

呼吸与危重症

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.001186

C57bl/6 小鼠 OVA 哮喘模型的建立与评价

邹文静¹, 王 婷¹, 丁凤霞¹, 符 州²

(重庆医科大学附属儿童医院 1. 儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地、儿科学重庆市重点实验室; 2. 呼吸科, 重庆 400014)

【摘要】目的: 本实验旨在利用无鸡蛋卵清蛋白(ovalbumin, OVA)诱导建立 C57bl/6 小鼠的哮喘模型, 并用地塞米松对该模型小鼠进行治疗, 用以评价模型是否建立成功。**方法:** 将 36 只 3 代以上脱敏饮食的 6 周龄雌性 C57bl/6 小鼠随机分为对照组、哮喘组、地塞米松治疗组。哮喘组小鼠在第 0、14 天分别腹腔注射 0.2 mL 致敏液[20 μ g OVA, 100 μ L 生理盐水, 100 μ L Al(OH)₃]致敏, 在第 21~27 天用 1.5% OVA 溶液雾化, 对照组小鼠在同样时间给予同剂量的生理盐水, 治疗组在第 25~27 天雾化前 0.5 h 腹腔注射 5 mg/kg 地塞米松溶液 0.2 mL。于末次雾化后 24 h 内对每组 6 只小鼠进行有创肺功能检测气道阻力, 其余 6 只进行支气管肺泡灌洗观察气道炎症情况, HE 染色观察肺部病理改变, PAS 糖原染色观察气道黏液分泌情况, ELISA 检测血清 IgE 以及肺泡灌洗液中 IL-4 含量。**结果:** 哮喘组小鼠气道阻力值在激发浓度为 25 mg/mL 时较对照组($F=26.530, P=0.000$)明显升高, 在激发浓度为 50 mg/mL 时较对照组($F=18.690, P=0.000$)明显升高, 支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)细胞计数细胞总数哮喘组较对照组($F=1.349, P=0.000$)和治疗组($F=1.461, P=0.006$)有明显增多, 嗜酸性粒细胞分类计数哮喘组较对照组($F=7.000, P=0.013$)和治疗组相比也有增多, 但差异无统计学意义($F=1.000, P=0.056$), 肺部病理和气管黏液分泌情况哮喘组与对照组相比均较严重, 哮喘组血清中 IgE 含量与对照组相比有统计学差异($F=15.10, P=0.036$)和治疗组相比有所增加, 但差异无统计学意义($F=2.680, P=0.083$), 哮喘组肺泡灌洗液中 IL-4 含量均较对照组($F=7.953, P=0.000$)和治疗组($F=4.413, P=0.008$)明显增加。**结论:** 本实验成功确立了构建 C57bl/6 小鼠哮喘稳定模型的方法。

【关键词】哮喘; 无鸡蛋卵清蛋白; 小鼠; 模型**【中图分类号】**R322**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2016-11-27

Establishment of a C57bl/6 mouse asthma model by ovalbumin and its evaluation

Zou Wenjing¹, Wang Ting¹, Ding Fengxia¹, Fu Zhou²

(1. Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics; 2. Development of Respiratory Disorders, Children's Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To establish a C57bl/6 mouse asthma model the ovalbumin(OVA) free and to evaluate the model using dexamethasone(Dex). **Methods:** Clean female C57bl/6 mice fed without OVA for over 3 generations were divided into three groups($n=36$, 12 for each group). The asthmatic group was sensitized by i.p with OVA aluminium hydroxide gel on day 1 and 14. From 21st day, asthmatic group was aerosolized 1.5% OVA for 7 days. The control group received saline as the substitution of OVA. The treated group was i.p with 5 mg/kg dexamethasone 0.5 h before atomization from 25th to 27th day. Twenty four hour after last atomization, 6 mice in each group were used to detect the airway resistance by invasive pulmonary function. The last 6 mice were used to detect airway inflammatory cells, lung pathological changes, mucus hypersecretion, total IgE in serum and IL-4 by bronchoalveolar lavage fluid(BALF), hematoxylin-eosin (HE) staining, periodic acid-schiff(PAS) staining and ELISA. **Results:** The airway resistance lung resistant in asthma group was higher than that in control group at 25 mg/mL concentration($F=26.530, P=0.000$) and also higher than that in control group at 50 mg/mL concentration($F=18.690, P=0.000$). BALF total cells of asthma group were higher than that in control group($F=1.349, P=0.000$) and treatment group($F=1.461, P=0.006$). The eosinophils cells of asthma group was higher than that of control group($F=7.000, P=0.013$). Lung pathological changes and mucus hypersecretion in asthma group were much serious. Total IgE in serum

作者介绍: 邹文静, Email: 1016278469@qq.com,

研究方向: 儿童哮喘发病机制及治疗研究。

通信作者: 符 州, Email: fu-zhou79@aliyun.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81670018)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20170313.1100.026.html>

(2017-03-17)

($F=15.10, P=0.036$) and IL-4 in BALF($F=15.10, P=0.036$) of asthma group were more serious than those of control group.**Conclusion:** The C57bl/6 mouse allergic asthma model is established by the way in this study.**【Key words】**asthma; ovalbumin free; mouse; model

支气管哮喘(简称哮喘)是一种以慢性气道炎症为特征的异质性疾病^[1],具有喘息、气促、胸闷和咳嗽等呼吸道症状,伴有可变的气流受限,气道黏液分泌增加和不同程度的气道重塑。有数据表明全球哮喘患者大约有 3 亿人,中国患者约有 3 000 万人,并呈逐年上升趋势^[2]。鉴于人体实验的局限性,目前哮喘疾病研究大多是通过建立动物模型进行,常用的动物为 Balb/c 小鼠或 SD 大鼠,而现今哮喘的机制研究中越来越多运用 C57bl/6 鼠背景的基因敲除小鼠,但国内大多数研究者对 C57bl/6 小鼠哮喘模型的建立尚无确切的方法,只是参照国内外一些过敏性疾病文献进行摸索建立,其效果并不明确。因此,确立一种可行并有效的 C57bl/6 小鼠哮喘模型的建立方法可为更多需要在 C57bl/6 小鼠上建立哮喘模型的实验人员提供更为简便经济的实验方法。本实验探讨了 C57bl/6 小鼠哮喘模型的建立方法,并用糖皮质激素对建立的哮喘模型进行治疗评价验证建模成功。

1 材料与方法

1.1 实验材料及仪器

SPF 级雌性 6 周龄 C57bl/6 小鼠 12 只,体质量 20~22 g,购于重庆医科大学实验动物中心,饲养于重庆医科大学附属儿童医院实验动物中心 SPF 级,温度 22℃~26℃,湿度 55%~60%,光照 12 h/d,无鸡蛋清蛋白(ovalbumin, OVA)的特殊饲料饲养并合笼,选取第 3 代母鼠生出的雌性小鼠 36 只饲养至 6 周开始建模。OVA、乙酰甲胆碱、氢氧化铝凝胶均购于美国 Sigma-Aldrich 公司,小鼠有创肺功能仪购于法国 EMKA 公司, IgE、IL-4 ELISA 试剂盒购于中国欣博盛生物公司。

1.2 实验方法

将 36 只 3 代特殊饲料喂养的小鼠随机分为对照组、哮喘组和地塞米松治疗组,每组 12 只。哮喘组小鼠于第 0、14 天分别腹腔注射 0.2 mL 致敏液[20 μg OVA, 100 μg 生理盐水, 100 μg Al(OH)₃]致敏,在第 21~27 天用 1.5% OVA 溶液 5 mL 雾化 30 min,雾化时小鼠出现较明显的头面抓痒、弓背、呼吸加深加快、安静少动等哮喘急性发作症状。对照组在同时间以同等方式给予同等剂量的生理盐水。地塞米松治疗在第 25~27 天雾化前 0.5 h 腹腔注射 0.2 mL 5 mg/kg 地塞米松溶液(图 1)。

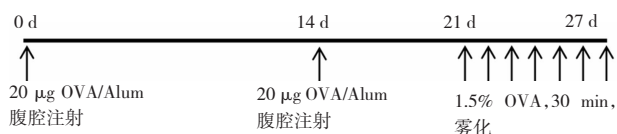


图 1 哮喘模型造模方法

1.3 气道通气阻力测定

选取哮喘组、对照组和地塞米松治疗组各 6 只小鼠于末次雾化后 24 h 内进行有创肺功能检测气道通气阻力。以 40 μL/10 g 腹腔注射 2%戊巴比妥钠溶液进行麻醉后行气管插管,连接呼吸机,通过生物记录仪测定小鼠气道气流和压力变化,得出小鼠肺通气阻力值(LR=ΔP/ΔF)。待小鼠呼吸平稳后向小鼠气道内依次雾化浓度为 0、3.125、6.25、12.5、25、50 mg/mL 的乙酰甲胆碱溶液,每次雾化 1 min,记录 5 min,收集后 3 min 的数据用于分析小鼠气道高反应性。

1.4 BALF 的灌取及细胞计数

末次雾化后 24 h 内将小鼠用 10%水合氯醛麻醉,眼球取血脱颈处死,暴露胸腔和气管,用止血钳夹闭左侧肺门,从气管上端插入留置针并固定。预冷的无菌 PBS 灌洗 3 次,每次 0.5 mL,4℃,2 500 r/min 离心 5 min,收集上清液参照 ELISA 试剂盒说明检测其中的 IL-4 含量。细胞沉淀加入 1 mL 无菌 PBS 后混匀取 20 μL 进行细胞总数计数,剩余细胞悬液按上述方法离心后取细胞沉淀涂片,晾干后行瑞氏染色细胞分类计数。

1.5 病理组织的处理

小鼠支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)灌洗后松开左侧肺门处的止血钳行心脏灌流,洗净左肺血管中的血细胞,取出左肺置于 4%的中性甲醛内固定 48 h,经脱水、包埋后切成 4 μm 薄片,置于载玻片上于 60℃烤箱内烘烤 48 h 后分别行 HE 染色和 PAS 染色,观察肺部损伤,炎症细胞浸润及支气管黏液分泌情况。

1.6 血清中总 IgE 含量检测

将小鼠眼球取血,常温,2 500 r/min 离心 3 min,取上清,再用同样条件重复离心 1 次取上层血清,参照 ELISA 试剂盒说明检测血清中 IgE 含量。

1.7 统计学处理

本实验数据采用 GraphPad Prism 5.0 软件和 SPSS 软件进行统计分析。方差齐时,各组均数比较采用单因素方差分析或 Tukey 检验。方差不齐时,各组比较用 Kruskal-Wallis 检验;组间比较用 *t* 检验;重复测量资料采用重复测量方差分析。检验水准 α=0.05。

2 结果

2.1 小鼠气道高反应性测定结果

哮喘组与对照组相比在低浓度乙酰甲胆碱溶液 0、3.125、6.25、12.5 mg/mL 激发下 LR 值无差异,在 25 mg/mL 浓度激发下哮喘组 LR 值(4.380 ± 1.427, n=6)与对照组(0.578 ± 0.132, n=6)相比差异有统计学意义(*F*=26.530, *P*=0.000), 50 mg/mL 浓度激发下哮喘组 LR 值(6.050 ± 1.891, n=6)与对照组(0.778 ± 0.241, n=6)相比差异有统计学意义(*F*=18.690,

$P=0.000$); 治疗组与哮喘组相比无统计学差异 ($F=6.270, P=0.051$); 治疗组与对照组相比无统计学意义 ($F=9.190, P=0.240$) (图 2)。说明哮喘组小鼠气道反应性与对照组相比明显增高, 且用地塞米松治疗后有所减轻。

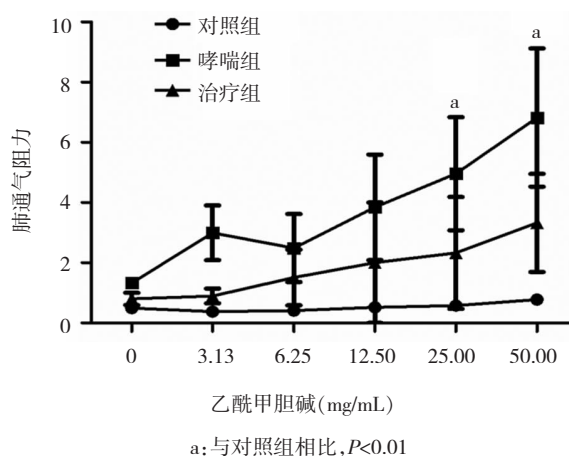
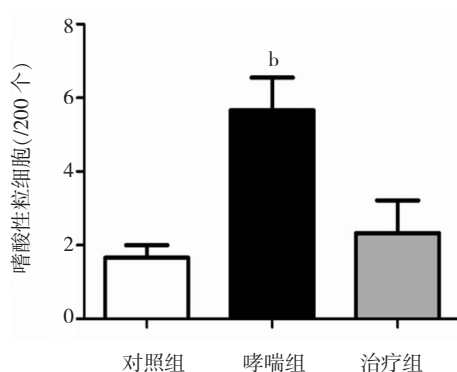
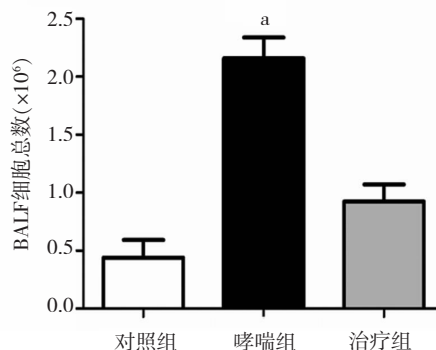


图 2 哮喘模型的气道高反应性

2.2 BALF 细胞计数与分类计数结果

支气管肺泡灌洗液离心后沉淀加入 1 mL PBS 吹打均匀, 取 20 μL 加入 180 μL 1% 稀盐酸混匀取 20 μL 加入细胞计数仪器内计数 3 次求平均值为每只小鼠 BALF 内细胞总数。细胞沉淀涂片瑞氏染色进行分类计数 200 个细胞, 算出每种细胞比例。哮喘组细胞总数 $[(2.160 \pm 0.179) \times 10^6]$ 与对照组 $[(0.439 \pm 0.154) \times 10^6]$ 相比明显增多, 差异有统计学意义 ($F=1.349, P=0.000$), 地塞米松治疗组细胞总数 $[(0.923 \pm 0.148) \times 10^6]$ 相对于哮喘组有所降低, 差异有统计学意义 ($F=1.461, P=0.006$), 而治疗组与对照相比无统计学差异 ($F=1.082, P=0.086$); 分类计数 200 个细胞中嗜酸性粒细胞总数哮喘组 (5.670 ± 0.882) 与对照组 (1.667 ± 0.333) 相比明显增多, 差异有统计学意义 ($F=7.000, P=0.013$), 治疗组 (2.333 ± 0.882) 与哮喘组小鼠相比有所降低但无统计学差异 ($F=1.000, P=0.056$), 而治疗组与对照组小鼠相比无统计学差异 ($F=7.000, P=0.519$) (图 3)。



a: 与对照组相比, $P<0.01$; b: 与对照组相比, $P<0.01$

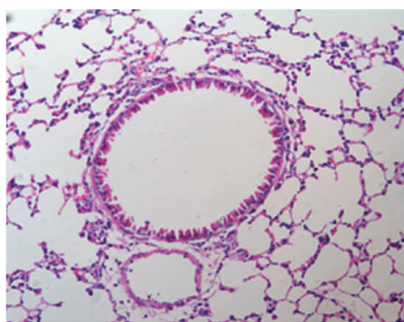
图 3 BALF 细胞总数和嗜酸性粒细胞分类计数

2.3 肺组织病理切片 HE 染色结果

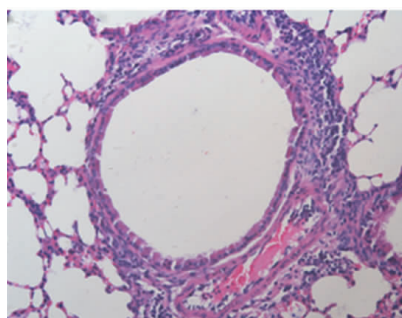
正常组小鼠支气管及肺泡结构正常, 气道黏膜上皮完整, 气道周围基本无炎症细胞浸润。哮喘组小鼠气道壁周围大量炎症细胞浸润, 上皮细胞不同程度坏死脱落。地塞米松治疗组小鼠气道周围炎症细胞浸润明显减少, 气道炎症明显减轻 (图 4)。

2.4 肺组织病理切片 PAS 糖原染色结果

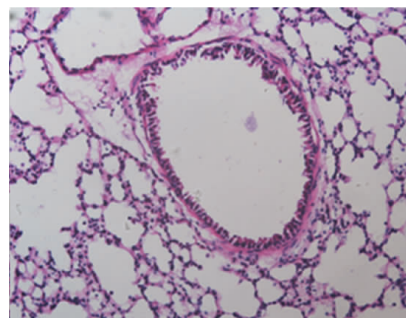
哮喘组、对照组和地塞米松治疗组小鼠肺组织病理切片进行 PAS 糖原染色发现, 哮喘组小鼠气道黏液分泌较对照组明显增多, 治疗组明显减少 (图 5)。



A. 对照组



B. 哮喘组



C. 治疗组

图 4 正常组、哮喘组和治疗组肺组织 HE 染色 (200 $\times$)

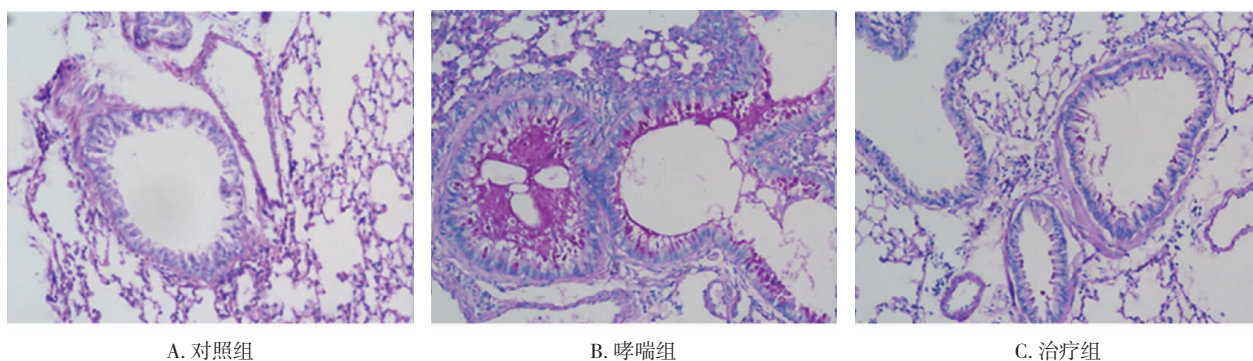


图 5 正常组、哮喘组和治疗组肺组织 PAS 染色(200×)

2.5 血清中总 IgE 含量检测结果

IgE 作为过敏性疾病特异性的抗体,检测哮喘组小鼠血清中总 IgE 含量(2.749 ± 0.524)高于对照组(0.939 ± 0.156), ($F=15.100, P=0.036$),地塞米松治疗组(1.613 ± 0.286)与哮喘组相比差异无统计学意义($F=2.680, P=0.083$),治疗组和对对照组相比无统计学差异($F=5.636, P=0.142$),如图 6 所示。

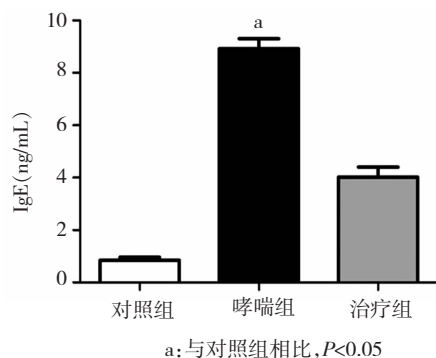


图 6 ELISA 检测血清总 IgE 含量

2.6 BALF 中 IL-4 含量检测结果

Th2 细胞相关因子 IL-4 在哮喘组(66.710 ± 8.375)BALF 中较对照组(11.750 ± 3.984)明显增高($F=7.953, P=0.000$),且在治疗组(28.300 ± 5.349)与哮喘组相比明显降低,差异有统计学意义($F=4.413, P=0.008$),治疗组与对照组相比,差异并不明显($F=1.802, P=0.038$)(图 7)。

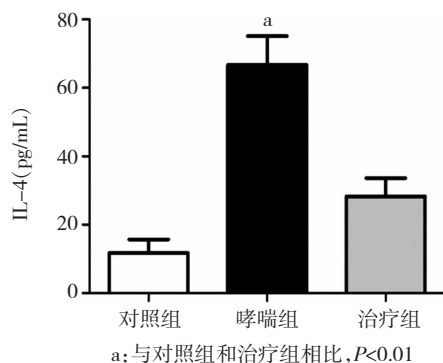


图 7 ELISA 检测 BALF 中 IL-4 含量

3 讨论

支气管哮喘的病因十分复杂,发病机制及治疗手段也未完全研究清楚,越来越深入的研究都需要在不同品系背景的小鼠上建立哮喘模型。例如 Huang 等^[3]在研究转录因子 KLF10 在哮喘气道炎症中的作用时,以及 Forkuo 等^[4]在研究 $\beta 2AR$ 在哮喘表型中的作用时均采用了 C57bl/6 为背景的基因敲除鼠,虽然目前在 Balb/c 小鼠、豚鼠或大鼠上建立哮喘模型的方法和成功率较为稳定^[5],但国内在 C57bl/6 小鼠上建立哮喘模型却没有一个较为稳定有效的方法。故确定一个稳定的 C57bl/6 小鼠哮喘模型建立方法将为深入研究哮喘发病机制及治疗手段提供重要的保证。现有国外研究利用尘螨在 C57bl/6 小鼠上成功的建立了过敏性哮喘模型^[6],也有利用 OVA 在 C57bl/6 小鼠上成功建立了过敏性气道高反应性模型^[7],但考虑到国内条件有限,尘螨的购置受限且价格贵,本实验采用了哮喘建模常用的 OVA,采用不同的致敏剂量(100、20、10 μg)以及不同的雾化浓度(1.5%、1%)进行摸索尝试观察建模后效果确定了本实验中的剂量效果最好。除此之外,本研究还查阅文献发现雌性个体对哮喘的易感性^[8],以及为了排除早期过敏原对建模的影响,并采用 3 代以上不含 OVA 的特殊饲料喂养的雌性小鼠进行建模。同时也用了非 3 代特殊饲料喂养的小鼠进行建模,发现其效果不佳,因此再次确定了用 OVA 对 C57bl/c 小鼠进行建模,需用 3 代以上不含 OVA 的特殊饲料喂养的小鼠。

鉴于国内外并无哮喘动物模型官方评价标准,

本实验参考现有的 Balb/c 小鼠哮喘模型建立成功的评价指标^[9]和人类哮喘急性发作的症状确定小鼠哮喘模型评价标准应该包括以下几点:可诱导的哮喘急性发作症状,气道高反应性,气道炎症细胞增多,气道黏液分泌增加,Th2 细胞相关因子以及血清过敏性 IgE 含量增加^[10]。在本实验所建立的哮喘模型中均可见到这些特征。肺功能检测作为诊断哮喘重要指标,可较为直接地反映气道通气阻力的变化^[12],其方法从无创到有创,各有利弊。目前国内无创测量最常用的是 Penh(enhanced pause)的测定^[11],即将小鼠自由放置于一容器内,仅测量容器内压力的变化,间接反映小鼠气道的反应性,并不是一个直接测定的结果。本实验在此基础上进行了改进采用有创法测量小鼠的肺通气阻力,通过麻醉下气管插管利用体积描记器直接测量小鼠气道内压力和气流量的变化比得出肺阻力($LR=\Delta P/\Delta F$),是目前测量小鼠通气功能最为精确的方法之一^[12]。此外,众所周知糖皮质激素是目前临床上治疗哮喘的一线药物,其治疗效果也是明确的,故本实验选用经典的糖皮质激素-地塞米松对建模的哮喘小鼠进行治疗,发现治疗组小鼠哮喘急性发作症状、气道高反应性、气道炎症、黏液分泌、Th2 相关因子 IL-4 以及血清过敏性 IgE 含量均较模型组明显降低,说明地塞米松对所建的哮喘模型有明显的治疗作用,也验证了本实验哮喘模型建立成功。

综上所述,从本实验结果可以看到,模型组小鼠在雾化时出现了明显的头面抓痒、弓背、呼吸加深加快、安静少动等哮喘急性发作症状,有创肺功能检测肺通气阻力明显增加,BALF 中炎症细胞和嗜酸性粒细胞数量增加,Th2 细胞相关因子 IL-4 含量也明显增加,肺组织病理切片染色发现气道周围炎症细胞聚集增加,气道黏液分泌增加,小鼠血清中过敏性 IgE 含量也明显增加,且在地塞米松治疗组以上症状均明显减轻,证明用 OVA 对 C57bl/6 小鼠建立哮喘模型成功。该模型的建立成功为今后更加深入地探索哮喘发病机制以及哮喘相关基因研究提供了实验基础,也为今后需要在 C57bl/6 小鼠

上建立哮喘模型的研究人员提供了有效的参考。

参 考 文 献

- [1] 尚云晓,冯 雍. 2014 版全球哮喘防治倡议(GINA)解读——与儿童哮喘相关内容[J]. 中国实用儿科杂志,2014,29(9):669-672.
- [2] Giovannini-Chami L, Albertini M, Scheinmann P, et al. New insights into the treatment of severe asthma in children[J]. Paediatr Respir Rev, 2014, 16(3):167-173.
- [3] Huang LT, Chang HW, Wu MJ, et al. Klf10 deficiency in mice exacerbates pulmonary inflammation by increasing expression of the proinflammatory molecule NPRA[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2016, 31(79):231-238.
- [4] Forkuo GS, Kim H, Thanawala VJ, et al. Phosphodiesterase 4 inhibitors attenuate the asthma phenotype produced by β 2-adrenoceptor agonists in phenylethanolamine N-methyltransferase-knockout mice[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2016, 55(2):234-242.
- [5] 刘 佳,郑 健,于 涛. 小鼠过敏性哮喘模型的研究进展及评价[J]. 中国比较医学杂志,2010,21(2):65-68.
- [6] Kumar S, Lanckacker E, Dentener M, et al. Aggravation of allergic airway inflammation by cigarette smoke in mice is CD44-dependent[J]. PLoS One, 2016, 11(3):e0151113.
- [7] Kosaka S, Tamauchi H, Terashima M, et al. IL-10 controls Th2-type cytokine production and eosinophil infiltration in a mouse model of allergic airway inflammation[J]. Immunobiology, 2011, 216(7):811-820.
- [8] Keselman A, Heller N. Estrogen signaling modulates allergic inflammation and contributes to sex differences in asthma[J]. Front Immunol, 2015, 6:813-816.
- [9] Huang ZG, Gao LJ, Zhao X, et al. Effect of Gubenfangxiao decoction on respiratory syncytial virus-induced asthma and expression of asthma susceptibility gene orosomucoid 1-like protein 3 in mice[J]. J Tradit Chin Med, 2016, 36(1):101-106.
- [10] Oliver AJ, Covar RA, Goldfrad CH, et al. Randomised trial of once-daily vilanterol in children with asthma on inhaled corticosteroid therapy[J]. Respir Res, 2016, 17(1):1-11.
- [11] 刘 娜,牛 超,胡晓燕,等. Wnt5a 在哮喘小鼠肺组织中的异常高表达[J]. 免疫学杂志,2015,31(3):190-194.
- [12] Zhang C, Zhang LH, Wu YF, et al. Suhuang antitussive capsule at lower doses attenuates airway hyperresponsiveness, inflammation, and remodeling in a murine model of chronic asthma[J]. Sci Rep, 2016, 6:21515.

(责任编辑:张辉洁)