

·论著·

支气管哮喘模型大鼠 IL24 IL210 IFN γ 的检测

李光,赵育莹,曲书强,逯晓辉,刘晨,唐建民,王丽群,张凤蕴

(哈尔滨医科大学免疫教研室,黑龙江 哈尔滨 150086)

[摘要] 目的 哮喘的发病机理尚不完全清楚,近年来,细胞因子在哮喘中的作用引起人们的关注。本文旨在探讨支气管哮喘的免疫学发病机理,研究细胞因子 IL24、IL210、IFN γ 与哮喘的关系。方法 建立大鼠支气管哮喘模型。将 Wistar 大鼠随机分为两组:正常对照组($n=11$)及哮喘组($n=11$),以卵白蛋白(OVA)腹腔注射致敏大鼠,两周后雾化吸入 OVA 发敏;发敏后杀鼠,取脾,制备单个核细胞悬液,体外培养,并以 OVA 刺激,取不同时间培养上清,应用 ELISA 双抗体夹心法测定其中 IL24、IL210 和 IFN γ 的水平。结果 支气管哮喘组动物单个核细胞培养上清中 IL24 的水平明显高于正常对照组(64.56 ± 5.83 vs 24.66 ± 3.68 pg/ml, $P < 0.05$),IL210 水平明显低于正常对照组(34.13 ± 0.85 vs 85.12 ± 6.13 , $P < 0.05$),IFN γ 水平明显低于正常对照组(3.87 ± 0.48 vs 14.51 ± 1.32 pg/ml, $P < 0.05$)。结论 细胞因子 IL24、IL210 和 IFN γ 可能参与了哮喘发病的病理生理过程。

[中国当代儿科杂志,2004,6(6):474-476]

[关键词] 哮喘;白细胞介素4;白细胞介素10;干扰素 γ ;大鼠

[中图分类号] R564.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2004)06-0474-03

Levels of IL24, IL210 and IFN γ in rats with asthma

Guang LI, Yu2Ying ZHAO, Shu2Qiang QU, Xiao2Hui LV, Chen LIU, Jian2Min TANG, et al. Department of Immunology, Haerbin Medical University, Haerbin 150086, China (Email: zhongfy_6272000@ahoo.com.cn)

Abstract : Objective The pathogenic mechanism of asthma has not yet been explained. This paper aims to study the relationships between IL24, IL210 and IFN γ and asthma so as to explore the immunologic pathogenesis of asthma. **Methods** The Wistar rats were randomly assigned into 2 groups: a Normal group ($n=11$) and an Asthma group ($n=11$). Asthma was induced by intraperitoneal injection of OVA and fog inhalation of OVA. Five days after asthma induction, the rats were sacrificed and their spleens were removed. Then the mononuclear cell suspension was prepared, cultured, and stimulated with OVA. The levels of IL24, IL210 and IFN γ in the supernatant were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The IL24 level in the mononuclear cells of the Asthma group (64.56 ± 5.83 pg/ml) was significantly higher than that of the Normal group (24.66 ± 3.68 pg/ml) ($P < 0.05$), while the levels of IL210 (34.13 ± 0.85 pg/ml) and IFN γ (3.87 ± 0.48 pg/ml) were significantly lower than those of the Normal group [85.12 ± 6.13] and [14.51 ± 1.32] pg/ml, respectively] ($P < 0.05$). **Conclusion** IL24, IL210 and IFN γ might be involved in the pathogenesis of asthma. [Chin J Contemp Pediatr, 2004, 6(6): 474-476]

Key words: Asthma; Interleukin24; Interleukin210; Interferon γ ; Rat

哮喘(asthma)主要表现为气道的高反应性炎症,儿童及成年人支气管哮喘的发病率均呈上升趋势。哮喘的发病机理尚不完全清楚,研究表明,其关键的效应细胞是 Th 细胞和嗜酸性粒细胞^[1]。近年来,细胞因子在哮喘中的作用引起国内外学者的关

注,国内该方面的研究较少。为探讨哮喘的免疫学发病机理,我们在建立大鼠哮喘动物模型的基础上,检测了模型动物脾细胞培养上清中 IFN γ ,IL24,IL210 的水平,现报告如下。

[收稿日期] 2003-09-13; [修回日期] 2004-03-14
[基金项目] 黑龙江省教育厅资助课题(编号:10531106)。
[作者简介] 李光(1967-),男,硕士,副教授,主攻方向:变态反应性疾病。
[通讯作者] 张凤蕴,哈尔滨医科大学免疫教研室,邮编:150086。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

Wistar 大鼠 22 只,雌雄各半,体重 150 ±30 g,购自中国农科院哈尔滨兽医研究所。大鼠随机分为两组:正常对照组及支气管哮喘组(模型组),每组 11 只。

1.2 试剂及试剂盒

卵白蛋白(OVA)为 Sigma 公司产品, Y99801 型雾化吸入器为上海亿圣科技有限公司产品。

大鼠 IFN γ 检测试剂,大鼠 IL210 检测试剂盒,大鼠 IL24 检测试剂盒均购自大连泛帮生物工程有限公司。

1.3 动物模型的建立^[2,3]

模型组动物腹腔注射 OVA 10 mg, Al(OH) $_3$ 10 mg,生理盐水 1 ml 的混悬液,第 10 天重复一次;对照组动物腹腔仅注射 Al(OH) $_3$ 10 mg,生理盐水 1 ml。

第 14 天开始连续 5 d 两组动物均以 1% OVA 雾化吸入发敏,每次 20 min,观察临床症状。

1.4 脾淋巴细胞悬液的制备

发敏 5 d 后杀鼠,取脾,分离淋巴细胞,制备单个核细胞悬液,以含 10% FCS 的 RPMI 1640 调细胞浓度为 2 ×10⁶ 个细胞/ml,加入 24 孔反应板中,每孔 1 ml,同时各孔加入 OVA 刺激(终浓度为 200 g/L)。将反应板置 37℃含 5% CO $_2$ 的培养箱中,取不同时间培养上清分装, - 20℃保存,备用。48 h 培养上清用于 IL24 和 IL210 的检测;72 h 培养上清用于 IFN γ 的检测。

1.5 被动皮肤过敏反应试验 (passive cutaneous anaphylaxis, PCA)

1.5.1 抗血清的制备 于第一次免疫动物两周后尾静脉采血分离血清,每组各大鼠抗血清混合。

1.5.2 PCA 试验 另选大鼠 4 只,随机分为两组。于鼠背皮内注射不同组别的 1:10 稀释的抗血清,每只注射两个点,每点 0.1 ml。48 h 后于尾静脉注射 5% OVA2伊文思兰 1.5 ml,30 min 后杀鼠,翻转背部皮肤,将兰斑皮片剪下,浸泡于丙酮-盐水中过夜,离心后取上清液,在分光光度计上 610 nm 处测 OD 值。

1.6 细胞因子的检测

1.6.1 IFN γ 的检测 采用 ELISA 双抗体夹心法检测。简言之,加 100 μ l 标准品及待测样品至抗 IFN γ 单克隆抗体包被的 96 孔反应板中,室温孵育 120 min,洗板后加入生物素化的抗大鼠 IFN γ 及辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的链霉亲和素 (streptoa2vidin),洗板后加入 TBM 显色,置反应板于酶标仪上

读取 OD(450nm) 值,制备标准曲线,求出 IFN γ 的量。

1.6.2 IL24 的检测 取 48 h 细胞培养上清,采用 ELISA 双抗体夹心法检测,其原理和步骤同 IFN γ 。

1.6.3 IL210 的检测 取 48 h 细胞培养上清,采用 ELISA 双抗体夹心法检测,其原理和步骤同 IFN γ 。

1.7 统计学处理

本文中实验数据以均数 ±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用两样本均数的双侧 t 检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 模型动物临床症状

以 1% OVA 雾化吸入后 3~10 min 内,模型组动物出现不同程度的挠鼻,咳嗽,呼吸加快,重者可闻及喘鸣音。

2.2 PCA 试验结果

注射模型组动物抗血清的注射部位皮片浸液的吸光度高于正常对照组。见表 1。

表 1 被动皮肤过敏反应试验结果	
Table 1 Results of passive cutaneous anaphylaxis	
($n = 2, \bar{x} \pm s$)	
抗血清组别	皮肤兰斑 OD 值
对照组	0.017 ±0.003
模型组	0.248 ±0.032 ^a
t	16.7
P	<0.05

2.3 细胞因子的检测结果

支气管哮喘组动物单个核细胞培养上清中 IL24 的水平明显高于正常对照组,IL210 水平明显低于正常对照组,IFN γ 水平明显低于正常对照组。见表 2。

表 2 两组细胞因子检测结果			
Table 2 Levels of cytokines in the two groups			
($n = 11, \bar{x} \pm s$)			
组别	细胞因子水平 (pg/ml)		
	IFN γ	IL24	IL210
对照组	14.51 ±1.32	24.66 ±3.68	85.12 ±6.13
模型组	3.87 ±0.48	64.56 ±5.83	34.13 ±0.85
t	2.48	2.61	2.52
P	<0.05	<0.05	<0.05

3 讨论

1966 年,日本学者 Ishiaka 发现, I 型超敏反应

是由血清 IgE 介导的,且 IgE 可通过血清被动转移使人及动物发生过敏反应。我们采用了抗 OVA 血清注入正常大鼠皮内,再以溶于伊文氏蓝的抗原攻击,抗原-抗体-伊文氏蓝在注射局部结合出现蓝斑,比较动物皮片浸液的吸光度,推测 IgE 抗体的量。从表 1 中可以看出,皮内注射模型组动物抗血清的注射部位皮片浸液的吸光度高于注射正常对照组血清者。根据临床症状及 PCA 试验结果表明哮喘模型建立成功。

支气管哮喘属 I 型超敏反应,需 Th 细胞参与,才能激发体液免疫应答。根据 Th 细胞产生的细胞因子谱不同,主要可分为 Th1 和 Th2 两种极化(polarization)形式,Th1/Th2 极化是免疫应答调节中的关键环节,Th1/Th2 极化异常或缺陷可导致疾病^[4]。Th1 细胞主要分泌 IL22, IFN γ , TNF α 等,而 Th2 细胞主要分泌 IL24, IL25, IL29, IL213 等。Th1 和 Th2 彼此相互抑制,在机体维持动态平衡,如果这一平衡被打破,则会形成疾病。哮喘时变应原启动 Th2 极化应答^[5],因此 IL24 水平增高,而 IFN γ 水平降低。IL210 的主要生物学活性表现为多种抑制功能与免疫刺激作用,包括抑制 Th 细胞增生,抑制 Th1 型细胞因子的合成及其活性。在实验性自身免疫性葡萄膜炎(experimental autoimmune uveoretinitis, EAU)中发现,IL210 对 EAU 的自然恢复有重要作用,若在 EAU 发病的早期中和体内 IL210,则明显加重病情^[6]。我们的结果证明哮喘动物脾细胞培养上清中 IL24 水平明显升高、IL210 和 IFN γ 明显降低,说明哮喘中细胞因子紊乱,其本质是 Th0 向 Th1/Th2 功能性极化失衡的结果。有学者用抗原特异性免疫疗法治疗花粉引起的过敏症,

发现治疗后症状明显减轻,血清中 IFN γ 水平升高,IL24 水平明显降低,说明 Th1 极化应答增强,抑制了 Th2 极化应答,提示某些细胞因子的水平变化可以反映治疗的效果^[7]。

我们的检测结果证明,细胞因子 IL24, IL210 和 IFN γ 参与哮喘的发病,这对儿童及成年人支气管哮喘的临床诊断,病情观察及治疗有一定指导意义。

[参 考 文 献]

- [1] Ohkawara Y, Lei XF, Stampfli MR, Marshall JS, Xing Z, Jordana M. Cytokine and eosinophil responses in the lung, peripheral blood, and bone marrow compartments in a murine model of allergen-induced airways inflammation [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997, 16(5): 510 - 520.
- [2] 苗会,薛全福,庄逢源,胡清华,赵静波. 哮喘大鼠动物模型的制备 [J]. 基础医学与临床, 1998, 18(1): 72 - 75.
- [3] 王朝霞,杨贵贞,宋丽君. 1 甘利欣对大鼠哮喘模型及哮喘患者血清 IgE 水平的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2003, 19(2): 124 - 127.
- [4] 王莉. Th1/Th2 极化:多因素的参与和调控 [J]. 上海免疫学杂志, 2001, 21(6): 376 - 378.
- [5] Grayson MH, Holtzman MJ. Lessons from allergic rhinitis versus asthma pathogenesis and treatment [J]. Immunology Allergy Clin North Am, 2002, 22(4): 845 - 869.
- [6] Saoudi A, Kuhu J, Huygen K, de Kozak Y, Velu T, Goldman M, et al. Th2 activated cells prevent experimental autoimmune uveoretinitis, a Th1-dependent autoimmune disease [J]. Eur J Immunol, 1993, 23(12): 3096 - 3103.
- [7] Sakaguchi M, Toda M, Hirahara K, Shirarish A. Antigen-specific immune therapies for the treatment of Japanese cedar pollinosis [J]. Clin Immunol, 2003, 39(3): 308 - 314.

(本文编辑:钟乐)

· 消息 ·

新生儿专业继续教育学习班通知

为提高围产新生儿专业医务人员业务水平,北京大学第一医院儿科按计划于 2005 年 3 月 22 日至 4 月 1 日举办新生儿专业继续教育学习班。本班已列入国家继续教育计划,授课教师包括虞人杰、周丛乐、鲍秀兰、徐景蓁、吴婉芳、姜毅等本院及北京市著名专家教授。主要授课内容包括:新生儿特有疾病的诊治及国内外研究进展、新生儿早产儿喂养新进展、新生儿脑损伤的诊断治疗进展、宫内感染、新生儿 NEC 和静脉营养、危重新生儿急救医学、高危妊娠对胎儿的影响、新生儿康复治疗、护理新概念、临床科研设计等。

学习结束考试合格者将获得北京大学结业证书及 25 学分。学费和讲义费共 850 元,学习班负责安排住宿,(床位费约 30、50、80 元/天),食宿费自理。报到时请带,1 寸免冠照片 1 张及学分册、身份证。欲参加本班者请与我们联系,联系人:于果、姜毅。地址:西安门大街 1 号,北京大学第一医院儿科,邮编 100034。电话:66551122 - 3213。E-mail:xsxxb1122@126.com。

北京大学第一医院儿科