

文章编号 1006-8147(2017)05-0408-04

论 著

特异性免疫治疗对特应性皮炎模型小鼠细胞因子的调控

毕田田, 陈立新, 王莹, 管志伟, 刘欣欣, 高西波, 宫泽琨, 李钦峰
(天津市儿童医院皮肤科, 天津 300134)

摘要 目的: 观察特异性免疫治疗(SIT)对特应性皮炎(AD)模型小鼠细胞因子的调控, 探讨其在免疫方面的作用机制。方法: 用尘螨溶液诱导 BALB/C 小鼠形成过敏体质, 再分别用 0.5% 丙酮和卵清蛋白诱导产生 AD 模型。用阿罗格脱敏试剂行 SIT 1 周。分别用 Elisa 法及 Real Time RT-PCR 法观察 SIT 前后小鼠血清 IL-4、IL-10、IFN- γ 水平及脾脏组织中 IL-4 mRNA、IL-10 mRNA、IFN- γ mRNA 表达的变化。结果: 治疗前较正常对照组, 血清 IL-4、IL-10 水平升高, IFN- γ 水平降低; 脾脏组织中 IL-4 mRNA、IL-10 mRNA 水平升高, IFN- γ mRNA 水平降低 (P 均 <0.01); SIT 后较治疗前血清 IL-4、IL-10 水平降低, IFN- γ 水平升高; 脾脏组织中 IL-4 mRNA、IL-10 mRNA 水平下调, IFN- γ mRNA 水平上调 (P 均 <0.01)。结论: SIT 可纠正 AD 小鼠 Th1/Th2 细胞因子平衡失调, 对除螨外丙酮及卵清蛋白引起的特应性皮炎小鼠均有良好的治疗作用。

关键词 特异性免疫治疗; 特应性皮炎; 细胞因子; RT-PCR; 小鼠

中图分类号 R758.2

文献标志码 A

Effect of specific immunotherapy on cytokines in atopic dermatitis mice model

BI Tian-tian, CHEN Li-xin, WANG Ying, GUAN Zhi-wei, LIU Xin-xin, GAO Xi-bo, GONG Ze-kun, LI Qin-feng
(Department of Dermatology, Tianjin Children's Hospital, Tianjin 300134, China)

Abstract **Objective:** To study the effect of specific immunotherapy on cytokines in atopic dermatitis (AD) mice model. **Methods:** The AD mice was established by sensitization with dust mite allergy solution, and then were treated with 0.5% DNCB or ovalbumin on the skin. The control group was treated with PBS. The remaining mice were treated with specific immunotherapy for one week. The serum levels of IL-4, IL-10 and IFN- γ were detected by Enzy-Linked immunosorbent assay (Elisa). The mRNA levels of IL-4, IL-10 and IFN- γ in spleen tissues of AD mice were detected by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results:** Compared with the normal controls, serum levels of IL-4 and IL-10 were increased, and IFN- γ was reduced in AD mice. The IL-4 mRNA and IL-10 mRNA levels of AD mice were up-regulated, the IFN- γ mRNA level was down-regulated. After SIT treatment, the expressions of IL-4 and IL-10 were reduced, and the expression of IFN- γ was increased. **Conclusion:** SIT could correct the imbalance of Th1/Th2 cytokines in mice with AD and have therapeutic effect on allergic dermatitis mice induced by different allergens.

Key words specific immunotherapy; atopic dermatitis; cytokines; RT-PCR; mice

特应性皮炎(atopic dermatitis, AD)是一种反复发作的慢性瘙痒性皮肤病,与过敏性鼻炎和哮喘等过敏性疾病相关^[1]。AD发病与多种细胞因子表达异常密切相关^[2-3],因发病机制尚未明确,尚缺乏根治性疗法。特异性免疫治疗(specific immunotherapy, SIT)被认为是目前唯一针对AD病因的治疗方法,是当今人们研究的热点^[4]。尘螨是临床上重要的致敏原,可引起各种过敏性疾病,其中皮肤过敏是最常见之一,因其广泛存在于空气中,很难通过完全避免来改善临床症状,因此作为一种常见的触发因子,在特应性皮炎的变态反应炎症中起重要作用。尘螨浸液皮试阳性率占总皮试阳性率70%以上,研

究报道尘螨变应原特异性免疫治疗对慢性湿疹有一定疗效。本研究通过尘螨诱导小鼠过敏体质进而建立卵清蛋白和丙酮诱导模型,观察SIT前后小鼠血清中IL-4、IL-10及IFN- γ 水平及脾脏组织中IL-4 mRNA、IL-10 mRNA、IFN- γ mRNA表达的变化,旨在探讨SIT对不同变应原诱发AD小鼠的疗效,进一步研究AD发病的免疫失衡机制,推动SIT在人特应性皮炎中的临床应用。

1 材料和方法

1.1 材料 雌雄各半的SPF级纯系BALB/c 6~8周龄小鼠36只(天津市实验动物中心),卵清蛋白(美国Sigma公司),丙酮、尘螨注射液(武汉博士德生物有限公司),小鼠血清IL-4、IL-10、IFN- γ ELISA试剂盒(上海亚培生物科技有限公司),SYBR Green 荧光定量PCR试剂盒(上海Life Technologies

基金项目 天津市卫生局科技基金资助(2012KZ029)

作者简介 毕田田(1988-),女,医师,硕士,研究方向:皮肤性病学;
通信作者: 李钦峰, E-mail: lyz20061217@sina.com。

公司),RT-PCR 仪(美国 ABI 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 分组及各组小鼠的干预处理

1.2.1.1 分组:雌雄各半的 SPF 级纯系 BALB/c 6~8 周龄小鼠 36 只,随机分为正常对照组、卵清蛋白组、丙酮组 3 组,每组 12 只。

1.2.1.2 小鼠的干预处理方法^[5]:(1)模前准备:10% 水合氯醛(0.3 mL/100 g)腹腔麻醉实验小鼠,将其固定于自制处置台上,用刀片将腹部毛剔除干净,胶带在除毛部位反复黏贴 8 次去除角质层,实验面积约 2 cm×2 cm。(2)诱发小鼠过敏体质:A.实验第 1 周,第 1、3、5、7 天,所有的实验动物注射尘螨提取液致敏。B.实验第 2 周,第 10、13 天注射尘螨提取液致敏;C.实验第 3~6 周,每周注射 1 次尘螨提取液致敏。(3)正常对照组:将蒸馏水滴加入斑试器内的滤纸片,用透明膜将斑试器固定于小鼠腹部实验范围,保证试剂与皮肤充分接触。用绷带固定,隔日更换滴加新鲜溶液的滤纸片。(4)卵清组:OVA 溶于双蒸水,配成 100 mg/mL 浓度。取 20 μ L OVA 溶液滴加入斑试器内的滤纸片,用透明膜将斑试器固定于小鼠腹部实验范围,消毒绷带将其固定。实验中隔日更换滴加新鲜溶液的纸片,致敏过程共 6 周。(5)丙酮组制作:分别于第 1 周隔日在小鼠背部 0.5% DNCB 1 次,每次 100 μ L,从第 2 周起每隔 2 日 1 次,每次 70 μ L,造模共 6 周。

1.2.1.3 标本收集:第 7 周造模实验结束 24 h 后,每组随机选择 6 只小鼠眼球内眦取血,注入试管中凝固后,离心 15 min(3 500 r/min),分离血清置于-25 $^{\circ}$ C 低温冰箱中待检。取接触斑试器部位皮肤,分成 2 份,1 份以 10% 甲醛固定,常规石蜡包埋、切片,苏木精-伊红染色;另 1 份置于液氮中用于后续实验分析。取脾脏组织暂存于-80 $^{\circ}$ C 低温冰箱中用于实验分析。

1.2.2 小鼠的特异性免疫治疗 卵清组和丙酮组各剩余 6 只小鼠,分别随机选择其中 3 只小鼠应用阿罗格进行特异性免疫治疗,治疗过程为 1 周。组内剩余 3 只小鼠未予任何干预治疗,待其自然转归,观察 1 周。实验结束后如上述方法收集血清及脾脏组织。

1.2.3 血清 IL-4、IL-10、IFN- γ 水平测定 采用双抗体夹心 ELISA 法,分别设标准品孔,空白孔,待测样品孔。参照试剂盒使用说明书,用酶标仪在 450 nm 波长测量各孔的吸光度。每个样本重复 3 次。制作样品浓度标准曲线,并根据其计算各样品的浓度。

1.2.4 脾脏组织中 IL-4、IL-10、IFN- γ mRNA 表达

的测定 用 Real Time RT-PCR 方法检测组织 IL-4、IL-10、IFN- γ mRNA 的表达。(1)抽提总 RNA:按 RN Aiso Reagent 操作说明书提取脾脏组织中总 RNA,紫外分析及电泳检测总 RNA 的纯度、浓度及完整性。(2)单链 cDNA 的合成:采用 Prime ScriptTM RT reagent Kit 试剂盒,严格按说明书操作。(3)Real Time RT-PCR:采用 SYBR Rremix Ex Taq 试剂盒,在 ABI7300 上设置检测文件,PCR 反应体系:ddH₂O 6 μ L,样本模板 cDNA 3 μ L,荧光染料 10 μ L,上下引物各 0.5 μ L,配成 20 μ L 的体系。PCR 扩增条件:95 $^{\circ}$ C,30 s,95 $^{\circ}$ C,10 s,59 $^{\circ}$ C(内参基因)或 58 $^{\circ}$ C(IL-4、IL-10、IFN- γ)30 s,72 $^{\circ}$ C 10 s。反应条件如下:预变性:95 $^{\circ}$ C,10 s(1 个循环),PCR 反应:95 $^{\circ}$ C,5 s;55 $^{\circ}$ C,30 s(40 个循环)。使用 Seauence detection software version 1.2.3 软件(Applied Biosystems 公司)分析 PCR 过程中样本的 CT (Threshold cycle) 值。CT 值随模板浓度增大而减少。结果计算:通过检测模板梯度稀释时的 Ct 值的变化来评价目标基因和内参基因的扩增效率,扩增效率是大体相同的,所以可以用相对定量法,公式为 Δ 循环阈值 (Ct)=样本 Ct 均值-内参照 Ct 均值, $\Delta\Delta Ct=(Ct_{目的}-Ct_{参比})_{实验}-(Ct_{目的}-Ct_{参比})_{对照}$ 。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示样本中目的基因相对表达含量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件处理。数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示。多个样本之间的两两比较采用 t 检验, $P<0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 AD 小鼠血清 IL-4、IL-10、IFN- γ 变化 卵清组治疗前与正常对照组比较:IL-4、IL-10 水平升高,IFN- γ 水平降低 ($t_1=70.48, t_2=43.47, t_3=-51.92, P<0.01$);卵清组治疗后较治疗前:IL-4、IL-10 水平降低,IFN- γ 水平升高 ($t_4=53.21, t_5=24.37, t_6=-35.49, P<0.01$)。丙酮组治疗前与正常对照组比较:IL-4、IL-10 水平升高,IFN- γ 水平降低 ($t_1=12.28, t_2=13.37, t_3=-29.31, P<0.01$);丙酮组治疗后较治疗前:IL-4、IL-10 水平降低,IFN- γ 水平升高 ($t_4=6.67, t_5=10.93, t_6=-19.75, P<0.01$)。治疗后卵清组与丙酮组之间无明显差异。组内未予治疗小鼠较前减轻不明显 ($P>0.05$)。见表 1、2。

2.2 特异性免疫治疗对脾脏组织中 IL-4、IL-10、IFN- γ mRNA 表达的影响 与正常对照组相比,卵清组和丙酮组 AD 小鼠 IL-4、IL-10 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值均升高,IFN- γ $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值降低 ($P<0.01$)。SIT 较治疗前,IL-4、IL-10 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值均降低,IFN- γ $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值升高 ($P<0.01$),表明 SIT 能下调脾脏组织中 IL-4 mRNA、IL-10 mRNA

的表达,上调 IFN- γ mRNA 的表达。组内未予治疗小鼠较前无明显变化。见表 3、4。

表 1 AD 模型组内未予干预小鼠血清细胞因子水平变化 (pg/mL)

Tab 1 The levels of serum cytokins in the untreated AD model groups (pg/mL)

分组	IL-4		IL-10		IFN- γ	
	治疗前	未干预组	治疗前	未干预组	治疗前	未干预组
卵清组	56.50 \pm 0.49	55.34 \pm 0.23	20.80 \pm 0.56	19.73 \pm 0.25	8.83 \pm 0.25	9.22 \pm 0.31
丙酮组	53.85 \pm 2.57	52.18 \pm 1.54	19.30 \pm 1.41	18.47 \pm 0.37	9.31 \pm 0.75	10.03 \pm 0.28

表 2 治疗前后小鼠血清细胞因子水平 (pg/mL)

Tab 2 The levels of serum cytokins before and after treatment in the groups (pg/mL)

分组	IL-4		IL-10		IFN- γ	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
对照组	30.06 \pm 0.51	29.83 \pm 0.25	10.07 \pm 0.29	9.77 \pm 0.11	18.50 \pm 0.31	19.05 \pm 1.03
卵清组	56.50 \pm 0.49 ^a	38.41 \pm 0.53 ^b	20.80 \pm 0.56 ^a	14.03 \pm 0.35 ^b	8.83 \pm 0.25 ^a	13.90 \pm 0.18 ^b
丙酮组	53.85 \pm 2.57 ^a	36.97 \pm 1.83 ^b	19.30 \pm 1.41 ^a	13.77 \pm 0.50 ^b	9.31 \pm 0.75 ^a	14.72 \pm 0.38 ^b

a: $P < 0.01$, 与正常对照组相比; b: $P < 0.01$, 与治疗前相比

表 3 治疗前后各组 IL-4、IL-10、IFN- γ mRNA $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值的比较

Tab 3 The $2^{-\Delta\Delta CT}$ values of IL-4, IL-10, IFN- γ mRNA before and after treatment in the groups

分组	IL-4		IL-10		IFN- γ	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
对照组	1.00 \pm 0.00	0.94 \pm 0.05	1.00 \pm 0.00	0.96 \pm 0.11	1.00 \pm 0.00	1.02 \pm 0.08
卵清组	2.28 \pm 0.57 ^a	1.46 \pm 0.78 ^b	3.73 \pm 1.41 ^a	1.89 \pm 0.78 ^b	0.57 \pm 0.09 ^a	0.81 \pm 0.47 ^b
丙酮组	2.13 \pm 0.44 ^a	1.29 \pm 0.83 ^b	3.65 \pm 1.35 ^a	2.72 \pm 0.50 ^b	0.63 \pm 0.75 ^a	0.89 \pm 0.38 ^b

a: $P < 0.01$, 与正常对照组相比; b: $P < 0.01$, 与治疗前相比

表 4 模型组内未予干预小鼠 IL-4、IL-10、IFN- γ mRNA $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值的比较

Tab 4 The $2^{-\Delta\Delta CT}$ values of IL-4, IL-10, IFN- γ mRNA in the untreated AD model groups

分组	IL-4		IL-10		IFN- γ	
	治疗前	未干预组	治疗前	未干预组	治疗前	未干预组
卵清组	2.28 \pm 0.57	2.15 \pm 0.35	3.73 \pm 1.41	3.12 \pm 0.15	0.57 \pm 0.09	0.59 \pm 0.11
丙酮组	2.13 \pm 0.44	2.01 \pm 1.36	3.65 \pm 1.35	3.07 \pm 0.22	0.63 \pm 0.75	0.67 \pm 0.27

3 讨论

AD 发病与免疫失衡有关。其中 Th1/Th2 失衡引起细胞因子分泌异常在 AD 的发展中起重要作用^[6]。Th1 细胞主要分泌 IL-2、IL-12、IFN- γ 等,主要介导细胞免疫及迟发性变态反应,参与细菌或病毒感染的炎症反应。Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 和 IL-13 等,参与以促进嗜酸粒细胞聚集为特征的 IgE 介导的 I 型变态反应^[7]。Th1 和 Th2 之间相互调节、制约,处于动态平衡,维持机体正常的细胞免疫和体液免疫功能,在过敏或变态反应中起重要作用^[8]。Th2 细胞因子在 AD 发病中占优势地位,可以调节肥大细胞在 AD 患者皮损的分布,并促进肥大细胞释放 IgE,进而引起 AD 患者 IgE 水平升高^[9]。IL-4 在 AD 发病机制中是关键的细胞因子,可诱导 B 淋巴细胞生成 IgE,与肥大细胞结合,释放更多的炎性介质,引起更严重的过敏反应。IL-10 具有

很强的抗炎及免疫抑制活性,能够抑制 IL-2、IFN- γ 及促炎因子的产生和释放。IFN- γ 能够抑制 B 细胞分泌 IgE,从而抑制 IgE 水平过高导致的超敏反应。

课题组前期实验中卵清蛋白与丙酮在尘螨致敏小鼠表皮可产生类似人类特应性皮炎的临床及病理改变,血清 IgE 水平升高,与大多数 AD 患者出现皮炎时伴有 IgE 升高的现象相似,提示小鼠 AD 建模成功,脱敏治疗后小鼠临床表现及病理均较之前好转^[5]。

SIT 是避免接触变应原以外唯一能影响变态反应性疾病自然进程的治疗手段^[10]。尽管 SIT 在变应性鼻炎和变应性哮喘的疗效已经得到公认,但对 AD 的应用价值却一直存在争论^[11-12]。在特应性免疫治疗 AD 的疗效判断上,目前大多数研究注重 SIT 对 AD 的安全性治疗对临床参数(如各种湿疹评分系统)的影响,而对有关 SIT 治疗前后血清中相关免

疫学指标的改变研究不多^[13-14]。

本实验选择尘螨预处理小鼠致敏,用卵清蛋白、丙酮两种刺激因子诱导AD小鼠模型,继而用阿罗格脱敏针对AD病因进行免疫治疗。实验结果显示:经特异性免疫治疗后较治疗前,血清IL-4、IL-10水平降低,IFN- γ 水平升高(P 均 <0.01),脾脏组织中IL-4 mRNA、IL-10 mRNA水平下调,IFN- γ mRNA水平上调(P 均 <0.01),提示SIT可促进Th1类细胞因子IFN- γ 的分泌,降低Th2细胞因子IL-4、IL-10的分泌,使其向Th1方向发展,减少Th2型细胞因子合成,具有明显的免疫调节作用,在一定程度上纠正Th1/Th2细胞因子平衡,对AD小鼠有良好的疗效。

本实验制作卵清蛋白和丙酮两种AD动物模型,阿罗格脱敏治疗均有效,因此笔者推测SIT对人类除尘螨外其他变应原引起的特应性皮炎也有一定效果,然而BalB/c小鼠毕竟与人体存在很大的差异,特异性免疫治疗在皮肤科的推广尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] Sehgal V N, Khurana A, Mendiratta V, et al. Atopic dermatitis: clinical connotations, especially a focus on concomitant atopic undertones in immuno-compromised /susceptible genetic and metabolic disorders [J]. Indian J Dermatol, 2016, 61(3):241
- [2] Akkoc T, Akdis M, Akdis A C, et al. Update in the mechanisms of allergen-specific immunotherapy [J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2011, 3(1):11
- [3] Liu F T, Goodarzi H, Chen H Y. IgE, mast cells, and eosinophils in atopic dermatitis[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2011,41(3):298
- [4] Jung T, Stügel G. Atopic dermatitis: therapeutic concepts evolving from new pathophysiological insights[J]. J Allergy Clin Immunol, 2008, 122(6):1074
- [5] 刘欣欣,陈立新,王莹,等.特异性免疫治疗对BALB/c小鼠特异性皮炎模型的疗效观察[J].中国皮肤性病学杂志,2016,30(11):1112
- [6] 雍磊,程相铎,李华信,等.淋巴结注射免疫治疗对特应性皮炎患者血清屋尘螨sIgE、IL-4和IFN- γ 的影响[J].免疫学杂志,2014,4(30):363
- [7] Akkoc T, Akdis M, Akdis A C, et al. Update in the mechanisms of allergen-specific immunotherapy[J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2011, 3(1):11
- [8] Kim C H, Park C D, Lee A Y, et al. Administration of poly(I:C) improved dermatophagoides farinac-induced atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice by the regulation of Th1/Th2 balance[J]. Vaccine, 2012, 30(14):2405
- [9] Eyerich K, Novak N. Immunology of atopic eczema: overcoming the Th1/Th2 paradigm[J]. Allergy, 2013, 68(8): 974
- [10] Larehe M, Akdis C A, Valenta R, et al. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy[J]. Nat Rev Immunol, 2006, 6(8): 761
- [11] Bussmann C, Maintz L, Hart J, et al. Clinical improvement and immunological changes in atopic dermatitis patients undergoing subcutaneous immunotherapy with a house dust mite allergoid: a pilot study[J]. Clin Exp Allergy, 2007, 37(9):1277
- [12] Novak N. Allergen specific immunotherapy for atopic dermatitis [J]. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2007, 7(6):542
- [13] Ring J, Alomar A, Bieber T, et al. Guidelines for treatment of atopic eczema(atopic dermatitis) part II [J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2012, 26(9):1176
- [14] Zhong H, Deng X, Song Z, et al. Immunological changes after ASIT in AD allergen-specific immunotherapy and their potential correlation with clinical response in patients with atopic dermatitis sensitized to house dust mite[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2015, 29(7):1318

(2016-12-05 收稿)

关于医学符号的使用

统计学符号不论用哪种字母,也不论大写或小写一律都用斜体。要注意区分拉丁字母和希腊字母。例如均数的符号是字母 \bar{x} ,卡方的符号是希腊字母 χ^2 ,自由度的符号是希腊文“ ν ”,不是拉丁文“V”。样本的相关系数是英文“ r ”,不能误为希腊文“ γ ”。

化学元素及核素在医学写作时一般多采用符号,都是拉丁字母正体大写。离子态是在右上角用数字加“-”或“+”表示。例如 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 P^{3-} 等等,不采用 Ca^{++} 、 P^{--} 、 Al^{+3} 、 O^{-2} 表示。核素的核子素(质量数)应写在元素符号的左上角,例如 ^{131}I 、 ^{32}P 。表示激发状态的 m 写在右上角,例如: $^{99}\text{Tc}^m$ 、 $^{133}\text{In}^m$ 。在科技论文和专著中不应写核素的中文名称,即不能写成 131 碘、 133 铟 m 等。

近几年分子生物学发展很快,并已渗透到许多学科,大多数分子生物学名词术语的符号已有统一的确定形式,要对符号的来源及其内涵有深刻的了解,使用时不致发生错误,例如:RNA有rRNA(ribosomal RNA)、tRNA(transfer RNA)、mRNA(messenger RNA)3类。r、t、m是表示类型的符号应小写,RNA应大写。

(编辑部)