

依据,同时,各类胰岛素促泌剂可以促进胰岛素的释放,高糖刺激的胰岛素释放也很明显,但随着药物作用时间的延长及药物浓度的增加,胰岛 β 细胞凋亡逐渐增加,胰岛素释放增加的幅度减少。综合实验结果可见,磺脲类药物对胰岛 β 细胞凋亡的影响较大,相比之下,苯甲酸衍生物对胰岛 β 细胞的凋亡影响较小,甚至在某种程度上可以促进胰岛 β 细胞增生,减少其凋亡。

胰岛素促泌剂对胰岛 β 细胞的凋亡的作用,可能与其产生的糖毒性恶性循环有关,胰岛素促泌剂尤其是磺脲类药物,与相应的受体结合以后,很难再与受体分离,可造成持续的胰岛素高分泌,直至凋亡,凋亡后的细胞无法释放胰岛素,产生磺脲类药物继发性失效的现象,血糖重新升高或者是低血糖的频发,使得本已不堪重负的 β 细胞也加快了走向衰竭的步伐,凋亡进一步加重^[6]。本研究结果可为胰岛 β 细胞凋亡的机制提供依据,对临床根据患者病程、胰岛细胞受损情况,指导 2 型糖尿病患者合理用药,选择

不同的降糖药物有一定的指导意义。

参考文献

- 1 Lupi R, Del Prato S. β - cell apoptosis in type 2 diabetes: quantitative and functional consequences[J]. *Diabetes & Metabolism*, 2008, 34: S56 - S64
- 2 Kathrin Maedler, Richard D. Carr, Domenico Bosco, *et al.* Sulfonylurea Induced β - Cell Apoptosis in Cultured Human Islets[J]. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2005, 90(1): 501 - 506
- 3 Del Prato S, Bianchi C, Marchetti P. beta - cell function and anti - diabetic pharmacotherapy[J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2007, 23(7): 518 - 527
- 4 UK. Prospective Diabetes Study Group. UK prospective diabetes study 16: overview of 6 years' therapy of type 2 diabetes: a progressive disease[J]. *Diabetes*, 1995, 44(11): 1249 - 1258
- 5 Jaber LA, Antal EJ, Slaughter RL, *et al.* comparison of pharmacokinetics and pharmacodynamics of short - and long - term glyburide therapy in NIDDM[J]. *Diabetes Care*, 1994, 17: 1300 - 1306
- 6 Donath MY, Ehses JA, Maedler K, *et al.* Mechanisms of β - cell death in type2 diabetes[J]. *Diabetes*, 2005, 54(2): S108 - S113

(收稿: 2009 - 08 - 24)

(修回: 2009 - 12 - 28)

小鼠 SEB/OVA 变应性鼻炎模型的实验研究

马 靖 刘 涛

摘 要 目的 建立变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)小鼠模型,研究金黄色葡萄球菌肠毒素 B(SEB)和卵清蛋白(OVA)在建立 AR 模型中的作用。**方法** 将 40 只 6~8 周 Balb/c 小鼠随机分为 4 组:OVA 组、SEB 组、OVA + SEB 组、生理盐水组,并建立小鼠 AR 模型。采用析因设计分析各组小鼠临床症状评分、血清 IgE 和 IL - 4 的水平,并对鼻黏膜行组织形态学观察。**结果** OVA 组、SEB 组、OVA + SEB 组及生理盐水组小鼠的症状评分分别为: 0.90 ± 0.99 、 0.70 ± 0.82 、 6.80 ± 1.03 、 0.60 ± 0.70 , OVA、SEB 交互效应 $P < 0.01$,有统计学意义,且 OVA + SEB 组鼻黏膜出现明显的 AR 形态学改变。血清 IgE、水平分别为 25.41 ± 3.87 ng/ml、 20.11 ± 2.23 ng/ml、 122.72 ± 5.68 ng/ml、 18.67 ± 2.00 ng/ml;IL - 4 的水平分别为 27.37 ± 1.52 pg/ml、 24.05 ± 2.13 pg/ml、 63.73 ± 3.81 pg/ml、 23.50 ± 2.62 pg/ml,二者 OVA、SEB 交互效应均有统计学意义。**结论** 只有 SEB 和 OVA 协同作用后可致小鼠 AR,即 SEB 可以提高机体对 OVA 的易感性,发挥免疫佐剂的作用。

关键词 变应性鼻炎 金黄色葡萄球菌肠毒素 B SEB

The Study of SEB/OVA Allergic Rhinitis Mice Model. Ma Jing, Liu Tao. Department of Otolaryngology - Head & Neck Surgery, First Clinical Medical College, Shanxi Medical University, Shanxi 030001, China

Abstract Objective To establish mice model of allergic rhinitis(AR) and to study the role of Staphylococcal enterotoxin B(SEB) and ovalbumin(OVA) in the model. **Methods** Forty Balb/c mice were evenly randomized into OVA group, SEB group, OVA + SEB group and normal sodium group and AR model was established. The symptom scores, total serum IgE concentration, IL - 4 concentration were analyzed by factorial design. Meanwhile, the morphology change of nasal mucosa was observed. **Results** The symptom scores in OVA group, SEB group, OVA + SEB group and normal sodium group were 6.80 ± 1.03 , 0.90 ± 0.99 , 0.70 ± 0.82 , 0.60 ± 0.70 respec-

tirely. The interaction of OVA and SEB had statistical significance ($P < 0.01$). Nasal mucosa of OVA + SEB group displayed an AR morphology change. Meanwhile, Total serum IgE concentrations were $25.41 \pm 3.87 \mu\text{g/ml}$, $20.11 \pm 2.23 \mu\text{g/ml}$, $122.72 \pm 5.68 \mu\text{g/ml}$, $18.67 \pm 2.00 \mu\text{g/ml}$ respectively. IL-4 concentration were $27.37 \pm 1.52 \text{pg/ml}$, $24.05 \pm 2.13 \text{pg/ml}$, $63.73 \pm 3.81 \text{pg/ml}$, $23.50 \pm 2.62 \text{pg/ml}$ respectively. the interaction of OVA and SEB in IgE and IL-4 concentration had statistical significance too. **Conclusion** Only OVA and SEB cooperation could induce AR development. SEB can elevate the affectivity of OVA to the organism and play a role of immunity adjuvant.

Key words Allergic rhinitis; Staphylococcal enterotoxin B; SEB

AR 是耳鼻咽喉—头颈外科的常见病之一,是由 IgE 介导的鼻黏膜的 I 型变态反应性疾病。金黄色葡萄球菌常驻人体表面,如呼吸道黏膜,其产生的 SEB 被用作有代表性的微生物产物。Shiomori 等的研究提示,SEB 可促进常年性变应性鼻炎 (PAR) 的发生。PAR 患者鼻腔金黄色葡萄球菌检出率显著高于非变应性对照组,尽管 SEB 产物量与症状程度无显著相关,但其症状计分也显著高于金黄色葡萄球菌检出阴性的 PAR 患者^[1]。鉴于 SEB 的免疫调节和对促炎细胞作用的证据越来越多,提示葡萄球菌感染与 AR 的发病机制有关。OVA 因具有可靠的抗原性而被认为是一种理想的抗原模型,经常用于研究过敏和抗原相关性炎症。本实验拟通过构建小鼠 AR 模型,研究 SEB 和 OVA 在建立 AR 模型中的作用。

材料与方法

1. 材料:(1) 实验动物:清洁级 Balb/c 雌性小鼠,6~8 周,15~20g 左右,共 40 只,购于中国医学科学院实验动物研究所。40 只小鼠随机分为 4 组:OVA 组、SEB 组、OVA + SEB 组、生理盐水组,每组 10 只。(2) 主要试剂:鸡卵清蛋白 (OVA) 及 SEB (产品号 s4881) 均购于美国 Sigma 公司。IgE 和 IL-4 ELISA 试剂盒均购置美国 R&D 公司。

2. 方法及步骤:(1) AR 模型的建立:OVA 组 OVA20 μg 溶于生理盐水中于第 0、3、6、10、14 天腹腔注射行基础致敏, OVA2 μg 溶于生理盐水中于 21~27 天连续给药 7 天进行激发。SEB 组 SEB10 μg 基础致敏,2 μg 激发;OVA + SEB 组 OVA20 μg + SEB10 μg 基础致敏, OVA2 μg + SEB2 μg 激发;生理盐水组以生理盐水代替,后 3 组给药时间同 OVA 组。(2) 症状评分:最后一次给药后观察半小时小鼠症状,并进行评分。计分标准:1 分为喷嚏 1~3 个,清涕流至前鼻孔,单前肢偶有

挠鼻;2 分为喷嚏 4~10 个,清涕超过前鼻孔,双前肢挠鼻;3 分为喷嚏 ≥ 11 个,清涕流至面部,不停到处擦鼻。叠加量计分,总分大于 5 分造模成功。(3) 标本的制备:末次激发 12h 后摘眼球取外周血处死小鼠并于 3000r/min 离心收集血清。(4) 双抗夹心 ELISA 法检测血清 IgE 和 IL-4:反应板每孔加入 100 μl 血清样品,37 $^{\circ}\text{C}$ 包被 90min。每孔用 350 μl 洗涤液洗涤 5 遍,生物素化二抗工作液 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1h,每孔加入 350 μl 洗涤液洗涤 5 遍。每孔加入 100 μl 辣根过氧化物酶标记的亲本素,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30min。洗涤 5 遍,加入 TMB 显色。采用 Model550 型酶标仪在 450nm 处检测和数据采集。(5) 组织形态学观察:切片行苏木精-伊红 (H-E) 染色,在 BI2000 医学图像分析系统 (成都泰孟科技公司) 下观察。

3. 统计学处理:症状评分、ELISA 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用析因设计,结果用 SPSS13.0 软件进行统计学分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 症状评分:SEB + OVA 组 10 只动物均出现不同程度喷嚏、流涕及挠鼻症状,评分都大于 5 分,造模成功。而 OVA 组、SEB 组及生理盐水组偶有喷嚏、挠鼻、无流涕,评分均小于 5 分,造模未成功。SEB + OVA 组、OVA 组、SEB 组及生理盐水组的症状评分分别为 6.80 ± 1.03 、 0.90 ± 0.99 、 0.70 ± 0.82 、 0.60 ± 0.70 。统计结果显示 (表 1):虽然 a、b 主效应 P 均小于 0.01 有统计学意义,但是根据 AR 临床症状评分标准,无专业意义。 $a * b < 0.01$,交互效应有统计学意义,即两因素协同作用可致小鼠 AR 发生;a 与 b 的单独效应相等,经计算结果为 2.85,即使用 b 因素时,用不用 a 因素的差别比不使用 b 时用不用 a 的差别平均多 2.85。

表 1 症状评分析因设计方差分析结果

变异来源	SS	<i>v</i>	MS	<i>F</i>	<i>P</i>
处理	207.025	1	207.025	265.228	<0.001
OVA 因素	105.625	1	105.625	135.320	<0.001
SEB 因素	87.025	1	87.025	111.491	<0.001
OVA 与 SEB 交互效应	81.225	1	81.225	104.060	<0.001
误差	28.100	36	0.781		
总变异	509.000	40			

2. 形态学观察:SEB + OVA 组见纤毛结构大量脱

落,组织水肿,小血管增生,黏膜上皮固有层嗜酸性

粒细胞浸润,淋巴细胞浸润。其余 3 组纤毛结构完整,无组织水肿现象,上皮细胞排列整齐,无明显是酸

性粒细胞浸润(图 1)。

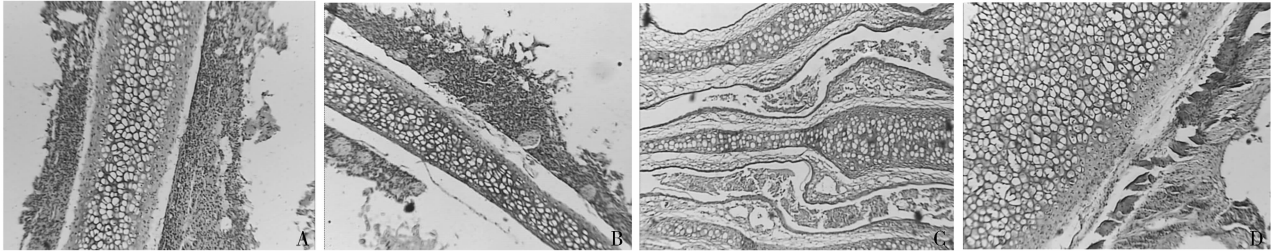


图 1 鼻中隔黏膜形态学观察(H-E 染色,×40)
A. OVA 组;B. SEB 组;C. OVA + SEB 组;D. 生理盐水组

3. 血清 IgE 检测:SEB + OVA 组(模型组)、OVA 组、SEB 组及生理盐水组的血清 IgE 浓度分别为 $122.72 \pm 5.68\text{ng/ml}$ 、 $25.41 \pm 3.87\text{ng/ml}$ 、 $20.11 \pm 2.23\text{ng/ml}$ 、 $18.67 \pm 2.00\text{ng/ml}$ 。统计结果显示(表 2):a、b 主效应

P 值均小于 0.01,有统计学意义,但无专业意义。 $a * b < 0.01$,a、b 的交互效应有统计学意义,即两因素协同作用可致模型组小鼠血清 IgE 明显增高;a 与 b 的单独效应相等为 29.00ng/ml 。

表 2 IgE 析因设计方差分析结果

变异来源	SS	<i>v</i>	MS	<i>F</i>	<i>P</i>
处理	86490.000	1	86490.000	6091.189	<0.001
OVA 因素	29394.831	1	29394.831	2070.175	<0.001
SEB 因素	24821.320	1	24821.320	1748.079	<0.001
OVA 与 SEB 交互效应	23419.792	1	23419.792	1649.374	<0.001
误差	511.171	36	14.199		
总变异	164637.115	40			

4. 血清 IL-4 检测:SEB + OVA 组(模型组)、OVA 组、SEB 组及生理盐水组的血清 IL-4 浓度分别为 $63.73 \pm 3.81\text{pg/ml}$ 、 $27.37 \pm 1.52\text{pg/ml}$ 、 $24.05 \pm 2.13\text{pg/ml}$ 、 $23.50 \pm 2.62\text{pg/ml}$ 。统计结果显示(表

3):a、b 主效应无专业意义, $a * b < 0.01$,a、b 的交互效应有统计学意义,即两因素协同作用可致模型组小鼠血清 IgE 明显增高;a 与 b 的单独效应相等为 17.92pg/ml 。

表 3 IL-4 析因设计分析结果

变异来源	SS	<i>v</i>	MS	<i>F</i>	<i>P</i>
处理	48080.356	1	48080.356	6778.334	<0.001
OVA 因素	4738.458	1	4738.458	668.024	<0.001
SEB 因素	3399.598	1	3399.598	479.273	<0.001
OVA 与 SEB 交互效应	3211.981	1	3211.981	452.823	<0.001
误差	255.357	36	7.093		
总变异	59685.750	40			

讨 论

金黄色葡萄球菌广泛分布于空气中和人体表面。夹杂在吸入空气中的金黄色葡萄球菌会在鼻黏膜局部生长、繁殖、产生毒素(如 SEB)。SEB 属于超抗原,和普通抗原不同的一点是,超抗原可以直接激活 5%~30% 的 T 细胞,而普通抗原只能直接激活不到 0.01% 的 T 细胞。SEB 可能作为一种免疫佐剂参与免疫调节。免疫佐剂的基本作用是加速淋巴细胞的

增生,使免疫反应的速度加快,幅度增强。通常用的免疫佐剂有灭活的结核杆菌,霍乱毒素和减毒的百日咳杆菌等^[2,3]。这些免疫佐剂和致敏原一起使用时可能诱导出 Th1 和 Th2 两种类型的免疫反应,或以 Th2 为主的免疫反应^[4,5]。
人们在日常生活中接触致敏原的频率极高,例如吸入的空气中夹杂有致敏性极强的植物花粉等,绝大部分人对这些致敏原并不发生反应。这是由于免疫

耐受现象的存在,避免了变态反应的发生。因此,要引起机体的变态反应,除了摄入致敏原是必需的因素之外,免疫佐剂也是必不可少的因素。由于 SEB 具备免疫佐剂的各种性质,并介入 Th1 和 Th2 免疫反应^[6,7]。同时,SEB 能增加上皮的通透性,从而导致同时摄入的抗原 OVA 吸收增加,即 SEB 和抗原共同作用可以提高机体对变态反应的易感性^[8]。强势的 Th2 细胞反应在 AR 的发生、发展中起着重要作用。Th2 细胞能够分泌 IL-4、IL-5、IL-10、IL-13 等细胞因子,其中 IL-4 可促使 B 细胞转换为浆细胞并产生 IgE,IgE 结合于肥大细胞、嗜碱性粒细胞表面,当再次接触抗原,肥大细胞、嗜碱及嗜酸性粒细胞是在鼻黏膜中局部聚集并释放炎性介质,导致鼻部过敏症状。本实验中,单独的 OVA 和或者 SEB 并不能引起小鼠鼻症状,但二者协同作用后,小鼠有明显的鼻过敏反应,同时血清 IgE 及 IL-4 水平明显增高,说明 SEB 起到了免疫佐剂的作用,提高了机体对普通抗原 OVA 的易感性,从而导致小鼠 AR 的发生。

本实验研究小鼠 SEB/OVA 变应性鼻炎模型,不仅建立了一个新的可用于呼吸道过敏和其他类型变应性疾病机制研究的模型,而且对 AR 的临床治疗有指导意义。

参考文献

- Shiomi T, Yoshida S, Miyamoto H, *et al.* Relationship of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* to pathogenesis of perennial allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*, 2000, 105 (3): 449 - 454

- Yang PC, Berin MC, Yu L, Perdue MH. Mucosal pathophysiology and inflammatory changes in the late phase of the intestinal allergic reaction in the rat. *Am J Pathol*, 2001, 158 (2): 681 - 690
- Yang PC, Berin MC, Yu LC, Conrad DH, Perdue MH. Enhanced intestinal transepithelial antigen transport in allergic rats is mediated by IgE and CD23 (FcεR2). *J Clin Invest*, 2000, 106 (7): 879 - 886
- Holmgren J, Adamsson J, Anjuere F, *et al.* Mucosal adjuvants and Anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA. *Immunol Lett*, 2005, 97 (2): 181 - 188
- Boyd AP, Ross PJ, Conroy H, Mahon N, Lavelle EC, Mills KH. Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin modulates innate and adaptive immune responses; distinct roles for acylation and enzymatic activity in immunomodulation and cell death. *J Immunol*, 2005, 175 (2): 730 - 738
- Dionne S, Laberge S, Deslandres C, Seidman EG. Modulation of cytokine release from colonic explants by bacterial antigens in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol*, 2003, 133 (1): 108 - 114
- Kedzierska A, Kaszuba - Zwoinska J, Słodowska - Hajduk Z, Kapinska - Mrowiecka M, Czubak M, Thor P, Wojcik K, Pryjma J. SEB-induced T cell apoptosis in atopic patients—correlation to clinical status and skin colonization by *Staphylococcus aureus*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2005, 53 (1): 63 - 70
- Yang PC, Jury J, Soderholm J, McKay DM, Sherman P, Perdue MH. Chronic psychological stress in rats induces intestinal sensitization to luminal antigens. *Am J Pathol*, 2006, 168 (1): 104 - 114

(收稿:2009-11-05)

(修回:2009-12-24)

(上接第 10 页)

- Vajkoczy P, Meyer B, Weidauer S, *et al.* Clazosentan (AXV-034343), a selective endothelin A receptor antagonist, in the prevention of cerebral vasospasm following severe aneurysmal subarachnoid hemorrhage: Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter phase IIa study[J]. *J Neurosurg*, 2005, 103: 9 - 17
- Pyne - Geithman GJ, Caudell DN, Cooper M, *et al.* Dopamine D(2) - receptor-mediated increase in vascular and endothelial NOS activity ameliorates cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in vitro [J]. *Neurocrit Care*, 2009, 10 (2): 225 - 231
- Pluta RM. Dysfunction of nitric oxide synthases as a cause and therapeutic target in delayed cerebral vasospasm after SAH[J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2008, 104: 139 - 147
- Khurana V, Sohni Y, Mangrum W, *et al.* Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism predict susceptibility to aneurysmal subarachnoid hemorrhage and cerebral vasospasm[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004, 24: 291 - 297
- McGirt M, Pradilla G, Legnani F, *et al.* Systemic administration of simvastatin after the onset of experimental subarachnoid hemorrhage attenuates cerebral vasospasm[J]. *Neurosurgery*, 2006, 58: 945 - 951
- Lynch J, Wang H, McGirt M, *et al.* Simvastatin reduces vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: Results of a pilot randomized clinical trial[J]. *Stroke*, 2005, 36: 2024 - 2026

- Ishiguro M, Murakami K, Link T, *et al.* Acute and chronic effects of oxyhemoglobin on voltage-dependent ion channels in cerebral arteries [J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2008, 104: 99 - 102
- Ishiguro M, Wellman TL, Honda A, *et al.* Emergence of a R-type Ca^{2+} channel (CaV2.3) contributes to cerebral artery constriction after subarachnoid hemorrhage [J]. *Circ Res*, 2005, 96 (4): 419 - 426
- Wellman T, Jenkins J, Penar P, *et al.* Nitric oxide and reactive oxygen species exert opposing effects on the stability of hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α) in explants of human pial arteries [J]. *FASEB J*, 2004, 18: 379 - 381
- Link TE, Murakami K, Beem - Miller M, *et al.* Oxyhemoglobin-induced expression of R-type Ca^{2+} channels in cerebral arteries [J]. *Stroke*, 2008, 39 (7): 2122 - 2128
- Ohkuma H, Suzuki S. Histological dissociation between intra- and extraparenchymal portion of perforation small arteries after experimental subarachnoid hemorrhage in dogs [J]. *Acta Neuropathol*, 1999, 98: 374 - 382
- Ohkuma H, Manabe H, Tanaka M, Suzuki S. Impact of cerebral microcirculatory changes on cerebral blood flow during cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage [J]. *Stroke*, 2000, 31: 1621 - 1627

(收稿:2009-11-03)

(修回:2009-12-22)