

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.12.005

文章编号: 1005-8982(2017)12-0025-05

脂肪移植治疗 DNCB 诱导 ACD 模型小鼠的实验研究*

旷翎¹, 贾晓敏², 冯浩¹, 伍博¹, 徐晓芹¹

[湖南师范大学第一附属医院(湖南省人民医院) 1.皮肤科, 2.病理科, 湖南 长沙 410005]

摘要:目的 探究脂肪移植治疗 2,4-二硝基氯苯(DNCB)诱导变应性接触性皮炎(allergic contact dermatitis, ACD)模型小鼠的效果及其可能机制。**方法** 采用 DNCB 复制 ACD 小鼠模型,随机分成 A(脂肪移植治疗组)、B(假手术治疗组)、C(药物治疗组)、D 组(自然修复组),观察脂肪移植对 ACD 小鼠的治疗效果。2 周后处死小鼠,取背部皮损处全层皮肤组织,苏木精-伊红染色法染色观察各组小鼠皮肤组织病理改变;实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测皮损中白介素 10(IL-10)、白介素 17(IL-17)、干扰素- γ (IFN- γ)的表达。**结果** A、C 组可以观察到表皮厚度恢复正常,角质层变薄;B、D 组无明显改变。RT-PCR 检测发现 A、C 组皮肤组织中 IL-10 和 IL-17 mRNA 水平低于 D 组,IFN- γ mRNA 较 D 组升高($P < 0.05$),而 B 与 D 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 脂肪移植可降低皮损中 IL-10 和 IL-17 的表达,促进 IFN- γ 产生,减轻皮损炎症。

关键词: 脂肪移植;变应性接触性皮炎;辅助性 T 细胞 1/辅助性 T 细胞 2;Treg/Th17

中图分类号: R758.2

文献标识码: A

Research on fat transplantation treatment for DNCB-sensitized allergic contact dermatitis of mouse model*

Ling Kuang¹, Xiao-min Jia², Hao Feng¹, Bo Wu¹, Xiao-peng Xu¹

[1. Department of Dermatology, 2. Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Hunan Normal University (Hunan Provincial People's Hospital), Changsha, Hunan 410005, China]

Abstract: Objective To explore whether fat transplantation can improve the symptoms of the mouse model of allergic contact dermatitis (ACD) induced by dinitrochlorobenzene (DNCB) as well as its possible mechanism. **Methods** ACD mouse models were randomly divided into group A (fat transplantation group), group B (pseudo surgery group), group C (medication group) and group D (spontaneously-recovered model group). The HE-stained skin tissues of each group were observed under light microscope. The expression levels of IL-10, IL-17 and IFN- γ mRNAs in the skin lesions were detected by qRT-PCR. **Results** In the groups A and C, the horny layers became thinner, and the thickness of epidermis recovered to normal while there were no overt changes in the groups B and D. The expression levels of IL-10 and IL-17 mRNAs in the skin tissues of the groups A and C were clearly lower than those of the group D, the level of IFN- γ mRNA was higher than that of the group D ($P < 0.05$); however, there was no significant changes in the IL-10, IL-17 or IFN- γ mRNA level between the groups B and D. **Conclusions** Fat transplantation can decrease the expression levels of IL-10 and IL-17 in skin lesions, promote the production of IFN- γ , reduce the symptoms of skin lesions and promote the recovery of skin lesions in the mouse model.

Keywords: fat transplantation; allergic contact dermatitis; Th1/Th2; Treg/Th17

收稿日期: 2016-07-15

* 基金项目: 湖南省教育厅优秀青年项目(No: 15B139); 湖南省卫生计生委项目(No: C2017035)

[通信作者] 冯浩, E-mail: doctorfenghao@126.com

变应性接触性皮炎 (allergic contact dermatitis, ACD)是由 T 细胞介导的迟发型 IV 超敏反应^[1],临床表现以皮肤红斑、丘疹、鳞屑为主要特征^[2-3]。其病因复杂,日常生活中的接触物均有可能致敏,目前斑贴试验是诊断该病的主要手段。而脂肪组织传统观念认为其只是一种储能组织,但目前有研究认为脂肪组织是一种具有分泌功能、可分泌多种细胞因子或其他物质的内分泌器官^[4]。因此,本实验采用脂肪移植对 ACD 小鼠进行治疗,观察其治疗效果并研究其可能的机制,为进一步临床应用提供更可靠的依据,寻找一种强有效、安全的治疗变应性接触性皮炎的新方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂及药品

BALB/c 雄性小鼠 40 只,体重 20 ~ 25 g,由湖南师范大学第一附属医院实验动物室提供 [使用许可证号:SYXK(湘)2010-0013]。2,4-二硝基氯苯(2,4-dinitrochlorobenzene, DNCB)(长沙市安华化学试剂公司),丙酮(湖南师大化学试剂厂),卤米松乳膏(香港澳美制药厂有限公司),Trizol RNA 分离试剂(上海 Life Technologies 公司),Power SYBR Green PCR Master Mix(上海,Life Technologies 公司),超纯 RNA 提取试剂盒(长沙新世纪生物科技有限公司)。

1.2 方法与分组

1.2.1 复制动物模型 参照文献[5]复制小鼠模型:实验前 1 天将小鼠腹部剃毛,选取约 2 cm × 2 cm 备用。实验第 1 天(致敏期)用加样器量取 7% DNCB 溶液 30 μl 涂抹于实验组小鼠腹部剃毛区激发致敏,第 2 和 3 天进行强化,第 7 天小鼠背部选取 2 cm × 3 cm 备用,第 8 天在小鼠背部剪毛区涂抹 1% DNCB 溶液 30 μl,1 次/3 d,共 4 次。观察小鼠背部是否出现发红、肿胀、粗糙、增厚、苔藓化等变应性接触性皮炎的临床表现。

1.2.2 分组及处理 将模型复制成功小鼠随机分 A(脂肪移植治疗组)、B(假手术治疗组)、C(药物治疗组)、D 组(自然修复组)。每组 10 只。脂肪取材步骤: BALB/c 小鼠经腹腔注射 0.1%戊巴比妥钠(0.01 ml/g)麻醉小鼠,游离出皮下脂肪,置于超净台无菌培养皿中。A 组:腹腔麻醉小鼠,于背部近头侧做约 1 cm 皮肤切口,迅速将脂肪移植于背部皮下,快速止血及缝合伤口;B 组:腹腔麻醉小鼠,于背部近头侧做皮肤

约 1 cm 皮肤切口,迅速止血及缝合伤口;C 组:背部外涂卤米松乳膏 1 次/d,共 2 周;D 组:不作处理。

1.3 检测方法

1.3.1 皮肤病理检查 环钻取各组小鼠皮损部位全层皮肤,取小鼠背部左侧 1.0 cm × 0.5 cm 皮肤。随即放入 10%甲醛进行固定、石蜡包埋、切片、苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining, HE)染色,观察皮肤的组织病理学变化。

1.3.2 皮肤组织白介素 10(IL-10)、白介素 17(IL-17)、干扰素-γ(IFN-γ)mRNA 表达的测定 环钻取各组小鼠皮损部位全层皮肤,取小鼠背部右侧 1.0 cm × 0.5 cm 皮肤。按试剂盒说明书提取组织总 RNA;采用 Prime Script RT reagent Kit with gDNA Eraser 逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)合成 cDNA。实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR):①qRT-PCR 引物序列由上海生工生物工程股份有限公司提供引物合成,选取超高分子量聚丙烯酰胺凝胶(polyacrylamide gelelectrophoresis, PAGE)纯化方法(见附表);②配制反应液,混匀后再分装到 qRT-PCR 专用 96 孔板中,各设置 2 个生物学重复和 3 个技术重复孔;③轻柔混匀,1 000 r/min 离心 3 min。将 96 孔板置于 Eppendorf qRT-PCR 仪上,设置好程序后开始反应。反应完成后检查熔解曲线是否为单一峰,将得到的 Ct 值按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析处理,比较 IL-10、IL-17 及 IFN-γ 转录水平的变化。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析,计量资料以

附表 qRT-PCR 引物序列

基因	引物序列
IL-10	正向引物:5'-TGGCCAGAAATCAAGGAGC-3'
	反向引物:5'-CAGCAGACTCAATACACT-3'
IL-17	正向引物:5'-ACCGCAATGAAGACCCTGAT-3'
	反向引物:5'-TCCCTCCGCATTGACACA-3'
IFN-γ	正向引物:5'-GGCCATCAGCAACAACATAAGCGT-3'
	反向引物:5'-TGGGTTGTTGACCTCAAACCTGGC-3'
GAPDH	正向引物:5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3'
	反向引物:5'-ACACATTGGGGGTAGGAACA-3'

注:GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)

均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用方差分析,两两比较用 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肉眼观察皮肤形态学

各组第 4 次激发 24 h 后,模型小鼠背部皮损出现发红、少许粗糙、增厚、苔藓化。经 2 周干预后,A、C 组小鼠背部皮肤红斑、渗出均明显好转,痂皮脱落,局部可见毛发生。B、D 组无明显好转。见图 1。

2.2 组织病理改变

组织 HE 染色后镜下显示,A、C 组表皮增生及真皮炎症细胞浸润较 B、D 组减轻,表皮细胞内及细胞间水肿基本消退,部分小鼠仍可见轻度角化过度;B、D 组表皮棘层增生伴细胞内水肿及细胞间水肿,真皮内较多炎症细胞浸润,部分小鼠仍可见表皮糜烂及真皮明显血管扩张充血。见图 2、3。

2.3 各组 IL-10、IL-17、IFN- γ mRNA 水平比较

为表达各组 mRNA 水平差异,将 D 组 IL-10、

IL-17、IFN- γ mRNA 表达水平标准化为 1^{6-7} 。各组小鼠皮肤组织的 IL-10 mRNA 表达水平比较,经方差分析,差异有统计学意义($F=98.380, P=0.000$),各组两两比较,经 SNK-*q* 检验,结果表明,A 组 IL-10 mRNA 表达水平较 D 组降低 ($P < 0.05$);C 组 IL-10 mRNA 表达水平较 D 组降低($P < 0.05$)。见图 4。

各组小鼠皮肤组织 IL-17 mRNA 表达水平比较,经方差分析,差异有统计学意义($F=407.604, P=0.000$),各组两两比较,经 SNK-*q* 检验,结果表明:A 组 IL-17 mRNA 表达水平较 D 组降低($P < 0.05$);C 组 IL-17 mRNA 表达水平较 D 组降低($P < 0.05$)。见图 5。

各组小鼠皮肤组织的 IFN- γ mRNA 表达水平比较,经方差分析,差异有统计学意义($F=1073.221, P=0.000$),各组两两比较,经 SNK-*q* 检验,结果表明,A 组 IFN- γ mRNA 表达水平较 D 组升高($P < 0.05$);C 组 IFN- γ mRNA 表达水平较 D 组升高($P < 0.05$)。见图 6。

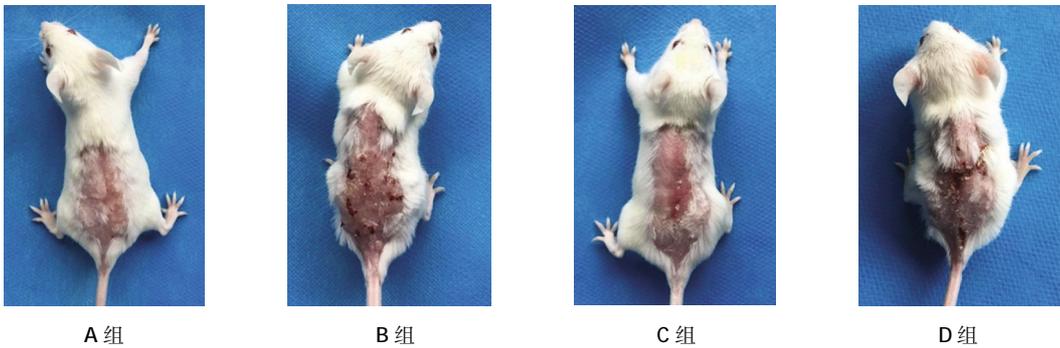


图 1 实验小鼠皮肤形态

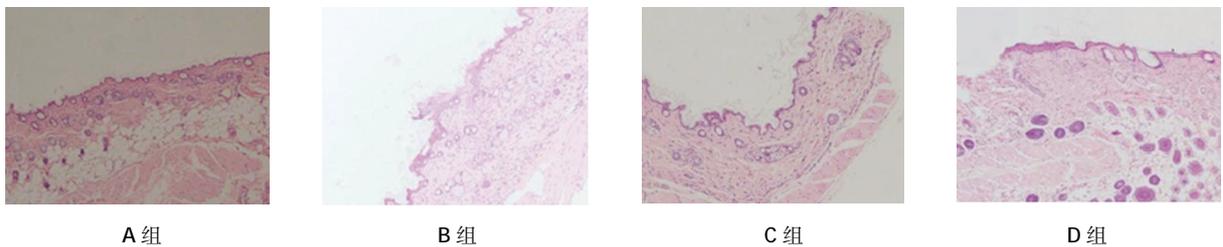


图 2 小鼠皮肤组织病理改变 (HE 染色 × 100)

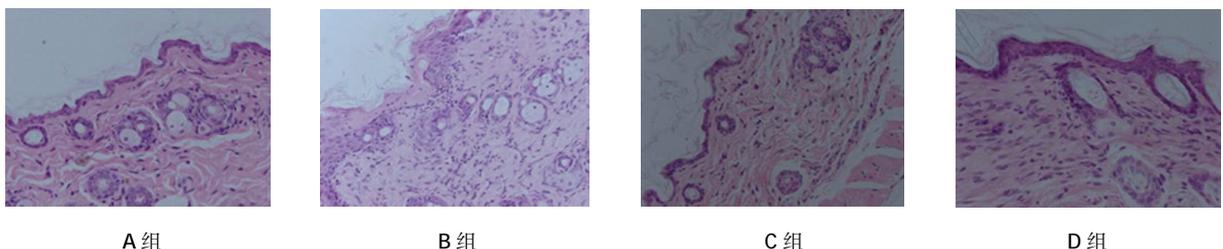


图 3 小鼠皮肤组织病理改变 (HE 染色 × 400)

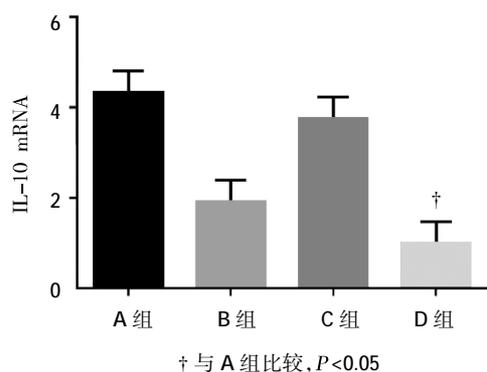


图 4 各组皮肤组织 IL-10 mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

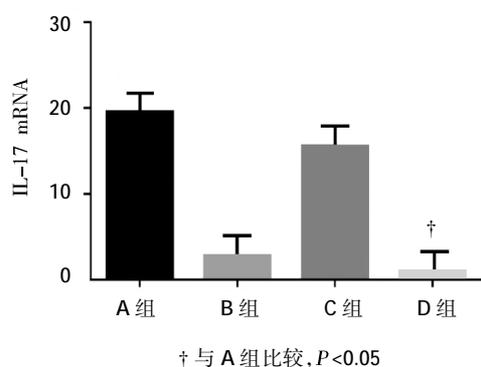


图 5 各组皮肤组织 IL-17 mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

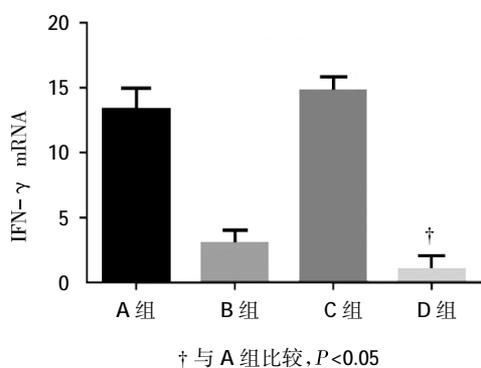


图 6 各组皮肤组织 IFN- γ mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

变应性接触性皮炎是一种细胞介导的超敏反应,其免疫学发病机制中辅助性 T 细胞 1(helper T cells 1,Th1)和辅助性 T 细胞 2(helper T cells 2,Th2)亚群及其相互间的作用失衡是最为关键的。Th1 细胞通常分泌白介素 2(Interleukin-2,IL-2)和 IFN- γ ,而不产生白介素 4(Interleukin-4,IL-4)、白介素 5(Interleukin-5,IL-5)、白介素 6(Interleukin-6,IL-6)及 IL-10;Th2 细胞则主要分泌 IL-4、IL-5、IL-6 及 IL-10,而不分泌 IL-2 和 IFN- γ 。IFN- γ 可以活化巨噬细胞,继而分泌多种炎症介质^[8-9]。国内外研究认为,ACD 的发病机制并不局限在 Th1/Th2 分化失

衡理论,研究提示机体还存在新的 T 细胞亚型——Th17 和 Treg 细胞。Treg 细胞是近年发现的新 CD4⁺ T 淋巴细胞亚群,具有免疫抑制性,并且抑制炎症反应的发生,在机体免疫耐受中发挥重要作用^[10]。Th17 细胞主要分泌 IL-17 等细胞因子,引发局部或全身的炎症反应^[11]。最新研究表明,IL-17 可促进 ACD 病情的发展^[12-13]。此外,Th17 在分化和功能上能够与 Treg 相互转化,Foxp3⁺ Treg 细胞通过直接或者间接的方式对 Th17 细胞进行拮抗,发挥抗炎和抑制免疫反应的作用。所以在 ACD 发病机制中 Th17 扮演着重要角色。自然调节性 T 细胞主要为 CD4⁺ CD25⁺ Treg, Foxp3 称叉状头/翅膀状螺旋转录因子,其特异性表达于 CD4⁺ CD25⁺ T 淋巴细胞上,是 Treg 细胞发生、发育,以及发挥生物学活性的关键因素;同时 CD4⁺ ICOS⁺ Foxp3⁺ T 细胞也是所有 CD4⁺ T 细胞中分泌 IL-10 最多的细胞亚群,IL-10 属于细胞因子中的干扰素家族,普遍认为是一种抗炎症因子^[14]。既往研究发现,ACD 皮损中 IL-10 表达增高,推测 IL-10 可能是 ACD 发病的一个重要因素。

最新观点认为,脂肪组织不仅是一种储能组织,同时也是一种具有分泌功能、可分泌多种细胞因子或激素的内分泌器官,脂肪组织可参与人体的各种反应活动^[15]。研究表明,脂肪组织具有的分泌和调节免疫功能源于其含有的脂肪干细胞[脂肪组织中有约 100 000 个脂肪源性干细胞(adipose derived stromal cells,ADSCs)/g],ADSCs 有免疫调节作用^[16]。许多研究表明,ADSCs 能改善多发性肌病、红斑狼疮等自身免疫性疾病的病情^[17]。最新研究表明,通过自体脂肪移植形成 ADSCs 的免疫调节作用,能使 Th2 细胞向 Th1 细胞分化,改善 Th1/Th2 分化失衡^[18-19],并通过促进 Foxp3⁺ Treg 的生成,从而进一步调控 Treg/Th17 细胞的平衡,来控制免疫反应^[20]。

本实验结果显示,A、C 组比 D 组角质层变薄,表皮厚度恢复正常,B、D 组则无明显改变。在脂肪移植治疗 ACD 样小鼠模型中,A 组小鼠皮肤中 Treg 细胞因子 IL-10 mRNA 和 Th17 细胞因子 IL-17 mRNA 表达减少,而 Th1 细胞因子 IFN- γ mRNA 表达增多,提示脂肪移植对 Th1、Th2、Th17、Treg 可能具有多重调节作用。实验结果表明,脂肪移植可通过调控 Th1/Th2、Treg/Th17 的平衡来控制 ACD 病情。但本实验仍存在不足,其具体调控机制等问题还需进一步研究。

参 考 文 献:

- [1] YUAN X Y, LIU W, ZHANG P, et al. Effects and mechanisms of aloperine on 2, 4-dinitrofluorobenzene-induced allergic contact dermatitis in BALB/c mice[J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 10(1/2/3): 147-152.
- [2] KAPLAN D H, IGYARTO B Z, GASPARI A A. Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis[J]. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12(2): 114-124.
- [3] RÖSE L, SCHNEIDER C, STOCK C, et al. Extended DNFB-induced contact hypersensitivity models display characteristics of chronic inflammatory dermatoses[J]. *Exp Dermatol*, 2012, 21(1): 25-31.
- [4] NAUTA A J, KRUISSELBRINK A B, LURVINK E, et al. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34⁺ derived and monocyte-derived dendritic cells[J]. *J Immunol*, 2006, 177: 2080-2087.
- [5] YUAN X Y, MA H M, LI R Z, et al. Topical application of aloperine improves 2,4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice[J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 658(2/3): 263-269.
- [6] ANDERSEN C L. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets[J]. *Cancer Research*, 2004, 64(15): 5245-5250.
- [7] YANG Y H. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation[J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(4): 15.
- [8] DING H L, WANG X L, WANG H W, et al. Successful treatment of refractory facial acne using repeat short-cycle ALA-PDT: case study[J]. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2011, 8(4): 343-346.
- [9] YUNG A, STABLES G I, FERNANDEZ C, et al. Microbiological effect of photodynamic therapy (PDT) in healthy volunteers: a comparative study using methyl aminolaevulinate and hexylaminolaevulinate cream[J]. *Clin and Exp Dermatol*, 2007, 32(6): 716-721.
- [10] BLENGIO F, RAGGI F, PIEROBON D, et al. The hypoxic environment reprograms the cytokine/chemokine expression profile of human mature dendritic cells[J]. *Immunobiology*, 2013, 218(1): 76-89.
- [11] ASARCH A, BARAK O, LOO D S, et al. Th17 cells: a new therapeutic target in inflammatory dermatoses[J]. *J Dermatolog Treat*, 2008, 19: 318-326.
- [12] UMEMURA M, OKAMOTO-YOSHIDA Y, YAHAGI A, et al. Involvement of IL-17A-producing TCR $\gamma \delta$ T cells in late protective immunity against pulmonary mycobacterium tuberculosis infection[J]. *Immun Inflamm Dis*, 2016, 24(4): 401-412.
- [13] HE D, WU L, KIM H K, et al. CD8⁺ IL-17-producing T cells are important in effector functions for the elicitation of contact hypersensitivity responses[J]. *J Immunol*, 2006, 177: 6852-6858.
- [14] WANG B, ZHUANG L, FUJISAWA H, et al. Enhanced epidermal langerhans cell migration in IL-10 knockout mice[J]. *J Immunol*, 1999, 162: 277-283.
- [15] ZHANG H, WANG L, GUO C, et al. Response of mouse thymic cells to radiation after transfusion of mesenchymal stem cells[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(51): 5295.
- [16] KOBAYASHI T, KATO-ITOH M, NAKAUCHI H. Targeted organ generation using mixl1-inducible mouse pluripotent stem cells in blastocyst[J]. *Stem Cells Dev*, 2015, 24(2): 182-189.
- [17] KIM S H, JUN C D, SUK K, et al. Gallic acid inhibits histamine release and proinflammatory cytokine production in mast cells[J]. *Toxicol Sci*, 2006, 91: 123-131.
- [18] RASMUSSEN I, RINGDE 'N O, SUNDBERG B, et al. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms[J]. *Exp Cell Res*, 2005, 305: 33-41.
- [19] MC FARLIN K, GAO X, LIU Y B, et al. Bone marrow derived mesenchymal stromal cells accelerate wound healing in the rat wounds[J]. *Wound Repair Regen*, 2006, 14(4): 471-478.
- [20] PEISER M, TRALAU T, HEIDLER J, et al. Allergic contact dermatitis: epidemiology, molecular mechanisms, in vitro methods and regulatory aspects: current knowledge assembled at an international workshop at BfR[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69: 763-781.

(童颖丹 编辑)