

## 嗜酸性粒细胞性胃肠炎小鼠胃黏膜肥大细胞数量和脱颗粒变化

杨 辉,钱淑怡,吴润秋,金 玉

南京医科大学附属儿童医院消化科,江苏 南京 210008

**[摘要]** 目的:探讨嗜酸性粒细胞性胃肠炎(eosinophilic gastroenteritis, EG)小鼠胃黏膜肥大细胞(mast cell, MC)数量、脱颗粒变化及其意义。方法:选用卵清蛋白(ovalbumin, OVA)诱导的Balb/c小鼠制备EG模型12只为OVA-EG组,同时选用同龄SPF级Balb/c小鼠12只作为正常对照组。两组均计算胃黏膜嗜酸性粒细胞(eosinophil, EOS)、MC数量,qPCR检测胃黏膜白细胞介素(interleukin, IL)-5 mRNA表达,电镜观察胃黏膜MC脱颗粒变化。结果:OVA-EG组小鼠胃黏膜组织中EOS数量、MC数量及IL-5 mRNA表达高于正常对照组( $P < 0.05$ ),电镜观察OVA-EG组小鼠胃黏膜MC有脱颗粒改变。结论:OVA-EG组小鼠胃黏膜组织MC数量增加,分泌IL-5增多,并出现MC脱颗粒改变,提示胃黏膜MC数量和部分功能变化可能与EG有关。

**[关键词]** 嗜酸性粒细胞性胃肠炎;肥大细胞;嗜酸性粒细胞;小鼠

**[中图分类号]** R725.7

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2018)11-1517-03

doi:10.7655/NYDXBNS20181106

嗜酸性粒细胞性胃肠炎(eosinophilic gastroenteritis, EG)是一种嗜酸性粒细胞浸润累及胃肠道的慢性非特异性胃肠道疾病,胃是最常累及的器官之一<sup>[1]</sup>。近年EG在我国儿童中的发病率呈上升趋势。EG的临床表现多样:腹痛、呕吐、腹泻、腹胀、甚至幽门梗阻和腹水、便血等。EG的病因及发病机制尚未阐明,多数认为内外源性过敏原引起的变态反应是EG的重要原因,大多数EG患者外周血总IgE水平升高,提示IgE介导的I型过敏反应可能参与EG的发生<sup>[2]</sup>。

肥大细胞(mast cell, MC)是IgE介导的I型过敏反应的靶细胞,其活化后可释放多种细胞因子及趋化因子,引起机体过敏反应<sup>[3]</sup>,在支气管哮喘、过敏性鼻炎、特应性皮炎、食物过敏等疾病中发挥重要作用<sup>[4]</sup>。MC脱颗粒释放的白细胞介素(interleukin, IL)-5刺激骨髓嗜酸性粒细胞(eosinophil, EOS)系增殖、分化、趋化,招募EOS聚集并脱颗粒造成局部组织损伤。本研究检测EG小鼠胃黏膜MC数量和脱颗粒变化,探讨其在EG中的作用。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

6周龄SPF级雌性Balb/c小鼠24只(南京医科大学实验动物中心提供),SPF环境饲养,自由摄食饮水,适应性喂养1周。实验分组:随机选取12只为正常对照组,卵清蛋白(Ovalbumin, OVA)诱导EG小鼠12只为OVA-EG组。平均体重:正常对照组

( $18.89 \pm 1.16$ )g, OVA-EG组( $18.68 \pm 1.15$ )g,两组小鼠体重差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。所有动物实验均经过南京医科大学动物保护与伦理委员会审批通过(批准编号:IACUC-1701001)。

#### 1.2 方法

##### 1.2.1 EG小鼠模型建立<sup>[5]</sup>

EG小鼠模型建立包括基础致敏、强化致敏以及灌胃激发3个阶段。OVA-EG组Balb/c小鼠适应性喂养1周后,第1天予OVA(Grade V, Sigma公司,美国)50  $\mu$ g与4%氢氧化铝[AL(OH)<sub>3</sub>]凝胶(Thermo公司,美国)混悬液0.5 mL腹腔注射基础致敏,之后第8、15天予OVA 50  $\mu$ g与生理盐水混悬液0.5 mL腹腔注射强化致敏,正常对照组予等量生理盐水腹腔注射。第18天开始OVA-EG组予OVA 50  $\mu$ g与生理盐水混悬液0.5 mL隔日灌胃激发,共6次,正常对照组予等量生理盐水灌胃。

每天记录小鼠体重、小鼠精神、活动、毛色、大便性状等。造模成功与否参考Talley标准<sup>[5]</sup>:OVA-EG组小鼠在予OVA致敏4周后出现精神萎靡、懒动、竖毛、弓背,大便稀、不成形。

##### 1.2.2 标本留取

末次激发后24 h处死小鼠,留取静脉血标本,取小鼠胃窦组织,1份常规固定用于石蜡切片,1份保存于-80  $^{\circ}$ C冰箱用于实时荧光定量RT-PCR。两组小鼠的胃窦黏膜行HE染色、甲苯胺蓝染色实时荧光定量RT-PCR,观察小鼠胃窦黏膜EOS数量、MC数

量变化、检测胃窦黏膜IL-5 mRNA表达。

### 1.2.3 EOS和MC数量

胃黏膜组织常规固定、脱水、石蜡包埋、切片、脱蜡至水、染色、显微镜下观察。EOS计数:200倍下随机计数10个视野内胃肠黏膜EOS数量,取平均值作为EOS密度(个/HPF),EG组EOS>20个/HPF,对照组<10个/HPF。MC计数:400倍下随机计数10个视野内胃黏膜MC数量,取平均值作为MC密度(个/HPF)。

### 1.2.4 透射电镜观察胃黏膜MC超微结构

胃窦黏膜组织标本用4%戊二醛固定、包埋、切片、双重染色,透射电镜观察MC的超微结构。

### 1.2.5 总RNA提取

剪取大小约20 mg的胃黏膜组织放入1.5 mL无酶离心管中、匀浆、离心,吸取上清液到1.5 mL无酶离心管中、加入等体积的异丙醇、混匀、室温静置、离心,试管底部出现RNA沉淀。弃上清,加入4℃预冷的75%乙醇、室温静置,离心、弃上清、室温干燥、加入DEPC去离子水溶解沉淀。用分光光度计测定 $D(260\text{ nm})$ 值及 $D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})$ ,根据 $D(260\text{ nm})$ 计算RNA浓度,取适量进行mRNA逆转录,余-80℃保存备用。

### 1.2.6 实时荧光定量RT-PCR检测IL-5 mRNA

将5×PrimeScript RT Master Mix 4 μL、总RNA 1 000 ng、加无RNA酶水、加入无酶EP管、混匀并离心。置于梯度PCR仪中,反应条件为:37℃ 15 min, 85℃ 5 s, 4℃保存。反应结束后将产物放在冰上待用或-20℃保存。

根据GenBank中登录的小鼠IL-5及内参GAPDH基因序列,用Primer3.0来设计引物(<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>),引物遵循包含2个外显子,引物由华大基因公司合成:IL-5:上游5'-GCAATGAGACGATGAGGCTTC-3',下游5'-GCCCCTGAAAGATTCTCCAATG-3'。GAPDH:上游5'-GTCTTCACTACCATGGAGAAGG-3',下游5'-TCATGGATGACCTTGGCCAG-3'。检测采用SYBR green Real-time PCR方法,置于ABI PRISM 7500荧光定量PCR仪中进行PCR扩增,反应条件为:95℃ 10 min;95℃ 15 s, 60℃ 1 min,循环40次。采用参照基因的 $\Delta\Delta C_t$ 法计算目的基因mRNA的相对表达量: $A=CT(\text{待测样本目的基因})-CT(\text{待测样本内标基因})$ 。 $B=CT(\text{对照样本目的基因})-CT(\text{对照样本内标基因})$ 。 $K=A-B$ ,表达倍数= $2^{-K}$ 。

### 1.3 统计学方法

采用SPSS 19.0软件进行统计学分析,数据用均

数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组数据比较采用 $t$ 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

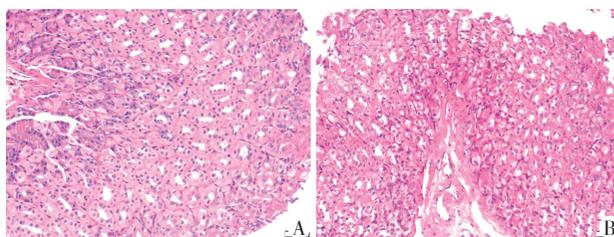
## 2 结果

### 2.1 验证模型小鼠

正常对照组小鼠精神活跃,反应灵活,毛色光滑,无腹泻及黑便,大便呈球形或圆条形。OVA-EG组小鼠在予OVA致敏4周后出现精神萎靡、懒动、竖毛、弓背,大便稀、不成形。

### 2.2 胃黏膜EOS

两组小鼠胃窦黏膜HE染色(图1):OVA-EG组小鼠胃窦黏膜可见EOS浸润,其中EOS<20个/HPF 2例,20~40个/HPF 4例,>40个/HPF 6例,平均( $42.50 \pm 17.62$ )个/HPF。正常对照组小鼠胃窦黏膜中未见明显EOS浸润。

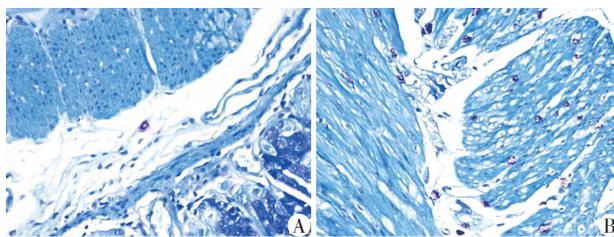


A:正常对照组胃窦;B:OVA-EG组胃窦。

图1 小鼠胃黏膜EOS(HE染色,×200)

### 2.3 胃黏膜MC

两组小鼠胃窦黏膜甲苯胺蓝染色(图2):OVA-EG组小鼠胃窦黏膜MC<15个/HPF 5例,15~20个/HPF 6例,>20个/HPF 1例,平均( $14.83 \pm 3.66$ )个/HPF。正常对照组小鼠胃窦黏膜MC平均( $3.17 \pm 2.14$ )个/HPF。



A:正常对照组胃窦;B:OVA-EG组胃窦。

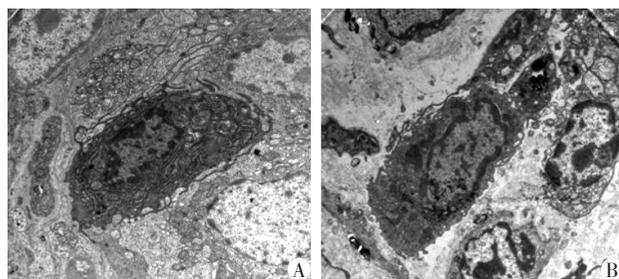
图2 小鼠胃黏膜MC(甲苯胺蓝染色,×200)

### 2.4 MC超微结构

电镜观察结果显示,与对照组比较,OVA-EG组小鼠胃窦黏膜MC胞浆颗粒明显减少,颗粒包膜相互融合形成细胞内空泡等脱颗粒现象(图3)。

### 2.5 实时荧光定量RT-PCR结果

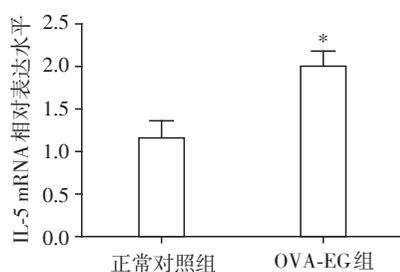
所有小鼠胃窦组织有IL-5 mRNA表达,OVA-



A:对照组胃窦;B:OVA-EG组胃窦。

图3 电镜观察两组小鼠胃窦黏膜MC脱颗粒变化( $\times 7\ 000$ )

EG组胃窦黏膜组织IL-5 mRNA的表达比正常对照组增高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图4)。



与正常对照组比较,\* $P < 0.05$ 。

图4 两组小鼠胃窦黏膜组织IL-5 mRNA表达比较

### 3 讨论

目前EG动物模型制备方法有3种<sup>[6-7]</sup>:①口服OVA致敏小鼠;②先后腹腔注射OVA和AL(OH)<sub>3</sub>凝胶混悬液、OVA溶液,继而予口服聚乳酸-羟基乙酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA]包裹的OVA微粒灌胃;③腹腔注射同前,在胃肠激发阶段给予OVA(50 mg)混悬液隔日灌胃,以维持小鼠胃肠损害。本研究选用第3种造模方法。胃窦组织HE染色发现:OVA-EG组小鼠胃窦黏膜EOS数量较正常对照组显著增加,提示本研究EG小鼠模型建造成功。

MC是过敏反应中一种关键的效应细胞<sup>[8]</sup>。本研究发现:OVA-EG组小鼠胃窦黏膜MC数量较正常对照组多,提示MC参与了小鼠EG的发生,其机制可能为OVA灌胃选择性诱导胃窦黏膜特异性B细胞产生IgE抗体,并与MC表面的高亲和力受体FcεRI结合,使小鼠胃窦黏膜MC致敏<sup>[9]</sup>,致敏的MC数量可能与过敏反应强度有一定关系。进一步,通过透射电镜观察到OVA-EG组小鼠胃黏膜MC超微结构存在脱颗粒现象,而对照组未发现这一特征。可能为OVA腹腔注射后使胃窦黏膜致敏MC表面的FcεRI交联活化,促使MC脱颗粒<sup>[10]</sup>。进而释放EOS趋化因子,导致EOS浸润,从而导致胃黏膜组织损伤<sup>[9]</sup>。

IL-5是MC脱颗粒后释放的重要炎症介质,也是刺激骨髓EOS增殖、分化的关键因子。本研究发现:OVA-EG组小鼠胃窦黏膜IL-5 mRNA表达较正常对照组显著增加,可能为OVA-EG组小鼠胃窦黏膜脱颗粒的MC数量增多,导致IL-5释放增加,并刺激骨髓EOS增殖、分化,进一步造成浸润至胃窦黏膜的EOS数量增多和胃窦黏膜组织损伤,产生腹痛、腹泻、呕吐、便血等临床胃肠症状。

综上所述,OVA-EG小鼠胃窦黏膜组织MC数量增多和脱颗粒改变,以及IL-5 mRNA表达增加,提示胃窦黏膜MC数量和功能改变可能参与EG小鼠的发病。

#### [参考文献]

- [1] Mehta P, Furuta GT. Eosinophils in gastrointestinal disorders: eosinophilic gastrointestinal diseases, celiac disease, inflammatory bowel diseases, and parasitic infections [J]. *Immunol Allergy Clin North Am*, 2015, 35(3):413-437
- [2] Cianferoni A, Spergel JM. Eosinophilic esophagitis and gastroenteritis [J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2015, 15(9):58
- [3] Hagenlocher Y, Lorentz A. Immunomodulation of mast cells by nutrients [J]. *Mol Immunol*, 2015, 63(1):25-31
- [4] Bastan R, Eskandari N, Sabzghabae AM, et al. Role of protein phosphatases inhibitors on the histamine release and the functional desensitization in human lung mast cells [J]. *J Res Med Sci*, 2014, 19(10):923-927
- [5] Talley NJ. Gut eosinophilia in food allergy and systemic and autoimmune diseases [J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2008, 37(2):307-332
- [6] 曾永梅,杨素芳,钟婉莹,等.卵清蛋白致敏小鼠嗜酸性细胞性胃肠炎模型的制备 [J]. *临床儿科杂志*, 2016, 34(4):303-306
- [7] Song DJ, Cho JY, Miller M, et al. Anti-Siglec-F antibody inhibits oral egg allergen induced intestinal eosinophilic inflammation in a mouse model [J]. *Clin Immunol*, 2009, 131(1):157-169
- [8] 徐红,陈美元,周瑶,等.哮喘小鼠模型中IL-25表达及其对肥大细胞IL-6分泌的影响 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2015, 35(6):804-807
- [9] Parravicini V, Gadina M, Kovarova M, et al. Fyn kinase initiates complementary signals required for IgE-dependent mast cell degranulation [J]. *Nat Immunol*, 2002, 3(8):741-748
- [10] Lam C, Shah KJ, Mansukhani R. Targeting interleukin-5 in patients with severe eosinophilic asthma: a clinical review [J]. *P T*, 2017, 42(3):196-201

[收稿日期] 2017-05-27