基础研究 文章编号:0253-3626(2010)03-0335-04

豚鼠和新西兰兔变应性鼻炎模型建立及比较

张 丽[1],杜经纬[2],王丽洪[2],谭 毅[3],龚晓波[1],江 鹏[1],王智彪[1]

(1.重庆医科大学生物医学工程系、重庆市生物医学工程学重点实验室、重庆市超声医学工程重点实验室—省部共建国家重点实验室培育基地,重庆 400016;2.重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科,重庆 400016;3.重庆医科大学实验动物中心,重庆 400016)

【摘 要】目的:旨在比较不同动物在不同剂量致敏原诱导下形成变应性鼻炎模型的特点。方法:采用甲苯-2,4-二异氰酸酯(Toluene-2,4-diisocyanate,TDI)致敏豚鼠和新西兰兔制作变应性鼻炎动物模型,在豚鼠和新西兰兔组中又各自使用高低两种TDI剂量。记录建模过程中动物症状体征评分,典型表现;末次激发后行鼻黏膜组织病理学检查及组胺含量测定;记录动物死亡率和建模成功率;对死亡动物行呼吸道解剖和组织病理学检查,探索死亡原因。结果:豚鼠和新西兰兔均能在TDI诱导下形成变应性鼻炎典型症状体征,模型组动物鼻黏膜见大量以嗜酸性粒细胞为主炎症细胞浸润且组胺含量明显增高(与空白对照组比较 $P<0.01$)。但不同动物之间,以及相同动物在不同给药剂量下,其症状体征出现的时间、典型表现、鼻黏膜嗜酸性粒细胞浸润程度、鼻黏膜组胺含量高低、建模死亡率、成功率等均有较大差异。动物死亡原因与药物剂量和变态反应均有一定关系。结论:豚鼠和新西兰兔在不同药物剂量下均可成功建模,但成模特点差异较大,应根据研究目的不同选取所需模型。

【关键词】变应性鼻炎;动物模型;豚鼠;新西兰兔

【中图图书分类法分类号】R765.21 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-12-25

Comparison of allergic rhinitis animal models in guinea pigs and new zealand rabbits

ZHANG Li, et al

(*Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To compare the characteristics of allergic rhinitis animal models in two different animals (Guinea pigs and New Zealand rabbits) induced with various doses of toluene-2,4-Diisocyanate (TDI). *Methods*: Low dose and high dose of TDI olive oil solution was used as sensitizer to establish models of Guinea pigs and New Zealand rabbits. The typical symptoms and sings of Guinea pigs and New Zealand rabbits were respectively scored during modeling. After the last challenge, nasal mucosa of Guinea pigs and New Zealand rabbits were histopathologically examined and the level of histamine in nasal mucosa was measured by spectrofluorometer. The mortality rates and model success rates were record. Respiratory tracts of dead animals were dissected and histopathologically examined to find out the causes of their death. *Results*: Compared with control groups, all the Guinea pigs and New Zealand rabbits in model groups got typical symptoms and sings of allergic rhinitis. Histopathology examination of nasal mucosa showed eosinophile cells infiltrating obviously. The levels of histamine in nasal mucosa were highly increased ($P<0.01$). However, between Guinea pigs and New Zealand rabbits, even the same animal specie but treated with different doses of TDI demonstrated obviously different results during modeling, including the time of symptoms and signs to appear, the most typical symptoms and signs, the degree of invasion of eosinophile cells, the level of histamine in nasal mucosa, the mortality rates and success rates. Dissection of the dead animals shows the cause of death may be connected with the drug doses and allergy. *Conclusion*: Allergic rhinitis animal models induced with two different doses of TDI in different animals have different characteristics. The selection of animal models should adapt to research purposes.

【Key words】Allergic rhinitis; Animal models; Guinea pigs; New Zealand rabbits

作者介绍:张 丽(1982-),女,硕士,研究方向:变应性鼻炎治疗。现工作单位:成都市第三人民医院耳鼻喉科。

通讯作者:王丽洪,女,副教授,E-mail: wlh-cq@126.com。

基金项目:重庆医科大学 2005 年创新基金(编号:重医大科[2005]8号 CX200537)。

变应性鼻炎是耳鼻喉科常见病,探索其发病机制和治疗方法均需质量稳定的动物模型。从 1988 年 Tanaka[1]首次建立变应性鼻炎动物模型至今,该领域研究者在选择动物种属,致敏原剂量上各不相同,动物模型的成模过程、典型表现、鼻

黏膜特征性组织病理学变化和组胺含量等均有较大差异，上述差异的具体数据至今仍未见文献单独报道。本实验选用豚鼠和新西兰兔，使用同种致敏原分别在 2 种剂量诱导下建模，首次详细比较了其成模特点，通过死亡动物尸体解剖分析了建模途中动物死亡可能原因。

1 材料与方法

1.1 动物

豚鼠 40 只，雌雄各半，体重 250 ~ 300 g。新西兰大白兔 40 只，雌雄各半，体重 2.5 ~ 3.0 kg。重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 试剂及设备

甲苯 -2,4- 二异氰酸酯(Toluene-2,4-Diisocyanate,TDI)(天津市光复精细化工研究所)；橄榄油(国药集团化学试剂有限公司)；组胺二盐酸盐(国药集团化学试剂有限公司)；邻苯二甲醛(OPA)(国药集团化学试剂有限公司)；其它试剂均为分析纯。荧光分光光度计(日本岛津 RF-540)；OLYMPUS 光镜(日本 OLYMPUS 公司 BX40)。

1.3 动物分组及建模方法

豚鼠 40 只，30 只为模型组(其中 15 只低剂量模型组，15 只高剂量模型组)，另 10 只空白对照组。新西兰兔 40 只，30 只为模型组(其中 15 只低剂量模型组，15 只高剂量模型组)，另 10 只空白对照组(动物分组，致敏原剂量详见表 1)。建模方法依照文献[1,2]，各模型组动物以 10%TDI 橄榄油溶液作致敏原，微量加样器缓慢滴鼻。建模过程分为致敏和激发两期。致敏期：模型组每日滴鼻 1 次，连续 7 d。激发期：从第 9 d 开始，改为隔日滴鼻 1 次，激发 4 次，共 8 d。建模时间总共 15 d。空白对照组用橄榄油液滴鼻，方法同前。

1.4 症状体征观察

以上各组动物每次激发后立即观察 30 min，2 h 后再观察 30 min。观察项目包括：抓痒次数，喷嚏次数，清涕程度，各组动物成模具体过程和典型表现。症状体征评分参照赵秀杰评分系统[2]。抓痒次数：轻抓挠鼻部几次，记 1 分；抓挠鼻面部不止，并到处擦磨，记 2 分。喷嚏：1 ~ 3 个记 1 分，4 ~ 10 个记 2 分，11 个以上记 3 分。清涕：流至前鼻孔记 1 分，流至前鼻孔和下唇之间记 2 分，清涕满面记 3 分。介于 2 条标准之间的用 0.5 分记。以上各项均采用叠加记分法，总分超过 5 分则视为症状学上建模成功。

1.5 鼻黏膜组织病理学观察

末次激发 2 h 后，股动脉放血法处死各组动物，钳取双侧鼻黏膜，一侧鼻黏膜以 4%多聚甲醛固定行 HE 染色，另侧鼻黏膜留作组胺含量测定。高倍镜下观察其组织病理学改变，计数 5 个高倍视野内嗜酸性粒细胞数目，以平均值反映其浸润程度。

1.6 鼻粘膜组胺含量测定

根据改良 Shore 法[3]测定鼻黏膜中组胺含量：称取鼻黏膜组织适量，按 20 ml/g 比例加入 25%三氯醋酸溶液进行组织匀浆，匀浆液经 2 500 r 室温离心 20 min，取上清 1.6 ml 于具塞离心管中，依次加 4.0 ml 正丁醇，0.2 ml NaOH(2.5 mol/L)和 1.5 g NaCl，以 250 r/min 每分钟于摇床萃取一定时间，经 4 000 r 室温离心 10 min，取上层有机相中 3.6 ml 正丁醇于具塞离心管中，加 2.0 ml 正庚烷和 1.2 ml HCl(0.1 mol/L)，混匀后以 250 r/min 每分钟于摇床萃取一定时间，经 4 000 r 室温离心 10 min 后弃有机相，取 1 ml 水相于 10 ml 具塞试管中，加 0.5 ml NaOH(0.4 mol/L)，快速加入 0.1%邻苯二甲醛(OPA)甲醇溶液 0.1 ml，立即混匀 21℃ ~ 22℃下反应 10 min，加 0.5 ml HCl(0.5 mol/L)终止反应。荧光分光光度计于激发波长 330 nm，发射波长 440 nm 测定荧光强度。绘制组胺标准液相对荧光强度与其浓度的回归曲线，计算待测鼻黏膜中组胺含量。

1.7 死亡动物呼吸道解剖及组织病理学观察

建模过程中死亡的动物在 12 h 内行呼吸系统解剖：沿面部剥离鼻背皮肤并剪开鼻骨，观察鼻黏膜色泽、鼻甲肿胀情况、鼻分泌物形态、鼻腔通气情况等。切开颈部和胸部皮肤及皮下组织并剖开胸腔，观察气管、支气管、肺部大体变化。钳取死亡动物鼻黏膜，气管、支气管、肺部组织，4%多聚甲醛固定行 HE 染色，高倍镜下观察其病理组织学改变。

1.8 统计方法

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，以 SPSS10.0 软件包行组间比较 t 检验。$P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 症状体征观察

豚鼠和新西兰兔均能在 TDI 诱导下出现抓痒、喷嚏、鼻

表 1 动物分组，致敏原剂量

动物组别	动物总数	致敏原	剂量(每侧鼻腔)
A(豚鼠低剂量模型组)	15	10%TDI 橄榄油溶液	5 μl
B(豚鼠高剂量模型组)	15	10%TDI 橄榄油溶液	10 μl
C(豚鼠空白对照组)	10	橄榄油溶液	5 μl
D(新西兰兔低剂量模型组)	15	10%TDI 橄榄油溶液	0.1 ml
E(新西兰兔高剂量模型组)	15	10%TDI 橄榄油溶液	0.5 ml
F(新西兰兔空白对照组)	10	橄榄油溶液	0.1 ml

分泌物增加、鼻塞等变应性鼻炎典型症状，相应对照组未出现上述改变。但不同动物种类之间，以及相同动物在不同给药剂量下，成模过程、症状出现时间、典型表现、死亡率、成功率均有较大差异。

A、B 2 组豚鼠之间比较：在第 1、2 次给药后 10 min 内，两组动物均出现不同程度烦躁，以抓鼻、喷嚏为主，清涕、鼻塞不明显。随给药时间延长，上述症状逐渐加重并出现少量清涕，轻微鼻塞(呼吸稍急促)。B 组动物症状出现较 A 组早，表现典型且持续时间长，但死亡率明显高于 A 组(详见表 2)。

D、E 2 组新西兰兔之间比较：在第 1、2 d 给药后 10 min 内，两组动物也普遍出现烦躁、抓鼻、喷嚏等表现，但第 3 d 至第 7 d，上述症状未再次出现，而以少量清涕、鼻塞(仰头张口呼吸)为主。直至第 10、11 d，方再次出现轻微抓鼻、喷嚏，伴以大量清涕、明显张口呼吸。E 组动物症状体征出现较 D 组早，表现典型且持续时间长，但死亡率明显高于 D 组(详见表 2)。

豚鼠组与新西兰兔组之间比较：前者在给药 1 周左右出现症状，以抓鼻、喷嚏为典型表现，清涕、鼻塞不如新西兰兔明显。新西兰兔组需给药近 2 周方出现典型症状，以清涕、鼻塞为主要变现(其鼻塞表现为呼吸急促，明显的仰头张口呼吸)，抓鼻、喷嚏等症状不如豚鼠明显。

2.2 鼻粘膜组织病理学观察

各模型组动物鼻黏膜 HE 染色见鼻黏膜上皮有脱离，黏膜下组织结构疏松，组织间隙水肿，血管扩张，固有层内可见以嗜酸性粒细胞为主的炎症细胞浸润，见图 1 中 1、2、4、5。各空白对照组动物鼻黏膜上皮结构完整，排列均匀，黏膜下层未见组织间隙水肿和血管充血，仅见少量炎症细胞浸润见图 1 中 3、6。各组动物鼻黏膜嗜酸性粒细胞浸润数目详见表 3。

2.3 鼻黏膜中组胺含量

各组动物末次激发 2 h 后鼻黏膜组胺含量详见表 3。

2.4 死亡动物呼吸道解剖及组织病理学观察

建模过程中，B、E 2 组动物大量死亡。死亡时间均于给药 2 h 后(最常见于给药当日夜间)。B 组死亡 11 只(死亡时间：第 3 d 4 只、第 4 d 4 只、第 6 d 3 只)。E 组死亡 9 只(死亡时间：第 6 d 5 只、第 7 d 2 只、第 9 d 2 只)。A 组死亡 1 只(死亡时间：第 3 d)。C、D、F 组直至建模结束均未见动物死亡。

死亡豚鼠和新西兰兔尸体解剖发现：鼻腔大量分泌物及血凝块阻塞，小心清除分泌物以及血凝块后见鼻黏膜充血肿胀，以下鼻甲为甚。动物颜面、前爪均可见抓挠鼻部留下的血迹。气管、支气管充满黄色较粘稠分泌物，通气完全受阻，肺部组织淤血水肿。鼻黏膜、支气管黏膜和肺组织的 HE 染色结果详见图 2。

3 讨 论

近年，对变应性鼻炎的研究已成为耳鼻喉科热点，但其动物模型的制备尚未标准化，建模动物、方法、致敏原剂量等差异较大[4]。建模动物常用豚鼠、小鼠、大鼠、新西兰兔等，建模方法常用甲苯 -2,4- 二异氰酸酯(Toluene-2,4-Diisocyanate，TDI)滴鼻、卵清蛋白(Ovalbumin，OVA)腹腔注射、O-

表 2 各组动物死亡数、症状体征评分、典型表现和成功率

动物组别	总数	死亡数	评分大于 5 出现时间(d)	典型表现	成功率
A(豚鼠低剂量模型组)	15	1	6.57 ± 0.51■	抓鼻，喷嚏	93.3%
B(豚鼠高剂量模型组)	15	11	3.44 ± 0.53	抓鼻，喷嚏	26.7%
C(豚鼠空白对照组)	10	0	未出现	无	0
D(新西兰兔低剂量模型组)	15	0	12.6 ± 1.35▲	清涕，鼻塞	100%
E(新西兰兔高剂量模型组)	15	9	8.75 ± 1.56	清涕，鼻塞	40%
F(新西兰兔空白对照组)	10	0	未出现	无	0

注：■表示与 B 组(豚鼠高剂量模型组)比较 $P<0.01$，▲表示与 E 组(新西兰兔高剂量模型组)比较 $P<0.01$

表 3 各组动物存活数量、嗜酸性粒细胞计数和鼻黏膜组胺含量

动物组别	动物总数	存活数量	嗜酸性粒细胞计数(个 / 高倍镜视野)	组胺含量(mg/g)
A(豚鼠低剂量模型组)	15	14	12.43 ± 3.69■▲●	9.70 ± 2.87■▲●
B(豚鼠高剂量模型组)	15	4	13.25 ± 3.30■△	10.37 ± 2.00■△
C(豚鼠空白对照组)	10	10	1.80 ± 1.32	1.96 ± 1.49
D(新西兰兔低剂量模型组)	15	15	7.33 ± 2.32■○	6.63 ± 2.04■○
E(新西兰兔高剂量模型组)	15	6	9.33 ± 2.80■	7.23 ± 2.65■
F(新西兰兔空白对照组)	10	10	1.40 ± 1.07	2.20 ± 1.67

注：■表示与相同动物空白对照组比较 $P<0.01$；▲表示与 D 组(新西兰兔低剂量模型组)比较 $P<0.01$；△表示与 E 组(新西兰兔高剂量模型组)比较 $P<0.01$；●表示与 B 组(豚鼠高剂量模型组)比较 $P>0.05$；○表示与 E 组(新西兰兔高剂量模型组)比较 $P>0.05$

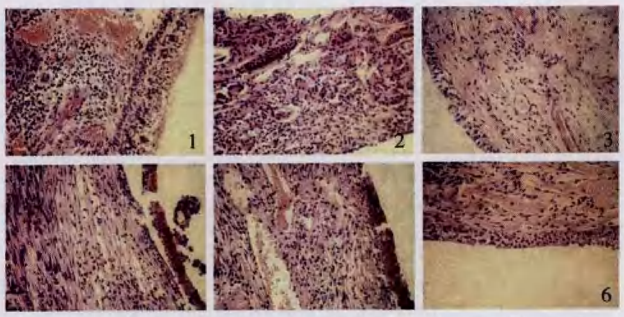


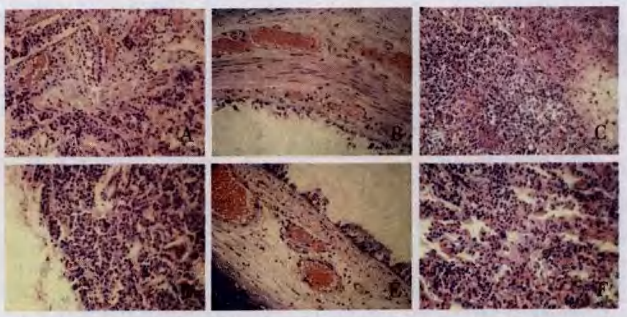
图 1 中的 1～6 依次为 A、B、C、D、E、F 组动物鼻黏膜改变（HE×400）

图 1　模型组（A、B、D、E 组）及对照组（C、F 组）鼻黏膜的组织病理学

VA 皮下注射、OVA 雾化吸入等。致敏原剂量豚鼠有 5 μl 或 10 μl 致敏，新西兰兔有 0.1 ml 或 0.5 ml 致敏。鉴于动物对变态反应敏感性有[5]：豚鼠 > 兔 > 犬 > 小鼠，OVA 腹腔或皮下注射致敏与临床变应性鼻炎患者自然病程差别较大，致敏剂雾化吸入极易造成下呼吸道致敏。综合以上因素并参考大量文献，本实验选取豚鼠和新西兰兔以 TDI 直接滴鼻建立模型，较好的保证了模型的稳定和可复制性。

结论 1：本实验发现豚鼠和新西兰兔于 15 d 内均可出现典型变应性鼻炎症状体征，模型组鼻粘膜见大量嗜酸性粒细胞浸润且组胺含量明显增高（与各自空白对照组比较 $P<0.01$），可见在 TDI 诱导下 2 种动物均能成功建模。结论 2：不同动物之间，成模各有特点。豚鼠于 1 周左右可成模，以抓鼻、喷嚏为典型表现，伴少量清涕，而鼻塞不明显，鼻黏膜嗜酸性粒细胞浸润程度及组胺含量明显高于新西兰兔。新西兰兔需 2 周方能成模，成模后典型表现为清涕、鼻塞，而抓鼻、喷嚏等症状及鼻黏膜嗜酸性粒细胞浸润程度和组胺含量均不如豚鼠明显。由此我们建议：如研究者欲了解某治疗方法对鼻痒、喷嚏等症状及鼻黏膜嗜酸性粒细胞浸润程度和组胺含量改善情况，推荐使用豚鼠模型；欲了解对清涕、鼻塞等症状改善情况，推荐使用新西兰兔模型。结论 3：本实验还发现：即使是相同动物，在不同剂量致敏原诱导下，成模过程也有较大差异。高剂量模型组，症状体征出现早，表现典型且持续时间长，但死亡率明显增高，致使实验成本、时间浪费大。建议使用低剂量模型组（豚鼠每次每侧鼻腔 5 μl，新西兰兔 0.1 ml）建模，其死亡率低，质量稳定，有利于后继操作。

动物死亡原因分析：（1）本实验高剂量组动物死亡率明显高于低剂量组，推测死亡原因与药物剂量相关。TDI 剂量超出动物上呼吸道吸收范围后，可能被动物吞咽，体内大量吸收致全身毒性反应，或者误吸入下呼吸道，直接对气道黏膜化学性毒物刺激，使气道反应性增高，引起急性炎症反应，气道分泌物增多，肺水肿，动物缺氧窒息。（2）尸体解剖及组织病理学检查发现：鼻黏膜、气管、支气管和肺组织均出现典型过敏性改变。动物死亡时间均发生于给药 2 h 后至第 2 d 早晨之间。可以推测，死亡原因与变态反应也具有一定相关性，且多为迟发性变态反应。



A（B 组鼻黏膜）、D（E 组鼻黏膜）：黏膜上皮脱落，黏膜下组织排列紊乱，组织间隙水肿明显，黏膜下小血管极度扩张，可见大量嗜酸性粒细胞为主的各种炎症细胞浸润。

B（B 组支气管黏膜）、E（E 组支气管黏膜）：黏膜上皮排列紊乱，部分上皮明显脱落残缺，黏膜下血管扩张充血，可见嗜酸性粒细胞、中性粒细胞等黏膜下浸润。

C（B 组肺组织）、F（E 组肺组织）：组织间隙淤血水肿，大量以嗜酸性粒细胞、中性粒细胞为主的炎症细胞浸润。

图 2　B、E 两组死亡动物鼻黏膜、支气管黏膜、肺组织病理学改变（HE×400）

参 考 文 献

[1] Tanka K, Okamoto Y. A nasal allergy model developed in the guinea pig by intranasal application of-2,4-toluene diisocyanate[J].Int Archs Allergy Appl Immun, 1988, 85(4): 392-397.

[2] 赵秀杰，董　震，杨占泉，等.鼻超敏反应实验模型的建立[J].中华耳鼻咽喉科杂志，1993，28(1)：17-18.

[3] Shore P A, Burk halter A, Cohn V H.A method for the fluorometric assay of histamine in tissues[J].J Pharmacol Exp Ther, 1959, 127: 182-186.

[4] 扬瑞嘉，黄志纯.变应性鼻炎动物模型的建立及评价[J].国际耳鼻咽喉头颈外科杂志，2007，31(2)：87-89.

[5] 施新猷，王四旺，顾为望，等.比较医学[M].西安：陕西科学技术出版社，2002.35.

（责任编辑：冉明会）