

· 实验研究 ·

尘螨过敏性哮喘小鼠模型的建立与评估

郭伟¹, 李孟荣², 肖建军³, 黄敏⁴

(1. 天津市儿童医院, 天津 300074; 2. 温州医学院附属育英儿童医院科研中心, 浙江 温州 325027;
3. 瑞安市人民医院, 浙江 瑞安 325200; 4. 温州医学院, 浙江 温州 325027)

[摘要] 目的 支气管哮喘(哮喘)的动物模型是研究人类哮喘的重要手段之一,但模型很难模拟人类哮喘的主要特点,而且因致敏原的不同影响了实验研究的意义。该文采用哮喘的常见致敏原尘螨抗原提取物(Derp)制作尘螨过敏性哮喘模型,并描述其气道炎症,评估其气道高反应性,尽可能与人类哮喘的病因及病变过程相似,以利于哮喘的实验研究。方法 C57BL/6J小鼠分为对照组和模型组,各6只,Derp两次腹腔注射致敏(day0, day10),麻醉后滴鼻激发隔日一次,共7次,空白对照组用生理盐水代替,末次激发后24 h检测气道高反应性(AHR),之后进行支气管肺泡灌洗,肺组织做病理检测(常规及特殊染色)。结果 模型组气道阻力增加幅度(Raw%)、动态肺顺应性下降幅度(Cdyn%)均增高($P < 0.01$),Raw增加25%时(PC25Raw),Cdyn下降15%时(PC15Cdyn)所需的MCh浓度均下降($P < 0.01$);肺泡灌洗液(BALF)中细胞总数、嗜酸细胞绝对值计数以及嗜酸细胞百分比均增加($P < 0.01$);模型组肺组织病理积分高于对照组($P < 0.01$),并且出现超微结构的改变,还可见杯状细胞,粘液及大量肥大细胞颗粒。结论 采用腹腔注射致敏并滴鼻激发的方法可以建立尘螨过敏性哮喘模型,具备了气道炎症及气道高反应性的特点。

[中国当代儿科杂志,2008,10(5):647-650]

[关键词] 尘螨;气道高反应性;哮喘;小鼠

[中图分类号] R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2008)05-0647-04

Preparation and evaluation of mouse model of house dust mite-induced asthma

GUO Wei, LI Meng-Rong, XIAO Jian-Jun, HUANG Min. Tianjin Children's Hospital, Tianjin 300074, China (Li M-R, Email: lmrjohn@163.com)

Abstract: Objective To prepare a mouse model of asthma by sensitizing and challenging with house dust mite allergen Derp and evaluate its reliability by measuring airway allergy inflammation and airway responsiveness. **Methods** Twelve C57BL/6J mice were randomly divided into two groups: control and asthma model. Mice of the asthma model group were sensitized by intraperitoneal injection of house dust mite allergen Derp on the first and tenth days of the experiment. From the 17th day, the mice were challenged by intranasal Derp, once every other day, seven times. The control group was treated with normal sodium instead of Derp. Twenty-four hours after the last challenge, airway responsiveness was evaluated. Bronchoalveolar lavage and histological examination of the lung were performed. **Results** Airway resistance increased and dynamic lung compliance decreased significantly in the asthma model group as compared to the control group ($P < 0.01$). When airway resistance increased by 25% and dynamic lung compliance decreased by 15%, the required metacholine concentration in the asthma model group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.01$). In the bronchoalveolar lavage fluid of the asthma model group, the number of total cells, absolute number of eosinophils (EOS) and the percentage of EOS in the total cell were significantly higher than those in the control group ($P < 0.01$). Pulmonary pathological scores in the asthma model group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.01$). The asthma model group showed ultrastructural changes of bronchial and pulmonary arterioles. Goblet cells, mastocyte granules, and increased mucus were observed in the lung tissues of the asthma model group. **Conclusions** A mouse model of asthma was prepared by sensitizing and challenging with house dust mite allergen Derp, with the characteristics of airway allergy inflammation and airway hypersensitivity reaction.

[Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10 (5):647-650]

Key words: House dust mite; Airway hypersensitivity reaction; Asthma; Mice

支气管哮喘的病理形态学基础是由嗜酸性粒细胞、肥大细胞、T淋巴细胞和中性粒细胞等多种炎性细胞及细胞组分参与的慢性气道炎症,并由此引起气道高反应性(AHR),从而导致气道阻塞、

[收稿日期]2008-03-17;[修回日期]2008-04-24
[作者简介]郭伟,男,硕士,医师。主攻方向:儿科呼吸。
[通讯作者]李孟荣,男,教授,主任医师,温州医学院附属育英儿童医院,邮编:325027。

气流受限。目前对哮喘病因、发病机制、治疗药物的研究离不开动物模型。据统计资料表明,人群中支气管哮喘(哮喘)的患病率为1.1%~9.9%,其中80%左右哮喘患者对尘螨过敏^[1],所以尘螨模型与人类的哮喘有更多的相似之处,动物模型的建立显得更加重要。本文参考国外文献^[2],用尘螨抗原(Derp)致敏激发建立模型,观测气道反应性,肺组织病理改变等指标。

1 材料与方法

1.1 动物和试剂

清洁级C57BL/6J雌性小鼠12只,6~8周,体重18~22 g,购自上海必凯实验动物有限责任公司。饲养温度23~26℃,相对湿度60%~70%,昼夜照明12/12 h。Derp购自美国Greer公司(XPB70-X29)。

1.2 模型的建立

对照组用生理盐水,模型组用尘螨抗原提取物/氢氧化铝(20 μg/2 mg)于第0天、第10天腹腔注射(i. p.)致敏,第17天开始激发,隔日一次,共7次。模型组小鼠麻醉后用尘螨抗原50 μL滴鼻(i. n.)激发,浓度为4 mg/mL,对照组用生理盐水代替。

1.3 气道高反应性检测

采用Med-lab U(南京美易科技有限公司提供)生物信号采集分析系统,首先对系统进行定标,定标过程是确定系统输出与输入的对应关系。对应关系包括零点和变化比例。零点调整是把输入为零时的输出值设置为零。实验过程中,根据定标过程确定的零点和变化率,可以精确地计算输入端的实际数值。

小鼠末次激发后24 h,腹腔注射25%乌拉坦麻醉,5 mL/kg,行气管插管并固定,分离一侧颈外静脉行静脉插管并固定,另外在小鼠右前胸4~5肋间行胸膜腔插管。然后,将小鼠放入体积描记器里。主要记录指标:潮气量(VT),跨肺压(Ptp),气道流速($\dot{V}$),记录基础值,然后将不同浓度的乙酰甲胆碱MCh(0.5,1,2,4,8 μg/mL),0.5 mL/kg,通过静脉给药,观察潮气量、跨肺压和气道流速的变化情况。并比较气道阻力(Raw)和肺动态顺应性(Cdyn)的变化,Raw是气流通过呼吸道时在吸气、呼气过程中肺处于等容量下,其等于推动压力与流速之比(Ptp/ $\dot{V}$)。Cdyn是指呼吸运动中当气流速度为零时的潮气量与跨肺压之比,即Cdyn = VT/ Ptp。将给药后的Raw、Cdyn与给药前的基础Raw、Cdyn相

比较,得到在不同浓度的MCh下气道阻力与肺顺应性的变化,比较Raw增加25%,Cdyn下降15%时所需的MCh浓度,分别用PC25Raw和PC15Cdyn表示。

1.4 BALF中细胞计数

将BALF的沉渣用1 mL PBS液重悬,用细胞计数板计数细胞总数,少量的红细胞不计入总数,取0.02 mL PBS重悬液用嗜酸细胞计数液做EOS绝对值计数,所有细胞计数工作均由一专人完成。

1.5 光镜标本制作及观察

石蜡包埋后的左肺组织,切片,4 μm厚,常规苏木精-伊红染色,观察支气管及血管周围的炎症细胞浸润情况,有无水肿,上皮损伤等情况,并予以评分^[3~5]。AB-PAS染色,观察杯状细胞增生及黏液分泌情况,红色表示中性黏液,蓝色表示酸性黏液,紫红色表示中性和酸性的混合物。甲苯胺蓝染色观察肥大细胞及其颗粒。

1.6 电镜标本的制作及观察

快速取近左肺门组织约1 mm×1 mm×1 mm大小,用冷的2.5%戊二醛作前固定,再用1%的锇酸后固定,半薄切片定位,EPON812包埋,超薄切片机切片,H-7500型透射电镜观察是否出现肺泡Ⅱ型上皮细胞结构的改变,是否出现板层体空泡化和排空现象,EOS和中性粒细胞等炎症细胞的浸润,肥大细胞及杯状细胞的改变,纤毛结构的变化,肺泡隔增厚和基底膜增厚。

1.7 统计学处理

统计分析采用SPSS11.5软件完成。用 t 检验统计。

2 结果

2.1 气道反应性

2.1.1 小鼠Raw的检测 静脉注射不同浓度MCh后,小鼠的Raw逐渐增大,模型组增大的幅度显著高于对照组($P<0.01$),(表1)。

2.1.2 小鼠Cdyn的检测 静脉注射不同浓度MCh后,各组小鼠的Cdyn逐渐缩小,模型组减小的幅度显著大于对照组($P<0.01$),(表2)。

2.1.3 小鼠PC25Raw、PC15Cdyn的检测 模型组PC25Raw、PC15Cdyn均显著低于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$,表3)。

2.2 BALF中细胞总数和EOS绝对值计数的比较

模型组BALF中细胞总数、EOS绝对值计数和EOS占细胞总数的百分比(EOS%)均显著高于对照组($P<0.01$,表4)。

表 1 MCh 激发后小鼠 Raw 增加幅度 (x̄±s)

组别	鼠数	MCh 浓度(μg/mL)				
		0.5	1	2	4	8
对照组	6	15.83±3.96	17.41±3.24	18.82±5.39	27.75±4.11	35.71±5.49
模型组	6	20.64±2.47 ^a	37.16±7.78 ^b	43.92±8.68 ^b	62.04±6.04 ^b	81.31±13.81 ^b

a: 与对照组比较, *P* < 0.05, b: *P* < 0.01

表 2 MCh 激发后小鼠 Cdyn 下降幅度 (x̄±s)

组别	鼠数	MCh 浓度(μg/mL)				
		0.5	1	2	4	8
对照组	6	7.26±2.00	9.77±1.68	10.75±2.85	13.82±1.27	22.27±3.66
模型组	6	10.82±2.35 ^a	15.09±3.11 ^b	29.15±4.29 ^b	34.25±4.32 ^b	43.02±7.50 ^b

a: 与对照组比较, *P* < 0.05; b: *P* < 0.01

表 3 小鼠 PC25Raw 和 PC15Cdyn 的比较 (x̄±s)

组别	鼠数	PC25Raw(μg/mL)	PC15Cdyn(μg/mL)
A 组	6	3.67±1.50	4.60±0.59
B 组	6	0.66±0.14 ^a	1.22±0.14 ^b

a: 与 A 组比较, *P* < 0.05, b: *P* < 0.01

表 4 小鼠 BALF 中细胞总数、EOS 绝对值计数
和 EOS 占细胞总数的百分比的比较 (x̄±s)

组别	鼠数	细胞总数	EOS 绝对 计数(×10 ⁹ /L)	EOS 占细胞总数 的百分比(EOS%)
对照组	6	0.25±0.04	0	0
模型组	6	3.25±0.56 ^a	81.33±25.63 ^a	24.97±6.66 ^a

a: 与对照组比较, *P* < 0.01

2.3 肺组织病理改变

2.3.1 对照组小鼠肺组织病理改变 肺组织结
构完整,各级支气管腔规则,黏膜上皮完整无脱落,

支气管及血管周围未见炎症细胞浸润,细支气管平
滑肌未出现增殖等情况,无明显的杯状细胞未见黏
液栓,未见明显的肥大细胞颗粒(图 1)。

2.3.2 模型组小鼠肺组织病理改变 大体观察:
肉眼可见小鼠肺脏呈轻度均匀性膨大,色发白、浑
浊,有多处不规则的暗红色充血区,切面有白色粘稠
的分泌物渗出。

镜下观察:肺组织切片苏木精-伊红染色可见支
气管及血管周围炎性细胞浸润,以 EOS、淋巴细胞和
中性粒细胞为主,肺间质及肺泡腔内也可见炎性细
胞浸润,气道上皮多处断裂或脱落,纤毛细胞消失、
上皮纤毛改变,亦可见黏液细胞,基底膜轻度增厚且
形态不规则,细支气管平滑肌轻度肥大,支气管管壁
轻度增厚。杯状细胞增多,大量黏液分泌,肺组织内
可见大量的肥大细胞颗粒(图 2)。

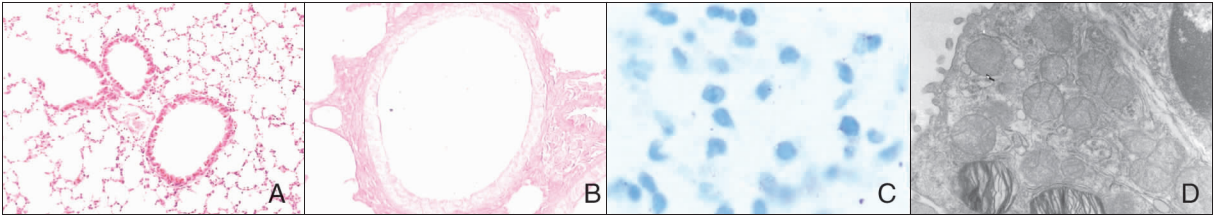


图 1 对照组小鼠肺组织切片。A:肺组织结构完整,管腔规则(苏木精-伊红染色×100); B:小鼠支气管内无大量黏液分泌,未见杯状细胞增生(AB-PAS 染色×200); C:未见明显的肥大细胞; D:电镜显示正常的肺泡Ⅱ型上皮细胞(×20 000)。

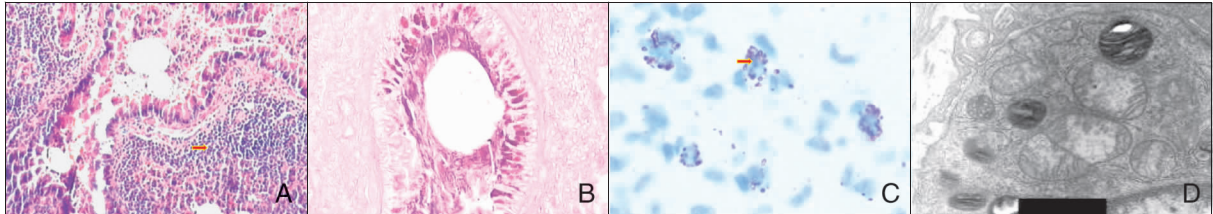


图 2 哮喘组小鼠肺组织切片。A:支气管周围有大量炎症细胞浸润(苏木精-伊红染色×100); B:小鼠肺组织显示支气管大量黏液分泌及杯状细胞增生(AB-PAS 染色×200); C:可见明显的肥大细胞及其颗粒(箭头所示); D:电镜显示脱落的肺泡Ⅱ型上皮细胞线粒体空泡(×20 000)。

2.3.3 肺组织治疗病理评分 血管周围、支气管周围 EOS 及水肿、上皮损伤,模型组均重于对照组(表 5)。

表 5 肺组织炎症病理评分 (x±s)				
组别	血管周围 EOS	支气管周 EOS	水肿	上皮损伤
对照组	0.00±0.00	0.00±0.00	0.30±0.10	0.33±0.08
模型组	3.83±0.75 ^a	3.43±0.50 ^a	3.67±0.55 ^a	3.83±0.65 ^a

a:与对照组比较,P<0.01

2.4 小鼠支气管及肺细小动脉超微结构改变

电镜下发现,对照组小鼠支气管纤毛上皮细胞纤毛排列整齐,肺泡隔结构正常;肺泡Ⅱ型上皮细胞,可见板层小体,表面微绒毛丰富,见图 1D;静息状态下的单核吞噬细胞,细胞浆内含有许多溶酶体,以初级溶酶体为主,表面凸起不明显,表面光滑伪足不多,吞噬不活跃;未见嗜酸性粒细胞和淋巴细胞的浸润。哮喘组小鼠支气管纤毛上皮细胞纤毛排列稀疏,纤毛正常结构缺失,部分有融合现象。巨噬细胞内可见次级溶酶体;毛细血管内可见嗜酸性粒细胞附壁现象,支气管壁、肺间质和肺泡腔中可见多个 EOS,胞浆内可见丰富的嗜酸性颗粒;可见脱落的肺泡Ⅱ型上皮细胞,表面微绒毛减少,胞质水肿,内含空泡的线粒体,见图 2D。肺泡隔内胶原纤维增多,肺泡隔增厚。可见肥大细胞及其颗粒;支气管壁可见胞浆内有大量黏液颗粒的杯状细胞。

3 讨论

支气管哮喘其发病机制复杂,有大量的学说,其中炎症假说已得到大家的认可,GINA2002 版中已明确提出哮喘是一种慢性炎症性疾病。而且气道炎症是气道高反应性的病理基础,大多数模型的评估也是根据气道高反应性和嗜酸粒细胞炎症作为观察指标。本研究采用同源突变近交系小鼠——C57BL/6J,其遗传背景清楚,较稳定,可重复性强,试剂多,便于哮喘炎症变化及 AHR 产生的免疫学和遗传学研究。本模型制作参照国内外文献,即腹腔内注射尘螨抗原致敏,同时给予佐剂氢氧化铝,采用滴鼻激发制作。本实验制作的小鼠尘螨模型具有哮喘的基本特征:具有气道的炎症及气道高反应性。这与文献^[6]报道的模型基本相似,此外我们还评估了气道高反应性,描述了超微结构的改变。

本实验采用体积描记法测定气道阻力(Raw)、

动态肺顺应性(Cdyn)、PC15Cdyn 和 PC25Raw 来评价气道反应性状况,使用 MCh 静脉给药作为激发方法,Raw 反应大气道的功能状态,其增大反应了平滑肌痉挛,黏膜充血水肿,粘液分泌增加,Cdyn 反应肺组织的弹性状况,其下降提示小气道有阻塞,二者结合可以反应小鼠的通气功能状况。实验结果表明哮喘组与正常对照组比较 AHR 明显升高。

国内外的类似模型并不多见,多采用 OVA 建立模型,而且动物选择、制作方法、指标检测等均有所差别。文献^[7]采用两次腹腔注射致敏,但本文在激发时延长了激发时间,能更好的使模型的气道反应性增高。同时对气道呼吸力学指标进行测定,在气道炎症方面本文不但做了常规病理,特殊细胞染色,而且还进行电镜检测,尽可能从多方面阐明哮喘模型的病理变化,加之同时评估了气道高反应性,使模型的特点进一步与人类的哮喘特点相似。我们建立的尘螨哮喘小鼠模型具有多种细胞参与的气道炎症和 AHR 特征,而且气道高反应性检测方法可以反应气道的高反应状态,表明该模型建立成功,适用于哮喘的基础研究。

[参 考 文 献]

[1] Takai T, Mineki R, Nakazawa T, Takaoka M, Yasueda H, Murayama K, et al. Maturation of the activities of recombinant mite allergens Der p 1 and Der f 1, and its implication in the blockade of proteolytic activity [J]. FEBS Lett, 2002, 531(2): 265-272.

[2] Clarke AH, Thomas WR, Rolland JM, Dow C, O'Brien RM. Murine allergic respiratory responses to the major house dust mite allergen Der p 1[J]. Int Arch Allergy Immunol, 1999, 120(2): 126-134.

[3] Underwood S, Foster M, Raeburn D, Bottoms S, Karlsson JA. Time-course of antigen-induced airway inflammation in the guinea-pig and its relationship to airway hyperresponsiveness[J]. Eur Respir J, 1995, 8(12):2104-2113.

[4] Sur S, Lam J, Bouchard P, Sigounas A, Holbert D, Metzger WJ. Immunomodulatory effects of IL-12 on allergic lung inflammation depend on timing of doses[J]. J Immunol, 1996, 157(9):4173-4180.

[5] Ashcroft T, Simpson JM, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale[J]. J Clin Pathol, 1988, 41(4):467-470.

[6] 郝敏麒,徐军,钟南山.尘螨致敏小鼠肺部变应性炎症模型的建立[J].中国病理生理杂志,2003,19(1):139-141.

[7] Ahn JH, Kim CH, Kim YH, Kim SJ, Lee SY, Kim YK, et al. Inflammatory and remodeling events in asthma with chronic exposure to house dust mites: a murine model[J]. J Korean Med Sci, 2007, 22(6):1026-1033.

(本文编辑:吉耕中)