

基础研究

重组葎草花粉主要变应原免疫特性研究

吴媛媛, 孙秀珍, 李满祥, 刘 昀, 王贵佐, 卢家美

西安交通大学医学院第二附属医院呼吸病研究所, 陕西 西安 710004

摘要:目的 鉴定重组葎草花粉主要变应原pTSX2的免疫特性,并初步评价其安全性。方法 应用Western blotting鉴定pTSX2的免疫特性;ELISA法检测经pTSX2免疫的小鼠血清sIgE、sIgG水平;pTSX2免疫治疗小鼠哮喘模型后:ELISA法测定小鼠血清sIgE、sIgG水平;计数小鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)中细胞总数及嗜酸性粒细胞(Eos)比值;ELISA法检测小鼠BALF中及脾组织匀浆中细胞因子(IL-4、IFN- γ)水平;评价小鼠肺组织炎症程度。结果 Western blotting结果显示重组表达的pTSX2可与70%的葎草花粉特异性过敏的变应性哮喘患者血清发生抗原抗体反应;pTSX2免疫正常小鼠后主要诱导产生血清sIgG;pTSX2免疫治疗小鼠哮喘模型后:血清中sIgE、sIgG的抗体水平分别为(146.74 \pm 28.57)和(548.76 \pm 11.98) μ g/ml,与哮喘模型组的(603.06 \pm 10.00)和(260.32 \pm 6.40) μ g/ml相比差异有统计学意义(P <0.05);BALF中细胞总数及Eos百分比与哮喘模型组相比明显下降(P <0.05);BALF中IL-4、IFN- γ 水平分别为(56.74 \pm 28.57)和(49.7 \pm 11.98) pg/ml,与哮喘模型组的(89.03 \pm 10.00)和(23.10 \pm 6.40) pg/ml相比差异有统计学意义(P <0.05);脾组织匀浆中IL-4、IFN- γ 水平分别为(126.24 \pm 37.00)和(1547.72 \pm 490.43) pg/ml,与哮喘模型组的(457.95 \pm 70.06)和(720.34 \pm 93.96) pg/ml相比差异有统计学意义(P <0.05);肺组织炎症程度减轻。结论 重组葎草花粉主要变应原pTSX2具有较好的免疫治疗作用,且安全性较高,其机制可能是抑制变应原sIgE抗体、诱导变应原sIgG抗体产生,降低气道炎症细胞浸润,调节Th1/Th2平衡。

关键词:支气管哮喘;葎草花粉变应原;重组变应原;特异性免疫治疗

中图分类号:R392 文献标志码:A 文章编号:1673-4254(2012)10-1431-04

doi: 10.3969/j.issn.1673-4254.2012.10.010 <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1627.R.20121012.2117.026.html>

Immunological characteristics of the recombinant major pollen allergen pTSX2 of *Humulus scandens*

WU Yuanyuan, SUN Xiuzhen, LI Manxiang, LIU Yun, WANG Guizuo, LU Jiamei

Institute of Respiratory Diseases, Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University College of Medicine, Xi'an 710004, China

Abstract: Objective To identify the immunological characteristics of the recombinant major pollen allergen pTSX2 of *Humulus scandens* and evaluate its safety in immunotherapy of allergic asthma in mice. **Methods** Western blotting was used to characterize the immunological properties of pTSX2, and its immunogenicity in normal mice was evaluated by detecting sIgG and sIgE levels. The mouse models of allergic asthma were immunized with pTSX2 and examined for sIgE and sIgG levels, total cells and eosinophils percentage in BALF, interleukin-4 (IL-4) and interferon- γ (IFN- γ) levels in BALF and spleen homogenate, and changes in lung pathologies. **Results** Western blotting showed that pTSX2 reacted with the majority (about 70%) of sera from patients allergic to *Humulus* pollen. In normal mice, pTSX2 mainly induced the production of sIgG. In mouse models of allergic asthma, intervention with pTSX2 caused a significant reduction of sIgE and an increase of sIgG (P <0.05), significantly decreased the total cells and eosinophils in BALF (P <0.05), obviously lowered IL-4 but increased IFN- γ in BALF and spleen homogenate (P <0.05), and diminished inflammatory cell infiltration and percentage of eosinophils in the lung tissues. **Conclusion** pTSX2 shows a definite therapeutic effect and safety in the treatment of allergic asthma in mice possibly by inhibiting sIgE and inducing sIgG production, suppressing airway allergic inflammation and regulating the balance between Th1 and Th2.

Key words: bronchial asthma; humulus pollen allergen; recombinant allergen; specific immunotherapy

吸入致敏花粉是诱发变应性哮喘及其他呼吸道变态反应性疾病最重要的因素,葎草花粉是国内夏秋季花粉症的重要致敏原之一^[1]。特异性免疫治疗(SIT)是唯

一针对病因、可以改变变态反应性疾病进程的治疗方法,成功的SIT可以调节哮喘外周血中Th1/Th2平衡。目前临床上主要用粗提变应原进行SIT,但粗提变应原除含有致敏组分外,还有次要组分及与抗原无关的组分,用于SIT可导致毒副作用。基因重组变应原已被证实可以显著提高变态反应性疾病的特异性诊断率和SIT的疗效^[2-3]。本研究拟在此基础上,在动物水平验证重组表达的葎草花粉主要变应原pTSX2的免疫学特性及初步

收稿日期:2012-05-17

基金项目:国家自然科学基金(30371336)

Supported by National Natural Science Foundation of China (30371336).

作者简介:吴媛媛,在读博士研究生,E-mail: yuan.11120929@stu.xjtu.edu.cn

通讯作者:孙秀珍,教授,E-mail: doc-ly@sohu.com

评价其安全性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 对象 4~5周龄雌性BALB/C小鼠(SPF级),体重16~19 g,由西安交通大学医学院动物实验中心提供。

1.1.2 主要试剂 重组葎草花粉主要变应原pTSX2由本课题组实验室保存,血清标本取自就诊于西安交通大学医学院第二附属医院呼吸科的葎草花粉变应性哮喘患者。sIgE、sIgG、IL-4及IFN- γ ELISA试剂盒均购自美国R&D公司。

1.2 方法

1.2.1 Western blotting 鉴定重组葎草花粉主要变应原pTSX2的免疫特性 pTSX2行SDS-PAGE,再转移到PVDF膜上,转移条件为0.20 A、1 h,用16份葎草花粉变应性哮喘患者血清(编号为1-16)分别作一抗,行Western blotting实验。

1.2.2 pTSX2免疫正常小鼠鉴定其免疫原性 30只4~5周龄雌性BALB/C小鼠,随机分为正常对照组(A组)、粗提葎草花粉变应原免疫组(B组)、pTSX2免疫组(C组),每组10只。C组用pTSX2 300 μg +等体积的弗氏完全佐剂予小鼠颈背部皮下多点注射免疫第1次;1周后用pTSX2 300 μg +等体积的弗氏不完全佐剂予小鼠颈背部皮下多点注射强化免疫,隔周1次,共强化3次。A组用生理盐水代替,B组用粗提葎草花粉变应原,方法及剂量同C组。末次免疫后2周,摘眼球采血,离心取上清,测血清总sIgE、sIgG浓度(按试剂盒内附说明书操作)。

1.2.3 初步评价pTSX2的安全性 观察免疫治疗期间及免疫治疗结束后2周内(共9周)小鼠哮喘模型的表现:有无过敏反应,小鼠精神状态及饮食情况,有无毛发脱落、瞎眼等症状,观察肺脏及脾脏色泽及形态是否正常,肺组织病理HE染色镜检有无充血、出血、水肿等。

1.2.4 pTSX2免疫小鼠哮喘模型鉴定其免疫治疗作用

1.2.4.1 实验对象及分组 36只雌性BALB/c随机等分为空白对照组(A组)、哮喘模型组(B组)和pTSX2免疫治疗组(C组)。根据本课题组的方法构建小鼠哮喘模型^[4],3组小鼠均予粗提葎草花粉变应原50 μl /只连续滴鼻激发5 d,1次/d。小鼠被激发后2周,C组用pTSX2 300 μg 予小鼠颈背部皮下多点注射,A、B组用生理盐水代替,隔天1次,共7次。免疫治疗结束后2周,3组小鼠均用粗提葎草花粉变应原50 μl /只再次滴鼻激发,共5次。

1.2.4.2 免疫保护作用的评价指标

1.2.4.2.1 症状 观察空白对照组(A组)、哮喘模型组(B组)和pTSX2免疫治疗组(C组)3组小鼠免疫治疗后,再

次予粗提葎草花粉变应原激发后的表现:有无烦躁不安、抓耳挠腮、呼吸加快加深甚至大小便失常等哮喘急性发作时的表现。

1.2.4.2.2 小鼠血清sIgE、sIgG水平 最后一次激发24 h后,用0.5%戊巴比妥钠0.1 ml腹腔注射麻醉小鼠,然后摘眼球取血,离心取上清,用ELISA法测定血清sIgE、sIgG水平(按试剂盒内附说明书操作)。

1.2.4.2.3 小鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)中细胞计数及细胞因子 固定小鼠,行右主支气管插管,缓慢推入预冷的PBS液1 ml,反复抽吸3次,收集BALF约0.8 ml。BALF经4 $^{\circ}\text{C}$ 、800 r/min离心5 min,留取上清保存在-70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,测IL-4、IFN- γ 水平;取沉淀细胞,用1 ml PBS重悬细胞,用细胞计数板计数细胞总数,取0.02 ml PBS重悬液用嗜酸细胞计数液做Eos绝对值计数。

1.2.4.2.4 小鼠脾组织匀浆IL-4、IFN- γ 水平 取脾,称质量,剪成碎片,置于玻璃匀浆器中,按0.2 mg/ μl 比例加入RIPA裂解液,研磨使组织匀浆化,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心,取上清保存于-70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,测IL-4、IFN- γ 水平(按试剂盒内附说明书操作)。

1.2.4.2.5 小鼠肺组织HE染色 取小鼠左肺组织,石蜡包埋,切片用10%甲醛固定,HE染色,光学显微镜下观察血管周围和气道周围炎性细胞浸润、上皮损伤、组织水肿情况。

1.3 统计学分析

应用SPSS 16.0进行统计学处理,实验数据以均值 \pm 标准差表示,采用单因素方差分析, $P<0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Western blotting

16张Western blotting胶片中11张(编号为3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13)可见清晰的显色条带(图1),说明pTSX2可与11份血清发生抗原抗体反应,提示该重组变应原具有抗原性。

2.2 pTSX2具有免疫原性

粗提葎草花粉变应原免疫组(B组)小鼠其血清sIgE、sIgG抗体分别为(89.03 \pm 10.0)和(23.10 \pm 6.40) $\mu\text{g}/\text{ml}$,明显高于正常对照组(A组)血清sIgE、sIgG抗体水平[分别为(25.19 \pm 10.14)和(8.61 \pm 1.77) $\mu\text{g}/\text{ml}$, $P<0.05$];pTSX2免疫组(C组)小鼠血清sIgE抗体水平为(46.74 \pm 18.57) $\mu\text{g}/\text{ml}$,与粗提变应原免疫组(B组)的(89.03 \pm 10.0) $\mu\text{g}/\text{ml}$ 相比具有显著性差异($P<0.05$);pTSX2免疫组(C组)小鼠血清sIgG抗体水平为(49.77 \pm 11.98) $\mu\text{g}/\text{ml}$,与正常对照组(A组)的(8.61 \pm 1.77) $\mu\text{g}/\text{ml}$ 相比具有显著性差异($P<0.01$)。上述结果表明,与粗提葎草花粉变应

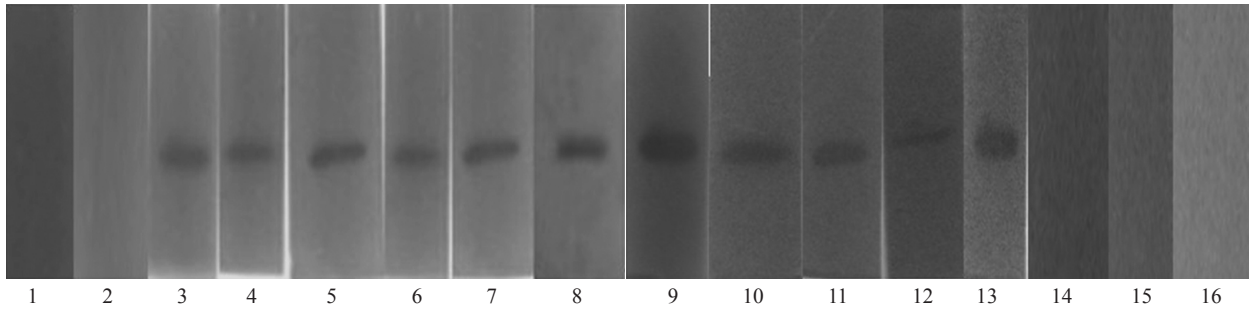


图1 Western blotting检测pTSX2与血清的结合

Fig.1 Binding of the recombinant major pollen allergen pTSX2 with the sera from patients allergic to *Humulus scandens* detected by Western blotting.

原比较,pTSX2变应原性明显下降,具有强的免疫原性。

2.3 pTSX2具有一定的安全性

在9周的观察期间,经pTSX2免疫治疗的小鼠,精神状态及饮食情况正常,无毛发脱落、瞎眼等症状;肺脏及脾脏色泽及形态正常,肺组织病理HE染色,无充血、出血、水肿等表现。初步说明该重组变应原具有一定的安全性。

2.4 pTSX2的对小鼠哮喘模型有免疫治疗作用

2.4.1 症状 空白对照组(A组)未出现急性哮喘发作的表现;哮喘模型组(B组)小鼠在激发后3 min内均不同程度地出现烦躁不安、抓耳挠腮、呼吸加快加深甚至大小便失常等哮喘急性发作时的表现;pTSX2免疫治疗组(C组)中8的小鼠未出现急性哮喘发作的表现,其余4只小鼠哮喘发作的时间延至5 min之后,且程度较轻,无大小便失常。表明pTSX2可以缓解哮喘症状、预防哮喘发作。

2.4.2 小鼠血清sIgE、sIgG抗体水平 哮喘模型组(B组)小鼠其血清sIgE、sIgG抗体水平为(603.06±10.00)和(260.32±6.40) μg/ml,与空白对照组(A组)sIgE、sIgG抗体水平[分别为(27.32±10.14)和(18.61±3.77) μg/ml]相比,具有显著性差异($P<0.05$);pTSX2免疫治疗组(C组)小鼠其血清sIgE、sIgG抗体水平为(146.74±28.57)和(548.76±11.98) μg/ml,与哮喘模型组(B组)比较,其血清sIgE水平降低,sIgG抗体水平升高,具有显著性差异($P<0.05$)。表明该重组变应原可能通过诱导sIgG抗体、抑制sIgE抗体生成,具有免疫治疗作用。

2.4.3 小鼠BALF中细胞总数和分类计数 由表1可见重组变应原可以降低炎症细胞浸润,抑制气道炎症。

2.4.4 小鼠BALF中细胞因子水平 哮喘模型组小鼠经pTSX2免疫治疗后,其BALF中IL-4水平降低,而IFN- γ 水平升高,具有显著性差异($P<0.05$,表2)。

2.4.5 小鼠脾组织匀浆上清细胞因子水平 哮喘模型组小鼠经pTSX2免疫治疗后,其脾组织匀浆上清中IL-4水平降低,而IFN- γ 水平升高,具有显著性差异($P<0.05$,表3)。

表1 小鼠BALF中细胞总数和Eos%

Tab.1 Total cell number and percentage of eosinophil in BALF in different groups (Mean±SD, n=12)

组别	WBC($\times 10^4$ /ml)	Eos%
空白对照组	13.67±4.43 [▲]	0.01±0 [▲]
哮喘模型组	97.32±20.62	19.78±8.65
重组变应原治疗组	23.65±10.23*	3.85±0.12*

与模型组比较, * $P<0.05$, [▲] $P<0.01$

表2 小鼠BALF中IL-4和IFN- γ 浓度

Tab.2 Cytokine (IL-4, IFN- γ) levels in BALF in different groups (Mean±SD, n=12)

组别	IL-4 (pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)
正常对照组	25.19±10.14*	38.61±3.77*
哮喘模型组	9.03±10.00	23.10±6.40
重组变应原治疗组	6.74±28.57*	49.70±11.98*

与模型组比较, * $P<0.05$

表3 小鼠脾组织匀浆上清IL-4、IFN- γ 浓度

Tab.3 IL-4 and IFN- γ levels in spleen homogenate in different groups (Mean±SD, n=12)

组别	IL-4 (pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)
正常对照组	212.42±25.19*	1021.33±127.37*
哮喘模型组	457.95±70.06	720.34±93.96
重组变应原治疗组	126.24±37.00*	1547.72±490.43*

与模型组比较, * $P<0.05$

2.4.6 光镜下小鼠肺组织炎症变化 哮喘模型组(B组)小鼠与空白对照组(A组)相比,其支气管及血管周围炎症细胞明显浸润,以Eos、淋巴细胞和中性粒细胞为主,还可见肥大细胞;气道上皮多处脱落,杯状细胞增多,基底膜增厚,细支气管平滑肌增生肥大;pTSX2免疫治疗组(C组)与哮喘模型组相比,其炎症细胞显著减少,炎症明显减轻,上皮结构基本恢复正常。上述结果表明pTSX2可以抑制炎症细胞,减轻炎症反应(图2)。

3 讨论

Th1/Th2 比例失衡是哮喘发病的主要免疫学机

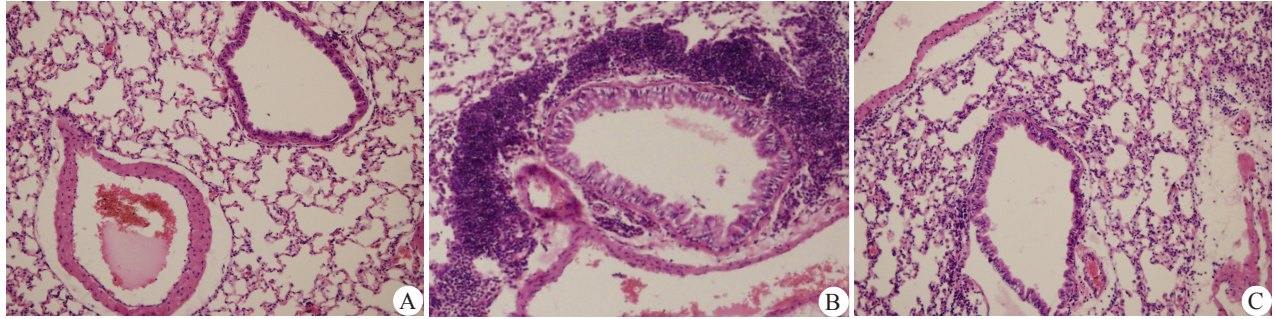


图2 各组小鼠肺组织病理HE染色结果

A: 空白对照组; B: 哮喘模型组; C: 免疫治疗组

Fig.2 Lung pathologies in the 3 groups (HE staining, original magnification: $\times 200$).

制^[6]。支气管哮喘患者外周血、支气管黏膜、支气管肺泡灌洗液中均存在以IL-4等细胞因子增加的Th2优势反应^[8]。IL-4可以抑制IFN- γ 分泌,并且是Th2细胞转化的必须因子^[9]。IFN- γ 是Th1特征性的细胞因子,它可以抑制B淋巴细胞分泌IgE抗体^[10],IFN- γ 也是Th2细胞的负生长调控因子,抑制人的支气管上皮细胞增殖,从而抵制Th2介导的变态反应。

本研究结果显示,正常小鼠经pTSX2免疫后,主要诱导血清sIgG抗体产生,而产生sIgE的水平与正常对照组无明显差别,说明该重组变应原具有较好的免疫原性。哮喘模型组小鼠予pTSX2免疫治疗后,当小鼠再次接触葎草花粉变应原时症状明显减轻甚至消失,气道及血管周围炎细胞浸润程度、病理炎症级别明显降低,血清sIgE浓度降低、sIgG浓度升高,BALF及脾组织匀浆中IL-4降低和IFN- γ 升高。上述结果均表明,pTSX2可诱导sIgG抗体的生成并使IFN- γ 水平升高,降低哮喘小鼠外周血及BALF中细胞总数和嗜酸性粒细胞的数量,抑制气道炎症细胞浸润,具有较好的免疫保护作用。免疫治疗后的小鼠,精神状态、饮食正常,无毛发脱落等中毒表现。小鼠肺脏及脾脏外观正常,肺组织HE染色未见明显充血等类似于急性肺损伤的病理表现,提示pTSX2不存在诱发免疫损伤等潜在危险性,初步验证pTSX2的安全性。因此,重组pTSX2对葎草花粉变应原哮喘小鼠有较好的免疫治疗作用,且具有一定的安全性,其机制可能是诱导sIgG抗体、抑制sIgE抗体生成、降低气道炎症细胞的浸润、调节Th1/Th2平衡。

参考文献:

[1] Yin J, St YE. An important allergenic pollen in China humulus[J].

Allergy Clin Immunol, 1995, 95(1): 164-6.

- [2] Schmid-Grendelmeier P, Holzmann D, Himly M, et al. Native art v 1 and recombinant art v 1 are able to induce humoral and T cell-mediated *in vitro* and *in vivo* responses in mugwort allergy[J]. J Allergy Clin Immunol, 2003, 111(6): 1328-36.
- [3] Davies JM, Mittag D, Dang TD, et al. Molecular cloning, expression and immunological characterisation of Pas n 1, the major allergen of Bahia grass Paspalum notatum pollen[J]. Mol Immunol, 2008, 46 (2): 286-93.
- [4] 李雅莉,张明,卢家美,等.葎草花粉致敏的小鼠肺部变应性炎症模型的建立[J].西安交通大学学报:医学版,2010,31(5):562-5.
- [5] 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(12): 2104-13.
- [6] Packard KA, Khan MM. Effects of histamine on Th1/Th2 cytokine balance[J]. Int Immunopharmacol, 2003, 3(7): 909-20.
- [7] Magnan AO, Mély LG, Camilla CA, et al. Assessment of the Th1/Th2 paradigm in whole blood in atopy and asthma. Increased IFN-gamma-producing CD8(+) T cells in asthma[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 161(6): 1790-6.
- [8] Lingnau K, Hoehn P, Kerdine S, et al. IL-4 in combination with TGF-beta favors an alternative pathway of Th1 development Independent of IL-12[J]. J Immunol, 1998, 161(9): 4709-18.
- [9] Pène J, Rousset F, Brière F, et al. IgE production by normal human B cells induced by alloreactive T cell clones is mediated by IL-4 and suppressed by IFN-gamma [J]. J Immunol, 1988, 141(4): 1218-24.
- [10] Takami K, Takuwa N, Okazaki H, et al. Interferon-gamma inhibits hepatocyte growth factor stimulated cell proliferation of human bronchial epithelial cells[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002, 26 (8): 231-8.

(编辑:黄开颜)