

基础研究

葎草花粉变应原核酸疫苗通过诱导 Foxp3⁺Treg 细胞分化介导对哮喘模型小鼠的免疫保护作用卢家美^{1,2}, 李满祥^{1,2}, 孙秀珍^{1,2}, 张永红^{1,2}, 刘 昀^{1,2}, 徐 晶^{1,2}, 张苏梅³西安交通大学医学院第二附属医院¹呼吸病研究室,²呼吸内科, 陕西 西安 710004;³西安医学院护理学院, 陕西 西安 710021

摘要:目的 构建葎草花粉变应原核酸疫苗 pcDNA3.1-Hum, 并探讨其是否通过诱导 Foxp3⁺Treg 细胞分化介导对哮喘模型小鼠的免疫保护作用。方法 双酶切 pTripIEx2-Hum 质粒以获取目的基因, 定向插入 pcDNA3.1(-) 载体以构建 pcDNA3.1-Hum 核酸疫苗并测序鉴定, 转染至 COS-7 细胞以证实表达。采用表达的目的蛋白刺激 CD4⁺CD25⁻ T 细胞, 验证其能否诱导 Foxp3⁺Treg 细胞分化。使用 pcDNA3.1-Hum 免疫正常小鼠, 检测特异性 IgE、IgG2a 水平以探讨其免疫原性、变应原性; 免疫哮喘模型小鼠以验证其免疫保护作用。结果 测序证实该构建成功并可在真核细胞内表达; 证实表达的目的蛋白可诱导 CD4⁺CD25⁻ T 细胞向 Foxp3⁺Treg 细胞分化。动物实验提示 pcDNA3.1-Hum 可诱导特异性 IgG2a, 不能诱导特异性 IgE; 可明显降低哮喘模型小鼠气道炎症反应、气道高反应性; 升高脾脏 Foxp3⁺Treg 细胞百分比; 降低 IL-4、升高 IFN- γ 水平。结论 成功构建了 pcDNA3.1-Hum 核酸疫苗, 表达的目的蛋白可介导 Foxp3⁺Treg 细胞分化。动物实验证实该疫苗具有免疫原性及免疫保护作用, 并提示其通过诱导 Foxp3⁺Treg 细胞分化介导 Th1 倾向的免疫保护作用。

关键词:变应性哮喘; 葎草花粉变应原; 核酸疫苗; 免疫原性; Foxp3⁺Treg 细胞

Foxp3⁺Treg cells mediate immune protection of humulus pollen allergy DNA vaccine pcDNA3.1-Hum in asthmatic miceLU Jiamei^{1,2}, LI Manxiang^{1,2}, SUN Xiuzhen^{1,2}, ZHANG Yonghong^{1,2}, LIU Yun^{1,2}, XU Jing^{1,2}, ZHANG Sumei³¹Respiratory Disease Research Center, ²Department of Respiratory Diseases, Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University College of Medicine, Xi'an 710004, China; ³Academy of Nursing, Xi'an Medical College, Xi'an 710021, China

Abstract: Objective To construct a humulus pollen allergy DNA vaccine pcDNA3.1-Hum and investigate its effect for immune protection mediated by Foxp3⁺Treg cells in asthmatic mice. **Methods** The target humulus gene obtained from pTripIEx2-Hum plasmid by double enzyme digestion was inserted sequentially into pcDNA3.1(-) vector to generate the recombinant plasmid pcDNA3.1-Hum, which was validated by sequencing. The pcDNA3.1-Hum plasmid was transfected into COS-7 cells and the expression of the ectopic protein was analyzed using Western blotting. Co-cultured dendritic cells and CD4⁺CD25⁻ T cells were stimulated with the expressed protein to test its efficacy in inducing Foxp3⁺Treg cells. The levels of humulus-specific IgE and IgG2a were assayed to evaluate the allergenicity and immunogenicity of pcDNA3.1-Hum in mice. The immunoprotective effect of pcDNA3.1-Hum was assessed in a mouse model of humulus-specific asthma. **Results** The constructed pcDNA3.1-Hum plasmid was validated by sequencing and Western blotting, and the expressed protein was shown to induce Foxp3⁺Treg cells in the co-culture. In normal mice, pcDNA3.1-Hum induced a significant increase of humulus-specific IgG2a but had no effect on IgE. In the asthmatic mice, pcDNA3.1-Hum significantly decreased inflammatory cell counts and eosinophil percentages in the BALF, ameliorated lung inflammation, and lowered AHR and IL-4 levels; immunization of the mice with pcDNA3.1-Hum reversed humulus-induced reduction of serum IFN- γ and prevented the humulus-triggered reduction of Foxp3⁺Treg cell percentage in the spleen. **Conclusion** We have successfully constructed a highly immunogenic pcDNA3.1-Hum DNA vaccine that can mediate immune protection by inducing Foxp3⁺Treg cells.

Key words: allergic asthma; humulus pollen allergy; DNA vaccine; immunogenicity; Foxp3⁺Treg cells

支气管哮喘(简称哮喘)是由多种细胞及其分泌的

收稿日期:2013-10-23

基金项目:国家自然科学基金(30772010)

Supported by National Natural Science Foundation of China (30772010).

作者简介:卢家美,在读博士,电话:029-87679973, E-mail: lu-jia1980@163.com

通信作者:孙秀珍,硕士生导师,教授,电话:029-87679973, E-mail: doc-ly@sohu.com

炎性介质参与的气道慢性炎症性疾病^[1]。哮喘作为一种常见的变态反应性疾病,其发病率呈上升趋势并严重危害人类健康^[2]。气传花粉、尘螨、霉菌、动物皮毛等多种变应原均可诱发或加重哮喘^[3]。特异性免疫治疗(SIT)被认为是唯一针对哮喘病因的治疗方法^[4-5]。但变应原提取物成分复杂,较难实现标准化,用于临床诊断和治疗时安全性较差。因此,变应原核酸疫苗正逐渐成

为目前的研究热点。葎草花粉是我国及东南亚地区夏秋季主要的花粉变应原之一,是花粉症的重要致病因素^[6]。因此,构建具有较强免疫原性的葎草花粉变应原核酸疫苗,并进一步探讨其免疫机制将为葎草花粉变应性哮喘的防治提供新的思路。

调节性T细胞(Treg细胞)作为T细胞家族的重要成员,具有抑制免疫系统过度激活的作用^[7]。研究发现特异性表达叉状头/翅膀状螺旋转录因子(Foxp3⁺)的Treg细胞可通过不同机制诱导免疫耐受并维持Th1/Th2的免疫平衡^[8]。动物实验证实,Foxp3⁺Treg细胞比例在变应性哮喘动物模型中明显降低,而输入外源性Foxp3⁺Treg细胞可显著改善哮喘动物模型的症状,提示Foxp3⁺Treg细胞与变应性哮喘的发病密切相关^[9]。本课题旨在构建具有较强免疫原性的葎草花粉变应原核酸疫苗pcDNA3.1-Hum,并探讨该疫苗是否通过诱导Foxp3⁺Treg细胞分化介导其对哮喘模型小鼠的免疫保护作用。

本课题组通过构建葎草花粉cDNA表达文库,筛选出具有葎草花粉免疫原性倾向的阳性克隆(基因号:EU088286),作为构建葎草花粉变应原核酸疫苗pcDNA3.1-Hum的目的基因^[10]。经BLAST序列分析证实该基因与拟南芥花粉外壳蛋白基因(基因号:GSLTFB91ZE04)具有高度同源性。ORF分析提示该目的基因有一个672 bp大小的开放阅读框,可编码224个氨基酸,预测其表达的目的蛋白相对分子质量约为26 400,生物信息学分析提示该基因适合构建核酸疫苗^[11]。

1 材料和方法

1.1 pcDNA3.1-Hum的构建

含目的基因的pTripIEx2-Hum质粒从本课题组构建的葎草花粉cDNA表达文库中筛选获得。真核表达载体pcDNA3.1(-)购自美国Invitrogen公司。分别采用HindⅢ内切酶(Fermentas)、EcoRⅠ内切酶(Fermentas)双酶切pTripIEx2-Hum、pcDNA3.1(-)质粒并行琼脂糖凝胶电泳,胶回收试剂盒(Promega)回收Hum目的基因片段和pcDNA3.1(-)质粒大片段。采用T₄DNA连接酶(Fermentas)将Hum目的基因定向插入pcDNA3.1(-)质粒大片段以构建pcDNA3.1-Hum重组质粒。将构建的含葎草花粉变应原基因EU088286的pcDNA3.1-Hum质粒,以T7通用测序引物测序(奥科生物技术有限公司),以明确构建的pcDNA3.1-Hum重组质粒是否成功。

1.2 pcDNA3.1-Hum的真核细胞表达

采用去内毒素质粒提取试剂盒(Fast-fisher Endo-Free Plasmid Kit, E.Z.N.A公司)提取质粒。将

COS-7细胞以 1×10^5 /ml接种于6孔板中,于细胞融合至约50%时,使用脂质体2000(Invitrogen)将pcDNA3.1-Hum转染至COS-7细胞(具体操作按说明书进行)。于37℃、5% CO₂培养箱中继续培养48 h,收集条件培养基并以BCA检测试剂盒(Pierce)测定总蛋白浓度,将等量蛋白(20 μg)上样于SDS-PAGE胶,电泳后转移至NC膜。以葎草花粉变应性哮喘患者血清作为一抗,辣根过氧化物酶标记的羊抗人IgG作为二抗(Sigma),将NC膜与West Pico化学荧光底物(Pierce)进行反应并曝光于放射性敏感的胶片,验证葎草花粉变应原基因的表达。

1.3 表达的葎草花粉变应原诱导CD4⁺CD25⁻T细胞向Foxp3⁺Treg细胞分化

采用Nie^[12]方法获取小鼠骨髓细胞,抗-CD11c-包被的磁珠(Miltenyi Biotec)分离纯化DC细胞。采用抗-CD4抗体包被的磁珠(Miltenyi Biotec)从小鼠脾脏中分离CD4⁺T细胞并进一步经抗-CD25磁珠(Miltenyi Biotec)筛选以获得CD4⁺CD25⁻T细胞。将DC细胞、CD4⁺CD25⁻T细胞分别以 1×10^5 /ml、 4×10^5 /ml接种于含10% FBS的DMEM培养基中,共培养72 h后加入100 ng/ml表达的葎草花粉变应原,6 h后采用小鼠Treg T细胞染色试剂盒(eBioscience)检测Foxp3⁺Treg细胞的百分比。

1.4 pcDNA3.1-Hum核酸疫苗变应原性、免疫原性检验

取30只4~6周龄雌性Balb/c小鼠,随机分为对照组、pcDNA3.1(-)治疗组、pcDNA3.1-Hum治疗组,每组10只。分别于第1、15天肌肉注射(小鼠肱四头肌)100 μl PBS、pcDNA3.1(-)(1 mg/ml)、pcDNA3.1-Hum(1 mg/ml)。于末次免疫后2周,收集肺泡灌洗液(BALF),以检测葎草花粉变应原特异性IgE、IgG2a水平。

1.5 葎草花粉变应原特异性IgE、IgG2a检测

采用ELISA方法分别测定小鼠BALF中葎草花粉变应原特异性IgE、IgG2a水平。以100 μl葎草花粉变应原提取液(1 mg/ml)4℃过夜包被检测板,用含0.05% Tween 20的PBS洗板3遍;于37℃下1% BSA封闭2 h后再次洗板,加入100 μl未经稀释的BALF并于37℃孵育1 h。分别加入生物素包被的抗鼠IgE(Southern Biotechnology Associates)、IgG2a(Southern Biotechnology Associates)抗体并于4℃孵育过夜。采用HRP标记的二抗孵育后,于450 nm波段下读取D₄₅₀值。

1.6 pcDNA3.1-Hum核酸疫苗免疫保护作用检验

取4~6周龄雌性Balb/c小鼠40只,随机等分为对照组、哮喘模型组、pcDNA3.1(-)模型治疗组和pcDNA3.1-Hum模型治疗组。哮喘模型组、pcDNA3.1(-)模型治疗组、pcDNA3.1-Hum模型治疗组均于第1天腹腔注射50 μg葎草花粉变应原/2 mg氢氧化铝凝胶

(200 μ l),第16~18天使用10 μ l葎草花粉变应原(5 mg/ml)滴鼻激发制备葎草花粉变应性哮喘小鼠模型。分别于第19、33天肌肉注射PBS、pcDNA3.1(-)、pcDNA3.1-Hum进行免疫治疗(具体方法同免疫原性的检验)。2周后再次使用葎草花粉变应原滴鼻激发,并于24 h后分别行BALF炎症细胞计数、嗜酸性粒细胞百分比、肺组织病理HE染色、AHR、脾脏CD4⁺T细胞中Foxp3⁺Treg细胞百分比和血清中IL-4、IFN- γ 浓度检测。

1.7 气道高反应性(AHR)检测

采用Flexivent小动物肺功能仪(SCIREQ)检测小鼠在不同浓度乙酰胆碱(Sigma)刺激下的气道阻力,间接反映小鼠的AHR。4%利多卡因腹腔注射麻醉小鼠后,雾化吸入PBS形成基线值,依次雾化吸入12.5、25、50 mg/ml浓度的乙酰胆碱,记录不同浓度乙酰胆碱刺激下的气道阻力。

1.8 BALF炎性细胞计数、嗜酸性粒细胞分类计数

将BALF于4 $^{\circ}$ C、800 r/min离心5 min,使用红细胞裂解液(Sigma)重悬细胞以去除红细胞,再次离心后用1 $\times$ PBS重悬细胞。采用细胞计数板计数细胞总数。将细胞悬液制成悬滴片并行Kwik-Diff染色,选取500个细胞行嗜酸性粒细胞分类计数,并计算出嗜酸性粒细胞的百分比。

1.9 血清IL-4、IFN- γ 水平检测

眼球取血并离心取上清,采用ELISA检测试剂盒分别测定小鼠血清中IL-4、IFN- γ 的浓度(具体操作见说明书)。

1.10 小鼠脾脏CD4⁺T细胞中Foxp3⁺Treg细胞的百分比

取小鼠脾脏,预冷的PBS冲洗干净后切成1 mm³左右的小块,使用含0.125%胰酶的DMEM高糖培养基消化细胞,200目细胞筛过筛以获得完全分离的细胞,800 r/min离心5 min并收集细胞。采用抗-CD4抗体包被的磁珠分离CD4⁺T细胞,并使用Treg T细胞染色试剂盒检测Foxp3⁺Treg细胞的百分比。

1.11 统计学分析

采用SPSS 13.0软件进行数据统计分析,实验数据以均数 $\pm$ 标准差表示。每组数据均符合正态性及方差齐性,多组数据间的比较采用单因素方差分析,两两组间比较采用LSD检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pcDNA3.1-Hum重组质粒的测序

核酸序列测定BLAST比对分析结果提示:pcDNA3.1-Hum质粒与pTripIEx2-Hum质粒中的目的片段一致,无突变、缺失和倒置,证明该重组质粒构建成功。

2.2 pcDNA3.1-Hum在真核细胞中的表达

免疫印迹法检测结果显示:pcDNA3.1-Hum组于大

约26 000处可见清晰的目的条带(图1),与预测目的蛋白分子量一致,而pcDNA3.1(-)组未见条带。提示pcDNA3.1-Hum质粒可在真核细胞内成功表达葎草花粉变应原Hum基因。

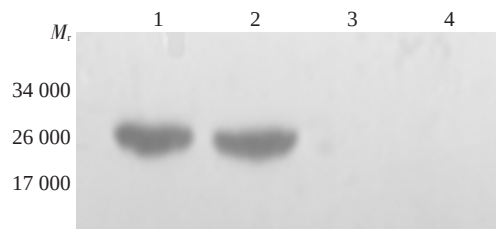


图1 pcDNA3.1-Hum在真核细胞中表达

Fig.1 Expression of pcDNA3.1-Hum in eukaryotic cells. Lanes 1, 2: pcDNA3.1-Hum; Lanes 3, 4: pcDNA3.1(-).

2.3 表达的葎草花粉变应原诱导CD4⁺CD25⁻T细胞向Foxp3⁺Treg细胞分化

为明确表达的葎草花粉变应原能否诱导DC细胞、CD4⁺CD25⁻T细胞共培养体系中Foxp3⁺Treg细胞的分化,采用流式细胞仪检测了葎草花粉变应原干预后Foxp3⁺Treg细胞的百分比。结果显示,表达的葎草花粉变应原干预组Foxp3⁺Treg细胞的百分比较对照组明显增加($P<0.01$,图2)。

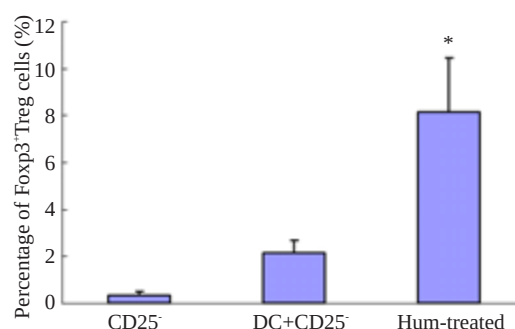


图2 表达的葎草花粉变应原诱导DC细胞、CD4⁺CD25⁻T细胞共培养体系中Foxp3⁺Treg细胞分化

Fig.2 Expression of humulus induces Foxp3⁺Treg cells in co-cultured DCs and CD4⁺CD25⁻T cells. $n=5$, $*P<0.01$ vs DC+CD25⁻ co-cultured cells.

2.4 pcDNA3.1-Hum的变应原性、免疫原性

如图3所示,使用pcDNA3.1-Hum核酸疫苗免疫正常小鼠后,pcDNA3.1-Hum组、pcDNA3.1(-)组小鼠BALF中葎草花粉变应原特异性IgE浓度与空白组无显著差异($P>0.05$)。pcDNA3.1-Hum组葎草花粉变应原特异性IgG2a浓度显著高于空白组($P<0.01$),而pcDNA3.1(-)组差异不明显($P>0.05$)。提示pcDNA3.1-Hum核酸疫苗具有较强的免疫原性,变应原性则不明显。

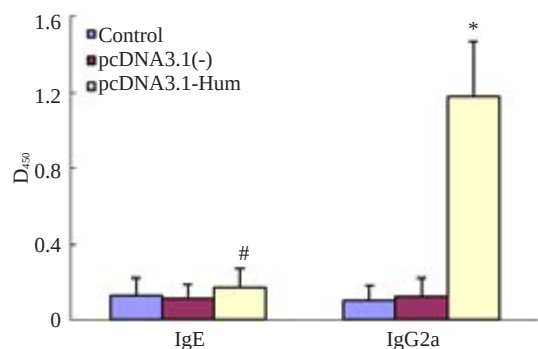
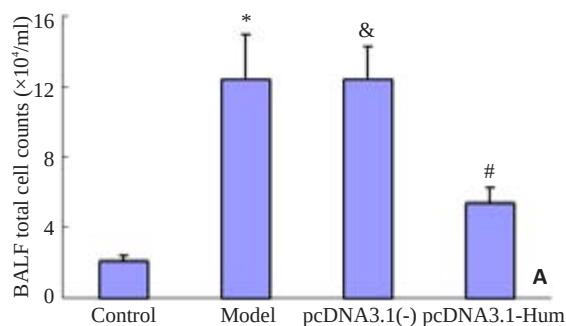


图3 pcDNA3.1-Hum免疫正常小鼠后BALF中葎草花粉变应原特异性IgE、IgG2a水平

Fig.3 Levels of humulus-specific IgE and IgG2a in BALF of pcDNA3.1-Hum-vaccinated mice. $n=10$, $*P<0.01$ vs control; $^{\#}P>0.05$ vs control.



2.5 pcDNA3.1-Hum对葎草花粉变应性哮喘模型小鼠的免疫保护作用

2.5.1 pcDNA3.1-Hum抑制哮喘模型小鼠的炎症反应 使用pcDNA3.1-Hum免疫葎草花粉变应性哮喘模型小鼠,以探讨该疫苗对哮喘小鼠的免疫保护作用。如图4所示,pcDNA3.1-Hum模型治疗组小鼠BALF中炎性细胞数量、嗜酸性粒细胞百分比明显低于模型组,差异具有统计学意义($P<0.01$);而pcDNA3.1(-)模型治疗组上述指标差异不明显($P>0.05$,与模型组相比)。肺组织HE染色病理切片示(图5):模型组小鼠小气道、周围肺组织及血管黏膜下均有明显的炎性细胞浸润,上皮细胞部分脱落,可见黏液栓,并伴有血管壁水肿。而

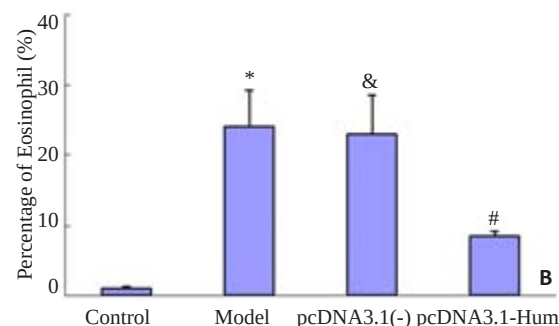


图4 pcDNA3.1-Hum免疫葎草花粉变应性哮喘模型小鼠后BALF中炎性细胞计数、嗜酸性粒细胞百分比

Fig.4 Counts of inflammatory cells and percentages of eosinophils in BALF of pcDNA3.1-Hum-vaccinated humulus asthmatic mice. $n=10$. $*P<0.01$ vs control; $^{\#}P<0.01$ vs Hum-model; $^{\&}P>0.05$ vs Hum-model.

pcDNA3.1-Hum模型治疗组炎症浸润及上皮损害明显减轻,提示该核酸疫苗具有抑制哮喘模型肺部炎症反应的作用。

2.5.2 pcDNA3.1-Hum降低哮喘模型小鼠的AHR 如图6所示,pcDNA3.1-Hum干预模型小鼠后,小鼠对乙酰胆碱的反应性明显降低($P<0.01$,与模型组相比),而pcDNA3.1(-)无此作用($P>0.05$,与模型组相比),提示该疫苗可明显减轻葎草花粉变应原诱导的AHR。

2.6 pcDNA3.1-Hum对IL-4、IFN- γ 水平的影响

如图7所示,pcDNA3.1-Hum模型治疗组小鼠血清中IL-4明显低于模型组($P<0.01$);血清中IFN- γ 明显高于模型组,其差异具有统计学意义($P<0.01$)。而pcDNA3.1(-)模型治疗组与模型组上述指标差异不明显($P>0.05$)。提示pcDNA3.1-Hum可显著抑制Th2倾向的免疫反应,并诱导Th1倾向的免疫反应。

2.7 pcDNA3.1-Hum诱导葎草花粉变应性哮喘模型小鼠Foxp3⁺Treg细胞分化

如图8所示,模型组小鼠脾脏中Foxp3⁺Treg细胞的百分比明显低于对照组,pcDNA3.1-Hum干预可显著升高Foxp3⁺Treg细胞的百分比($P<0.01$),而pcDNA3.1

(-)无此作用($P>0.05$)。

3 讨论

本课题组成功构建了葎草花粉变应原核酸疫苗pcDNA3.1-Hum,并证实其可在真核细胞内表达。于体外研究证实表达的葎草花粉变应原可诱导CD4⁺CD25⁺T细胞向Foxp3⁺Treg细胞分化。动物实验证实pcDNA3.1-Hum疫苗具有较好的免疫原性;并于哮喘模型水平上证实该核酸疫苗通过诱导Foxp3⁺Treg细胞分化介导对哮喘小鼠的免疫保护作用。

哮喘的病因复杂,遗传和环境因素均参与其发生,但具体发病机制目前尚不明确。以往认为哮喘的发病与Th1/Th2细胞免疫失衡密切相关^[13-14]。但Th1/Th2细胞功能失衡学说不能完全解释哮喘的发病。随着对哮喘免疫机制的深入研究,Treg细胞在哮喘发病中的作用逐渐被重视。Treg细胞作为CD4⁺T淋巴细胞的新亚群,是机体维持免疫耐受的重要因素。新的观点认为Th1/Th2/Treg模式能够更好的阐释哮喘的发病机制^[15-16]。Treg细胞既可抑制Th1细胞分化,又可抑制Th2细胞的分化及应答,但对后者的作用更强。Treg细胞通过抑制

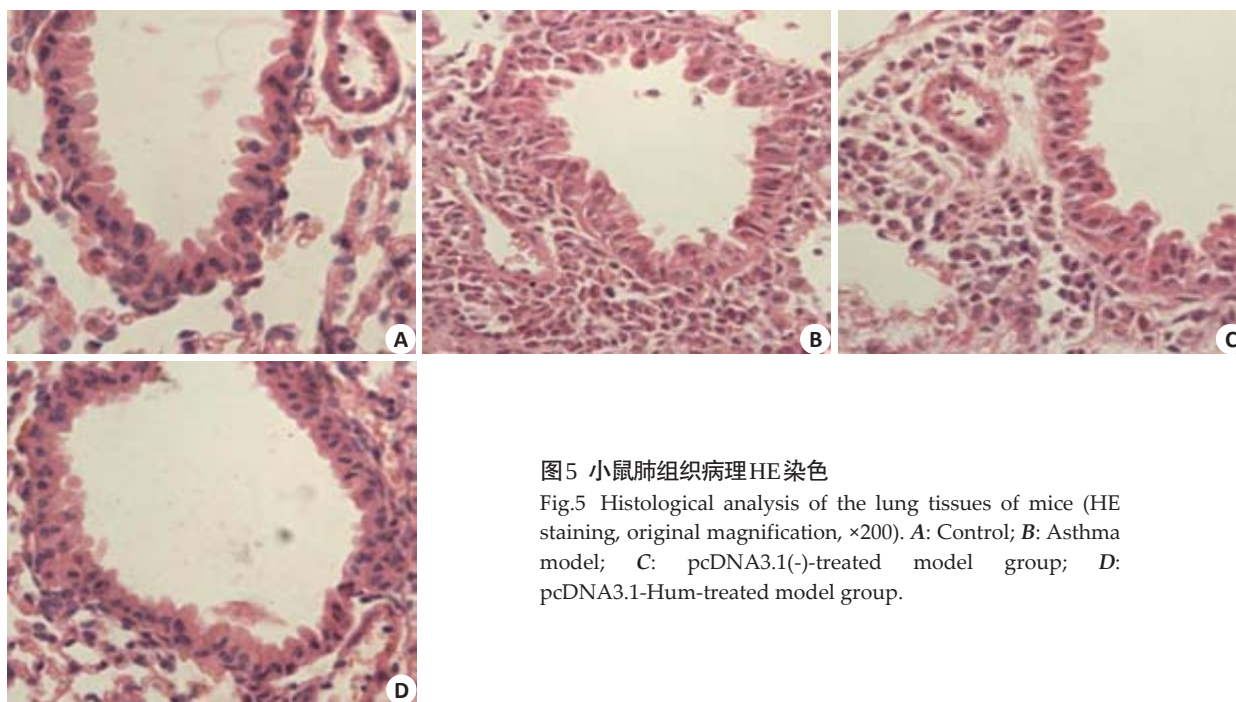


图5 小鼠肺组织病理HE染色

Fig.5 Histological analysis of the lung tissues of mice (HE staining, original magnification, $\times 200$). A: Control; B: Asthma model; C: pcDNA3.1(-)-treated model group; D: pcDNA3.1-Hum-treated model group.

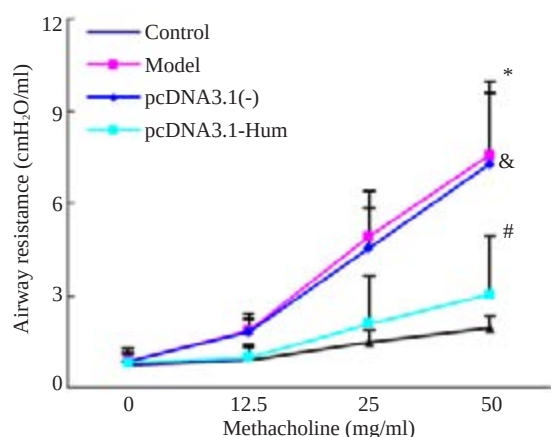


图6 pcDNA3.1-Hum 核酸疫苗降低葎草花粉变应性哮喘模型小鼠 AHR

Fig.6 Reduced AHR in pcDNA3.1-Hum-vaccinated mice. $n=10$. * $P<0.01$ vs control, # $P<0.01$ vs Hum-model, & $P>0.05$ vs Hum-model.

Th2类细胞因子的产生,减轻由Th2介导的气道炎症反应,即Treg细胞通过调节Th1/Th2平衡,抑制抗原诱导的Th2细胞分化而强化Th1细胞活性。

Foxp3属于叉状头/翅膀状螺旋转录调节因子家族,可促使CD4⁺CD25⁻T细胞转变为CD4⁺CD25⁺Treg细胞,是调控CD4⁺CD25⁺Treg细胞的标志性转录因子^[17]。Foxp3通过其Forkhead结构域与DNA特定位点结合,以调节目基因的表达式。Foxp3⁺Treg细胞被证实可以有效地抑制免疫应答的过度激活,是变应原核酸疫苗发挥免疫调控作用的重要效应细胞^[18-19]。本研究在体外共培养细胞体系中证实表达的葎草花粉变应原可诱导Foxp3⁺Treg细胞分化。动物实验也证实肌肉注射

pcDNA3.1-Hum可显著升高脾脏CD4⁺T细胞中Foxp3⁺Treg细胞百分比;同时,pcDNA3.1-Hum还可抑制葎草花粉变应性哮喘模型小鼠的气道炎症及AHR、诱导Th1倾向的免疫反应。提示pcDNA3.1-Hum核酸疫苗通过诱导Foxp3⁺Treg细胞发挥对哮喘模型小鼠的免疫保护作用。

变应原核酸疫苗作为一种基因治疗,既可诱导持久的细胞免疫应答,又可诱导体液免疫应答,还具有介导免疫记忆的作用^[20]。变应原核酸疫苗作为SIT的新方法,与传统花粉变应原提取液相比,其纯度较高并更易实现标准化,用于哮喘治疗时安全性较好。因此,变应原核酸疫苗为变应性哮喘及其它变应性疾病的防治提供了新的治疗途径。但变应原核酸疫苗存在免疫原性较低的缺点,通常选用基因佐剂以增强免疫治疗效果^[21]。非甲基化CpG序列作为特异性DNA基序,主要通过变应原耦联增强抗原提呈功能,介导Th0细胞向Th1细胞分化,可作为免疫佐剂以增强免疫调节作用^[22]。本研究在构建葎草花粉变应原核酸疫苗时,选用pcDNA3.1(-)质粒作为真核表达载体,因其富含CpG序列,可视为pcDNA3.1-Hum核酸疫苗的内在佐剂,以增强该疫苗的免疫原性。本研究证实,pcDNA3.1-Hum核酸疫苗在正常小鼠体内诱导了较高水平的葎草花粉变应原特异性IgG2a,提示该核酸疫苗具有较好的免疫原性。

葎草花粉变应原核酸疫苗作为一种新型的变应原疫苗,具有较好的免疫原性及免疫保护作用。该核酸疫苗的成功构建,为葎草花粉变应性哮喘的防治提供了新的治疗途径。

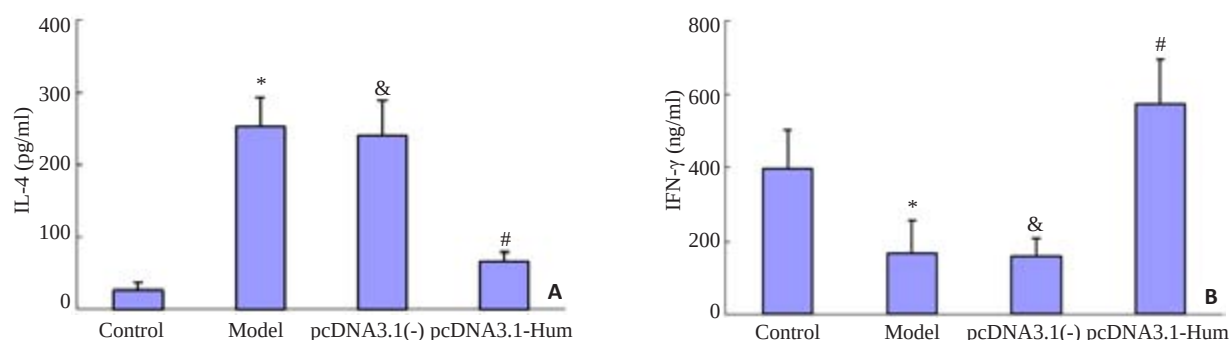


图7 pcDNA3.1-Hum免疫葎草花粉变应性哮喘模型小鼠后血清中IL-4、IFN-γ的浓度

Fig.7 Serum levels of IL-4 (A) and IFN-γ (B) in pcDNA3.1-Hum-vaccinated asthma model mice. $n=10$, * $P<0.01$ vs control, # $P<0.01$ vs Hum-model, & $P>0.05$ vs Hum-model.

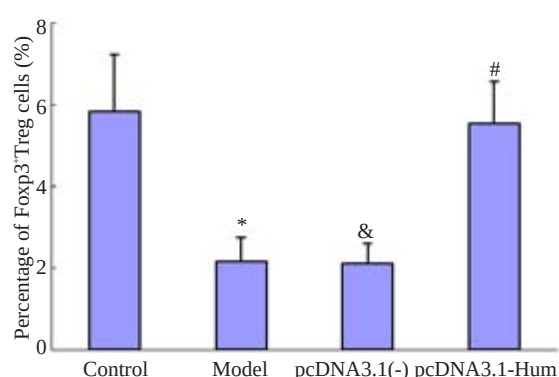


图8 小鼠脾脏CD4⁺T细胞中Foxp3⁺Treg细胞百分比

Fig.8 Percentages of Foxp3⁺Treg cells in CD4⁺T cells of mouse spleen. $n=10$. * $P<0.01$ vs control; # $P<0.01$ vs Hum-model; & $P>0.05$ vs Hum-model.

参考文献:

- [1] Labre MP, Herman EJ, Dumitru GG, et al. Public health interventions for asthma: an umbrella review, 1990-2010[J]. Am J Prev Med, 2012, 42(4): 403-10.
- [2] Anandan C, Nurmatov U, van Schayck OC, et al. Is the prevalence of asthma declining? Systematic review of epidemiological studies [J]. Allergy, 2010, 65(2): 152-67.
- [3] Valenta R, Campana R, Marth K, et al. Allergen-specific immunotherapy: from therapeutic vaccines to prophylactic approaches[J]. J Intern Med, 2012, 272(2): 144-57.
- [4] Kim JM, Lin SY, Suarez-Cuervo C, et al. Allergen-specific immunotherapy for pediatric asthma and rhinoconjunctivitis: a systematic review[J]. Pediatrics, 2013, 131(6): 1155-67.
- [5] 陈壮桂, 陈岩峰, 李 鸣, 等. 屋尘螨变应原特异性免疫治疗对变应性哮喘患儿预后的影响[J]. 南方医科大学学报, 2009, 29(6): 1179-81.
- [6] Park JW, Ko SH, Kim CW, et al. Identification and characterization of the major allergen of the Humulus japonicus pollen[J]. Clin Exp Allergy, 1999, 29(8): 1080-6.
- [7] Shimon S, Makoto M, Costantino CM, et al. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system[J]. Nat Rev Immunol, 2010, 10(7): 490-500.
- [8] Lloyd CM, Hawrylowicz CM. Regulatory T cells in asthma [J]. Immunity, 2009, 31(3): 438-49.
- [9] Lewkowich IP, Herman NS, Schleifer KW, et al. CD4⁺CD25⁺ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function [J]. J Exp Med, 2005, 202(11): 1549-61.
- [10] 徐 晶, 孙秀珍, 刘 昀, 等. 从葎草花粉cDNA表达文库中筛选过敏感性哮喘特异性变应原[J]. 中华医学杂志, 2009, 89(42): 3002-6.
- [11] 徐 晶, 孙秀珍, 刘 昀, 等. 致过敏性哮喘的葎草花粉特异性变应原pTSX1 cDNA克隆的生物信息学分析[J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2010, 31(2): 151-5.
- [12] Nie W, Yan H, Li S, et al. Angiotensin-(1-7) enhances angiotensin II induced phosphorylation of ERK1/2 in mouse bone marrow-derived dendritic cells [J]. Mol Immunol, 2009, 46(3): 355-61.
- [13] Alzakar RH, Alsamarai AM. Efficacy of immunotherapy for treatment of allergic asthma in children [J]. Allergy Asthma Proc, 2010, 34(5): 324-30.
- [14] Lee, SH. Mechanism of allergic asthma pathogenesis by protease allergen[J]. Hanyang Med Rev, 2013, 33(1): 39-44.
- [15] 杨玉梅, 赵 杨, 杨 炯. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞在过敏性哮喘中的作用[J]. 四川医学, 2010, 31(3): 392-4.
- [16] Ryanna K, Stratigou V, Safinia N, et al. Regulatory T cells in bronchial asthma[J]. Allergy, 2009, 64(3): 335-47.
- [17] Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells[J]. Nat Immunol, 2003, 4(4): 330-6.
- [18] Zhang F, Huang G, Hu B, et al. Induction of immune tolerance in asthmatic mice by vaccination with CTLA-4-antigen combination-encoding DNA [J]. Clin Vaccine Immunol, 2011, 18(7): 1591-603.
- [19] Tsai Y, Lin C. Mechanism of regulatory T cells during allergen-specific immunotherapy: from the past to future[J]. J Allergy Clin Immunol, 2011, 127(2): 286-99.
- [20] Johansen P, von Moos S, Mohanan D, et al. New routes for allergen immunotherapy[J]. Hum Vaccin Immunother, 2012, 8(10): 1525-33.
- [21] Moingeon P. Adjuvants for allergy vaccines [J]. Hum Vaccin Immunother, 2012, 8(10): 1492-8.
- [22] Hessenberger M, Weiss R, Weinberger EE, et al. Transcutaneous delivery of CpG-adjuvanted allergen via laser-generated micropores [J]. Vaccine, 2013, 31(34): 3427-34.

(编辑:黄开颜)