

血清总 IgE、INF- γ 、IL-4 作为变应性鼻炎动物模型建立的客观评价指标初探*

张建辉¹ 唐嗣泉¹

[摘要] 目的:探讨血清总 IgE、INF- γ 、IL-4 作为卵清白蛋白致敏实验性变应性鼻炎(AR)大鼠模型建立客观评价指标及意义。方法:以 SD 大鼠为实验对象,随机分为 AR 组和对照组,每组 10 只。AR 组以卵清白蛋白作为致敏原,对照组以生理盐水替代卵清白蛋白,其余方法与步骤 2 组均相同。采用行为学评分、鼻腔组织学观察及血清 IgE、IL-4、INF- γ 检测综合判断造模是否成功。结果:2 组鼻腔激发后行为学评分差异有统计学意义($P < 0.05$)。对大鼠鼻黏膜进行苏木精-伊红染色,AR 组大鼠鼻黏膜符合 AR 形态学改变,对照组大鼠鼻黏膜变化并不明显。血清总 IgE、IL-4、INF- γ ELISA 检测结果,2 组血清中 IL-4、IgE 含量比较,AR 组显著高于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。AR 组血清中 INF- γ 含量显著低于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论:卵清白蛋白致敏成功建立 AR 大鼠模型,血清总 IgE、INF- γ 、IL-4 含量可作为建立 AR 动物模型的客观评价指标。

[关键词] 鼻炎,变应性;大鼠模型;IgE;INF- γ ;IL-4

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2015.15.013

[中图分类号] R765.21 **[文献标志码]** A

Establishment and evaluation of the SD rat allergic rhinitis model

ZHANG Jianhui TANG Siquan

(Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, the Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, 637000, China)

Corresponding author: TANG Siquan, E-mail: tangsiquan@126.com

Abstract Objective: To investigate method established and system evaluated in the model of SD rat with AR. **Method:** To establish AR model of SD rats by ovalbumin (OVA), 20 cases of SD rats were randomly divided into two groups, namely control group (10 cases) and AR group (10 cases). AR models were sensitized and challenged by OVA. Control group were used with normal saline instead of OVA. The score of pathology and praxiology were observed when the SD rats in AR group appeared typical symptom of allergic rhinitis, and levels of IL-4, INF- γ , IgE in the serum were examined by ELISA. According to the behavioral score, nasal histology and content of IL-4, INF- γ , IgE of serum, Rat allergic rhinitis model were judged successfully established or not. **Result:** Behavioral scores were significantly increased in OVA-challenged rats compared with the control group, $P < 0.05$. Nasal epithelial goblet cells, eosinophils and lymphocytes in nasal mucosa in the AR rats exhibited obvious increase relative to the control group. IL-4, IgE levels in the AR rat exhibited obvious increase relative to control group while INF- γ levels exhibited obvious reduction ($P < 0.05$). **Conclusion:** The allergic rhinitis models in SD rat by OVA were successfully established. The levels of IgE, INF- γ and IL-4 in Serum can be used as objective evaluation of animal models of allergic rhinitis established successfully or not.

Key words allergic rhinitis; rat model; IgE; INF- γ ; IL-4

变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)动物模型的成功建立,是进一步实施 AR 相关研究的前提和基础。目前 AR 动物模型成功建立的评价指标尚无统一的标准。传统的较为人们所接受的方法是参照行为学评分及病理组织学检查^[1],其中行为学评分对于大样本需客观准确地记录每一只动物在被

激发后的鼻痒程度、喷嚏次数存在一定的操作难度,且带有一定的主观性。因此我们拟将血清总 IgE、代表 Th1/Th2 细胞的主要细胞因子 INF- γ 、IL-4 作为客观指标纳入 AR 动物模型的评价体系,探讨能否进一步佐证 AR 动物模型成功建立,为 AR 动物模型的建立找到更具有可操作性的客观评价指标。

1 材料与方法

1.1 材料

健康 SD 大鼠共 20 只,雌雄各半,体重 175~255 g,由川北医学院动物实验中心提供。饲养条件:室温(23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度(60 ± 5)%,单笼饲

*基金项目:四川省教育厅资助课题(No:12ZB221;11ZA185);四川省卫生厅资助课题(No:110295);川北医学院 2012 年度科研发展计划项目[No:川北医科(2012)17 号]

¹川北医学院附属医院耳鼻咽喉头颈外科(四川南充,637000)

通信作者:唐嗣泉, E-mail: tangsiquan@126.com

养,自由饮水,雌雄分开,每笼 5 只,保持室内安静,适应性饲养 1 周后正式实验开始。卵清白蛋白(美国 Sigma 公司),氢氧化铝粉末(成都科龙化工试剂厂),大鼠 IL-4、INF- γ 、IgE ELISA 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 AR 大鼠分组及模型建立 将实验大鼠随机分为 AR 组和对照组,每组 10 只。造模方法参照文献[1]方法:AR 组用卵清白蛋白 20 mg 作为致敏原,氢氧化铝 30 mg 作为佐剂;生理盐水溶解制备为 1 ml 混悬液腹腔注射做基础致敏,隔日 1 次,连续 8 次,共 15 d;从第 16 天开始,每天 AR 组鼻腔用 1% 卵清白蛋白溶液滴鼻进行激发,连续 10 d,每次每侧鼻腔 50 μ l。对照组:用生理盐水代替卵清白蛋白,余下步骤和方法 2 组相同;每次滴鼻后立即观察大鼠打喷嚏及搔鼻的次数,持续观察时间都为 30 min。采用行为学评分、鼻腔组织学变化及血清 IgE、IL-4、INF- γ 检测综合判断造模是否成功。

1.2.2 大鼠行为学评分标准^[1] 根据鼻痒、喷嚏、流涕出现的次数多少、轻重程度、时间长短为评分标准并记录评分。症状观察时间是每次给致敏物后 30 min。鼻痒程度:轻擦外鼻几次,记 1 分;抓挠鼻面不止,到处摩擦记 2 分。喷嚏次数:1~3 个计 1 分,4~10 个计 2 分,11 个以上计 3 分。流涕:流至鼻前孔计 1 分,超过鼻前孔计 2 分,流涕满面计 3 分。各症状记分相叠加后,总分数为 5 分者判断为造模成功。

1.2.3 取材及检查 采集血清:在末次激发 30 min 后,将大鼠用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉(0.4 ml/100 g),仰卧位固定。心脏取血,用干净试管收集血液,室温凝固 30 min,3 000 r/min 离心 10 min,取出血清分装入 Ep 管,ELISA 检测血清总 IgE、IL-4、INF- γ 含量。采集组织:剥去大鼠上颌骨部皮肤,将上颌骨从颅骨中游离,沿鼻中隔剪开鼻腔。取出鼻中隔软骨及黏膜,用 4℃ 生理盐水冲净血液及黏液,放入 4% 多聚甲醛中固定,苏木精-伊红染色观察鼻黏膜形态学变化。

1.3 统计学处理

各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,本实验数据结果采用 SPSS 19.0 软件对各组数据先行方差齐性检验,检验水准按 $P=0.2$,方差齐时,差异显著性检验采用成组 t 检验;方差不齐时,采用两独立样本非参检验。检验标准取 $P=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 行为学评分

行为学评分致敏第 15 天后,AR 组大鼠鼻腔

激发和行为学评分累加结果均超过 5 分,提示造模成功。对照组大鼠仅少数偶尔有打喷嚏和抓鼻现象出现。AR 组评分为 6.30 ± 0.67 ,对照组行为学评分为 2.10 ± 0.73 ,2 组差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 苏木精-伊红染色

苏木精-伊红染色后显微镜下观察,AR 组大鼠鼻黏膜上皮内杯状细胞数增多,上皮下层可见程度不同的组织水肿、小动脉血管扩张及血浆渗出,同时可见浸润的淋巴细胞和嗜酸粒细胞,并伴有腺体的明显增生(图 1)。对照组大鼠鼻黏膜上皮内见到增生的杯状细胞数少,上皮淋巴细胞浸润不明显,少见组织水肿和腺体增生(图 2)。

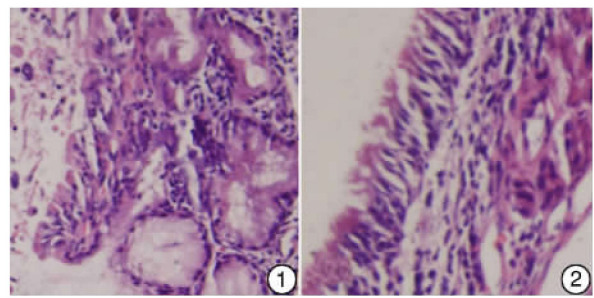


图 1 AR 组鼻黏膜腺体明显扩张 (苏木精-伊红染色 $\times 200$); 图 2 对照组大鼠鼻黏膜上皮及腺体 (苏木精-伊红染色 $\times 200$)。

2.3 血清总 IgE、IL-4、INF- γ ELISA 检测

AR 组和正常对照组血清中 IL-4、INF- γ 、IgE 含量见表 1。血清中 IL-4、IgE 含量 AR 组显著高于正常对照组,差异均有统计学意义($P<0.01$)。血清中 AR 组 INF- γ 含量显著低于对照组,2 组差异有统计学意义($P<0.01$)。

表 1 AR 组、对照组血清总 IgE、IL-4、INF- γ 检测结果比较 $\bar{x} \pm s$

组别	例数	IgE/ (ng $\cdot$ ml ⁻¹)	IL-4/ (pg $\cdot$ ml ⁻¹)	INF- γ (mg $\cdot$ ml ⁻¹)
AR 组	10	$52.10 \pm 6.01^{1)}$	$49.90 \pm 15.04^{1)}$	$30.80 \pm 5.01^{1)}$
对照组	10	12.00 ± 2.21	10.70 ± 2.91	89.40 ± 7.57

与对照组比较,¹⁾ $P<0.01$ 。

3 讨论

动物实验,是生命科学实验研究中十分重要的部分之一。实验动物疾病模型的成功建立,是对实验动物疾病进行科学研究的前提和科学性的可靠保证。目前国内外复制 AR 动物模型尚无统一标准,复制动物疾病模型所使用的致敏原、免疫佐剂、致敏与激发时间、方法及给药途径等也不完全一致。自 1988 年 Tanaka 等利用甲苯二异氰酸酯建

立豚鼠 AR 模型后,随着对 AR 的广泛深入研究,人们采取了多种方法对建立不同动物模型进行研究^[2]。目前已用数种致敏原对小鼠、大鼠、豚鼠、山羊、兔、犬等建立了 AR 的动物模型。模型动物选择根据不同实验需要而定。AR 动物模型的致敏途径,有抗原经腹腔注射、皮内注射和雾化吸入几种方式。其中如采用超声雾化吸入激发,有诱发哮喘可能,不利于下一步实验观察 AR 对下呼吸道炎症及哮喘的影响。致敏原选择用卵清白蛋白造模已是一种被国内外学者广泛采用且比较成熟的方法^[3-5]。本实验选用大鼠致敏建立 AR 模型,是因为大鼠比较容易致敏和容易重复,在激发阶段经鼻腔滴药大鼠较小鼠易于操作,因采用超声雾化吸入激发,有诱发哮喘可能,不利于进一步实验观察 AR 对哮喘的影响等研究。该实验采用卵清白蛋白腹腔内注射,并经鼻腔滴药激发建立 AR 模型,该方法目前国内报道较多,成功率高,重复性好。本实验观察卵清白蛋白滴鼻致敏后迅速出现打喷嚏、流清涕和鼻痒症状,行为学评分大于 5 分,符合 AR 速发相表现。对照组中动物偶有打喷嚏及抓鼻现象。本实验中 AR 组大鼠鼻黏膜上皮内杯状细胞数增多,上皮下层可见程度不同的组织水肿、小动脉血管扩张及血浆渗出,同时可见浸润的淋巴细胞和嗜酸粒细胞,并伴有腺体的明显增生。对照组则少见上述表现。病理改变与行为学改变及评分一致。AR 患者鼻黏膜局部 CD4⁺ T 淋巴细胞主要向 Th2 转化,出现 Th2/Th1 比例失衡,TH2 细胞比例增加。Th2 淋巴细胞释放的细胞因子(主要为 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 和 IL-13 等)主要介导机体体液免疫,尤其是 IL-4 能够促进机体产生 IgE,导致 AR 发生。Th1 淋巴细胞主要释放的细胞因子如 IFN- γ 等能抑制 Th2 活化,进而抑制 IgE 产生。当机体 Th1 细胞分泌的 IFN- γ 不足时可导

致 Th2 功能亢进,引起 IL-4 产生过多导致大量产生 IgE。经血清 ILISA 检测,该实验 AR 组血清总 IgE、IL-4 较正常对照组明显升高,INF- γ 较正常对照组明显降低($P < 0.01$),差异均有统计学意义,符合 AR 血清学改变。因此,我们认为该方法 AR 动物模型成功建立。AR 动物模型成功建立的评价体系,目前亦无统一的标准。传统的较为人们所接受的方法是参照行为学评分及病理组织学检查^[1]。

本实验将血清总 IgE、代表 Th1/Th2 细胞的主要细胞因子 INF- γ 、IL-4 作为客观指标纳入 AR 动物模型的评价体系,进一步佐证 AR 动物模型是否成功建立,更具有可操作性和评价结果的客观性。因此,在 AR 动物模型建立是否成功的评价体系中同时采用血清总 IgE、INF- γ 、IL-4 含量作为建立 AR 动物模型的评价指标,操作性强,更具客观性,有实际应用价值,是保证在 AR 动物模型上进一步实验研究成功的基础和前提。

参考文献

- [1] 赵秀杰,董震,杨占泉,等.鼻超敏反应实验模型的建立[J].中华耳鼻咽喉科杂志,1993,28(1):17-18.
- [2] 张罗,韩德民.变应性鼻炎治疗的进展[J].中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2005,40(3):230-233.
- [3] SEHMI R, WOOD I J, WATSON R, et al. Allergen-induced increases in IL-5 receptor α -subunit expression on bone marrow-derived CD34⁺ cells from asthmatic subjects[J]. Clin Invest, 1997;2457-2466.
- [4] 赵宇, C. Andrew van Hasselt, 吴港生,等.卵清白蛋白经鼻致敏建立变应性鼻炎动物模型[J].中华耳鼻咽喉科杂志,2005,40(3):176-180.
- [5] 田翠玲,雷小平,税民鸿,等.趋化因子 Eotaxin 和 RANTES 在变应性鼻炎大鼠模型中的表达[J].临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2014,28(14):1069-1071.

(收稿日期:2015-04-14)