

· 论 著 ·

重组粉尘螨Ⅱ类变应原致敏小鼠肺部 变应性炎症模型的建立

周书林, 常维佳, 姜玉新, 陈文魁

皖南医学院医学寄生虫学教研室, 安徽 芜湖 241002

摘要: **目的** 探讨以重组粉尘螨Ⅱ类变应原(rDer f 2)建立小鼠肺部变应性炎症模型的方法。**方法** 将30只6~8周龄雌性SPF级BALB/c小鼠,随机分为PBS组(阴性对照组)、卵清蛋白(OVA)组(阳性对照组)和rDer f 2组(实验组)。实验组分别于第0、7、14天用rDer f 2对小鼠腹腔进行注射致敏;再于第21天开始,连续7d进行雾化激发;对照组分别用PBS和OVA代替。最后一次雾化激发后24h内处死动物,观察肺组织病理变化、支气管肺泡灌洗液(BLAF)中的白细胞计数及分类,用ELISA测定BLAF和脾细胞培养上清中白细胞介素2(IL-2)、IL-4、IL-17和IFN- γ 的含量及血清中IgG1、IgE抗体水平变化。**结果** 实验组和阳性对照组BALB/c小鼠肺组织呈现明显的炎症性病理改变;rDer f 2组的BALF中白细胞总数 $[(17.39 \pm 1.03) \times 10^6/L]$ 及嗜酸性粒细胞(EOS) $[(1.61 \pm 0.03) \times 10^6/L]$ 计数,均明显高于PBS组($P < 0.01$);BALF中IL-4 $[(78.92 \pm 9.06) \text{ pg/ml}]$ 、IL-17 $[(201.63 \pm 31.26) \text{ pg/ml}]$ 与PBS组比较呈明显的高水平表达($P < 0.01$);而IL-2 $[(8.29 \pm 1.27) \text{ pg/ml}]$ 和IFN- γ $[(51.04 \pm 15.85) \text{ pg/ml}]$ 的含量则显著下降($P < 0.01$);上述指标在脾细胞培养上清中出现类似的变化。rDer f 2组血清中IgE $[(37.63 \pm 6.57) \text{ IU/ml}]$ 、IgG1 $[(16.68 \pm 2.90) \mu\text{g/ml}]$ 的含量表现为Th2型反应增强趋势;但OVA组和rDer f 2组间所有指标差异均无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 用rDer f 2腹腔注射致敏后再雾化激发的方式能够成功构建小鼠肺部变应性炎症模型。

关键词: 粉尘螨; 重组粉尘螨Ⅱ类变应原; 致敏; 哮喘模型

中图分类号: R384.8 文献标志码: A 文章编号: 1003-4692(2012)03-0221-04

The model of pulmonary allergic inflammation in mice established with recombinant group 2 allergen of *Dermatophagoides farinae*

ZHOU Shu-lin, CHANG Wei-jia, JIANG Yu-xin, CHEN Wen-kui

Department of Medical Parasitology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui Province, China

Supported by the Anhui Provincial Natural Science Fund (No. 11040606M214) and Natural Science Fund of Anhui Provincial Education Department (No. kj2009B152)

Abstract: Objective To establish a model of pulmonary allergic inflammation with BALB/c mice. **Methods** BALB/c mice were divided into PBS group, OVA group and recombinant Der f 2 protein (rDer f 2) group. The mice in the test group were sensitized by intraperitoneal injection of rDer f 2 at day 0, 7 and 14, and exposed to aerosolized allergen for 7 consecutive days starting from the 21 days. PBS or OVA instead of rDer f 2 was used in the control groups. All mice were executed within 24 h after the final exposure to aerosolized allergen. Pathological changes of the lung, cell counts and classification were studied with IL-2, IL-4, IL-17 and IFN- γ levels in BALF detected by ELISA. Cells from spleen were cultured for 72 h, with IL-2, IL-4, IL-17 and IFN- γ in supernatant, and allergen-specific IgG1 and IgE in serum detected by ELISA. **Results** In the OVA and rDer f 2 groups, the total number of white blood cells $[(17.39 \pm 1.03) \times 10^6/L]$ and eosinophils $[(1.61 \pm 0.03) \times 10^6/L]$ in BALF were significantly higher in OVA and rDer f 2 groups than those in PBS group ($P < 0.01$). The levels of IL-4 $[(78.92 \pm 9.06) \text{ pg/ml}]$ and IL-17 $[(201.63 \pm 31.26) \text{ pg/ml}]$ in BALF from OVA and rDer f 2 groups were significantly increased ($P < 0.01$), compared with those in PBS group. On the contrary, levels of IL-2 $[(8.29 \pm 1.27) \text{ pg/ml}]$ and IFN- γ $[(51.04 \pm 15.85) \text{ pg/ml}]$ in BALF were reduced significantly ($P < 0.01$). The similar trends were also detected in terms of the above cytokines in the supernatants of spleen cell cultures. Moreover, the levels of IgE $[(37.63 \pm 6.57) \text{ IU/ml}]$, IgG1 $[(16.68 \pm 2.90) \mu\text{g/ml}]$ in OVA and rDer f 2 groups were also significantly increased in serum than those in PBS group ($P < 0.01$). The phenomenon indicated that Th2-type immune response was enhanced and Th1-type immune response was reduced, with no statistically significant difference between OVA and rDer f 2 groups ($P > 0.05$) observed. **Conclusion** A pulmonary allergic inflammation model of BALB/c mice can be established successfully by intraperitoneal injection followed by aerosolization with rDer f 2 protein.

Key words: *Dermatophagoides farinae*; Recombinant group 2 allergen; Allergy; Animal model of asthma

基金项目: 安徽省自然科学基金(11040606M214); 安徽省教育厅自然科学基金项目(kj2009B152)

作者简介: 周书林(1963-), 男, 硕士, 副教授, 从事媒介生物防治研究。Email: zhouslokk@yahoo.com.cn

支气管哮喘(哮喘)是由气道内多种炎症细胞及其细胞组分参与的气道慢性炎症性疾病。目前全球哮喘患者约3亿,患病率达1%~18%,不仅严重影响个人健康,也日益成为严重的公共卫生问题之一^[1]。现有的研究资料证明,尘螨变应原是导致哮喘的最主要病因^[2],其中粉尘螨(*Dermatophagoides farinae*)Ⅱ类变应原(Der f 2)可与约80%的尘螨过敏性疾病患者的血清螨特异性IgE相结合^[3],被认为是诱导哮喘与变态反应性疾病的最重要变应原之一。目前体外实验及皮肤实验的结果显示,大部分重组变应原具有与天然变应原组分相似的IgE结合能力^[4],同时重组变应原具有产量高、生产条件恒定和易于纯化的优势。近年来的文献资料显示,自Cates等^[5]在无免疫佐剂参与致敏的情况下,用屋尘螨(*D. pteronyssinus*)蛋白成功构建小鼠气道炎症模型之后,后续研究者亦多使用屋尘螨变应原^[6-7]。本研究用重组粉尘螨Ⅱ类变应原(rDer f 2)致敏和激发BALB/c小鼠,构建小鼠肺部变态反应性炎症模型,检测相关指标,为后续进行螨性过敏性哮喘防治的疫苗研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物 6~8周龄雌性SPF级BALB/c小鼠30只,体质量(20±2)g,购于扬州大学比较医学中心。

1.2 主要试剂及仪器 rDer f 2为本实验室制备;RMPI-1640培养液(杭州吉诺生物医药技术有限公司);小鼠IgE、IgG1、白细胞介素2(IL-2)、IL-4、IL-17、IFN- γ ELISA检测试剂盒(上海今迈生物科技有限公司);鸡卵清蛋白(OVA)(美国Sigma公司);其他均为国产分析纯。CO₂恒温培养箱(日本三洋公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物分组 30只BALB/c小鼠随机分为3组,即PBS组(阴性对照组)、OVA组(阳性对照组)和rDer f 2组(实验组),每组10只。

1.3.2 小鼠致敏模型的建立 rDer f 2组小鼠每只腹腔注射200 μ l致敏液[含rDer f 2 10 μ g, Al(OH)₃ 4 mg,溶于PBS, pH 7.2];OVA组小鼠每只腹腔注射200 μ l致敏液[含OVA 10 μ g, Al(OH)₃ 4 mg,溶于PBS, pH 7.2];PBS组则以PBS代替致敏液注射,注射部位及剂量与上述两组相同。注射时间分别在第0、7、14天。第21天起,将rDer f 2组小鼠置于自制小鼠雾化吸入箱中,由402AI超声雾化器提供动力,以10 μ g/ml rDer f 2蛋白溶液(以PBS稀释)雾化吸入激发,每天雾化30 min,连续雾化7 d,观察并记录小鼠哮喘发作情况;OVA组用1%(M/V)OVA(以PBS稀释)进行雾化吸入激发;PBS组给予PBS液雾化吸入。

1.3.3 血清和脾细胞悬液制备及特异性细胞因子检测 各组小鼠分别取4只,最后一次雾化吸入激发后24 h眼球取血,自然凝血,留取血清,-80℃保存,用ELISA法检测小鼠血清中特异性IgG1和IgE的含量。取血后将小鼠脱臼处死。按文献[8]制成脾细胞悬液,台盼蓝染色,活细胞>98%者可供实验使用。调整细胞密度为1×10⁶/L。取调整好的脾细胞悬液1 ml加入到无菌平底24孔细胞培养板中,OVA组、rDer f 2组各孔分别加入相应的抗原(OVA/rDer f 2)溶液至终浓度为25 μ g/ml。CO₂恒温培养箱(37℃, 5% CO₂)培养72 h,收集上清,ELISA法检测脾细胞上清中抗原特异性细胞因子IL-2、IL-4、IL-17和IFN- γ 的含量。

1.3.4 支气管肺泡灌洗液(BALF)制备及细胞因子检测 分别将各组小鼠(6只)腹腔注射10%水合氯醛0.2~0.3 ml麻醉,切开气管,插管、固定,注入1 ml无菌预冷的PBS进行支气管肺泡灌洗,按0.4、0.3、0.3 ml灌洗3次,回收BALF,回收率>90%。2000 r/min离心5 min(离心半径8.5 cm),收集细胞沉淀,用1 ml PBS重悬并对其进行白细胞及嗜酸性粒细胞计数。同时上清液-80℃冻存,ELISA法检测BALF特异性细胞因子IL-4、IL-2、IL-17和IFN- γ 。

1.3.5 肺组织切片HE染色 取出其肺组织浸于10%甲醛溶液固定,石蜡包埋,常规切片,HE染色,光学显微镜观察并拍照记录。

1.4 统计学处理 实验结果用SPSS 16.0软件进行单因素方差分析,各组数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠症状和体征的改变 OVA组、rDer f 2组小鼠在第21天(激发第1天)雾化吸入约10~15 min后,出现不同程度的喘息、呼吸加深加快、烦躁不安等现象;在以后的激发过程中,出现不同程度的喘息及其他哮喘症状,且症状每次开始出现的时间逐渐提前。停止雾化后小鼠主要的哮喘症状消失,但仍有喘息,数分钟之后恢复正常。PBS组小鼠在雾化激发阶段仅出现轻微烦躁和抓耳挠腮症状,未见明显哮喘症状。

2.2 ELISA法测定血清中特异性抗体含量 调查结果显示,3组间IgG($F=8.284, P=0.009$)、IgE($F=68.135, P=0.000$)差异有统计学意义,其中OVA、rDer f 2组无差别,但均高于PBS组(图1)。说明rDer f 2蛋白能够明显诱导哮喘小鼠血清中IgG1和IgE的产生。

2.3 脾细胞抗原特异性细胞因子的含量变化 由表1可见,3组间IL-4($F=4.717, P=0.040$)、IFN- γ ($F=8.567, P=0.008$)和IL-2($F=194.184, P=0.000$)差异

均有统计学意义,其中OVA、rDer f 2组无差别,但均高于PBS组。3组间IL-17差异无统计学意义($F=2.795, P=0.114$)。基本表明rDer f 2蛋白能刺激小鼠脾细胞表现以Th2为主的过敏反应。

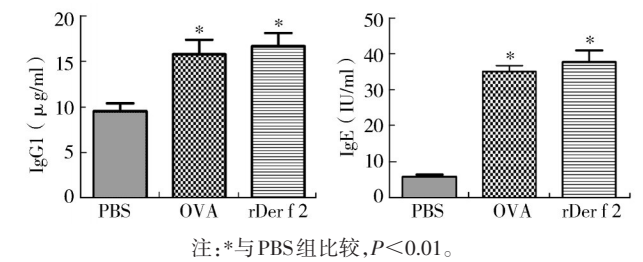


图1 血清中各组IgG1、IgE抗体水平变化
Fig. 1 Changes of IgG1, IgE in the serum in the individual groups

表1 小鼠脾细胞培养上清IL-4、IL-17、IL-2和IFN-γ的变化
($\bar{x} \pm s$, pg/ml, $n=4$)

Table 1 Change in IL-4, IL-17, IL-2 and IFN-γ in the supernatants of cultured splenocytes ($\bar{x} \pm s$, pg/ml, $n=4$)				
组别	IL-4	IL-17	IFN-γ	IL-2
PBS	21.67 ± 4.48	9.13 ± 3.33	269.40 ± 12.85	85.46 ± 6.90
OVA	26.04 ± 2.73 ^a	12.94 ± 1.90	248.80 ± 17.89 ^a	43.64 ± 9.27 ^a
rDer f 2	29.01 ± 2.50 ^a	13.39 ± 2.99	226.70 ± 12.34 ^a	35.30 ± 6.82 ^a

注:a. 与PBS组比较, $P<0.05$ 。

2.4 BALF细胞计数 BALF炎症细胞计数显示, 3组间白细胞总数($F=123.103, P=0.000$)、嗜酸性粒细胞计数($F=741.105, P=0.000$)差异均有统计学意义, 其中OVA、rDer f 2组无差别, 但均高于PBS组(表2)。该结果表明, rDer f 2蛋白可诱导BALB/c小鼠肺部产生炎症反应, 导致肺组织炎性细胞浸润, 而致BALF中细胞总数、嗜酸性粒细胞增多等与哮喘一致的症状。

2.5 BALF特异性细胞因子含量 ELISA法检测BALF中抗原特异性IL-4、IL-2、IL-17和IFN-γ的变化, 结果显示, 3组间IL-4($F=657.755, P=0.000$)、IL-17($F=$

189.156, $P=0.000$)、IFN-γ($F=105.578, P=0.000$)和IL-2($F=144.479, P=0.000$)差异均有统计学意义, 其中OVA、rDer f 2组无差别, 但均高于PBS组(表3)。该结果亦表明rDer f 2蛋白致敏和激发BALB/c小鼠可诱导其肺部细胞因子呈Th2型反应。

表2 BALF中炎症细胞数的变化($\times 10^6/L$)
Table 2 Change in inflammatory cells in the BALF ($\times 10^6/L$)

组别	白细胞总数	嗜酸性粒细胞计数
PBS	3.96 ± 0.11	0.14 ± 0.06
OVA	19.59 ± 2.43 ^a	1.72 ± 0.09 ^a
rDer f 2	17.39 ± 1.03 ^a	1.61 ± 0.03 ^a

注:a. 与PBS组比较, $P<0.01$ 。

表3 小鼠BALF中IL-4、IL-17、IL-2和IFN-γ的变化
($\bar{x} \pm s$, pg/ml, $n=6$)

Table 3 Change in IL-4, IL-17, IL-2 and IFN-γ in the BALF ($\bar{x} \pm s$, pg/ml, $n=6$)				
组别	IL-4	IL-17	IL-2	IFN-γ
PBS	17.18 ± 5.26	106.63 ± 21.76	16.82 ± 1.39	93.31 ± 11.16
OVA	84.29 ± 9.03 ^a	209.13 ± 37.99 ^a	9.42 ± 2.01 ^a	43.31 ± 12.53 ^a
rDer f 2	78.92 ± 9.06 ^a	201.63 ± 31.26 ^a	8.29 ± 1.27 ^a	51.04 ± 15.85 ^a

注:a. 与PBS组比较, $P<0.01$ 。

2.6 肺组织切片HE染色 实验小鼠肺组织切片经HE染色后可见, OVA组和rDer f 2组小鼠支气管、血管黏膜下及周围肺组织有明显的炎性细胞浸润(以嗜酸性粒细胞、淋巴细胞及巨噬细胞为主)(图2A, 箭头所示), 大量炎症细胞向小支气管及血管迁移, 肺间质及肺泡内也可见炎性细胞浸润(图2B, 箭头所示), 支气管上皮细胞部分断裂及脱落, 血管壁水肿明显, 支气管壁轻度增厚, 偶见纤维化增生, 部分可见黏液栓。而PBS组小鼠肺组织切片无明显病理改变, 各级支气管及肺泡结构规则也完整, 小支气管及血管周围无明显炎性细胞浸润, 支气管管壁黏膜完整无断裂及脱落。

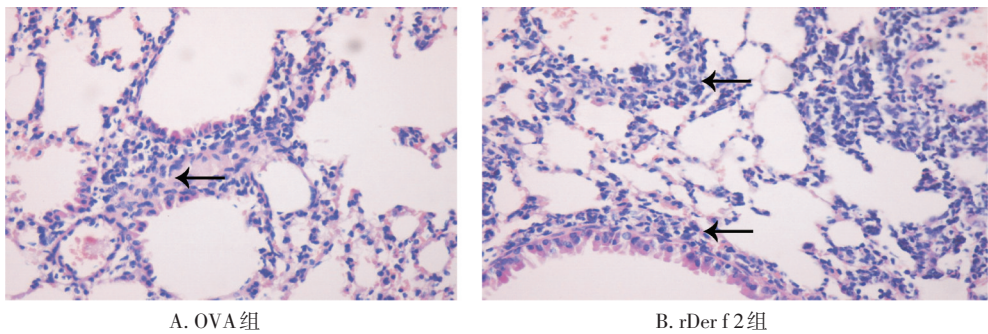


图2 肺组织病理切片结果(HE染色, $\times 400$)
Fig. 2 Pathological changes of lung tissue in the groups (HE staining, $\times 400$)

3 讨论

目前, 用于实验研究的哮喘动物模型大部分是应用OVA构建的^[9], 但OVA并非人类哮喘的自然致敏原。因此, 利用哮喘患者自然致敏原如真菌、豚草、花

粉、尘螨等构建动物模型, 对于研究人类哮喘发病机制更具有针对性。陈华夏等^[9]应用粉尘螨蛋白致敏小鼠成功建立了哮喘动物模型。但天然粉尘螨蛋白组成成分复杂, 就目前所知可诱导机体产生特异性IgE抗体的组分已达30多种^[10]。因此, 建立单一变应原组分致

敏的动物模型将为后续研究的开展提供物质支持。据报道,通过大肠埃希菌表达的rDer p 2与Der f 2均具有较好的IgE结合活性^[5]。本实验利用大肠埃希菌表达系统获得了rDer f 2蛋白,经ELISA检测显示,可与哮喘患者的血清特异性IgE抗体结合,具有良好的变应原性,可用来免疫动物^[6]。

理想的哮喘动物模型应具有人类哮喘的主要特征:包括由多种细胞,特别是肥大细胞、嗜酸性粒细胞和T细胞参与的慢性炎症反应;对多种刺激因子的气道反应性增高及慢性气道重塑等^[11]。目前认为T淋巴细胞在哮喘的发病机制中起主要作用。Th1/Th2细胞比例失衡是哮喘发病的关键环节^[12],Th17细胞(分泌促炎性介质IL-17^[13])可能也参与了哮喘的发生^[14]。其中,Th2型细胞因子IL-4和Th17型细胞因子IL-17的增高、Th1型细胞因子IFN- γ 、IL-2的降低在哮喘发病中具有重要作用,是哮喘肺部变应性炎症的重要特征之一^[9]。

本实验用自制的rDer f 2免疫小鼠并检测相关指标,显示脾细胞上清中抗原特异性细胞因子IL-4、IL-17的含量明显升高,而IL-2、IFN- γ 的含量则显著降低,与血清检测结果中显示的IgG1、IgE的变化一致。Th1型细胞因子IFN- γ 可促使Th0细胞向Th1方向分化,抑制IL-4的表达和IgE的合成,发挥抗炎作用。本实验中,rDer f 2组小鼠的脾细胞上清及BALF中的IFN- γ 和IL-4分别低于和高于PBS组,表明rDer f 2组小鼠的Th1型免疫反应减弱而Th2型免疫反应增强;Th17细胞主要产生IL-17A、IL-17F和IL-22,在多种疾病中发挥重要作用。Wilson等^[15]通过哮喘动物模型发现,哮喘的气道高反应性和气道重塑主要取决于Th17细胞的应答和IL-17的水平^[16]。本研究rDer f 2组小鼠BALF中IL-17水平明显高于对照组,小鼠BALF中IL-17水平与对照组比较虽有升高,但差异无统计学意义。对此,尚需进一步研究,这基本说明Th17炎症反应亦增强。此与李国平等^[6]用rDer p 2构建小鼠哮喘模型的报道基本一致。

多种细胞因子参与的慢性气道炎症是哮喘的本质,其病理学改变涉及到气道、肺间质血管及肺泡等多方面^[17]。本研究以rDer f 2腹腔注射致敏小鼠并激发后,取肺组织做常规切片,HE染色后显示,该组小鼠肺部可见明显炎性细胞浸润,管腔内渗出物增加,组织水肿,显示哮喘动物模型构建成功,此与蔡红星等^[18]报道基本一致。

综上所述,用rDer f 2对BALB/c小鼠进行腹腔注射致敏、雾化吸入激发,可以成功建立rDer f 2致敏小鼠肺部变应性炎症模型,为后续进行螨性过敏性哮喘

防治的动物实验研究提供基本数据及参考。

参考文献

- [1] 李美容,王敏.哮喘小鼠模型的建立与评价[J].临床肺科杂志,2011,16(5):664-665.
- [2] 陈代雄,周平坤,冉丕鑫,等.屋尘螨和粉尘螨主要变应原的筛选和分析[J].中国热带医学,2009,9(2):232-234.
- [3] 吉坤美,刘晓宇,唐艳,等.标准化粉尘螨变应原脱敏疫苗中主要变应原Der f 2含量测定[J].中国人兽共患病学报,2010,26(7):663-667.
- [4] Johannessen BR, Skov LK, Kastrup JS, et al. Structure of the house dust mite allergen Der f 2: Implications for function and molecular basis of IgE cross-reactivity [J]. Febs Lett, 2005, 579 (5): 1208-1212.
- [5] Cates EC, Fattouh R, Wattie J, et al. Intranasal exposure of mice to house dust mite elicits allergic airway inflammation via a GM-CSF-Mediated mechanism [J]. J Immunol, 2004, 173(10):6384-6392.
- [6] 李国平,刘志刚,钟南山.重组Der p 2变应原诱导小鼠变态反应气道炎症动物模型的建立[J].中华微生物学和免疫学杂志,2005,25(7):564-569.
- [7] 吴奎,毕玉田,孙颀,等.屋尘螨提取液致敏BALB/c与C57BL/6小鼠肺部变应性炎症模型的比较[J].第三军医大学学报,2005,27(17):1756-1759.
- [8] 张文学.免疫学实验技术[M].北京:科学出版社,2007:135-136.
- [9] 陈华夏,高金明,蒋磊,等.粉尘螨蛋白致敏小鼠肺部变应性炎症模型的建立[J].基础医学与临床,2009,29(9):901-904.
- [10] 杨李,王运刚,崔玉宝.尘螨变应原免疫生物学研究进展[J].中国病原生物学杂志,2011,6(2):150-155.
- [11] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组.支气管哮喘防治指南(支气管哮喘的定义、诊断、治疗和管理方案)[J].中华结核和呼吸杂志,2008,26(3):132-138.
- [12] Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages [J]. Nat Immunol, 2005, 6 (11):1123-1132.
- [13] Park H, Li Z, Yang XO, et al. A distinct lineage of CD4⁺ T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17 [J]. Nat Immunol, 2005, 6(11):1133-1141.
- [14] Cheung PF, Wong CK, Lam CW. Molecular mechanisms of cytokine and chemokine release from eosinophils activated by IL-17A, IL-17F, and IL-23: implication for Th17 lymphocytes-mediated allergic inflammation [J]. J Immunol, 2008, 180(8):5625-5635.
- [15] Wilson RH, Whitehead GS, Nakano H, et al. Allergic sensitization through the airway primes Th17-dependent neutrophilia and airway hyperresponsiveness [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 180(8): 720-730.
- [16] 施宇衡,时国朝,万欢英,等.过敏性哮喘患者外周血Th17细胞及IL-17水平的变化[J].诊断学理论与实践,2010,9(5):473-476.
- [17] Brown MD, Gilmore PE, Hart CA, et al. Characterization of benign and malignant prostate epithelial Hoechst 33342 side populations [J]. Prostate, 2007, 67(13):1384.
- [18] 蔡红星,周鹰,史卫红,等.重组变应原rDer f 1对哮喘小鼠CD4⁺CD25⁺调节性T细胞及肺部病理的作用[J].重庆医学,2009,38 (23):2951-2955.

收稿日期:2011-12-27