

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

肖 凤, 王伴青, 唐和生, 孙朝越, 李梦军, 廖义林, 刘继志
(井冈山学院医学院, 江西 吉安 343000)

摘 要:【目的】寻找法医学鉴定过敏性休克死亡的病理形态学诊断指标。【方法】利用组织芯片技术采用免疫组化方法(S-P法)检测 35 只过敏性休克豚鼠(实验组 28 只,对照组 7 只)死后 0、6、12、24 h 4 个时间点的心、肝、肺、肾、脾、胃、肠、气管及扁桃体组织中的 IgE 及 IL-4 的表达情况。【结果】IgE 的表达:实验组肺及气管组织呈阳性表达,并以 0、6 h 表达最强,各时间点的表达强度有统计学意义, $P < 0.01$;脾组织呈弱阳性表达,各时间点的表达强度无统计学意义, $P > 0.05$;实验组其它脏器及对照组所有脏器均无表达。IL-4 的表达:实验组肺、气管及胃组织呈阳性表达,并以 0、6 h 表达最强,各时间点的表达强度有统计学意义, $P < 0.01$;肠组织呈弱阳性表达,各时间点的表达强度无统计学意义, $P > 0.05$;实验组其它脏器及对照组所有脏器均无表达。【结论】免疫组化方法检测 IgE、IL-4 的表达,可望作为鉴定过敏性休克死亡的病理形态学诊断指标。

关键词:过敏反应;细胞因子;豚鼠;免疫组织化学

中国分类号:D919.4

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2006)02-0181-03

Expression and Forensic Significance of IgE and IL-4 in Organs of Guinea Pigs Died of Anaphylactic Shock

XIAO Feng, WANG Ban-qing, TANG He-sheng, SHUN Chao-yue, LI Meng-jun, LIAO Yi-lin, LIU Ji-zhi
(Medical College, Jinggangshan University, Jian, 343000, China)

Abstract:【Objective】To seek the pathomorphological targets in forensic identification of anaphylactic shock.【Methods】After 35 guineapigs were died of anaphylactic shock, in which the test group was 28 and the control group was 7, we selected the hearts, lungs, livers, spleens, kidneys, stomachs, intestins, tracheas and tonsils of the guineapigs at 0 h, 6 h, 12 h, and 24 h, respectively and detected the expression of IgE and IL-4 by tissue chip and S-P immunohistochemical method.【Results】(1) The expression of IgE: There was positive expression in the lungs and tracheas in the test group, and was the highest at 0,6 hour in four times, and there were statistical significance, $P < 0.01$; There was low expression in the spleens in the test group, and no statistical difference, $P > 0.05$; but no expression in other tissues in the test group and in all tissues in the control group. (2) The expression of IL-4: There was positive expression in the lungs, tracheas, stomachs, and intestins in the test group, and was the highest at 0, 6 hour in four times, and there were statistical significance, $P < 0.01$; There was low expression in the intestins in the test group, and no statistical difference, $P > 0.05$; but no expression in other tissues in the test group and in all tissues in the control group.【Conclusion】To detect the expression of IgE, IL-4 by immunohistochemical method may be hopeful to become the pathomorphological targets for anaphylactic shock.

Key words: allergic reaction; cytokine; guinea pigs; immunohistochemistry

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(2):181-183,187]

目前关于过敏性休克死亡的病理形态学研究国内报告甚少^[1,2]。法医学鉴定过敏性休克死亡因缺乏特征性的病理形态学诊断指标,而常采用排

除法进行鉴定,即根据用药后出现过敏性休克的临床表现,尸检又未发现致死性原因等综合分析判定。为此,医患双方对鉴定结论产生异议的纠纷

收稿日期:2005-11-04

基金项目:江西省吉安市科技局科技计划基金资助项目(200409)

作者简介:肖凤(1965),男,江西吉安人,硕士,副教授,副主任医师。E-mail:xiaofeng196510@tom.com

时常发生,法医学鉴定过敏性休克死亡成为一大难题。有研究表明豚鼠在致敏后血清总 IgE 明显升高,抗原再次攻击前血清 IgE 抗体明显高于再次攻击后休克死亡者,提示 IgE 可能在组织中存留^[3,4]。而 IL-4 又是促进合成 IgE 的主要细胞因子,故推测过敏性休克死亡者脏器中可能有 IgE 和 IL-4 存留。我们在 2004 年 1 月至 2004 年 10 月间利用组织芯片技术、用免疫组化方法检测过敏性休克死亡豚鼠脏器中的 IgE 和 IL-4 的表达,以探讨 IgE 和 IL-4 能否作为法医学鉴定过敏性休克死亡的病理形态学诊断指标;为模拟实际检案,本研究分别于过敏性休克豚鼠死后 0、6、12、24 h 4 个时间点取所有脏器(除脑外)进行研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

多人混合的正常人血清,井冈山学院 2003 级妇幼班部分学生提供。纯种 Hartly 豚鼠 40 只,雌雄不拘,体质量约 200~250 g,按随机分组法分为正常对照组和模型组,由江西医学院实验动物中心提供。兔抗人 IgE 抗体、兔抗人 IL-4 抗体、DAB(棕黄色)、S-P 试剂盒均购自 DAKO 生物技术有限公司武汉分公司。

1.2 致敏原注射液的制备

参照文献[5],将多人正常血清混合后,离心后取上清液,用无菌生理盐水 1:10 稀释,即为致敏原注射液。

1.3 动物致敏

实验组于豚鼠一侧后爪掌皮内注射致敏原 0.15 mL 形成皮丘。对照组于同样部位注射同样剂量的无菌生理盐水。两组动物均放在同一清洁级动物室饲养。饲养期间豚鼠死亡 5 只,其中实验组 4 只,对照组 1 只。

1.4 动物发敏

实验组致敏后饲养 20 d,用 2 mL 注射器于胸前区心脏搏动最明显处刺入心腔,见搏动性回血后注射混合人血清 1 mL,诱发过敏性休克,所有实验组豚鼠均出现过敏性休克症状,其中 25 只豚鼠在 2 s~10 min 内死亡。对照组同样饲养 20 d 后注射生理盐水 1 mL,无 1 死亡,采用断头处死。

1.5 尸体解剖

两组动物分别在死后 0、6、12、24 h 4 个时间点

解剖。死后 0 h 解剖 9 只(实验组 7 只,对照组 2 只),死后 6 h 解剖 8 只(实验组 6 只,对照组 2 只),死后 12 h 解剖 8 只(实验组 6 只,对照组 2 只),死后 24 h 解剖 7 只(实验组 6 只,对照组 1 只),取心、肺、肝、肾、脾、胃、肠、扁桃体、气管共 9 个脏器组织,备作组织芯片。

1.6 组织芯片的制备

参照文献[6],采用手工方法制作组织芯片。步骤如下:将上述脏器组织分别取材,组织块大小为 1.1 mm×1.1 mm×1.1 mm。制作 2.7 cm×2.4 cm×0.5 cm 的空白受体蜡块,用直径 1.0 mm 的细钻头在蜡块上打孔 4×8 个,孔间间距约 1.5 mm,孔深 3 mm。按脏器将组织块放入空白受体蜡块孔中,制作组织芯片。每个组织芯片安放 4×8 个组织块。将制好的组织芯片蜡块切成厚 4 μm 的连续切片 2 张,分别作 HE 染色和免疫组化染色。用于免疫组化染色的蜡片裱于 100 g 多聚赖氨酸处理的载玻片上,78 ℃ 烤片 30 min 后移至 60 ℃ 恒温箱中过夜,37 ℃ 保存备用。

1.7 免疫组化 S-P 法染色

染色方法按试剂盒说明书进行,以 PBS 代替一抗、二抗、抗生素蛋白-链霉亲和素辣根过氧化物酶作对照。阳性反应呈棕黄色或浅黄色,定位于细胞内、小血管壁及血管周围等。在图象分析仪上,每张切片随机取 5 个高倍视野,测定一定面积内阳性信号面积和阳性信号平均灰度值,计算阳性指数(PI), $PI = \text{阳性信号面积} \times \text{阳性信号平均灰度值} / \text{测定面积}$ 。

1.8 统计学处理

实验组各脏器各时间段阳性指数(PI)均数比较用 t 检验。

2 结 果

2.1 临床表现与尸检所见

实验组豚鼠于抗原攻击后即开始出现活动减少,继而竖毛,躁动,呼吸困难,四肢软弱,抽搐,大小便失禁,最后 25 只死亡,3 只症状缓解,未死亡,休克发生率为 100%,死亡率为 89.3%。对照组未出现上述任何症状,未发生死亡。尸检所见:实验组和对照组各脏器均呈现急死的一般病理改变,实验组在肝、肾、脾间质及气管与胃肠黏膜下见嗜酸性粒细胞浸润,对照组未见嗜酸性粒细胞

浸润,实验组肺水肿较对照组明显。

2.2 IgE 表达

实验组 0、6、12、24 h 4 个时间点肺小血管壁及血管周围出现浅黄色或棕黄色区域;气管粘膜上皮细胞浆、小血管壁及结缔组织出现浅黄色或

棕黄色区域;脾髓质出现浅黄色区域和棕黄色阳性细胞;心、肝、胃、肠等脏器组织无显色(即未检见 IgE)。在 0、6、12、24 h 4 个时间点肺组织 IgE 的表达情况,见表 1。对照组豚鼠(7 例)心、肝、肺、肾、胃、肠和气管等 4 个时间点上均无显色。

表 1 IgE 在各时间点各脏器的表达情况(PI)

Table 1 Expression of IgE in the organs at different time points

Tissue	0 h	6 h	12 h	24 h	t	P
Lung	48.2 ±3.0	52.3 ±3.4	40.8 ±2.5	36.2 ±3.0	6.654	<0.01
Trachea	46.8 ±3.2	51.9 ±2.4	41.2 ±3.0	36.5 ±3.6	3.205	<0.01
Spleen	14.5 ±2.8	12.3 ±2.5	11.4 ±3.0	9.8 ±2.9	0.564	>0.05

2.3 IL-4 表达

实验组 0、6、12、24 h 4 个时间点肺小血管壁及血管周围出现浅黄色或棕黄色区域;气管、胃、肠粘膜上皮细胞浆、小血管壁及结缔组织出现浅

黄色或棕黄色区域;心、肝、脾等脏器组织无显色(即未检见 IL-4)。在 0、6、12、24 h 个时间点肺组织 IL-4 的表达情况见表 2。对照组豚鼠(7 例)心、肝、肺、肾、胃、肠和气管等 4 个时间点均无显色。

表 2 IL-4 在各时间点各脏器的表达情况(PI)

Table 2 Expression of IL-4 in the organs at different time points

Tissue	0 h	6 h	12 h	24 h	t	P
Lung	40.1 ±3.2	45.3 ±2.4	36.4 ±2.8	28.5 ±3.1	5.770	<0.01
Trachea	38.4 ±3.2	44.2 ±4.2	28.4 ±3.0	19.2 ±2.5	3.263	<0.01
Gastric	36.5 ±3.5	31.4 ±2.2	21.8 ±3.4	16.6 ±2.5	5.201	<0.01
Intestinal	16.5 ±2.8	14.6 ±3.0	10.3 ±3.5	9.9 ±2.2	0.237	>0.05

3 讨 论

各种类型的过敏反应中总 IgE 均升高,并且 IgE 的生成量关系到致敏个体是否发生速发型变态反应^[7,8]。本研究实验组豚鼠肺、气管组织 IgE 阳性表达,脾组织 IgE 弱阳性表达,肝、心、肾等 6 个脏器组织中 IgE 均呈阴性,这与郭薇等^[9]报道在豚鼠过敏性休克肺组织检见大量 IgE 基本一致。同时提示肺、气管可能是过敏性休克中受累最严重的器官,少数过敏性休克病人死于窒息可能主要与气管受累而痉挛有关。杨镇等^[9]报道在日本血吸虫病兔肝内血管壁检见 IgE,说明寄生虫感染时 IgE 多出现在肝组织内,提示不同组织检出 IgE 可能有助于鉴别寄生虫感染和过敏性休克。过敏性休克豚鼠 IgE 的阳性表达分布在肺小血管壁及其周围,气管粘膜上皮细胞浆内及结缔组织和脾髓质细胞浆内,上述脏器均表现为病变越重的区域阳性强度越强。这提示过敏性休克时,组胺、5-HT

的大量释放,小血管和毛细血管通透性增加,免疫球蛋白便可溢出血管,进入组织间隙,从而使小血管壁及结缔组织染色阳性。本实验中过敏性休克死亡豚鼠的肺、气管组织中 IgE 的表达 4 个时间点均呈阳性表达,并以 0、6 h 表达最强,各时间点的表达强度有统计学意义,而脾组织中 IgE 阳性表达各时间点无显著性差异,提示 IgE 可望作为法医学鉴定过敏性休克死亡的病理形态学诊断指标。肺、气管组织中不同时间点的表达强度差异和在脾组织中表达的无差异性,提示法医学鉴定过敏性休克死亡应根据尸检时间选择脏器和指标。

IL-4 是辅助 T 细胞衍生的细胞因子,是促进 IgE 合成的最主要细胞因子。本次研究发现实验组豚鼠肺、气管、胃组织 IL-4 呈阳性表达,肠组织 IL-4 弱阳性表达,而肝、心、肾、脾等 5 个脏器组织中 IL-4 均呈阴性,这与 McGwire 等^[11]报道过敏性疾病脾脏 IL-4 的含量较多而利什曼病的脾脏 IL-4 含量很少不一致。过敏性休克豚鼠 IL-4 的阳性

(下转第 187 页 to page 187)

亡,并且无明显肝脏损害。在整个实验过程中,改良造模组大鼠无 1 例死亡,除了临床检测指标(蛋白尿,血尿)取得比较满意的结果外,病理方面也较为理想,6 只大鼠肾脏系膜区都以较强的 IgA 沉积为主,说明用 LPS+BSA+CCL₄ 作为 IgA 肾病的模型改良方法是成功的。当然,这只是小样本的实验,要想得到更为肯定的结果,还需扩大样本量来证实。

参考文献:

- [1] 黄 胜,孙 林,叶任高.两种系膜增殖性肾炎大鼠模型的建立比较[J].中国实验动物学报,2002,10(4):236-238.
- [2] 李江涛,许 晨,李 素,等.雷公藤单体 T4 治疗 IgA 肾病的实验研究[J].上海医学,2003,26(suppl):19-22.
- [3] 王 丽,章友康,王海燕,等.肝脾和(或)胃肠黏膜免疫在肾小球系膜区 IgA 沉积中的作用 [J].中华内科杂志,1988,27(4):216-220.
- [4] 刘 震,周树录,谭建三,等.大鼠系膜增殖性肾小球肾炎模型的改进[J].华西医科大学学报,1996,27(2):182-184.
- [5] WOODROFFE A J, GORMLY A A, CLARKSON A R. Experimental cirrhosis and deposition of glomerular IgA immune complexes[J]. *Contrid Nephrol*, 1984, 40:51-54.
- [6] 郭啸华,刘志红,黎磊石.大黄酸对 2 型糖尿病肾病大鼠疗效观察[J].中华肾脏病杂志,2002,18(4):280-284.
- [7] MUSO E, YOSHIDA H, TAKEUCHI E, et al. Enhanced production of glomerular extracellular matrix in a new mouse strain of high serum IgA ddY mice [J]. *Kidney Int*, 1996, 50(6):1946-1957.
- [8] MIYAWAKI S, MUSO E, TAKEUCHI E, et al. Selective breeding for high serum IgA levels from noninbred ddY mice: isolation of a strain with an early onset of glomerular IgA deposition[J]. *Nephron*, 1997, 76(2):201-207.
- [9] 徐淑云. CCl₄ 诱发的肝纤维化动物模型[M]//徐淑云. 药理实验方法学. 第 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2002:1350-1351.

(编辑 黄小延)

(上接第 183 页 from page 183)

表达分布在肺小血管壁及其周围,气管胃、肠粘膜上皮细胞浆及结缔组织,上述脏器均表现为病变越重的区域阳性强度越强。本实验还发现过敏性休克死亡豚鼠的肺、气管、胃组织 4 个时间点均呈阳性表达,并以 0、6 h 表达最强,各时间点的表达强度存在显著性差异;而肠组织 IL-4 阳性表达各时间点无显著性差异;对照组豚鼠所有脏器组织各时间点均无表达。这与 IgE 的表达情况基本一致。揭示 IL-4 促进 IgE 合成,并协同 IgE 参与过敏性休克反应。也可望作为法医学鉴定过敏性休克死亡的病理形态学诊断指标。

本实验提示 IgE 和 IL-4 可望作为法医学鉴定过敏性休克死亡的病理形态学诊断指标;它们在肺、气管、胃组织中不同时间点的表达强度差异和在脾、肠组织中表达的无差异性提示法医学鉴定过敏性休克死亡应根据尸检时间选择脏器和指标。

参考文献:

- [1] 左芷津.过敏性休克死亡动物肾脏免疫复合物型的实验研究[J].中国法医学杂志,1994,9(2):82-84.
- [2] 郭 薇,陈玉川,成建定等.豚鼠过敏性休克 IgE 和 C₃ 复合物分布及 C-kit 蛋白表达[J].中山医科大学学

报,2002,23(2):103-104.

- [3] 左止津,祝家镇.检测青霉素过敏性休克血中 IGE 类抗体[J].中国法医学杂志,1993,9(3):140-142.
- [4] 周亦武.药物过敏性休克的病理变化及其法医学鉴定[J].中国法医学杂志,1993,9(3):167-168.
- [5] 左止津,祝家镇.过敏性休克死亡体内白三烯变化的研究[J].中国法医学杂志,1992,7(3):141-142.
- [6] 赵 坡,辛 貌,王德文.用引物介导原位标记方法检测脑胶质瘤染色体畸变[J].中华病理学杂志,1996,25(2):291-293.
- [7] 巴德年.当代免疫学技术与应用[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1998:122-123.
- [8] BRUCE S, BOCHNER M D, LAWRENCE M, et al. Anaphylaxis [J]. *New Eng J Med*, 1991, 324 (25):1785-1787.
- [9] 杨 镇,地大鹏,施宝明,等.日本血吸虫病兔肝内血管壁免疫球蛋白和补体的免疫组织化学分析[J].同济医科大学学报,1998,27(1):49-51.
- [10] McGWIRE B S, CHANG K P, ENGMAN D M. Migration through the extracellular matrix by the parasitic proto zoon *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp⁶³. *Infect Immunity* 2003, 71 (3): 1008-1010

(编辑 黄小延)