

## • 论著—实验研究 •

## 小鼠局部变应性鼻炎耐受模型的研究\*

张启迪<sup>1</sup> 祝婉婷<sup>1</sup> 邹知欣<sup>1</sup> 余文婷<sup>1</sup> 高培<sup>1</sup> 王颖<sup>2</sup> 陈建军<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:通过鼻腔滴入过敏原建立小鼠局部变应性鼻炎动物耐受模型,并对其免疫学指标及特征进行研究。方法:使用卵清蛋白(OVA)和磷酸盐缓冲液(PBS)对小鼠每日局部滴鼻,记录过敏症状,检测小鼠血清OVA特异性抗体(IgE、IgG1、IgG2a)及脾脏细胞培养上清的细胞因子(IL-4、IL-10、IFN- $\gamma$ )浓度,观察鼻黏膜嗜酸粒细胞及杯状细胞的浸润情况,用RNA-seq技术分析局部鼻黏膜基因的变化。结果:小鼠在OVA刺激下首先表现为过敏症状加重,血清OVA特异性抗体IgE、IgG1、IgG2a和体外培养脾脏细胞上清中IL-4、IFN- $\gamma$ 、IL-10升高,鼻黏膜嗜酸粒细胞和杯状细胞显著升高,鼻黏膜编码IL-10、TGF- $\beta$ 基因表达上调,嗜酸粒细胞活化基因上调。随着滴鼻时间继续延长,过敏症状逐渐减轻,血清OVA特异性抗体IgE、IgG1、IgG2a则持续增加,体外培养脾脏细胞上清IL-4下降,IL-10升高,IFN- $\gamma$ 有下降的趋势,鼻黏膜杯状细胞显著减少,嗜酸粒细胞活化基因显著下调,鼻黏膜编码IL-10、TGF- $\beta$ 等耐受基因维持高表达。筛选出10个与局部变应性鼻炎免疫耐受相关的核心基因: *Rps27a*、*Uba52*、*Kng2*、*Gnal*、*C3*、*Rtp4*、*Reep1*、*Rtp2*、*Rtp1*、*Reep5*。结论:通过局部持续滴入过敏原,可使小鼠先形成过敏,继而产生免疫耐受。这种免疫耐受的产生,可能是在变应原的持续作用下,诱导了全身及局部的免疫耐受效应。

**[关键词]** 鼻炎,变应性;免疫耐受;变应原;小鼠模型

**DOI:**10.13201/j.issn.2096-7993.2022.12.011

**[中图分类号]** R765.21 **[文献标志码]** A

## Establishment of local allergic rhinitis tolerance in mouse model

ZHANG Qidi<sup>1</sup> ZHU Wanting<sup>1</sup> ZOU Zhixin<sup>1</sup> YU Wenting<sup>1</sup>GAO Pei<sup>1</sup> WANG Ying<sup>2</sup> CHEN Jianjun<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Otorhinolaryngology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430022, China; <sup>2</sup>Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University)

Corresponding author: CHEN Jianjun, E-mail: yllly80331@163.com

**Abstract Objective:** To establish a mouse model of local allergic rhinitis tolerance by intranasal infusion of allergen, and study its immunological indexes and characteristics. **Methods:** The mice were given ovalbumin(OVA) and phosphate buffer solution(PBS) daily, and their allergic symptoms were recorded. OVA-specific antibodies (IgE, IgG1, IgG2a) in serum and cytokine(IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ ) in splenic culture supernatant were detected. The infiltration of eosinophils and goblet cells in nasal mucosa were observed, and the changes in local nasal mucosa genes were analyzed by RNA-seq technique. **Results:** Mice first showed aggravation of allergic symptoms when stimulated with OVA. The serum OVA-specific antibodies IgE, IgG1, IgG2a and the cytokine(IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ ) in splenic culture supernatant were increased, the eosinophils and goblet cells in nasal mucosa were significantly increased. The expression of encoding IL-10, TGF- $\beta$  gene and eosinophils activation gene in nasal mucosa were up-regulated. As the duration of nasal dripping increased, the allergic symptoms gradually decreased, serum OVA-specific antibodies IgE, IgG1, IgG2a continued to increase. Splenic culture supernatant IL-4 decreased, IL-10 increased, IFN- $\gamma$  had a downward trend. In nasal mucosa, goblet cells decreased significantly. Genes involved in eosinophils activation were significantly down-regulated. The encoding tolerance genes such as IL-10 and TGF- $\beta$  genes remained highly expressed. Ten core genes associated with immune tolerance in localized allergic rhinitis were screened, *Rps27a*, *Uba52*, *Kng2*, *Gnal*, *C3*, *Rtp4*, *Reep1*, *Rtp2*, *Rtp1*, *Reep5*. **Conclusion:** The mice first develop an allergy and then develop immune tolerance by continuous local drops of the allergen. The generation of immune tolerance may be induced by the continuous action of allergens, which induced systemic and

\*基金项目:国家自然科学基金项目(No:81873693)

<sup>1</sup>华中科技大学同济医学院附属协和医院耳鼻喉头颈外科(武汉,430022)

<sup>2</sup>安徽医科大学第一附属医院耳鼻喉头颈外科

通信作者:陈建军,E-mail:yllly80331@163.com

local immune tolerance effects.

**Key words** rhinitis, allergic; immune tolerance; allergen; mouse model

在过去的 20 年中,变应性鼻炎(AR)影响了全球 40% 的人口,患病率不断上升。AR 不仅使人们的生活质量下降,还带来巨大的经济负担<sup>[1]</sup>。AR 动物模型研究对 AR 的发病机制、治疗等具有重要意义。我们在前期的研究中,通过局部鼻腔滴注过敏原的方法,建立了稳定的 AR 小鼠动物模型,该动物模型的建立有别于经典的腹腔注射+鼻腔局部激发的动物模型,其应用不含佐剂的卵清蛋白(OVA)溶液在鼻腔局部进行滴注,通过 8 周左右的时间诱导小鼠局部的过敏症状,不但使局部嗜酸粒细胞显著升高和血清中特异性 IgE 升高,还使脾细胞培养上清中呈现出显著的 Th2 细胞因子分泌表现<sup>[2]</sup>。由于该模型能模拟人体 AR 的形成过程,因此可望更好地应用于 AR 的机制研究中。

在前期研究的基础上,我们进一步维持鼻腔过敏原的滴入,发现小鼠的过敏症状逐渐减轻,甚至最终接近正常状态,即形成了典型的耐受状态。临床上针对 AR 患者进行特异性免疫治疗时,通过皮下注射、舌下含服等方式,亦可显著减轻患者的过敏症状<sup>[3]</sup>,并可诱导机体对过敏原的特异性免疫耐受。免疫耐受的形成本主要依靠调节性 T 细胞(Treg)以及其他具有抑制作用的细胞、细胞因子和调节性抗原提呈细胞诱导和维持<sup>[4-5]</sup>。通过局部过

敏原持续滴鼻所形成的过敏-耐受模型中的机制是否与特异性免疫治疗形成的免疫耐受机制类似,或者是否存在其他的耐受机制,目前尚不清楚。因此,本研究通过对局部过敏原持续滴鼻的耐受模型进行观察,以期对相关耐受机制进行探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

24 只 5 周龄雌性 BALB/c 小鼠,SPF 级,购于北京维通利华有限公司,饲养于华中科技大学动物房。本实验经华中科技大学动物伦理委员会批准进行。

### 1.2 模型构建

将 24 只小鼠随机分为过敏对照组、过敏实验组、耐受对照组、耐受实验组,共 4 组,每组 6 只。① 过敏对照组:每天用 PBS 滴鼻,每侧鼻孔各 10  $\mu$ L,当滴鼻至第 8 周时,处死小鼠;② 耐受对照组:每天用 PBS 滴鼻,每侧鼻孔各 10  $\mu$ L,当滴鼻至第 15 周时,处死小鼠;③ 过敏实验组:每天用 25 mg/mL OVA(Sigma 公司)滴鼻,每侧鼻孔各 10  $\mu$ L,当滴鼻至第 8 周时,处死小鼠;④ 耐受实验组:每天用 25 mg/mL OVA 滴鼻,每侧鼻孔各 10  $\mu$ L,当滴鼻至第 15 周时,处死小鼠。小鼠局部 AR 耐受模型制备流程图见图 1。

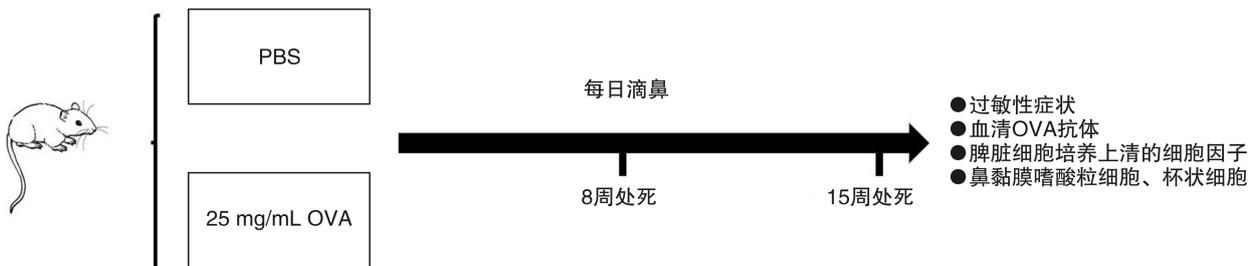


图 1 小鼠局部 AR 耐受模型制备流程图

### 1.3 实验方法

**1.3.1 症状学评分** 由于喷嚏症状在所有过敏性症状中最为突出,因此在第 0、4、7、15 周每周的第 1 天,记录每只小鼠滴鼻后 10 min 的打喷嚏次数并进行计算。

**1.3.2 血清 OVA 特异性抗体水平检测** 采用间接 ELISA 法测定血清 OVA 特异性抗体 IgE、IgG1 和 IgG2a 的浓度。具体方法:每 2 周小鼠尾静脉取血,收集血清保存于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱待检。将 2.5  $\mu\text{g/mL}$  OVA 包被在酶标板上,使用 1% 牛血清白蛋白(BSA)封闭。血清 IgE 按 1:200, IgG1 按 1:1000, IgG2 按 1:100 稀释,第 1 次孵育后加入 HRP 标记二抗,第 2 次孵育后加入显色液,第 3 次孵

育后加入终止液,最后在自动酶标仪上读取 406 nm 处 OD 值。

**1.3.3 脾细胞上清细胞因子水平检测** 在无菌台中解剖小鼠脾脏,使用小鼠脾脏淋巴细胞分离液试剂盒(TBD)分离出脾脏中的淋巴细胞,并用培养液(20%胎牛血清加入 1%双抗)重悬。将细胞悬液置于 24 孔细胞培养板中,每孔  $5 \times 10^6$  个/mL,并加入 30  $\mu\text{g/mL}$  OVA 刺激置于细胞培养箱中。培养 72 h 后收集上清液待检。使用 IL-4、IFN- $\gamma$ 、IL-10 试剂盒(R&D)检测脾细胞培养上清液细胞因子的水平。

**1.3.4 鼻黏膜组织学检测** 按照 Dunston 等<sup>[6]</sup>的方法提取鼻黏膜:剪去小鼠下颚,剔除鼻部周围的皮肤、肌肉及外周软组织,暴露鼻黏膜。将一半的

鼻黏膜置于无菌的离心管中,做好标记放入液氮;另外一半鼻组织相继放置在 4%多聚甲醛中和 EDTA 脱钙液中进行固定、脱钙,脱钙 1 周后行石蜡包埋切片。切片行苏木精-伊红染色及 PAS 染色,观察嗜酸粒细胞及杯状细胞情况。

**1.3.5 鼻黏膜 RNA 测序** 将每组小鼠鼻黏膜混合为 2 个样本进行 RNA-seq 检测分析,由武汉康测公司测序并分析。将之前放置于液氮中的小鼠鼻黏膜提取总 RNA,随后进行 DNA 酶切。用 Nanodrop™ OneC 分光光度计(Thermo Fisher Science Inc.)检测 A260/A280 以确定 RNA 质量,1.5%琼脂糖凝胶电泳法证实 RNA 的完整性。使用 Qubit™ RNA 广谱分析试剂盒(Life Technologies)对合格的 RNA 进行定量。将 200~500 bp 的扩增产物进行浓缩、定量,最后在 DNBSEQ-T7 测序仪(MGI Tech Co.,China)上进行测序。使用 TBtools 软件进行基因分析。使用 Kobas 软件(2.1.1 版本)对差异基因进行 GO 富集分析, $P < 0.05$  且错误检出率  $< 0.05$  为差异有统计学意义。对差异基因进行基因集富集分析, $P < 0.05$  且  $|NES| > 1$  为差异有统计学意义。将差异表达基因录入 STRING 数据库,构建差异基因的蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络。使用 Cytoscape 软件构建可视化 PPI 网络,并使用 CytoHubba 插件计算蛋白质节点的连通度和筛选差异显著的蛋白组模块。将排名前十的基因选为核心基因,并认为差异有统计学意义。

**1.4 统计学方法**

采用 GraphPad Prism 9.0 及 SPSS 22.0 等统计学软件分析数据。过敏性症状、血清特异性抗体、脾细胞培养上清液细胞因子和嗜酸粒细胞计数使用  $\bar{X} \pm S$  表示。采用秩和检验分析过敏性症状、血清特异性抗体、嗜酸粒细胞个数的组间差异。使用 Dunnett-*t* 检验对嗜酸粒细胞进行组间两两比较。使用单因素 ANOVA 分析脾细胞上清液细胞因子组间差异,然后使用 LSD 检验进行组间两两比较。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 症状学评分**

过敏实验组和耐受实验组在第 4 周逐渐出现喷嚏症状。在第 7~8 周时,其症状达到最高峰。

耐受实验组继续滴鼻,症状逐渐减轻,第 10~15 周时症状基本维持在较低的水平。不同时期滴鼻后各组的症状差异见表 1。与过敏对照组相比,过敏实验组喷嚏数在第 4、7 周均显著增加( $P < 0.01$ )。与耐受对照组相比,耐受实验组喷嚏数在第 4、7 周均显著增加( $P < 0.01$ ),第 15 周时喷嚏数与第 7 周相比显著减少( $P < 0.05$ ),与对照组相比无显著差异( $P = 0.35$ )。

**2.2 血清 OVA 特异性抗体**

过敏实验组和耐受实验组血清 OVA 特异性抗体 IgE、IgG1、gG2a 随着滴鼻时间的延长而升高。特异性 IgE、IgG2a 从第 0~15 周仍呈上升趋势,特异性 IgG1 从第 0 周快速上升至第 12 周之后趋势减缓。不同时期滴鼻后各组的血清 OVA 特异性抗体差异见表 2。过敏实验组的 IgE、IgG1、IgG2a 在第 4、8 周时与过敏对照组比较有显著差异( $P < 0.05$ )。耐受实验组的 IgE、IgG1、IgG2a 在第 4、8、15 周时,与耐受对照组比较有显著差异( $P < 0.05$ )。第 15 周耐受实验组 IgE、IgG1、IgG2a 均显著高于第 8 周时的浓度水平( $P < 0.05$ )。

**2.3 脾细胞培养上清细胞因子浓度**

过敏实验组脾细胞培养上清 IL-4、IFN- $\gamma$ 、IL-10 与过敏对照组相比均显著增加( $P < 0.01$ )。耐受实验组与耐受对照组比较发现,IL-4 与 IFN- $\gamma$  无显著差异,IL-10 显著升高( $P < 0.01$ )。将过敏实验组与耐受实验组比较发现,耐受实验组 IL-4 显著下降( $P < 0.01$ ),IFN- $\gamma$  亦有下降趋势,而 IL-10 则显著升高( $P < 0.05$ )。各组脾细胞培养上清细胞因子浓度差异见图 2。

**2.4 鼻黏膜苏木精-伊红和 PAS 染色**

**2.4.1 苏木精-伊红染色** 与过敏对照组相比,过敏实验组鼻黏膜上皮嗜酸粒细胞显著增加( $P < 0.01$ ),上皮细胞结构紊乱改变更加显著。耐受实验组与过敏实验组比较可见鼻黏膜上皮嗜酸粒细胞数目无显著差异。

**2.4.2 PAS 染色** 杯状细胞胞浆染为紫红色,与其他组织易于区分。与过敏对照组相比,过敏实验组杯状细胞显著增生。耐受实验组与过敏实验组比较发现杯状细胞显著减少(图 3)。

表 1 各组小鼠喷嚏数量比较

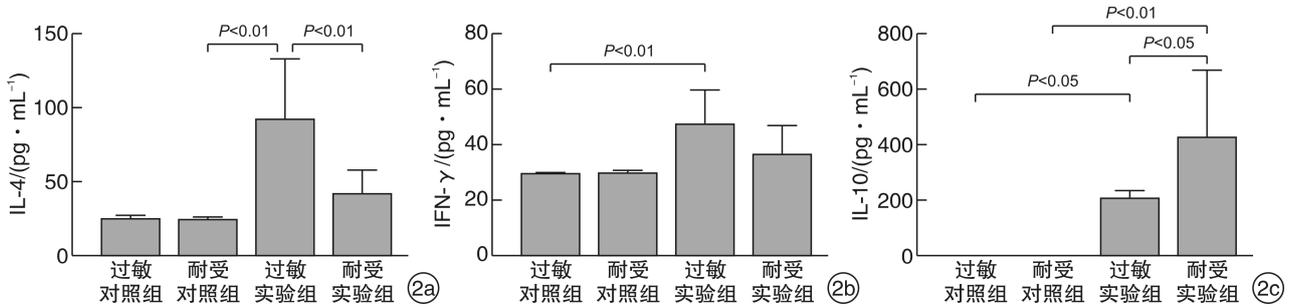
时间	过敏对照组	过敏实验组	耐受对照组	耐受实验组
第 0 周	2.33±1.80	1.33±0.84	1.83±1.34	1.50±1.26
第 4 周	2.17±0.9	9.25±2.86 <sup>2)</sup>	2.50±1.66	8.67±3.73 <sup>3)</sup>
第 7 周	2.6±1.36	14.2±3.12 <sup>2)</sup>	1.60±1.62	14.80±3.12 <sup>3)</sup>
第 15 周	—	—	2.25±1.30	4.00±2.45 <sup>1)</sup>

与第 7 周过敏实验组比较,<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与过敏对照组比较,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与耐受对照组比较,<sup>3)</sup> $P < 0.01$ 。

表 2 各组小鼠 OVA 特异性血清抗体水平比较

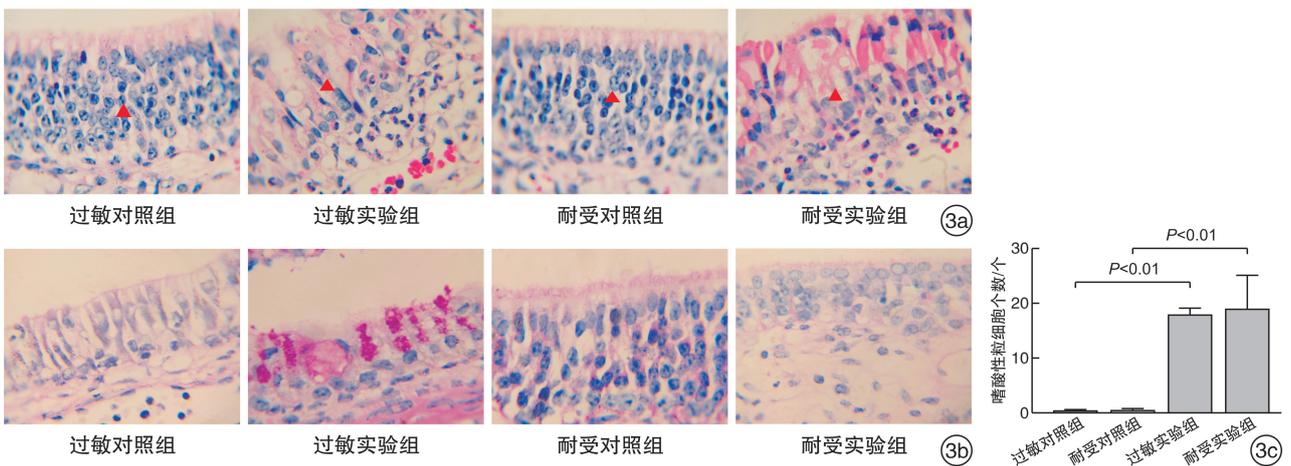
时间	过敏对照组	过敏实验组	耐受对照组	耐受实验组
<b>IgE</b>				
第 0 周	0.14 ± 0.04	0.13 ± 0.04	0.06 ± 0.01	0.11 ± 0.05
第 4 周	0.07 ± 0.01	0.32 ± 0.22 <sup>1)</sup>	0.14 ± 0.04	0.28 ± 0.15 <sup>2)</sup>
第 8 周	0.03 ± 0.00	0.55 ± 0.30 <sup>1)</sup>	0.04 ± 0.01	0.87 ± 0.49 <sup>2)</sup>
第 15 周	—	—	0.04 ± 0.02	1.61 ± 0.33 <sup>2) 3)</sup>
<b>IgG1</b>				
第 0 周	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
第 4 周	0.01 ± 0.00	0.30 ± 0.22 <sup>1)</sup>	0.02 ± 0.00	0.34 ± 0.14 <sup>2)</sup>
第 8 周	0.01 ± 0.00	0.70 ± 0.26 <sup>1)</sup>	0.04 ± 0.03	0.71 ± 0.29 <sup>2)</sup>
第 15 周	—	—	0.05 ± 0.04	1.61 ± 0.23 <sup>2) 3)</sup>
<b>IgG2a</b>				
第 0 周	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.03 ± 0.01
第 4 周	0.02 ± 0.00	0.18 ± 0.13 <sup>1)</sup>	0.02 ± 0.00	0.36 ± 0.09 <sup>2)</sup>
第 8 周	0.05 ± 0.03	0.22 ± 0.13	0.04 ± 0.01	0.34 ± 0.22 <sup>2)</sup>
第 15 周	—	—	0.08 ± 0.05	0.92 ± 0.41 <sup>2) 3)</sup>

与过敏对照组比较,<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与耐受对照组比较,<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ; 与第 8 周过敏实验组比较,<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ 。



2a: 各剂量组 IL-4 表达情况; 2b: 各剂量组 IFN- $\gamma$  表达情况; 2c: 各剂量组 IL-10 表达情况。

图 2 脾细胞培养上清细胞因子变化



3a: 鼻黏膜苏木精-伊红染色(▲上皮细胞所在方位); 3b: 鼻黏膜 PAS 染色; 3c: 鼻黏膜上皮嗜酸粒细胞计数。

图 3 各组鼻黏膜染色比较

## 2.5 鼻黏膜基因表达结果

**2.5.1 局部鼻黏膜 RNA-seq 结果** 过敏实验组与过敏对照组相比较, 嗜酸粒细胞活化功能相关基因 *IL6*、*Csf1*、*Csf2*、*Csf3*、*Tnf* 显著上调, *IL16*、*IL18*、*IL2* 未见显著变化; 嗜酸粒细胞的趋化功能相关基因 *Ccl11*、*IL5* 无显著变化; 耐受相关基因

*IL10*、*tgfb1*、*tgfb3* 上调, *tgfb2* 无显著变化。GO 基因功能富集结果表明, 固有免疫应答、适应性免疫应答、炎症反应、免疫反应及信号传导等生物学过程显著上调。基因集富集分析表明, 富集的基因集涉及 T 细胞增殖信号通路 ( $P = 0.014$ )。

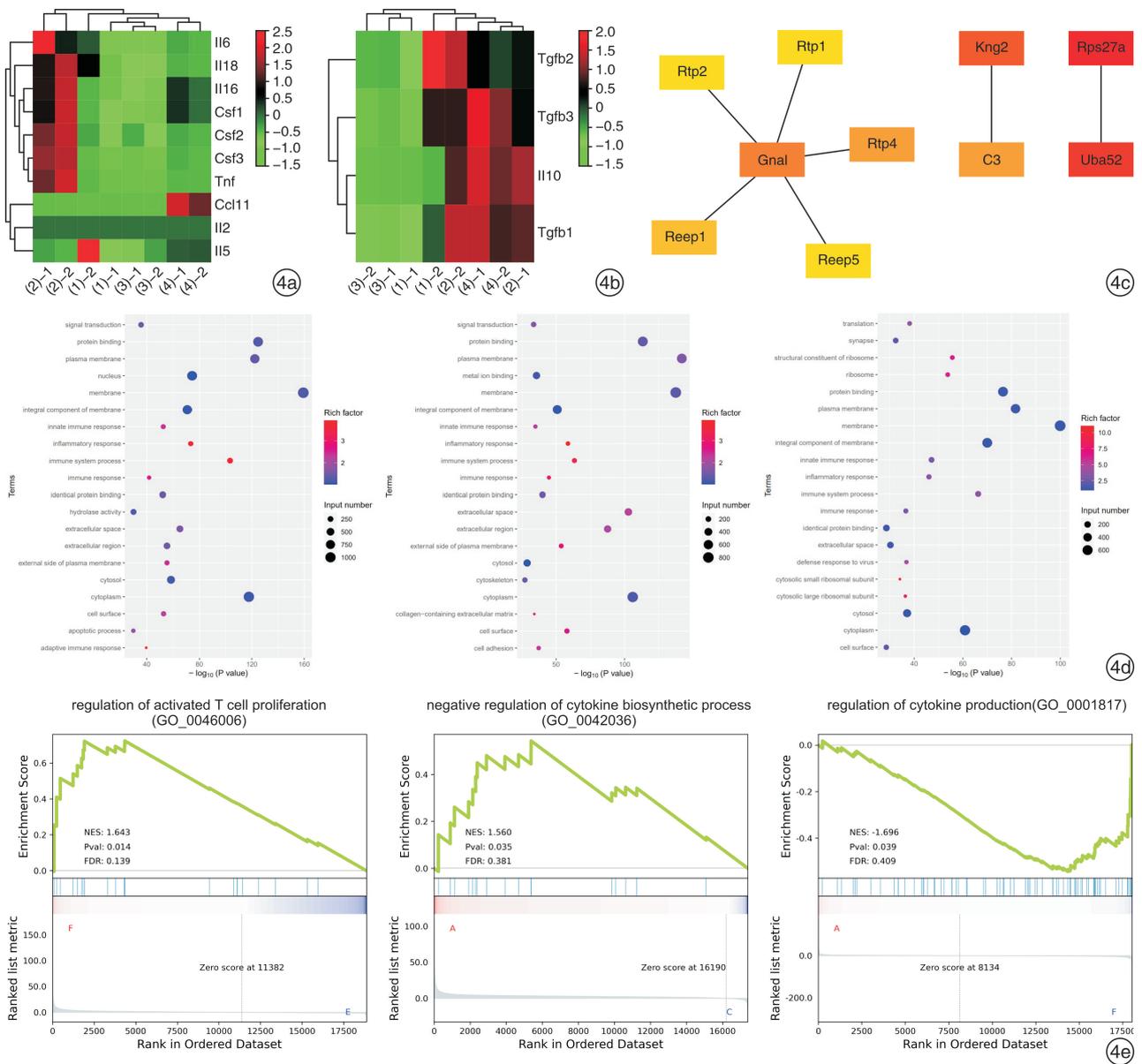
耐受实验组与耐受对照组比较后发现, 嗜酸粒

细胞活化功能相关基因 *IL16*、*csf1*、*tnf* 上调, *IL18*、*Csf2*、*Csf3*、*IL2* 无显著差异,嗜酸粒细胞的趋化功能相关基因 *Ccl11* 上调、*IL5* 无明显变化;耐受相关基因 *IL10*、*tgfb1*、*tgfb3* 上调,*tgfb2* 无明显变化。*GO* 基因功能富集结果表明,固有免疫应答、炎症反应、免疫反应、信号传导等生物学过程显著上调。富集的基因集涉及细胞因子生物合成过程的负调控( $P=0.035$ )。

将耐受实验组和过敏实验组进行比较,可见嗜酸粒细胞活化功能相关基因 *IL6*、*IL18*、*Csf2*、*Csf3*、*Tnf* 显著下调,*IL16*、*IL2*、*Csf1* 未发生显著变化;嗜酸粒细胞的趋化功能相关基因 *Ccl11* 上

调,*IL5* 无显著变化;耐受相关基因 *IL10*、*tgfb1*、*tgfb2*、*tgfb3* 无显著变化。*GO* 基因功能富集结果表明,固有免疫应答、炎症反应及免疫反应等生物学过程显著下调。富集的基因集涉及细胞因子产生调节信号通路( $P=0.039$ )

**2.5.2 核心基因分析** 使用 STRING 数据库构建 PPI 网络,它由 8516 个节点和 99105 条边组成。使用 cytoHubba 插件,根据 Degree 值计算出排名前 10 的差异表达基因,分别为 *Rps27a*、*Uba52*、*Kng2*、*Gnal*、*C3*、*Rtp4*、*Reep1*、*Rtp2*、*Rtp1*、*Reep5* 即为 AR 免疫耐受的核心基因。见图 4。



4a:鼻黏膜嗜酸粒细胞功能相关基因表达热图,每组显示 2 个样本,(1)为过敏对照组(2)为过敏实验组(3)为耐受对照组(4)为耐受实验组;4b:耐受相关的基因表达热图,每组显示 2 个样本;4c:AR 免疫耐受模型的前 10 核心基因,颜色从深到浅代表 Degree 值从大到小;4d:差异表达基因的 GO 分析气泡图;过敏实验组与过敏对照组比较上调的富集基因;耐受实验组与耐受过敏组比较上调的富集基因;耐受实验组与过敏实验组比较下调的富集基因;4e:差异表达基因的基因集富集分析结果。

图 4 鼻黏膜差异基因表达

### 3 讨论

本研究使用 OVA 每日持续滴鼻方法,建立了小鼠局部 AR 耐受模型,发现随着滴鼻时间的延长,小鼠全身 Th2 反应先增强后减弱,Th1 反应先增强随后也有下降趋势,Treg 反应则持续增强,局部炎症反应增强到一定程度后亦呈下降趋势。

免疫耐受的形成是过敏症状得以从根本上减轻的重要机制,因此在过敏反应进程中具有非常重要的意义。在自然状态下,养蜂人可因蜜蜂反复蛰咬,从而形成对蜂毒的自然耐受<sup>[7]</sup>。在临床上,免疫耐受的形成更多是通过人为给予大剂量的过敏原提取物刺激,从而诱导形成免疫耐受状态。如使用尘螨抗原进行皮下特异性免疫治疗使 AR 患者鼻部症状显著减轻<sup>[8-9]</sup>。使用草花粉舌下含片可使中重度的花粉 AR 患者发生免疫耐受,其鼻部症状可显著减轻,sIgG4 可见显著升高<sup>[10]</sup>。Maeta 等<sup>[11]</sup>在使用高剂量 OVA 诱导小鼠口服免疫耐受时发现,腹泻发生率与时间有相关性,在致敏阶段,腹泻发生率与口服激发时间呈正相关;口服免疫耐受之后,与腹腔激发时间呈负相关。本研究结果显示,过敏实验组在第 7~8 周时过敏症状达到最高峰,随后症状逐渐减轻,这与 Maeta 等的研究结果相一致。研究发现,免疫耐受能够使靶器官中的过敏性炎症细胞,如肥大细胞、嗜酸粒细胞和嗜碱粒细胞活性降低<sup>[12]</sup>。在 AR 的发生过程中,嗜酸粒细胞能够释放促炎因子和其他炎症介质,促进过敏性炎症的发展<sup>[13]</sup>。本研究发现,嗜酸粒细胞和杯状细胞先随着滴鼻时间增加而表达增加,免疫耐受形成后,局部黏膜中嗜酸粒细胞数量虽然变化不大,但通过鼻黏膜 RNA 测序结果发现,耐受实验组嗜酸粒细胞活化相关因子表达显著降低,包括 *IL6*、*IL18*、*Csf2*、*Csf3* 和 *Tnf*。Lopez-Ramirez 等<sup>[14]</sup>使用高剂量屋尘螨抗原使哮喘模型小鼠形成免疫耐受后,发现气道高反应性明显改善,同时肺组织中的杯状细胞增生显著减少。本研究还发现耐受实验组中杯状细胞显著减少,且与症状显著减轻的改变相一致。

在诸多临床研究中,IgG4 抗体被认为是 AIT 形成的与免疫耐受相关的标志性抗体<sup>[15-17]</sup>。小鼠 IgG1 在功能上与人类 IgG4 相似<sup>[18]</sup>。本研究中发现,随着滴鼻时间的延长,IgG1 可持续增高。亦可能与人体免疫耐受形成过程中 IgG4 产生增高具有相似的机制。

IL-10 是主要由 Treg 细胞产生的细胞因子,能够显著抑制过强的 Th 反应,尤其可使 Th2 细胞反应受到抑制<sup>[19]</sup>。我们观察不同组脾细胞培养上清液及细胞因子改变情况发现,在第 8 周 AR 模型中,过敏实验组 IL-4、IL-10、IFN- $\gamma$  均有升高,表明当过敏原暴露后,小鼠 Th1、Th2、Treg 反应都是增

强的;而在第 15 周时,随着过敏原暴露时间的延长,耐受实验组中 IL-10 显著上升,IL-4 显著下降,表明耐受实验组 Treg 细胞功能增强,可能对 Th2 相关反应产生抑制。

Nouri-Aria 等<sup>[20]</sup>发现,季节性 AR 患者行特异性免疫治疗后,其鼻黏膜中 IL-10 mRNA 可显著增加;TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 和 TGF- $\beta$ 3 均可在免疫耐受中发挥一定的生物学效应<sup>[21]</sup>。本研究发现,耐受实验组小鼠鼻黏膜免疫耐受相关细胞因子 IL-10、TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 3 的基因表达均有上调,可能对 AR 局部炎症及嗜酸粒细胞活化起负性调节作用,从而减轻过敏反应。

GO 富集分析的结果表明,AR 免疫耐受主要与免疫反应、炎症反应有关,基因集富集分析研究了免疫耐受可能发生机制,主要涉及 T 细胞增殖和细胞因子合成的信号通路。Fossati-Jimack 等<sup>[22]</sup>发现,C3 通过调节 DC 功能,在多肽介导的小鼠皮肤移植模型耐受的诱导中起关键作用,C3 缺陷小鼠不能产生诱导耐受所需的功能性 Treg 细胞。C3 基因可能在诱导小鼠 AR 局部耐受机制中起重要作用,其他核心基因与免疫耐受的关系尚未见文献报道,需要进一步研究。

综上所述,以一定剂量的变应原持续滴鼻,可使 BALB/c 小鼠先形成过敏,继而产生免疫耐受。这种免疫耐受的产生,可能是在变应原的持续作用下,诱导了全身及局部的免疫耐受效应。如 Treg 细胞免疫反应功能加强,从而抑制了 Th2 反应和局部炎症反应。该局部免疫耐受的小鼠模型,可望为过敏-免疫耐受相关研究提供一个有效的动物模型工具。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] Brozek JL, Bousquet J, Agache I, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines-2016 revision[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 140(4): 950-958.
- [2] Wang Y, Zhou Y, Zhu Y, et al. The Comparison of Intraperitoneal Injection and Nasal-only Delivery Allergic Rhinitis Model Challenged With Different Allergen Concentration[J]. *Am J Rhinol Allergy*, 2019, 33(2): 145-152.
- [3] Durham SR, Emminger W, Kapp A, et al. SQ-standardized sublingual grass immunotherapy: confirmation of disease modification 2 years after 3 years of treatment in a randomized trial[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2012, 129(3): 717-725. e5.
- [4] Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of immune tolerance to allergens: role of IL-10 and Tregs[J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(11): 4678-4680.
- [5] Soyer OU, Akdis M, Ring J, et al. Mechanisms of peripheral tolerance to allergens[J]. *Allergy*, 2013, 68

- (2):161-170.
- [6] Dunston D, Ashby S, Krosnowski K, et al. An effective manual deboning method to prepare intact mouse nasal tissue with preserved anatomical organization [J]. *J Vis Exp*, 2013, 78:50538.
- [7] Santos MCP, Serra-Caetano A, Pedro E, et al. Expansion of FOXP3+ regulatory CD4 T cells upon exposure to hymenoptera venom during the beekeeping season [J]. *Allergy*, 2019, 74(6):1182-1184.
- [8] Jutel M, Brügggenjürgen B, Richter H, et al. Real-world evidence of subcutaneous allergoid immunotherapy in house dust mite-induced allergic rhinitis and asthma [J]. *Allergy*, 2020, 75(8):2050-2058.
- [9] Bozek A, Kołodziejczyk K, Kozłowska R, et al. Evidence of the efficacy and safety of house dust mite subcutaneous immunotherapy in elderly allergic rhinitis patients: a randomized, double-blind placebo-controlled trial [J]. *Clin Transl Allergy*, 2017, 7:43.
- [10] Scadding GW, Calderon MA, Shamji MH, et al. Immune Tolerance Network GRASS Study Team. Effect of 2 Years of Treatment With Sublingual Grass Pollen Immunotherapy on Nasal Response to Allergen Challenge at 3 Years Among Patients With Moderate to Severe Seasonal Allergic Rhinitis: The GRASS Randomized Clinical Trial [J]. *JAMA*, 2017, 317(6):615-625.
- [11] Maeta A, Matsushima M, Katahira R, et al. Diets Supplemented with 1% Egg White Induce Oral Desensitization and Immune Tolerance in an Egg White-Specific Allergic Mouse Model [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2018, 176(3/4):205-214.
- [12] Gri G, Piconese S, Frossi B, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40 L interaction [J]. *Immunity*, 2008, 29(5):771-781.
- [13] Zeng Q, Zeng Y, Tang Y, et al. Effect of IL-35 on apoptosis, adhesion, migration, and activation of eosinophils in allergic rhinitis [J]. *Pediatr Allergy Immunol*, 2022, 33(2):e13717.
- [14] Lopez-Ramirez MA, Soto F, Wang C, et al. Built-In Active Microneedle Patch with Enhanced Autonomous Drug Delivery [J]. *Adv Mater*, 2020, 32(1):e1905740.
- [15] van Neerven RJ, Wikborg T, Lund G, et al. Blocking antibodies induced by specific allergy vaccination prevent the activation of CD4+ T cells by inhibiting serum-IgE-facilitated allergen presentation [J]. *J Immunol*, 1999, 163(5):2944-2952.
- [16] Radulovic S, Jacobson MR, Durham SR, et al. Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4+ CD25+ cells in the nasal mucosa [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2008, 121(6):1467-1472.
- [17] Wachholz PA, Nouri-Aria KT, Wilson DR, et al. Grass pollen immunotherapy for hayfever is associated with increases in local nasal but not peripheral Th1:Th2 cytokine ratios [J]. *Immunology*, 2002, 105(1):56-62.
- [18] Lilienthal GM, Rahmüller J, Petry J, et al. Potential of Murine IgG1 and Human IgG4 to Inhibit the Classical Complement and Fcγ Receptor Activation Pathways [J]. *Front Immunol*, 2018, 9:958.
- [19] Brooks DG, Trifilo MJ, Edelmann KH, et al. Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo [J]. *Nat Med*, 2006, 12(11):1301-1309.
- [20] Nouri-Aria KT, Wachholz PA, Francis JN, et al. Grass pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity [J]. *J Immunol*, 2004, 172(5):3252-3259.
- [21] Okamura T, Sumitomo S, Morita K, et al. TGF-β3-expressing CD4+CD25(-)LAG3+ regulatory T cells control humoral immune responses [J]. *Nat Commun*, 2015, 19:6:6329.
- [22] Fossati-Jimack L, Ling GS, Baudino L, et al. Intranasal peptide-induced tolerance and linked suppression: consequences of complement deficiency [J]. *Immunology*, 2015, 144(1):149-157.

(收稿日期:2022-08-08)