

文章编号: 1000-5862(2016)02-0186-04

1,25(OH)₂VD₃在过敏原特异性免疫 治疗花粉过敏哮喘中的应用

肖小军¹ 张慧云² 林瑛姿² 刘志刚^{1*} 杨平常¹ 刘晓宇^{1*}

(1. 深圳大学医学院过敏反应与免疫学研究所, 广东 深圳 518060;

2. 海南医学院病理生理学教研室, 海南 海口 571101)

摘要: 以1,25(OH)₂VD₃为佐剂制备软叶针葵花粉变应原疫苗,以小鼠致敏哮喘模型为研究对象进行特异性免疫治疗. 通过检测小鼠气道高反应性、血清中特异性抗体、细胞因子以及肺组织病理学切片等指标对治疗模型的构建进行评价. 探讨1,25(OH)₂VD₃在过敏原特异性免疫治疗花粉过敏哮喘免疫机制中的作用. 结果表明: 以1,25(OH)₂VD₃为变应原疫苗能有效抑制花粉特异性IgE的产生和Th2细胞因子IL-4分泌,促进封闭性抗体IgG2a产生和Th1细胞因子IFN-γ的分泌,增加耐受性细胞因子IL-10生产,使Th2反应向Th1反应转变. 1,25(OH)₂VD₃在花粉过敏性哮喘治疗中能大幅提高过敏原特异性免疫治疗的疗效.

关键词: 1,25(OH)₂VD₃; 特异性免疫治疗; 过敏哮喘; 软叶针葵; profilin

中图分类号: R 392.8 **文献标志码:** A **DOI:** 10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2016.02.15

0 引言

过敏哮喘是由嗜酸粒细胞(EOS)、淋巴细胞、肥大细胞等多种细胞及其组分参与的气道变应性炎症,具有气道黏液高分泌和气道高反应性. 过敏性疾病作为临床上的常见多发病,被WHO认为是人类的一个重要的健康问题^[1-2]. 在众多过敏原中,来自草被和树木的花粉是重要的吸入性过敏原. 花粉过敏性鼻炎是指因花粉而引起的一种鼻腔过敏性炎症,由IgE介导的I型超敏反应. 软叶针葵(Phoenix roebelenii)属棕榈科植物,在亚热带、热带地区广泛栽种,在授粉季节会产生大量花粉,这些花粉是引起这些地区花粉过敏性疾病主要致敏原之一. Profilin又称前纤维蛋白,是一种广泛存在于高等植物的泛过敏原,profilin特异性的IgE抗体是不同过敏原之间发生交叉反应的一个重要原因^[3-5]. 孟光等^[6]重组克隆软叶针葵profilin蛋白基因,经过高效克隆表达,获得大量可溶性profilin蛋白,并通过免疫学实验验证了该花粉profilin蛋白具有良好的免疫原性. 1,25(OH)₂VD₃是维生素D生物活性代谢产物,属开环甾类化合物激素,除了能调节钙和骨代谢外,还发挥其他生物活性作用,如通过影响树突状细胞活

化或T细胞受体表达,调节免疫反应. 本实验旨在利用软叶针葵花粉激发建立哮喘小鼠模型,并以1,25(OH)₂VD₃为佐剂进行软叶针葵花粉profilin过敏原特异性免疫治疗,以探讨1,25(OH)₂VD₃在过敏原特异性免疫治疗花粉过敏哮喘免疫机制中的作用. 为扩展其应用于临床哮喘防治提供新的理论依据.

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

雌性BALB/c小鼠(SPF级,5~6周龄,体重16~20g),购于广东省医学实验动物中心,并在SPF级动物房饲养. 重组软叶针葵花粉(Phoenix roebelenii)过敏原profilin蛋白(PrP); 1,25(OH)₂VD₃(美国Sigma); Al(OH)₃(美国Sigma); 乙酰甲胆碱(Sigma,美国); 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠IgG和IgG2a抗体(E-Bioscience,美国); 生物素标记羊抗鼠IgE抗体(E-Bioscience,美国); Mouse IL-4、IL-10和IFN-γELISA试剂盒(Biolegend,美国).

1.2 实验方法

1.2.1 软叶针葵花粉过敏原profilin蛋白表达纯化 取实验室已制备的含有软叶针葵花粉profilin基

收稿日期: 2015-10-23

基金项目: 国家自然科学基金(81302553),广东省工程技术研究开发中心(2013158925),广东省科技计划(2014A020212466)和深圳市南山区创新机构提升(KC2014ZDTS0004B, KC2014ZDTS0004B)资助项目.

通信作者: 刘志刚(1959-),男,江西南昌人,教授,博士生导师,主要从事过敏性疾病过敏原的相关研究;

刘晓宇(1986-),男,江西南昌人,助教,硕士,主要从事过敏性疾病过敏原的相关研究.

因序列的 BL21 表达菌种, 在 37 °C 恒温摇床 150 r · min⁻¹ 条件下进行大量表达. 将表达得到蛋白进行 Ni²⁺ 亲和层析法纯化, 对含目的蛋白的洗脱组分进行透析并真空冻干保存.

1.2.2 动物致敏及疫苗特异性免疫治疗 小鼠随机分为 5 组 (n=6): 正常组 (Normal)、模型组 (Model)、1,25(OH)₂VD₃-PrP 治疗组、PrP 治疗组和 1,25(OH)₂VD₃ 治疗组. 正常对照组致敏及治疗都用生理盐水处理, 其余各组采用给每只小鼠腹腔注射吸附于 2 mg Al(OH)₃ 上的 50 μg 软叶针葵花粉粗提蛋白致敏, 致敏 3 次, 每隔两周 1 次. 从第 36 天开始治疗, VD₃-PrP 治疗组采用每只小鼠皮下注射 50 μg PrP 和 100 ng 1,25(OH)₂VD₃, PrP 治疗组注射 50 μg PrP, 1,25(OH)₂VD₃ 治疗组注射等量 1,25(OH)₂VD₃ 治疗组. 治疗 3 次, 每隔 3 天 1 次. 最后一次治疗 1 周后, 小鼠用 200 μg 花粉粗提蛋白连续滴鼻激发 3 次, 每天 1 次. 最后一次激发 24 h 后, 检测小鼠气道高反应性 (AHR) 的变化, 然后处死.

1.2.3 气道高反应性 (AHR) 的变化检测 小鼠最后一次激发 24 h 后, 用无创伤性全肺呼吸量计描箱中 (Buxco 美国) 检测小鼠气道高反应性. 先测定基值, 然后依次吸入不同浓度雾化的乙酰甲胆碱 PBS 液 (0.00, 6.25, 12.50, 25.00, 50.00, 100.00 mg · mL⁻¹ PBS), 每 5 min 记录一次每只小鼠的反应. 以 PBS 的 Penh 值为基础值, 绘制不同乙酰甲胆碱浓度激发下 Penh 值变化的百分比曲线.

1.2.4 血清中特异性抗体 (IgE, sIgG 和 IgG2a) 检测 小鼠气道高反应性检测后 24 h 内处理, 眼球取血, 室温静置 2 h 后, 离心取上层血清. 利用间接 ELISA 法检测血清中鱼尾葵花粉特异性 IgE、IgG、IgG2a 应答水平. 用花粉粗提蛋白 (1 ng · μL⁻¹) 包被 4 °C 过夜, 再用 3% BAS/PBS 封闭 2 h. PBST 液洗板后加用 1% BSA-PBST 溶液稀释的小鼠血清孵育 1 h. 然后加入生物素标记的羊抗小鼠二抗 (HRP-IgG 1:2 000, HRP-IgG2a 1:2 000, Biotin-IgE 1:20 000) 37 °C 孵育 1 h. 最后加入 TMB 显色液, 37 °C 避光显色 10 min, 而后用 1 mol · L⁻¹ H₂SO₄ 终止反应. 酶标仪 450 nm 处读取 OD 值.

1.2.5 细胞因子的检测 无菌条件下取出小鼠脾脏磨碎分离淋巴细胞, 然后在 24 孔培养板上, 用 RPMI1640 培养基培养 37 °C 恒温培养 72 h, 收集培养液, 4 °C 1 500 r · min⁻¹ 离心取上清, 保存于 -80 °C 待做细胞因子测定. 采用 ELISA 试剂盒检测脾细胞培养液上清及 BALF 上清中 IL-4、IL-10 和 INF-γ 水平, 严格依照说明书进行操作.

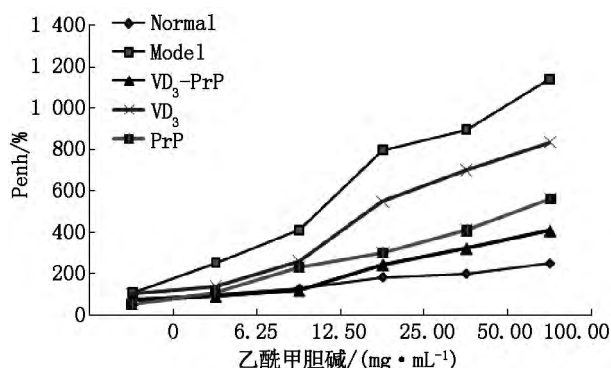
1.2.6 肺组织病理切片观察 小鼠处死后立即取其肺, 于 4% 中性甲醛溶液中固定 24 h, 再依次通过不同浓度酒精进行脱水. 随后再将肺组织包埋于石

蜡中并修切成长宽约 5 mm 的小蜡块. 再用切片机将蜡块切片 (4 μm 厚度), 将切片展开于进行 HE 染色, 然后封片, 在光学显微镜下进行肺组织病理变化观察.

2 实验结果

2.1 气道高反应性 (AHR) 的变化检测

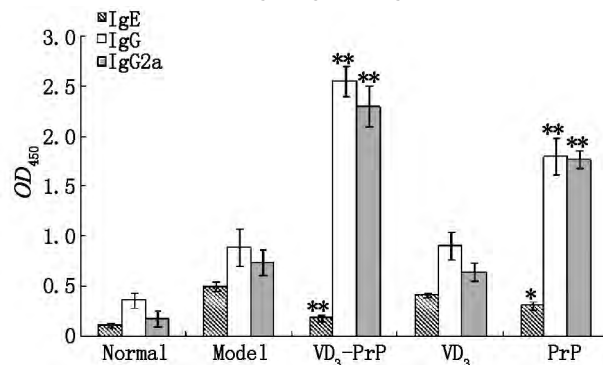
在软叶针葵花粉过敏原末次激发 24 h 后, 通过乙酰甲胆碱激发实验, 检测小鼠气道高反应性的变化. 结果 (见图 1) 显示, 模型组与正常组相比, 气道高反应性显著增强 (P < 0.05), 尤其在 25、50 和 100 mg · mL⁻¹ 3 个乙酰甲胆碱的浓度增强的更明显. 以 1,25(OH)₂VD₃ 为佐剂软叶针葵花粉重组 profilin 蛋白和单独用蛋白治疗组与模型组相比均显著减轻小鼠的气道高反应性 (P < 0.05), 且 1,25(OH)₂VD₃ 为佐剂重组 profilin 蛋白治疗组的气道高反应性比 profilin 蛋白治疗组还低.



Normal: 正常对照组; Model: 过敏性哮喘模型组; VD₃-PrP: 1,25(OH)₂VD₃ 为佐剂 profilin 蛋白治疗组; VD₃: 1,25(OH)₂VD₃ 治疗组; PrP: profilin 蛋白治疗组.

图 1 小鼠气道反应性

2.2 血清中特异性 IgE、IgG 及 IgG2a 水平变化



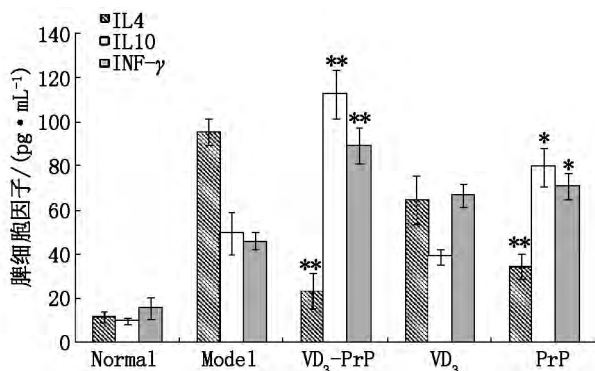
与模型组相对比* < 0.05, ** < 0.01, Normal: 正常对照组; Model: 过敏性哮喘模型组; VD₃-PrP: 1,25(OH)₂VD₃ 为佐剂 profilin 蛋白治疗组; VD₃: 1,25(OH)₂VD₃ 治疗组; PrP: profilin 蛋白治疗组.

图 2 血清中特异性 IgE、IgG 和 IgG2a 水平检测结果

通过 ELISA 法测定血清中特异性 IgE、IgG 和 IgG2a 抗体水平的变化. 结果(见图 2)显示,模型组与正常组相比 sIgE 明显升高. $1,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ -PrP 和 PrP 预防治疗后 sIgE 均比模型组明显降低 ($P < 0.05$),其中 $1,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ -PrP 疫苗疗效更显著 ($P < 0.01$),抑制 sIgE 免疫应答效果好. 另外, $1,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ -PrP 和 PrP 预防治疗后 sIgG 和 sIgG2a 显著升高,与模型组相比有显著差异,其中 $1,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ -PrP 诱导产生 sIgG2a 比 PrP 作用更明显. 结果说明 $1,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ -PrP 治疗后能抑制 Th2 反应,向 Th1 反应转变.

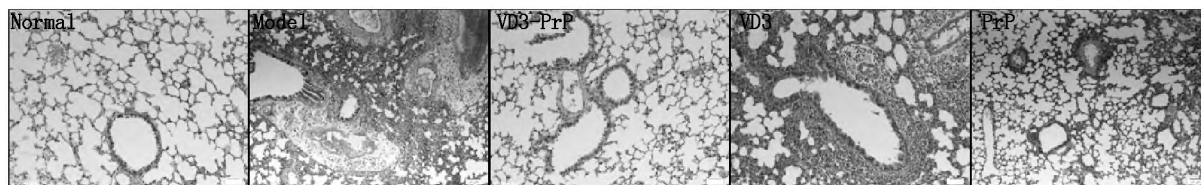
2.3 脾细胞培养上清液中细胞因子水平检测

根据脾细胞培养上清液中细胞因子检测结果(见图 3)显示,与正常组相比,模型组表现为以 Th2 细胞因子为主的免疫应答反应:显著高水平的 IL-4 ($P < 0.05$). 与模型组相比, $1,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 为佐剂的重组 profilin 蛋白和 profilin 蛋白治疗预防治疗后均表现为下调的 IL-4 水平 ($P < 0.01$) 和上调的 IL-10 以及上调的 $\text{IFN-}\gamma$ 水平 ($P < 0.05$). 说明 2 种疫苗治疗后均有抑制 Th2 反应的能力,从而使机体抗炎和免疫抑制作用更强.



与模型组相对比* < 0.05 , ** < 0.01 . Normal: 正常对照组; Model: 过敏性哮喘模型组; VD_3 -PrP: $1,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 为佐剂 profilin 蛋白治疗组; VD_3 : $1,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 治疗组; PrP: profilin 蛋白治疗组.

图 3 脾细胞培养上清液中细胞因子水平



Normal: 正常对照组; Model: 过敏性哮喘模型组; VD_3 -PrP: $1,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 为佐剂 profilin 蛋白治疗组; VD_3 : $1,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 治疗组; PrP: profilin 蛋白治疗组.

图 4 肺组织形态学观察

花粉过敏主要是由 IgE 介导的过敏性疾病^[12-13]. 肥大细胞表面表达有 IgE 亲和受体,受到抗原刺激后释放大量炎性颗粒. IgG2a 抗体能与 IgE 竞

2.4 肺组织病理切片观察

肺组织病理切片观察结果(见图 4)显示,正常组小鼠肺组织切片组织结构完整清晰,未见损伤及水肿,气管和血管周围无炎症细胞浸润. 模型组小鼠肺组织显示肺组织和支气管结构紊乱,有内出血和水肿,支气管和血管管壁增厚,周围有大量炎症细胞浸润. PLGA-PrP 纳米疫苗治疗组肺组织病理变化与正常组相似,组织结构完整清晰,未见损伤和水肿,气管和血管周围未见或偶见极少量炎症细胞浸润. 重组 Profilin 蛋白(PrP)治疗组与正常组相比,虽然肺组织未见水肿和损伤,但结构仍有些紊乱,且可见少量炎症细胞浸润,而与模型组相比肺组织病理变化要好.

3 讨论

花粉是重要的吸入性过敏原,其被吸入后被鼻腔分泌物消化,释放多种可溶性蛋白,具有较强的抗原性^[7]. 关于软叶针葵花粉过敏原的分子属性鲜有报道. 最近研究显示该花粉内的肌动蛋白抑制蛋白(profilin)在花粉症中起重要作用^[8-9]. 传统过敏原特异性免疫治疗大多使用天然过敏原来治疗,这些疫苗虽然能获得一定的疗效但也有不足之处:天然过敏原提取物标准化困难;较高浓度的过敏原有可能在过敏病人治疗过程中引起全身性过敏反应或过敏性休克等副作用^[10]. $1,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 是维生素 D 在机体内最强的活性形式,它可以与维生素 D 受体结合发挥重要的生物学效应. 目前有研究表明,维生素 D 与变应性哮喘存在相关性^[8]. 新近研究明确了维生素 D 受体基因为哮喘的易感基因,这提示 $1,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 与维生素 D 受体结合产生调节支气管哮喘的调节效应^[11]. 因此,本课题组以 $1,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 为佐剂制备的软叶针葵花粉 profilin 重组蛋白疫苗,探讨该疫苗对花粉过敏性哮喘的治疗效果.

争肥大细胞表面的受体从而封闭抗体^[14-15]. 从本实验的结果看,经 $1,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 为佐剂制备了软叶针葵花粉 profilin 重组蛋白疫苗及单独用 profilin 重

组蛋白疫苗特异性免疫治疗后的小鼠血清中 IgE 含量比模型组明显降低,而 IgG2a 含量显著升高,小鼠 IL-4 水平明显降低,IFN- γ 和 IL-10 水平明显升高,均具有显著差异,而且 1,25(OH)₂VD₃ 为佐剂的蛋白疫苗治疗要比单独使用蛋白疗效好,依从性低,能有效调节 Th1/Th2 的平衡,使其向 Th1 偏移,更能很好地抑制炎症,改善肺部过敏症状。因此,将 1,25(OH)₂VD₃ 为佐剂应用于花粉过敏原疫苗特异性免疫治疗过敏性哮喘中具有很好的疗效,为花粉过敏性疾病的预防及治疗奠定基础。

4 参考文献

- [1] Liu Zhigang, Song Juanjuan, Kong Xiaoli. A study on pollen allergens in China [J]. Biomedical and Environmental Sciences 2010, 23: 319-322.
- [2] 刘志刚, 易海涛, 夏立新, 等. 低致敏原应用于特异性免疫治疗的研究进展 [J]. 江西师范大学学报: 自然科学版 2011, 35(4): 353-357.
- [3] Casquete-Roman E, Rosado-Gil T, Postigo I, et al. Profilin cross-reactive panallergen causes latex sensitization in the pediatric population allergic to pollen [J]. Annals of Allergy Asthma & Immunology 2012, 109(3): 215-219.
- [4] Xiao Xiaojun, Zhang Xinxin, Ma Li, et al. Effects of Caryota mitis profilin-loaded PLGA nanoparticles in a murine model of allergic asthma [J]. Int J Nanomedicine, 2013, 8(11): 4553-4562.
- [5] Liu Xiaoyu, Xiao Xiaojun, Xia Lixin, et al. Identification and characterization of a pan-allergen profilin, a major allergen from Caryota mitis pollen [J]. Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology 2014, 32(1): 39-45.
- [6] 孟光, 姚敏, 刘志刚, 等. 软叶针葵花粉肌动蛋白抑制蛋白基因的克隆表达与纯化及免疫学鉴定 [J]. 中华检验医学杂志 2008, 31(10): 1171-1172.
- [7] 冯明礼, 赵锦云, 刘建珍, 等. 致敏花粉与变应性鼻炎发病关系及花粉变应原免疫治疗效果的研究 [J]. 中国公共卫生 2000, 16(8): 714-715.
- [8] 蒋聪利, 肖小军, 马莉, 等. 软叶针葵花粉疫苗治疗小鼠过敏性鼻炎的效果和机制 [J]. 细胞与分子免疫学杂志 2014, 30(2): 113-116.
- [9] 孟光, 李春林, 蔡琼香, 等. 海口地区热带植物花粉致敏性调查 [J]. 临床耳鼻咽喉科杂志 2005, 19(22): 1044-1045.
- [10] 宋颖芳, 赖国祥, 戚好文, 等. 1,25-二羟维生素 D₃ 抑制被动致敏人气道平滑肌细胞的增殖 [J]. 中国病理生理杂志 2011, 27(9): 1828-1831.
- [11] 解童玲, 林荣军, 郭建萍, 等. 1,25-二羟基维生素 D₃ 对支气管哮喘小鼠白细胞介素-17 表达的影响 [J]. 中华实用儿科临床杂志 2014, 29(4): 307-310.
- [12] 朱剑萍, 姚红伊, 谢诒诚, 等. 艾蒿花粉诱导豚鼠过敏反应 [J]. 中国病理生理杂志 2009, 25(1): 7-12.
- [13] González-Rioja R, Ferrer A, Arilla M C, et al. Diagnosis of Parietaria judaica pollen allergy using natural and recombinant Par j1 and Par j2 allergens [J]. Clin Exp Allergy, 2007, 37(2): 243-250.
- [14] Nivenka P, Jayasekera, Tudor P, Toma, Andrew Williams, et al. Mechanisms of immunotherapy in allergic rhinitis [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy 2007, 61(1): 29-33.
- [15] 万远芳, 刁庆春. 花粉疫苗治疗变态反应性疾病进展 [J]. 国际皮肤性病杂志 2008, 34(2): 107-109.

The Effects of 1,25(OH)₂VD₃ for Allergen Specific Immunotherapy in Allergic Asthma

XIAO Xiaojun¹, ZHANG Huiyun², LIN Yingzi², LIU Zhigang^{1*}, YANG Pingchang¹, LIU Xiaoyu^{1*}
(1. Institute of Allergy and Immunology, School of Medicine, Shenzhen University, Shenzhen Guangdong 518060, China;
2. Department of Pathophysiology, Hainan Medical College, Haikou Hainan 571101, China)

Abstract: BALB/c mice as research allergic asthma models, then immunological therapy with allergen vaccine together with 1,25(OH)₂VD₃ as adjuvants through subcutaneous injection. Evaluate these treatment models by detecting the mice before and after the treatment of airway hyperresponsiveness, specific antibodies in serum, cytokines and pathological changes of lung. A murine model of allergic asthma was established to study the efficacy and mechanism of the 1,25(OH)₂VD₃ for the treatment of allergic asthma. After 1,25(OH)₂VD₃ vaccines specific immune therapy, the lung symptoms and high reactivity of mice are decreased, and the levels of IgG2a elevated, IgE levels drop, which are specificity antibody in serum. In supernatant of cultivating spleen cells, INF- γ and IL-10 levels increase, the production of IL-4 decreased. 1,25(OH)₂VD₃ functions more appropriately as a specific immunotherapy adjuvant for allergen vaccines due to its superior efficacy and markedly fewer side effects.

Key words: 1,25(OH)₂VD₃; specific immunotherapy; allergic asthma; phoenix roebelenii; profilin

(责任编辑: 刘显亮)