

不同剂量卵蛋白对豚鼠血清中 IgE 的影响

崔红花, 郭娇, 杨超燕, 沈志滨*, 唐春萍, 尹永芹

(广东药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:用豚鼠全身过敏性试验模型探讨不同剂量卵蛋白(OVA)的过敏性。方法:用不同剂量的卵蛋白致敏激发豚鼠,复制全身过敏性试验模型,观察过敏反应症状,ELISA 检测不同剂量 OVA 组和空白对照组的豚鼠血清中 OVA 特异性抗体 IgE 的含量变化。结果:全身过敏实验阳性对照组(OVA)致敏率为 100%,大部分过敏反应级别较高;阴性对照组的致敏率为 0%;14 d 时过敏反应无明显差异,21 d 时过敏反应有统计学意义($P < 0.05$);14 d 时 OVA 组与对照组比,血清 IgE 值水平无明显差异,21 d OVA 组与对照组比,血清 IgE 值水平显著差异($P < 0.05$)。结论:OVA 致敏原的剂量在一定浓度范围内与过敏反应指标 IgE 值呈现相关性。

[关键词] 卵蛋白;过敏反应;免疫球蛋白 IgE

[中图分类号] R 285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)06-0141-03

过敏反应或称 I 型变态反应,是最常见的一种变态反应。自 1967 年 Wide 等建立了 IgE 抗体的免疫检测方法以来,有关 IgE 在变态反应性疾病的诊断和发病机制的研究方面均取得了很大进展,但其诊断价值及临床意义方面还存在某些争论^[1,2]。反复接触变应原易使机体特异性 IgE 水平增高。一般而言,反复接触某一些变应原才会引起对该变应原的特异性反应,接触的变应原越多,症状出现得越快^[3]。蓝继奎等^[4]以阳性抗原卵白蛋白和部分中药注射剂为受试物,进行被动皮肤过敏试验(PCA),表明致敏剂量是影响 PCA 试验的一个重要因素,在一定的范围内,PCA 试验反应强弱呈现剂量依赖性,当抗原致敏剂量小于一定量时,PCA 试验阴性。文献^[5]提示,在抗原致敏剂量处于临界状态时,增加免疫次数能够增强 PCA 试验敏感性,增加免疫次数可使特异性 IgE 抗体进一步升高。该实验选用豚鼠,以卵蛋白(OVA)为致敏源,观察对特异性 IgE 反应及全身反应的影响,拟用过敏原浓度与血清中 IgE 之间的量效关系,从而为建立体外过敏原评价体系奠定基础,为过敏原的标准化等问题提供技术支持。

1 材料和方法

1.1 动物及分组 Hartley 豚鼠,普通级,由广东省医学实验动物中心提供,实验动物许可证号 SCXK(粤)2008-0002(粤监证字 2008A027)。实验环境温度 25~30℃,相对湿度 40%~60%。用不含卵蛋白组分的豚鼠特种饲料常规喂养。动物分组①Hartley 豚鼠 40 只,雄性,体重(300 ± 350) g,随机分为 A, B, C, D 4 组:0.080 mg·mL⁻¹ OVA 致敏组、0.040 mg·mL⁻¹ OVA 致敏组、0.020 mg·mL⁻¹ OVA 致敏组及空白组,每组 10 只。②Hartley 豚鼠 18 只,雄性,体重(250 ± 300) g,随机分为 E, F, G 3 组:0.004 mg·mL⁻¹ OVA 致敏组、0.002 mg·mL⁻¹ OVA 致敏组、0.001 mg·mL⁻¹ OVA 致敏组,每组 6 只。实验室喂养 3d,以适应环境。

1.2 试剂及仪器 豚鼠 IgE 试剂盒,美国 ADL 公司生产,产品编号:RT110371;BIO-RAD Model 680 型酶标仪;LD4-2A 型低速离心机。

1.3 过敏原的制备 实验用过敏原参照文献^[6]制备。将卵蛋白定量,用生理盐水稀释至所需各浓度,临用配制。

1.4 豚鼠免疫 根据全身过敏试验的方法^[6]进行实验。①豚鼠饲养 1 周后开始免疫,取过敏原卵蛋白提取液,按分组隔日 ip(每只 0.5 mL,下同),共 3 次,然后将它们均分为两组。第 1 组于首次注射后的第 14 天 iv 卵蛋白提取液,观察注射后有无抓鼻、咳嗽、竖毛、抽搐、呼吸困难、大小便失禁、休克和死亡等反应,对其过敏反应严重程度进行分级(0 症状:正常;1~4 症状:不安、立毛、发抖、搔鼻;5~10

[收稿日期] 2009-10-04

[基金项目] 国家科技支撑计划资助项目(2006BAIB03-06);国家自然科学基金(20905015);广东省自然科学基金(9451022401003240);广东药学院人才引进科研启动基金项目(2007ZYX07,2007ZYX06)

[通讯作者] * 沈志滨, Tel: (020) 39352179; E-mail: szb8113@yahoo.com.cn

症状:喷嚏、咳嗽、呼吸急促、排尿、排粪、流泪;11~19 症状:呼吸困难、罗音、紫癜、步态不稳、跳跃、喘息、痉挛、横转、潮式呼吸;20 症状:死亡,见表 1)。第 2 组于首次注射后 21d 同样以 iv 卵蛋白提取液,并进行观察。②在此组实验中,只观察第 14d 时的反应。空白对照组注射等体积生理盐水,各实验组豚鼠分别在激发后眼球后血管丛采血,分离血清,-20℃ 贮存备用,用于 IgE 测定。

表 1 全身致敏性评价标准

症状评分	过敏反应分级	过敏反应强度评价
0	-	阴性
1~4	+	弱阳性
1~10	++	阳性
11~19	+++	强阳性
20	++++	极强阳性

1.5 IgE 测定 于试验第 14 d 和 21 d 取血清分离血清,IgE 测定试剂盒分析各组血清 IgE 水平。具体方法参见试剂盒说明。主要步骤:在包被有抗豚鼠 IgE 抗体的微孔中加入标本(或样品)及酶标耦合液后(36±2)℃ 孵育 60 min;洗掉未结合的血清组分,加入底物 A,B 后(36±2)℃ 下避光孵育 15 min,最后加入终止液后,酶标仪 450 nm 波长测定 A 值。显色

的吸光度与最初结合在微孔中的 IgE 成比例。

1.6 统计学处理 采用 SPSS11.0 统计软件进行分析,记量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较采用单因素方差分析。记数资料比较采用多样本非参数检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 致敏豚鼠过敏症状分析

2.1.1 致敏期 各组豚鼠均无异常表现,但部分豚鼠出现死亡。

2.1.2 激发期 激发后立即观察动物的表现,看有无出现抓鼻、竖毛、呼吸困难、痉挛、休克及死亡等反应症状。过敏性休克常在数分钟内出现,严重的可在 5~10 min 左右出现动物死亡。对动物至少观察 24 h。根据动物表现,按表 1 标准对过敏反应的强度进行判断。

由表 2 可见,全身过敏实验阳性对照组(OVA)致敏率为 100%,大部分过敏反应级别较高,OVA 对照组在激发后 5min 内豚鼠出现明显过敏症状,前爪频繁搔挠口鼻处,体毛直立,身体颤抖,呼吸频率加快,精神萎靡,活动减少,大部分在 10 min 内休克死亡;未死亡的豚鼠在 60~180 min 内基本恢复正常;空白对照组无明显过敏症状,致敏率为 0%。

表 2 以不同剂量 OVA 致敏豚鼠过敏反应发生率

组别	时间 /d	OVA 致敏量 /mg·mL ⁻¹	阴性 (-)	弱阳性 (+)	阳性 (++)	强阳性 (+++)	极强阳性 (++++)	发生率 (%)	平均分
A1	14	0.080	—	—	—	—	4	100	18.5
A2	21	0.080	—	—	—	—	4	100	16.3 ¹⁾
B1	14	0.040	—	—	1	—	3	100	20.4
B2	21	0.040	—	—	—	—	4	100	20.8 ¹⁾
C1	14	0.020	—	—	—	—	5	100	18.4
C2	21	0.020	—	—	—	—	4	100	14.0 ¹⁾
D1	14	0.000	5	—	—	—	—	0	0.0
D2	21	0.000	5	—	—	—	—	0	0.0
E	14	0.004	—	—	1	—	4	100	20.0
F	14	0.002	—	—	2	—	4	100	12.2
G	14	0.001	—	—	—	1	5	100	14.5

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$ (下同)。

通过实验发现,9 组过敏反应率均为 100%,但从过敏反应症状发现卵蛋白浓度不同,过敏症状不尽相同,为了使分析结果更准确,我们对每一个症状给与分值。具体来讲,它是综合比较各种指标的重要性及严重程度,对每号实验结果评定出一个综合

分数,而以此分数作为单指标进行统计分析。此种方法的关键是评分,既要反映各项症状的优劣,又要反映各项症状的重要性。

从表 1 发现,在该实验中,第 20 症状(死亡)是最严重的现象,故给与 4 分;0 症状:0 分;1~4 症

状:每一个症状各给与 1 分;5 ~ 10 症状:每一个症状各给与 2 分;11 ~ 19 症状:每一个症状各给与 3 分。所以,其评分为将每一个症状的分值加和即可,见表 2。

由表 2 可见,A 和 C 组过敏平均分 21 d 低于 14 d,显示过敏反应可能 21 d 时呈下行。B 组过敏平均分 21 d 与 14 d 基本接近。F 和 G 组过敏反应明显低于其他组,这说明过敏反应可能和卵蛋白浓度呈一定的相关性。

通过多样本非参数检验,14 d 时过敏反应无明显差异,21 d 时过敏反应有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 IgE 测定结果 IgE 测定结果如表 3 所示。14 d 时各试验组血清中 IgE 值均较空白对照组升高,但 21 d 时各试验组血清中 IgE 值并无较好的规律,且 A2 组 IgE 值低于空白对照组。通过单因素方差分析,14 d 时 OVA 组与对照组比,血清 IgE 值水平无明显差异 ($P > 0.05$),21 d 时 OVA 组与对照组比,血清 IgE 值水平显著差异 ($P < 0.05$)。

表 3 不同剂量 OVA 对 IgE 的影响 ($\bar{x} \pm s, \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

分组	IgE 值	分组	IgE 值
A1	218.51 ± 141.53	D1	167.48 ± 60.19
A2	154.05 ± 22.52 ¹⁾	D2	372.31 ± 93.34
B1	180.91 ± 90.82	E	189.50 ± 23.80
B2	189.58 ± 97.79 ¹⁾	F	182.94 ± 25.12
C1	168.60 ± 55.93	G	193.27 ± 19.65
C2	236.45 ± 52.19 ¹⁾		

2.3 相关性分析

2.3.1 过敏症状与 IgE 的相关性分析 本试验对过敏症状的综合分值和 IgE 进行了相关分析,发现 14 d 时无相关性,21 d 时有相关性,方程: $\text{IgE} = 350.81 - 8.543x$ 过敏症状,相关系数 $r = 0.719$ 。说明过敏症状与 IgE 值有一定的相关性。

2.3.2 IgE 与 OVA 浓度的相关性分析 一共考察了 7 个浓度的 OVA 对豚鼠过敏反应的影响,发现 IgE 值并没有非常好的趋势,对 IgE 和 OVA 浓度进行了相关性分析,发现 A1, B1, C1 3 组 IgE 值与 OVA 呈正相关, $Y = 0.001 2X - 0.1748$, $r = 0.995 6$, A2, B2, C2 3 组 IgE 值与 OVA 呈负相关, $Y = 0.000 7X - 0.184 4$, $r = 0.962 1$ 。说明过敏反应指标 IgE 值与 OVA 浓度在一定浓度范围内呈现相关性。

3 讨论

I 型变态反应是一复杂的免疫性疾病,尽管近年来在其机制、诊断及其防治方面均取得了较大进展,但仍未很好解决。明确过敏原的种类、成分、主次过敏原和致敏剂量是关键所在。但目前国内尚缺乏研究此领域的评价体系。

过敏性动物模型的建立是现阶段过敏症研究的主要手段,豚鼠因易于过敏,常用于速发型过敏性呼吸道疾病研究。主要有两种致敏途径,即口服和注射。本实验根据全身过敏试验的方法进行实验,致敏时采用腹腔注射,激发时采用静脉注射。实验结果表明,致敏期间各组豚鼠均无异常表现;全身过敏实验阳性对照组(OVA)致敏率为 100%,阴性对照组的致敏率为 0%;过敏症状综合评分表明,过敏反应可能和卵蛋白浓度呈一定的相关性。通过多样本非参数检验,21 d 时过敏反应有统计学意义 ($P < 0.05$)。

本研究发现 OVA 致敏原的剂量在一定浓度范围内与过敏反应指标 IgE 呈现相关性,比较各组血清 IgE 水平,未发现较好的规律性变化。可能样本量较少(4 ~ 6 只),且豚鼠血清 IgE 波动大,导致标准差较大,其致敏机制尚待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Geha R S. Nature versus nurture in allergy and hypersensitivity[J]. Curr Opin Immunol, 2003, 15(6): 603.
- [2] Hamelmann E, Tateda K, Oshiba A, Gelfand E W. Role of IgE in the development of allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness: A murine model[J]. Allergy, 1999, 54(4): 297.
- [3] 林燕萍. 变态反应疾病知多少? 首届国际中西医结合变态反应学术会议暨全国中西医结合变态反应第三次学术会议资料汇编[C]. 北京:2007:372.
- [4] 蓝继奎. 中药注射剂 I 型变态反应试验方法学研究[D]. 重庆:重庆医科大学,2008:1.
- [5] 顾一峰,张新民,马宇滢,等. 不同免疫次数对大鼠血清总 IgE 和特异性 IgE 的影响[J]. 上海实验动物科学, 2004, 24(4): 234, 239.
- [6] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:160.

[责任编辑 何伟]