

基础研究

DOI: 10.11699/cyxh20131120

豚鼠过敏性休克死亡白细胞介素-4、白细胞介素-13 与免疫球蛋白 E 的表达及法医学意义

刘 勇¹, 陈小倩², 李 航¹, 余 舰¹

(1. 遵义医学院法医系, 遵义 563000; 2. 贵州省仁怀市人民医院病理科, 仁怀 564500)

【摘要】目的:建立豚鼠过敏性休克死亡动物模型,探讨豚鼠血清中白细胞介素(interleukin, IL)-4、IL-13 和免疫球蛋白 E(IgE)的表达,旨在为临床和法医学诊断过敏性休克提供科学、客观的参考依据。**方法:**用酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法检测 30 只过敏性休克豚鼠(实验组 20 只,对照组 10 只)血清 IL-4、IL-13 和 IgE 的表达情况。**结果:**实验组血清 IL-4 水平明显高于对照组($P=0.000$);实验组血清 IL-13 水平明显高于对照组($P=0.000$);实验组血清 IgE 水平明显高于对照组($P=0.000$)。**结论:**实验组血清 IL-4、IL-13 与 IgE 水平明显高于对照组,为过敏性休克临床诊断及法医学鉴定提供了参考依据。

【关键词】豚鼠;过敏性休克;白细胞介素 4;白细胞介素 13;免疫球蛋白 E;法医学

【中国图书分类法分类号】D919

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-03-02

Expression and forensic significance of interleukin-4, interleukin-13 and immunoglobulin E in guinea pigs died of anaphylactic shock

LIU Yong¹, CHEN Xiaoqian², LI Hang¹, YU Jian¹

(1. Department of Forensic Medicine, Zunyi Medical College; 2. Department of Pathology, People's Hospital of Renhuai City in Guizhou Province)

【Abstract】Objective: To establish animal model of guinea pig anaphylactic shock, to explore the expression of interleukin-4 (IL-4), interleukin-13 (IL-13) and immunoglobulin E (IgE) in guinea pig serum and to provide scientific and objective evidences for clinical and medicolegal diagnosis of anaphylactic shock as well. **Methods:** Totally 30 guinea pigs were died of anaphylactic shock were divided into experiment group ($n=20$) and control group ($n=10$). ELISA method was used to detect IL-4, IL-13 and IgE by extracting serum of guinea pigs in experiment group and control group. **Results:** Serum IL-4 level in experimental group was higher than that in control group, $P=0.000$; serum IL-13 level in experimental group was higher than that in control group, $P=0.000$; serum IgE level in experimental group was higher than that in control group, $P=0.000$. **Conclusions:** Serum levels of IL-4, IL-13 and IgE in experiment group are obviously higher those in control group, which provides evidences for anaphylactic shock forensic identification and clinical diagnosis.

【Key words】 guinea pig; anaphylactic shock; interleukin-4; interleukin-13; immunoglobulin E; forensic medicine

流行病学调查资料表明,随着工业的发展,过敏性疾病的发病率明显增高,过敏性休克是 I 型超敏反应中后果最严重的一种,然而,过敏性休克死亡机制复杂,尤其是药物所致过敏性休克死亡者,常由于缺乏相关病历证据或在非医院内发生死亡等原因,法医学鉴定起来比较困难,它必须在排除自然性疾病、中毒及机械性暴力所致死亡原因的基础上,结合过敏原接触史、死前临床表现、解剖发现、死后血清免疫球蛋白 E (immunoglobulin E, IgE) 水平等

进行综合判断。IgE 抗体在过敏性休克中作为主要抗体的地位已被确认,而白细胞介素(interleukin, IL)-4、IL-13 是促进合成 IgE 的主要细胞因子,故推测过敏性休克死亡者血液内同样含有 IL-4、IL-13。因此,本研究通过复制豚鼠过敏性休克死亡的模型,用酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)联合检测 IgE、IL-4、IL-13 的表达,以探讨 IL-4、IL-13 能否作为过敏性休克死亡的实验室参考指标。

作者介绍:刘 勇, Email: liuyongzmc@163.com,

研究方向:法医病理学、法医临床学。

通信作者:余 舰, Email: yujianzmc@hotmail.com。

基金项目:贵州省科学技术基金资助项目(编号:黔科合 J 字[2012]2362)。

1 材料方法

1.1 材料

英国种豚鼠 Hartley 系封闭群健康豚鼠 30 只,体质量约

150~200 g,雌雄不拘,由遵义医学院动物中心提供,随机分为实验组 20 只,对照组 10 只。正常多人混合血清,遵义医学院附属医院检验科提供。豚鼠 IL-4、IL-13 及 IgE 的 ELISA 试剂盒,武汉华美生物工程有限公司提供。

1.2 致敏原注射液的制备

参考文献[1],将来自遵义医学院附属医院正常多人血清进行混合,1 500 r/min 离心 10 min,弃除沉淀物,取上清液,用生理盐水以 1:9 浓度稀释即为致敏原,置于-70 ℃液氮保存。

1.3 动物致敏

将健康豚鼠 30 只随机分成实验组和对照组,实验组 20 只,对照组 10 只,并分笼饲养 7 d 进行适应性喂养。第 8 天,在实验组豚鼠右侧后爪内注射致敏原 0.2 ml 形成皮丘,对照组于同部位注射同剂量无菌生理盐水。2 组动物均再放置在同一清洁级实验室饲养 21 d,实验期间实验动物均未见不适反应及异常活动,所有动物未死亡。

1.4 动物发敏

2 组动物在第 29 天,实验组用装入 1 ml 致敏原的注射器在心前区心脏搏动最明显处刺入心脏,见搏动性回血之后注射致敏原 1 ml,诱发过敏性休克反应,实验组 20 只豚鼠均出现不同程度过敏性休克症状,其中 15 只在 1 min 20 s~30 min 内死亡,实验组中 5 只未死亡者,于 1 h 后再次注射致敏原,观察仍未死亡。对照组 10 只豚鼠注射相同剂量无菌生理盐水,均未出现过敏性休克症状和死亡,采用断颈处死。

1.5 解剖

2 组动物在死后立即进行尸体解剖,剪开胸腔用真空负压管抽取两组动物右心血,充分静置后,3 500 r/min 离心 15 min,取上清液置于-70 ℃液氮保存备检。取 2 组动物的喉、气管、肺、肝、肾等脏器于 4%中性甲醛固定,进行 HE 染色及特殊组织学检查。

1.6 ELISA 法检测

按照试剂盒说明书进行豚鼠血清 IgE、IL-4 及 IL-13 酶联免疫 ELISA 法检测,ELISA 数据结果分别用 IL-4、IL-13 和 IgE 系列不同浓度的参考标准品在相同条件下制作标准曲线。以检测物浓度为横坐标,以吸光度(absorbance, A)为纵坐标,将各浓度的值逐点连接,中央较呈直线的部分是最理想的检测区域。①所有 A 值都减除空白值后再行计算;②以标准品不同标准浓度梯度之 A 值作图,画出标准曲线,将浓度作为 X 轴, A 值作为 Y 轴;③根据样品的 A 值及曲线的斜率计算出细胞因子的含量。

1.7 统计学处理

实验数据采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析。实验组和对照组的数据经正态性分析和方差齐性检验之后,数据非正态分布,且组间方差不齐,因此采用 Wilcoxon 秩和检验,统计数据采用 $M(Q_1, Q_3)$ 表示, $P \leq 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 临床表现及组织学检验

实验组过敏性休克发生率为 100%,死亡率为 75%。对照组 10 只豚鼠均未出现上述过敏性休克症状,亦未发生死亡。实验组死亡豚鼠均出现明显喉头及气管充血、水肿,喉、气管、肺等组织内见明显嗜酸性粒细胞浸润,肺组织主要呈肺气肿改变;对照组未见水肿及嗜酸性粒细胞浸润。

2.2 ELISA 试验结果

实验组血清中 IL-4 含量较对照组有明显升高($P=0.000$),证实 2 组血清含量差别有统计学意义(表 1)。

实验组血清中 IL-13 含量较对照组有明显升高($P=0.000$),证实 2 组血清含量差别有统计学意义(表 1)。

实验组血清中 IgE 含量较对照组有明显升高($P=0.000$),证实 2 组血清含量差别有统计学意义(表 1)。

3 讨论

本实验组中血清 IgE 水平较对照组显著升高,并有显著性差异,同国内学者高彩荣等^[2]研究过敏性休克的动物模型实验结果一致。IgE 是 I 型超敏反应中的关键介质,当相邻的 FcεR I 发生桥联激活肥大细胞和嗜碱性粒细胞释放出一系列生物活性物质,如组胺、肥大细胞类胰蛋白酶、类糜蛋白酶、白三烯、前列腺素血小板活化因子、IL-5、肿瘤坏死因子 α 等导致 I 型变态反应的发生,并可能导致严重的后果^[3]。它在过敏性休克中作为主要抗体的地位已被确认。临床医师常根据血清中总 IgE 抗体或特异性 IgE 抗体的高表达情况,来作为对过敏性疾病诊断的主要实验室依据,正常人血清中极微, IgE 含量约为 0.1~0.7 μg/ml。血清 IgE 用于死后诊断过敏反应还存在一些问题,如死后的凝血、溶血可影响血 IgE 的检测和含量,年龄因素、个体差异、某些寄生虫病、真菌感染和金黄色葡萄球菌感染、某些肝病和骨髓瘤时、某些抗生素和药物(偏亚硫酸氢盐、可待因、吗啡等)都会导致 IgE 含量的变化^[4]。近年研究发现小鼠可在肥大细胞或 IgE 缺陷状态下被过敏原攻击仍然可以迅速发生全身过敏反应,除了 IgE 抗体小鼠 IgG1 抗体也能引发全身过敏反应^[5]。因此,检测死者体内 IgE 水平升高有重要价值,但不能作为诊断过敏性休克的唯一标准,应联合其他指标进行判断。

表 1 IL-4、IL-13 和 IgE 在血清中的表达及分析

Tab.1 Expression of IL-4, IL-13 and IgE in serum

组别	IL-4(pg/ml)			IL-13(pg/ml)			IgE(ng/ml)		
	M	Q ₁	Q ₃	M	Q ₁	Q ₃	M	Q ₁	Q ₃
对照组 (n=10)	15.94	14.20	19.38	10.69	9.33	12.21	34.17	29.25	35.89
实验组 (n=20)	70.49 ^a	56.61	87.79	24.60 ^a	22.28	33.26	130.69 ^a	119.13	197.47

注:a,与对照组相比, $P < 0.05$

本实验发现过敏性休克实验组豚鼠血清中的 IL-4 水平明显升高,提示 IL-4 参与过敏性休克反应的发生。国内学者^[6]通过建立过敏性休克的动物模型,发现实验组 IL-4 在组织中有高表达。国外 Gaspard 研究发现^[7]青霉素过敏病人中特异性 IgE 抗体阳性中 IL-4、IL-13 和干扰素- γ 升高,青霉素过敏者与 IL-4 中 R α 多位易感基因有关。过敏体质个体的研究显示,启动能够增加 IL-4 表达的基因,一定伴随 IgE 水平的升高。结合本实验结果,实验组血清中 IgE 水平明显升高,提示 IL-4 可能通过调节 IgE 的合成,并协同 IgE 参与过敏性休克全身反应。以前认为,IL-4 主要由 Th2 细胞产生,其他 T 细胞亚群、双阳性胸腺细胞、激活的肥大细胞等也能产生。但 Gessner 等^[8]通过建立小鼠模型,在小鼠的 IL-4 基因序列下游插入强化绿色荧光蛋白 (green fluorescence protein, GFP) 后,结果该小鼠大量表达 GFP,实验表明 IL-4 主要是由嗜碱性粒细胞激活后生成的。嗜碱性粒细胞激活后快速合成 IL-4 和 IL-13,快速产生大量 IL-4,总量与高分化 Th2 细胞相近,活化后提供 Th0 向 Th2 型免疫所需的内源性启动因子 IL-4,从而促进过敏反应向 Th2 型免疫反应发展,人体内是否存在类似机制,需进一步研究。

本实验还发现过敏性休克实验组豚鼠血清中的 IL-13 水平明显升高,提示 IL-13 参与过敏性休克反应的发生。IL-13 主要由活化 T 细胞产生,与 IL-4 一样同属于 Th2 类分泌细胞因子,研究表明 IL-4、IL-13 信号转导系统在哮喘发病机制中起重要作用,IL-13 的表达占据主要地位,明显多于 IL-4 的表达,是哮喘效应期的中轴调节因子。张跃文和乔海灵^[9]研究结果发现青霉素过敏患者血清 IL-13 浓度高于健康对照组,提示青霉素过敏反应可能与血清 IL-13 浓度升高有关,IL-13+2044G/A 基因多态性可能与某些青霉素特异性 IgE 抗体浓度升高有关。有研究表明^[10-12],青霉素过敏反应中 IL-13 和 IL-4 等细胞因子 mRNA 的表达也明显增加,IL-13 在过敏反应中的驱动作用大于 IL-4,IL-13 在青霉素过敏反应中的作用不依赖于 IL-4 的参与。本实验提示 IL-13 参与了过敏性休克的发生,与 IL-4 一起协同 IgE 发挥重要作用。

本实验 IL-4、IL-13 与 IgE 实验组与对照组比较均有明显升高,但实验数据组间的相关性分析,需进一步分析研究。

综上所述,过敏性休克死亡豚鼠血清中 IL-4、IL-13 水平明显升高,同时血清 IgE 水平亦明显升高,说明 IL-4 与 IL-13 参与了过敏性休克的发生,并协同 IgE 参与了过敏性休克的发生。因此,IL-4、IL-13 有望与 IgE 共同作为过敏性休克临床诊断及法医学

鉴定的参考指标之一。

参 考 文 献

- [1] 任广睦,白吉伟,高彩荣,等.混合人血清诱发豚鼠过敏性休克猝死模型的建立[J].法医学杂志,2005,21(3):169-170.
- [2] Ren G M, Bai J W, Gao C R, et al. Lethal anaphylactic shock model induced by human mixed serum in guinea pigs[J]. Journal of Forensic Medicine, 2005, 21(3): 169-170.
- [3] 高彩荣,郭相杰,孙俊红,等.过敏性休克急死豚鼠血清和肺组织内 IgE 的变化及法医学意义[J].中国法医学杂志,2007,22(6):369-371.
- [4] Gao C R, Guo X J, Sun J H, et al. IgE change in the serum and lung of guinea pig died of anaphylactic shock and its significance of forensic medicine[J]. Chinese Journal of Forensic Medicine, 2007, 22(6): 369-371.
- [5] Simons F E, Arduoso L R, Bilò M B, et al. World allergy organization guidelines for the assessment and management of anaphylaxis[J]. World Allergy Organ J, 2011, 4(2): 13-37.
- [6] Horn K D, Halsey J F, Zumwalt R E. Utilization of serum tryptase and immunoglobulin e assay in the postmortem diagnosis of anaphylaxis[J]. Am J Forensic Med Pathol, 2004, 25(1): 37-43.
- [7] Miyajima I, Dombrowicz D, Martin T R, et al. Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and Fc gammaR III. assessment of the cardiopulmonary changes, mast cell degranulation, and death associated with active or IgE- or IgG1-dependent passive anaphylaxis[J]. J Clin Invest, 1997, 99(5): 901-914.
- [8] 肖 凤,王伴青,唐和生,等.过敏性休克死亡豚鼠脏器中 IgE、IL-4 的表达及其法医学意义[J].中山大学学报,2006,27(2):181-183.
- [9] Xiao F, Wang B Q, Tang H S, et al. Expression and forensic significance of IgE and IL-4 in organs of guinea pigs died of anaphylactic shock[J]. Journal of Sun Yat-sen University, 2006, 27(2): 181-183.
- [10] Gaspard I, Guinépain M T, Laurent J, et al. IL-4 and IFN- γ mRNA induction in human peripheral lymphocytes specific for beta-lactam antibiotics in immediate or delayed hypersensitivity reactions[J]. J Clin Immunol, 2000, 20(2): 107-116.
- [11] Gessner A, Mohrs K, Mohrs M. Mast cells, basophils, and eosinophils acquire constitutive IL-4 and IL-13 transcripts during lineage differentiation that are sufficient for rapid cytokine production[J]. J Immunol, 2005, 174(2): 1063-1072.
- [12] 张跃文,乔海灵.青霉素过敏患者白细胞介素 13 血清浓度及其基因多态性[J].中国药理学与毒理学杂志,2010,24(2):111-114.
- [13] Zhang Y W, Qiao H L. Serum concentration of interleukin-13 and its gene polymorphisms in allergic patients to penicillin[J]. Chinese Journal of Pharmacology Toxicology, 2010, 24(2): 111-114.
- [14] Grünig G, Warnock M, Wakil A E, et al. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma[J]. Science, 1998, 282(5397): 2261-2263.
- [15] Li L, Xia Y, Nguyen A, et al. Effects of Th2 cytokines on chemokine expression in the lung: IL-13 potently induces eotaxin expression by airway epithelial cells[J]. J Immunol, 1999, 162(5): 2477-2487.
- [16] Wills-Karp M, Luymbazi J, Xu X, et al. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma[J]. Science, 1998, 282(5395): 2258-2261.

(责任编辑:关蕴良)