

大鼠分泌性中耳炎中耳 Th2/Th1 细胞失衡模式的研究

刘华 赵守琴 佟静 宋扬 范尔钟 王阳 高占梅

【摘要】 目的 探讨大鼠分泌性中耳炎中耳微环境中的 Th2/Th1 细胞失衡模式。方法 选用 SD 大鼠 20 只,随机分为实验组和对照组,每组各 10 只(20 耳)。实验组以卵清蛋白腹腔致敏后耳内激发制成分泌性中耳炎(OME)模型,对照组以 PBS 替代卵清蛋白。耳内激发后 2 d 处死动物,采用 HE 染色切片观察各组中耳黏膜病理变化及炎症细胞的改变,采用 ELISA 法测定各组大鼠中耳腔灌洗液中 Th2 型细胞因子白介素 4(IL-4)和 Th1 型细胞因子干扰素 γ (IFN- γ)的含量,免疫组化染色检测中耳黏膜和骨髓腔中 IL-4、IFN- γ 的表达。结果 实验组与对照组比较中耳灌洗液中 IL-4 含量、Th2/Th1 (IL-4/IFN- γ) 比值以及中耳黏膜和骨髓腔中 IL-4 表达、Th2/Th1 (IL-4/IFN- γ) 比值均出现一致性增高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);而中耳微环境中 IFN- γ 含量组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 在变应原刺激下 OME 大鼠中耳微环境中 IL-4 合成显著增高,而 IFN- γ 相对减少,Th2/Th1 比值增高,存在以 Th2 亢进为特征的 Th2/Th1 细胞失衡反应,中耳微环境的 Th2/Th1 细胞失衡模式是分泌性中耳炎重要的免疫学发病机制之一。

【关键词】 中耳炎,伴渗出液; 免疫反应,黏膜; T 淋巴细胞,辅助诱导; 干细胞因子

A study of Th2/Th1 imbalance in the rat model of otitis media with effusion LIU Hua, ZHAO Shou-qin, TONG Jing, SONG Yang, FAN Er-zhong, WANG Yang, GAO Zhan-mei. Department of Otolaryngology, Affiliated Tangshan Worker's Hospital of Hebei Medical University, Tangshan 063000, China
Corresponding author: ZHAO Shou-qin, Email: zhao_sq@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate the shift of Th2/Th1 type cytokine profile in middle ear of rat model of otitis media with effusion (OME). **Methods** Twenty SD rats were randomly divided into OME (Exp group) and control group (Con group), OME was induced by intraperitoneal injection of OVA and later challenging in tympanic bullae. The expression of IFN- γ and IL-4 were observed by immunohistochemistry in temporal bone marrow cavity and middle ear mucosa. The level of IFN- γ and IL-4 in tympanic lavage fluid (TLF) were determined by ELISA. **Results** Pathological examination showed that middle ear mucosa inflammation and eosinophil infiltration in Exp group were obviously severe than Con group. As compared to the Con group, the level of IL-4 and the ratio of Th2/Th1 (IL-4/IFN- γ) significantly increased ($P < 0.05$) in TLF, temporal bone marrow cavity and middle ear mucosa of Exp group, however, no significant difference in IFN- γ levels was found ($P > 0.05$) between Exp and Con group. **Conclusions** Th2-cytokine profile predominates in the middle ear microenvironment of allergic OME rat model. Th1/Th2 imbalance is involved in the pathogenesis of OME.

【Key words】 Otitis media, with effusion; Immuneresponse, mucosa; T lymphocytes, help inducer; Cytokines

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2011.24.021

基金项目: 国家自然科学基金(81070777)

作者单位: 063000 河北省,河北医科大学附属唐山市工人医院耳鼻喉科(刘华、宋扬、高占梅),口腔科(佟静);首都医科大学附属北京同仁医院耳鼻咽喉头颈外科(赵守琴),中心实验室(王阳);北京市耳鼻咽喉科研究所基础部(范尔钟)

通讯作者: 赵守琴, Email: zhao_sq@yahoo.com.cn

分泌性中耳炎(otitis media with effusion, OME)的发病机理至今尚未完全阐明,目前研究认为免疫因素在 OME 的发生发展中起重要作用,但对免疫反应的作用方式和调控机制并不清楚^[1]。研究发现在不同刺激因素作用下 T 辅助细胞(T helper cells, Th)可发生极化反应,所产生两类功能不同的效应细胞(Th1 和 Th2 细胞)在疾病的发生发展过程中发挥至关重要的作用^[2]。本研究通过免疫组化(immunohistochemistry, IHC)和酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测 Th2 型细胞因子白介素 4(interleukin-4, IL-4)和 Th1 型细胞因子干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)在大鼠 OME 中耳局部的表达,分析 Th2/Th1 比例变化,探讨 Th2/Th1 细胞失衡模式在 OME 发病机理中的作用。

材料与方 法

1. 实验动物:体重 250~300 g,雄性 Sprague-Dawley 大鼠 20 只(SPF 级,北京维通利华实验动物技术有限公司)。随机分实验组和对照组,每组 10 只(20 耳)(麻醉意外死亡实验组 2 只、对照组 1 只)。全部动物经耳窥镜检查证实无外耳道及中耳感染。

2. 造模方法:实验组参考 Hardy SM 造模方法^[3],采用 1.2 mg 卵清蛋白(ovalbumin, OVA, V 级, Sigma, 美国)溶于 0.6 ml 磷酸缓冲液(PBS),再以 5.14 mg 氢氧化铝(购自北京化学试剂公司)溶于 0.6 ml PBS 作为免疫佐剂行腹腔注射,第 8 天重复注射一次,此为全身致敏阶段;第 15 天用 10% 水合氯醛 15 mg/kg 行腹腔注射麻醉,在手术显微镜下经鼓膜以微量进样器将 0.1 mg OVA 溶于 35 μ l PBS 后注入大鼠中耳腔,第 16 天再次麻醉,以耳内镜观察鼓膜情况,并重复第 2 次注射,此为耳内激发阶段,制成 OME 模型。对照组全身致敏阶段以 5.14 mg 氢氧化铝溶于 1.2 ml PBS 腹腔注射,耳内激发时用 PBS 替代 OVA。第 18 天处死动物,取出双侧中耳,以 50 μ l PBS 灌洗中耳腔 3 次并收集灌洗液 150 μ l,4 $^{\circ}$ C 4000 g 离心 10 min 后取上清液冻存于 -80 $^{\circ}$ C 待测细胞因子。双侧中耳组织标本用 4% 的多聚甲醛固定,10% EDTA 溶液脱钙,经脱水后,石蜡包埋切片,常规 HE 染色光镜下观察中耳及咽鼓管的病理变化,计数嗜酸粒细胞,甲苯胺蓝染色计数肥大细胞,免疫组化染色检测中耳黏膜及骨髓腔中 IL-4、IFN- γ 的表达。

3. 中耳灌洗液中细胞因子含量测定:以 ELISA 试剂盒(购自晶美生物工程有限公司)检测中耳渗液中 IFN- γ 、IL-4 浓度。先以试剂盒所示的标准品原始浓度绘制标准曲线,然后在酶标仪 450 nm 波长下测得各标本的吸光度值,与标准曲线相比得到对应浓度,即得出实际浓度。计算平均浓度时包括低于最低标准浓度的数值(IL-4 7 pg/ml; IFN- γ 15 pg/ml)。

4. 免疫组化:采用 ABC 法检测中耳黏膜及骨髓腔中 IL-4、IFN- γ 的表达情况。具体操作如下:常规脱蜡;置于 PBS(0.01 mmol/L, pH 7.0)中煮沸 6 min 抗原修复;加入 3% H₂O₂ 中浸泡 10 min, PBS 冲洗 3 次;滴加 10% 山羊血清封闭非特异性抗原,室温 20 min;加入适量兔抗大鼠 IL-4 或 IFN- γ 多克隆抗体(武汉博士德公司,中国),IL-4、IFN- γ 稀释度均为 1:50,4 $^{\circ}$ C 过夜;PBS 冲洗 3 次,滴加抗兔生物素化二抗工作液,37 $^{\circ}$ C 孵育 40 min, PBS 冲洗 3 次;滴加辣根过氧化物酶标记链霉卵白素工作液,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, PBS 冲洗 3 min;DAB 显色,苏木素复染,梯度脱水,中性树脂封片。阴性对照以 PBS 替代第一抗体。

5. 细胞计数方法:炎症细胞计数:目镜上配计数格,在低倍镜下于中耳黏膜上皮固有层、骨髓腔选取 5 个阳性细胞多的视野,在高倍镜下计数细胞,取每高倍镜视野下的均数;IL-4、IFN- γ 的阳性细胞计数:目镜上配计数格,以胞质和(或)胞核棕色颗粒状染色为阳性细胞,自听泡鼓室段起始处切片,厚度为 3~4 μ m,出现管腔状结构后,连续切片选取第 9、10 张。低倍镜下于中耳黏膜上皮固有层及骨髓腔选取 5 个阳性细胞多的视野(黏膜 1 个视野,骨髓腔 4 个视野),高倍镜下计数细胞,计算阳性细胞比率:

阳性细胞比率 = 胞质和(或)胞核染色阳性细胞数/计数格内细胞总数 \times 100%。

6. 统计学分析:采用 SPSS 11.5 统计软件包,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验,均以 $P < 0.05$ (双侧检验)为差异有统计学意义。

结 果

1. 造模结果:所有大鼠在行耳内注射后每天进行耳镜检查。实验组在 24 h 后,鼓膜及周围组织出现充

血,鼓膜有不同程度的放射状扩张的血管,48 h 后出现明显内陷、充血,部分可见液平面及中耳内气泡形成。对照组基本正常,少量放射状血管纹。

实验组 8 只(16 耳)、对照组 9 只(18 耳)成功获取中耳及咽鼓管鼓室段标本。病理观察实验组咽鼓管鼓室段纤毛上皮肿胀,纤毛排列紊乱,部分纤毛脱落,中耳黏膜明显增厚,毛细血管增多、扩张,中耳黏膜下层、骨髓腔中有较多嗜酸粒细胞、淋巴细胞、中性粒细胞(图 1,2),此外咽鼓管周围组织中肥大细胞增多、脱颗粒。实验组中耳黏膜或骨髓腔中嗜酸粒细胞数以及咽鼓管周围组织肥大细胞数显著多于对照组($P < 0.05$),中性粒细胞数量稍高于对照组($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 中耳黏膜或骨髓腔中嗜酸性粒细胞计数、咽鼓管周围组织肥大细胞计数(个, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠耳数	嗜酸性粒细胞	肥大细胞	中性粒细胞
实验组	16	1.925 ± 0.484	2.350 ± 0.459	2.293 ± 0.458
对照组	18	1.350 ± 0.329	1.500 ± 0.354	2.008 ± 0.578
<i>t</i> 值		-4.091	-6.125	-0.1584
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01	0.123

2. 中耳灌洗液中 IFN- γ 、IL-4 水平变化:实验组 8 只(16 耳)、对照组 9 只(18 耳)成功收集中耳灌洗液,实验组中耳灌洗液中 IL-4 含量及 IL-4/IFN- γ 比值明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。IFN- γ 含量实验组与对照组比较稍有减低,但组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 IFN- γ 、IL-4 中耳灌洗液中含量及中耳黏膜组织及骨髓腔中的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠耳数	中耳灌洗液			中耳黏膜组织及骨髓腔		
		IL-4 (pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)	IL-4/IFN- γ	IL-4 阳性细胞(%)	IFN- γ 阳性细胞(%)	IL-4 阳性细胞百分比/ IFN- γ 阳性细胞百分比
实验组	16	13.076 ± 6.029	107.392 ± 54.804	0.139 ± 0.077	0.338 ± 0.119	0.253 ± 0.056	1.357 ± 0.498
对照组	18	8.312 ± 3.753	132.560 ± 94.198	0.087 ± 0.052	0.220 ± 0.080	0.242 ± 0.092	0.979 ± 0.389
<i>t</i> 值		-2.8	0.965	-2.328	-3.118	-0.351	-2.179
<i>P</i> 值		0.009	0.343	0.026	0.004	0.729	0.041

3. 中耳黏膜组织及骨髓腔中 IL-4 和 IFN- γ 的表达:实验组 IL-4 阳性细胞呈多样性,可见淋巴细胞、嗜酸粒细胞等多种细胞胞质中均有表达,胞质染色呈强阳性(深棕黄色颗粒状)(图 3),多分布于中耳黏膜上皮下层、骨髓腔及中耳腔渗液中。而对照组呈弱阳性(浅棕黄色)(图 4)。实验组 IL-4 阳性细胞比例明显增多差异有统计学意义($P < 0.05$)。在大鼠中耳黏膜上皮下层、骨髓腔及中耳腔渗液中淋巴细胞、中性粒细胞、上皮细胞等多种细胞胞质中均有 IFN- γ 表达(图 5,6),实验组 IFN- γ 阳性细胞比例稍高于对照组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。实验组 Th2/Th1 (IL-4/IFN- γ) 比值明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

讨 论

随着免疫学的研究进展,发现 Th 在免疫应答反应中起核心作用,提出“Th2/Th1 平衡假说”。机体对于抗原刺激的反应是通过免疫细胞及其产物相互作用形成的网络调节系统来实现的,在不同抗原的诱导下 Th 可发生极化反应,产生两类功能不同的效应细胞(Th1 和 Th2 细胞)介导不同的免疫反应,并相互作用、相互调控。Th1 细胞分泌细胞因子(IL-2、IFN- γ)参与自身免疫疾病和慢性感染性疾病。Th2 细胞分泌细胞因子(IL-4、IL-5、IL-9、IL-13)发挥控制和放大变应性炎症反应的作用。正常机体 Th2/Th1 细胞及其分泌的细胞因子处于动态平衡状态,这种平衡对维持机体的免疫自稳起重要作用。现已证明,Th2/Th1 平衡失衡,Th2 活化亢进是变应性鼻炎发病的重要基础^[4]。目前研究认为中耳的黏膜系统作为上呼吸道的衍化,具有与鼻

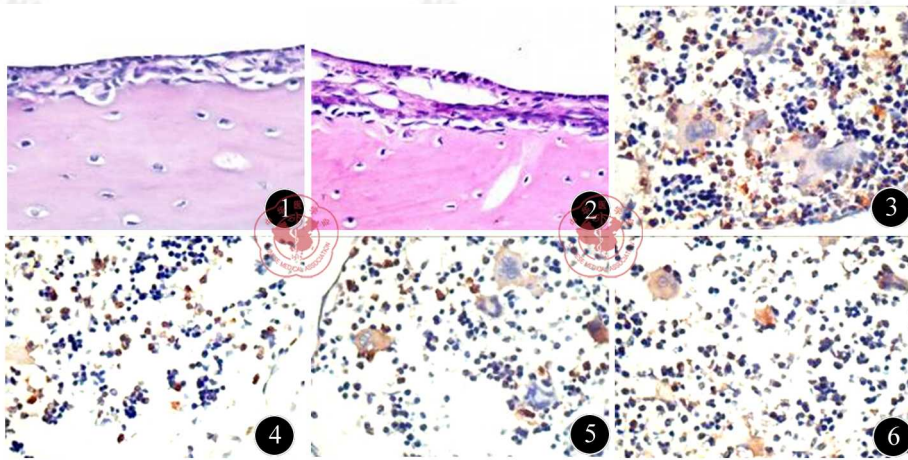


图1 对照组中耳黏膜(HE ×1000) 图2 实验组中耳黏膜明显增厚, 毛细血管增多、扩张, 中耳黏膜下层炎性细胞浸润(HE ×1000) 图3 OME组中耳骨髓腔内IL-4表达(IHC ×400) 图4 对照组中耳骨髓腔内IL-4表达(IHC ×400) 图5 OME组中耳骨髓腔内IFN- γ 表达(IHC ×400) 图6 对照组中耳骨髓腔内IFN- γ 表达(IHC ×400)

黏膜相似的免疫功能,在病理因素作用下可出现各种免疫细胞增殖及迁徙现象,参与免疫应答反应^[5-6]。我们成功建立了变应原诱发大鼠分泌性中耳炎模型,并证实其中耳黏膜及骨髓腔中 Th2 型细胞因子 IL-4、IL-5 表达明显上调,Th 参与分泌性中耳炎的发病过程。分泌性中耳炎的免疫应答中是否也像变应性鼻炎一样,在中耳局部存在 Th2/Th1 免疫应答模式?

本研究发现耳内激发 48 h 后实验组动物中耳黏膜明显增厚,毛细血管增多、扩张,纤毛上皮损伤,部分纤毛脱落,中耳黏膜下层、骨髓腔中有较多嗜酸粒细胞、淋巴细胞、中性粒细胞浸润,上述现象符合 OME 组织病理学特征,与我们此前的研究结果一致,再次证实动物模型可靠^[7]。

文献中一般以合成 IL-4 的细胞代表 Th2 细胞,以分泌 IFN- γ 的细胞代表 Th1 细胞,并以 IL-4/IFN- γ 比值来说明 Th2/Th1 细胞失衡。IL-4 由活化 T 细胞、肥大细胞产生,是 Th2 细胞转化的核心因素,研究发现 IL-4 能与 Th0 细胞表面 IL-4 受体结合,由转录因子 STAT6、IRF4 和 GATA3 介导传递信号,促进 Th2 细胞分化,增强 IL-4、IL-5 表达,降低 IFN- γ 表达^[8-9]。本研究发现 OME 组大鼠中耳渗液、中耳黏膜及骨髓腔中 Th2 型细胞因子 IL-4 水平较对照组呈同步性升高,这一结果与既往研究^[10-11]发现 OME 患者中耳渗液和黏膜中 Th2 型细胞因子(IL-4、IL-5)及其 mRNA 表达水平显著增高的现象一致。提示中耳微环境中存在以 IL-4 分泌异常增高为特征的 Th2 反应。

研究认为 NK 细胞产生的 IFN- γ 为 Th1 型细胞因子,其与 Th0 细胞表面特异性受体结合后,通过转录因子 STAT1、IRF1 和 T-bet 介导传递信号,促进 Th1 细胞分化,增加 IL-12 分泌,IL-12 通过转录因子 STAT4 传导信号,进一步上调 IFN- γ 表达,抑制 Th2 反应^[12]。本研究发现 Th1 型细胞因子 IFN- γ 在 OME 组大鼠中耳黏膜、骨髓腔中表达上调,与对照组比较差异无统计学意义,与孙荣等^[13]研究结果相似。但 OME 组大鼠中耳渗液中 IFN- γ 含量稍低于对照组,可能与细胞因子分泌的变异范围大、数据分布离散以及样本数较少有关。实验组与对照组比较,中耳黏膜、骨髓腔和中耳腔灌洗液中 Th2/Th1 (IL-4/IFN- γ) 比值呈现一致性增高,差异均有统计学意义。

以上研究结果表明中耳黏膜系统作为上呼吸道黏膜的延续,具有免疫活性,在变应原的作用下中耳局部微环境中 T 细胞激活,通过转录因子启动程序性的反应增强 IL-4 基因转录活性,促进中耳微环境中 IL-4 的大量分泌,同时抑制 IFN- γ 的生成,进而形成大鼠中耳微环境发生 Th2 免疫偏极化反应,提示 Th2/Th1 在 OME 的发病过程中起着相当重要的作用。机体免疫反应是连续的程序化过程,探讨 OME 发病机制应注意到不同阶段 Th2/Th1 的不同变化,OME 中耳微环境中 Th2/Th1 随时间变化的机制尚不明确,值得进行深入研究。

参 考 文 献

- [1] Doyle WJ. The link between allergic rhinitis and otitis media. *Curr Opin Allergy. Clin Immunol*, 2002, 2; 21-25.
- [2] Crammer LC, Greenberg PA//顾瑞金. 帕特森变态反应性疾病. 北京:人民卫生出版社, 2004; 50-52.
- [3] Hardy SM, Heavner SB, White DR, et al. The role of late-phase allergy in the development of eustachian tube dysfunction. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2001, 125; 339-345.
- [4] 张罗, 周兵, 韩德民, 等. 变应性鼻炎研究进展-发病机制. *中国耳鼻咽喉-头颈外科杂志*, 2003, 10; 316-320.
- [5] Nguyen LH, Manoukian JJ, Sobol SE, et al. Similar allergic inflammation in the middle ear and the upper airway: evidence linking otitis media with effusion to the united airways concept. *J Allergy Clin Immunol*, 2004, 114; 1110-1115.
- [6] Nguyen LH, Manoukian JJ, Tewfik TL, et al. Evidence of allergic inflammation in the middle ear and nasopharynx in atopic children with otitis media with effusion. *J Otolaryngol*, 2004, 33; 345-351.
- [7] 刘华, 赵守琴, 刘泊, 等. 变应原诱发大鼠分泌性中耳炎动物模型的建立. *听力学及言语疾病杂志*, 2008, 16; 304-307.
- [8] Lohoff M, Mak TW. Role of interferon regulatory factors in T helper cell differentiation. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5; 125-135.
- [9] Mendoza L. A network model for the control of the differentiation process in Th cells. *Biosystems*, 2006, 84; 101-114.
- [10] Sobol SE, Taha R, Schloss MD, et al. T(H)2 cytokine expression in atopic children with otitis media with effusion. *J Allergy Clin Immunol*, 2002, 110; 125-130.
- [11] Wright ED, Hurst D, Miotto D, et al. Increased expression of major basic protein (MBP) and interleukin-5 (IL-5) in middle ear biopsy specimens from atopic patients with persistent otitis media with effusion. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2000, 123; 533-538.
- [12] Agnello D, Lankford CS, Bream J, et al. Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insight. *J Clin Immunol*, 2003, 23; 147-161.
- [13] 孙荣, 洪苏玲, 唐新业. 变应反应性中耳炎动物模型的建立及 I 型变应反应与分泌性中耳炎关系的探讨. *临床耳鼻咽喉科杂志*, 2005, 19; 170-172.

(收稿日期: 2011-07-27)

(本文编辑: 梁雷)

刘华, 赵守琴, 佟静, 等. 大鼠分泌性中耳炎中耳 Th2/Th1 细胞失衡模式的研究 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2011, 5(24): 7282-7286.