

吴瑞,李秀敏,苗明三. 基于数据挖掘的哮喘动物模型应用分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(3): 89-93.
Wu R, Li XM, Miao MS. Application analysis of an asthma animal model based on data mining [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(3): 89-93.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020. 03. 015

基于数据挖掘的哮喘动物模型应用分析

吴 瑞,李秀敏*,苗明三*

(河南中医药大学,郑州 450046)

【摘要】 目的 分析哮喘动物模型造模要素,为提高造模成功率及有效评价受试药物提供方法学参考。

方法 以哮喘和动物模型为主题词,搜索中国知网(2009 年 1 月至 2019 年 8 月)相关期刊文献,收集实验动物种类、激发方式、致敏方法、检测指标等,建立数据库,进行统计分析。结果 纳入符合标准的期刊文献 118 篇,其中使用最多的实验动物种类为 BALB/c 小鼠(43 次,36.4%)和 SD 大鼠(42 次,35.5%);使用最多激发方式为雾化激发(102 次,86.4%);使用最多的致敏方法为卵清白蛋白(OVA)致敏(107 次,90.6%);检测最多的指标为肺组织病理(92 次,77.9%)、血清中生化指标(49 次,41.5%)、肺泡灌洗液细胞分类计数(42 次,35.6%)、肺组织免疫组化(40 次,33.9%)、肺泡灌洗液上清中生化指标(39 次,33.1%)等。结论 建立哮喘动物模型时使用 BALB/C 小鼠或 SD 大鼠作为实验动物,采用雾化激发的方式雾化致敏,用 OVA 作为致敏抗原,可以提高模型的成功率,指标选取建议选取肺组织病理、血清中生化指标、肺泡灌洗液细胞分类计数等以有效的评价受试药物,为更好的进行哮喘动物实验研究提供依据。

【关键词】 数据挖掘;哮喘;动物模型

【中图分类号】R-33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856(2020) 03-0089-05

Application analysis of an asthma animal model based on data mining

WU Rui, LI Xiumin*, MIAO Mingsan*

(Henan University of Chinese Medicine, Henan, Zhengzhou 450046, China)

【Abstract】 **Objective** To analyze the modeling elements of asthma animal models and provide a method ological reference to improve the success rate of modeling and evaluating test drugs. **Methods** Using asthma and animal models as key words, we searched for related literature in the China Knowledge Network (January 2009 to August 2019), recorded experimental animal species, stimulation method, sensitization method, and detection indicators, established a database, and conducted statistical analysis. **Results** There were 118 articles in the journals, and the most used experimental animals were BALB/c mice (43 times, 36.4%) and SD rats (42 times, 35.5%). The most exciting mode is atomization (102 times, 86.4%). The most used sensitization method was sensitization by ovalbumin (OVA) (107 times, 90.6%). The most detected indexes were lung histopathology (92 times, 77.9%), serum biochemistry indicators (49 times, 41.5%), cell counts in alveolar lavage fluid (42 times, 35.6%), immunohistochemistry of lung tissue (40 times, 33.9%), and biochemical indicators in alveolar lavage fluid (39 times, 33.1%). **Conclusions** BALB/c mice or SD rats were used as experimental animals to establish asthma animal models. The sensitization agent was atomized, and OVA was

【基金项目】国家中医药管理局中医药标准化专项(2017-149-11);河南省产学研合作(182107000029);杰出外籍科学家工作室(GZS2019006);国家国际合作基地(2016-65)。

【作者简介】吴瑞(1992—),女,硕士研究生,专业:中药学。E-mail: wurui9625@163.com

【通信作者】苗明三(1965—),男,教授,研究方向:中药药理学。E-mail: miaomingsan@163.com

used as the sensitizing antigen to improve the success rate of the model. Lung histopathology, serum biochemical indicators, and cell counts in lavage fluid were used to effectively evaluate test drugs and provide a basis for better experimental animal research in asthma.

[Keywords] data mining; asthma; animal model

支气管哮喘(称为“哮喘”),是一种以气道炎症细胞浸润为病理特征和气道高反应性为生理特征的慢性炎症性疾病。近年来,由于环境因素和生活方式的改变,哮喘的发病率逐年上升^[1-2]。因此,医学界越来越关注与哮喘有关的研究。由于临床人体试验的局限与困难性,目前主要运用动物实验来探索哮喘发病机制、评测新的治疗方法、研究开发新的治疗药物。哮喘动物实验研究的主要和中心环节是建立哮喘实验动物模型,该模型必须高度贴合人类哮喘的病理生理学和临床变化过程,但目前实验研究所使用的哮喘动物模型存在造模方法复杂、模型吻合度低、模型成功率低等问题。因此本文对最近 10 年有关建立哮喘动物模型的相关实验文献进行了整理分析,从实验动物种类、激发方式、致敏方法、检测指标等方面总结哮喘动物模型的研究进展,提出建立与临床哮喘状态相一致的动物模型的完善建议,为哮喘的临床及实验研究提供一定的参考。

1 材料和方法

1.1 数据来源

以“哮喘”和“动物模型”为主题,在中国知网数据库高级检索界面进行搜索,时间范围是 2009 年 1 月至 2019 年 8 月,共检索到期刊文献 248 篇。

1.2 纳入标准

选择研究哮喘的全部动物实验文献;会议、硕博论文等不作为纳入的范畴;排除综述类和资料不全的文献。最终有 118 篇文献符合纳入标准,将收集的实验动物种类、激发方式、致敏方法、检测指标等录入 Excel 2013 归纳处理,以此建立哮喘动物模型的数据库。实验动物名称、种类等均参照《实验动物和动物实验技术》^[3]进行规范,统一处理具有不同名称的动物种类,如“荷兰猪”统一为“豚鼠”。

1.3 统计学方法

首先对各项数据单独归纳整理,分析其应用所占比例,其次对各项数据进行整体分析,对模型建立方法和检测指标进行系统性和区域化整理。

2 结果

2.1 统计结果

2.1.1 实验动物种类

将录入的 118 篇实验文献^[4-22]中的全部实验动物种类进行分类排序,统计得出共有 8 类实验动物,累积频率 118 次。在这些实验动物中,使用频数 ≥ 10 的共有 4 种,累积出现 109 次,使频数最高的前四位分别是 BALB/c 小鼠(43 次,36.4%)、SD 大鼠(42 次,35.5%)、Wistar 大鼠(12 次,10.2%)和豚鼠(12 次,10.2%)。在 118 篇实验文献中,实验动物种类分布情况详情见表 1。

2.1.2 造模激发方式

将 118 篇实验文献所涉及的造模激发方式进行分类规范。统计得出,118 篇实验文章涵盖了 5 种激发方式。在 5 种激发方式中,使用最多激发方式为雾化激发(102 次,86.4%)。造模激发方式分类及使用频数见表 2。

2.1.3 致敏方法

将 118 篇实验文献所涉及的致敏方法进行分类规范。统计得出,118 篇实验文章涵盖了 6 种致敏方法。在 6 种致敏方法中,使用最多的致敏方式为卵清白蛋白致敏(107 次,90.6%)。由于这些实验文献致敏时基本采用氢氧化铝为佐剂,故其使用情况不再归纳统计。致敏方法分类及使用频数见表 3。

2.1.4 检测指标

将录入的 118 篇实验文献中的全部检测指标进行分类排序。在这些检测指标中,若同一组织被分成不同的检测指标,则分别统计,如肺组织在同一实验中既检测肺组织病理又做肺组织免疫组化;若同一组织被同时检测多个同类型指标,则归为一类,不再分开统计,如血清中同时检测 IL-4、IL-17A、sIgE、sIgG1、sIgG2a 等,则把这些指标统称为血清指标,同一实验只计入一次。统计结果表明,118 篇实验文献涵盖 16 种不同的指标类型,累积频数 355 次。其中检测较多的指标为肺组织病理(92 次,77.9%)、血清中生化指标(49 次,41.5%)、肺泡灌洗液细胞分类计数(42 次,35.6%)、肺组织免疫组化(40 次,33.9%)、肺泡灌洗液上清中生化指标(39 次,33.1%)等。检测指标分类及使用频数见表 4。

表 1 实验动物种类频数分布
Table 1 Frequency distribution of experimental animal species

实验动物种类 Experimental animal species	频数(次) Frequency (times)
BALB/c 小鼠 BALB/c mice	43
SD 大鼠 SD rats	42
Wistar 大鼠 Wistar rats	12
豚鼠 Guinea pigs	12
C57BL/6 小鼠 C57BL / 6 mice	5
KM 小鼠 KM mice	2
BN 大鼠 BN rats	1
新西兰兔 New Zealand rabbit	1

表 2 造模激发方式分类及使用频数统计
Table 2 Classification of model establishment methods and frequency statistics

造模激发方式 Modeling method	频数(次) Frequency (times)
雾化 Atomize	102
滴鼻 Intranasal	10
雾化+滴鼻 Atomization + nasal drop	3
气道滴入 Airway drip	2
雾化+烟熏 Atomization + smoke	1

表 3 致敏方法分类及使用频数统计
Table 3 Classification of sensitization methods and frequency statistics

致敏方法 Sensitization method	频数(次) Frequency (times)
OVA	107
OVA+灭活百日咳杆菌疫苗 OVA+inactivated pertussis vaccine	7
桦树花粉 Birch pollen	1
螨虫 Mites	1
OVA+呼吸道合胞病毒 OVA+respiratory syncytial virus	1
交链孢霉提取物 Cyclospora extract	1

表 4 检测指标分类及使用频数
Table 4 Classification of test indicators and frequency of use

检测指标 Detection Indicator	频数(次) Frequency (times)
肺组织病理 Pulmonary histopathology	92
血清中生化指标 Biochemical indicators in serum	49
肺泡灌洗液细胞分类计数 Cell count of alveolar lavage fluid	42
肺组织免疫组化 Immunohistochemistry of lung tissue	40
肺泡灌洗液上清中生化指标 Biochemical index of alveolar lavage fluid supernatant	39
表观指标 Apparent indicators	36
肺功能 Lung function	13
肺组织实时荧光定量 PCR Real-time fluorescent quantitative PCR of lung tissue	12
肺组织蛋白免疫印迹法(WB) Western blot of lung tissue protein (WB)	10
血细胞计数 Blood count	7
流式细胞仪分析脾细胞 Splenic cells were analyzed by flow cytometry	5
血浆中生化指标 Biochemical indices in plasma	3
肺匀浆上清生化指标 Biochemical index of lung homogenate supernatant	3
肺脏器指数 Lung viscera index	2
血常规 Routine blood	1
脾实时荧光定量 PCR Real-time fluorescent quantitative PCR of the spleen	1

2.2 结果分析

建立哮喘动物模型,是利用所选种类动物更加贴合地模仿哮喘疾病的病理生理过程与特征。目前还未发现与人类发病过程完全相同的动物自发性哮喘模型,因此需要人工加以复制,鼠类动物因其基因组序列与人类相似,常被研究者用来建立哮喘模型。通过表 1 可以看出,建立哮喘动物模型多使用 BALB/c 小鼠、SD 大鼠、Wistar 大鼠和豚鼠。据报道 BALB/c 小鼠对致敏原较易产生气道炎症反应及气道高反应性,从而更加容易复刻哮喘模型,同时 BALB/c 小鼠也是受到国外广泛认同的哮喘动物模型品系,用其进行哮喘动物实验研究更容易受国际医学界认可^[23-25]。SD 大鼠和 Wistar 大鼠的来源广泛,容易饲养繁殖,价格相对便宜,生物学试剂种类多并且容易获得,对抗原的反应性较为一致,

在测量指标较多的情况下,研究者更倾向于选择其作为实验动物。在建立模型时,豚鼠更容易被致敏,因其反应的靶器官为肺,接触致敏原后容易产生过敏变态反应,程度较大鼠、小鼠强,因此在研究中应用广泛。但因为豚鼠繁殖率较低、饲养条件要求高、相关配合的免疫学试剂相对不足等原因,其使用频次低于 BALB/c 小鼠和 SD 大鼠。此外,在统计分析过程中发现大多数实验文章选择雌性动物作为实验研究对象,笔者查阅资料后发现,雾化激发后雌鼠的气道炎症、嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润程度、支气管肺泡灌洗液中炎症细胞数等哮喘特征均比雄鼠更为严重,就建立哮喘模型来说,雌鼠比雄鼠更有优势^[26]。

建立哮喘动物模型最主要是使动物模型出现免疫原性及免疫应答,防止脱敏情况发生,因此在制备哮喘模型过程先采用抗原致敏,使动物机体内存有致敏物,然后气道局部激发,诱导动物产生哮喘反应。从表 2 和表 3 可以看出,本文统计发现使用最多的致敏抗原为 OVA,在全部实验文章的致敏方法中占比 90.6%;使用最多的激发方式为雾化激发,在全部实验文章的激发方式中占比 86.4%。研究表明 OVA 为异种蛋白,有较强的抗原性和免疫原性,能成功建立哮喘气道慢性变应性炎症模型^[27]。致敏后,大多采用雾化激发的方式使模型动物口鼻完全暴露在造模激发液中,雾化器长时间持续激发刺激动物,激发液经呼吸道进入动物机体后可直接作用于气道、肺,从而成功诱导肺产生炎症反应^[28]。在激发后,实验动物会出现较明显的头面部瘙痒、站立不稳、腹式呼吸(呼吸短促)等类似哮喘发作的症状,这些现象可以作为评价模型成功的重要指标。

哮喘动物模型应该具备气道炎性细胞浸润、气道高反应性、血清 IgE 水平增高等特征。而这些特征可以在肺组织病理、血清中生化指标、肺泡灌洗液细胞分类计数、肺组织免疫组化、肺泡灌洗液上清中生化指标等指标中体现。肺组织病理是评价哮喘模型是否成功的重要指标,哮喘经常会由急性炎症反复发作而转变为慢性炎症,因此气道反复损伤与修复病理组织镜下观察可以看到大量炎性细胞、炎症介质浸润。经过本文统计发现,118 篇实验文献中所测得血清生化指标较多的为 sIgE、IgE、TNF- α 、IL-4、IL-5、IL-10、IL-13、IL-17、干扰素- γ (IFN- γ) 等,这些指标可以有效评价炎症反应情况。

肺泡灌洗液中各类炎症细胞和上清中的生化指标在评价气道炎症中发挥重要作用,例如,中性粒细胞水平与哮喘严重程度呈正相关^[29]。免疫组化技术是根据抗原抗体的结合反应与化学显色原理,使组织切片中待测细胞的化学成分通过过氧化物酶等标记出来,便于显微镜的观察与统计,对过敏性哮喘小鼠模型成功情况的判定具有重要意义^[30]。

3 讨论

哮喘的发病机制十分复杂,医学界至今还不能将其解释清楚,但目前能确定的是哮喘的发病机制跟气道炎症、气道高反应性以及免疫耐受受损相关^[28]。因此在建立哮喘动物模型时还要从这些方面入手。

哮喘动物模型的建立方法多种多样,但目前所建立的哮喘动物模型还不能完全等同人类哮喘疾病的病理生理过程,所以在建立贴近临床、结合哮喘表型、结合哮喘疾病发生发展过程及病理生理改变的哮喘动物模型是未来的主要研究方向。通过对近 10 年哮喘实验文献中的数据进行挖掘整理可知,使用 BALB/c 小鼠或 SD 大鼠作为实验动物,采用雾化激发的方式雾化致敏,用 OVA 作为致敏抗原,可以有效提高模型的成功率,指标选取建议选取肺组织病理、血清中生化指标、肺泡灌洗液细胞分类计数等作为评价指标,此外在建立模型时还要综合考虑到方法、给药剂量、实验目的及实验条件等。作者期望通过自己的整理能为提高造哮喘动物模型成功率及评价受试药物有效性提供一定的方法学参考。

参考文献:

- [1] 陈一平. 支气管哮喘动物模型建立及研究现状 [J]. 医学综述, 2014, 20(5): 840-843.
- [2] Fahy JV. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma: insights from clinical studies [J]. Proc Am Thorac Soc, 2009, 6(3): 256-259.
- [3] 苗明三,朱飞鹏. 常用医药研究动物模型 [M]. 北京,人民卫生出版社,2007.
- [4] 黄朝强,黄梅青,朱燕华,等. 石仙桃多糖对哮喘大鼠肺部炎症、细胞外信号调节酶和蛋白激酶 B 表达水平的影响 [J]. 广西医学, 2018, 40(15): 1702-1705.
- [5] 颜玺,郭亚蕾,薛中峰. 苍耳子挥发油对支气管哮喘大鼠气道重塑的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(14): 106-111.
- [6] 王忠敏,汤卫红,王惠庭,等. 哮喘模型小鼠肺组织 TGF- β 1、MMP-9、TIMP-1 与气道重塑相关性研究 [J]. 浙江中西医结合

- 合杂志, 2018, 28(11): 920-923.
- [7] 谢枝隽,尹佳,周俊雄. 特异性免疫治疗对桦树花粉过敏小鼠 Th17 细胞的影响 [J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2019, 13(2): 130-136.
- [8] 王明磊,王文革,张俊红,等. 布地奈德对哮喘小鼠模型 IL-22 的调控作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(5): 55-59.
- [9] 任佳羽,杨贵方,胡松岩,等. 越婢加半夏汤降低过敏性哮喘小鼠的血清 IgE 和升高肺组织中 SOD 的活力 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(9): 18-21.
- [10] Yang X, Guo G, Dang M, et al. Assessment of the therapeutic effects of fucoxanthin by attenuating inflammation in ovalbumin-induced asthma in an experimental animal model [J]. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2019, 38(3): 229-238.
- [11] 韩超,杨柳,张秋玲,等. 黄芩苷对哮喘大鼠气道重塑作用的实验研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2017, 22(7): 749-754.
- [12] 柯莉芹,王凤美,罗运春. 血管活性肠肽对哮喘小鼠气道炎症及 Th17/Treg 平衡的影响 [J]. 中国当代儿科杂志, 2017, 19(6): 699-704.
- [13] Laxmi V, Gupta R, Bhattacharya SK, et al. Inhibitory effects of sildenafil and tadalafil on inflammation, oxidative stress and nitrosative stress in animal model of bronchial asthma [J]. Pharmacol Rep, 2019, 71(3): 517-521.
- [14] 卢雯雯,吴国琳,余国友. 中药治疗支气管哮喘作用机制初探 [J]. 浙江中医杂志, 2017, 52(4): 299.
- [15] 常欣欣,乌日娜,徐喜媛. 利用基因干扰小鼠探讨低分子蛋白酪氨酸酶在哮喘发病中的作用 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(30): 76-77.
- [16] Mazur M¹, Olczak J¹, Olejniczak S, et al. Targeting acidic mammalian chitinase is effective in animal model of asthma [J]. J Med Chem, 2018, 61(3): 695-710.
- [17] 张方琪,韩新鹏,张芳,等. 动态观察过敏原诱导的哮喘小鼠模型从急性炎症到慢性重塑的发展 [J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(2): 380-384.
- [18] 邹爱玲,柳新,于文潇. 润肺膏对哮喘大鼠支气管肺泡灌洗液中 TNF- α 、IFN- γ 含量的影响 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2017, 4(16): 2975-2976.
- [19] 朱婷婷,翁翠叶,贾宵宵,等. Wnt7b/ β -catenin 信号通路在大鼠哮喘气道重塑中的作用 [J]. 温州医科大学学报, 2017, 47(1): 14-18.
- [20] 王芳,郭永梅,胥彦琪,等. 白藜芦醇对慢性哮喘小鼠模型气道炎症的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 33(1): 32-35.
- [21] 王文丽,李冬梅,施雷. 痰瘀同治法干预咳嗽变异性哮喘大鼠病症结合动物模型气道慢性炎症疗效的实验研究 [J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(1): 223-226.
- [22] 杨志华,吴尚华,沈玉鹏,等. 中药复方对咳嗽变异性哮喘模型大鼠血清 IgE 和 IL-2 水平的影响 [J]. 西部中医药, 2016, 29(11): 15-17.
- [23] Mousavi F, Kardar GA, Pourpak Z. IgE-mediated allergic responses associated to Ailanthus altissima pollen using an animal model [J]. Allergologia et Immunopathologia(Madr), 2019, 47(3): 272-276.
- [24] Hayashi T, Adachi Y, Hasegawa, et al. Less sensitivity for late Airway inflammation in males than females in BALB/c mice [J]. Scand J Immunol, 2003, 57(6): 562-567.
- [25] Matsubara S, Swasey CH, Loader JE, et al. Estrogen determines sex differences in airway responsiveness after allergen exposure [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2008, 38(5): 501-508.
- [26] Agrawal T, Gupta GK, Agrawal DK. Vitamin D supplementation reduces airway hyperresponsiveness and allergic airway inflammation in a murine model [J]. Clin Exp Allergy, 2013, 43(6): 672-683.
- [27] 孔瑞,尹佳. 过敏性哮喘动物模型 [J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2019, 13(1): 67-72.
- [28] Wong CK, Wang CB, Li ML, et al. Induction of adhesion molecules upon the interaction between eosinophils and bronchial epithelial cells: Involvement of p38 MAPK and NF- κ B [J]. Int Immunopharmacol, 2006, 6(12): 1859-1871.
- [29] 冯晨,徐康宁. 病理诊断中免疫组化技术的应用探讨 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(59): 69-75.
- [30] 谭杰军,王甜甜,刘志伟,等. 哮喘动物模型建立的思考与体会 [J]. 中国中医急症, 2016, 25(5): 816-818.

[收稿日期] 2019-09-21