

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.15.018

抗补体 5a 受体抗体对变应性鼻炎大鼠 Treg/Th17 免疫失衡的调控作用

刘玉娟¹, 吴云霄², 魏燕高^{1△}

杨凌示范区医院; 1. 耳鼻喉科; 2. 神经内科, 陕西咸阳 712100

摘要:目的 探究抗补体 5a 受体(C5aR)抗体对变应性鼻炎(AR)大鼠调节性 T 细胞(Treg)/辅助 T 淋巴细胞 17(Th17)免疫失衡的调控作用及机制初探。方法 60 只 Wistar 大鼠随机分为对照组、模型组、抗 C5aR 抗体组、抗 C5aR 抗体+Jagged1 组, 每组 15 只, 除对照组外, 其余各组大鼠均用卵清蛋白(OVA)和氢氧化铝[Al(OH)₃]致敏法建立 AR 模型。造模成功后, 抗 C5aR 抗体组腹腔注射 10 mg/kg 抗 C5aR 抗体, 抗 C5aR 抗体+Jagged1 组腹腔注射 10 mg/kg 抗 C5aR 抗体和 5 μL 的 10 μg/mL Jagged1 钛, 对照组和模型组注射等体积的生理盐水, 每周注射 1 次, 持续 4 周。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清免疫球蛋白 E(IgE)、干扰素-γ(IFN-γ)、白细胞介素(IL)-6、IL-10 和 IL-17 水平, HE 染色和 PAS 染色观察鼻腔黏膜组织嗜酸性粒细胞与杯状细胞数目, 免疫组织化学染色检测 Notch1 表达, Western blot 检测 RORγt、Foxp3、Notch1 及 Jagged1 蛋白表达, 流式细胞术检测外周血 Treg 和 Th17 亚群比例。结果 各处理组大鼠建模后表观行为学评分明显高于对照组($P<0.05$); 与对照组比较, 模型组血清中 IgE 水平升高, IFN-γ、IL-10 水平下降, IL-6、IL-17 水平升高, 鼻腔黏膜组织中嗜酸性细胞粒数目和杯状细胞数目增加, RORγt 蛋白表达上调, Foxp3 蛋白表达则下调, Th17 细胞比例增加, Treg 细胞比例减少, Th17/Treg 比值上升, Notch1 与 Jagged1 蛋白表达升高, 差异均有统计学意义($P<0.05$); 与模型组比较, 抗 C5aR 抗体组血清 IgE 水平下降, IFN-γ、IL-10 水平升高而 IL-6、IL-17 水平下降, 鼻腔黏膜组织中嗜酸性细胞粒数目和杯状细胞数目减少, RORγt 蛋白表达下调, Foxp3 蛋白表达上调, Th17 细胞比值减少, Treg 细胞比例增加, Th17/Treg 比例降低, Notch1 与 Jagged1 蛋白表达降低, 差异均有统计学意义($P<0.05$); 而相较于抗 C5aR 抗体组, 经过抗 C5aR 抗体与 Jagged1 肽作用的大鼠, 各检测指标改善情况又受到明显抑制, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 抗 C5aR 抗体可改善 AR 大鼠的症状, 并且可调节机体内 Treg/Th17 免疫平衡, 抑制 Notch1-Jagged1 信号途径的激活。

关键词: 变应性鼻炎; 抗补体 5a 受体; 调节性 T 细胞; 辅助 T 淋巴细胞 17**中图法分类号:** R446.6**文献标志码:** A**文章编号:** 1672-9455(2022)15-2091-07

Regulation of anti-complement 5a receptor antibody on Treg/Th17 immune imbalance in rats with allergic rhinitis

LIU Yujuan¹, WU Yunxiao², WEI Yangao^{1△}

1. Department of Otolaryngology; 2. Department of Internal Medicine-Neurology, Yangling Demonstration Area Hospital, Xianyang, Shaanxi 712100, China

Abstract: **Objective** To explore the regulation and mechanism of anti-complement 5a receptor (C5aR) antibody on regulatory T cells/helper T lymphocytes 1 (Treg/Th17) immune imbalance in rats with allergic rhinitis (AR). **Methods** A total of 60 Wistar rats were randomly divided into control group, model group, anti-C5aR antibody group, anti-C5aR antibody + Jagged1 group, 15 rats in each group. Except for the control group, all rats in the other groups were treated with ovalbumin (OVA) and aluminum hydroxide [Al(OH)₃] sensitization method to establish AR model. After successful modeling, the anti-C5aR antibody group was intraperitoneally injected with 10 mg/kg anti-C5aR antibody, and the anti-C5aR antibody + Jagged1 group was intraperitoneally injected with 10 mg/kg anti-C5aR antibody and 5 μL of 10 μg/mL Jagged1 titanium, and the control and model groups were injected an equal volume of normal saline was injected once a week for 4 weeks. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to detect serum immunoglobulin E (IgE), interferon-γ (IFN-γ), interleukin (IL)-6, IL-10 and IL-17 levels, HE staining and PAS staining were used to observe the number of eosinophils and goblet cells in nasal mucosa tissue, immunohistochemical staining was used to detect Notch1 expression, Western blot was used to detect RORγt, Foxp3, Notch1 and Jag-

作者简介: 刘玉娟, 女, 主治医师, 主要从事耳鼻咽喉相关研究。△ 通信作者, E-mail: weiyangao687364@126.com。

网络首发 <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20220722.1903.012.html> (2022-07-25)

ged1 protein expression, and flow cytometry was used to detect the proportion of peripheral blood Treg and Th17 subsets. **Results** The behavioral scores of rats in each treatment group after modeling were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$); compared with the control group, the serum IgE level in the model group increased, the IFN- γ and IL-10 levels decreased, and the IL-6 and IL-17 levels increased, the number of eosinophil granules and goblet cells in the nasal mucosa tissue increased, the expression of ROR γ t protein was up-regulated, and the expression of Foxp3 protein was down-regulated, the proportion of Th17 cells increased, the proportion of Treg cells decreased, and the ratio of Th17/Treg increased, the expression of Notch1 and Jagged1 protein increased, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the model group, serum IgE levels in the anti-C5aR antibody group decreased, IFN- γ , IL-10 levels increased while IL-6, IL-17 levels decreased, and the number of eosinophil granules and goblet cells in the nasal mucosa tissue decreased, ROR γ t protein expression was down-regulated, Foxp3 protein expression was up-regulated, the proportion of Th17 cells decreased, the proportion of Treg cells increased, Th17/Treg ratio decreased, Notch1 and Jagged1 protein expression decreased, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the anti-C5aR antibody group, the rats treated with anti-C5aR antibody and Jagged1 peptide showed significant inhibition of the improvement of each detection index, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Anti-C5aR antibody could improve the symptoms of AR rats, regulate the immune balance of Treg/Th17 in the body, and inhibit the activation of Notch1-Jagged1 signal pathway.

Key words: allergic rhinitis; anti-complement 5a receptor; regulatory T cells; helper T lymphocytes 17

变应性鼻炎(AR)是一种 I 型过敏性免疫球蛋白 E(IgE)依赖型鼻黏膜疾病,由吸入的过敏原包括尘螨、花粉和动物皮屑等引起^[1]。AR 对患者生活质量产生了较大影响,也给社会医疗服务造成了一定负担,现已成为全世界重大公共卫生问题^[2-3]。目前,AR 的发病机理尚未完全阐明。有研究表明,在多数情况下运用抗组胺药和皮质类固醇激素可以减轻 AR 症状^[4],但是,耐药性的产生使 AR 患者难以治愈。因此,迫切需要开发新颖且有效的药物来治疗 AR。

补体 C5a 是活化的补体系统 C5 裂解后的小片段产物,其能够促进炎症因子的释放,通过与特定的补体 5a 受体(C5aR)结合发挥作用,已有研究表明,C5a 激活后参与多种疾病反应,例如系统性红斑狼疮、败血症、缺血再灌注损伤和类风湿关节炎等^[5-7]。目前,靶向 C5a 和 C5aR 开发抗体以及小分子化合物已成为多种疾病的治疗靶点,其中,抗 C5aR 抗体是 C5a 拮抗剂,可抑制 C5a 的活性从而减轻炎症反应。为了探索抗 C5aR 抗体对 AR 的作用,本研究以构建的大鼠 AR 模型为研究对象,观察抗 C5aR 抗体施用后的效果,为临床 AR 的治疗提供实验依据。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料来源 60 只无特定病原体(SPF 级)Wistar 大鼠,雌雄各 30 只,4~6 周龄,体质量 160~220 g,由本院 SPF 级动物实验中心提供,饲养于标准动物环境条件下,实验期间自由饮水、摄食。

1.2 仪器与试剂 抗 C5aR 抗体购自上海吉尔生物化学有限公司,Jagged1 肽、卵清蛋白(OVA)和氢氧化铝[Al(OH)₃]干粉购自美国 Sigma 公司,酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自南京建成生物工程研究所,HE 染色试剂盒、PAS 染色试剂盒和免疫组织化学染色试剂购自武汉博士德生物公司,抗体

Notch1、Jagged1、ROR γ t、Foxp3 购自美国 Cell Signaling 公司,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔/山羊抗鼠和 β -actin 购自北京康为世纪生物科技有限公司,BCA 蛋白检测试剂盒和增强化学发光法(ECL)发光液购自上海碧云天生物研究所。

1.3 方法

1.3.1 大鼠 AR 模型制备 建立 Wistar 大鼠 AR 模型,具体按照参考文献[8]方法操作。首先进行基础致敏,将 0.3 mg OVA 和 30 mg Al(OH)₃ 加入 1 mL 的生理盐水混合均匀,制成混悬液,通过腹腔注射,隔日注射 1 次,共注射 7 次,用时 14 d,同时对照组大鼠腹腔注射等量生理盐水;接着进行鼻腔激发,致敏后的大鼠取 2%OVA 进行滴鼻,采用微量进样器从鼻腔滴入,每侧滴入 50 μ L,每天 1 次,连续 7 d,对照组以等量生理盐水滴入鼻腔。末次鼻腔激发后,进行表观行为学指标评估大鼠 AR 模型是否造模成功,观察 30 min 内大鼠喷嚏、鼻溢和搔鼻动作行为,采用叠加量化计分,具体为(1)喷嚏:1~4 个为 1 分,>4~10 个为 2 分,>10 个为 3 分;(2)流鼻涕:流至鼻孔前为 1 分,流出鼻孔为 2 分,流至面部计为 3 分;(3)挠痒:单前肢偶有挠鼻为 1 分,双前肢挠鼻为 2 分,双前肢不停挠鼻为 3 分。叠加评分总分>5 分,判断为造模成功。

1.3.2 分组与给药 将 60 只 Wistar 大鼠按照随机数字表法分为 4 组,包括对照组、模型组、抗 C5aR 抗体组、抗 C5aR 抗体+Jagged1 组,每组 15 只。除对照组外其余 3 组大鼠均建立 AR 模型,对照组予以生理盐水处理。造模完成后,抗 C5aR 抗体组大鼠腹腔注射 20 μ L 抗 C5aR 抗体(10 μ g/mL),抗 C5aR 抗体+Jagged1 组大鼠腹腔注射 20 μ L 抗 C5aR 抗体(10 mg/kg),同时注射 5 μ L Jagged1 肽(10 μ g/mL),对照组和模型组注射等体积的生理盐水,每周注射 1

次,共持续 4 周。

1.3.3 ELISA 断颈法处死各组大鼠,通过眼眶采血,将收集的血液静置于室温下 2 h,接着以 4 000 r/min 离心 15 min,分离血清,保存在-80 ℃冰箱中。使用大鼠特异性 ELISA 试剂盒检测血清中 IgE、干扰素-γ(IFN-γ)、白细胞介素(IL)-6、IL-10 和 IL-17 的水平,步骤严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.3.4 HE 染色 处死大鼠后分离鼻骨前皮肤,咬除鼻骨,取双侧鼻腔黏膜组织,迅速清洗干净,置于 4% 多聚甲醛中固定;将固定好的组织常规石蜡包埋,在切片机上切成 5 μm 的组织薄片,通过 HE 染色观察组织学改变。步骤包括:组织切片采用二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,加入苏木精染色 5 min,流水冲洗干净,再加入伊红染色 3 min,流水再次冲洗干净,利用梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,通过光学显微镜观察鼻腔黏膜组织形态变化,并随机选择 6 个不同视野观察计数嗜酸性粒细胞数目,取平均值作为结果。

1.3.5 PAS 染色 取制备的鼻腔黏膜组织石蜡切片,二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱水后,将切片置于阿利新蓝溶液中浸泡 10 min,流水冲洗干净,置于过碘酸溶液中氧化 5 min,接着浸入 Leagene Schiff Reagent 中染色 10 min,流水冲洗后,通过 Mayer Lillie 苏木素染色液染核,酸性乙醇分化,加入氨水溶液返蓝,洗净后,再次进行脱水与透明处理,中性树胶封片,通过光学显微镜观察鼻腔黏膜组织染色情况,并随机选择 6 个不同视野观察计数杯状细胞数目,取平均值作为结果。

1.3.6 免疫组织化学染色 鼻腔黏膜组织石蜡切片经过二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱水后,置于 0.3% 过氧化氢中 30 min,并通过高温(98 ℃)加热 5 min 进行抗原修复,接着加入山羊血清,室温孵育 1 h,将切片与兔抗 Notch1(1:200)一抗工作液,在 4 ℃ 共同孵育过夜。PBS 缓冲液清洗,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(1:5 000)二抗工作液,在室温下孵育 1 h,在切片上滴加 DAB 显色,自来水清洗干净,加苏木素复染,二甲苯透明,中性树胶封片,在光学显微镜下观察组织中阳性表达并捕获图像,胞质染成黄色至棕色即为阳性,随机选择 6 个视野,采用 Image-Pro Plus 软件统计阳性表达面积。

1.3.7 Western blot 将鼻腔黏膜组织充分剪碎,PBS 缓冲液清洗干净,加入 RIPA 裂解缓冲液提取组织总蛋白,通过 BCA 法测定蛋白质含量。以 30 μg 各组蛋白样品加样,通过 10% SDS-PAGE 凝胶分离蛋白质,转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉中室温封闭 2 h,TBST 洗膜,加入 RORγt(1:1 000)、Foxp3(1:1 000)、Notch1(1:1 000)与 Jagged1(1:1 000)一抗工作液,以 β-actin 作为内参蛋白(1:1 000),4 ℃ 下孵育过夜。次日,TBST 洗膜,加入对应的辣根过氧化物酶标记二抗工作液(1:5 000),室温下孵育 1 h,

TBST 洗膜后,滴加 ECL 发光液显色曝光,凝胶成像系统拍照,Image Pro-Plus 分析系统分析蛋白条带灰度值,计算各蛋白表达水平。

1.3.8 流式细胞术分析外周血 CD4⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞(Treg 细胞)和 CD4⁺IL-17A⁺ 辅助性 T 细胞 17(Th17 细胞)百分比 采集各组小鼠外周血,流式细胞仪检测 Treg、Th17 细胞比例,取肝素抗凝血,在避光条件下加入抗体,Treg 细胞以 CD4/Foxp3 标记,Th17 细胞以 CD4/IL-17A 标记,室温孵育 15 min,接着加入 500 μL 裂解液,轻轻混匀,室温避光孵育 10 min,加入 1.5 mL PBS 缓冲液,置于离心机中以 2 500 r/min 离心 10 min,弃上清液后加入 PBS 缓冲液轻轻混匀,立即通过流式细胞仪进行分析。

1.4 统计学处理 使用 SPSS20.0 软件进行数据处理及统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间数据比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验;计数资料采用频数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 建模后 4 组大鼠表观行为学评分比较 末次鼻腔激发后,4 组大鼠 30 min 内喷嚏、鼻溢和搔鼻动作行为的评分结果见表 1。对照组大鼠未见明显的喷嚏与流涕表现,偶有抓鼻;而模型组、抗 C5aR 抗体组和抗 C5aR 抗体+Jagged1 组的大鼠均表现出烦躁不安,打喷嚏、流涕以及频繁抓鼻等现象,表观行为学评分均高于 5 分,且明显高于对照组($P < 0.05$),说明 AR 模型构建成功。

表 1 4 组大鼠表观行为学评分比较($\bar{x} \pm s$,分)

组别	<i>n</i>	行为学评分
对照组	15	0.53±0.03
模型组	15	7.80±0.86 [#]
抗 C5aR 抗体组	15	7.54±0.79 [#]
抗 C5aR 抗体+Jagged1 组	15	7.76±0.80 [#]

注:与对照组比较,[#] $P < 0.05$ 。

2.2 4 组大鼠血清 IgE 水平比较 模型组大鼠血清中 IgE 水平明显低于对照组($P < 0.05$);抗 C5aR 抗体组 IgE 水平较模型组明显升高($P < 0.05$);抗 C5aR 抗体+Jagged1 组 IgE 水平高于抗 C5aR 抗体组($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 4 组大鼠血清 IgE 水平比较($\bar{x} \pm s$,μg/L)

组别	<i>n</i>	IgE
对照组	15	182.34±14.52
模型组	15	23.12±1.89 [*]
抗 C5aR 抗体组	15	69.04±5.78 [#]
抗 C5aR 抗体+Jagged1 组	15	171.90±14.77 ^{&}

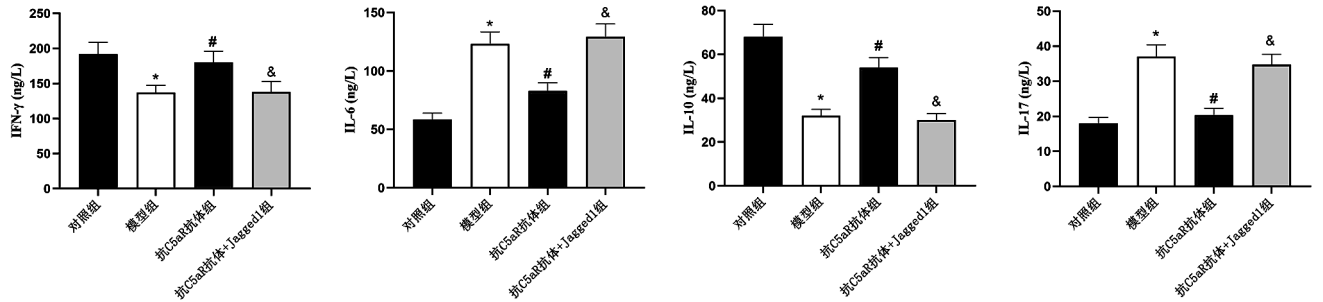
注:与对照组比较,^{*} $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$;与抗 C5aR 抗体组比较,[&] $P < 0.05$ 。

2.3 4 组大鼠血清 IFN-γ、IL-6、IL-10 和 IL-17 水平比较 与对照组比较,模型组血清 IFN-γ、IL-10 水平明显下降,IL-6、IL-17 水平明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,抗 C5aR 抗体组 IFN-γ、IL-10 水平明显升

高,而 IL-6、IL-17 水平明显下降($P<0.05$);与抗 C5aR 抗体组比较,抗 C5aR 抗体+Jagged1 组 IFN- γ 、IL-10 水平明显下降,同时 IL-6、IL-17 水平明显升高($P<0.05$),见图 1。

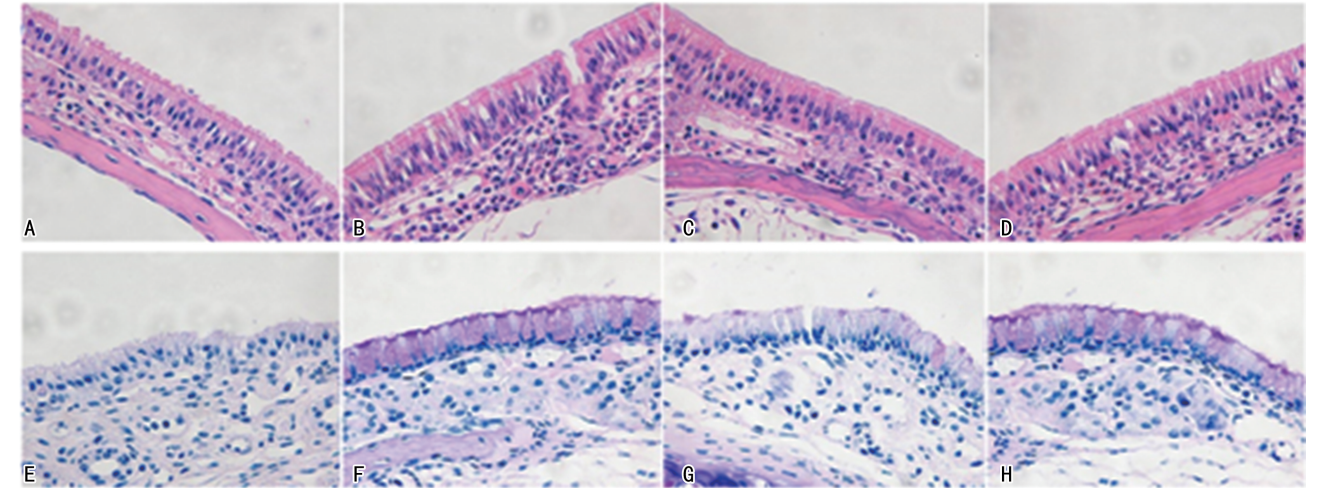
2.4 4 组大鼠鼻腔黏膜组织病理学变化比较 HE 染色和 PAS 染色结果显示,对照组大鼠鼻腔黏膜组织结构整齐、排列有序,未发现组织损伤;模型组大鼠鼻腔黏膜组织可见明显的血管扩张、水肿和严重炎症性

细胞浸润,嗜酸性细胞粒数目和杯状细胞数目均明显增加;抗 C5aR 抗体组鼻腔黏膜组织仍有水肿,相较于模型组炎症细胞浸润程度减轻,嗜酸性细胞粒数目和杯状细胞数目均减少;而与抗 C5aR 抗体组相比较,抗 C5aR 抗体+Jagged1 组鼻腔黏膜组织水肿和炎性细胞浸润较为严重,嗜酸性细胞粒数目和杯状细胞数目也表现为增加,见图 2。



注:A~D 分别为 4 组 IFN- γ 、IL-6、IL-10 和 IL-17 水平比较;与对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与抗 C5aR 抗体组比较,& $P<0.05$ 。

图 1 ELISA 检测各组大鼠血清 IFN- γ 、IL-6、IL-10 和 IL-17 水平



注:A 为对照组大鼠鼻腔黏膜组织 HE 染色,B 为模型组大鼠鼻腔黏膜组织 HE 染色,C 为抗 C5aR 抗体组大鼠鼻腔黏膜组织 HE 染色,D 为抗 C5aR 抗体+Jagged1 组大鼠鼻腔黏膜组织 HE 染色,E 为对照组大鼠鼻腔黏膜组织 PAS 染色,F 为模型组大鼠鼻腔黏膜组织 PAS 染色,G 为抗 C5aR 抗体组大鼠鼻腔黏膜组织 PAS 染色,H 为抗 C5aR 抗体+Jagged1 组大鼠鼻腔黏膜组织 PAS 染色。

图 2 各组大鼠鼻腔黏膜组织病理学变化观察(400 $\times$)

2.5 4 组大鼠鼻腔黏膜组织 ROR γ t 与 Foxp3 表达比较 Western blot 检测结果显示,模型组鼻腔黏膜组织中 ROR γ t 蛋白表达较对照组明显上调,Foxp3 蛋白表达则明显下调($P<0.05$);与模型组比较,抗 C5aR 抗体组 ROR γ t 蛋白表达明显下调、Foxp3 蛋白表达明显上调($P<0.05$);而相较于抗 C5aR 抗体组,抗 C5aR 抗体+Jagged1 组 ROR γ t 蛋白表达明显上调,Foxp3 蛋白表达明显下调($P<0.05$),见图 3。

2.6 4 组大鼠外周血 Treg 细胞和 Th17 细胞亚群比例分析 流式细胞术检测结果显示,与对照组比较,模型组外周血中 Th17 细胞比例升高,Treg 细胞比例降低,Th17/Treg 比值明显增加($P<0.05$);与模型

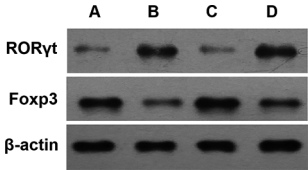
组比较,抗 C5aR 抗体组 Th17 细胞比例降低而 Treg 细胞比例升高,Th17/Treg 比值明显下降($P<0.05$);而相较于抗 C5aR 抗体组,抗 C5aR 抗体+Jagged1 组 Th17 细胞比例升高,Treg 细胞比例降低,同时,Th17/Treg 比值明显增加($P<0.05$),见图 4。

2.7 4 组大鼠鼻腔黏膜组织 Notch1-Jagged1 信号途径相关蛋白表达比较 通过免疫组织化学染色结果可观察到,对照组鼻腔黏膜组织中染色较浅,Notch1 蛋白阳性表达率为(8.50% $\pm$ 0.66%);模型组中染色较深,Notch1 蛋白阳性表达率为(38.03% $\pm$ 3.15%),较对照组明显增加($P<0.05$);抗 C5aR 抗体组中染色明显变浅,Notch1 蛋白阳性表达率为(8.47% $\pm$

0.70%),较模型组明显降低($P<0.05$);而抗 C5aR 抗体+Jagged1 组染色又明显加深,Notch1 蛋白阳性表达率为(43.55%±3.89%),相较于抗 C5aR 抗体组明显增加($P<0.05$),见图 5。

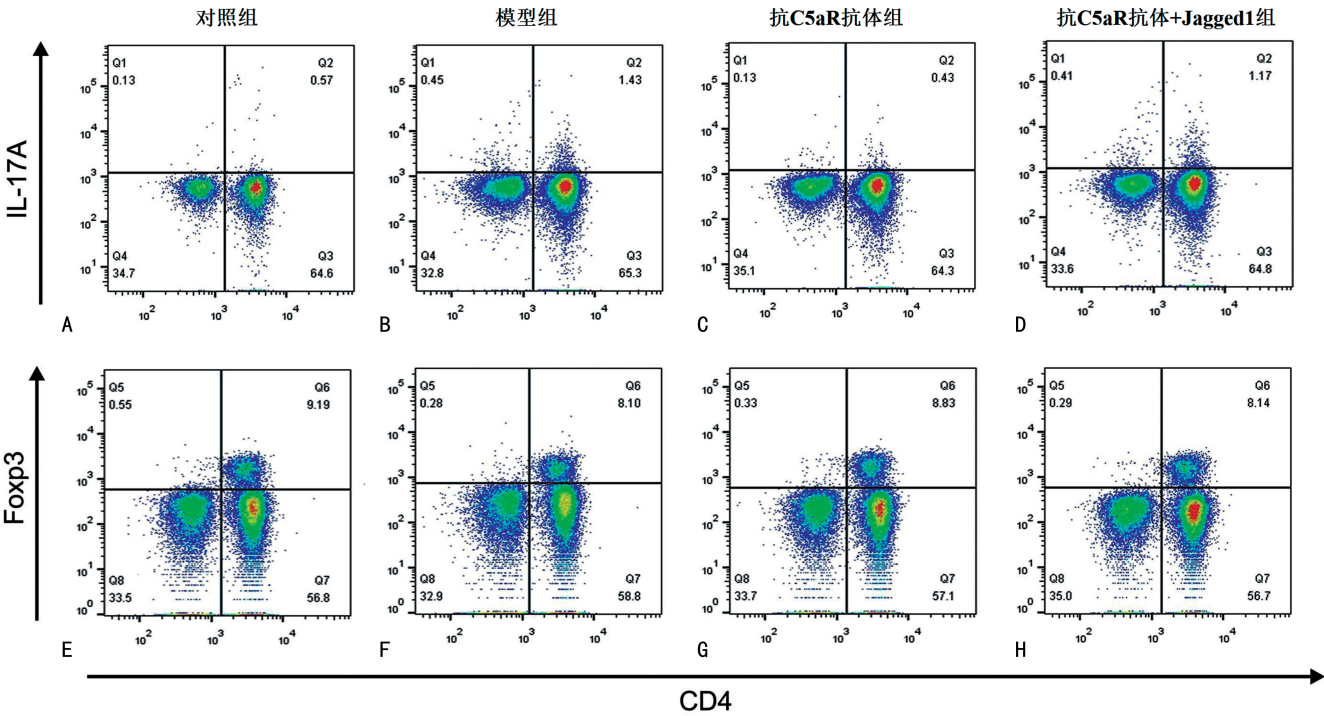
Western blot 检测结果显示,与对照组比较,模型组鼻腔黏膜组织中 Notch1 与 Jagged1 蛋白表达明显升高($P<0.05$);与模型组比较,抗 C5aR 抗体组鼻腔黏膜组织中 Notch1 与 Jagged1 蛋白表达则明显下降($P<0.05$);而抗 C5aR 抗体+Jagged1 组 Notch1 与 Jagged1 蛋白表达较抗 C5aR 抗体组则明显升高($P<$

0.05),见图 6。



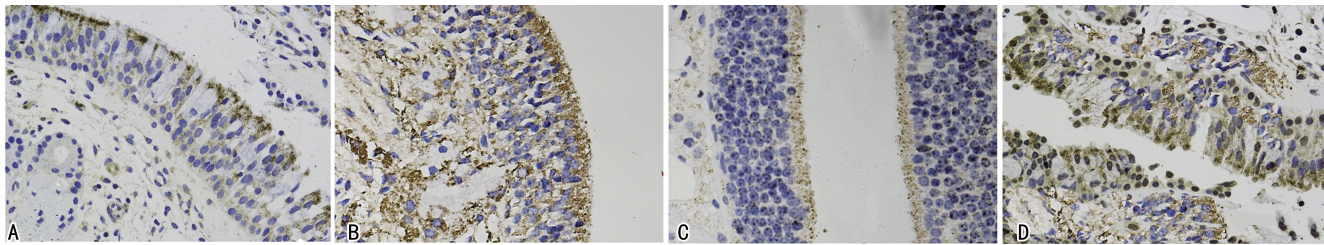
注:A 为对照组,B 为模型组,C 为抗 C5aR 抗体组,D 为抗 C5aR 抗体+Jagged1 组。

图 3 Western blot 检测鼻腔黏膜组织中 RORγt 与 Foxp3 蛋白表达



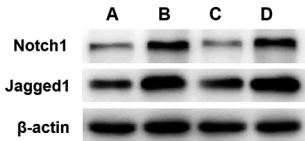
注:A 为对照组大鼠外周血中 Th17 细胞比例,B 为模型组大鼠外周血中 Th17 细胞比例,C 为抗 C5aR 抗体组大鼠外周血中 Th17 细胞比例,D 为抗 C5aR 抗体+Jagged1 组大鼠外周血中 Th17 细胞比例,E 为对照组大鼠外周血 Treg 细胞比例,F 为模型组大鼠外周血 Treg 细胞比例,G 为抗 C5aR 抗体组大鼠外周血 Treg 细胞比例,H 为抗 C5aR 抗体+Jagged1 组大鼠外周血 Treg 细胞比例。

图 4 流式细胞术检测 Treg 细胞和 Th17 细胞亚群比例



注:A 为对照组大鼠鼻腔黏膜组织 Notch1 蛋白染色,B 为模型组大鼠鼻腔黏膜组织 Notch1 蛋白染色,C 为抗 C5aR 抗体组大鼠鼻腔黏膜组织 Notch1 蛋白染色,D 为抗 C5aR 抗体+Jagged1 组大鼠鼻腔黏膜组织 Notch1 蛋白染色。

图 5 免疫组织化学染色检测鼻腔黏膜组织 Notch1 表达(400×)



注:A 为对照组,B 为模型组,C 为抗 C5aR 抗体组,D 为抗 C5aR 抗体+Jagged1 组。

3 讨论

AR 是由 IgE 介导的与过敏原免疫反应相关的鼻黏膜炎症疾病,AR 患者通常以鼻塞、打喷嚏和鼻痒等症状为主要特征。在 AR 反应中,当过敏原与鼻黏膜接触后,肥大细胞通过分泌释放炎症介质如组胺、IL 等,诱导急性过敏反应的发生;当在过敏原中持续暴露 6~10 h 后,鼻腔中会引发炎症细胞如嗜酸性粒

图 6 Western blot 检测鼻腔黏膜组织中 Notch1 与 Jagged1 蛋白表达

细胞浸润,嗜酸性粒细胞来源的介质诱导上皮损伤并致使鼻腔黏膜肿胀^[9]。如今,AR 已影响全球 10%~20% 成年人的健康^[3],因此,了解 AR 的性质是改善该疾病的有效途径。本研究使用 OVA 和 Al(OH)₃ 诱导构建大鼠 AR 模型,在经过抗 C5aR 抗体治疗后发现,AR 大鼠炎症反应及鼻腔黏膜组织病变现象均得到了明显改善。

补体系统是人体重要的免疫防御系统,活化后参与多种疾病的发生、发展,包括癌症、炎症及自身免疫性疾病等。该系统主要由血浆蛋白与膜蛋白组成,级联反应的激活通过 3 个主要途径的链式反应发生:经典途径、替代途径和凝集素途径,这些途径启动后最终形成 C3、C5 转换酶并产生过敏毒素 C3a、C5a,它们主要通过与其相应的受体 C3aR 和 C5aR 结合来发挥作用^[10]。其中,补体成分 C5a 是主要的促炎介质,该活性片段可激活中性粒细胞与巨噬细胞,合成并释放炎性介质而致使炎症反应的发生,其特异性受体 C5aR 也在单核细胞和巨噬细胞上表达。研究表明,C5a/C5aR 相互作用导致中性粒细胞募集和巨噬细胞积累,并加剧多种炎症反应性疾病^[11-12]。而以 C5aR 作为靶点开发补体 C5aR 单克隆抗体可有效治疗其介导的疾病。如抗 C5aR 抗体联合大蒜素对大鼠炎症肠病具有较好的治疗效果,可抑制炎症反应,提高动物生存率^[13]。本研究结果显示,抗 C5aR 抗体对 AR 大鼠也有良好的治疗效果。

Th17 细胞和 Treg 细胞是人类免疫系统的重要组成部分。Th17 细胞代表促炎性 T 细胞的子集,可促进组织损伤和自身免疫病理损伤。IL-17 是 Th17 细胞发挥生物学作用的主要细胞因子。相比之下,Treg 细胞发挥免疫抑制作用,其功能障碍可能诱发自身免疫性疾病^[14]。在生理条件下,Th17 细胞和 Treg 细胞在动态平衡中互相拮抗,并参与维持机体正常的免疫状态。当 Treg 细胞数量减少或 Th17 细胞数量增加时,Th17/Treg 失衡并诱导炎症反应^[15-16]。本研究结果显示,AR 发生后大鼠机体内 Th17/Treg 失衡,在经过抗 C5aR 抗体治疗后 Th17/Treg 趋于平衡状态。

Notch 信号传导是一个保守且特征明确的途径,在动物发育、维持体内稳态和疾病中发挥关键作用,并介导细胞增殖、发育及分化。在哺乳动物中已发现了 Notch 信号的 4 个受体(Notch1~4)和 5 个配体(Jagged1~2 和 Delta-like 1、3、4)。Notch 受体与其配体结合后,Notch 信号通路被激活并催化 Notch 受体,导致 Notch 细胞内结构域(N-ICD)的释放。接着,N-ICD 易位到细胞核中,并与共激活因子结合以介导下游基因的表达^[17-18]。以往研究表明,Notch1-Jagged1 信号途径在 AR 中被激活,Notch1 可通过抑制 Treg 细胞分化而调节 Foxp3 表达^[19]。本研究结果同样显示,AR 大鼠鼻腔黏膜组织中 Notch1 与 Jag-

ged1 蛋白表达明显升高,使用抗 C5aR 抗体治疗后,组织内 Notch1 与 Jagged1 蛋白表达均下降。为了进一步验证抗 C5aR 抗体是否通过 Notch1-Jagged1 信号途径发挥作用,笔者通过联合使用抗 C5aR 抗体与 Jagged1 肽作用后发现其对 AR 大鼠未起到改善作用。由此推测,抗 C5aR 抗体可能通过调控 Notch1-Jagged1 信号途径在 AR 中发挥作用。

综上所述,抗 C5aR 抗体可能通过减轻炎症反应,调控 ROR γ t 与 Foxp3 蛋白表达,介导 Th17/Treg 平衡及抑制 Notch1-Jagged1 信号途径激活,从而对 AR 大鼠的症状起到一定的改善作用。然而,Notch 信号通路与 Hedgehog、Wnt、NF- κ B、AKT/mTOR 等多个信号通路交互作用参与细胞、组织、器官的分化与发育过程,在本研究中,给予 Notch 信号传导途径配体的 Jagged1 肽作用,是直接还是间接与抗 C5aR 抗体治疗产生拮抗作用还有待后续进行深入探究。

参考文献

- [1] SHAHGORDI S, SANKIAN M, YAZDANI Y, et al. Immune responses modulation by curcumin and allergen encapsulated into PLGA nanoparticles in mice model of rhinitis allergic through sublingual immunotherapy[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 84: 106525.
- [2] ZHANG W, BA G, TANG R, et al. Ameliorative effect of selective NLRP3 inflammasome inhibitor MCC950 in an ovalbumin-induced allergic rhinitis murine model[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 83: 106394.
- [3] SHUSTERMAN D. Nonallergic rhinitis: environmental determinants[J]. *Immunol Allergy Clin North Am*, 2016, 36(2): 379-399.
- [4] MAHAJAN A, MANHAS M, KALSOTRA P, et al. A prospective study of audiological manifestations in patients of allergic rhinitis[J]. *Indian J Otolaryngol*, 2021, 20: 1-6.
- [5] MONSINJON T, GASQUE P, CHAN P, et al. Regulation by complement C3a and C5a anaphylatoxins of cytokine production in human umbilical vein endothelial cells[J]. *FASEB J*, 2003, 17(9): 1003-1014.
- [6] RICKLIN D, LAMBRIS J D. Complement in immune and inflammatory disorders: pathophysiological mechanisms[J]. *J Immunol*, 2017, 190(8): 3831-3839.
- [7] PHIELER J, CHUNG K J, CHATZIGEORGIOU A, et al. The complement anaphylatoxin C5a receptor contributes to obese adipose tissue inflammation and insulin resistance[J]. *J Immunol*, 2013, 191(8): 4367-4374.
- [8] 苗明三, 项丽玲, 苗艳艳. 变应性鼻炎动物模型制备规范(草案)[J]. *中草药*, 2018, 49(1): 50-57.
- [9] PALLER A S, SPERGEL J M, MINA-OSORIO P, et al. The atopic march and atopic multimorbidity: many trajectories, many pathways[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2019, 143(1): 46-55.

明显升高,补体 C3、补体 C4 明显降低,患者血中 IL-17、IL-35、补体 C3 及补体 C4 是 CHB 患者肝纤维化的独立性影响因素。但本研究并未对患者进行长期随访,有待后续深入分析。

参考文献

[1] MARK T W, RYAN T B, ELIZABETH B G, et al. Enhanced CDC of B cell chronic lymphocytic leukemia cells mediated by rituximab combined with a novel anti-complement factor H antibody[J]. PLoS One, 2017, 12(6): e0179841.

[2] GALLO E, MILLERJONES J, RUSSELL D, et al. The radio/X-ray domain of black hole X-ray binaries at the lowest radio luminosities [J]. Month Not Roy Astron Soc, 2018, 445(1): 290-300.

[3] 王林, 刘学恩, 庄辉. 多种细胞在肝纤维化逆转中的作用 [J]. 临床肝胆病杂志, 2018, 34(4): 862-866.

[4] SANJOY P, SACHIT G, INGRID L R, et al. Analysis of back-contact interface recombination in thin-film solar cells[J]. IEEE J Photovolt, 2018, 8(3): 871-878.

[5] KOSUKE O, TAKEKI F, TAKESHI KI, et al. Effect of interleukin (IL)-35 on IL-17 expression and production by human CD4⁺ T cells[J]. PeerJ, 2017, 5(11): e2999.

[6] LI Y, WANG Y, LIU H, et al. Lower level of IL-35 and its reduced inhibition in Th17 cells in patients with bone marrow mononuclear cells Coombs test-positive hemocytopenia; [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(2): 2973-2981.

[7] 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2015 年更新版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2015, 31(12): 1941-1960.

[8] YAO S T, CAO F, CHEN J L, et al. NLRP3 is required

for complement-mediated Caspase-1 and IL-1 beta activation in ICH[J]. 2017, 61(3): 385-395.

[9] CHEN C C, ITAKURA E, NELSON G M, et al. IL-17 is a neuromodulator of caenorhabditis elegans sensory responses[J]. Nature, 2017, 542(7639): 43-48.

[10] 张曹庚, 张志峰, 张红云, 等. 血清 IL-35、IL-17 与恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎患者 HBeAg 阴转的相关性[J]. 肝脏, 2018, 23(12): 21-25.

[11] ALCARAZQUILES J, TITOS E, CASULLERAS M, et al. Polymorphisms in the IL-1 gene cluster influence systemic inflammation in patients at risk for acute-on-chronic liver failure[J]. Hepatology, 2017, 65(1): 202-216.

[12] GUERRA E S, LEE C K, SPECHT C A, et al. Central role of IL-23 and IL-17 producing eosinophils as immunomodulatory effector cells in acute pulmonary aspergillosis and allergic asthma[J]. PLoS Pathogens, 2017, 13(1): e1006175.

[13] 陈俊华, 章武战. 细胞因子 IL-17、IL-22 和 IL-33 与补体 C3、补体 C4 在系统性红斑狼疮患者外周血中的表达及意义[J]. 中国卫生检验杂志, 2018, 28(7): 849-850.

[14] ALEKSANDRA K, KRZYSZTOF S, MARIOLA S, et al. Diverse activity of IL-17⁺ cells in chronic skin and mucosa graft-versus-host disease[J]. Arch Immunol Ther Exper, 2019, 67(5): 1-13.

[15] JUNG E S, PETERSEN B S, MAYR G, et al. Compound heterozygous mutations in IL-10RA combined with a complement factor properdin mutation in infantile-onset inflammatory bowel disease[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2018, 30(12): 1491.

(收稿日期: 2021-11-10 修回日期: 2022-03-25)

(上接第 2096 页)

[10] IMAMURA T, YAMAMOTO I M, SUETA A, et al. Influence of the C5a-C5a receptor system on breast cancer progression and patient prognosis [J]. Breast Cancer, 2016, 23(6): 876-885.

[11] KAIDA T, NITTA H, KITANO Y, et al. C5a receptor (CD88) promotes motility and invasiveness of gastric cancer by activating RhoA[J]. Oncotarget, 2016, 7(51): 84798-84809.

[12] WADA Y, MAEDA Y, KUBO T, et al. C5a receptor expression is associated with poor prognosis in urothelial cell carcinoma patients treated with radical cystectomy or nephroureterectomy[J]. Oncol Lett, 2016, 12(5): 3995-4000.

[13] 周亚妮, 刘丹. 抗 C5aR 抗体联合大蒜素对诱发性炎性肠病大鼠的治疗作用[J]. 实验动物与比较医学, 2020, 40(4): 328-333.

[14] ZHU X, LI S, ZHANG Q, et al. Correlation of increased Th17/Treg cell ratio with endoplasmic reticulum stress in chronic kidney disease [J]. Medicine (Baltimore),

2018, 97(20): e10748.

[15] NOACK M, MIOSSSEC P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases[J]. Autoimmun Rev, 2014, 13(6): 668-677.

[16] KUREBAYASHI Y, NAGAI S, IKEJIRI A, et al. Recent advances in understanding the molecular mechanisms of the development and function of Th17 cells[J]. Genes Cells, 2013, 18(4): 247-265.

[17] SUN J, LUO Z, WANG G, et al. Notch ligand Jagged1 promotes mesenchymal stromal cell-based cartilage repair [J]. Exp Mol Med, 2018, 50(9): 126.

[18] LI C, SHENG A, JIA X, et al. Th17/Treg dysregulation in allergic asthmatic children is associated with elevated notch expression[J]. J Asthma, 2018, 55(1): 1-7.

[19] JIAO W E, WEI J F, KONG Y G, et al. Notch signaling promotes development of allergic rhinitis by suppressing Foxp3 expression and Treg cell differentiation[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2019, 178(1): 33-44.

(收稿日期: 2021-11-02 修回日期: 2022-03-01)