

重组屋尘螨 2 类变应原疫苗免疫治疗小鼠 过敏性气道炎症的研究

喻海琼^{1,2}, 刘志刚^{1*}, 于琨瑛³, 许卓谦², 丘劲¹

【摘要】 目的 观察以聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)材料为佐剂制备的重组屋尘螨 2 类变应原(rDer p 2)纳米微粒疫苗(DEPN)对小鼠过敏性气道炎症的影响,并探讨其免疫治疗机制。方法 制备 PLGA-rDer p 2 纳米粒子并鉴定其特性。40 只 BALB/c 小鼠随机分为 5 组, A 组(对照组)均给予生理盐水(100 μ l)。B、C、D 和 E 组腹部皮下注射屋尘螨粗浸液(10 μ g)免疫小鼠致敏,然后分别用 PBS(100 μ l)、2 mg 空白 PLGA 粒子(empty PLGA, EP)、100 μ g rDer p 2、2 mg 的 DEPN 纳米疫苗(载有 100 μ g rDer p 2)皮下注射进行免疫治疗,连续免疫治疗 3 d, 1 次/d, 各组用 rDer p 2 (50 μ g)滴鼻激发,激发后第 2 天剖杀,收集支气管肺泡灌洗液(BALF)并对细胞进行总计数和分类计数;HE 染色和 PAS 染色(Periodic Acid-Schiff Stain)观察小鼠肺部组织炎症和支气管黏液分泌;用 ELISA 检测 BALF 和脾细胞培养上清的细胞因子(IL-4、IFN- γ)和血清中变应原特异性 IgG2a 和 IgE 抗体浓度。结果 B、C 组肺部呈明显的变态反应性炎症, D、E 组变应原诱导的肺部嗜酸粒细胞浸润和黏液分泌比 B、C 组显著减轻。BALF 中的细胞总数 B 组比 A 组明显增多,分类细胞以中性和嗜酸粒细胞为主,超过 50%。rDer p 2 特异性 IgE 抗体水平, D 组(0.93 \pm 0.04)和 E 组(0.77 \pm 0.10)均低于 B 组(1.14 \pm 0.10) (P <0.01); 特异性 IgG2a 抗体水平, D 组(1.02 \pm 0.01)和 E 组(1.17 \pm 0.46)均高于 B 组(0.14 \pm 0.01) (P <0.01)。在 BALF 中, D 组[(55.60 \pm 3.79) pg/ml]和 E 组[(48.60 \pm 4.50) pg/ml] IL-4 水平均低于 B 组[(78.90 \pm 6.07) pg/ml] (P <0.01); IFN- γ 水平 E 组[(68.50 \pm 2.87) pg/ml] 显著高于 B 组[(27.30 \pm 3.51) pg/ml] (P <0.01)。脾细胞上清的 IL-4 水平, D 组[(56.3 \pm 4.85) pg/ml]和 E 组[(40.2 \pm 4.36) pg/ml]显著低于 B 组[(81.20 \pm 6.84) pg/ml] (P <0.01); IFN- γ 水平, E 组 [(70.20 \pm 3.85) pg/ml] 显著高于 B 组[(34.60 \pm 2.25) pg/ml]。结论 DEPN 免疫治疗可抑制小鼠肺部过敏炎症,其机制可能与调节 Th1/Th2 平衡有关。

【关键词】 聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA); 屋尘螨; 变应原; 纳米微粒; 过敏性气道炎症; 小鼠

中图分类号:R384.42,R392.1 文献标识码:A

Immunotherapy with Recombinant House Dust Mite Group 2 Allergen Vaccine Inhibits Allergic Airway Inflammation in Mice

YU Hai-qiong^{1,2}, LIU Zhi-gang^{1*}, YU Kun-ying³, XU Zuo-qian², QIU Jing¹

(1 Allergy and Immunology Institute, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China; 2 Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, China; 3 College of Medicine, Nanchang University, Nanchang 330006, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the efficacy and mechanism of subcutaneously given recombinant Der p 2 entrapped PLGA nanoparticles (DEPN) on mouse model with allergic airway inflammation. **Methods** 40 BALB/c mice were randomly divided into 5 groups, group A (normal control) were treated with saline (100 μ l) all the time, groups B, C, D and E were sensitized intraperitoneally with crude dust mite extracts (10 μ g) and then subcutaneously treated respectively with PBS (100 μ l), 2 mg empty PLGA (EP), 100 μ g rDer p 2, and 2 mg DEPN (loaded with 100 μ g rDer p 2) for 3 times, once per day, followed by intranasal challenge of 50 μ g rDer p 2. One day post challenge, mice were sacrificed and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected. Number of the total cells and eosinophils was determined, and airway inflammation and mucus secretion were analyzed by haematoxylin and eosin (H&E) staining and periodic acid-Schiff (PAS) staining. Level of cytokines in the supernatant of splenocyte culture was assayed by ELISA. Level of rDer p 2 specific IgG2a and IgE in the sera was determined by ELISA. **Results** The lung histology showed development of eosinophil infiltration in the airway of mice in groups B and C. The lung inflammation and mucus secretion in groups D and E were significantly alleviated than that of groups B and C. Number of total cells (63.50 \pm 5.12) and

基金项目: 国家 863 高技术发展计划项目(No.2002AA214011); 国家自然科学基金(No.30471505、30271226); 粤港关键领域重点突破项目(No.20054982207); 广东省科技计划重大项目(No.2003 C104019); 深圳市科技计划(No.200218)

作者单位: 1 深圳大学过敏反应与免疫学研究所, 深圳 518060; 2 广州医学院, 广州 510182; 3 南昌大学医学院, 南昌 330006

* 通讯作者, E-mail: LZG@szu.edu.cn

eosinophils (15.32 ± 3.04) in BALF decreased in group B. Compared with group B, the number of total cells in groups D (55.3 ± 5.20) $\times 10^4$ /ml and E (41.00 ± 4.91) $\times 10^4$ /ml greatly decreased ($P < 0.05$), and same with that of eosinophils in groups D (9.56 ± 1.09) $\times 10^4$ /ml and E (3.22 ± 0.31) $\times 10^4$ /ml. The rDer p 2 specific IgE and IgG2a antibodies in group B were 1.14 ± 0.105 and 0.14 ± 0.07 respectively. The level of specific IgE was significantly lower ($P < 0.01$) in groups D (0.93 ± 0.04) and E (0.77 ± 0.09), and that of IgG2a in groups D (1.02 ± 0.01) and E (1.17 ± 0.46) were significantly higher ($P < 0.01$) than that in group B. The level of IL-4 and IFN- γ in BALF in group B were (78.90 ± 6.07) pg/ml and (27.30 ± 3.51) pg/ml respectively. IL-4 in groups D and E was (55.6 ± 3.79) pg/ml and (48.6 ± 4.50) pg/ml respectively, significantly lower ($P < 0.01$) than that of group B; while IFN- γ (68.50 ± 2.87) pg/ml in group E was significantly higher than that of group B ($P < 0.01$). IL-4 released from cultured splenocytes in groups D and E was (56.30 ± 4.85) pg/ml and (40.20 ± 4.36) pg/ml respectively, significantly lower than that in group B (81.2 ± 6.84 pg/ml) ($P < 0.01$). The released IFN- γ in group E was (70.20 ± 3.85) pg/ml, significantly higher than in group B (34.60 ± 2.25) pg/ml ($P < 0.01$). **Conclusion** DEPN can inhibit airway allergic inflammation, its mechanism may be relevant to a balance of Th1 and Th2.

【Key words】 Poly (D, L-lactic-co-glycolic) acid (PLGA); House dust mite; Allergen; Nanoparticle; Allergic airway inflammation; Mouse

Supported by the National 973 Project(No.2002AA214011); the National Natural Science Foundation of China (No.30471505、30271226); Guangdong and Hongkong Key Project (No.20054982207); Guangdong Province Science and Technology Project (No.2003 C104019); Shenzhen City Science and Technology Project(No.200218)

* Corresponding author, E-mail: lzg@szu.edu.cn

过敏性疾病是目前世界性重大卫生问题之一。常见的有过敏性哮喘和过敏性鼻炎等。哮喘是一种以肺部嗜酸粒细胞浸润和对各种激发因子产生气道高反应为特征的慢性气道炎性疾病，是一种常见病和多发病，且发病率有逐年上升的趋势^[1,2]。过敏性哮喘的特征是特应性个体异常增高的 Th2 型反应。Th2 型反应表现为增多的 Th2 细胞及其分泌的细胞因子，如白细胞介素 4 (IL-4)、IL-5、IL-9、IL-13 等，它们在哮喘的发生和发展中起重要的作用^[3]。哮喘发生与室内过敏原暴露密切相关，其中屋尘螨变应原是诱导哮喘与其它变态反应疾病最重要的变应原之一^[4,5]。研究已证实，哮喘与过敏性鼻炎患者血清中屋尘螨 Der p 2 抗原特异性 IgE 抗体阳性率为 79.2%，屋尘螨 Der p 2 抗原是儿童与成人哮喘发作的主要危险因素之一^[6]。

目前的药物治疗并不能从根本上改变其自然病程。经研究证明，特异性免疫治疗(SIT)，即皮下注射逐渐增加剂量的特异性变应原制剂可有效调节过敏性疾病异常的免疫应答反应。成功的 SIT 伴随有 Th2 细胞的减少和 Th1 型细胞因子分泌水平的增高^[7,8]。但 SIT 有诱导系统过敏反应的危险，这种副作用的发生与变应原疫苗本身的缺陷和变应原粗提物诱导的血清高 IgE 抗体产生有关^[9]。且皮下注射操作麻烦，病人顺应性较差。

聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)是一种安全的生物可降解材料，可促进变应原直接被抗原呈递细胞吸收^[10]，在生物体内缓慢释放变应原^[11]。Scholl 等^[12]的

试验还证实，用 PLGA 包裹的变应原可有效的诱导抗体 IgG 的产生，而致敏性比铝佐剂显著降低。但屋尘螨 Der p 2-PLGA 纳米疫苗在治疗过敏性气道炎症中的作用，目前未见相关报道。作者等通过物理方法制备包裹屋尘螨 Der p 2 变应原的 PLGA 纳米疫苗，研究该疫苗对重组 Der p 2 变应原诱导的小鼠过敏性气道炎症的免疫保护作用，并探讨其作用机制。

材料与方 法

1 实验材料

PLGA 购自四川琢新生物材料有限公司；IL-4、 γ 干扰素 (IFN- γ) 细胞因子试剂盒购于美国 R&D 公司；辣根过氧化物酶偶联二羊抗鼠 IgE 抗体 (HRP-IgE) 与 HRP-IgG2a 抗体购于美国 SouthBiot 公司；二辛可宁酸 (BCA) 试剂盒为美国 Pierce 公司产品；刘氏染液 (Liu's stain) 购自珠海贝索生物技术有限公司；其他试剂均为国产分析纯试剂。6~8 周龄 BALB/c 小鼠 (SPF 级) 由广州医学院实验动物中心提供。重组屋尘螨 Der p 2 变应原和屋尘螨变应原粗浸液由深圳大学生命科学学院变态反应疾病研究室提供。

2 PLGA-Der p2 纳米疫苗的制备及检测

取 50 mg PLGA 溶于 1 ml 二氯甲烷(DCM)中，加入 100 μ l Der p 2 溶液(100 mg/ml)，超声 1 min(40 w)，可见乳白色初乳形成，加入 4 %聚乙烯醇 (PVA) 溶液 2 ml，再次超声 1 min，形成复乳，然后将此复乳转移至 50 ml 双蒸水(pH 6.6)中，室温下搅拌 4 h 以

上使有机溶剂完全挥发, 10 000×g 离心 10 min, 收集沉淀, 用双蒸水重新分散。置于低温冷冻干燥机中 24 h, 收集干燥的粉末, 4 °C 保存。

用扫描电镜观察粒子形态和大小, BCA 蛋白质定量法测定纳米粒子载药量; 用纳米颗粒粒度分析仪 (N4PLUS, 美国 Beckman Coulter 公司) 测定纳米粒子平均粒径及粒度分布。

3 免疫和治疗过程

BALB/c 小鼠 40 只, 6~8 周龄, 体重 18~22 g, 按随机数字表法分为 5 组, 分别为 A、B、C、D 和 E 组, 每组 8 只, 雌雄各半。A 组 (对照组) 给予 100 μ l 生理盐水, 其他各组给予 10 μ g 屋尘螨变应原粗浸液+4 mg 氢氧化铝 [Al(OH)₃] 生理盐水混悬液 100 μ l 腹部皮下 (该方法本研究室已有成功预实验) 注射致敏, 连续 3 次, 每次间隔 1 周, 末次致敏后 2 周。各组分别进行免疫治疗, A 组: 100 μ l 生理盐水, B 组: PBS (100 μ l), C 组: 2 mg 空白 PLGA 纳米, D 组: 100 μ g Der p 2, E 组: 2 mg 的 DEPN 纳米疫苗 (载有 100 μ g Der p 2)。连续免疫治疗 3 d, 1 次/d, 各组于末次免疫治疗后 2 周, B、C、D 和 E 组分别用 50 μ g/50 μ l 重组 Der p 2 变应原滴鼻激发, 1 次/d, 连续 7 d。A 组用同剂量的生理盐水滴鼻。各组于末次滴鼻后 24 h, 进行以下系列检测。

4 支气管肺泡灌洗

通过支气管肺泡灌洗观察小鼠气道炎症细胞的浸润情况。固定动物, 暴露小鼠气道后, 进行气管切开和气管插管, 缓慢推注入预冷 PBS 300 μ l 进行支气管肺泡灌洗 (BAL), 反复抽吸 3 次, 收集支气管肺泡灌洗液 (BALF), 并记录回收率 (大于 80%); BALF 经 4 °C 1 500×g 离心 10 min 后, 取沉淀细胞, 用 1 ml 1% 牛血清白蛋白 (BSA) -PBS 细胞重悬, 计数; 另取细胞悬液涂片, 用刘氏染色液染色, 显微镜下 200 个细胞进行分类计数。上清液于 -70 °C 保存, 用 ELISA 法测定 BALF 中 IL-4、IFN- γ 细胞因子水平。

5 血清中 Der p 2 抗原特异性 IgE 与 IgG2a 测定

2 mg/ml rDer p 2 用 pH 9.6 的包被液稀释至终浓度为 10 μ g/ml, 加入 100 μ l/孔到 96 孔板中, 4 °C 过夜。用 PBST (含 0.05% Tween) 洗板 5 次, 加入封闭液 100 μ l/孔, 37 °C 孵育 2 h, 再用 PBST 洗板 5 次。将各组小鼠血清按 1:100 稀释, 分别加入 100 μ l/孔到已包被 rDer p 2 的 96 孔酶标板中, 37 °C 孵育 2 h, 用 PBST 洗液洗板 5 次, 每孔加入 100 μ l 已稀释的

HRP-IgE (1:1 000) 或 HRP-IgG2a (1:2 000), 37 °C 孵育 2 h, PBST 洗板 5 次, 加入含 0.5 mg/ml 邻苯二胺 (OPD) 的磷酸-柠檬酸缓冲液, 37 °C 避光显色 20 min, 加入 2.5 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 读取吸光度 (A₄₅₀ 值)。

6 组织学检查

分离各组小鼠肺组织, 置 10% 中性甲醛固定, 常规制作切片, 支气管和肺组织 HE 染色后观察肺组织炎症细胞浸润; 用过碘酸希夫 (PAS) 染色检测杯状细胞分泌黏液情况; 根据血管周围和气道周围嗜酸粒细胞浸润情况 (分为 0~5 分) 以及肺组织中上皮损伤、组织水肿情况 (分为 0~5 分)^[13] 对肺组织炎症病变情况进行评分。

7 脾细胞抗原特异性 IL-4、IFN- γ 的产生

无菌条件下分离各组小鼠脾细胞, 经 100 目网过滤, 用 PBS 平衡液重悬脾细胞; 用乙二胺四乙酸-氯化铵 (EDTA-NH₄Cl) 红细胞裂解液裂解红细胞, 1 500×g 离心 5 min, 收集细胞沉淀, 用 RPMI1640 培养基 (含 100 mg/L 小牛血清、100 mg/L 青霉素及 100 mg/L 链霉素) 重悬脾细胞, 制备均质的脾细胞悬液。取细胞悬液进行台盼蓝 (Trypan blue) 染色, 观察活细胞 >98% 者即可供实验用。将脾细胞悬液调整到细胞密度为 5×10⁶/ml。取脾细胞悬液 100 μ l 加入到无菌平底 96 孔板中, 加入 rDer p 2 至终浓度为 10 μ g/ml, 并设立阴性对照组 (不加刺激物), 恒温培养箱 (Biosource Incustar 150, 上海力申科学仪器有限公司) 培养 72 h。收集培养上清液。用 ELISA 测定 IL-4 和 IFN- γ 水平。

8 统计学分析

用 SPSS11.5 进行单因素方差分析, 各组数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

结 果

1 屋尘螨 PLGA 纳米疫苗的特征

屋尘螨 PLGA 纳米疫苗在扫描电镜下呈椭圆形、光滑的颗粒 (图 1), 其平均粒径为 370~550 nm。Der p 2 的载药量为 500 μ g/10 mg (即为 5%)。

2 血清中 rDer p 2 特异性 IgE 与 IgG2a 抗体水平

ELISA 测定血清中 Der p 2 特异性 IgE (1:1 000 稀释) 和 IgG2a 抗体 (1:2 000 稀释) A₄₅₀ 值变化。在激发后 24 h, B 组 Der p 2 特异性 IgE 和 IgG2a 抗体水平分别为 1.14±0.10 和 0.14±0.01, 与 B 组相比, Der p 2 特

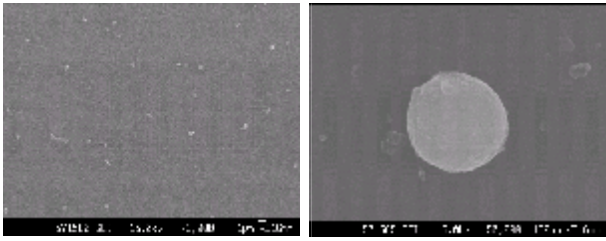


图 1 DEPN 纳米粒子的扫描电镜图谱
Fig.1 The SEM examination of nanoparticles(DEPN)

异性 IgE, D 组(0.93±0.04)和 E 组(0.77±0.09)均有显著下降 ($P<0.01$); 而特异性 IgG2a 水平, 在 D 组(1.02±0.01)和 E 组(1.17±0.46)显著升高($P<0.01$)。结果表明, rDer p 2 和 DEPN 纳米粒子免疫小鼠后, 能诱导血清 Der p 2 特异性 IgG2a 抗体产生, 并可抑制特异性 IgE 的生成 (表 1)。

表 1 血清中 IgE 与 IgG2a 抗体水平 (A_{450} 值, $\bar{x}\pm s$)
Table 1 The level of rDer p 2-specific IgE and IgG2a in sera of mice (A_{450} 值, $\bar{x}\pm s$)

抗体 Antibody	A组 Group A	B组 Group B	C组 Group C	D组 Group D	E组 Group E
IgG2a	0.07±0.01	0.14±0.01	0.37±0.01	1.02±0.01*	1.17±0.46*
IgE	0.04±0.01	1.14±0.10	1.02±0.04	0.93±0.04*	0.77±0.09*

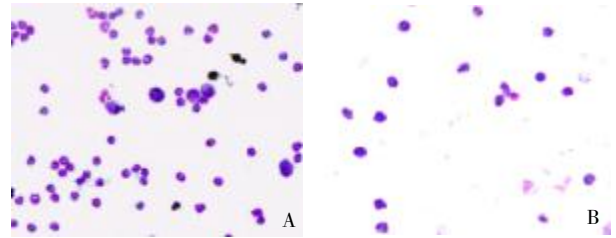
注: * 与 B 组相比, $P<0.01$ 。
Note: * Compared with group B, $P<0.01$.

3 BALF 细胞计数

阴性对照组 BALF 中的细胞总数较少, 细胞分类以单核细胞和淋巴细胞为主, 占 90% 以上; 与之相比, B 组 BALF 中的细胞总数明显增多 (63.50 ± 5.12) $\times 10^4$ /ml, 细胞分类以中性和嗜酸粒细胞 (15.32 ± 3.04) $\times 10^4$ /ml 为主, 超过 50% (图 2)。结果表明, 含有变应原加有铝佐剂的屋尘螨粗浸液可诱导小鼠肺组织产生炎症反应, 导致炎症细胞 (主要为中性粒细胞和嗜酸粒细胞) 向肺组织浸润, 从而使 BALF 中的细胞总数显著增多; 与 B 组相比, D 组 (55.30 ± 5.20) $\times 10^4$ /ml 和 E 组的细胞总数 (41.00 ± 4.91) $\times 10^4$ /ml 显著减少 ($P<0.05$), D 组 (9.56 ± 1.09) $\times 10^4$ /ml 和 E 组的 (3.22 ± 0.306) $\times 10^4$ /ml 嗜酸粒细胞数均显著减少 ($P<0.01$) (表 2)。

4 尘螨 PLGA 纳米疫苗可抑制小鼠气道炎症细胞浸润和黏液分泌

在 rDer p 2 变应原激发后 24 h, 通过肺组织观察尘螨纳米疫苗对重组 Der p 2 变应原诱导的气道炎症的作用。B 组在气道、肺泡和血管周围存在大量的炎症细胞浸润 (如嗜酸粒细胞), 杯状细胞增生、黏液分泌增加 (图 3A); 相反, E 组有效抑制



A: B 组 Group B, B: E 组 Group E。
图 2 刘氏染液 BALF 细胞涂片
Fig.2 Cells in BALF stained by Liu's staining

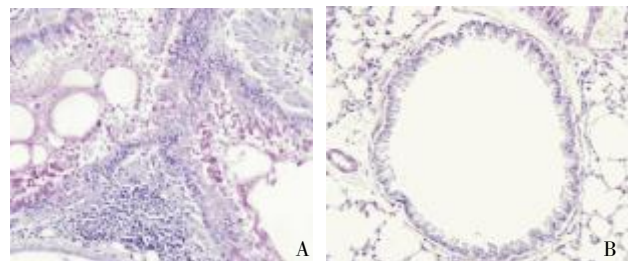
表 2 BALF 中总细胞数和嗜酸粒细胞数 ($\bar{x}\pm s$)
Table 2 The number of total cells and eosinophils in BALF ($\bar{x}\pm s$)

细胞数 No. cells ($\times 10^4$ /ml)	A组 Group A	B组 Group B	C组 Group C	D组 Group D	E组 Group E
总细胞数 Total cells	21.30±3.35	63.50±5.12	58.50±8.21	55.30±5.20*	41.00±4.91*
嗜酸粒细胞数 Eosinophils	0	15.32±3.04	12.48±1.76*	9.56±1.09**	3.22±0.31**

注: 与 B 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
Note: Compared with group B, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

气道炎症细胞浸润, 气道上皮细胞中有黏液分泌 (图 3B)。与 A 组相比, B 组小鼠的支气管、细支气管上皮下和小血管周围有明显的炎症细胞浸润, 以嗜酸粒细胞为主, 气道上皮结构紊乱, 部分脱落, 部分可见黏液栓, 上皮下充血水肿明显, 肺泡间质增厚, 也可见炎症细胞浸润 (图 4A)。E 组小鼠肺组织切片观察可见, 炎症反应明显减轻, 炎症细胞浸润比 B 组显著减少, 气道上皮结构基本恢复正常 (图 4B)。

气道、肺泡和血管周围的炎症细胞浸润情况, E 组与分别 C、D 和 B 组相比, 气道、肺泡和血管周围的炎症细胞浸润、上皮水肿和损伤等减少 (表 3)。



A: B 组, B: E 组。(PAS 染色所示, B 组管腔内出现大量黏液分泌, 而 E 组管腔无明显黏液分泌)
A: Group B, B: Group E. (PAS staining revealed more significant mucus secretion in group B than group E)

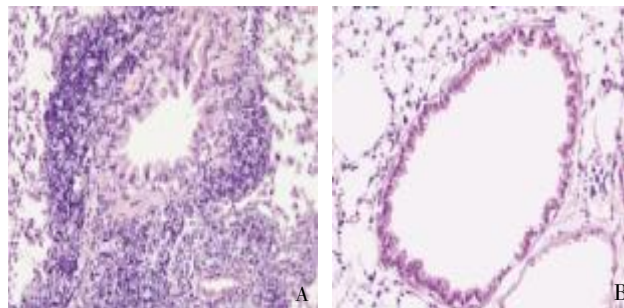
图 3 小鼠气道黏液分泌情况 (PAS 染色, $\times 200$)
Fig.3 Mucus secretion in mouse airway (PAS staining, $\times 200$)

表 3 肺组织病理改变按 Underwood 标准评分
Table 3 Pathological change of lung tissue according to Underwood Scoring

组别 Group	肺组织病理改变 Pathological change of lung tissue		
	炎症细胞浸润 Infiltration of inflammatory cells	上皮水肿 Edema of epithelium	上皮损伤 Impairment of epithelium
A	0	0	0
B	4(3~5)	4(3~5)	5(5~5)
C	3(2~5)	3(2~5)	3(2~5)
D	2(1~3)	2(1~3)	2(1~3)
E	1(1~2)	1(1~3)	1(1~2)

5 BALF 和脾细胞培养上清中的细胞因子谱

末次激发后 24 h, 在 BALF 中, B 组的 IL-4 和 IFN- γ 分别为(78.90 \pm 6.07) pg/ml 和(27.30 \pm 3.51) pg/ml, 与之相比, D 组(55.60 \pm 3.79 pg/ml)和 E 组(48.60 \pm 4.50) pg/ml 的 IL-4 显著降低(P <0.01); E 组(68.50 \pm 2.87) pg/ml 的 IFN- γ 显著升高(P <0.01), 而 C 组(33.40 \pm 3.13) pg/ml 和 D 组(32.50 \pm 2.95) pg/ml 亦有升高(P <0.05)。脾细胞上清中, B 组的 IL-4 和 IFN- γ 分别为(81.20 \pm 6.84) pg/ml 和(34.60 \pm 2.25) pg/ml, 与之相



A: B 组, B: E 组。(B 组出现明显的血管周和支气管周嗜酸粒细胞浸润, E 组则改善较明显, 气道上皮结构较正常, 无明显嗜酸粒细胞浸润。) A: group B, B: group E. (Apparent perivascular and bronchiolar eosinophil infiltration in group B, no apparent lung eosinophilic inflammation with nearly normal epithelial structure in group E)

图 4 肺组织病理变化(HE 染色, $\times 200$)
Fig.4 Histological examination of lung (HE staining, $\times 200$)

比, E 组(70.20 \pm 3.85) pg/ml 的 IFN- γ 显著增高(P <0.01); 而 D 组(56.3 \pm 4.85) pg/ml 和 E 组(40.2 \pm 4.36) pg/ml 的 IL-4 分泌显著减少 (P <0.01)。结果表明, E 组的 BALF 和脾细胞上清中主要以 Th1 细胞因子如 IFN- γ 为主, 分泌少许 Th2 细胞因子 IL-4; 相反, B 组小鼠 BALF 和脾细胞上清中主要以 Th2 细胞因子如 IL-4 为主, 分泌较少 Th1 细胞因子 IFN- γ (表 4)。

表 4 BALF 和脾细胞中 IFN- γ 和 IL-4 水平 [$(\bar{x}\pm s)$ pg/ml]
Table 4 Level of IFN- γ , IL-4 in BALF and splenocytes [$(\bar{x}\pm s)$ pg/ml]

组别 Group	细胞因子 Cytokine	IFN- γ 和 IL-4 水平 Level of IFN- γ , IL-4				
		A组 Group A	B组 Group B	C组 Group C	D组 Group D	E组 Group E
支气管肺泡灌洗液 BALF	IL-4	10.20 \pm 1.27	78.90 \pm 6.07	75.70 \pm 4.09	55.60 \pm 3.79**	48.60 \pm 4.50**
	IFN- γ	37.80 \pm 3.44	27.30 \pm 3.51	33.40 \pm 3.13*	32.50 \pm 2.95*	68.50 \pm 2.87**
脾细胞 Splenocytes	IL-4	12.50 \pm 2.18	81.20 \pm 6.84	78.90 \pm 10.28	56.30 \pm 4.85**	40.20 \pm 4.36**
	IFN- γ	48.00 \pm 5.90	34.60 \pm 2.25	45.30 \pm 5.18	40.10 \pm 4.26	70.20 \pm 3.85**

注: 与 B 组相比, * P <0.05, ** P <0.01。 Notes: Compared with group B, * P <0.05, ** P <0.01.

讨 论

随着变态反应疾病和哮喘免疫学的研究进展, 出现了许多新的治疗策略。如生物可降解材料 PLGA 被用于抗原的载体系统, 已引起研究者的广泛关注^[14], 大小为 1~1.5 μ m 的微粒单次皮下注射免疫治疗可诱导长时间的 IgG 应答反应^[15]。PLGA 具有减低毒性和提高效力的优点, 并具有缓释性和粒径小等特点, 有利于抗原呈递至免疫系统。其他一些载体如脂质体微粒也被用于蛋白质疫苗的投递^[16]。屋尘螨 Der p 2 变应原是诱发过敏性哮喘的主要变应原之一, 故其很适合作为变应原疫苗的候选抗原分子^[17]。本研究证实, 用 PLGA-Der p 2 纳米(DEPN)疫苗免疫能有效抑制 Der p 2

抗原特异性 IgE 抗体产生, 能诱导 Der p 2 抗原特异性 IgG2a 抗体生成, 并证实用 DEPN 免疫治疗能有效调节 IgE 免疫应答。

小鼠变态反应实验证明, 小鼠 IgG1、IgG2a 和 IgE 抗体亚型可反应 T 淋巴细胞应答的种类。IFN- γ 在小鼠 B 淋巴细胞合成 IgG2a 抗体过程中起着关键作用, IFN- γ 能有效抑制 IL-4 诱导的 IgE 抗体产生。因此, IgG2a 抗体增加和 IgE 抗体减少能够反应抗原特异性淋巴细胞分泌细胞因子从以分泌 Th2 细胞因子为主转变为以分泌 Th1 细胞因子为主^[18]。本研究分析了 DEPN 疫苗对变应原诱导肺部变态反应气道炎症动物模型免疫应答的影响, 结果发现变应原诱导的肺部变态反应气道炎症动物模型, 主要表现为分泌大量的

IL-4 细胞因子和 IgE 抗体增加。而 DEPN 疫苗免疫能有效诱导 IgG2a 抗体的合成, 并抑制 IgE 抗体合成; IgE 抗体水平下降与支气管肺泡灌洗液中 Th1 细胞因子 IFN- γ 水平增加和血清中 IgG2a 抗体水平增加有关。结果表明, DEPN 疫苗免疫能有效调节过敏性鼻炎中的 Th1/Th2 平衡, 抑制 IgE 抗体生成。

在变应原诱导的过敏反应应答过程中, 变应原能活化 CD4⁺T 细胞, 诱导 IgE 抗体生成, 过敏反应与气道炎症和气道痉挛密切相关^[19]。本研究发现变应原诱导肺部变态反应气道炎症动物模型主要表现为气道、肺泡和血管周围出现大量的炎症细胞浸润, 上皮结构破坏, 杯状细胞增生、黏液分泌增加, 而 DEPN 疫苗能有效抑制炎性细胞浸润和结构破坏及黏液分泌, 进一步证实, DEPN 疫苗能有效调节以 Th2 为主的变态反应性免疫应答, 抑制 IgE 抗体生成, 这种免疫应答反应可有效治疗由变应原诱导的气道炎症。

总之, 以 PLGA 为佐剂的屋尘螨 Der p 2 变应原纳米疫苗能调节过敏反应中失衡的 Th2/Th1 免疫应答, 抑制抗原特异性 IgE 抗体生成, 有效抑制变应原诱导的肺部变态反应性炎症, 因此, 以新型、安全的 PLGA 为佐剂的屋尘螨 Der p 2 变应原纳米疫苗是治疗变态反应性疾病的一种新途径。

参考文献

- [1] Rosenstreich DL, Moday HJ, Hudes G. Asthma and the environment[J]. J Asthma, 2003, 40 (Suppl):23-29.
- [2] Vargas MH, Diaz-Mejia GS, Furuya ME, et al. Trends of asthma in Mexico: an 11-year analysis in a nationwide institution[J]. Chest, 2004, 125: 1993-1997.
- [3] Swain SL, Weinberg AD, English M, et al. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors[J]. J Immunol, 1990, 145: 3796-3806.
- [4] Milian E, Diaz AM. Allergy to house dust mites and asthma[J]. P R Health Sci J, 2004, 23: 47-57.
- [5] Johnson CC, Ownby DR, Havstad SL, et al. Family history, dust mite exposure in early childhood, and risk for pediatric atopy and asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2004, 114: 105-110.
- [6] Trombone AP, Tobias KR, Ferriani VP, et al. Use of a chimeric ELISA to investigate immunoglobulin E antibody responses to Der p 1 and Der p 2 in mite-allergic patients with asthma, wheezing and/or rhinitis[J]. Clin Exp Allergy, 2002, 32: 1323-1328.
- [7] Ebner C, Siemann U, Bohle B. Immunological changes during specific immunotherapy of grass pollen allergy: reduced lymphoproliferative response to allergen and shift from Th2 to Th1 in T cell clones specific for Phl p I, a major grass pollen allergen[J]. Clin Exp Allergy, 1997, 27:1007.
- [8] Secrist H, Chelen CJ, Wen Y, et al. Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4 T cells from allergic individuals[J]. J Exp Med, 1993, 178: 2123-2130.
- [9] Bousquet J, Lockey RF, Malling HJ. WHO position paper allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases[J]. J Allergy Clin Immunol, 1998, 44: 1-42.
- [10] Eldridge JH, Staas JK, Meulbroek JA, et al. Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system[J]. Mol Immunol, 1991, 28:2978-2986.
- [11] Aguado MT, Lambert PH. Controlled-release vaccines: biodegradable polylactide/polyglycolide (PL/PG) microspheres as antigen vehicles[J]. Immunobiology, 1992, 184: 113-125.
- [12] Scholl I, Weissenbock A, Forster-Waldl E, et al. Allergen-loaded biodegradable poly(D, L-lactic-co-glycolic) acid nanoparticles down-regulate an ongoing Th2 response in the BALB/c mouse model[J]. Clin Exp Allergy, 2004, 34: 315-321.
- [13] Underwood S, Foster M, Raeburn D, et al. Time-course of antigen-induced airway inflammation in the Guinea pig and its relationship to airway hyperresponsiveness[J]. Eur Respir J, 1995, 8:2104-2113.
- [14] Hora MS, Rana RK, Nunberg JH, et al. Release of human serum albumin from poly (lactide-co-glycolide) microspheres [J]. Pharm Res, 1990, 7:1190-1194.
- [15] Li CW, Sun WB, Yu Y, et al. Preparation of subunit vaccine with liposomal adjuvant for *Campylobacter jejuni*[J]. Shaanxi Med J, 2006, 3: 297-230.
(李成文, 孙万邦, 余妍, 等. 空肠弯曲菌外膜蛋白亚单位脂质体佐剂疫苗的研制[J]. 陕西医学杂志, 2006, 35: 297-300.)
- [16] Jeffery HS, Davis S, O'Hagan DT. The preparation and characterization of poly (lactide-co-glycolide) microparticles. II. The entrapment of a model protein using a (water-in-oil)-in-water emulsion solvent evaporation technique[J]. Pharm Res, 1993, 10: 362-367.
- [17] Jin HS, Yong TS, Park JW, et al. Immune reactivity of recombinant group 2 allergens of house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus*, and *Dermatophagoides farinae* [J]. J Investig Allergol Clin Immunol, 2003, 13(1): 36-42.
- [18] Van Oosterhout AJ, Van Esch B, Hofman G, et al. Allergen immunotherapy inhibits airway eosinophilia and hyperresponsiveness associated with decreased IL-4 production by lymphocytes in a murine model of allergic asthma[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1998, 19: 622-628.
- [19] Martin JG, Suzuki M, Ramos-Barbon D, et al. T cell cytokines: animal models[J]. Paediatr Respir Rev, 2004, 5(Suppl A): S47.
(收稿日期:2006-09-07 编辑:盛慧锋)

本刊祝广大读者
新春快乐、事业成功、万事如意!