

CpG ODN 对哮喘小鼠肺组织 FcεR I、FcγR II b 表达的影响

朱宝俊 罗 芳 李孟荣

摘 要 **目的** 观察 CpG ODN 对哮喘小鼠肺组织 FcεR I、FcγR II b 表达的影响,探讨其诱导免疫耐受的相关机制。**方法** 将 48 只清洁级雄性 Balb/c 小鼠随机分为正常对照组(A 组)、哮喘组(B 组)、地塞米松(DXM)治疗组(C 组)、CpG ODN 治疗组(D 组),每组 12 只。以卵白蛋白(OVA)作用建立小鼠哮喘模型。收集支气管肺泡灌洗液(bronchial alveolar lavage fluid, BALF)计数细胞总数并分类,取肺组织作病理,反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法测定肺组织中 FcεR I、FcγR II b mRNA 的表达。**结果** (1)电镜观察肺组织超微结构:B 组显示支气管及血管周围有较多炎性细胞浸润,肺泡隔内嗜酸性粒细胞浸润,C 组和 D 组与 B 组相比明显减轻。(2)BALF 中炎症细胞表达变化:与 B 组相比,C 组、D 组 BALF 中细胞总数、嗜酸性粒细胞(eosinophil, EOS)绝对值以及 EOS 占细胞总数的百分比(EOS%)均显著减少($P < 0.01$)。(3)RT-PCR 结果:C 组、D 组 FcεR I mRNA 表达均显著低于 B 组($P < 0.01$),C 组、D 组 FcγR II b mRNA 表达均显著高于 B 组($P < 0.01$)。(4)相关分析:小鼠肺组织 FcεR I 和 FcγR II b 表达呈显著负相关($P < 0.01, n = 40$)。**结论** CpG ODN 能降低哮喘小鼠肺组织 FcεR I 的表达,增加 FcγR II b 的表达,具有改善气道炎症和诱导免疫耐受的作用。

关键词 哮喘 小鼠 CpG ODN FcεR I FcγR II b 免疫耐受

[中图分类号] R393

[文献标识码] A

Effects of CpG ODN on FcεR I and FcγR II b Expression in Asthma Model of Mice. Zhu Baojun, Luo Fang, Li Mengrong. The Second Affiliated Hospital & Yuying Children's Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325027, China

Abstract **Objective** To investigate the possible mechanisms induced by CpG ODN on the expression of FcεR I and FcγR II b of lung tissue in acute asthma model of mice. **Methods** Totally 48 male Balb/c mice were randomly divided into the control group (group A), asthma model group (group B), dexamethasone control group (group C), CpG ODN treatment group (group D) with 12 in each. Group B were sensitized by OVA to establish the acute mice asthma model. BALF were collected and the total cell numbers were counted. Lung were fixed and sections were used for Pulmonary ultrastructure. FcεR I and FcγR II b mRNA in the lung were measured by RT-PCR. **Results** Pulmonary ultrastructure: Group B showed inflammation cell infiltration, pulmonary alveolus II type epithelial cell swelling entry into the alveolar lumen. Group C and group D were much lighter than those of group B. In the BALF, compared with group B, the total cell numbers, the absolute numbers of EOS and EOS% were markedly decreased than group C and D ($P < 0.01$). RT-PCR results: The expression of FcεR I in group D and group C were significantly lower than group B ($P < 0.01$), and the expression of FcγR II b in group D and group C was significantly higher than group B ($P < 0.01$). Correlative analysis: The expression of FcεR I was negatively correlated with FcγR II b ($P < 0.01, n = 40$). **Conclusion** CpG ODN lower FcεR I and increase FcγR II b expression in the lung tissue of asthma mouse and improve airway inflammation, induce immune tolerance.

Key words Asthma; Mice; CpG ODN; FcεR I; FcγR II b; Immune tolerance

CpG ODN 是含有 CpG DNA 结构的人工合成寡聚核苷酸,因其具有免疫刺激作用,所以又称免疫刺激 DNA (immunostimulatory DNA sequences, ISS -

DNA)。CpG ODN 被抗原递呈细胞上的 TLR-9 识别而促进 Th1 细胞分化,并且通过阻止抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC)将抗原递呈给 Th2 细胞而抑制 Th2 细胞活化,在过敏性疾病的免疫治疗中发挥重要作用^[1,2]。Fc 受体包括 IgE 受体 FcεR、IgG 受体 FcγR、IgA 受体 FcαR、IgM 受体 FcμR 及 IgD 受体 FcδR,其中 IgE 与 FcεR I 的相互作用一直是 I 型变态反应的核心和关键,而 FcγR II b 的关键作用就是调节 APC 的抗原递呈能力,Fc 受体能改变 APC 的

基金项目:温州市科技局对外科技合作交流项目(H20090021)

作者单位:325027 温州医科大学附属第二医院;316100 浙江省舟山市普陀中医院(朱宝俊);315000 宁波市妇女儿童医院(罗芳);温州医科大学附属第二医院育英儿童医院呼吸科哮喘及变态反应免疫治疗中心(李孟荣)

通讯作者:李孟荣,电子信箱:lmjohn@163.com

表型和功能,激活或抑制 APC 上的 Fc 受体在免疫耐受和平衡上起关键作用^[3]。本实验通过 OVA 致敏和激发建立哮喘小鼠模型,在激发前给予 CpG ODN 干预,观察 FcεR I、FcγR II b 在哮喘小鼠肺组织中的变化,探讨 CpG ODN 对 FcεR I、FcγR II b 的调控作用,为哮喘的治疗提供新的策略。

材料与方法

1. 主要试剂:CpG ODN 序列如下:5′-TCCATGACGTTCTGACGTT-3′、溴化乙淀、琼脂糖(上海生工生物工程有限公司),卵清蛋白(OVA,Grade V),地塞米松(DXMS,美国 Sigma 公司),Al(OH)₃ 自行配置,多聚甲醛(武汉博士德公司),Trizol 抽提试剂(美国 Invitrogen 公司),RT-PCR 试剂盒(美国 Fermentas 公司),H-7500 型透射电镜(日本 HITACHI 公司)。

2. 实验动物分组:清洁级健康雄性 Balb/c 小鼠 48 只,4~6 周龄,体重 18~22g,购自中国科学院上海实验动物中心,于温州医学院实验动物中心层流实验室饲养,饲养温度 25℃,相对湿度 70%,昼夜照明 12h/12h。随机分为 4 组,分别为正常对照组(A 组),哮喘模型组(B 组),DXM 治疗组(C 组),CpG ODN 治疗组(D 组)。

3. 哮喘模型建立:哮喘模型制备参考文献[4]并加以改进:第 1 天和第 14 天腹腔注射 0.5% OVA/Al(OH)₃ 混合液 0.2ml[内含 OVA 0.1mg 和 Al(OH)₃ 10mg]致敏,各 1 次,共 2 次。第 25 天开始使用空气压缩雾化器向置于密闭有机玻璃容器内的小鼠喷雾 1% OVA 液激发,每次持续 30min,每天 1 次,连续激发 1 周。正常对照组以生理盐水替代 OVA 致敏和激发,DXM 组和 CpG ODN 组在激发前 1 天和每次激发前 1h 分别给予腹腔注射 DXM 0.5mg/kg 和 CpG ODN 50 微克/只。

4. 标本收集及检测:小鼠末次激发后 24h,腹腔注射 25% 乌拉坦(5ml/kg)麻醉,行气管插管并固定。打开胸腔,暴露肺组织,右肺行支气管肺泡灌洗,支气管肺泡灌洗液(BALF)经离心(2000r/min,40℃)10min,取上清液-80℃保存备用,用于细胞计数及分类。取肺组织分别包好丢入液氮速冻后,保存在-80℃冰箱备 RNA 抽提。每组取 1 只小鼠取左肺门约 1mm×1mm×1mm 肺组织置于装有预冷的 2.5% 戊二醛固定液的小瓶内,至组织块沉入瓶底后,送电镜室。

5. RT-PCR 法检测肺组织 FcεR I、FcγR II mRNA 的表达:采用异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法抽提总 RNA,进行反转录,按以下条件进行 PCR 扩增:94℃ 预变性 5min,延伸 72℃ 5min。扩增产物用琼脂糖凝胶电泳,获得图像后,用 Quantity One 软件测定产物光密度值,将目的条带与内参 GAPDH 扩增带的光密度值之比,作为组织中目的基因 mRNA 表达水平的指标。引物序列分别为:FcεR I:上游 5′-TTAGCGCAGGTGGAATATGAA-3′,下游 5′-CTAGGTTAGGAGTTCGGTTTCA-3′;FcγR II b:上游 5′-CCATAGCTGGAGGAA-CAAAC-3′,下游 5′-AATAACAATGCGTGCAGACA3′。GAPDH:上游 5′-GCACAGTCAAGGCCGAGAA3′,下游 5′-CCTCACCCCCATTGTGATGTAGTG-3′。

6. 统计学方法:用 SPSS 13.0 对数据进行统计分析,取 $P < 0.05$ 为显著性差异水平。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,方差齐性检验采用 Levene 检验,多组样本均数比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两两比较方差齐者用 LSD 检验,方差不齐者采用 Dunnett's T3 检验,两变量相关分析采用 Pearson 直线相关分析法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 各组小鼠症状比较:在致敏阶段,第 1 次致敏后,各组小鼠表现无明显差异。在激发阶段,A 组无上述症状;B 组小鼠表现为烦躁不安、呼吸急促、腹肌抽搐和大小便失禁等症状,严重者呼吸减慢或节律不齐,动作迟缓或俯伏不动、四肢瘫软,反应迟钝;C 组和 D 组小鼠上述表现较 B 组明显减轻。

2. 肺组织超微结构:电镜下 A 组显示支气管上皮细胞纤毛排列整齐及正常肺泡 II 型上皮细胞;B 组显示支气管上皮细胞纤毛排列稀疏或断裂,炎症细胞浸润,肺泡隔明显增厚,可见吞噬小体,肺泡 II 型上皮细胞肿胀,脱落于肺泡腔内,出现板层体空泡化和部分排空现象;C 组和 D 组支气管上皮细胞纤毛排列尚整齐,肺泡 II 型上皮细胞板层小体及线粒体空泡变性现象不明显。详见图 1。

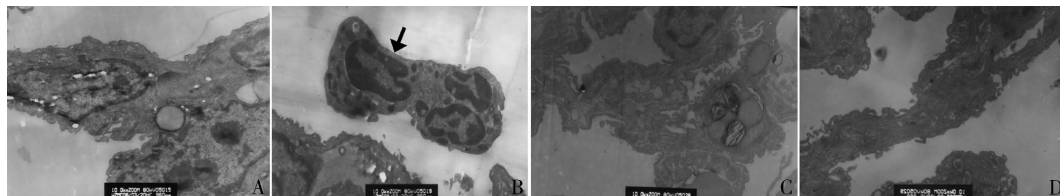


图 1 小鼠肺组织电镜结果(×10000)

A. 显示正常肺泡隔,无炎症细胞浸润;B. 显示肺泡隔内嗜酸性粒细胞浸润;C. 显示肺泡隔结构基本恢复正常;D. 显示肺泡隔结构基本恢复正常

3. BALF 中细胞总数和分类计数比较:B 组 BALF 中细胞总数、EOS 绝对值计数和嗜酸性粒细胞

(EOS)占细胞总数的百分比(EOS%)均显著高于 A 组($P < 0.01$),C 组和 D 组 BALF 中细胞总数、EOS

绝对值计数和 EOS % 均显著低于 B 组 ($P < 0.01$), 但仍高于 A 组 ($P < 0.01$), C 组与 D 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。在淋巴细胞 (Lym) 百分比 (Lym %) 的比较中, B 组、C 组和 D 组均显著高于 A

组 ($P < 0.01$), C 组与 A 组比较及 D 组与 B 组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), C 组显著低于 B 组 ($P < 0.01$, 表 1)。

表 1 各组小鼠 BALF 中细胞总数计数和分类计数 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞总数 ($\times 10^7/L$)	EOS 绝对数 ($\times 10^7/L$)	分类计数 (%)	
				EOS	Lym
A 组	12	19.08 $\pm$ 5.34	0.14 $\pm$ 0.08	0.56 $\pm$ 0.18	4.25 $\pm$ 0.89
B 组	12	68.88 $\pm$ 13.24 *	12.09 $\pm$ 2.62 *	9.10 $\pm$ 2.27 *	15.70 $\pm$ 2.19 *
C 组	12	32.38 $\pm$ 8.01 * Δ	1.05 $\pm$ 1.72 * Δ	2.35 $\pm$ 0.98 * Δ	7.77 $\pm$ 2.78 * Δ
D 组	12	34.89 $\pm$ 9.62 Δ	2.76 $\pm$ 0.25 * Δ	3.17 $\pm$ 0.25 * Δ	15.33 $\pm$ 0.83 *

与 A 组比较, * $P < 0.01$; 与 B 组比较, $\Delta P < 0.01$

4. 各组小鼠肺组织 FcεR I 和 FcγR II b mRNA 表达结果比较: B 组肺组织 FcεR I mRNA 表达显著高于 A 组 ($P < 0.01$), C、D 组与 A 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。C 和 D 组显著低于 B 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), C 组与 D 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。B 组肺组织 FcγR II b mRNA 的表达显著低于 A 组 ($P < 0.01$), C、D 组与 A 组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。C 和 D 组显著高于 B 组 ($P < 0.05$), C 组与 D 组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 2 和图 2)。

表 2 各组肺组织中 FcεR I mRNA 和 FcγR II b mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	FcεR I mRNA	FcγR II b mRNA
A 组	0.69 $\pm$ 0.14	1.47 $\pm$ 0.44
B 组	1.33 $\pm$ 0.46 *	0.84 $\pm$ 0.16 *
C 组	0.81 $\pm$ 0.12 Δ	1.26 $\pm$ 0.21 Δ
D 组	0.76 $\pm$ 0.16 $\Delta\Delta$	1.25 $\pm$ 0.45 Δ

与 A 组比较, * $P < 0.01$; 与 B 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

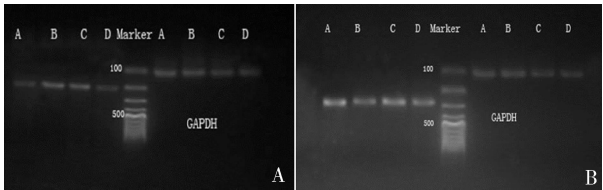


图 2 小鼠肺组织 FcεR I mRNA 和 FcγR II b mRNA 表达结果

A. 显示各组小鼠肺组织 FcεR I mRNA 的表达结果; B. 显示各组小鼠肺组织 FcγR II b mRNA 的表达结果

5. 相关性分析: 小鼠肺组织 FcεR I mRNA 和 FcγR II b mRNA 表达呈负相关 ($r = -0.47$, $P <$

0.01, $n = 40$)。

讨 论

支气管哮喘(以下简称哮喘)是一种具有气道高反应性和气道变应性炎症两大主要特征的呼吸道变态反应性疾病,而气道变应性炎症是其主要发病学基础。目前认为,哮喘是一种对过敏原免疫耐受缺陷的疾患,因此研究哮喘免疫耐受的发生机制,对于提高儿童哮喘防治水平具有重要意义。

Toll 样受体(toll like receptor, TLRs)信号转导途径是介导天然免疫和获得性免疫之间的桥梁,在人类迄今发现了 10 种 TLRs (TLR1 ~ TLR10),而小鼠存在 12 种 TLRs (TLR1 ~ TLR9 和 TLR11 ~ TLR13)^[5]。TLR9 是哺乳动物识别细菌和病毒 DNA 上非甲基化 CPG 序列的主要受体^[6]。目前,越来越多的实验证明 CpG ODN 在过敏性疾病治疗中的作用,如 Ramaprakash 等^[7]研究证实,CpG ODN 可以通过 toll 样受体 9 (toll like receptor 9, TLR - 9)依赖及非依赖途径改善实验性真菌性哮喘小鼠气道重塑及降低气道高反应性,同时使肺组织白细胞介素 10 (interleukin - 10, IL - 10) 和 12 (interleukin - 12, IL - 12) 表达增加。本课题组前期研究发现,CpG ODN 可增加哮喘小鼠肺组织糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体 (glucocorticoid - induced tumor necrosis factor receptor, GITR) 及糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体配体 (glucocorticoid - induced tumor necrosis factor - related receptor ligand, GITRL) 的表达,启动 IDO 介导的色氨酸分解代谢,从而对急性哮喘模型有预防或治疗作用^[8]。

IgE 与 FcεR I 的相互作用一直是 I 型变态反应的核心和关键。IgE 的作用依赖于 IgE 与效应细胞表

面相应受体的结合。在人体内存在高亲和力 $\text{Fc}\epsilon\text{R I}$ 和低亲和力 $\text{Fc}\epsilon\text{R II}$ 两种 IgE 受体,前者表达于肥大细胞、嗜碱性粒细胞,后者表达于单核-吞噬细胞、B 细胞、树突细胞、嗜酸性粒细胞等。IgE 合成后,在血清中存在的时间很短,2~4 天后即结合到有 IgE 受体的各种细胞上,使其处于致敏状态,当机体再次接触过敏原时,过敏原与结合于细胞表面的 IgE 结合,使细胞膜上两个邻近的 $\text{Fc}\epsilon\text{R I}$ 发生桥联,触发细胞膜一系列的生化反应。在哮喘治疗有效的病人其 APC 上 $\text{Fc}\epsilon\text{R I}$ 下降和血清 IgE 下降水平一致^[9]。抗 IgE 单克隆抗体(omalizumab)与 IgE 结合后,降低了血浆游离的 IgE 水平,阻断了 IgE 与其受体的结合,同时还使肥大细胞、嗜碱性粒细胞表面 $\text{Fc}\epsilon\text{R I}$ 表达下调,进而抑制了由 TH2 介导的炎症反应的进一步扩大,最终减缓或阻止了 IgE 介导的炎症反应^[10]。本研究药物干预组(C 组和 D 组)肺组织中 $\text{Fc}\epsilon\text{R I}$ 表达比哮喘组(B 组)明显降低(分别为 $P < 0.01$ 及 $P < 0.05$)且与对照组(A 组)相比无统计学差异,提示 CpG ODN 可以抑制 T、B 淋巴细胞过度活化的可能机制是通过抑制协同刺激分子的表达,并使 $\text{Fc}\epsilon\text{R I}$ 表达下调而间接抑制 IgE 的合成来实现的,以此达到控制哮喘炎症反应的目的。

$\text{Fc}\gamma\text{R II b}$ 的分子质量为 40kDa,是 IgG 的低亲和力受体, $\text{Fc}\gamma\text{R II b}$ 抑制 B 细胞的增殖、抗体的分泌、B 淋巴细胞受体(BCR)结合抗原的递呈能力和淋巴因子的释放,进而导致 B 细胞的活化丧失、无能和耐受^[11]。 $\text{Fc}\gamma\text{R II b}$ 分布广泛,包括 B 细胞、单核细胞、巨噬细胞等。Desai 等^[12]发现在哮喘小鼠形成免疫耐受过程中,DCs 可以通过增加表达具有抑制作用的 $\text{Fc}\gamma\text{R II b}$ 而部分减弱免疫反应,而 $\text{Fc}\gamma\text{R II b}$ 在哮喘发病中的作用如何,尚未完全阐明。本研究显示发现 B 组肺组织 $\text{Fc}\gamma\text{R II b}$ 表达显著低于 A 组($P < 0.01$),表明其诱导 B 细胞的耐受力下降,而 C 组和 D 组肺组织中 $\text{Fc}\gamma\text{R II b}$ 的表达比 B 组明显增高($P < 0.01$),且与 A 组相比无统计学差异。本研究表明 CpG ODN 抑制 T、B 淋巴细胞过度活化的可能机制是促进 T 细胞分化为 Treg 细胞,并间接增加 IgG 合成,以此达到控制哮喘炎症反应,诱导免疫耐受的目的。

相关分析发现,肺组织内 $\text{Fc}\epsilon\text{R I}$ 和 $\text{Fc}\gamma\text{R II b}$ 表达呈负相关,初步证实 $\text{Fc}\epsilon\text{R I}$ 和 $\text{Fc}\gamma\text{R II b}$ 在哮喘过程中可能起到不同的介导作用,即 $\text{Fc}\epsilon\text{R I}$ 的高表达与 $\text{Fc}\gamma\text{R II b}$ 的低表达可能促进哮喘的发生、发展,提

示通过靶向性阻断 $\text{Fc}\epsilon\text{R I}$ 产生和增加 $\text{Fc}\gamma\text{R II b}$ 的表达可能会部分中断气道炎症进展,从而达到部分治疗哮喘的目的。CpG ODN 在哮喘治疗中的免疫调节作用存在多种不同的调节机制,并且彼此之间有复杂的网络联系,而如何在信号通路上靶向性抑制 $\text{Fc}\epsilon\text{R I}$ 信号和加强 $\text{Fc}\gamma\text{R II b}$ 信号仍有待更深入的研究。

参考文献

- 1 Kulis M, Gorentla B, Burks A W, *et al.* Type B CpG oligodeoxynucleotides induce Th1 responses to peanut antigens; modulation of sensitization and utility in a truncated immunotherapy regimen in mice [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2013, 57(5):906-915
- 2 Pali-Scholl I, Szollosi H, Starkl P, *et al.* Protamine nanoparticles with CpG-oligodeoxynucleotide prevent an allergen-induced Th2-response in BALB/c mice[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2013, 85(3):656-664
- 3 Boruchov AM, Heller G, Veri MC, *et al.* Activating and inhibitory IgG Fc receptors on human DCs mediate opposing functions [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(10):2914-2923
- 4 崇蕾,张维溪,聂颖,等. Notch2、Notch4 受体在哮喘小鼠肺中的表达及布地奈德、姜黄素对其影响 [J]. *医学研究杂志*, 2012, 41(4):73-75
- 5 Qian C, Cao X. Regulation of Toll-like receptor signaling pathways in innate immune responses [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2013, 1283:67-74
- 6 Gupta GK, Agrawal DK. CpG oligodeoxynucleotides as TLR9 agonists: therapeutic application in allergy and asthma [J]. *Bio Drugs*, 2010, 24(4):225-235
- 7 Ramaprakash H, Hogaboam CM. Intranasal CpG therapy attenuated experimental fungal asthma in a TLR9-dependent and -independent manner [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2010, 152(2):98-112
- 8 王琼艳,李孟荣,王玥,等. CpG ODN 对哮喘小鼠肺组织 GITR/GITRL 表达的影响 [J]. *医学研究杂志*, 2013, 42(7):121-125
- 9 Milgrom H, Fick RJ, Su JQ, *et al.* Treatment of allergic asthma with monoclonal anti-IgE antibody. rhuMAb-E25 Study Group [J]. *N Engl J Med*, 1999, 341(26):1966-1973
- 10 D'Amato G, Perticone M, Buccioni E, *et al.* Treating moderate-to-severe allergic asthma with anti-IgE monoclonal antibody (omalizumab). An update [J]. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*, 2010, 42(4):135-140
- 11 Liu W, Won SH, Tolar P, *et al.* Antigen-induced oligomerization of the B cell receptor is an early target of Fc gamma RIIB inhibition [J]. *J Immunol*, 2010, 184(4):1977-1989
- 12 Desai DD, Harbers SO, Flores M, *et al.* Fc gamma receptor IIB on dendritic cells enforces peripheral tolerance by inhibiting effector T cell responses [J]. *J Immunol*, 2007, 178(10):6217-6226

(收稿日期:2013-11-21)

(修回日期:2013-12-09)