DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.04.016
第24卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 4
2002年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2002

文章编号:1000-5404(2002)04-0413-03

论著

腺病毒载体介导CTLA4Ig基因治疗小鼠变应性鼻炎

朱 瑾[1],吴 军[2],易绍萱[2],罗高兴[2],陈希炜[2],郑峻松[2],贺伟峰[2],张 宁[2] (第三军医大学附属西南医院:[1]耳鼻咽喉科;[2]烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 检测CTLA4Ig-重组腺病毒载体(Ad-CTLA4Ig)在变应性鼻炎治疗中的作用。方法 采用卵清蛋白(OVA)致敏和激发诱导小鼠变应性鼻炎。实验组在OVA激发前30 min予以Ad-CTLA4Ig腹腔注射。未转CTLA4IgcDNA的腺病毒载体(Adv)作对照。比较各组动物鼻部症状和鼻粘膜形态学改变,并采用ELISA法测定血清中OVA-特异性IgE水平。结果 CTLA4Ig-重组腺病毒实验组小鼠鼻部症状和鼻粘膜病理改变不明显,并且血清中OVA-特异性IgE水平明显低于对照组($P<0.05$)。结论 Ad-CTLA4Ig可防治小鼠变应性鼻炎的发生,提示CTLA4Ig-重组腺病毒载体有可能运用于临床变应性鼻炎的治疗。

关键词:CTLA4Ig-重组腺病毒载体;变应性鼻炎;IgE
中图法分类号:R373.1;R394.2;R765.210.5 文献标识码:A

Gene therapy for allergic rhinitis with recombinant adenovirus vector containing CTLA4Ig in mice

ZHU Jin, WU Jun, YI Shao-xuan, LUO Gao-xing, CHEN Xi-wei, ZHEN Jun-song, HE Wei-feng, ZHANG Ning (Department of Otorhinolaryngology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To examine the role of recombinant adenovirus vector containing CTLA4Ig gene (Ad-CTLA4Ig) in treatment of induced allergic rhinitis in mice. **Methods** Allergic rhinitis was induced by sensitizing and challenging with ovalbumin(OVA). Ad-CTLA4Ig was intraperitoneally injected 30 min before OVA challenge. Adenovirus vector without inserted CTLA4Ig cDNA served as the control. The symptoms and morphological changes of nasal mucosa of each group were observed, and the serum levels of IgE against OVA were detected with ELISA. **Results** There was no obvious symptom and pathological change in Ad-CTLA4Ig treated group, in which the serum OVA-specific IgE levels were significantly lower than that in control groups($P<0.05$). **Conclusion** Ad-CTLA4Ig prevents and treats allergic rhinitis of mice, which imply the possibility of the usage of Ad-CTLA4Ig for allergic rhinitis in future.

Key words: recombinant CTLA4Ig adenovirus vector; allergic rhinitis; IgE

变应性鼻炎属IgE介导的I型变态反应。其发病率高,严重影响患者的生活质量。过去对变应性鼻炎的治疗主要采用变应原脱敏和激素等药物对症治疗,但疗效欠佳。目前变应性鼻炎的治疗研究的热点是免疫治疗。由于活化的$CD4^+$ T细胞在变应性鼻炎发生发展中的重要作用[1],因此,调控$CD4^+$ T细胞活化增殖是变应性鼻炎免疫治疗的焦点。基因治疗是通过基因传递治疗疾病的一种手段[2]。本实验采用卵清蛋白(OVA)诱导小鼠变应性鼻炎,并通过运用重组腺病毒载体介导CTLA4Ig在体内表达,观察其对鼻部症状、鼻粘膜组织形态和血清IgE的影响,以探索变应性鼻炎免疫和基因治疗的新方法。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

6~8周龄的雄性BALB/c小鼠(第三军医大学实验动物中心)30只,每组10只。CTLA4Ig-重组腺病毒载体(滴度约为5×10^{10}pfu/ml)由本实验室构建[3,4]。未转质粒的腺病毒(Adv)由本实验室提供。所用致敏原卵清蛋白(OVA)购自上海生工。FITC标记的抗小鼠腺病毒抗体、PE标记的抗人CTLA4抗体以及IgE ELISA试剂盒均购自Pharmingen公司。

1.2 OVA致敏、激发以及Ad-CTLA4Ig的干预

采用加入氢氧化铝佐剂的OVA 10 μg腹注致敏,隔日1次,共7次。14 d后,予以20 μl OVA(25 μg/ml)滴鼻激发,每日1次,共7次。实验组(Ad-CTLA4Ig组)在每次激发前30 min腹注2 ml的Ad-CTLA4Ig。腺病毒对照组(Adv组)在相同时相腹注2 ml的Adv。在OVA激发过程中观察小鼠鼻部症状,并在末次激发后12 h从心脏穿刺抽血,静置后取血清备用。同时取鼻腔粘膜组织做常规病理检查。

1.3 鼻组织感染Ad-CTLA4Ig和CTLA4Ig的局部表达

取各组动物鼻粘膜组织冰冻切片,分别用FITC-抗腺病毒抗体和PE-抗CTLA4抗体行免疫组化染色。荧光显微镜观察并照相。

1.4 ELISA法测定血清中OVA特异性IgE

用50 μl/孔OVA(100 μg/ml)加入96孔板覆盖过夜。16 h后每孔加入待测血清200 μl。室温2 h后,脱脂奶封闭液清洗并封闭过夜。PBS/Tween清洗后每孔加入生物素化抗鼠IgE(1∶2 000)100 μl,室温孵育1 h。PBS洗2次后,每孔加入亲合素标记的HRP 100 μl,孵育30 min。DAB显色后测A_{405}。

基金项目:国家自然科学基金资助重大项目(39993430-2);国家科技部重点项目(96-920-20-10);重庆市科委院士基金资助项目(96-901-05-18)及99重点攻关项目资助项目(1999-6-40)
作者简介:朱 瑾(1967-),女,江苏省海门市人,博士研究,主治医师,讲师,主要从事与耳鼻咽喉相关的免疫学的研究,发表论文5篇。电话:(023)68754512
通信作者:吴 军,电话:(023)68754006,E-mail:Junwupro@public.cta.cq.cn
收稿日期:2002-02-05;修回日期:2002-03-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.5 统计学处理

数据结果采用 $\bar{x}\pm s$ 表示，用 SAS 软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 鼻部症状和组织形态学观察

变应性鼻炎模型组（OVA 组）小鼠在激发后出现典型变应性鼻炎症状，如流涕、喷嚏、烦躁等；鼻组织病理切片显示鼻粘膜充血、水肿，可见炎性细胞渗出，见图 1。Adv 组小鼠亦有相似鼻部症状出现，鼻粘膜病理改变与模型组无明显差异。但 Ad-CTLA4Ig 组小鼠鼻部症状不明显，且鼻粘膜病理改变明显减轻，见图 2。

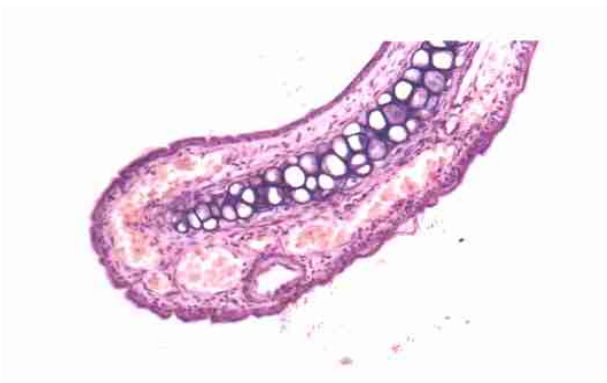


图 1 变应性鼻炎小鼠鼻粘膜组织充血、水肿，可见炎性细胞浸润 （HE× 20）

Fig 1 Congested and swollen nasal mucosa with some inflammatory cells exuded from the vessels in mice with allergic rhinitis （HE× 20）



图 2 **Ad-CTLA4Ig** 实验组小鼠鼻粘膜组织病变不明显 （HE× 20）

Fig 2 No obvious changes in nasal mucosa in mice treated with Ad-CTLA4Ig （HE× 20）

2.2 Ad-CTLA4Ig 局部转染和 CTLA4Ig 局部表达的检测

在荧光显微镜下，通过绿色荧光激发 FITC 后，细胞发出明亮的绿色荧光。此时，可见腹注 Ad-CTLA4Ig 和 Adv 的小鼠鼻粘膜上皮细胞抗腺病毒抗体免疫组化染色呈强阳性，鼻甲软骨呈弱阳性，见图 3；OVA 组未见阳性细胞。在用红色荧光激发后，抗 CTLA4 抗体的 PE 标记受激发，细胞发出明亮的红色。此时，可见 Ad-CTLA4Ig 组小鼠鼻粘膜上皮细胞和血管内皮细胞呈强阳性、鼻甲软骨细胞呈弱阳性，见图 4；OVA 组和 Adv 组均未见阳性染色。

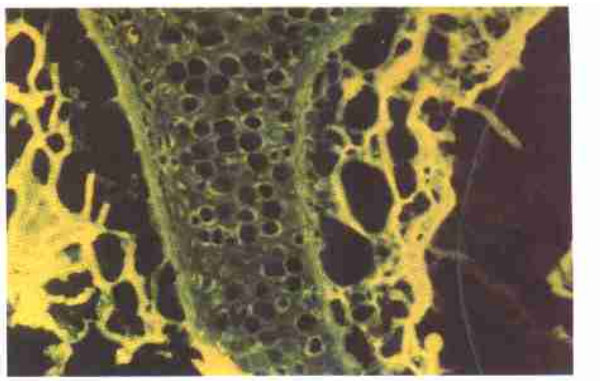


图 3 **Ad-CTLA4Ig** 实验组和 **Adv** 对照组鼻粘膜上皮细胞抗腺病毒抗体免疫荧光染色呈强阳性 （× 40）

Fig 3 Nasal mucosal epitheliums showing strong positive to anti-adenovirous antibody in Ad-CTLA4Ig treated group and Adv group （× 40）

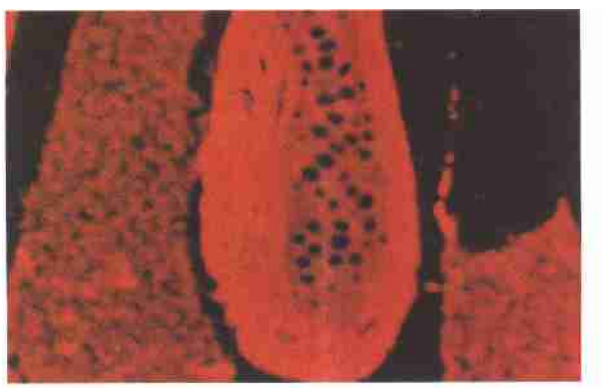
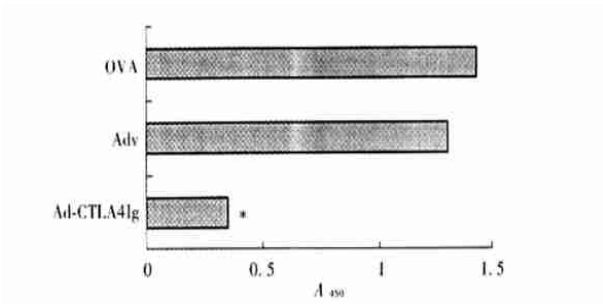


图 4 **Ad-CTLA4Ig** 实验组鼻粘膜上皮细胞、血管内皮细胞抗 **CTLA4** 抗体免疫荧光染色呈强阳性 （× 20）

Fig 4 Nasal mucosal and vascular endothelial cells having strong positive to anti-CTLA4 antibody in Ad-CTLA4Ig treated group （× 20）

2.3 血清 OVA-特异性 IgE 水平

由于没有 IgE 标准品，而理论上 A_{405} 值与血清 IgE 水平呈正相关，因此我们采用所测 A_{405} 值代表血清中 OVA-特异性 IgE 的相对水平。测定结果显示 Ad-CTLA4Ig 组小鼠血清 OVA-特异性 IgE 水平明显低于 OVA 组和 Adv 组（$P<0.05$），而后二者间无显著性差异（$P>0.05$），见图 5。



A_{405} values（$\bar{x}\pm s$）were used to represent the levels of serum OVA-specific IgE. *: Denotes values significantly different from those of other two groups（$P<0.05$）

图 5 **Ad-CTLA4Ig** 对血清 **OVA-特异性 IgE** 水平的影响

Fig 5 Effects of Ad-CTLA4Ig on serum OVA-specific IgE levels

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨论

特异性抗原进入特应性个体, 产生特异性 IgE 抗体, 附着于肥大细胞和嗜碱性细胞表面, 机体处于致敏状态, 当相同的抗原再次进入, 与 IgE 结合, 使肥大细胞脱颗粒, 释放一系列炎性介质, 引起毛细血管扩张、嗜酸性细胞浸润等速发反应。之后 8 ~ 24 h 症状复发, 出现迟发相反应, 而这种反应受活化的 $CD4^+$ T 细胞的调控[5]。有学者认为在整个变应性疾病的发生中活化的 $CD4^+$ T 细胞起着始发和关键的作用[1,6]。变应原诱导 Th2 细胞增殖活化, 并释放相应的细胞因子, 介导了 IgE 和浆细胞的生成以及嗜酸性细胞的渗出, 并最终引起一系列的临床症状。因此, 目前对变应性鼻炎的治疗研究的焦点是调控 $CD4^+$ T 细胞的活化。$CD4^+$ T 细胞的活化除需要抗原递呈细胞(APC)提供的抗原肽-MHC 复合物与 T 细胞上的受体 TCR 结合外, 还需要第二信号系统的参与。目前发现的最重要的第二信号由 APC 上的 B7 家族分子与 T 细胞上 CD28 结合而形成。生理条件下 CTLA4 分子能以比 CD28 强 20 倍以上的结合力竞争性结合 B7 分子, 产生负面信号使 T 细胞活化障碍[7,8]。已有研究证实 CTLA4Ig 融合蛋白和 CTLA4Ig-腺病毒载体可通过阻断 T 细胞活化从而降低移植排斥反应和自身免疫性疾病的发生[3,9]。

本实验中采用重组腺病毒载体介导的 CTLA4Ig 进行基因治疗。重组腺病毒载体由于缺乏腺病毒复制所必须的 E1 元件而不能在一般细胞中自我复制, 具有一定的安全性。实验中, 我们通过抗腺病毒抗体免疫荧光染色, 证实了 CTLA4Ig-腺病毒载体腹腔注射后可高效转染至鼻粘膜。这与我们在实验前的预想相吻合。因为腺病毒载体对细胞的感染能力依赖于病毒表面纤毛与其相应受体的结合, 由于鼻粘膜中有较多的腺病毒受体, 从而易感染 CTLA4Ig-腺病毒载体。另外, 通过抗 CTLA4 抗体的免疫荧光染色, 亦进一步证实腺病毒载体介导的 CTLA4Ig 可在小鼠鼻粘膜中高效表达。

过去通常认为血清 IgE 水平能反应变应性疾病的发病程度, 从而使减少血清 IgE 水平一度成为变应性疾病免疫治疗的目标[10]。为此, 本实验选用血清抗原特异性 IgE 作为疗效观察指标。实验结果证实血清 OVA-特异性 IgE 水平在用 CTLA4Ig-腺病毒载体治疗组明显降低, 与相应的鼻粘膜形态学观察吻合, 这说明血清抗原特异性 IgE 可作为反映变应性疾病严重程度和免疫治疗疗效的指标。同时, 本实验结果亦证实 CTLA4Ig-腺病毒载体可防治小鼠变应性疾病发生。CTLA4在作用中仅阻断结合了 APC 提供的抗原肽-MHC 复合物的 T 细胞的活化, 可诱导特异性免疫耐受, 而不影响机体全身的免疫功能。因此, CTLA4-腺病毒载体在治疗变应性鼻炎中的疗效具有持久性和安全性的优点。这为 CTLA4Ig-腺病毒载体进一步运用于临床变应性鼻炎的基因治疗提供了实验依据。

参考文献:

[1] Benson M, Adner M, Cardell L O. Cytokines and cytokine receptors in allergic rhinitis: how do they relate to the Th2 hypothesis in allergy [J]. Clin Exp Allergy, 2001, 31(1): 361－367.

[2] 王　飚, 宣海星. 基因治疗的现状与展望[J]. 生命科学, 2000, 12(2): 68－71.

[3] 罗高兴, 吴　军, 易绍萱, 等. 重组腺病毒载体局部介导 CTLA4Ig 延长小鼠异体移植皮肤的存活[J]. 中华烧伤杂志, 2000, 16(1): 37－39.

[4] 易绍萱, 吴　军, 姜　庆, 等. 人 CTLA4 胞外区 cDNA 的克隆及 Ig 融合蛋白表达载体的构建[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(9): 834－837.

[5] Van Neerven R J. The role of allergen-specific T cells in the allergic immune response: relevance to allergy vaccination [J]. Allergy, 1999, 54(6): 552－561.

[6] Baraniuk J N. Pathogenesis of allergic rhinitis[J]. J Allergy Clin Immunol, 1997, 99(2): s763－s772.

[7] Waterhouse P, Marengere L E, Mittrucker H W, *et al*. CTLA-4, a negative regulator of T-lymphocyte activation [J]. Immunol Rew, 1996, 153(1): 181－207.

[8] Greenfield E A, Nguyen K A, Kuchroo V K. CD28/B7 costimulation: a review[J]. Crit Rev Immunol, 1998, 18(5): 389－418.

[9] Comoli P, Locatelli F, Moretta A, *et al*. Human alloantigen-specific anergic cells induced by a combination of CTLA4-Ig and CsA maintain anti-leukemia and anti－viral cytotoxic response [J]. Bone Marrow Transplant, 2001, 27(12): 1 263－1 273.

[10] Coyle A, Wagner C, Bertrand S, *et al*. Central role of immunoglobulin (Ig) E in the induction of lung eosinophil infiltration and T helper 2 cell cytokine production: inhibition by a non-anaphylactogenic anti-IgE antibody [J]. J Exp Med, 1996, 183(4): 1 303－1 310.

(编辑　王　红)

(上接 409 页)

结果证实为膀胱突出憩室, 随后切除膀胱憩室, 行耻骨上膀胱造瘘术。阴囊内置橡皮片引流。折叠缝合内环口, 以 Bassini 法行疝修补术。术后恢复顺利, 3 周后痊愈出院。

讨论

滑疝少见, 巨大滑疝在临床上更为少见。文献[1]报道滑疝占腹股沟疝的 3%左右。本例患者由于病程长, 疝内容物不断进入疝囊产生的下坠力将囊颈的腹膜渐渐推向疝囊, 并同时使盲肠(包括阑尾)及膀胱成为疝囊壁的一部分。膀胱滑疝患者常有尿频、尿急和尿痛, 以及排尿后包块缩小的病史, 但本例患者无类似情况。B 型超声检查未能提示膀胱憩室, 可能是膀胱未充盈。我们术中发现疝囊前内侧壁增厚, 考虑有膀胱滑疝, 并将疝囊壁与膀胱分离。术中穿刺未抽出尿液, 与未从尿管注入液体充盈膀胱有关。本例患者膀胱滑疝已形成较大憩室, 临床少见。滑疝的处理, 最好术前能诊断出来, 术中应熟悉腹股沟区的解剖, 操作仔细, 层次清楚, 避免术后出现并发症。

关键词: 疝; 腹股沟
中图法分类号: R656.21　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 陈佳平. 巨大滑疝的修复[J]. 中国修复重建外科杂志, 1994, 8(3): 159－160.

(编辑　汪勤俭)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net