

SYN008 与 Xolair[®] 对过敏性哮喘小鼠治疗作用 效果比较:炎症与重塑

徐新军^{1*}, 邵丽婷^{1*}, 陈颖², 刘会芳², 杨玉娟¹, 张宇¹, 王泠睿¹, 宋西成¹

(1.青岛大学附属烟台毓璜顶医院, 山东 烟台 264000; 2.滨州医学院第二临床医学院, 山东 烟台 264000)

摘要:目的 分析奥马珠单抗类似药(SYN008)对过敏性哮喘模型小鼠的疗效及与奥马珠单抗原创药(Xolair[®])的疗效比较,为 SYN008 临床应用提供依据。方法 将 40 只健康 BALB/c 小鼠随机分为 4 个组,每组 10 只。第 I 组为对照组,第 II~IV 组采用卵清蛋白(ovalbumin, OVA)——氢氧化铝腹腔注射诱发哮喘,且 III 组和 IV 组分别用 Xolair[®](200 μ g/只)和 SYN008(200 μ g/只)腹腔注射。造模完成后检测各组小鼠血清 IgE 及肺泡灌洗液(broncho alveolar lavage fluid, BALF)中 2 型辅助性 T 细胞(T helper 2 cell, Th2)细胞因子变化;通过苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色、过碘酸-雪夫(peryoxynitrite-schiff, PAS)染色和马松三色(Masson's trichrome, Masson)染色观察小鼠肺组织病理变化;并通过实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time PCR, RT-qPCR)、酶联免疫吸附实验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、免疫印迹(western blotting, WB)和免疫组化法检测肺组织中转化生长因子 β 1(transforming growth factor beta 1, TGF- β 1)、磷酸化 Smad 家族成员 3(phosphorylated Smad family member 3, P-smad3)和 Smad 家族成员 3(Smad3)、胶原蛋白 III(collagen III, COL3)和黏蛋白(mucin 5AC, MUC5AC)的表达情况。结果 与对照组比较,哮喘组小鼠血清 IgE 和 BALF 中白细胞介素-4(interleukin 4, IL-4)、IL-5 和 IL-13 含量明显升高(P 均 <0.001);与 II 组比较,III 组和 IV 组小鼠血清 IgE 和 BALF 中 IL-4/5/13 含量都明显下降($P<0.001, P<0.05, P<0.01, P<0.05; P<0.001, P<0.05, P<0.05, P<0.05$);HE、PAS 和 Masson 染色证实了 Xolair[®]和 SYN008 可有效减少哮喘小鼠炎症细胞聚集、气道杯状细胞化生和胶原沉积,并且两者可以通过抑制肺组织的 TGF- β 1、P-smad3/Smad3、COL3 和 MUC5AC 减轻气道重塑,且两组各项检测指标均无统计学差异。结论 SYN008 可以改善小鼠的过敏性哮喘,且与 Xolair[®]药效一致,未来有望应用于临床有效治疗过敏性哮喘。

关键词:奥马珠单抗类似药(SYN008);奥马珠单抗原创药(Xolair[®]);过敏性哮喘;炎症;重塑

中图分类号:R562.2

文献标志码:A

Comparison of the therapeutic effect of SYN008 with Xolair[®] in allergic asthma mice: inflammation and remodeling

XU Xinjun^{1*}, SHAO Liting^{1*}, CHEN Ying², LIU Huifang², YANG Yujuan¹,
ZHANG Yu¹, WANG Hanrui¹, SONG Xicheng¹

(1. Yantai Yuhuangding Hospital, Qingdao University, Yantai 264000, Shandong, China;

2. The second Medical College of Binzhou Medical University, Yantai 264000, Shandong, China)

Abstract: Objective To compare the efficacy of omalizumab analogue (SYN008) with omalizumab original drug (Xolair[®]) in allergic asthma mice model, providing a basis for the clinical application of SYN008. **Methods** Forty healthy BALB/c mice were divided into four groups, with 10 mice in each. Group I was the control group and asthma was induced by intraperitoneal injection of ovalbumin (OVA)-aluminium hydroxide in groups II-IV. Mice in groups III

and IV were treated with Xolair[®] (200 µg/each) and SYN008 (200 µg/each) intraperitoneally, respectively. The levels of IgE in serum and T helper 2 cell (Th2) cytokines in broncho alveolar lavage fluid (BALF) were detected in each group; lung tissues were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, peroxynitrite-schiff (PAS) staining and Masson's trichrome (Masson) staining. For the expression of transforming growth factor beta 1 (TGF-β1), phosphorylated Smad family member 3 (P-smad3)/Smad family member 3 (Smad3), collagen III (COL3) and mucin 5AC (MUC5AC), lung tissues were examined by quantitative real-time PCR (RT-qPCR), enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), western blotting (WB) and immunohistochemistry. **Results** The levels of IgE in serum and interleukin-4 (IL-4), IL-5 and IL-13 in BALF were significantly increased in the group II compared with those in the control group (all $P < 0.001$). The levels of IgE in serum and IL-4/5/13 in BALF in groups III and IV were significantly decreased compared with those in the group II ($P < 0.001$, $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.05$; $P < 0.001$, $P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.05$). HE, PAS and Masson staining confirmed that Xolair[®] and SYN008 could effectively reduce inflammatory cell aggregation, airway cuprocyte chemotaxis and collagen deposition in mice with asthma. Xolair[®] and SYN008 could attenuate airway remodeling by inhibiting TGF-β1, P-smad3/Smad3, COL3 and MUC5AC in lung tissues, with no reach statistical significance between the two groups in all the assays. **Conclusion** SYN008 improves allergic asthma in mice and is consistent with the efficacy of Xolair[®], which is expected to be clinically significant for allergic asthma in the future.

Key words: Omalizumab analogue (SYN008); Omalizumab original drug (Xolair[®]); Allergic asthma; Inflammation; Remodeling

过敏性哮喘以2型炎症和气道重塑为主要特点,对人类健康和生活质量产生了严重影响。2型炎症主要是由2型辅助性T细胞(T helper 2 cell, Th2)、2型固有淋巴细胞(Type 2 innate lymphoid cells, ILC2s)以及生成的2型细胞因子白介素-4(Interleukin-4, IL-4)、IL-5和IL-13共同驱动。其中IgE在2型炎症中处于关键地位,它能够通过与高亲和力受体FcεRI和低亲和力受体FcεRII或CD23相互作用激活肥大细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞(Eosinophilic granulocyte, EOS),进而释放炎症介质^[1]。已知IL-4和IL-13能够上调所有细胞中这些受体的表达,IL-5则会促进EOS分化和成熟,延长EOS在组织中的存活时间^[2-3],从而放大IgE的效应。不仅如此,在哮喘炎症发展过程中出现的重塑现象主要表现为气道基底膜(Reticular Basement Membrane, RBM)增厚、肌成纤维细胞和平滑肌细胞的激活和增殖,以及细胞外基质蛋白沉积和纤维化,有多种因子参与到气道重塑的过程中^[4-5]。研究表明^[6],IgE可以作用于平滑肌细胞促进气道重塑,IL-4和IL-13则诱导气道上皮细胞释放转化生长因子β1(transforming growth factor beta 1, TGF-β1),并促进上皮杯状细胞化生,产生大量以黏蛋白(mucin 5AC, MUC5AC)为主的黏液成分,在哮喘发病机制中发挥着重要作用。由此可见IgE是贯穿整个发病过程的关键因素,针对IgE进行有效药物的开发并应用于临床可以很好地造福广大患者。

奥马珠单抗作为首个用于治疗以IgE为主要介导因素的哮喘的生物制剂,其原研药Xolair[®]在临床应用中表现出显著的疗效,可以很大程度上阻断2型炎症中IgE的信号传导^[3],进而有效降低中重度过敏性哮喘的急性发作率,减少吸入性糖皮质激素(inhaled corticosteroid, ICS)或口服糖皮质激素(oral corticosteroids, OCS)使用剂量^[7-8],只是其昂贵的价格令很多患者望而却步。近年来,随着医学研究的不断推进,其他抗IgE单克隆抗体也逐渐问世,它们相似的疗效及更为优惠的价格给哮喘患者提供了更多的选择。注射用重组抗IgE单克隆抗体(产品代码:LR008, SYN008)是我国自主研发的奥马珠单抗类似药,但目前尚无体内实验验证其对过敏性哮喘的治疗效果以及与原创新药的疗效比较,并且奥马珠单抗在改善过敏性哮喘重塑方面的研究也较少。2023年11月1日至2024年6月15日间,为此我们进行实验探究SYN008对卵清蛋白(ovalbumin, OVA)诱导的过敏性哮喘小鼠的治疗作用以及与Xolair[®]在疗效方面的差异,同时分析药物对过敏性哮喘小鼠气道重塑机制方面的影响,为其应用于临床提供依据。

1 资料与方法

1.1 实验动物

40只6~8周龄雌性BALB/c小鼠(济南鹏越实验动物繁育有限公司),饲养于烟台毓璜顶医院

实验动物中心。所有小鼠均在恒温室(22℃~24℃)中自由采食,12 h 光暗循环(早上 7:00 到晚上 7:00)。本动物实验由烟台毓璜顶医院伦理委员会批准(2024-449)。

1.2 方法

1.2.1 建立哮喘模型

将 BALB/c 小鼠随机分为对照组、OVA 组、OVA+Xolair® 组和 OVA+SYN008 组,每组 10 只。OVA 组小鼠在第 0 天、第 7 天和第 14 天腹腔注射 200 μL 致敏液,其中含有 20 μgOVA(索莱宝,中国

北京)与 2 mg Al(OH)₃(InvivoGen,法国)混合悬浮在磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)中,从第 21~28 天,每天对小鼠进行 5% OVA/PBS 溶液雾化 30 min 进行激发^[9-11]。OVA+Xolair® 组和 OVA+SYN008 组小鼠在第 20 天分别腹腔注射 Xolair®(诺华制药,瑞士)和 SYN008(石药集团,中国石家庄)200 μg^[12]。对照组用 PBS 进行致敏和激发。所有小鼠在最后一次雾化后 24 h 处死,取血、支气管肺泡灌洗液(Broncho Alveolar Lavage Fluid, BALF)和肺组织,流程详情见图 1。

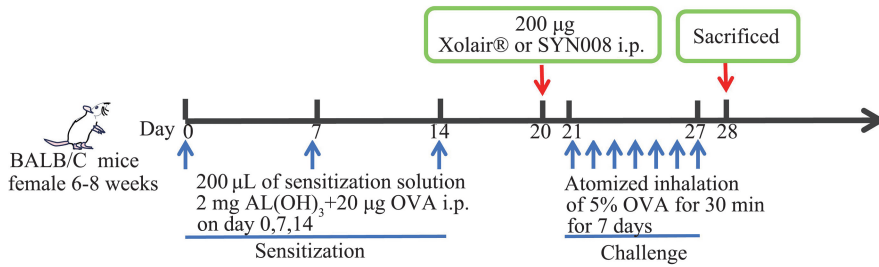


图 1 过敏性哮喘小鼠模型建立及药物治疗方法

Figure 1 Establishment of mouse model of allergic asthma and pharmacological treatments

1.2.2 血液和支气管肺泡灌洗液的采集与检测

用 2% 的异氟醚对小鼠进行麻醉,深反射消失后用 5 mL 采血管从小鼠眼球采血 800 μL。对小鼠气管插管并用 0.5 mL 预冷 PBS 灌洗 3 次,然后在 4℃ 下离心 BALF 样品,收集上清液,保存在 -80℃ 下,直至使用。收取血液样本 2~4 h 后需在 3 450×g 的离心条件下离心 5 min,然后获取上层血清^[13-14]。并使用酶联免疫吸附试验(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(基因美,中国武汉)检测 IgE、IL-4、IL-5 和 IL-13 水平。

1.2.3 苏木精和伊红(HE)、过碘酸雪夫(PAS)及马松三色(Masson)染色

用 4% 多聚甲醛固定实验小鼠肺组织,制备石蜡包埋组织切片(4 μm)。切片用苏木精和伊红(索莱宝)染色,以观察肺组织形态变化和炎细胞浸润情况。气道黏液分泌和杯状细胞增生通过 PAS(索莱宝)染色进行鉴定。Masson 染色法(索莱宝)用于评估气道胶原沉积和上皮纤维化^[15]。在光镜下观察,用 Image J 软件分析图像^[16]。

1.2.4 实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)

用 Trizol 试剂(思科捷,中国济南)提取总 RNA,并测量 RNA 浓度。使用逆转录试剂盒(诺唯赞,中国南京)将提取的 RNA 逆转录为 cDNA 进行 RT-qPCR。 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ value 表示 mRNA 的相对表达水平。RT-qPCR 的引物序列见表 1。

表 1 基因的 RT-qPCR 引物序列

Table 1 RT-qPCR primer sequences for genes

引物名称	引物序列(5'-3')
GAPDH	CAGGAGGCATTGCTGATGAT(正向)
	GAAGGCTGGGGCTCATT(反向)
TGF-β1	ACCGCAACAACGCCATCTATGAG(正向)
	GGCACTGCTTCCCGAATGTCTG(反向)
MUC5AC	TCACTCTACCACTCCCTGCTTCTG(正向)
	CACCTGACAATCCTGGCTACACATC(反向)

1.2.5 免疫印迹(Western blotting)

取各组小鼠右肺用 RIPA 裂解缓冲液(思科捷)制备组织匀浆,冰上裂解 20 min,12 000 r/min 离心 15 min,取上清液。使用增强型 BCA 蛋白检测试剂盒(思科捷)测定蛋白质浓度。取 20 μg 等量上样缓冲液混匀,100℃ 煮沸 10 min。蛋白质经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离后转移到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上。PVDF 膜用 5% 脱脂牛奶密封 2 h。冲洗后加入 P-smad3、Smad3、COL3 及内参 GAPDH 作为一抗(1:1 000)(Immunoway,美国),4℃ 孵育过夜。用三羟甲基氨基甲烷缓冲液(Tris Buffered Saline with Tween-20, TBST)洗涤后加入山羊抗兔二抗(1:5 000)(Proteintech,美国),37℃ 摇床条件下孵育 2 h。孵育后,再次用 TBST 洗膜。用造影剂显现蛋白条带,并用 Image J 软件进行分析。

1.2.6 免疫组化

69℃烤片1h后对组织切片进行梯度脱蜡处理,之后进行抗原修复。在阻断内源性过氧化物酶活性后,将组织切片置于5%山羊血清(思科捷)中封闭。然后用MUC5AC兔一抗和二抗(亲科生物,中国徐州)孵育,进行DAB染色,细胞核用苏木精复染。最后在光镜下观察。

1.3 统计学处理

使用GraphPad Prism 8.0.1(GraphPad Software, USA)进行统计分析。计量资料先进行正态检验和方差齐性检验,符合正态分布和方差齐性的数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。两组间的均值比较采用独立样本 t 检验。多组比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 SYN008可以减轻OVA诱导的过敏性哮喘小鼠的IgE及Th2炎症因子

通过ELISA检测各组小鼠血清样本中IgE和BALF中Th2炎症因子包括IL-4、IL-5和IL-13的水平。如图2所示,哮喘模型组小鼠血清IgE滴度显著高于对照组($P<0.001$),且哮喘模型组小鼠BALF中IL-4、IL-5和IL-13含量均显著高于对照组($P<0.001$, $P<0.001$, $P<0.001$)。Xolair®组小

鼠血清IgE滴度和BALF中IL-4、IL-5和IL-13含量均显著低于模型组($P<0.001$, $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.05$)。SYN008组血清IgE滴度和BALF中IL-4、IL-5和IL-13含量均显著低于模型组($P<0.001$, $P<0.05$, $P<0.05$, $P<0.05$)。Xolair®组和SYN008组两组间IgE、IL-4、IL-5和IL-13的水平差异无统计学意义($P=0.31$, $P=0.84$, $P=0.49$, $P=0.64$)。

2.2 SYN008可有效减少哮喘小鼠炎细胞聚集、气道杯状细胞化生和胶原沉积

HE染色结果显示,对照组肺脏组织结构正常,未见明显病理变化;与对照组相比,哮喘模型组小鼠出现肺组织结构受损及明显炎细胞聚集,Xolair®和SYN008组小鼠肺组织肺泡整体病变程度明显减轻(图3A、3D)。PAS染色显示与对照组相比,哮喘模型组小鼠肺组织气道黏液分泌和杯状细胞化生都增多,Xolair®和SYN008治疗组小鼠肺组织气道杯状细胞化生明显减少(图3B、3E)。Masson染色显示对照组小鼠肺组织可见少量蓝色胶原,哮喘模型组小鼠胶原沉积明显加重,且与哮喘模型组小鼠相比,Xolair®和SYN008组小鼠气道胶原沉积明显减轻(图3C、3F)。Xolair®治疗组和SYN008治疗组小鼠肺组织的炎细胞聚集、气道杯状细胞化生和胶原沉积改善情况差异无统计学意义($P=0.83$, $P=0.84$, $P=0.73$)。

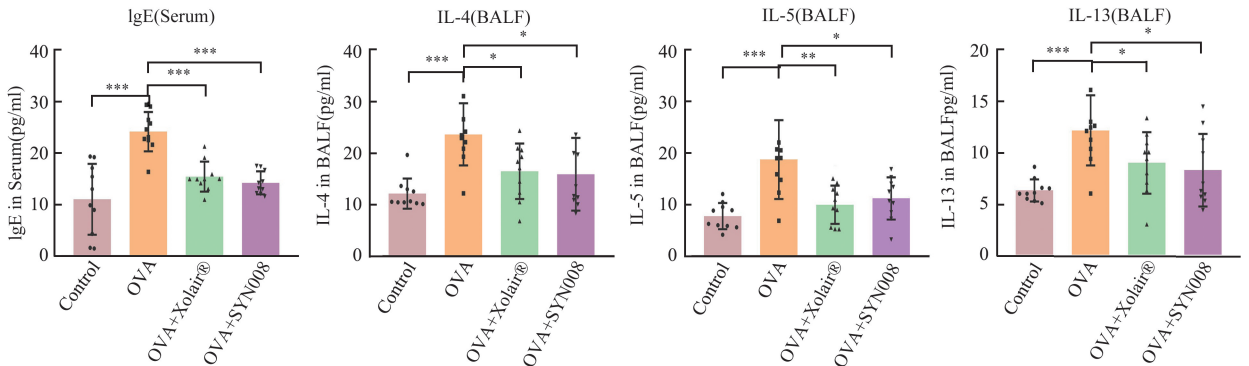
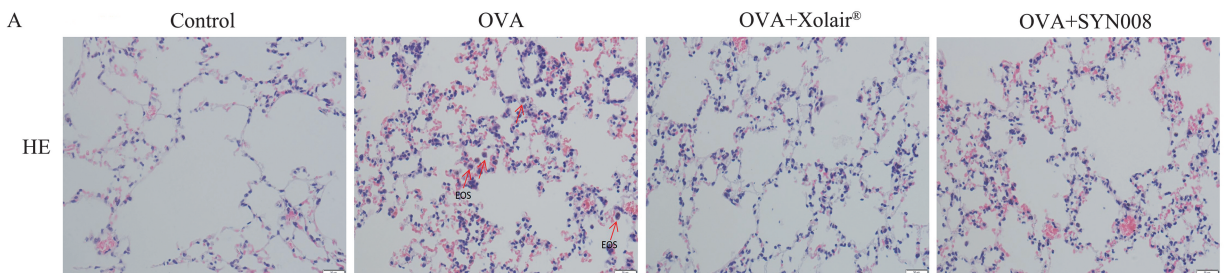


图2 四组小鼠血清IgE和BALF中IL-4、IL-5和IL-13 ELISA检测结果
(* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)

Figure 2 ELISA results of IgE in serum and IL-4/5/13 in BALF of four groups of mice
(* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)



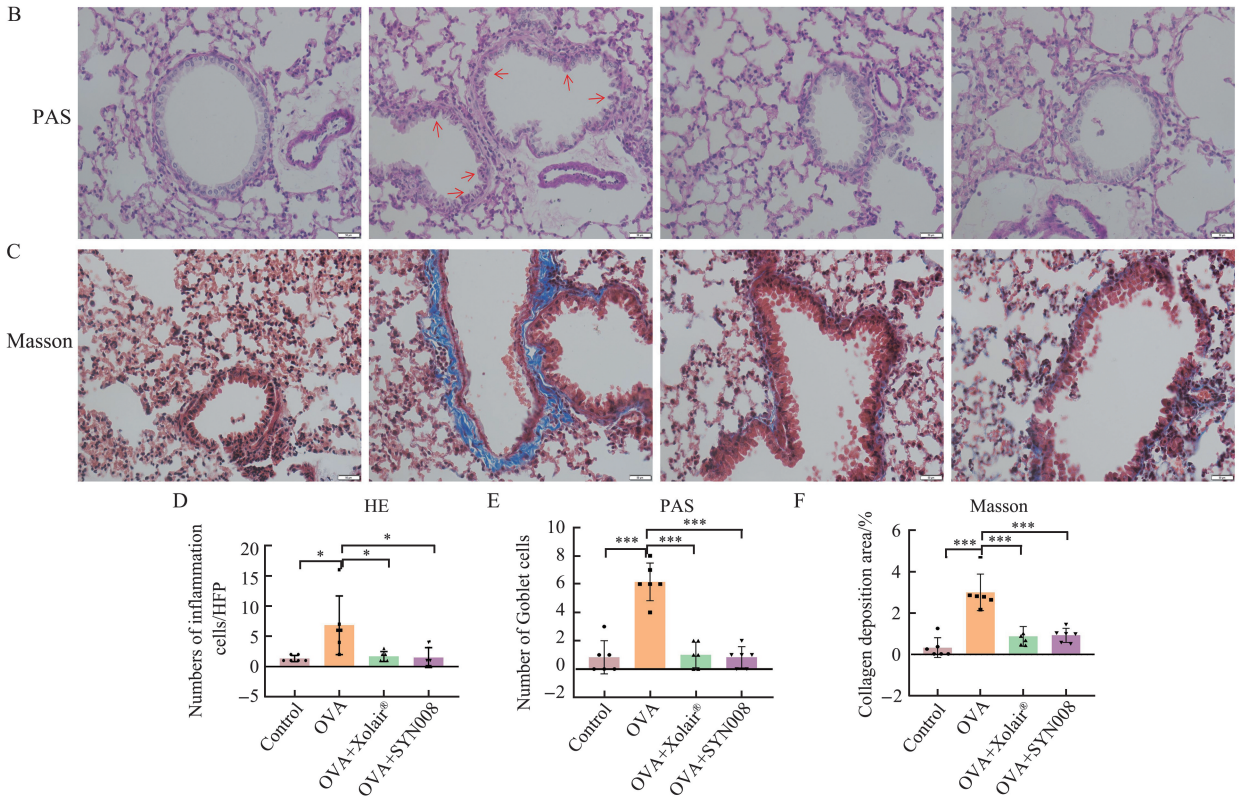


图3 四组小鼠肺组织病理形态学变化(400×)

A: 四组小鼠肺组织 HE 染色, 箭头所示为 EOS 所在; B: 四组小鼠肺组织 PAS 染色, 箭头所示为着色的杯状细胞; C: 四组小鼠肺组织 Masson 染色, 蓝色部分为沉积的胶原纤维; D、E、F 分别为 HE、PAS、Masson 的统计图。
(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

Figure 3 Histopathological and morphological changes in the mice lungs of four groups(400×)

A: HE staining of mice lung tissue in four groups with the arrows pointing to EOS; B: PAS staining of mice lung tissue in four groups with the arrows showing the stained cuprocytes; C: Masson staining of mice lung tissue in four groups with the blue part showing the deposited collagen fibres; D, E, and F are statistical plots for HE, PAS, and Masson, respectively.

(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

2.3 SYN008 可以通过影响 TGF- β 1、P-smad3/Smad3、COL3 和 MUC5AC 的表达减轻气道重塑

与对照组比较, 模型组小鼠肺组织中 TGF- β 1 的 mRNA 水平表达明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, Xolair® 和 SYN008 组 TGF- β 1 的 mRNA 水平表达明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.05$), 见图 4A。ELISA 结果显示模型组小鼠 TGF- β 1 与对照组相比明显升高 ($P < 0.01$), 与模型组比较, Xolair® 和 SYN008 组相比明显降低 ($P < 0.01$, $P < 0.01$), 见图 4B。Xolair® 组和 SYN008 组 TGF- β 1 表达在 RT-qPCR 和 ELISA 上差异均无统计学意义 ($P = 0.37$, $P = 0.17$)。如图 4C、D、E 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肺组织中 P-smad3/Smad3、COL3 的蛋白水平明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与模型组比较, Xolair® 组的 P-smad3/Smad3、COL3 的蛋白水平表达明显降

低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与模型组比较, SYN008 组 P-smad3/Smad3、COL3 的蛋白水平表达也明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且 Xolair® 组和 SYN008 组 P-smad3/Smad3、COL3 表达在蛋白水平上均无统计学差异 ($P = 0.21$, $P = 0.47$)。

RT-qPCR 结果显示, 与对照组比较, 哮喘模型组小鼠 MUC5AC 表达明显升高 ($P < 0.05$), 与哮喘模型组小鼠比较, Xolair® 和 SYN008 组小鼠 MUC5AC 表达明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.05$), 且 Xolair® 组和 SYN008 组小鼠 MUC5AC 的 mRNA 水平差异无统计学意义 ($P = 0.86$), 见图 4F。免疫组化结果显示, 哮喘模型组小鼠 MUC5AC 与对照组相比表达增加, 与哮喘模型组比较, Xolair® 和 SYN008 组 MUC5AC 表达则受到抑制, 且 Xolair® 组和 SYN008 组 MUC5AC 的蛋白表达水平无明显差异, 见图 4G。

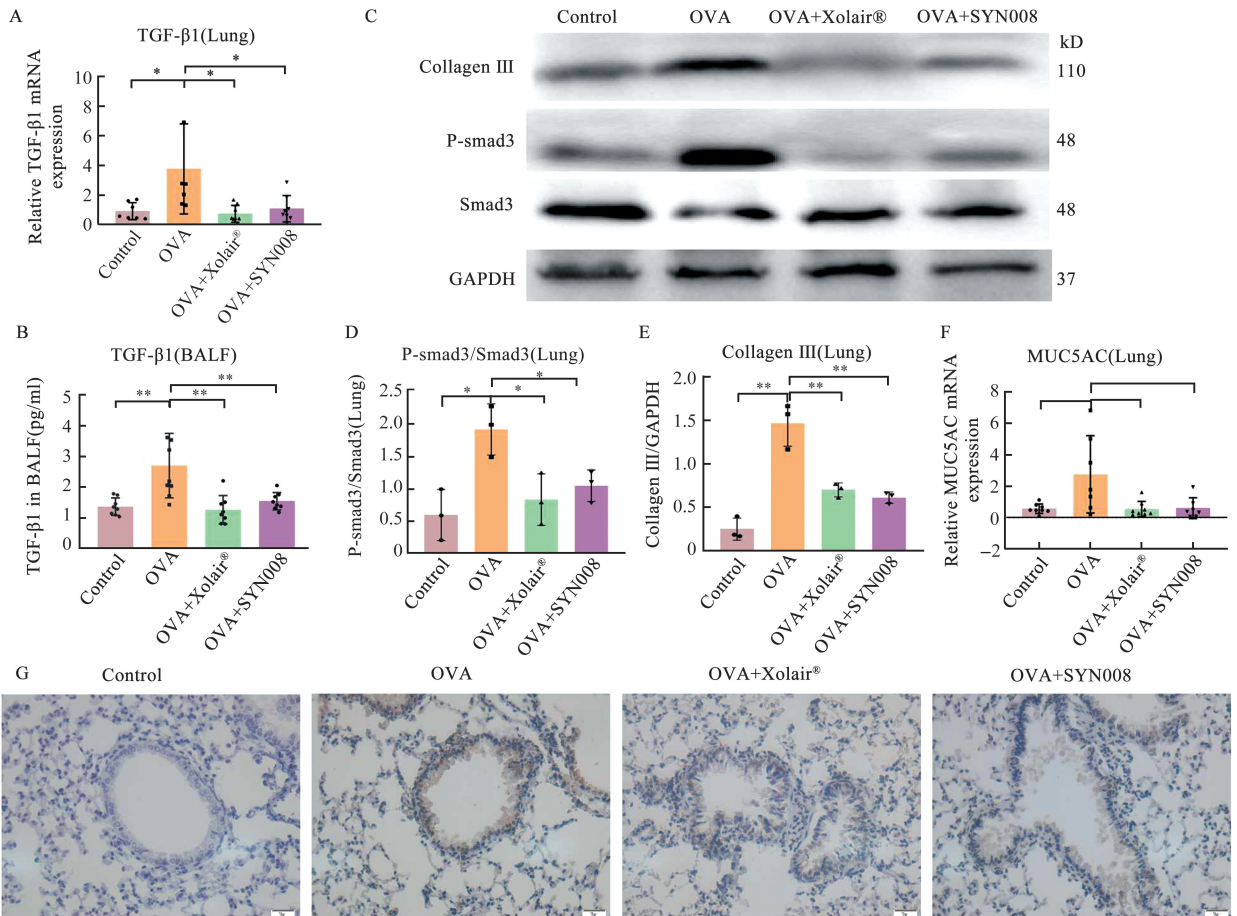


图4 四组小鼠肺组织和BALF中TGF-β1、肺组织MUC5AC的表达变化

A: 四组小鼠肺组织TGF-β1的mRNA水平的比较; B: 四组小鼠BALF中TGF-β1的ELISA检测结果; C: 四组小鼠肺组织P-smad3/Smad3、COL3的Western blotting结果展示图; D: 对图C中P-smad3/Smad3结果的量化比较; E: 对图C中COL3结果的量化比较; F: 四组小鼠肺组织MUC5AC的mRNA水平的比较; G: 四组小鼠肺组织MUC5AC免疫组化染色结果(400×)。

(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

Figure 4 Expression changes of TGF-β1 and MUC5AC in lung tissue and BALF in four groups of mice

A: Comparison of mRNA levels of TGF-β1 in mice lung tissues of four groups; B: ELISA results of TGF-β1 in BALF of mice in the four groups; C: Western blotting results of P-smad3/Smad3 and COL3 in mice lung tissues of four groups; D: Quantitative comparison of the P-smad3/Smad3 from Figure C; E: Quantitative comparison of the COL3 results from Figure C; F: Comparison of mRNA levels of MUC5AC in mice lung tissues of four groups; G: Immunohistochemical staining of MUC5AC in mice lung tissues of four groups (400×).

(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

3 讨论

过敏性哮喘中炎症的反复发作会引起气道重塑,这使哮喘的控制难度进一步增加,因此在减轻气道炎症的同时干预气道重塑的发生对哮喘的治疗至关重要。目前临床尚无针对气道重塑的有效防治措施,有研究表明主要适用于中重度持续性过敏性哮喘治疗的奥马珠单抗^[17-18]在改善气道炎症和重塑方面起着重要作用^[19-20]。尽管奥马珠单抗治疗慢性自发性荨麻疹及过敏性哮喘适应证已纳入国家医保目录,但是患者仍承受着较大的经济负担。因此开发有效且价格低廉的奥马珠单抗类似药具有十分

重要的临床意义。

奥马珠单抗通过靶向结合IgE不仅可以降低体内IgE水平,而且还降低了树突状细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞表面FcεRI的表达,从而阻断IgE与FcεRI结合,防止肥大细胞和嗜碱性粒细胞脱颗粒以及降低被IgE致敏和被过敏原激活的能力,减轻外周和支气管组织的炎症反应,并降低IL-4、IL-5和IL-13的水平^[21-23]。不仅如此,奥马珠单抗还可以通过调节Th2型免疫反应失衡,减少Th2细胞的活化,从而阻断诱发过敏性哮喘发作的炎症级联反应。更有临床研究表明奥马珠单抗可以缓解重度哮喘患者的炎症反应,并且随着时间会逐渐改善^[24-25],且与皮下免疫疗法联合使用可更快

地控制哮喘,降低用药需求,增强肺功能^[26]。本研究表明,与对照组比较,哮喘模型组的 IgE 总水平和 BALF 中 IL-4、IL-5 和 IL-13 都升高,SYN008 与 Xolair® 都降低了血清中 IgE 总水平和 BALF 中 IL-4、IL-5 和 IL-13 的表达,且两者之间差异无统计学意义,说明 SYN008 可以通过有效靶向 IgE 减轻气道炎症,且在抗炎方面与 Xolair® 之间并无差异。

不仅如此,在 IgE 介导的速发型变态反应中,多种炎细胞被活化,产生大量的趋化因子又会吸引大量炎细胞聚集在支气管周围,因此奥马珠单抗可以抑制后续炎症反应的发生^[27]。而且汤葳团队^[28]还发现奥马珠单抗可下调过敏性哮喘患者外周血 EOS 表面共刺激分子 CD40、CD80 和 CD86 的表达并降低嗜酸性粒细胞趋化蛋白 eotaxin-1 水平,从而减少嗜酸性粒细胞和其他炎细胞的趋化聚集,而且临床研究也表明奥马珠单抗可以有效降低血嗜酸性粒细胞比例^[29]。本研究表明,与对照组比较哮喘模型组的炎细胞数量增多,SYN008 与 Xolair® 均可有效减少哮喘小鼠炎细胞聚集,且两者之间差异无统计学意义,说明 SYN008 可以有效减轻肺部炎细胞的浸润和聚集,且在抗炎方面与 Xolair® 之间并无差异。

既往研究表明^[12,30-31],奥马珠单抗能够通过减轻炎症因子的产生减少上皮细胞生成 TGF- β 1 和 MUC5AC,同时还可以抑制气道平滑肌细胞分泌胶原蛋白,从而改善气道重塑现象。已知在哮喘气道重塑发展过程中 TGF- β 发挥着关键作用^[32-33],尤其是 TGF- β 1 可以通过调控多种因子影响气道重塑^[34-35],且多种药物的研究也都是通过抑制 TGF- β 1 来发挥抗重塑的作用^[36-37]。研究发现,TGF- β 1 可以通过 SMOC2/AKT 调节肺成纤维细胞的增殖、迁移和成纤维细胞向肌成纤维细胞的转化^[38],重要的是,TGF- β 1/Smad3 作为重塑相关的经典通路会促进气道平滑肌的增殖^[39],以及气道平滑肌细胞中胶原和纤连蛋白基因的表达^[35],尤其是 COL3 的沉积。并且抑制哮喘中的 TGF- β 1/Smad3 信号通路也可以减弱支气管上皮间充质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)介导的气道重塑^[21,40]。因此我们选择 TGF- β 1、P-smad3/Smad3 和 COL3 作为奥马珠单抗重塑相关的检测指标。而且杯状细胞化生作为气道重塑的重要特征,是黏液过度分泌的主要来源和结构基础,而 MUC5AC 是气道黏液的主要组成部分,主要受以 IL-13 为主的多种细胞因子的刺激产生,因此气道上皮中的 MUC5AC 可代表气道黏液分泌的强度^[41-42]。研究表明 MUC5AC 表

达增加会加剧小鼠哮喘发作^[43],且靶向 MUC5AC 会阻断杯状细胞化生^[44],进而减轻哮喘的发展^[45],因此检测 MUC5AC 的水平也有助于反映过敏性哮喘的气道重塑现象。本研究表明,与对照组比较,哮喘模型组的杯状细胞化生和胶原沉积增多,且 TGF- β 1、P-smad3/Smad3 被激活,COL3 和 MUC5AC 生成增多,SYN008 与 Xolair® 都可以减少气道杯状细胞化生和胶原沉积的表达,且 TGF- β 1 和 MUC5AC 的表达也被抑制,两者之间无统计学差异,说明 SYN008 可以通过降低 TGF- β 1 和 MUC5AC 相关的通路来抑制气道重塑的发生发展,且在减轻气道重塑方面与 Xolair® 之间无差异。综上所述,SYN008 在过敏性哮喘小鼠模型中发挥与 Xolair® 相同的免疫调节和改善重塑的作用。过敏性哮喘的发生发展和奥马珠单抗改善气道炎症和重塑方面的相关机制如图 5 所示。

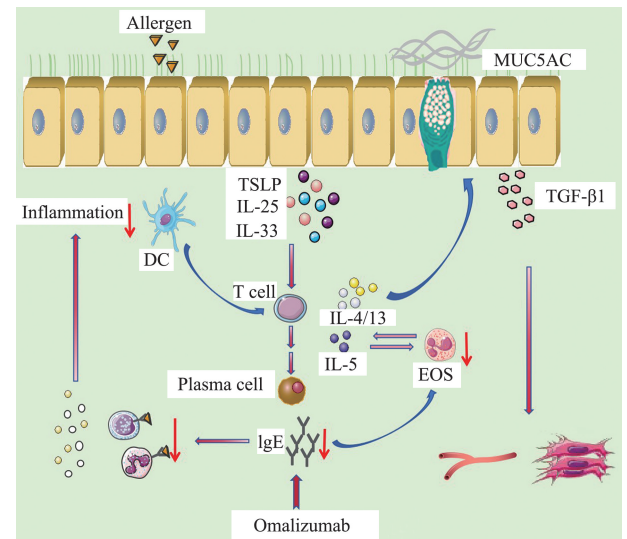


图 5 过敏性哮喘发病及奥马珠单抗治疗机制图
Figure 5 Diagram of allergic asthma pathogenesis and omalizumab treatment mechanism

现如今,奥马珠单抗不仅应用于过敏性哮喘,还逐步应用于慢性自发性荨麻疹、鼻窦炎合并鼻息肉、过敏性鼻炎的治疗,并且有证据表明与脱敏治疗联合使用可有效减轻脱敏治疗剂量递增期的不良反应,其应用市场广大^[46-48],而类似药凭借其低廉的价格和与原研药相近的疗效具有显著优势。然而,其他抗 IgE 单克隆抗体虽然也具有与奥马珠单抗相似的疗效但也存在些许问题,比如利格利珠单抗在抑制 IgE:CD23 相互作用方面的效果则不如奥马珠单抗^[49]。有研究表明类似药 CT-P39 在疗效、安全性以及药代动力学等方面与奥马珠单抗呈现出等效性^[50],同时国内的另一款奥马珠单抗类似药 CMAB007 目前尚未有与原创药物及其他类似药在

药代、药效与安全性等方面的比较研究^[51],当然在将类似药应用于临床研究时应充分考虑过敏性疾病的严重程度以及患者的年龄段等因素,未来可进行相关研究从而找到在疗效和价格方面最有优势的类似药,而本研究中 SYN008 与原创药相似的疗效说明 SYN008 具有很大的发展潜力。

与既往研究相比,本研究探究 SYN008 对过敏性哮喘小鼠炎症和重塑病理指标的影响,证实 SYN008 可以有效减轻哮喘小鼠的炎症和重塑现象,并将 SYN008 与奥马珠单抗原创药物进行比较,对药物应用于临床有重要的意义。但是本研究也有一定的局限性,哮喘的发生发展是一个复杂的病理生理过程,在炎症检测方面,我们仅对经典炎症因子 IL-4、IL-5 和 IL-13 以及 IgE 的水平进行了检测,而未对 IL-1 β 和 IL-6 等在过敏性哮喘中同样发挥重要作用的其他因子予以检测^[52-53]。此外,我们也未深入探究 SYN008 抑制炎症和重塑的具体分子机制及相关通路。未来我们可以运用蛋白质组学来分析疾病组和药物治疗组的分子差异,找出更多与炎症和重塑功能相关的蛋白和通路,为其临床应用提供充分的理论支持。

在本研究中我们发现奥马珠单抗类似药 SYN008 通过靶向 IgE 引起一系列炎症指标(IgE、IL-4/5/13)及重塑相关指标(TGF- β 1、MUC5AC)下降,进而确定了其在治疗 OVA 诱导的过敏性哮喘小鼠的显著作用,并且与奥马珠单抗原研药表现出相同程度的疗效。因此,我们初步判断 SYN008 有望成为治疗哮喘的有效药物。

参考文献:

- [1] Patadia R, Casale TB, Fowler J, et al. Advancements in biologic therapy in eosinophilic asthma[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2024, 24(4): 251-261.
- [2] Hammad H, Lambrecht BN. The basic immunology of asthma[J]. *Cell*, 2021, 184(6): 1469-1485.
- [3] 张韵秋,任秀敏,徐鸥,等.奥马珠单抗靶向治疗慢性鼻窦炎伴鼻息肉的研究进展[J/OL]. *山东大学耳鼻喉眼学报*, 1-9 [2024-10-02]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/37.1437.R.20240408.1519.006.html>.
ZHANG Yunqiu, REN Xiumin, XU Ou, et al. Research progress on omalizumab targeted therapy for chronic sinusitis with nasal polyps[J]. *Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University*, 1-9 [2024-10-02]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/37.1437.R.20240408.1519.006.html>.
- [4] Grzela K, Litwiniuk M, Zagorska W, et al. Airway remodeling in chronic obstructive pulmonary disease and asthma; the role of matrix metalloproteinase-9[J]. *Arch Immunol Ther Exp*, 2016, 64(1): 47-55.
- [5] Savin IA, Zenkova MA, Sen'kova AV. Bronchial asthma, airway remodeling and lung fibrosis as successive steps of one process[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(22): 16042. doi:10.3390/ijms242216042.
- [6] Niespodziana K, Borochova K, Pazderova P, et al. Toward personalization of asthma treatment according to trigger factors[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2020, 145(6): 1529-1534.
- [7] Chase NM, Littlejohn M, Holweg CTJ, et al. Effectiveness of omalizumab across different dosing regimens in patients with moderate-to-severe allergic asthma [J]. *Respir Med*, 2024, 223: 107537. doi:10.1016/j.rmed.2024.107537.
- [8] Liao JY, Tang J, Jiang YP, et al. Effects of omalizumab on lung function in patients with moderate-to-severe allergic asthma: a systematic review and meta-analysis[J]. *Ther Adv Respir Dis*, 2024, 18: 17534666231221771. doi:10.1177/17534666231221771.
- [9] Qin ZW, Chen YJ, Liu N, et al. Mechanisms of Bushe-nyiqi Decoction in the treatment of asthma: an investigation based on network pharmacology with experimental validation[J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1361379. doi:10.3389/fphar.2024.1361379.
- [10] 王瑞茵,李红雯,张清,等.青蒿琥酯对哮喘小鼠气道反应性和气道炎症的影响[J]. *中华医学杂志*, 2019, 99(32): 2536-2541.
WANG Ruiyin, LI Hongwen, ZHANG Qing, et al. Effect of artesunate on airway responsiveness and airway inflammation in asthmatic mice [J]. *National Medical Journal of China*, 2019, 99(32): 2536-2541.
- [11] 孙丛丛,崔文静,张锦涛,等.铁死亡在支气管哮喘气道重塑中的作用[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2024, 62(7): 1-9.
SUN Congcong, CUI Wenjing, ZHANG Jintao, et al. Roles of ferroptosis in asthmatic airway remodeling[J]. *Journal of Shandong University (Health Sciences)*, 2024, 62(7): 1-9.
- [12] 张越,佟训靓,李艳,等.奥马珠单抗对过敏性哮喘小鼠气道重塑的影响[J]. *临床药物治疗杂志*, 2022, 20(7): 40-45.
ZHANG Yue, TONG Xunliang, LI Yan, et al. Effects of Omalizumab on airway remodeling in allergic asthma mouse[J]. *Clinical Medication Journal*, 2022, 20(7): 40-45.
- [13] Ren C, Mou YK, Song XY, et al. P2X7 receptor of microglia in olfactory bulb mediates the pathogenesis of

- olfactory dysfunction in a mouse model of allergic rhinitis[J]. *Faseb J*, 2023, 37(6): e22955. doi:10.1096/fj.202300160RR.
- [14] Zhang FQ, Han XP, Zhang F, et al. Therapeutic efficacy of a co-blockade of IL-13 and IL-25 on airway inflammation and remodeling in a mouse model of asthma[J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 46: 133-140. doi: 10.1016/j.intimp.2017.03.005.
- [15] Zhang MY, Lin JT, Zhang JY, et al. Artesunate inhibits airway remodeling in asthma via the MAPK signaling pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1145188. doi: 10.3389/fphar.2023.1145188.
- [16] Ma WX, Jin QY, Guo HQ, et al. Metformin ameliorates inflammation and airway remodeling of experimental allergic asthma in mice by restoring AMPK α activity[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 780148. doi: 10.3389/fphar.2022.780148.
- [17] Sardon-Prado O, Diaz-Garcia C, Corcuera-Elosegui P, et al. Severe asthma and biological therapies: now and the future[J]. *J Clin Med*, 2023, 12(18): 5846. doi: 10.3390/jcm12185846.
- [18] 奥马珠单抗治疗过敏性哮喘专家组,中华医学会呼吸病学分会哮喘学组.奥马珠单抗治疗过敏性哮喘的中国专家共识[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2018, 41(3): 179-185.
- [19] Vignola AM, Humbert M, Bousquet J, et al. Efficacy and tolerability of anti-immunoglobulin E therapy with omalizumab in patients with concomitant allergic asthma and persistent allergic rhinitis: solar[J]. *Allergy*, 2004, 59(7): 709-717.
- [20] Velling P, Skowasch D, Pabst S, et al. Improvement of quality of life in patients with concomitant allergic asthma and atopic dermatitis: one year follow-up of omalizumab therapy[J]. *Eur J Med Res*, 2011, 16(9): 407-410.
- [21] Kraik K, Tota M, Laska J, et al. The role of transforming growth factor- β (TGF- β) in asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [J]. *Cells*, 2024, 13(15): 1271. doi:10.3390/cells13151271.
- [22] Eggel A, Pennington LF, Jardetzky TS. Therapeutic monoclonal antibodies in allergy: targeting IgE, cytokine, and alarmin pathways[J]. *Immunol Rev*, 2024; 19. doi: 10.1111/imr.13380.
- [23] Pelaia G, Gallelli L, Renda T, et al. Update on optimal use of omalizumab in management of asthma [J]. *J Asthma Allergy*, 2011, 4: 49-59. doi:10.2147/JAA.S14520 .
- [24] Cilli A, Uzer F, Ozbey G. Clinical remission maintained and improved over time in patients with severe asthma treated with omalizumab[J]. *J Asthma*, 2024, 61(11): 1469-1476.
- [25] Ghanei M, Ghalebagh B, Sami R, et al. Efficacy and safety of a proposed omalizumab biosimilar compared to the reference product in the management of uncontrolled moderate-to-severe allergic asthma: a multicenter, phase III, randomized, double-blind, equivalency clinical trial [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1425906. doi:10.3389/fimmu.2024.1425906.
- [26] Long C, Sun CH, Lin H, et al. Efficacy and safety of subcutaneous immunotherapy combined with omalizumab in children with dust mite-induced asthma [J]. *J Asthma*, 2024, 61(11): 1561-15670.
- [27] 柳杉杉,申昆玲.从IgE发现到抗IgE抗体产生看哮喘的生物治疗趋势[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2021, 36(12): 902-907.
- LIU Shanshan, SHEN Kunling. Biotherapy trends in asthma: from the discovery of IgE to anti-IgE antibody production[J]. *Chinese Journal of Applied Clinical Pediatrics*, 2021, 36(12): 902-907.
- [28] Yan HC, Sun L, Ni YM, et al. Effective omalizumab treatment influenced eosinophil function in severe allergic asthmatics[J]. *J Thorac Dis*, 2023, 15(6): 3115-3125.
- [29] Couillard S, Jackson DJ, Pavord ID, et al. Choosing the right biologic for the right patient with severe asthma[J]. *Chest*, 2024, 6: S0012-3692 (24) 05139-0. doi: 10.1016/j.chest.2024.08.045.
- [30] 杨文平,李刚,亓玉心,等.奥马珠单抗对支气管哮喘大鼠肺功能及气道重塑的影响及机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2023, 33(14): 16-21.
- YANG Wenping, LI Gang, QI Yuxin, et al. Effects of omalizumab on pulmonary function and airway remodeling in asthmatic rats and the underlying mechanisms[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2023, 33(14): 16-21.
- [31] 周进,王文杰,丁静,等.荆僵白果膏联合奥马珠单抗治疗老年支气管哮喘患者的效果及其对气道重塑和气道炎症的影响[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2024, 32(7): 101-105.
- ZHOU Jin, WANG Wenjie, DING Jing, et al. Effect of jingjiang baiguo ointment combined with omalizumab in the treatment of elderly patients with bronchial asthma and its impact on airway remodeling and airway inflammation [J]. *Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease*, 2024, 32(7): 101-105.
- [32] Song YL, Wang ZG, Jiang JZ, et al. DEK-targeting aptamer DTA-64 attenuates bronchial EMT-mediated airway remodelling by suppressing TGF- β 1/Smad, MAPK and PI3K signalling pathway in asthma[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(23): 13739-13750.
- [33] 蔡秋景,张倩,何学佳,等.气道平滑肌细胞通过TGF- β 1/Smad3信号通路调节IL-33的表达参与哮喘[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2020, 58(4): 78-83.

- CAI Qiuqing, ZHANG Qian, HE Xuejia, et al. Airway smooth muscle cells regulate IL-33 expression through TGF- β 1/Smad3 signaling pathway to participate in asthma[J]. *Journal of Shandong University (Health Sciences)*, 2020, 58(4): 78-83.
- [34] Peng HY, Sun F, Jiang YX, et al. Semaphorin 7a aggravates TGF- β 1-induced airway EMT through the FAK/ERK1/2 signaling pathway in asthma[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1167605. doi:10.3389/fimmu.2023.1167605.
- [35] Wang YB, Yang HK, Su X, et al. TGF- β 1/SMOC2/AKT and ERK axis regulates proliferation, migration, and fibroblast to myofibroblast transformation in lung fibroblast, contributing with the asthma progression[J]. *Hereditas*, 2021, 158(1): 47. doi:10.1186/s41065-021-00213-w.
- [36] Muhamad SA, Safuan S, Stanslas J, et al. Lignosus rhinocerotis extract ameliorates airway inflammation and remodelling via attenuation of TGF- β 1 and Activin A in a prolonged induced allergic asthma model[J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 18442. doi:10.1038/s41598-023-45640-z.
- [37] Fang YN, Jin WW, Guo Z, et al. Quercetin alleviates asthma-induced airway inflammation and remodeling through downregulating periostin via blocking TGF- β 1/smud pathway[J]. *Pharmacology*, 2023, 108(5): 432-443.
- [38] Janulaityte I, Januskevicius A, Kalinauskaite-Zukauske V, et al. In vivo allergen-activated eosinophils promote collagen I and fibronectin gene expression in airway smooth muscle cells via TGF- β 1 signaling pathway in asthma[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(5): 1837. doi:10.3390/ijms21051837.
- [39] Wu HY, Wang D, Shi H, et al. PM2.5 and water-soluble components induce airway fibrosis through TGF- β 1/Smad3 signaling pathway in asthmatic rats[J]. *Mol Immunol*, 2021, 137: 1-10. doi:10.1016/j.molimm.2021.06.005.
- [40] He HJ, Cao LH, Wang Z, et al. Sinomenine relieves airway remodeling by inhibiting epithelial-mesenchymal transition through downregulating TGF- β 1 and Smad3 expression in vitro and in vivo[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 736479. doi:10.3389/fimmu.2021.736479.
- [41] Bonser LR, Erle DJ. Airway mucus and asthma; the role of MUC5AC and MUC5B[J]. *J Clin Med*, 2017, 6(12): 112. doi:10.3390/jcm6120112.
- [42] Boomer J, Choi J, Alsop A, et al. Increased Muc5AC and decreased ciliated cells in severe asthma partially restored by inhibition of IL-4R α receptor[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2024; 27. doi:10.1164/rccm.202307-1266OC.
- [43] Jia ZR, Bao KF, Wei P, et al. EGFR activation-induced decreases in claudin1 promote MUC5AC expression and exacerbate asthma in mice[J]. *Mucosal Immunol*, 2021, 14(1): 125-134.
- [44] Dai JH, Ma B, Wen XL, et al. Upregulation of miR-92a contributes to blocking goblet cell metaplasia by targeting MUC5AC in asthma[J]. *J Recept Signal Transduct*, 2020, 40(6): 613-619.
- [45] Gao QQ, Feng CR, Shi Q, et al. Guishaozichuan granules can attenuate asthma in rats via the MUC5AC/EGFR signaling pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1011751. doi:10.3389/fphar.2022.1011751.
- [46] Zuberbier T, Ensina LF, Giménez-Arnau A, et al. Chronic urticaria; unmet needs, emerging drugs, and new perspectives on personalised treatment[J]. *Lancet*, 2024, 404(10450): 393-404.
- [47] Anagnostou A, Greenhawt M, Shaker M, et al. Food allergy yardstick: where does omalizumab fit? [J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2024; S1081-S1206(24)00494-0. doi:10.1016/j.anaai.2024.07.034.
- [48] Halken S, Larenas-Linnemann D, Roberts G, et al. EAACI guidelines on allergen immunotherapy: prevention of allergy[J]. *Pediatr Allergy Immunol*, 2017, 28(8): 728-745.
- [49] Gasser P, Tarchevskaya SS, Guntern P, et al. The mechanistic and functional profile of the therapeutic anti-IgE antibody ligelizumab differs from omalizumab[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 165. doi:10.1038/s41467-019-13815-w.
- [50] Maurer M, Saini SS, McLendon K, et al. Pharmacokinetic equivalence of CT-P39 and reference omalizumab in healthy individuals: a randomised, double-blind, parallel-group, Phase 1 trial[J]. *Clin Transl Allergy*, 2022, 12(11): e12204. doi:10.1002/ctlt.12204.
- [51] Zhou B, Lin BR, Li J, et al. Tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of CMAB007, a humanized anti-immunoglobulin E monoclonal antibody, in healthy Chinese subjects[J]. *MAbs*, 2012, 4(1): 110-119.
- [52] Namakanova OA, Gorshkova EA, Zvartsev RV, et al. Therapeutic potential of combining IL-6 and TNF blockade in a mouse model of allergic asthma[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(7): 3521. doi:10.3390/ijms23073521.
- [53] Mahmutovic Persson I, Menzel M, Ramu S, et al. IL-1 β mediates lung neutrophilia and IL-33 expression in a mouse model of viral-induced asthma exacerbation[J]. *Respir Res*, 2018, 19(1): 16. doi:10.1186/s12931-018-0725-z.