

HSP70/CD80 DNA 疫苗通过调节 Th1/Th2/Treg/Th17 细胞对小鼠 急性哮喘的抑制作用

李燕¹, 谢敏², 史小玲¹, 王晓燕¹, 唐利¹, 钟森³, 陈庄¹

(1. 泸州医学院附属医院医学实验中心, 四川 泸州 646000;

2. 成都华西海圻医药科技有限公司, 四川 成都 610041; 3. 成都中医药大学附属医院, 四川 成都 610075)

摘要:目的 考察热休克蛋白70(HSP70)/CD80 DNA 疫苗治疗小鼠急性哮喘的疗效,研究该过程中 Th1/Th2/Treg/Th17 再平衡的作用机制。方法 BALB/c 小鼠40只随机分为空白对照组(空白组),哮喘模型组(模型组),pVAX1(+)空载体对照组(空载组)和 HSP70/CD80 疫苗治疗组(治疗组),每组10只。鸡卵清蛋白(OVA)激发致敏小鼠构建急性哮喘模型,HSP70/CD80 DNA 疫苗进行治疗。吸入性支气管激发试验测定气道反应性,ELISA 法测定血清中 IgE 的含量,HE 和 AB-PAS 染色观察肺组织病理学改变,ELISA 法观察支气管肺泡灌洗液中 γ -干扰素(IFN- γ)、白细胞介素-4(IL-4)、转化生长因子 β (TGF- β)和白细胞介素-17(IL-17)等细胞因子的含量变化,实时荧光定量 PCR 观察肺组织中 T-bet、GATA 连接蛋白3(GATA-3)、叉头蛋白3(Foxp3)和维甲酸受体相关孤儿受体(ROR γ t)等转录因子的表达。结果 与模型组相比,DNA 疫苗治疗后小鼠气道反应性明显下降($P < 0.05$),IgE 浓度降低($P < 0.05$),肺组织炎症浸润减少,杯状细胞增生不明显,IFN- γ /IL-4 和 TGF- β /IL-17 比值升高($P < 0.05$),T-bet/GATA-3 和 Foxp3/ROR γ t 比值升高($P < 0.05$)。结论 HSP70/CD80 DNA 疫苗可能通过改变 IFN- γ /IL-4 和 TGF- β /IL-17 的比值、T-bet/GATA-3 和 Foxp3/ROR γ t 的比值,使 Th1/Th2/Treg/Th17 恢复平衡,从而发挥对哮喘的治疗作用。

关键词:哮喘;CD4 + CD25 + 调节性 T 细胞;辅助性 T 细胞 17

中图分类号: R392.9 **文献标志码:** A

Hsp70/CD80 DNA vaccine inhibits asthma by regulating the balance of Th1/Th2/Treg/Th17 in an acute mouse model

LI Yan¹, XIE Min², SHI Xiaoling¹, WANG Xiaoyan¹, TANG Li¹, ZHONG Sen³, CHEN Zhuang¹

(1. Molecular Medicine Experimental Center, Affiliated Hospital of Luzhou Medicine College, Luzhou 646000, Sichuan, China;

2. WestChina-Frontier Pharmaceutical Technology Company, Chengdu 610041, Sichuan, China;

3. Affiliated Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610075, Sichuan, China)

Abstract: Objective To explore the mechanism of Th1/Th2/Treg/Th17 rebalance in an acute asthma mouse model treated with heat shock protein70 (Hsp70)/CD80 DNA vaccine. **Methods** Forty BALB/c mice were divided into the control group, asthma-model group, pVAX1-vector group and vaccine treatment group, 10 in each group. They were intraperitoneally injected into ovalbumin (OVA) to build acute asthma model and treated with DNA vaccine. The airway responsiveness was evaluated after inhaling the methacholine (Mch). The IgE content in serum was detected by ELISA. The pathological change of lung tissue was observed by HE and AB-PAS staining. The expressions of interferon- γ

(IFN- γ), interleukin-4 (IL-4), transforming growth factor beta (TGF- β) and interleukin-17 (IL-17) in BALF were measured by ELISA. The expressions of T-bet, GATA binding protein 3 (GATA-3), forkhead box protein3 (Foxp3) and retinoid related orphan receptor gamma t (ROR γ t) in lung tissue were detected by Real-time PCR. **Results** Compared with asthmatic mouse, mouse treated with vaccine exhibited the decreased airway responsiveness, IgE (all $P < 0.05$) and inflammatory infiltration of lung tissues, repressed proliferation of goblet cells, and increased IFN- γ /IL-4, TGF- β /IL-17, T-bet/GATA-3 and Foxp3/ROR γ t (all $P < 0.05$). **Conclusion** The Hsp70/CD80 DNA vaccine plays a therapeutic role in asthma by restoring the balance of Th1/Th2/Treg/Th17 cell.

Key words: Asthma; CD4 + CD25 + Regulatory T cell; T helper cell 17

哮喘是一种免疫调节异常的呼吸系统疾病,其发病机制复杂。免疫反应异常是哮喘发生的重要环节,在哮喘中发挥关键作用^[1]。本课题前期构建了热休克蛋白 70 (heat shock protein70, HSP70)/CD80 DNA 疫苗,以该重组融合蛋白作为免疫原,刺激机体产生免疫应答。并观察 HSP70/CD80 DNA 疫苗对小鼠急慢性哮喘的预防和治疗作用,发现其机制可能是从非特异性免疫方面恢复辅助性 T 细胞 1 (T helper cell 1, Th1)/辅助性 T 细胞 2 (T helper cell 2, Th2) 平衡^[2-3]。随着人们对 CD4 + T 细胞认识的逐渐深入,发现 CD4 + CD25 + 调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)和辅助性 T 细胞 17 (T helper cell 17, Th17)也在哮喘的发生中具有重要作用。HSP70/CD80 DNA 疫苗在治疗哮喘的过程中是否也调节 Treg/Th17 的平衡,目前尚不清楚。本研究拟探讨 HSP70/CD80 DNA 疫苗治疗小鼠急性哮喘的作用及其对 Th1/Th2/Treg/Th17 的影响,旨在为该疫苗的临床应用提供实验基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 健康雌性、SPF 级近交系 BALB/c 小鼠购于第三军医大学; HSP70/CD80 DNA 质粒由泸州医学院附属医院感染与免疫实验室构建^[4]; Endo-free 质粒大量提取试剂盒购于德国 QIAGEN 公司; 离心柱总 RNA 提取试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司; iScriptTM cDNA Synthesis Kit 购自美国 Bio-Rad 公司; TaKaRa SYBR Premix Ex TaqTM II 购自宝生物工程(大连)有限公司; Real-time PCR 引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 疫苗制备 pVAX1 (+) 质粒和 HSP70/CD80 DNA 质粒的制备按照试剂盒说明书进行。测定纯度及浓度后,用生理盐水调整浓度到 1 mg/mL 备用, -20 °C 存储。

1.2.2 动物模型制备 BALB/c 小鼠随机分为 4 组:空白对照组(空白组),哮喘模型组(模型组), pVAX1 (+) 空载体对照组(空载组)和 HSP70/CD80 疫苗治疗组(治疗组),每组 10 只。模型制备过程中,空载组死亡 1 只小鼠。实验开始第 0 和 14 天,新鲜配制含 10 μ g 鸡卵清蛋白(ovalbumin, OVA)的铝佐剂混悬物 200 μ L,分别腹腔注射模型组、空载组和治疗组小鼠,而空白组小鼠注射等剂量生理盐水。第 17 和 25 天,治疗组小鼠股四头肌处肌肉注射 100 μ g HSP70/CD80 DNA 疫苗,空载组注射 100 μ g pVAX1,空白组和模型组注射等体积生理盐水。第 28 天,对模型组、空载组和治疗组小鼠以 1% OVA 行雾化吸入激发,连续 7 次,30 min/次。空白组生理盐水雾化。

1.2.3 气道反应性检测 最后一次 OVA 雾化 24 h 内,吸入乙酰甲胆碱(methacholine, Mch)后检测小鼠肺功能,全身体积描记仪记录 Penh,按以下公式计算出% 基线 Penh 值: $100 \times (\text{检测 Penh 值} - \text{基线 Penh 值}) / \text{基线 Penh 值}$,各组进行比较。

1.2.4 ELISA 法检测血清 IgE 取小鼠眼球血, 4 000 r/min 离心 10 min,收集血清, -80 °C 保存。

1.2.5 观察肺组织病理学改变 切取肺组织固定于 4% 多聚甲醛 12 h。制备切片,进行 HE 和 AB-PAS 染色。镜下观察炎细胞浸润、杯状细胞增生分泌情况,参照文献对炎细胞浸润和杯状细胞进行评分^[5-6]。

1.2.6 ELISA 法检测气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中细胞因子含量 注入 400 μ L 生理盐水到主支气管,反复灌洗 3 次,吸出 BALF, 2 000 r/min 离心 10 min,收集上清,检测 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)、白细胞介素-4(interleukin-4, IL 4)、转化生长因子 β (transforming growth factor beta, TGF- β)和白细胞介素-17(interleukin-17, IL 17)含量。

1.2.7 检测肺组织中转录因子 mRNA 水平 按试

剂盒说明书进行肺组织总 RNA 提取、逆转录和 Real-time PCR 反应。检测各样本 T-bet、GATA 连接蛋白 3 (GATA binding protein 3, GATA3)、叉头蛋白 3 (forkheah box protein3, Foxp3) 和维甲酸受体相关孤儿受体 (retinoid related orphan receptor gamma t, ROR γ t) Ct 值。根据 Ct 值,用软件 ABI StepOne 进行分析,按公式 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算各样本相对表达量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件。先用 Shapiro-Wilk 行正态分布检验,符合正态分布即可用方差分析行多组间比较,用 LSD 检验行多组间两

两比较,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。如不符合用 Kruskal-Wallis H 检验行多组间比较,用 Mann-Whitney U 检验行多组间两两比较,数据以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 气道反应性的改变 见表 1。Mch 吸入浓度达到 24 mg/mL 后,与空白组小鼠相比,模型组和空载组小鼠气道反应性升高 ($P < 0.05$);与模型组小鼠相比,治疗组小鼠气道反应性降低 ($P < 0.05$)。

表 1 吸入不同浓度 Mch 后小鼠气道反应性的变化 (%)

组别	<i>n</i>	1.5 mg/mL	3 mg/mL	6 mg/mL
空白组	10	18.03(10.24,41.78)	18.03(10.28,42.19)	18.28(10.77,30.74)
模型组	10	13.54(2.19,29.22)	14.41(7.64,31.53)	32.36(24.69,48.67)
空载组	9	42.73(33.31,49.91)	48.35(34.58,60.65)	56.72(15.78,101.38)
治疗组	10	27.25(12.15,32.65)	22.71(5.28,30.85)	26.52(18.32,65.69)
χ^2		26.84	7.57	3.02
<i>P</i>		>0.05	>0.05	>0.05

组别	<i>n</i>	12 mg/mL	24 mg/mL	48 mg/mL
空白组	10	56.80(40.24,167.23)	99.97(50.34,138.23)	75.37(51.38,148.95)
模型组	10	75.97(39.49,99.55)	218.16(123.41,304.04)*	312.83(218.72,615.64)*
空载组	9	147.81(50.74,239.15)	194.43(165.05,302.58)*	276.40(253.32,323.75)*
治疗组	10	83.11(34.94,158.78)	91.26(86.87,126.92) Δ	172.87(154.90,210.66) Δ
χ^2		1.68	15.00	10.44
<i>P</i>		>0.05	<0.05	<0.05

* $P < 0.05$ vs 空白组; $\Delta P < 0.05$ vs 模型组。

2.2 IgE 水平的变化 模型组和空载组的血清 IgE 浓度 [(7.45 \pm 0.81) pg/mL, (7.08 \pm 0.74) pg/mL] 高于空白组 [(5.36 \pm 0.29) pg/mL], $P < 0.05$; 治疗组的血清 IgE 浓度 [(5.91 \pm 0.52) pg/mL] 低于模型组和空载组 ($P < 0.05$)。

2.3 肺组织炎细胞浸润和黏液分泌情况 见表 2、图 1。与空白组相比,模型组和空载组小鼠肺组织

出现大量炎细胞浸润 ($P < 0.05$), 以单核细胞和嗜酸粒细胞为主;与模型组和空载组相比,治疗组小鼠的气道、血管周围和肺泡区炎症反应减轻 ($P < 0.05$)。AB-PAS 染色后进行杯状细胞评分,结果表明,模型组和空载组小鼠的支气管上皮中阳性杯状细胞增多 ($P < 0.05$);与模型组相比,空白组和治疗组小鼠杯状细胞增生不明显 ($P < 0.05$)。

表 2 小鼠肺组织炎细胞浸润和 AB-PAS 染色结果

组别	<i>n</i>	气道周围炎细胞浸润评分	血管周围炎细胞浸润评分	肺泡区炎细胞浸润评分	AB-PAS 染色阳性细胞数
空白组	10	0.27 \pm 0.01	0.17 \pm 0.04	0.41 \pm 0.04	19.87 \pm 5.76
模型组	10	0.95 \pm 0.02*	1.18 \pm 0.03*	1.93 \pm 0.08*	78.54 \pm 4.02*
空载组	9	0.73 \pm 0.01*	0.99 \pm 0.04*	1.82 \pm 0.07*	60.15 \pm 2.43*
治疗组	10	0.46 \pm 0.02 Δ	0.48 \pm 0.03 Δ	0.96 \pm 0.06 Δ	36.21 \pm 1.95 Δ
<i>F</i>		22.87	6.07	7.68	99.30
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

* $P < 0.05$ vs 空白组; $\Delta P < 0.05$ vs 模型组。

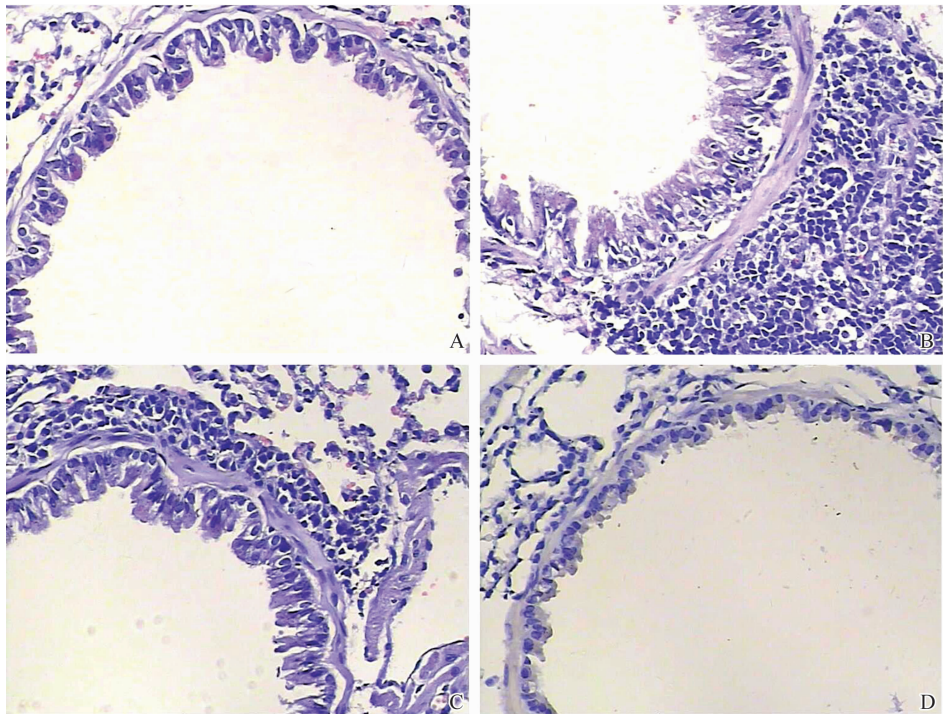


图1 各组小鼠肺组织切片(HE染色, ×200)
A:空白组;B:模型组;C:空载组;D:治疗组。

Fig.1 The microphotographs of lung tissues in mice (HE staining, ×200)

A: Control group; B: Asthma-model group; C: pVXA1-vector group; D: Vaccine treatment group.

2.4 细胞因子的改变 见表3。计算 BALF 上清液中细胞因子 IFN- γ /IL-4 和 TGF- β /IL-17 比值,结

果表明,模型组的比值低于空白组和治疗组比值 ($P < 0.05$)。

表3 细胞因子和转录因子的表达水平比值

组别	<i>n</i>	IFN- γ /IL-4	TGF- β /IL-17	T-bet/GATA-3	Foxp3 /ROR γ t
空白组	10	6.19 \pm 0.14	3.86 \pm 0.13	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
模型组	10	3.18 \pm 0.19*	1.27 \pm 0.01*	0.60 \pm 0.02*	0.43 \pm 0.03*
空载组	9	4.96 \pm 0.18*	2.29 \pm 0.15*	1.51 \pm 0.13*	0.48 \pm 0.02*
治疗组	10	5.74 \pm 0.11 Δ	3.83 \pm 0.17 Δ	2.63 \pm 0.26 Δ	1.87 \pm 0.11 Δ
<i>F</i>		8.80	2.73	4.13	10.76
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

* $P < 0.05$ vs 空白组; $\Delta P < 0.05$ vs 模型组。

2.5 转录因子表达水平 见表3。计算 T-bet/GA-TA-3 比值和 Foxp3 /ROR γ t 比值,结果表明,模型组比值低于空白组和治疗组比值 ($P < 0.05$)。

3 讨论

哮喘以气道高反应性、气道炎症和气道重建为主要特征。本研究用 OVA 致敏激发小鼠,末次雾化激发后小鼠出现上述典型症状,说明模型成功建立。HSP70 是一类以分子伴侣形式维持细胞稳态的高度保守的蛋白。HSP70 可以通过干扰细胞内炎症信号转导通路而抑制炎症反应^[7]。在哮喘的炎症反应中,HSP70 与树突细胞、单核细胞和髓系衍生抑制性细胞表面受体相结合,从而使这些细胞

免疫应答活化。HSP70 还可增强 Treg 细胞因子 IL-10 和 TGF- β 的分泌^[8]。CD80 是免疫球蛋白超家族成员,常表达于 DCs、B 细胞、巨噬细胞等细胞表面。研究表明,CD80 通过与 T 细胞表面分子 CD28 和/或 CTLA-4 作用,为 Treg^[9]、Th17^[10] 等 T 淋巴细胞活化提供共刺激信号。HSP70/CD80 DNA 疫苗对急性哮喘小鼠进行干预后,发现哮喘气道症状有所减轻,提示该疫苗可能对其有治疗作用。

Th1/Th2 失衡是哮喘发病的核心。Th2 活化过程中,转录因子 GATA-3 和 T-bet 发挥重要作用^[11]。T-bet 是调节 Th1 分化的关键转录因子,它能抑制 IL-4 的合成^[12] 和 Th2 的活化^[13]。哮喘时 Th2 增强,Th1 抑制,Th1/Th2 平衡向 Th2 发生偏移。本研究用 HSP70/CD80 DNA 疫苗治疗哮喘小鼠后,发

现治疗组 IFN- γ /IL-4 比值和 T-bet/GATA-3 比值相较模型组升高, IFN- γ 和 T-bet 也升高,说明该 DNA 疫苗上调 IFN- γ /IL-4、T-bet/GATA-3,可能通过改变 Th1/Th2 失衡状态,从而发挥对哮喘的治疗作用。

Treg 细胞能够抑制哮喘反应的发生。Treg 细胞分泌 TGF- β 、IL-10 等细胞因子,抑制嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和肥大细胞的活化,减轻 Th2 细胞因子 IL-9 等的分泌,从而抑制气道炎症反应。Th17 细胞能够促进哮喘反应的发生。Th17 细胞合成、分泌细胞因子 IL-17,IL-17 具有活化支气管上皮细胞的作用,使其分泌多种促炎因子,从而加重气道炎症反应^[14-15]。Treg 和 Th17 细胞相互制约,维持平衡。转录因子 ROR γ t 和 STAT3 调控 Th17 细胞的活化。Treg 分化由关键转录因子 Foxp3 调节和信号转导通路 TGF- β /Smad 调控。本研究结果显示,模型组 TGF- β /IL-17 比值和 Foxp3/ROR γ t 比值降低,同时 Foxp3 降低、ROR γ t 升高,提示免疫平衡向 Th17 发生偏移。通过疫苗治疗后,降低的 TGF- β /IL-17 比值和 Foxp3/ROR γ t 比值回升, TGF- β 和 Foxp3 也升高,说明 HSP70/CD80 DNA 疫苗可能通过改变 Treg/Th17 平衡,而在哮喘的治疗中发挥作用。

Th1/Th2/Treg/Th17 细胞间并非是静止不变的,而是保持着一种动态平衡关系。与以往的研究结果一致,本研究发现 Th2、Th17 的促炎反应与 Th1、Treg 的抑制炎症之间存在相互协同、相互抑制的作用。HSP70/CD80 DNA 疫苗除了通过 IFN- γ /IL-4 和 T-bet/GATA-3 比值的上调,以恢复 Th1/Th2 平衡外,还能上调 TGF- β /IL-17 和 Foxp3/ROR γ 比值,从而恢复 Treg/Th17 平衡,最终缓解哮喘的各种气道症状,对其产生治疗作用。

参考文献:

[1] Pelaia G, Vatrella A, Maselli R. The potential of biologics for the treatment of asthma[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2012, 11(12): 958-972.

[2] 成争艳,史小玲,何光彤,等. 热休克蛋白 70/CD80 嵌合疫苗对支气管哮喘小鼠的影响[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2009, 32(9): 716-717.

[3] 李燕,郭宇,史小玲,等. HSP70/CD80 DNA 疫苗通过调节趋化因子及受体对哮喘小鼠气道炎症的作用[J]. *中华微生物学与免疫学杂志*, 2013, 33(2): 123-128.

LI Yan, GUO Yu, SHI Xiaoling, et al. The effect of HSP70/CD80 DNA vaccine on airway inflammation by regulating the chemokine and the receptor of chemokine in

asthmatic mice[J]. *Chin J Microbiol Immunol*, 2013, 33(2): 123-128.

[4] 李晖,史小玲,钟森,等. hsp70/CD80 嵌合 DNA 真核表达质粒的构建及鉴定[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2002, 25(4): 244-245.

[5] Tanaka H, Masuda T, Tokuoka S, et al. The effect of allergen-induced airway inflammation on airway remodeling in a murine model of allergic asthma[J]. *Inflamm Res*, 2001, 50(12): 616-624.

[6] McMillan S J, Xanthou G, Lloyd C M. Manipulation of allergen-induced airway remodeling by treatment with anti-TGF-beta antibody: effect on the Smad signaling pathway[J]. *J Immunol*, 2005, 174(9): 5774-5780.

[7] Wakashin H, Hirose K, Maezawa Y, et al. IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 178(10): 1023-1032.

[8] Wachstein J, Tischer S, Figueiredo C, et al. HSP70 enhances immunosuppressive function of CD4(+) CD25(+) FoxP3(+) T regulatory cells and cytotoxicity in CD4(+) CD25(-) T cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): 51747-51777.

[9] Barnes M J, Griseri T, Johnson A M, et al. CTLA-4 promotes Foxp3 induction and regulatory T cell accumulation in the intestinal lamina propria[J]. *Mucosal Immunol*, 2013, 6(2): 324-334.

[10] Bouguermouh S, Fortin G, Baba N, et al. CD28 costimulation down regulates Th17 development[J]. *PLoS One*, 2009, 4(3): 5087-5117.

[11] Maier E, Duschl A, Horejs-Hoeck J. STAT6-dependent and -independent mechanisms in Th2 polarization[J]. *Eur J Immunol*, 2012, 42(11): 2827-2833.

[12] Lohoff M, Mak T W. Roles of interferon-regulatory factors in T-helper-cell differentiation[J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(2): 125-135.

[13] Oestreich K J, Weinmann A S. T-bet employs diverse regulatory mechanisms to repress transcription [J]. *Trends Immunol*, 2012, 33(2): 78-83.

[14] Oboki K, Ohno T, Saito H, et al. Th17 and allergy[J]. *Allergol Int*, 2008, 57(2): 121-134.

[15] 李洵,叶茜,高顺翠,等. 白细胞介素 17 抗体对哮喘小鼠中性粒细胞的影响[J]. *山东大学学报:医学版*, 2009, 47(3): 43-47.

LI Wei, YE Qian, GAO Shuncui, et al. Effects of IL-17 neutralization antibody on polymorph-nuclear of asthma in mice[J]. *Journal of Shandong University: Health Sciences*, 2009, 47(3): 43-47.