

## 粉尘螨壳聚糖纳米疫苗舌下含服对哮喘小鼠的治疗作用

喻海琼<sup>1,2\*</sup>, 刘志刚<sup>2</sup>, 国华<sup>2</sup>, 周一平<sup>1</sup>

**【摘要】** 目的 制备粉尘螨(*Dermatophagoides farinae*)壳聚糖纳米疫苗,并观察其免疫治疗哮喘小鼠的效果。方法 采用离子凝胶法制备粉尘螨壳聚糖纳米疫苗。30 只 BALB/c 小鼠随机均分为 5 组,阴性对照组(A 组)用生理盐水处理,其余组用 50  $\mu$ g 粉尘螨粗提液+2 mg 氢氧化铝腹腔注射致敏,第 28 天开始分别用 PBS(B 组,模型组)、空白壳聚糖(C 组)、粉尘螨变应原(Der f)组(D 组,1 mg/次)和粉尘螨壳聚糖纳米疫苗(DCN)(E 组,负荷 1 mg Der f 的 DCN/次)舌下含服免疫 18 次,每次间隔 1 d,末次免疫后 1 周用 50  $\mu$ g 粉尘螨变应原滴鼻激发,每天 1 次,连续 7 次。末次激发后 24 h 检测小鼠的气道高反应性;末次激发后 48 h 处死小鼠,取血,行肺泡灌洗,无菌摘取肺组织和脾脏;计数小鼠肺泡灌洗液(BALF)中细胞总数和嗜酸粒细胞数,观察 BALF 和脾细胞上清中 IL-4、IL-10 和 IFN- $\gamma$  细胞因子水平,血清中 IgE、IgA 和 IgG2a 抗体水平;运用 HE 染色观察肺部炎症细胞的浸润程度,运用 MTT 法检测脾细胞的淋巴细胞增殖反应,计算刺激指数(SI)。结果 与 B 组相比,D、E 组气道高反应性和肺部病理改变减轻。D 组( $36.50 \times 10^4/\text{ml}$ ,  $3.72 \times 10^4/\text{ml}$ )和 E 组( $34.25 \times 10^4/\text{ml}$ ,  $2.25 \times 10^4/\text{ml}$ )的 BALF 中细胞总数、嗜酸粒细胞数显著少于 B 组( $61.67 \times 10^4/\text{ml}$ ,  $14.17 \times 10^4/\text{ml}$ )( $P < 0.05$ )。与 B 组(IgE: 0.39, IgA: 0.79)相比,D 组和 E 组血清中抗原特异性 IgE 抗体水平(D: 0.22, E: 0.22)显著降低,而 IgA 抗体水平(D: 0.88, E: 1.03)显著升高。D 组和 E 组的 BALF 中 IL-4 水平(D: 28.49 pg/ml, E: 20.93 pg/ml)和脾细胞分泌的 IL-4(D: 27.82 pg/ml, E: 20.80 pg/ml)水平均显著低于 B 组(56.33 pg/ml, 45.84 pg/ml)( $P < 0.05$ )。而 BALF 中的 IFN- $\gamma$ (D: 18.80 pg/ml, E: 37.32 pg/ml)、IL-10(D: 118.90 pg/ml, E: 129.15 pg/ml)水平显著高于 B 组(13.60 pg/ml, 29.61 pg/ml)( $P < 0.05$ );脾细胞分泌的 IFN- $\gamma$ (D: 20.68 pg/ml, E: 42.42 pg/ml)、IL-10(D: 36.31 pg/ml, E: 161.37 pg/ml)水平亦显著高于 B 组(13.50 pg/ml, 22.52 pg/ml)( $P < 0.05$ )。与 B 组(SI: 0.23)相比,D 组(SI: 0.14)和 E 组(SI: 0.13)的淋巴细胞增殖反应明显抑制。而 C 组(SI: 0.22)对致敏小鼠无明显疗效。结论 粉尘螨壳聚糖纳米疫苗对致敏小鼠具有免疫治疗作用。

**【关键词】** 粉尘螨;壳聚糖;纳米颗粒;舌下含服疫苗;免疫治疗

中图分类号:R384.42

文献标识码:A

## Therapeutic Effect on Murine Asthma with Sublingual Use of *Dermatophagoides farinae*/Chitosan Nanoparticle Vaccine

YU Hai-qiong<sup>1,2\*</sup>, LIU Zhi-gang<sup>2</sup>, GUO Hua<sup>2</sup>, ZHOU Yi-ping<sup>1</sup>

(1 Shenzhen Futian People's Hospital, Shenzhen 518033, China; 2 Allergy and Immunology Institute, School of Medicine, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

**【Abstract】** Objective To prepare *Dermatophagoides farinae* (Der f)/chitosan nanoparticle vaccine (DCN), and to investigate the effect of sublingual administration with DCN in asthma mice model. Methods DCN were prepared by ionotropic gelation. 30 BALB/c mice were randomly divided into 5 groups: normal control group(A), PBS control group(B), Chitosan group(C), Der f group(D), DCN group(E). Group A were treated with normal saline (100  $\mu$ l) all the time. Mice in other groups were sensitized intraperitoneally with 50  $\mu$ g dust mite extracts plus 2 mg Al(OH)<sub>3</sub>, and on day 28 given a sublingual vaccination of PBS(group B), or empty CS nanoparticles (group C), or Der f (group D, 1 mg Der f) or DCN (group E, loaded with 1 mg Der f). All the mice received 18 doses at 1-day intervals. One week after the last immunization, mice in group B, C, D, and E were intranasally challenged with 50  $\mu$ g Der f extract daily for seven days. Twenty-four hours after the last challenge, airway hyper-responsiveness (AHR) was assessed by using whole-body plethymography. Two days post challenge, mice were sacrificed and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected. Number of the total cells and eosinophils was determined. Level of cytokines in the supernatant of splenocyte culture was

assayed by ELISA. Level of Der f specific IgE, IgG2a and IgA in the sera was determined by ELISA. Airway inflammation was analyzed by HE staining. Spleen lymphocyte proliferation responses were analyzed by MTT colorimetry. Results Compared with group B, AHR and the lung inflammation in groups D and E were greatly reduced. Numbers of total cells and eosinophils in BALF of groups D ( $36.50 \times 10^4/\text{ml}$ ,  $3.72 \times 10^4/\text{ml}$ ) and E ( $34.25 \times 10^4/\text{ml}$ ,  $2.25 \times 10^4/\text{ml}$ ) were significantly lower than that of group B ( $61.67 \times 10^4/\text{ml}$ ,  $14.17 \times 10^4/\text{ml}$ ) ( $P < 0.05$ ). The level of specific IgE was significantly lower in groups D (0.22) and E (0.22), and that of IgA in groups D (0.88) and E (1.03) was significantly higher than that in group B (0.79). The level of IL-4 in BALF (D: 28.49 pg/ml, E: 20.93 pg/ml) and cultured splenocytes (D: 27.82 pg/ml, E: 20.80 pg/ml) of groups D and E was significantly lower than that of group B (56.33 pg/ml, 45.84 pg/ml) ( $P < 0.05$ ). While IFN- $\gamma$  (D: 18.80 pg/ml, E: 37.32 pg/ml) and IL-10 (D: 118.90 pg/ml, E: 129.15 pg/ml) in BALF in groups D and E were significantly higher than that of group B (13.60 pg/ml, 29.61 pg/ml) ( $P < 0.05$ ), and same with IFN- $\gamma$  (D: 20.68 pg/ml, E: 42.42 pg/ml) and IL-10 (D: 36.31 pg/ml, E: 161.37 pg/ml) in spleen cultured supernatants of groups D and E ( $P < 0.05$ ). The allergen-specific splenocyte proliferation was inhibited in groups D (SI: 0.14) and E (SI: 0.13), and there was no significant difference between group C (SI: 0.22) and group B (SI: 0.23). Conclusion Dermatophagoides farinae (Der f) /chitosan nanoparticle vaccine has therapeutic effect on murine asthma.

【Key words】 Dermatophagoides farinae; Chitosan; Nanoparticle; Sublingual vaccine; Immunotherapy

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

哮喘是一种以肺部嗜酸粒细胞浸润和对各种激发因子产生气道高反应为特征的慢性气道炎症疾病,其发病有逐年上升的趋势<sup>[1,2]</sup>。过敏性哮喘的发生与接触过敏原有密切关系,粉尘螨变应原是诱导哮喘和其他变态反应疾病最重要的变应原之一<sup>[3,4]</sup>。研究证实,哮喘与过敏性鼻炎患者血清中粉尘螨抗原特异性 IgE 抗体阳性率为 70%~80%<sup>[5]</sup>。

特异性免疫治疗具有改变疾病自然进程的特点,是唯一的对因治疗方法。舌下含服免疫治疗因其临床有效性和安全性受到广泛重视,但由于有效的治疗剂量较高,在一定程度上增加了治疗费用。新型蛋白质和多肽疫苗载体,如聚乳酸/乙醇酸共聚物(PLGA)、壳聚糖等,具有生物可降解性和安全性等特点,如能提高舌下含服疫苗的疗效,将有很好的应用前景。本研究制备粉尘螨壳聚糖纳米舌下含服疫苗(DCN),并对其表征,研究其对粉尘螨变应原诱导的变态反应性哮喘小鼠的免疫治疗作用,对其作用机制进行探讨,拟为研制新型的舌下含服疫苗提供新思路。

## 材料与方 法

### 1 材 料

粉尘螨粗提液由深圳大学过敏和免疫研究所提供,壳聚糖购自美国 Sigma 公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠 IgE、羊抗鼠 HRP-IgA 和羊抗鼠 HRP-IgG2a 均购于美国 Seratech 公司, $\gamma$  干扰素(IFN- $\gamma$ )与白细胞介素 4 (IL-4) ELISA 检测试剂盒购自美国 R&D 公司。噻唑蓝(MTT)购自美国 Biomol 公司。

### 2 粉尘螨壳聚糖纳米疫苗的制备及表征

将 1.2 ml 三聚磷酸钠(TPP)溶液(0.84 mg/ml)滴至 3 ml 壳聚糖(CS)溶液(2 mg/ml)中,磁力搅拌;再加入 1 mg 粉尘螨变应原(Der f),10 956 $\times$ g 离心 20 min,弃上清,沉淀即为粉尘螨壳聚糖纳米疫苗,将之以超纯水重悬。分别用光子相关法(PCS)和激光多普勒分析法(LDA)测定纳米粒子的粒径和 Zeta 势能。采用 micro-BCA 法(micro-bichinchoninic acid protein assay)测定其包封率和载药量,计算公式为:包封率(association efficiency)=(总蛋白-游离蛋白)/总蛋白 $\times$ 100%,载药量(loading efficiency)=(总蛋白-游离蛋白)/粒子重量 $\times$ 100%。

### 3 动物分组与免疫

30 只 4~6 周龄雌性 BALB/c 小鼠(购自广东省实验动物中心),随机分为阴性对照组(A 组)、阳性对照组(模型组, B 组)、空白壳聚糖组(C 组)、粉尘螨变应原组(D 组)和粉尘螨壳聚糖纳米疫苗组(E 组),每组 6 只。A 组始终以生理盐水处理,其余各组在第 0、7 和 14 天用 50  $\mu$ g 粉尘螨变应原+2 mg Al(OH)<sub>3</sub> 腹腔注射致敏。第 28 天乙醚麻醉小鼠后,分别用 PBS、空白壳聚糖、粉尘螨变应原(1 mg/次)和粉尘螨壳聚糖纳米疫苗(负荷 1 mg Der f 的 DCN/次)舌下含服免疫 18 次,每次间隔 1 d,末次免疫 1 周后用 50  $\mu$ g 粉尘螨变应原滴鼻激发,每天 1 次,连续 7 次。末次激发 24 h 后进行气道高反应检测。末次滴鼻 48 h 后处死小鼠,取血,分离制备血清,-20  $^{\circ}$ C 保存;参照文献 [6] 的方法进行肺泡灌洗,收集肺泡灌洗液(BALF),-20  $^{\circ}$ C 保存;无菌摘取肺组织和脾脏。

## 4 疗效观测

**4.1 气道高反应的检测** 小鼠末次激发 24 h 后, 检测小鼠气道高反应性(AHR)的变化。将小鼠放入非创伤性全体积呼吸计量器(whole body plethysmograph)鼠笼中, 小鼠依次吸入雾化的 PBS 缓冲液与 1、10、30、50 和 100 mg/ml 乙酰甲胆碱, 观察肺功能指标扩大间隙(Penh)值的变化, 并以 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。

**4.2 BALF 中细胞总数、嗜酸粒细胞计数** A~E 组 BALF 离心后获得的沉淀细胞, 用 PBS 洗 2 次, 稀释为 1 ml 悬液, 混匀后取 0.1 ml 加入血细胞计数板, 显微镜下进行细胞计数。另取 0.2 ml 于洁净光滑载玻片上涂片, 以刘氏染液染色, 光学显微镜下进行细胞分类计数。

**4.3 BALF 中 IL-4、IL-10 与 IFN- $\gamma$  的测定** 按 ELISA 试剂盒说明书进行。

**4.4 肺组织学观察** 打开胸腔, 取各组小鼠支气管肺组织, 10%甲醛溶液固定, 常规石蜡切片, HE 染色, 光学显微镜观察, 并参照文献[6]的 Underwood 评分法记录评分。

**4.5 血清中 IgE、IgA 和 IgG2a 水平测定** 按文献[6]的方法, 使用包被液(pH 9.6)稀释粉尘螨变应原 Der f, 至终浓度 10  $\mu$ g/ml, 加入 96 孔板, 包被过夜, 封闭。用含 5%小牛血清的 PBS 按一定稀释度 (IgE: 1:100, IgA: 1:1000, IgG2a: 1:1000)稀释免疫血清, 然后分别加入到已包被粉尘螨变应原 Der f 的 96 孔板中, 100  $\mu$ l/孔, 37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h; PBST (含吐温-20)洗板 5 次, 加入 100  $\mu$ l 兔抗鼠 HRP-IgE (1:1000)或羊抗鼠 HRP-IgA(1:4000)、羊抗鼠 HRP-IgG2a(1:4000), 37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h, PBST 洗板 5 次; 加入 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物, 显色, 终止反应, 读取吸光度(A<sub>450</sub>值)。

**4.6 脾细胞体外培养上清细胞因子 IL-4、IL-10 和 IFN- $\gamma$  的测定** 按文献[6]的方法制备脾细胞悬液。以 RPMI 1640 培养基将脾细胞悬液的细胞密度调至  $5.0 \times 10^6$ /ml。将 100  $\mu$ l 脾细胞悬液加入无菌平底 96 孔板中, 在有或无粉尘螨变应原 Der f (终浓度 20  $\mu$ g/ml)的条件下, 于 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养 72 h。收集培养上清液。按 ELISA 试剂盒说明书操作, 测定其 IL-4、IL-10 和 IFN- $\gamma$  水平。

**4.7 MTT 法检测细胞增殖反应** 脾细胞培养 48 h 后, 加入噻唑蓝(MTT, 终浓度为 0.5 mg/ml), 继续培养 4 h。加入 100  $\mu$ l 酸化十二烷基硫酸钠(SDS) [10% SDS+0.01 mol/L 盐酸 (100  $\mu$ l 1 mol/L 盐酸)]。过夜孵育, 测定 A<sub>570</sub> 值, 计算刺激指数(SI)。

## 5 统计学分析

用 SPSS13.0 软件进行统计学分析, 多组间比较采用单因素方差检验。

## 结 果

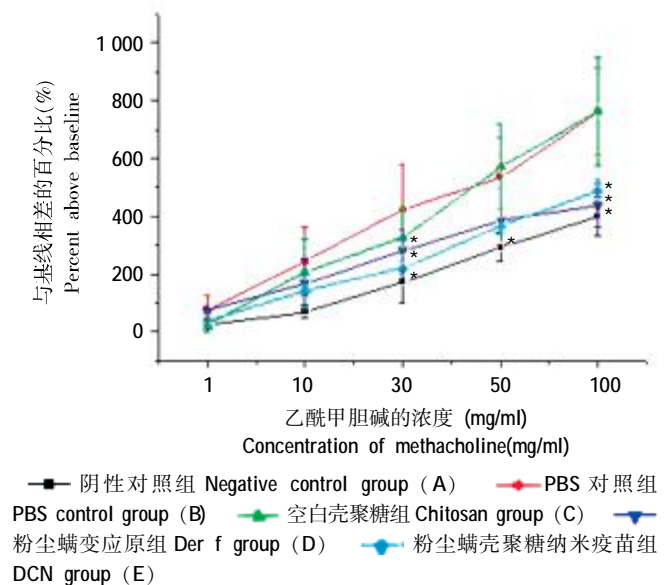
### 1 粉尘螨壳聚糖纳米粒子的表征

空白壳聚糖纳米粒子的粒径为 (672.97 $\pm$ 23.12) nm。包裹了粉尘螨变应原的壳聚糖纳米的粒子粒径为 (789.34 $\pm$ 56.21) nm。空白壳聚糖纳米粒子的 Zeta 势能为 81.8 mv, 包裹了粉尘螨变应原的壳聚糖纳米粒子的 Zeta 势能为 39.5 mv。

粉尘螨壳聚糖纳米粒子的包封率为 60%, 载药量为 15.6%。

### 2 气道高反应性的变化

结果显示, E 组与 B 组相比, 30 mg/ml 和 100 mg/ml 的乙酰甲胆碱浓度激发, 可显著减轻小鼠的气道高反应性。E 组与 D 组相比, 两者间的差异无统计学意义。而 C、B 两组间的差异亦无统计学意义 (图1)。



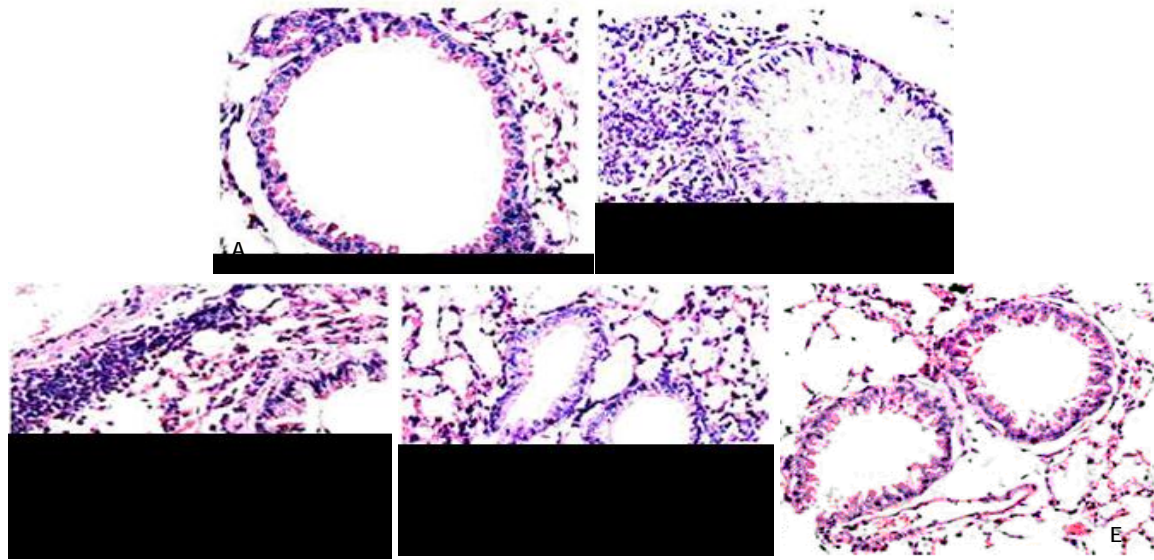
\* 与 B 组相比, P<0.05。\* vs group B, P<0.05.

图 1 小鼠气道高反应变化

Fig.1 Airway hyperresponsiveness assay in mice

### 3 粉尘螨壳聚糖纳米疫苗对致敏小鼠肺局部炎症的影响

在 Der f 变应原激发后 48 h, 与 B 组相比, E 组能有效抑制气道、肺泡和血管周围的炎症细胞浸润和组织水肿(表 1)。B 组小鼠在气道、肺泡和血管周围存在大量的炎症细胞(如嗜酸粒细胞)浸润(图 2B)。与 B 组相比, E 组小鼠的支气管略呈不规则, 周围仅有少量炎症细胞浸润, 近似正常肺组织



A: 阴性对照组 (A 组); B: PBS 对照组 (B 组); C: 空白壳聚糖组 (C 组); D: 粉尘螨变应原组 (D 组); E: 粉尘螨壳聚糖纳米疫苗组 (E 组)。  
A: Negative control group (A); B: PBS control group (B); C: Chitosan group (C); D: Der f group (D); E: DCN group (E).

图 2 小鼠肺组织 (HE 染色, x200)

Fig.2 Histological examination of mice lungs (HE staining, x200)

形态(图 2E), 其病理评分比 D 组低 (表 1)。而 C 组无此改变(图 2C)。各组小鼠肺部炎症病理评分情况见表 1。

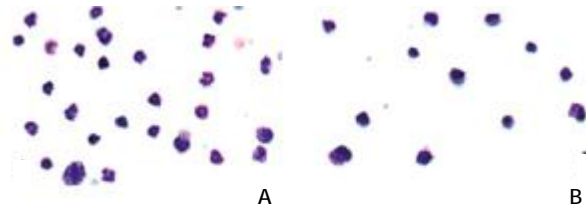
表 1 小鼠肺组织炎症病理评分  
Table 1 Lung pathological scores in mice

组别 Group	炎症细胞浸润 Perivascular and peribronchiolar eosinophilia	上皮水肿 Epithelial edema	上皮损伤 Epithelial damage
阴性对照组 Negative control group	0	0	0
PBS 对照组 PBS control group	4(3~5)	4(3~5)	5(4~5)
空白壳聚糖组 Chitosan group	3.5(2~5)	4(2~5)	4(3~5)
粉尘螨变应原组 Der f group	2(1~3)	2(1~3)	1.5(1~2)
粉尘螨壳聚糖 纳米疫苗组 DCN group	1(1~2)	1.5(1~2)	1(1~2)

#### 4 BALF 细胞学计数与 BALF 中 IL-4、IL-10 和 IFN-γ 水平变化

结果显示, 与 A 组  $[(3.83 \pm 0.88) \times 10^4/\text{ml}, 0]$  相比, B 组(模型组)BALF 中的细胞总数  $[(61.67 \pm 7.63) \times 10^4/\text{ml}]$  和嗜酸粒细胞数  $[(14.17 \pm 4.40) \times 10^4/\text{ml}]$  明显增多。与 B 组相比, D 组  $[(36.50 \pm 5.93) \times 10^4/\text{ml}, (3.72 \pm 0.72) \times 10^4/\text{ml}]$  和 E 组  $[(34.25 \pm 6.61) \times 10^4/\text{ml}, (2.25 \pm 0.66) \times 10^4/\text{ml}]$  BALF 中总细胞数和嗜酸粒细胞数显著减少 ( $P < 0.01$ ); 而 C 组与 B 组 BALF 中总细胞数和

嗜酸粒细胞数相近  $[(75.67 \pm 12.40) \times 10^4/\text{ml}, (17.38 \pm 4.54) \times 10^4/\text{ml}]$ 。E 组与 D 组相比, BALF 中嗜酸粒细胞数间的差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。图 3 示 A 组和 E 组 BALF 中细胞涂片的结果。



A: PBS 对照组 (A 组); B: 粉尘螨壳聚糖纳米疫苗组 (E 组)。  
A: PBS control group (A); B: DCN group (E).

图 3 BALF 中的细胞涂片 (刘氏染色, x400)  
Fig.3 Cells in BALF (Liu's staining, x400)

与 B 组相比, D、E 两组 BALF 中 IL-10  $[(118.90 \pm 23.15), (129.15 \pm 18.75) \text{ pg/ml}]$ 、IFN-γ  $[(18.80 \pm 5.50), (37.32 \pm 2.93) \text{ pg/ml}]$  水平较高 ( $P < 0.05$ ), 而 IL-4  $[(28.49 \pm 4.96), (20.93 \pm 2.74) \text{ pg/ml}]$  水平则显著降低 ( $P < 0.01$ )。与 D 组相比, E 组的 IFN-γ 水平显著升高 ( $P < 0.05$ ) (表 2)。

#### 5 血清中 IgE、IgA 与 IgG2a 水平

与 B 组相比, E 组小鼠血清中 Der f 特异性 IgA  $(1.03 \pm 0.1)$ 、IgG2a  $(0.98 \pm 0.05)$  抗体水平明显升高 ( $P < 0.01$ ), D 组小鼠血清中 Der f 特异性 IgA  $(0.88 \pm 0.08)$  抗体水平明显升高 ( $P < 0.01$ ); 而 D 组  $(0.22 \pm 0.02)$  和 E 组  $(0.22 \pm 0.02)$  特异性 IgE 水平显著下降 ( $P < 0.01$ )。

表 2 BALF 中 IFN- $\gamma$ 、IL-4 和 IL-10 的水平  
Table 2 Level of IFN- $\gamma$ , IL-4 and IL-10 in BALF

组别 Group	细胞因子水平 Cytokines level(pg/ml)		
	IFN- $\gamma$	IL-4	IL-10
A组 Group A	10.91 $\pm$ 2.07	9.44 $\pm$ 1.71*	11.57 $\pm$ 2.48*
B组 Group B	13.60 $\pm$ 3.10	56.33 $\pm$ 7.88	29.61 $\pm$ 10.33
C组 Group C	19.74 $\pm$ 2.98**	50.65 $\pm$ 10.94	33.06 $\pm$ 7.90
D组 Group D	18.80 $\pm$ 5.05**	28.49 $\pm$ 4.96*	118.90 $\pm$ 23.15*
E组 Group E	37.32 $\pm$ 2.93*	20.93 $\pm$ 2.74*	129.15 $\pm$ 18.75*

注: 与 B 组相比, vs group B, \* P<0.01, \*\* P<0.05。

与 D 组相比, E 组血清中 Der f 特异性 IgA 水平较高 (P<0.05)(表 3)。

表 3 小鼠血清中 IgE、IgG2a 与 IgA 抗体水平  
Table 3 Level of Der f-specific IgE, IgG2a and IgA in sera of mice

组别 Group	抗体水平(A <sub>450</sub> 值) Antibody level (A <sub>450</sub> value)		
	IgE	IgG2a	IgA
A组 Group A	0.11 $\pm$ 0.01*	0.12 $\pm$ 0.03*	0.17 $\pm$ 0.05*
B组 Group B	0.39 $\pm$ 0.06	0.91 $\pm$ 0.04	0.79 $\pm$ 0.09
C组 Group C	0.36 $\pm$ 0.03	0.89 $\pm$ 0.04	0.78 $\pm$ 0.09
D组 Group D	0.22 $\pm$ 0.02*	0.96 $\pm$ 0.04	0.88 $\pm$ 0.08*
E组 Group E	0.22 $\pm$ 0.02*	0.98 $\pm$ 0.05*	1.03 $\pm$ 0.10*

注: 与 B 组相比, \* P<0.01。 Note: vs group B, \* P<0.01。

## 6 脾细胞分泌的 IL-4、IL-10 与 IFN- $\gamma$ 的测定

结果显示, B 组脾细胞培养上清中 IL-4、IL-10 和 IFN- $\gamma$  分别为(45.84 $\pm$ 6.91)、(22.52 $\pm$ 6.39)和(13.50 $\pm$ 3.46) pg/ml。与 B 组相比, Der f 变应原在体外刺激能诱导 E 组的脾细胞分泌大量 IFN- $\gamma$  [(42.42 $\pm$ 7.28) pg/ml]和 IL-10 [(161.37 $\pm$ 51.91) pg/ml] (P<0.01); 而 IL-4 的分泌显著减少[(20.80 $\pm$ 6.12) pg/ml] (P<0.01); D 组 Der f 变应原在体外刺激主要诱导小鼠脾细胞分泌显著增多的 IL-10 [(36.31 $\pm$ 28.83) pg/ml]和显著减少的 IL-4 [(27.82 $\pm$ 5.88) pg/ml] (P<0.01) (表 4)。

表 4 脾细胞培养上清中 IFN- $\gamma$ 、IL-4 和 IL-10 的水平  
Table 4 Levels of IFN- $\gamma$ , IL-4 and IL-10 in culture supernatant of splenocytes cells

组别 Group	细胞因子水平 Cytokines level(pg/ml)		
	IFN- $\gamma$	IL-4	IL-10
A组 Group A	10.20 $\pm$ 3.27	8.47 $\pm$ 1.14*	12.48 $\pm$ 2.51
B组 Group B	13.50 $\pm$ 3.46	45.84 $\pm$ 6.91	22.52 $\pm$ 6.39
C组 Group C	20.68 $\pm$ 5.55**	48.18 $\pm$ 10.91	21.85 $\pm$ 7.15
D组 Group D	19.33 $\pm$ 5.11	27.82 $\pm$ 5.88*	36.31 $\pm$ 28.83**
E组 Group E	42.42 $\pm$ 7.28*	20.80 $\pm$ 6.12*	161.37 $\pm$ 51.91*

注: 与 B 组相比, \* P<0.01, \*\* P<0.05。  
Note: vs group B, \* P<0.01, \*\* P<0.05。

## 7 MTT 法测定脾细胞增殖反应

用 MTT 法检测脾细胞对非特异性刺激物(ConA)和特异性刺激物(Der f)的增殖反应。结果显示, 与 B

组相比, 各组对 ConA 的刺激无显著差异; 而对粉尘螨变应原的刺激, D 组和 E 组的脾淋巴细胞增殖受到抑制, SI 值分别为 0.14 $\pm$ 0.02 和 0.13 $\pm$ 0.02 (表 5)。

表 5 各组脾细胞增殖刺激指数变化  
Table 5 Der f-specific proliferation of pooled splenocytes

刺激物 Stimulator	刺激指数 Stimulation indices				
	A组 Group A	B组 Group B	C组 Group C	D组 Group D	E组 Group E
ConA	0.17 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.02	0.16 $\pm$ 0.02
Der f	0.13 $\pm$ 0.01	0.23 $\pm$ 0.05	0.22 $\pm$ 0.02	0.14 $\pm$ 0.02*	0.13 $\pm$ 0.02*

注: 与 B 组相比, \* P<0.05。 Note: vs group B, \* P<0.05。

## 讨 论

舌下含服免疫治疗是一种有效和安全的给药方法<sup>[7]</sup>, 但其比传统的免疫治疗给药量大, 成本高, 影响普及使用<sup>[8]</sup>。理想的舌下含服免疫佐剂应是安全、无毒、本身无免疫原性, 可增强抗原的免疫原性、促进黏膜对抗原的吸收, 防止抗原的降解, 刺激机体对抗原产生有效和有利的免疫应答。很多研究者采用变应原修饰佐剂, 如 PLGA、戊二醛和脂质体等修饰变应原, 以达到增加疗效、缩短疗程、减少给药次数、减轻局部及全身反应的目的。但这些佐剂的制备方法较复杂, 制备过程对蛋白质活性有一定影响<sup>[9,10]</sup>。

壳聚糖是甲壳素脱乙酰化产物, 除了具有来源广泛、性质稳定、生物相容性和可降解性好、安全和低毒的优点外, 还有促进黏膜吸收的特性, 它可促大分子药物通过黏膜上皮屏障<sup>[11]</sup>, 突破上皮间的紧密连接<sup>[12]</sup>。其具有很强的亲水性, 可制成缓释微球达到缓释目的<sup>[13]</sup>。本研究通过沉淀/凝聚法制备的壳聚糖-蛋白质纳米粒子形状规则, 表面带正电荷, 有利于与黏膜吸附; 制备的壳聚糖粉尘螨纳米粒子, 壳聚糖对蛋白质包裹率为 60%, 蛋白质负荷率为 15.6%。由于粒子直径在 700~800 nm 之间, 故能有效被黏膜 M 细胞吞噬<sup>[14]</sup>, 转运至下方具有丰富抗原呈递细胞(包括 B 细胞与树突状细胞)的淋巴组织, 并随后迁移至引流淋巴结, 通过共同刺激信号活化 T 细胞。

研究证实, 粉尘螨提取液舌下含服治疗可改善粉尘螨过敏患者的症状和用药评分, 改变患者的免疫学参数<sup>[15,16]</sup>。本研究结果显示, 与模型组比, 粉尘螨变应原壳聚糖纳米疫苗舌下含服治疗能有效抑制气道高反应性、炎症细胞浸润和黏液分泌。且与单纯粉尘螨舌下含服治疗组相比, 其可显著降低炎症评分, 具有较好的治疗效果。Wang 等<sup>[17]</sup>的研究结果显示, 粉尘螨免疫治疗可诱导分泌调节性 IL-10 细胞因子的 T 细胞生成。在本研究中, 用变应原刺激 E 组小鼠的脾



细胞,其脾细胞主要分泌 Th1 细胞因子(如 IFN- $\gamma$  和调节性细胞因子 IL-10),分泌少许 Th2 细胞因子(IL-4);其淋巴细胞增殖被抑制。而 B 组小鼠脾细胞主要分泌 Th2 细胞因子如 IL-4,分泌 Th1 细胞因子 IFN- $\gamma$  较少。结果显示,粉尘螨壳聚糖纳米疫苗免疫治疗能有有效的诱导以免疫无能为特点的外周耐受,调节以 Th2 反应为主的变态反应向 Th1 或 Th0 转化。与模型组相比,粉尘螨壳聚糖纳米疫苗组小鼠血清中特异性 IgG2a、IgA 的含量升高,IgE 含量下降,显示其可调节抗体免疫应答的转化,与临床试验的结果一致<sup>[18]</sup>。与单纯粉尘螨变应原组(D 组)相比,粉尘螨壳聚糖纳米疫苗组(E 组)脾细胞培养上清和 BALF 中 IFN- $\gamma$  含量升高,血清中特异性 IgG2a 抗体水平升高,显示其可诱导保护性抗体及 Th1 反应。与 D 组相比,E 组血清中特异性 IgA 水平升高,提示壳聚糖具有黏膜佐剂的效应,可促进黏膜免疫应答。以上免疫学参数的特点可能与 E 组气道炎症评分低于 D 组有关,表明粉尘螨壳聚糖纳米疫苗有较好的免疫促进作用和治疗效果。

本研究结果表明,舌下含服壳聚糖粉尘螨纳米疫苗可抑制粉尘螨变应原诱导的气道高反应性、肺部嗜酸性炎症浸润和 Th2 型反应,其机制与诱导调节性 T 细胞和 Th1 细胞为主的免疫应答,及诱导变应原特异型 IgG2a、IgA 抗体产生,抑制变应原致敏所致的抗原特异性 IgE 抗体产生有关。

#### 参 考 文 献

- [1] Brozek JL, Bousquet J, Baena-Cagnani CE, et al. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA) guidelines: 2010 revision[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 126(3): 466-476.
- [2] Bousquet J, Mantzouranis E, Cruz AA, et al. Uniform definition of asthma severity, control, and exacerbations: Document presented for the world health organization consultation on severe asthma[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 126(5): 926-938.
- [3] Sade K, Roitman D, Kivity S. Sensitization to *Dermatophagoides*, *Blomia tropicalis*, and other mites in atopic patients[J]. *J Asthma*, 2010, 47(8): 849-852.
- [4] Chen YZ, Ma Y, Wang HY, et al. Individual allergens as risk factors for asthma and bronchial hyperresponsiveness in Chinese children[J]. *Chin J Pediatr*, 2003, 41(7): 538-541. (in Chinese) (陈育智, 马煜, 王红玉, 等. 中国三城市儿童个人过敏原与喘息及气道高反应性的相关性研究[J]. *中华儿科杂志*, 2003, 41(7): 538-541.)
- [5] Zhu JQ, Liu ZG, Gao B, et al. Cloning, expression and purification of Der f I gene and its immunological characteristics [J]. *Acta Entomol Sin*, 2006, 49(2): 213-218. (in Chinese) (朱健琪, 刘志刚, 高波, 等. 粉尘螨 I 类变应原(Der f I)的克隆表达、纯化及免疫学特性[J]. *昆虫学报*, 2006, 49(2): 213-218.)
- [6] Yu HQ, Li XH, Guo H, et al. Sublingual immunotherapy efficacy of *Dermatophagoides farinae* vaccine in a murine asthma model[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2010, 152(1): 41-48.
- [7] Compalati E, Passalacqua G, Bonini M, et al. The efficacy of sublingual immunotherapy for house dust mites respiratory allergy: results of a GA2LEN meta-analysis[J]. *Allergy*, 2009, 64(11): 1570-1579.
- [8] Incorvaia C, Riaro-Sforza GG, Incorvaia S, et al. Sublingual immunotherapy in allergic asthma: Current evidence and needs to meet [J]. *Ann Thorac Med*, 2010, 5(3): 128-132.
- [9] D'Anneo RW, Bruno ME, Falagiani P, et al. Sublingual allergoid immunotherapy: A new 4-day induction phase in patients allergic to house dust mites[J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2010, 23(2): 553-560.
- [10] Yan H, Chen L, Chen WK. Study on preparation and properties of microspheres of *Dermatophagoides farinae* antigen encapsulated by PLGA[J]. *Acta Acad Med Wannan*, 2003, 22(2): 92-94. (in Chinese) (颜辉, 陈玲, 陈文魁. 尘螨(浸液)抗原 PLGA 微球的制备及其性质的研究[J]. *皖南医学院学报*, 2003, 22(2): 92-94.)
- [11] Artursson P, Lindmark T, Davis SS, et al. Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2)[J]. *Pharm Res*, 1994, 11(9): 1358-1361.
- [12] Borchard G, Lueßen HL, De Boer GA, et al. The potential of mucoadhesive polymers in enhancing intestinal peptide drug absorption III: Effects of chitosan glutamate and carbomer on epithelial tight junctions in vitro[J]. *J Control Rel*, 1996, 39(3): 131-138.
- [13] Felt O, Buri P, Gurny R. Chitosan: A unique polysaccharide for drug delivery[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 1998, 24(11): 979-993.
- [14] Wikingsson L, Sjöholm I. Polyacryl starch microparticles as adjuvant in oral immunisation, inducing mucosal and systemic immune responses in mice[J]. *Vaccine*, 2002, 20(27-28): 3355.
- [15] Ciprandi G, Fenoglio D, Cirillo I, et al. Sublingual immunotherapy: An update on immunologic and functional effects [J]. *Allergy Asthma Proc*, 2007, 28(1): 40-43.
- [16] Kim ST, Han DH, Moon J, et al. Clinical and immunologic effects of sublingual immunotherapy on patients with allergic rhinitis to house-dust mites: 1-year follow-up results[J]. *Am J Rhinol Allergy*, 2010, 24(4): 271-275.
- [17] Wang W, Xiang L, Liu Y, et al. Effect of house dust mite immunotherapy on interleukin-10-secreting regulatory T cells in asthmatic children[J]. *Chin Medical J*, 2010, 123(15): 2099-2104.
- [18] Eifan AO, Akkoc T, Yildiz A, et al. Clinical efficacy and immunological mechanisms of sublingual and subcutaneous immunotherapy in asthmatic/rhinitis children sensitized to house dust mite: an open randomized controlled trial[J]. *Clin Exp Allergy*, 2010, 40(6): 922-932.

(收稿日期: 2010-10-26 编辑: 杨频)