

嗜酸性粒细胞在抗过敏反应中的应用研究

梁铎耀, 李博琨

(太原市外国语学校, 山西 太原)

摘要: 本文中嗜酸性粒细胞作为原材料制备药物, 或从灭活寄生虫中提取趋化因子, 增殖人体内的嗜酸性粒细胞, 治疗过敏反应。采用方法: 提取灭活寄生虫体内可使嗜酸性粒细胞增殖的趋化因子 ECFP。将 ECFP 制作为凝胶以治疗皮肤过敏, 或制作为注射液治疗急性过敏反应。利用动物组织培养技术在体外增殖从人或哺乳动物外周血中分离出的嗜酸性粒细胞。利用细胞破碎技术提取嗜酸性粒细胞内的组胺酶, 制备组胺酶类药物。将药物与嗜碱性粒细胞混合培养以检测药物活性。研究后发现利用嗜酸性粒细胞生产的药物可有效治疗人体的过敏反应。部分药物相比于传统药物更具有治疗的针对性, 可降低治疗时对人体不良影响。

关键词: 过敏反应; 嗜酸性粒细胞; 寄生虫; 提取嗜酸性粒细胞; 动物组织培养技术; 组胺酶

中图分类号: R392 **文献标识码:** A **DOI:** 10.19613/j.cnki.1671-3141.2018.72.060

本文引用格式: 梁铎耀, 李博琨. 嗜酸性粒细胞在抗过敏反应中的应用研究 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(72): 141-142.

Study on the Application of Eosinophils in Anti - allergic Reaction

LIANG Duo-yao, LI Bo-kun

(Taiyuan foreign language school, Taiyuan Shanxi)

ABSTRACT: In this paper, eosinophils are used as raw materials to prepare drugs, or chemokines are extracted from inactivated parasites to proliferate human eosinophils and treat allergic reactions. Methods: ECFP, a chemokine which can proliferate eosinophils in inactivated parasites, was extracted. ECFP was made into gel to treat skin allergy or injection to treat acute allergic reaction. Eosinophils isolated from human or mammalian peripheral blood were proliferated in vitro by animal tissue culture technique. Histamine enzymes were extracted from eosinophils by cell disruption technique to prepare histaminase drugs. Mixed drugs and basophils were cultured to detect drug activity. The study found that the use of eosinophils produced drugs can be effective in the treatment of human allergies. Some drugs are more targeted than traditional drugs, which can reduce the adverse effects on the human body.

KEY WORDS: Allergic reaction; Eosinophils; Parasites; Extraction of eosinophils; Animal tissue culture; Histamine enzyme

1 过敏及抗过敏现状

世界变态反应组织对 30 个国家过敏性疾病的流行病学调查显示: 这些国家的总人口中, 22% 的人患有过敏性疾病, 如过敏性鼻炎、哮喘、结膜炎、湿疹、食物过敏、药物过敏等。美国约有四五千万人有过敏问题, 其中 3950 万人患有季节性过敏性鼻炎。据世界卫生组织估计, 全球有 1.5 亿哮喘患者, 并呈逐年上升趋势, 其中 50% 的成人及至少 80% 的儿童均由过敏因素如花粉引发。季节性过敏性炎症如不经治疗, 25%-38% 将发展为哮喘, 最终成为常年哮喘、肺气肿、肺心病。世界卫生组织同时估计, 每年有超过 18 万人死于哮喘, 于 2005 年更有约 25 万人因哮喘病而导致死亡^[1]。

生活中的过敏原较多, 分为吸入性过敏原包括花粉、柳絮、螨虫、油烟、香烟、尾气等; 食入性过敏原包括牛奶、鸡蛋、牛羊肉、海鲜、酒精、抗菌药等; 接触式过敏原包括化妆品、金属、辐射、肥皂等; 注射式过敏原包括青霉素、链霉素、异种血清等。过敏人群很难在生活中完全避免与过敏原接触。

现阶段抗过敏药主要分为激素类、抗组胺类、钙剂类和免疫抑制剂类。激素类药物作用时间短, 不能从根本上解决过敏反应的发生, 部分药物的副作用会对人体的其他机能造成不良影响。抗组胺类药物可以分解由嗜碱性粒细胞 (basophil, BASO) / 肥大细胞产生的组织胺, 对皮肤粘膜过敏反应的治疗效果较好, 但对有关节痛和高热者无效; 对支气管哮喘疗效较差。钙剂类药物能增加毛细血管的致密度, 降低通透性, 从而减少渗出, 减轻或缓解过敏症状, 但此类药物不具有针对性, 会影响人体的循环系统的正常运行。免疫抑制剂可以有效地缓解各类过敏反应, 但是会损害人体的正常免疫机制, 造成人体免疫力下降。综合来看, 现阶段存在的各类抗过敏药物都存在使用局限性。

2 EOS 抗过敏机理

人体的过敏反应主要是指相同的过敏原再次进入肌体时, 通过与致敏的 BASO 表面的抗体特异性结合, 使这种细

胞释放以组织胺为主的生物活性介质的过程。在此过程中, 白细胞中的嗜酸性粒细胞 (Eosinophil, EOS) 与 BASO 产生拮抗作用, 释放组胺酶和芳基硫酸酯酶 (Aryl sulfatase, ARS) 对 BASO 释放的组胺和白三烯进行灭活, 吞噬 BASO 所排出的颗粒, 同时产生前列腺素 E1 抑制 BASO 的脱颗粒过程^[2]。EOS 合成并分泌的组胺酶、ARS 和前列腺素 E1^[3] 均为人体正常生物活性物质, 在生理浓度范围内的剂量无毒副作用, 并能有效完成对 BASO / 肥大细胞的拮抗作用。

采用动物细胞培养技术在体外增殖 EOS 并从中提取组胺酶、ARS 和前列腺素 E1, 以应用于抗过敏反应。当寄生虫侵入时, EOS 快速增殖并参与抗感染反应, 因此, 以灭活寄生虫幼虫提取物做诱导剂, 诱导体内 EOS 增殖, 增强其对 BASO 的拮抗作用。技术路线如图 1 所示。

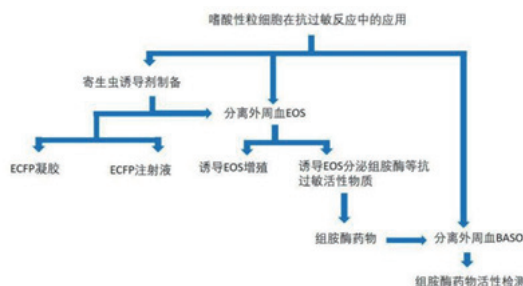


图 1 技术路线图

3 生物诱导 EOS 增殖

3.1 寄生虫诱导 EOS 增殖

寄生虫感染是 EOS 增多最常见的原因。单细胞的原虫感染一般不引起 EOS 增高, 而多细胞的蠕虫、吸虫感染可引起 EOS 增多, 其增多的程度与虫体特别是幼虫侵入组织的数量和范围相平行。在组织内被包裹的或仅限于肠道腔内的感染 (蛔虫、绦虫), 一般不引起 EOS 增多。但能破坏肠粘膜的寄生虫 (钩虫) 可使 EOS 增多。

选取巴西日圆线钩虫(*Nippostrongylus brasiliensis*)和旋毛虫(*Trichinella spiralis*)作为诱导剂诱导EOS增殖。由于EOS具有趋化性,而寄生虫可产生EOS趋化因子(ECFP)^[4],可以利用这一特点来完成诱导剂的制备。

3.2 诱导药物制备

由于活体寄生虫在人体内会发生增殖而破坏人体健康,所以在制作诱导剂的时候需要对寄生虫进行灭活处理,并从灭活寄生虫匀浆中提取ECFP。灭活方式可采取高温灭活或蒸馏灭活。然后可以使用蛋白质水解酶水解灭活残留物并滴加显色液显色并分离,从而达到制备的目的。

3.2.1 凝胶制备

利用ECFP对EOS的作用,我们可以在提取的ECFP溶液中添加卡波普(CarboPol)制作ECFP凝胶。由于I型超敏反应的过程中会释放大量组胺,可以在凝胶中添加一些抗组胺类药物以达到辅助治疗的效果。凝胶可以涂抹在过敏皮肤的表面进行局部治疗。

3.2.2 注射液制备

将ECFP配置到浓度为0.9%的生理盐水中,再在溶液中添加一定量的地氯雷他定作为辅助治疗的抗组胺药。对于一些急性的I型超敏反应,我们可以通过静脉注射的方法达到快速治疗的目的。

由于ECFP为具有生理活性的物质,注射前应进行皮试试验以防止重度不良反应发生。

由于EOS会在反应中释放致炎因子白三烯,上皮毒素髓鞘碱性蛋白(Myelin basic protein, MBP)、嗜酸性粒细胞阳离子蛋白(Eosinophil cationic protein, ECP)、促红细胞生成素(Erythropoietin, EPO)和神经毒素EDN^[5],参与变态反应的迟发相反应,从而损害靶细胞及组织,导致皮肤组织出现水肿、瘙痒和渗出等症状^[6]。需要在治疗I型超敏反应的过程中配合使用抗毒素以及少量糖皮质激素以降低EOS增多而造成的不良反应。

4 利用EOS制备组胺酶

4.1 人外周血EOS分离培养

EOS的过敏反应主要依靠其释放的组胺酶,前列腺素E1和ARS。由于EOS在急性的I型超敏反应初期含量较少,所以可以通过动物细胞培养技术在体外增殖EOS制备组胺酶和ARS。

选择分离哺乳动物或人体外周血通过密度梯度分离法,免疫磁珠分离法^[7]或流式细胞术法^[8-10]分离出EOS。将处理过的EOS制成细胞悬液并转入培养液中5%二氧化碳培养箱中进行原代培养。待瓶壁贴满EOS时再用胰蛋白酶处理使其分散成为单个细胞并转入培养液中,放入二氧化碳培养箱中进行传代培养。培养环境温度控制在 $36.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 为宜,pH控制在7.2~7.4之间。

分离得到高纯度、高活性EOS,是研究EOS相关疾病的基础和关键。由于健康人体外周血中EOS含量较低,且其密度与中性粒细胞接近,单独采用Percoll密度梯度离心法分离EOS,得到的细胞纯度和回收率都很有限。综上所述,本研究采用密度梯度离心法结合CD-16免疫磁珠法分离外周血EOS。首先制成白细胞悬液,再通过两层密度为1.082g/mL、1.094g/mL Percoll密度梯度离心,产生含有中性粒细胞和嗜酸性粒细胞的细胞悬液^[11]。把无菌蒸馏水加入细胞悬液中30s,然后恢复等渗以破坏红细胞,小心吸出含红细胞碎片的上清液,保留底层细胞,并将底层细胞悬液中混入Anti-CD16免疫磁珠孵育。将孵育后的细胞悬液加入磁柱,收集洗出液即获得较高纯度的人外周血EOS。用含10% FCS PRMI培养基悬浮培养纯化得到的EOS待用。除此方法外还可以选择使用裂解液(pH7.4, 155mmol/L NH_4Cl , 10mmol/L KHCO_3 , 0.1mmol/L Na_2EDTA)选择性地破坏红细胞,且在4℃可以减

少细胞聚集,但是这种方法会增加嗜酸性粒细胞的密度^[12]。

使用细胞破碎技术提取体外增殖的EOS中的组胺酶,前列腺素E₁和ARS。

4.2 EOS提取物药物制备

4.2.1 组胺酶注射液

组胺酶ARS和地氯雷他定可混合加入浓度为0.9%的生理盐水中制备注射液,用于肌肉注射或静脉注射。

注射液主要针对急性I型超敏反应造成组胺含量增多,用于过敏性哮喘急救和过敏性湿疹的治疗。

注射液注射后可利用Yousuf^[13]方法进行血浆组织胺含量的检测。

4.2.2 组胺酶药物活性检测

分离人或哺乳动物外周血中的BASO并将其和组胺酶注射液混合进行培养。在试管内滴加免疫球蛋白E(IgE)抗体培养液后向其中添加致敏抗原如甘露醇。两小时后可对培养液进行离心。去除上层清液后用显微镜观察BASO是否有颗粒性物质如肝素和组胺等放出。在培养体系中加入Alcian蓝染液^[14],混匀,于室温过夜。由于脱颗粒后BASO不再显示碱性,可通过此方法统计其脱颗粒率,评价抗组胺活性物的功效。如有碱性颗粒放出则说明注射液对BASO的灭活效果不佳。上层清液可用高效液相色谱法^[15]测定组胺含量。

5 结论

通过诱导剂增殖EOS可有效治疗过敏反应,并且可以避免使用免疫抑制剂和钙剂对人体产生的不良影响。ECFP凝胶可涂抹在体表,对皮肤过敏性疾病的治疗有良好效果。ECFP注射液对急性过敏性疾病的治疗效果较好。通过增殖EOS生产组胺酶可用于生产组胺酶类药物解决过敏反应中组胺增多的问题。但EOS的增多的同时也会对人体产生不良影响,需要其他药物进行辅助治疗。

参考文献

- [1] Ruby Pawankar等.世界过敏组织白皮书[M].美国:世界过敏组织,2013.
- [2] 何韶衡,刘志刚.基础过敏反应学[M].北京:科学出版社,2009.
- [3] 金伯泉.医学免疫学.5版[M].北京:人民卫生出版社,2008.
- [4] 刘影.嗜酸性粒细胞与寄生虫感染[J].国外医学(寄生虫病分册),1999,(6):249-251.
- [5] 郭明丽,聂贵红,秦占芬.嗜酸性粒细胞与变态反应[J].河北医药,2002,24(10):827-828.
- [6] 黄英河,罗光浦,梁海东.嗜酸性粒细胞计数在湿疹诊断中的应用[J].中国现代医药应用,2010,4(22):75-76.
- [7] 李一荣,吴健民,邹萍.利用磁性细胞分选技术阴性选择法分离外周血嗜酸性粒细胞[J].中国免疫学杂志,2000,16(8):423-427.
- [8] 李鹏,邢杰.嗜酸性粒细胞的提纯[J].武警医学院学报,2005,14(1):62-65.
- [9] 李树权.嗜酸性粒细胞的分离与纯化[J].广西医科大学学报,2001,18(6):917.
- [10] 刘艳荣.实用流式细胞术[M].北京:北京大学医学出版社,2008.
- [11] Zeck Kapp G,Kroegel C,Riede UN,et al.Mechanisms of human eosinophil activation by complement protein C5a and platelet-activating factor:similar functional responses are accompanied by different morphologic alterations[J].Allergy,1995,50(1):34-47.
- [12] Fukuda T, Dunnette SL, Reed CE, et al.Increased numbers of hypodense eosinophils in the blood of patients with bronchial asthma[J].Am Rev Respir Dis,1985,132(5):981-985.
- [13] 王健,等.血浆组胺酶测定及其临床应用[J].临床检验杂志,1988,6(3):140-123.
- [14] 崔惠林,等.人胎儿呼吸道肥大细胞的组化特征及其与其它细胞的关系[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2000,9(1):45-48.
- [15] 高明巧,喻冰.介绍改进的瑞氏-姬姆萨复合染色液[J].锦州医学院学报,1991,12(4):246.