

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.03.0265

## 抑制树突状细胞的自噬改善小鼠哮喘病情

邓常文<sup>1</sup>, 夏福灿<sup>2</sup>, 姜岩岩<sup>3</sup>, 屈玉兰<sup>1</sup>, 邓捷文<sup>3</sup>, 张星星<sup>1</sup>, 郭振红<sup>3</sup>, 白冲<sup>1\*</sup>

1. 第二军医大学长海医院呼吸与危重症医学科, 上海 200433

2. 浙江大学医学院免疫学研究所, 杭州 310058

3. 第二军医大学医学免疫学国家重点实验室, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 研究抑制树突状细胞(DCs)自噬对DCs功能及小鼠哮喘的影响。**方法** (1)将BALB/c小鼠按随机数字表法分为3组:急性哮喘对照组(哮喘组)、哮喘自噬抑制剂氯喹(CQ)治疗组(CQ组)和空白对照组(对照组)。哮喘组和CQ组利用卵清蛋白(OVA)诱导建立小鼠过敏性哮喘模型,CQ组加用CQ。用H-E染色观察各组小鼠肺组织的病理改变,酶联免疫吸附实验、蛋白质印迹实验、流式细胞术分别检测各组小鼠血清OVA特异性IgE以及肺DCs自噬水平、表面共刺激分子和主要组织相容性复合体II类分子(MHC II)的表达水平。(2)体外用自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤(3MA)抑制C57/B6小鼠骨髓源DCs自噬,检测DCs表面共刺激分子、MHC II的表达水平。(3)获取OT2小鼠脾脏CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞,与各组肺DCs以1:10的比例混匀,流式细胞术检测T细胞的增殖情况与活化反应。**结果** (1)CQ组IgE的表达水平( $P<0.05$ )、肺炎细胞浸润程度以及肺DCs自噬水平( $P<0.05$ )和CD86、MHC II表达水平( $P<0.05$ )均低于哮喘组。(2)3MA体外抑制骨髓源DCs自噬后,DCs表面的CD86及MHC II表达均低于哮喘组( $P<0.05$ )。(3)CQ组肺DCs体外诱导的T细胞增殖能力与活化反应均弱于哮喘组( $P<0.05$ )。**结论** 自噬抑制剂可抑制过敏性哮喘肺DCs的自噬,下调DCs表面共刺激分子、MHC II的表达以及DCs诱导的T细胞增殖能力,改善哮喘病情。

**[关键词]** 树突状细胞;自噬;哮喘;细胞增殖

**[中图分类号]** R 562.25

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2016)03-0265-08

## Inhibiting autophagy of dendritic cells meliorates asthma in mice

DENG Chang-wen<sup>1</sup>, XIA Fu-can<sup>2</sup>, JIANG Yan-yan<sup>3</sup>, QU Yu-lan<sup>1</sup>, DENG Jie-wen<sup>3</sup>, ZHANG Xing-xing<sup>1</sup>, GUO Zhen-hong<sup>3</sup>, BAI Chong<sup>1\*</sup>

1. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Institute of Immunology, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China

3. National Key Laboratory of Medical Immunology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To study the impact of autophagy inhibition on functions of dendritic cells (DCs) and mouse model of allergic asthma. **Methods** (1)BALB/c mice were divided into three groups using the random number table: asthma model group, asthma treated with autophagy inhibitor (chloroquine) group (asthma+CQ group) and control group. Mouse models in asthma group and asthma+CQ group were induced with ovalbumin (OVA); meanwhile, mice of asthma+CQ group were also treated with autophagy inhibitor CQ. Hematoxylin-Eosin (H-E) staining was used to observe the pathological changes in lung tissues of mice. ELISA, Western blotting analysis and flow cytometry were used to detect the serum OVA-specific IgE, autophagy level, and expression of surface co-stimulatory molecules and major histocompatibility complex class II (MHC II) on lung DCs, respectively. (2)Bone marrow-derived DCs were treated with autophagy inhibitor 3-methyladenine (3MA) *in vitro* and the surface expression of co-stimulatory molecules and MHC II was detected. (3) We sorted CD4<sup>+</sup>T cells from spleens of OT2 mice, then co-cultured with lung DCs from mice of different groups (T cells : DCs=1 : 10), and detected the activation and proliferation of T cells with flow cytometry. **Results** (1) The level of OVA-specific IgE ( $P<0.05$ ), extent of

**[收稿日期]** 2015-11-09 **[接受日期]** 2016-01-05

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81270073,81570019),第二军医大学优秀硕士研究生苗子培育基金. Supported by National Natural Science Foundation of China (81270073,81570019) and Cultivation Foundation for the Excellent Master Candidates of Second Military Medical University.

**[作者简介]** 邓常文,硕士生,主治医师. E-mail: dengcw1122@163.com

\*通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-66895004, E-mail: bc7878@sohu.com

inflammatory cell infiltration in lung tissues, autophagy level in lung DCs ( $P < 0.05$ ), and expression of CD86 and MHC II ( $P < 0.05$ ) on lung DCs in asthma+CQ group were significantly lower than those in the asthma group. (2) 3-MA treatment decreased the surface expression of CD86 and MHC II on bone marrow-derived DCs ( $P < 0.05$ ). And (3) lung DCs from asthma+CQ group had lower ability for activating T cells and promoting T cell proliferation than those from the asthma group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Autophagy inhibitors can improve the pathologic condition of allergic asthma through inhibiting autophagy in DCs, down-regulating surface expression of co-stimulatory molecules and MHC II on DCs, and further inhibiting the DCs-induced proliferation of T cells.

**[Key words]** dendritic cells; autophagy; asthma; cell proliferation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(3): 265-272]

支气管哮喘(简称哮喘)是全球范围内发病率较高的慢性气道疾病之一。全球目前有近3亿哮喘患者,临床上常用 $\beta_2$ 受体激动剂改善临时症状,吸入糖皮质激素以长期控制<sup>[1]</sup>。而激素的长期使用易扰乱机体免疫功能,也容易导致药物拮抗<sup>[2]</sup>。过敏性哮喘的发病机制复杂,树突状细胞(dendritic cells, DCs)是哮喘发病的始动者,能驱使CD4幼稚T细胞活化并向Th2细胞方向分化,维持疾病相关免疫反应和免疫耐受<sup>[3]</sup>。因此,干扰DCs的免疫活性是探索哮喘治疗的可选靶点。

自噬是一种进化保守的细胞降解过程,在清除细胞内源性或外源性病原体等天然免疫反应及调节DCs、T细胞、B细胞等适应性免疫细胞的生存、增殖、免疫活性中均扮演了重要的角色,涉及肿瘤、衰老、炎症等病理生理过程,在慢性阻塞性肺疾病、肺损伤、肺纤维化、肺部感染、哮喘等肺脏相关疾病中的作用也愈来愈受研究者的重视<sup>[4-9]</sup>。有研究提示,特异性敲除DCs自噬基因Atg5能影响DCs抗原提呈及诱导CD4<sup>+</sup>T细胞的活化,致使小鼠更易感染单纯疱疹病毒<sup>[10]</sup>。DCs的自噬也与DCs活化相应的T细胞反应以抵抗呼吸道合胞病毒感染相关<sup>[11]</sup>。同样,经自噬诱导剂雷帕霉素预处理的DCs可增强由结核分枝杆菌感染引起的T细胞反应<sup>[12]</sup>,雷帕霉素还能通过诱导自噬致使自身免疫性葡萄膜炎加重<sup>[13]</sup>。哮喘属于一类多种细胞参与的以免疫系统功能紊乱、炎症因子分泌异常为表现,并以气道慢性炎症、气道高反应性、气道重塑为特点的呼吸系统变态反应性疾病<sup>[14-15]</sup>。DCs的自噬与哮喘的关系目前并不清楚。本研究通过下调DCs的自噬水平,观察DCs的相关功能的改变以及过敏性哮喘的病情进展,初步探讨DCs自噬对哮喘病情

的影响。

## 1 材料和方法

1.1 实验动物及主要试剂、仪器 BALB/c及C57/B6小鼠均购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司[许可证号:SYXK(沪)2013-0058],鼠龄6~8周,体质量20~22g,适应1周后建立小鼠过敏性哮喘模型;OT2小鼠(编号:004194)购于美国Jackson Lab。BALB/c、C57/B6及OT2小鼠均在第二军医大学免疫学国家重点实验室SPF级动物房饲养[许可证号:SYXK(沪)2013-0016]。所有动物实验均经第二军医大学实验动物伦理委员会批准。小鼠重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、小鼠重组白介素(IL)-4因子(美国PeproTech公司),RPMI 1640培养基(法国Biowest公司),胎牛血清(fetal bovine serum, FBS;美国Gibco公司),流式抗体CD16/32抗体、7AAD-PerCP Cy5.5抗体, Siglec-F-PerCP Cy5.5抗体、CD11c PerCP-Cy5.5/APC/PE抗体、主要组织相容性复合体II类分子(MHC II)-FITC抗体、CD40-APC抗体、CD80-eFluor-450抗体、CD86-APC抗体、CD4-PerCP抗体、CFSE-FITC抗体(美国eBioscience公司),LC3抗体(英国Abcam公司),鼠血清IgE检测试剂标记HRP山羊抗小鼠IgE二抗(美国eBioscience公司),细胞分离纯化所用CD11c磁珠、CD4(L3T4)磁珠、分选磁柱(德国Miltenyi Biotec公司)。流式细胞仪(LSR II, BD公司),离心机(Microfuge 16 centrifuge,美国Beckman公司;Centrifuge 5430R,德国Eppendorf公司),雾化仪PARI Boy N(德国PARI公司),电泳胶紫外分析仪(台式紫外分析装置,FR-110,上海复日科技有限公司)。

1.2 动物分组及哮喘模型的建立 BALB/c小鼠

按随机数字表法分为空白对照组(对照组)、急性哮喘对照组(哮喘组)、哮喘自噬抑制剂氯喹(chloroquine, CQ)治疗组(CQ组)3组。哮喘组与CQ组小鼠均于第0、7、14天腹腔注射卵清蛋白(ovalbumin, OVA)致敏液(0.5 mg/mL OVA与10%十二水合硫酸铝钾配制而成),每只小鼠注射OVA量为100  $\mu$ g/200  $\mu$ L。第21天起每只小鼠给予10 mL 2% OVA高频雾化吸入进行激发,每天1次,每次30 min,连续4 d。CQ组于每次雾化前0.5 h腹腔注射60  $\mu$ g/g CQ(200  $\mu$ L冷生理盐水稀释),哮喘组则予以200  $\mu$ L冷生理盐水腹腔注射。空白对照组以冷生理盐水代替OVA致敏和激发,时间同上。在末次雾化后24 h内处置完所有小鼠,准备后续实验。

**1.3 骨髓来源 DCs 的分离与培养** 参照并改良 Inaba 等<sup>[16]</sup>的实验方法,取雄性 C57/B6 小鼠,直接脊髓离断法处死小鼠,分离小鼠股骨、胫骨,置于 RPMI 1640 培养液中反复吹吸骨髓腔直至骨头变为白色,弃之,继续吹打培养液,直至将骨髓条打匀。加入无菌的 Tris-NH<sub>4</sub>Cl 溶液裂解红细胞 2 min,加入 DCs 专用培养液[RPMI 1640 培养液+10 ng/mL 重组 GM-CSF+1 ng/mL IL-4+10% FBS+1% 100 $\times$ 双抗]铺于 6 孔板中培养。第 3 天起每天换半液,根据实验需要于第 5~7 天收取细胞待用。标记 DCs 表面 CD11c 以检测 DCs 浓度,即加入 CD11c PerCP-Cyanine5.5/APC/PE 抗体后使用流式细胞仪进行分析鉴定。无需磁珠分选,培养所得的 CD11c<sup>+</sup>DCs 纯度可达 80% 以上。

**1.4 T 淋巴细胞增殖实验** 取 4 周龄雄性 OT2 小鼠 1 只,取脾脏制成脾细胞悬液,CD4 磁珠分选纯化脾细胞悬液获得 CD4<sup>+</sup>的 T 淋巴细胞,部分 T 淋巴细胞行 CFSE 染色后使用计数板计数备用。

各组 BALB/c 小鼠肺 DCs 的获取:处死小鼠,获取各组小鼠肺组织,充分剪碎并加入胶原酶 IV(美国 Gibco 公司)于 37 $^{\circ}$ C 孵育 45 min,取出后于超净台碾磨、过滤、破红细胞制作成肺单细胞悬液,再经过 Percoll 液(美国 General Electric 公司)4 $^{\circ}$ C 梯度离心 30 min,获得以淋巴细胞为主的肺单细胞悬液,最后使用 CD11c 磁珠进行磁珠分选纯化获得不同组小鼠肺 DCs,纯度达 80% 以上。

上述获得的 T 淋巴细胞与各组 DCs 按照 1:10 的比例(每孔 1 $\times$ 10<sup>4</sup> 的 DCs 及 1 $\times$ 10<sup>5</sup> 的 T 细胞)铺于 96 孔板内,根据分组加入 OVA-17 肽(OVA 323-339 氨基酸序列:ISQAVHAAHAEINEAGR)进行刺激,共培养 72 h。收取各组细胞,行抗鼠 CD4-PE/CD3-APC 抗体(美国 eBioscience 公司)染色,流式细胞术分析 T 细胞的增殖和 CD69 的表达。

**1.5 蛋白质印迹法检测 DCs 自噬水平** 使用蛋白质印迹法检测上述步骤所得的各组小鼠肺 DCs 自噬相关标志性分子微管相关蛋白 1 轻链 3- $\beta$ (microtubule-associated protein 1 light chain 3- $\beta$ , MAP1LC3-II, 简称 LC3)的表达水平。经 RIPA 裂解液裂解 DCs 获得蛋白,以 100  $\mu$ g 加样,行 12% SDS-PAGE 后,将蛋白转移至硝酸纤维素膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,加入 LC3 抗体;4 $^{\circ}$ C 过夜后, TBST 缓冲液洗涤 3 次,加入兔抗鼠 IgG-HRP 继续孵育,洗涤后化学发光法显影。用 ImageJ 软件进行 LC3 蛋白的定量分析,计算自噬流指标 LC3 II/I 比值及 LC3 II/actin 比值以表示自噬水平的变化<sup>[17-18]</sup>。

**1.6 小鼠模型外周血的收集及肺组织病理检测** 实验中通过一侧眼球取血后处死小鼠,剪开小鼠皮毛和肋骨,充分暴露肺脏,分离获取肺组织;将肺组织浸入 4% 多聚甲醛溶液中固定,乙醇脱水,常规石蜡包埋、切片,行 H-E 染色。

**1.7 ELISA 法检测血清 OVA 特异性 IgE 分子水平** 将 96 孔板用 10  $\mu$ g/mL OVA 包被过夜,次日用 PBST 清洗 3 遍,加入 1:200 稀释的血清样本室温孵育 2 h, PBST 清洗 5 遍;加入 1:1 000 稀释的 HRP 标记山羊抗小鼠 IgE 二抗孵育 1 h, PBST 清洗 5 遍;加入 1:1 混匀的 ELISA 显色液 A 和 B 液,室温显色 20 min 后,加入 100  $\mu$ L 终止液终止显色,用 Bio-Rad 伯乐 iMark 酶标仪(美国)检测光密度(D)值。

**1.8 流式细胞术分析 DCs 表面各分子表达水平** 骨髓来源 DCs 检测采用先筛除凋亡细胞(7AAD 阴性)再标记 CD11c(CD11c 阳性)的策略,即为 7AAD<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>DCs 的定位骨髓来源 DCs 的流式细胞术检测策略;肺组织源 DCs 检测采用先用 CD16/32 抗体进行 FcR 封闭后,去除凋亡细胞

(7AAD 阴性)、筛除嗜酸粒细胞及肺泡巨噬细胞 (Siglec-F 阴性),再选择 CD11c 阳性及 MHC II 阳性细胞为需要进一步分析的肺源 DCs 的策略,即为 7AAD<sup>-</sup>/Siglec-F<sup>-</sup>/CD11c<sup>+</sup>/MHC II<sup>+</sup> DCs 的定位肺组织源 DCs 的流式细胞术检测策略<sup>[19]</sup>。分别检测各 DCs 表面 CD40、CD80、CD86、MHC II 的表达水平。

1.9 体外实验观察自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤 (3MA) 对 DCs 表面共刺激分子及 MHC II 的影响 根据 1.3 项下实验方法,分离培养骨髓来源的 DCs 并随机分为对照组、DCs OVA 预处理组 (OVA 组)、DCs OVA 预处理并 3MA 自噬抑制组 (3MA 组),其中 OVA (100 μg/mL) 预处理及 3MA (40 μg/mL) 处理时间为 12 h,再分别收取各组 DCs 行流式细胞术检测。如 1.8 项下方法所述,以 7AAD<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> DCs 定位骨髓来源 DCs 的流式细胞术检测策略,分别检测各 DCs 表面 CD40、CD86、MHC II 的表达水平。

1.10 统计学处理 数据分析采用 Graph Pad Prism 5.0 或 SPSS 19.0 统计软件完成。所有计量资料均用  $\bar{x} \pm s$  表示。符合正态分布和方差齐性的数据采用单因素方差分析,不符合正态分布和方差齐性的数据则采用 Kruskal-Wallis 检验。检验水准 ( $\alpha$ ) 为 0.05。

## 2 结果

2.1 各组小鼠血清 OVA 特异性 IgE 的表达水平 结果(图 1)显示,哮喘组小鼠血清 OVA 特异性 IgE 的表达水平高于对照组 ( $P < 0.05$ ),而 CQ 组小鼠血清 OVA 特异性 IgE 的表达水平较哮喘组降低 ( $P < 0.05$ )。

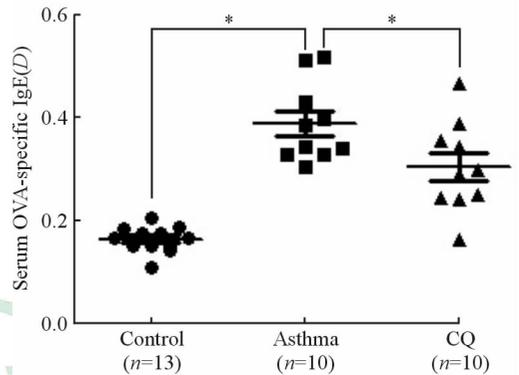


图 1 各组小鼠血清 OVA 特异性 IgE 的表达水平

Fig 1 Comparison of serum OVA-specific IgE levels in all groups

CQ: Chloroquine; OVA: Ovalbumin. \*  $P < 0.05$ .  $\bar{x} \pm s$

2.2 各组小鼠肺组织病理结果 结果如图 2 所示,哮喘组小鼠血管周围及细支气管有大量炎症细胞浸润,肺泡间隔部分有增宽,部分肺泡间隔可见断裂,炎症浸润多于对照组。与哮喘组相比,CQ 组小鼠血管和支气管周围炎症细胞浸润明显减少。

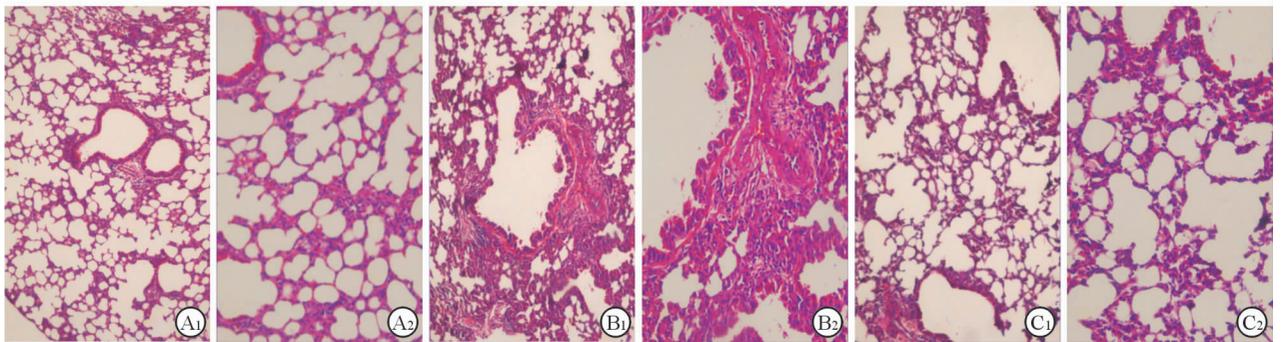


图 2 各组小鼠肺组织病理结果(H-E 染色)

Fig 2 Lung inflammation as detected by H-E staining in all groups

A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>: Control group; B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>: Asthma group; C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>: CQ group. CQ: Chloroquine. Original magnification: ×100 (A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>), ×200 (A<sub>2</sub>, B<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>)

2.3 各组小鼠肺 DCs 自噬水平的检测 采用蛋白质印迹法检测各组 LC3 的表达水平,结果发现哮喘组小鼠肺 DCs 的 LC3 II/actin 比值高于对照组 ( $P < 0.05$ ),LC3 II/I 比值也有升高趋势 ( $P >$

0.05);而较于哮喘组,CQ 组肺 DCs 的 LC3 II/I 及 LC3 II/actin 比值均降低 ( $P < 0.05$ ),说明哮喘组肺 DCs 自噬水平比对照组高,而 CQ 组肺 DCs 的自噬较哮喘组下降,见图 3。

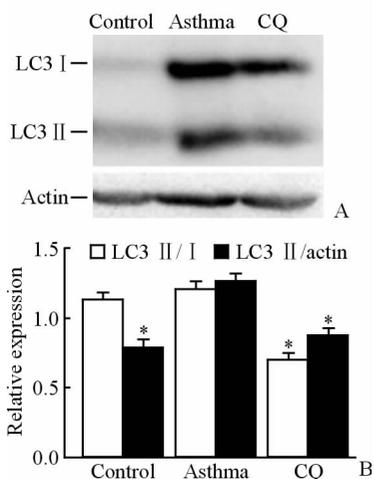


图 3 各组小鼠肺 DCs 自噬水平的变化

Fig 3 Changes of autophagy levels in lung-DCs in each group

A: Representative LC3-immunoblots of lung-DCs in all groups; B: The LC3-II to the LC3-I ratio and LC3-II to actin ratio in all groups. DCs: Dendritic cells; CQ: Chloroquine; LC3: Microtubule-associated protein 1 light chain 3- $\beta$ . \*  $P < 0.05$  vs asthma group.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.4 各组小鼠肺 DCs 表面共刺激分子及 MHC II 的表达 利用流式细胞仪检测各组小鼠肺 DCs 表面共刺激分子 CD80、CD86、CD40 及 MHC II 的表达情况。结果(图 4)显示,相比如对照组,哮喘组肺 DCs 表面 CD80、CD86 及 MHC II 的表达水平均升高( $P < 0.05$ ); CQ 组与哮喘组相比,CD86 及 MHC II 的表达水平均降低( $P < 0.05$ ),CD80 也有下降趋势( $P > 0.05$ )。3 组小鼠肺 DCs 表面 CD40 未见明显变化。

2.5 体外抑制 DCs 自噬对 DCs 表面共刺激分子及 MHC II 的影响 收取各组细胞检测非凋亡 DCs 表面共刺激分子 CD86、CD40 及 MHC II 的表达情况。结果(图 5)显示,与对照组相比,OVA 组 DCs 表面 CD86、CD40 及 MHC II 的表达水平均升高( $P < 0.05$ ); 3MA 组与 OVA 组相比,CD86 及 MHC II 的表达水平均降低( $P < 0.05$ ),CD40 也呈现下降趋势( $P > 0.05$ ); 3MA 组与对照组相比差异无统计学意义。

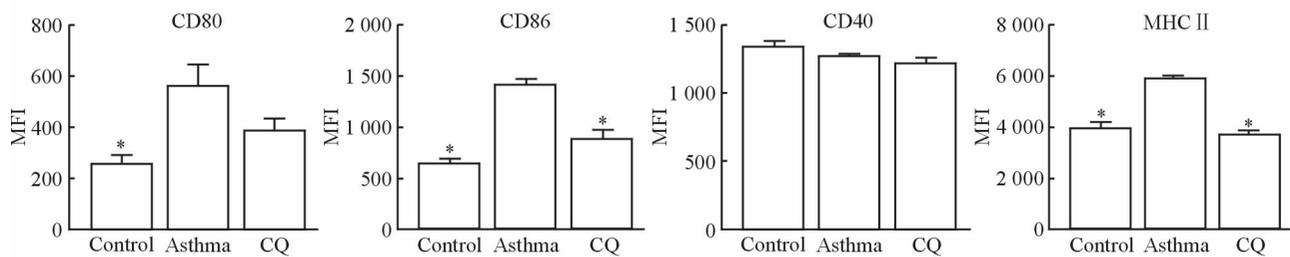


图 4 各组小鼠肺 DCs 表面共刺激分子及 MHC II 的表达

Fig 4 Expression of surface co-stimulatory molecules and MHC II on lung DCs in each group

MFI: Mean fluorescence intensity; CQ: Chloroquine; DCs: Dendritic cells; MHC II: Major histocompatibility complex class II. \*  $P < 0.05$  vs asthma group.  $n = 5, \bar{x} \pm s$

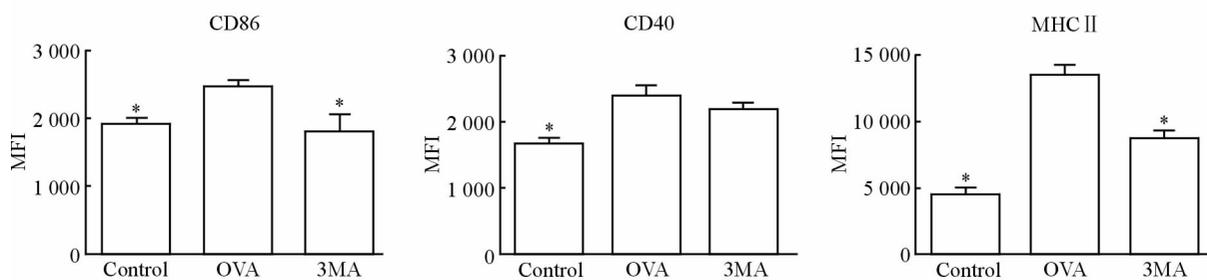


图 5 3MA 对 DCs 表面共刺激分子及 MHC II 表达的影响

Fig 5 Impact of 3MA on surface co-stimulatory molecules and MHC II on DCs in each group

MFI: Mean fluorescence intensity; OVA: Ovalbumin; 3MA: 3-Methyladenine; MHC II: Major histocompatibility complex class II; DCs: Dendritic cells. \*  $P < 0.05$  vs OVA group.  $n = 5, \bar{x} \pm s$

2.6 各组小鼠肺 DCs 对 OT2 小鼠 T 细胞增殖功能的影响 相较于对照组,哮喘组诱导的 CD4<sup>+</sup>T 细胞增殖增加( $P < 0.05$ ),而 CQ 组与哮喘组相比诱导的 T 细胞增殖降低( $P < 0.05$ ),且 CQ 组与对照组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),说明抑制

DCs 自噬能降低 DCs 诱导的 OT2 小鼠 T 细胞的增殖能力,见图 6。

2.7 各组小鼠肺 DCs 对 OT2 小鼠 T 细胞活化反应的影响 利用流式细胞术检测各组 CD4<sup>+</sup>T 细胞 CD69 的表达(图 7),结果发现哮喘组 T 细胞 CD69

的表达水平高于对照组( $P < 0.05$ ),而 CQ 组低于哮喘组 ( $P < 0.05$ ),且 CQ 组与对照组相比差异无统

计学意义( $P > 0.05$ ),说明自噬抑制剂可以降低 T 细胞活化反应。

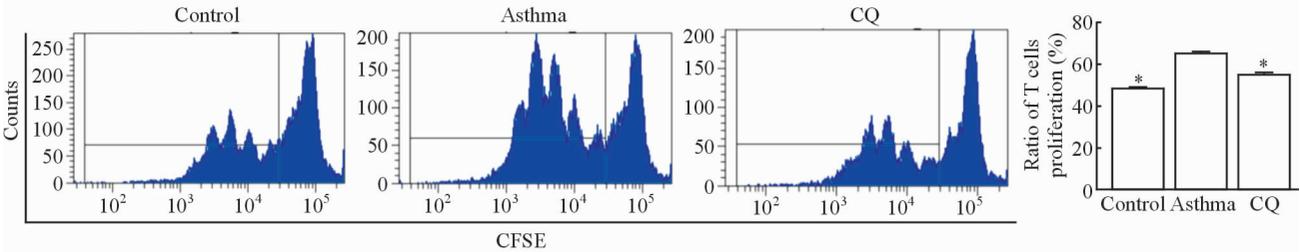


图 6 各组小鼠肺 DCs 诱导的 T 细胞增殖情况

Fig 6 Mouse lung DCs-induced proliferation of T cells in each group

CFSE: Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester; CQ: Chloroquine; DCs: Dendritic cells. \*  $P < 0.05$  vs asthma group.  $n = 6, \bar{x} \pm s$

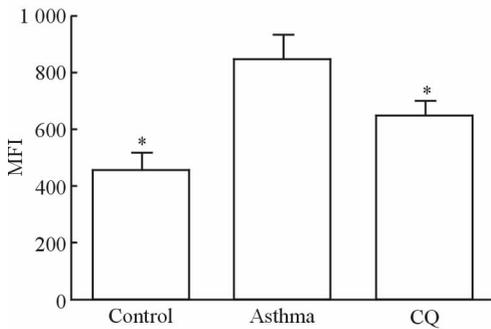


图 7 各组小鼠 T 细胞表面 CD69 的表达

Fig 7 CD69 expression in T cells surface of mice in each group

MFI: Mean fluorescence intensity; CQ: Chloroquine. \*  $P < 0.05$  vs asthma group.  $n = 6, \bar{x} \pm s$

### 3 讨论

过敏性哮喘是多种细胞及细胞组分参与的慢性炎症性疾病。本研究成功建立了 OVA 特异性过敏性哮喘小鼠模型,观察哮喘模型中肺 DCs 自噬水平的变化及抑制自噬对哮喘病情的影响并对其机制进行了初步探讨。

DCs 在哮喘的发病过程中发挥重要的作用。以往研究发现,携带了抗原的 DCs 到达纵隔淋巴结 T 细胞聚集区域后,高表达一系列共刺激分子和 MHC II [20],这些成分能诱导幼稚 T 细胞增殖和分化 [21-22],而分化产生的不同 T 细胞对于气道的炎症具有不同作用 [22-23]。有研究提示哮喘小鼠气道壁 DCs 及肺组织自噬水平与对照组相比均有升高 [24],本研究通过磁珠分选哮喘小鼠肺 DCs,并采用蛋白质印迹法检测自噬相关蛋白 LC3,结果提示 LC3 II / I 比值 ( $P > 0.05$ ) 及 LC3 II /actin 比值 ( $P < 0.05$ ) 均高于对照组,说明小鼠肺 DCs 自噬水平在

哮喘中升高。在此基础上进一步探索自噬抑制剂是否对哮喘的病情有影响,结果发现,CQ 组 OVA 特异性 IgE 水平低于哮喘组 ( $P < 0.05$ ),而且肺炎症细胞浸润程度也低于哮喘组,说明抑制自噬能改善哮喘病情。

MHC II 是 DCs 提呈加工后的外来抗原激活 T 淋巴细胞以致病的重要分子 [25],CD80、CD86、CD40 是 DCs 活化 T 淋巴细胞所需的表面共刺激信号分子 [26]。有研究提示自噬影响 MHC II 抗原复合物的形成而与 DCs 抗原提呈功能有关 [27-28],自噬抑制剂 3MA 能抑制 MHC II 介导的抗原提呈 [29]。本实验检测了各组小鼠肺 DCs 表面共刺激分子 CD80、CD86、CD40 及 MHC II 的表达水平,结果发现,与对照组相比,哮喘组肺 DCs 表面 CD80、CD86 及 MHC II 均升高 ( $P < 0.05$ );与哮喘组比较,CQ 组 CD86 及 MHC II 则降低 ( $P < 0.05$ ),CD80 也有下降趋势,说明哮喘自噬抑制治疗组肺 DCs 表面共刺激分子及 MHC II 较哮喘对照组降低。同时检测抑制 DCs 自噬后对 LC3 表达的影响,结果 CQ 组肺 DCs LC3 II / I 及 LC3 II /actin 比值均降低 ( $P < 0.05$ ),说明自噬抑制剂 CQ 能抑制哮喘肺 DCs 的自噬。本研究通过体外使用自噬抑制剂 3MA 处理 DCs 后检测 DCs 表面共刺激分子及 MHC II 的表达,得到类似结果。

为进一步明确抑制哮喘模型中肺 DCs 自噬后对 CD4<sup>+</sup> T 细胞增殖和活化的影响,本实验利用 OT2 鼠作为 CD4<sup>+</sup> T 供体进行 T 细胞增殖与活化实验,结果提示较于哮喘组,CQ 组小鼠 T 细胞的增殖能力和活化反应均降低 ( $P < 0.05$ ),说明抑制 DCs 自噬能抑制 DCs 诱导的 OT2 小鼠 T 细胞增殖能

力、降低 T 细胞活化反应。

本研究也发现 CQ 没能完全改善哮喘的病情,且在影响 DCs 表面共刺激分子中的趋势不一致。原因可能是自噬溶酶体的形成发生在自噬流的晚期,CQ 只能抑制自噬溶酶体的形成而发挥抑制自噬的作用,目前尚无 CQ 影响自噬泡的形成及各自噬蛋白功能的报道,因此存在未能完全消减自噬作用的可能;另外 CQ 为一种抗疟疾药,具有抑制自噬以外的作用,并且不能非特异作用于某一种细胞。因此开发特异性自噬抑制剂将有助于进一步深入探讨自噬与哮喘的相关性。

综上所述,自噬抑制剂可能改善哮喘病情、抑制肺 DCs 的自噬、下调 DCs 表面共刺激分子及 MHC II 的表达以及抑制 DCs 诱导的 T 细胞增殖能力。自噬与哮喘呼吸道病毒的复制和免疫反应相关,自噬基因 *Atg5* 多态性与哮喘相关<sup>[30]</sup>,而且自噬水平可能与哮喘严重程度相关<sup>[31]</sup>。本研究首次较为深入地探索 DCs 自噬与哮喘的关系,拟通过 DCs 自噬条件性敲除动物模型进一步探索研究 DCs 自噬与哮喘发生和发展的关系,为哮喘的靶向治疗提供新的思路。

#### [参考文献]

- [1] Edwards M R, Bartlett N W, Hussell T, Openshaw P, Johnston S L. The microbiology of asthma[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2012, 10: 459-471.
- [2] Ferreira L N, Brito U, Ferreira P L. Quality of life in asthma patients[J]. *Rev Port Pneumol*, 2010, 16: 23-55.
- [3] van Helden M J, Lambrecht B N. Dendritic cells in asthma[J]. *Curr Opin Immunol*, 2013, 25: 745-754.
- [4] Ryter S W, Mizumura K, Choi A M. The impact of autophagy on cell death modalities[J]. *Int J Cell Biol*, 2014, 2014: 502676.
- [5] Green D R, Levine B. To be or not to be how selective autophagy and cell death govern cell fate[J]. *Cell*, 2014, 157: 65-75.
- [6] Choi A M, Ryter S W, Levine B. Autophagy in human health and disease[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368: 1845-1846.
- [7] Bhattacharya A, Eissa N T. Autophagy and autoimmunity crosstalks[J]. *Front Immunol*, 2013, 4: 88.
- [8] Xu Y, Eissa N T. Autophagy in innate and adaptive immunity[J]. *Proc Am Thorac Soc*, 2010, 7: 22-28.
- [9] Mizumura K, Cloonan S M, Haspel J A, Choi A M. The emerging importance of autophagy in pulmonary diseases[J]. *Chest*, 2012, 142: 1289-1299.
- [10] Lee H K, Mattei L M, Steinberg B E, Alberts P, Lee Y H, Chervonsky A, et al. *In vivo* requirement for Atg5 in antigen presentation by dendritic cells[J]. *Immunity*, 2010, 32: 227-239.
- [11] Reed M, Morris S H, Jang S, Mukherjee S, Yue Z, Lukacs N W. Autophagy-inducing protein beclin-1 in dendritic cells regulates CD4 T cell responses and disease severity during respiratory syncytial virus infection[J]. *J Immunol*, 2013, 191: 2526-2537.
- [12] Jagannath C, Lindsey D R, Dhandayuthapani S, Xu Y, Hunter R L Jr, Eissa N T. Autophagy enhances the efficacy of BCG vaccine by increasing peptide presentation in mouse dendritic cells[J]. *Nat Med*, 2009, 15: 267-276.
- [13] Zhang Z, Wu X, Duan J, Hinrichs D, Wegmann K, Zhang G L, et al. Low dose rapamycin exacerbates autoimmune experimental uveitis [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e36589.
- [14] Martinez F D, Vercelli D. Asthma[J]. *Lancet*, 2013, 382: 1360-1372.
- [15] Bhakta N R, Woodruff P G. Human asthma phenotypes: from the clinic, to cytokines, and back again[J]. *Immunol Rev*, 2011, 242: 220-232.
- [16] Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor[J]. *J Exp Med*, 1992, 176: 1693-1702.
- [17] Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing [J]. *EMBO J*, 2000, 19: 5720-5728.
- [18] Dickinson J D, Alevy Y, Malvin N P, Patel K K, Gunsten S P, Holtzman M J, et al. IL13 activates autophagy to regulate secretion in airway epithelial cells [J]. *Autophagy*, 2015, 12: 397-409.
- [19] Plantinga M, Guillems M, Vanheerswynghels M, Deswarte K, Branco-Madeira F, Toussaint W, et al.

- Conventional and monocyte-derived CD11b<sup>+</sup> dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen[J]. *Immunity*, 2013, 38: 322-335.
- [20] Stumbles P A, Thomas J A, Pimm C L, Lee P T, Venaille T J, Proksch S, et al. Resting respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate T helper cell type 2 (Th2) responses and require obligatory cytokine signals for induction of Th1 immunity[J]. *J Exp Med*, 1998, 188: 2019-2031.
- [21] Vermaelen K Y, Carro-Muino I, Lambrecht B N, Pauwels R A. Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes[J]. *J Exp Med*, 2001, 193: 51-60.
- [22] Akbari O, Freeman G J, Meyer E H, Greenfield E A, Chang T T, Sharpe A H, et al. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity[J]. *Nat Med*, 2002, 8: 1024-1032.
- [23] Akbari O, DeKruyff R H, Umetsu D T. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen[J]. *Nat Immunol*, 2001, 2: 725-731.
- [24] 曹 足,潘频华,谭洪毅,覃庆武,王 展,苏晓丽,等. 抗神经生长因子抗体对支气管哮喘小鼠肺组织自噬水平的影响[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2014, 37: 507-511.
- [25] Bakhru P, Sirisaengtaksin N, Soudani E, Mukherjee S, Khan A, Jagannath C. BCG vaccine mediated reduction in the MHC-II expression of macrophages and dendritic cells is reversed by activation of Toll-like receptors 7 and 9[J]. *Cell Immunol*, 2014, 287: 53-61.
- [26] Pen J J, Keersmaecker B D, Heirman C, Corthals J, Liechtenstein T, Escors D, et al. Interference with PD-L1/PD-1 co-stimulation during antigen presentation enhances the multifunctionality of antigen-specific T cells[J]. *Gene Ther*, 2014, 21: 262-271.
- [27] Paludan C, Schmid D, Landthaler M, Vockerodt M, Kube D, Tuschl T, et al. Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy [J]. *Science*, 2005, 307: 593-596.
- [28] Schmid D, Pypaert M, Münz C. Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes[J]. *Immunity*, 2007, 26: 79-92.
- [29] Münz C. Enhancing immunity through autophagy[J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 423-449.
- [30] Jyothula S S, Eissa N T. Autophagy and role in asthma [J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2013, 19: 30-35.
- [31] Poon A, Eidelman D, Laprise C, Hamid Q. ATG5, autophagy and lung function in asthma [J]. *Autophagy*, 2012, 8: 694-695.

[本文编辑] 曾奇峰,孙 岩