

·基础研究·

变应性鼻炎患者血浆细胞外囊泡对树突状细胞和巨噬细胞的调控作用

方淑斌, 付清玲

(中山大学附属第一医院耳鼻咽喉科医院, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】树突状细胞(DCs)和巨噬细胞(M ϕ)在变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)的发病过程中起重要调控作用。本研究主要探讨AR血浆细胞外囊泡(EVs)对DCs和M ϕ 分化的调控作用。【方法】招募健康志愿者(HC)和AR患者各6人,应用超速离心法制备HC-EVs和AR-EVs;将磁珠分选所得人CD14⁺单核细胞在体外分别诱导分化成DCs和M ϕ ,并用5 \times 10⁸/mL HC-EVs和AR-EVs分别对单核细胞、DCs和M ϕ 进行刺激,通过ELISA、聚合酶链反应(PCR)或流式分析的方法进行分析。【结果】流式分析表明,与HC-EVs相比,AR-EVs刺激CD14⁺单核细胞5天后,单核细胞表面CD14、CD68、CD80和CD86表达水平均无显著差异。用AR-EVs刺激不成熟DCs(iDC)2天后,iDC表面HLA-DR、CD40和CD80表达水平亦无显著差异。用AR-EVs刺激M ϕ 2天后,PCR显示M ϕ 中IL-6(P <0.001)和TNF- α (P <0.05)的表达水平显著下降,TGM2的表达水平显著上升(P <0.05),而MRC1和IL-10的表达水平则无显著变化。【结论】AR-EVs可显著促进M ϕ 向促炎的M2型极化,抑制M ϕ 向M1型极化,但AR-EVs对CD14⁺单核细胞向DCs和M ϕ 分化及DCs的成熟均无明显作用,这提示血浆EVs可能通过调控M ϕ 的极化促进AR的发生发展。

关键词:变应性鼻炎;细胞外囊泡;树突状细胞;巨噬细胞;免疫调控

中图分类号:R392 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2021)06-0808-08

DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2021.0602

Effects of Plasma Extracellular Vesicles on Dendritic Cells and Macrophages in Patients with Allergic Rhinitis

FANG Shu-bin, FU Qing-ling

(Otorhinolaryngology Hospital, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Correspondence to: FU Qing-ling; E-mail: fuqingl@mail.sysu.edu.cn

Abstract:【Objectives】Dendritic cells (DCs) and macrophages (DCs) are involved in the pathogenesis of allergic rhinitis (AR). The present study was aimed to explore the effects of plasma extracellular vesicles (EVs) derived from patients with AR on differentiation of DCs and M ϕ .【Methods】Healthy control ($n=6$, HC) and AR patients ($n=6$) were recruited, and HC-EVs and AR-EVs were isolated from plasma by ultracentrifugation. Human CD14⁺ monocytes were isolated and induced into DCs and M ϕ , respectively. Human monocytes, DCs and M ϕ were cultured in the presence of 5 \times 10⁸/mL HC-EVs or AR-EVs, and collected for polymerase chain reaction (PCR) or flow cytometry analysis.【Results】Compared with HC-EVs, no significant effect was observed on levels of CD14, CD68, CD80 and CD86 on monocytes after be-

收稿日期:2021-05-25

基金项目:国家自然科学基金(81770984, 81970863);广东省基础与应用研究基金(2020A1515110794);中国博士后科学基金(2021M693639)

作者简介:方淑斌, 博士后, 研究方向:呼吸道变应炎症及感音神经性聋的发病机制及其干预, E-mail: fangshb3@mail.sysu.edu.cn; 付清玲, 通信作者, 研究员, 博士生导师, 研究方向:呼吸道变应性炎症的发病机制及干细胞干预, E-mail: fuqingl@mail.sysu.edu.cn

ing treated with AR-EVs for 5 days. Similarly, levels of HLA-DR, CD40 and CD80 on immature DCs (iDCs) showed no significant difference in the presence of AR-EVs for 2 days. Interestingly, levels of IL-6 ($P<0.001$) and TNF- α ($P<0.05$) were significantly decreased, and level of TGM2 were significantly increased in M ϕ treated with AR-EVs for 2 day. However, no effects of AR-EVs were observed on levels of MRC1 and IL-10.【Conclusion】 AR-EVs were able to promote proinflammatory M2 polarization and inhibit M1 polarization of M ϕ , but showed no significant effects on differentiation of DCs or M ϕ as well as the maturation of DCs, suggesting that plasma EVs could promote the development of AR via regulation on M ϕ polarization.

Key words: allergic rhinitis; extracellular vesicles; dendritic cells; macrophages; immunomodulation

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2021, 42(6): 808-815]

变应性鼻炎 (allergic rhinitis, AR) 是一种以炎症浸润、气道重塑和气道高反应为特点, 由多种细胞和细胞因子参与的呼吸道变应性炎症^[1-3]。AR 发病率逐年上升且治疗仍以对症治疗为主^[4]。因此, 深入探讨 AR 的发病机制可为 AR 的临床治疗提供新型靶点。细胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs) 是由细胞释放的纳米级别微囊泡, 可分为由多囊泡体途径形成的外泌体和由胞膜释放形成的细胞外囊泡^[5-6]。EVs 在呼吸道变应性炎症的发病过程中扮演着极为重要的角色^[5, 7]。其中, 变应性呼吸道炎症患者肺泡灌洗液中的 EVs 所包含的 miRNA 和蛋白质与正常人不同, 这些差异性表达的 miRNA 和蛋白质可通过调控免疫细胞的功能促进炎症反应^[8-13]。此外, 气道组织中炎症反应所产生的 EVs 亦可进入血液循环, 且其所携带的 miRNA 等生物活性分子的表达谱亦与正常人存在差异^[14-15]。在呼吸道变应性炎症中, 外周循环中树突状细胞 (dendritic cells, DCs) 可分为髓系 DCs (myeloid DCs, mDCs) 和浆系 DCs (plasmacytoid DCs, pDCs), 其中 pDCs 和 mDCs 均可参与调控炎症反应^[16-17]。巨噬细胞 (macrophages, M ϕ) 可分为 M1 型和 M2 型巨噬细胞, M2 型巨噬细胞中 TGM2 表达升高可促进嗜酸性炎症浸润, 而 MRC1 和 IL-10 升高则可抑制炎症浸润^[18]。外周血循环中的单核细胞可在特定炎症因子的作用下分化形成 DCs 和 M ϕ 进而促进炎症的发生发展。血浆 EVs 可通过调控辅助性 T 细胞的分化促进多发性硬化和风湿性关节炎等炎症性疾病的发展^[19-20], 表明血浆 EVs 具备一定的免疫应答的作用。但是, 关于呼吸道变应性炎症患者血浆 EVs 对 DCs 和 M ϕ 分化成熟和功能的调控作用则有待进一步探讨。因此, 本研究拟通过体外细胞实验探讨 AR 患者血浆 EVs (AR-EVs) 对

DCs 和 M ϕ 调控作用, 从而为 AR 的发病机制提供新的理解。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验细胞 本实验所用单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞是由白膜来源外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) 分选和诱导所得。其中, 白膜由广州血液中心所提供, 中山大学附属第一医院伦理委员会批准豁免签署知情同意书。

1.1.2 实验试剂 GM-CSF 和 M-CSF 购自美国 Peprotech 公司, IL-4 购自美国 R&D 公司。流式抗体购自美国 BD 公司, 内毒素 (lipopolysaccharide, LPS) 购自美国 Sigma 公司, FicolI 液购自美国 MP Biomedicals, 荧光定量 PCR 试剂盒购自瑞士 Roche 公司, 逆转录试剂盒购自日本 Takara 公司, Western Blot 抗体购自美国 Abcam 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 志愿者招募 在本研究中, 我们招募了 6 位 HC 健康志原者 (healthy control, HC) 和 6 位 AR 患者。其中, AR 患者主要诊断依据为 Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma 2008^[1], 主要包括: 鼻部症状 (流鼻涕、鼻痒、鼻塞、打喷嚏和鼻后滴漏) 和尘螨检测阳性。HC 无任何鼻部症状及变应性鼻炎病史。所有的志愿者未使用抗组胺药物或激素 1 个月以上, 无吸烟史, 无其他疾病病史。每位志愿者抽取 20 mL 静脉血, 300 $\times g$ 离心 5 min 去除血细胞, 取上清进一步于 2 000 $\times g$ 离心 10 min 去除细胞碎片和血小板等, 将标本按 2 mL/管冻存于 -80 $^{\circ}C$ 冰箱。本研究已通过中山大学附属第一医院临床科研和

实验动物伦理委员会审批(伦审[2019]331号)并得到患者的知情同意。

1.2.2 血浆 EVs 的提取 我们利用超速离心法分离 HC 血浆 EVs (HC-EVs) 及 AR-EVs^[21]。简述之,将冻存的血浆于 4 °C 融化,用无菌的 PBS 溶液稀释 10 倍,于 12 000 ×g 离心 30 min,然后于 110 000 ×g 依次离心 2 h 和 70 min,最后用 50 μL PBS 重悬,-80 °C 冻存(图 1A)。

1.2.3 纳米颗粒示踪分析 用无菌 PBS 按 1:50 比例将 EV 样品稀释,取 1 mL 稀释后的样本按照说明用 NS300 Nanosight instrument (Malvern, UK) 进行检测,每个样本重复检测 3 次,每次 1 min。

1.2.4 透射电镜 用 2% 戊二醛固定 EV 样品,然后将 10 μL EV 样品滴至铜网上,2 min 后滴加 3% 磷钨酸(pH=7.0)于铜网,2 min 后滴加纯水,用滤纸从铜网边缘吸取多余的水,晾干后使用透射电镜(H7650; HITACHI, Tokyo, Japan)进行观察拍照。

1.2.5 Western Blot 将 EV 样品按体积加入 Loading Buffer 后,在恒温金属浴机上 95 °C 孵育 5 min;配制质量分数 10% 的分离胶和 5% 的浓缩胶,按顺序加入 20 μg/孔样品进行电泳,80 V 电泳 25 min,145 V 电泳 45 min;于 15 V 恒压转膜 1 h 将样品转到 PVDF 膜,用 5% 的脱脂奶粉于摇床上室温孵育 1 h;用质量分数 5% 的 BSA 溶液按比例稀释抗体:CD63 (1:2 000),Alix (1:5 000) 和 TSG101 (1:1 000),于 4 °C 孵育过夜,洗涤后与二抗(1:5 000)于室温孵育 1 h,最后用显影液曝光显影。

1.2.6 人 PBMC 的分选 首先将白膜按 2:1 用 PBS 进行稀释,在 50 mL 离心管中加入 Ficoll 液,体积为稀释后白膜体积的一半,然后进行离心(778 ×g, 20 min, RT),用移液枪小心吸出中间的 PBMC 层,根据所吸取的 PBMC 的体积近 1:5 加入 PBS,进行离心(778 ×g, 20 min, RT),所获取细胞即为 CD4⁺T 细胞。

1.2.7 CD14⁺单核细胞的分选 吸取 1×10⁸ 个 PBMC,用 175 μL MACS Buffer 重悬后,加入 25 μL CD14⁺磁珠,于 4 °C 孵育 15 min;安装好分选磁柱,向磁柱加入 500 μL MACS Buffer 湿润柱子;用 2 mL MACS Buffer 重悬孵育后的 PBMC,300 ×g 离心 5 min 后,用 1 mL MACS Buffer 重悬细胞,待其缓慢流干后,再向磁柱加入 500 μL MACS Buffer 3 次;最后再将磁柱放置于新的 15 mL 离心管上,加入 1 mL MACS Buffer 后快速用活塞将吸附于磁柱上的细胞挤压至离心管中,所获即为 CD14⁺单核细胞。

1.2.8 巨噬细胞和树突状细胞的诱导 将 5×10⁵ 个 CD14⁺单核细胞种植于 24 孔板内,分别用含 M-CSF (50 ng/mL) 的完全培养基(RPMI 1640 + 10% FBS) 培养 6 天将其诱导成巨噬细胞;同样地,用含 GM-CSF (50 ng/mL) + IL-4 (10 ng/mL) 的完全培养基培养 5 天可将其诱导成为不成熟树突状细胞 (immature DCs, IDC),再加入 100 ng/mL LPS 刺激 2 天即可获得成熟树突状细胞。

1.2.9 血浆 EVs 与单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞共培养 将单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞按 5×10⁵ 种植于 24 孔板,用 RPMI 1640 + 10% FBS 进行培养,并分别加入 5×10⁸ HC-EVs 和 AR-EVs,收样后用于流式分析、PCR 检测或 ELISA 检测。

1.2.10 流式分析 收集细胞后,根据需要按说明书加入相应的抗体,包括:CD14-PC7、HLA-DR-APC-A750、CD40-APC、CD80-FITC、CD86-PC7 和 CD68-PC7,孵育 30 min 后,收集细胞后进行流式分析(Beckman Coulter, 美国),每个样本最终分析的细胞数大约为 2×10⁴。

1.2.11 聚合酶链反应 收集细胞,加入 1 mL RNeasy Plus 对细胞进行裂解,加入 1/5 RNeasy Plus 体积的氯仿进行萃取,取上清液并加入等体积的异丙醇进行沉淀,最后用 75% 的乙醇洗涤 2 遍。本研究中 PCR 所使用的引物为(5'→3'):

F-*TNF-α* CAGGCGGTGCCTATGTCTC, R-*TNF-α* CGATCACCCCGAAGTTCAGTAG;

F-*MRC1* GGGTTGCTATCACTCTCTATGC, R-*MRC1* TTTCTTGCTGTGTGCGGTAGTT;

F-*TGM2* GAGGAGCTGGTCTTAGAGAGG, R-*TGM2* CGGTCACGACACTGAAGGTG;

F-*GAPDH* GAGTCAACGGATTTGGTCTCG, R-*GAPDH* TTGATTTTGGAGGGATCTCG。

1.2.12 酶联免疫吸附测定 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 根据说明书,利用 R&D DuoSet ELISA Kit 对细胞上清进行检测。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 6 统计软件进行数据分析,计量资料以均数±标准误 (Mean ± SEM) 表示。两组间比较采用 *t* 检验,多组间数据比较采用单因素方差分析。*P* < 0.05 表明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血浆 EVs 的提取与鉴定

我们招募了6位 HC 志愿者和6位 AR 患者,入组志愿者的基本信息见表1。通过超速离心法分别制备 HC-EVs 和 AR-EVs(图1A),利用透射电镜观察其形态结构,发现 HC-EVs 和 AR-EVs 均为直径约 100 nm 的囊泡,具备完整的膜结构(图1B)。通过 Western Blot 鉴定 HC-EVs 和 AR-EVs 中的特异性标记物,发现其均表达 CD63、Alix 和 TSG101,同时 HC-EVs 和 AR-EVs 中这些特异性标记物的表达水平无显著差异(图1C)。此外,我们利用纳米颗粒示踪分析对所获取的 HC-EVs 和 AR-EVs 的颗粒数进行定量分析(图1D),两者之间的浓度亦未见明显差异。上述这些结果表明超速离心法可成功从血浆中制备 EVs 用于后续的实验研究。

2.2 AR-EVs 对树突细胞和巨噬细胞的分化无显著促进作用

由于巨噬细胞和树突状细胞均可从 CD14⁺ 外周血单核细胞分化而来,因此,本研究首先探讨 AR-EVs 是否能够调控单核细胞向树突状细胞和巨噬细胞分化。我们分别于第0天和第3天给予单核细胞 HC-EVs 和 AR-EVs 进行刺激,并于第5天收集细胞进行分析(图2A)。通过流式分析,我们

表1 志愿者基本信息

Table 1 Baseline characteristics of volunteers

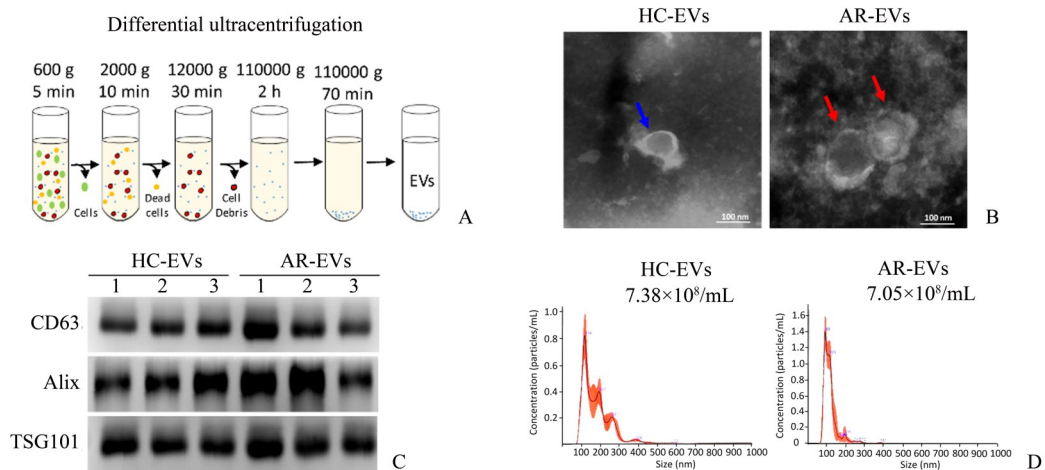
Characteristics	HC subjects	AR patients
No. of patients	6	6
Age/years	25.00 ± 1.12	24.67 ± 1.21
Sex (female/male)	3/3	4/2
SPT result (positive/subjects tested)	0/6	6/6

AR: Allergic rhinitis, HC: healthy control, SPT: Skin prick test.

发现 CD14 ($F=1.38, P=0.29$)、CD80 ($F=0.86, P=0.45$)、CD86 ($F=0.60, P=0.57$) 和 CD68 ($F=2.35, P=0.14$) 的组间比较均无显著差异。此外,HC-EVs 和 AR-EVs 对单核细胞特异性标记物 CD14 的表达水平无明显抑制作用 ($P=0.92$)。同时,HC-EVs 和 AR-EVs 对巨噬细胞特异性标记物 CD68 ($P=0.13$) 的表达水平以及树突状细胞特异性标记物 CD80 ($P=0.68$) 和 CD86 ($P=0.71$) 的表达水平亦无明显的作用(图2B、C)。上述结果表明 HC-EVs 和 AR-EVs 在单核细胞向巨噬细胞和树突状细胞的分化过程均无显著促进作用。

2.3 AR-EVs 对树突状细胞成熟的调控作用

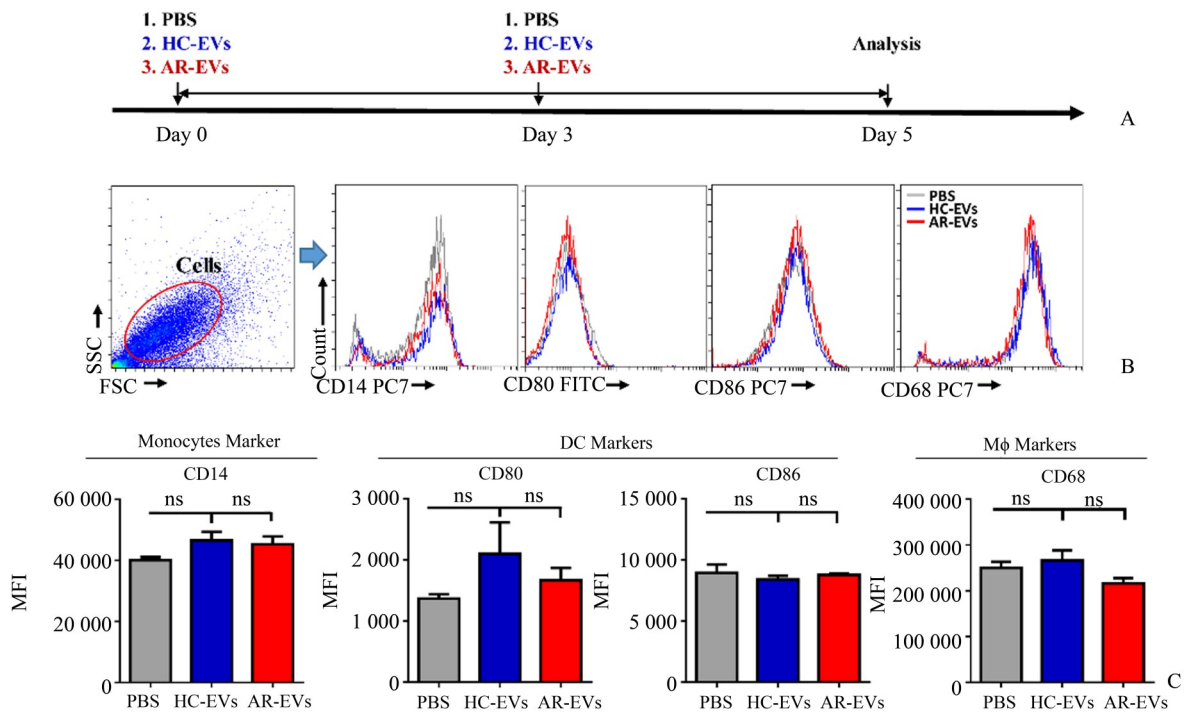
一般而言,单核细胞在 GM-CSF 和 IL-4 的作用下可分化形成 iDC,其在 LPS 的作用下再进一步



A: Schematic diagram for isolation of plasma EVs by differential centrifugation. B: Characterization of the structure of plasma EVs by transmission electron microscopy. C: Western blot for detection of EV markers on plasma EVs. D: Particle number of isolated plasma EVs by nanoparticle tracking analysis. AR: allergic rhinitis, EVs: extracellular vesicles, HC: healthy control.

图1 血浆 EVs 的鉴定

Fig. 1 Characterization of plasma EVs



A: Schematic diagram showing the study design. B and C: Representative histogram and statistical results for flow cytometry analysis of CD14, CD80, CD86 and CD68. AR: allergic rhinitis, EVs: extracellular vesicles, HC: healthy control, ns: no significance, MFI: mean fluorescence index, PBS: phosphate buffer solution. Data are shown as Mean \pm SEM ($n = 3, 5$ and 5 for PBS, HC-EVs and AR-EVs, respectively). ns by one-way ANOVA test ($F = 1.38, P = 0.29$ for CD14, $F = 0.86, P = 0.45$ for CD80, $F = 0.60, P = 0.56$ for CD86 and $F = 2.35, P = 0.14$ for CD68).

图2 血浆EVs对树突状细胞和巨噬细胞分化的调控作用

Fig. 2 Effects of plasma EVs on differentiation of dendritic cells and macrophages

分化为成熟DC。既然AR-EVs对单核细胞向iDC分化无显著促进作用,那么其能否促进iDC向mDC的成熟呢?为此,我们进一步于第5天用 $5 \times 10^8/\text{mL}$ HC-EVs和AR-EVs刺激iDC,并于第7天收集细胞进行分析(图3A)。结果表明,HLA-DR ($F = 8.04, P = 0.0085$)、CD40 ($F = 11.38, P = 0.0029$)和CD80 ($F = 14.50, P = 0.0013$)的组间比较均具有显著差异。LPS作为阳性对照可显著上调HLA-DR ($P = 0.0075$)、CD40 ($P = 0.0046$)和CD80 ($P = 0.0035$)的表达水平。不过,HC-EVs和AR-EVs处理对HLA-DR ($P = 0.99$)、CD40 ($P = 0.99$)和CD80 ($P = 0.97$)的表达水平没有明显作用(图3B)。上述结果表明,AR-EVs对DCs的成熟亦无显著调控作用。

2.4 AR-EVs可促进巨噬细胞向M2型分化

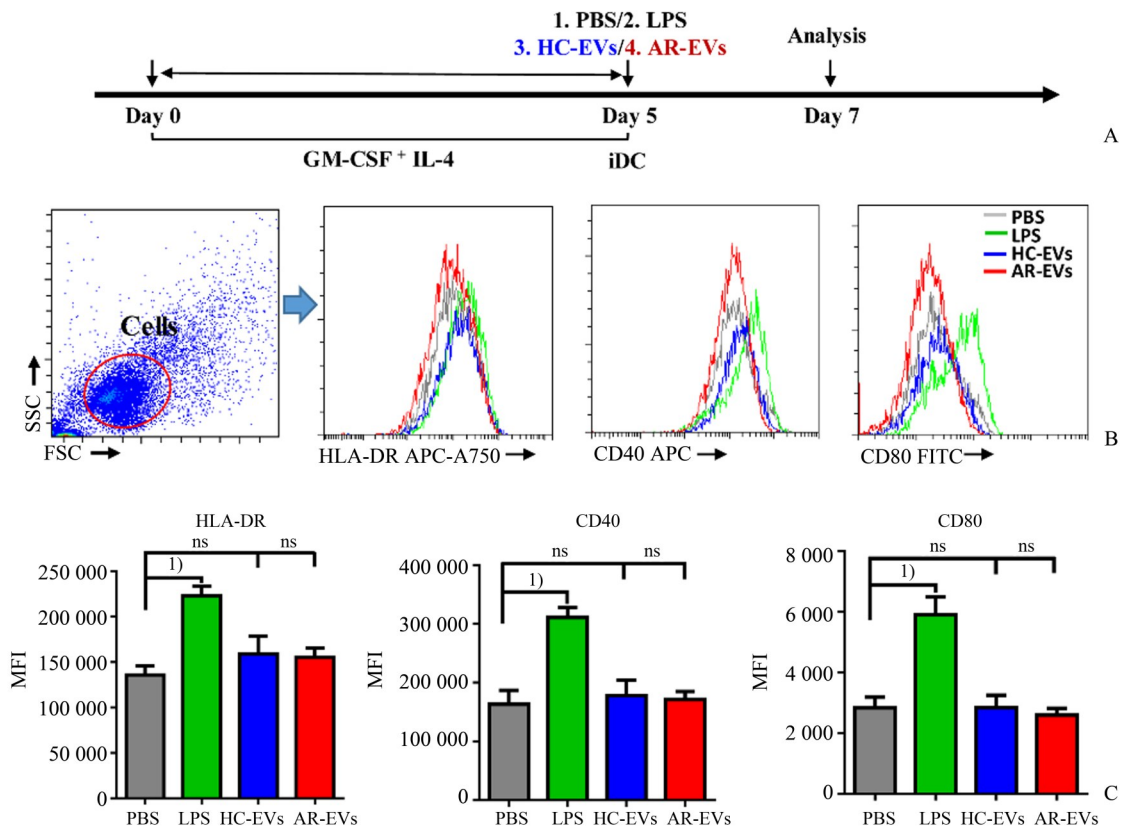
M ϕ 在不同的炎症环境中可分别极化为M1型和M2型M ϕ ,其分别主导Th1和Th2型类型的发生发展,Th2介导的变应性鼻炎主要是由M2型M ϕ 参与介导。由于上述结果发现AR-EVs对M ϕ 分化无显著促进作用,那么AR-EVs对M ϕ 极化的调控作用又是如何的呢?为此,我们于第7天给予HC-

EVs和AR-EVs刺激成熟的M ϕ ,并于第9天收集细胞进行分析(图4A)。我们发现与HC-EVs相比,AR-EVs可显著抑制M1型M ϕ 标记物IL-6 ($P < 0.001$)和TNF- α ($P < 0.05$)的表达水平,同时可显著促进M2型M ϕ 促炎标记物TGM2的表达水平,但是AR-EVs对M2型M ϕ 抑炎标记物MRC1和IL-10的表达水平则无显著调控作用(图4B)。综上所述,我们的结果表明AR-EVs可促进巨噬细胞向促炎的M2型分化。

3 讨论

本研究发现AR-EVs对DCs和M ϕ 的分化以及iDCs的成熟无显著的调控作用,但其可显著促进M ϕ 向促炎的M2型极化和抑制M ϕ 向M1型极化,提示血浆EVs在AR发病过程中对巨噬细胞的功能调控扮演着重要的角色,为AR的发病机制提供了新的阐释。

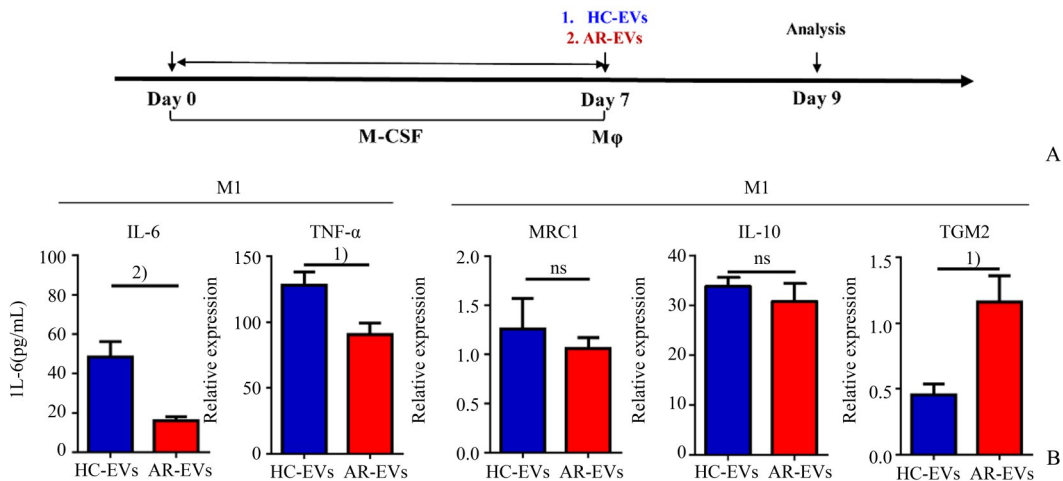
既往研究已经表明,EVs具备显著的免疫调控



A: Schematic diagram showing the study design. B: Representative histogram and statistical results for flow cytometry analysis of HLA-DR, CD40 and CD80. AR: allergic rhinitis, EVs: extracellular vesicles, HC: healthy control, LPS: Lipopolysaccharide, ns: no significance, MFI: mean fluorescence index, PBS: phosphate buffer solution. Data are shown as Mean±SEM ($n = 3$ for all groups). 1) $P < 0.01$ or ns by one-way ANOVA test ($F=8.04$, $P=0.0085$ for HLA-DR, $F=11.38$, $P=0.0029$ for CD40 and $F=14.50$, $P=0.0013$ for CD80).

图3 血浆EVs对树突状细胞成熟的调控作用

Fig. 3 Effects of plasma EVs on maturation of dendritic cells



A: Schematic diagram showing the study design. B: Statistical results for ELISA of IL-6 and PCR analyses of TNF- α , MRC1, IL-10 and TGM2. AR: allergic rhinitis, EVs: extracellular vesicles, HC: healthy control, ns: no significance, PCR: polymerase chain reaction, PBS: phosphate buffer solution. Data are shown as Median±SEM ($n = 5$ for all groups). 2) $P < 0.001$, 1) $P < 0.05$ and ns by t test.

图4 血浆EVs对巨噬细胞极化的调控作用

Fig. 4 Effects of plasma EVs on polarization of macrophages

作用。我们课题组前期已经证实经尾静脉给予间充质干细胞及其来源的EVs可通过调控DCs的分化成熟和巨噬细胞的分化与极化减轻呼吸道变应性炎症的发生发展^[22-23]。在呼吸道变应性炎症中,树突状细胞可在外界环境变应原的作用下可释放携带抗原肽的EVs,并通过其表面的CD54与受体DCs表面的LFA-1结合进而促使CD4⁺T向Th2方向活化^[24-25];单核细胞或巨噬细胞可在TGF- β , IL-1 β 和IFN- γ 等炎症因子的作用下释放包含白三烯合成酶的EVs促进粒细胞的趋化和浸润^[26]。这表明EVs一方面可通过其表面的膜蛋白与靶细胞膜蛋白相互作用,另一方面可通过EVs所包含的活性物质被靶细胞吞噬进入胞内而发挥作用,因而我们可通过调控EV中miRNA和蛋白质等有效成分的水平以及干扰EV与靶细胞之间的特异性接触等方式进行靶向治疗。与细胞来源的EVs相比,人体血浆中的EVs更为复杂,其主要是人体多种细胞在不同的炎症环境下产生的,因而单一细胞来源的EVs往往无法真实地明确呼吸道变应性炎症中EVs的作用。因此,在本研究中我们从HC和AR血浆中分离出EVs探讨其对树突状细胞和巨噬细胞的分化和功能的调控作用。值得注意的是,我们前期已经发现AR-EVs可显著促进CD4⁺T细胞向Th2分化(未发表数据),而在本研究中我们发现同样浓度的AR-EVs亦可显著促进M ϕ 向M2方向活化,抑制其向M1方向活化,尽管其对DCs和M ϕ 的分化以及

iDCs的成熟则无显著调控作用。这证实了血浆EVs在Th2介导的AR发病过程中具备显著的免疫调控作用。

巨噬细胞是多种炎症反应发生发展的初始免疫细胞,其可通过释放多种炎症因子促进免疫反应。在气道组织中,原位巨噬细胞主要位于气道表面,保护机体免受外源微生物和过敏原等的侵害^[27-28]。而在呼吸道变应性炎症中,外周血中的单核细胞可被趋化至气道组织中,并极化成M2型M ϕ 介导2型炎症反应。我们的研究结果证实,尽管血浆EVs对M ϕ 的分化成熟无显著调控作用,但是其可促进M ϕ 向M2型极化^[29-31]。既往研究已经表明,M2型巨噬细胞中TGM2表达升高可促进炎症浸润,而相反地,M2型M ϕ 中MRC1和IL-10升高则可抑制炎症浸润^[18]。我们的研究发现AR-EVs可抑制TGM2的表达,而对MRC1和IL-10的表达则无显著作用,表明AR-EVs可促进促炎的M2型巨噬细胞的极化。我们的结果初步证实了AR-EVs对M ϕ 的功能具备显著的免疫调控作用,证明血浆EVs是治疗AR的潜在靶点。然而,关于AR-EVs对M ϕ 的调控机制则有待进一步探讨。

综上所述,本研究通过体外细胞实验探讨AR-EVs对DCs和M ϕ 的分化成熟及其功能的调控作用,证实AR-EVs可显著促进M ϕ 向促炎的M2型极化,为AR的发病机制提供了新的诠释。

参考文献

- [1] Bousquet J, Khaltayev N, Cruz AA, et al. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA (2) LEN and AllerGen) [J]. *Allergy*, 2008, 63 Suppl 86: 8-160.
- [2] Gauvreau GM, El-Gammal AI, Byrne PM. Allergen-induced airway responses [J]. *Eur Respir J*, 2015, 46 (3): 819.
- [3] Meltzer EO. Allergic rhinitis: burden of illness, quality of life, comorbidities, and control [J]. *Immunol Allergy Clin North Am*, 2016, 36(2): 235-248.
- [4] Zhang Y, Zhang L. Increasing prevalence of allergic rhinitis in China [J]. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2019, 11(2): 156-169.
- [5] Robbins PD, Morelli AE. Regulation of immune responses by extracellular vesicles [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(3): 195-208.
- [6] Thery C, Witwer KW, Aikawa E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines [J]. *J Extracell Vesicles*, 2018, 7(1): 1535750.
- [7] Tkach M, Thery C. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go [J]. *Cell*, 2016, 164(6): 1226-1232.
- [8] Admyre C, Grunewald J, Thyberg J, et al. Exosomes with major histocompatibility complex class II and co-stimulatory molecules are present in human BAL fluid [J]. *Eur Respir J*, 2003, 22(4): 578-583.

- [9] Prado N, Marazuela EG, Segura E, et al. Exosomes from bronchoalveolar fluid of tolerized mice prevent allergic reaction[J]. *J Immunol*, 2008, 181(2): 1519–1525.
- [10] Torregrosa Paredes P, Esser J, Admyre C, et al. Bronchoalveolar lavage fluid exosomes contribute to cytokine and leukotriene production in allergic asthma[J]. *Allergy*, 2012, 67(7): 911–919.
- [11] Levanen B, Bhakta NR, Torregrosa Paredes P, et al. Altered microRNA profiles in bronchoalveolar lavage fluid exosomes in asthmatic patients[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, 131(3): 894–903.
- [12] Lässer C, O'Neil SE, Ekerljung L, et al. RNA-containing exosomes in human nasal secretions[J]. *Am J Rhinol Allergy*, 2011, 25(2): 89–93.
- [13] Sanchez-Vidaurre S, Eldh M, Larssen P, et al. RNA-containing exosomes in induced sputum of asthmatic patients[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 140(5): 1459–1461.e2.
- [14] Kim SH, Bianco NR, Shufesky WJ, et al. MHC class II+ exosomes in plasma suppress inflammation in an antigen-specific and Fas ligand/Fas-dependent manner[J]. *J Immunol*, 2007, 179(4): 2235–2241.
- [15] Almqvist N, Lonnqvist A, Hultkrantz S, et al. Serum-derived exosomes from antigen-fed mice prevent allergic sensitization in a model of allergic asthma[J]. *Immunology*, 2008, 125(1): 21–27.
- [16] Klechevsky E. Functional diversity of human dendritic cells[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2015, 850: 43–54.
- [17] Froidure A, Shen C, Pilette C. Dendritic cells revisited in human allergic rhinitis and asthma[J]. *Allergy*, 2016, 71(2): 137–148.
- [18] Abdelaziz MH, Abdelwahab SF, Wan J, et al. Alternatively activated macrophages; a double-edged sword in allergic asthma[J]. *J Transl Med*, 2020, 18(1): 58.
- [19] Kimura K, Hohjoh H, Fukuoka M, et al. Circulating exosomes suppress the induction of regulatory T cells via let-7i in multiple sclerosis [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 17.
- [20] Wang L, Wang C, Jia X, et al. Circulating exosomal miR-17 inhibits the induction of regulatory T cells via suppressing TGFBR II expression in rheumatoid arthritis [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50(5): 1754–1763.
- [21] Thery C, Amigorena S, Raposo G, et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids [J]. *Curr Protoc Cell Biol*, 2006, Chapter 3: Unit 3.22.
- [22] Gao WX, Sun YQ, Shi J, et al. Effects of mesenchymal stem cells from human induced pluripotent stem cells on differentiation, maturation, and function of dendritic cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 48.
- [23] Fang SB, Zhang HY, Meng XC, et al. Small extracellular vesicles derived from human MSCs prevent allergic airway inflammation via immunomodulation on pulmonary macrophages [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(6): 409.
- [24] Hao S, Bai O, Li F, et al. Mature dendritic cells pulsed with exosomes stimulate efficient cytotoxic T-lymphocyte responses and antitumour immunity [J]. *Immunology*, 2007, 120(1): 90–102.
- [25] Nolte-'t Hoen EN, Buschow SI, Anderton SM, et al. Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1 [J]. *Blood*, 2009, 113(9): 1977–1981.
- [26] Esser J, Gehrmann U, D'Alexandri FL, et al. Exosomes from human macrophages and dendritic cells contain enzymes for leukotriene biosynthesis and promote granulocyte migration [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 126(5): 1032–1040, 1040. e1031–1034.
- [27] Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. Origin and functions of tissue macrophages [J]. *Immunity*, 2014, 41(1): 21–35.
- [28] Mathias LJ, Khong SM, Spyroglou L, et al. Alveolar macrophages are critical for the inhibition of allergic asthma by mesenchymal stromal cells [J]. *J Immunol*, 2013, 191(12): 5914–5924.
- [29] Draijer C, Boorsma CE, Robbe P, et al. Human asthma is characterized by more IRF5+ M1 and CD206+ M2 macrophages and less IL-10+ M2-like macrophages around airways compared with healthy airways [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 140(1): 280–283.e3.
- [30] Girodet PO, Nguyen D, Mancini JD, et al. Alternative macrophage activation is increased in asthma [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2016, 55(4): 467–475.
- [31] Robbe P, Draijer C, Borg TR, et al. Distinct macrophage phenotypes in allergic and nonallergic lung inflammation [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015, 308(4): L358–367.