

# 建立小鼠哮喘模型两种不同方法的比较

袁丽粉 乔建瓯 王健

**摘要 目的** 比较两种小鼠哮喘模型建立方法的优缺点。**方法** 30只BALB/c小鼠随机正常对照组、OVA组、OVA/RSV组分为3组:采用卵白蛋白和氢氧化铝混悬液致敏,予以卵白蛋白持续雾化以及RSV多次滴鼻激发分别建立OVA组及OVA/RSV组哮喘小鼠模型,对照组采用无菌注射用水致敏和雾化激发。末次激发24h后,测定肺功能,行支气管肺泡灌洗液中细胞分类计数,HE染色观察其肺组织病理改变。**结果** 各模型组与对照组相比较,均有明显的哮喘症状,病理学结果显示气道壁增厚明显,管腔可见狭窄,管壁及其周围大量炎性细胞浸润,而且OVA/RSV组小鼠肺组织病理损害较OVA组明显加重。增强呼气时间歇(Penh)值OVA/RSV组小鼠较OVA组小鼠明显升高( $P < 0.05$ ),其支气管肺泡灌洗液中中性粒细胞计数、单核细胞、淋巴细胞及嗜酸性粒细胞计数显著高于OVA组( $P < 0.05$ )。**结论** 通过OVA致敏并予以RSV诱导建立哮喘小鼠模型,是一种更好地模拟人类哮喘发病机制的建模方法。

**关键词** 哮喘 卵白蛋白 RSV 动物模型

中图分类号 R1

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.08.032

**Comparison of Two Different Methods of Establishment of Mouse Asthma Model.** Yuan Lifen, Qiao Jianou, Wang Jian. Department of Respiratory Medicine, Shanghai Ninth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200011, China

**Abstract Objective** To compare the advantages and disadvantages of the two methods. **Methods** Thirty BALB/c mice were randomly divided into 3 groups: normal control group, OVA group and OVA/RSV group. With ovalbumin and hydroxide suspension sensitized, OVA mouse asthma model group and OVA/RSV group were established respectively by continuous atomization of ovalbumin and repeated nasal drops of RSV. The control group was established by sensitization and atomization excitation of sterile injection water. 24 hours after the last stimulation, the lung function was measured. The cell sorting and counting in bronchoalveolar lavage fluid were performed. The pathological changes of lung tissue were observed by HE staining. **Results** Compared with the control group, the model groups have obvious symptoms of asthma, airway wall thickening, lumen stenosis and a large number of inflammatory cell infiltration. And pathological damage of lung tissue in OVA/RSV group was significantly increased, compared with OVA group. The enhanced expiratory pause (Penh) values of OVA/RSV group were significantly higher than those in group OVA ( $P < 0.05$ ), and the number of neutrophils, monocytes, lymphocytes and eosinophils in BALF were significantly higher than those in OVA group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The establishment of asthma mouse model by OVA sensitization and RSV induction is a better way to simulate the human asthma pathogenesis.

**Key words** Asthma; Ovalbumin; RSV; Animal model

哮喘( asthma )是一种慢性气道变态反应性炎性疾病,其发生率逐年上升,严重危害着人类的健康,已成为患者家庭和全社会的一个沉重的负担<sup>[1]</sup>。如何防治哮喘的发生、发展已经成为呼吸领域的重要课题,哮喘发病机制复杂,鉴于人体试验的局限性,目前对哮喘病因、发病机制及治疗等方面的研究很大程度上需要通过动物模型来进行,建立合适的动物模型便成了当务之急。哮喘模型种类繁多,小鼠模型是哮喘

研究中最常用的工具<sup>[2]</sup>。本研究选用BALB/c小鼠作为实验动物,建立两种动物模型,从动物行为学、气道反应性、细胞分类、病理学等方面对模型进行初步评价,以期为合理选择哮喘动物模型提供依据,推动哮喘的进一步研究。

## 资料与方法

1. 主要器材及药品:甲基乙酰胆碱(methacholine, Mch,美国Sigma公司),生物光学显微镜(日本Nikon公司),血细胞计数仪(日本光电MEK-7222K),卵白蛋白(ovalbumin,OVA,Grade V,美国Sigma公司),氢氧化铝[Al(OH)<sub>3</sub>,美国Sigma公司],小鼠无创肺功能仪(美国Buxco公司),5%戊巴比妥钠(中国医药集团上海化学试剂公司)。

基金项目:上海交通大学医学院科技基金资助项目(12XJ10020)

作者单位:200011 上海交通大学医学院附属第九人民医院呼吸内科

通讯作者:王健,主任医师,电子信箱:wangjian0628@163.com

2. 实验动物、分组及方法:(1)实验动物及分组:SPF 级健康雌性 BALB/c 小鼠 30 只,体质量 15~20g,4 周龄,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。各小鼠均分笼(每笼 10 只),自由饮用食物和水,12h 昼夜周期喂养。经标准饲料适应性喂养 2 周后随机均分为正常对照组、OVA 组、OVA/RSV 组 3 组。(2)实验方法:正常对照组:于第 1 天(D0)、第 7 天(D7)分别腹腔注射 0.2ml 无菌注射用水,于第 8 天起使用超声雾化仪超声雾化无菌注射用水,每天 1 次,每次 0.5h,连续雾化 1 周。OVA 组:D0、D7 腹腔注射新鲜配制的卵蛋白氢氧化铝溶液 0.2ml(内含卵蛋白 20 微克及氢氧化铝凝胶 2.25mg),在第 8~15 天使用超声雾化仪超声雾化 1% OVA 气雾剂(1% 卵白蛋白无菌注射用水溶液雾化吸入诱喘)0.5h。每次当出现打喷嚏、呼吸急促、瘫软等症状时雾化结束,每次约 0.5h。OVA/RSV 组:D0、D7 腹腔注射 0.2ml OVA 与 Al(OH)<sub>3</sub> 的混合物[其中含 20μg OVA 与 2.25mg Al(OH)<sub>3</sub> 凝胶],在第 8~15 天连续滴鼻 10<sup>7</sup> pfu 的 RSV 25 微升/只。

3. 肺功能测定:采用全体积描记系统(whole body plethysmography, WBP)检测小鼠呼吸功能,采用梯度浓度 Mch 检测液(依次为 PBS、3.125、6.25、12.5、25、50mg/ml)依次雾化攻击并检测气道反应性,测定相应浓度下的增强的呼吸间歇(enhanced pause, Penh),于雾化激发后 24h 内无创检测呼吸功能。

4. 支气管肺泡灌洗液中细胞分类计数:小鼠取仰卧位,剪开颈部和胸部皮肤,分离颈部肌肉,充分暴露

气管。打开胸腔,暴露肺组织,结扎左肺主支气管。颈前气管处用 22G 留置针行气管插管;用 PBS 缓冲液行右肺支气管肺泡灌洗,每次 0.5ml,重复 3 次,回收率在 80% 以上。收集支气管肺泡灌洗液于 1.5ml Eppendorf 管中,离心(2000r/min, 4℃)10min,弃去上清,离心后的沉淀用 0.5ml PBS 重悬,用于细胞分类计数。

5. 肺组织病理学观察:处死小鼠后,取其右肺后叶组织于 10% 中性福尔马林溶液固定至少 24h,然后取出制成石蜡切片,常规苏木素-伊红染色,光镜下病理组织观察。

6. 统计学方法:所有数据均以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,使用 SPSS 19.0 统计软件包进行处理,组间比较采用 t 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. 行为学改变:OVA 组小鼠表现为呼吸急促、烦躁不安、明显竖毛、搔头挠背、抓耳挠腮等症状,致敏激发过程中无 1 例死亡。而 OVA/RSV 组小鼠症状则较为严重,大多数表现为腹肌抽搐、尿便失禁、点头呼吸、喘鸣、呼吸减慢或节律不齐、动作迟缓或俯伏不动,四肢瘫软、反应迟钝等症状,在滴鼻过程中死亡 2 例。正常对照组均无上述症状。

2. 肺功能改变:经肺功能检测,OVA 组及 OVA/RSV 组在 Mch 各个浓度的 Penh 值均高于正常对照组,其差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。OVA/RSV 组在 Mch 各个浓度的 Penh 值均高于 OVA 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,表 1)。

表 1 各组小鼠梯度浓度 Mch 检测液下的 Penh 值 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Mch 浓度(mg/ml)				
	PBS	3.125	6.25	12.5	25
正常对照组	45.37 ± 4.60	49.49 ± 5.56	62.32 ± 8.23	61.81 ± 6.96	90.36 ± 8.52
OVA 组	72.15 ± 4.90 *	78.79 ± 8.50 *	103.73 ± 8.96 *	123.10 ± 10.20 *	163.06 ± 12.21 *
OVA/RSV 组	134.92 ± 10.55 **	195.35 ± 11.75 **	260.66 ± 9.98 **	300.04 ± 15.23 **	369.41 ± 18.22 **
与正常对照组比较, * $P < 0.05$ ; 与 OVA 组比较, ** $P < 0.05$					

3. 支气管肺泡灌洗液中细胞分类计数:在白细胞分类计数中 4 组细胞数量比较:中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞及嗜酸性粒细胞在哮喘模型组都较对照

组有明显增多( $P < 0.05$ );OVA/RSV 组与 OVA 组相比较,各分类白细胞计数均有增多,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,表 2)。

表 2 各组小鼠支气管肺泡灌洗液中细胞分类计数 ( $\bar{x} \pm s, 10^4/ml$ )

组别	n	中性粒细胞	淋巴细胞	单核细胞	嗜酸性粒细胞
正常对照组	10	0.70 ± 0.21	0.53 ± 0.19	0.55 ± 0.13	0.05 ± 0.04
OVA 组	10	2.32 ± 0.16 *	1.55 ± 0.28 *	0.64 ± 0.23 *	0.24 ± 0.09 *
OVA/RSV 组	10	4.17 ± 0.39 **	3.02 ± 0.72 **	1.02 ± 0.31 **	0.46 ± 0.13 **

与正常对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与 OVA 组比较, \*\*  $P < 0.05$

4. 肺组织病理学改变:各模型组小鼠与正常组相比,气道壁明显增厚,管腔狭窄,管壁及其周围大量炎

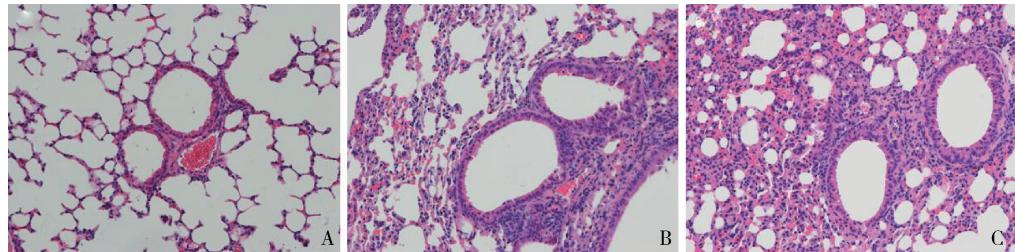


图 1 各组小鼠肺组织病理学改变(HE, ×200)

A. 正常对照组; B. OVA 组; C. OVA/RSV 组

## 讨 论

流行病学研究显示,哮喘是一种常见的慢性呼吸道疾病,严重影响着人类的健康,哮喘的病死率随着发生率的升高而上升,说明目前的哮喘防治尚存在某些不足,究其根本原因,可能是对哮喘发病机制认识尚存在重大不足<sup>[3,4]</sup>。哮喘的发病机制十分复杂,作为生命科学研究的一个重要支撑条件,疾病动物模型在很大程度上促进了对哮喘病理生理机制的理解。而一个成功稳定的哮喘动物模型在哮喘研究中至关重要,作为最常用的基础实验研究工具,小鼠哮喘模型可以模拟人类哮喘的气道高反应性、变态反应性炎症以及气道重塑等特征,并在哮喘发病机制的相关分子研究中发挥着极其重要的作用<sup>[5~7]</sup>。建立一种更加贴近人类病理生理机制的哮喘模型是哮喘科研研究的首要任务。BALB/c 小鼠作为实验动物用于哮喘模型的复制有着独特的优点,如哮喘的发生特点和人类相似<sup>[8]</sup>。BALB/c 小鼠较易产生针对 OVA 的气道高反应性,但容易对长期单一过敏原的雾化攻击产生耐受,从而降低气道炎症和气道高反应性表现<sup>[9,10]</sup>。有报道,在 OVA 致敏条件下,RSV 感染动物模型可加重气道炎性改变,导致气道上皮细胞的破坏增生,这极大可能导致哮喘动物模型气道高反应性的增加<sup>[11~13]</sup>。目前,常见的激发方式主要有雾化吸入及鼻内给药,其中雾化吸入激发小鼠状态较好,致死率低,使用较为广泛。

本研究建立了两种哮喘模型,从动物行为学、气道反应性、病理学、细胞分类等方面对模型进行了初步评价,以期选择一种更加符合哮喘发作临床特点的动物模型。通过实验笔者发现,与 OVA 组相比,OVA/RSV 组模型哮喘症状表现的更加明显,气道反应性更明显(表 1),支气管肺泡灌洗液中各类细胞明显增多(表 2),肺部病理组织可见气道壁明显增厚,

性细胞浸润,OVA/RSV 组小鼠与 OVA 组小鼠气道壁增厚更加明显,管腔更为狭窄(图 1)。

管腔明显狭窄,管壁及其周围大量炎性细胞浸润(图 1)。但病死率相对来说比较高,整个研究过程中,RSV 滴鼻激发过程中死亡 2 只,而 OVA 组无 1 例死亡。本研究结果显示,同样在 OVA 致敏条件下,RSV 滴鼻激发建立的哮喘模型优于 OVA 雾化激发建立的哮喘模型,鼻内给药制作的哮喘模型表现出更为明显的气道及肺组织炎症、气道高反应性、杯状细胞和上皮细胞增生以及轻度的上皮组织纤维化。一个良好的哮喘模型,应具备气道高反应性、气道炎性及气道重塑等特点,能在一定程度上模拟人类哮喘的发生、发展过程,这样才能使得制备的小鼠哮喘模型更加贴近人类哮喘表现,模拟哮喘实际发病情况,在此基础上进一步为哮喘的发病机制及治疗研究搭建技术平台,对实验研究并最终指导临床治疗开辟了新的途径<sup>[14]</sup>。

综上所述,在小鼠哮喘模型制备方面,相比于 OVA 组,OVA/RSV 组有如下优点:①发病病理过程与人类更为相似;②哮喘症状及肺部病理表现出气道炎症及气道反应性变化更明显;③造模方法操作简单可行、稳定,重复性好,模型成功率高;④省时、省力,适合大样本研究。而缺点是相比于 OVA 致敏 OVA 雾化激发建模,OVA 致敏 RSV 滴鼻激发病死率较高。综合以上的实验结果,笔者由此得出结论,OVA 致敏 RSV 滴鼻激发是一种较为成功的复制小鼠哮喘模型的方法。

## 参考文献

- 苏楠,林江涛,刘国梁,等.我国 8 省市支气管哮喘患者控制水平的流行病学调查[J].中华内科杂志,2014,53(8):601~606
- Kim HJ, Lee E, Lee SH, et al. Mold elicits atopic dermatitis by reactive oxygen species: Epidemiology and mechanism studies [J]. Clin Immunol, 2015, 161(2):384~390
- Dhawale VS, Amara VR, Karpe PA, et al. Activation of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) attenuates allergic air way inflammation in rat asthma model[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2016, 306:17~26

(下转第 138 页)

综上所述,NMOSD 好发于女性,首发症状表现复杂,以脊髓灰质受累为主,能诱发促进出现脑部病灶,NMO-IgG 抗体可作为 NMOSD 的支持诊断依据。

### 参考文献

- 徐雁,王维治. 视神经脊髓炎谱系疾病 2015 新诊断标准解读[J]. 中华神经科杂志,2016,49(6):499-501.
- 张伟赫,矫毓娟,焦劲松. 伴系统性自身免疫病的视神经脊髓炎谱系疾病临床和影像学特点分析[J]. 中华神经科杂志,2015,48(4):324-327.
- Patejdl R, Wittstock M, Zettl UK, et al. Neuromyelitis optica spectrum disorder coinciding with hematological immune disease: a case report[J]. Mult Scler Relat Disord,2016,8(9):101-103.
- Tanaka M, Tanaka K. Sudden hearing loss as the initial symptom in Japanese patients with multiple sclerosis and seropositive neuromyelitis optica spectrum disorders[J]. J Neuroimmunol,2016,15(298):16-18.
- 唐敏,周群,朱幼玲,等. 长节段脊髓病变表现为脊髓空洞症的视神经脊髓炎谱系疾病 1 例[J]. 安徽卫生职业技术学院学报,2015,14(6):96-97.
- 张遥,费允云,牛婧雯,等. 合并结缔组织病的视神经脊髓炎谱系疾病回顾性研究[J]. 中华医学杂志,2014,94(39):3056-3061.
- 郝洪军,刘冉,刘琳琳,等. 视神经脊髓炎谱系疾病 AQP4 抗体/NMO-IgG 阳性患者的分析[J]. 中华临床医师杂志:电子版,2015,8(21):3844-3848.
- Sinnecker T, Schumacher S, Mueller K, et al. MRI phase changes in multiple sclerosis vs neuromyelitis optica lesions at 7T[J]. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm,2016,3(4):259-265.
- Luo JJ, Lv H, Sun W, et al. Anti-N-methyl-d-aspartate receptor encephalitis in a patient with neuromyelitis optica spectrum disorders[J]. Mult Scler Relat Disord,2016,8(2):74-77.
- 宋洋洋,韩金鸣,曹青青,等. 以不典型大脑病变起病的视神经脊髓炎谱系疾病 1 例报告[J]. 中风与神经疾病杂志,2016,33(7):653-654.
- Matsusue E, Fujihara Y, Suto Y, et al. Three cases of neuromyelitis optica spectrum disorder with optic neuritis and transverse myelitis[J]. Acta Radiol Open,2016,5(5):1456-1461.
- 马文巧,杨丽娜,赵宁,等. 以最后区综合征为首发症状的视神经脊髓炎谱系疾病 8 例临床分析[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志,2016,23(3):221-223.
- 王瑞金,齐冬,张拥波. 视神经脊髓炎谱系疾病 1 例报道并文献复习[J]. 中国临床神经科学,2016,24(3):324-327,347.
- De Sèze J, Kremer L, Collongues N. Neuromyelitis optica spectrum disorder(NMOSD): a new concept[J]. Rev Neurol: Paris,2016,172(4-5):256-262.
- 赵朔,徐全刚,魏世辉. 视神经脊髓炎相关性视神经炎临床研究进展[J]. 中华眼底病杂志,2015,31(6):605-608.
- Sepúlveda M, Armangue T, Martinez - Hernandez E, et al. Clinical spectrum associated with MOG autoimmunity in adults: significance of sharing rodent MOG epitopes[J]. J Neurol,2016,263(7):1349-1360.
- 黄鑫,刘建国,雷霞,等. 视神经脊髓炎谱系疾病复发相关因素的临床研究[J]. 中风与神经疾病杂志,2016,33(5):433-437.
- 钟晓南,胡学强. 抗水通道蛋白 4 抗体阴性视神经脊髓炎/视神经脊髓炎谱系疾病的再认识[J]. 中华神经科杂志,2016,49(6):425-429.
- Wang X, Yi H, Liu J, et al. Anti-thyroid antibodies and thyroid function in neuromyelitis optica spectrum disorders[J]. J Neurol Sci,2016,7(15):13-19.
- Roy U, Saini DS, Pan K, et al. Neuromyelitis optica spectrum disorder with tumefactive demyelination mimicking multiple sclerosis: a rare case[J]. Front Neurol,2016,11(7):73-82.
- 邱伟,常艳宇,李蕊,等. AQP4 基因多态性与 NMO 临床表型的相关性分析及功能研究[J]. 中华医学杂志,2015,95(7):501-506.
- Finke C, Heine J, Pache F, et al. Normal volumes and microstructural integrity of deep gray matter structures in AQP4<sup>+</sup> NMOSD[J]. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm,2016,3(3):229-235.

(收稿日期:2016-10-28)

(修回日期:2016-12-20)

(上接第 134 页)

- Kim SG, Lee E, Park NY, et al. Britanin attenuates ovalbumin-induced airway inflammation in a murine asthma model[J]. Arch Pharm Res,2016,39(7):1006-1012.
- Johnson JR, Folestad E, Rowley JE, et al. Pericytes contribute to airway remodeling in a mouse model of chronic allergic asthma[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,2015,308(7):658-671.
- Grundström J, Saarne T, Kemi C, et al. Development of a mouse model for chronic cat allergen-induced asthma[J]. Int Arch Allergy Immunol,2014,165(3):195-205.
- Silva RA, Almeida FM, OlivoCR, et al. Airway remodeling is reversed by aerobic training in a murine model of chronic asthma[J]. Scand J Med Sci Sports,2015,25(3):258-266.
- Wu Y, You H, Ma P, et al. Role of transient receptor potential ion channels and evoked levels of neuropeptides in a formaldehyde-induced model of asthma in BALB/c mice[J]. PLoS One,2013,8(5):e62827.
- Chi XY, Jiang SJ, Wang J, et al. Effect of glucocorticoid in mice of asthma induced by ovalbumin sensitisation and RSV infection[J]. Asian Pac J Allergy Immunol, 2011,29(2):176-180.
- Silva RA, Vieira RP, Duarte AC, et al. Aerobic training reverses airway inflammation and remodelling in an asthma murine model[J]. Eur Respir J, 2010,35(5):994-1002.

(收稿日期:2016-11-28)

(修回日期:2016-12-20)