

DOI:10. 11798/j. issn. 1007-1520. 201501002

· 鼻 - 鼻窦专科 ·

IL-9 在变应性鼻炎小鼠模型鼻黏膜中的表达研究

赵 鹤,曹志伟,顾兆伟,柳 萌,吴雄英
(中国医科大学附属盛京医院 耳鼻咽喉科,辽宁 沈阳 110004)

摘 要: **目的** 探讨 IL-9 在小鼠变应性鼻炎 (allergic rhinitis, AR) 发生发展中的作用。**方法** 利用 Balb/c 小鼠建立卵清蛋白致敏的变应性小鼠模型,按激发时间分为 6 组 (30 min、2 h、6 h、12 h、24 h、48 h),同时使用生理盐水作为对照组,每组各 5 只小鼠。取各组小鼠鼻黏膜组织,利用免疫组化 SABC 法检测 IL-9 在各组小鼠鼻黏膜组织中的表达情况。**结果** IL-9 在对照组以及实验组中均有表达,且实验组明显高于对照组,两组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);IL-9 在实验组中随激发时间表达先增高后下降。**结论** IL-9 在小鼠变应性鼻炎中的表达与变应性鼻炎发病机制存在着一定的相互关联。

关 键 词: 变应性鼻炎;变应性鼻炎小鼠模型;IL-9 Balb/c 小鼠
中图分类号:Q786;R765. 21 文献标识码:A 文章编号:1007 - 1520(2015)01 - 0004 - 04

Expression of IL-9 in nasal mucosa of mouse model with allergic rhinitis

ZHAO He, CAO Zhi-wei, GU Zhao-wei, LIU Meng, WU Xiong-ying
(Department of Otolaryngology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China)

Abstract: **Objective** To investigate the role of IL-9 in the development of allergic rhinitis in mice. **Methods** Balb/c mice were used for establishing the animal model of allergic rhinitis with ovalbumin sensitization. According to the excitation time course, all the model mice were divided into 6 groups (5 mice in each group), i. e., groups of 30-min, two-hour, 6-hour, 12-hou, 24-hour, and 48-hour. Instead of ovalbumin, normal saline was applied to the mice of the control group. Expression of IL-9 in the nasal mucosa was detected by immunohistochemical SABC method. **Results** Expression of IL-9 could be detected in both the control and experimental groups. The expression level of IL-9 in the experimental group was higher than that in the control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The expression of IL-9 in the experimental groups showed a trend increased first and decreased afterwards with excitation time extension. **Conclusion** Expression of IL-9 may have correlation with pathogenesis of allergic rhinitis in mice.

Key words: Rhinitis, allergic; Animal Model, mouse; IL-9; Balb/c mouse

变应性鼻炎 (allergic rhinitis, AR) 在我国发病率较高,主要以鼻痒、喷嚏、清水样涕为主要症状,且常反复发作,严重影响人们生活质量。目前,学者们致力于研究其发病机制^[1-2],近来研究发现,IL-9 也是炎症介质中的重要因子,IL-9 在哮喘中有所表达,并参与到哮喘的发生发展^[3-4]。目前认为变应性鼻炎和哮喘是同一气道同一疾病,因此,笔者拟利用小鼠建立变应性鼻炎小鼠模型,检测 IL-9 在小鼠鼻黏膜组织中的表达情况进而研究其在变应性鼻炎发生发

展中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

6~8 周龄无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) Balb/c 小鼠 35 只,体重 18~20 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司。无菌饲料 (北京华阜康生物科技股份有限公司);鸡卵清蛋白 (ovalbumin, OVA) (美国, Sigma-Aldrich, A5253);氢氧化铝粉 (分析纯,购自天津市大茂化学试剂厂)。

1.2 模型建立

小鼠在屏障系统中饲养,将小鼠按照激发时间随机分为 6 个实验组 (30 min、2 h、6 h、12 h、24 h、

基金项目:国家自然科学基金青年项目 (81200730);辽宁省科技计划项目 (2011404013 - 10);辽宁“百千万人才工程”培养经费资助 (辽人社 [2011] 377 号, 2011921042)。
作者简介:赵 鹤,男,硕士研究生,住院医师,助教。
通信作者:曹志伟, Email: caozw@sj-hospital.org

48 h),每组各 5 只。实验组使用卵蛋白致敏,将 10 μ g卵清蛋白 + 10 mg 氢氧化铝溶于 0.1 ml 生理盐水中,分别于造模的第 1、3、5、7、9、11、13、15 天对实验组小鼠进行腹腔注射,第 16 天起至第 27 天每日分别用 10 μ g 卵清蛋白溶于 10 μ l 生理盐水中,对小鼠进行滴鼻,每个鼻孔 10 μ l,连续激发 11 d。对照组均同期使用生理盐水替代。

1.3 模型评价

通过激发,动物模型会出现打喷嚏、挠鼻、抓脸、鼻溢等症状,末次激发后观察 30 min。计分标准:1 分:鼻痒;轻摩擦鼻几次;2 分:抓挠鼻面部不止;3 分:到处擦磨。喷嚏:1 ~ 3 个为 1 分,4 ~ 10 个为 2 分,11 个以上为 3 分;清涕:流到前鼻孔为 1 分,超过前鼻孔为 2 分,流涕满面为 3 分。以叠加法记录总分,总分超过 5 分即为建模成功。应用上述计分标准计分,实验组均大于 5 分,对照组均小于 5 分。

1.4 取材与蜡块切片

6 个实验组分别于末次激发后 30 min、2 h、6 h、12 h、24 h、48 h 处死,对照组于 27 d 直接处死。所有小鼠均采用颈椎脱位法,促死后取下头部,去皮,剪去下颌骨,以眼后缘为界,去除小鼠脑部组织,剩余部分直接固定。

取下组织后放入乙醇福尔马林混合固定液固定 1 周后流水冲洗 24 h,将组织放入 5% 甲酸中脱钙 4 周,其中每 3 日更换甲酸。甲酸脱钙后流水冲洗 24 h。继续依次放入 75% 乙醇 24 h、85% 乙醇 24 h、95% 乙醇 24 h、95% 乙醇 24 h、无水乙醇 24 h、无水乙醇 24 h、二甲苯 24 h、二甲苯 8 h。浸完二甲苯后放入液体蜡 12 h 后包埋成蜡块。蜡块制作完成后,行石蜡切片,采取 2 μ m 厚度切片。

1.5 HE 染色

切片后,70℃烤箱烘烤 12 h 后,依次放入二甲苯 20 min、二甲苯 30 min、无水乙醇 10 min、95% 乙醇 5 min、85% 乙醇 5 min,紧接自来水冲洗片刻后苏木素染色 10 min。苏木素染色后流水冲洗 15 min,紧接伊红染色 90 s,自来水冲洗片刻,依次放入 95% 乙醇片刻、95% 乙醇片刻、无水乙醇 10 min、无水乙醇 10 min、二甲苯 10 min、二甲苯 10 min。二甲苯结束后树胶封片,镜检。镜下可见实验组小鼠鼻甲黏膜肿胀,嗜酸细胞浸润,对照组未见明显黏膜肿胀及嗜酸性粒细胞浸润,说明造模成功。

1.6 免疫组织化学染色

采用免疫组化 SABC 法。石蜡切片常规脱蜡、水化,3% 过氧化氢溶液阻断内源性过氧化物酶,抗原修复,滴加兔抗鼠 IL-9 多克隆抗体,工作浓度为 1:400。IL-9 多克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司,SABC 检验试剂盒以及 DAB 染色试剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司。按说明书配好 DAB 染色剂,显微镜下将染色剂滴入切片组织,镜下观察,待细胞膜和胞浆出现棕黄色颗粒后自来水冲洗切片终止染色,以细胞膜和胞浆出现棕黄色颗粒为阳性染色。免疫组化切片每张任选 5 个高倍镜视野($\times 400$)相机拍照后输入计算机存储,以 IPP 5.0 图像分析软件进行图像分析处理,计算累计光密度值。

1.7 统计学方法

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组均数间的差异用 SPSS 13.0 软件进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

IL-9 免疫反应阳性表达为细胞浆和细胞膜呈黄褐色。其表达主要在鼻黏膜上皮细胞、固有层炎性细胞及黏膜下层腺体的细胞和胞浆内。IL-9 在各组的表达具体见表 1。

表 1 IL-9 在各组中平均光密度的表达情况(只, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	平均光密度
实验 30 min *	5	65.17 $\pm$ 3.10
实验 2 h *	5	81.26 $\pm$ 2.18
实验 6 h *	5	60.22 $\pm$ 3.33
实验 12 h *	5	41.13 $\pm$ 2.97
实验 24 h *	5	40.92 $\pm$ 2.55
实验 48 h *	5	39.91 $\pm$ 3.01
对照组	5	10.52 $\pm$ 2.09

注: * 与对照组相比, $P < 0.05$

各组鼻黏膜组织中均有 IL-9 的表达。IL-9 在实验组 30 min 中的平均光密度为 65.17 $\pm$ 3.10,在实验组 2 h 中的平均光密度为 81.26 $\pm$ 2.18,然后呈逐渐下降趋势。IL-9 蛋白表达较高,颜色较深,对照组表达极低,因而只有淡背景色。在实验组中,随着时间的延长 IL-9 的表达先呈上升趋势后呈下降趋势。实验组明显高于对照组,且差异具有统计学意义($P < 0.05$)(图 1 ~ 3)。

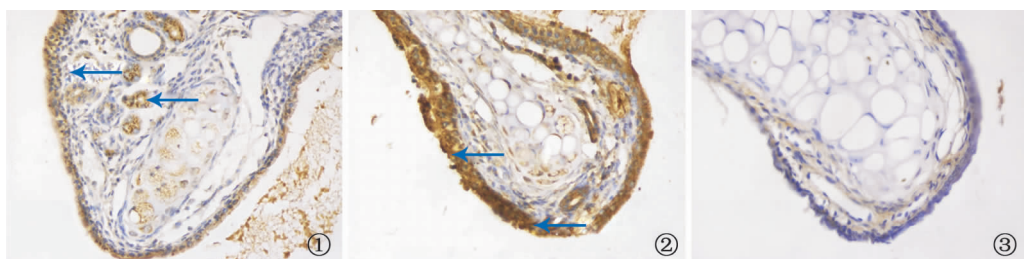


图1 IL-9在实验组小鼠鼻黏膜组织30 min中的表达(免疫组化 $\times 400$) ($\uparrow$ 示阳性表达) 图2 IL-9在实验组小鼠鼻黏膜组织2 h中的表达(免疫组化 $\times 400$) ($\uparrow$ 示阳性表达) 图3 IL-9在对照组中的表达(免疫组化 $\times 400$)

3 讨论

变应性鼻炎是以嗜酸性粒细胞及肥大细胞浸润为特点的I型变态反应。在变应性鼻炎中,Th细胞以及其分泌的细胞因子在嗜酸细胞的迁移、凋亡以及功能的调节上起到重要作用。Th2细胞分泌细胞因子IL-4、IL-13等参与体液免疫,而Th1细胞则介导细胞免疫,两者相互抑制^[1,5]。随着研究的不断深入,越来越多的细胞因子进入学者的视线,如IL-9、IL10、IL-17等。

最初,IL-9被认为是在鼠体内刺激T细胞和肥大细胞的生长因子,近来在鼠模型以及人体实验中逐渐扩展了笔者对IL-9的了解,有研究在哮喘患者支气管活检组织中发现了IL-9mRNA的高水平表达^[6],过度表达IL-9的转基因小鼠模型也在抗原刺激的作用下表现出高气道反应性,嗜酸细胞浸润以及IgE的大量生成等哮喘模型的表现。而IL-9基因敲出的小鼠模型或者应用IL-9中和抗体的实验则可以得到逆转气道高反应性,减少酸性细胞浸润等结果^[7-8]。上述实验证实了IL-9在哮喘的发病过程中对抗原反应的支持以及其在免疫调节中起到的重要作用。

国际上认为,哮喘与变应性鼻炎为“同一气道,同一疾病”,因而IL-9同样很可能参与变应性鼻炎的发生发展。目前,尚无明确报道IL-9在变应性鼻炎的发生发展中的表达及作用。

本组实验发现,IL-9蛋白在变应性鼻炎小鼠鼻黏膜上皮及腺体周围呈高表达,明显高于对照组,并且随时间的推移先升高后下降。IL-9由Th9细胞分泌,并且具有多种生物学功能^[9],是否Th9细胞在变应性鼻炎小鼠鼻黏膜中大量表达导致IL-9高表达还是基因调控导致IL-9高表达存在疑惑。从IL-17及Th17的表达及其作用推断^[10-15],笔者认为Th9细胞在变应性鼻炎小鼠鼻黏膜中很可能呈高表

达,并且很有可能分泌IL-9及其他因子参与变应性鼻炎的发生发展,同时很有可能是基因调控导致,后续将通过进一步实验研究IL-9表达升高的机制。

众所周知,嗜酸性粒细胞及肥大细胞浸润同样是变应性鼻炎的又一特征。嗜酸性粒细胞及肥大细胞主要集中在变应性鼻炎小鼠鼻黏膜上皮及腺体血管周围。研究发现,IL-10在变应性鼻炎小鼠模型中抑制嗜酸性粒细胞及肥大细胞的表达,进而抑制变应性鼻炎的发生发展^[16],抑制IL-9的表达是否能同样抑制嗜酸性粒细胞及肥大细胞的表达。实验结果显示,IL-9促进变应性鼻炎的发生发展,抑制IL-9的表达很有可能抑制嗜酸性粒细胞及肥大细胞的表达,进而抑制变应性鼻炎的发展。每种蛋白的表达都有控制其表达的mRNA,IL-9在变应性鼻炎小鼠鼻黏膜中高表达推断mRNA同样呈高表达,与IL-9蛋白表达趋势一致。

总之,笔者通过实验证明IL-9参与到变应性鼻炎的发生发展。后续将进一步深入实验,证实上述推断,进而深入探讨变应性鼻炎的发病机制,为变应性鼻炎的治疗提供新的思路。

参考文献:

- [1] Liu M, Zheng S, Wang X, et al. Regulatory roles of IL-12, IL-4 and IFN-gamma on IgE synthesis in atopic patients [J]. Chin Med J (Engl), 1999, 112(6): 550-553.
- [2] 吴兴宇,余文胜. SOCS₃和Eotaxin蛋白及其mRNA在变应性鼻炎鼻黏膜组织中的表达[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2014, 20(1): 59-62.
- [3] Ying S, Meng Q, Kay AB, et al. Elevated expression of interleukin-9 mRNA in the bronchial mucosa of atopic asthmatics and allergen-induced cutaneous late-phase reaction: relationships to eosinophils, mast cells and T lymphocytes [J]. Clin Exp Allergy, 2002, 32(6): 866-871.
- [4] Kim MS, Cho KA, Cho YJ, et al. Effects of Interleukin-9 Blockade on Chronic Airway Inflammation in Murine Asthma Models [J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2013, 5(4): 197-206.

[5] Malmhall C, Bossios A, Pullerits T, et al. Effects of pollen and nasal glucocorticoid on FOXP³⁺, GATA-³⁺ and T-bet + cells in allergic rhinitis[J]. Allergy, 2007, 62(9):1007 – 1013.

[6] Parker JC, Thavagnanam S, Skibinski G, et al. Chronic IL9 and IL-13 exposure leads to an altered differentiation of ciliated cells in a well-differentiated paediatric bronchial epithelial cell model[J]. PLoS One, 2013, 8(5):e61023.

[7] Sharma SK, Almeida FA, Kierstein S, et al. Systemic FasL Neutralization Increases Eosinophilic Inflammation in a Mouse Model of Asthma[J]. Allergy, 2012, 67(3):328 – 335.

[8] Oh CK, Leigh R, McLaurin KK, et al. A randomized, controlled trial to evaluate the effect of an anti-interleukin-9 monoclonal antibody in adults with uncontrolled asthma[J]. Respir Res, 2013,19(14):93.

[9] Stassen M, Schmitt E, Bopp T. From interleukin-9 to T helper 9 cells[J]. Ann N Y Acad Sci, 2012, 1247(1):56 – 68.

[10] Burgler S, Ouaked N, Bassin C, et al. Differentiation and functional analysis of human T(H)17 cells[J]. J Allergy Clin Immunol, 2009, 15(3):588 – 595.

[11] Ishigame H, Kakuta S, Nagai T, et al. Differential roles of interleukin-17A and-17 F in host defense against mucoepithelial bacterial infection and allergic responses [J]. Immunity, 2009, 15(1):108 – 119.

[12] Quan SH, Zhang YL, Han DH, et al. Contribution of interleukin 17A to the development and regulation of allergic inflammation in a murine allergic rhinitis model[J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2012, 15(5):342 – 350.

[13] Wakashin H, Hirose K, Maezawa Y, et al. IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2008, 15(10):1023 – 1032.

[14] Zhao J, Lloyd CM, Noble A. Th17 responses in chronic allergic airway inflammation abrogate regulatory T-cell-mediated tolerance and contribute to airway remodeling[J]. Mucosal Immunol, 2013, 15(2):335 – 346.

[15] Cao PP, Li HB, Wang BF, et al. Distinct immunopathologic characteristics of various types of chronic rhinosinusitis in adult Chinese[J]. J Allergy Clin Immunol, 2009, 15(3):478 – 484.

[16] Wang SB, Deng YQ, Ren J, et al. Exogenous interleukin-10 alleviates allergic inflammation but inhibits local interleukin-10 expression in a mouse allergic rhinitis model[J]. BMC Immunol, 2014, 15(1):9.

(修回日期:2014 – 09 – 25)

· 消息 ·

《中国耳鼻咽喉颅底外科杂志》2015 年征订启事

《中国耳鼻咽喉颅底外科杂志》是中华人民共和国教育部主管、中南大学主办、中南大学湘雅医院承办、国内外公开发行的医学学术性期刊。本刊以耳鼻咽喉颅底外科工作者为主要读者对象,重点报道耳鼻咽喉颅底外科领域内领先的科研成果、基础理论研究及先进的临床诊疗经验。本刊设有论著、短篇论著、临床报道、经验交流、技术与方法、病案报道、综述等栏目。本刊为双月刊,定价12.00元,全年72.00元,全国各地邮局均可订阅,邮发代号42 – 171。本刊编辑部可免费为读者代办邮购。通讯地址:湖南省长沙市湘雅路87号中南大学湘雅医院《中国耳鼻咽喉颅底外科杂志》编辑部(湘雅医院内),邮编:410008,投稿网址: <http://www.xyosbs.com>,Email: xyent@126.com,电话(传真):0731 – 84327469;0731 – 84327210。欢迎踊跃投稿、积极订阅。