要原因。过去的研究中多采用无菌环境饲养或多种抗生素联合应用建立动物模型<sup>[4]</sup>, 前者对实验环境要求高, 一般研究机构难以达到, 而且大多数抗生素均可被吸收入血, 因此这两种方法的影响均是全身性的。基于万古霉素给药后局部浓度高、极少吸收入血<sup>[12]</sup>, 本研究首次通过万古霉素雾化吸入局部给药方式, 探索建立呼吸道菌群失调模型, 并应用 16S rRNA 高通量测序技术验证菌群失调, 且本模型血清中未检测到万古霉素, 对全身其他部位无影响, 为呼吸道菌群失调模型的建立提供了新思路。尽管肠道菌群也发生了变化, 但与呼吸道发生改变的菌群在属水平完全不同, 且与对照组相比, 菌群失调组小鼠 *Akkermansia* 属是增加的, 而在呼吸道中是降低的, 发生了完全相反的变化, 考虑其可能受万古霉素少量误吞、固有菌群组成及局部微环境等三重因素的影响。后期研究有望通过经肺给药的方式或万古霉素新剂型避免误吞, 以进一步改进此动物模型<sup>[13]</sup>。

研究发现哮喘患者痰液及支气管镜活检组织中变形菌门增加, 拟杆菌特别是 *Prevotella* 菌属减少, 提示变形菌可能是过敏性哮喘的致病菌, 而 *Prevotella* 菌属可能是有益菌群<sup>[7]</sup>。另外, 相关研究发现 *Akkermansia* 菌属具有抗炎<sup>[14]</sup>、调节代谢的作用, 与肥胖及糖尿病呈负相关<sup>[15]</sup>, 而肥胖是过敏性哮喘发病的一个重要危险因素。因此, 万

古霉素雾化吸入导致呼吸道中变形菌门增加、*Prevotella* 菌属及 *Akkermansia* 菌属减少, 可能是过敏性呼吸道炎症反应加重的重要因素。

过敏性呼吸道疾病的发病与 Th1/Th2 平衡失调有关, 为 Th2 细胞反应过强所致。Th1 和 Th2 之间通过细胞因子互相调节。IL-4、IL-5 是重要的 Th2 型细胞因子, 其中 IL-4 可促进 B 细胞发生免疫球蛋白类型转换, 刺激 IgE 的产生, 而 IL-5 可促进嗜酸性粒细胞的活化、募集, 二者对过敏性呼吸道疾病的发病起促进作用; IFN- $\gamma$  是一种 Th1 型细胞因子, 可抑制 Th2 型细胞免疫反应, 下调 IL-4、IL-5 等细胞因子的产生, 对过敏性呼吸道疾病的发病起抑制作用<sup>[16-17]</sup>。IL-33 主要由受损的上皮细胞和内皮细胞释放, 作为一种警报因子持续表达在呼吸道等粘膜表面, 研究发现 IL-33 受体 ST2 表达于 Th2 细胞, IL-33 与 ST2 结合促进 IL-4、IL-5 及 IL-13 等 Th2 型细胞因子的表达, 而不影响 Th1 型细胞因子 IFN- $\gamma$  的表达<sup>[18]</sup>; 另外, 最近的研究发现固有样淋巴细胞 (innate lymphoid cells, ILC) 也表达 ST2, IL-33 可直接激活 ILC, 产生 IL-5、IL-13 等细胞因子<sup>[19]</sup>, 因此 IL-33 是 IL-4、IL-5 及 IL-13 等细胞因子的上游因子, 可诱发 Th1/Th2 平衡失调, 对过敏性呼吸道疾病的发病起重要的促进作用。相关研究表明, 某些细菌代谢产物可促进 IL-33 的产生<sup>[20]</sup>。我们的研究发现, 呼吸道菌群失调加重了 Th1/Th2 平衡失调, 而进一步检测 IL-33 水平发现, 与卵清蛋白组相比, 菌群失调联合卵清蛋白组 BALF 中 IL-33 明显升高, 而血清及肠组织中 IL-33 水平各组间差异无统计学意义, 因此, 我们猜测呼吸道菌群失调可能促进了局部 IL-33 的产生, 激活 Th2 及 ILC, 诱发 Th1/Th2 平衡失调, 导致过敏性呼吸道炎症反应, 从而促进过敏性呼吸道疾病发病。

综上所述, 我们成功建立了小鼠呼吸道菌群失调模型, 并研究发现呼吸道菌群失调对过敏性呼吸道疾病的发病具有一定的促进作用, 而这种作用可能是通过促进局部 IL-33 的产生实现的, 这将有助于进一步探讨过敏性呼吸道疾病的病理生理学机制, 为疾病的诊断与治疗提供新思路。

#### 参考文献:

- [1] Bousquet J, Dahl R, Khaltayev N. Global alliance against chronic respiratory diseases [J]. Eur Respir J,

- 2008, 29(2): 233-239.
- [2] Braman SS. The Global Burden of Asthma [J]. *Chest*, 2006, 130(1 Suppl): 4S-12S.
- [3] Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size [J]. *BMJ*, 1989, 299(6710): 1259-1260.
- [4] Herbst T, Sichelstiel A, Schär C, et al. Dysregulation of allergic airway inflammation in the absence of microbial colonization [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 184(2): 198-205.
- [5] Kim YG, Udayanga KGS, Totsuka N, et al. Gut dysbiosis promotes M2 macrophage polarization and allergic airway inflammation via fungi-induced PGE2 [J]. *Cell Host Microbe*, 2014, 15(1): 95-102.
- [6] Vital M, Harkema JR, Rizzo M, et al. Alterations of the murine gut microbiome with age and allergic airway disease [J]. *J Immunol Res*, 2015, 2015: 1-8.
- [7] Hilty M, Burke C, Pedro H, et al. Disordered microbial communities in asthmatic airways [J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8578.
- [8] Goleva E, Jackson LP, Harris JK, et al. The effects of airway microbiome on corticosteroid responsiveness in asthma [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013, 188(10): 1193-1201.
- [9] Zhang Z. Dietary fiber intake regulates intestinal microflora and inhibits ovalbumin-induced allergic airway inflammation in a mouse model [J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0147778.
- [10] Zhang C, Li S, Liu Y, et al. Structural modulation of gut microbiota in life-long calorie-restricted mice [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 2163.
- [11] Duan W, Chan JH, Wong CH, et al. Anti-inflammatory effects of mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor U0126 in an asthma mouse model [J]. *J Immunol*, 2004, 172(11): 7053-7059.
- [12] Don Hayes JR, Murphy BS, Mullett TW, et al. Aerosolized vancomycin for the treatment of MRSA after lung transplantation [J]. *Respirology*, 2010, 15(1): 184-186.
- [13] Sullivan BP, Elgendy N, Kuehl C, et al. Pulmonary delivery of vancomycin dry powder aerosol to intubated rabbits [J]. *Mol Pharm*, 2015, 12(8): 2665-2674.
- [14] Png CW, Lindén SK, Gilshenan KS, et al. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria [J]. *Am J Gastroenterol*, 2010, 105(11): 2420-2428.
- [15] Everard A, Belzer C, Geurts L, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(22): 9066-9071.
- [16] Palm NW, Rosenstein RK, Medzhitov R. Allergic host defenses [J]. *Nature*, 2011, 484(7395): 465-472.
- [17] Paul WE, Zhu J. How are TH2-type immune responses initiated and amplified? [J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(4): 225-235.
- [18] Schmitz J, Owyang A, Oldham E, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines [J]. *Immunity*, 2005, 23(5): 479-490.
- [19] Monticelli LA, Sonnenberg GF, Abt MC, et al. Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus [J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(11): 1045-1054.
- [20] Cayrol C, Girard JP. IL-33: an alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy [J]. *Curr Opin Immunol*, 2014, 31(3): 31-37.

(编辑 孙慧兰)