

## IL-4 与 IL-10 在过敏性休克中的表达及意义\*

刘勇,李航,余舰<sup>△</sup>

(遵义医学院法医系,贵州遵义 563000)

**摘要:**目的 复制过敏性休克豚鼠动物模型,探讨 IL-4 与 IL-10 在豚鼠血清中的表达,为法医学和临床对过敏性休克的诊断提供科学、客观的参考依据。方法 采用多人混合血清建立过敏性休克的豚鼠模型,豚鼠 40 只(实验组 30 只,对照组 10 只),用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测过敏性休克豚鼠血清中 IL-4 与 IL-10 的表达情况。结果 实验组血清 IL-4、IL-10 水平明显高于对照组( $P < 0.01$ )。结论 实验组血清 IL-4 与 IL-10 水平明显高于对照组,为过敏性休克的法医学和临床的诊断提供了参考依据。

**关键词:**豚鼠;过敏性休克;白细胞介素 4;白细胞介素 10

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.15.026

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)15-1898-03

## Expression and significance of IL-4 and IL-10 in anaphylactic shock\*

Liu Yong, Li Hang, Yu Jian<sup>△</sup>

(Department of Forensic Medicine, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563000, China)

**Abstract:** Objective To establish animal model of guinea pig anaphylactic shock, explore the expression of IL-4 and IL-10 in guinea pig serum, provide scientific and objective evidence for medicolegal and clinical diagnosis of anaphylactic shock as well. **Methods** After 40 guinea pigs were classified into the experimental and the control groups, in which the experimental group was 30 and the control group was 10, Elisa method was used to detect IL-4 and IL-10 by extracting serum of guinea pigs in the experiment group and the control group. **Results** The IL-4 levels of serum in experimental group was higher than that in control group ( $P < 0.01$ ); the IL-10 levels of serum in experimental group was higher than that in control group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** The level of serum IL-4 and IL-10 in the experiment group are obviously higher than that of the control group. This provides an evidence for anaphylactic shock forensic identification and clinical diagnosis.

**Key words:** guinea pig; anaphylactic shock; interleukin-4; interleukin-10

流行病学调查结果显示,过敏性疾病已成为 21 世纪严重影响人类健康的全球性疾病,其中,药物是引起成年人过敏反应的最常见原因,食品是引起儿童过敏反应最常见的原因。美国死于过敏反应的人每年约 1 500 人,过敏反应终身患病率约 0.05%~2.00%,其中,还未包括那些在医院外发生未诊断、或在医院内未正确诊断的病例<sup>[1-2]</sup>。有关过敏性休克的发病机制仍未完全明确。研究提示环境因素及遗传因素可能是该病的主要原因,目前,普遍认为是由遗传因素和环境因素共同作用致病。而过敏性休克是 I 型超敏反应中发病最急、能引起严重后果的一种类型,临床上过敏性休克发病急骤,可没有任何征兆,病情严重者常危及生命,是临床急重症之一。同样在法医鉴定实践中,常由于缺乏相关资料或发生在非医院内死亡,经尸体解剖缺乏有特征性的病理形态改变,同时实验室亦不能提供有价值的确切的诊断标准,尤其是药物所致过敏性休克死亡者,多是应用排他性诊断,并结合具体案情和临床表现综合做出过敏判断。由于法医学鉴定起来比较困难,也是引发医疗纠纷的一个重要原因。目前,血清总 IgE、血清  $\beta$ -类胰蛋白酶已经作为过敏性休克诊断的实验室参考指标之一,而 IL-4 与 IL-10 在细胞因子网络中与 IgE 关系密切,故推测 IL-4 与 IL-10 在过敏性休克患者的血清中会有变化。基于此原理,本实验通过豚鼠过敏性休克动物模型的复制,采用 ELISA,检测

过敏性休克血清中 IL-4 与 IL-10 的表达情况,以期探讨 IL-4 与 IL-10 能否作为过敏性休克患者诊断的实验室参考指标。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 英国纯种 Hartley 系健康豚鼠 40 只,雌雄不限,体质量 150~250 g,动物由遵义医学院动物中心提供,本实验动物分为实验组 30 只,对照组 10 只。血清由遵义医学院附属医院检验科检验合格的多人健康血清。豚鼠的 IL-4、IL-10 及 IgE 的 ELISA 试剂盒仍由武汉华美生物公司提供。

**1.2 致敏原注射液的制备** 本次实验参考改良型豚鼠过敏性休克模型<sup>[3]</sup>,将本院检验科提供的健康多人血清进行混合,以 3 000 r/min 进行离心 10 min,离心完成后弃沉淀物,取上清液留存,致敏原用生理盐水以 1:2 浓度稀释配制,诱发致敏原以 1:20 浓度稀释配制,上述配制液置于-70℃液氮保存。

**1.3 动物致敏** 将实验豚鼠 40 只分成实验组和对照组,实验组豚鼠 30 只,对照组豚鼠 10 只,进行分笼饲养适应环境性喂养 3 d,第 4 天在实验组豚鼠的后爪皮内用 1 mL 注射器注射致敏原 0.1~0.2 mL 以形成皮丘为标准,同时对对照组豚鼠后爪皮内注射 0.1~0.2 mL 无菌生理盐水形成皮丘,第 7 天再以同样方法、剂量注射致敏原加强免疫,之后两组动物在室温环境的清洁级实验室饲养 14 d,观察实验动物无异常反应,所有动物未见死亡。

表 1 IL-4、IL-10 和 IgE 在血清中的表达及分析

组别	n	IL-4(pg/mL)			IL-10(pg/mL)			IgE(ng/mL)		
		中位数	P <sub>25</sub>	P <sub>75</sub>	中位数	P <sub>25</sub>	P <sub>75</sub>	中位数	P <sub>25</sub>	P <sub>75</sub>
实验组	30	68.50 <sup>a</sup>	55.61	58.10	41.08 <sup>a</sup>	63.30	33.20	120.69 <sup>a</sup>	105.53	180.27
对照组	10	14.94	14.20	8.20	7.35	10.47	12.21	33.10	28.25	36.89

<sup>a</sup>:  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

**1.4 动物发敏** 两组动物在加强致敏后 15 d, 实验组用 1 mL 注射器装满所配诱发过敏原, 在剃毛后的足背静脉注射诱发过敏原 1 mL, 注射时应注意回血之后注射, 进行动物发敏。实验组 30 只豚鼠在注射发敏原后均出现了不同程度过敏性症状, 其中 25 只在 2~30 min 内死亡, 5 只未死, 未死豚鼠于 2 h 后再次注射发敏原, 结果该 5 只豚鼠仍未发生死亡。同时对照组 10 只豚鼠在剃毛后的足背静脉注射无菌生理盐水 1 mL, 注射后对照组 10 只豚鼠均未出现任何异常反应, 未出现死亡, 对照组豚鼠后均采取断颈处死。

**1.5 解剖、取样及常规苏木素-伊红(HE)组织染色** 实验组动物在死后解剖, 打开胸腔用真空负压管抽取右心血, 室温静置 30 min 后, 5 000 r/min 离心 15 min, 取上层血清至无菌离心管于 -70 °C 液氮保存, 同时取实验组喉、气管、肺、肝、肾等脏器, 于 10% 中性甲醛固定 7 d, 常规制片、HE 染色及甲苯胺蓝法特染组织。对照组采用断颈处死后, 样本取材及染色同实验组。

**1.6 ELISA 法检测** 本实验方法同刘勇等<sup>[4]</sup>在豚鼠过敏性休克死亡 IL-4、IL-13 与 IgE 的表达及其法医学意义中采用的方法。(1)按照说明书分别用 IL-4、IL-10 和 IgE 浓度梯度标准品绘制吸光度(A)值标准曲线, 以被测物的浓度为 X 轴, A 值为 Y 轴, 绘制各浓度点曲线, 最理想检测区域取位于曲线中间较直部分;(2)所有 A 值都需按减掉空白值计算;(3)利用标准曲线斜率, 输入被测样品的 A 值计算出所检测样本的含量。

**1.7 统计学处理** 采用 SPSS18.0 统计进行数据分析处理, 两组数据同样经过正态性分析和方差齐性检验之后, 所得数据同样呈非正态分布, 同时数据组间方差不齐。因此, 同样采用 Wilcoxon 秩和检验。采用四分位间距表示统计数据, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 临床表现及组织病理学检查** 实验组 30 只豚鼠均出现了过敏性休克症状, 开始表现为活动量减少、对外界刺激反应迟钝, 后出现躁动、呼吸深快、喷嚏、甩头、搔嘴毛, 继而出现四肢乏力、行动不稳、站立不能、倒地侧翻, 最后出现呼吸困难、痉挛抽搐、大小便失禁、意识障碍、死亡, 休克发生率为 100%, 病死率为 83%; 对照组 10 只豚鼠均未出现异常活动, 表现与平常活动无异, 均未出现过敏症状, 无动物死亡。实验组豚鼠经动物解剖及组织病理学检查发现喉头明显水肿, 气管及支气管壁血管高度扩张淤血、黏膜层伴水肿, 喉、气管、支气管、肺等有大量嗜酸性粒细胞浸润, 其他发现支气管痉挛、肺气肿、多器官水肿淤血等改变; 对照组未发现明显喉头水肿, 喉、气管及支气管、肺组织内仅见极少量嗜酸性粒细胞浸润。实验组气管及肺组织经甲苯胺蓝法特染, 上述组织内可见肥大细胞明显脱颗粒现象, 对照组未见脱颗粒现象; 以上临床表现及组织病理学检查结果与国内过敏性休克动物模型相似<sup>[4]</sup>。

**2.2 ELISA 试验结果** 实验组血清中的 IL-4、IL-10、IgE 水

平较对照组有明显升高( $P < 0.01$ ), 见表 1。

## 3 讨 论

研究表明过敏性休克是由 IgE 介导的 I 型超敏反应中发病最急、后果最为严重的一种类型, IgE 是触发过敏性休克的核心介质。当再次接触过敏源时相邻肥大细胞和嗜碱性粒细胞表面的 FcεRI 发生桥联, 迅速激发肥大细胞和嗜碱性粒细胞释放多种生物活性物质, 如组胺、白三烯、多种 IL、类胰、糜蛋白酶等导致 I 型变态反应的发生, 并可导致严重的后果, 过敏反应可以表现为局部或全身的反应, 轻者如表现皮肤红斑、荨麻疹、全身瘙痒, 或者喷嚏、上呼吸道分泌物增加、恶心、头痛, 严重者可表现气促、呼吸困难、呕吐、腹泻、意识障碍, 可因循环障碍休克或因呼吸困难窒息死亡<sup>[5-7]</sup>。本实验通过对 IgE 水平的检测, 来确定模型是否复制成功, 结果显示实验组中血清的 IgE 水平有显著升高, 同国内学者过敏性休克的动物模型实验结果一致<sup>[4,8]</sup>, 同时组织学检查喉头水肿, 喉、气管、肺等组织中出现大量嗜酸性粒细胞, 甲苯胺蓝法特染可见肥大细胞脱颗粒, 以上显示模型建立成功。由于正常健康人血清中 IgE 水平极低, 约 0.1~0.7 μg/mL, 过敏反应会有明显增高, 因此, 临床医生和法医鉴定人通常把血清中总 IgE 抗体的高表达作为过敏性反应诊断的主要依据之一。但是血清 IgE 用于过敏反应死亡的诊断还需要注意影响因素, 如死后的凝血、溶血、寄生虫病、某种真菌或金黄色葡萄球菌感染、某些肿瘤如骨髓瘤、某些药物(偏亚硫酸氢盐、可待因、吗啡等)等会影响血清中 IgE 水平的变化<sup>[9]</sup>。Miyajima 等<sup>[10]</sup>在复制过敏性休克小鼠模型中, 实验发现小鼠在体内肥大细胞或 IgE 缺陷状态下小鼠仍可发生全身过敏反应, 实验结果提示除了 IgE 抗体, 小鼠 IgG1 抗体也可能引发全身过敏反应, 在人体中是否存在肥大细胞或 IgE 缺陷仍可发生过敏性休克的机制需深入研究。因此, 多指标实验室联合检测在过敏性休克中的诊断更具价值。

本实验中, 实验组豚鼠血清中的 IL-4 水平较对照组明显升高, 提示 IL-4 可能参与了过敏性休克反应过程, 与国内学者的动物模型研究结果<sup>[11]</sup>基本相同。Gaspard 等<sup>[12]</sup>通过对青霉素过敏体质患者的研究, 发现他们血清中特异性 IgE 抗体阳性, 并同时伴有血清中 IL-4 水平的升高。本实验显示, 实验组血清中的 IL-4 水平较对照组明显升高, 同时实验组血清中 IgE 明显升高, 提示 IL-4 与 IgE 一样参与了过敏性休克反应。研究发现, IL-4 可使变应原致敏的 B 淋巴细胞合成的 IgM 抗体转换成 IgE 抗体, 同时 IL-4 参与调控细胞因子网络 Th1 和 Th2 的平衡, IL-4 通过激活 Th0 细胞向 Th2 细胞分化, 分化的 Th2 细胞能分泌多种细胞因子, 促使过敏反应朝向 Th2 型免疫发展, 因此推测 IL-4 通过参与调控细胞因子网络, 促进 IgE 合成而在过敏性休克中发挥作用<sup>[13]</sup>。Gessner 等<sup>[14]</sup>通过小鼠模型发现 IL-4 主要是由嗜碱性粒细胞激活后生成, 而人体内嗜碱性粒细胞是否通过类似机制在过敏性反应中发挥重要作用需深入研究。

本实验中,实验组豚鼠血清中的 IL-10 水平较对照组明显升高,提示 IL-10 可能也参与了过敏性休克反应过程。研究证实 IL-10 在体内主要由肥大细胞、Treg、Bregs 等细胞产生,IL-10 可抑制肥大细胞 FcεRI 的表达,抑制 T 淋巴细胞增殖,抑制 Th2 细胞因子合成等过敏性休克速发相的关键环节,实现对 IgE 介导 I 型超敏反应速发相的抑制。有研究显示,严重创伤伴休克患者血清中的 IL-10 水平明显升高<sup>[13]</sup>,感染性休克患者血清中 IL-10 水平明显高于单纯细菌性感染的患者<sup>[15]</sup>,Stone 等<sup>[16]</sup>研究发现临床上诊断为过敏性休克患者血清中 IL-10 的水平较健康人血清中的水平有较显著升高,并且 IL-10 水平升高的幅度与休克严重程度呈正相关,在过敏性休克的病理生理过程中,过敏反应引起的严重休克更具致命性。因此推测当过敏性休克引发严重休克时,血清中的 IL-10 大量合成,其在血清中水平升高程度又与休克的严重程度相关,其可能在扩张血管,引起循环衰竭中起重要作用。目前尚不清楚引发 IL-10 在过敏性休克血清中水平变化的机制,IL-10 在细胞因子网络中如何起调控作用,以及 IL-10 与 IgE 如何相互作用需进一步深入研究。

#### 参考文献:

- [1] Shen YW, Li L, Grant J, et al. Anaphylactic deaths in Maryland(United States) and Shanghai(China): A review of forensic autopsy cases from 2004 to 2006[J]. *Forensic Sci Int*, 2009, 186(1/3): 1-5.
- [2] Lieberman P, Camargo CA, Bohlke K, et al. Epidemiology of anaphylaxis: findings of the American College of Allergy, Asthma and Immunology Epidemiology of Anaphylaxis Working Group [J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2006, 97(5): 596-602
- [3] 陈炯垣, 赖跃, 李冬日, 等. 混合人血清诱发豚鼠过敏反应死亡模型的改良[J]. *法医学杂志*, 2012, 28(6): 408-412.
- [4] 刘勇, 陈小倩, 李航, 等. 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[J]. *重庆医科大学学报*, 2013, 38(11): 1322-1324.
- [5] Simons FE, Arduzzo LR, Bilò MB, et al. World allergy organization guidelines for the assessment and management of anaphylaxis[J]. *World Allergy Organ J*, 2011, 4(2): 13-37.
- [6] Pumphrey RS, Roberts IS. Postmortem findings after fatal anaphylactic reactions[J]. *J Clin Pathol*, 2000, 53(4): 273-276.

- [7] Castells MC. Anaphylaxis and hypersensitivity reactions [M]. New Jersey: Humana Press, 2011: 33-46.
- [8] 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.
- [9] Kevin D, John F, Ross E. Utilization of serum tryptase and immunoglobulin E assay in the postmortem diagnosis of anaphylax [J]. *Am J Forensic Med Pathol*, 2004, 25(1): 37-43.
- [10] Miyajima I, Dombrowicz D, Martin TR, 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.
- [11] 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: 医学科学版*, 2006, 27(2): 181-183, 187.
- [12] Gaspard I, Guinpepain MT, Laurent J, et al. IL-4 and IFN-gamma 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.
- [13] 丁杰, 吴理香, 付贵峰. 重度创伤伴失血性休克患者血清白介素-10 的动态变化[J]. *中国基层医药*, 2008, 15(3): 357-358.
- [14] 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.
- [15] 李秀华, 陈永铭, 洪亮, 等. 低剂量氢化可的松治疗感染性休克时对外周血 T 淋巴细胞凋亡的影响及机制[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2011, 31(5): 730-735.
- [16] Stone SF, Cotterell C, Isbister GK, et al. Elevated serum cytokines during human anaphylaxis: Identification of potential mediators of acute allergic reactions[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, 124(4): 786-792.

(收稿日期: 2013-10-08 修回日期: 2014-03-10)

(上接第 1897 页)

- 液对焦虑小鼠行为干预的研究[J]. *中成药*, 2012, 34(3): 569-572.
- [17] 叶良平, 陆璐, 王善如, 等. 冬虫夏草提取物对模型大鼠血糖及氧化应激的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2012, 19(12): 40-42.
- [18] 张佳伟, 黄建钊, 赵鹏伟, 等. 冬虫夏草在大鼠离体肝脏保存中的实验研究[J]. *中国民族民间医药*, 2013, 2: 12-14.
- [19] 栾洁, 陈雅琳, 储智勇, 等. 冬虫夏草子实体对小鼠抗疲劳及耐缺氧能力的影响[J]. *时珍国医国药*, 2013, 24(1):

47-48.

- [20] 方士英, 徐茂红, 叶良兵, 等. 冬虫夏草对免疫性肝损伤小鼠模型的保护作用研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2011, 27(10): 891-895.
- [21] 吴建良, 王志勇, 孙丽伟, 等. 冬虫夏草对肝纤维化小鼠 Smad3 蛋白表达的影响[J]. *中国中医急症*, 2011, 20(11): 1786-1789.

(收稿日期: 2014-01-11 修回日期: 2014-03-15)