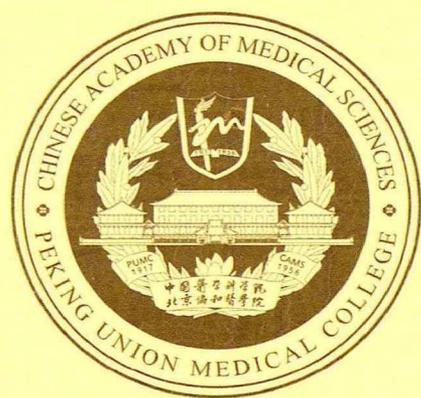


中國醫學科學院  
北京協和醫學院

# 碩士研究生學位論文



北京協和醫學院研究生院

学校代码: 10023

学 号: S2021001042

# 硕士学位论文

## 联合铝盐佐剂对建立蒿属花粉过敏性哮喘动物模型以 及变应原免疫治疗的影响

Effect of aluminum salt adjuvant on establishment of  
Artemisia pollen allergic asthma animal model and  
allergen immunotherapy

所院: 北京协和医院

姓名: 郑卉爽

指导教师: 关凯

导师小组:

学科专业: 变态反应学

研究方向: 不区分研究方向

完成日期: 2024年5月

# 目 录

中英文缩略词表 .....	7
第一部分: 蒿属花粉过敏性哮喘小鼠模型建立 .....	9
1. 前言 .....	9
2. 材料与方法 .....	11
2.1 实验动物 .....	11
2.2 主要实验材料及试剂 .....	11
2.3 主要仪器及设备 .....	12
2.4 试剂配制 .....	13
2.5 制备大籽蒿粗提液 .....	13
2.6 动物分组及建模步骤 .....	14
2.7 样品的处理与存放 .....	15
2.8 观察的指标与检测方法 .....	15
2.9 统计学分析 .....	20
3 结果 .....	20
3.1 血清中免疫球蛋白分析 .....	20
3.2 气道炎症评估 .....	21
3.3 气道高反应性评价 .....	22
3.4 组织学分析 .....	23
3.5 大籽蒿蛋白提取液 SDS-PAGE 电泳和血清 sIgE 与蒿变应原蛋白组分的结合情况 .....	23
4 讨论 .....	24
第二部分: 不同剂量铝盐佐剂对建模的影响 .....	27
1. 前言 .....	27
2. 材料与方法 .....	28
2.1 实验动物 .....	28
2.2 制备大籽蒿粗提液 .....	28
2.3 动物分组及建模步骤 .....	28
2.4 样品的处理与存放 .....	29
2.5 观察的指标与检测方法 .....	29
2.6 统计学分析 .....	29
3 结果 .....	30
3.1 小鼠存活情况 .....	30
3.2 血清中免疫球蛋白分析 .....	30
3.3 气道炎症评估 .....	31

3.4 组织学分析.....	32
4 讨论.....	34
第三部分: 探索不同剂量铝盐佐剂对变应原免疫治疗的影响.....	37
1. 前言.....	37
2. 材料与方法.....	37
2.1 实验动物.....	37
2.2 制备大籽蒿粗提液.....	38
2.3 动物分组、建模步骤及 SCIT 步骤.....	38
2.4 样品的处理与存放.....	39
2.5 观察的指标与检测方法.....	39
2.6 统计学分析.....	42
3 结果.....	42
3.1 血清中免疫球蛋白分析.....	42
3.2 气道炎症评估.....	43
3.3 组织学分析.....	45
4 讨论.....	47
第四部分: 研究结论与不足.....	49
1. 研究结论.....	49
2. 研究不足和展望.....	49
参考文献.....	50

# 联合铝盐佐剂对建立蒿属花粉过敏性哮喘动物模型以及变应原免疫治疗的影响

## 中文摘要

过敏性哮喘是一种 Th2 细胞介导的疾病，以嗜酸性粒细胞炎症，粘液分泌过多和气道高反应性为特征。在过去 30 年里，儿童和成人过敏性哮喘的患病率有所增加。铝盐佐剂可诱导 Th2 型炎症偏向的免疫能力，因此多被用于建立小鼠过敏性疾病模型。其广泛使用部分归因于 70 年使用历史的良好安全性和耐受性<sup>[1]</sup>。变应原免疫治疗 (Allergen immunotherapy, AIT) 是目前唯一能改变过敏性疾病进程，避免过敏性鼻炎发展成哮喘的治疗方式<sup>[2]</sup>。AIT 旨在诱导临床变应原特异性无反应性，这是由免疫耐受机制介导的，减少变应原接触部位炎性效应细胞的激活和募集<sup>[3]</sup>。其免疫耐受可分为快速、中期、晚期三个阶段。在第一阶段，变应原诱导嗜碱性粒细胞和肥大细胞活化（脱颗粒和促炎症介质）减少<sup>[4]</sup>。随着变应原的剂量进一步增加和 AIT 维持阶段的进展，开始影响适应免疫，导致变应原特异性调节 T 和 B 细胞产生，同时 Th2 细胞减少，从而积极抑制促过敏反应<sup>[5]</sup>。AIT 晚期时，变应原激发的即使反应显著降低，并影响终末器官（如气道高反应的逆转）<sup>[6]</sup>。变应原和佐剂联合使用，可以增强对过敏原的免疫反应，促进 Th1 反应与 Th2 介导的超敏反应竞争，从而抑制 Th2 型炎症反应。

蒿属花粉是引起我国呼吸系统过敏性疾病最主要的室外过敏原之一。本研究采用腹腔注射致敏以及经鼻滴入激发的方式建立一种蒿属花粉过敏性哮喘小鼠模型，基于这个模型我们探究不同剂量的铝盐佐剂是否对小鼠过敏性哮喘模型的建立以及 AIT 产生影响。结果提示，模型组小鼠血清 T-IgE、sIgE、肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、IL-4、IL-5、IL-9 和 IL-13 的含量均显著升高。肺组织 HE 和 PAS 染色分析发现，模型组小鼠支气管狭窄，炎症细胞浸润，肺部结构破坏，杯状细胞增生。在第二部分研究中发现过高剂量的铝盐佐剂导致在小鼠建模的过程中出现死亡。添加佐剂建模组小鼠的血清 sIgE、T-IgE、BALF 中的中性粒细胞、IL-4、IL-5、IL-9、IL-10 和 IL-13 水平比不添加佐剂组明显高。不添加佐剂组小鼠哮喘模型嗜酸性粒细胞增多，但是伴随相对较低水平的 sIgE。使用铝盐佐剂建立的哮喘模型的肺部炎症是以嗜酸性粒细胞为中心性、弥漫性病变为特征的炎症。在第三部分研究中，我们发现经 AIT 后小鼠血清 sIgE、T-IgE、肺泡灌洗液中 IL-5、IL-9、IL-13 和 IL-17 水平下降，血清中 IgG1、IgG2a、IgG2b 水平和肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞和中性粒细胞数量上升，并且治疗后的肺部炎症减

轻。高剂量佐剂治疗组小鼠血清 sIgG 水平明显比其他四组治疗组的水平高。使用低剂量佐剂亦能成功建立小鼠 AIT 模型。

目前，国内外成熟的蒿属花粉过敏性哮喘的动物模型较少。本研究创新性地建立了蒿属花粉过敏性哮喘的小鼠模型和皮下注射脱敏治疗模型。为哮喘发病机制及免疫治疗的研究提供依据。

**关键词：**铝盐佐剂，过敏性哮喘，蒿属花粉，动物模型，变应原免疫治疗

## **Effect of combined aluminum salt adjuvants on the establishment of an animal model of Artemisia pollen allergic asthma and on allergen immunotherapy**

### **abstract**

Allergic asthma is a Th2 cell-mediated disease characterized by eosinophilic inflammation, mucus hypersecretion and airway hyperresponsiveness. The prevalence of allergic asthma in children and adults has increased over the past 30 years. Aluminum salt adjuvant induces Th2-type inflammation-biased immunocompetence and is therefore mostly used to model allergic diseases in mice. Their widespread use is partly attributed to the favorable safety and tolerability of a 70-year history of use <sup>[1]</sup>. Allergen immunotherapy (AIT) is currently the only treatment modality that can alter the course of allergic disease and prevent allergic rhinitis from progressing to asthma <sup>[2]</sup>. AIT aims to induce clinical allergen-specific unresponsiveness, which is mediated by immune tolerance mechanisms and reduces activation and recruitment of inflammatory effector cells at the site of allergen exposure <sup>[3]</sup>. Its immune tolerance can be divided into three phases: rapid, intermediate, and late. In the first phase, allergen induces a decrease in basophil and mast cell activation (degranulation and pro-inflammatory mediators) <sup>[4]</sup>. As the dose of allergen is further increased and the maintenance phase of AIT progresses, it begins to affect adaptive immunity, leading to positive suppression of pro-allergic responses by allergen-specific modulation of T- and B-cell production with concomitant reduction of Th2 cells <sup>[5]</sup>. In the late phase of AIT, the allergen-stimulated even response is significantly reduced and affects the end-organ (e.g., reversal of airway hyperresponsiveness) <sup>[6]</sup>. The combination of allergens and adjuvants enhances the immune response to allergens and promotes Th1 responses that compete with Th2-mediated hypersensitivity, thereby suppressing Th2-type inflammatory responses.

Artemisia pollen is one of the most important outdoor allergens causing respiratory allergic diseases in China. In this study, we used intraperitoneal injection sensitization as well as transnasal drip stimulation to establish a mouse model of Artemisia pollen allergic asthma, based on which we investigated whether different doses of aluminum salt adjuvant had any effect on the establishment of the mouse model of allergic asthma as well as AIT. The results suggested that the levels of serum T-IgE, sIgE, eosinophils,

neutrophils, IL-4, IL-5, IL-9, and IL-13 in the alveolar lavage fluid of mice in the model group were significantly elevated. Analysis of HE and PAS staining of lung tissues revealed bronchial stenosis, infiltration of inflammatory cells, destruction of lung structures, and hyperplasia of cup cells in mice of the model group. In the second part of the study it was found that too high a dose of aluminum salt adjuvant resulted in death during the modeling of the mice. Mice in the adjuvant-added modeling group had significantly higher levels of serum sIgE, T-IgE, neutrophils in BALF, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, and IL-13 than those in the no-adjuvant group. The increase in eosinophils in the mouse asthma model in the no-adjuvant group was accompanied by relatively low levels of sIgE. The lung inflammation in the asthma model established using the aluminum salt adjuvant was an inflammation characterized by eosinophil-centered, diffuse lesions. In the third part of the study, we found that serum sIgE, T-IgE, and alveolar lavage fluid levels of IL-5, IL-9, IL-13, and IL-17 decreased, serum levels of IgG1, IgG2a, and IgG2b, and alveolar lavage fluid counts of eosinophils and neutrophils increased, and lung inflammation was reduced after treatment in mice treated with AIT. Serum sIgG levels in mice in the high-dose adjuvant treatment group were significantly higher than those in the other four treatment groups. The mouse AIT model was also successfully established using the low-dose adjuvant.

Currently, there are few mature animal models of *Artemisia* pollen allergic asthma at home and abroad. In this study, we have innovatively established a mouse model of *Artemisia* pollen allergic asthma and a subcutaneous injection desensitization treatment model. It provides a basis for the study of asthma pathogenesis and immunotherapy.

**Keywords:** aluminum salt adjuvant, allergic asthma, *artemisia* pollen, animal model, allergen immunotherapy

## 中英文缩略词表

缩写	英文全名	中文全名
AHR	Airway hyperresponsiveness	气道高反应性
AIT	Allergen immunotherapy	变应原免疫治疗
APC	Antigen-presenting cell	抗原呈递细胞
ASE	Artemisia sieversiana pollen extract	大籽蒿花粉提取液
BALF	Bronchoalveolar lavage fluid	肺泡灌洗液
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附测定
Eos	Eosinophils	嗜酸性粒细胞
FEV1	Forced Expiratory Volume in the first second	第 1 秒用力呼气量
FVC	Forced expiratory volume	用力呼气容积
HDM	House dust mite	屋尘螨
HE	Hematoxylin-eosin staining	苏木精和伊红染色
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
IgG1	Immunoglobulin G1	免疫球蛋白 G1
IgG2a	Immunoglobulin G2a	免疫球蛋白 G2a
IgG2b	Immunoglobulin G2b	免疫球蛋白 G2b
IL-10	Interleukin 10	白介素 10
IL-13	Interleukin 13	白介素 13
IL-17	Interleukin 17	白介素 17
IL-4	Interleukin 4	白介素 4
IL-5	Interleukin 5	白介素 5
IL-9	Interleukin 9	白介素 9
LD50	Median lethal dose	半数致死量
NEUT	Neutrophils	中性粒细胞
OVA	Ovalbumin	卵清蛋白
PAS	Periodicacid-schiff reaction	高碘酸希夫染色
PBS	Hosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲溶液
PFAS	Pollen food allergy ayndrome	花粉-食物过敏综合 症
pI	Isoelectric point	等电点
PVDF	Polyvinylidene fluoride	聚偏二氟乙烯膜
SCIT	Specific subcutaneous allergen immunotherapy	皮下注射免疫治疗

SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate poly - acrylamide gel electrophoresis	十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳
sIgE	Specific immunoglobulin E	特异性免疫球蛋白 E
SLIT	Sublingual allergen immunotherapy	舌下脱敏治疗
T-IgE	Total immunoglobulin E	总免疫球蛋白
WB	Western blot analysis	蛋白质印迹分析

注: 按照首字母排序

## 第一部分：蒿属花粉过敏性哮喘小鼠模型建立

### 1. 前言

近年来哮喘患病率呈现上升趋势，全球哮喘患者约 3.5 亿人<sup>[7]</sup>。不同的哮喘内型可以表现为类似的临床综合症，其特征为气道粘膜炎症，粘液分泌过多，以及对发作性支气管痉挛的易感性<sup>[7]</sup>。目前，最常见也是最具特征的内型是过敏性嗜酸性粒细胞（Eosinophils, Eos）哮喘伴 2 型炎症<sup>[8]</sup>。过敏性哮喘是由 Th2 型免疫反应驱动，发生机制涉及适应性免疫和固有免疫。尤其是 CD4<sup>+</sup> Th2 细胞，可产生 Th2 细胞因子（IL-4、IL-5、IL-9 和 IL-13），导致大量 Eos 在气道壁堆积，粘液过度分泌，并由过敏原特异性 B 细胞合成免疫球蛋白 E（ImmunoglobulinE, IgE），从而促进肥大细胞释放大量炎症介质参与疾病。

常见可诱发过敏性哮喘的变应原包括尘螨、真菌、动物皮屑、花粉等。花粉是与过敏性哮喘和季节性鼻炎相关的重要户外变应原<sup>[9]</sup>。蒿属花粉主要分布在亚洲、欧洲和北美的温带、寒冷和亚热带地区。在我国夏末秋季（8 月下旬至 9 月上旬）因其产生大量花粉颗粒，被认为是我国北方重要的变应原<sup>[10,11]</sup>。蒿花粉过敏患者中合并花粉-食物过敏综合症（Pollen food allergy syndrome, PFAS）的比例达 72%<sup>[12]</sup>。蒿花粉过敏患者常合并桃、樱桃、芒果、荔枝等食物过敏<sup>[13]</sup>。

临床研究是调查哮喘的最佳方法，但是临床研究易受限于伦理方面，哮喘患者的肺组织活检和 BALF 采集的临床适应症很少，这限制了我们的研究疾病发病机制的能力<sup>[14]</sup>。另外，在药物进入临床阶段之前需满足严格的规定<sup>[15]</sup>。因此，动物模型常被用作研究哮喘发生发展的替代工具。I 型变态反应作为过敏性哮喘的发病机理较明确，据此制备的动物模型和人类哮喘有较高相似度<sup>[16]</sup>。过敏性哮喘小鼠模型的经典建模步骤包括致敏和支气管激发<sup>[17]</sup>。Marcelo<sup>[17]</sup>等人汇总比较不同致敏以及激发的方式（表 1）。致敏方式对哮喘模型制备无明显影响，而主要与致敏剂量有关<sup>[18]</sup>。使用腹腔注射进行致敏与人类自然状态下致敏完全不同，因此一些研究使用经鼻滴入的方式对动物进行致敏，雾化的方式对动物进行激发。经呼吸道致敏是未来制造过敏性哮喘动物模型的一个趋势<sup>[19]</sup>。但是由于本研究主要研究联合铝盐佐剂对建模的影响，因此采取腹腔注射的方式进行致敏。

目前，国内外文献报道使用葎草、豚草、桦树、雪松等花粉建立过敏性哮喘小鼠模型较多<sup>[20]</sup>。但是，成熟的蒿属花粉过敏性哮喘的动物模型较少。Zhang<sup>[21]</sup>等人使用皮下注射的方式进行致敏，每间隔 1 周致敏 1 次，3 次致敏后进行连续 7 天的吸入雾化激发（30 分钟/次）成功建立了蒿属花粉过敏性哮喘模型。在本节中，采用腹腔注射致敏以及经鼻滴入激发的方式建立一种蒿属花粉过敏性哮喘小鼠模

型, 为蒿花粉相关过敏性哮喘发病机制和特异性免疫治疗研究提供依据。

表 1 不同致敏及激发方式比较<sup>[17]</sup>

致敏/激发的方式	优缺点
致敏方式	<b>腹腔注射</b> <b>优点:</b> 1. 最传统的方式 2. 需要变应原剂量小 3. 不需要镇静剂 <b>缺点:</b> 1. 诱导耐受性 2. 与人类致敏途径不同 3. 需要佐剂
	<b>皮下注射</b> <b>优点:</b> 1. 需要变应原剂量小 2. 不需要镇静剂 3. 创伤小于腹腔注射 4. 在 HDM 模型中优于腹腔注射 5. 与OVA模型中的腹腔注射效果相似 <b>缺点:</b> 1. 与人类致敏途径不同 2. 需要佐剂
	<b>经鼻滴入</b> <b>优点:</b> 1. 与人类致敏模式类似 2. 可用于慢性暴露 3. 不需要使用佐剂 <b>缺点:</b> 1. 需要进行多次 2. 需要镇静剂
激发方式	<b>雾化吸入</b> <b>优点:</b> 与人类激发模式类似 <b>缺点:</b> 需要大剂量的变应原
	<b>经鼻滴入</b> <b>优点:</b> 1. 与人类激发模式类似 2. 可引起上气道炎症 3. 可用于慢性暴露 <b>缺点:</b> 1. 需要进行多次 2. 需要镇静剂
	<b>经气管滴入</b> <b>优点:</b> 1. 可使变应原进入下气道 2. 需要变应原的剂量少

---

**缺点:**

1. 有创
  2. 需要镇静剂
- 

注: HDM 为屋尘螨, OVA 为卵圆清蛋白

## 2. 材料与方法

### 2.1 实验动物

6-8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠 12 只饲养在无病原体设施中, 体重约为 18-20g。于北京协和医院动物房饲养一周以适应环境。北京协和医院动物实验伦理委员会审批通过了所有实验程序 (伦理批号: XHDW-2022-099)。

### 2.2 主要实验材料及试剂

材料与试剂名称	生产厂家	产地
大籽蒿花粉	北京市过敏性疾病诊疗精准医学重点实验室	中国北京
异氟烷	瑞沃德公司	中国深圳
氢氧化铝佐剂	博奥龙 (Biogragon)	中国北京
磷酸盐缓冲溶液	武汉赛维尔生物科技有限公司	中国武汉
4%多聚甲醛固定液	武汉赛维尔生物科技有限公司	中国武汉
Stain Buffer 染色缓冲液	BD Bioscience	美国
蛋白质上样缓冲液	NCM Biotech	中国上海
生理盐水	武汉赛维尔生物科技有限公司	中国武汉
甲醇	国药集团	中国上海
丽春红染料	上海碧云天公司	中国上海
TBST 缓冲液	武汉赛维尔生物科技有限公司	中国武汉
ELISA 终止液	北京索莱宝科技有限公司	中国北京
TMB 显色液	Thermo Scientific	美国
考马斯亮蓝染料 (R-250)	上海碧云天公司	中国上海
考马斯亮蓝染料 (5 × G-250)	北京索莱宝科技有限公司	中国北京
T-IgE 检测试剂盒	武汉华美生物工程有限公司	中国武汉
山羊抗小鼠 IgE 抗体	Southern Biotech	美国
抗人 IgE 抗体	Abcam, Cambridge, MA, USA	英国
Goat-anti-mouse IgG1-HRP	Southern Biotech 公司	美国

---

Goat-anti-mouse IgG2a-HRP	Southern Biotech 公司	美国
Goat-anti-mouse IgG2b-HRP	Southern Biotech 公司	美国
Zombie NIR™ M Fixable Viability Kit	Biologend	美国
CD45-FITC	Biologend	美国
CD11b APC	Biologend	美国
Ly6C-BV421	Biologend	美国
Siglec-F PE	Biologend	美国
IL-9 检测试剂盒	广州科联生物技术有限公司	中国广东
Luminex 多因子检测试剂盒	RD systems	美国
ELISA 96 孔可拆酶标板	美国 Corning	美国
脱脂奶粉	BD Bioscience	美国
牛血清白蛋白 (BSA)	Sigma-Aldrich	美国
乙酰胆碱	Sigma-Aldrich	美国
XPAGE™蛋白预制胶 (12 孔)	ACE 生物	中国南京
0.25 μm PVDF 膜	Millipore 公司	爱尔兰
0.45 μm PVDF 膜	Millipore 公司	爱尔兰
蛋白标准品 (marker)	Thermo Scientific	美国
封板膜	上海碧云天公司	中国上海
封口膜	Parafilm	美国
离心管	Parafilm	美国
各个型号枪头	Axygen 公司	美国

### 2.3 主要仪器及设备

仪器及设备名称	厂家名称	产地
涡旋振荡仪	Thermo Scientific	美国
微孔板孵育振荡器	海门市其林贝尔仪器制造有限公司	中国江苏
Masterflex L/S cole-parmer 蠕动泵 (Device Size: 50cm <sup>2</sup> )	Cole-Parmer/科尔帕默	美国
磁力搅拌器	Thermo Scientific	美国
移液枪	Eppendorf	德国
高压灭菌锅 SQ810C	日本 Yamato	日本

台式高速冷冻离心机	Thermo Scientific	美国
电泳系统	BIO-RAD 公司	美国
转膜系统	BIO-RAD 公司	美国
水平摇床	江苏海门其林贝尔仪器公司	中国江苏
制冰机	SANYO 公司	日本
多功能酶标仪-Synergy H1	安捷伦 BioTek	美国
超灵敏多功能成像仪 (Demo)	美国 GE AI	美国
化学发光成像分析仪 ChemiDoc)	BIO-RAD 公司	美国
BIO-plex 200 悬液芯片系统	bio-plex	美国
BD FACSCelesta™ 细胞分析仪	BD Biosciences	美国
Buxco FinePointe 系统	DSI BUXCO	美国

## 2.4 试剂配制

- (1) 大籽蒿提取液吸附在氢氧化铝佐剂上：按照下文中的剂量配制好后，充分涡旋振荡 30 分钟；
- (2) 花粉提取液：为 0.125 mol/L 的碳酸氢铵溶液。取 9.89g 碳酸氢铵粉末，溶于 1 L 的蒸馏水中，用玻璃棒充分溶解搅拌；
- (3) 丽春红染料配制：其中含有 5%乙酸和 0.1%丽春红。取 0.1g 粉末的丽春红，溶于 95ml 蒸馏水和 5ml 乙酸中，充分混匀后在室温保存。使用后可回收反复使用；
- (4) 抗体稀释液和封闭液配制：为 1%的脱脂奶粉，现配现用。取 1g 脱脂奶粉，向其中加入 100ml 的 TBST 缓冲液中，充分混匀溶解，可保存在 4℃短期内使用；
- (5) 封闭液体（蛋白质印迹分析实验使用）：为 5%的脱脂奶粉，现配现用。取 2.5g 脱脂奶粉，向其中加入 50ml 的 TBST 缓冲液中，充分混匀溶解，可保存在 4℃环境中短期内使用。

## 2.5 制备大籽蒿粗提液

- (1) 溶解：按照 1:20 (w/v) 的比例溶解大籽蒿花粉。取 25 大籽蒿花粉，加入 500ml 0.125 mol/L 的碳酸氢铵溶液中，摇晃充分混匀；
- (2) 搅拌：在瓶中放入搅拌子，在 4℃的条件下充分搅拌 24h；
- (3) 离心：在 4℃的条件下离心 (12000rpm, 1h) 后取上清液。

- (4) 过滤: 用  $0.45\ \mu\text{m}$  孔径的 PVDF 膜过滤一遍后, 再用  $0.25\ \mu\text{m}$  孔径的 PVDF 膜过滤;
- (5) 溶液置换: 使用蒸馏水清洗蠕动泵的管道后, 用  $0.5\ \text{mol/L}$  的氢氧化钠溶液清洗管道, 再用 PBS 溶液清洗一遍。将原来溶液中的碳酸氢铵溶液, 置换成 PBS 溶液;
- (6) 测定蛋白浓度: 采用 Bradford 法测定总蛋白浓度。最终测得的浓度为  $1.5\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ;
- (7) 分装: 将提取的大籽蒿粗提液进行分装, 冻存在  $-20^\circ\text{C}$  以备使用。

## 2.6 动物分组及建模步骤

- (1) 分组: 随机将雌性 BALB/c 小鼠分为模型组和对照组, 每组 6 只;
- (2) 腹腔注射致敏: 每间隔 7 天对小鼠进行 1 次腹腔注射致敏, 致敏 4 次。具体方法: 抓取小鼠固定, 使小鼠的身体呈一直线。使用 75% 的酒精棉球消毒注射部位。注射部位位于小鼠腹中线两侧  $0.5\text{cm}$  处。将注射针头以  $45^\circ$  角向腹腔内推进, 回抽注射器, 若无回流物, 即可缓慢推药。完毕后, 轻旋针头拔出注射器, 以防漏液;
- (3) 滴鼻激发: 在第 25 天, 使用异氟烷对小鼠吸入麻醉后进行滴鼻激发, 连续 5 天;
- (4) 模型组小鼠每次致敏使用  $100\ \mu\text{g}$  大籽蒿粗提液 (吸附在  $2\text{mg}$  的氢氧化铝佐剂上), 滴鼻激发使用  $50\ \mu\text{g}$  的大籽蒿粗提液。对照组小鼠致敏和滴鼻激发则均使用同等剂量的磷酸盐缓冲溶液 (Phosphate-buffered saline, PBS);
- (5) 于第 30 天取样。

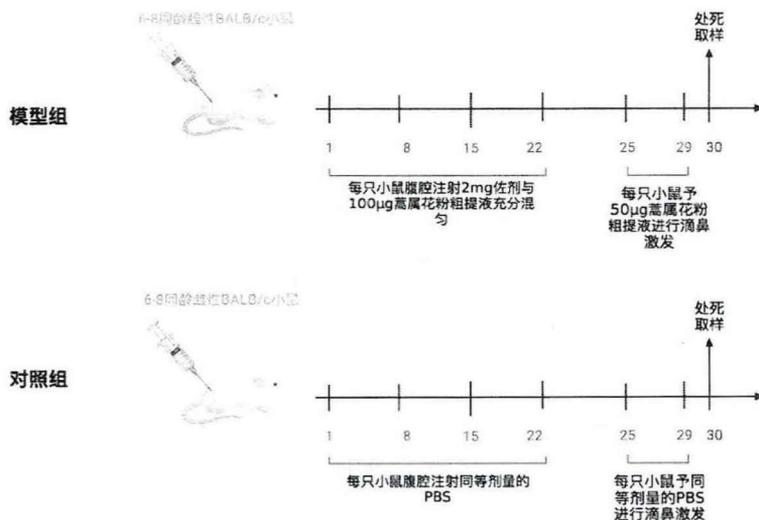


图 1 建模流程图

## 2.7 样品的处理与存放

- (1) 血清: 将取得的小鼠血液在 37°C 的环境下, 静置 3-4 小时后进行离心 (3000g, 10 分钟) 来获得血清。分装后冻存于 -20°C 以备使用。长久保存则转移至 -80°C 环境中;
- (2) BALF: 将小鼠仰卧位固定后, 分离颈部皮毛充分暴露气管进行气管插管, 用 0.5 ml PBS 冲洗气道 3 次获得肺泡灌洗液 (Bronchoalveolar lavage fluid, BALF), 在 4°C 的条件下离心 (500g, 10 分钟) 后收集细胞并悬浮进行流式细胞术, 将上清液储存在 -20°C, 后续进行细胞因子检测;
- (3) 肺组织: 取小鼠左上肺叶用生理盐水洗涤后, 使用 4% 的多聚甲醛中固定 24 小时, 并用苏木精-伊红 (Hematoxylin-eosin staining, HE) 染色和高碘酸希夫 (Periodic acid-schiff reaction, PAS) 染色。

## 2.8 观察的指标与检测方法

### 2.8.1 血清总免疫球蛋白 E 和特异性免疫球蛋白 E 检测

#### 2.8.1.1 T-IgE 检测

使用 T-IgE 试剂盒检测使用小鼠总免疫球蛋白 E (Total immunoglobulin E, T-IgE)。

具体实验步骤如下所示, 以下出现的试剂均为试剂盒中所有:

- (1) 配试剂: 将所有的试剂转移置室温 30 分钟。配制洗涤工作液 (取 10ml 浓缩洗涤液加入 240ml 蒸馏水充分混匀)、生物素标记抗体工作液 (取 10  $\mu$ l 生物素标记抗体加入 990  $\mu$ l 生物素抗体稀释液充分混匀)、辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase, HRP) 亲和素工作液 (取 100  $\mu$ l HRP 加入 9900  $\mu$ l HRP 稀释液充分混匀);
- (2) 孵育血清: 使用样品稀释液按照 1:10 的比例稀释血清。100  $\mu$ l/孔加入 96 孔板中, 封板后在室温下孵育 2 小时;
- (3) 拍板: 甩干, 不用洗涤;
- (4) 孵育抗体: 100  $\mu$ l/孔稀释后的生物素抗体工作液加入 96 孔板中, 封板后在室温下孵育 1 小时;
- (5) 洗板: 甩板弃液, 200  $\mu$ l/孔洗涤液, 2 分钟/次, 洗 5 次;
- (6) 100  $\mu$ l/孔稀释后的 HRP 加入 96 孔板中, 封板后在室温下孵育 1 小时;
- (7) 显色: 每孔加入 100  $\mu$ l 底物溶液, 避光显色 15 分钟;
- (8) 终止: 每孔加入 50  $\mu$ l 终止溶液终止反应;

- (9) 在 15 分钟内使用多功能酶标仪 Synergy H1 检测 450 nm 波长处测定各孔吸光度 (OD 值)。

### 2.8.1.2sIgE 检测

使用酶联免疫吸附测定 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 方法检测特异性免疫球蛋白 E (Specific immunoglobulin E, sIgE)。

具体实验步骤如下所示:

- (1) 包板: 使用大籽蒿粗提液作为包板液。将 ASE 稀释至  $10\ \mu\text{g/ml}$ , 每孔加入  $100\ \mu\text{l}$  ASE 稀释液, 使用封板膜封板后放置于  $4^\circ\text{C}$  冰箱中孵育过夜;
- (2) 洗板: 取出 96 孔板后, 在室温下放置 30 分钟, 甩板弃包板液,  $300\ \mu\text{l}$  /孔 TBST 缓冲液洗板, 5 分钟/次, 洗 3 次;
- (3) 封闭: 甩板弃液, 将  $200\ \mu\text{l}$  /孔的 1%BSA 溶液加入 96 孔板中, 封板后在室温下放置 2 小时;
- (4) 洗板: 甩板弃液,  $300\ \mu\text{l}$  /孔 TBST 缓冲液洗板, 5 分钟/次, 洗 3 次;
- (5) 孵育血清: 拍板, 使用 1%BSA 按照 1:10 的比例稀释血清。  $100\ \mu\text{l}$  /孔加入 96 孔板中, 封板后在室温下孵育 1 小时;
- (6) 洗板: 甩板弃液,  $300\ \mu\text{l}$  /孔 TBST 缓冲液洗板, 5 分钟/次, 洗 3 次;
- (7) 孵育抗体: 拍板, 使用 1% BSA 按照 1:1000 比例稀释与 HRP 偶联的山羊抗小鼠 IgE 抗体。  $100\ \mu\text{l}$  /孔加入 96 孔板中, 封板后在室温下孵育 1 小时;
- (8) 洗板: 甩板弃液,  $300\ \mu\text{l}$  /孔 TBST 缓冲液洗板, 5 分钟/次, 洗 3 次;
- (9) 显色: 拍板, 每孔加入  $100\ \mu\text{l}$  TMB 显色液, 避光显色 15 分钟;
- (10) 终止: 每孔加入  $50\ \mu\text{l}$  稀硫酸溶液终止反应;
- (11) 在 15 分钟内使用多功能酶标仪 Synergy H1 检测 450 nm 波长处测定各孔吸光度 (OD 值)。

### 2.8.2 嗜酸性粒细胞及中性粒细胞检测

使用流式细胞术检测 BALF 中的 Eos 和 NEUT, 具体实验步骤如下所示:

- (1) 细胞清洗: 细胞处理计数之后, 从每个 BALF 样本中取  $1 \times 10^6$  个细胞待检测 Eos 和中性粒细胞 (Neutrophil, NEUT), 每个样本中加入 2ml  $4^\circ\text{C}$  的 PBS。在 500g,  $4^\circ\text{C}$  的条件下离心 5 分钟;
- (2) 细胞重悬: 去上清后, 每管加  $100\ \mu\text{l}$   $4^\circ\text{C}$  的 PBS 重悬;
- (3) 细胞孵育: 避光孵育 30 分钟;
- (4) 细胞清洗: 每管加 2ml stain buffer 染色缓冲液重悬, 500g,  $4^\circ\text{C}$ , 弃上清;



- (9) 使用 Bioplex 200 悬液芯片系统进行检测。

#### 2.8.4 气道高反应性评价

在最后一次激发后24小时使用 Buxco FinePointe系统和软件 (DSI Buxco, 美国) 测量小鼠的AHR。

具体实验步骤如下所示:

- (1) 调试仪器: 检查仪器的气密性, 顺利完成后开始实验;
- (2) 麻醉: 使用1%戊巴比妥麻醉小鼠, 剂量为0.1-0.2ml/10g;
- (3) 气管插管: 用胶带纸将小鼠摆正放平固定在泡沫板上, 上门牙挂上橡皮筋。用75%的酒精消毒小鼠颈部, 切开皮肤和肌肉筋膜, 钝性分离颈前肌肉组织, 充分暴露小鼠气管。用剪刀在小鼠颈部环状软骨下缘环间组织横向剪开一个“V”字型切口。将通气管缓慢插入;
- (4) 上机检测: 气道阻力 (以  $\text{cmH}_2\text{O}\cdot\text{s}/\text{ml}$  为单位) 和肺顺应性 (以  $\text{ml}/\text{H}_2\text{O}$  为单位) 的测量以雾入PBS 为基线。然后逐渐增加雾化乙酰胆碱的浓度 (1.5、3、6、12和24mg/mL), 每种浓度雾入20  $\mu\text{l}$ , 持续1分钟;
- (5) 实验数据储存: 实验结束后, 先将小鼠下机, 停止采集数据后, 将数据存储在文件中。

#### 2.8.5 肺组织病理评估分析

油镜下对小鼠肺组织进行观察。每张切片的炎症平均得分是通过将肺部切片中所有单个支气管的得分相加并除以肺部切片中存在的支气管数量来计算的, 对支气管的外周炎症程度进行评估参考表 2<sup>[22]</sup>。

表 2 支气管的外周炎症程度评分

评分	支气管外周炎症
1分	支气管周围没有炎症细胞
2分	支气管周围分散着炎症细胞, 并涉及支气管周长的 25%以下
3分	局灶性的支气管周围炎症细胞浸润, 没有完全围绕支气管 (即涉及支气管周长的 大约 25%-75%)
4分	有 1 层明确的炎症细胞完全包围支气管
5分	有 2 层明确的炎症细胞完全包围支气管
6分	3层或以上明确的炎症细胞完全包围支气管

## 2.8.6 大籽蒿蛋白提取物 SDS-PAGE 电泳和血清 sIgE 与蒿变应原蛋白组分的蛋白质印迹分析

使用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Sodium dodecyl sulfate poly - acrylamide gel electrophoresis , SDS - PAGE) 和蛋白质印迹分析 (Western blot analysis, WB) 小鼠血清中sIgE与蒿变应原蛋白组分结合情况。

具体实验步骤如下所示:

### 通过SDS - PAGE分离10 $\mu$ g的大籽蒿粗提蛋白

- (1) 蛋白样本处理: 取160 $\mu$ l的ASE, 加入40 $\mu$ l 5 $\times$ 的蛋白质上样缓冲液中进行混匀。在100 $^{\circ}$ C条件下煮10分钟。待冷却之后, 10000g离心1分钟, 待用;
- (2) 电泳缓冲液处理: 将预制胶卡在电泳内槽中, 缓慢将梳子拔出, 在内槽中加入电泳缓冲液, 直至淹没短玻璃板, 将内槽置于外槽中, 并加入电泳缓冲液至最大刻度;
- (3) 蛋白上样: 使用移液枪上样, 将处理过的蛋白质样品加到点样孔中。同时加入蛋白分子的maker作为指示剂;
- (4) 运行电泳: 将电压设置为160 V, 100mA。约1小时可完成电泳。最终根据蛋白分子 maker 相对应的蛋白质量来决定运行电泳的时间;
- (5) 染色: 电泳运行结束后, 将挡板从槽内中取出, 撬开较短的挡板, 小心切除浓缩胶部分, 将分离胶放入塑料盒中, 倒入适量的考马斯亮蓝染色液 (R-250), 盖好盖子, 放置于水平摇床上, 振荡染色约1小时, 直到能看到凝胶上的蛋白条带;
- (6) 脱色及扫描: 回收染色液后, 加入脱色液体, 放置于水平摇床上进行脱色, 期间可多次更换脱色液, 直至凝胶背景板变白色, 条带清晰可见。将凝胶取出放置于扫描仪上, 扫描后保存结果。

### Western Blot鉴定

- (1) 转膜: 将凝胶放置于转膜缓冲液中平衡10分钟。裁剪与凝胶大小一致的聚偏二氟乙烯膜 (Polyvinylidene fluoride , PVDF), 将PVDF膜放在甲醇溶液中激活后转放入转膜缓冲液中平衡。按照“三明治法”将PVDF膜转入转膜夹中, 顺序为“阴极—海绵垫—凝胶—PVDF膜—滤纸—海绵垫—阳极”, 完全排出气泡。盖好转膜夹板盖子, 放置在转印槽中, 预制胶一侧靠近负极, 半干

转转移10分钟;

- (2) 染色: 将PVDF膜放入塑料盒中, 加入适量的丽春红染液, 置于水平摇床上染色数分钟, 膜纸上能清洗看到条带后, 进行裁剪成宽窄一致的膜条;
- (3) 洗膜: 用TBST缓冲溶液洗膜, 将膜放入塑料盒中, 置于水平摇床上, 5分钟/次, 一共清洗3次;
- (4) 封闭: 将PVDF膜放入塑料盒中, 加入适量的5%脱脂牛奶, 置于水平摇床上进行封闭2小时来阻断非特异性结合;
- (5) 洗膜: 封闭结束后, 用TBST缓冲溶液洗膜, 将膜入塑料盒中, 置于水平摇床上, 5分钟/次, 一共清洗3次;
- (6) 孵育血清: 分别将健康人、蒿花粉过敏患者、对照组小鼠、模型组小鼠血清池的血清按照 1:10稀释 (用5%的脱脂牛奶), 每条膜上均匀滴上1 ml稀释后的血清, 置于水平摇床上, 在4 °C条件下孵育过夜;
- (7) 洗膜: 孵育结束后, 用TBST缓冲溶液洗膜, 将膜入塑料盒中, 置于水平摇床上, 5分钟/次, 一共清洗3次;
- (8) 孵育抗体: 用5%的脱脂牛奶, 按照1:1000的比例配制来稀释与 HRP 偶联的抗人 IgE 抗体和山羊抗小鼠IgE抗体, 室温下孵育1小时;
- (9) 洗膜: 孵育结束后, 用TBST缓冲溶液洗膜, 将膜入塑料盒中, 置于水平摇床上, 5分钟/次, 一共清洗3次;
- (10) 显影: 清洗膜条后, 将其沥干, 置于显色平板上, 缓慢滴上现配的ECL显色液。避光反应3分钟后, 用吸水纸吸去多余的显色液, 放入化学发光成像仪内进行曝光, 曝光的时间取决于反应信号的强弱。曝光后保存图片。

## 2.9 统计学分析

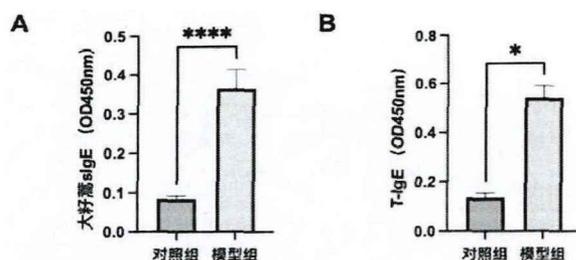
采用GraphPad Prims10.02 (美国) 和SPSS 26.0统计学软件 (IBM, 美国) 对数据进行分析。数据用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) /中位数 ± 四分位数进行描述, 使用 t 检验评价组间差异。当数据不符合正态分布时候, 采用 Mann-Whitney U 检验进行分析。P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 血清中免疫球蛋白分析

过敏性哮喘是一种 IgE 介导的 I 型超敏反应, 本研究为对比模型组小鼠较对照

组小鼠 sIgE 和 T-IgE 是否升高，检测了两组小鼠的血清大籽蒿 sIgE 和 T-IgE。结果发现，模型组小鼠血清大籽蒿 sIgE 和 T-IgE 水平均显著高于对照组小鼠 ( $P < 0.001$ ,  $P = 0.0159$ ) (图 2)。



**图 2** 两组小鼠血清大籽蒿 sIgE和T-IgE 比较

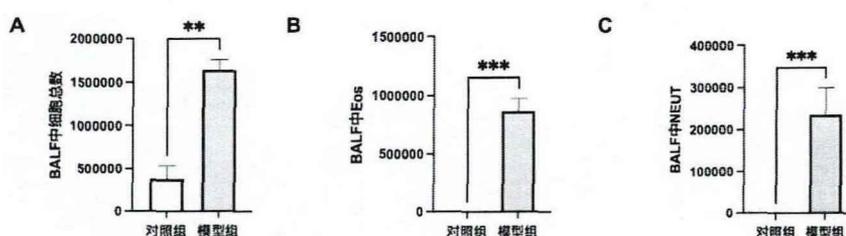
A: 血清大籽蒿 sIgE, B: 血清大籽蒿 T-IgE

绝对值表示为  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  ( $n=6$ ) \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  和\*\*\* $P < 0.001$

### 3.2 气道炎症评估

白细胞在肺内聚集是过敏性哮喘患者的特征之一，本研究为检测对照组和模型组小鼠的肺内白细胞聚集情况，对小鼠 BALF 中的白细胞进行计数并分类计数。结果发现，模型组小鼠的 BALF 中的 WBC、Eos 和 NEUT 水平均高于对照组 ( $P < 0.001$ ) (图 3)。

接触变应原后会导致气道管腔和实质组织分泌多种炎症介质，通常是 Th2 型细胞因子，也包括脂质和酶，这些介质会导致炎症反应<sup>[23]</sup>。检测小鼠 BALF 中的细胞因子发现，模型组小鼠 BALF 中的 IL-4、IL-5、IL-9 和 IL-13 的水平明显高于对照组小鼠 ( $P < 0.05$ ) (图 4)。两组小鼠 BALF 中 IL-10 的水平则无明显差异。



**图 3** 两组小鼠BALF中细胞总数比较

A: BALF中细胞总数, B: BALF中Eos, C: BALF中NEUT

绝对值表示为  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  ( $n=6$ ) \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  和\*\*\* $P < 0.001$

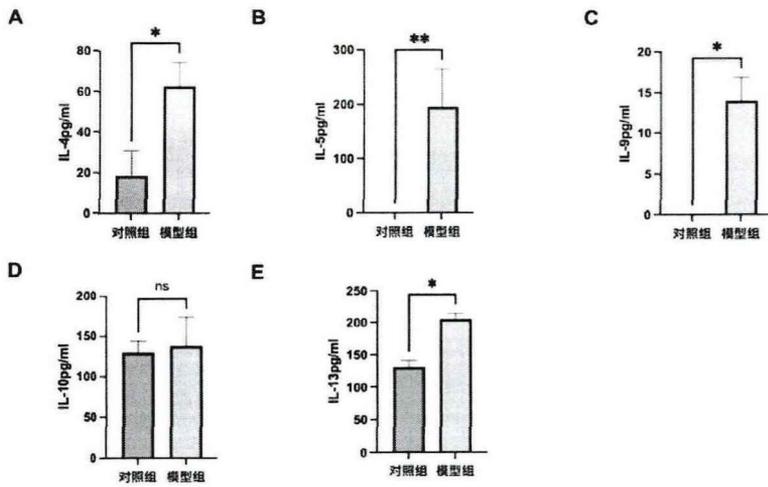


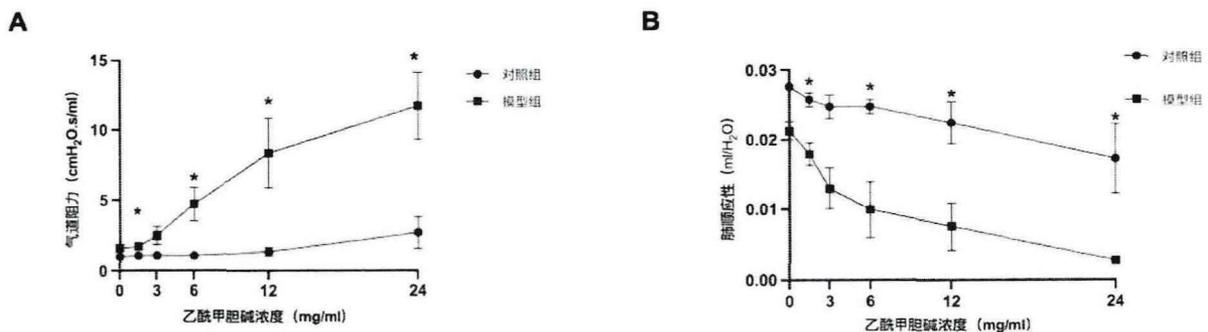
图 4 两组小鼠 BALF 中细胞因子比较

A: IL-4, B: IL-5, C: IL-9, D: IL-10, E: IL-13

绝对值表示为  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  (n=6) \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 和\*\*\*P < 0.001

### 3.3 气道高反应性评价

为了确定模型组小鼠是否存在 AHR，我们评估了吸入胆碱能激动剂后气道阻力和肺部动态顺应性的剂量递增的反应。与对照组小鼠比较发现，模型组小鼠对乙酰胆碱产生 AHR，具体表现在吸入 1.5、6、12 和 24mg/ml 乙酰胆碱后气道阻力明显升高 (P < 0.05)，吸入 1.5、6、12 和 24mg/ml 乙酰胆碱后肺顺应性明显下降 (P < 0.05) (图 5)。



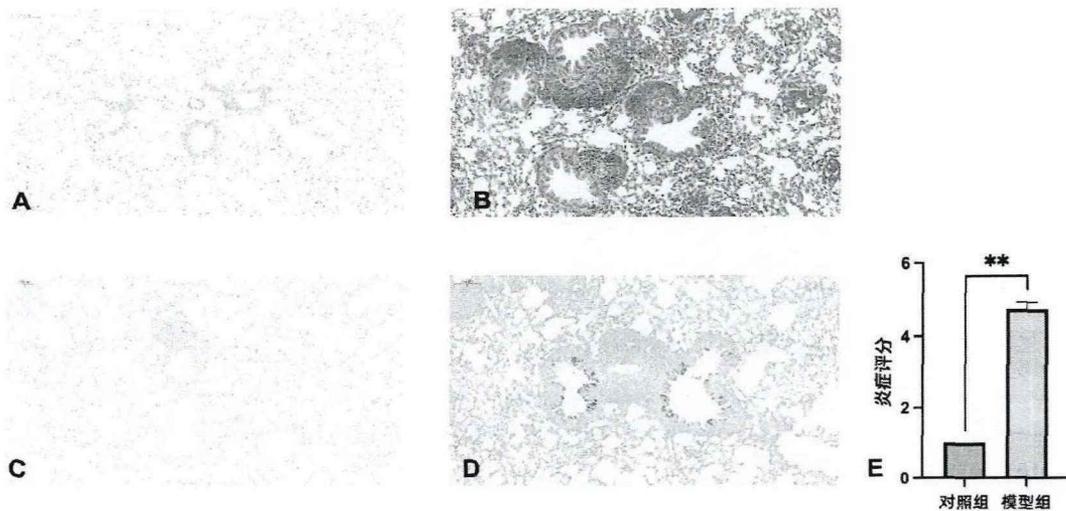
### 图5 两组小鼠气道高反应评价

A: 气道阻力评价, B: 顺应性评价

绝对值表示为  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  (n=4) \*P < 0.05

### 3.4 组织学分析

观察对照组和模型组小鼠的肺部病理组织发现模型组小鼠的气道变窄, 肺部结构破坏, 炎症主要在支气管和血管周围, 以Eos和淋巴细胞为主(图6)。PAS染色发现模型组小鼠的杯状细胞增生, 支气管粘液物质明显增多(图6)。模型组的肺组织病理评分明显高于对照组(P < 0.01)(图6)。



### 图6 两组小鼠肺组织炎症比较

A: 对照组小鼠肺组织HE染色 (10×), B: 模型组小鼠肺组织HE染色 (10×), C: 对照组小鼠肺组织PAS染色 (10×), D: 模型组小鼠肺组织PAS染色 (10×), E: 两组小鼠肺组织病理评分比较

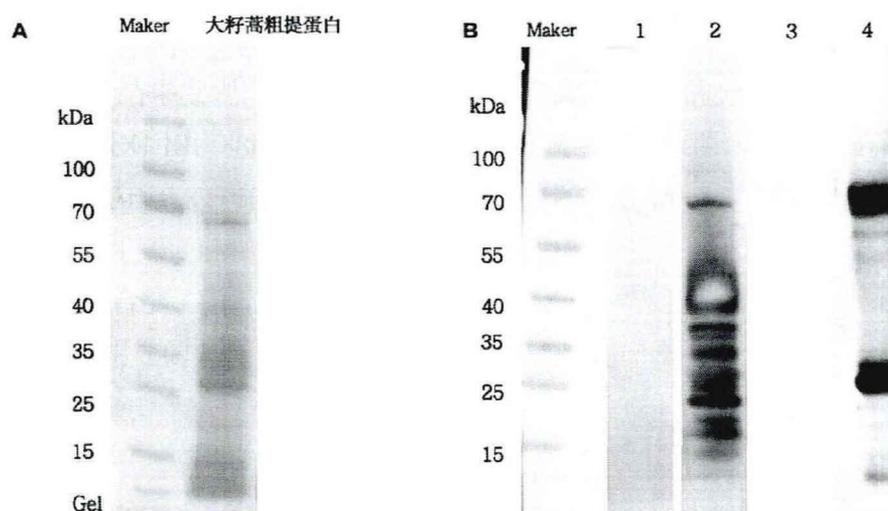
绝对值表示为  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  (n=6) \*P < 0.05, \*\*P < 0.01和\*\*\*P < 0.001

### 3.5 大籽蒿蛋白提取液 SDS-PAGE 电泳和血清 sIgE 与蒿变应原蛋白组分的结合情况

为评估大籽蒿花粉粗提液的蛋白的特征, 我们使用 SDS-PAGE 对大籽蒿花粉粗提物进行了研究。发现大籽蒿花粉蛋白分子量主要分布于 9-70kDa (图 7A)。

我们分别对对照组和模型组小鼠的血清以及蒿属花粉过敏患者和健康人血清进行

蛋白质印迹分析。结果发现，模型组小鼠血清 sIgE 结合蛋白的分子量在 9-70kDa 之间 (图 7B2)，并且对 18、38kDa、50kDa 的蛋白反应剧烈，依照蛋白的分子量推断为 Art si 5 (9kDa)、Art si 3 (10 kDa)、Art si 8 (17 kDa)、Art si 2 (18 kDa)、Art si 1 (28kDa)、Art si 14 (38 kDa)、Art si 12 (50 kDa)、Art an7 (70kDa)。蒿属花粉过敏患者血清 sIgE 结合蛋白的分子量在 28kDa 和 70kDa 处尤为清晰 (图 7B4)，在 9/10kDa 处有淡但明显的条带。对照组小鼠和健康人血清 sIgE 对大籽蒿花粉蛋白均无反应 (图 7B 1、3)。



**图7** SDS-PAGE和血清印迹分析

A: 大籽蒿花粉粗提蛋白质图谱; B: 血清sIgE与大籽蒿花粉的抗原结合特性进行蛋白质印迹分析。第1泳道: 使用对照组小鼠血清池; 第2泳道: 使用模型组小鼠血清池; 第3泳道: 使用健康人血清池; 第4泳道: 使用蒿属花粉过敏患者血清池

## 4 讨论

本研究使用 BALB/c 雌性小鼠，采用 ASE 经腹腔注射的方式致敏，最后以滴鼻激发的方法成功建立了一种蒿属花粉过敏性哮喘小鼠模型。具体表现为血清 T-IgE、sIgE、BALF 中 Eos、NEUT、IL-4、IL-5、IL-9 和 IL-13 的含量显著升高，肺部炎症加重，气道阻力升高以及肺部顺应性下降。既往的研究已证明，CD<sup>4+</sup>T Th2 细胞、IL-4 IL-5、IL-13 以及上游产物如 GATA，介导 Eos 肺部炎症、AHR、粘液分泌和 IgE 升高，这些都是过敏性哮喘的标志<sup>[15]</sup>，与本研究的结果一致。持续的气传变应原诱导的气道炎症是由 IgE 依赖性急性反应和 Th 记忆细胞晚期反应的连续激活级联

引起的<sup>[24]</sup>。晚期反应由 Th2 细胞因子（包括 IL-4 和 IL-13）驱动，这些细胞因子也控制 IgE-B 细胞的成熟，Th 记忆细胞反复循环产生这些细胞因子。

随着研究的发展，研究者多使用具有临床相关性的天然存在的变应原提取物或纯化蛋白，如花粉、尘螨、霉菌等对动物进行致敏和激发，从而诱导出类似自然发生的、接近人类表型的哮喘动物模型<sup>[25]</sup>。传统上，使用卵清蛋白（Ovalbumin, OVA）致敏是最常用的哮喘模型。然而，OVA 诱导免疫耐受，而不是明显的哮喘样气道反应，与人类疾病没有相似之处。本研究使用 ASE 作为变应原进行致敏和激发，免疫印迹实验表明，模型小鼠的 IgE 抗体主要与分子量 9-70kDa 的蛋白结合，并包括引起蒿属花粉过敏患者过敏的 Art si 1 (28kDa)、Art an7 (70kDa)、Art si 5 (9kDa) 和（或）Art si 3 (10 kDa) 蛋白。这说明该模型小鼠表现出与患者相似的 IgE 反应模式，可用于后续蒿属花粉过敏性哮喘的相关研究。

目前建立过敏性哮喘小鼠模型最常用的是雌性 BALB/c 品系小鼠，因为这些小鼠在致敏和激发时更容易产生 Th2 免疫反应。其他用于建立过敏性哮喘的小鼠还有 C57BL/6 和 A/J 品系<sup>[26]</sup>。除了猫和马之外，动物不会自发出现哮喘的症状<sup>[27]</sup>。由于啮齿类动物的妊娠期短，产量大，是进行实验的理想选择<sup>[23]</sup>。豚鼠是最早用于研究过敏性呼吸道疾病的物种之一<sup>[28]</sup>。然而，豚鼠的个体差异较大，同一批豚鼠同一致敏剂量会出现不同的致敏，甚至死亡共存的现象<sup>[29,30]</sup>。除此之外，通常诱导的过敏性哮喘豚鼠模型是由 IgG 介导的 I 型超敏反应，并且缺乏近交系和物种特异性试剂较少限制了豚鼠在哮喘研究中的应用<sup>[31]</sup>。猴子、羊、兔子、狗和大鼠也被用于过敏性气道疾病的模型，但这些动物各有利弊。使用小鼠作为实验对象进行造模有许多优点，例如：可选择品系多、造模成本低、方式成熟、免疫系统与人类接近并且易对花粉致敏产生明显的 I 型超敏反应和气道高反应性<sup>[32,33]</sup>。性别差异亦可以影响过敏性哮喘发生。雌性激素可引发肺部炎症和过敏反应，而雄性激素则起到相反的作用<sup>[34]</sup>。Shigeki<sup>[35]</sup>等人研究发现内源性雌激素可能调节变应原暴露小鼠气道平滑肌神经激肽 1 依赖性的前功能激活。故本研究使用雌性 BALB/c 小鼠为实验对象进行建模。

ILC2s 产生的 IL-10 与过敏有关，并对慢性过敏有抑制作用<sup>[36]</sup>。当吸入变应原接触气道上皮之后，诱导 Th2 细胞活化，产生 Th2 型炎症因子，导致 Eos 在气道内堆积，粘液过度分泌<sup>[37]</sup>。本研究中检测小鼠 BALF 中的细胞因子，发现模型组的 IL-4、IL-5、IL-9、IL-13 水平明显较对照组高，但是 IL-10 的水平无明显变化。IL-4 可以上调在幼稚辅助 T 细胞中的 Th2 转录因子 GATA-3，对 Th0 向 Th2 分化和 IL-5、IL-9、IL-13、CCL17 和 Eos 趋化因子的合成具有重要作用<sup>[38]</sup>。IL-5 负责骨髓中 Eos 的成熟和释放，参与 Eos 的分化、增殖、生存、激活、粘附、外渗和脱颗粒，并且促进 B 细胞合成 IgE，促进嗜碱性粒细胞分化和组胺释放。IL-13 与 IL-4 有一些共同的功能，IL-13 诱导产生 IgE 的 B 细胞，并促进内皮细胞增殖和粘液分泌<sup>[39]</sup>。IL-9 能增强 Th2 细胞因子的产生，活化气道中的 Eos、嗜碱性粒细胞和肥大

细胞，促进粘液分泌。另外，IL-9可抑制IFN- $\gamma$ 的产生，并协同促进IL-4诱导的IgE分泌<sup>[40]</sup>。

小鼠过敏性哮喘模型形成的肺部炎症与人类哮喘的病理特点略有不同<sup>[41,42]</sup>。长期接触变应原会导致支气管的结构改变，如粘液过度分泌、细胞外基质沉积、气道平滑肌增生和促纤维化生长因子的产生<sup>[43]</sup>。但是，小鼠造模后晚期为非生理性支气管狭窄<sup>[42]</sup>。虽然小鼠的气管外没有粘膜下腺体，但在变应原致敏和激发的动物中可发现粘液高度分泌和杯状细胞增生<sup>[44]</sup>，这与本研究的结果一致。过敏性哮喘的主要生理特征是可逆性气道阻塞，伴有对胆碱能激动剂反应。在人体，这通常表现为吸入胆碱能激动剂或其他物质后，第1秒用力呼气量（Forced Expiratory Volume in the first second, FEV1）和用力呼气容积（Forced expiratory volume, FVC）下降。通常小鼠肺功能检测吸入或静脉注射胆碱能激动剂后气道阻力和肺顺应性的剂量递增的反应<sup>[23]</sup>。

研究人类疾病的潜在机制，以及药物及治疗方法的初步试验，在很大程度上依赖于动物模型。理想的动物模型应准确反映人类该疾病的典型症状和病理生理特征，还应具有良好的可重复性及操作性<sup>[45]</sup>。目前不存在任何一种动物模型可完全复制人类过敏性哮喘的病理过程，但是这些动物模型可以帮助我们了解过敏性哮喘的发生机制以及新型治疗方法。相信未来会探索出一种更接近人类哮喘的实验动物模型，为基础及临床工作提供指导意义。综上所述，本研究建立蒿属花粉过敏性哮喘小鼠模型，为哮喘发病机制及免疫治疗的研究打下基础。

## 第二部分：不同剂量铝盐佐剂对建模的影响

### 1. 前言

“佐剂”一词来自拉丁语“adjuvare”，意思是帮助或援助<sup>[23]</sup>。根据美国国家癌症研究所的定义，佐剂是一种可以刺激免疫系统并增强对疫苗反应的药剂，其本身没有任何特定的抗原效应<sup>[46]</sup>。佐剂可用于控制或调节抗原持久性/递送，也可作为具有免疫刺激的储存库或递送系统，或仅用于靶向支持或甚至限制抗体应答的Th型应答（免疫增强）<sup>[6]</sup>。佐剂分为具有免疫原性和不具有免疫原性；前者包括革兰阴性杆菌的内毒素、百日咳杆菌等，后者包括氢氧化铝等<sup>[47]</sup>。一开始铝盐溶液被添加到生长培养基中，以帮助通过沉淀纯化破伤风和白喉疫苗抗原，但研究人员发现注射用明矾（硫酸铝钾）沉淀的白喉类毒素比豚鼠中的可溶性类毒素诱导更强的抗体反应。1926年Glenny<sup>[48]</sup>等人首次描述含铝佐剂的免疫刺激作用，提出在注射部位延长抗原的免疫暴露时间，来激发持续的高抗体滴度的概念<sup>[49]</sup>。

在疫苗中常用的铝盐佐剂的形式包括氢氧化铝 $[\text{Al}(\text{OH})_3]$ ，磷酸铝 $(\text{AlPO}_4)$ 或硫酸铝钾（明矾） $[\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}]$ <sup>[50]</sup>。这些佐剂在文献中经常被统称为“明矾（Alum）”。然而，将所有的铝盐佐剂统称为“明矾”具有误导性，因为氢氧化铝和磷酸铝具有不同的物理特性和性质<sup>[50]</sup>。氢氧化铝比磷酸铝具有更强的佐剂作用，这可能是由于氢氧化铝的吸附能力更强，在中性pH值下对某些抗原的吸附效果更好<sup>[50]</sup>。因此，目前最常用的铝盐佐剂是氢氧化铝<sup>[23]</sup>。氢氧化铝是一种在生理pH[等电点（Isoelectric point, pI）=11]下带正电荷的疫苗载体，能强烈吸收带负电荷的抗原<sup>[51]</sup>。疫苗中第二常用的铝盐佐剂是磷酸铝，是一种无定形羟基磷酸铝，在生理pH（pI=5~7）条件下带负电荷。在明矾沉淀疫苗中，明矾是一种氢氧化铝，含有一些硫酸根阴离子以及缓冲液中使用的阴离子，在适合的pH条件下能产生 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 胶体吸附抗原，从而产生佐剂效应<sup>[52]</sup>。

诱导Th2型炎症偏向的免疫应答能力是铝盐佐剂在诱导小鼠过敏性疾病模型的基础<sup>[53]</sup>。小鼠产生Th2型炎症反应和疾病的能力似乎并不取决于过敏原的类型，使用佐剂会增强Th2型炎症启动，并增加过敏性哮喘的严重程度<sup>[15]</sup>。因此，在既往的研究中建立过敏性哮喘小鼠模型时多添加铝盐佐剂。然而，铝盐佐剂存在缺点，包括在注射部位形成局部的肉芽肿和对明矾的敏感性增加<sup>[54,55]</sup>。既往的文献中指出吸附在铝盐佐剂上的抗原的免疫原性取决于许多因素，其中最重要的是佐剂的用量和抗原在佐剂上的吸附程度<sup>[50]</sup>。

在第一部分的研究中，我们已经成功建立蒿属花粉过敏性哮喘的小鼠模型。在本节，我们优化铝盐佐剂的使用，探索不同剂量的明矾佐剂是否对小鼠过敏性

哮喘模型的建立产生影响。

## 2. 材料与方法

### 2.1 实验动物

6-8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠 12 只饲养在无病原体设施中，体重约为 18-20g。于北京协和医院动物房饲养一周以适应环境。北京协和医院动物实验伦理委员会审批通过了所有实验程序（伦理批号：XHDW-2022-099）

### 2.2 制备大籽蒿粗提液

制备方法同第一部分中 2.5 制备大籽蒿粗提液。

### 2.3 动物分组及建模步骤

(1) 分组：随机将雌性 BALB/c 小鼠分为对照组、不添加佐剂建模组、低剂量佐剂建模组、中剂量佐剂建模组、高剂量佐剂建模组和超高剂量佐剂建模组，每组 6 只小鼠。

(2) 腹腔注射致敏：每间隔 7 天对小鼠左下腹位置进行 1 次致敏，连续致敏 4 周。具体操作方式同第一部分中 2.6 动物模型建立与分组。

(3) 滴鼻激发：在第 25 天，使用异氟烷对小鼠吸入麻醉后进行滴鼻激发，连续 5 天。

(4) 模型组小鼠每次致敏均使用 100  $\mu$ g ASE，低剂量佐剂建模组、中剂量佐剂建模组、高剂量佐剂建模组、超高剂量佐剂建模组小鼠分别使用 2mg/次、4mg/次、6mg/次和 8mg/次氢氧化铝佐剂（表 3）。致敏滴鼻激发使用 50  $\mu$ g/次的 ASE。

(5) 于第 30 天取样。

表 3 实验设计概览

组别	致敏	滴鼻激发
对照组	PBS	PBS
不添加佐剂建模组	0mg Al (OH) <sub>3</sub> +100 $\mu$ g ASE	50 $\mu$ g ASE
低剂量佐剂建模组	2mg Al (OH) <sub>3</sub> +100 $\mu$ g ASE	50 $\mu$ g ASE
中剂量佐剂建模组	4mg Al (OH) <sub>3</sub> +100 $\mu$ g ASE	50 $\mu$ g ASE

高剂量佐剂建模组	6mg Al (OH) <sub>3</sub> +100μ.g ASE	50μ.g ASE
超高剂量佐剂建模组	8mg Al (OH) <sub>3</sub> +100μ.g ASE	50μ.g ASE

注：PBS 为磷酸盐缓冲溶液，ASE 为大籽蒿花粉粗提液

## 2.4 样品的处理与存放

样品处理与存放方式同第一部分中 2.7 中样品处理与存放。

## 2.5 观察的指标与检测方法

### 2.5.1 T-IgE 与 sIgE 检测

具体检测方法同第一部分中 2.8.1 血清总免疫球蛋白和特异性免疫球蛋白 E 检测的实验步骤。

### 2.5.2 嗜酸性粒细胞及中性粒细胞检测

具体检测方法第一部分中 2.8.2 嗜酸性粒细胞和中性粒细胞检测的实验步骤。

### 2.5.3 细胞因子检测

具体检测方法同第一部分中 2.8.3 细胞因子检测的实验步骤。

### 2.5.4 肺组织病理评估分析

油镜下对小鼠肺脏进行观察。对支气管的外周炎症程度进行评估参考表 2。

## 2.6 统计学分析

采用 GraphPad Prims10.02 (美国) 和 SPSS 26.0 统计学软件 (IBM, 美国) 对数据进行分析。数据用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) / 中位数 ± 四分位数进行描述, 使用 t 检验评价组间差异。当数据不符合正态分布时候, 采用 Mann-Whitney U 检验进行分析。P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 小鼠存活情况

在实验结束时高剂量佐剂（6mg/次致敏）建模组小鼠仅1只为存活，超高剂量（8mg/次致敏）建模组小鼠均无存活（图8）。因此在下列的结果和讨论部分均使用对照组、不添加佐剂建模组、低剂量佐剂添加建模组和中剂量佐剂添加建模组。

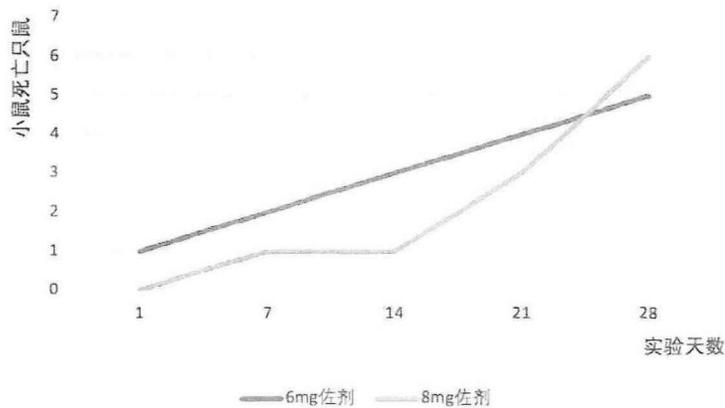


图8 小鼠存活情况

#### 3.2 血清中免疫球蛋白分析

对比各组小鼠血清 sIgE 和 T-IgE，发现两个添加佐剂建模组小鼠血清 sIgE 和 T-IgE 均明显高于对照组和不添加佐剂建模组小鼠 ( $P < 0.05$ )（图9）。中剂量佐剂建模组小鼠的血清 sIgE 明显高于低剂量佐剂组小鼠 ( $P < 0.05$ )。两个添加佐剂建模组小鼠血清 T-IgE 水平无差异 ( $P > 0.05$ )。

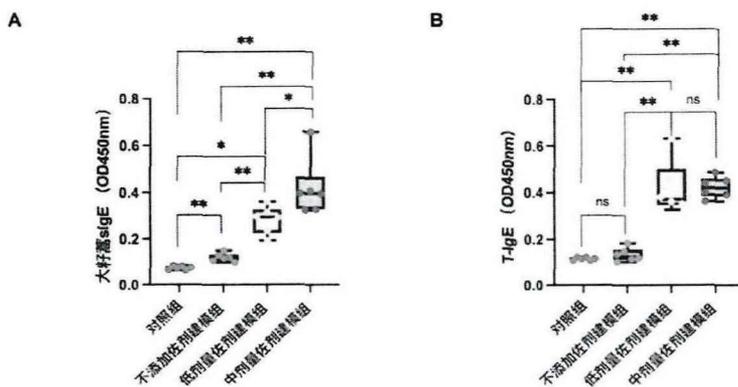


图 9 四组小鼠血清大籽蒿 sIgE和T-IgE 比较

A: 血清大籽蒿 sIgE, B: 血清大籽蒿 T-IgE

绝对值表示为平均值 ± 四分位数 (n=6) ns P>0.05, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 和\*\*\*P < 0.001

### 3.3 气道炎症评估

分析各组小鼠 BALF 中的炎症细胞, 发现三组建模组小鼠的 BALF 中白细胞总数、Eos 和 NEUT 均高于对照组 (P<0.05)。不添加佐剂建模组的小鼠 BALF 中 WBC 和 Eos 明显高于低剂量佐剂建模组 (P<0.05)。两个添加佐剂建模组小鼠 BALF 中的白细胞、Eos 和 NEUT 数量比较均无差异 (P>0.05) (图 10)。

分析各组小鼠 BALF 中的细胞因子, 发现两个添加佐剂组建模的小鼠 BALF 中 IL-4、IL-9、IL-10 和 IL-13 的水平均比不添加佐剂建模组高 (P<0.05)。然而, 两个佐剂组之间比较则均不存在差异 (P>0.05)。低剂量佐剂建模组小鼠 BALF 中 IL-5 的水平明显高于不添加佐剂建模组 (P<0.05) (图 11)。

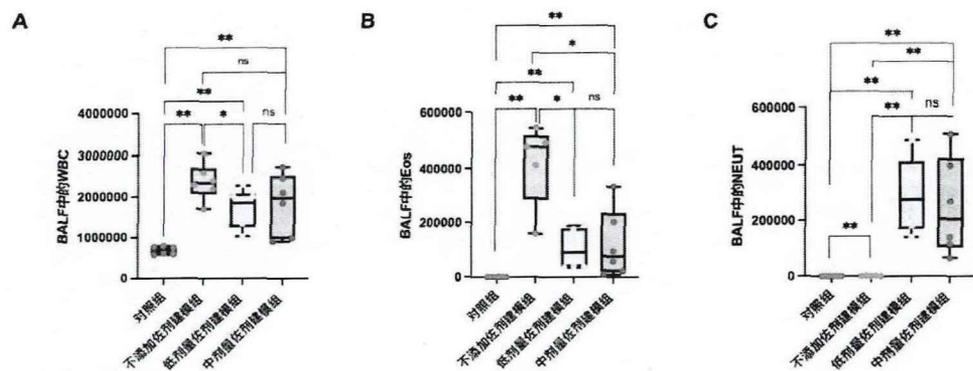


图10 四组小鼠BALF中细胞总数比较

A: BALF中细胞总数, B: BALF中Eos, C: BALF中NEUT

绝对值表示为平均值 ± 四分位数 (不添加佐剂建模n=5, 其余组n=6) ns P>0.05, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01和\*\*\*P < 0.001

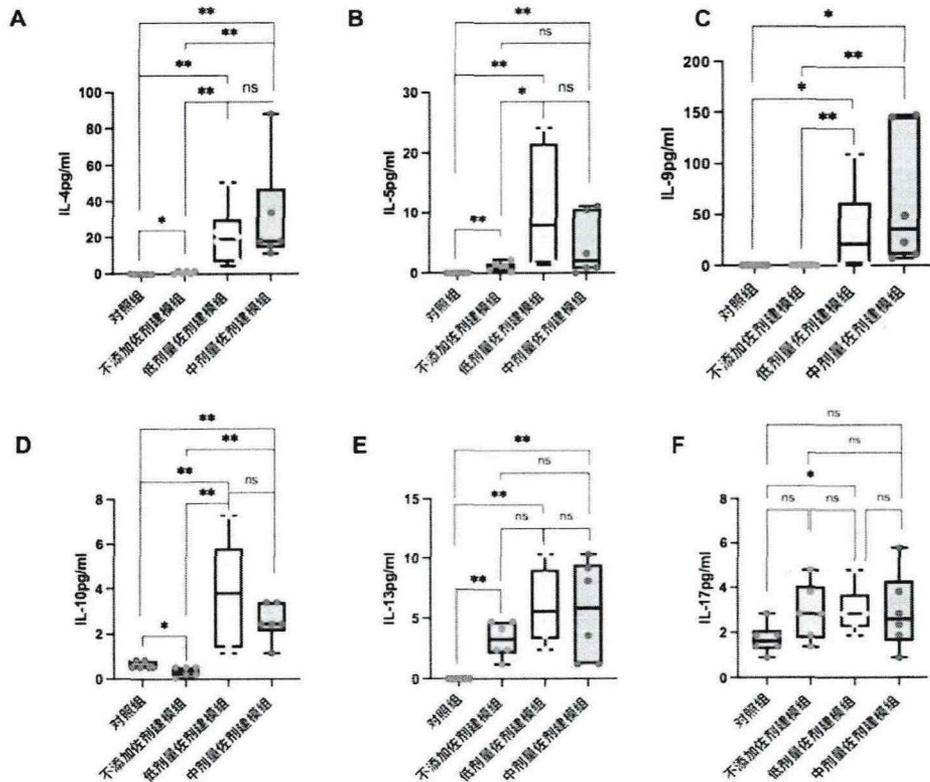


图11 四组小鼠BALF中细胞因子比较

A: BALF中IL-4, B: BALF中IL-5, C: BALF中IL-9, D: BALF中IL-10, E: BALF中IL-13, F: BALF中IL-17

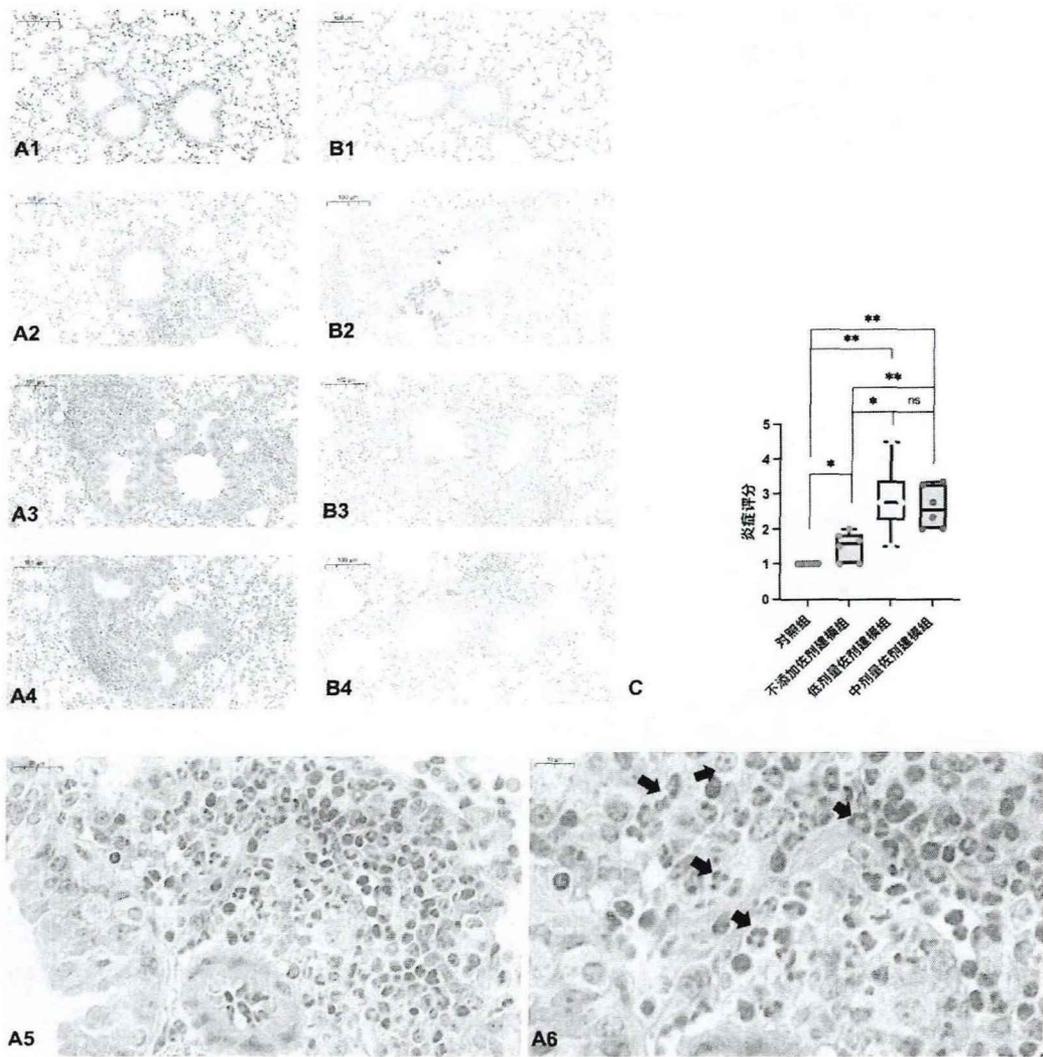
绝对值表示为平均值 ± 四分位数 (n=6) , ns P>0.05, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01和\*\*\*P < 0.001

### 3.4 组织学分析

观察三组模型组小鼠的肺部病理组织发现模型组小鼠的气道变窄, 肺部结构破坏并且血管和气管周围有大量炎症细胞浸润 (图 12 A2 ~ A4); PAS染色发现建模组小鼠支气管的杯状细胞增生, 支气管粘液物质明显增多 (图 12 B2 ~ B4)。使用佐剂建模的两组小鼠肺组织中浸润的细胞多位于大气道附近。然而, 不加佐剂建模组的小鼠肺组织中的炎症细胞多浸润于血管周围 (图 12 A2), 并且支气管周围的 Eos 较少, 炎症

评分较两组添加佐剂建模组低。不加佐剂建模组的小鼠肺组织 PAS 染色发现，支气管中的粘液物质较两个不加佐剂建模组多（图 12 B2~4）。

比较各组小鼠肺组织病理评分，发现三个模型组的肺组织病理评分均高于对照组（ $P < 0.05$ ）。两组添加佐剂建模组小鼠的肺组织病理评分均高于不添加佐剂组（ $P < 0.05$ ），但两个添加佐剂建模组的小鼠肺组织评分无差异（图 12C）。



**图12** 四组小鼠肺组织炎症比较

A1~A6 为 HE 染色，A1~A4 (10×) A1: 对照组，A2: 不加佐剂建模组，A3: 低剂量佐剂建模组，A4: 中剂量佐剂建模组，A5: 低剂量建模组 (63×)，A6: 低剂量建模组 (100×)，图中箭头所指代表 Eos

B1~B4 为 PAS 染色 (10×)，B1: 对照组，B2: 不加佐剂建模组，B3: 低剂量佐剂建模组，B4: 中剂量佐剂建模组；C: 小鼠肺组织病理评分比较

绝对值表示为平均值 ± 四分位数 (n=6) \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  和 \*\*\* $P < 0.001$

## 4 讨论

本研究探索不同剂量的铝盐佐剂是否对小鼠过敏性哮喘模型的建立产生影响。结果提示，在使用过高剂量的铝盐佐剂建模过程中小鼠死亡。添加佐剂建模组小鼠的血清 sIgE、T-IgE、BALF 中 Ne、IL-4、IL-5、IL-9、IL-10 和 IL-13 水平比不添加佐剂组明显高，但是 BALF 中的 WBC 和 Eos 总数较不添加佐剂组低。分析小鼠肺组织发现添加佐剂建模组小鼠的肺部炎症较未添加佐剂重。低剂量佐剂建模组和中剂量佐剂建模组比较，仅中剂量佐剂建模组血清 sIgE 水平较高，其他检测指标均不存在统计学差异。

使用铝盐佐剂建立的小鼠哮喘模型的肺组织中的炎症细胞较大且弥漫，并且位于大气道周围，主要包含 Eos、巨噬细胞、淋巴细胞、浆细胞、多核巨细胞和 NEUT，会导致以 Eos 为弥漫性、中心性病变为特征的 Eos 细胞炎症<sup>[56]</sup>。相反，未用铝盐佐剂建模的小鼠肺组织中炎症细胞浸润主要发生在较小气道周围，以淋巴细胞和巨噬细胞浸润较多，Eos、NEUT、多核巨细胞较少<sup>[57]</sup>。这与本研究的结果一致，然而造成这种差异的机制目前尚不清楚<sup>[58]</sup>。

关于铝盐佐剂的作用，既往有文献做出讨论。铝盐佐剂选择性地刺激小鼠的 Th2 型免疫反应和人体的混合反应 (Th1 和 Th2 免疫反应)<sup>[53]</sup>。注射明矾使固有免疫细胞定位和募集，从而产生一个小型的促炎环境；赋予各种多形核细胞快速浸润，包括但不限于接种部位的 Eos，NEUT<sup>[59]</sup>。长期以来，铝盐佐剂的储存效应一直被描述为其主要功能模式，使抗原从注射部位的微粒表面缓慢释放，抗原呈递细胞 (Antigen-presenting cell, APC) 可以持续摄取和处理抗原来延长免疫系统的呈递和刺激<sup>[60,61]</sup>，并且可以增强 IgE 抗体应答<sup>[61]</sup>。Conrad<sup>[62]</sup>等人比较使用氢氧化铝佐剂和不使用佐剂的小鼠过敏性气道炎症模型表型，发现诱导急性过敏性气道炎症不需要佐剂，并且行为学研究表明使用佐剂的小鼠有严重的痛苦表现。

Eos 增多伴随相对较低水平的 IgE，类似人类的非特异性迟发性哮喘内型<sup>[63]</sup>。Hyun<sup>[64]</sup>等人比较明矾佐剂-OVA 致敏和不加明矾佐剂-OVA 致敏建模小鼠，发现添加明矾佐剂组小鼠的 BALF 中的 Eos 细胞含量较高。但是，本研究发现未加佐剂建模组小鼠的 Eos 较两组加佐剂组建模小鼠明显偏高。造成这种差异的原因尚不清楚。有趣的是我们发现未加佐剂建模组小鼠的 IgE 的水平明显低于加佐剂组建模小鼠，结果类似先前的未用佐剂建模的动物实验研究<sup>[65]</sup>。这种类型的小鼠哮喘模型可能与强烈的 Eos 增多和皮质醇耐药性增强有关，在未来的研究中这种模型对进行皮质类固醇抵抗测试将很有意义<sup>[63]</sup>。

就铝盐佐剂的剂量而言，可能需要小剂量佐剂才能使抗原完全吸附<sup>[66]</sup>。随着铝盐佐剂量的增加，佐剂效应增加到一定浓度，之后佐剂效应随着铝佐剂浓度的

进一步增加而下降<sup>[50]</sup>。过量的铝盐佐剂可能会使矿物化合物完全覆盖抗原，从而抑制免疫力，或者铝化合物可能会对巨噬细胞产生细胞毒性<sup>[50]</sup>。铝代谢在动物实验中显示铝佐剂被组织间液中的柠檬酸溶解，并迅速排出体外，而过量铝引起的许多炎症被认为是活化的典型表现<sup>[67]</sup>。铝是环境中丰富的金属，我们每天都会在食物和水中摄入<sup>[68]</sup>。在美国，人类疫苗中允许使用的铝佐剂最大含量为 0.85 mg 铝/剂量，而获得许可的疫苗中铝含量为 0.125 至 0.85 mg 铝/剂量<sup>[52]</sup>。迄今为止，尚无科学证据表明含铝疫苗与急性或者慢性神经功能障碍或疾病之间存在因果关系<sup>[69]</sup>。大鼠的氢氧化铝的 LD50 是 1100mg/kg（腹腔注射）/ >5000 mg/kg(口服)（数据来源：[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)）。但是，目前关于小鼠的氢氧化铝的毒理学资料暂缺。在不同的研究中，建立过敏性疾病小鼠模型使用不同剂量的铝盐佐剂，单次致敏最多使用剂量达 50mg（表 4）。然而，在本研究中使用 6mg/次和 8mg/次铝盐佐剂致敏的小鼠在实验结束时出现死亡的情况。

铝盐佐剂的使用受到毒性和副作用等问题的阻碍，限制了其免疫中的广泛应用<sup>[5]</sup>。人们一直怀疑环境铝是多种慢性神经疾病的共同因素。并且，已经出现了一种观点：铝佐剂可能在某些易感个体中长期存在不安全性<sup>[70]</sup>。既往在小鼠模型中研究了铝佐剂对神经系统的潜在影响，发现铝佐剂诱导运动缺失和认知改变<sup>[71]</sup>。明矾颗粒与其他难降解颗粒一样，可能不会完全局限于小鼠的注射组织中，但可以在吞噬细胞内传播到区域淋巴结，然后传播到更远的部位和大脑<sup>[72]</sup>。然而，迄今为止，铝盐佐剂的直接毒性作用与疫苗之间尚未建立联系<sup>[73]</sup>。大鼠肌肉注射部位坏死，肌肉纤维受损。影像学检查结果与人类巨噬性肌筋膜炎相似，注射部位以外的肌肉组织检查正常<sup>[74]</sup>。铝的间接毒性作用可以被解释为人类巨噬性肌筋膜炎，这种疾病可能由自身炎症/自身免疫机制介导<sup>[73]</sup>。这一假设在最近一项大型的药物流行病学研究中被驳斥，疫苗中的铝盐佐剂与自身炎症/自身免疫无关<sup>[73]</sup>。

综上所述，在建立动物模型时使用铝盐佐剂是安全有效的<sup>[75]</sup>。本研究，联合铝盐佐剂成功地建立蒿属花粉过敏性哮喘小鼠模型。目前小鼠的氢氧化铝半致死量尚不清楚。本研究中，使用高剂量的铝盐佐剂（累积 24mg 氢氧化铝）建模时出现小鼠死亡的情况。因此，在使用最低剂量铝盐佐剂可以成功的前提下，我们推荐使用低剂量的铝盐佐剂确保实验过程中小鼠的安全。

表 4 部分使用铝盐佐剂建模文章概览

序号	文章标题	建模类型	致敏方式/变应原	铝盐佐剂的类型	单次最高使用佐剂剂量	实验期间佐剂累
1	铝盐佐剂在建立变应性鼻炎动物模型中的安全性研究 <sup>[76]</sup>	过敏性鼻炎	腹腔注射 /OVA	Al (OH) <sub>3</sub>	5mg	37mg
2	生后早期变应原暴露对哮喘小鼠气道炎症及气道高反应性的影响 <sup>[77]</sup>	过敏性哮喘	腹腔注射 /OVA	Al (OH) <sub>3</sub>	10mg	100mg
3	Establishing the phenotype in novel acute and chronic murine models of allergic asthma <sup>[78]</sup>	过敏性哮喘	腹腔注射 /OVA	Al (OH) <sub>3</sub>	50mg	100mg
4	Pharmacologic inhibition of S-nitrosoglutathione reductase protects against experimental asthma in BALB/c mice through attenuation of both bronchoconstriction and inflammation <sup>[79]</sup>	过敏性哮喘	腹腔注射 /OVA	KAl (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·12H <sub>2</sub> O	20mg	20mg
5	Murine model of allergen induced asthma <sup>[80]</sup>	过敏性哮喘	腹腔注射 /OVA	Al (OH) <sub>3</sub>	2mg	4mg
6	尘螨诱导特应性皮炎小鼠模型和哮喘小鼠模型的构建 <sup>[81]</sup>	过敏性哮喘	腹腔注射 /HDM	铝佐剂 (未具体阐明何种类型)	50mg	50mg
7	Establishment and characterization of murine models of asthma and subcutaneous immunotherapy for Humulus pollen allergy <sup>[82]</sup>	过敏性哮喘	皮下注射 / 葎草花粉	Al (OH) <sub>3</sub>	8mg	24mg

注: OVA 为卵圆清蛋白, HDM 为屋尘螨

### 第三部分：探索不同剂量铝盐佐剂对变应原免疫治疗的影响

#### 1. 前言

铝盐佐剂广泛用于过敏性疾病免疫治疗的制剂和预防传染病的疫苗中。20 世纪 20 年代以来一直使用铝盐佐剂，是目前使用时间最长的佐剂，同时也是被许可的疫苗产品中使用最多的佐剂<sup>[83]</sup>。铝盐佐剂经典的作用机制是通过“仓库效应 (Warehouse effects)”来发挥作用，即使抗原保留以及从注射部位或者局部引流的淋巴结缓慢释放。铝盐作为佐剂的作用机制要复杂得多，有研究发现切除注射部位不影响动物模型的免疫反应强度，这说明佐剂的“仓库效应”机制存在一定的缺陷<sup>[84]</sup>。然而，AIT 注射部位的控制和持续释放被认为有助于耐受，因此“仓库效应”仍然是 AIT 中的重要作用机制。除了“仓库效应”外，关于铝盐佐剂的作用机制，包括募集抗原呈递细胞的炎症反应、NALP3 炎症小体激活、细胞死亡释放 DNA 引起危险相关分子模式识别，以及抗原呈递细胞增强吞噬作用<sup>[85]</sup>。

在过去几十年间，过敏性哮喘和鼻炎等过敏性疾病的患病率大幅上涨。AIT 是目前唯一能改变过敏性疾病进程，避免过敏性鼻炎发展成哮喘的治疗方式，其包括皮下注射脱敏治疗 (Specific subcutaneous allergen immunotherapy, SCIT) 和舌下脱敏治疗 (Sublingual allergen immunotherapy, SLIT) 两种方式。AIT 能针对潜在的 Th2 细胞驱动的疾病过程<sup>[86]</sup>。铝盐佐剂可以使免疫反应偏向已知下调过敏性 Th2 型炎症的 T 辅助细胞 (Th1)，因此铝盐佐剂在 AIT 中的使用会有明显的好处<sup>[2]</sup>。铝盐佐剂沉淀物与抗原之间相互作用的主要作用力 (机制) 是由铝盐佐剂表面上的羟基与抗原表面上可用的磷酸基的置换驱动的，此外还有非特异性范德华力和静电相互作用力的总和<sup>[87]</sup>。这些相互作用的动态特征会随着时间的推移而改变，从而影响疫苗的稳定性和效力<sup>[88]</sup>。目前，尘螨 SCIT 制剂中含佐剂，但是蒿花粉的脱敏治疗 SCIT 不包含佐剂<sup>[21]</sup>。

在本节中，在前文中建立的蒿属花粉过敏性小鼠哮喘模型的基础上，建立蒿属花粉过敏性小鼠 SCIT 治疗模型，并分析不同铝盐佐剂剂量对治疗的影响。

#### 2. 材料与amp;方法

##### 2.1 实验动物

6-8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠 12 只饲养在无病原体设施中，体重约为 18-20g。于北京协和医院动物房饲养一周以适应环境。北京协和医院动物实验伦理委员会审批通过了所有实验程序 (伦理批号: XHDW-2022-099)。

## 2.2 制备大籽蒿粗提液

具体制备步骤同第一部分中 2.5 制备大籽蒿粗提液。

## 2.3 动物分组、建模步骤及 SCIT 步骤

(1) 分组：随机将雌性 BALB/c 小鼠分为 6 组，分别为对照组、未治疗组、不添加佐剂治疗组、低剂量佐剂治疗组、中剂量佐剂治疗组和高剂量佐剂治疗组，每组 6 只小鼠；

(2) 腹腔注射致敏：每间隔 7 天对小鼠左下腹位置进行 1 次致敏，连续致敏 4 周。具体操作方式同第一部分中 2.6 动物模型建立与分组；

(3) 滴鼻激发：在第 25 天，使用异氟烷对小鼠吸入麻醉后进行滴鼻激发，连续 5 天；

(4) SCIT：左手拇指和食指轻柔地捏起小鼠背部的皮肤，右手拿注射器，以  $30^{\circ} \sim 45^{\circ}$  角斜刺入针头。轻摆动注射器，若可容易摆动针头，表示正确刺进小鼠皮下。如果回抽后无血液，缓慢将药物推入。完毕后，轻旋针头拔出注射器，以防漏液。整个过程小心操作，以免伤害小鼠；

(5) 在第 32 天开始 SCIT。在第 32 天、第 34 天、第 36 天、第 38 天、第 40 天、第 42 天、第 44 天和第 46 天进行颈后皮下免疫注射治疗（图 13）；

(6) 模型组小鼠每次致敏使用  $100 \mu\text{g ASE}$ （吸附在  $2\text{mg}$  的铝盐佐剂上），滴鼻激发使用  $50 \mu\text{g ASE}$ 。对照组小鼠致敏和滴鼻激发则使用同等剂量的 PBS。SCIT 具体的剂量如表 4 所示；

(8) 在第 50、51 天进行滴鼻激发，次日杀鼠取材。

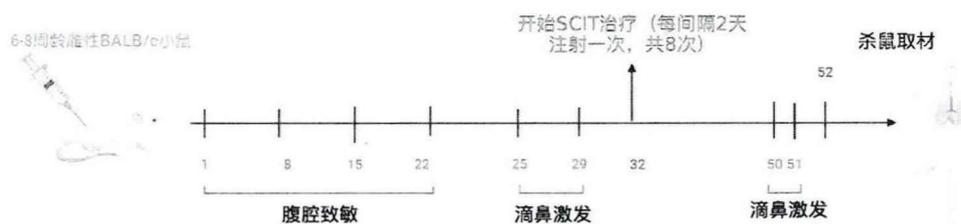


图13 SCIT治疗模式图

表 4 实验设计概览

组别	致敏	滴鼻激发	皮下注射免疫治疗	滴鼻激发
对照组	PBS	PBS	PBS	PBS
未治疗组	2mg Al (OH) <sub>3</sub> +100μg ASE	50μg	PBS	50μg ASE
不添加佐剂治疗组	2mg Al (OH) <sub>3</sub> +100μg ASE	50μg	300μg ASE+0mg Al (OH) <sub>3</sub>	50μg ASE
低剂量佐剂治疗组	2mg Al (OH) <sub>3</sub> +100μg ASE	50μg	300μg ASE+0.1mg Al (OH) <sub>3</sub>	50μg ASE
中剂量佐剂治疗组	2mg Al (OH) <sub>3</sub> +100μg ASE	50μg	300μg ASE+0.5mg Al (OH) <sub>3</sub>	50μg ASE
高剂量佐剂治疗组	2mg Al (OH) <sub>3</sub> +100μg ASE	50μg	300μg ASE+1mg Al (OH) <sub>3</sub>	50μg ASE

注：PBS 为磷酸盐缓冲溶液，ASE 为大籽蒿粗提液

## 2.4 样品的处理与存放

具体步骤同第一部分中 2.7 中样品处理与存放。

## 2.5 观察的指标与检测方法

### 2.5.1 T-IgE、sIgE、IgG1、IgG2a 和 IgG2b 检测

#### 2.5.1.1 T-IgE、sIgE 检测

具体检测方法同第一部分中 2.8.1 血清总免疫球蛋白和特异性免疫球蛋白 E 检测的实验步骤。

#### 2.5.1.2 IgG1 检测

使用 ELISA 的方法检测 IgG1。

具体实验步骤如下所示：

(1) 包板：使用大籽蒿粗提液作为包板液。将大籽蒿粗提液稀释至 10 μg/ml，每孔加入 100 μL 稀释液，使用封板膜封板后放置于 4℃ 冰箱中孵育过夜。

(1) 洗板：取出 96 孔板后，在室温下放置 30 分钟，甩板弃包板液，300 μl/孔 TBST 缓冲液洗板，5 分钟/次，洗 3 次。

(2) 封闭：甩板弃液，将 200 μl/孔的 1%BSA 溶液加入 96 孔板中，封板后在室温下放置 2 小时。

- (3) 洗板: 甩板弃液, 300  $\mu$ l/孔 TBST 缓冲液洗板, 5 分钟/次, 洗 3 次。
- (4) 孵育血清: 拍板, 使用 1%BSA 按照 1:10000 的比例稀释血清。100  $\mu$ l/孔加入 96 孔板中, 封板后在室温下孵育 1 小时。
- (5) 洗板: 甩板弃液, 300  $\mu$ l/孔 TBST 缓冲液洗板, 5 分钟/次, 洗 3 次。
- (6) 孵育抗体: 拍板, 使用 1% BSA 按照 1: 4000 比例稀释与辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase , HRP) 偶联的山羊抗鼠 IgE 抗体。100  $\mu$ l/孔加入 96 孔板中, 封板后在室温下孵育 1 小时。
- (7) 洗板: 甩板弃液, 300  $\mu$ l/孔 TBST 缓冲液洗板, 5 分钟/次, 洗 3 次。
- (8) 显色: 拍板, 每孔加入 100  $\mu$ l TMB 显色液, 避光 15 分钟。
- (9) 终止: 每孔加入 50  $\mu$ l 稀硫酸终止反应。
- (10) 在 15 分钟内使用多功能酶标仪 Synergy H1 检测 450 nm 波长处测定各孔吸光度 (OD 值)。

#### 2.5.1.3 IgG2a 检测

使用 ELISA 的方法检测 IgG2a。

具体实验步骤如下所示:

- (1) 包板: 使用大籽蒿粗提液作为包板液。将大籽蒿粗提液稀释至 10  $\mu$ g/ml, 每孔加入 100  $\mu$ L 稀释液, 使用封板膜封板后放置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中孵育过夜。
- (2) 洗板: 取出 96 孔板后, 在室温下放置 30 分钟, 甩板弃包板液, 300  $\mu$ l/孔 TBST 缓冲液洗板, 5 分钟/次, 洗 3 次。
- (3) 封闭: 甩板弃液, 将 200  $\mu$ l/孔的 1% BSA 溶液加入 96 孔板中, 封板后在室温下放置 2 小时。
- (4) 洗板: 甩板弃液, 300  $\mu$ l/孔 TBST 缓冲液洗板, 5 分钟/次, 洗 3 次。
- (5) 孵育血清: 拍板, 使用 1% BSA 按照 1:10 的比例稀释血清。100  $\mu$ l/孔加入 96 孔板中, 封板后在室温下孵育 1 小时。
- (6) 洗板: 甩板弃液, 300  $\mu$ l/孔 TBST 缓冲液洗板, 5 分钟/次, 洗 3 次。
- (7) 孵育抗体: 拍板, 使用 1%BSA 按照 1:4000 比例稀释与 HRP 偶联的山羊抗小鼠 IgG2a 抗体。100  $\mu$ l/孔加入 96 孔板中, 封板后在室温下孵育 1 小时。
- (8) 洗板: 甩板弃液, 300  $\mu$ l/孔 TBST 缓冲液洗板, 5 分钟/次, 洗 3 次。
- (9) 显色: 拍板, 每孔加入 100  $\mu$ l TMB 显色液, 避光 15 分钟。
- (10) 终止: 每孔加入 50  $\mu$ l 稀硫酸终止反应。
- (11) 在 15 分钟内使用多功能酶标仪 Synergy H1 检测 450 nm 波长处测定各孔吸光度 (OD 值)。

#### 2.5.1.4 IgG2b 检测

使用 ELISA 的方法检测 IgG2a。

具体实验步骤如下所示：

- (1) 包板：使用大籽蒿粗提液作为包板液。将大籽蒿粗提液稀释至  $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ，每孔加入  $100\ \mu\text{L}$  稀释液，使用封板膜封板后放置于  $4^\circ\text{C}$  冰箱中孵育过夜。
- (2) 洗板：取出 96 孔板后，在室温下放置 30 分钟，甩板弃包板液， $300\ \mu\text{l}/\text{孔}$  TBST 缓冲液洗板，5 分钟/次，洗 3 次。
- (3) 封闭：甩板弃液，将  $200\ \mu\text{l}/\text{孔}$  的 1%BSA 溶液加入 96 孔板中，封板后在室温下放置 2 小时。
- (4) 洗板：甩板弃液， $300\ \mu\text{l}/\text{孔}$  TBST 缓冲液洗板，5 分钟/次，洗 3 次。
- (5) 孵育血清：拍板，使用 1% BSA 按照 1:4000 的比例稀释血清。 $100\ \mu\text{l}/\text{孔}$  加入 96 孔板中，封板后在室温下孵育 1 小时。
- (6) 洗板：甩板弃液， $300\ \mu\text{l}/\text{孔}$  TBST 缓冲液洗板，5 分钟/次，洗 3 次。
- (7) 孵育抗体：拍板，使用 1%BSA 按照 1:4000 比例稀释与 HRP 偶联的山羊抗小鼠 IgG2b 抗体。 $100\ \mu\text{l}/\text{孔}$  加入 96 孔板中，封板后在室温下孵育 1 小时。
- (8) 洗板：甩板弃液， $300\ \mu\text{l}/\text{孔}$  TBST 缓冲液洗板，5 分钟/次，洗 3 次。
- (9) 显色：拍板，每孔加入  $100\ \mu\text{l}$  TMB 显色液，避光 15 分钟。
- (10) 终止：每孔加入  $50\ \mu\text{l}$  稀硫酸终止反应。
- (11) 在 15 分钟内使用多功能酶标仪 Synergy H1 检测  $450\ \text{nm}$  波长处测定各孔吸光度 (OD 值)。

## 2.5.2 嗜酸性粒细胞及中性粒细胞检测

具体检测方法第一部分中 2.8.2 嗜酸性粒细胞和中性粒细胞检测的实验步骤。

## 2.5.3 细胞因子检测

取 BALF 的上清液，使用 Luminex 多因子检测试剂盒 2 来进行细胞因子检测，分析上清液中 IL-4、IL-5、IL-10、IL-12、IL-13、IL-17 的含量，使用 IL-9 检测试剂盒检测 BALF 中 IL-9。实验方法根据测定试剂盒中的步骤。使用 Bioplex 200 悬液芯片系统进行检测。

## 2.5.4 肺组织病理评估分析

油镜下对小鼠肺脏进行观察。对支气管的外周炎症程度进行评估参考表 2。

## 2.6 统计学分析

采用GraphPad Prims10.02 (美国) 和SPSS 26.0统计学软件 (IBM, 美国) 对数据进行分析。数据用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) /中位数  $\pm$  四分位数进行描述, 使用t检验评价组间差异。当数据不符合正态分布时候, 采用 Mann-Whitney U 检验进行分析。P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 血清中免疫球蛋白分析

#### 3.1.1 血清中免疫球蛋白 E 分析

分析各组小鼠血清中 sIgE 的水平, 发现四组治疗组小鼠的血清大籽蒿 sIgE 的水平明显比未治疗组低 (P < 0.05)。比较三个添加佐剂治疗组小鼠的 sIgE 则无差异 (P > 0.05)。高剂量佐剂治疗组小鼠血清 T-IgE 水平明显低于其他治疗组 (P < 0.05) (图 14)。

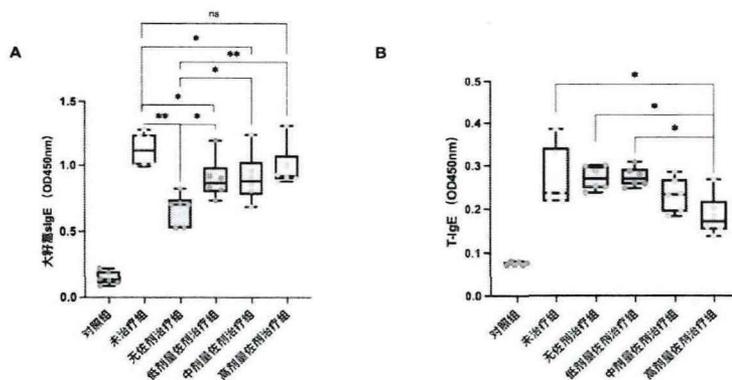


图14 六组小鼠血清大籽蒿 sIgE和T-IgE 比较

A: 血清大籽蒿 sIgE, B: 血清大籽蒿 T-IgE

绝对值表示为平均值  $\pm$  四分位数 (n=6) ns P > 0.05, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01和\*\*\*P < 0.001

### 3.1.2 血清中免疫球蛋白 G 分析

分析各组小鼠血清中 sIgG 的水平，发现四个治疗组小鼠血清 IgG1 和 IgG2a 水平均比未治疗组高 ( $P < 0.05$ ) (图 15A、B)。但是，比较四个治疗组小鼠之间的 IgG1、IgG2a 水平均不存在差异 ( $P > 0.05$ )。四个治疗组小鼠血清 IgG2b 的水平较未治疗组稍升高，但不存在统计学差异 ( $P > 0.05$ ) (图 15C)。

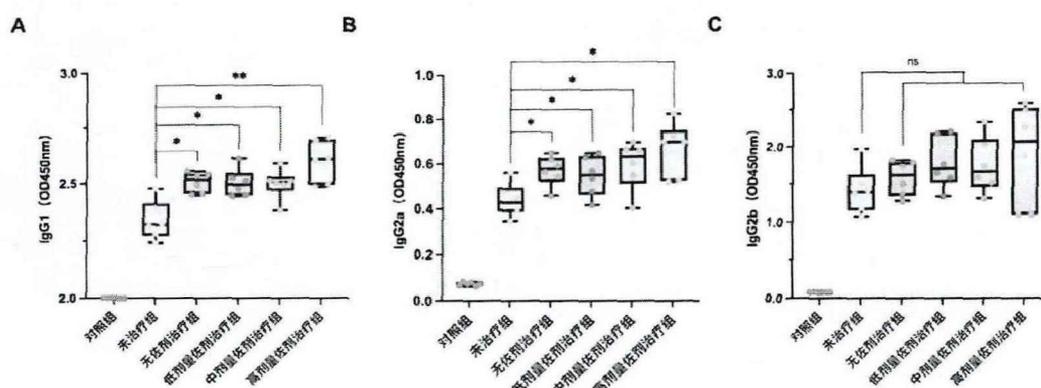


图15 六组小鼠血清大籽蒿 IgG1、IgG2a和IgG2b比较

A: 血清大籽蒿 IgG1, B: 血清大籽蒿IgG2a, C: 血清大籽蒿IgG2b

绝对值表示为平均值  $\pm$  四分位数 ( $n=6$ ) ns  $P > 0.5$ , \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  和 \*\*\* $P < 0.001$

### 3.2 气道炎症评估

分析各组小鼠 BALF 中的炎症细胞，发现四个治疗组的 BALF 中 WBC 总数均明显高于未治疗组 ( $P < 0.05$ )。中剂量佐剂治疗组小鼠 BALF 中 WBC 的数量明显高于未添加佐剂治疗组 ( $P < 0.05$ )。三组添加佐剂治疗组小鼠间比较发现，高佐剂治疗的 BALF 中 WBC 总数均比其他两组低 ( $P < 0.05$ ) (图 16A)。高剂量佐剂治疗组小鼠 BALF 中 Eos 明显高于未治疗组、无佐剂治疗组、低剂量佐剂治疗组和中剂量佐剂治疗组 ( $P < 0.05$ ) (图 16B)。未治疗组与四个治疗组的小鼠 BALF 中的 NEUT 数量差异无统计学差异 ( $P > 0.05$ ) (图 14C)。

高剂量佐剂治疗组小鼠 IL-4 和 IL-9 均明显低于未治疗组和其他三个治疗组 ( $P < 0.05$ )。经治疗后，低剂量佐剂治疗组小鼠 BALF 中 IL-5 的水平明显降低；

中剂量佐剂小鼠 BALF 中 IL-17 的水平明显降低；高剂量佐剂治疗组小鼠 BALF 中 IL-5、IL-10 和 IL-13 的水平明显降低 ( $P < 0.05$ )。其他治疗组小鼠 BALF 中 IL-17 的水平较治疗前稍有降低，但是差异不具有统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

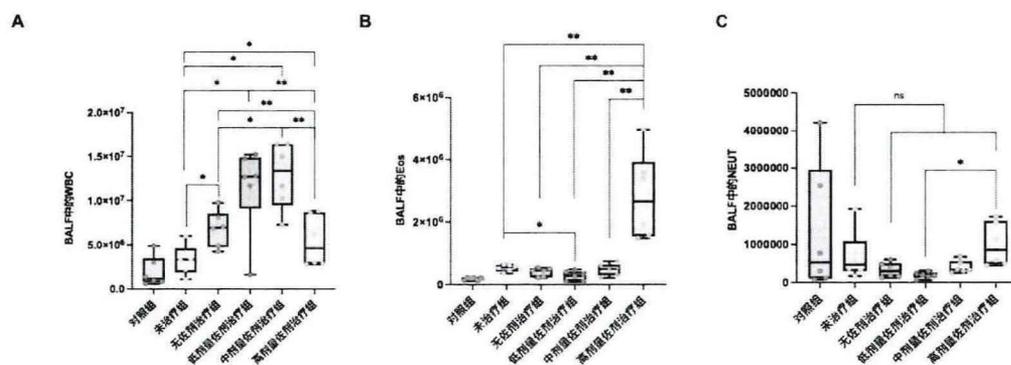


图16 六组小鼠BALF中细胞总数比较

A: BALF中细胞总数, B: BALF中Eos, C: BALF中NEUT

绝对值表示为平均值  $\pm$  四分位数 ( $n=6$ ) ns  $P > 0.05$ , \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 和\*\*\* $P < 0.001$

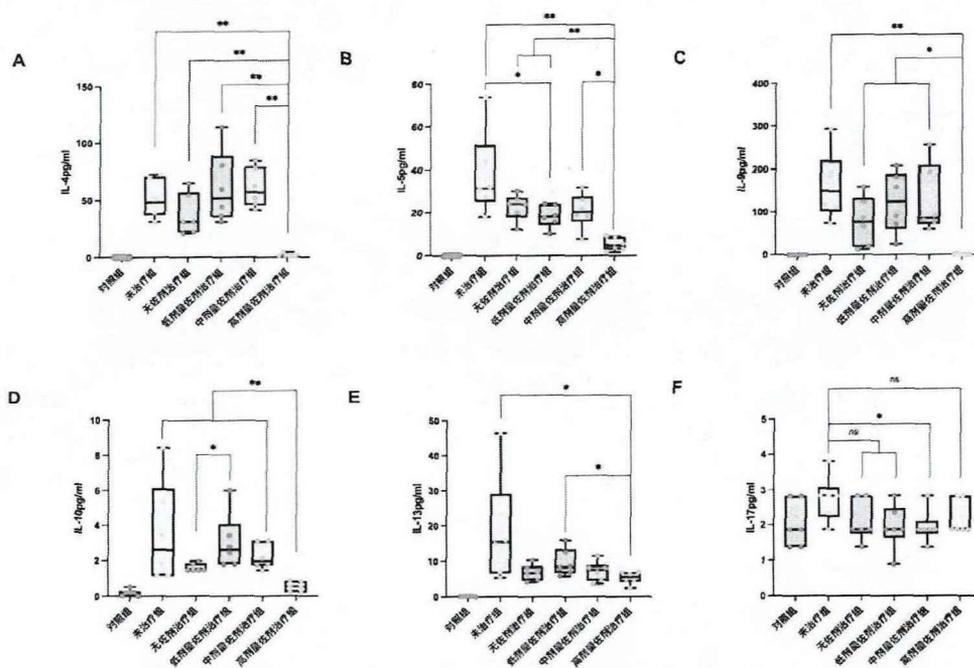


图17 四组小鼠BALF中细胞因子比较

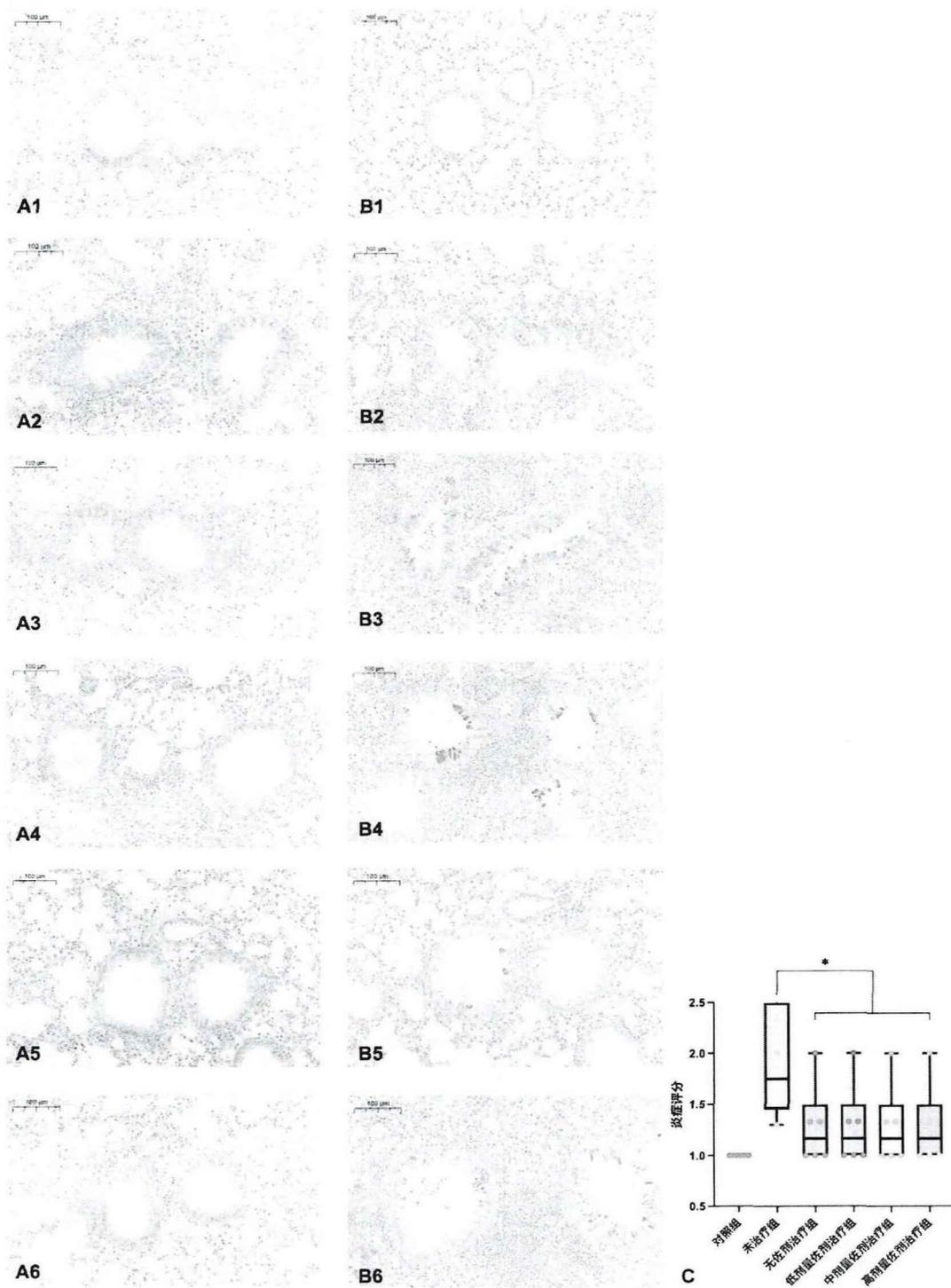
A: BALF中IL-4, B: BALF中IL-5, C: BALF中IL-9, D: BALF中IL-10, E: BALF中IL-13, F: BALF中IL-17

绝对值表示为平均值 ± 四分位数 (n=6) , ns P>0.05, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01和\*\*\*P < 0.001

### 3.3 组织学分析

分析各组小鼠的肺组织发现, 未治疗组小鼠气道变窄, 肺部结构破坏, 并且血管和气管周围有大量炎症细胞浸润 (图17 A2); PAS染色发现模小鼠支气管的杯状细胞增生, 支气管粘液物质明显增多 (17 B2)

四组治疗组小鼠肺组织的炎症较未治疗组轻 (图17 A3~6), 炎症评分明显低于未治疗组 (P < 0.05) (图17C)。PAS染色发现, 四组治疗组小鼠肺组织支气管中的粘液物质较未治疗组多 (图17 B2~6)。四个治疗组小鼠的肺组织炎症评分无差异 (P>0.05)。



**图17** 六组小鼠肺组织炎症比较

A1-6 为 HE 染色 (10×), A1: 对照组, A2: 未治疗组, A3: 无佐剂治疗组, A4: 低剂量佐剂治疗组, A5: 中剂量佐剂治疗组, A6: 高剂量佐剂治疗组; B1-6 为 PAS 染色 (10×), B1: 对照组, B2: 未治疗组, B3: 无佐剂治疗组, B4: 低剂量

佐剂治疗组, B5: 中剂量佐剂治疗组, B6: 高剂量佐剂治疗组, C: 小鼠肺组织病理评分比较

绝对值表示为平均值  $\pm$  四分位数 (n=6) \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 和\*\*\*P < 0.001

## 4 讨论

在本研究中, 我们在先前成功建立蒿属花粉过敏性小鼠模型的基础上, 探究不同剂量的铝盐佐剂对小鼠 SCIT 治疗的影响。结果提示, 经过治疗后小鼠血清 sIgE、T-IgE、BALF 中 IL-5、IL-9、IL-13 和 IL-17 水平下降, 血清 IgG1、IgG2a、IgG2b 水平和 BALF 中 WBC 总数上升; 分析肺组织发现, 治疗后的肺部炎症减轻。除高剂量佐剂治疗组, 不同佐剂治疗组比较发现佐剂剂量越多, 血清 IgE、BALF 中 WBC 越多 (无佐剂治疗组 < 低剂量佐剂治疗组 < 中剂量佐剂治疗组)。

联合氢氧化铝佐剂制备变应原被广泛用于过敏患者的 SCIT<sup>[86]</sup>。SCIT 逐渐增加疫苗剂量 (吸附在氢氧化铝佐剂上的变应原提取物), 最终进入每月注射一次的维持阶段, 一般持续 3~5 年。变应原-佐剂组合系统的物理化学特性 (如吸附作用), 可以促进免疫细胞的摄取, 并且可以使变应原缓慢释放, 提高重复给药的疫苗耐受性和免疫原性<sup>[6,89]</sup>。除此之外, 它们在注射部位引起局部炎症, 但也通过与疫苗中的生物活性分子结合降低全身和局部反应的严重性。受到刺激的免疫系统可能需要较少的过敏原, 从而避免变应原-IgE 复合物来减少副作用<sup>[5]</sup>。虽然单抗原复合物充分证明了铝盐佐剂的吸附特性, 但过敏性 SCIT 制剂由复杂的变应原/类过敏性水提取物 (蛋白质材料的高度复杂混合物) 组成, 目前文献中关于 AIT 中特定吸附能力及其配方一致性的经验数据很少<sup>[6]</sup>。

铝盐佐剂是对神经和骨骼有潜在毒性的物质。另外, 明矾可以优先诱导 Th2 细胞, 从而增强 2 型免疫反应, 这表明将明矾用作于人类花粉免疫治疗的辅助剂可能是有害的<sup>[90,91]</sup>。因此作为用作 SCIT 中的佐剂的安全性需要不断重新评估。但是, 到目前为止, 还没有出现在市售 SCIT 中使用明矾的安全问题<sup>[6]</sup>。到目前为止, 还没有一个毒代动力学模型涉及肌肉或 SCIT 的应用<sup>[92]</sup>。除此之外, 目前尚无任何铝佐剂的皮下吸收动力学的体内数据<sup>[92]</sup>。然而, 关于 SCIT 使用中的铝盐佐剂吸附效能尚未见报道。从生物学角度来看, 在长疗程 AIT 中使用明矾佐剂的明显局限性在于, 明矾佐剂通常刺激所谓的 Th1 免疫应答而不是 Th2 免疫应答有关, 这反过来又会影响抗体反应的类型<sup>[93,90]</sup>。

铝盐佐剂的任何免疫调节特性都会对已经建立的免疫应答产生影响<sup>[91]</sup>。这与使用明矾促进幼稚小鼠免疫应答完全不同<sup>[91]</sup>。因此, 明矾对小鼠的促进 Th2 炎症作用与对人类 AIT 的脱敏作用无关<sup>[91]</sup>。SCIT 导致 IgE 促进变应原-IgE 复合物与 B

细胞结合的血清抑制活性增加，这种作用是通过诱导 IgG 类的“抗体”，特别是 IgG4 介导（小鼠中的 IgG2a）的<sup>[94,95]</sup>。使 IgG1、IgG2a/b 的水平增加，并减少 Th2 炎症和气道中的 Eos，这与先前的研究结果一致<sup>[96]</sup>。Hesse 等人的动物实验<sup>[96]</sup>和临床研究<sup>[97]</sup>对比 SCIT 和 SLIT 两种治疗方法，其中 SCIT 使用明矾佐剂，而 SLIT 不含佐剂，均发现 SCIT 治疗可能增强了诱导免疫球蛋白反应。我们的研究发现，仅高剂量佐剂治疗组小鼠血清 IgG 较无佐剂治疗组水平高。结合先前的研究，我们推测一定剂量的 Alum 可增强诱导免疫球蛋白反应，但仍需要深入研究去验证。

与经典的预防疫苗相比，SCIT 中使用的铝 ( $Al^{3+}$ ) 的浓度相对较高，接近每支注射铝化合物用量的监管阈值，其中的原因尚不清楚，可能与确保充分吸附和效能有关<sup>[98]</sup>。有效的 AIT 与诱导不同亚群的调节性 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞相关，这些淋巴细胞可积极抑制促进 2 型细胞因子 (IL-4、IL-5、IL-9、IL-13、IL-31)。在本研究中，高剂量佐剂治疗组小鼠每次 SCIT 时使用 300  $\mu$ g ASE [吸附在 1mg Al (OH)<sub>3</sub> 上]，该组小鼠血清 sIgG1、sIgG2a 和 sIgG2b 的水平高于其他治疗组小鼠；BALF 中 IL-4、IL-5、IL-9、IL-13 含量明显比其他四组治疗组的水平低。这说明可能需要一定剂量的氢氧化铝佐剂才能更好地发挥效能。Wilcock<sup>[91]</sup>等人研究明矾对外周血单核细胞 (PBMC) 的体外效应，比较单独梯牧草和用梯牧草和明矾共同培养的 PBMC，发现明矾能显著下调 Th2 型细胞因子 IL-5 和 IL-13 的产生，但是 Th1 型细胞因子没有发生变化，另外明矾诱导的细胞因子生成的变化不依赖于 IL-4 或 IL-12。在本研究中，添加佐剂进行治疗组的 BALF 中 IL-5 和 IL-13 均明显低于未添加佐剂治疗组，与先前的研究结果类似。虽然这些结果无法准确反映明矾在体内的作用，但是这解释了为什么明矾佐剂多年以来用作治疗过敏性疾病非常成功的佐剂<sup>[86]</sup>。

小鼠模型在临床前研究中非常有价值，可以表征 AIT 的脱敏机制，并评估提高其疗效的新方法<sup>[99]</sup>。更深入了解 AIT 诱导致敏个体对变应原耐受的机制，才能提高其疗效<sup>[99]</sup>。AIT 的最佳佐剂应减少变应原的使用量，从而减少局部副作用，提高 AIT 的整体安全性，不诱导 Th2 细胞，并提供持久的耐受性记忆<sup>[5]</sup>。在本研究中，我们成功建立蒿属花粉过敏型过敏性哮喘的 SCIT 模型，比较不同剂量的铝盐佐剂对 AIT 的影响，发现较低剂量的佐剂亦能成功进行 SCIT，使用高剂量佐剂 SCIT 效果较好。

## 第四部分：研究结论与不足

### 1. 研究结论

AIT 是目前过敏性疾病唯一的治疗方法。在 AIT 过程中，免疫调节佐剂同变应原使用一样重要。铝盐佐剂是目前在人类疫苗中使用最多的佐剂。铝盐佐剂的作用机制包括“库存效应”、募集抗原呈递细胞的炎症反应、NALP3 炎症小体激活、细胞死亡释放 DNA 引起危险相关分子模式 (DAMP) 识别，以及抗原呈递细胞增强吞噬作用。但是，铝盐佐剂的毒性和副作用等问题阻碍了在免疫中的广泛应用。

在本研究中，我们比较了不同剂量的铝盐佐剂对建立蒿属花粉过敏性哮喘小鼠模型和 AIT 的影响，发现较低剂量的铝盐佐剂也能成功建立模型，并且过高剂量的铝盐佐剂可能导致小鼠在实验过程中死亡。因此，在未来的研究中，在不影响实验结果的情况下应使用更低剂量的佐剂，确保实验平稳进行。

### 2. 研究不足和展望

本研究尚存在种种不足之处，在今后可以继续深入开展进行下一步工作，具体建议如下：

1. IL-5 是 Eos 分化和存活的关键细胞因子。本研究中，同一组的小鼠 BALF 中的 Eos 含量高，但是 IL-5 含量较低。在未来的研究中建议检测小鼠肺组织中和 BALF 中的细胞因子是否存在不同；
2. 由于本研究在疫情期间进行，故研究完成的时间紧张，未对小鼠进行肺功能检测，将来可完善此部分实验数据；
3. Xie<sup>[100]</sup>等人的研究比较长期治疗组（一周进行一次 SCIT，共治疗 8）和短期治疗组（两天进行一次 SCIT，共治疗 8 次）小鼠的 SCIT 治疗疗效。在本研究中，仅采用短期的 SCIT 治疗方法，在未来的研究中可以比较长期与短期两种治疗方法；
4. 在此研究中未比较不同的变应原剂量和相同佐剂剂量结合进行 SCIT 的治疗疗效，在将来的实验中可以进行开展；
5. sIgG1 和 sIgE 的比值比 sIgE 滴度本身能更好地预测症状，这可能是控制哮喘/鼻炎的一个容易获得的治疗靶点<sup>[101]</sup>。如果在治疗过程中达到更高的 sIgG1/sIgE 值，治疗效果可能更好<sup>[96]</sup>。本研究中，sIgG1 和 sIgE 的检测值均使用的是 OD 值（450 nm 波长处），在未来的研究中可以检测具体的含量值，进行 sIgG1/sIgE 的比较。

## 参考文献

- [1] Ho NI, Huis in 't Veld, Lisa GM, et al. Adjuvants Enhancing Cross-Presentation by Dendritic Cells: The Key to More Effective Vaccines?[J]. *Front Immunol*, 2018, 9.
- [2] Jacobsen L, Wahn U, Bilo MB. Allergen-specific immunotherapy provides immediate, long-term and preventive clinical effects in children and adults: the effects of immunotherapy can be categorised by level of benefit -the centenary of allergen specific subcutaneous immunotherapy[J]. *Clin Transl Allergy*, 2012, 2(1):1-11.
- [3] Shamji MH, Durham SR. Mechanisms of immunotherapy to aeroallergens[J]. *Clin Exp Allergy*, 2011, 41(9):1235-46.
- [4] Ozdemir O. Any defining role of mast cell or mast cell density in oral squamous cell carcinoma[J]? *Annals of medical and health sciences research*, 2014, 4(6):975-7.
- [5] Chesné J, Schmidt-Weber CB, Esser von-Bieren J. The Use of Adjuvants for Enhancing Allergen Immunotherapy Efficacy[J]. *Immunol Allergy Clin North Am*, 2016, 36(1):125-45.
- [6] Klimek L, Schmidt-Weber CB, Kramer MF, et al. Clinical use of adjuvants in allergen-immunotherapy[J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2017, 13(6):599-610.
- [7] Komlósi ZI, van de Veen W, Kovács N, et al. Cellular and molecular mechanisms of allergic asthma[J]. *Mol Aspects Med*, 2022, 85:100995.
- [8] Wenzel SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches[J]. *Nat Med*, 2012, 4;18(5):716-25.
- [9] Widmer F, Hayes PJ, Whittaker RG, et al. Substrate preference profiles of proteases released by allergenic pollens[J]. *Clin Exp Allergy*, 2000, 30(4):571-6.
- [10] 中国医师协会变态反应医师分会, 福棠儿童医学发展研究中心, 北京医师协会变态反应专科医师分会. 过敏原特异性IgE检测结果临床解读中国专家共识[J]. *中华预防医学杂志*, 2022, 56(06):707-725.
- [12] Deng S, Yin J. Mugwort Pollen-Related Food Allergy: Lipid Transfer Protein Sensitization and Correlation With the Severity of Allergic Reactions in a Chinese Population[J]. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2019, 11(1):116-128.
- [13] 姜楠楠, 向莉. 花粉-食物过敏综合征[J]. *中华临床免疫和变态反应杂志*, 2023, 17(5):455-463.
- [14] Nials AT, Uddin S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge[J]. *Dis Model Mech*. 2008, 1(4-5):213-20.
- [15] Epstein MM. Do mouse models of allergic asthma mimic clinical disease[J]? *Int Arch Allergy Immunol*, 2004, 133(1):84-100.

- [16]张星东.过敏性哮喘动物模型在致敏、哮喘发作和气道高反应性等方面的应用研究[J].中国比较医学杂志,2012,22(9):1-7.
- [17]Alun MV, Bonamichi-Santos R, Arantes-Costa FM, et al. Animal models of asthma: utility and limitations[J]. J Asthma Allergy, 2017, 10:293-301.
- [18]何权瀛.对我国哮喘动物实验研究的评价与思考[J].国外医学 (呼吸系统分册),2005,25(9):718-719.
- [19]Krieger SM, Boverhof DR, Woolhiser MR, et al .Assessment of the respiratory sensitization potential of proteins using an enhanced mouse intranasal test (MINT) [J]. Food Chem Toxicol, 2013, 59:165-76.
- [20]宋天园,肖兰,王甜,等.花粉过敏动物模型的研究进展[J].黑龙江动物繁殖,2022,30(03):23-31.
- [21]Zhang Q, Xi G, Yin J. Artemisia sieversiana pollen allergy and immunotherapy in mice[J]. Am J Transl Res, 2021, 15;13(12):13654-13664.
- [22]Liu J, Yin J. Immunotherapy With Recombinant Alt a 1 Suppresses Allergic Asthma and Influences T Follicular Cells and Regulatory B Cells in Mice[J]. Front Immunol, 2021, 12:747730.
- [23]Burks A W. Middleton's allergy: principles and practice[M]. Ninth edition. Edinburgh: Elsevier,2020.
- [24]Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation[J]. Nature, 2008, 24;454(7203):445-54.
- [25]Debeuf N, Haspeslagh E, van Helden M, et al. Mouse Models of Asthma[J]. Curr Protoc Mouse Biol, 2016, 1;6(2):169-184.
- [26]K Kumar RK, Herbert C, Foster PS. The "classical" ovalbumin challenge model of asthma in mice[J]. Curr Drug Targets, 2008, 9(6):485-94.
- [27]Sagar S, Akbarshahi H, Uller L. Translational value of animal models of asthma: Challenges and promises[J]. Eur J Pharmacol, 2015, 15;759:272-7.
- [28]Jose PJ, Griffiths-Johnson DA, Collins PD, et al. Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation[J]. J Exp Med, 1994, 1;179(3):881-7.
- [29]Pretolani M, Vargaftig BB. Role of eosinophil mobilization and activation in experimental airway inflammation and bronchopulmonary hyperreactivity[J]. Ann N Y Acad Sci, 1996, 31;796:72-81.
- [30]楼金成,苗镡允,苏嘉琪,等.过敏性哮喘大鼠模型的建立方法与评价[J].中国比较医学杂志,2023,33(1):130-137.
- [31]Ricciardolo FL, Nijkamp F, De Rose V, et al. The guinea pig as an animal model for

- asthma[J]. *Curr Drug Targets*, 2008, 9(6):452-65.
- [32] Zosky GR, Sly PD. Animal models of asthma[J]. *Clin Exp Allergy*, 2007, 37(7):973-88.
- [33] Pabst R. Animal models for asthma: controversial aspects and unsolved problems[J]. *Pathobiology*, 2002-2003;70(5):252-4.
- [34] Silveyra P, Fuentes N, Rodriguez Bauza DE. Sex and Gender Differences in Lung Disease[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2021;1304:227-258.
- [35] Matsubara S, Swasey CH, Loader JE, et al. Estrogen determines sex differences in airway responsiveness after allergen exposure[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008, 38(5):501-8.
- [36] Morita H, Kubo T, Rückert B, et al. Induction of human regulatory innate lymphoid cells from group 2 innate lymphoid cells by retinoic acid[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2019, 143(6):2190-2201.e9.
- [37] Lambrecht BN, Hammad H, Fahy JV. The Cytokines of Asthma[J]. *Immunity*, 2019, 16;50(4):975-991.
- [38] Regateiro FS, Botelho Alves P, Moura AL, et al. The diverse roles of T cell subsets in asthma[J]. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*, 2021, 53(5):201-208.
- [39] Zhang J, Zou Y, Chen L, et al. Regulatory T Cells, a Viable Target Against Airway Allergic Inflammatory Responses in Asthma[J]. *Front Immunol*, 2022, 10;13:902318.
- [40] Jia L, Wang Y, Li J, et al. Detection of IL-9 producing T cells in the PBMCs of allergic asthmatic patients[J]. *BMC Immunol*, 2017, 19;18(1):38.
- [41] Kumar RK, Foster PS. Modeling allergic asthma in mice: pitfalls and opportunities[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002, 27(3):267-72.
- [42] 何婷,钱佩瑶,洪敏,等.诱发支气管哮喘动物模型气道重塑特征的方法和评价[J]. *中国实验动物学报*,2022,30(1):117-123.
- [43] McMillan SJ, Lloyd CM. Prolonged allergen challenge in mice leads to persistent airway remodelling [J]. *Clin Exp Allergy*, 2004,34(3):497-507.
- [44] Borthwick DW, West JD, Keighren MA, et al. Murine submucosal glands are clonally derived and show a cystic fibrosis gene-dependent distribution pattern[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*,1999,20(6):1181-9.
- [45] 朱蓉娜. 变应性鼻炎的变应原检测和多因素分析及模型的建立[D]. 山西:山西医科大学,2020.
- [46] Israeli E, Agmon-Levin N, Blank M, et al. Adjuvants and autoimmunity[J]. *Lupus*, 2009,18(13):1217-25.
- [47] 周艳丽,阮研硕,劳文艳,等.哮喘动物模型的建立方法研究进展[J]. *环境与健康杂*

志,2017,34(10):931-936.

[48]Glenny A T , Pope C G , Waddington H ,et al. Immunological notes. XVII–XXIV[J]. *Journal of Pathology & Bacteriology*, 1926, 29(1).

[49]Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G. Mechanisms of action of adjuvants[J]. *Front Immunol*, 2013, 16;4:114.

[50]Gupta RK, Rost BE, Relyveld E, et al. Adjuvant properties of aluminum and calcium compounds[J]. *Pharm Biotechnol*, 1995;6:229-48.

[51]Ghimire TR. The mechanisms of action of vaccines containing aluminum adjuvants: an in vitro vs in vivo paradigm[J]. *Springerplus*, 2015, 16;4:181.

[52]Baylor NW, Egan W, Richman P. Aluminum salts in vaccines--US perspective[J]. *Vaccine*, 2002, 31;20 Suppl 3:S18-23.

[53]H Hogenesch H. Mechanism of immunopotential and safety of aluminum adjuvants[J]. *Front Immunol*. 2013 , 10;3:406.

[54]V ogelbruch M, Nuss B, Körner M, et al. Aluminium-induced granulomas after inaccurate intradermal hyposensitization injections of aluminium-adsorbed depot preparations[J]. *Allergy*. 2000, 55(9):883-7.

[55]Clemmensen O, Knudsen HE. Contact sensitivity to aluminium in a patient hyposensitized with aluminium precipitated grass pollen[J]. *Contact Dermatitis*, 1980, 6(5):305-8.

[56]Jungsuwadee P, Dekan G, Stingl G, et al. Recurrent aerosol antigen exposure induces distinct patterns of experimental allergic asthma in mice[J]. *Clin Immunol*, 2002, 102(2):145-53.

[57]Roche WR. Inflammatory and structural changes in the small airways in bronchial asthma[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 157(5 Pt 2):S191-4.

[58]Mojtabavi N, Dekan G, Stingl G, et al. Long-lived Th2 memory in experimental allergic asthma. [J]. *J Immunol*. 2002, 1;169(9):4788-96.

[59]McKee AS, Munks MW, MacLeod MK, et al. Alum induces innate immune responses through macrophage and mast cell sensors, but these sensors are not required for alum to act as an adjuvant for specific immunity[J]. *J Immunol*, 2009, 183(7):4403-14.

[60]Kool M, Soullié T, van Nimwegen M, et al. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells[J]. *J Exp Med*, 2008, 14;205(4):869-82.

[61]Mark A, Björkstén B, Granström M. Immunoglobulin E responses to diphtheria and tetanus toxoids after booster with aluminium-adsorbed and fluid DT-vaccines[J]. *Vaccine*,

1995, 13(7):669-73.

[62] Conrad ML, Yildirim AO, Sonar SS, et al. Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models[J]. *Clin Exp Allergy*, 2009, 39(8):1246-54.

[63] Gerday S, Schleich F, Henket M, et al. Asthmatics with concordant eosinophilic disease classified according to their serum IgE status[J]. *Respir Med Res*, 2021, 79:100797.

[64] Wang HB, Weller PF. Pivotal advance: eosinophils mediate early alum adjuvant-elicited B cell priming and IgM production[J]. *J Leukoc Biol*, 2008, 83(4):817-21.

[65] Stiehm M, Peters M. Specific Immunotherapy in a Murine Model of Grass Pollen (Phl p5b)-Induced Airway Inflammation[J]. *Front Allergy*, 2021, 16:2:777545.

[66] Majgaard Jensen O, Koch C. On the effect of Al(OH)<sub>3</sub> as an immunological adjuvant[J]. *APMIS*, 1988, 96(3):257-64.

[67] Clements CJ, Griffiths E. The global impact of vaccines containing aluminium adjuvants[J]. *Vaccine*, 2002, 31;20 Suppl 3:S24-33.

[68] Willhite CC, Ball GL, McLellan CJ. Total allowable concentrations of monomeric inorganic aluminum and hydrated aluminum silicates in drinking water[J]. *Crit Rev Toxicol*, 2012, 42(5):358-442.

[69] Institute of Medicine (US) Immunization Safety Review Committee. Immunization Safety Review: Vaccines and Autism[M]. Washington (DC): National Academies Press (US); 2004.

[70] Crépeaux G, Eidi H, David MO, et al. Non-linear dose-response of aluminium hydroxide adjuvant particles: Selective low dose neurotoxicity[J]. *Toxicology*, 2017, 15;375:48-57.

[71] Petrik MS, Wong MC, Tabata RC, et al. Aluminum adjuvant linked to Gulf War illness induces motor neuron death in mice[J]. *Neuromolecular Med*, 2007;9(1):83-100.

[72] Eidi H, David MO, Crépeaux G, et al. Fluorescent nanodiamonds as a relevant tag for the assessment of alum adjuvant particle biodisposition[J]. *BMC Med*, 2015, 17;13:144.

[73] Goullé JP, Grangeot-Keros L. Aluminum and vaccines: Current state of knowledge[J]. *Med Mal Infect*, 2020, 50(1):16-21.

[74] Gherardi RK, Coquet M, Cherin P, et al. Macrophagic myofasciitis lesions assess long-term persistence of vaccine-derived aluminium hydroxide in muscle[J]. *Brain*, 2001, 124(Pt 9):1821-31.

[75] Vecchi S, Bufali S, Skibinski DA, et al. Aluminum adjuvant dose guidelines in vaccine formulation for preclinical evaluations[J]. *J Pharm Sci*, 2012, 101(1):17-20.

- [76]范尔钟,锡琳,韩德民,等.铝佐剂在建立变应性鼻炎动物模型中的安全性研究[J].中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2009,44(8):664-668.
- [77]苗青,张静.生后早期过敏原暴露对哮喘小鼠气道炎症及气道高反应性的影响[J].中华微生物学和免疫学杂志,2021,41(12):927-933.
- [78]Fernandez-Rodriguez S, Ford WR, Broadley KJ, et al. Establishing the phenotype in novel acute and chronic murine models of allergic asthma[J]. *Int Immunopharmacol*, 2008, 8(5):756-63.
- [79]Blonder JP, Mutka SC, Sun X, et al. Pharmacologic inhibition of S-nitrosoglutathione reductase protects against experimental asthma in BALB/c mice through attenuation of both bronchoconstriction and inflammation[J]. *BMC Pulm Med*, 2014, 10;14:3.
- [80]Reddy AT, Lakshmi SP, Reddy RC. Murine model of allergen induced asthma[J]. *J Vis Exp*, 2012, 14;(63):e3771.
- [81]罗承慧,高江瑞,陈俊威,等.尘螨诱导特应性皮炎小鼠模型和哮喘小鼠模型的构建[J].畜牧兽医学报,2024,55(3):1257-1267.
- [82]Xi GP, Zhang Q, Yin J. Establishment and characterization of murine models of asthma and subcutaneous immunotherapy for *Humulus pollen* allergy[J]. *Immun Inflamm Dis*, 2021, 9(2):443-455.
- [83]Hassett KJ, Cousins MC, Rabia LA, et al. Stabilization of a recombinant ricin toxin A subunit vaccine through lyophilization. *Eur J Pharm Biopharm*. 2013, 85(2):279-86.
- [84]Hutchison S, Benson RA, Gibson VB, et al. Antigen depot is not required for alum adjuvanticity[J]. *FASEB J*, 2012, 26(3):1272-9.
- [85]Shah RR, Hassett KJ, Brito LA. Overview of Vaccine Adjuvants: Introduction, History, and Current Status[J]. *Methods Mol Biol*, 2017;1494:1-13.
- [86]Francis JN, Durham SR. Adjuvants for allergen immunotherapy: experimental results and clinical perspectives[J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2004, 4(6):543-8.
- [87]Lindblad EB. Aluminium compounds for use in vaccines[J]. *Immunol Cell Biol*, 2004, 82(5):497-505.
- [88]Brito LA, O'Hagan DT. Designing and building the next generation of improved vaccine adjuvants[J]. *J Control Release*, 2014, 28;190:563-79.
- [89]Casale TB, Stokes JR. Immunotherapy: what lies beyond[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2014, 133(3):612-9: quiz 620.
- [90]Sokolovska A, Hem SL, HogenEsch H. Activation of dendritic cells and induction of CD4(+) T cell differentiation by aluminum-containing adjuvants[J]. *Vaccine*, 2007, 6;25(23):4575-85.

- [91] Wilcock LK, Francis JN, Durham SR. Aluminium hydroxide down-regulates T helper 2 responses by allergen-stimulated human peripheral blood mononuclear cells[J]. *Clin Exp Allergy*, 2004, 34(9):1373-8.
- [92] Weisser K, Stübler S, Matheis W, et al. Towards toxicokinetic modelling of aluminium exposure from adjuvants in medicinal products[J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2017, 88:310-321.
- [93] Ulanova M, Tarkowski A, Hahn-Zoric M, et al. The Common vaccine adjuvant aluminum hydroxide up-regulates accessory properties of human monocytes via an interleukin-4-dependent mechanism[J]. *Infect Immun*, 2001, 69(2):1151-9.
- [94] Pichler U, Asam C, Weiss R, et al. The fold variant BM4 is beneficial in a therapeutic Bet v 1 mouse model[J]. *Biomed Res Int*, 2013;2013:832404.
- [95] Shamji MH, Wilcock LK, Wachholz PA, et al. The IgE-facilitated allergen binding (FAB) assay: validation of a novel flow-cytometric based method for the detection of inhibitory antibody responses[J]. *J Immunol Methods*, 2006, 20;317(1-2):71-9.
- [96] Hesse L, van Ieperen N, Habraken C, et al. Subcutaneous immunotherapy with purified Der p1 and 2 suppresses type 2 immunity in a murine asthma model[J]. *Allergy*. 2018, 73(4):862-874.
- [97] Bohle B. Immune mechanisms of SCIT and SLIT: facing possible differences[J]? *Clin Exp Allergy*, 2014, 44(3):304-6.
- [98] Kramer MF, Heath MD. Aluminium in allergen-specific subcutaneous immunotherapy--a German perspective[J]. *Vaccine*, 2014, 16;32(33):4140-8.
- [99] Kumi Nagamoto-Combs. *Animal Models of Allergic Disease: Methods and Protocols*[M]. New York, NY: Springer US, 2021.
- [100] Xie Z, Yin J. Chinese Birch Pollen Allergy and Immunotherapy in Mice[J]. *Inflammation*, 2019, 42(3):961-972.
- [101] Holt PG, Strickland D, Bosco A, et al. Distinguishing benign from pathologic TH2 immunity in atopic children[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 137(2):379-87.