

· 技术与方法 ·

不同佐剂和激发方式对哮喘小鼠肺部炎症反应的影响

钟文清, 谭建新[△]

(广东医学院附属医院儿童医学中心, 广东湛江 524023)

摘要:目的 研究不同佐剂和激发方式对哮喘小鼠的肺部炎症反应发生和发展的影响。方法 应用无特定病原体(SPF)级的 BALB/c 小鼠,以卵清蛋白作过敏原,采用氢氧化铝和十二水硫酸铝钾作佐剂,雾化 7 d 后比较炎症反应表现,选用合适的佐剂后用滴鼻和雾化的激发方式制备小鼠哮喘模型,对肺泡灌洗液(BALF)的白细胞进行计数及分类和观察肺组织中气管和血管周围的炎症反应。结果 采用十二水硫酸铝钾激发哮喘 BALF 中白细胞和嗜酸性粒细胞比例比氢氧化铝高($P < 0.05$),肺组织炎症反应更明显。5 次及 7 次雾化均比 3 次滴鼻激发哮喘的 BALF 中白细胞和嗜酸性粒细胞比例高($P < 0.05$),肺组织炎症反应更明显;5 次与 7 次雾化激发哮喘,炎症反应无明显差别;停止雾化 10 d 后炎症反应明显减轻。结论 在建立哮喘模型中,十二水硫酸铝钾比氢氧化铝能更明显地诱导肺部炎症反应;雾化比滴鼻更能诱导肺部炎症反应;结束雾化一段时间后炎症反应会消退。

关键词:哮喘;氢氧化铝;十二水硫酸铝钾;支气管肺泡灌洗液

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.36.027

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)36-4433-03

The effect of different adjuvants and challenge methods on asthma mice's lung inflammation

Zhong Wenqing, Tan Jianxin[△]

(Department of Children's Medical Center, the Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524023, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of different adjuvants and challenge methods on asthma mice's lung inflammation. **Methods** BALB/c mice were sensitized with ovalbumin in aluminium hydroxide or alum adjuvant. After 7 days challenges, choose the proper adjuvant with intranasal or atomized to prepare mice asthma model. Count and classify the white blood cells(WBC) in bronchoalveolar lavage fluid(BALF), observe the peribronchial and perivascular inflammation. **Results** Compare the WBC and eosinophils in BALF, the alum group are higher than aluminum hydroxide group($P < 0.05$), 5 and 7 days' atomized groups are higher than 3 days' intranasal group($P < 0.05$), 5 and 7 days' atomized groups have showed no significant difference($P > 0.05$). 10 days after the last challenge, the inflammation fade sharply, and the corresponding result occurred in the lung inflammation. **Conclusion** In establishing asthma model, alum is better than aluminum hydroxide, atomization is better than intranasal. Inflammation will fade after stop atomization a period of time.

Key words: asthma; aluminium hydroxide; aluminum potassium sulfate dodecahydrate; bronchoalveolar lavage fluid

支气管哮喘(简称哮喘)是一种常见的呼吸系统疾病,临床表现主要为喘息、气急、胸闷或咳嗽等,肺部病理改变一般为炎症反应细胞浸润和气道慢性炎症反应等。小鼠是最常用于构建哮喘模型的动物,国内外的学者所用的佐剂和激发方式各异。较常用的佐剂为氢氧化铝和十二水硫酸铝钾,激发方式常用的有雾化和滴鼻。建立稳定的哮喘模型是研究哮喘发病及其治疗的基础。本研究通过比较不同佐剂和激发方式对哮喘模型的影响,观察小鼠肺组织中气管和血管周围的炎症反应,进一步观察在停止雾化 10 d 后肺部炎症反应的消退情况。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 38 只无特定病原体(SPF)级小鼠购于广西医科大学实验动物中心,所有小鼠均为 6~8 周雌性。

1.2 主要试剂和材料 鸡卵清蛋白(OVA)、氢氧化铝,均购自美国 Sigma 公司;十二水硫酸铝钾购自上海阿拉丁公司;KYWH1004 型雾化器(雾化颗粒小于 $5 \mu\text{m}$)由佛山凯亚医疗科技有限公司生产;红细胞裂解液由北京康为世纪公司生产;快速瑞氏染液由南京建成科技有限公司生产。

1.3 方 法

1.3.1 致敏液与激发液配制 致敏液分 3 种:哮喘组每只小

鼠注射 $200 \mu\text{L}$ 致敏液 I ($100 \mu\text{g}$ OVA 和 2mg 十二水硫酸铝钾溶于 $200 \mu\text{L}$ 生理盐水)或致敏液 II ($100 \mu\text{g}$ OVA 和 2mg 氢氧化铝溶于 $200 \mu\text{L}$ 生理盐水);对照组用生理盐水代替致敏液致敏。激发液分 3 种:1% OVA (1g OVA 溶于 100mL 生理盐水中)、滴鼻液 ($100 \mu\text{g}$ OVA 溶于 $30 \mu\text{L}$ 生理盐水中)、生理盐水(对照组用生理盐水作为激发液)。

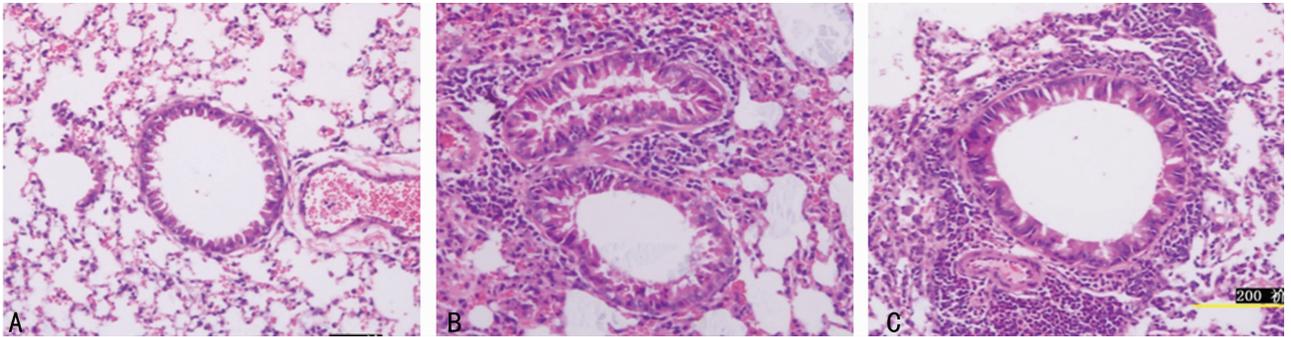
1.3.2 动物分组与激发方法 采用随机数表法将小鼠随机分成 A~F 6 组,除 D 组 8 只外其余每组 6 只,先取 3 组进行实验:分别为 A 组(对照作用,用生理盐水致敏,生理盐水雾化 7 d)、B 组(用致敏液 II 致敏,1% OVA 雾化 7 d)、C 组(用致敏液 I 致敏,1% OVA 雾化 7 d);经实验发现十二水硫酸铝钾作佐剂致敏效果较好(结果见后),再取 3 组用致敏液 I 致敏,以激发方法不同分别为 D 组(用滴鼻液激发 3 d)、E 组(用 1% OVA 雾化 5 d)、和 F 组(用 1% OVA 雾化 7 d,在末次雾化 10 d 后处死)。所有实验组均于第 0、14 天腹腔注射致敏,于第 21 天开始激发,雾化时间为每天 30 min。D 组滴鼻激发前用 1% 戊巴比妥钠 10mL/kg 腹腔注射麻醉,然后将 $30 \mu\text{L}$ 滴鼻液缓慢交替滴入 2 个鼻孔。

1.3.3 支气管肺泡灌洗 于末次激发 24 h 后(其中 F 组末次

表 1 不同佐剂及激发方式对 BALF 白细胞总数及分类计数($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	白细胞($\times 10^3$)	E	M	N	L
A 组	8.75 \pm 1.13	2.50 \pm 1.96	70.35 \pm 5.41	6.88 \pm 2.12	20.26 \pm 3.01
B 组	71.08 \pm 5.89 ^a	40.02 \pm 2.75 ^a	38.67 \pm 2.95 ^a	8.37 \pm 1.93	12.94 \pm 2.62 ^a
C 组	360.83 \pm 30.69 ^{ab}	46.33 \pm 7.01 ^{ab}	35.27 \pm 4.03 ^a	7.16 \pm 2.16	11.24 \pm 2.75 ^a
D 组	13.76 \pm 1.58 ^{ac}	32.47 \pm 7.24 ^{abc}	42.15 \pm 8.54 ^{ac}	18.49 \pm 3.44 ^{abc}	6.89 \pm 2.43 ^{ab}
E 组	316.83 \pm 28.25 ^{ad}	45.28 \pm 6.89 ^{ad}	25.15 \pm 6.62 ^{abcd}	16.10 \pm 5.62	13.47 \pm 3.89
F 组	13.71 \pm 2.08 ^a	13.66 \pm 2.23 ^{abcd}	51.72 \pm 3.36 ^{abcd}	11.93 \pm 4.26	22.69 \pm 4.02 ^{bcd}

^a: $P < 0.05$, 与 A 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 B 组比较; ^c: $P < 0.05$, 与 C 组比较; ^d: $P < 0.05$, 与 D 组比较。



A: A 组; B: B 组; C: C 组。

图 1 各组肺组织炎症反应比较(HE \times 200)

激发 10 d 后)经戊巴比妥钠麻醉摘眼球放血处死,仰卧位固定,分离颈部皮肤和肌肉充分暴露气管,用血管夹夹闭左主支气管,用注射器经环状软骨做气管插管,0.5 mL 生理盐水对右肺进行灌洗 3 次后回收 80%左右。肺泡灌洗液(BALF)于 4 $^{\circ}$ C 500 g 离心 10 min,弃上清后用 100 μ L 生理盐水重悬,参照说明书裂解红细胞,沉淀再用 100 μ L 生理盐水重悬,用牛鲍计数板计白细胞总数。重悬液涂片后进行瑞氏染色,分类计数至少 200 个白细胞。

1.4 肺组织苏木素-伊红(HE)染色 左肺用 10% 甲醛固定 24 h 后经脱水和常规石蜡包埋,切片厚度为 3 μ m,HE 染色后镜下观察肺部炎症反应。

1.5 统计学处理 采用 SPSS17.0 对数据进行分析处理,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 ANOVA 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 激发时的表现 D 组在滴鼻的过程中出现明显腹式呼吸,呼吸加深加快,有 1 只因为麻醉过深、滴鼻过快而死亡。除 A 组外,所有雾化激发哮喘小鼠在第 3 次雾化时均出现烦躁不安、抓鼻、大小便失禁。

2.2 BALF 细胞计数 各组 BALF 的白细胞总数比较,见表 1。C 组炎症反应较 B 组严重($P < 0.05$)。与 A 组比较, D 组白细胞轻度增高($P < 0.05$),B、C 和 E 组都显著增高($P < 0.05$)。C、E 组与 D 组比较,白细胞明显增多($P < 0.05$)。F 组与 C 组比较,白细胞显著下降($P < 0.05$)。C 组较 E 组白细胞多但差异无统计学意义($P = 0.262$)。对 BALF 的白细胞[包括嗜酸性粒细胞(E)、单核细胞(M)、中性粒细胞(N)和淋巴细胞(L)]进行计数和分类计数。在各组的嗜酸性粒细胞比较中:B 组较 C 降低;与 A 组比较,其余各组均增高;B、C 及 E 组均较 D 组增高;C 组与 E 组无差别;F 组比 B、C、D 及 E 组均

明显降低,见表 1。

2.3 各组肺组织炎症反应比较 气管和血管周围炎症反应比较,A 组气管完整,气管周围未出现炎症反应细胞浸润的现象,肺部小动静脉周围无炎症反应细胞浸润,纹理清晰,见图 1A。B 组气管及血管周围炎症反应较明显,部分气管内有黏液栓形成,见图 1B。C 组气道周围炎症反应浸润,气管上皮细胞增厚部分脱落,杯状细胞增高,部分气道平滑肌细胞增厚,气管内有黏液栓形成,血管周围大量的炎症反应细胞浸润,见图 1C,气管及血管周围炎症反应较 B 组重。D 组局部气管出现严重的炎症反应、黏液栓形成,局部小血管周围出现大量的炎症反应细胞浸润。但仍有大部分气管及血管周围无炎症反应浸润;E 组肺部炎症反应类似于 C 组。F 组观察到气管周围炎症反应明显减轻,基本恢复正常;血管周围炎症反应细胞明显减轻但仍未恢复正常,仍能观察到少量炎症反应细胞浸润。

3 讨论

过敏性哮喘是一种以嗜酸性粒细胞增高和呼吸道高反应性为特点的气道炎症反应,并伴有多种细胞因子参与的过程。环境、种属、佐剂及激发方法对小鼠哮喘炎症反应均有影响^[1],然而,不同激发方式对哮喘模型的影响较少报道^[2]。虽然近年研究哮喘特别是难治性哮喘较多采用尘螨作为过敏原^[3-5],但在研究哮喘的防治上更多的是用 OVA 作为过敏原^[6-7],本研究亦采用 OVA 作为过敏原,先比较十二水硫酸铝钾和氢氧化铝佐剂对哮喘模型的影响,同样激发 7 d 均能成功诱发哮喘,但无论从 BALF 中的白细胞和嗜酸性粒细胞计数,还是从肺组织中气道和血管周围炎症反应比较,以十二水硫酸铝钾为佐剂的炎症反应程度比氢氧化铝更严重,这可能与十二水硫酸铝钾佐剂的乳化效果更好有关^[1]。

在研究急性哮喘模型中,慢性模型的构建有不同的方法^[8-10]。为了更好地观察肺部炎症反应表现,本实验采用 5 次

和 7 次的雾化激发方式进行研究,同时也比较 3 次滴鼻激发的效果。对于哮喘组,在观察其激发过程的表现时发现有个别小鼠在第 1 次雾化时就出现抓鼻、烦躁不安和大小便失禁,第 3 次激发时普遍出现上述现象,这说明常用的 3 次雾化激发能建立较稳定的哮喘模型^[11-12],激发 5 次和 7 次后能出现较明显的炎性反应表现,但两者的炎性反应表现无明显差别,7 次雾化组的部分气道平滑肌细胞轻度增厚。平滑肌细胞的增生是气道重塑的重要组成部分^[13-15],这说明连续激发 7 d 后才开始出现气道重塑的病理改变,这也能解释为什么研究气道重塑应该选用慢性哮喘模型。滴鼻也能诱导哮喘的发生^[2,16-17],虽然滴鼻的操作简单耗材也较少,但滴鼻激发受干扰的因素很多,主要与操作者的技术有关,麻醉得太深或滴得太快均会导致小鼠死亡,本实验有 1 只小鼠因此窒息死亡,观察发现在麻醉后接近苏醒的状态下滴鼻效果最好。滴鼻的过程中要不断翻动小鼠以达到 OVA 能均匀地进入肺部,但即使这样也不能均匀地进入肺部,肺部病理切片发现,局部的气道和血管炎性反应严重,但整个肺部炎性反应较轻,这可能与滴注 OVA 时局限于个别气道有关。与正常对照组比较,滴鼻组 BALF 中的嗜酸性粒细胞虽然明显增高,但总炎性反应细胞增高并不明显。与滴鼻比较,雾化组整体炎性反应明显,肺组织病理也能发现大部分气道和血管周围出现较明显的炎性反应细胞浸润,这有可能是引起 BALF 中炎性反应细胞明显增高的原因。

综上所述,建立哮喘模型与佐剂和激发方式密切相关。十二水硫酸铝钾能溶于水,乳化效果比氢氧化铝好,是较理想的佐剂。在研究肺部整体炎性反应时,传统的雾化激发方法较滴鼻好。采用 5 次雾化较 3 次滴鼻激发的方法能更有效地诱导哮喘的发生。

参考文献:

- [1] 李睿,刘恩梅,杨锡强,等.不同饲养环境、种属、佐剂及激发方法对小鼠哮喘炎症的影响[J].重庆医学,2006,35(1):43-44.
- [2] 沈璐,赖克方,姜华,等.不同激发方式对小鼠过敏性支气管哮喘模型的影响[J/CD].中华哮喘杂志:电子版,2009,3(6):404-408.
- [3] Fredriksson K, Fielhaber JA, Lam JK, et al. Paradoxical effects of rapamycin on experimental house dust mite-induced asthma[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e33984.
- [4] Liu T, Laidlaw TM, Feng C, et al. Prostaglandin E2 deficiency uncovers a dominant role for thromboxane A2 in house dust mite-induced allergic pulmonary inflammation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(31): 12692-12697.
- [5] Gregory LG, Jones CP, Walker SA, et al. IL-25 drives remodelling in allergic airways disease induced by house dust mite[J]. Thorax, 2013, 68(1): 82-90.
- [6] Bargut TC, Ferreira TP, Daleprane JB, et al. Fish oil has beneficial effects on allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in mice[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e75059.
- [7] Jung JH, Kang IG, Kim DY, et al. The effect of Korean red ginseng on allergic inflammation in a murine model of allergic rhinitis[J]. J Ginseng Res, 2013, 37(2): 167-175.
- [8] Park YN, Lee YJ, Choi JH, et al. Alleviation of OVA-induced airway inflammation by flowers of *Inula japonica* in a murine model of asthma[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2011, 75(5): 871-876.
- [9] Kim SH, Kim BK, Lee YC. Effects of Corni fructus on ovalbumin-induced airway inflammation and airway hyper-responsiveness in a mouse model of allergic asthma [J]. J Inflamm(Lond), 2012, 9(1): 9.
- [10] Kim MS, Cho KA, Cho YJ, et al. Effects of interleukin-9 blockade on chronic airway inflammation in murine asthma models [J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2013, 5(4): 197-206.
- [11] Zha WJ, Qian Y, Shen Y, et al. Galangin Abrogates Ovalbumin-Induced Airway Inflammation via Negative Regulation of NF- κ B [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013: 767689.
- [12] Gong JH, Shin D, Han SY, et al. Blockade of Airway Inflammation by Kaempferol via Disturbing Tyk-STAT Signaling in Airway Epithelial Cells and in Asthmatic Mice [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013: 250725.
- [13] Manso L, Reche M, Padial MA, et al. Diagnostic tools assessing airway remodelling in asthma [J]. Allergol Immunopathol(Madr), 2012, 40(2): 108-116.
- [14] Hofmann Bowman MA, Heydemann A, Gawdzik J, et al. Transgenic expression of human S100A12 induces structural airway abnormalities and limited lung inflammation in a mouse model of allergic inflammation [J]. Clin Exp Allergy, 2011, 41(6): 878-889.
- [15] Cho JY, Pham A, Rosenthal P, et al. Chronic OVA allergen challenged TNF p55/p75 receptor deficient mice have reduced airway remodeling [J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(8): 1038-1044.
- [16] Mo JH, Chung YJ, Hayashi T, et al. The role of plasmacytoid and myeloid dendritic cells in induction of asthma in a mouse model and the effect of a TLR9 agonist on dendritic cells [J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2011, 3(3): 199-204.
- [17] Takada E, Furuhashi M, Nakae S, et al. Requirement of apoptosis-inducing kinase 1 for the induction of bronchial asthma following stimulation with ovalbumin [J]. Int Arch Allergy Immunol, 2013, 162(2): 104-114.