

建立特应性皮炎动物模型的方法学进展

孟昭影 赵自刚 社会博 牛春雨

特应性皮炎(atopic dermatitis, AD)是一种常见的以顽固性皮肤瘙痒和自发性皮炎为主要临床特征的慢性复发性皮肤病,常伴有哮喘、过敏性鼻炎、湿疹等过敏性疾病,主要累及婴幼儿和学前儿童。AD的病因复杂,涉及遗传、免疫、感染、环境、精神等多种因素,人们也从基因遗传、免疫功能紊乱以及Th1/Th2失衡等角度探讨其发病学机制,但至今尚未完全阐明^[1]。为了深入研究AD的发病机制,探讨与发现新的治疗方法,多数学者开始复制各种不同致病因素或发病机制的多种动物变态反应模型,结合皮肤表现,研究AD的发病机制与治疗手段。鉴于导致皮肤变态反应的多样性,加之不同动物对不同过敏原的反应性不同,这些均决定了建立AD动物模型的复杂性和多样性。因此,应用何种致敏方法、何种动物,建立AD动物模型反映的发生机制也不尽相同。本文就近年来建立AD动物模型的方法学进展简单综述。

一、被动皮肤过敏反应

世界变态反应组织(WAO)认为AD是一种遗传性皮肤屏障缺陷并与IgE相关的以淋巴细胞浸润为主的皮肤炎症^[2]。研究表明,AD的炎症介质表达为双向模式,即急性期炎症表达为Th2细胞因子(如IL-4),慢性期炎症表达为Th1细胞因子(如IFN- γ 和IL-12);大多数AD患者血清总IgE、抗原特异性IgE以及嗜酸性粒细胞数目明显升高,表明AD属于I型变态反应^[3]。因此,AD属于I型变态反应性疾病的典型代表。被动皮肤过敏反应(passive cutaneous anaphylaxis reaction, PCA)是研究I型变态反应性疾病的常用动物模型,能够比较系统地反映I型变态反应性疾病的病理生理过程,因此多数研究均选用PCA作为AD的动物模型,这一模型在过敏性疾病基础研究中发挥了重要作用^[4-7]。

PCA是利用与同种或异种动物组织有结合性的

抗体所引起的局部过敏反应,来检验抗体或抗原的高敏感度方法。PCA的操作方法,一般是首先应用卵清蛋白(OVA)制备同种或异种动物的抗血清,再将抗血清注射于动物皮肤内,观察蓝斑反应。其作用机制为,有结合性的抗体与组织的肥大细胞结合,向抗原液内混入伊文蓝(Evans)等色素再注射到静脉内,其抗原则在抗血清注射部位与附着在肥大细胞上的抗体起反应,于是组胺或其他药物因子则游离出来而出现局部过敏反应;由于血管通透性升高,故含色素的血浆便渗漏到组织内,使皮肤出现蓝斑;通过测定蓝斑的直径,可作为反应强度的指标,或者进行抗体稀释试验,用呈现阳性的最高稀释度的倒数来作为抗体价。我室应用该方法,成功制备了大鼠的同种PCA模型,其皮损区表现与AD临床患者表现极为相似^[8,9]。Spergel等^[10]用OVA制成斑贴致敏无菌条件下的BALB/c小鼠,引起小鼠血清IgE升高和局部皮炎表现;皮损组织病理检查发现表皮颗粒层增生,灶性棘层肥厚和中性粒细胞聚集,中度海绵水肿;真皮中性粒细胞、淋巴细胞、浆细胞和嗜酸粒细胞浸润。同时,研究发现血清卵白蛋白特异性IgE明显升高,皮损局部IL-4、IL-5升高,IFN- γ 随病程延长而升高,提示随着病程延长,Th2型免疫反应向Th1型、Th2型混合免疫反应转化,这点类似于AD慢性皮损的改变。因此,认为可以用PCA作为研究AD发病机制和治疗的理想的实验模型。该模型具有敏感性高、费用低、操作简便和结果直观等特点。

二、吸入变应原

研究表明,吸入性变应原包括尘螨和动物皮毛是人类AD的一个重要诱因,减少和避免接触尘螨可以使AD的临床症状得到明显改善^[3]。Sasakawa等^[11]将少量尘螨抗原提取液注射到NC小鼠皮下,诱发产生了皮炎损害,成功复制小鼠AD模型,其皮损组织病理表现为表皮增生、角化过度,大量CD4⁺T淋巴细胞、嗜酸性粒细胞及肥大细胞浸润,CD4⁺T细胞表达IL-4、IL-5增加。Huang等^[12]发现该小鼠皮肤组织中肥大细胞周围存在大量神经纤维,证实P物质、

作者单位:075000 张家口,河北北方学院附属第一医院皮肤科(孟昭影);河北北方学院微循环研究所(赵自刚、社会博、牛春雨)

生长因子等相关神经源性物质与 AD 发病有一定的关系。

三、转基因模型

研究表明,基因遗传因素参与 AD 的发生^[1],故应用转基因动物模型也可观察 AD 的发生机制。Chan^[13]等报道了 K14-IL-4 转基因小鼠模型,该 K14-IL-4 转基因小鼠一般在 4 个月时即可出现慢性自发性瘙痒性皮炎,如浸润增厚、鳞状脱屑、苔藓样变;组织病理检查可见早期为表皮角化过度及肥大细胞脱颗粒,晚期为表皮角化不全,单核细胞、嗜酸性粒细胞等炎症细胞的浸润;此外 K14-IL-4 转基因小鼠也存在着皮肤屏障功能受损的表现,容易引起葡萄球菌性脓皮病。有研究表明在儿童和成人 AD 患者的皮损处金葡菌的检出率高达 78%~100%,并与皮损的严重程度密切相关^[14]。这些研究也证实了转基因小鼠模型与感染在 AD 发病学中的意义,因此,可以用 K14-IL-4 转基因小鼠模型来探讨 IL-4 以及金黄色葡萄球菌在 AD 发病过程中的作用等。

四、基因缺陷模型

由于基因遗传因素在 AD 的发病学中具有重要作用^[1],故应用基因缺陷动物或基因敲除技术也可复制 AD 的动物模型。核因子 κ B (NF- κ B) 是具有多项转录调节作用的蛋白质,调节免疫和炎症因子表达,在炎症和免疫反应中起枢纽作用^[15]。研究发现 NF- κ B 可通过调控 Th0 细胞分化为 Th1/Th2 的过程参与 AD 炎症反应的发生^[16]。由于 RelB 属于 NF- κ B 转录因子家族成员之一,主要表达淋巴系统和树突状细胞,故 Barton^[17]等采用 RelB 缺陷小鼠模型来研究 NF- κ B 与 AD 发病的关系。RelB 缺陷小鼠模型与 AD 具有很强的相似性,如自发性皮肤炎症,外周血 IgE 明显升高,并且皮损处可发现 IL-4、IL-5、IFN- γ 、嗜酸性粒细胞活化趋化因子以及趋化因子受体 3 (CCR3) mRNA 表达升高等;皮肤病理改变为表皮角化过度、嗜酸性粒细胞及 CD4 细胞浸润等。这一模型主要由 T 淋巴细胞介导,从一个 T 淋巴细胞角度模拟了 AD 的发病过程。Tsukuba^[18]等采用基因敲除技术成功地复制了组织蛋白酶 E 缺乏小鼠模型。该小鼠在常规环境下可自发出现瘙痒及皮炎及毛发脱落等表现,与 AD 的皮肤损害特点类似。同样,其皮损组织病理表现为表皮角化过度,巨噬细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞浸润,伴有总 IgE 水平升高;进一步研究表明,该模型小鼠的 Th2 细胞因子成优势表达,IL-18、IL-1 β 水平升高,而 IL-2 及 IFN- γ

水平则与正常小鼠相同。因此,可以通过该模型研究组织蛋白酶 E 缺乏与 AD 发病的关系。神经酰胺是皮肤角质层的组成成分,在维护皮肤屏障和保持角质层水分方面发挥重要作用。研究发现,人类 AD 患者皮损部位和非皮损部位神经酰胺含量均明显减少,并与 AD 的病情密切相关。为此,Aioi A 等^[19]针对 AD 的皮肤屏障功能损害的特征对 BALB/c 和 NC/Nga Tnd 小鼠皮炎部位的皮肤的保水特征及其屏障功能等进行了对比研究,结果表明,一般实验室条件下 8 周龄的 NC/Nga Tnd 小鼠,出现严重瘙痒、自发性皮肤干燥、屏障功能紊乱,还伴有角质层神经酰胺含量明显下降;血浆总 IgE 水平升高与皮炎的严重程度相一致,肥大细胞和分泌 IL-4 的 CD4⁺T 细胞数目在皮损中升高,随着时间的变化其皮肤与组织病理出现相应变化;这一自发性皮炎的特征都与 AD 的皮肤特点临床和组织病理表现十分相似。因此可以应用 NC/Nga Tnd 小鼠研究皮肤屏障功能损害与 AD 发病的关系。

总之,因为 AD 涉及的病因复杂,临床表现多为 I 型变态反应,少数为 IV 型反应,也可与外界过敏原相关的过敏性反应^[20],因此研究其发生机制的动物模型类型较多,各有特点。在基础医学实验研究中,我们可以根据不同的研究目的选择不同的 AD 模型,从不同角度对研究 AD 的发生机制,为 AD 的诊断、治疗提供有价值的实验资料,开辟新的治疗思路。

参考文献

- 1 尚金星,社会博,孟昭影,等. 特应性皮炎的病因学与发病学. 医学研究杂志, 2008, 37(11): 119-121
- 2 Jonansson SG, Bieber T, Dahl R, *et al.* Revised nomenclature for allergy for global use; report of the nomenclature review committee of the world allergy organization, october 2003. J Allergy Clin Immunol, 2004, 113(5): 832-836
- 3 Leslie C, Paul A. //: 顾瑞金. 帕特森变态反应性疾病[M]. 6 版, 北京: 人民卫生出版社, 2004: 261-270
- 4 宋玲,姜允中,张延志,等. 高压氧对 I 型变态反应及免疫功能的影响. 中华航海医学杂志, 1998, 5(4): 215-217
- 5 胡学军,骆和生,吴谦. 祛风清肺口服液抗 I 型变态反应的实验研究. 广州中医药大学学报, 1999, 16(1): 45-48
- 6 任华丽,张宏誉. 类胰蛋白酶在过敏性疾病诊断中的应用. 中华医学检验杂志, 2005, 28(8): 828-830
- 7 孙仁山,陈晓红,冉新泽,等. 重组可溶性 IgE 受体对小鼠被动皮肤过敏反应的抑制效应. 中国麻风皮肤病杂志, 2005, 21(11): 858-860
- 8 孟昭影,张玉平,杜舒婷,等. 被动皮肤过敏反应大鼠肠系膜淋巴管的变化. 中国微循环, 2008, 12(5): 275-278

(转第 101 页)