

• 基础研究论著 •

OVA 致敏 BN 大鼠 IL-17 表达水平的变化*

张丽莉¹, 杨芷菁², 马 雅², 刘志刚², 陈 思^{2△}

(深圳大学: 1. 校医院; 2. 过敏反应与免疫学研究所, 广东深圳 518060)

摘要:目的 研究卵清蛋白(OVA)致敏的 Brown Norway(BN)大鼠外周血中白细胞介素(IL)-17 表达水平的变化, 探讨 IL-17 在鸡蛋所致食物过敏(FA)中的作用。方法 建立 OVA 致敏的大鼠模型(OVA 组), 并以仅给予 PBS 灌胃的大鼠(PBS 组)作为对照, 采用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测各组 IL-17A mRNA 表达水平, 采用 ELISA 法检测各组血浆中 IL-17 蛋白水平。结果 OVA 组 IL-17A mRNA 表达水平显著高于 PBS 组, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 且 OVA 组 IL-17 水平也明显高于 PBS 组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 OVA 诱发 FA 动物模型中可检测到外周血 IL-17 表达水平上升, 提示 IL-17 可能在 FA 的发病过程中起重要作用。

关键词:食物过敏; 卵清蛋白; 白细胞介素 17; Brown Norway 大鼠

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.12.002

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)12-1412-02

Changes of expression of IL-17 in OVA-induced food allergy model in BN rats*

Zhang Lili¹, Yang Zhijing², Ma Ya², Liu Zhigang², Chen Si^{2△}

(1. Hospital of University; 2. Allergy and Immunology Institute, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of IL-17 in OVA-induced food allergy in BN rats and to analyze the effect of IL-17 in egg allergies. Methods OVA-induced food allergy models were established. The PBS-treated rats were served as controls. The expression levels of IL-17A mRNA were detected by real-time quantitative PCR. The corresponding protein levels of IL-17 were measured by ELISA. Results The expression level of IL-17A mRNA in OVA-treated BN rats was significantly higher than that in PBS-treated BN rats ($P < 0.01$). Consistently, the expression of IL-17 protein levels in OVA-treated BN rats was significantly higher than that in PBS-treated BN rats ($P < 0.05$). Conclusion The expression of IL-17 was significantly increased in OVA-induced food allergy model, which implies that IL-17 may play an important role in the mechanism of food allergy.

Key words: food allergy; ovalbumin; interleukin-17; Brown Norway rat

食物过敏(FA)的发病率和流行情况在世界范围内急剧增加, 已被世界卫生组织(WHO)列为 21 世纪重点防治的三大疾病之一。鸡蛋是最常见的诱发 FA 的食物之一, 鸡蛋的过敏原主要在蛋清中, 卵清蛋白(OVA)含量占蛋清中蛋白总量的 50%, 是引起鸡蛋过敏的重要蛋白。本研究建立了 OVA 致敏的 FA 动物模型, 并研究了其外周血白细胞介素(IL)-17 表达水平的变化情况, 以期阐明 FA 的发病机制提供新资料, 现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 动物模型 27 只健康 4 周龄 SPF 级雌性 Brown-Norway (BN)大鼠, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。饲养于深圳市药检所 SPF 级动物房。动物以不含 OVA 的标准饲料及灭菌双蒸水适应性喂养 1 周, 饲养温度(23±3)℃, 湿度 70%~78%, 12 h 自动昼夜循环。采用随机分组法将动物分为 OVA 组($n=17$)和 PBS 组($n=10$), OVA 组每天用 0.1 mol/L 无菌 PBS 稀释的 OVA 1 mg 灌胃, 共 6 周, PBS 组每天用 PBS 液 1 mL 灌胃, 共 6 周。

1.2 方 法

1.2.1 外周血单个核细胞的提取、RNA 的提取和 cDNA 的合成 建模成功后, 从大鼠尾静脉取血, 肝素抗凝后按常规

方法分离外周血单个核细胞(PBMC)。应用 TRIzol 试剂盒(Gibco BRL 公司)提取 RNA。然后应用随机引物和反转录酶试剂盒(Gibco BRL 公司)合成 cDNA 第 1 链。并经大鼠内参 β -actin 的实时荧光定量 PCR(RT-PCR)确定所合成 cDNA 的质量。

1.2.2 SYBR Green I RT-PCR 从大鼠 IL-17A 基因序列(NM_001106897.1)中设计引物, IL-17A 上游引物: 5'-ACA GTG AAG GCA GCG GTA CT-3'; 下游引物: 5'-GCT CAG AGT CCA GGG TGA AG-3'; 片段大小为 177 bp, 引物由上海生工合成。利用 SYBR Green I 染料检测各组 IL-17A 基因表达情况, 并将 β -actin 基因作为内参。PCR 反应体系共 25 μ L, 包括 2.5×Real Mastr Mix 试剂(Tiangen 公司)11.25 μ L, 0.4 mmol/L 上、下游引物以及 1 μ L cDNA。PCR 反应条件: 95℃ 2 min 变性后, 共进行 45 个循环扩增, 每一循环包括 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 82℃ 1 s。反应在 Chromo 4 荧光定量 PCR 仪(BIO-RAD 公司)中进行。采用相对定量法分别分析各组 IL-17A 基因表达情况, 以 β -actin 为内参, 利用 Ct 值计算各组 PBMC 中 IL-17A 相对 mRNA 表达量, 其计算公式为: $2^{-\Delta Ct} \times 100\%$, 其中 $\Delta Ct = Ct_{(IL-17)} - Ct_{(\beta-actin)}$ 。

1.2.3 血浆中 OVA-IgE 和 IL-17 的检测 收集各组血浆, 采

* 基金项目: 深圳市科技研发资金基础研究计划一般项目(JC201105170643A)。 △ 通讯作者, E-mail: chensi@szu.edu.cn。

用 ELISA 法检测 OVA-IgE 和 IL-17 含量,试剂盒均为美国 R&D 公司生产,操作参照试剂盒说明书,若 OVA 组 OVA-IgE 含量达到 PBS 组 OVA-IgE 含量平均值加 3 倍标准差之和,则视为建模成功。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件包,所有检测数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,并采用 *t* 检验进行统计学分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OVA 诱导 FA 动物模型的建立 采用 ELISA 法检测致敏 6 周后 OVA 组和 PBS 组外周血特异性 OVA-IgE 的表达,结果显示:实验组 OVA-IgE 含量为 (11.58 ± 0.18) pg/mL,明显高于 PBS 组 $[(6.40 \pm 0.06)$ pg/mL],差异有统计学意义 ($P < 0.01$),说明采用 OVA 灌胃 6 周后已成功建立 OVA 致敏的 FA 动物模型。

2.2 各组 IL-17A mRNA 表达水平 OVA 组 PBMC 中 IL-17A mRNA 相对表达量为 $(11.79 \pm 3.40)\%$,PBS 组 IL-17A mRNA 相对表达量为 $(4.32 \pm 1.46)\%$,OVA 组明显高于 PBS 组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),见图 1。

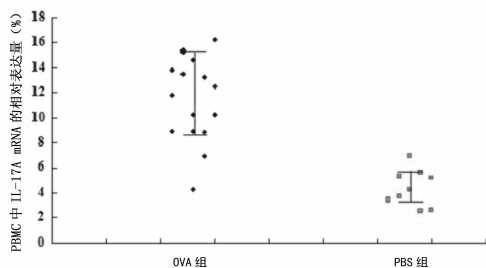


图 1 各组 PBMC 中 IL-17A mRNA 的表达水平

2.3 各组 IL-17 蛋白表达水平 OVA 组血浆 IL-17 蛋白表达量为 (2.95 ± 0.76) pg/mL,高于 PBS 组 $[(2.50 \pm 0.80)$ pg/mL],差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 2。

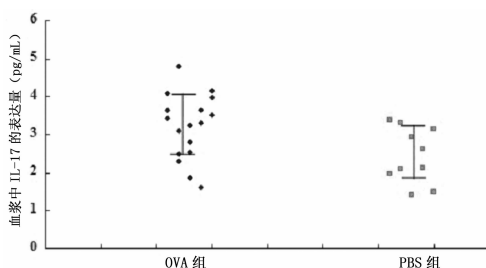


图 2 各组外周血中 IL-17 蛋白表达水平

3 讨论

90% 以上的 FA 是由花生、坚果类、鱼类、甲壳类、乳类、小麦、大豆和蛋类等过敏原引起,鸡蛋是最常见的一种过敏原。国外有报道鸡蛋过敏占婴幼儿和儿童 FA 的 35%,占成年人 FA 的 12%^[1],而对儿童 FA 的调查发现,70% 以上的患儿对鸡蛋过敏^[2]。本研究采用 BN 大鼠建立鸡蛋 OVA 致敏的 FA 动物模型,BN 大鼠的优点是对无致敏史的食物不过敏,特异性较高,且具有较高的易感性,是研究 FA 发病机制的理想模型动物^[3-4]。在致敏 6 周后,通过检测外周血 OVA-IgE 的表达水平确定建模成功。

常见的 FA 以 I 型变态反应为主, T 细胞亚群特别是

CD4⁺ T 细胞行为异常在食物过敏原引起的变态反应发病机制中占主导地位,目前对 Th1 与 Th2 亚群失衡的研究较多^[5-7]。“卫生假说”认为,幼年时期过少暴露于细菌等病原体,导致对 Th1 细胞克隆的刺激不充分,从而不能与 Th2 细胞克隆的扩增相平衡,最终导致过敏易感体质^[5]。国内外不同课题组在对 FA 动物模型的研究中也发现,在致敏动物中,Th2 型细胞因子的表达占优势^[6-7],Th2 型细胞的优势表达随后诱导 B 细胞产生大量 IgE,从而诱发机体产生过敏性炎症反应。

目前,FA 的发病机制尚未完全明确,细胞免疫尤其是 Th 细胞亚群平衡的紊乱与 FA 的发生、发展有直接关系。Th17 可能在 FA 中发挥重要作用,Th17 细胞主要分泌细胞因子 IL-17,其主要生物学功能是促进炎症反应。目前的研究表明,IL-17 与类风湿关节炎^[8]、多发性硬化^[9]、炎症性肠炎^[10]等 Th1 细胞介导的自身免疫性疾病密切相关。近年来,也有越来越多的证据表明,IL-17 在 Th2 功能失调所引起的过敏性疾病如过敏性哮喘中可能也发挥了重要的作用^[11]。FA 是以 Th2 功能亢进为特征的疾病,目前关于 IL-17 在其中的作用的研究工作开展较少,只有 Perrier 等^[12]曾报道在 OVA 致敏的 BALB/c 小鼠中,Th2 型细胞因子(IL-5 和 IL-13)优势表达的同时,也出现了 IL-17 水平的增高,而 IL-17 在 FA 中的作用机制国内外尚未见报道。本研究在前期建立的致敏动物模型基础上,首次从 mRNA 水平和蛋白水平检测了外周血中 IL-17 的表达量。RT-PCR 检测结果表明,OVA 组的 IL-17A mRNA 表达量明显高于 PBS 组 ($P < 0.01$),同时,ELISA 法结果证实了 OVA 组 IL-17 蛋白水平也高于 PBS 组 ($P < 0.05$),差异均有统计学意义。

综上所述,本研究首次证实了 OVA 致敏 BN 大鼠外周血高表达 IL-17,说明 IL-17 可能参与了 FA 的发生,但其具体机制尚不清楚,有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Poms RE, Klein CL, Anklam E. Methods for allergen analysis in food: a review[J]. Food Addit Contam, 2004, 21(1): 1-31.
- [2] 杨珍,陈同辛,周伟. 上海地区 720 例特应质儿童食物过敏临床分析[J]. 临床儿科杂志, 2009, 27(5): 458-461.
- [3] 黄娟,钟燕,蔡威,等. 经口致敏食物过敏大鼠模型的建立[J]. 卫生研究, 2009, 38(1): 57-59.
- [4] 吕相征,刘秀梅,杨晓光. BN 大鼠食物过敏动物模型的实验研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2005, 17(2): 103-105.
- [5] Vandenbulcke L, Bachert C, Van Cauwenberge P, et al. The innate immune system and its role in allergic disorders[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2006, 139(2): 159-165.
- [6] Mathias CB, Hobson SA, Garcia-Lloret M, et al. IgE-mediated systemic anaphylaxis and impaired tolerance to food antigens in mice with enhanced IL-4 receptor signaling[J]. J Allergy Clin Immunol, 2011, 127(3): 795-805.
- [7] Calhoun KH, Schofield ML. IgE-mediated food allergy[J]. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg, 2010, 18(3): 182-186.
- [8] Kohno M, Tsutsumi A, Matsui H, et al. Interleukin-17 gene expression in patients with rheumatoid arthritis[J]. Mod Rheumatol, 2008, 18(1): 15-22.
- [9] Ishizu T, Osoegawa M, Mei FJ, et al. Intrathecal (下转第 1416 页)

实验结果表明,第 9 组 HUC-MSC 冻存方法为最佳方法,即使用 90%血清+10%DMSO 为冻存液,将细胞配成 10^6 /mL 的浓度置于厚壁聚乙烯泡沫盒中,立即封存置 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 24 h,再投入液氮中冻存。目前公认的最佳降温速率为 $-1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$,而在分阶段降温过程中,特别是 $-20\sim-4\text{ }^\circ\text{C}$ 区间,细胞最易受损^[13]。第 9 组细胞置于厚壁聚乙烯泡沫中直接放入 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱冻存,其降温速率接近于最佳降温速率,故而活率、回收率及 CD44 积分值为最佳,经统计学分析,9 组细胞中仅第 9 组 $P<0.01$,差异非常显著。

本次实验冻存复苏后,活率最差组为第 5、7 组,均为 88%;回收率最差组为第 3、5、7 组,分别为 61%、69%、73%。分析第 3、5、7 组冻存方法,其共同点为均采用 10^7 /mL 的冻存浓度,可以看出 HUC-MSC 的冻存细胞浓度大于或等于 10^7 /mL 时影响冻存效果。而采用 10^5 、 10^6 /mL 的细胞冻存浓度冻存,复苏后所得细胞活率和回收率均大于或等于 90%。据此分析 HUC-MSC 的冻存细胞浓度大于或等于 10^7 /mL 时,冻存后对细胞的活率和回收率有较大影响,冻存效果较差。

实验结果还表明,冻存效果相对较好的第 1、2、4、6、8、9 组的细胞活率和回收率都在 90%以上。说明除了冻存细胞浓度因素外,不同的冻存液、冻存温度、冻存时间等因素对细胞的冻存效果没有较大的、较为明显的影响。

此外,冻存实验前后,HUC-MSC 的免疫抗原 CD44 均显色为阳性,CD34 均为阴性,说明 HUC-MSC 的冻存不改变细胞的免疫抗原 CD44 和 CD34,冻存后的 HUC-MSC 依然能够保持其原有的免疫学表面抗原标志 CD44^+ ;但各组之间不同的冻存方法,其 CD44 积分值均较冻存前有所降低,部分组 HUC-MSC 的 CD44 信号强度有所减弱,由此说明 HUC-MSC 的冻存会降低部分细胞的 CD44 信号强度。9 组细胞 CD44 积分值经统计学分析,第 1、2、3、4、6、7、8 组间差异无统计学意义 ($P>0.05$),表现为积分值全部降低较多;第 5 组积分值略增高 ($P<0.05$);第 9 组在 9 组中积分值最高 ($P<0.05$),采用第 9 组冻存方法的 HUC-MSC CD44 积分值为 221,其积分值最接近冻存前的间充质干细胞 CD44 信号强度(积分值为 251)。说明第 9 组细胞所采用的冻存方法能够相对较好地保持间充质干细胞原有的 CD44 信号强度,该组冻存方法为最佳冻存方法。

依据实验结果,笔者认为使用 90%血清+10%DMSO 作为冻存液,将细胞配成 10^6 /mL 及以下浓度置于厚壁聚乙烯泡沫盒中,立即封存置 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 24 h,再投入液氮中冻存为最佳冻

存方法。选择合适的冻存方法是保证冻存效果的关键所在。对间充质干细胞冻存方法的单一影响因素研究较多,但对于多因素多水平的研究较少,此实验为 HUC-MSC 冻存方法的比较和选择提供了实验依据。

参考文献

- [1] Guo L, Ying F, Meng HQ, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells into dopaminergic neuron-like cells in vitro[J]. Biomed Environ Sci, 2005, 18(1): 36-42.
- [2] 沈华. 脐带间充质干细胞的研究进展[J]. 中国美容医学, 2009, 16(8): 1158-1160.
- [3] Qiao C, Xu W, Zhu W, et al. Human mesenchymal stem cells isolated from the umbilical cord[J]. Cell Biol Int, 2008, 32(1): 8-15.
- [4] 孟强, 赵树铭. 提高脐造血干细胞移植归巢的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(3): 366-368.
- [5] Baksh D, Song I, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cell: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy[J]. J Cell Mol Med, 2004, 8(3): 301-316.
- [6] 刘民培, 郭晓钟, 李亚东. 现代临床实验研究技术[M]. 北京: 清华大学出版社, 2008.
- [7] 张炳强, 于丽, 石娟, 等. 人脐带间充质干细胞分离培养方法的优化[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2009, 18(2): 123-127.
- [8] 袁源, 杨树源, 韩忠朝, 等. 人脐带间充质干细胞分离纯化及基本生物学特性研究[J]. 中华实验外科杂志, 2008, 23(1): 118.
- [9] 宋建新, 朱红艳, 蒋雅光, 等. 骨髓标本放置时间对流式细胞术白血病免疫分型检测结果的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(3): 391-392.
- [10] 窦慧慧, 郭文君, 于丽, 等. 人脐带间充质干细胞分离培养方法的研究[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2010, 19(2): 186-189.
- [11] Tiu R, Gondek L, O'Keefe C, et al. Clonality of the stem cell compartment during evolution of myelodysplastic syndromes and other bone marrow failure syndromes[J]. Leukemia, 2010, 21(8): 1648-1657.
- [12] Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, et al. Identification of mesenchymal stem cells in human first trimester fetal blood, and bone marrow[J]. Blood, 2010, 98(8): 2396-2402.
- [13] 雷从民, 孟沛霖. 小鼠骨髓造血干细胞冷冻损伤的实验研究[J]. 中华血液学杂志, 1998, 10(6): 289-291.

(收稿日期: 2011-11-04)

(上接第 1413 页)

activation of the IL-17/IL-8 axis in opticospinal multiple sclerosis [J]. Brain, 2005, 128(Pt 5): 988-1002.

- [10] Veldhoen M, Stockinger B. TGF β 1, a 'Jack of all trades': the link with pro-inflammatory IL-17-producing T cells[J]. Trends Immunol, 2006, 27(8): 358-361.
- [11] He R, Oyoshi MK, Jin H, et al. Epicutaneous antigen exposure induces a Th17 response that drives airway inflammation after inha-

lation challenge[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(40): 15817-15822.

- [12] Perrier C, Thierry AC, Mercenier A, et al. Allergen-specific antibody and cytokine responses, mast cell reactivity and intestinal permeability upon oral challenge of sensitized and tolerized mice [J]. Clin Exp Allergy, 2010, 40(1): 153-162.

(收稿日期: 2012-04-23)