

高琴琴,丁子桐,李友林,等. 不同剂量卵蛋白诱发 BALB/c 小鼠支气管哮喘模型的比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29 (4): 52 – 57.

Gao QQ, Ding ZT, Li YL, et al. Comparison of asthma models induced by different doses of ovalbumin in BALB/c mice [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(4): 52 – 57.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 04. 009

不同剂量卵蛋白诱发 BALB/c 小鼠支气管哮喘模型的比较

高琴琴¹, 丁子桐¹, 李友林², 史琦², 苗丰¹,
石璐¹, 楚慧伦¹, 孔德明¹, 孙文燕^{1*}

(1.北京中医药大学中药学院中药药理系, 北京 102488; 2. 中日友好医院中医肺病二部, 国家中医药管理局重点研究室(肺病慢性咳嗽), 中医药防治过敏性疾病北京市重点实验室(BZ0321), 中日友好医院呼吸中心; 国家呼吸疾病临床研究中心, 北京 100029)

【摘要】目的 探讨不同剂量卵蛋白(ovalbumin, OVA)对 BALB/c 小鼠支气管哮喘模型血清 IgE、IL-4、IFN- γ 含量、支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)嗜酸性粒细胞(eosinophils, EOS)数量及肺组织病理学的影响,初步确定较为合适的 OVA 造模剂量。方法 BALB/c 小鼠随机分为正常组,模型 1 组(OVA 20 μ g),模型 2 组(OVA 50 μ g),模型 3 组(OVA 100 μ g),醋酸地塞米松组(OVA 100 μ g)。除正常组外,其余各组小鼠分别腹腔注射相应剂量 OVA 致敏,并以 1% OVA 雾化激发,建立支气管哮喘模型。ELISA 法检测血清 IgE、IL-4、IFN- γ 含量,瑞氏染色计算 BALF 中 EOS 数目,HE 染色观察肺组织病理学变化。结果 与正常组相比,各组小鼠血清 IgE、IL-4、IFN- γ 及 BALF 中 EOS 均显著增加($P<0.05$),肺组织中均出现炎性细胞浸润、支气管上皮细胞变性、支气管平滑肌细胞增生等病理改变,在 IgE、IL-4、IFN- γ 含量及肺组织病理变化方面以 OVA 50 μ g 组小鼠更为明显。结论 三种剂量 OVA 均可成功诱发 BALB/c 小鼠出现哮喘,综合而言 50 μ g OVA 所诱发的哮喘模型更为明显,推荐作为 BALB/c 小鼠哮喘模型的适宜造模剂量。

【关键词】支气管哮喘;动物模型;卵蛋白;BALB/c 小鼠

【中图分类号】R-33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856(2019) 04-0052-06

Comparison of asthma models induced by different doses of ovalbumin in BALB/c mice

GAO Qinqin¹, DING Zitong¹, LI Youlin², SHI Qi², MIAO Feng¹,
SHI Lu¹, CHU Huilun¹, KONG Deming¹, SUN Wenyan^{1*}

(1. School of Chinese Materia Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China.
2. The Second Department of Traditional Chinese Medicine for Lung Disease, China-Japan Friendship Hospital, the Key Unit of SATCM Pneumonopathy Chronic Cough and Dyspnea, Beijing Key Laboratory of Prevention and Treatment of Allergic Diseases by Traditional Chinese Medicine (BZ0321), China-Japan Friendship Hospital Respiratory Center; National Respiratory Disease Clinical Research Center, Beijing 100029)

[基金项目]北京市科学技术委员会“十病十药”研发专项课题(Z161100001816004)。

[作者简介]高琴琴(1992—),女,在读硕士生,研究方向:中药抗炎免疫药理。E-mail: 20160931903@bucm.edu.cn

[通信作者]孙文燕(1970—),男,博士,副教授,硕士生导师,主要研究方向:中药防治免疫性疾病的药理学研究及中药毒理学研究。
E-mail: sunwy@bucm.edu.cn

[Abstract] Objective To investigate the effects of different doses of ovalbumin (OVA) on the serum levels of IgE, IL-4, and IFN- γ , on the number of eosinophils (EOS) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), and on lung histopathology in the BALB/c mice with bronchial asthma, to determine the optimal OVA dose. **Methods** BALB/c mice were randomly divided into a normal group, model 1 group (OVA 20 μg), model 2 group (OVA 50 μg), model 3 group (OVA 100 μg), and dexamethasone acetate group (OVA 100 μg). In addition to the normal group, the other groups of mice were sensitized by intraperitoneal injection of the corresponding doses of OVA, and stimulated by 1% OVA atomization to establish bronchial asthma models. The serum levels of IgE, IL-4, and IFN- γ were determined by ELISA. The number of EOS in BALF was calculated by Wright staining, and the pathological changes of lung tissue were observed by HE staining. **Results** Compared with the normal group, the serum levels of IgE, IL-4, and IFN- γ and EOS in BALF were significantly increased in all groups ($P < 0.05$). Inflammatory cell infiltration, bronchial epithelial cell degeneration, bronchial smooth muscle cell hyperplasia, and other pathological changes were observed in the lung tissues. Especially, in the OVA 50 μg group, the changes in the IgE, IL-4, and IFN- γ levels and lung histopathological changes were more pronounced. **Conclusions** All the three doses of OVA can induce asthma in BALB/c mice successfully, and the asthma model induced by 50 μg of OVA had more pronounced alterations. It is recommended that 50 μg of OVA be used as the appropriate dosage for establishing an asthma model in BALB/c mice.

[Keywords] bronchial asthma; animal model; ovalbumin; BALB/c mice

支气管哮喘是由多种炎性细胞及细胞组分参与的气道慢性炎症性疾病,是常见的慢性呼吸道疾病之一。该病严重威胁人们健康,且目前尚缺乏根治药物。动物模型是药物评价的重要工具,卵蛋白 (ovalbumin, OVA) 致敏激发法是最常用的建立模型方法,但造模剂量不尽一致。许多哮喘模型 OVA 致敏剂量多在 10~100 μg 不等,其中以 20、50、100 μg 最为常见,但国内外对不同致敏剂量的造模小鼠进行对比的研究很少,且关于最佳 OVA 致敏剂量并无明确的报道。本研究基于文献^[1-3],采用常用的三种剂量 (20、50、100 μg) OVA 复制 BALB/c 小鼠哮喘模型,通过观察血清 IgE、IL-4、IFN- γ 的含量、支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 嗜酸性粒细胞 (eosinophils, EOS) 数量及肺组织病理变化情况,以探索较为合适的 OVA 剂量。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 6~8 周龄 BALB/c 小鼠 50 只,体重 18~20 g,雌雄各半,由斯贝福 (北京) 生物技术有限公司提供 [SCXK (京) 2016-0002]。动物饲养于中日友好医院屏障环境中 [SYXK (京) 2016-0043], 温度 22℃~24℃,湿度 44%~50%。本实验方案经过中日友好医院实验动物福利伦理委员会审查,符合动物保护、动物福利和伦理原则,符合国家实验动物福利伦理相关规定,审查编号: 180105。本实验实施

过程中严格遵守动物使用的 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

卵蛋白,北京博奥森生物技术有限公司,批号 AH06C17666;4% 氢氧化铝凝胶, Thermo 公司,批号:SH255260;醋酸地塞米松,天津力生制药股份有限公司,批号:1705021;小鼠 IgE、IL-4、IFN- γ 酶联免疫试剂盒,联科生物。

402B 型超声雾化器,江苏鱼跃医疗设备股份有限公司; Multiskan MK3 全自动多功能酶标仪, Thermo 公司, USA; DH4000 A 电热恒温培养箱,天津泰斯特。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组

随机将动物分为 5 组,即正常组,模型 1 组 (OVA 20 μg),模型 2 组 (OVA 50 μg),模型 3 组 (OVA 100 μg),醋酸地塞米松组 (OVA 100 μg),每组 10 只,雌雄各半。

1.3.2 哮喘模型的复制

BALB/c 小鼠适应性饲养一周,采用 OVA 和氢氧化铝凝胶腹腔注射及 OVA 雾化激发方法建立支气管哮喘模型。具体方法及时间节点见表 1。

在第 22~28 天,各模型组与醋酸地塞米松组每天雾化吸入 1% OVA 30 min,正常组每天雾化吸入生理盐水 30 min。醋酸地塞米松组在雾化前 1 h 灌胃给药醋酸地塞米松 (0.5 mg/kg),其余各组灌胃生理盐水。

表 1 BALB/c 小鼠支气管哮喘模型建立方法($n=10$)
Table 1 Method of establishing BALB/c mouse model of bronchial asthma

组别 Groups	腹腔注射致敏(第 1、8、15 天) Sensitization by intraperitoneal injection (1, 8, 15 days)			雾化激发(第 22~28 天) Atomization excitation (22~28 days)
	OVA 剂量(μg) OVA dose	氢氧化铝凝胶(mg) Aluminium hydroxide gel	生理盐水(mL) Normal saline	OVA 浓度 OVA concentration
正常组 Normal group	—	—	0.2	—
模型 1 组 Model 1 group	20	2	0.2	1%
模型 2 组 Model 2 group	50	4	0.2	1%
模型 3 组 Model 3 group	100	4	0.2	1%
醋酸地塞米松组 Dexamethasone acetate group	100	4	0.2	1%

1.3.3 血清 IgE、IL-4、IFN- γ 的含量测定
第 29 天,各组小鼠眼球取血,3000 r/min 离心 10 min,取血清,采用 ELISA 法检测血清中 IgE、IL-4、IFN- γ 的含量。实验步骤严格按照说明书进行操作。

1.3.4 支气管肺泡灌洗液(BALF)EOS 计数
钝性分离颈部组织,暴露气管,在气管上剪一个 T 型小口,插入静脉留置针软管,用注射器注入 0.8 mL 生理盐水,重复 3 次。将收集到的 BALF 2500 r/min 离心 5 min,将沉淀涂片,进行瑞氏染色,高倍镜下计数 EOS。

1.3.5 肺组织病理学观察
取小鼠右肺,福尔马林固定 24 h,脱水后石蜡包埋、切片、HE 染色。每组随机选取 6 只,在光学显微镜下(200 倍)观察小鼠肺组织的病理变化。

1.4 统计学方法
所有数据均以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SAS 9.2 统计软件处理。对正常组、模型 1 组、模型 2 组、模型 3 组进行多组间比较;若数据服从正态分布且方差齐采用方差分析,若不服从正态分布或方差不齐采用非参数检验,以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 为差异有统计学意义。

对模型 3 组、醋酸地塞米松组进行两组间差异性比较;若服从正态分布且方差齐采用 t 检验;数据不服从正态分布或方差不齐采用非参数检验。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果
2.1 一般情况观察
BALB/c 小鼠在致敏时无显著特征,经卵蛋白激发后出现呼吸急促、弓背直立、躁动挠鼻、二便失禁等典型表现。

2.2 各组小鼠血清中 IgE、IL-4、IFN- γ 含量比较
与正常组比较,模型 1、2、3 组小鼠血清 IgE、IL-4、IFN- γ 含量均明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),IL-4/IFN- γ 比值显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型 3 组比较,醋酸地塞米松组血清 IgE、IFN- γ 含量明显下降($P<0.05$),IL-4/IFN- γ 比值显著升高($P<0.05$)。见表 2。

2.3 各组小鼠肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞计数
与正常组比较,模型 1、2、3 组小鼠 BALF 中 EOS 数明显升高($P<0.05$);与模型 3 组相比,醋酸泼尼松组 BALF 中 EOS 数有下降趋势($P>0.05$)。见表 3。

2.4 肺组织病理学观察
三种不同剂量的卵蛋白均可造成小鼠肺组织炎症细胞浸润、淋巴滤泡形成、支气管上皮细胞变性、支气管平滑肌增生等病理损害。模型 2 组(OVA 50 μg)较模型 1 组(OVA 20 μg)、3 组(OVA 100 μg)支气管平滑肌增生及黏膜皱襞损伤更为严重。醋酸地塞米松组较模型 3 组上述病理损害明显减轻。见表 4,图 1。

表 2 各组小鼠血清中 IgE、IL-4、IFN-γ 含量及 IL-4/IFN-γ 比值比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 2 Comparison of the serum IgE, IL-4, IFN-γ, and IL-4/IFN-γ ratio in each group					
组别 Groups	剂量 Dose(mg/kg)	IgE(ng/mL)	IL-4(pg/mL)	IFN-γ(pg/mL)	IL-4/IFN-γ
正常组 Normal group	—	128. 07±60. 97	9. 82±2. 31	13. 74±12. 23	1. 52±1. 49
模型 1 组 Model 1 group	—	425. 67±253. 83 ^{△△}	17. 43±6. 43 ^{△△}	145. 334±141. 94 ^{△△}	0. 48±0. 71 ^{△△}
模型 2 组 Model 2 group	—	738. 09±383. 59 ^{△△}	33. 29±49. 82 ^{△△}	227. 03±287. 27 ^{△△}	0. 53±0. 67 [△]
模型 3 组 Model 3 group	—	698. 00±238. 08 ^{△△}	27. 16±40. 69 [△]	175. 23±152. 41 ^{△△}	0. 20±0. 13 ^{△△}
醋酸地塞米松组 Dexamethasone acetate group	0. 5	512. 60±169. 22 [*]	13. 56±4. 83	62. 15±68. 18 [*]	0. 44±0. 36 [*]

注:与正常组比较, [△] $P<0. 05$, ^{△△} $P<0. 01$;与模型 3 组比较, ^{*} $P<0. 05$, ^{**} $P<0. 01$ 。
Note. Compared with the normal group, [△] $P<0. 05$, ^{△△} $P<0. 01$. Compared with the model 3 group, ^{*} $P<0. 05$, ^{**} $P<0. 01$.

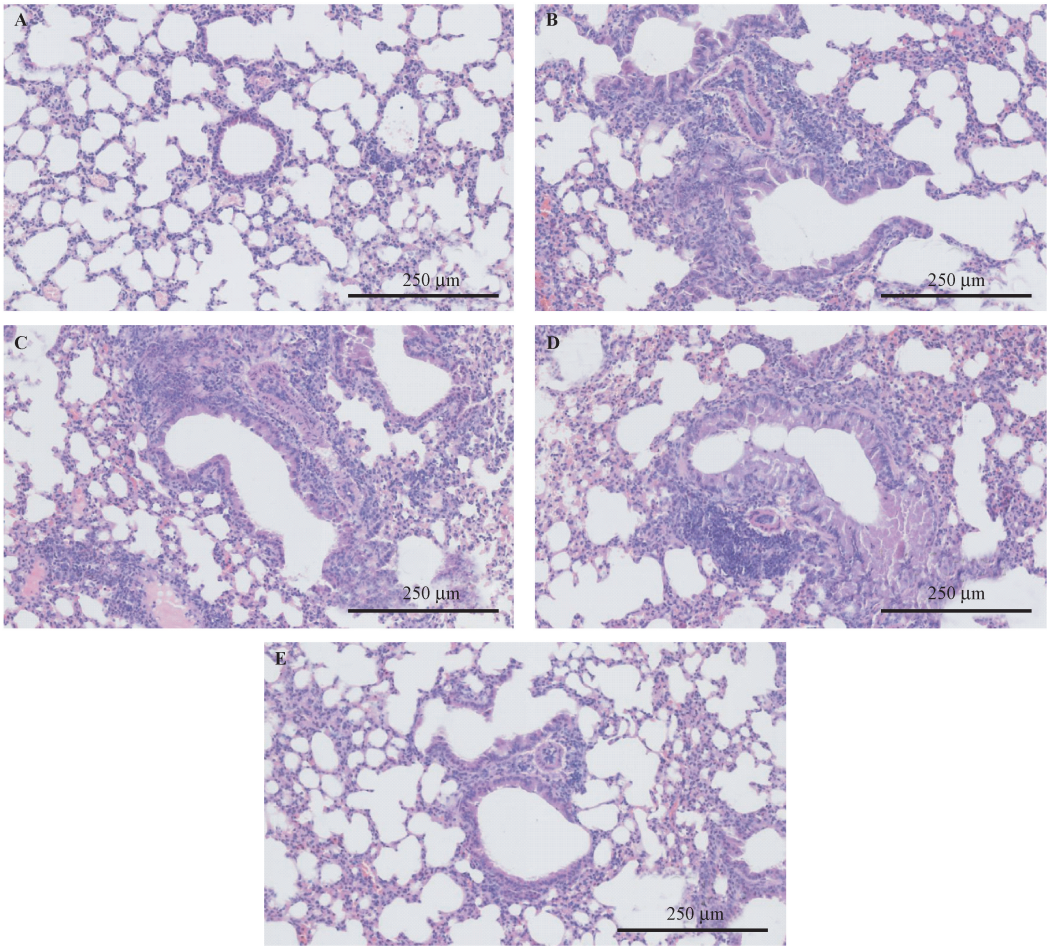
表 3 各组小鼠 BALF 中 EOS 数量比较($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Comparison of EOS numbers in BALF of each group

组别 Groups	n	嗜酸性粒细胞数 Eosinophil count
正常组 Normal group	8	0. 32±0. 41
模型 1 组 Model 1 group	10	1. 62±2. 08 [△]
模型 2 组 Model 2 group	10	1. 44±1. 15 [△]
模型 3 组 Model 3 group	8	0. 70±0. 39 [△]
醋酸地塞米松组 Dexamethasone acetate group	10	0. 56±0. 47

注:与正常组比较, [△] $P<0. 05$ 。
Note. Compared with the normal group, [△] $P<0. 05$.

表 4 各组小鼠肺组织病理变化比较
Table 4 Comparison of pathological changes in the lung tissue of mice in each group

组别/病理特征 Groups/pathological characteristics	支气管及血管 周围炎细胞浸润 Bronchial and perivascular inflammatory cell infiltration	淋巴滤泡 Lymphoid follicle	间质及肺泡 腔炎胞浸润 Interstitial and alveolar inflammatory cell infiltration	支气管管 腔内黏液栓 Bronchial intraluminal mucus plug	黏膜皱襞 Mucosal folds	上皮细胞变性 Epithelial degeneration	支气管平滑肌增生 Bronchial smooth muscle hyperplasia
正常组 Normal group	极少量 Very few	未见 Not yet seen	未见 Not yet seen	未见 Not yet seen	正常 Normal	正常 Normal	正常 Normal
模型 1 组 Model 1 group	中等量 Medium equivalent	可见 Visual	可见 Visual	可见 Visual	正常 Normal	轻度 Mild	轻度 Mild
模型 2 组 Model 2 group	中等量 Medium equivalent	可见 Visual	可见 Visual	可见 Visual	变平 Flatten	轻度 Mild	明显 Obvious
模型 3 组 Model 3 group	大量 Massive	可见 Visual	可见 Visual	可见 Visual	较正常 More normal	轻度 Mild	轻度 Mild
醋酸地塞米松组 Dexamethasone acetate group	少量 A few	减轻 Alleviated	可见少量 A few	减轻 Alleviated	明显 Obvious	减轻 Alleviated	不明显 Not obvious



注:A:正常组; B:模型 1 组; C:模型 2 组; D:模型 3 组; E:醋酸泼尼松组。

图 1 各组哮喘小鼠肺组织病理观察(×200)

Note. A, Normal group. B, Model 1 group. C, Model 2 group. D, Model 3 group. E, Dexamethasone acetate group.

Figure 1 Pathological observation of lung tissue in each group of the asthmatic mice

3 讨论

哮喘的发病机制复杂,动物模型的不断研究及优化为进一步研究其发病机制提供客观有效的手段。目前用于制作哮喘模型的动物多采用 BALB/c 小鼠^[3],常用的模型制备方法是采用 OVA 和氢氧化铝致敏及 OVA 雾化吸入激发,但采用 OVA 制作哮喘模型的方法存在很大的差异,致敏剂量多在 10~100 μg 不等,国内外关于最佳 OVA 致敏剂量并无明确的报道,综合近五年的文献,多使用 20、50、100 μg 的 OVA 进行致敏。如房祥峰^[4],刘家齐等^[5]采用 20 μg OVA 辅以氢氧化铝致敏小鼠;张明强^[2],刘瑞等^[6]采用 50 μg OVA 辅以氢氧化铝致敏小鼠;程胜^[3],谢林艳等^[7]采用 100 μg OVA 辅以氢氧化铝致敏小鼠。

本研究基于上述等近年来的文献分析,选用三

种剂量的 OVA 进行致敏激发。随着 IgE 和嗜酸性粒细胞数的升高,导致气道管腔狭窄,支气管平滑肌增生,气道上皮细胞变性,支气管及血管周围炎症细胞浸润,杯状细胞增生并分泌大量黏液,使得平滑肌的敏感性增高,导致气道高反应性,从而引起肺组织病理改变以及呼吸急促、躁动挠鼻、二便失禁等症状。因此,哮喘模型的成功从小鼠的症状、嗜酸性粒细胞数、气道病理改变以及血清 IgE、IL-4、IFN-γ 含量变化等几个方面来评价,以此来评估哮喘发病过程中的气道炎症、气道重塑和气道高反应性,从而探索较为合适的 OVA 剂量。

IgE 可介导 I 型超敏反应,使嗜碱性粒细胞和肥大细胞脱颗粒,释放多种炎症介质加重哮喘炎症反应^[5]。本研究结果显示三组哮喘模型小鼠血清中 IgE 均明显升高;而阳性药醋酸地塞米松组与模型 3 组相比,IgE 水平降低,表明其可降低 IgE 介导

的变态反应。

炎症反应在哮喘发生和进展中发挥着重要作用, EOS 作为哮喘中气道炎症、超敏反应及组织损伤等病理过程的主要效应细胞, 参与哮喘的炎症过程^[8]。本研究收集 BALF 并检测其中 EOS, 发现模型 1、2、3 组哮喘模型小鼠 EOS 较正常组升高。

辅助性 T 细胞亚群 Th2 的免疫增强在哮喘的发生、发展起着主导作用^[9]。Th2 主要分泌 IL-4、IL-5 等细胞因子, 而 Th1 主要分泌 IL-2、INF- γ 等细胞因子。本研究中 3 个模型组较正常组 IL-4 均显著升高。经典理论认为 Th1/Th2 失衡是哮喘发病的关键机制, 但近年来较多研究发现哮喘的发病机制已不能单纯用 Th1/Th2 平衡理论来解释。研究者用特异性抗原在体外分离哮喘患儿外周血单个核细胞, 检测发现上清液中 IFN- γ 和 IL-4 水平均增高, 提示哮喘患儿体内 Th1 和 Th2 细胞功能均增强; 而且在哮喘缓解期患者外周血中淋巴细胞产生的 IFN- γ 较特应症患者及正常人明显增多^[10]。本研究中以 IFN- γ 为代表的 Th1 细胞因子显著升高, 与上述结果一致。因此, 不能只考虑用 Th1/Th2 平衡理论来解释哮喘的发病机制, 需要进行更多的探索完善, 近年来研究较多的有 Th17/Treg 平衡、TGF- β /TrSmads^[11] 及 VEGF/MMP^[12] 信号通路等。

组织形态学是评价哮喘模型是否成功的重要指标^[13]。本研究发现, 3 个模型组的肺组织病理切片可见大量的炎性细胞浸润, 支气管管腔内可见黏液栓, 上皮细胞变性, 黏膜皱襞改变及支气管平滑肌增生等表现, 与哮喘患者的病理特征相似; 模型 2 组 (50 μ g) BALB/c 小鼠较模型 1 组 (20 μ g)、模型 3 组 (100 μ g) 在支气管平滑肌增生及黏膜皱襞变化方面更为显著。

综上所述, 本研究采用三种剂量 OVA 诱导的 BALB/c 小鼠哮喘模型均获成功, 但综合而言 50 μ g OVA 所诱发的哮喘模型血清 IgE、IL-4、INF- γ 含量以及肺组织病理改变更为明显, 可用于哮喘相关的

实验研究。醋酸地塞米松可减少 IgE 分泌、降低血清炎性细胞因子含量, 减轻肺组织病理变化, 可作为阳性药使用。

参考文献:

- [1] 吴佳佳, 钟大玲, 刘蕊蕊, 等. 大黄素对哮喘小鼠肺组织形态及 BALF 中炎性细胞因子分泌水平的影响 [J]. 四川中医, 2017, 35 (04): 66-68.
- [2] 张明强. IRAK-M 在哮喘中的免疫调节作用及变应性支气管肺曲菌病患者临床特征分析 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2016.
- [3] 程胜, 陈辉龙, 王正云, 等. 滴鼻和雾化两种不同激发方式对小鼠支气管哮喘模型气道炎症的影响 [J]. 华中科技大学学报 (医学版), 2014, 43 (2): 121-124.
- [4] 房祥峰. 气管内注射 TSLP 中和抗体抑制哮喘小鼠气道炎症和气道高反应性研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2014.
- [5] 刘家齐, 赵正晓, 魏颖, 等. 芍药苷对哮喘模型小鼠气道炎症趋化因子及受体的干预作用 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24 (5): 460-464.
- [6] 刘瑞. 厚朴麻黄汤对哮喘小鼠肺组织病理及血清 IL-13、INF- γ 影响的实验研究 [D]. 郑州: 河南中医药大学, 2016.
- [7] 谢林艳. 粉防己碱下调 NF- κ B 和 iNOS、抑制哮喘小鼠气道炎症和气道高反应性的研究 [D]. 南京: 南京医科大学, 2015.
- [8] 王利玲, 吴强鹏, 程黎. 抗菌肽 LL-37 激活嗜酸性粒细胞释放炎性递质对哮喘的发病机制研究 [J]. 医学研究生学报, 2017, 30 (1): 70-76.
- [9] 李航, 刘小虹, 徐卫方. 中药对哮喘 T 细胞亚型免疫调节作用的研究进展 [J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28 (1): 132-136.
- [10] 龚臣, 邓静敏. Th17/Treg 在支气管哮喘发病机制中的作用及研究进展 [J]. 中华哮喘杂志 (电子版), 2013, 7 (3): 41-45.
- [11] 赵欣欣, 万力生, 李佳曦, 等. 基于 TGF- β 1/Smads 信号通路中医药防治哮喘气道重塑研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18 (1): 160-163.
- [12] 杨今实, 金香, 孙天一, 等. 朝医麻黄定喘汤对哮喘小鼠 MAPKs/NF- κ B/VEGF 信号通路的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32 (10): 4448-4452.
- [13] 郑凌霄, 于芬芳, 刘曼曼, 等. 哮喘小鼠动物模型的建立与评价 [J]. 热带病与寄生虫学, 2017, 15 (4): 244-247.

[收稿日期] 2018-09-14