

· 论 著 ·

## 抗 IL-13 单抗抑制上呼吸道杯状细胞增生缓解急性声门下喉炎的疗效及分子机制研究\*

万思远<sup>1</sup>, 林志星<sup>2</sup>, 廖薇薇<sup>3</sup>, 李乐辉<sup>1△</sup>

1. 海南医学院第一附属医院急诊科, 海南海口 570000; 2. 海南医学院第一附属医院重症医学科, 海南海口 570000; 3. 海南医学院第二附属医院消化内镜科, 海南海口 570100

**摘要:**目的 探讨抗白细胞介素(IL)-13 单抗通过缓解杯状细胞化生及增生在急性声门下喉炎治疗中的作用及其分子机制。**方法** 采集海南医学院第一附属医院收治的 33 例临床急性声门下喉炎患儿的外周血标本, 根据 Westley 哮喘评分将患儿分为轻度组(Mild group)和中-重度组(Moderate-Severe group)。体外在气/液界面(ALI)培养正常人支气管上皮细胞(NHBE 细胞), 细胞实验分组: Group-1(对照组, NHBE 细胞维持培养)、Group-2(纤毛细胞诱导组)、Group-3(IL-13 处理组)、Group-4(IL-13+抗 IL-13 单抗处理组)。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定外周血血清或细胞培养上清液炎症因子 IL-10、干扰素  $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )和 IL-13 水平。采用免疫印迹(Western blot)法测定杯状细胞分化标志物麦芽凝集素(WGA)和纤毛细胞分化标志物乙酰化- $\alpha$ -微管蛋白(AAT)的表达水平, 以及磷酸化(p)-胞外信号调节蛋白激酶 1/2(ERK1/2)和 ERK1/2 的表达水平, 采用光学显微镜测量细胞直径。在体动物实验中, 将 30 只雌性 C57BL/6J 小鼠随机分为 Control 组、Model 组[使用卵清蛋白(OVA)+脂多糖(LPS)诱导哮喘小鼠模型]和 Model+anti-IL-13 antibody 组(鼻滴法给予 Model 组小鼠抗 IL-13 单抗治疗), 每组 10 只。**结果** 与 Mild group 相比, Moderate-Severe group 外周血血清 IL-10、IFN- $\gamma$  和 IL-13 水平均升高( $P < 0.05$ )。与 Group-1 细胞相比, Group-2 AAT 表达水平上调( $P < 0.05$ ); Group-3 WGA 表达水平上调( $P < 0.05$ ), IL-10、IFN- $\gamma$  和 IL-13 水平升高( $P < 0.05$ ), 杯状细胞直径增大( $P < 0.05$ ), p-ERK1/2 水平上调( $P < 0.05$ ); 与 Group-3 相比, Group-4 WGA 表达水平下调( $P < 0.05$ ), IL-10、IFN- $\gamma$  和 IL-13 水平降低( $P < 0.05$ ), 杯状细胞直径减小( $P < 0.05$ ), p-ERK1/2 水平下调( $P < 0.05$ )。4 组细胞 ERK1/2 表达水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。在体动物实验结果显示, 与 Control 组小鼠相比, Model 组小鼠支气管炎症评分升高( $P < 0.05$ ); 与 Model 组相比, Model+anti-IL-13 antibody 组小鼠支气管炎症评分降低( $P < 0.05$ )。**结论** 抗 IL-13 单抗可抑制气道杯状细胞化生和增生, 或许可用于缓解急性声门下喉炎。

**关键词:** 急性声门下喉炎; 杯状细胞; 白细胞介素-13; 抗 IL-13 单抗

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2025.02.008

中图法分类号: R473.76; R446.6

文章编号: 1673-4130(2025)02-0168-07

文献标志码: A

### Effects and mechanisms study of anti-IL-13 monoclonal antibody on goblet cell hyperplasia in relieving acute laryngitis\*

WAN Siyuan<sup>1</sup>, LIN Zhixing<sup>2</sup>, LIAO Weiwei<sup>3</sup>, LI Lehui<sup>1△</sup>

1. Department of Emergency, the First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou, Hainan 570000, China; 2. Department of Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou, Hainan 570000, China; 3. Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou, Hainan 570100, China

**Abstract: Objective** To investigate the effects and mechanisms of anti-IL-13 monoclonal antibody in alleviating goblet cell metaplasia and hyperplasia in the treatment of acute subglottic laryngitis. **Methods** Peripheral blood samples of children with acute subglottic laryngitis were collected and the children were divided into Mild group and Moderate-Severe group. Normal bronchial epithelial cells (NHBE cells) were cultured in vitro at the gas/liquid interface (ALI). Cell experiment were grouped as follows: Group-1 (NHBE cell maintenance cultured group), Group-2 (ciliated cell differentiation induction group), Group-3 (IL-13 treatment group), and Group-4 (IL-13+anti-IL-13 monoclonal antibody treatment group). The levels of inflammatory cytokines IL-

\* 基金项目: 海南省卫生健康行业科研项目(22A200029)。

作者简介: 万思远, 男, 主治医师, 主要从事急危重症诊治研究。 △ 通信作者, E-mail: 897086741@qq.com。

10, IFN- $\gamma$  and IL-13 in peripheral blood or cell culture supernatant were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The expression levels of goblet cell differentiation marker WGA and ciliary cell differentiation marker AAT, and the levels of phosphorylated (p-) ERK 1/2 and ERK 1/2 were determined by Western blot. The Cells diameter were measured by optical microscope. In vivo experiment, 30 female C57BL/6J mice were randomly divided into Control group, Model group [(ovalbumin (OVA) and lipopolysaccharide (LPS) induced asthma mice model], and Model+anti-IL-13 antibody group (mice were treated intranasal with anti-IL-13 monoclonal antibody), 10 mice in each group. **Results** Compared with Mild group, serum levels of IL-10, IFN- $\gamma$  and IL-13 in Moderate-Severe group were increased ( $P < 0.05$ ). Compared with Group-1 cells, in Group-2 cells AAT expression was up-regulated ( $P < 0.05$ ). Compared with Group-1 cells, in Group-3 cells WGA expression was up-regulated ( $P < 0.05$ ), the levels of IL-10, IFN- $\gamma$ , and IL-13 were increased ( $P < 0.05$ ), goblet cells diameters increased ( $P < 0.05$ ), and the levels of p-ERK 1/2 were up-regulated ( $P < 0.05$ ). Compared with Group-3, in Group-4 cells WGA expression were down-regulated ( $P < 0.05$ ), IL-10, IFN- $\gamma$ , and IL-13 levels were decreased ( $P < 0.05$ ), goblet cells diameters decreased ( $P < 0.05$ ), and the levels of p-ERK 1/2 were down-regulated ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in the expression levels of ERK 1/2 among the four groups ( $P > 0.05$ ). In vivo animal experiment, compared with Control group, the bronchial inflammation score of the Model group mice was increased ( $P < 0.05$ ). Compared with Model group, the bronchial inflammation score of the Model+anti-IL-13 antibody group was decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Anti-IL-13 monoclonal antibody can inhibit airway goblet cell metaplasia and hyperplasia, and may be used to relieve acute subglottic laryngitis.

**Key words:** acute subglottic laryngitis; goblet cell; interleukin-13; anti-IL-13 monoclonal antibody

儿童急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 的流行病学特征与成人的不同。Meta 分析显示, 基于全球范围人群统计的儿童 ARDS 发病率为 3.5/100 000, 基于儿科重症监护病房 (ICU) 患者统计的发病率为 2.3%, 病死率为 33.7%, 基于不同地理位置人群统计的儿童 ARDS 发病率和病死率不同, 亚洲地区病死率 (51.0%) 高于欧洲地区 (27.3%)<sup>[1]</sup>。病毒性上呼吸道感染导致的急性喉梗阻, 也称急性声门下喉炎或哮喘, 是 6 个月至 5 岁儿童 (发病高峰年龄为 2 岁) 最常见的 ARDS 形式, 影响约 3% 的儿童<sup>[1]</sup>。急性声门下喉炎的特点是突然发作, 最常见于夜间, 多伴有吠叫性咳嗽、吸气性喘鸣、声音嘶哑和上呼吸道阻塞引起的呼吸窘迫<sup>[1]</sup>。糖皮质激素是目前治疗急性声门下喉炎的主要药物<sup>[2-3]</sup>, 但仍需开发更多新的有效药物。

急性声门下喉炎仅见于部分呼吸道感染患儿, 这与患儿喉部声门下区的解剖结构 (气道最狭窄部分直径十分接近环状软骨水平)、黏膜下肿胀和气道高反应性有关<sup>[4-5]</sup>。人气道上皮由数量占绝对优势的纤毛上皮细胞、分泌黏液的杯状细胞、俱乐部细胞和气道基底细胞组成<sup>[6]</sup>。杯状细胞通过分泌黏液将大多数环境分子包裹在黏液中, 再通过纤毛运动将污染物从气道表面清除。纤毛上皮细胞是终末分化细胞, 起源于俱乐部细胞和 (或) 气道基底细胞。气道基底细胞向纤毛上皮细胞的分化受 Notch 信号通路的严格调控。抑制 Notch 信号促进向纤毛上皮细胞分化, 而高水平的 Notch 信号促进向杯状细胞分化<sup>[7]</sup>。

白细胞介素 (IL)-13 是一种由辅助性 T 细胞 (Th 细胞) 分泌的炎症因子。IL-13 通过刺激 Notch 信号通路导致杯状细胞数量增加, 使黏液分泌增多, 并且使纤毛搏动频率降低、纤毛缩短或纤毛细胞数量降低<sup>[8]</sup>, 这些也都是哮喘和急性声门下喉炎等患者气道上皮的典型特征<sup>[8]</sup>。本研究拟探讨 IL-13 和抗 IL-13 单抗在杯状细胞化生和炎症因子分泌中的作用, 以及抗 IL-13 单抗治疗对缓解支气管炎症水平及治疗急性声门下喉炎的效果。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 30 只 7~8 周龄雌性 C57BL/6J 小鼠, 体重 20~25 克, 购自海南药物研究所有限责任公司。正常人支气管上皮细胞 (NHBE 细胞, 货号 SHC683) 购自上海赛泓瑞生物 (中国)。小气道上皮细胞完全培养液 (货号 3231) 购自 ScienCell (美国)。I 型鼠尾胶原 (货号 08-115)、牛垂体提取物 (货号 02-104)、抗菌药物/抗霉菌溶液 (10 $\times$ , 货号 A5955) 重组人 IL-13 (货号 SRP3274)、致敏 V 级卵清蛋白 (OVA, 货号 A5503)、II 级 OVA (货号 A5253)、脂多糖 (LPS, 货号 L2880) 购自 Sigma-Aldrich (美国)。无血清 DMEM/F12 培养液 (货号 11320033)、氢氧化铝 (货号 77161) 购自 Thermo Fisher (美国)。抗人 IL-10 (货号 EK110)、干扰素  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ , 货号 EK180HS) 和 IL-13 (货号 EK113) ELISA 试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司 (中国)。抗 IL-13 单抗 (货号 ab25037)、兔抗人乙酰化- $\alpha$ -微管蛋白 (AAT) 一抗 (货号

ab209348), 兔抗人麦芽凝集素(WGA)一抗(货号 ab178444)、兔抗人  $\alpha$ -Tubulin 一抗(货号 ab7291), 兔抗人磷酸化(p-)胞外信号调节蛋白激酶 1/2[ERK1/2(货号 ab201015)]、兔抗人 ERK1/2(货号 ab184699)、兔抗人 GAPDH(货号 ab8245)、辣根过氧化物酶(HRP)-标记山羊抗兔 IgG(H+L)二抗(货号 ab7090)购自 Abcam(英国)。

## 1.2 方法

**1.2.1 资料来源及标本采集** 采集来本院急诊科就诊并确诊的 33 例急性声门下喉炎患儿外周血标本, 测定其血清炎症细胞因子水平。33 例患儿中男 14 例, 女 19 例; 平均年龄( $29.8 \pm 17.6$ )个月; 平均体重( $12.7 \pm 2.7$ )kg; 根据 Westley 哮喘评分将其分为轻度组(Mild group, 0~1 分)20 例, 中-重度组(Moderate-Severe group, 2 分及以上)13 例。所有人类血液标本测定试验均经患儿监护人授权并签订知情同意书, 并通过本院伦理委员会批准。

**1.2.2 细胞培养** 正常人支气管上皮细胞(NHBE 细胞)维持培养; 将  $0.9 \times 10^5$  个 NHBE 细胞接种于  $25 \text{ cm}^2$  细胞培养瓶中, 添加小气道上皮细胞完全培养液, 置于  $37^\circ\text{C}$  恒温湿润的  $5\% \text{ CO}_2$  细胞培养箱中维持培养。

**1.2.3 正常纤毛细胞和杯状细胞诱导分化和培养** 在气/液界面(ALI)诱导 NHBE 细胞向正常纤毛细胞分化, 使用 24 孔板细胞小室进行 ALI 分化诱导培养。第 0 天, 预先在上层细胞小室放置 2 张  $18 \text{ mm} \times 18 \text{ mm}$  高硼硅玻璃盖玻片, 然后向其上预包被一层 I 型鼠尾胶原。第 1 天, 接种  $3.2 \times 10^6$  个 NHBE 细胞于 I 型鼠尾胶原上, 细胞小室和下层 24 孔板均添加含胰岛素-转铁蛋白-硒丙酮酸钠(1%), 三碘甲状腺氨酸( $10 \text{ ng/mL}$ ), 表皮生长因子( $0.5 \text{ ng/mL}$ ), 全反式维甲酸( $10 \text{ mol/L}$ ), 氢化可的松( $0.5 \text{ mg/mL}$ ), 牛血清白蛋白( $2 \text{ mg/mL}$ ), 牛垂体提取物( $30 \text{ mg/mL}$ ), 抗菌药物/抗霉菌溶液( $1 \times$ )的无血清 DMEM/F12 培养液。每 2 天换液 1 次, 连续培养 4~5 d, 倒置显微镜下观察上层细胞小室, 确定细胞汇合度接近 100% 后, 弃上层细胞培养液, 开始仅在下层 24 孔板中添加上述培养液, 建立 ALI 界面, 诱导 NHBE 细胞向正常纤毛细胞分化, 周期 12~14 d 即可完成分化<sup>[8]</sup>。在 ALI 诱导 NHBE 细胞向杯状细胞分化: 细胞培养方式和建立 ALI 界面, 同上, 在 ALI 诱导 NHBE 细胞向正常纤毛细胞分化, 不同之处在于从第 0 天预包被一层 I 型鼠尾胶原时开始, 向所有细胞培养液中添加  $5 \text{ ng/mL}$  重组人 IL-13, 连续诱导培养 14 d。

**1.2.4 体外细胞实验分组和处理方式** 细胞实验分组如下。(1)Group-1(对照组): NHBE 细胞维持培

养;(2)Group-2(纤毛细胞诱导组): NHBE 细胞 ALI 培养至正常纤毛细胞分化 14 d, 第 15 天开始向细胞培养液中添加  $10 \mu\text{L}$  磷酸盐缓冲液(PBS)处理细胞 48 h;(3)Group-3(IL-13 处理组): NHBE 细胞 ALI 培养并添加 IL-13 处理 14 d, 第 15 天开始向细胞培养液中添加  $10 \mu\text{L}$  PBS 处理细胞 48 h;(4)Group-4(IL-13+抗 IL-13 单抗处理组): NHBE 细胞 ALI 培养 IL-13 处理 14 d, 第 15 天开始向细胞培养液中添加抗 IL-13 单抗( $1 \mu\text{g/mL}$  抗 IL-13 单抗溶于  $10 \mu\text{L}$  PBS)处理细胞 48 h。

**1.2.5 ELISA** 采集患儿外周血清样本,  $-80^\circ\text{C}$  冷冻保存备用。采集“体外细胞实验分组”处理第 16 天结束后的细胞培养上清液。使用抗人 IL-10、IFN- $\gamma$  和 IL-13 ELISA 试剂盒对上述指标进行测定。

**1.2.6 免疫印迹(Western blot)** NHBE 细胞向纤毛细胞和杯状细胞分化和增殖的情况采用纤毛细胞标志物 AAT 和杯状细胞标志物 WGA 的表达水平进行测定。向 24 孔板上层细胞小室的细胞培养物中加入  $0.5 \text{ mL}$  补充有蛋白酶抑制剂混合物的 RIPA 裂解液裂解细胞。总蛋白质提取物进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。采用半干电转印法( $70 \text{ mA}$  恒流,  $4^\circ\text{C}$  电转印  $1.5 \text{ h}$ )将总蛋白质电转印至 PVDF 膜上。使用  $5\%$  脱脂奶粉对 PVDF 膜进行封闭。向膜上滴加一抗工作液,  $4^\circ\text{C}$  共同孵育过夜。次日, 向膜上滴加二抗工作液, 室温共同孵育 1 h。使用超敏增强型化学发光(ECL)底物对目的条带进行显影。一抗工作液稀释度: 兔抗人 AAT 一抗为  $1:1000$  稀释, 兔抗人 WGA 一抗为  $1:1000$  稀释, 兔抗人  $\alpha$ -actin 一抗为  $1:1000$  稀释, 兔抗人 p-ERK1/2 为  $1:1000$  稀释, 兔抗人 ERK1/2 为  $1:2000$  稀释, 兔抗人 GAPDH 为  $1:2000$  稀释, HRP 标记山羊抗兔 IgG(H+L)二抗为  $1:6000$  稀释。

**1.2.7 实验动物和分组** 30 只雌性 C57BL/6J 小鼠饲养于恒温[( $22 \pm 3$ ) $^\circ\text{C}$ ]、恒湿( $55\% \sim 70\%$ )、配备光照/黑暗(12 h/12 h)循环的标准 SPF 级鼠房, 可以自由采食和饮水。小鼠造模前先适应性饲养 1 周。将在体实验小鼠分为 Control 组、Model 组和 Model+anti-IL-13 antibody 组, 每组 10 只。所有动物实验均经本院伦理委员会批准。

**1.2.8 建立 OVA+LPS 诱导的哮喘小鼠模型** 建立 OVA+LPS 诱导的哮喘小鼠模型, Model 组和 Model+anti-IL-13 antibody 组小鼠分别于第 0、7 和 14 天腹腔注射  $100 \mu\text{g}$  致敏 V 级 OVA 和  $1 \text{ mg}$  氢氧化铝。随后分别于第 15、17、19 天鼻滴法给予  $50 \mu\text{g}$  OVA 和  $1 \mu\text{g}$  LPS。Control 组和 Model+anti-IL-13 antibody 组分别于第 21、23、25、27 天鼻滴法给予  $20 \mu\text{L}$  生理盐水或  $10 \mu\text{g}$ (溶解于  $20 \mu\text{L}$  生理盐水)抗 IL-

13 单抗。在鼻滴法操作结束后 60 min 内, Model 组和 Model + anti-IL-13 antibody 组给予 3% II 级 OVA 气雾剂致敏, Control 组给予生理盐水。第 28 天颈椎脱臼法处死所有小鼠, 采集其肺组织, 制备石蜡组织切片并进行组织病理学分析。

**1.2.9 苏木精-伊红染色(HE 染色)** 采集小鼠肺组织, 立即浸没于 4% 多聚甲醛中固定超过 48 h。石蜡包埋小鼠肺组织并制备 4 μm 石蜡组织切片。使用 HE 染色液套装, 按照常规流程染色即可。组织病理学分析支气管周围炎症水平: 0 级, 支气管周围无细胞; 1 级, 细胞数量少; 2 级, 炎性细胞环 1 层; 3 级, 有 2~4 层炎症细胞组成的圆环; 4 级, 有 >4 层炎症细胞组成的圆环<sup>[9]</sup>。

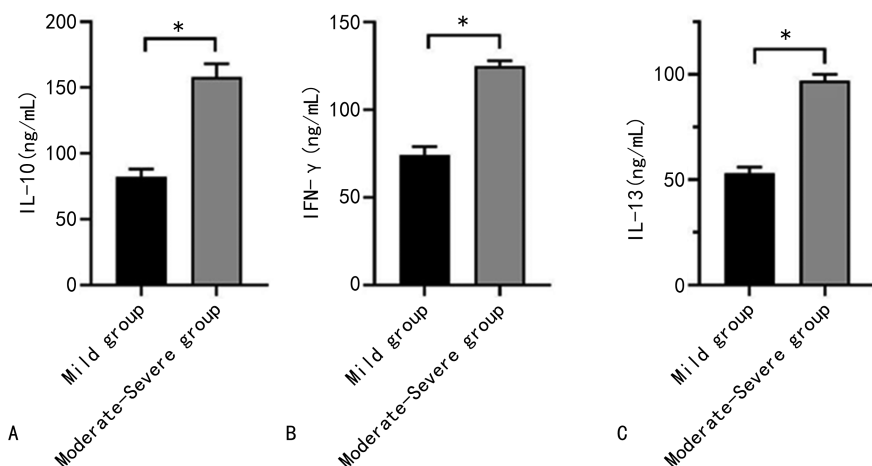
**1.3 统计学处理** 使用 GraphPad Prism v8 软件对

数据进行统计分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  的形式表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

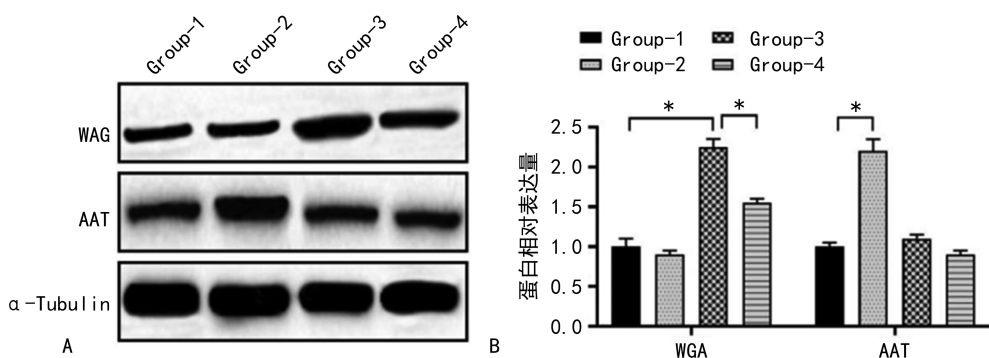
**2.1 外周血清炎症因子水平测定** 与 Mild group 相比, Moderate-Severe group 外周血清 IL-10、IFN-γ 和 IL-13 水平均升高( $P < 0.05$ )。见图 1。

**2.2 体外抗 IL-13 单抗处理抑制 NHBE 细胞向杯状细胞分化** 与 Group-1 组细胞相比, Group-3 组细胞杯状细胞分化标志物 WGA 表达水平上调( $P < 0.05$ ), Group-2 组细胞纤毛细胞分化标志物 AAT 表达水平上调( $P < 0.05$ ); 与 Group-3 组细胞相比, Group-4 组细胞杯状细胞分化标志物 WGA 表达水平下调( $P < 0.05$ )。见图 2。



注: A 为两组 IL-10 测定结果; B 为两组 IFN-γ 测定结果; C 为两组 IL-13 测定结果; \*  $P < 0.05$ 。

图 1 急性喉炎患儿外周血清炎症因子水平测定结果



注: A 为 Western blot 法测定结果; B 为蛋白相对表达统计结果; \*  $P < 0.05$ 。

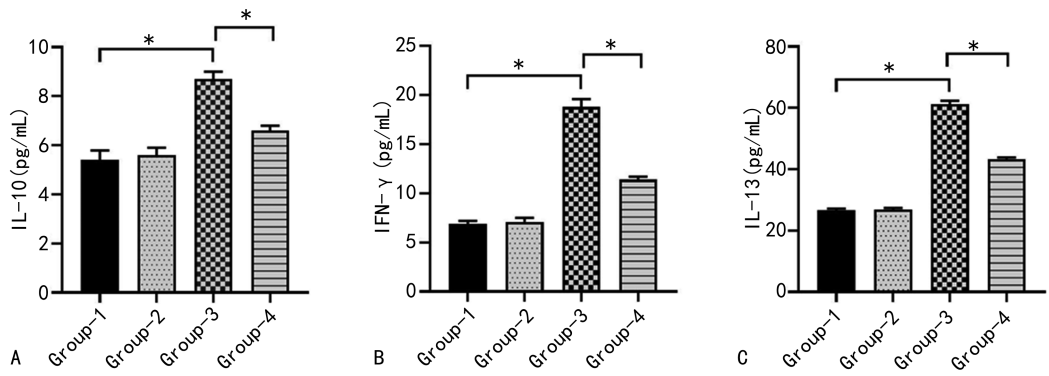
图 2 体外不同处理组细胞杯状细胞和纤毛细胞分化标志物表达水平测定结果

**2.3 体外抗 IL-13 单抗处理抑制杯状细胞大量分泌炎症因子** 与 Group-1 组细胞相比, Group-3 组细胞分泌的炎症因子 IL-10、IFN-γ 和 IL-13 水平均升高( $P < 0.05$ ); 与 Group-3 组细胞相比, Group-4 组细胞分泌的炎症因子 IL-10、IFN-γ 和 IL-13 水平均降低( $P < 0.05$ )。见图 3。

**2.4 体外抗 IL-13 单抗处理抑制杯状细胞 ERK1/2 信号通路的活化** 与 Group-1 组细胞相比, Group-3

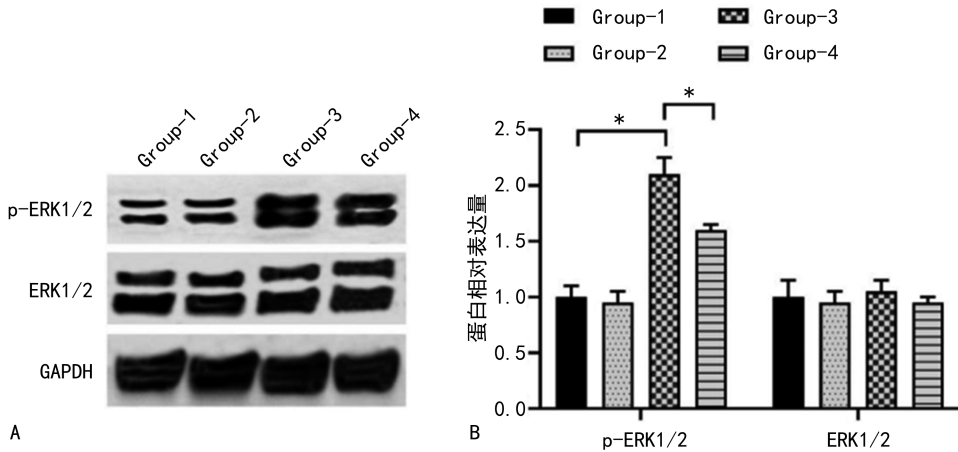
组细胞 p-ERK1/2 水平上调( $P < 0.05$ ); 与 Group-3 组细胞相比, Group-4 组细胞 p-ERK1/2 水平下调( $P < 0.05$ ); 4 组细胞 ERK1/2 水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见图 4。

**2.5 在体实验抗 IL-13 单抗处理缓解支气管炎症水平** 与 Control 组相比, Model 组支气管炎症评分升高( $P < 0.05$ ); 与 Model 组相比, Model + anti-IL-13 antibody 组支气管炎症评分降低( $P < 0.05$ )。见图 5。



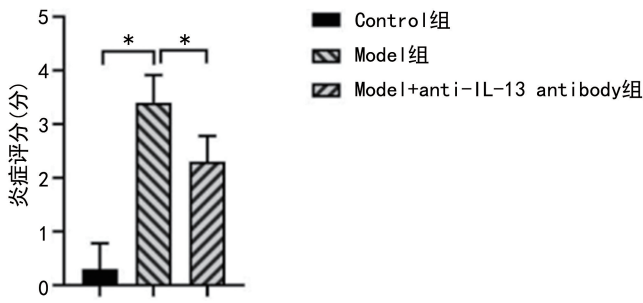
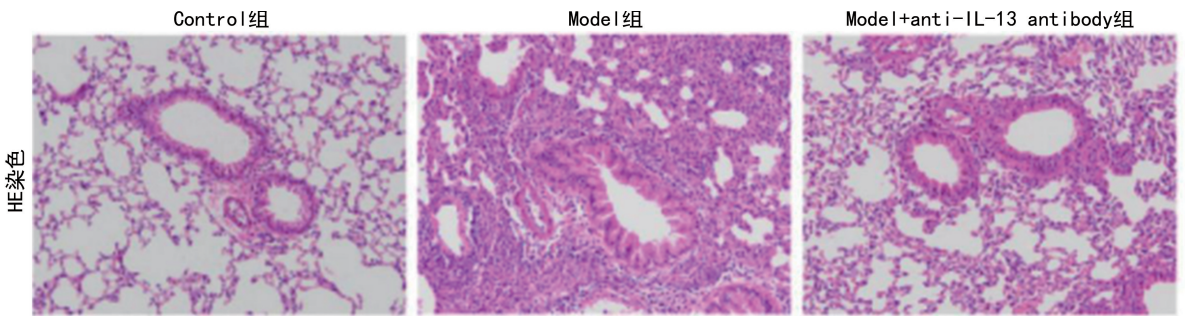
注:A为各组 IL-10 测定结果;B为各组 IFN-γ 测定结果;C为各组 IL-13 测定结果; \* P<0.05。

图 3 体外不同处理组细胞直径和分泌炎症性细胞因子水平测定结果



注:A为 Western blot 法测定结果;B为蛋白相对表达统计结果; \* P<0.05。

图 4 体外不同处理组细胞 ERK1/2 活化水平测定



注:A为组织病理学分析(HE染色, ×200)结果;B为相对定量结果; \* P<0.05。

图 5 不同处理组小鼠支气管炎症评分

### 3 讨 论

大多数急性声门下喉炎患儿体征可在 48 h 内消

退,然而仍有约 5%的患儿症状会持续长达 1 周,需要住院治疗。药物治疗和干预措施目的是减少疾病发

作的持续时间和严重程度,并尽量减少不良反应<sup>[1,10]</sup>。正常气道上皮是一种机械屏障,存在功能极化,上皮细胞可以双向分泌细胞因子,积极参与先天性和获得性免疫应答。当致病性颗粒物刺激后,细胞因子被大量分泌,引起杯状细胞化生和增生,分泌产生大量黏液,可将病毒、细菌等致病颗粒包裹,然后通过纤毛运动清除,是重要的先天免疫屏障<sup>[11]</sup>。这些细胞因子主要包括由气道上皮细胞、Th 细胞等分泌的炎症因子 IL-9、IL-13、IL-6、IFN- $\gamma$ ,以及抗炎细胞因子 IL-10 等<sup>[11]</sup>。这些细胞因子通过自分泌和旁分泌的方式,刺激气道上皮重塑和病理性增厚<sup>[6]</sup>。本研究检测了轻度和中-重度急性声门下喉炎患儿外周血血清 IL-10、IFN- $\gamma$  和 IL-13 水平,结果发现中-重度患儿上述细胞因子水平高于轻度患儿。

已有研究报道,添加 IL-13 连续诱导 14 d,可诱导正常气道上皮细胞分化为杯状细胞<sup>[8]</sup>。杯状细胞化生和增生是急性声门下喉炎进行性加重并出现上呼吸道阻塞和呼吸窘迫的重要原因<sup>[12]</sup>。有效缓解杯状细胞化生和增生或许可以快速降低疾病进展的严重程度。本研究中,ALI 培养 NHBE 细胞 14 d 可诱导其向纤毛细胞分化(Group-2),而向培养液中添加 IL-13 后连续培养 14 d 可诱导其向杯状细胞分化(Group-3);检测细胞分化标志物也发现,Group-3 杯状细胞标志物 WGA 表达水平上调,而且 Group-3 杯状细胞可高水平分泌炎症因子 IL-10、IFN- $\gamma$  和 IL-13,这与前述研究结果一致。

胞外信号调节激酶(如 ERK1/2)信号通路对于细胞存活和增殖至关重要。通过激活缺血/再灌注损伤心肌的 ERK1/2 信号通路可以促进心肌抗凋亡、存活和降低心肌损伤面积<sup>[13]</sup>。ERK1/2 和 AKT 磷酸化激活能够促进肾癌细胞存活和恶性进展<sup>[14]</sup>。在心血管疾病中,血管平滑肌细胞(VSMC)肥大与 ERK1/2 的过度磷酸化激活密切相关。降低 ERK1/2 磷酸化可降低 VSMC 的过度增殖和肥大,缓解支架内再狭窄<sup>[15]</sup>。在本研究中,对细胞内 ERK1/2 信号通路的磷酸化和活化水平测定发现,与 Group-1 相比,Group-3 细胞 p-ERK1/2 水平上调;而与 Group-3 相比,Group-4 细胞 p-ERK1/2 水平下调;说明 IL-13 炎症因子的刺激可通过上调 p-ERK1/2 的水平介导杯状细胞增生,拮抗 IL-13 可下调 p-ERK1/2 的活化水平。

目前有研究显示,通过抑制 IL-13 改善气道上皮杯状细胞化生:例如,鼻滴 miR-141-3p 模拟物以靶向抑制哮喘小鼠模型气道 IL-13 的水平 and 杯状细胞化生,可改善哮喘气道重塑和病理性黏液分泌增多<sup>[16]</sup>;克拉霉素可降低 IL-13 诱导的豚鼠哮喘模型气道杯状

细胞化生,改善气道黏膜纤毛分化<sup>[17]</sup>;抑制 IL-13 还可抑制肺纤维化<sup>[18]</sup>;使用抗 IL-13 单抗治疗,仅有一项 II 期临床试验报道,可逆转嗜酸性食管炎的上皮-间质转化<sup>[19]</sup>。已有实验研究证明,使用单一结构域的抗 IL-13 单抗治疗更具安全性和有效性<sup>[20]</sup>,说明抗 IL-13 单抗治疗具有潜在巨大的临床应用价值。本研究中,使用抗 IL-13 单抗鼻滴法治疗 OVA+LPS 诱导的哮喘模型小鼠,结果发现与 Model 组相比,Model+anti-IL-13 antibody 组小鼠支气管炎症评分降低,可明显缓解模型小鼠支气管炎症,结果提示,或许可以采用局部给药的方式应用于临床快速缓解急性声门下喉炎。

本研究中,在体外细胞水平向诱导分化的杯状细胞中加入抗 IL-13 抗体 48 h 后,杯状细胞标志物 WGA 表达水平下调,细胞分泌的炎症因子 IL-10、IFN- $\gamma$  和 IL-13 水平降低,说明抗 IL-13 抗体处理对于缓解杯状细胞高水平分泌特征,具有一定的治疗作用。尽管体动物模型水平实验通过鼻滴的给药方式,初步探讨了其缓解 OVA+LPS 诱导的哮喘小鼠模型支气管炎症水平的疗效,但是需进一步深入探讨何种形式的抗 IL-13 抗体用于治疗急性声门下喉炎更为安全、更为有效。

总之,尽管本研究尚未通过在体动物模型实验水平深入探索抗 IL-13 抗体的不同形式对治疗急性声门下喉炎的安全和有效性。然而,从目前已获得的结果可知,抗 IL-13 单抗处理可抑制气道杯状细胞化生和增生,并于在体实验中可缓解哮喘小鼠模型支气管炎症水平,提示抗 IL-13 抗体或许可用于缓解急性声门下喉炎。

## 参考文献

- [1] QURAIISHI H, LEE D J. Recurrent croup[J]. *Pediatr Clin North Am*, 2022, 69(2): 319-328.
- [2] 陈扬. 儿童急性呼吸窘迫综合征的诊治进展[J]. *中国当代儿科杂志*, 2018, 20(9): 717-723.
- [3] 陆国平, 王一雪. 儿童急性呼吸窘迫综合征的药物管理[J]. *中国当代儿科杂志*, 2018, 20(9): 697-700.
- [4] MAZUREK H, BREBOROWICZ A, DONIEC Z, et al. Acute subglottic laryngitis. Etiology, epidemiology, pathogenesis and clinical picture[J]. *Adv Respir Med*, 2019, 87(5): 308-316.
- [5] 韦妙. 急诊科小儿急性喉炎实施全方位护理的干预效果[J]. *中国医学文摘(耳鼻咽喉科学)*, 2023, 38(4): 173-175.
- [6] HELLINGS P W, STEELANT B. Epithelial barriers in allergy and asthma[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2020, 145(6): 1499-1509.
- [7] GEROVAC B J, FREGIEN N L. IL-13 inhibits multicilin expression and ciliogenesis via Janus Kinase/Signal

- Transducer and activator of transcription independently of Notch cleavage[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2017, 54(4):554-561.
- [8] KIMURA Y, SHINODA M, SHINKAI M, et al. Solithromycin inhibits IL-13-induced goblet cell hyperplasia and MUC5AC, CLCA1, and ANO1 in human bronchial epithelial cells[J]. *PeerJ*, 2023, 11:e14695.
- [9] TAKEDA K. Measurement of airway hyperresponsiveness in mice[J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2506:95-109.
- [10] 韦妙. 急诊科小儿急性喉炎实施全方位护理的干预效果[J]. *中国医学文摘(耳鼻咽喉科学)*, 2023, 38(4):173-175.
- [11] MASPERO J, ADIR Y, AL-AHMAD M, et al. Type 2 inflammation in asthma and other airway diseases[J]. *ERJ Open Res*, 2022, 8(3):00576-2021.
- [12] LI E, KNIGHT J M, WU Y F, et al. Airway mycosis in allergic airway disease[J]. *Adv Immunol*, 2019, 142:85-140.
- [13] LEUNG S W, LAI J H, WU J C, et al. Neuroprotective effects of emodin against ischemia/reperfusion injury through activating ERK-1/2 signaling pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(8):2899.
- [14] LIU Y, CHEN J B, ZHANG M, et al. SGK2 promotes renal cancer progression via enhancing ERK 1/2 and AKT phosphorylation[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(7):2756-2767.
- [15] ZHANG J, LIU Y, LONG M, et al. Inhibitory effect of CP-25 on intimal formation and vascular hyperplasia via suppression of GRK2/ERK1/2/EV11 signaling[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2020, 694:108601.
- [16] SIDDIQUI S, JOHANSSON K, JOO A, et al. Epithelial miR-141 regulates IL-13-induced airway mucus production[J]. *JCI Insight*, 2021, 6(5):e139019.
- [17] HARA K, KONDO M, TSUJI M, et al. Clarithromycin suppresses IL-13-induced goblet cell metaplasia via the TMEM16A-dependent pathway in guinea pig airway epithelial cells[J]. *Respir Investig*, 2019, 57(1):79-88.
- [18] KOMIYA K, OHTA S, ARIMA K, et al. Clarithromycin attenuates IL-13-induced periostin production in human lung fibroblasts[J]. *Respir Res*, 2017, 18(1):37.
- [19] GANN P H, DEATON R J, MCMAHON N, et al. An anti-IL-13 antibody reverses epithelial-mesenchymal transition biomarkers in eosinophilic esophagitis: phase 2 trial results[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2020, 146(2):367-376.
- [20] WALKER K, BARAVALLE R, HOLYFIELD R, et al. Identification and characterisation of anti-IL-13 inhibitory single domain antibodies provides new insights into receptor selectivity and attractive opportunities for drug discovery [J]. *Front Immunol*, 2023, 14:1216967.
- (收稿日期:2024-06-12 修回日期:2024-09-22)
- 
- (上接第 167 页)
- [13] 赫捷, 陈万青, 沈洪兵, 等. 中国人群肝癌筛查指南(2022, 北京)[J]. *中华消化外科杂志*, 2022, 21(8):971-996.
- [14] 中华预防医学会肝胆胰疾病预防与控制专业委员会, 中国研究型医院学会肝病专业委员会, 中华医学会肝病学分会, 等. 原发性肝癌的分层筛查与监测指南(2020 版)[J]. *临床肝胆病杂志*, 2021, 37(2):286-295.
- [15] 张倍宁, 王文娜, 马娅琼, 等. 肝细胞癌上调的长链非编码 RNA 在肝癌中的表达及作用机制[J]. *癌症进展*, 2023, 21(18):1973-1977.
- [16] XIE W, WANG Y, ZHANG Y, et al. Single-nucleotide polymorphism rs4142441 and MYC co-modulated long non-coding RNA OSER1-AS1 suppresses non-small cell lung cancer by sequestering ELAVL1 [J]. *Cancer Sci*, 2021, 112(6):2272-2286.
- [17] 李燕, 马俊旗, 马蓉. LncRNA OSER1-AS1 通过调控 miR-433-3p 影响宫颈癌细胞增殖、迁移及侵袭[J]. *中国细胞生物学学报*, 2020, 42(11):1909-1917.
- [18] 甘景卓, 李树义, 董雪燕, 等. 血清 LncRNA OSER1-AS1 及 HOTAIR 表达与原发肝癌病理特征及预后的相关性分析[J]. *重庆医学*, 2023, 52(6):834-839.
- [19] LIU S J, ZANG Y W, HUANG C J, et al. Downregulation of Rab23 inhibits hepatocellular carcinoma by repressing SHH signaling pathway [J]. *Cancer Rep (Hoboken)*, 2024, 7(1):e1921.
- [20] 甘景卓. 原发性肝癌中 LncRNA OSER1-AS1 与 miR-612 表达的相关性及生物学意义[J]. *现代消化及介入诊疗*, 2022, 27(1):45-50.
- [21] 谢惠君, RASHED N, 宁勇, 等. 循环 microRNA 作为肝细胞癌标志物的研究现状[J]. *临床肝胆病杂志*, 2021, 37(2):448-451.
- [22] 尹梦媛, 孙路遥, 张春玉. 免疫调节因子 miR-433-3p 通过靶向 MAPK8 及 GRB2 调控卵巢癌进展的机制研究[J]. *国际免疫学杂志*, 2023, 46(4):351-362.
- [23] 陈虹, 崔婧, 罗晨, 等. miR-433-3p 靶向 HP1BP3 抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力[J]. *中国病理生理杂志*, 2023, 39(11):1964-1972.
- [24] GÉCZI D, NAGY B, SZILÁGYI M, et al. Analysis of circulating miRNA profile in plasma samples of glioblastoma patients[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(10):5058.
- [25] 万智双, 熊丁, 曹宸. miR-433-3p 靶向 MAPK8 对肝癌细胞 MHCC97H 增殖、凋亡和迁移的调控作用[J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(1):57-62.
- [26] 王丽, 甘景卓, 王丽丽, 等. 肝细胞肝癌中 LncRNA OSER1-AS1 靶向调控 miR-433-3p 的作用[J]. *生物医学工程与临床*, 2024, 28(2):265-271.
- (收稿日期:2024-07-19 修回日期:2024-09-09)