DOI:10.16016/j.1000-5404.201511164

哮喘气道重塑小鼠模型的构建及病理学特征变化的探讨

郭东霖,赵生涛,王熠杰,王长征,王 彦 (400037 重庆,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)

[摘要] **目的** 构建哮喘气道重塑小鼠模型并观察不同雾化吸入激发时间气道重塑病理学特征的变化。**方法** 采用卵蛋白(ovalbumin,OVA)腹腔致敏小鼠,1% OVA 雾化吸入激发小鼠,末次激发 24 h 后处死小鼠以构建致敏小鼠模型。模型组依据雾化吸入激发时间不同,分为 2、4、6、8 周和 10 周 5 组。收集支气管肺泡灌洗液(bronchoveolar lavage fluid,BALF)分类计数嗜酸性粒细胞总数,肺组织切片 HE、PAS、Masson 观察病理变化。**结果** 与正常组相比,各激发时长的模型组细胞总数和嗜酸性粒细胞总数均明显增高($P\leqslant0.001$),嗜酸性粒细胞浸润,杯状细胞化生均明显加重($P<0.001$),但是气道基底膜仅在 8 周和 10 周组增厚明显($P\leqslant0.036$)。**结论** 气道重塑开始于炎症早期,随着激发时间推移而逐渐加重,但各项气道重塑特征呈现的时间段不一致,气道重塑病理特征的形成需约 8 周的时间激发才能完整呈现。

[关键词] 哮喘;气道重塑;嗜酸性粒细胞
[中图法分类号] R-332;R36;R562.25 [文献标志码] A

Establishment of mouse model of asthma airway remodeling and investigation of pathological features

Guo Donglin, Zhao Shengtao, Wang Yijie, Wang Changzheng, Wang Yan (Institute of Respiratory Diseases, Key Laboratory of Respiratory Disease Research, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To establish a mouse model of asthma airway remodeling and investigate the changes of pathological features at different challenging time. **Methods** The mice were randomly divided into 1 control group and 5 model groups (2-, 4-, 6-, 8- and 10-week groups) according to different challenging time. To make the airway remodeling in the allergic mice, the mice were sensitized with ovalbumin (OVA) and repeatedly challenged with OVA. Bronchoalveolar lavage fluids (BALF) were collected for counting total cells and eosinophils (EOS) at 24 h after the last challenge. The pathological changes of lung tissues were observed by HE, PAS and Masson staining. **Results** Compared with the control group, the counts of total cells and EOS were increased ($P\leqslant0.001$), and the scores of EOS infiltration and goblet cell hyperplasia were significantly higher in the 5 model groups ($P<0.001$). However, the airway basement membrane was thicker only in the 8-week group and 10-week group ($P\leqslant0.036$). **Conclusion** Airway remodeling begins in the early stage of inflammation and becomes more serious along with the challenge time. However, the pathological characteristics of remodeling do not appear at the same time. The challenge of about 8 weeks is necessary to exhibit complete pathological characteristics of airway remodeling.

[**Key words**] asthma; airway remodeling; eosinophils

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (31371013). Corresponding author: Wang Changzheng, E-mail: czwang@neteasa.com, Wang Yan, E-mail: wangyanflower@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31371013)
[通信作者] 王长征,E-mail:czwang@neteasa.com
王 彦,E-mail:wangyanflower@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160131.1127.003.html(2016-01-31)

支气管哮喘是一种常见的由多种细胞和细胞因子参与的呼吸道慢性炎症性疾病[1-2]。而气道壁的形态在哮喘病理过程中并不仅仅呈现出主要以嗜酸性粒细胞性炎症浸润,同时还伴随着特征性结构的变化,我们称之为气道重塑[3]。如今支气管哮喘气道重塑已被广泛认为发生于气道炎症早期[4],并随着炎症的持续而不断进展。气道重塑的主要病理特征包括:上皮杯状细胞化生,气道平滑肌肥大、增生,气道上皮下胶原沉积[5]。气道重塑的研究是近年来哮喘研究的一个热点,然而至今仍没有鉴定气道重塑模型的金标准,不同研究人员选择不同的激发时间来构建哮喘气道重塑小鼠模型,Qin 等[6]雾化吸入激发 8 周,Lopez 等[7]激发 12 周,而 Shurin 等[8]仅仅用了 4 d,可见不同研究组构建气道重塑模型所用的激发时间相差甚大,使研究者们对气道重塑模型的构建产生诸多疑惑,而激发时间的长短是否会导致气道重塑模型的差异尚不清楚。本研究旨在通过观察不同雾化吸入激发时间哮喘小鼠的气道炎症和重塑相关的病理改变,以期探讨哮喘气道重塑的病理进展,摸索出合适的激发时间,为气道重塑模型的构建提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物及主要试剂

4~5 周龄雌性 BALB/c 小鼠 36 只,在 SPF 中饲养,由第三军医大学新桥医院实验动物中心提供,卵蛋白(ovalbumin,OVA)购自美国 Sigma 公司,氢氧化铝佐剂[(aluminumhydroxide, AL(OH)$_3$)]购自美国 Thermo 公司,雾化器(ss-7B)购自江苏双盛医疗器械有限公司。

1.2 动物模型的分组与建立

36 只小鼠以随机数字表法分为 6 组,每组 6 只,即正常组和 5 个不同激发时间的模型组。各模型组第 0、7、14 天 20 μg OVA 腹腔注射致敏,注射体积为 200 μL[含 20 μg OVA 溶于 50 μL 生理盐水 + AL(OH)$_3$ 150 μL],第 28~31 天给予 1% OVA 雾化激发吸入 35 min,每天 1 次,第 35 天起隔天 1 次,按雾化总时长 2、4、6、8、10 周分为 2、4、6、8、10 周组,正常对照组用等量生理盐水(NS)代替致敏和激发给药。

1.3 支气管肺泡灌洗

各组末次激发 24 h 后每只小鼠用 1% 戊巴比妥钠 200 μL 腹腔注射麻醉后分离颈部组织,暴露气道,予 24G 型号的静脉留置针行气管插管,注入生理盐水行支气管肺泡灌洗,共 2 次,每次 0.8 mL,平均回收率在 80% 以上,计细胞总数,离心后保留上清,100 μL 生理盐水重悬沉淀后涂片,行 HE 染色,显微镜下计数至少 300 个细胞做嗜酸性粒细胞分类计数。

1.4 气道病理学分析

打开胸腔,取左肺浸入 4% 多聚甲醛中固定 24 h 后,常规脱水石蜡包埋,切成 5 μm 厚切片。①进行 HE 染色后对气道周围炎症细胞浸润程度进行 0~4 级评分[9]:0 分表示气道周围未见炎症细胞;1 分表示气道周围可见少许炎症细胞;2 分表示气道周围大部分区域被 1 层炎症细胞环绕;3 分表示气道周围大部分区域被 2~4 层炎症细胞环绕;4 分表示气道周围大部分区域被 4 层以上炎症细胞环绕。②进行 PAS 染色后对气道上皮杯状细胞化生程度进行 0~4 级评分[10]:0 分表示未见杯状细胞化生;1 分表示可见 <25% 的上皮细胞产生杯状细胞化生;2 分表示可见 25% ≤上皮细胞 <50% 产生杯状细胞化生;3 分表示可见 50% ≤上皮细胞 <75% 产生杯状细胞化生;4 分表示 ≥75% 的上皮细胞产生杯状细胞化生。③利用 Masson 三色染色对内径在 100~200 μm 的气道基底膜厚度进行测量。光镜下每组随机选取 10 个视野进行评分和测量。

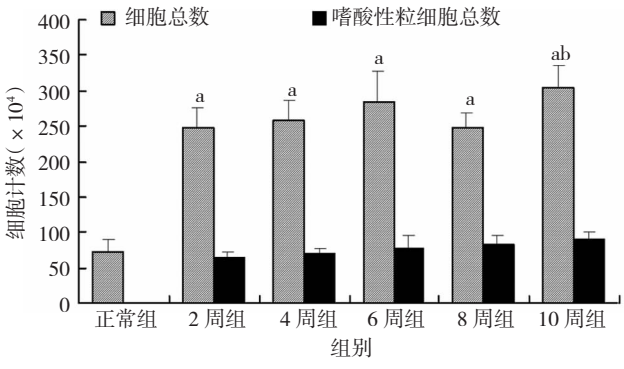
1.5 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。各组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组小鼠细胞总数及嗜酸性粒细胞总数比较

与正常组比较,各个激发时长的模型组的细胞总数和嗜酸性粒细胞总数均明显升高($P < 0.001$)。与 2 周组比较,10 周组的细胞总数和嗜酸性粒细胞总数均明显升高($P = 0.013$,图 1)。



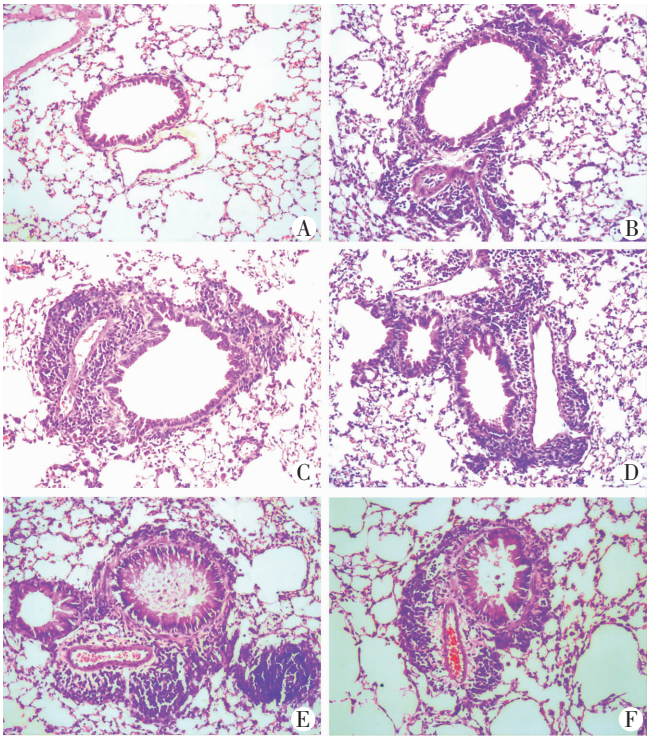
a:$P \leq 0.001$,与正常组比较;b:$P = 0.013$,与 2 周组比较

图 1 各组小鼠细胞总数及嗜酸性粒细胞总数比较

2.2 各组小鼠气道周围炎症细胞浸润程度比较

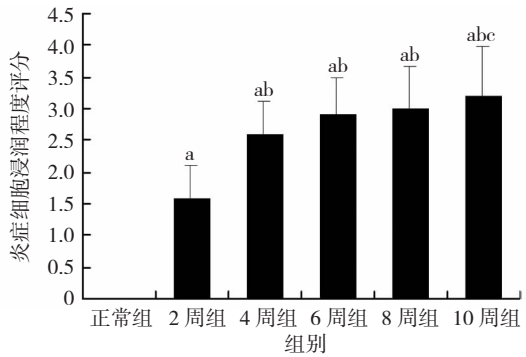
正常组气道未见明显炎症浸润。与正常组比较,

各气道重塑模型组气道均可见明显的气道炎症($P<0.001$,图2、3)。与2周组比较,其余4组气道周围炎症细胞浸润程度明显加重($P<0.01$)。与4周组相比,10周组气道炎症细胞浸润更显著($P=0.038$)。由此可见,随着激发时间的增加,气道炎症逐渐加重,并未出现随着激发时间延长导致免疫耐受而减轻气道炎症表现。



A:正常组 B:2周组 C:4周组 D:6周组 E:8周组 F:10周组

图2　各组小鼠肺组织病理变化　(HE×400)

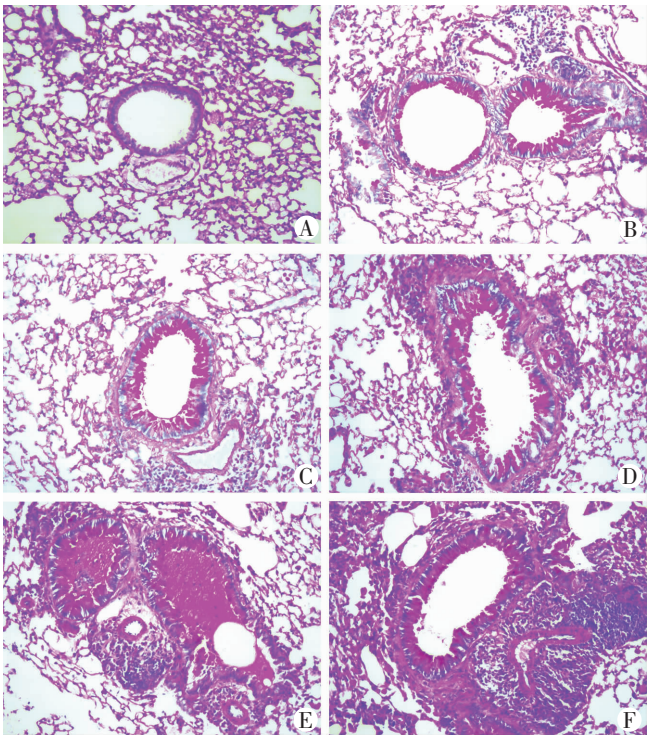


a:$P<0.001$,与正常组比较;b:$P<0.01$,与2周组比较;c:$P=0.038$,与4周组比较

图3　各组小鼠炎症细胞浸润程度评分比较

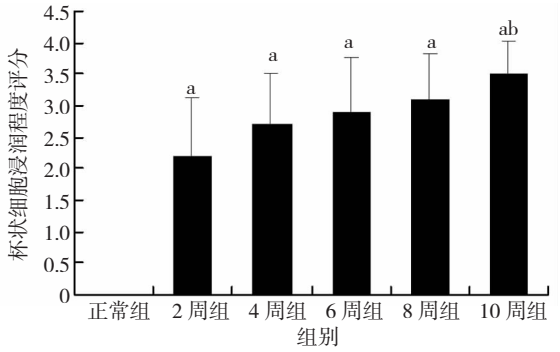
2.3　各组小鼠气道上皮细胞杯状细胞化生程度比较

正常组未见明显气道上皮杯状细胞化生。与正常组比较,各模型组均出现显著的气道上皮杯状细胞化生($P\leqslant0.001$,图4、5)。与2周组相比,10周组杯状细胞化生程度明显加重($P=0.024$),提示气道上皮杯状细胞化生在激发早期就可以出现,但随着激发时间明显延长至10周,气道上皮杯状细胞化生进一步加重,表明气道重塑的形成可以通过更长激发时间来获得更为明显的病理现象。



A:正常组 B:2周组 C:4周组 D:6周组 E:8周组 F:10周组

图4　各组小鼠肺组织病理变化　(PAS×400)

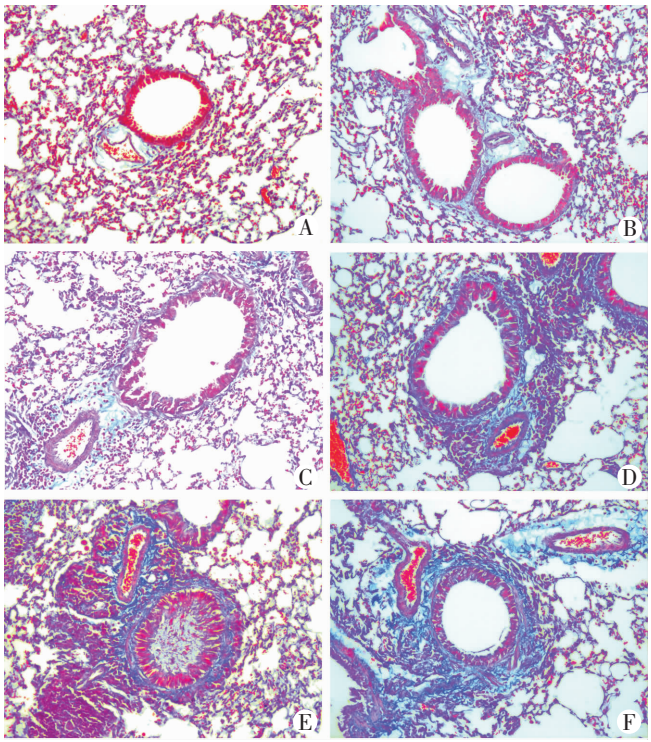


a:$P\leqslant0.001$,与正常组比较;b:$P=0.024$,与2周组比较

图5　各组小鼠气道上皮杯状细胞化生程度评分比较

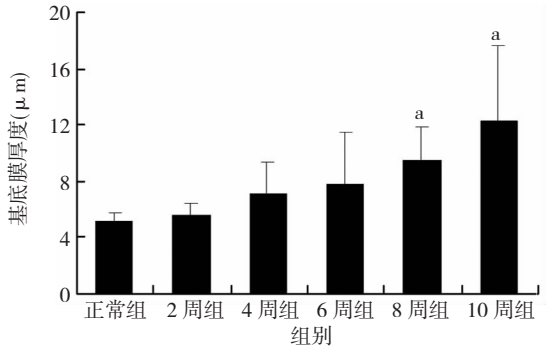
2.4　各组小鼠气道基底膜厚度比较

与正常组比较,2、4、6周组的肺间质中可见明显的胶原纤维增生,但基底膜厚度未见明显差异,直到8周组和10周组的基底膜厚度明显增大,差异有统计学意义($P<0.05$,图6、7)。以上结果表明气道基底膜的增厚这一病理改变需要激发时间达到8周以后才能表现出来。



A:正常组;B:2 周组;C:4 周组;D:6 周组;E:8 周组;F:10 周组

图 6 各组小鼠肺组织病理变化(Masson ×400)



a:$P<0.05$,与正常组比较

图 7 各组小鼠气道基底膜厚度比较

3 讨论

气道重塑被认为是慢性哮喘难以治疗甚至逐渐恶化的至关重要的病理机制,寻找气道重塑的治疗策略可能是重症哮喘或难治性哮喘的治疗的关键[11]。因此,构建气道重塑动物模型对于研究气道重塑的发生机制及治疗方法具有重要作用。然而,目前仍缺乏构建气道重塑动物模型的标准方法和公认指标。通过雾化吸入或滴鼻给予过敏源等方式激发小鼠并不能简单构建气道重塑模型,因为很多动物模型都只能短时间维持气道重塑的表现。Lloyd 等[12]发现长时间的激发会导致免疫耐受,Shinagawa 等[11]在使用 BALB/c 小鼠气道重塑模型中发现嗜酸性粒细胞总数在 2 周时达到峰值,3 周时就明显下降,Yiamouyiannis 等[13]研究证明早期出现的嗜酸性粒细胞会逐渐减少,气道炎症和气道高反应现象会逐渐消失[11]。因此,在构建气道重塑模型时,嗜酸性粒细胞持续性的炎症能否得到持续维持显得尤为重要。

本研究结果显示,采用 BALB/c 小鼠,以氢氧化铝为免疫佐剂,给予 OVA 腹腔注射致敏小鼠,相隔 2 周后 1% OVA 雾化激发 2 周即可明显观察到杯状细胞化生,胶原纤维沉积增多等哮喘气道重塑的部分病理特征,然后随着激发时间延长,并未出现免疫耐受现象,嗜酸性粒细胞总数和气道炎症并未如上所述发生减少的现象而是逐渐增多,以 10 周组最显著。长时间的激发充分保障了病理现象进一步进展的可能。肺组织病理结果也表明,炎症细胞浸润在 2 周组较正常组,4 周组较 2 周组嗜酸性粒细胞浸润明显加重,有统计学差异,而 6 ~8 周气道炎症细胞浸润与 4 周组相比虽未出现统计学差异,但呈现缓慢增加的趋势,并且一直持续到 10 周,且 10 周组嗜酸性粒细胞总数和气道炎症细胞浸润较 2 周组与 4 周组均显著加重。而且杯状细胞化生现象也呈现与气道炎症细胞浸润相似表现,2 周时出现明显杯状上皮细胞化生,此后 4 ~8 周组较 2 周组虽随激发时间而呈现缓慢加重趋势但并未有明显统计学差异,直至 10 周组才较 2 周组显著加重。由此可见 2 周时即可见明显的杯状细胞化生,胶原纤维沉积增多证实了气道重塑可产生于炎症早期,与以往研究一致[4]。而不同的是,气道基底膜增厚并未在激发早期出现。2 周时虽可见增多的胶原纤维沉积,但是气道基底膜厚度并未有变化。气道重塑过程中所谓的“基底膜增厚”指的是基底膜黏膜下层胶原纤维沉积,肌成纤维细胞增生,血管生成以及气道平滑肌肥大增生[14]。有研究表明,增多的胶原纤维主要来自于气道与有炎症细胞渗出的血管之间的肺间质[4],然后随着炎症细胞向气道浸润而逐渐迁移并沉积在气道基底膜下。本实验病理结果显示 2 周时即可见肺间质中有胶原纤维沉积,并随着炎症细胞的趋化而向气道迁移,直至 8 周时才可见明显的基底膜增厚,表明胶原纤维的产生,迁移,沉积需要一个缓慢的过程,而不能像杯状细胞化生现象一般早期即可出现。同样,10 周组气道基底膜的增厚显著重于 2 周组。因此,本研究结果表明雾化激发时间最长的 10 周组气道炎症和气道重塑均最显著重于 2 周组,而出现典型气道基底膜增厚需要激发至少 8 周。

总而言之,我们有理由相信,构建一个较为完整的哮喘小鼠气道重塑模型,需要在不发生免疫耐受,保持慢性嗜酸性粒细胞炎症的前提下,能够呈现较为全面的气道重塑病理特征。而我们观察到气道重塑尽管发生在嗜酸性炎症早期,但也仅仅是部分现象比如杯状

细胞化生,胶原纤维增生。而相对更重要的气道壁增厚包括气道下纤维沉积,平滑肌肥大增生则必须经过较长时间的持续激发,本实验条件下至少需要激发8周。本研究结果阐明了气道重塑病理特征的形成需要大约8周的时间激发,且长时间持续激发并未诱导免疫耐受而导致气道炎症的减轻甚至消失,为哮喘气道重塑模型的构建提供了重要参考。但停止激发以后气道炎症和气道重塑改变能否继续维持,且本研究中缺乏气道高反应性的检测,因此仍需进一步研究,为今后气道重塑的研究提供更多的依据。

参考文献:

[1] Bousquet J, Chanez P, Lacoste J Y, *et al*. Eosinophilic inflammation in asthma[J]. N Engl J Med, 1990, 323(15): 1033 - 1039.

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

[3] Zhang J, Ma M, Qin D, *et al*. Lung morphometry changes in prevention of airway remodeling by protocatechuic aldehyde in asthmatic mice[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(5): 6890 - 6901.

[4] Sumi Y, Hamid Q. Airway Remodeling in Asthma[J]. Allergol Int, 2007, 56(4): 341 - 348.

[5] 朱涛, 任旭斌, 朱静, 等. γ-氨基丁酸A型受体调节哮喘动物模型气道重构的实验研究[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(4): 842 - 846.

[6] Qin X J, Zhang G S, Zhang X, *et al*. Protein tyrosine phosphatase SHP2 regulates TGF-β1 production in airway epithelia and asthmatic airway remodeling in mice[J]. Allergy, 2012, 67(12): 1547 - 1556. DOI: 10.1111/all.12048

[7] Lopez E, del-Pozo V, Miguel T, *et al*. Inhibition of chronic airway inflammation and remodeling by galectin-3 gene therapy in a murine model[J]. J Immunol, 2006, 176(3): 1943 - 1950.

[8] Shurin M R, Yanamala N, Kisin E R, *et al*. Graphene oxide attenuates Th2-type immune responses, but augments airway remodeling and hyperresponsiveness in a murine model of asthma[J]. ACS Nano, 2014, 8(6): 5585 - 5599. DOI: 10.1021/nn406454u

[9] Kang J Y, Lee S Y, Rhee C K, *et al*. Effect of aging on airway remodeling and muscarinic receptors in a murine acute asthma model[J]. Clin Interv Aging, 2013, 8: 1393 - 1403. DOI: 10.2147/CIA.S50496

[10] Padrid P, Snook S, Finucane T, *et al*. Persistent airway hyperresponsiveness and histologic alterations after chronic antigen challenge in cats[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1995, 151(1): 184 - 193.

[11] Shinagawa K, Kojima M. Mouse model of airway remodeling: strain differences[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2003, 168(8): 959 - 967.

[12] Lloyd C M, Gonzalo J A, Coyle A J, *et al*. Mouse models of allergic airway disease[J]. Adv Immunol, 2001, 77: 263 - 295.

[13] Yiamouyiannis C A, Schramm C M, Puddington L, *et al*. Shifts in lung lymphocyte profiles correlate with the sequential development of acute allergic and chronic tolerant stages in a murine asthma model[J]. Am J Pathol, 1999, 154(6): 1911 - 1921.

[14] Keglowich L F, Borger P. The Three A's in Asthma- Airway Smooth Muscle, Airway Remodeling & Angiogenesis[J]. Open Respir Med J, 2015, 9: 70 - 80. DOI: 10.2174/1874306401509010070

(收稿:2015-11-24;修回:2016-01-07)
(编辑 邓强庭)

(上接1101页)

初诊时HbA1c <8.5%;(3)发病时胰岛功能满足二者之一:①24 h尿C肽<10 μg/d;②空腹C肽<0.3 ng/mL和餐后C肽(或)胰高糖素刺激试验<0.5 ng/mL。除此之外,还可能有以下临床特点:胰岛相关抗体阴性;常常在1周内起病;98%的患者血清胰酶增高;70%的患者起病前有类似感冒样症状或胃肠道症状;可发生在妊娠或分娩后[2]。本例患者为急性起病,起病前有上腹部不适、恶心、呕吐等胃肠道症状,2 d即出现糖尿病酮症酸中毒。入院时血糖>16 mmol/L,糖化血红蛋白水平仅为6.1%。胰岛相关抗体测定均为阴性,空腹C肽<0.1 ng/mL,75 g葡萄糖刺激后C肽<0.1 ng/mL。据以上临床特点及检查结果本例患者可确诊为F1D。

F1D的具体发病机制尚不明确,大多数学者认为遗传易感性、病毒感染、自身免疫及妊娠可能与本病的发生有关[3]。国内许多报道F1D大多发生在妊娠期间或分娩后[4],对于青年男性发生FID合并急性肾功能衰竭却鲜有报道。在临床工作中,对疑诊为F1D的患者应及时完善血糖、肾功能等检查,以免漏诊或误诊。

参考文献:

[1] Imagawa A, Hanafusa T, Miyagawa J, *et al*. A navel subtype of type 1 diabetes mellitus characterized by a rapid onset and an absence of diabetes-related antibodies [J]. N Engl J Med, 2000, 342(5): 301 - 307. DOI: 10.1056/NEJM200002033420501

[2] 梁杏欢, 李励, 蔡劲薇, 等. 暴发性1型糖尿病的研究新进展[J]. 广西医科大学学报, 2015, 32(2): 334 - 336. DOI:10.16190/j.cnki.45-1211/r.2015.02.060

[3] 黄惠彬, 巩雪莹, 林丽香, 等. 暴发性1型糖尿病的临诊应对[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2014, 30(1): 83 - 86. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-6699.2014.01.022

[4] 陈婧, 宁丹, 李翔, 等. 人工流产后暴发性1型糖尿病1例[J]. 中华糖尿病杂志, 2015, 7(3): 189 - 190. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-5809.2015.03.015

(收稿:2015-10-29;修回:2015-12-22)
(编辑 冷怀明)