文章编号:1000-5404(2008)21-2055-03

论著

肥胖哮喘动物模型的建立

夏 宇,黄 英,袁红欣,王模奎,娄小丽 (重庆医科大学附属儿童医院呼吸中心,重庆 400014)

摘 要:目的 探索在高脂饲料诱导肥胖基础上建立哮喘动物模型,并对模型进行评估。**方法** 40只清洁级雌性3周断乳C57BL/6J小鼠按随机数字表法分为4组,每组10只。分别进行普通饲料喂养+NS致敏激发(A组);普通饲料喂养+OVA致敏激发(B组);高脂饲料喂养+NS致敏激发(C组);高脂饲料喂养+OVA致敏激发(D组),比较各组肥胖和哮喘评价指标。**结果** ①C、D组体质量、体长、Lee's指数、肝脏质量、肝脏/体质量均明显大于A、B组($P<0.05$)。②A、C组小鼠肺组织无炎症改变,B、D组炎症浸润明显,其中D组更甚。③支气管肺泡灌洗液细胞总数、嗜酸性粒细胞比例D组明显高于各组,B组明显高于A组($P<0.05$)。④B、D组支气管肺泡灌洗液中IL-4分别较A、C组明显升高($P<0.05$),IFN-γ则明显降低($P<0.05$),D组IL-4/IFN-γ明显高于B组($P<0.05$)。**结论** 用不含致敏原的自制高脂饲料喂养,采用OVA致敏、激发C57BL/6J小鼠成功建立了肥胖哮喘模型。

关键词: 肥胖;哮喘;动物模型
中图法分类号: R-332; R562.25; R589.2 **文献标识码:** A

Establishment of mouse obesity asthma model

XIA Yu, HUANG Ying, YUAN Hong-xin, WANG Mo-kui, LOU Xiao-li (Department of Respiratory Diseases, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To establish an obesity animal model in mice and evaluate the model. Methods A total of 40 clean 3-week-old weaning female C57BL/6J mice were randomly and equally divided into 4 groups. Group A were fed with normal diet food and sensitized with normal saline (NS), group B were fed with normal diet and challenged with ovalbumin (OVA). Groups C and D were fed with high fat diet and only the later received OVA challenging. Body weight, liver weight, index of liver/body weight, Lee's index, lung morphology, cell number of bronchoalveolar lavage fluid, concentration of IL-4 and IFN-γ were measured or calculated. Results (1) The body weight, liver weight, index of liver/body weight, Lee's index of group C and D were significantly higher than those of group A and B. (2) Local inflammation was significant in groups B and D, with the later more serious. (3) Total cell count and ratio of eosinophil of bronchoalveolar lavage fluid were highest in group D followed by group B and group A. (4) Groups B and D had a higher concentration of IL-4 and lower level of IFN-γ in comparison with group A and C, and the ratio of IL-4/IFN-γ was higher in group D than group B. (5) Two mice respectively from groups C and D had not meet the obesity criterion before challenge, and the other 2 mice from group B and D respectively died during challenge, so they were excluded in this study. Conclusion Mouse obesity asthma animal model can be established in C57BL/6J mice by feeding with self-made high fat food and sensitized and provocated by OVA.

Key words: obesity; asthma; animal model

近年肥胖在哮喘发生、发展中的作用逐渐受到重视[1,2],2006版GINA将其列为哮喘的独立危险因素之一。但人类肥胖和哮喘发生的自然过程长,且不便观察,使得以人为研究对象受到很大限制。国外采用基因缺陷或高脂饮食诱导的肥胖小鼠来建立哮喘模型以进行相关研究[3]。但人类多为单纯性肥胖,前者有一定局限,而后者所用纯化配方饲料造价高[4]。国内虽有肥胖、哮喘各自的动物模型,但尚无肥胖、哮喘一体的动物模型。本研究采用不含致敏原的自制高脂饲料喂养、卵清蛋白(ovalbumin,OVA)致敏激发C57BL/

基金项目:"十一五"国家科技支撑计划(2007BA124B05)
Supported by the Supporting Project of "the Eleventh Five-year Plan" of China (2007BA124B05)
作者简介:夏 宇,女,重庆市人,硕士研究生,医师,主要从事儿童哮喘发病机制方面的研究。电话:(023)63624074,E-mail:xiayu790921@sina.com
通信作者:黄 英,电话:(023)63624074,E-mail:huangying62@126.com
收稿日期:2008-02-29;修回日期:2008-03-30

6J小鼠,对建立肥胖哮喘动物模型的方法进行了探索,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂

PARIBOY高频雾化器(CE,German),电子称(Pharmacia Biotech),Model550酶联分析仪(Bio-Rad),卵清蛋白OVA(Grade Ⅲ、Ⅴ,Sigma),分析纯硫酸铝钾(重庆北碚生化试剂厂),mlL-4 ELASA Kit、mlIFN-γELASA Kit(北京晶美生物工程有限公司)。

1.2 动物来源及管理

清洁级近交系雌性,3周断乳C57BL/6J小鼠购于重庆医科大学实验动物中心,按清洁级饲养。饲养于专用独立送风隔离笼具内,保持恒定温度,过滤空气,湿度55%~65%,光照10~12 h/d,饲料和水皆经紫外线消毒处理,操作于超净台内进行。

1.3 方法

1.3.1 动物分组 40只C57BL/6J小鼠,体质量(6.31±0.25)g,按随机数字表法分为4组:A组,普通饲料+生理盐水(NS)致敏激发组;B组,普通饲料+OVA致敏激发组;C组,高脂饲料+NS致敏激发组;D组,高脂饲料+OVA致敏激发组。每组10只。

1.3.2 饲料 为不含致敏原的普通饲料和不含致敏原的高脂饲料。不含致敏原的普通饲料配方为:玉米0.3 kg,麦麸0.2 kg,次粉0.2 kg,豆柏0.15 kg,鱼粉0.15 kg,骨粉0.02 kg,酵母0.05 kg,菜油0.01 kg,维生素A 0.01 kg,盐0.01 kg,每10千克供能118.92 kJ,其中脂肪占13.8%。不含致敏原的高脂饲料配方为:麦麸0.1 kg,次粉0.2 kg,豆柏0.2 kg,鱼粉0.2 kg,骨粉0.2 kg,菜油0.01 kg,猪油0.2 kg,维生素A 0.01 kg,盐0.01 kg,维生素E 60 U,每10千克供能166.06 kJ,其中脂肪占53.0%。

1.3.3 实验步骤 各组小鼠分笼饲养,自由摄食和取水。A、B组采用不含致敏原的普通饲料喂养,C、D组采用不含致敏原的高脂饲料喂养,至第12周时淘汰C、D组中不满足肥胖标准小鼠,肥胖标准为体质量较普通饲料喂养(A、B组)平均体质量还高20%以上。然后参照李睿等[5]报道的方法对B、D组用OVA进行致敏及激发,对A、C组以生理盐水代替致敏液和激发液,部位及注射剂量、激发时间与B、D组相同。

1.3.4 动物处置 末次激发结束24 h内2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠,测量小鼠体长(鼻尖至肛门的距离),计算Lee's指数[体质量$^{1/3}$×1 000/体长(cm)]。小鼠仰卧,分离颈部组织,暴露气管,结扎左测气管,22号留置针行气管插管,37 ℃生理盐水0.5 ml缓慢注入,保留片刻后回收,灌洗2次,混合置于EP管中,用细胞计数板计数细胞总数后800×g离心5 min,收集上清,ELISA法测IL-4及IFN-γ。细胞沉渣悬浮后吸取悬浮液涂片,瑞氏染色后计数200个细胞中各种炎症细胞比例。摘取左肺,投入多聚甲醛中固定,石蜡包埋制作切片,并进行HE染色。打开腹腔,取出肝脏,生理盐水冲洗干净后滤纸吸干,电子称称肝脏质量。

1.4 统计方法

数据均以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 10.0统计软件,多组间比较采用SNK-q方差分析。

2 结果

2.1 肥胖评价指标

2.1.1 体质量 实验第1天A、B、C、D各组小鼠体质量分别为(6.31±0.33)、(6.41±0.22)、(6.27±0.14)、(6.33±0.20)g,组间差异无统计学意义($P>0.05$);自实验第5周起C、D组体质量增长速度较A、B组明显加快,实验第12周(致敏前)时各组小鼠体质量分别为(23.55±0.74)、(23.67±0.72)、(32.63±0.93)、(32.44±0.96)g,C、D组体质量较A、B组平均体质量高20%以上,达肥胖标准。实验第16周(激发后)各组体质量分别为(24.99±0.78)、(24.87±0.72)、(35.80±0.67)、(35.28±1.18)g,C、D组体质量仍较A、B组平均体质量高20%以上。

2.1.2 Lee's指数与肝脏质量 A、B组间体长、Lee's指数、肝脏质量、肝脏/体质量无明显差异($P>0.05$);C、D组间体长、Lee's指数、肝脏质量、肝脏/体质量无明显差异($P>0.05$),但均显著高于A、B组($P<0.05$)。见表1。

表1 各组小鼠Lee's指数与肝脏质量($\bar{x}\pm s$)

组别	n	体长(cm)	Lee's指数	肝脏质量(g)	肝脏/体质量
A组	10	8.60±0.16	338.60±6.52	1.39±0.04	5.56±0.05
B组	9	8.70±0.10	337.11±6.45	1.39±0.03	5.58±0.05
C组	9	9.1±0.13^{ab}	361.67±5.79^{ab}	2.04±0.05^{ab}	5.71±0.04^{ab}
D组	8	9.1±0.18^{ab}	359.25±9.62^{ab}	2.02±0.06^{ab}	5.72±0.04^{ab}

a:$P<0.05$,与A组比较;b:$P<0.05$,与B组比较

2.2 哮喘评价指标

2.2.1 哮喘急性发作症状 B、D组所有小鼠在雾化过程中出现不同程度的烦躁不安或安静少动、呼吸加快、点头呼吸、弓背直立、前肢缩抬、大小便失禁等哮喘速发相表现,A、C组小鼠活动自如,无上述表现。

2.2.2 肺组织病理损害 A、C组小鼠细支气管和肺泡清晰,无炎症细胞浸润;B组细支气管周围炎症细胞浸润明显,黏膜皱襞减少,平滑肌及基底膜增厚;D组炎症改变更甚,炎症细胞浸润更明显,黏膜及平滑肌断裂,肺泡不同程度融合。

2.2.3 支气管肺泡灌洗液中细胞总数及炎性细胞分类 细胞总数、嗜酸性粒细胞比例D组明显高于各组($P<0.05$);B组明显高于A组($P<0.05$)。见表2。

2.2.4 支气管肺泡灌洗液中细胞因子水平检测 B、D组IL-4分别较A、C组明显升高($P<0.05$),IFN-γ明显降低($P<0.05$),IL-4/IFN-γ明显升高($P<0.05$),其中D组IL-4/IFN-γ较B组更高。见表3。

表2 支气管肺泡灌洗液中白细胞总数及炎性细胞分类($\bar{x}\pm s$)

组别	n	细胞总数(×10^4/ml)	巨噬细胞(/200个)	淋巴细胞(/200个)	中性粒细胞(/200个)	嗜酸性粒细胞(/200个)
A组	10	12.00±1.56	145.30±7.44	37.90±5.38	15.60±3.37	1.20±1.22
B组	9	182.78±17.04^{a}	65.44±4.70	47.56±3.75	10.33±1.22	76.78±3.70^{a}
C组	9	16.56±5.13	142.22±6.00	44.78±5.81	11.44±1.51	1.56±1.13
D组	8	268.00±16.31^{abc}	17.25±2.31	62.63±8.37	5.88±3.04	114.25±8.08^{abc}

a:$P<0.05$,与A组比较;b:$P<0.05$,与B组比较;c:$P<0.05$,与C组比较

表 3　支气管肺泡灌洗液中细胞因子水平($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-4(pg/ml)	IFN-γ(pg/ml)	IL-4/IFN-γ
A 组	10	4.81 ± 0.24	12.44 ± 1.18	0.39 ± 0.05
B 组	9	18.39 ± 0.90[a]	7.76 ± 0.77[a]	2.38 ± 0.30[a]
C 组	9	3.94 ± 0.20	12.51 ± 1.27	0.32 ± 0.04
D 组	8	21.70 ± 1.47[abc]	8.31 ± 0.59[ab]	2.62 ± 0.20[abc]

a: $P<0.05$,与 A 组比较;b: $P<0.05$,与 C 组比较;c: $P<0.05$,与 B 组比较

3　讨论

肥胖可能导致哮喘发病率增加、症状加重的观点逐渐受到重视,国外已进行了大量流行病学研究,但以人群为研究对象存在种种限制,因此诱发动物肥胖和哮喘,建立实验动物模型已成为研究的重要手段。国内尚无肥胖和哮喘一体的动物模型,且已建立的肥胖模型并不能同时满足哮喘研究的要求。因此探寻建立肥胖哮喘动物模型方法十分必要。然而建立肥胖哮喘模型需要解决 3 个关键问题:①选择兼顾 2 种疾病的动物种系;②选择恰当的肥胖模型建立方法;③在肥胖基础上诱导发生哮喘。

国内建立肥胖动物模型时多用 Sprague-Dawley(SD)和 Wistar 大鼠,但其建立的哮喘模型重复稳定性欠佳[6],而用于建立哮喘模型时常应用的 BALB/c 小鼠、Brown-Norway(BN)大鼠、豚鼠等对高脂饮食诱导的肥胖又不敏感。故本研究选用了既对高脂饲料敏感、又可用于哮喘研究的 C57BL/6J 小鼠作为建立模型的动物。考虑到雌性小鼠不仅能成功建立哮喘模型,而且较雄性动物更易出现肥胖,因此以雌性小鼠为观察对象。

目前多采用高脂饲料诱导法建立肥胖模型。国外高脂饲料多为造价较高的纯化压缩饲料,不适于国内广泛应用,而国内高脂饲料喂养 C57BL/6J 多以建立糖尿病、动脉粥样硬化模型为目的,致其肥胖的相关资料较少,且饲料配方中可能含有致敏原。本研究对自制高脂饲料喂养 C57BL/6J 小鼠进行了探索。本实验的高脂饲料中脂肪的供能超过了总能量的一半,与国外压缩纯化饲料相近,高脂饲料喂养的 19 只(1 只死亡)小鼠中,肥胖率高达 89.5%。且从市场购得猪油,加热炼成液体状添加在基础饲料中,成本低廉、配制简单,优势明显。考虑到本实验是采用刚离乳的生长期小鼠,更需注意配方中蛋白质的成分与比例,只有粗蛋白的含量大于 20% 时,才能满足其快速生长的要求[8]。因此在配方中添加了豆柏、鱼粉等蛋白质含量较高的成分保证小鼠的正常生长。本实验参照国内文献以体质量较对照组平均体质量高 20% 以上为肥胖,并综合考察 Lee's 指数、肝脏质量、肝脏/体质量等指标后高脂饲料的致肥率达 89.5%,表明肥胖模型建立成功。

虽然国内建立哮喘模型的方法已较成熟,但缺乏在肥胖基础上建立哮喘动物模型的经验。为减少干扰因素,本实验中对于体质量远高于正常对照组的肥胖小鼠在建立哮喘模型时采用了和普通体质量小鼠相同的致敏和激发剂量,且未用国外肥胖哮喘研究中用到的 O_3。为了避免动物接触环境中可能存在的微量 OVA,所有饲料均不含鸡蛋,并采用清洁级动物。结果表明肥胖小鼠经 OVA 致敏激发后有哮喘发作症状,肺病理炎症改变明显,肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞升高,并出现 TH2 优势,哮喘模型建立成功,且与单纯哮喘动物相比,肥胖哮喘小鼠上述改变更为显著,证实了肥胖哮喘间有关联,表明本模型可以用于肥胖与哮喘关系的进一步研究。

为了保证模型的建立成功,还需要注意以下几点:①高脂饲料易发软、发脆,小鼠在啃吃的过程中,浪费很大,建议配置好的饲料可适当进行烘烤,使饲料有良好的硬度,适于鼠类用饲料磨牙的习惯。②配方中部分成分(如骨粉、菜油)含量少,不易混合均匀,可能导致动物摄入差别,从而造成同一组内体质量差异大,在混合时可采用"逐步混合法。③高脂饲料可能导致小鼠的维生素缺乏,出现脱毛、毛色变红等现象,在其饮用水中加入复合维生素可改善。

本实验选择兼顾哮喘、肥胖 2 种疾病的动物种系,采用自制高脂饲料建立了肥胖小鼠模型,并在其基础上用 OVA 致敏激发诱导哮喘,成功建立了肥胖哮喘模型。本方法经济成本低,可操作性强,可以在国内的相关研究中运用,为进一步进行肥胖与哮喘相关机制研究提供基础。

参考文献:

[1] Hilda-Segura N, Hernandez L, Velazquez C, *et al*. Asthma and obesity: related inflammatory diseases[J]. Rev Alerg Mex, 2007, 54(1): 24 - 28.

[2] 夏　宇,黄　英. 肥胖与哮喘研究进展[J]. 国际呼吸杂志, 2007, 27(11): 866 - 869.

[3] Johnston R A, Zhu M, Rivera-Sanchez Y M, *et al*. Allergic airway responses in obese mice[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2007, 176(7): 650 - 658.

[4] Boulet L P, Hamid Q, Bacon S L, *et al*. Symposium on obesity and asthma November 2, 2006[J]. Can Respir J, 2007, 14(4): 201 - 208.

[5] 李　睿,刘恩梅,杨锡强,等. 不同饲养环境、种属、佐剂及激发方法对小鼠哮喘炎症的影响[J]. 重庆医学, 2006, 35(1): 43 - 44.

[6] 施焕中. 正确认识和合理应用支气管哮喘的动物模型[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2005, 28(11): 749 - 750.

[7] 钱伯初,史　红,吕燕萍. 肥胖动物模型的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2007, 16(15): 1159 - 1162.

[8] 李　媛,王保芝,岂春晓,等. 一种新的肥胖大鼠模型的制备方法[J]. 河北医科大学学报, 2005, 26(4): 305 - 307.

(编辑　汪勤俭)