文章编号:1000-5404(2005)17-1756-04

论著

屋尘螨提取液致敏BALB/c与C57BL/6小鼠肺部变应性炎症模型的比较

吴 奎,毕玉田,孙 鲲,夏俊波,王长征 (第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037)

提 要: 目的 研究以屋尘螨提取液复制BALB/c和C57BL/6小鼠肺部变应性炎症模型的方法。**方法** BALB/c和C57BL/6小鼠各分为对照组、加强组和常规组。加强组在第1天采用皮下注射,以后隔日采取腹腔注射进行致敏,再用提取液多次滴鼻激发(第15~17天)。最后1次滴鼻24 h后对小鼠作肺泡灌洗。常规组则于第1、8天腹腔注射2次,第15~17天滴鼻3次。对照组用PBS作注射和滴药。进行灌洗液细胞计数和分类,肺组织病理计分,灌液洗用ELISA测定IL-2、IL-4、IL-5和IFN-γ含量。**结果** ①C57BL/6加强组肺部病理计分明显升高,呈明显变应性炎症病理改变;灌洗液中细胞计数和嗜酸性粒细胞计数明显升高($P<0.05$);灌洗液IL-4、IL-5明显升高($P<0.05$),IFN-γ、IL-2无明显变化;②BALB/c加强组、腹腔注射致敏组和C57BL/6腹腔注射致敏组可见炎性细胞浸润,但嗜酸性细胞较少,BALF中IL-4、IL-5升高较加强组为弱,灌洗液中细胞计数增高,但嗜酸性细胞计数较对照组无明显差异,③单剂量组上述指标与对照组比较无显著差异。**结论** 与BALB/c相比,在屋尘螨致敏小鼠哮喘模型的复制中,C57BL/6更易取得成功,且使用皮下注射加强致敏C57BL/6小鼠所复制屋尘螨致敏哮喘模型更为典型。

关键词: 变应原;哮喘;动物模型;屋尘螨
中图法分类号: R392.11; R562.25; R593.1 **文献标识码**: A

Comparative study of allergic pulmonary inflammation of BALB/c and C57BL/6 mice sensitized and challenged with house dust mite extracts

WU Kui, BI Yu-tian, SUN Kun, XIA Jun-bo, WANG Chang-zheng (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the difference between of allergic pulmonary inflammation of BALB/c and C57BL/6 mice sensitized and challenged with house dust mite extracts. **Methods** BALB/c and C57BL/6 mice were divided into control group, intensified group and conventional group according to different methods of sensitization and challenge. The mice of intensified group were sensitized by subcutaneouse injection of house dust mite extract at day 1 and then by intraperitoneal injection every other day and challenged several times by intranasal drip of house dust mite extract from day 15 to day 17. The mice of conventional group were sensitized by intraperitoneal injection at day 1 and day 8 and challenged three times by intranasal drip from day 15 to day 17. PBS instead of house dust mite extract was used in control group. All mice underwent pulmonary lavage in 24 h after the last time of nasal challenge and the pathological manifestation of the lung, cell counts and classification and IL-2, IL-4, IL-5 and IFN-γ levels in BALF were studied. **Results** There was pulmonary eosinophilic inflammation in the mice sensitized/challenged with house dust mite extract. Total cells count, eosinophil count and IL-4, IL-5 levels in BALF enhanced significantly while IFN-γ showed no significant changes. The changes of IL-4, IL-5, and total cells count and eosinophil count and pathological manifestation of the lung were more intensive in C57BL/6 mice than BALB/c mice. **Conclusion** As compared with BALB/c, C57BL/6 mice is more useful in elucidating the mechanisms of asthmatic reactions because of the severity of local pulmonary inflammation.

Key words: allergen; asthma; animal model; house dust mite

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30470772)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30470772)
作者简介:吴 奎(1971-),男,江苏省沛县人,博士,主治医师,讲师,主要从事支气管哮喘方面的研究。电话:(023)68757245
通讯作者:王长征,电话:(023)68774603
收稿日期:2005-02-25;**修回日期**:2005-06-05

哮喘是一种以包括嗜酸性粒细胞在内的多种炎性细胞浸润、Th2 细胞因子分泌增加和气道高反应性为特征的气道慢性变应性炎症[1,2]。嗜酸性粒细胞浸润与哮喘气道炎症和气道高反应性密切相关。Th2 型细胞因子 IL-4 和 IL-5 在抗原诱导的嗜酸性粒细胞浸润至炎症部位中起着必需的作用。而 Th1 型细胞因子 IFN-γ 和 IL-12 在体内抑制嗜酸性粒细胞浸润、IgE 和 IgG1 分泌,并增强 IgG2 分泌。

在哮喘的发病过程中,各种外源性过敏原起着重要的作用。尘螨是我国哮喘患者最常见的过敏原之一[3],50% 以上过敏患者和 80% 以上的哮喘儿童对螨虫过敏原过敏[4]。因此尘螨模型的复制在哮喘的研究中非常重要,采用尘螨诱发的哮喘模型能够更好地模拟人类的哮喘。大部分哮喘动物模型使用了豚鼠,但这并不能恰当反映人肺部炎症的复杂机制,特别是不同人种的基因背景。而鼠类哮喘模型有着多种有利条件。人类和鼠类免疫系统有着类似的细胞因子和免疫球蛋白产物模式,而且通常使用大部分同基因异系小鼠在遗传学上是不均一的。小鼠的基因背景显然对其免疫后的 IgE、IgG 分泌的高低有关,这分别反应了在特应性和非特应性患者的反应状态。本研究使用屋尘螨诱发 BALB/c 和 C57BL/6 两种小鼠肺部变态反应性炎症的模型进行比较,为今后对于哮喘发病机制研究和探索新的治疗手段打下基础。

1　材料与方法

1.1　主要试剂

1.1.1　标准化的屋尘螨提取液　　购自丹麦 ALK 公司,产品号:ALK(503) D. pteronyssinus,主要成分是 Der p1 和 Derp 2,含量为100 000 U/ml,使用前用 0.1 mol/L PBS 稀释。

1.1.2　IL-4、IL-5 和 IFN-γ ELISA 检测试剂盒　　美国 Ebioscience 公司

1.2　动物分组

6 ~ 8 周雌性 SPF 级 BALB/c 小鼠 21 只,体质量(20 ± 2)g,第三军医大学实验动物中心提供;6 ~ 8 周 SPF 级 C57BL/6 小鼠 21 只,体质量(20 ± 2)g 重庆医科大学实验动物中心提供。两种动物动物分为正常对照组(以下简称对照组,control group),皮下注射加强组(以下简称加强组,intensified group)和常规腹腔注射组(以下简称常规组,conventional group),共 6 组。每组均 7 只动物。

1.3　致敏和激发步骤

加强组和腹腔注射组采用标准化的屋尘螨提取液致敏和激发。加强组第 1 天皮下注射含 2% 氢氧化铝的2 000 U/ml 屋尘螨提取液 100 μl,第 3、5、7 天腹腔注射含 2% 氢氧化铝的 2 000 U/ml 屋尘螨提取液 100 μl 共 3 次,第 9、11、13 天注射 4 000 U/ml 屋尘螨提取液 50 μl 共 3 次;腹腔注射组第 1、8 天,腹腔注射含 2% 氢氧化铝的屋尘螨提取液 100 μl(2 000 U/ml)共 2 次。4 组均于第 15、16、17 天,每天用 0.3% 戊巴比妥 0.3 ml 腹腔注射麻醉小鼠后,用4 000 U/ml 屋尘螨提取液 50 μl/次缓慢滴鼻,1 次/d。对照组步骤同加强组,但滴入和注射的是相同量的 0.1 mol/L PBS。最后 1 d 滴鼻后 24 h 进行以下步骤。

1.4　支气管肺泡灌洗液回收

0.3% 戊巴比妥 0.3 ml 腹腔注射麻醉动物后,眼底动脉放血处死。打开胸腔,结扎右主支气管。以眼科剪在气管上剪一斜口,插管,0.1 mol/L PBS 0.3 ml/次冲洗,灌洗 2 次,灌洗液回收率 > 80%。

1.5　灌洗液细胞涂片的制作、细胞计数和分类

肺泡灌洗液(BALF)离心(800 r/min) 10 min,收集的上清移至另一干净 Eppendorf 管中,-70 ℃保存,准备测定 IL-4、IL-5、IL-2 和 IFN-γ,细胞沉淀用 1 ml PBS 重悬,取少许用于细胞计数,算出每毫升的细胞数。余液再次离心后弃上清,用少许 PBS 重悬后涂片,空气中晾干后放于固定液(50% 乙醚和 50% 乙醇)固定过夜。次日冲洗后常规 HE 染色,光学显微镜下进行细胞分类,数 200 个细胞,求出百分比。用所得的细胞总数乘以百分比即得各分类细胞的绝对计数。

1.6　肺的病理组织学检查

取小鼠右肺组织放入 4% 多聚甲醛液固定过夜。常规取材后,进行梯度酒精脱水,组织透明处理,浸蜡,石蜡包埋切片,HE 染色,光镜下观察肺组织嗜酸性粒细胞(EOS)浸润,水肿和气道上皮损伤情况,根据文献[3]的标准进行评分。

1.7　BALF 中的 IL-4、IL-5 和 IFN-γ 含量的测定

冰冻保存的 BALF 重新溶解,各取 100 μl,分别测定其中 IL-4、IL-5 和 IFN-γ 的浓度,按 ELISA 试剂盒说明书进行测定。

1.8　统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,病理计分采用中位数(全距)表示,各组间比较采用 SPSS 软件进行独立样本的 t 检验。

2　结果

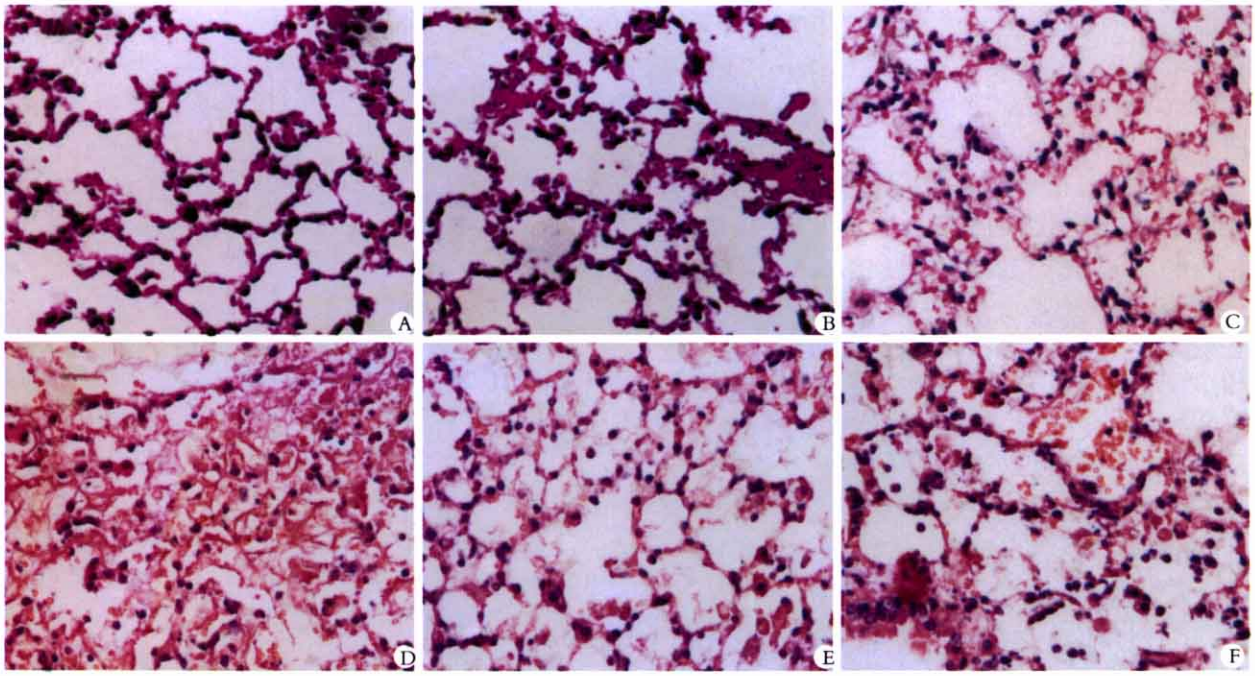
2.1　肺组织病理学变化

肺组织主要病理改变:C57BL/6 加强组小鼠小支气管、血管粘膜下和周围肺组织有明显的炎症细胞(以嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞为主)浸润,大量炎症细胞向小支气管和血管迁移,上皮细胞部分有脱落,部分可见粘液栓,血管壁明显水肿。C57BL/6 常规组可见炎细胞浸润,嗜酸性粒细胞较加强组明显减少,而 BALB/c 加强组和 BALB/c 腹腔注射组可见炎细胞浸润,嗜酸性粒细胞较少,偶尔可见,2 对照组均未见明显炎细胞浸润及明显炎性改变,见表 1、图 1 。

表 1　尘螨致敏小鼠肺组织炎症病理计分

Tab 1　Histopathological scores of murine allergic pulmonary inflammation sensitized/challenged by house clust mite extract

	Group	Perivascular eosinophilia	Peribronchiolar eosinophilia	Epithelial edema	Epithelial damage
BALB/c	Control	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)
	Conventional	1(0-1)	0(0-0)	0(0-0)	1(0-1)
	Intensified	2(1-2)	1(0-1)	1(0-1)	2(1-2)
C57BL/6	Control	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)
	Conventional	1(1-2)	2(1-2)	2(2-3)	2(2-4)
	Intensified	5(4-6)	4(4-5)	3(3-4)	5(4-5)



A: BALB/c control group without inflammatory cells infiltrated into the lung; B: C57BL/6 control group without inflammatory cells infiltrated into the lung; C: BALB/c conventional group with very few inflammatory cells and eosinophils in the lung; D: C57BL/6 conventional group with the eosinophils seen occasionally; E: BALB/c intensified group with a few eosinophils in the lung; F: C57BL/6 intensified group with more eosinophils in the lung

图1 以尘螨提取液致敏/激发的小鼠过敏性肺部炎症的病理改变 (HE×400)

Fig 1 Histopathological changes of murine allergic pulmonary inflammation sensitized/challenged by mite extract (HE×400)

2.2 BALF 细胞学改变

BALB/c 小鼠中,常规组 BALF 淋巴细胞计数与对照组的小鼠无显著差异,而单核巨噬细胞较对照组有所增加,细胞计数中偶可见嗜酸性粒细胞;加强组 BALF 中细胞总数、淋巴细胞、单核细胞均较对照组明显增加,EOS 亦偶见,与常规组嗜酸性粒细胞相比无显著差异,见表2。

C57BL/6 小鼠中,其常规组、加强组 BALF 细胞总数、淋巴细胞计数、单核巨噬细胞计数及嗜酸性粒细胞计数均较对照组显著增加。与常规组相比,加强组小鼠各细胞增加更为显著,见表2。

在两种不同种系动物之间进行比较可见 C57BL/6 小鼠无论采用何种方法进行致敏/激发,均较 BALB/c 小鼠有更强的肺部嗜酸性粒细胞性炎症。

表2 尘螨致敏小鼠 BALF 中的细胞总数和分类计数的变化($n=7$, $\bar{x}\pm s$, $\times10^5$/L)

Tab 2 Cell count of BALF from the mice sensitized by house dust mite extract ($n=7$, $\bar{x}\pm s$, $\times10^5$/L)

Group		Total cells	Lymphocyte	Mononuclear macrophage	Eosinophil
BALB/c	Control	3.386±0.907	1.739±0.64	0.056±0.027	0
	Conventional	4.231±1.3	2.115±0.787	0.136±0.068 *	0.05±0.023 **
	Intensified	6.113±0.885 **#	3.094±0.487 **#	0.223±0.092 **#	0.057±0.017 **
C57BL/6	Control	3.521±0.817	1.74±0.335	0.067±0.027	0
	Conventional	6.277±1.312 *	3.526±1.051 **$	0.299±0.092 **$	1.956±0.543 **$$
	Intensified	9.481±2.906 **$	4.787±2.321 **	1.566±0.835 **##$	3.997±1.966 **$$

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$, *vs* conventional; $: $P<0.05$, $$: $P<0.01$, *vs* BALB/c

2.3 BALF 中 IL-4、IL-5 和 IFN-γ 的含量测定

在两种小鼠中,其常规致敏组和加强组 BALF 中 IL-4 和 IL-5 含量均较对照组显著增高,而 IFN-γ 的含量较对照组则显著降低,这种变化以加强组更为明显,提示在两种小鼠中以两种方法进行致敏/激发均可诱导肺部细胞因子增呈 Th2 型反应。而在两种小鼠中进行比较,可以发现以 C57BL/6 小鼠变化更为显著(表3)。

表3 尘螨致敏小鼠的 BALF 的 IL-4、IL-5 和 IFN-γ 的含量变化($n=7$, $\bar{x}\pm s$, $\times10^5$/L)

Tab 3 IL-4, IL-5 and IFN-γ levels in BALF from mice sensitized by house dust mite extract ($n=7$, $\bar{x}\pm s$, $\times10^5$/L)

Group	n	IL-4	IL-5	IFN-γ
BALB/c	Control	56.772±18.683	9.644±3.721	709.299±162.469
	Conventional	79.757±13.332 *	16.541±4.65 *	493.091±85.351 *
	Intensified	109.278±21.062 **#	25.024±7.399 **#	353.787±103.107 **#
C57BL/6	Control	53.683±19.426	12.429±4.21	578.513±243.582
	Conventional	119.174±38.319 *$	25.777±5.98 *$	350.464±71.202 *$
	Intensified	194.739±66.005 **#$	49.131±18.253 **#$	192.501±59.373 **##$

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$, *vs* conventional; $: $P<0.05$, *vs* BALB/c

3 讨论

哮喘病理改变主要有:①粘膜上皮组织中嗜酸性

粒细胞、淋巴细胞等炎症细胞浸润。②支气管内膜纤毛细胞受损或坏死、上皮脱落。③支气管粘膜水肿和充血及气道粘膜腔中大量分泌物和粘液存留,可伴有气管平滑肌重塑,粘液腺化生和粘膜下腺体增生。在发病的过程中,起主要作用的是 T 淋巴细胞[5,6],其中细胞因子呈现 Th2 型的免疫应答,来源于 Th0、Th2、肥大细胞和嗜酸性粒细胞等的 IL-4 对 Th2 型细胞的分化和抑制 Th1 型应答起着关键的作用,它在哮喘的发病中表达升高,导致了 B 细胞合成 IgE 的增加、嗜酸性粒细胞的聚集和 Th2 型类别转换。

尘螨是引起哮喘发病的主要过敏原之一,因此复制尘螨模型在哮喘的研究中非常重要,采用尘螨诱发的哮喘模型能够更好地反映人体的哮喘情况。目前屋尘螨哮喘模型的制作多采用 Clarke 等[7]的方法,亦有采用雾化吸入方法制作[8],但国内郝敏麒等[9]报道,单纯采用 Clarke 等的方法并不能制出满意的屋尘螨致敏小鼠肺变态反应模型,其原因可能在于 Clarke 等采用的是纯化的 Der p1 抗原,而国内经常使用的是屋尘螨提取液,其成份较为复杂。雾化吸入哮喘模型由于使用的抗原较多,而屋尘螨难以获得,比较珍贵,故难以采用。本研究对国内外经常使用的两种小鼠 BALB/c 和 C57BL/6 使用屋尘螨提取液,通过皮下注射后反复进行腹腔注射致敏,并用多次滴鼻的方法成功使用尘螨提取液制作出小鼠的肺部炎症模型。表现为小鼠的 BALF 中的细胞总数和 EOS 均明显增多,气管和血管粘膜下和周围明显的嗜酸性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞浸润。部分肺组织也可见炎症细胞的浸润,并可见充血、水肿和气道上皮的脱落,部分可见粘液栓。对 BALF 中 IL-4、IL-5 和 IFN-γ 的测定表明:IL-4、IL-5 明显升高,而 IFN-γ 则显著降低,表现 Th2 型细胞因子占优势。证实我们成功构建了屋尘螨致敏的 C57BL/6 小鼠肺部变应性炎症模型。其病理变化和人类变应性哮喘的病理特征以及 Clarke 等报道的哮喘动物模型特征基本相符。而在两种小鼠中,C57BL/6 小鼠表现出浸润至肺部的嗜酸性粒细胞更高,产生的 IL-4 和 IL-5 水平也更高。众所周知,IL-4 和 IL-5 在嗜酸性粒细胞浸润至肺部中起着重要作用。IL-4 通过诱导 VCAM-1 表达而引起嗜酸性粒细胞的转内皮迁移[10]。IL-5 则强烈地促进嗜酸性粒细胞的成熟、粘附和活化[11,12]。另外这些细胞因子对嗜酸性粒细胞的趋化性和活化导致了嗜酸性粒细胞相关粒蛋白,如主要碱性蛋白(MBP)、ECP 和神经源性毒素(EDN)的释放,并随后发生炎症反应和组织损伤在局部的播散。这些结果表明,嗜酸性粒细胞浸润是由 IL-4 和 IL-5 所引起,与 BALB/c 相比,在 C57BL/6 小鼠肺部所观察到的更高的嗜酸性粒细胞浸润可能是由肺组织局部更高的 IL-4 和 IL-5 产生所引起。我们的结果也与以卵蛋白致敏哮喘模型所获得的结果一致[13,14]。

我们的结果表明,使用屋尘螨提取液进行皮下注射后反复多次进行腹腔注射进行致敏,继而以滴鼻的方式进行激发可以成功复制屋尘螨过敏哮喘小鼠模型,其中 C57BL/6 较 BALB/c 更易于诱发哮喘肺部炎症。

参考文献:

[1] Bosquet J, Jeffery P K, Busse W W, *et al*. Asthma: From bronchoconstriction to airway inflammation and remodeling[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 161(5): 1720 - 1745.

[2] Bochner B S, Busse WW. Allergy and asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2005, 115(5): 953 - 959.

[3] Gehring U, Heinrich J, Jacob B, *et al*. Respiratory symptoms in relation to indoor exposure to mite and cat allergens and endotoxins. Indool factors and genetics in asthma (INGA) study group[J]. Eur Respir J, 2001, 18(3): 555 - 563.

[4] Bousquet J. Global initiative for asthma (GINA) and its objectives [J]. Clin Exp Allergy, 2000, 30 (Suppl 1): 2 - 5.

[5] Herrick C A, Bottomly K. To respond or not to respond: T cells in allergic asthma[J]. Nat Rev Immunolo, 2003, 3(5): 405 - 412.

[6] Lazaar A L, Panettieri R A. Pathogenesis and treatment of asthma: recent advances. Drug Discovery Today: Disease Mechanisms [J]. 2004, 1(1): 111 - 116.

[7] Clarke A H, Thomas W R, Rolland J M, *et al*. Murine allergic respiratory responses to the major house dust mite allergen Der p 1[J]. Int Arch Allergy Immunol, 1999, 120(2): 126 - 134.

[8] Tournoy KG, Kips JC, Schou C, *et al*. Airway eosinophilia is not a requirement for allergen-induced airway hyperresponsiveness[J]. Clin Exp Allergy, 2000, 30(1): 79 - 85.

[9] 郝敏麒, 徐　军, 钟南山. 尘螨致敏小鼠肺部变应性炎症模型的建立[J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(1): 139 - 141.

[10] Dearman R J, Humphreys N, Skinner R A, *et al*. Allergen-induced cytokine phenotypes in mice: role of CD4 and CD8 T cell populations [J]. Clin Exp Allergy, 2005, 35(4): 498 - 505.

[11] Ciprandi G, Marseglia G L, Klersy C, *et al*. Relationships between allergic inflammation and nasal airflow in children with persistent allergic rhinitis due to mite sensitization[J]. Allergy, 2005, 60(7): 957 - 960.

[12] Liu C F, Chen Y L, Shieh C C, *et al*. Therapeutic effect of surfactant protein D in allergic inflammation of mite-sensitized mice[J]. Clin Exp Allergy, 2005, 35(4): 515 - 521

[13] Morokata T, Ishikawa J, Ida K, *et al*. C57BL/6 mice are more susceptible to antigen-induced pulmonary eosinophilia than BALB/c mice, irrespective of systemic T helper 1/T helper 2 responses[J]. Immunology, 1999, 98(3): 345 - 351.

[14] Takeda K, Haczku A, Lee J J, *et al*. Strain dependence of airway hyperresponsiveness reflects differences in eosinophil localization in the lung[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001, 281(2): L394 - L402.

(编辑　王　红)