维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)03－0299－03

新生大鼠注射尘螨对其发育后期气道炎症作用的研究

代继宏[1], 符　州[1], 刘　宇[2]

(1.重庆医科大学儿科学院呼吸科,重庆　400014;重庆医科大学临床学院药剂科,重庆　400016)

【摘　要】目的:研究早期接触屋尘螨(HDM)能否加重后期哮喘发作时的气道炎症及其相关免疫学机理。方法:新生 Wistar 大鼠生后即注射 HDM 提取液,制作哮喘模型,检测血 IL－4 及 IFN－γ 水平、OVA－IgE 水平、支气管肺泡灌洗液(BALF)中嗜酸性粒细胞(EOS)计数。结果:HDM 组 EOS 百分比、血清 OVA 特异性 IgE 水平、IL－4 水平分别为(37.07±1.10)%、(0.204±0.023)和(78.96±12.18)pg/ml,为最高,而 IFN－γ 水平最低,为(93.78±2.10)pg/ml。结论:生后早期接触 HDM 能加重以后气道变态反应性炎症,与 T_H1/T_H2 失衡有关。

【关键词】哮喘;动物模型;TH 亚群;螨

【中国图书分类法分类号】R562.2+5;R384.4　　【文献标识码】　　【收稿日期】2003－09－22

Effects of house dust mite injected in neonate rats on airway inflammation and TH subset in later life

DAI Jihong, et al

(*Department of Respiratory Medicine, College of Pediatrics, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study whether early exposure to house dust mite will aggravate airway inflammation as well as the onset of asthma and to explore the relevant mechanism. *Methods*: Neonate Wistar rats were injected with HDM subcutaneously instantly after birth. After the four times management, they were established as models of asthma with OVA, and bronchoalveolus was lavaged to count percentage of eosinophils. And levels of IL－4, IFN－γ and serum OVA－IgE were also detected. *Results*: In HDM group, the percentage of EOS, level of serum OVA－IgE and level of IL－4 were (37.07±1.10) %, (0.20±0.023) and (78.96±12.18) pg/ml, respectively, the highest among the three groups, otherwise level of IFN－γ, the lowest, (93.78±2.10) pg/ml. *Conclusion*: Early exposure to house dust mite after birth could aggravate the level of airway inflammation in later life and increase the level of IgE, which is related with T_H1/T_H2 imbalance.

【Key words】Asthma; Animal model; TH subset; Mite

哮喘是小儿最常见的变态反应性疾病,屋尘螨(HDM)是过敏性哮喘中的重要变应原,能引起机体致敏或诱发哮喘。但是,机体致敏的时间和机理还不清楚,早期接触 HDM 是否会对发育后期的气道炎症有明显影响等问题都需要进一步研究。

我们应用 Wistar 大鼠于新生期接触 HDM,探讨早期接触 HDM 对气道炎症的作用及相关免疫学机理。

1　材料与方法

1.1　实验对象及分组

新生鼠来源:新生 Wistar 大鼠(重庆医科大学实验动物中心提供)于 24h 内立即随机分 3 组,分别为:哮喘模型组(Asthma)、正常对照组(Control)和尘螨组(HDM),每组新生鼠数目为 10 只,并用断趾法进行标记。

HDM 组:新生 Wistar 大鼠于 24h 内立即皮下注射 HDM 提取液 0.1ml/只(含 Derp 5000SBE 单位),以后分别于大鼠 7、14 和 21 天日龄时进行 3 次注射,剂量同前。

Asthma 组和 Control 组均按照上述方法进行注射,但用生理盐水(N.S)代替 HDM 提取液。

1.2　哮喘模型制作

所有大鼠均于日龄第 30 天时开始进行以下实验:

HDM 组和 Asthma 组:大鼠分别于日龄第 30 天、第 37 天时,用 OVA(GradeV)1mg＋氢氧化铝 200mg＋N.S 1ml 混悬液在大鼠两腹股沟、腹、前足跖,共 4 点作皮下注射,每点

作者介绍:代继宏(1970－　),男,主治医生,硕士,主要研究方向:小儿哮喘的发病机理。

维普资讯 http://www.cqvip.com

0.2ml,最后腹腔注射 0.2ml。于日龄第 44 天,将大鼠置于自制密闭容器中,用高频雾化器提供雾化动力,以 1% OVA (GradeⅢ)进行雾化吸入激发,30min/次,连续 6 天。

Control 组:用 N.S 代替 OVA 进行致敏和激发,方法同前。

最后一次激发后 24h,老鼠以 10%异戊巴比妥钠腹腔麻醉(0.1ml/kg),75%乙醇浸泡 3min,取仰卧位固定于手术台上,打开胸腔,无菌心脏采血致死。

1.3 观察指标和检测方法

1.3.1 外周血单个核细胞(PBMC)的制备及培养

大鼠无菌心脏穿刺采血 2ml,吸取血浆 100μl 冻存待检 IgE。剩余部分用密度梯度离心法分离 PBMC,调整细胞浓度为 1×10^6/ml,取细胞悬液 1ml,加 ConA(终浓度 5μg/ml),置 37℃、5% CO_2 孵箱培养 48h,离心收集上清,置于 -20℃冰箱冻存待检细胞因子。

1.3.2 支气管肺泡灌洗(BAL)及灌洗液(BALF)中细胞分类计数

大鼠心脏采血致死后,充分暴露颈部正中区域,分离气管,插入 22G 留置针,缝线固定,用冰浴 N.S 灌洗,1ml/次 8 次,所有回吸液置于冰浴离心管,8 次灌洗完后离心,1000rpm×10min,沉渣 50μl 直涂片、瑞氏染色,显微镜 400×,按中性粒细胞(NEU)、嗜酸性粒细胞(EOS)、淋巴细胞(LYM)和巨噬细胞(MAC)分类计数 200 个细胞,每张玻片计数两次,取平均值记录。

1.3.3 血清 OVA 特异性 IgE 抗体检测

用 100μl OVA/孔(100μg/ml)包被 96 孔酶标板,然后用酶联免疫吸附法(ELISA 法)检测 OVA 特异性 IgE 水平,全自动酶标仪测定吸光度(以 A 值表示),以各自的 A 值做统计分析。

1.3.4 培养上清中细胞因子测定

用 ELISA 法检测 PBMC 培养上清中 IFN-γ、IL-4 的浓度,步骤严格按说明书进行,试剂盘购自 DACLONE。

1.4 统计学处理

实验结果以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS 11.0 统计分析软件包。各组样本均数先进行方差齐性检验,若方差齐同,采用单因素方差分析,如果各组均数间差别有显著性,用最小显著差法(LSD 法)在分组均值之间作成对比较;若方差不齐,采用多个样本比较的秩和检验,用 Games-Howell 法作有时自由的成对比较。以 $P<0.05$ 判定有无显著性差别。

2 结 果

2.1 BALF 各细胞成分百分比

Asthma 组 EOS 百分比为(24.50±0.93)%明显高于 Control 组的(9.00±0.52)%,两组差异有显著性,而 HDM 组为(37.07±1.10)%,较 Asthma 组及 Control 组明显增高,其差异有显著性(表 1)。

表 1 BALF 中白细胞计数和分类($\bar{x}\pm s$)

实验组	n	各细胞成分百分比(%)			
		EOS	NEU	LYM	MAC
Control 组	10	9.00±0.52*	20.83±2.68	21.25±0.75	48.72±1.43
Asthma 组	10	24.50±0.93	25.50±3.03	19.75±3.34	30.25±4.83
HDM 组	10	37.07±1.10**	18.70±2.05	21.85±1.99	22.38±3.06
		q	P		
		6.90*	<0.05		
		6.01**	<0.05		

*/**:vs Asthma 组

2.2 血清 OVA 特异性 IgE 水平

Control 组、Asthma 组与 HDM 组血清 OVA 特异性 IgE 水平分别为(0.031±0.007)、(0.111±0.007)和(0.204±0.023),三组间存在统计学差异。进一步进行组间比较发现,Control 组和 Asthma 组间,HDM 组和 Asthma 组间之差异有显著性(表 2)。

2.3 PBMC 培养上清 IL-4 水平

Control 组为最低,HDM 组为最高,Asthma 组居中,差异有显著性($P<0.05$)(表 3)。

2.4 PBMC 培养上清 IFN-γ 水平

HDM 组和 Asthma 组较低,Control 组较高($P<0.05$),Control 组和 Asthma 组间比较差异有显著性($P<0.05$)(表 3)。

表 2 血清中 OVA 特异性 IgE 水平($\bar{x}\pm s$)

实验组	n	OVA 特异性 IgE(A 值)	
Control 组	10	0.031±0.007*	
Asthma 组	10	0.111±0.007	
HDM 组	10	0.204+0.023*	
		q	P
		8.33*	<0.05
		7.20*	<0.05

*vs Asthma 组

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 3 PBMC 培养上清 IL-4/IFN-γ 水平($\bar{x} \pm s$)

实验组	n	细胞因子产物(pg/ml)			
		IL-4		IFN-γ	
Control 组	10	17.20±0.06*		191.81±0.19※	
Asthma 组	10	51.34±1.56		95.44±8.39	
HDM 组	10	78.96±12.18**		93.78±2.10	
		q	p	q	p
		12.23*	<0.05	20.30※	<0.05
		7.80**	<0.05	1.90	>0.05

*/**/※vs Asthma 组

3 讨 论

1964 年 Voorhorst[1,2] 等提出螨(mites)可能是导致屋内尘土过敏的原因,此后,螨(以屋尘螨/HDM 最多见)在呼吸系统变态反应性疾病中所占的地位引起广大学者的重视,与哮喘的关系非常密切[3]。

新生儿早期接触 HDM 对小儿哮喘的发生及发展的影响还存在较多争议。一方面,Nilsson[4,5] 等学者认为新生儿早期接触 HDM 等吸入过敏原会使哮喘等变态反应性炎症加重。另一方面,Susanne[6] 等持不同的观点。但以上研究均系临床或流行病学调查,从我们的动物实验结果采看,生后早期接触 HDM 能加重以后气道变态反应性炎症,本实验 HDM 组大鼠在生后即皮下注射 HDM,制成哮喘模型后出现明显的气道炎症。

我们从免疫学角度的研究表明,发生此病变与体内高水平 IgE 有关。我们认为,当变应原进入机体后,能选择性激活 $CD4^+$ T_H2 细胞和 B 细胞,诱导产生变应原特异性 IgE 抗体应答,引起变态反应。尘螨中的半胱氨酸蛋白酶是一种与木瓜蛋白酶同源的变应原,可引起呼吸道过敏。当在出生后的早期阶段,如新生儿期接触 HDM 等变应原后,可使机体处于高敏状态,$CD4^+$ T_H2 细胞和 B 细胞分泌亢进,一旦发生哮喘,则气道炎症较未接触者严重,其血清 IgE 抗体水平明显升高。

进一步研究发现,引起这种改变的原因除了与 T_H1/T_H2 失衡有关。IL-4 在引起哮喘气道炎症中有重要作用,它能促进 T_HO 细胞分化为 $CD4^+$ T_H2 细胞,并促进 B 淋巴细胞合成 IgE,而 IgE 促进 EOS 趋化、募集,激活 EOS 并延长其寿命[7,8]。而这种 T_HO 细胞分化的能力在生后 1 天的新生鼠已经与成年鼠相同[9],但是,这种反应是偏向于 T_H2 的。Yang Lp[10] 等持相似的观点。

在我们的实验中,HDM 组大鼠其血清 IgE 水平、PBMC 产生 IL-4 水平为最高,而 IFN-γ 水平为最低。该结果可解释为:早期持续的 T_H2 偏向可提供一个能进行变应原特异性 T_H2 记忆细胞选择的机会窗,而该机会窗可能处于肺和气道生后生理构建的关键时期,被吸入变应原早期反复致敏可以令机体处于高敏状态,表现为 T_H2 细胞因子分泌亢进、T_H1 细胞因子分泌减少、血清 IgE 水平增高、气道高反应。当发生气道变态反应性炎症(如哮喘)时,体内的 T_H1/T_H2 平衡进一步紊乱,继续向 T_H2 方向发展,并进一步影响气道修复。

但是,我们的实验结果仅仅表明在 Wistar 大鼠体内的免疫反应。是否能应用到人类还不得而知,尚需要进一步研究。

参 考 文 献

[1] Voorhorst R, Elias RW, Spieksma FT. Housedust, a source of allergens and of misunderstanding[J]. Ned Tijdschr Geneeskd, 1966;110(1):46-48.

[2] Voorhorst R. Correspondence:of mites and men[J]. J Allergy, 1967;40(6):357-358.

[3] 叶世泰,张庆松. 实用变态反应学[M]. 北京:人民卫生出版社,1987 年:62-65.

[4] Nilsson L, Bjoksten B, Hattevig, et al. Season of birth as predictor of atopic manifestations[J]. Arch Dis Child, 1997;76:341-344.

[5] Warner JA, Jones AC, Miles EA, Prenatal sensitisation [J]. Pediatr Allergy Immunol, 1996;7(9 Suppl):98-101.

[6] Lau S, Illi S, Sommerfeld C, et al. Early exposure to House-dust mite and cat allergens and development of childhood asthma: a cohort study. Multicentre allergy study group [J]. Lancet, 2000;356(9239):1392-1397.

[7] Hubert M, Corrigan CJ, Kimmitt P, et al. Relationship between IL-4 and IL-5 mRNA Expression and Disease Severity in Atopic Asthma[J]. Am. J. Respir. Crit. Care Med, 1997;156(3):704-708.

[8] Barnes PJ. Th2 cytokines and asthma: an introduction [J]. Respir Res, 2001;2(2):64-65.

[9] Adkins B, Du RQ. Newborn mice develop balanced Thl/Th2 primary effector responses in vivo but are biased to Th2 secondry responses[J]. J Immunol, 1998;160(9):4217-4224.

[10] Yang LP, Byun DG, Demeure CE, et al. Default development of cloned human naive $CD4^+$ T cells into interleukin-4 and interleukin-5 producing eVector cells[J]. Eur J Immunol, 1995;25:3517-3520.