

文章编号: 1000-7423(2014)-04-0268-06

【论著】

# 粉尘螨变应原 Der f 1 mRNA 对小鼠特异性免疫治疗的实验研究

姜玉新<sup>1\*</sup>, 尹康<sup>2</sup>, 靳文杰<sup>2</sup>, 吴露依<sup>2</sup>, 李朝品<sup>3</sup>

**【摘要】** 目的 探讨粉尘螨变应原 Der f 1 mRNA 疫苗对哮喘小鼠的特异性免疫治疗效果。方法 50 只 BALB/c 小鼠随机分为 5 组 (10 只/组), 分别为 PBS 组、Der f 1 变应原致敏组、Der f 1 变应原免疫治疗组、 $\beta$ -actin mRNA 免疫治疗组和 Der f 1 mRNA 免疫治疗组。分别于第 0、第 7 和第 14 天, PBS 组小鼠腹腔注射 PBS, 其余 4 组小鼠则腹腔注射 10  $\mu$ g Der f 1 进行致敏, 建立小鼠哮喘模型。自第 21 天起, 除 PBS 组小鼠雾化吸入 PBS, 其他 4 组小鼠均雾化吸入 100  $\mu$ g/ml Der f 1 变应原, 30 min/次, 1 次/d, 连续 7 d, 观察并记录小鼠哮喘发作情况。5 组小鼠于最后 1 次雾化吸入致敏 2 周后, 背部皮下分别注射 100  $\mu$ l PBS、1  $\mu$ g Der f 1 (维持致敏)、10  $\mu$ g Der f 1 (免疫治疗)、2  $\mu$ g  $\beta$ -actin mRNA 和 2  $\mu$ g Der f 1 mRNA, 1 次/周, 连续 3 周。最后 1 次皮下注射后 2 周处死小鼠。收集各组小鼠的支气管肺泡灌洗液 (BALF), ELISA 法检测  $\gamma$  干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 和白介素 13 (IL-13) 水平, 并计数嗜酸粒细胞 (EOS); 收集各组小鼠脾组织, 分离脾细胞, 除 PBS 组外, 其他 4 组均加入 10  $\mu$ g/ml Der f 1 培养 72 h, ELISA 法检测脾细胞培养上清液中 IFN- $\gamma$  和 IL-13 水平; 取各组小鼠眼球血, ELISA 法检测血清中总 IgE 以及变应原特异性 IgE (sIgE)、IgG<sub>1</sub> (sIgG<sub>1</sub>) 和 IgG<sub>2a</sub> (sIgG<sub>2a</sub>) 抗体水平。HE 染色观察各组小鼠肺组织切片。结果 除 PBS 组外, 其他 4 组小鼠雾化吸入致敏后, 均出现急性哮喘发作症状。小鼠 BALF 中, Der f 1 mRNA 免疫治疗组和 Der f 1 免疫治疗组的 IFN- $\gamma$  水平分别为 (897.56 $\pm$ 105.73) 和 (864.48 $\pm$ 70.62) pg/ml, 均明显高于 Der f 1 变应原致敏组 [(209.05 $\pm$ 52.28) pg/ml] 和  $\beta$ -actin mRNA 免疫治疗组 [(219.47 $\pm$ 64.72) pg/ml] ( $P$ <0.01); 两者 IL-13 水平分别为 (241.64 $\pm$ 31.41) 和 (321.94 $\pm$ 41.07) pg/ml, 则明显低于 Der f 1 变应原致敏组 [(520.62 $\pm$ 43.77) pg/ml] 和  $\beta$ -actin mRNA 免疫治疗组 [(507.22 $\pm$ 42.26) pg/ml] ( $P$ <0.01); 两者 EOS 数量分别为 (1.33 $\pm$ 0.44)  $\times 10^5$  和 (1.48 $\pm$ 0.39)  $\times 10^5$  个/ml, 均明显低于 Der f 1 变应原致敏组 [(3.54 $\pm$ 0.52)  $\times 10^5$  个/ml] 和  $\beta$ -actin mRNA 免疫治疗组 [(2.98 $\pm$ 0.53)  $\times 10^5$  个/ml] ( $P$ <0.01)。脾细胞培养上清的 ELISA 检测结果显示, Der f 1 mRNA 免疫治疗组和 Der f 1 免疫治疗组的 IFN- $\gamma$  水平分别为 (420.91 $\pm$ 69.92) 和 (334.92 $\pm$ 43.72) pg/ml, 明显高于 Der f 1 变应原致敏组 [(123.75 $\pm$ 15.48) pg/ml] 和  $\beta$ -actin mRNA 免疫治疗组 [(128.84 $\pm$ 59.00) pg/ml] ( $P$ <0.01); 两者 IL-13 水平 [(268.51 $\pm$ 40.42) 和 [(285.26 $\pm$ 62.21) pg/ml] 则显著低于 Der f 1 变应原致敏组 [(613.89 $\pm$ 51.54) pg/ml] 和  $\beta$ -actin mRNA 免疫治疗组 [(524.05 $\pm$ 39.12) pg/ml] ( $P$ <0.01)。血清中抗体水平的 ELISA 检测结果显示, Der f 1 mRNA 免疫治疗组的总 IgE、sIgE 和 sIgG<sub>1</sub> 抗体水平分别为 (33.72 $\pm$ 9.78)、(22.76 $\pm$ 8.09) 和 (17.87 $\pm$ 7.59) ng/ml, 均显著低于 Der f 1 变应原致敏组 [(94.34 $\pm$ 11.66)、(65.67 $\pm$ 9.47) 和 (75.18 $\pm$ 9.52) ng/ml] 和  $\beta$ -actin mRNA 免疫治疗组 [(86.48 $\pm$ 10.26)、(62.36 $\pm$ 8.35) 和 (69.51 $\pm$ 8.98) ng/ml] ( $P$ <0.01); 其 sIgG<sub>2a</sub> 抗体水平为 (7.74 $\pm$ 0.88) ng/ml, 则明显高于 Der f 1 变应原致敏组 [(2.81 $\pm$ 1.17) ng/ml] 和  $\beta$ -actin mRNA 免疫治疗组 [(1.06 $\pm$ 0.11) ng/ml] ( $P$ <0.01)。肺组织切片 HE 染色镜检结果显示, 与 Der f 1 变应原致敏组相比, Der f 1 mRNA 免疫治疗组小鼠的气道上皮和肺泡上皮细胞结构基本完整, 炎症细胞浸润明显减少。结论 Der f 1 mRNA 疫苗可有效纠正 Th1/Th2 失衡。

**【关键词】** 粉尘螨; 变应原; mRNA 疫苗; 特异性免疫治疗

中图分类号: R384.429 文献标识码: A

## Experimental Study on the Der f 1 mRNA Molecules Derived from *Dermatophagoides farinae* for Specific Immunotherapy on Murine Model of Asthma

JIANG Yu-xin<sup>1\*</sup>, YIN Kang<sup>2</sup>, JIN Wen-jie<sup>2</sup>, WU Lu-yi<sup>2</sup>, LI Chao-pin<sup>3</sup>

(Wannan Medical College, 1 Department of Physiology, 2 School of Clinical Medicine, 3 Department of Medical Parasitology, Wuhu 241002, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of Der f 1 mRNA molecules for specific immunotherapy on murine

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 81172790, 81270091); 国家级大学生创新创业训练项目 (No. 201310368022, 201310368031)

作者单位: 皖南医学院, 1 基础医学院生理学教研室; 2 临床医学院; 3 基础医学院医学寄生虫学教研室, 芜湖 241002

\* 通讯作者, E-mail: jiangyuxin2000@hotmail.com

model of asthma. **Methods** Fifty BALB/c mice were randomly divided into 5 groups: PBS group, Der f 1 sensitization group, Der f 1 specific immunotherapy (SIT) group,  $\beta$ -actin mRNA SIT group, and Der f 1 mRNA SIT group. On days 0, 7 and 14, mice in PBS group received PBS injection; mice in the other groups were intraperitoneally injected with 10  $\mu$ g Der f 1. At day 21, the mice in the 4 experimental groups were challenged with a 30-min inhaled dose of Der f 1 (100  $\mu$ g/ml) for 7 successive days. Two weeks after the final sensitization, the mice in the above five groups were immunized by intradermal injection with PBS, 1  $\mu$ g Der f 1, 10  $\mu$ g Der f 1, 2  $\mu$ g  $\beta$ -actin mRNA, and 2  $\mu$ g Der f 1 mRNA, respectively for 3 times at one-week intervals. Two weeks after the last intradermal injection, all mice were sacrificed and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected. ELISA was performed to detect the levels of IFN- $\gamma$  and IL-13 in BALF, the number of eosinophils in the BALF was recorded. Splenocytes were prepared, and cultured with Der f 1 allergen (10  $\mu$ g/ml) for 72 h. Splenocytes of PBS group was cultured without Der f 1 allergen. The levels of IFN- $\gamma$  and IL-13 in splenocyte culture supernatant were measured by ELISA, as well as serum antibody levels of total IgE, allergen-specific IgE (sIgE), sIgG<sub>1</sub>, and sIgG<sub>2a</sub>. Lung sections were stained in hematoxylin and eosin, and observed under the microscope. **Results** Except for PBS group, mice in the other 4 group showed symptoms of acute asthma attack. Compared with Der f 1 sensitization group [(897.56 $\pm$ 105.73) pg/ml] and  $\beta$ -actin mRNA SIT group [(219.47 $\pm$ 64.72) pg/ml], the level of IFN- $\gamma$  in BALF from Der f 1 mRNA SIT group [(897.56 $\pm$ 105.73) pg/ml] and Der f 1 SIT group [(864.48 $\pm$ 70.62)pg/ml] significantly increased ( $P$ <0.01). However, the level of IL-13 in BALF from Der f 1 mRNA SIT group [(241.64 $\pm$ 31.41) pg/ml] and Der f 1 SIT group [(321.94 $\pm$ 41.07)pg/ml] was significantly lower than that of Der f 1 sensitization group [(520.62 $\pm$ 43.77) pg/ml] and  $\beta$ -actin mRNA SIT group [(507.22 $\pm$ 42.26) pg/ml] ( $P$ <0.01). The number of eosinophils in Der f 1 mRNA SIT group [(1.33 $\pm$ 0.44) $\times$ 10<sup>5</sup>/ml] and Der f 1 SIT group [(1.48 $\pm$ 0.39) $\times$ 10<sup>5</sup>/ml] was also lower than that of Der f 1 sensitization group [(3.54 $\pm$ 0.52) $\times$ 10<sup>5</sup>/ml] and  $\beta$ -actin mRNA SIT group [(2.98 $\pm$ 0.53) $\times$ 10<sup>5</sup>/ml] ( $P$ <0.01). The levels of IFN- $\gamma$  and IL-13 in splenocyte culture supernatant showed that IFN- $\gamma$  level in Der f 1 mRNA SIT group [(420.91 $\pm$ 69.92) pg/ml] and Der f 1 SIT group [(334.92 $\pm$ 43.72) pg/ml] was significantly higher than that of Der f 1 sensitization group [(123.75 $\pm$ 15.48) pg/ml] and  $\beta$ -actin mRNA SIT group [(128.84 $\pm$ 59.00) pg/ml] ( $P$ <0.01). However, IL-13 level of Der f 1 mRNA SIT group [(268.51 $\pm$ 40.42) pg/ml] and Der f 1 SIT group [(285.26 $\pm$ 62.21)pg/ml] was significantly lower than that of Der f 1 sensitization group [(613.89 $\pm$ 51.54) pg/ml] and  $\beta$ -actin mRNA SIT group [(524.05 $\pm$ 39.12) pg/ml] ( $P$ <0.01). Compared with Der f 1 sensitization group [total IgE: (94.34 $\pm$ 11.66) ng/ml, sIgE: (65.67 $\pm$ 9.47) ng/ml, sIgG<sub>1</sub>: (75.18 $\pm$ 9.52) ng/ml, sIgG<sub>2a</sub>: (2.81 $\pm$ 1.17) ng/ml] and  $\beta$ -actin mRNA SIT group [total IgE: (86.48 $\pm$ 10.26) ng/ml, sIgE: (62.36 $\pm$ 8.35) ng/ml, sIgG<sub>1</sub>: (69.51 $\pm$ 8.98) ng/ml, IgG<sub>2a</sub>: (1.06 $\pm$ 0.11) ng/ml], the serum antibody levels of total IgE [(33.72 $\pm$ 9.78) ng/ml], sIgE [(22.76 $\pm$ 8.09) ng/ml], sIgG<sub>1</sub> [(17.87 $\pm$ 7.59) ng/ml] of Der f 1 mRNA SIT group decreased significantly ( $P$ <0.01), whereas the level of IgG<sub>2a</sub> [(7.74 $\pm$ 0.88) ng/ml] increased ( $P$ <0.01). Compared with Der f 1 sensitization group, the asthmatic symptoms were relieved after immunization with Der f 1 mRNA for specific immunotherapy, including intact structure of respiratory and alveolar epithelial cells, decreased inflammatory cell infiltration, and similar to those in Der f 1 SIT group. However, the breakage and detachment of bronchial epithelial cells occurred in  $\beta$ -actin mRNA SIT group. **Conclusion** Der f 1 mRNA vaccine can correct Th1 and Th2 imbalance.

**【Key words】** *Dermatophagoides farinae*; Allergen; mRNA vaccine; Specific immunotherapy

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 81172790, 81270091) and National Training Programs of Innovation and Entrepreneurship for Undergraduates (No. 201310368022, 201310368031)

\* Corresponding author, E-mail: jiangyuxin2000@hotmail.com

变应性哮喘是临床常见病、多发病,属于 I 型过敏性疾病,为重要的公共卫生问题之一<sup>[1]</sup>。变应性哮喘是一种以肺部嗜酸粒细胞浸润和对各种激发因素产生气道高反应性为特征的慢性气道炎症疾病,其发病率逐年上升<sup>[2,3]</sup>。约 80% 的变应性哮喘患者对尘螨有变态反应,其中粉尘螨 I 类变应原 (Der f 1) 是主要的空气传播变应原之一<sup>[4,5]</sup>。辅助性 T 细胞 Th1/Th2 比例失衡是变应性哮喘发病的重要因素之一<sup>[6,7]</sup>。目前,特异性免疫治疗 (specific immunotherapy, SIT) 是变应

性哮喘惟一有效的病因疗法<sup>[8]</sup>。但因变应原疫苗的成分复杂 (尤其是特性不明的变应原存在) 以及给药剂量高,易导致变应反应不良反应的发生<sup>[7]</sup>。

近年来,基于核酸的疫苗备受关注。大量的动物实验证明, DNA 疫苗可下调变应性哮喘模型中的 Th2 反应,从而纠正 Th1/Th2 比例失衡<sup>[9,10]</sup>。但基于 DNA 的疫苗由于存在质粒 DNA 整合到宿主基因组、免疫病理副效应、自身免疫性疾病的诱导,以及不可控的编码变应原的长期表达等风险,而对 DNA 疫苗的安全性提

出质疑<sup>[8]</sup>。mRNA疫苗可克服DNA疫苗的不足,如无需外源质粒DNA骨架和病毒启动子、mRNA不会整合到宿主基因组、mRNA只需进入细胞质就可进行相应的外源变应原的翻译、以及翻译后的mRNA迅速降解等<sup>[8,11]</sup>。Roesler等<sup>[5]</sup>成功检测了29种变应原mRNA疫苗对I型变态反应疾病的免疫治疗效果。但Der f 1作为变应性哮喘的重要致敏原之一,其mRNA疫苗的研究尚未见报道。本研究拟建立Der f 1的mRNA疫苗表达载体,并对变应性哮喘小鼠模型进行特异性免疫治疗,观察其效果,以期变应性哮喘的防治提供理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 50只6~8周龄SFP级雌性BALB/c小鼠,体重18~22 g,购自扬州大学比较医学中心(许可证号为SCXK苏2007-0001)。

1.1.2 主要试剂和仪器 原核表达重组载体pET28a-Der f 1为本实验室构建并保存,Der f 1变应原为本实验室分离纯化并保存。pTNT质粒、T7或SP6 RiboMAX大规模RNA制备系统购自普洛麦格(北京)生物技术有限公司;EcoR I和Kpn I内切酶、DNase I、T<sub>4</sub> DNA连接酶购自美国ThermoFisher Scientific公司;γ干扰素(IFN-γ)、白细胞介素13(IL-13)、变应原特异性IgE、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2a</sub>和总IgE检测试剂盒购自美国R&D公司;ScriptCap m7G加帽系统购自美国Epicentre Biotechnologies公司;细菌脂多糖(LPS)购自美国Sigma公司;RPMI 1640培养基、胎牛血清、青霉素和链霉素购自生工生物工程(上海)股份有限公司;刘氏染液购自珠海贝索生物技术有限公司;其他均为国产分析纯。

CO<sub>2</sub>培养箱(MCO-15AC型)为日本SANYO公司产品;超净工作台(SW-CJ-2A型)为吴江市新长城空调净化有限公司产品;酶标仪(ELx800型, BioTek®)为美国伯爵仪器有限公司产品;超声雾化器(402AI型)为丹阳市江苏鱼跃医疗设备股份有限公司产品;台式高速冷冻离心机(Beckman Coulter Microfuge 22R型)为美国贝克曼公司产品。

### 1.2 方法

1.2.1 pTNT-Der f 1重组载体的构建 以pET28a-Der f 1为模板,用Der f 1基因的特异性引物(正向引物:5'-GCGGAATTTCAGCGCTTGCCGTATCAATTCGGTTAAC-3',引入EcoR I酶切位点;反向引物为5'-CATGGTACCGTTGTTCCGGCTTGAAATATCCG-3',引入Kpn I酶切位点)进行PCR扩增。用EcoR I和Kpn I对PCR产物和pTNT载体进行双酶切,酶切产物纯化

后,用T<sub>4</sub> DNA连接酶进行连接,连接产物转化大肠埃希菌(*E. Coli*) DH5α感受态细胞后,挑取菌落单克隆进行双酶切鉴定,阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。同时构建小鼠源β-actin基因的重组载体pTNT-β-actin(阴性对照),所用引物:正向引物5'-GCGGAATTCTCATCACTATTGGCAACGAGC-3',反向引物5'-CATGGTACCAACAGTCCGCC-TAGAAGCAC-3',酶切位点同上。

1.2.2 mRNA的制备 分别以pTNT-Der f 1和pTNT-β-actin为模板,上述引物进行mRNA转录,转录反应用T7或SP6 RiboMAX大规模RNA制备系统,操作均按说明书进行。反应产物用DNase I进行消化,去除残存的DNA。经罗氏高效DNA地高辛标记和检测试剂盒II检测无残存DNA后,将获得的RNA用ScriptCap m7G加帽系统按说明书进行加帽,以维持mRNA的稳定性。

1.2.3 小鼠哮喘模型的建立及特异性免疫治疗 哮喘小鼠模型的制备按常规方法进行。50只BALB/c小鼠随机分为5组(10只/组),分别为PBS组、Der f 1变应原致敏组、Der f 1免疫治疗组、β-actin mRNA免疫治疗组和Der f 1 mRNA免疫治疗组。分别在第0、7、14 d, PBS组小鼠腹腔注射100 μl含2% Al(OH)<sub>3</sub>的PBS混悬液,其余4组小鼠则分别腹腔注射含10 μg的Der f 1(溶于100 μl含2% Al(OH)<sub>3</sub>的PBS混悬液)进行致敏。自第21天起,依次将各组小鼠放入雾化吸入箱进行雾化吸入, PBS组吸入含2% Al(OH)<sub>3</sub>的PBS混悬液,其余4组吸入含100 μg/ml Der f 1变应原的2% Al(OH)<sub>3</sub>的PBS混悬液,30 min/(次·日),连续激发7 d,观察并记录小鼠哮喘发作情况。变应原和mRNA特异性免疫治疗分别根据文献<sup>[8,12]</sup>的方法适当修改后进行。最后1次雾化吸入致敏2周后, PBS组小鼠背部皮下注射(选择6~8个点)100 μl 2% Al(OH)<sub>3</sub>的PBS, Der f 1变应原致敏组、Der f 1免疫治疗组、β-actin mRNA免疫治疗组和Der f 1 mRNA免疫治疗组的小鼠则分别用1 μg Der f 1(维持致敏)、10 μg Der f 1(免疫治疗)、2 μg β-actin mRNA和2 μg Der f 1 mRNA(均溶于100 μl含2% Al(OH)<sub>3</sub>的PBS混悬液)皮下注射,1次/周,连续3周。最后1次背部皮下注射2周后处死小鼠进行相关检测。

1.2.4 支气管肺泡灌洗液中特异性细胞因子检测及嗜酸粒细胞计数 各组小鼠处死前,行气管插管,用1 ml预冷的PBS灌洗收集支气管肺泡灌洗液(BALF),分别用0.3、0.3和0.4 ml PBS灌洗3次,回收率>90%,1 000×g离心5 min,收集上清,-80℃冻存。ELISA法检测特异性细胞因子IFN-γ和IL-13,操作按说明书进行。用1 ml PBS重悬细胞沉淀,细胞浓度调整至

$1.0 \times 10^6/\text{ml}$ ; 取细胞悬液涂片用刘氏染色, 光学显微镜下计数嗜酸粒细胞 (EOS)。

**1.2.5 脾细胞体外培养上清中细胞因子IFN- $\gamma$ 和IL-13水平的测定** 处死后的小鼠置于75%酒精浸泡数分钟, 无菌分离脾组织并剪碎, 300目尼龙膜网过滤,  $1\ 000 \times g$ 离心5 min, 细胞沉淀用RPMI 1640培养基(含10%胎牛血清、100 U/ml青霉素和100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素)重悬制成单个脾细胞悬液, 活细胞 $\geq 98\%$ 。镜下调整细胞密度至 $1.0 \times 10^6/\text{ml}$ 。取1 ml/孔的脾细胞悬液置无菌平底48孔板中, 同时加入10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的Der f 1抗原(含5 pg/mg LPS), 于CO<sub>2</sub>恒温培养箱(37  $^{\circ}\text{C}$ , 5% CO<sub>2</sub>)培养72 h, 收集培养上清液, PBS组则不加Der f 1抗原。ELISA法测定IFN- $\gamma$ 和IL-13水平, 按说明书进行。

**1.2.6 血清中总IgE、抗原特异性IgE (sIgE)、sIgG<sub>1</sub>和sIgG<sub>2a</sub>抗体水平的测定** 各组小鼠摘眼球取血, 静置30 min, 4  $^{\circ}\text{C}$   $1\ 000 \times g$ 离心5 min, 取上清。ELISA检测血清中总IgE、sIgE、sIgG<sub>1</sub>和sIgG<sub>2a</sub>抗体水平, 按说明书进行。

**1.2.7 肺组织病理切片** 10%甲醛固定各组小鼠肺组织, 石蜡包埋, 常规切片, HE染色, 镜下观察。

**1.3 统计学分析** 各组资料均以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 用SPSS16.0统计软件进行单因素方差分析, 两样本间比较采用LSD-*t*或Tamhane's T<sub>2</sub>法检验。检验水平为 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 小鼠哮喘发作情况观察** 小鼠在用Der f 1变应原变态反应过程中, 除PBS组外, 其他各组小鼠均出现不同程度的烦躁不安或安静少动、呼吸急促并伴有点头呼吸/或前肢缩抬/或抓耳挠背/或弓背直立等类似急性哮喘发作症状; PBS组小鼠活动自如, 未见阳性反应。

**2.2 各组小鼠BALF中的IFN- $\gamma$ 和IL-13水平** ELISA检测结果显示, Der f 1 mRNA免疫治疗组和Der f 1免疫治疗组的IFN- $\gamma$ 水平分别为(897.56  $\pm$  105.73)和(864.48  $\pm$  70.62) pg/ml, 明显高于Der f 1变应原致敏组[(209.05  $\pm$  52.28) pg/ml]和 $\beta$ -actin mRNA免疫治疗组[(219.47  $\pm$  64.72) pg/ml]( $P < 0.01$ )。两者的IL-13水平分别为(241.64  $\pm$  31.41)和(321.94  $\pm$  41.07) pg/ml, 明显低于Der f 1变应原致敏组[(520.62  $\pm$  43.77) pg/ml]和 $\beta$ -actin mRNA免疫治疗组[(507.22  $\pm$  42.26) pg/ml]( $P < 0.01$ ), 但Der f 1 mRNA免疫治疗对IL-13的抑制作用更明显。

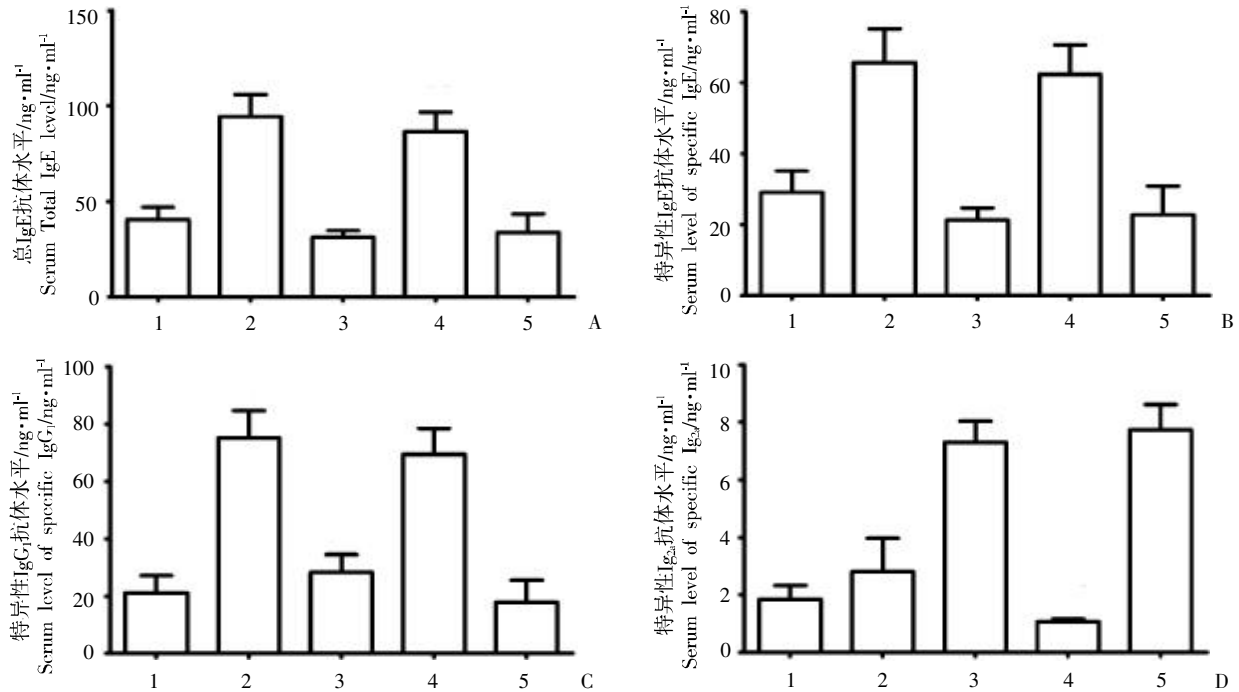
**2.3 BALF中的嗜酸粒细胞计数结果** Der f 1变应原致敏组的BALF中的嗜酸粒细胞总数 [(3.54  $\pm$  0.52)  $\times$

$10^5$ 个/ml]明显高于PBS组 [(0.25  $\pm$  0.10)  $\times 10^5$ 个/ml] ( $P < 0.01$ ), 而Der f 1 mRNA免疫治疗组 [(1.33  $\pm$  0.44)  $\times 10^5$ 个/ml]和Der f 1免疫治疗组 [(1.48  $\pm$  0.39)  $\times 10^5$ 个/ml]的嗜酸粒细胞总数则低于Der f 1变应原致敏组 ( $P < 0.01$ )。与Der f 1变应原致敏组相比,  $\beta$ -actin mRNA免疫治疗组对嗜酸粒细胞的抑制作用不明显 [(2.98  $\pm$  0.53)  $\times 10^5$ 个/ml] ( $P > 0.05$ )。

**2.4 脾细胞培养上清中的IFN- $\gamma$ 和IL-13水平** ELISA结果显示, Der f 1 mRNA免疫治疗组和Der f 1免疫治疗组的IFN- $\gamma$ 水平分别为(420.91  $\pm$  69.92)和(334.92  $\pm$  43.72) pg/ml, 明显高于Der f 1变应原致敏组[(123.75  $\pm$  15.48) pg/ml]和 $\beta$ -actin mRNA免疫治疗组[(128.84  $\pm$  59.00) pg/ml] ( $P < 0.01$ )。与Der f 1变应原致敏组 [(613.89  $\pm$  51.54) pg/ml]和 $\beta$ -actin mRNA免疫治疗组 [(524.05  $\pm$  39.12) pg/ml]相比, Der f 1 mRNA免疫治疗组 [(268.51  $\pm$  40.42) pg/ml]和Der f 1免疫治疗组 [(285.26  $\pm$  62.21) pg/ml]的IL-13水平均显著降低 ( $P < 0.01$ )。

**2.5 血清总IgE、sIgE、sIgG<sub>1</sub>和sIgG<sub>2a</sub>抗体水平** ELISA检测结果显示, Der f 1 mRNA免疫治疗组小鼠总IgE、sIgE和sIgG<sub>1</sub>抗体水平分别为(33.72  $\pm$  9.78)、(22.76  $\pm$  8.09)和(17.87  $\pm$  7.59) ng/ml, 较Der f 1变应原致敏组 [(94.34  $\pm$  11.66)、(65.67  $\pm$  9.47)和(75.18  $\pm$  9.52) ng/ml]和 $\beta$ -actin mRNA免疫治疗组 [(86.48  $\pm$  10.26)、(62.36  $\pm$  8.35)和(69.51  $\pm$  8.98) ng/ml]显著降低 ( $P < 0.01$ )。Der f 1 mRNA免疫治疗组和Der f 1免疫治疗组小鼠的sIgG<sub>2a</sub>抗体水平为(7.74  $\pm$  0.88)和(7.31  $\pm$  0.73) ng/ml ( $P > 0.05$ ), 显著高于Der f 1变应原致敏组的(2.81  $\pm$  1.17) ng/ml ( $P < 0.01$ )。 $\beta$ -actin mRNA免疫治疗组小鼠的sIgG<sub>2a</sub>抗体水平 [(1.06  $\pm$  0.11) ng/ml]与Der f 1变应原致敏组间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (图1)。

**2.6 肺组织病理检查结果** 肺组织病理切片HE染色后镜下观察示, PBS组小鼠的支气管及肺泡上皮细胞结构相对完整, 血管壁未明显增厚, 也未见明显的嗜酸粒细胞浸润等炎症反应 (图2A); Der f 1变应原致敏组小鼠支气管、血管黏膜下及周围肺组织有明显的以嗜酸粒细胞为主的炎症细胞浸润, 形成血管炎和/或支气管周围炎, 支气管上皮细胞部分断裂及脱落 (图2B、2C)。Der f 1免疫治疗组和Der f 1 mRNA免疫治疗组可见炎症反应明显减轻, 炎症细胞浸润比Der f 1变应原致敏组显著减少, 且气道上皮及肺泡上皮细胞结构基本完整 (图2D、2F)。 $\beta$ -actin mRNA免疫治疗组小鼠的病理变化未见明显好转, 仍见支气管上皮细胞部分断裂及脱落 (图2E)。

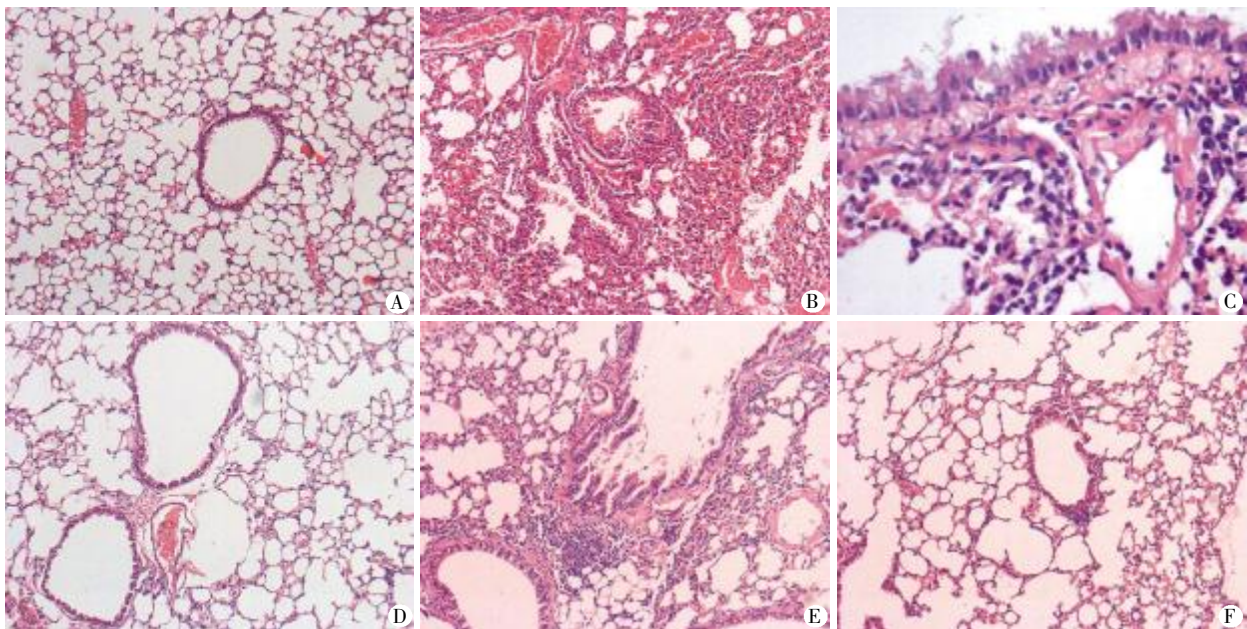


1; PBS组; 2; Der f 1 变应原致敏组; 3; Der f 1 免疫治疗组; 4;  $\beta$ -actin mRNA 免疫治疗组; 5; Der f 1 mRNA 免疫治疗组。\* 与 Der f 1 变应原致敏组相比,  $P < 0.01$ 。

1; PBS group; 2; Der f 1 sensitization group; 3; Der f 1 specific immunotherapy group; 4;  $\beta$ -actin mRNA immunotherapy group; 5; Der f 1 mRNA specific immunotherapy group. \* vs Der f 1 sensitization group,  $P < 0.01$ .

图1 各组小鼠血清中总IgE、Der f 1 特异性IgE (sIgE)、sIgG<sub>1</sub>和sIgG<sub>2a</sub>抗体水平

Fig.1 Serum levels of total IgE, specific IgE (sIgE), sIgG<sub>1</sub>, and sIgG<sub>2a</sub> of mice from the five groups



A: PBS组 ( $\times 100$ ), 支气管及肺泡上皮细胞等结构相对完整; B: Der f 1 变应原致敏组 ( $\times 100$ ), 支气管上皮脱落; C: Der f 1 变应原致敏组 ( $\times 400$ ), 明显的支气管炎和血管炎及上皮脱落; D: Der f 1 免疫治疗组 ( $\times 100$ ), 轻度血管炎, 肺泡上皮细胞相对完整; E:  $\beta$ -actin mRNA 免疫治疗组 ( $\times 100$ ), 支气管周围炎及上皮脱落; F: Der f 1 mRNA 免疫治疗组 ( $\times 100$ ), 支气管周围存在极少量炎症, 肺泡上皮细胞相对完整。

A: PBS group ( $\times 100$ ), relatively intact structures of bronchia and alveolar epithelial cells; B: Der f 1 sensitization group ( $\times 100$ ), desquamation of bronchia epithelial cells; C: Der f 1 sensitization group ( $\times 400$ ), bronchitis and vasculitis, and epithelial desquamation; D: Der f 1 SIT group ( $\times 100$ ), mild vasculitis, and relatively intact structure of alveolar epithelial cells; E:  $\beta$ -actin mRNA SIT group ( $\times 100$ ), peribronchitis, epithelial desquamation; F: Der f 1 mRNA SIT group ( $\times 100$ ), thimbleful inflammation around bronchia, and relatively intact structure of alveolar epithelial cells.

图2 各组小鼠肺组织切片的病理改变 (HE染色)

Fig.2 Pathological changes of murine lung tissue of mice in each group (HE staining)

### 3 讨 论

螨性变应性哮喘是以肺内嗜酸粒细胞聚集、气道高反应性为特点的 IgE 介导的 I 型变态反应性疾病, 主要表现为 Th1/Th2 细胞比例失衡, 并以分泌 Th2 型细胞因子 (如 IL-4、IL-5 和 IL-13 等) 为主的免疫应答, 而 Th1 型细胞因子 (如 IFN- $\gamma$  和 IL-2) 分泌则受到抑制<sup>[13,14]</sup>。特异性免疫治疗是过敏性疾病的惟一病因治疗<sup>[8]</sup>, 可有效纠正 Th1/Th2 平衡失调、抑制 IgE 分泌和减少炎症效应细胞 (如嗜酸粒细胞) 数量等<sup>[15,16]</sup>。目前, 针对尘螨变应原特异性免疫治疗疫苗主要包括变应原疫苗<sup>[17]</sup>和 DNA 疫苗<sup>[18]</sup>, 但其临床应用前景仍不尽如人意。RNA 疫苗可克服上述两种疫苗的不足, 成为哮喘疫苗研究的热点。本研究探讨了粉尘螨 I 类变应原基因 Der f 1 mRNA 疫苗对过敏性哮喘小鼠的免疫治疗效果, 结果表明, Der f 1 mRNA 可有效提高由 Der f 1 变应原致敏的哮喘小鼠 BALF 和脾细胞培养上清中 IFN- $\gamma$  水平, 同时抑制了 IL-13 的分泌, 从而有效校正了变应性哮喘中的 Th1/Th2 比例失衡, 且其效果与 Der f 1 变应原免疫治疗效果相似。IFN- $\gamma$  能有效抑制 IgE 抗体产生, 并促使 Th2 型细胞因子分泌向 Th1 型细胞因子分泌转变<sup>[19]</sup>, 另外, 本研究结果显示, Der f 1 mRNA 不仅可有效降低哮喘小鼠血清中的总 IgE、Der f 1 特异性 IgE 和 IgG<sub>1</sub> 抗体水平, 亦可促进保护性抗体 IgG<sub>2a</sub> 的分泌。由于变应原活化 Th 细胞后可诱导 IgE 抗体产生, 诱发气道炎症和气道高反应性等变应性哮喘症状<sup>[20]</sup>。本研究中, 肺组织病理切片结果显示, Der f 1 变应原诱发的哮喘模型表现为气道、肺泡和血管周围有大量炎症细胞浸润、上皮细胞脱落等结构破坏, 而经 Der f 1 mRNA 进行免疫治疗后, 炎症细胞浸润减少、上皮细胞脱落减轻。

综上所述, Der f 1 mRNA 疫苗可有效调节小鼠在变应性哮喘发病过程中 Th1/Th2 免疫应答失衡, 并抑制抗原特异性 IgE 抗体的产生, 从而为变态反应性疾病的治疗提供了一种新型候选疫苗。

#### 参 考 文 献

- [1] Bousquet PJ, Chinn S, Janson C, *et al.* Geographical variation in the prevalence of positive skin tests to environmental aeroallergens in the European Community Respiratory Health Survey I [J]. *Allergy*, 2007, 62(3): 301-309.
- [2] Masoli M, Beasley R. Asthma exacerbations and inhaled corticosteroids [J]. *Lancet*, 2004, 363(9416): 1236.
- [3] 郑蔓茵, 邬玉兰, 闫浩, 等. 粉尘螨第 7 类变应原 (Der f 7) 基因

的克隆表达及免疫学特性鉴定 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2011, 31(5): 363-366.

- [4] Milián E, Díaz AM. Allergy to house dust mites and asthma [J]. *P R Health Sci J*, 2004, 23(1): 47-57.
- [5] 杨庆贵, 李朝品. 粉尘螨 I 类变应原的 cDNA 克隆测序及亚克隆 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2004, 22(3): 173-175.
- [6] Gaffen SL, Hajishengallis G. A new inflammatory cytokine on the block: re-thinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th17 cells and IL-17 [J]. *J Dent Res*, 2008, 87(9): 817-828.
- [7] 喻海琼, 刘志刚, 国华, 等. 粉尘螨壳聚糖纳米疫苗舌下含服对哮喘小鼠的治疗作用 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2011, 29(1): 4-9.
- [8] Roesler E, Weiss R, Weinberger EE, *et al.* Immunize and disappear-safety-optimized mRNA vaccination with a panel of 29 allergens [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, 124(5): 1070-1077.
- [9] Weiss R, Scheibhofer S, Gabler M, *et al.* Is genetic vaccination against allergy possible? [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2006, 139(4): 332-345.
- [10] Medjitna TD, Stadler C, Bruckner L, *et al.* DNA vaccines: safety aspect assessment and regulation [J]. *Dev Biol (Basel)*, 2006, 126: 261-270.
- [11] Probst J, Weide B, Scheel B, *et al.* Spontaneous cellular uptake of exogenous messenger RNA *in vivo* is nucleic acid-specific, saturable and ion dependent [J]. *Gene Ther*, 2007, 14(15): 1175-1180.
- [12] Secor ER, Carson WF, Singh A, *et al.* Oral bromelain attenuates inflammation in an ovalbumin-induced murine model of asthma [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2008, 5(1): 61-69.
- [13] Conejero L, Higaki Y, Baeza ML, *et al.* Pollen-induced airway inflammation, hyper-responsiveness and apoptosis in a murine model of allergy [J]. *Clin Exp Allergy*, 2007, 37(3): 331-338.
- [14] Yu J, Jang SO, Kim BJ, *et al.* The effects of lactobacillus rhamnosus on the prevention of asthma in a murine model [J]. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2010, 2(3): 199-205.
- [15] Pauli G, Larsen TH, Rak S, *et al.* Efficacy of recombinant birch pollen vaccine for the treatment of birch-allergic rhinoconjunctivitis [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2008, 122(5): 951-960.
- [16] Li CP, Jiang YX, Guo W, *et al.* Production of a chimeric allergen derived from the major allergen group 1 of house dust mite species in *Nicotiana benthamiana* [J]. *Hum Immunol*, 2013, 74(5): 531-537.
- [17] Takai T, Kato T, Sakata Y, *et al.* Recombinant Der p 1 and Der f 1 exhibit cysteine protease activity but no serine protease activity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 328(4): 944-952.
- [18] Jarman ER, Lamb JR. Reversal of established CD4<sup>+</sup> type 2 T helper-mediated allergic airway inflammation and eosinophilia by therapeutic treatment with DNA vaccines limits progression towards chronic inflammation and remodelling [J]. *Immunology*, 2004, 112(4): 631-642.
- [19] Dal Negro RW, Guerriero M, Micheletto C, *et al.* Changes in total IgE plasma concentration measured at the third month during anti-IgE treatment predict future exacerbation rates in difficult-to-treat atopic asthma: a pilot study [J]. *J Asthma*, 2011, 48(5): 437-441.
- [20] Moingeon P. Sublingual immunotherapy: from biological extracts to recombinant allergens [J]. *Allergy*, 2006, 61(Suppl 81): 15-19.

(收稿日期: 2014-1-18 编辑: 张争艳)