维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)04－0601－03

一种改良型小鼠哮喘模型方法的建立及评价

田代印[1],符　州[1],张　燕[2],王莉佳[1],迟　磊[1],李　睿[1],戴继宏[1],罗晓菊[1]

(1.重庆医科大学附属儿童医院免疫室,重庆　400014;2.重庆医科大学公共卫生学院统计教研室,重庆　400016)

【摘　要】目的:改良建立小鼠哮喘模型的方法并评价其效果。方法:清洁级 BALB/c 小鼠 20 只,随机分为模型组和对照组,模型组于第 0 和 14d 注射 OVA(卵清蛋白)致敏,第 21～25 天雾化吸入 5%OVA 激发,对照组用生理盐水替代。结果:模型组在激发过程中出现明显头面部瘙痒,呼吸加深加快,安静少动,弓背,前肢缩抬等哮喘急性发作表现。BALF(支气管肺泡灌洗液)中白细胞总数及嗜酸性粒细胞分类明显增多。血清及 BALF 中 IL－4 明显增高,INF－γ 下降,OVA 特异性 IgE 增高。肺组织病理切片见小支气管及伴行血管周围有较多炎症细胞浸润,可见大量嗜酸性粒细胞,杯状细胞增生,平滑肌增厚,部分肺泡间隔融合形成肺气肿。结论:通过对小鼠哮喘模型建立方法的改良,成功复制出小鼠哮喘发作的动物模型。

【关键词】哮喘;小鼠;动物模型

【中国图书分类法分类号】R322　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2004－12－09

A modified method in establishing mouse asthma model

TIAN Daiyin, et al

(*Laboratory for Clinical Immunology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish and assess a modified mouse asthma model. *Methods*: Clean female BALB/c mice were divided into 2 groups(n = 20, 10 for each group). The asthmatic group was sensitized by i. p. and i. n. with OVA aluminum potassium sulfate solution on day 0 and 14. Mice were challenged via the airways with OVA(5% in saline) for 14 days (from day 21 to 35) using ultrasonic nebulization. The control group received saline as the substitution of OVA. *Results*: The asthmatic group demonstrated the symptoms of acute asthma, such as scratching the head continuously, breathing deeply and fast, staying still, bowing the back, lifting the forelimbs, and so on. There were more leukocytes and eosinophils in the BALF of asthmatic group. In either blood or BALF, the levels of IL－4 and OVA specific IgE were significantly elevated while the IFN－γ level was lower in the asthmatic group, as compared with the control group. In asthmatic mice, inflammatory cell increased. The goblet cell hyperplasia, smooth muscle cell proliferation and pulmonary emphysema were much more serious in asthmatic mice than in control mice. *Conclusion*: This successful modified mouse asthma model may provide a necessary tool in the fundamental research of asthma.

【Key words】Asthma; Mouse; Animal model

鼠类动物模型一直是哮喘研究的重要手段和工具,目前国外多选用 BALB/c 小鼠来建立哮喘模型。遗憾的是,可能因各实验室条件不同,文献报道的哮喘模型建立方法在国内常不能成功复制。但因小鼠遗传背景清楚,所需试剂易购价廉,理应作为哮喘模型的良好选择。本实验结合文献报道,通过控制实验动物条件、改良致敏剂及致敏方法等,摸索出了一种新的、效果良好的小鼠哮喘模型建立方法。

1　材料与方法

1.1　实验动物

清洁级,雌性,BALB/c 小鼠 20 只,6～8 周龄,体重 20～22g,由重庆医科大学实验动物中心提供及代养。随机分为 2 组,每组 10 只。

1.2　主要试剂与仪器

卵清蛋白 OVA(Grade V, Sigma),硫酸铝钾(分析纯),PARIBOY 高频雾化器(CE, German),mIL－4 ELASA Kit (Bender, America),mIFN－γ ELASA Kit(武汉博士得),生物素化大鼠抗小鼠 IgE(BD, America),辣根过氧化物酶标记链亲合素(北京中杉生物试剂公司)

1.3　实验步骤

作者介绍:田代印(1977－　),女,博士生,
主要研究方向:儿童哮喘的发病机理和防治。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271380)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.3.1 动物致敏

致敏液配制:参照 Sc — Woong Oh 等[1]的方法,OVA 溶液(500μg/ml)加等量 10% 硫酸铝钾,混匀,10M NaOH 调 PH 值至 6.5,室温孵育 60min,离心 750g×15min,去上清使 OVA 仍保持原有浓度。

致敏方法:模型组于第 0,14 天两次致敏,途径采用腹腔+皮内注射相结合,0.2ml/只,即含 100μg OVA,多点注射。对照组则用生理盐水替代,注射部位及量相同。

1.3.2 动物激发

模型组于实验第 21 天起,将小鼠置于 20cm×20cm×15cm 的自制密闭容器中,以 5% OVA 雾化吸入激发,每次 30min,连续 14d。对照组小鼠行生理盐水雾化吸入,时间相同。

1.3.3 动物处置

最后一次激发后 48h 处死小鼠,留取血清,-20℃待检细胞因子。

1.3.4 支气管肺泡灌洗及白细胞计数

小鼠仰卧,用 22G 留置针行气管插管。结扎一侧主支气管,冷 PBS 灌洗,0.5ml×2,回吸率在 80% 以上。即刻 4℃冷冻离心 500g×5min。收集上清,-20℃待检细胞因子。吸取细胞沉渣,充板计白细胞总数,涂片,瑞氏染色,细胞分类计数。

1.3.5 统计学处理

实验结果以均数±标准差表示($\bar{x}\pm s$),采用 SAS8.1 统计分析软件包。行完全随机设计两样本 t 检验,若方差不齐则行近似 t 检验,$\alpha=0.05$。

2 结 果

模型组小鼠在雾化过程中出现明显的头面部瘙痒,呼吸加深加快,点头呼吸,安静少动,弓背,前肢缩抬,二便失禁等哮喘急性相表现。

肺病理:肉眼可见肺脏体积增大,有形状不规则的暗红色充血区。镜下可见支气管及伴行血管周围大量炎症细胞浸润,肺间质及肺泡腔内可见嗜酸性粒细胞,支气管管腔内可见粘液栓,粘膜皱壁减少,杯状细胞增生,血管平滑肌明显增生,部分肺泡间隔融合形成肺气肿(见图 1,2)。

模型组 BALF 中白细胞总数及嗜酸性粒细胞分类明显增加,与对照组相比,差异有显著性($P<0.001$)

模型组血清及 BALF 中,IL-4 明显升高,IFN-γ 明显下降,OVA 特异性 IgE 明显升高,与对照组相比,差异均有显著性($P<0.001$)。



图 1 对照组小鼠肺组织切片(HE×10)



图 2 模型组小鼠肺组织切片(HE×10)

表 1 小鼠最后一次激发后 48h BALF 中白细胞记数和分类

组别	n	白细胞数(10^6/L)	白细胞分类(%)			
			嗜酸	中性	淋巴	单核
模型组	10	34.10±10.78*	32.00±2.54*	25.60±2.54	23.20±1.30	19.20±2.86
对照组	10	1.87±0.99	0.60±0.24	35.60±2.61	31.40±2.30	32.40±1.67

注:与对照组比较 $P<0.001$*

表 2 小鼠最后一次激发后 48h 血清中细胞因子测定($\bar{x}\pm s$)

组别	n	细胞因子含量(pg/ml)		IL-4/IFN-γ	OVA-sIgE(OD 值)
		IL-4	IFN-γ		
模型组	10	8.930±0.860*	170.590±46.850*	0.052	0.617±0.056*
对照组	10	1.803±0.630	903.840-82.290	0.002	0.253±0.040

注:与对照组比较 $P<0.001$*

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 3 小鼠最后一次激发后 48h BALF 中细胞因子测定($\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞因子含量(pg/ml)		IL-4/IFN-γ	OVA-sIgE(OD 值)
		IL-4	IFN-γ		
模型组	10	29.22±2.58*	176.11±27.56*	0.166	0.469±0.090*
对照组	10	8.82±0.77	496.85±63.22	0.018	0.148±0.028

注:与对照组比较 $P<0.001$*

3 讨 论

由于哮喘病因非常复杂,其发病机制至今尚不十分清楚,许多研究需要通过动物模型进行,故成功的哮喘动物模型对哮喘病因及发病机理研究中有十分重要的意义。目前用于复制哮喘模型的主要有豚鼠、大鼠和小鼠。本实验未选用豚鼠和大鼠,主要基于豚鼠对 OVA 反应个体差异较大,且豚鼠的变态反应由 IgG 而非 IgE 介导,与人类不同[2]。大鼠哮喘模型重复稳定性欠佳,且实验所需试剂较难购得,故我们采用了遗传背景清楚且与人更为接近的近交系 BALB/c 小鼠作为哮喘模型的动物。致敏原仍选择常用的鸡卵清蛋白(OVA),因其为异种蛋白,有很强的抗原性和免疫原性,故通常作为致敏原。

本模型的具体改进处有:第一,严格筛选实验动物和改进饲养条件。参照文献报导,实验动物全部选择变态反应较易诱出的成年雌性小鼠,为了避免动物接触环境中可能存在的微量 OVA,本实验全部小鼠从母代即接受特殊饲料喂养。喂养严格按照清洁级动物标准进行,由动物中心专业人员饲养。第二,对致敏剂进行改良。实验中常用的致敏剂一般由抗原和佐剂组成,佐剂在增强 OVA 的抗原性及免疫应答方面起重要作用。文献中常用的佐剂为氢氧化铝,我们在实验中发现氢氧化铝与 OVA 不能很好混合,放置后出现明显分层。而佐剂与抗原混合的程度会对抗原的免疫原性的产生一定影响,故我们在 Se-Woong Oh 等[1]方法的基础上,用硫酸铝钾取代氢氧化铝,并用 10M 的氢氧化钠调节 PH 值,使蛋白质变性,两者形成混悬小球后充分混合,增强了 OVA 的致敏效果。第三,增加致敏部位和延长激发时间。Christina A. Herrick 等[3]研究发现皮肤是很重要的致敏部位,单纯腹腔致敏不能诱发 IL-13 所致的 TH2 类变态反应,故本实验采用腹腔注射和皮内注射相结合,多点致敏。另在激发时间上,由于哮喘的本质是气道的慢性变应性炎症,为了更好的模拟慢性炎症过程,故延长了雾化激发时间,采取连续激发 14d,每次 30min,以形成典型的变应性炎症。

从实验结果可以看到,模型组小鼠在雾化过程中出现了明显的类似人哮喘急性发作症状;肺组织病理切片可见大量炎症细胞浸润,嗜酸性粒细胞增多和肺气肿; BALF 中白细胞总数及嗜酸性粒细胞分类明显增加;血清及 BALF 中模型组 TH2 类细胞因子 IL-4 升高,TH1 类细胞因子 IFN-γ 下降,体现了哮喘 THI 功能降低,TH2 功能亢进的特征。以上均有力证明了经改良后的小鼠哮喘模型是成功的,该模型的建立可以为哮喘研究提供更好的选择工具。

参 考 文 献

[1] Se WO, Chong IP, Dong KL, et al. Tryptase Inhibition Blocks Airway Inflammation in a Mouse Asthma Model. The Journal of Immunology[J]. 2002;168,1992-2000.

[2] 崔龙苹,杨永清,陈汉平,等. 过敏性哮喘大鼠模型的制备[J]. 上海实验动物学. 2000;20(2):69.

[3] Christina AH, Lan X, Andrew NJM, et al. IL-13 Is Necessary, Not Simply Sufficient, for Epicutaneously Induced Th2 Responses to Soluble Protein Antigen. The Journal of Immunology[J]. 2003;170:2488-2495.