

魏丹丹,汪丽婷,龙洁,等. 重度哮喘动物模型构建的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(9): 69-78.

Wei DD, Wang LT, Long J, et al. Advances in establishment of animal models of severe asthma [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(9): 69-78.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.09.009

重度哮喘动物模型构建的研究进展

魏丹丹¹,汪丽婷¹,龙洁¹,陈艳焦^{1,2},王宇^{1,2},杨永清^{1,2},徐玉东^{1,2*}

(1.上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院,上海 201203;2.上海市针灸经络研究所,上海 200030)

【摘要】 重度哮喘(severe asthma,SA)患者需要大剂量激素,在联合其他药物治疗才能够维持症状控制,或即使采用上述治疗仍不可控,是目前哮喘研究的难点和热点之一。建立一种稳定可复制、高度模拟SA临床病理特征的实验动物模型,对于深入研究SA的发病机制、药物治疗和预防具有重要意义。本文通过回顾与整理国内外近十年来SA动物模型相关的实验研究,从动物选择、模型制备方法、模型病理表型等方面总结和分析SA动物模型构建的最新进展,为基于动物模型开展的SA基础研究提供参考依据。

【关键词】 重度哮喘;动物模型;过敏原;气道炎症;气道高反应性

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2023)09-0069-10

Advances in establishment of animal models of severe asthma

WEI Dandan¹, WANG Liting¹, LONG Jie¹, CHEN Yanjiao^{1,2}, WANG Yu^{1,2}, YANG Yongqing^{1,2}, XU Yudong^{1,2*}

(1. Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China. 2. Shanghai Research Institute of Acupuncture and Meridian, Shanghai 200030)

【Abstract】 Severe asthma, which requires high doses of glucocorticoids in combination with other medications to maintain symptom control or is uncontrollable even with these treatments, is currently a challenge in the clinical management of asthma. The establishment of a stable and reproducible animal model that closely mimics the pathophysiological and clinical characteristics of patients with severe asthma is important for in-depth study of severe asthma pathogenesis, identifying potential therapeutic targets, and developing targeted drugs. This article reviews studies related to the establishment of animal models of severe asthma in the past 10 years and summarizes the recent progress in the establishment and evaluation of animal models of severe asthma from three aspects: selection of the animal, establishment protocols, and model pathological phenotypes. This review summarizes and analyzes the current progress in the establishment of SA animal models, and provides a reference for severe asthma basic research using animal models.

【Keywords】 severe asthma; animal models; allergens; airway inflammation; airway hyperresponsiveness

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

支气管哮喘是一种以慢性气道炎症为主要病理特征的复杂、异质性疾病,临床表现为发作性咳嗽、气促、胸闷,以及伴有哮鸣音的呼气性呼吸困难。重度哮喘(severe asthma,SA)在确诊哮喘和控

制合并症的基础上,需要使用大剂量吸入性皮质激素(corticosteroids,CS),并联合控制药物(如长效 β_2 受体激动剂、白三烯调节剂或茶碱),且/或过去1年中有 $\geq 50\%$ 的时间需使用全身性CS控制,

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81973952,81973951,82105013);上海市青年英才扬帆计划项目(20YF1445300);上海市中医药传承创新发展三年行动计划项目(ZY(2021-2023)-0208)。

【作者简介】 魏丹丹(1997—),女,硕士,研究方向:针灸治疗哮喘的免疫学机制。E-mail: wdd_april@163.com

【通信作者】 徐玉东(1981—),男,博士,研究员,研究方向:针灸治疗哮喘的临床与基础研究。E-mail: xuyudong@shutcm.edu.cn

或者采用以上治疗症状仍不可控。与轻中度哮喘患者相比,SA 患者诱导痰中嗜酸性粒细胞、中性粒细胞等炎症细胞数量升高更为明显,气道重塑病理变化更加显著^[1]。SA 虽然只占全部哮喘人数的 5%~10%,却是哮喘致残、致死的主要原因^[2]。SA 的发病机制和治疗靶点成为目前哮喘研究的热点之一。

建立一种稳定、可复制、便捷,并且能够重现人类 SA 临床表型和主要病理特征的实验动物模型,对于研究 SA 的发病机制、药物治疗和预防具有重要意义。本文以“重症哮喘/重度哮喘/难治性哮喘/激素抵抗型哮喘/激素不敏感型哮喘”为关键词,检索中国知网、万方、PubMed 等文献数据库收录的近十年来国内外已发表动物实验类研究,将从动物选择、模型制备方法、病理表型等方面对最近十年来 SA 模型的构建方法与特点进行总结和分析,为基于 SA 动物模型开展的相关基础研究提供参考依据。

1 重度哮喘模型常用实验动物

目前 SA 模型常用实验动物既有小鼠、大鼠^[3]、豚鼠^[4]、兔等,也有研究使用大型动物马进行建模。对近十年的 SA 动物模型文献中动物种属进行统计,数据显示小鼠使用率高达 90%,说明小鼠是 SA 研究最常用的实验动物。小鼠容易诱发气道炎症、气道高反应性(airway hyperreactivity, AHR)、气道黏液高分泌等病理变化,因此更适合用于构建哮喘模型。其中,尤以 BALB/c 品系小鼠最常使用,更容易诱发出明显的气道炎症和 AHR,其造模成功率较高^[5],其次为 C57BL/6(包括 C57BL/6J 和 C57BL/6N)、A/J 品系,其中 A/J 小鼠易感哮喘,而且对致敏剂的反应也很强。

由于小鼠的生长发育较快,在 4~6 周时身体各个器官已逐渐成熟,6~8 周即可达到性成熟,所以一般实验研究选择正值青壮年的 6~8 周小鼠。根据实验目的不同也可选择不同周龄的小鼠,有研究者利用 10~14 周龄小鼠构建 SA 模型,探索 SA 的慢性高炎症负荷对恐惧行为和大脑神经免疫通路的影响^[6]。此外,有研究使用屋尘螨(house dust mite, HDM)诱导 BALB/c 小鼠构建过敏性哮喘模型,发现雌性小鼠支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中嗜酸性粒细胞、中性粒细胞和巨噬细胞的数量以及血清 HDM 特异性 IgE 水平均

显著高于雄性小鼠,但在 C57BL/6NJ 小鼠 BALF 中,雄性小鼠嗜酸性粒细胞的积累高于雌性小鼠;不仅如此,不同性别、品系的小鼠哮喘模型肺细胞因子表达也存在差异,比如雌性 BALB/c 小鼠相较于雄鼠更趋向于 Th17 细胞免疫反应,IL-17A 表达水平更高,而 C57BL/6NJ 雌性小鼠哮喘模型的肺中 Th1 细胞因子变化更为明显^[7]。

2 重度哮喘模型的制备方法

2.1 过敏原的选择

用于制备 SA 动物模型的过敏原主要可分为以下几类:(1)环境过敏原:包括 HDM、蟑螂提取物(cockroach, CRA)、二氧化氮(NO₂)等;(2)病原体过敏原:包括转录腺病毒^[8]、流感病毒 H3N2^[9]、衣原体、流感嗜血杆菌^[10]、呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)等;(3)化合物过敏原:包括卵清蛋白(ovalbumin, OVA)、三硝基苯(trinitro phenyl, TNP)^[11]、对甲苯二异氰酸酯(toluenediisocyanate, TDI)^[12]等。对近十年来 SA 模型文献进行统计,结果显示,约 51%的研究选用 OVA 作为造模的过敏原、约 42%的研究选用 HDM 作为造模的过敏原。目前,最常用的过敏原是 OVA 和 HDM,其中,OVA 是动物哮喘模型应用最广泛的经典过敏原。HDM 是哮喘患者中最易接触到的环境过敏原之一,临床哮喘患者对其过敏率高达 85%,使用 HDM 诱导 SA 模型可以更好地模拟人类哮喘的发生过程。

2.1.1 单一过敏原造模

指只使用一种过敏原制备 SA 动物模型的造模方法。有研究者认为白介素 IL-13(interleukin, IL-13)主要介导哮喘炎症反应,使用含有小鼠 IL-13 基因的腺病毒颗粒作为单一过敏原,发现能够诱导出具有气道炎症、AHR 和粘液分泌、中性粒细胞增多、类固醇激素抵抗(steroids-resistant)等特征的动物模型^[8]。此外,化合物 TDI 常用于制造泡沫塑料及橡胶、绝缘漆等,是职业哮喘发病常见过敏原。有研究者发现获得职业哮喘的患者通常对 CS 治疗反应差,因此将 TDI 作为单一过敏原进行小鼠致敏发现能够显著诱发产生 Th2 和 Th17 反应以及激素抵抗^[12]。

2.1.2 复合过敏原造模

指使用两种及两种以上过敏原制备 SA 动物模型的造模方法。复合过敏原多以 OVA 和/或 HDM

联合其他过敏原,如 OVA+NO₂^[13]、HDM+流感病毒 H3N2^[9]、OVA+衣原体、流感嗜血杆菌^[10]、OVA+TNP^[11]、OVA+HDM+CRA^[14]等。有研究者通过 OVA 联合衣原体、流感嗜血杆菌诱导小鼠发现,感染病菌能够抑制嗜酸性粒细胞,但不能抑制 AHR, BALF 中性粒细胞有明显升高,使用 CS 治疗后气道炎症和 AHR 未改善,提示使用病菌复合过敏原可以诱导类固醇激素抵抗性哮喘(steroids-resistant asthma)模型^[10]。除病菌以外,常用的 OVA 和 HDM 也可以联合使用作为复合过敏原。有研究者使用 OVA+CRA+HDM 多重过敏原对小鼠腹腔致敏及滴鼻激发,与使用单一过敏原相比,复合过敏原更易诱导小鼠产生激素抵抗^[14]。

2.1.3 单一过敏原和复合过敏原的比较

使用单一过敏原造模的优点在于方法简单、造模时间短、成本低,但如 IL-13 腺病毒、TDI 作为动物造模的过敏原并不常用;使用复合过敏原的优点在于造模成功率高,更易产生 SA,而且复合过敏原能够更好的模拟临床复杂的环境-免疫的交互作用,但复合过敏原造模流程相对复杂、造模时间长、成本高。此外,对过敏原类型的选择也和实验研究目的密切相关,比如 TDI 诱导的 SA 模型,除了诱发 Th2 细胞炎症反应以外,还能够产生显著的 Th17 炎症反应,用于探索 Th17 细胞在 SA 发病中的作用与机制^[12];OVA+HDM 等可以构建高 Th2 型嗜酸粒细胞的 SA 模型^[14];HDM+LPS 被用于构建低 Th2 型和高中性粒细胞的 SA 模型^[15]。

2.2 常见佐剂及其选择

2.2.1 常见佐剂

佐剂是一类能够改变免疫应答类型、发挥辅助作用的非特异性物质。目前,临床上使用最多的佐剂为铝佐剂,包括氢氧化铝(Al(OH)₃)和磷酸铝等。研究表明,铝佐剂可以诱导机体产生强烈的体液免疫,还能够促进树突状细胞(dendritic cells, DCs)的募集和活化、释放细胞因子及其他介质诱发炎症反应^[16],因此在 SA 造模中常配合使用铝佐剂加强过敏原的致敏效果。

完全弗式佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)属于油乳类佐剂,可诱导体液免疫反应,增强机体细胞免疫应答能力。在 SA 模型中 CFA 常和 HDM 配合使用诱导增强免疫反应。有研究应用 HDM/CFA(1 μg/μL, 100 μL)皮下注射致敏小鼠,14 d 后使用 HDM(5 μg/μL, 20 μL)激发,模型小鼠

的肺部中性粒细胞显著增多并表现出激素抵抗等特征^[17]。

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)属于阴离子脂质佐剂,是革兰氏阴性菌独特的病原相关分子模式,LPS 可持续释放到环境中并且显著污染室内灰尘,是哮喘严重程度的增强因素^[18]。有研究者采用 LPS 作为佐剂联合 OVA 建立 SA 模型,发现该模型气道炎症以中性粒细胞浸润为主^[3]。有学者给予小鼠模型不同剂量 LPS(1 μg 或 10 μg),发现 OVA 联合高剂量的 LPS 更易建立高中性粒细胞的 SA 哮喘模型,该模型对 CS 的治疗无效^[19]。

环二鸟苷酸(cyclic diguanylate, c-di-GMP)属于核酸类佐剂,存在于多种导致 SA 的感染细菌中,c-di-GMP 已被证明是一种有效的粘膜佐剂,可诱导 Th1/Th17 反应并伴有低 Th2 反应^[20]。有研究者使用 HDM 和 c-di-GMP 致敏小鼠,随后用 HDM 和低剂量的 c-di-GMP 激发,可以成功诱导出小鼠的 AHR,且明显高于单独使用 HDM 诱导的小鼠模型,此外该模型也表现出中性粒细胞显著增多^[21]。

2.2.2 佐剂的选择

佐剂的使用可以提高免疫应答作用,但同时佐剂的使用离不开过敏原的属性,常见 SA 造模多使用 OVA+Al(OH)₃、HDM+CFA 或 HDM+LPS 等方式。铝佐剂和 OVA 通常使用腹腔/皮下注射致敏的方式,在体内诱导 CD4⁺ T 细胞向 Th2 细胞分化,可增强 OVA 的免疫原性。LPS 同样为环境中的过敏原,多配合 HDM 进行滴鼻或气管滴注的方式致敏,CFA 作为油乳类佐剂,常用腹腔/皮下注射的方式致敏,在滴鼻和腹腔两种方式的加持下,提高造模成功率。

2.3 致敏与激发方法

SA 模型在致敏和激发的持续时间、时间间隔、给药途径、给药剂量等虽存在一定差异,但也有以下 5 个共同点:(1)动物多次致敏,两次致敏间隔通常为 7~14 d;(2)过敏原激发多持续 4~7 d,能够引起较强烈的 AHR、气道炎症等特征;(3)给药方式通常为滴鼻、气管给药、雾化吸入、腹腔注射、皮下注射等。其中,腹腔注射多在致敏阶段使用,气管给药和滴鼻多在激发阶段使用;(4)过敏原剂量:致敏阶段使用低剂量,激发阶段使用高剂量;(5)多使用 Al(OH)₃、LPS 或 CFA 作为佐剂,能够获得较为稳定、可重复的 SA 动物模型。(具体的方法和内容详见表 1)

表 1 重度哮喘模型的构建方法
Table 1 Methods of establishing severe asthma models

品系 Strain	性别 Gender	周龄 Week age	致敏方法 Sensitization methods	激发方法 Challenge methods	检测指标 Detection indicators
C57BL/6 ^[13]	♀	6~8	Day 0 雾化吸入 NO ₂ 1 h, Day 1~3 雾化吸入 1% OVA Day 0 nebulized NO ₂ for 1 hour, Day 1~3 nebulized inhalation with 1% OVA	Day 14~16 雾化吸入 OVA Day 14 ~ 16 nebulized inhalation of OVA	AHR、炎症细胞分类计数、细胞因子分析、激素抵抗 AHR, differential count of inflammatory cells, cytokine analysis, corticosteroid resistance
C57BL/6J ^[9]	♂	8	使用 5 μg/μL HDM 滴鼻, 5 次/周, 连续 5 周 Use 5 μg/μL HDM by nasal drops, 5 times a week, for 5 consecutive weeks	每周一滴鼻含有流感病毒的 20 TCID ₅₀ Every Monday nasal drops 20 TCID ₅₀ which contains of influenza virus	AHR、炎症细胞分类计数、肺组织病理学分析、细胞因子分析、激素抵抗 AHR, differential count of inflammatory cells, lung histopathological analysis, cytokine analysis, corticosteroid resistance
C57BL/6J, BALB/c ^[21]	♂	8~10	Day 1, 3, 5 滴鼻 25 μg HDM+5 μg ci-di-GMP Day 1, 3, 5 nasal drops 25 μg HDM+5 μg ci-di-GMP	Day 11, 18, 25 滴鼻 25 μg HDM+0.5 μg c-di-GMP, Day 12~13, 19~20, 26~27 滴鼻 25 μg HDM Day 11, 18, and 25 nasal drops 25 μg HDM+0.5 μg c-di-GMP, Day 12~13, 19~20, and 26~27 nasal drops 25 μg HDM	AHR、炎症细胞分类计数、气道上皮细胞增殖、细胞因子的分析、激素抵抗 AHR, differential count of inflammatory cells, proliferation of airway epithelial cells, cytokine analysis, corticosteroid resistance
BALB/c ^[11]	♂	6~8	Day 0, 7 腹腔注射 10 μg TNP-OVA 复合物 Day 0, 7 intraperitoneal injection with 10 μg TNP-OVA complex	Day 14~20, 滴鼻 2 μg TNP-OVA-IgE 复合物 Day 14~20 nasal drops 2 μg of TNP-OVA-IgE complex	炎症细胞分类计数、细胞因子分析 Differential count of inflammatory cells, cytokine analysis
BALB/c ^[12]	♂	6~8	Day 1, 8 用 0.3% TDI 对小鼠进行皮肤致敏(每耳 20 μL) Day 1, 8 use 0.3% TDI for skin sensitization of mice (20 μL per ear)	Day 15, 18, 21 使用 3% TDI 进行压缩空气雾化 3 h Day 15, 18, and 21 use 3% TDI for compressed air atomization for 3 hours	炎症细胞分类计数、肺组织病理学分析、细胞因子分析、激素抵抗 Differential count of inflammatory cells, lung histopathological analysis, cytokine analysis, corticosteroid resistance
A/J, BALB/c ^[22]	♂	/	Day 0, 14 皮下注射 50 μg OVA (吸附于 5 mg 的 Al(OH) ₃ , 溶于 200 μL 的生理盐水) Day 0, 14 subcutaneous injections of 50 μg OVA (adsorbed in 5 mg of Al(OH) ₃ , dissolved in 200 μL of saline)	Day 9~22 滴鼻 25 μg HDM (溶于 25 μL 生理盐水) Day 9~22 nasal drops 25 μg HDM (dissolved in 25 μL normal saline)	AHR、白细胞浸润、组织重塑、细胞因子和磷酸化受体 p-38、MKP-1 水平 AHR, leukocyte infiltration, tissue remodeling, levels of cytokines and phosphorylated receptors p-38, MKP-1
C57BL/6J ^[23]	/	/	Day 1 背部皮下注射 100 μL 乳化液, 其中含有 50 μL CFA 辅以 4 mg/mL 的结核分枝杆菌提取物和 25 μg HDM Day 1 subcutaneous injection of 100 μL of emulsion which containing 50 μL of CFA, and supplemented with 4 mg/mL of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> extract and 25 μg of HDM in the back	Day 19~22, 鼻内吸入 10 μg HDM 和 40 μL 生理盐水 Day 19~22, intranasally inhale with 10 μg HDM and 40 μL saline	AHR、炎症细胞分类计数、细胞因子分析、肺蛋白分析、肺组织病理学分析、激素抵抗 AHR, differential count of inflammatory cells, cytokine analysis, lung protein analysis, lung histopathological analysis, corticosteroid resistance
BALB/c ^[14]	♀	6~8	Day 1, 14, 21 腹腔注射 20 μg OVA+2.5 μg CRA+2.5 μg HDM +明矾 Day 1, 14 and 21 intraperitoneal injection of 20 μg OVA + 2.5 μg CRA+2.5 μg HDM +alum	Day 26 气管交替给药 20 μg OVA 或 CRA 或 HDM, 1 周两次 Day 26 tracheal administration of 20 μg OVA or CRA or HDM alternately, twice a week	AHR、炎症细胞分类计数、趋化因子和细胞因子的分析、胶原蛋白分析、激素抵抗 AHR, differential count of inflammatory cells, chemokine and cytokine analysis, collagen analysis, corticosteroid resistance

续表 1

品系 Strain	性别 Gender	周龄 Week age	致敏方法 Sensitization methods	激发方法 Challenge methods	检测指标 Detection indicators
Sprague-Dawley ^[3]	♂	7~8	Day 0, 7 腹腔注射 OVA+明矾, 气管给药 10 μg LPS Day 0, 7 intraperitoneal injection of OVA + alum, tracheal administration of 10 μg LPS	Day 14~53, 雾化吸入 OVA, 5 次/周, Day 21, 35 气管给药 10 μg LPS Day 14 ~ 53, nebulized OVA inhalation, 5 times/week, Day 21, 35 tracheal administration of 10 μg LPS	炎症细胞分类计数、肺组织病理学分析、细胞因子分析、激素抵抗 Differential count of inflammatory cells, lung histopathological analysis, cytokine analysis, corticosteroid resistance
C57BL/6 ^[24]	♀	7	Day 0, 7 皮下注射 50 μg HDM Day 0, 7 subcutaneously inject 50 μg HDM	Day 14~17 滴鼻 15 μg HDM Day 14~17 nasal drops 15 μg HDM	炎症细胞分类计数、肺组织病理学分析 Differential count of inflammatory cells, lung histopathological analysis
C57BL/6 ^[25]	♀	6~7	Day 0~2 腹腔注射 100 μg HDM +100 μg OVA+15 μg LPS Day 0~2 Intraperitoneal injection of 100 μg HDM+100 μg OVA+15 μg LPS	Day 14~15, 18~19 使用 OVA 雾化 30 min Day 14 ~ 15, 18 ~ 19 use OVA atomization for 30 minutes	小鼠行为学、AHR、炎症细胞分类计数、和细胞因子分析、肺组织病理学分析 Mouse behavior, AHR, differential count of inflammatory cells, lung histopathological analysis
BALB/c ^[26]	♂	6~8	Day 0 皮下注射 100 μg HDM +CFA Day 0 subcutaneous injection of 100 μg HDM+CFA	Day 14 滴鼻 25 μg HDM+30 μg 鼻病毒替代物 poly(I;C) Day 14 nasal drops 25 μg HDM+30 μg rhinovirus substitute poly(I;C)	AHR、炎症细胞分类计数、肺组织病理学分析、激素抵抗 AHR, differential count of inflammatory cells, lung histopathological analysis, corticosteroid resistance
BALB/c ^[27]	♂	6~8	Day 1, 7, 14 腹腔注射 50 μg OVA + 4 mg 明矾 Day 1, 7, and 14 intraperitoneal injection of 50 μg OVA + 4 mg Alum	Day 21~27 雾化吸入 3% OVA 30 min/d, Day 24, 26, 28 使用 13-S-HODE(0.6 mg/kg) Day 21~27 nebulized inhalation of 3% OVA 30 min/d, Day 24, 26, and 28 using 13-S-HODE (0.6 mg/kg)	AHR、炎症细胞分类计数、肺组织病理学分析、细胞因子检测分析、激素抵抗 AHR, differential count of inflammatory cells, lung histopathological analysis, cytokine analysis, corticosteroid resistance
Dunkin-Hartley ^[4]	♂	/	Day 1, 4, 7 腹腔注射 150 μg OVA+100 mg Al(OH) ₃ Day 1, 4, and 7 intraperitoneal injections of 150 μg OVA+100 mg Al(OH) ₃	Day 19, 21 雾化吸入 300 μg/mL OVA, Day 21 雾化吸入 30 μg/mL LPS Nebulized inhalation of 300 μg/mL OVA on Day 19 and 21, nebulized inhalation of 30 μg/mL LPS on Day 21	AHR、炎症细胞分类计数、肺组织病理学分析、细胞因子分析、激素抵抗 AHR, differential count of inflammatory cells, lung histopathological analysis, cytokine analysis, corticosteroid resistance
BALB/c ^[28]	/	6~8	25 μg HDM(溶于 50 μL 生理盐水)滴鼻, 5 次/周, 共 7 周 25 μg HDM (dissolved in 50 μL normal saline) nasal drops, 5 times/week, a total of 7 weeks	第 7 周的最后 3 d, HDM 致敏前 30 min 滴鼻接种 1×10 ⁶ TCID ₅₀ HRV1B In the last 3 days of the 7 th week, nasal inoculation with 1×10 ⁶ TCID ₅₀ HRV1B for 30 minutes before HDM sensitization	炎症细胞分类计数、肺组织病理学分析、细胞因子分析、激素抵抗 Differential count of inflammatory cells, lung histopathological analysis, cytokine analysis, corticosteroid resistance
BALB/c ^[29]	♀	/	Day 0 皮下注射 100 μg HDM +CFA Day 0 subcutaneously inject 100 μg HDM+CFA	Day 14 滴鼻 100 μg HDM (溶于 35 μL 的生理盐水) Day 14 intranasally 100 μg HDM (dissolved in 35 μL of saline)	AHR、炎症细胞分类计数、肺组织病理学分析、细胞因子分析、激素抵抗 AHR, differential count of inflammatory cells, lung histopathological analysis, cytokine analysis, corticosteroid resistance
BALB/c ^[30]	♀	8~10	Day 0 皮下注射 20 μg OVA(溶于 50 μL PBS)+50 μL CFA Day 0 subcutaneous injection of 20 μg OVA (dissolved in 50 μL PBS) + 50 μL CFA	Day 21~23 雾化吸入 3% OVA 10 min Day 21~23 nebulized inhalation of 3% OVA for 10 minutes	肺组织病理学分析、细胞因子分析、激素抵抗 Lung histopathological analysis, cytokine analysis, corticosteroid resistance

续表 1

品系 Strain	性别 Gender	周龄 Week age	致敏方法 Sensitization methods	激发方法 Challenge methods	检测指标 Detection indicators
BALB/c ^[15]	♀	6~8	Day 0~2 滴鼻 40 μL 溶液 (含 25 μg HDM+1 μg LPS) Day 0~2 nasal drops 40 μL solution (containing 25 μg HDM+ 1 μg LPS)	Day 14~15, 18~19 滴鼻 40 μL 乳液 (含有 6.25 μg HDM+0.25 μg LPS) Day 14~15, 18~19 nasal drop 40 μL emulsion (containing 6.25 μg HDM+ 0.25 μg LPS)	AHR、炎症细胞分类计数、肺组织 病理学分析、细胞因子分子、激素 抵抗 AHR, differential count of inflammatory cells, lung histopathological analysis, cytokine analysis, corticosteroid resistance

3 重度哮喘动物模型的病理表型分析

3.1 气道炎症

SA 炎症反应可根据气道 Th2 数量分为高 Th2 型和低 Th2 型。高 Th2 型 SA 以嗜酸性粒细胞浸润为主,气道细胞炎症因子升高以 Th2 分泌的细胞因子为主。IL-4 可诱导幼稚 T 细胞向 Th2 细胞分化,IL-5 促进骨髓中嗜酸性粒细胞的成熟并释放 IL-13,使嗜酸粒细胞向气道迁移,通过作用于气道平滑肌细胞引起气道反应性^[31]。有研究者使用复合过敏原制备 SA 模型,与使用 OVA 或 HDM 等单一过敏原诱导的过敏性哮喘模型比较,OVA+HDM+CRA 多重过敏原诱导 SA 模型小鼠的白细胞总数明显增多,其中嗜酸性粒细胞和巨噬细胞数量显著升高,肺部 Th2 型细胞因子 IL-4、IL-5 的表达水平是普通哮喘组的 3 倍,IL-13 和 Th1 型细胞因子 IFN- γ 、IL-12 表达水平也显著升高^[14]。目前,针对高 Th2 型 SA 分泌高水平 IgE、IL-5、IL-13 等炎症介质,已开发出相应的靶向药物用于临床治疗,而低 Th2 型 SA 仍缺乏有效的生物标志物。

低 Th2 型(或称为 Th2/Th17 型、中性粒细胞型)SA 模型以肺中性粒细胞浸润为主要特征,通常表现为较重的气道炎症反应和呼吸道重塑病理变化,且对激素治疗反应不敏感,气道细胞因子表达以 Th1 细胞分泌的 IFN- γ 和 IL-12 以及 Th17 细胞分泌的 IL-17A 为主,其中 IL-17A 被证明可以降低人气管上皮对 CS 的敏感性^[32]。采用 HDM 和 LPS 联合诱导低 Th2 型 SA 小鼠模型,其肺组织炎症细胞总数及巨噬细胞计数经地塞米松(dexamethasone, Dex)治疗后显著下降,而肺中淋巴细胞和中性粒细胞浸润及 AHR 不能被有效抑制,在 Dex 治疗后反而促进 Th1 细胞因子 IFN- γ 、IL-12 以及 Th17 细胞因子 IL-17A 等的表达增加^[15]。用高剂量 LPS 联合三磷酸腺苷(adenosinetriphosphate, ATP)刺激过敏原

装载后的 DCs,并且将这些细胞通过鼻腔滴注的方式致敏小鼠,在过敏原激发后该模型表现出 SA 的特征,气道中性粒细胞和 Th17 细胞数量明显增多,IL-17A 分泌水平显著升高,与气道滴注低剂量 LPS 刺激的过敏原转载 DCs 相比,该模型组的气道重塑病理变化显著增强。进一步研究发现,在中性粒细胞炎症基础上,IL-17A 对气道结构细胞(如成纤维细胞等)的作用加重了该模型的气道重塑水平^[33]。也有研究表明低 Th2 型 SA 小鼠模型对于抗 IL-17F 的治疗有效,而对抗 IL-17A 的治疗无效,提示 IL-17F 在 SA 炎症病理反应中发挥重要作用^[12]。

3.2 气道高反应性

AHR 是哮喘的基本特征,能够直接或间接通过运动、冷空气、过度换气诱发,引起气道平滑肌收缩,从而导致气道变窄和气流受限。哮喘的 AHR 主要有两种表现形式:其一表现为短暂的、可诱发的,通常发生在过敏原暴露后,在吸入 CS 治疗或环境控制后可迅速缓解,这种短暂的 AHR 对间接刺激更为明显,研究认为其与气道炎症病理密切相关;其二表现为持久性,多见于 SA,在吸入 CS 或环境控制后仍难以缓解,多继发于慢性气道炎症所导致的结构性气道变化^[34]。

在哮喘患者中,气道敏感性、反应性和最大反应都明显增强。但是,与轻中度哮喘相比,SA 患者的气道敏感性更高。在相同的 1 s 秒内用力呼气量(FEV₁)的变化率下,引起 SA 的气道最大反应的刺激物浓度低于轻中度哮喘患者^[35]。同样,在 SA 动物模型中,有学者发现患有牧场哮喘(pasture asthma, PA)的马匹具有重度 AHR,与对照马匹相比,患有 PA 的马匹吸入乙酰甲胆碱(methacholine, Mch)后,肺阻力的平均百分比变化明显更大,且诱发 PA 马匹气道收缩反应的过敏原浓度更低,表明 PA 马匹气道敏感性更强。同时低浓度 Mch (<1 mg/mL)引起 PA 的马匹肺阻力增加 40%,而对照组

在较高剂量(8~16 mg/mL)下肺阻力仍无明显变化^[36]。

除了牧草马哮喘,有研究者通过 OVA 特异性 Th1 细胞过继转输,诱发 Th1 细胞介导的 SA 小鼠模型,与普通哮喘模型组相比,发现 SA 组小鼠肺阻力升高更加明显,AHR 更显著增强^[37]。不仅如此,有研究者使用 HDM 和流感病毒 H3N2 诱导 SA 小鼠模型,分别在第 4、8、10、15 天检测肺阻力,与仅使用 HDM 诱导的普通哮喘组相比,流感病毒 H3N2 诱导的 SA 小鼠表现出较早、较高的气道阻力值,AHR 持续时间延长,且对低浓度的 Mch 敏感性更高^[9]。

3.3 气道重塑

由于哮喘气道炎症造成气道组织结构反复损伤刺激,最终引起的气道壁结构变化被称为气道重塑。其主要病理特征包括气道平滑肌细胞增殖肥大、上皮完整性丧失、上皮-间质转化、杯状细胞化生、粘液分泌过多、上皮下纤维化、网状基底膜增厚和血管生成等,均可导致不可逆转的肺功能丧失^[38]。SA 患者与轻中度哮喘患者比较,气道重塑更为明显,主要表现为支气管壁增厚,支气管内径变窄,支气管壁面积百分比增大,导致有效通气面积减小气道阻力显著增大,构成阻塞性通气障碍^[39]。

利用 OVA+CRA+HDM 多重过敏原诱导小鼠 SA 模型,发现小鼠气道上皮杯状细胞内黏液分泌降低,而细胞外的黏液栓塞明显增强,同时平滑肌层厚度和肺组织纤维化程度高于轻中度哮喘模型^[14]。在 OVA 诱导的哮喘小鼠模型过敏原激发阶段(第 5~55 天),使小鼠反复暴露于低剂量的流感嗜血杆菌(1×10^7 CFU,每周 1 次,共 8 次),能够使小鼠气道 Th2 细胞主导的嗜酸粒细胞炎症表型,转变为 Th17 细胞主导的中性粒细胞炎症表型,同时导致哮喘模型气道黏液分泌增加和气道重塑加重,主要表现为上皮下和血管周围空间的胶原蛋白沉积和肌肉层增厚, α -平滑肌肌动蛋白和几种主要胶原蛋白增加^[40]。此外,Th17 相关细胞因子 IL-17A 和 IL-22 在中性粒细胞型 SA 中发挥了重要作用,并参与气道重塑。IL-17A 在 SA 哮喘患者痰液中增加,诱导上皮细胞、内皮细胞和成纤维细胞表达“促纤维化”细胞因子,并在体外研究中激发人气道平滑肌细胞迁移,IL-22 可促进肌成纤维细胞分化、上皮-间质转化以及体外平滑肌的增殖、迁移,在慢性 SA 小鼠模型中,气道重塑以上皮下纤维化、粘液过度生成、

平滑肌细胞增生和肥大、高表达 IL-17A 和 IL-22 为主要特征^[41]。由此看来,SA 哮喘小鼠模型气道细胞纤维化高、细胞过度增殖迁移、粘液分泌加重,气道重塑与中性粒细胞型炎症密切相关。

由于小鼠的气道壁是一种较薄的组织结构,因此小鼠哮喘模型中气道重塑的研究较少涉及气道平滑肌的变化,主要聚焦于气道上皮下纤维化。而大鼠哮喘模型在过敏原致敏和反复激发后,通常能够表现出气道平滑肌增生肥厚等组织病理学变化,这些气道重塑变化与大鼠模型的 AHR 程度密切相关^[42]。但是,有研究指出大鼠类固醇抵抗组与皮质类固醇激素敏感哮喘组相比,两者在杯状细胞增生、上皮下胶原厚度和气道平滑肌重塑方面无显著差异^[3]。因此,SA 动物模型中气道重塑的研究存在一定生理性局限,其在 SA 疾病中的病理表型差异性以及诊断价值,仍有待阐明。

3.4 激素抵抗

临床上,SA 患者尽管接受了高剂量的激素治疗,但仍会出现难以控制的哮喘症状,被称为激素抵抗性哮喘。有证据表明糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor,GR)异常、核组蛋白去乙酰化酶 2(histone deacetylase 2,HDAC2)活性降低等可导致激素抵抗的发生和发展^[43]。此外,非编码 RNA、细胞自噬等因素在激素抵抗中的作用也是近年研究的热点。

通过 OVA 和衣原体病毒、流感嗜血杆菌、流感病毒 H1N1、RSV 合并感染 BALB/c 小鼠诱导 SSIAD(severe steroid-insensitive allergic airway disease)新型小鼠模型,小鼠肺部 miRNA-21 表达水平增加,而 miR-21 靶磷酸酶和张力蛋白同系物(PTEN)的表达减少,并且与 AKT 磷酸化水平增加和 HDAC2 水平降低有关,通过抑制 miR-21 或 PI3K,小鼠对 CS 治疗的敏感性恢复^[44]。反复接触过敏原也可导致小鼠对 CS 不敏感,与单次 LPS 激发相比,A/J 小鼠经 3 d 的 LPS(0.1 mg/mL,每只 40 μ L,每天两次)鼻内激发,HDAC2 和核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)水平显著降低,AKT 磷酸化水平增加,丙酸氟替卡松对其气道炎症的抑制作用明显减弱^[45]。总之,激素抵抗是 SA 的重要病理特征,制备新型 SA 模型能够更深入地研究其发病机制,并开发新的治疗药物。

3.5 其他

除气道炎症、AHR、气道重塑和激素抵抗等病

理表型外,SA 动物模型也表现出不同的分子表型,如 NOD 样受体蛋白 3(NOD-like receptor protein 3, NLRP3)、外泌体、miRNA、唾液结合免疫球蛋白样凝集素 9(sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin-9, Siglec-9) 等特征性分子,这些分子可能成为 SA 的特征性诊断标记物或治疗靶点。

NLRP3 炎性小体是一种存在于细胞浆中的多蛋白复合物,由凋亡相关斑点样蛋白(ACS)、半胱氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)以及 NOD 样受体蛋白组成,它是一种重要的炎症介质,参与多种炎症反应核免疫调节过程^[46]。使用衣原体、流感嗜血杆菌以及 OVA 诱导 SA 小鼠模型,表现为气道中性粒细胞、NLRP3、IL-1 β 表达增高,靶向 NLRP3 的治疗可以减少 IL-1 β 的产生,降低 SA 模型中性粒细胞炎症和 AHR^[10]。临床证据也表明,SA 患者肺组织、诱导痰中 NLRP3 和 IL-1 β 的表达增多,这可能与中性粒细胞比例增加以及哮喘控制不佳有关^[47]。此外,有研究显示参与 SA 发病机制的所有类型的细胞都会产生和分泌外泌体,外泌体含有蛋白质、核酸、脂质、细胞因子和生长因子以及共刺激分子,因此可以调节 SA 中的免疫炎症反应^[48]。miRNA 是一种内源性非编码小 RNA,它在转录后水平调节细胞功能,参与调节哮喘等肺疾病,其中 miR-9 可调节 GR 信号和 AHR,miR-21 能够抑制 Th1 相关细胞因子的表达。哮喘小鼠敲除 miR-21 表现为嗜酸粒细胞炎症减少,Th1 型细胞因子增加^[49]。因此,miR-9 和 miR-21 可以作为 SA 模型的辅助检测指标。此外,Siglec-9 是特异性表达于中性粒细胞的抑制性唾液酸聚糖受体,当 Siglec-9 与特异性配体或抗体结合,可诱导中性粒细胞凋亡或自噬,有助于促进中性粒细胞炎症消退,是治疗 SA 中性粒细胞增多的潜在靶标^[50]。

4 总结与展望

目前,SA 动物模型的制备在动物品系、过敏原种类、致敏和造模方法等方面存在诸多差异,通过总结近十年的 SA 模型造模方案,发现动物选择多以 BALB/c 小鼠为主。致敏原可分为环境过敏原、病原体过敏原、化合物过敏原三大类,根据过敏原使用形式的不同,还可分为单一过敏原和复合过敏原,多配合佐剂来增强模型动物的免疫应答反应。动物接受过敏原致敏次数通常不少于 2 次,并通过多次反复的过敏原激发进行诱导,过敏原的给药方

式多选用皮下或腹腔注射、气管滴入或雾化吸入等。

在 SA 动物模型病理表型方面,以高 Th2 型或低 Th2 型区分表型,伴有气道炎症、气道重塑、AHR 加重,细胞因子显著增高、激素抵抗等特征。SA 动物模型可表现出较早、较高的气道阻力值,气道敏感性更高,且 AHR 持续时间延长,气道重塑病理变化加重。

此外,SA 动物模型的研究仍存在许多问题。(1)临床 SA 患者对异体蛋白过敏引发哮喘的较少,而动物造模时选用 OVA 腹腔或皮下注射致敏具有明显的局限性,使用病毒感染、环境中提取过敏原更符合临床;(2)在研究激素抵抗时多选用 Dex 腹腔注射,而临床较少使用 Dex 治疗,多使用吸入性氢化可的松或甲泼尼龙;(3)目前 SA 动物模型的表型较为简单,还不能充分模拟 SA 患者的复杂临床表型,选用合适的过敏原(多重联合过敏原等)、佐剂以及致敏和激发方案,同时利用基因编辑等方法可能有助于构建具有特定临床表型的 SA 模型;(4)在 SA 动物模型中通过传统的气道炎症、AHR、气道重塑、激素抵抗等指标进行评估以外,可以结合 NLRP3 炎性小体、外泌体和特定 miRNA 等进行 SA 病理表型分析。

综上所述,今后还需针对 SA 临床表型进一步优化动物模型的构建方法,建立能够更好地模拟人类 SA 病理变化的实验动物模型,进而加深对 SA 发病机制的研究,发现新的干预靶点,并最终开发出新的 SA 预防和治疗药物。

参考文献:

- [1] Hastie AT, Mauger DT, Denlinger LC, et al. Mixed sputum granulocyte longitudinal impact on lung function in the severe asthma research program [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2021, 203(7): 882-892.
- [2] Reddel HK, Bacharier LB, Bateman ED, et al. Global Initiative for Asthma Strategy 2021: executive summary and rationale for key changes [J]. *Eur Respir J*, 2021, 59(1): 2102730.
- [3] Qin Q, Chen X, Feng J, et al. Low-intensity aerobic exercise training attenuates airway inflammation and remodeling in a rat model of steroid-resistant asthma [J]. *Chin Med J*, 2014, 127(17): 3058-3064.
- [4] Lowe AP, Thomas RS, Nials AT, et al. LPS exacerbates functional and inflammatory responses to ovalbumin and decreases sensitivity to inhaled fluticasone propionate in a Guinea pig model of asthma [J]. *Br J Pharmacol*, 2015, 172(10): 2588-2603.
- [5] Han M, Rajput C, Ishikawa T, et al. Small animal models of respiratory viral infection related to asthma [J]. *Viruses*, 2018,

- 10(12): 682.
- [6] Lewkowich I, Ahlbrand R, Johnson E, et al. Modulation of fear behavior and neuroimmune alterations in house dust mite exposed A/J mice, a model of severe asthma [J]. *Brain Behav Immun*, 2020, 88: 688–698.
- [7] Mostafa DHD, Hemshekhar M, Piyadasa H, et al. Characterization of sex-related differences in allergen house dust mite-challenged airway inflammation, in two different strains of mice [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 20837.
- [8] Therien AG, Bernier V, Weicker S, et al. Adenovirus IL-13-induced airway disease in mice: a corticosteroid-resistant model of severe asthma [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008, 39(1): 26–35.
- [9] Ravanetti L, Dijkhuis A, Sabogal Pineros YS, et al. An early innate response underlies severe influenza-induced exacerbations of asthma in a novel steroid-insensitive and anti-IL-5-responsive mouse model [J]. *Allergy*, 2017, 72(5): 737–753.
- [10] Kim RY, Pinkerton JW, Essilfie AT, et al. Role for NLRP3 inflammasome-mediated, IL-1 β -dependent responses in severe, steroid-resistant asthma [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2017, 196(3): 283–297.
- [11] Sagar S, Verheijden KA, Georgiou NA, et al. Differential regulation of inflammation and immunity in mild and severe experimental asthma [J]. *Mediators Inflamm*, 2013, 2013: 808470.
- [12] Chen R, Zhang Q, Chen S, et al. IL-17F, rather than IL-17A, underlies airway inflammation in a steroid-insensitive toluene diisocyanate-induced asthma model [J]. *Eur Respir J*, 2019, 53(4): 1801510.
- [13] Martin RA, Ather JL, Daggett R, et al. The endogenous Th17 response in NO₂⁻ promoted allergic airway disease is dispensable for airway hyperresponsiveness and distinct from Th17 adoptive transfer [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e74730.
- [14] Duechs MJ, Tilp C, Tomsic C, et al. Development of a novel severe triple allergen asthma model in mice which is resistant to dexamethasone and partially resistant to TLR7 and TLR9 agonist treatment [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e91223.
- [15] 王楠, 陈子, 葛林阳, 等. 模拟临床的中性粒细胞性激素抵抗型支气管哮喘小鼠模型的建立及意义 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2020, 43(1): 40–46.
- [16] Kooijman S, Brummelman J, van Els CACM, et al. Novel identified aluminum hydroxide-induced pathways prove monocyte activation and pro-inflammatory preparedness [J]. *J Proteomics*, 2018, 175: 144–155.
- [17] Allam VSRR, Sukkar MB. Investigating MIF in mouse models of severe corticosteroid-resistant neutrophilic asthma [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2080: 203–212.
- [18] Qian G, Jiang W, Zou B, et al. LPS inactivation by a host lipase allows lung epithelial cell sensitization for allergic asthma [J]. *J Exp Med*, 2018, 215(9): 2397–2412.
- [19] Yu QL, Chen Z. Establishment of different experimental asthma models in mice [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(3): 2492–2498.
- [20] Yan H, Chen W. The promise and challenges of cyclic dinucleotides as molecular adjuvants for vaccine development [J]. *Vaccines*, 2021, 9(8): 917.
- [21] Raundhal M, Morse C, Khare A, et al. High IFN- γ and low SLPI mark severe asthma in mice and humans [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(8): 3037–3050.
- [22] Serra MF, Cotias AC, Pão CRR, et al. Repeated allergen exposure in A/J mice causes steroid-insensitive asthma via a defect in glucocorticoid receptor bioavailability [J]. *J Immunol*, 2018, 201(3): 851–860.
- [23] Menson KE, Mank MM, Reed LF, et al. Therapeutic efficacy of IL-17A neutralization with corticosteroid treatment in a model of antigen-driven mixed-granulocytic asthma [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2020, 319(4): L693–L709.
- [24] Raftis EJ, Delday MI, Cowie P, et al. *Bifidobacterium* breve MRx0004 protects against airway inflammation in a severe asthma model by suppressing both neutrophil and eosinophil lung infiltration [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 12024.
- [25] 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.
- [26] De Alba J, Otal R, Calama E, et al. Double-stranded RNA evokes exacerbation in a mouse model of corticosteroid refractory asthma [J]. *Clin Sci*, 2015, 129(11): 973–987.
- [27] Panda L, Gheware A, Rehman R, et al. Linoleic acid metabolite leads to steroid resistant asthma features partially through NF- κ B [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 9565.
- [28] Rochlitzer S, Hoymann HG, Müller M, et al. No exacerbation but impaired anti-viral mechanisms in a rhinovirus-chronic allergic asthma mouse model [J]. *Clin Sci*, 2014, 126(1): 55–65.
- [29] McAlinden KD, Kota A, Haghgi M, et al. Pharmacologic inhibition of vacuolar H⁺ ATPase attenuates features of severe asthma in mice [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2020, 62(1): 117–120.
- [30] Yamazumi Y, Sasaki O, Suyama-Fuchino S, et al. The RNA-binding protein Mex-3B plays critical roles in the development of steroid-resistant neutrophilic airway inflammation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 519(2): 220–226.
- [31] Agache I. Severe asthma phenotypes and endotypes [J]. *Semin Immunol*, 2019, 46: 101301.
- [32] Rahmawati SF, Vos R, Bos IST, et al. Function-specific IL-17A and dexamethasone interactions in primary human airway epithelial cells [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 11110.
- [33] Peters M, Köhler-Bachmann S, Lenz-Habijan T, et al. Influence of an allergen-specific Th17 response on remodeling of the airways [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2016, 54(3): 350–358.
- [34] Xiong DJP, Martin JG, Lauzon AM. Airway smooth muscle function in asthma [J]. *Front Physiol*, 2022, 13: 993406.
- [35] Gauvreau GM, Davis BE, Scadding G, et al. Allergen

- provocation tests in respiratory research; building on 50 years of experience [J]. *Eur Respir J*, 2022, 60(2): 2102782.
- [36] Hunter CL, Bowser JE, Wills RW, et al. Airway hyperresponsiveness is severe and persistent in an equine model of neutrophilic asthma [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2020, 62(6): 808–810.
- [37] Kobayashi M, Ashino S, Shiohama Y, et al. IFN- γ elevates airway hyper-responsiveness via up-regulation of neurokinin A/neurokinin-2 receptor signaling in a severe asthma model [J]. *Eur J Immunol*, 2012, 42(2): 393–402.
- [38] Boulet LP. Airway remodeling in asthma; update on mechanisms and therapeutic approaches [J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2018, 24(1): 56–62.
- [39] Ye WJ, Xu WG, Guo XJ, et al. Differences in airway remodeling and airway inflammation among moderate-severe asthma clinical phenotypes [J]. *J Thorac Dis*, 2017, 9(9): 2904–2914.
- [40] Yang X, Wang Y, Zhao S, et al. Long-term exposure to low-dose *Haemophilus influenzae* during allergic airway disease drives a steroid-resistant neutrophilic inflammation and promotes airway remodeling [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(38): 24898–24913.
- [41] Margelidon-Cozzolino V, Tscopoulos A, Chenivresse C, et al. Role of Th17 cytokines in airway remodeling in asthma and therapy perspectives [J]. *Front Allergy*, 2022, 3: 806391.
- [42] Ramos-Barbón D, Ludwig MS, Martin JG. Airway remodeling [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2004, 27(1): 3–21.
- [43] Maltby S, Tay HL, Yang M, et al. Mouse models of severe asthma; understanding the mechanisms of steroid resistance, tissue remodelling and disease exacerbation [J]. *Respirology*, 2017, 22(5): 874–885.
- [44] Kim RY, Horvat JC, Pinkerton JW, et al. microRNA-21 drives severe, steroid-insensitive experimental asthma by amplifying phosphoinositide 3-kinase-mediated suppression of histone deacetylase 2 [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 139(2): 519–532.
- [45] Ueda K, Nishimoto Y, Kimura G, et al. Repeated lipopolysaccharide exposure causes corticosteroid insensitive airway inflammation via activation of phosphoinositide-3-kinase δ pathway [J]. *Biochem Biophys Rep*, 2016, 7: 367–373.
- [46] Li Z, Guo J, Bi L. Role of the NLRP3 inflammasome in autoimmune diseases [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 130: 110542.
- [47] Galvão I, Kim RY, Shen S, et al. Emerging therapeutic targets and preclinical models for severe asthma [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2020, 24(9): 845–857.
- [48] Haj-Salem I, Plante S, Gounni AS, et al. Fibroblast-derived exosomes promote epithelial cell proliferation through TGF- β 2 signalling pathway in severe asthma [J]. *Allergy*, 2018, 73(1): 178–186.
- [49] Lu TX, Hartner J, Lim EJ, et al. microRNA-21 limits *in vivo* immune response-mediated activation of the IL-12/IFN- γ pathway, Th1 polarization, and the severity of delayed-type hypersensitivity [J]. *J Immunol*, 2011, 187(6): 3362–3373.
- [50] Chen Z, Bai FF, Han L, et al. Targeting neutrophils in severe asthma via siglec-9 [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2018, 175(1–2): 5–15.

[收稿日期]2023-02-17