文章编号:1000-5404(2014)12-1299-04

论著

抗趋化因子配体20抗体对哮喘小鼠气道炎症和气道高反应的抑制作用

李 霞[1],代继宏[2] (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院:儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室[1],呼吸中心[2])

[摘要] **目的** 研究趋化因子配体20(CC chemokine ligand 20, CCL20)在哮喘小鼠肺组织内的表达,观察抗小鼠CCL20单克隆抗体对哮喘小鼠肺部炎症和气道高反应的抑制作用。**方法** 6~8周龄雌性BALB/c小鼠按随机数字表法分为4组:哮喘组、正常对照组、CCL20单克隆抗体治疗组(单抗组)和治疗对照组,每组8只。哮喘组予卵蛋白(ovalbumin,OVA)致敏和激发建立哮喘小鼠模型,单抗组和治疗对照组致敏和激发同哮喘组,但自第1次激发起,雾化前1 h分别腹腔注射给予抗小鼠CCL20单克隆抗体或磷酸盐缓冲溶液(PBS),连续5 d。正常对照组用PBS代替OVA进行致敏和激发。末次激发后24 h用无创肺功能体描仪行小鼠气道反应性检测,HE染色观察肺组织病理炎症及评分,免疫组化及图像分析和实时荧光定量PCR分别测定小鼠肺组织CCL20的蛋白含量和基因表达水平。**结果** 哮喘组小鼠肺组织炎症病理评分、气道高反应、肺组织CCL20 mRNA相对表达量及免疫组化CCL20平均光密度值均显著高于正常对照组。与哮喘组相比,单抗组小鼠肺部细胞浸润减轻($P<0.05$),肺功能(雾化乙酰甲胆碱浓度为25~50 mg/mL时)Penh降低($P<0.05$),肺组织CCL20平均光密度值显著降低($P<0.01$),而CCL20 mRNA表达无影响。**结论** CCL20单克隆抗体可改善OVA诱发的小鼠哮喘炎症和气道高反应,其抑制作用可能与抗鼠CCL20单抗阻断部分CCL20活性有关。

[关键词] 哮喘;单克隆抗体;趋化因子配体20
[中图法分类号] R562.25;R967;R976 [文献标志码] A

Monoclonal antibody against CC chemokine ligand 20 inhibits airway inflammation and airway hyperresponsiveness in asthmatic mice

Li Xia[1], Dai Jihong[2]([1]Key Laboratory of Developmental Diseases in Childhood of Ministry of Education, [2]Center of Respiratory Disorders, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the expression of CC chemokine ligand 20 (CCL20) in the lung tissues of asthmatic mice and the effect of anti-CCL20 monoclonal antibody on airway inflammation and airway hyper-responsiveness (AHR) in asthmatic BALB/c mice. **Methods** A total of 32 BALB/c mice at the age of 6 to 8 weeks were randomly divided into an asthma group, a normal control group, an anti-CCL20 monoclonal antibody treatment group and a therapeutic control group. The mice in the asthma group were sensitized and challenged with ovalbumin (OVA) to establish an asthma model, while the mice in the normal control group were sensitized and challenged with PBS. The sensitive and challenge methods of the anti-CCL20 monoclonal antibody treatment group and the therapeutic control group were the same as that of the asthma group. But since the first challenge, mice of the former 2 groups received an intraperitoneal injection of anti-CCL20 monoclonal antibody and PBS, respectively, in 1 h before atomization inhalation for 5 consecutive days. Within 24 h after the final OVA challenge, AHR was measured by lung function instrument. The degree of inflammation in lung tissue was evaluated by HE staining. The expression of CCL20 at mRNA and protein levels in lung tissue were detected by real-time fluorescent quantitative PCR (real-time PCR) and immunochemistry assay. **Results** Compared with the normal control group, the score of inflammation in lung tissue, the AHR, the expression of CCL20 mRNA in lung tissue homogenate and the mean density for CCL20 of the asthma group were significantly higher. In the anti-CCL20 monoclonal antibody treatment group, pulmonary cell infiltration was alleviated when compared with the asthma group ($P<0.05$). Lung function Penh values were significant lower in the anti-CCL20 monoclonal antibody treatment group than in the asthma group ($P<0.05$). The mean density for

[通信作者] 代继宏,E-mail:danieljh@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140524.2147.004.html(2014-05-21)

CCL20 was significant lower in the anti-CCL20 monoclonal antibody treatment group than in the asthma group ($P<0.01$), but the CCL20 mRNA expression showed no obvious difference among the groups. **Conclusion** Anti-CCL20 monoclonal antibody can attenuate OVA-induced mice asthma inflammation and AHR, possibly involving CCL20 activity blockage by the antibody.

[**Key words**] asthma; monoclonal antibody; CC chemokine ligand 20; inflammation; airway hyperresponsiveness

Corresponding author: Dai Jihong, E-mail: danieljh@163.com

趋化因子是一类小分子量[(8~10)×10³]的蛋白质,其在病原体入侵时募集白细胞中起着关键作用,同时在维持体内平衡也发挥了重要作用[1]。趋化因子配体20(CC chemokine ligand 20, CCL20)又称为巨噬细胞炎性蛋白-3α(macrophage inflammatory protein-3α, MIP-3α),是趋化因子家族中的重要成员之一,通过与其受体趋化因子受体6(CC chemokine receptor 6, CCR6)结合发挥作用。CCL20结合CCR6后,参与调节黏膜免疫,包括募集未成熟树突状细胞(immature dendritic cells, DCs)、成熟DCs、专职的抗原提呈细胞(APCs)至上皮炎症部位[2]。Francis等[3]发现过敏原激发后支气管肺泡灌洗液中CCL20增高,也有研究发现$CCR6^{-/-}$小鼠对过敏原诱导的气道炎症减弱[4]。提示CCL20/CCR6通路可能参与了哮喘的发生、发展。因此,我们假设通过抑制CCL20活性可减轻哮喘气道炎症反应。

本研究拟通过卵清白蛋白(ovalbumin, OVA)诱导的哮喘小鼠模型,探讨哮喘小鼠CCL20表达,并研究抗鼠CCL20单克隆抗体对CCL20在肺组织基因表达及蛋白水平的影响,观察其对气道高反应和气道炎症的抑制作用,旨在为哮喘治疗奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验分组及动物模型的建立

SPF级BALB/c小鼠32只,体质量为(18±2)g,雌性,购自重庆医科大学实验动物中心。按随机数字表分为4组:哮喘组、正常对照组、CCL20单克隆抗体治疗组(单抗组)和治疗对照组,每组8只。哮喘组小鼠分别于第0、14天腹腔注射致敏液,第21~27天予1% OVA高频雾化进行激发,每天1次,每次30 min,连续7 d[5]。单抗组和治疗对照组致敏和激发同哮喘组,但自第1次激发起,雾化前1 h分别腹腔注射给予抗小鼠CCL20单克隆抗体0.5 mg/kg(美国R&D公司)或磷酸盐缓冲溶液(PBS),连续5 d。正常对照组用PBS代替OVA进行致敏和激发。

1.2 肺功能Penh值测定

第28天用无创肺功能体描仪行小鼠气道反应性检测,待检测的小鼠先雾化吸入乙酰甲胆碱(美国Sigma公司),依次由低浓度开始(0、3.13、6.25、12.5、25、50 mg/mL),每个溶度雾化3 min、休息2 min、连续记录5 min并取其平均值。用呼吸曲线Penh值表示雾化不同质量浓度乙酰甲胆碱后的气道高反应性。

1.3 肺组织HE染色及图像分析

将小鼠脱颈处死,取左肺组织置于10%中性甲醛固定24 h,脱水及石蜡包埋,切片(4 μm),HE染色,镜下观察并摄片。参照Myou等[6]的方法分别对肺组织支气管细支气管周围的炎症、血管周围炎症及肺泡周围炎症进行组织学评分。

1.4 CCL20免疫组化检测

一抗选用兔抗小鼠CCL20多克隆抗体(美国Gene Tex公司)。稀释度为1∶200,按照即用型二步法检测试剂盒说明书滴加二抗,二抗为HRP标记羊抗兔IgG多聚体,DAB显色,苏木精复染。阴性对照以PBS代替一抗,其他条件均相同。用NIS-Elements BR 3.2软件分析,结果用肺组织支气管细支气管阳性区域的平均光密度值(mean density)表示。

1.5 CCL20 mRNA表达水平检测

组织研磨仪TissueLyser LT(QIAGEN,德国)将肺组织样品磨碎并匀质化,TRIzol试剂提取肺组织总RNA,紫外分光光度计检测总RNA纯度[$D(260)/D(280)$在1.8~2.0]。按照逆转录试剂盒(TaKaRa,大连宝生物)说明书操作,逆转录合成cDNA,以此为模板行Real-time PCR(SYBR Green Real-time PCR Master Mix,TOYOBO公司,日本)。上、下游引物序列及产物长度见表1(Invitrogen,上海)。GAPDH、CCL20均用荧光定量PCR进行检测。各样本的定量结果均用其相应的GAPDH结果作为CCL20 mRNA相对表达水平。

表1 基因引物序列与产物长度

基因		引物序列(5′→3′)	产物长度(bp)
GAPDH	上游	TCACTGCCACCCAGAAGA	186
	下游	GACGGACACATTGGGGGTAG	
CCL20	上游	GGCAGAAGCAGCAAGCAACTAC	109
	下游	GTCACAAGCTTCATCGGCCA	

1.6 统计学处理

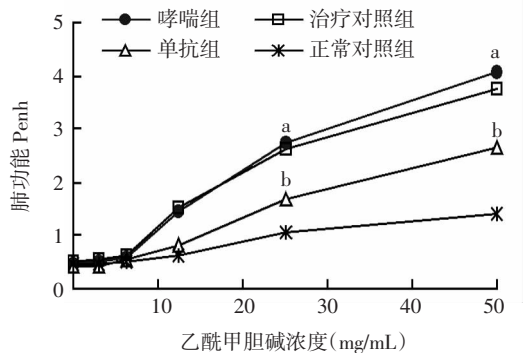
采用SPSS 17.0进行统计分析。数据以$\bar{x}\pm s$表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,方差齐性组间两两比较采用LSD法,方差不齐性则用Dunnett's T3法。

2 结果

2.1 小鼠气道高反应性变化结果

如图1所示,各实验组小鼠的气道阻力均随吸入乙酰甲胆碱质量溶度的增加而呈现上升趋势。在吸入乙酰甲胆碱浓度25~50 mg/mL时,OVA哮喘组小鼠呼吸曲线Penh呈明显增高,与正常对照组相比有显著性差异($P<0.05$)。腹腔注射单

克隆抗体干预后小鼠在吸入乙酰甲胆碱浓度 25 ~ 50 mg/mL 时,呼吸曲线 Penh 与哮喘组相比有显著性降低($P<0.05$)。哮喘组小鼠在乙酰甲胆碱的各个剂量时与治疗对照组相比都未出现显著性差异($P>0.05$)。

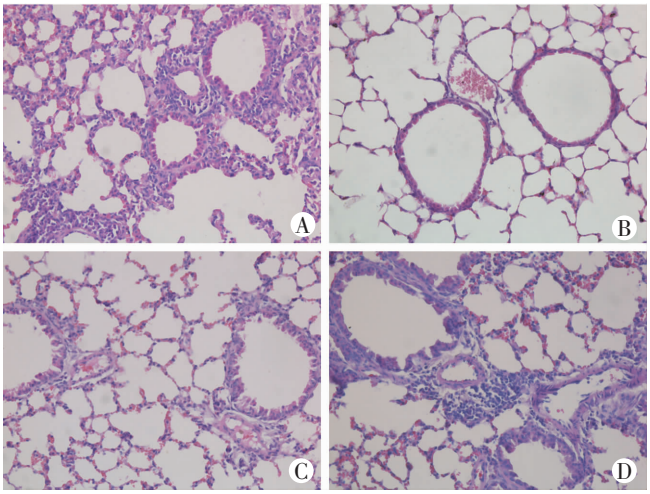


a: $P<0.05$,与正常对照组比较;b: $P<0.05$, 与哮喘组比较

图 1 各组小鼠不同浓度乙酰甲胆碱吸入时 Penh 的变化

2.2 各组小鼠肺组织病理结果

如图 2 和表 2 所示,与正常对照组相比,OVA 雾化激发 7 d 后,哮喘组和治疗对照组小鼠的支气管周围和血管周围有大量的炎症细胞浸润,病理评分均显著增高($P<0.01$)。与哮喘组相比,单抗组小鼠肺组织炎性浸润减轻、病理评分结果降低($P<0.05$)。



A:哮喘组;B:正常对照组;C:单抗组;D:治疗对照组

图 2 HE 染色观察各组小鼠肺组织病理变化 (×200)

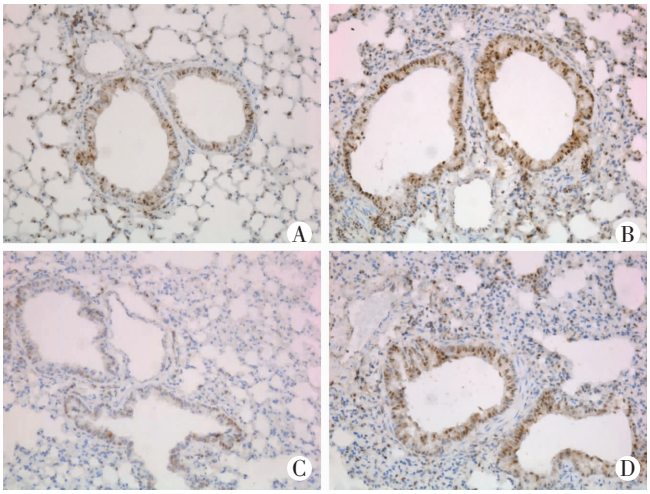
表 2 各组小鼠肺组织病理评分结果 ($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

组别	细支气管周围炎	血管周围炎	肺间质炎症	总分
哮喘组	1.40 ±0.51	1.90 ±0.56	0.60 ±0.51	3.90 ±0.99[a]
正常对照组	0.28 ±0.48	0.28 ±0.48	0.28 ±0.48	0.85 ±0.69
单抗组	0.71 ±0.48	1.00 ±0.57	0.28 ±0.48	2.00 ±0.81[b]
治疗对照组	1.33 ±0.51	1.66 ±0.51	0.83 ±0.75	3.83 ±0.98[a]

a:$P<0.01$,与正常对照组比较;b:$P<0.05$,与哮喘组比较

2.3 免疫组化检测肺组织 CCL20 表达结果

小鼠肺组织 CCL20 主要表达在支气管细支气管上皮细胞,肺泡上皮细胞及支气管周围、血管周围浸润的炎性细胞的胞质和胞核。关于 CCL20 的变化[哮喘组(0.155 ±0.021);正常对照组(0.125 ±0.017);单抗组(0.135 ±0.011);治疗对照组(0.157 ±0.018)]与正常组相比,哮喘组、治疗对照组小鼠肺组织 CCL20 平均光密度值显著升高($P<0.01$);单克隆抗体干预后,支气管细支气管上皮细胞 CLL20 表达显著降低,和哮喘组比较具有显著性差异($P<0.01$),但较正常对照组高表达($P<0.05$,图 3)。



A:哮喘组;B:正常对照组;C:单抗组;D:治疗对照组

图 3 免疫组化观察各组小鼠肺组织 CCL20 变化 (二步法 ×200)

2.4 小鼠肺组织 CCL20 mRNA 表达的变化

CCL20 mRNA 表达水平在哮喘组(1.864 ±0.606)和治疗对照组(2.283 ±0.676)小鼠肺组织匀浆中显著高于正常对照组[(0.828 ±0.278), $P<0.01$]。与哮喘组相比,单抗组(1.821 ±0.255)小鼠肺组织匀浆 CCL20 mRNA 相对表达量无明显改变($P>0.05$)。单抗组较正常对照组相比显著性增高,差异有统计学意义($P<0.01$)。

3 讨论

CCL20 在多种上皮细胞均有表达,包括角质形成细胞、肺上皮细胞和肠上皮细胞等[7-9]。通常情况下,CCL20 处于低的基础水平,但在受到来源于微生物的促炎信号包括细胞因子(如 TNF-α1)和 Toll 样受体(toll-like receptor,TLR)激动剂的刺激后,CCL20 能够被强烈诱导产生[10],如肺部病原体感染期间,上皮细胞增加 CCL20 的产生,导致了 $CCR6^+$ 未成熟 DCs 在肺内的募集[11]。Lundy 等[4]证实了高水平的 CCL20 直接调节常规性 DCs 在肺部的募集和以 Th2 依赖的 T 细胞活化,而缺乏 CCR6 过敏性哮喘小鼠与野生型哮喘小鼠比较气道高反应性减弱。这表明 CCL20/CCR6 通路的激活参与了慢性气道炎症和气道高反应性的发生。研究还发现人类呼吸道上皮细胞(NCI-H292)产生 MUC5AC 黏蛋白是由于 CCL20 与 CCR6 结合后通过金属蛋白酶的 TNF-α-转化酶依赖的表皮生长因子活化来实现[12]。以上提示 CCL20/CCR6 通路可能通过影响免疫细胞的募集、气道黏蛋白的分泌等加重上

皮的炎症反应。本研究 Real-time PCR 与免疫组化检测结果均显示 CCL20 在 OVA 哮喘小鼠肺组织的表达较正常对照组显著增加,表明 CCL20 参与了支气管哮喘的发病过程,CCL20 表达增多很可能也是导致各种免疫细胞向气道上皮细胞聚集的原因之一,气道上皮的免疫紊乱促进了哮喘的形成。

CCL20 单克隆抗体通过干扰 CCL20 的趋化作用,阻断 CCL20/CCR6 通路的激活,在 2,4,6-三硝基苯磺酸诱导的结肠炎[13]和变应性鼻炎[14]中,均证实其存在有效的拮抗作用,Dieu-Nosiean 等[15]通过体外实验发现经 IL-1β 和 TNF-α 干预后,皮肤角质形成细胞分泌大量的 CCL20,能够诱导 CD1a 阳性朗格汉斯细胞前体迁移,但在抗 MIP-3α 存在时这种效应能够被完全的阻断。本研究发现给予单抗治疗后肺组织免疫组化中 CCL20 蛋白表达较哮喘组明显下降($P<0.01$),说明抗鼠 CCL20 单抗在一定程度上阻断了 CCL20 活性,降低了局部 CCL20 蛋白的溶度。Reibman 等[8]研究发现人类支气管上皮细胞 CCL20 的产生受多种促炎性细胞因子 TNF-α、IL-1β 和促变应性细胞因子 IL-4、IL-13 调节,这种调控被认为是通过激活 ERK1/2 和 p38MAPK 通路实现的。本研究中 CCL20 单抗干预后小鼠肺组织 CCL20 蛋白表达量降低,但仍较正常对照组增高,且差异有统计学意义($P<0.05$),OVA 哮喘小鼠与致敏原接触后产生大量的炎性因子降低了单抗介导的中和效应,这一现象是否与该效应相关,仍在进一步研究中。此外,也可能是 CCL20 单抗只能在一定程度上抑制 CCL20 的功能,并不能减少 CCL20 的产生,或者与 CCL20 单抗的给药方式、用药剂量等相关,但其确切的机制还需深入研究。本研究进一步发现给予 CCL20 单克隆抗体能够减轻 OVA 哮喘小鼠模型肺组织病理炎症,降低哮喘小鼠气道阻力,提示抗鼠 CCL20 单抗能够改善哮喘小鼠气道炎症和降低气道高反应,继而有效地抑制小鼠哮喘的发生,可能与抗鼠 CCL20 单抗能够使 CCL20 蛋白在机体内的局部溶度降低有关。

综上所述,本研究通过构建 OVA 哮喘小鼠模型发现 CCL20 在肺组织广泛存在,并且哮喘小鼠肺组织 CCL20 的表达显著高于正常对照组,证明哮喘的形成与肺组织 CCL20 的表达增加有关。用腹腔注射抗鼠 CCL20 单抗,初步揭示了其能够对小鼠体内部分 CCL20 活性的阻断作用,继而有效地抑制哮喘的发生。

下一步还应进一步研究趋化因子在过敏性疾病发病机制中的作用,以及对气道各种炎性细胞的趋化性、胸腺 $CD4^+CD25^+$ 调节性 T 细胞发育与分化的影响等。

参考文献:

[1] Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors [J]. Ann Rev Immunol, 2000, 18: 217 - 242.

[2] Ito T, Carson W F, Cavassani K A, *et al*. CCR6 as a mediator of immunity in the lung and gut[J]. Exp Cell Res, 2011, 317(5): 613 - 619.

[3] Francis J N, Sabroe I, Lloyd C M, *et al*. Elevated $CCR6^+$ $CD4^+$ T lymphocytes in tissue compared with blood and induction of CCL20 during the asthmatic late response[J]. Clin Exp Immunol, 2008, 152 (3): 440 - 447.

[4] Lundy S K, Lira S A, Smit J J, *et al*. Attenuation of allergen-induced responses in $CCR6^{-/-}$ mice is dependent upon altered pulmonary T lymphocyte activation[J]. J Immunol, 2005, 174(4): 2054 - 2060.

[5] 姜小丽, 杨婷, 杨宝辉, 等. 哮喘小鼠中 $Foxp3^+$ Treg/Th17 的失衡及意义[J]. 免疫学杂志, 2013, 29(4): 286 - 290.

[6] Myou S, Leff A R, Myo S, *et al*. Blockade of inflammation and airway hyperresponsiveness in immune-sensitized mice by dominant-negative phosphoinositide 3-kinase-TAT[J]. J Exp Med, 2003, 198(10): 1573 - 1582.

[7] Nakayama T, Fujisawa R, Yamada H, *et al*. Inducible expression of a CC chemokine liver- and activation-regulated chemokine (LARC)/ macrophage inflammatory protein (MIP)-3 alpha/CCL20 by epidermal keratinocytes and its role in atopic dermatitis[J]. Int Immunol, 2001, 13(1): 95 - 103.

[8] Reibman J, Hsu Y, Chen L C, *et al*. Airway epithelial cells release MIP-3alpha/CCL20 in response to cytokines and ambient particulate matter[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003, 28(6): 648 - 654.

[9] Rumbo M, Sierro F, Debard N, *et al*. Lymphotoxin beta receptor signaling induces the chemokine CCL20 in intestinal epithelium[J]. Gastroenterology, 2004, 127(1): 213 - 223.

[10] Schutyser E, Struyf S, Van-Damme J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2003, 14(5): 409 - 426.

[11] Greaves D R, Wang W, Dairaghi D J, *et al*. CCR6, a CC chemokine receptor that interacts with macrophage inflammatory protein 3alpha and is highly expressed in human dendritic cells[J]. J Exp Med, 1997, 186(6): 837 - 844.

[12] Kim S, Lewis C, Nadel J A. CCL20/CCR6 feedback exaggerates epidermal growth factor receptor-dependent MUC5AC mucin production in human airway epithelial (NCI-H292) cells[J]. J Immunol, 2011, 186(6): 3392 - 3400.

[13] Katchar K, Kelly C P, Keates S, *et al*. MIP-3alpha neutralizing monoclonal antibody protects against TNBS-induced colonic injury and inflammation in mice[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007, 292(5): G1263 - G1271.

[14] 武江, 吴建. 趋化因子配体 20 单克隆抗体对小鼠变应性鼻炎的抑制作用[J]. 上海医学, 2011, 34(3): 214 - 217.

[15] Dieu-Nosjean M C, Massacrier C, Homey B, *et al*. Macrophage inflammatory protein 3alpha is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors[J]. J Exp Med , 2000, 192(5): 705 - 718.

(**收稿**:2014-02-19;**修回**:2014-04-14)

(编辑 邓强庭)