

腺苷 A2A 受体在过敏性哮喘发生、发展中的作用

王林林, 时国朝, 万欢英, 汤 葳, 侯小霞, 潘丽娜, 倪颖梦, 陶连琴, 石宝玉, 宋慧慧
(上海交通大学医学院附属瑞金医院呼吸科, 上海 200025)

[摘要] 目的:初步探讨腺苷 A2A 受体在过敏性哮喘疾病中的表达水平变化和在哮喘发生、发展过程中的作用。方法:分别选择 18 例对屋尘螨过敏的慢性持续期哮喘患者(过敏性哮喘组)和 19 名健康志愿者(正常对照组),通过荧光实时定量 PCR 方法检测研究对象外周血单个核细胞中 A2A 受体 mRNA 水平。酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血浆中屋尘螨特异性免疫球蛋白(Ig)E、白细胞介素(IL)-4、IL-17A 和转化生长因子(TGF)-β 水平。结果:过敏性哮喘组 A2A 受体 mRNA 明显高于正常对照组 [(0.45±0.29)×10⁻³ 比 (0.21±0.06)×10⁻³; t=3.611, P<0.01], 且 A2A 受体 mRNA 与血浆 IL-4 水平呈正相关(r=0.583, P<0.01), 与 TGF-β 水平呈负相关(r=-0.499, P<0.01), 与 IL-17A 无相关性(r=0.395, P=0.085)。结论:腺苷 A2A 受体可能参与了过敏性哮喘的发生、发展。

关键词:过敏性哮喘;腺苷 A2A 受体;细胞因子

中图分类号:R562.25 文献标识码:A 文章编号:1673-6087(2013)02-0132-03

DOI:10.3969/j.issn.1673-6087.2013.02.012

Role of adenosine A2A receptor in development and progress of allergic asthma WANG Linlin, SHI Guochao, WAN Huanying, TANG Wei, HOU Xiaoxia, PAN Lina, NI Yingmeng, TAO Lianqin, SHI Baoyu, SONG Huihui. Department of Pulmonary Diseases, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of adenosine A2A receptor (A2AR) and its role in the development and progress of allergic asthma. **Methods** Eighteen patients with persistent asthma allergic to house dust mite and 19 healthy volunteers served as control were enrolled. The expression of A2AR mRNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) was determined by SYBR Green relative quantitative real-time PCR. The level of specific house dust mites IgE, interleukin (IL-4), IL-17A and transforming growth factor (TGF)-β were detected by ELISA. **Results** Expression of A2AR mRNA was significantly higher in patients with allergic asthma than that in normal controls [(0.45±0.29)×10⁻³ vs (0.21±0.06)×10⁻³, t=3.611, P<0.01]. A2AR mRNA was positively correlated with IL-4 (r= 0.583, P<0.01), negatively correlated with TGF-β (r= 0.499, P<0.01), and no correlation was found with IL-17A (r=0.395, P=0.085).

Conclusions A2AR might participate in the development and progress of allergic asthma.

Key words: Allergic asthma; Adenosine A2A receptor; Cytokines

根据受体的亲和力以及是否与腺苷酸环化酶耦联可将腺苷受体分为 A1、A2A、A2B 和 A3 4 种类型,其中 A2A 和 A2B 可与腺苷酸环化酶耦联,介导胞内环化单磷酸腺苷(cAMP)水平增加,且腺苷 A2A 受体(A2AR)的亲和力强于 A2BR。A2AR 是与 T 细胞有关的主要抗炎腺苷受体。近年来有研究表明,腺苷可作为免疫抑制因子作用于 A2AR,抑制炎症性细胞因子白细胞介素 (IL)-2、肿瘤坏死因子(TNF)-α、IL-1β、干扰素(IFN)-γ 分泌^[1-4],促进调节性 T 细胞(Tregs)表达叉头蛋白 3(FoxP3),分泌 IL-10 和转化生长因子 (TGF)-β,抑制效应性 T 细胞(Teffs)的增殖和功能^[5-7]。但关于 A2AR 在过敏性

哮喘患者外周血单个核细胞(PBMCs)的表达水平以及临床意义研究甚少。本研究初步探讨 A2AR 在过敏性哮喘疾病中的表达水平变化和在哮喘发生、发展过程中的作用。

对象与方法

一、研究对象

纳入 2011 年 10 月至 2012 年 5 月本院呼吸科门诊确诊并治疗的 18 例慢性持续性过敏性哮喘患者(过敏性哮喘组)和 19 名来自同期本院健康体检的健康志愿者(正常对照组)。对研究对象进行未使用支气管舒张剂的肺功能检查和过敏原皮肤点刺试验。所有过敏性哮喘患者在入选前 1 个月内未口

通讯作者:时国朝 E-mail: shiguochao@hotmail.com

服或静脉应用糖皮质激素和其他免疫抑制剂,1周内无急性感染,无其他慢性病病史。哮喘患者过敏原(屋尘螨)皮肤点刺试验均为阳性。健康志愿者肺功能第1秒用力呼气容积(FEV_1)占预计值百分比($FEV_1\%$)在参考范围内,过敏原(屋尘螨)皮肤点刺试验阴性,无过敏性疾病。2组性别和年龄差异无统计学意义。过敏性哮喘组 $FEV_1\%$ 明显低于正常对照组,特异性屋尘螨免疫球蛋白(Ig)E明显高于正常对照组(见表1)。研究经上海交通大学医学院附属瑞金医院伦理委员会批准同意。

表1 过敏性哮喘患者与正常对照者的一般资料比较

指标	正常对照组 (n=19)	过敏性哮喘组 (n=18)	t	P
年龄(岁)	38±11	37±12	-0.277	0.783
性别(男/女)(n)	13/6	12/6	0.111	0.912
$FEV_1\%$	92.3±6.5	80.0±16.7	-2.959	0.006
屋尘螨 IgE(U/mL)	1.0±1.7	28.5±18.5	5.774	0.001

二、主要试剂与仪器

人淋巴细胞分离液购自上海博蕴生物科技有限公司。Trizol mRNA 抽提试剂为美国 Invitrogen 公司产品,cDNA 反转录试剂盒为美国 Promega 公司产品,SYBR Green 实时定量 PCR 试剂盒购自上海冠泰生物科技有限公司(BioTnT),人血浆 IL-17A、IL-4 和 TGF- β 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒为加拿大 Anogen 公司产品,人血浆尘螨特异性 IgE ELISA 试剂盒为德国 Dr. Fooke-Achterrath Laboratorien GmbH 公司产品。实验仪器包括 ABI villa7 实时 PCR 仪(Life Technologies,美国)、酶标仪(Labsystems Multiskan MS,芬兰)。

三、实验方法

1. 分离 PBMCs: 抽取入选研究对象的外周静脉血 8 mL,肝素抗凝,离心后收集血浆-80℃冻存,待 ELISA 检测。用预温的 1640 培养液(含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 0.1 ng/mL 链霉素)将血液稀释 1 倍,于 15 mL 离心管中加入与稀释血液等体积的预温淋巴细胞分离液,并将稀释血液缓慢加入离心管中离心,可见离心管中液体分为 4 层,轻轻洗出白色絮状层,用磷酸盐缓冲液(PBS)重复洗涤细胞 2 次,取 2×10^6 个 PBMCs 转入 1.5 mL 离心管中离心后加入 1 mL mRNA 抽提液 Trizol,-80℃冻存。

2. 检测血浆屋尘螨特异性 IgE、IL-17A、IL-4 和 TGF- β 水平:取上述冻存血浆,应用 ELISA 双抗体夹心法检测血浆屋尘螨特异性 IgE、IL-17A、IL-4 和 TGF- β 水平,按照试剂盒操作说明进行操作。每个样本均设 2 个复孔,酶标仪测定 492 nm 处吸光值。

3. 检测 PBMCs 的 A2AR mRNA 表达水平:引物由 Invitrogen 公司设计, Biotnt 公司合成。引物序列:上游 5'ATC GCC ATT GAC CGC TAC AT 3',下游 5'GCT GAC CGC AGT TGT TCC A 3'。采用 Trizol 一步提取法抽提 mRNA。利用 cDNA 试剂盒反转录成目标 cDNA。应用 SYBR Green 实时定量 PCR 试剂盒添加 PCR 反应体系,采用 ABI villa7 实时 PCR 仪进行 PCR 扩增并记录 cDNA 的 ΔCT 值,且换算成 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值,使目标浓度与 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值呈线性关系,目标浓度越小, $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值越小。

四、统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计分析软件对数据进行统计学分析。根据正态分布和方差齐性分析结果,实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较采用独立样本 t 检验。各指标之间的相关性采用 Persons 直线相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、PBMCs 表达 A2AR mRNA 水平

荧光实时相对定量 PCR 检测显示,过敏性哮喘组 A2AR mRNA 的相对定量 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值为 $(0.45 \pm 0.29) \times 10^{-3}$,正常对照组 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值为 $(0.21 \pm 0.06) \times 10^{-3}$,过敏性哮喘组高于正常对照组($t=3.611$, $P=0.001$)。

二、血浆 IL-4、IL-17A 和 TGF- β 水平

过敏性哮喘组患者血浆 IL-17A 和 IL-4 水平明显高于正常对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其 TGF- β 明显低于正常对照组 ($P < 0.01$) (见表 2)。

表2 过敏性哮喘组与正常对照组血浆 IL-4、IL-17A 和 TGF- β 水平比较($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{g/L}$)

项目	正常对照组 (n=19)	过敏性哮喘组 (n=18)	t	P
IL-4	3±3	137±187	2.981	0.025
IL-17A	16±23	54±47	2.439	0.006
TGF- β	164±43	66±33	-6.316	0.000

三、A2AR mRNA 与血浆 IL-4、IL-17A 和 TGF- β 相关性分析

Persons 相关分析结果显示,A2AR mRNA 与血浆 IL-4 水平呈正相关($r=0.583$, $P=0.01$),与 TGF- β 水平呈负相关($r=-0.499$, $P=0.006$),而与 IL-17A 无相关性($r=0.395$, $P=0.085$)。

讨 论

目前研究提示损伤、炎性和激活的 T 细胞可释

放过多的三磷酸腺苷(ATP)到胞外。表达于白细胞的胞外酶 CD39 和 CD73 可将胞外具有促炎作用的 ATP^[8-10]依次分解为一磷酸腺苷(AMP)和腺苷,而腺苷又可作用于腺苷受体发挥多种作用^[5-6]。

腺苷受体通常表达于淋巴细胞、中性粒细胞和肥大细胞等,介导促炎或抗炎效应。不同的腺苷受体具有不同的作用。本研究主要探讨了 A2AR 在过敏性哮喘中的作用。目前研究提示 A2AR 是与 T 细胞有关的主要抗炎腺苷受体。而支气管哮喘是常见的慢性炎症性疾病,因此我们提出假设 A2AR 可能参与了过敏性哮喘疾病免疫学发病机制,其表达水平可能是下降的。但本研究发现过敏性哮喘组患者 A2AR 水平明显高于正常对照组,这可能与机体具有保护自身稳态的作用有关,机体为了维持自身稳态,代偿性地表达 A2AR,拮抗胞外 ATP 和腺苷等炎性介质介导的炎症反应,尽管尚未阻止过敏性哮喘疾病的发生和进展。

那么,A2AR 是如何参与过敏性哮喘疾病发生、发展?本研究结果提示 A2AR mRNA 水平与 IL-4 水平呈显著正相关,与 TGF- β 水平呈负相关。Tregs 细胞和 Teffs 细胞均表达 A2AR。Tregs 细胞的 A2AR 被激活后,可促进其表达 FoxP3 和分泌 TGF- β ;表达于 Teffs 细胞的 A2AR 激活后可抑制 Teffs 细胞的增殖和功能。而在过敏性哮喘疾病患者外周血中存在 Tregs 细胞和 Teffs 细胞 [辅助性 T 细胞(Th)2 和 Th17]失衡^[11],且由 Th2 和 Th17 细胞分别分泌的介导炎症反应的 IL-4 和 IL-17A 在过敏性哮喘患者外周血中增多,而 Tregs 细胞分泌的免疫抑制细胞因子 TGF- β 明显减少。因此,推测过敏性哮喘机体以试图控制 IL-4 介导的炎症反应可能代偿性地促进了 Tregs 细胞和 Teffs 细胞表达 A2AR,从而试图上调 TGF- β 和下调 IL-4 分泌。而 A2AR mRNA 水平与血浆中 IL-17A 水平并无明显的相关性,这可能是机体虽代偿性表达 A2AR,但尚未控制哮喘的发生、发展的原因。

综上所述,本研究发现过敏性哮喘组 A2AR mRNA 明显高于正常对照组,且与 IL-4 正相关,与 TGF- β 负相关,提示 A2AR 可能参与了过敏性哮喘的发生、发展。但本研究只是初步探讨了过敏性哮喘患者 PBMCs 表达 A2AR 的水平,推测性的分析了其表达变化导致过敏性哮喘发生、发展的机制,对于在过敏性哮喘中 A2AR 表达变化的具体机制

尚需进一步研究。

[参考文献]

- [1] Day YJ, Huang L, Ye H, et al. Renal ischemia-reperfusion injury and adenosine 2A receptor-mediated tissue protection: the role of CD4⁺ T cells and IFN- γ [J]. *Immunol*, 2006, 176(5): 3108-3114.
- [2] Erdmann AA, Gao ZG, Jung U, et al. Activation of Th1 and Tc1 cell adenosine A2A receptors directly inhibits IL-2 secretion in vitro and IL-2-driven expansion *in vivo* [J]. *Blood*, 2005, 105(12): 4707-4714.
- [3] Sipka S, Kovács I, Szántó S, et al. Adenosine inhibits the release of interleukin-1 β in activated human peripheral mononuclear cells [J]. *Cytokine*, 2005, 31(4): 258-263.
- [4] Lappas CM, Rieger JM, Linden J. A2A adenosine receptor induction inhibits IFN- γ production in murine CD4⁺ T cells [J]. *J Immunol*, 2005, 174(2): 1073-1080.
- [5] Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression [J]. *Blood*, 2007, 110(4): 1225-1232.
- [6] Fletcher JM, Lonergan R, Costelloe L, et al. CD39⁺ Foxp3⁺ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis [J]. *J Immunol*, 2009, 183(11): 7602-7610.
- [7] Zarek PE, Huang CT, Lutz ER, et al. A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells [J]. *Blood*, 2008, 111(1): 251-259.
- [8] Imai M, Goepfert C, Kaczmarek E, et al. CD39 modulates IL-1 release from activated endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 270(1): 272-278.
- [9] Warny M, Aboudola S, Robson SC, et al. P2Y₆ nucleotide receptor mediates monocyte interleukin-8 production in response to UDP or lipopolysaccharide [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(28): 26051-26056.
- [10] Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression [J]. *J Exp Med*, 2007, 204(6): 1257-1265.
- [11] Shi YH, Shi GC, Wan HY, et al. Coexistence of Th1/Th2 and Th17/Treg imbalances in patients with allergic asthma [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2011, 124(13): 1951-1956.

(收稿日期:2013-01-05)

(本文编辑:张永)