

梧桐花粉致敏大鼠动物模型的建立及特异性抗体检测

陈小东 陈 臻* 张尚权¹ 吴芝莉¹ 王逸宏¹ 李逸平¹

(复旦大学附属华山医院呼吸科, 上海 200040;

¹中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要 用梧桐花粉浸液作为过敏原, 经皮下多点注射对实验动物进行免疫, 用雾化的梧桐花粉浸液进行激发, 建立了变态反应性疾病的实验动物模型。随后通过ELISA、Western 印迹等方法对其血清中的梧桐抗原特异性 IgG、IgE 进行检测。结果显示有特异性 IgG、IgE 抗体的存在。

关键词 梧桐花粉; SD 大鼠; 变态反应; IgG; IgE

梧桐花粉是常见的过敏原, 常会诱发支气管哮喘、过敏性鼻炎等变态反应性疾病。在花粉症患者血清中同时有特异性 IgE 和 IgG 的存在^[1]。

长期以来, 特异性抗体的检测是以患者的血清作为研究材料, 不可避免血清中的特异性抗体随花粉季节的变化造成含量上的波动等问题。而 IgE 抗体在血清中含量极低, 且稳定性差, 实验材料的缺乏为非花粉季节的研究工作造成很大困难, 故建立稳定的实验动物模型很有必要。我们用国内常见的 SD 大鼠, 其过敏反应与人类相似, 也是由 IgE 介导, 相对于豚鼠, 还有种系纯、价廉等优点。建立的动物模型对进一步研究变态反应性疾病的发病机制有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 材料

梧桐花粉, 4~5 月采集于上海街边; SD 大鼠, 性别不拘, 致敏前约 150 g, 中科院生化细胞所动物房提供; 氢氧化铝(10 mg/ml)佐剂, 自制; 福氏佐剂, 购于上海思吉生物公司; 辣根过氧化物酶标记羊抗大鼠 IgG(H+L), 美国 ImmuClub 公司; 生物素标记羊抗大鼠 IgE(Fc), 美国 NORDIC 公司; 辣根过氧化物酶标记链酶亲和素, 美国 Vector 公司; 鲁米诺化学发光底物试剂盒, 美国 Pierce 公司。

1.2 梧桐花粉浸出液的制备

梧桐花粉自然干燥至恒重。用乙醚脱脂数次直至乙醚层无色。乙醚彻底挥发后按每 g 花粉加入 10 ml coca's(5.0 g 氯化钠、2.75 g 碳酸氢钠、4 ml 苯酚, 加蒸馏水至 1000 ml)溶液的比值(1:10, W/V),

于 4 °C 浸出 48 h, 期间用磁力搅拌器搅拌几次, 每次 20 min。浸出后离心取上清液, 其蛋白质含量在 1 mg/ml 左右(Bradford 法检测), 此浸出液置透析袋中用生理盐水或 PBS 透析至外液无色。梧桐浸出液经无菌过滤后分装, 冻存。

1.3 梧桐致敏大鼠

实验时取出花粉浸液, 与等量氢氧化铝(10 mg/ml)佐剂混合后进行免疫。或改用福氏佐剂(思吉生物), 第一次免疫用福氏完全佐剂, 以后各次用福氏不完全佐剂, 与梧桐抗原等量混匀成为油包水后立即使用。同时设阴性对照, 将花粉浸液换作生理盐水, 其他条件相同。于第 1 天, 第 15 天, 第 22 天免疫, 共 3 次, 每次每只 1 ml(0.5 ml 浸液+0.5 ml 佐剂)。在大鼠腹腔、两腋下、两后足跖 5 点注射, 每点 0.2 ml。第 29 天开始激发, 将大鼠置透明密闭容器中, 留一小出气口, 超声雾化器雾化梧桐花粉浸液, 让大鼠持续吸入 20 min, 每日 1 次, 共 7 日。第 36 天大鼠股动脉放血处死, 每只可采血 10~20 ml, 分离血清, 分装后冻存。放血后立即打开大鼠胸腔, 取右肺中叶, 用 10% 甲醛固定后做常规病理切片。

1.4 ELISA

花粉变应原用包被稀释液(0.05 mol/L Na₂CO₃-NaHCO₃, pH 9.6)1:10 稀释, 酶标板(Nunc)每孔加 100 μl, 4 °C, 24 h, 弃液, 洗涤液 PBST(PBS+0.05% Tween-20, pH 7.4)满孔洗涤 3 次, 每次 3 min。封闭液(PBS+3%BSA)加满孔, 37 °C, 1 h,

收稿日期: 2004-01-29 接受日期: 2004-03-18

* 通讯作者。Tel: 021-54921395, Fax: 021-62497416, E-mail:

iamcz@sohu.com

洗板3次,每次3 min。阳性血清用稀释液稀释(PBS),每孔100 μl , (同时设阴性对照、空白对照) 37 $^{\circ}\text{C}$, 1 h, 洗板3次,每次3 min。酶标二抗稀释(PBST + 0.5 mg/ml BSA), 每孔100 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$, 1 h, 洗板3次,每次3 min。加底物液(OPD- H_2O_2)每孔100 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色30 min。加终止液2 mol/L H_2SO_4 每孔50 μl , 20 min内酶标仪读数。如是生物素标记二抗则在显色前加辣根过氧化物酶标记链酶亲和素, 每孔100 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$, 1 h, 洗板3次, 垫吸水纸拍干后加显色底物(OPD- H_2O_2)。其余同前。

1.5 Western 印迹

梧桐花粉浸液与等量加样缓冲液混合, 进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳完后进行电转移, 将蛋白质从凝胶中转移到NC膜上(硝酸纤维素膜)。50 g/L 脱脂奶粉(TBST)封闭过夜。次日将膜用TBST漂洗。加血清(TBST+50 g/L 脱脂奶粉稀释), 室温缓慢振荡1~2 h, 膜用TBST漂洗3次。加酶标二抗(TBST+50 g/L 脱脂奶粉稀释), 室温缓慢振荡1~2 h, 膜用TBST漂洗3次, 甩干。加荧光显色底物, 1~2 min后于暗室中用感光胶片曝光30 s至1 min, 显影、定影后将胶片晾干。如是生物素标记二抗则在显影前加辣根过氧化物酶标记链酶亲和素, 室温振荡1 h, 膜用TBST漂洗3次, 甩干后加荧光显色底物。

2 结果

2.1 大鼠致敏后的临床症状

在梧桐变应原激发后5 min左右, 大鼠开始用前爪抓挠鼻、面部不止, 呼吸频率加快, 呼吸幅度增大, 并用口协助呼吸, 时常伴有腮部的颤抖, 在激发4~5天后出现频繁的咳嗽、喷嚏。阴性对照大鼠在雾化生理盐水吸入后除有轻微抓鼻外无异常表现。

2.2 大鼠肺组织病理学变化

实验组大鼠肺组织病理学切片经光镜观察, 可见小支气管、细支气管和伴行动脉周围有较多炎症细胞浸润, 除中性粒细胞及淋巴细胞外, 还有大量嗜酸性粒细胞。支气管平滑肌增厚, 管腔缩窄, 并有黏液栓形成。正常对照组大鼠肺部病理学检查未发现明显异常(图1)。

2.3 ELISA 检测特异性 IgG

实验结果表明, 阳性大鼠血清在1:5、1:50、1:500稀释度, 其对应孔在加入底物后都明显变色, 直至1:5000的稀释度显色不明显。证

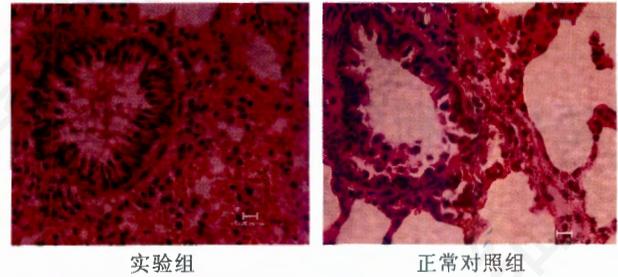


图1 大鼠肺组织病理学变化(HE \times 400)

明阳性大鼠血清中梧桐特异性IgG抗体的存在。血清滴度为500。用阴性大鼠血清1:5稀释度的对应孔和加不加血清的空白对照孔均不显色。辣根过氧化物酶标记羊抗大鼠IgG的稀释度为1:250。两种佐剂免疫后的抗血清效价接近。

2.4 ELISA 检测特异性 IgE

实验结果表明, 阳性大鼠血清在1:5、1:10稀释度时, 用梧桐抗原包被的孔与用3%BSA直接封闭的孔相比, 两者显色后有明显差别, 因此有梧桐特异性IgE抗体的存在。阴性大鼠血清在相同稀释度时没有上述的抗原特异性。生物素标记羊抗大鼠IgE(Fc)为1:1000稀释, 辣根过氧化物酶标记链酶亲和素为1:300稀释。

2.5 特异性 IgG 的 Western 印迹分析

由图2可见, 加阴性血清温育的膜结果显示没有任何条带, 可排除非特异性结果的可能。阳性大鼠血清中含有多种针对不同蛋白质的特异性IgG抗体, 证明梧桐提取液中许多蛋白质的免疫原性都较强, 至于图2(A)中a、b两份结果之间的差异, 是

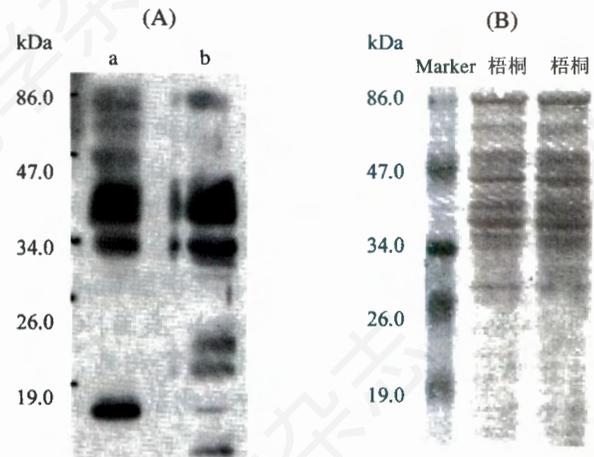


图2 特异性IgG的Western印迹分析

(A)医用X光片曝光后的结果;(B)转膜后用丽春红染色的原始条带。(a)氢氧化铝佐剂的阳性大鼠血清作为一抗;(b)福氏佐剂的阳性大鼠血清作为一抗。

由于大鼠的个体差异, 还是由不同佐剂造成的差异, 有待进一步研究。

3 讨论

关于花粉症的发病机制, 一般认为花粉变应原在吸入后会刺激呼吸道膜下浆细胞产生 IgE 抗体, IgE 与花粉变应原结合后黏附于肥大细胞、嗜酸性细胞表面, 引起嗜酸性细胞浸润、肥大细胞脱颗粒及组胺等炎性介质的释放, 导致哮喘等疾病的发生^[2]。另外, 国内外普遍认为 IgG 的一个亚类 IgG₄ 也参与了上述病理过程, 故本实验对两种抗体均进行了检测。

临床上曾用花粉浸出液为病人做皮肤挑刺实验 (skin prick test, SPT) 作为诊断方法, 并用花粉浸出液做成针剂进行特异性免疫治疗 (antigen specific immunotherapy, SIT), 又称减敏治疗, 取得了很好的疗效。然而, 实验室制备的梧桐花粉浸出液中含有主要变应原 (主要致敏物)、次要变应原、其他蛋白质及色素、多糖类非致敏物质^[3]。用此种未经严格定性、定量的制剂进行诊断、治疗近年来已被禁止。因此, 筛选出花粉中的主要过敏原, 是对提纯后得到标准化制剂的关键^[4]。目前已有国产商品化的尘螨变应原面世, 通过 ELISA 检测患者血清中尘螨特异性 IgE 抗体的含量进行诊断, 报告阳性的病人用减敏疗法治疗, 同样有良好的疗效。国外已有包括花粉在内的多种变应原实现了标准化生产, 但除了售价昂贵、不易普及外, 其疗效也不理想, 这是由于国内外环境中的变应原存在较大差异。梧桐花粉作为春季主要的致敏原, 如能实现脱敏用制剂的标准化, 将成为广大花粉症患者的福音。

我们用 Western 印迹没能理想地检测出特异性

IgE, 原因可能由于 IgE 抗体含量过低, 已低于 Western 印迹的检出极限。此外, 特异性 IgG 抗体因在含量上占绝对优势 (在血清 1:1000 稀释后进行 IgG 的 Western 印迹仍有明显的特异性条带), 竞争性地与抗原决定簇结合, 并造成空间位阻, 导致 IgE 与梧桐抗原结合困难。因而, 梧桐花粉中的主要变应原, 可用经过一定程度纯化后的花粉蛋白 (比如层析后的不同组分) 在酶标板上包被, 然后做 ELISA (IgE), 从而确定主要变应原。

过敏性哮喘的动物模型以豚鼠、大鼠最为普遍。目前此类研究大多采用全身免疫数周后再行激发的方法, 即事先用小剂量的抗原注射先使动物体内产生一个致敏的基础^[5], 在一段时间后, 进行不同部位的激发, 就可能诱发不同部位的病变。哮喘的动物模型是通过雾化变应原反复刺激引起肺部的慢性炎症, 如用变应原滴眼将表现为变态反应性结膜炎, 变应原滴鼻后表现为过敏性鼻炎等。致敏物以卵清蛋白最常用^[6], 也有用邻苯二甲酸酐等有机酸酐致喘大鼠的报道^[7]。豚草、蒿属花粉曾成功诱发了豚鼠的过敏性鼻炎^[8]。用梧桐花粉作为致敏原的动物模型的建立, 将为进一步研究此类过敏性疾病的发病机制打下基础。

参考文献 (References)

- [1] 殷少军等。上海医学, 1998, 21: 152
- [2] 汪敏刚等。支气管哮喘, 上海: 人民卫生出版社, 1986
- [3] Zeiler T et al. J Allergy Clin Immunol, 1997, 100: 721
- [4] Boluda L et al. J Allergy Clin Immunol, 1998, 101: 210
- [5] Goroneberg DA et al. Allergy, 2003, 58: 1101
- [6] 吕国平等。中华结核和呼吸杂志, 1995, 18: 377
- [7] 赵振东等。中华劳动卫生职业病杂志, 1998, 16: 342
- [8] 余洪猛等。上海实验动物科学, 2001, 21: 212

Animal Models of Allergic Diseases Induced by *Platanus acerifolia* Pollen and Measurements of Specific Antibodies

Xiao-Dong Chen, Zhen Chen*, Shang-Quan Zhang¹, Zhi-Li Wu¹, Yi-Hong Wang¹, Yi-Ping Li¹

(Respiratory Department of Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China; ¹Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract Allergic diseases of rats were induced by allergen extracted from *Platanus acerifolia* pollen. Firstly, rats were injected intraperitoneally and subcutaneously with the mixture of allergen and adjuvant. Subsequently, these rats were challenged with aerosolized allergen. After the last inspiration, rats were killed and their serums were separated. Specific IgE and IgG in serums were measured by ELISA or Western blotting. The results revealed the existence of specific IgE and IgG.

Key words *Platanus acerifolia* pollen; SD rats; allergic response; IgE; IgG