论著

文章编号:1000-5404(2010)19-2098-03

葎草花粉特异性致敏哮喘动物模型的制备

王胜昱[1],王丽娜[1],曹博淦[1],孙秀珍[2],兀 威[1],陈 晖[1],刁 鑫[1],刘延峰[1],牟 建[1] (710077 西安,西安医学院附属医院呼吸内科[1];710062 西安,西安交通大学第二附属医院呼吸内科[2])

【摘要】 目的 建立葎草花粉粗浸液诱导的小鼠变态反应气管炎症动物模型。方法 制备葎草花粉粗浸液,将40只清洁级雌性BALB/c小鼠按随机数字表法分为4组,每组10只。①空白对照组:PBS+氢氧化铝致敏激发;②低剂量组:100 μg葎草粗浸液+氢氧化铝致敏激发;③中剂量组:200 μg葎草粗浸液+氢氧化铝致敏激发;④高剂量组:300 μg葎草粗浸液+氢氧化铝致敏激发。通过HE染色观察小鼠肺部炎症和黏液分泌,支气管肺泡灌洗液中细胞总数和细胞分类,酶联免疫吸附试验检测BALF,脾组织匀浆上清的IL-4、IFN-γ和血清抗原特异的抗体验证哮喘动物模型。结果 随着抗原浓度的升高,肺部病理改变呈明显的变态反应炎症;高剂量组小鼠支气管肺泡灌洗液中的细胞总数为(210.75±78.80)×10^6/L、巨噬细胞数为(48.65±3.27)%、EOS数为(24.37±4.28)%、IL-4、血清抗原特异性IgE抗体、IgG1抗体明显高于空白对照组($P<0.05$);支气管肺泡灌洗液、脾组织匀浆上清的IFN-γ较空白对照组下降($P<0.05$)。结论 葎草花粉成功构建小鼠变态反应气道炎症动物模型。

【关键词】 哮喘/化学诱导;葎草;模型;小鼠
【中图法分类号】 R-332;R562.25;R593.1 【文献标志码】 A

Establishment of allergic mouse asthma model with *Humulus pollen* allergen

Wang Shengyu[1], Wang Lina[1], Cao Bogan[1], Sun Xiuzhen[2], Wu Wei[1], Chen Hui[1], Diao Xin[1], Liu Yanfeng[1], Mou Jian[1] ([1]Department of Respiratory Medicine[1], Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an, Shannxi Province, 710077; [2]Department of Respiratory Medicine, Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shannxi Province, 710062, China)

【Abstract】 Objective To establish the allergic trachitis model of mice with *Humulus pollen* allergen infusion. Methods *Humulus pollen* allergen infusion was prepared. Forty clean and female BALB/c mice were randomly divided into blank control group sensitized with PBS + aluminium hydroxide, low dose group sensitized with 100 μg *Humulus pollen* allergen infusion + aluminium hydroxide, medium dose group sensitized with 200 μg *Humulus pollen* allergen infusion + aluminium hydroxide, and high dose group sensitized with 300 μg *Humulus pollen* allergen infusion + aluminium hydroxide, 10 mice in each group. After lung tissue samples from mice were stained with haematoxylin and eosin (H&E), inflammation and mucus secretion were observed, total number of cells in alveoli lavage solution and their composition were calculated, BALF, IL-4, IFN-γ, IgE and IgG1 in homogenate supernatant of splenocytes were assayed by enzyme-linked immunoassay (ELISA). Results Allergic inflammation aggravated with the increasing concentration of allergen. The total number of cells, macrophages, and EOS in alveoli lavage solution was (210.75±78.80)×10^6/L, 48.65%±3.27%, and 24.37%±4.28%, respectively. The serum levels of IL-4, IgG1 and IgE were significantly higher in low, medium and high dose groups than in blank control group ($P<0.05$). However, the IFN-γ level in alveoli lavage solution and homogenate supernatant of splenocytes was lower in low, medium and high dose groups than in blank control group ($P<0.05$). Conclusion *Humulus pollen* allergen infusion can be used in establishing the allergic trachitis model of mice.

【Key words】 chemically induced asthma; *Humulus album*; modela; mouse

Corresponding author: Wang Shengyu, Tel: 86-29-84278403, E-mail: wangshengyu@yeah.net

全球许多国家和地区哮喘的患病率和病死率均呈上升趋势,加强哮喘发病机制及诊治方法的研究具有深远意义。目前认为支气管哮喘是由多种细胞和细胞组分共同参与的气道慢性炎症,血清总IgE水平与哮喘的严重程度和气道高反应性相关[1]。支气管哮喘的发病机制复杂,并且相关研究涉及到人体时会受到种种限制,因此有关病因的确定、发病机制的探索、新治疗方法的评价、新药的研究与开发在相当程度上均需要通过动物实验进行,故制备哮喘动物模型可在一

【通信作者】 王胜昱,电话:(029)84278403,E-mail:wangshengyu@yeah.net

定程度上达到研究目的[2]。

花粉与草粉是最常见的引起哮喘发作的室外变应原。我国东部地区主要为豚草花粉,北部主要为蒿草类。孙秀珍等[3]十多年对西安地区气传致敏花粉调查研究及变态反应临床实践发现变态反应性疾病患者葎草花粉过敏原皮肤试验、sIgE 阳性率达 50% 以上,提示葎草花粉是西北地区最主要的气传致敏原之一。本研究构建葎草花粉致敏的哮喘动物模型,旨在为今后研究葎草花粉过敏性哮喘的发病机制和探索新的治疗手段打下基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

清洁级健康 BALB/c 小鼠 40 只,3 ~ 4 周龄,雌性,体质量(16 ± 2)g,购于西安交通大学医学院实验动物中心,按随机数字表法分为空白对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组,每组 10 只,并用苦杏仁酸标记。氢氧化铝凝胶由本实验室自制;IL-4、IFN-γ、IgE、IgG1(ELISA)检测试剂盒购于西安沃尔森生物技术有限公司。

1.2 葎草花粉粗浸液的制备和浓度测定

将从自然界采摘的葎草花粉经过去脂、提取、过滤与分离、透析浓缩、酸碱度校正、除菌过滤等步骤[4]制备成葎草花粉粗浸液,用 Bradford 法[5]检测浓度为 0.952 mg/ml,冷藏备用。

1.3 葎草花粉粗浸液诱导小鼠肺部变态反应模型的建立

空白对照组腹腔注射 PBS 100 μl 加氢氧化铝 2 mg,低剂量组腹腔注射 100 μg 葎草粗浸液 + 氢氧化铝 2 mg 致敏,中剂量组腹腔注射 200 μg 葎草粗浸液 + 氢氧化铝 2 mg 致敏,高剂量组腹腔注射 300 μg 葎草粗浸液 + 氢氧化铝 2 mg 致敏。第 9、17 天后加强致敏方法,剂量同前。在第 25 天空白对照组用 PBS 代替变应原滴鼻激发,低剂量组采用 100 μg 葎草变应原激发,中剂量组采用 200 μg 葎草变应原激发,高剂量组采用 300 μg 葎草变应原激发,每天 1 次,连续 3 d。最后 1 d 滴鼻后 24 h 取血,采用 ELISA 测定血清特异的 IgE 和 IgG1。观察肺泡灌洗液(BALF)中细胞总数和细胞分类。ELISA 测定 BALF 上清中的 IL-4、IFN-γ。肺脏进行 HE 染色。脾组织匀浆 IL-4 和 IFN-γ 的产生:将处死的免疫小鼠浸入 75% 乙醇中消毒 2 ~ 3 s,置超净台,再次局部消毒皮肤,无菌条件下摘脾,并依次在 4 ℃条件下研磨、PBS 冲洗、用 RIPA 裂解液裂解,并在 4 ℃下 4000 r/min 离心 10 min,取匀浆液上清。用 ELISA 方法测定 IL-4 和 IFN-γ,方法同前。

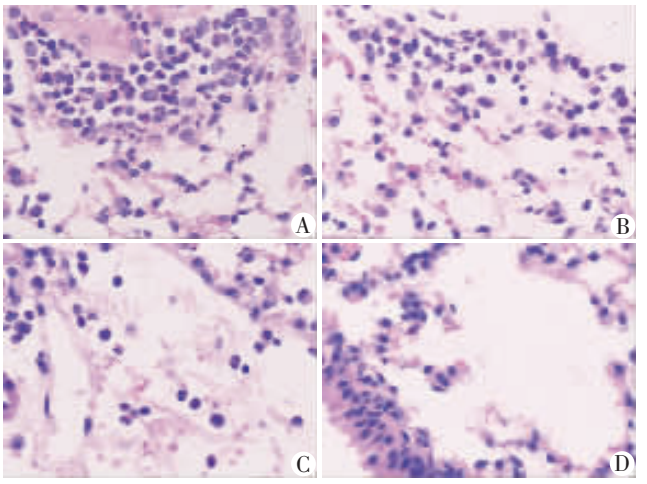
1.4 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件进行独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 病理变化

小鼠肺组织炎症病理评分按低、中、高剂量组依次增高。低、中、高剂量组与空白对照组比较,血管周围和气管周围存在明显的炎症细胞浸润。高剂量组小鼠支气管、血管黏膜下和周围肺组织有明显的炎症细胞浸润,以巨噬细胞和嗜酸性粒细胞为主,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,肺泡内有水肿,且有黏液上皮化生。中、低剂量组中炎性细胞数量及其分类明显低于高剂量组。而空白对照组气管结构无明显改变,小鼠支气管黏膜上皮、黏膜肌层基本完好,支气管管腔规则,周围基本无炎症细胞浸润(图 1)。



A:高剂量组;B:中剂量组;C:低剂量组;D:空白对照组

图 1 不同剂量葎草花粉粗浸液致敏小鼠与对照组肺组织病理观察 (HE ×400)

2.2 BALF 中细胞学变化

BALF 以巨噬细胞为主,低、中、高剂量组中细胞总数、嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞、巨噬细胞及淋巴细胞比例均明显高于空白对照组($P < 0.05$),表明葎草花粉可诱导气管炎症反应。见表 1。

表 1 肺泡灌洗液中细胞学改变($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞总数 ($\times 10^6$/L)	嗜中性粒细胞 (%)	淋巴细胞 (%)	巨噬细胞 (%)	嗜酸性粒细胞 (%)
空白对照组	23.67 ± 2.81	2.23 ± 0.58	4.27 ± 1.23	93.25 ± 4.28	0.25 ± 0.13
低剂量组	59.88 ± 13.25[a]	6.28 ± 1.26[a]	7.51 ± 2.35[a]	71.93 ± 4.89[a]	13.56 ± 2.35[a]
中剂量组	111.83 ± 11.11[a]	10.37 ± 2.18[a]	12.24 ± 1.89[a]	55.48 ± 3.67[a]	21.59 ± 3.14[a]
高剂量组	210.75 ± 78.80[a]	13.17 ± 1.78[a]	13.73 ± 1.35[a]	48.65 ± 3.27[a]	24.37 ± 4.28[a]

a:$P < 0.05$,与空白对照组比较

2.3 BALF 中 IL-4 和 IFN-γ 的测定

与空白对照组相比较,低、中、高剂量组小鼠在致敏激发后,BALF 中 IL-4 含量明显升高,而 IFN-γ 明显下降($P < 0.05$)。提示 BALF 中 Th2 型细胞因子产生,抑制 Th1 型细胞因子分泌。见表 2。

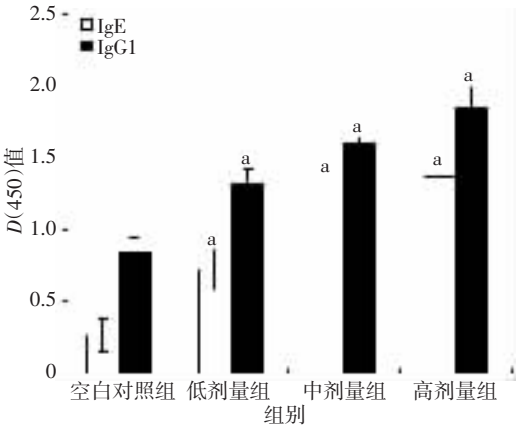
表 2 BALF、脾组织匀浆中 IL-4 和 IFN-γ 的测定(pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-4		IFN-γ	
	BALF	脾	BALF	脾
空白对照组	1.14 ± 0.42	59.28 ± 6.23	70.02 ± 3.88	735.63 ± 6.01
低剂量组	5.48 ± 1.28[a]	247.35 ± 6.99[a]	49.02 ± 5.49[a]	516.39 ± 6.72[a]
中剂量组	18.37 ± 7.54[a]	316.31 ± 1.21[a]	24.44 ± 1.33[a]	413.72 ± 8.03[a]
高剂量组	63.73 ± 3.45[a]	599.70 ± 7.38[a]	5.52 ± 2.14[a]	243.14 ± 7.13[a]

a:$P < 0.05$,与空白对照组比较

2.4 血清中特异性 IgE 和 IgG1 测定

低、中、高剂量组小鼠在致敏激发后，小鼠产生抗原特异性 IgE 和 IgG1，与空白对照组相比较有显著性差异（$P<0.05$）。说明葎草花粉粗浸液能诱导小鼠产生特异性 IgE 和 IgG1。见图2。



a：$P<0.05$，与空白对照组比较

图2 ELISA 法测定各组小鼠血清中的 IgE 与 IgG1

2.5 脾组织匀浆 IL-4 和 IFN-γ 的测定

与空白对照组相比较，低、中、高剂量组小鼠在致敏激发后，脾组织中 IL-4 含量明显升高，而 IFN-γ 明显下降（$P<0.05$）。表明葎草花粉粗浸液能诱导小鼠脾脏产生 Th2 型细胞因子，抑制 Th1 型细胞因子分泌。见表2。

3 讨论

近年来利用动物模型研究哮喘发病机制的报道越来越多，这在一定程度上反映出动物模型在哮喘研究尤其是发病机制的研究中正起着越来越重要的作用。Tsunematsu 等[6]构建西洋杉花粉模型是间隔1周腹腔注射，连续3周末次滴鼻。Chapoval 等[7]所诱发的哮喘模型是2次腹腔注射2次滴鼻。程晓明等[8]通过2次腹腔注射与雾化吸入激发构建卵清蛋白（OVA）小鼠哮喘模型。以上研究表明经腹腔和鼻腔两种途径多次注入变应原能较好地在 BALB/c 小鼠中诱发出与人类哮喘类似的迟发相反应，如气道高反应性（AHR）、气道内及气道周围嗜酸性粒细胞浸润、局部淋巴细胞表达 Th2 细胞因子增加。因此我们选择腹腔注射与滴鼻激发的方式构建模型。

BALB/c 小鼠体内能够产生针对吸入性变应原的特异性 IgE 抗体，而且也更容易诱发出哮喘症状以及明显气道炎症和气道高反应性，能够用于构建哮喘模型[9-11]。本实验通过对小鼠腹腔注射和滴鼻激发不同剂量葎草花粉粗浸液，从肺组织病理变化结果发现小鼠肺组织变态反应炎症逐渐加重，巨噬细胞和嗜酸性粒细胞随抗原剂量增加而增加，表现为气道和血管周围出现大量的炎症细胞浸润。BALF 中细胞学变化显示：小鼠 BALF 存在大量炎症细胞，巨噬细胞和嗜酸性粒细胞随抗原剂量增加而增加，其病理变化与人类过敏性哮喘的病理变化有一定相似。此外我们研究还发现个别老鼠肺部炎症反应不明显，支气管肺泡灌洗液中细胞分类嗜酸性粒细胞不高，可能与老鼠周龄在入组时偏差有关。黄华琼等[12]研究证实小鼠越在生命早期经过敏原激发，肺部炎症和气道高反应性越容易产生；而周龄过大的小鼠肺部炎症反应则不明显。

支气管哮喘的特征是 Th1 型细胞和 Th2 型细胞应答的失衡，其中 Th2 细胞起着重要作用[13]。Th1 型淋巴细胞主要分泌 IFN-γ 等细胞因子，Th2 型淋巴细胞主要分泌 IL-4、IL-5 等细胞因子。Th2 型细胞因子分泌增多，诱导嗜酸性粒细胞聚集，合成 IgE 抗体增多，使 Th1 型淋巴细胞应答受到抑制。在本研究中，高剂量组的脾组织匀浆与肺泡灌洗液中 IL-4 明显高于其他组，而 IFN-γ 却显著降低；血中特异性 IgE 和 IgG1 显著上升均表明葎草花粉粗浸液成功诱导 Th2 型淋巴细胞反应。

本实验通过制备葎草花粉粗浸液，腹腔注射与滴鼻激发两种方式成功构建 BALB/C 小鼠变态反应气道炎症动物模型，为研究葎草花粉所致过敏性哮喘的发病机制、病理生理及其免疫治疗打下基础。

参考文献：

[1] 潘开宇，徐峰，刘军. 142 例哮喘患儿严重程度与血清总 IgE 水平、过敏原特异性 IgE 的关系研究[J]. 第三军医大学学报，2009，31(23)：2326，2329.

[2] 施焕中，林江涛. 肺脏免疫学及免疫相关性疾病[M]. 北京：人民卫生出版社，2006：369.

[3] 孙秀珍，李玉馥，赵子慎. 西安地区气传致敏性花粉的初步调查[J]. 陕西医学杂志，1993，22(4)：246 - 247.

[4] 乔秉善. 变态反应学实验技术[M]. 北京：中国协和医科大学出版社，2002：9 - 25.

[5] 李海玲，彭书明，李凛，等. 4 种常用蛋白浓度测定方法的比较[J]. 中国生化药物杂志，2008，29(4)：277 - 278，282.

[6] Tsunematsu M，Yamaji T，Kozutsumi D，*et al*. Establishment of an allergic rhinitis model in mice for the evaluation of nasal symptoms[J]. Life Sci，2007，80(15)：1388 - 1394.

[7] Chapoval S P，David C S. CD28 costimulation is critical for experimental allergic asthma in HLA-DQ8 transgenic mice[J]. Clin Immunol，2003，106(2)：83 - 94.

[8] 程晓明，王长征，李淑平，等. 哮喘致敏小鼠模型的建立及脾脏 $CD4^+$ T 细胞的分离[J]. 第三军医大学学报，2001，23(3)：369 - 370.

[9] 刘素芝，刘玉丽，曹国龙，等. 哮喘动物模型免疫炎症反应发生验证的要点[J]. 中国组织工程研究与临床康复，2007，11(29)：5814 - 5816.

[10] 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.

[11] 刘传和，薛全福，陈育智. 支气管哮喘动物模型的研究状况[J]. 中华结核和呼吸杂志，2000，23(11)：647 - 649.

[12] 黄华琼，王娇莉，叶飒，等. 不同致敏和激发时间对哮喘模型的影响[J]. 中国病理生理杂志，2008，24(11)：2285 - 2288.

[13] 吴奎，孙鲲，毕玉田，等. 屋尘螨过敏原 DNA 疫苗对哮喘模型小鼠 $Foxp3^+$ 调节性 T 细胞功能的影响[J]. 第三军医大学学报，2008，30(5)：374 - 377.

（收稿：2010-04-22 修回：2010-06-15）

（编辑 邓强庭）