

白梦天,李韵,胡竹林. 不同条件下建立过敏性结膜炎小鼠模型的比较研究[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(3): 330-337.
Bai MT, Li Y, Hu ZL. Comparison of mouse models of allergic conjunctivitis under different conditions [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(3): 330-337.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.03.006

不同条件下建立过敏性结膜炎小鼠模型的比较研究

白梦天^{1,2,3,4}, 李韵⁵, 胡竹林^{1,2,3,4*}

(1. 昆明医科大学第四附属医院眼科, 昆明 650032; 2. 云南省眼科研究所, 昆明 650032; 3. 云南省第二人民医院眼科, 昆明 650032; 4. 姚克专家工作站, 昆明 650032; 5. 昆明医科大学第一附属医院, 昆明 650032)

【摘要】 目的 分别在不同抗原、不同激发途径、不同小鼠周龄条件下,建立过敏性结膜炎小鼠模型,通过比较免疫应答状态,筛选最佳致敏条件,为过敏性结膜炎小鼠动物模型的建立提供新的思路和方法。方法 SPF级 Balb/c 小鼠 65 只,在不同抗原(卵清蛋白、豚草花粉、屋尘螨),不同激发途径(灌胃、雾化吸入、皮下注射),不同小鼠周龄(1周龄、2周龄、3周龄、8周龄)条件下构建过敏性结膜炎小鼠动物模型。RT-qPCR 检测小鼠结膜组织中 CCL5 mRNA、IL-17 mRNA 相对表达水平,流式细胞术检测脾脏单细胞悬液 IL-17 占 CD4⁺T 细胞百分比。结果 同阴性对照组比较,卵清蛋白组、屋尘螨组、豚草花粉组 IL-17 百分比、CCL5 mRNA 及 IL-17 mRNA 表达均上升,其中以豚草花粉组上升的最为显著。同阴性对照组比较,皮下注射组、灌胃组、雾化吸入组、阳性对照组 IL-17 百分比、IL-17 mRNA 表达均上升,CCL5 mRNA 在灌胃组中的表达与阴性对照组接近,皮下注射组的表达水平更接近阳性对照组。1周龄、2周龄组小鼠 IL-17 百分比、CCL5 mRNA、IL-17 mRNA 表达水平较为接近,但显著低于3周龄、8周龄组小鼠。结论 豚草花粉在构建过敏性结膜炎小鼠动物模型中具有更好的致敏性。皮下注射法激发抗原在过敏性结膜炎小鼠动物模型构造中可取得较满意效果,尽管未见明显眼部症状及体征,但全身和局部均呈致敏状态。3周龄 Balb/c 小鼠免疫应答反应已较为接近成年 Balb/c 小鼠。

【关键词】 过敏性结膜炎;白介素 17;屋尘螨;卵清蛋白;豚草花粉

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 03-0330-08

Comparison of mouse models of allergic conjunctivitis under different conditions

BAI Mengtian^{1,2,3,4}, LI Yun⁵, HU Zhulin^{1,2,3,4*}

(1. Department of Ophthalmology, Fourth Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, China.

2. Yunnan Eye institute, Kunming 650032. 3. Yunnan Second People's Hospital, Kunming 650032.

4. Expert workstation of Yao Ke, Kunming 650032. 5. the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032)

Corresponding author: HU Zhulin. E-mail: hzl77@263.net

【Abstract】 Objective To establish a mouse model of allergic conjunctivitis by comparison of different antigens, routes of administration, and ages of mice. We compared their immune response status and screened for optimal sensitization conditions to provide new ideas and method to establish mouse models of allergic conjunctivitis. **Methods** Sixty-five SPF Balb/c mice were selected to establish allergic conjunctivitis models using different antigens (ovalbumin,

【基金项目】 云南省眼科疾病防治研究重点实验室(2017DG008), 云南省第二人民医院白内障与眼底疾病防治省创新团队(2017HC010), 云南省姚克专家工作站(2017IC064)。

Funded by Key Laboratory of Yunnan Province for the Prevention and Treatment of Ophthalmology(2017DG008), Provincial Innovation Team for Cataract and Ocular Fundus Disease of the Second People's Hospital of Yunnan Province (2017HC010), Expert Workstation of Yao Ke (2017IC064).

【作者简介】 白梦天(1990—),男,在读博士研究生,研究方向:眼表疾病与免疫性眼病。Email:308347673@qq.com

【通信作者】 胡竹林(1965—),男,医学博士,教授,博士生导师,主要研究方向为眼表疾病。Email: hzl77@263.net

ragweed pollen, house dust mite), administration routes (gastric administration, aerosol inhalation, subcutaneous injection) and ages (1, 2, 3 and 8 weeks). **Results** The expression levels of interleukin-17 (IL-17) and C-C motif chemokine ligand 5 (CCL5) mRNA were increased in the ovalbumin, house dust mite and ragweed pollen groups, especially the later, compared with the negative control group. Compared with the negative control group, the expression of IL-17 mRNA was increased in the subcutaneous injection, gavage, inhalation and positive control groups. The expression of CCL5 mRNA in the gavage group was close to that of the negative control group, while its expression level in the subcutaneous injection group was closer to that of the positive control group. Expression levels of CCL5 and IL-17 mRNA were similar in 1- and 2-week-old mice, but significantly lower than those in 3- and 8-week-old mice. **Conclusions** Ragweed pollen provided better sensitization in the preparation of an allergic conjunctivitis mouse model. Subcutaneous injection of antigen achieved satisfactory result in the allergic conjunctivitis mouse model. Although there were no obvious eye symptoms, the whole body and local areas were sensitized. The immune response of 3-week-old Balb/c mice was close to that of adult Balb/c mice.

【Keywords】 allergic conjunctivitis; interleukin-17; house dust mites; ovalbumin; ragweed pollen

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

过敏性结膜炎 (Allergic conjunctivitis, AC) 的常见临床症状为眼红、流泪、眼痒及结膜水肿等。目前认为, AC 的发生与肥大细胞的激活以及 T 细胞的成熟与分化有关。当机体致敏后, 肥大细胞被激活, 抗原与眼表肥大细胞膜 FcεRI 上的 IgE 结合, 引起早期相反应 (Early phase reaction, EPR), 肥大细胞脱颗粒, 释放组胺。而晚期相反应 (Later phase reaction, LPR) 则可见大量细胞因子及趋化因子 (CCL11、CCL5、CCL24) 释放, 后者可招募嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞及中性粒细胞等, 从而引起角结膜组织的炎性损伤^[1]。此外, 结膜上皮和角膜缘处的抗原呈递细胞 (Antigen presenting cell, APCs) 和树突状细胞 (Dendritic Cells, DCs) 还可与幼稚 CD4⁺T 细胞、Th0 辅助细胞 (Th0 cell) 相互作用, 从而促进其成熟并转化为 Th1 辅助细胞 (Th1 cell)、Th2 辅助细胞 (Th2 cell)。Th2 辅助细胞可通过释放白介素-3 (Interleukin-3, IL-3)、白介素-4 (Interleukin-4, IL-4)、白介素-5 (Interleukin-5, IL-5)、白介素-13 (Interleukin-13, IL-13) 参与过敏反应, 并诱导 B 细胞产生 IgE, 促进肥大细胞生长、嗜酸性粒细胞聚集以及粘液的分泌^[2]。此外, CCR-7/CCL21 信号轴被认为参与了成熟 DCs 向眼表淋巴结转运的过程。而成熟的 DCs 可主动上调趋化因子受体-7 (Chemokine receptor-7, CCR-7) 的反应性, 促进局部淋巴内皮细胞对 CCL21 的敏感性^[3]。

白介素-17 (Interleukin-17, IL-17) 在 2000 年首次由 Infante-Duarte^[4] 报道, 并认为 IL-17 的产生不同于 Th1 辅助细胞、Th2 辅助细胞, 其具有独特地分化和调节机制。IL-17 高表达与自身免疫疾病关系密切, 如系统性红斑狼疮、银屑病、类风湿性关节

炎、过敏性哮喘等^[5]。Validad 等^[6] 比较了春季角结膜炎 (vernal keratoconjunctivitis, VKC) 患者与正常患者血清及泪液中 IL-17 含量, 发现 VKC 患者血清和泪液中 IL-17 含量显著提升, 并且症状与体征的严重程度与 IL-17 含量呈正相关。而在 IL-17 基因缺陷小鼠中, 其过敏性鼻结膜炎症状较正常小鼠显著减轻^[7]。因此, 有研究者认为, IL-17 表达水平可作为评价过敏性疾病治疗是否有效的指标^[8]。

肥大细胞脱颗粒后可释放肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α) 和 IL-4。TNF-α 可刺激结膜成纤维细胞和结膜上皮细胞中 CCL5 的释放。CCL5 不仅可主动招募淋巴细胞核中性粒细胞, 还可作为多种炎性细胞的非特异性趋化因子^[9]。此外, 有报道证明结膜上皮细胞 IL-33/CCL5 信号轴与 AC 呈正相关^[10]。

当前, 关于不同抗原在相同条件下致敏性的比较报道甚少。此外, 不同激发途径引发过敏性结膜炎免疫应答是否存在差异, 目前尚不清楚。不同年龄段患者发生过敏性结膜炎时机体免疫应答是否存在差异, 还需进一步研究。因此, 为对上述问题进行初步探索, 我们分别在不同抗原、不同激发途径、不同小鼠周龄条件下, 构建过敏性结膜炎小鼠动物模型, 并比较免疫应答状态, 筛选最佳致敏条件, 以为过敏性结膜炎小鼠动物模型的建立提供新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 Balb/c 小鼠 65 只, 雌性 31 只, 雄性 34

只半。其中,1 周龄小鼠 5 只(4.61 ± 0.67)g,2 周龄小鼠 5 只(7.14 ± 0.76)g,3 周龄小鼠 5 只(9.72 ± 0.82)g,8 周龄小鼠 50 只(21.87 ± 1.72)g。均由昆明医科大学实验动物中心提供【SCXK(滇)K2015-0002】,操作地点为中国医学科学院昆明动物研究所【SYXK(滇)K2017-0008】。实验方案通过昆明医科大学动物伦理委员会审核(动物伦理审查号:kmmu2019002)。本实验遵从实验动物 3R 原则,并给予实验动物人道主义关怀。

1.1.2 主要仪器与试剂

4/-20℃ 冰箱,美的公司(合肥);-80℃ 超低温冰箱,Thermo 公司(美国);低温高速离心机,Thermo 公司(美国);电泳仪,六一仪器厂(北京);QuantStudio 12 K flex 实时荧光定量 PCR 系统,ABI 公司(美国);紫外分光光度计(NanoRrop2000),Thermo 公司(美国);凝胶成像仪图像分析系统,Bio-Rad 公司(美国);组织研磨器,天根生化科技有限公司(北京);流式细胞仪,BD 公司(美国);豚草花粉(Ragweed, Short, RW),Greer Labs 公司(美国);卵清蛋白(Ovalbumin, OVA),Sigma 公司(美国);屋尘螨(House dust mite, HDM),Greer Labs 公司(美国);氢氧化铝佐剂(Aluminum hydroxide adjuvant),Thermo 公司(美国);RNAiso Plus, TaKaRa 公司(日本);异丙醇,生工生物工程有限公司(上海);氯仿,东样化工有限公司(常州);PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser, TaKaRa 公司(日本);TB Green™ Premix Ex Taq™ II, TaKaRa 公司(日本);白细胞分化抗原 CD4-FITC 荧光检测试剂,Biolegend 公司(美国);白介素 17-PE 荧光检测试剂,Biolegend 公司(美国);白细胞分化抗原 CD3-PerCP-CY5.5 荧光检测试剂,Biolegend 公司(美国);白细胞分化抗原 CD8a-APC-CY7 荧光检测试剂,Biolegend 公司(美国);白细胞分化抗原 CD25-APC 荧光检测试剂,Biolegend 公司(美国);细胞激活剂,Biolegend 公司(美国);破膜液,Biolegend 公司(美国);红细胞裂解液,Biolegend 公司(美国);胎牛血清,Roche 公司(瑞士)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型的建立

本实验主要分为三个步骤:步骤一为筛选最佳抗原、步骤二为筛选最佳激发方式、步骤三为筛选最佳小鼠周龄。

步骤一(筛选最佳抗原):随机选择 8 周龄

Balb/c 小鼠 20 只。随机分为阴性对照组、卵清蛋白组(Ovalbumin, OVA)、屋尘螨组(House dust mites, HDM)、豚草花粉组(Ragweed pollen, RW)($n=5$ 只/组)。第 1 天,各组分别腹腔注射生理盐水、OVA、HDM、RW 25 mg/kg,均溶解于氢氧化铝佐剂 10 μ L 中。第 7、8 天连续两天各组给予相应抗原 10 mg/kg,溶解于氢氧化铝佐剂 10 μ L 中滴双眼,24 h 后处死。分离双眼结膜组织后行总 RNA 提取、反转录后,RT-qPCR 检测 CCL5 mRNA、IL-17 mRNA 表达水平。分离脾组织,流式细胞术检测 IL-17 占 CD4⁺ T 细胞百分比。

步骤二(筛选最佳激发途径):随机选择 8 周龄 Balb/c 小鼠 25 只。随机分为阴性对照组、皮下注射组、雾化吸入组、灌胃组、阳性对照组(滴眼组)($n=5$ 只/组)。第 1 天各组腹腔注射最佳抗原(根据步骤一结果选择)25 mg/kg,均溶解于氢氧化铝佐剂 10 μ L 中。第 7、8 天连续两天各组采取相应方式激发,剂量为 10 mg/kg,溶解于氢氧化铝佐剂 10 μ L 中。阴性对照组腹腔注射等质量分数的生理盐水。24 h 后处死。分离双眼结膜组织后行总 RNA 提取、反转录后,RT-qPCR 检测 CCL5 mRNA、IL-17 mRNA 表达水平。分离脾组织,流式细胞术检测 IL-17 占 CD4⁺ T 细胞百分比。

步骤三(筛选最佳小鼠周龄):随机选择 Balb/c 小鼠 20 只。随机分为 1 周龄组、2 周龄组、3 周龄组、8 周龄组($n=5$ 只/组)。第 1 天各组腹腔注射最佳抗原(根据步骤一结果选择)25 mg/kg,均溶解于氢氧化铝佐剂 10 μ L 中。第 7、8 天,进行抗原激发(根据步骤二结果选择),剂量为 10 mg/kg,溶解于氢氧化铝佐剂 10 μ L 中。24 h 后处死。分离双眼结膜组织后行总 RNA 提取、反转录后,RT-qPCR 检测 CCL5 mRNA、IL-17 mRNA 表达水平。分离脾脏组织,流式细胞术检测 IL-17 占 CD4⁺ T 细胞百分比。

1.2.2 小鼠结膜组织 CCL5 mRNA、IL-17 mRNA 相对表达情况

TRIzol 法进行总 RNA 提取,逆转录为 cDNA,模板 3 μ L,总体系为 20 μ L。CCL5 正向引物:5'-TGCCTAAAGTGTACATTTTGCTCA-3',反向引物:5'-CTAAGGAGTGATACACCTCGTAGTTG-3'。IL-17 正向引物:5'-TTTAACTCCCTTGCGCAAAA-3',反向引物:5'-CTTTCCTCCGCATTGACAC-3'。 β -actin 正向引物:5'-GGCTGTATCCCTCCATCG-3',反向引物:5'-CCAGTTGTAACAATGCCATGT-3'。

1.2.3 脾单细胞悬液的制备

彻底麻醉小鼠后,沿左侧腹部剪开腹部,暴露脾。小心分离其周围脏器其脂肪组织后,剪下脾,PBS 反复漂洗后放置于 10 mL 培养皿中。取 5 mL 无菌注射器柱塞,以末端扁平部顺时针轻柔研磨脾,吹打混匀。将脾细胞转移至 200 目筛网上再次研磨,筛网下方收集悬液。1000 rpm 10 min 离心。弃上清,加入红细胞裂解液 5 mL,室温,3 min,加入 PBS 10 mL,1000 rpm 10 min 离心。PBS 漂洗 2 次,加入 5 mL PBS 重悬备用。

1.2.4 流式细胞术

取脾单细胞悬液 3 mL 滴加于细胞培养板中,RPMI 1640 培养基 3.6 mL,胎牛血清 0.4 mL,细胞激活剂 10 μ L,吹打混匀后放置于细胞培养箱中孵育。24 h 后,1200 rpm,8 min 离心,弃上清。加入 0.5 mL PBS 重悬细胞,加入 CD3-PerCP-CY5.5 5 μ L, CD4-FITC 5 μ L, CD8a-APC-CY7 5 μ L,室温避光,30 min。加入破膜工作液 1 mL,室温避光,30 min。1200 rpm,8 min 离心,弃上清。加入 IL-17-PE 2 μ L,室温避光,30 min。加入 1 mL PBS 吹打混匀,1200 rpm,8 min 离心,弃上清。加入 PBS 200 μ L,上机。

1.3 统计学分析

实验数据采用 SPSS 20.00 及 Graph Pad Prism 7.0 整理分析,所有数据均符合正态分布。计量资料以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组样本均数之间的比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较采用 LSD 法,均以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同抗原构建小鼠过敏性结膜炎模型后脾单细胞悬液中 IL-17 占 CD4⁺ T 百分比情况及结膜组织 CCL5 mRNA、IL-17 mRNA 相对表达水平

IL-17 在阴性对照组、OVA 组、HDM 组、RW 组小鼠脾细胞悬液中占 CD4⁺ T 细胞百分比为(0.54 \pm 0.05)%、(3.17 \pm 0.10)%、(2.96 \pm 0.14)%、(3.95 \pm 0.14)%。(F=778.9, $P < 0.05$)。阴性对照组与 OVA 组($P = 0.000$),OVA 组与 HDM 组($P = 0.010$)、R 组、HDM 组、RW 组($P < 0.05$)差异具有显著性(图 1A)。

CCL5 mRNA 在阴性对照组、OVA 组、HDM 组、RW 组的相对表达量分别为(1.00 \pm 0.00)、(2.58

± 0.55)、(2.36 ± 0.41)、(3.74 ± 0.55) ($F = 19.268, P < 0.05$)。阴性对照组与 OVA 组($P = 0.014$)、HDM 组($P = 0.031$)、RW 组($P = 0.000$),RW 组与 HDM 组($P = 0.031$)之间差异有显著性(图 1B)。IL-17 mRNA 在阴性对照组、OVA 组、HDM 组、RW 组的相对表达量分别为(1.00 \pm 0.00)、(2.07 ± 0.51)、(3.46 ± 0.57)、(4.34 ± 0.65) ($F = 29.452, P = 0.000$)。阴性对照组与 OVA 组($P = 0.031$)、HDM 组($P = 0.000$)、RW 组($P = 0.003$)之间差异具有显著性(图 1C)。

本实验结果提示,在相同条件下,豚草花粉具有更佳的致敏性,因此在后续实验中,我们将以豚草花粉作为主要抗原。

2.2 不同激发途径构建小鼠过敏性结膜炎模型后脾 IL-17 占 CD4⁺ T 百分比情况及结膜组织 CCL5 mRNA、IL-17 mRNA 相对表达水平

IL-17 在阴性对照组、皮下注射组、雾化吸入组、灌胃组、阳性对照组小鼠脾细胞悬液中占 CD4⁺ T 细胞百分比为(0.55 ± 0.05)%、(3.14 ± 0.11)%、(2.93 ± 0.14)%、(2.74 ± 0.14)%、(4.21 ± 0.21)% ($F = 449.2, P < 0.05$)。阴性对照组与皮下注射组、雾化吸入组、灌胃组、阳性对照组($P < 0.05$)差异有显著性。皮下注射组与灌胃组、阳性对照组($P < 0.05$)差异具有显著性(图 2A)。

CCL5 mRNA 在阴性对照组、皮下注射组、灌胃组、雾化吸入组、阳性对照组的相对表达量分别为(1.00 ± 0.00)、(2.64 ± 1.79)、(1.23 ± 0.35)、(1.39 ± 0.57)、(2.96 ± 0.54) ($F = 298.93, P = 0.000$)。阴性对照组与皮下注射组($P = 0.000$)、雾化吸入组($P = 0.000$)、阳性对照组($P = 0.000$),皮下注射组与灌胃组($P = 0.000$)、阳性对照组($P = 0.0131$)之间差异有显著性(图 2B)。IL-17 mRNA 在阴性对照组、皮下注射组、灌胃组、雾化吸入组、阳性对照组的相对表达量分别为(1.00 ± 0.00)、(3.20 ± 0.24)、(2.94 ± 0.29)、(2.80 ± 0.10)、(3.26 ± 0.20) ($F = 63.883, P = 0.000$)。阴性对照组与皮下注射组($P = 0.000$)、灌胃组($P = 0.000$)、雾化吸入组($P = 0.000$)、阳性对照组($P = 0.000$),皮下注射组与灌胃组($P = 0.0085$)之间差异具有显著性(图 2C)。

本实验结果提示,在相同条件下,通过皮下注射进行激发后,结膜组织 CCL5 mRNA、IL-17 mRNA 相对表达水平及脾细胞 IL-17 占 CD4⁺ T 百分比更

接近阳性对照组,因此在后续实验中,我们将采用皮下注射法进行激发。

2.3 不同周龄小鼠构建过敏性结膜炎模型后脾脏 IL-17 占 CD4⁺ T 百分比情况及结膜组织 CCL5 mRNA、IL-17 mRNA 相对表达水平

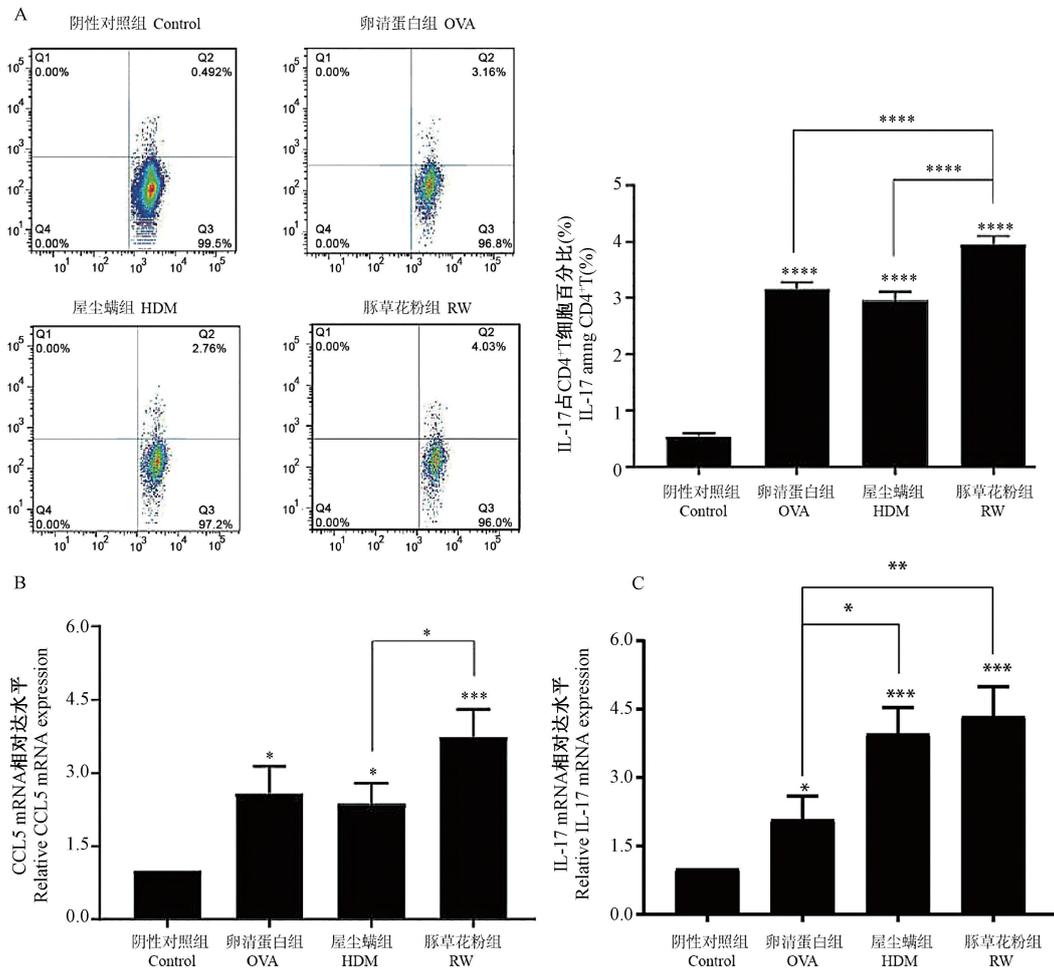
IL-17 在 1 周龄组、2 周龄组、3 周龄组、8 周龄组小鼠脾细胞悬液中占 CD4⁺ T 百分比为 (2.75 ± 0.08)%、(2.72 ± 0.16)%、(3.06 ± 0.34)%、(3.29 ± 0.14)%。(F = 8.614, P < 0.05)。8 周龄与 1 周龄、2 周龄(P < 0.05)差异具有显著性(图 3A)。

CCL5 mRNA 在 1 周龄组、2 周龄组、3 周龄组以及 8 周龄组的相对表达量分别为 (1.74 ± 0.13)、(1.78 ± 0.14)、(2.55 ± 0.03)、(2.59 ± 0.04)(F =

55.13, P = 0.000)。1 周龄组与 3 周龄组(P = 0.0001)、8 周龄组(P = 0.000)、2 周龄组与 3 周龄组(P = 0.0001)、8 周龄组(P = 0.0001)差异有显著性(图 3B)。IL-17 mRNA 在 1 周龄组、2 周龄组、3 周龄组以及 8 周龄组的相对表达量分别为 (1.98 ± 0.17)、(1.97 ± 0.17)、(2.95 ± 0.07)、(2.93 ± 0.12)(F = 45.54, P = 0.000)。1 周龄组与 3 周龄组(P = 0.0002)、8 周龄组(P = 0.0002)、2 周龄组与 3 周龄组(P = 0.0002)、8 周龄组(P = 0.0002)差异具有显著性(图 3C)。

3 讨论

蛋白类、花粉类、尘螨类物质不仅为过敏性结



注: * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, **** P < 0.0001, 下图同。

图 1 不同抗原构建小鼠过敏性结膜炎模型后脾单细胞悬液中 IL-17 占 CD4⁺ T 百分比(A) 以及结膜组织 CCL5 mRNA (B)、IL-17 mRNA (C) 相对表达水平

Note. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, **** P < 0.0001, the same in the following Figures.

Figure 1 Percentage of IL-17 in CD4⁺ T in spleen single cell suspension (A) and relative expression levels of CCL5 mRNA (B) and IL-17 mRNA (C) in conjunctival tissues and after constructing mouse model of allergic conjunctivitis with different antigens

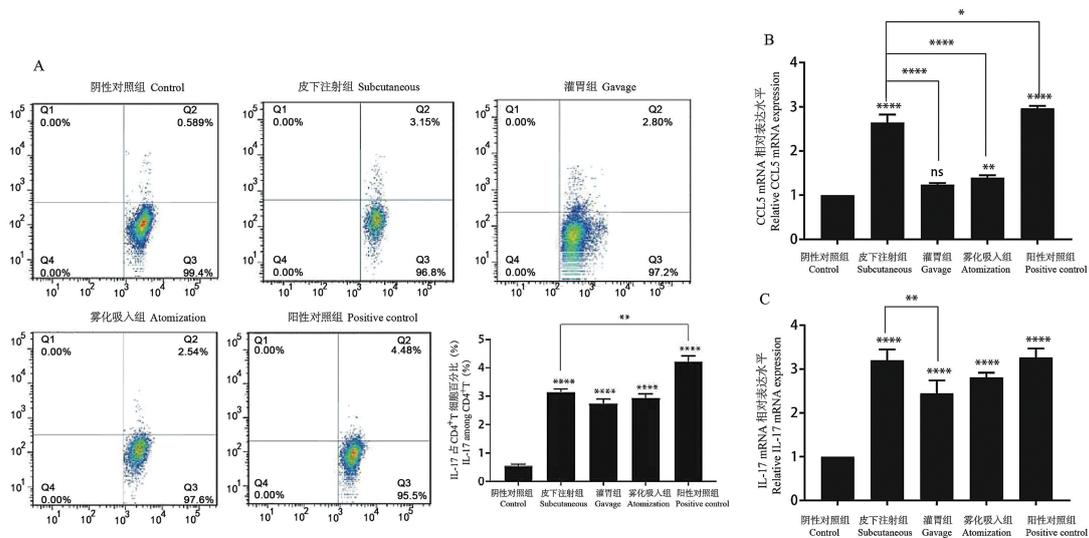


图 2 不同激发途径构建小鼠过敏性结膜炎模型后脾单细胞悬液中 IL-17 占 CD4⁺ T 百分比(A) 及结膜组织 CCL5 mRNA (B)、IL-17 mRNA (C) 相对表达水平

Figure 2 Percentage of IL-17 in CD4⁺ T in spleen single cell suspension and relative expression levels of CCL5 mRNA (B) and IL-17 mRNA (C) in conjunctival tissues and after constructing mouse model of allergic conjunctivitis with different methods of challenge

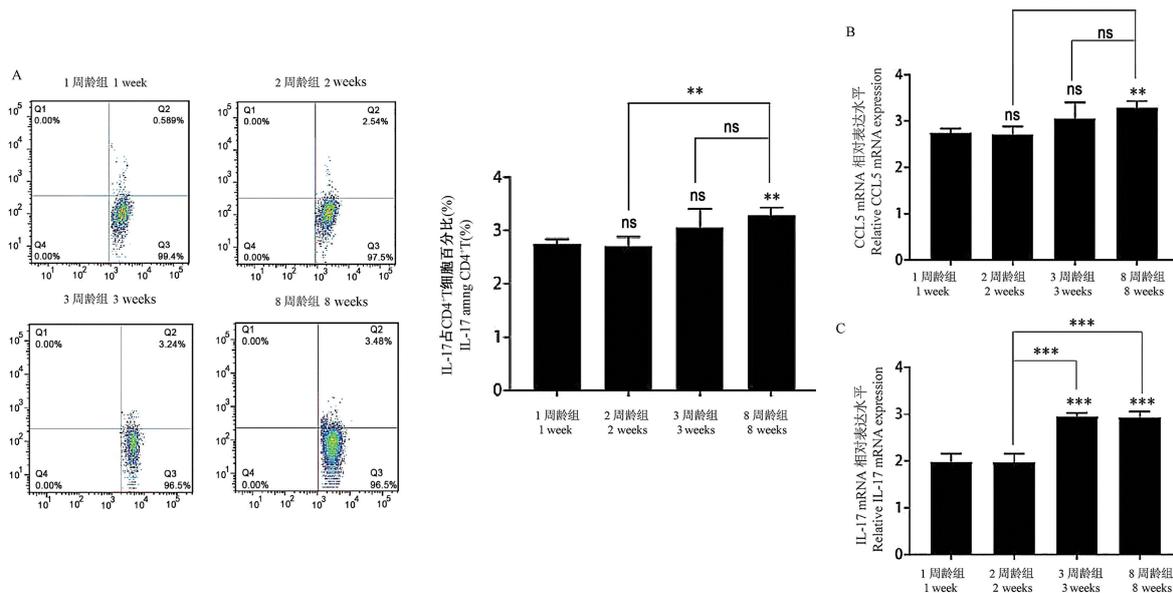


图 3 不同周龄构建小鼠过敏性结膜炎模型后脾单细胞悬液中 IL-17 占 CD4⁺ T 百分比情况(A) 及结膜组织 CCL5 mRNA (B)、IL-17 mRNA (C) 相对表达水平

Figure 3 Percentage of IL-17 in CD4⁺ T in spleen single cell suspension (A) and relative expression levels of CCL5 mRNA (B) and IL-17 mRNA (C) in conjunctival tissues and after constructing mouse model of allergic conjunctivitis with different age

膜炎患者常见的致敏原,也为构建过敏性结膜炎动物模型的常用抗原。其可建立稳定可靠的过敏性结膜炎动物模型^[11-13]。

目前,关于上述三类抗原在相同条件下构建过敏性结膜炎致敏效力的比较研究报道较少。因此,我们首先对 OVA、HDM、RW 进行致敏性的比较。

我们的实验结果发现,豚草花粉激发小鼠后,小鼠结膜组织中 CCL5 mRNA、IL-17 mRNA 表达最高、脾脏单细胞悬液中 IL-17 百分比最高,提示豚草花粉在此实验条件下致敏效力最佳。豚草花粉包含至少 52 种抗原成分,其中 22 种可特异性结合 IgE。此外,研究者将豚草花粉进行分离和提纯后得到大量

可致敏的蛋白质,分子大小多在 $5 \times 10^3 \sim 63 \times 10^3$ ^[14-16],以 $30 \times 10^3 \sim 40 \times 10^3$ 抗原性最强。豚草花粉过敏患者出现眼部症状占其过敏患者的 89.4%,合并哮喘者占 21.21%^[17]。此外, Furmonaviciene 等^[18]发现,序列同一性超过 25% 的不同类型的过敏原之间具有相似的 IgE、T 细胞识别表位从而更易发生交叉反应。陶爱林等^[19]通过聚类分析发现在 NCBI 数据库中可找到许多与豚草花粉高度同源的不同类型的过敏原,提示豚草花粉可与多种不同类型的过敏原发生交叉反应,从而极易引发过敏性疾病。

随后,使用豚草花粉对 Balb/c 小鼠予以灌胃、雾化吸入、皮下注射的激发方式观察免疫应答状态。实验结果发现,皮下注射组与阳性对照组(滴眼激发)小鼠结膜组织 CCL5 mRNA 和 IL-17 mRNA 表达情况及脾脏单细胞悬液中 IL-17 百分比最为接近,提示皮下注射激发更能有效诱导小鼠过敏性结膜炎的发生。有研究指出,皮下细胞外基质(extracellular matrix, ECM)可缓慢地吸收药物,尽管其最大血药浓度(maximum blood concentration, C_{max})低于静脉注射,但可明显延长注射药物的 C_{max} 持续时间^[20]。此外,经皮下注射分子量 $>20 \times 10^3$ 的药物可直接经间质淋巴管收集,豚草花粉的主要抗原成分可直接进入淋巴系统^[21]。Carton 等^[22]使用荧光标记的 MHC 复合物结合 CD40 示踪法发现,皮肤中 DCs 可迅速移行至注射部位皮下。因此有研究者认为,皮下注射更易引起免疫反应^[23]。灌胃能很好地激发消化系统过敏性症状,从而引起一系列食物性过敏性症状,但豚草花粉进入胃内后在胃蛋白酶的作用下,其分子结构发生改变,致使全身致敏效应下降^[24]。Balb/c 小鼠较易产生针对花粉的气道高反应性,但致敏原的多次雾化激发较易使其产生耐受,一定程度上降低过敏反应和气道高反应表现^[25]。

吴旭颖等^[26]分别选取 5 周龄和 10 周龄正常 Balb/cA-nu 小鼠,抽取外周血行流式细胞术,发现 5 周龄小鼠外周血中 CD19⁺ B 细胞、B220⁺ B 细胞、NK 细胞、粒细胞比例均低于 10 周龄小鼠。这与我们的实验结果存在一定差异,可能的原因有:(1)小鼠品系差异, Balb/cA-nu 小鼠为无胸腺, T 细胞缺陷的 Balb/c 裸鼠^[27]。(2)处理方式差异,本研究中 Balb/c 小鼠均为经抗原处理后的小鼠。(3)处理时间节点不同,我们选择分别选了哺乳期、断奶期、生

长期、性成熟期小鼠。而目前未见可较好解释不同周龄 Balb/c 小鼠免疫应答差异的相关报道,因此具体机制尚不清楚。

因此,根据本实验结果,我们认为,豚草花粉在构建过敏性结膜炎小鼠动物模型中具有更好的致敏性。皮下注射法激发抗原在过敏性结膜炎小鼠动物模型构造中可取得较满意效果。皮下注射法激活抗原未见明显的小鼠的眼部症状及体征,但全身和局部均呈免疫应答状态。3 周龄 Balb/c 小鼠免疫应答反应已较为接近成年 Balb/c 小鼠。

参 考 文 献(References)

- [1] Fukuda K, Kumagai N, Fujitsu Y, et al. Fibroblasts as local immune modulators in ocular allergic disease [J]. *Allergol Int*, 2006, 55 (2):121-129.
- [2] Irkec MT, Bozkurt B. Molecular immunology of allergic conjunctivitis [J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2012, 12 (5):534-539.
- [3] Schlereth S, Lee HS, Khandelwal P, et al. Blocking CCR7 at the ocular surface impairs the pathogenic contribution of dendritic cells in allergic conjunctivitis [J]. *Am J Pathol*, 2012, 180 (6):2351-2360.
- [4] Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, et al. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells [J]. *J Immunol*, 2000, 165(11):6107-6115.
- [5] Wang D, Huang S, Yuan X, et al. The regulation of the Treg/Th17 balance by mesenchymal stem cells in human systemic lupus erythematosus [J]. *Cell Mol Immunol*, 2017, 14(5):423-431.
- [6] Validad MH, Khazaei HA, Pishjoo M, et al. The Study of interleukin-17 level in vernal keratoconjunctivitis disease and its relationship between symptom and sign severity [J]. *Semin Ophthalmol*, 2017, 32(6):721-724.
- [7] Nakae S, Komiya Y, Nambu A, et al. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses [J]. *Immunity*, 2002, 17:375-387.
- [8] Keisuke O, Tatsukuni O, Hirohisa S, et al. Th17 and allergy [J]. *Allergol Int*, 2008, 57(2):121-134.
- [9] Elieh Ali Komi D, Grauwet K. Role of mast cells in regulation of T cell responses in experimental and clinical settings [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2018, 54(3):432-445.
- [10] Matsuba-Kitamura S, Yoshimoto T, Yasuda K, et al. Contribution of IL-33 to induction and augmentation of experimental allergic conjunctivitis [J]. *Int Immunol*, 2010, 22 (6):479-489.
- [11] Kuo CH, Collins AM, Boettner DR, et al. Role of CCL7 in type I hypersensitivity reactions in murine experimental allergic conjunctivitis [J]. *J Immunol*, 2017, 198 (2):645-656.
- [12] Sun W, Sheng Y, Chen J, et al. Down-regulation of miR-146a

- expression induces allergic conjunctivitis in mice by increasing TSLP level [J]. *Med Sci Monit*, 2015, 21: 2000–2007.
- [13] Yasue M, Nakamura S, Yokota T, et al. Experimental monkey model sensitized with mite antigen [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 1998, 115(4):303–311.
- [14] Roebber M, Hussain R, Iaapper DG, et al. Isolation and properties of a new short ragweed pollen allergen, Ra6 [J]. *J Immunol*, 1983, 131(2):706–711.
- [15] Pilyavskaya A, Wieczorek M, Jones SW, et al. Isolation and characterization of a new basic antigen from short ragweed pollen (*Ambrosia artemisiifolia*) [J]. *Mol Immunol*, 1995, 32(7):523–529.
- [16] 刘玲,肖小军,李兵,等. 三裂叶豚草花粉致敏蛋白组分的分离、纯化及鉴定[J]. *中华临床免疫和变态反应杂志*, 2014, 8(1):15–17.
- Liu L, Xiao XJ, Li B, et al. Isolation, purification, and identification of allergens of ambrosia trifida pollen [J]. *Chin J Allergy Clin Immunol*, 2014, 8(1):15–17.
- [17] Parnia S, Brown JL, Frew AJ. The role of pollutants in allergic sensitization and the development of asthma [J]. *Allergy*, 2002, 57(12):1111–1117.
- [18] Furmonaviciene R, Shakib F. The molecular basis of allergenicity: comparative analysis of the three dimensional structures of diverse allergens reveals a common structural motif [J]. *Mol Pathol*, 2001, 54(3):155–159.
- [19] 陶爱林,何韶衡. 豚草花粉泛过敏原同源基因克隆与序列分析[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2004(3):9–13.
- Tao AL, He SH. Cloning and sequencing of homologous panallergen genes in pollen of short ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) [J]. *Chin J Microbiol Immunol*, 2004, (3):9–13.
- [20] Kinney SR, Carlson L, Ser-Dolansky J, et al. Curcumin ingestion inhibits mastocytosis and suppresses intestinal anaphylaxis in a murine model of food allergy [J]. *PLoS One*, 2015, 10:e0132467.
- [21] Bates JH, Cojocarú A, Haverkamp HC, et al. The synergistic interactions of allergic lung inflammation and intratracheal cationic protein [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 177(3):261–268.
- [22] McLennan DN, Porter CJ, Charman SA. Subcutaneous drug delivery and the role of the lymphatics [J]. *Drug Discov Today Technol*, 2005, 2(1):89–96.
- [23] Fathallah AM, Bankert RB, Balu-Iyer SV. Immunogenicity of subcutaneously administered therapeutic proteins—a mechanistic perspective [J]. *AAPS J*, 2013;15(4):897–900.
- [24] Catron DM, Rusch LK, Hataye J, et al. CD4+ T cells that enter the draining lymph nodes after antigen injection participate in the primary response and become central-memory cells [J]. *J Exp Med*, 2006, 203(4):1045–1054.
- [25] Cook IF. Evidence based route of administration of vaccines [J]. *Hum Vaccin*, 2008, 4(1):67–73.
- [26] 吴旭颖,田玉书,吴金峰,等. Balb/cA-nu 小鼠主要脏器参数、血生理生化指标和免疫细胞的测定 [J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(5):42–46.
- Wu YX, Tian YS, Wu JF, et al. The study on organ weights, blood physiological and biochemical parameters and immune cells in BALB/cA-nu mice [J]. *Chin J Comp Med*, 2014, 24(5):42–46.
- [27] Li SR, Wang DP, Yu XL, et al. Uncv (uncovered): a new mutation causing hairless on mouse chromosome 11 [J]. *Genet Res*, 1999, 73(3):233–238.

[收稿日期] 2019–11–18