基础研究 文章编号:0253-3626(2010)08-1191-03

# 糖皮质激素与 BCG 用于分泌性中耳炎治疗的实验研究

孙 荣[1],唐新业[2],王永红[1],洪苏玲[2],李永强[1]

(1. 重庆医科大学附属第一医院体检中心,重庆 400016;2. 重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究糖皮质激素(Glucocorticoids,GCS)及卡介苗(Bacille calmette-guerin,BCG)疫苗在治疗分泌性中耳炎(Secretory otitis media,SOM)中的疗效及其作用机制。方法:将 24 只 BALB/C 小鼠分为 4 组,每组 6 只,其中卵清白蛋白(Ovalbumin, OVA)模型组(OVA 组)、卡介苗治疗组(BCG 组)、糖皮质激素治疗组(GCS 组)腹腔注射卵清白蛋白致敏,然后用卵清白蛋白耳内激发 2 次;阴性对照组(CON 组)腹腔注射生理盐水,然后生理盐水激发 2 次。BCG 组在耳内激发前 3 d 给予双下肢外侧皮内注射卡介苗 0.02 mg,GCS 组在耳内激发前 3 d 给予经口吸入强的松 1 mg,其它 2 组不作干预,4 组分别于 2 次激发后 2 d 处死小鼠,中耳组织做病理切片观察其形态学改变,免疫组织化学染色观察 IL-4、IL-5、INF-γ、IL-12 细胞因子的表达差异情况。结果:BCG 组、GCS 组中耳粘膜组织炎症反应较 OVA 组明显减轻,且 GCS 组与 BCG 组比较,炎症反应亦明显减轻,Th1 型细胞因子 IL-12、IFN-γ 较 OVA 组显著增多,($P<0.05$);而 Th2 型细胞因子 IL-4、IL-5 较 OVA 组明显减少($P<0.05$),BCG 在一定程度上扭转了 I 型变态反应的发生发展,而 GCS 使 Th1、Th2、型细胞因子更趋于平衡。结论:卡介苗是有效的免疫调节剂,可能通过调节 Th1/Th2 的细胞的平衡,达到治疗的作用。而糖皮质激素仍然是变应性炎症疾病治疗中最有效的一类药物,为临床治疗分泌性中耳炎提供依据。

【关键词】糖皮质激素,卡介苗;中耳炎,分泌性;动物模型;免疫调节

【中国图书分类法分类号】R764.21 【文献标识码】B 【收稿日期】2009-04-28

# The experimental study of glucocorticoids and BCG vaccine's treatment for secretory otitis media

*SUN Rong, et al*

(*The Center of Medical Examination, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the the mechanism of effect of glucocorticoids and BCG vaccine in the treatment of secretory otitis media. *Methods*: 24 BALB/C mice were divided into 4 groups of 6, The OVA、BCG and GCS groups were immunized with OVA/alum and challenged with OVA. BCG group was injected with BCG 0.02 mg intraperitoneal injection 3 days before being challenged, GCS group was given the oral inhalation prednisone 1 mg for 3 days before being stimulated. And the other two groups have non-intervention, 2 days later the mice were killed all, We analysed the pathology observation of the middle ear mucosa, the expression of cytokines such as IL-4、IL-5、IFN-γ and IL-12 by immunohistochemistry. *Results*: BCG Group, GCS group of middle ear mucosa inflammatory response than the OVA group was significantly reduced, and the GCS group, compared with BCG Group, also significantly reduce the inflammatory. Th1-type cytokines IL-12, IFN-γ was significantly increased than the OVA group, ($P<0.05$); while Th2-type cytokines IL-4, IL-5 was significantly reduced, ($P<0.05$). *Conclusion*: BCG is an effective immunomodulator, probably by regulating the Th1/Th2 balance. And glucocorticoids are still the the most effective drugs in the treatment of allergic inflammatory disease. The study provides the basis for the clinical treatment of secretory otitis media.

【Key words】Glucocorticoids; BCG; Otitis media; Secretory; Animal model; Immune-modulation

分泌性中耳炎(Secretory otitis media,SOM)是以中耳积液及传导性耳聋为主要特征的中耳非化脓性炎性疾病,本病在小儿发病率较高,是小儿常见的致聋原因之一,但其病因机制尚未完全明确[1]。近年有研究表明 SOM 与变态反应有关[2]。本研究以 BALB/C 小鼠为研究对象,采用卵清白蛋白(Ovalbumin,OVA)致敏并耳内激发小鼠制成分泌性中耳炎模型,并应用卡介苗(Bacille calmette-guerin,BCG)疫苗、糖皮质激素(Glucocorticoids,GCS)干预,观察各组中耳粘膜组织形态学变化以及 IL-4、IL-5、IFN-γ、IL-12 表达的变化,旨在为临床治疗分泌性中耳炎提供依据。

作者介绍:孙 荣(1977-),女,硕士,主治医师,

研究方向:耳鼻咽喉变态反应性疾病及健康管理。

通讯作者:王永红,女,主任医师,E-mail:wyho231029@yahoo.com.cn。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

6～8 周健康雄性 BALB/C 小鼠 24 只（重庆医科大学动物中心提供），体重 25~30 g，随机分成糖皮质激素治疗组（GCS 组）、卡介苗治疗组（BCG 组）、OVA 模型组、正常对照组（Control group，CON 组），每组 6 只，每只动物在实验前均经电耳镜检查证实无外耳道及中耳感染。

### 1.2 造模及干预方法[3]

OVA 模型组给予 2 mg 卵清蛋白（Ovlbumin，OVA，sigma 美国）溶于 0.6 ml 生理盐水，以 5.14 mg 氢氧化铝（购自温州东升化学试剂公司）为免疫佐剂行腹腔注射，每周 1 次，共 2 周，此为全身致敏阶段，2 周后用无菌技术经鼓膜前下象限注入 1 mg/ml OVA/PBS 混合液 15 μl，24 h 后鼠再次麻醉，观察鼓膜状态，并重复注射第 2 次，此为耳内激发阶段，造成分泌性中耳炎动物模型[4,5]。BCG 组在耳内激发前 3 d 给予双下肢外侧皮内注射卡介苗 0.02 mg（购自上海生物制品研究所，0.2~0.3 mg），GCS 组在耳内激发前 3 d 给予经口吸入强的松 1mg，余步骤同模型组。对照组以 0.6 ml 生理盐水加 5.14 mg 氢氧化铝行腹腔注射，以生理盐水耳内激发，时间同模型组。

### 1.3 标本取材和检测指标

所有动物在耳内激发后 2 d 断头活杀，解剖听泡，4%多聚甲醛固定后，5%硝酸水溶液脱钙，经脱水后石蜡包埋切片，常规 HE 染色光镜检查鼓室粘膜增生情况，免疫组织化学染色检测 IL-4、IL-5、IL-12、IFN-γ 的表达（均购自武汉博士德公司），DAB 显色试剂购自北京中山生物技术有限公司，步骤按试剂盒说明进行。

### 1.4 细胞计数方法

目镜上配计数格，在低倍镜下于中耳粘膜下固有层、中耳腔渗出液中选取 5 个阳性细胞多的区域，在高倍镜下计细胞数，取 5 个高倍视野下的均值，结果以均数 ± 标准差表示，粘膜厚度用测微计在光镜下测量。

### 1.5 统计学分析

采用 SPSS11.0 统计软件包中的配对 $t$ 检验，以 $P<0.05$ 为有显著性意义。

## 2 结 果

### 2.1 耳部体格检查情况

所有实验动物在行耳内注射后每天进行电耳镜检查，OVA 组在耳内激发 24 h 后，鼓膜及周围组织出现红斑，且鼓膜有不同程度放射状扩张的血管纹，且鼓膜逐渐失去正常的光泽，呈淡黄色或琥珀色，活动受限。BCG 组、GCS 组鼓膜未出现或少量红斑，活动略受限，放射状血管纹较少，颜色呈乳白色半透明状。对照组鼓膜基本正常，略或无充血，活动无受限。

### 2.2 GCS、BCG 对 SOM 模型中耳炎症反应的影响

GCS 组与 BCG 组中耳炎症较 OVA 组明显减轻，嗜酸性粒细胞减少，粘膜层变薄，中耳腔渗出液减少，其中 GCS 组炎症减轻更明显。BCG 组、GCS 组粘膜厚度及嗜酸性粒细胞数明显低于 OVA 组，$P<0.05$；GCS 组明显低于 BCG 组，$P<0.05$；OVA 组可见中耳组织有较多的嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、浆细胞浸润，粘膜明显增厚，毛细胞血管增多，通透性增加，纤毛上皮脱落，中耳腔可见浆液性渗出物。BCG 组、GCS 组、OVA 组的粘膜厚度及嗜酸性粒细胞计数均高于 CON 组，$P<0.05$（表 1）。

### 2.3 GCS、BCG 对 SOM 模型 Th1、Th2 型细胞因子表达的影响

OVA 组 IL-4、IL-5、IFN-γ、IL-12 阳性细胞呈多样性，可见淋巴细胞、浆细胞、嗜酸性粒细胞、上皮细胞、血管内皮细胞及成纤维细胞等多种细胞表达，表达于胞浆中，呈棕黄色颗粒，多要分布于粘膜上皮下固有层、骨髓腔以及中耳腔渗出液当中，而 CON 组呈弱阳性或无表达。OVA 组 Th1 类细胞因子 IFN-γ、IL-12 明显低于 BCG 组、GCS 组，差异有显著性意义，$P<0.05$，而 BCG 组、GCS 组 Th2 类细胞因子 IL-4、IL-5 明显低于 OVA 组，$P<0.05$。BCG 组与 GCS 组相比，差异有显著性意义，$P<0.05$（表 2）。

## 3 讨 论

BCG 是减毒的结核杆菌活菌苗，作为免疫调节剂，它对免疫系统的调节作用发挥先导作用。缺乏感染是具有遗传性过敏倾向的人罹患变态反应性疾病的原因，接种疫苗可能诱导机体产生保护性的 Th1 反应[6]。BCG 的作用首先是加强 T 细胞的功能，能促进 T 细胞的增殖，增强 T 细胞依赖的体液免疫功能；接种后，可使机体产生保护性的 Th1 细胞，建立一种 Th1 型免疫应答，从而抑制变应原的致敏作用和粘膜高反应状态的产生，BCG 能激活自然杀伤细胞、巨噬细胞和树突状细胞等抗原呈递细胞，使之产生 IFN-γ 和 IL-12，诱导 Th2 反应向 Th1 反应转变，并促使 Th0 细胞向 Th1 细胞分化[7]。本研究发现 BCG 能明显抑制 Th2 反应，增强保护性的 Th1 反应，一定程度上纠正了因Ⅰ型变态反应、Th2 型细胞因子及细胞浸润对中耳粘膜的损害。

而肾上腺皮质分泌的糖皮质激素及其人工合成物是变应性炎症疾病治疗中最有效的一类药物。糖皮质激素具有强大的抗炎、抗毒、抗过敏作用，它的抗过敏作用通过抑制多种炎症细胞的趋化、游走、聚集和分泌，抑制过敏原经 IgE 受体激活巨噬细胞，抑制巨噬细胞释放多种炎症介质和嗜酸性粒细胞脱颗粒，并减少和抑制肥大细胞释放过敏介质来实现。治疗量的糖皮质激素能抑制巨噬细胞对抗原的吞噬、处理与呈递作用，抑制激活巨噬细胞产生 IL-1，抑制 T 细胞产生 IL-2，抑制 IFN 对巨噬细胞的作用，还可抑制补体蛋白的合成与分泌。小剂量的糖皮质激素主要抑制细胞免疫，大剂量

表 1 4 组小鼠中耳粘膜厚度及嗜酸性粒细胞胞的比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 鼠数 | 耳数 | 粘膜厚度(μm) | ESO 计数(个) |
|---|---|---|---|---|
| GCS 组 | 6 | 12 | 0.128 ± 0.021[1,2,3] | 1.33 ± 0.65[1,2,3] |
| BCG 组 | 6 | 12 | 0.210 ± 0.014[2,3] | 2.42 ± 0.9[2,3] |
| OVA 组 | 6 | 12 | 0.924 ± 0.064[3] | 7.25 ± 1.14[3] |
| CON 组 | 6 | 12 | 0.068 ± 0.010 | 0.42 ± 0.51 |

[1]与 BCG 组相比 $P<0.05$; [2]与 OVA 组相比 $P<0.05$; [3]与 CON 组相比 $P<0.05$

表 2 4 组小鼠中耳粘膜中 IL-4、IL-5、IFN-γ、IL-12 阳性细胞数的比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 鼠数 | IL-4 阳性细胞数(个) | IL-5 阳性细胞数(个) | IFN-γ 阳性细胞数(个) | IL-12 阳性细胞数(个) |
|---|---|---|---|---|---|
| GCS 组 | 6 | 5.50 ± 1.00[1,2,3] | 7.17 ± 1.27[1,2,3] | 6.17 ± 0.83[1,2,3] | 4.17 ± 0.94[1,2,3] |
| BCG 组 | 6 | 7.83 ± 1.27[2,3] | 9.75 ± 1.22[2,3] | 12.47 ± 1.00[2,3] | 13.58 ± 1.31[2,3] |
| OVA 组 | 6 | 15.42 ± 1.08[3] | 18.00 ± 1.95[3] | 5.33 ± 1.07[3] | 6.5 ± 1.17[3] |
| CON 组 | 6 | 2.33 ± 1.07 | 2.42 ± 0.90 | 1.25 ± 0.87 | 1.00 ± 0.74 |

[1]与 BCG 组相比 $P<0.05$; [2]与 OVA 组相比 $P<0.05$; [3]与 CON 组相比 $P<0.05$

则能抑制由 B 细胞转化成浆细胞的过程,使抗体生成减少,降低血清 IgG 与 IgA 的水平,干扰体液免疫。糖皮质激素亦能增强血管张力,减轻充血和降低毛细血管通透性[8]。本研究表明糖皮质激素能显著抑制 Th2 反应,使 Th1、Th2 型细胞因子达到一种新的平衡,从而减少超敏反应对中耳的损害,从上述数据中可以看出糖皮质激素仍然是治疗 SOM 最有效的药物。

SOM 病因尚不明确,目前认为主要与咽鼓管功能障碍、感染及免疫反应等有关。本研究认为Ⅰ型变态反应在 SOM 发病机制中发挥重要作用,治疗上糖皮质激素是最有效药物之一,BCG 作为免疫调节剂亦能有效治疗 SOM,二者作用机理不同,但关于激素及 BCG 的用药途径,剂量,用药时间及效果的观察还需更多更进一步的动物实验及研究,为临床上治疗 SOM 提供科学依据。

## 参 考 文 献

[1] 田勇泉,孙爱华.耳鼻咽喉科学(第五版)[M]. 北京:人民卫生出版社,2001. 340-345.

[2] Hurst D S.Association of otitis media with effusion and allergy as demonstrated by intradermal skin testing and eosinophil cationic protein levels in both middle ear effusion and mucosal biopsies[J].The Laryngoscope,1996, 106(9):1129-1137.

[3] 孙 荣,洪苏玲,唐新业,等.变态反应性中耳炎动物模型的建立及Ⅰ型变态反应与分泌性中耳炎关系的探讨[J].临床耳鼻咽喉科杂志,2005, 19(4): 170-172.

[4] Hardy S M,Heavner S B,White D R,et al. Late-phase allergy and Eustachian tube dysfunction[J].Otolaryngol Head Neck Surg,2001,125(4): 339-345.

[5] Hoke W,Pollock,Charles S,et al. The role of soluble interleukin-4 receptor and interleukin-5 antibody in preventing late-phase allergy-induced eustachian tube dysfunction[J].Otolaryngol Head Neck Surg,2002, 127(3): 169-176.

[6] 魏 伟,李晓辉,张洪泉,等.抗炎免疫药理学[M]. 人民卫生出版社,2005. 277-278.

[7] 金美玲,蔡映云,任 涛,等.草分支杆菌疫苗治疗哮喘模型小鼠的实验研究[J].复旦学报(医学版),2002,29(6):465-468.

[8] 张莹莹,糖皮质激素治疗分泌性中耳炎的临床疗效观察[J],听力学及言语疾病杂志,2008, 16(4):329-330.

(责任编辑:关蕴良)