



# 小鼠过敏性哮喘模型的研究进展及评价

刘佳, 郑健, 于涛

(东北林业大学盐碱地生物资源环境研究中心, 东北油田盐碱植被恢复与重建教育部重点实验室, 哈尔滨 150040)

**【摘要】** 支气管哮喘(简称哮喘)是常见的慢性病,随着过敏患者的增加,小鼠过敏性哮喘模型的研究越来越重要。本文通过对近年来国内外小鼠过敏性哮喘的实验研究文献进行总结,从实验小鼠的选择、制备模型的方法及模型的评价指标等方面进行综合分析,为进一步开展哮喘研究提供帮助。

**【关键词】** 哮喘;模型;小鼠;过敏原

**【中图分类号】** R562.2<sup>+</sup>5;R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)02-0065-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.02.15

## Progress and Evaluation of Research on Mouse Models of Allergic Asthma

LIU Jia, ZHENG Jian, YU Tao

(Alkali Soil Natural Environmental Science Center, Northeast Forestry University/Key Laboratory of Saline-alkali Vegetation Ecology Restoration in Oil Field, Ministry of Education, Harbin 150040, China)

**【Abstract】** Bronchial asthma (asthma for short) is a common chronic disease. With the increase of allergic patients, it is increasingly important to emphasize the need of mouse allergic asthma models in research of this disease. This review summarizes recent domestic and overseas literatures on mouse allergic asthma experiments through comprehensive analysis on mouse selection, models making and model evaluation.

**【Key words】** Asthma; Model; Mice; Allergen

支气管哮喘(简称哮喘)是以气道高反应性(AHR)、黏液高分泌和气道嗜酸粒细胞(EOS)、淋巴细胞、单核细胞等多种炎症细胞浸润慢性气道性疾病。国内外已能利用这些特征复制出哮喘急性炎症和气道重塑等各种模型。

由于小鼠免疫遗传背景较为清楚,动物肺功能测定技术的提高,大量相关分子生物学试剂及抗体可供选用,而使得小鼠成为制备哮喘模型的首选动物。本文介绍了几种小鼠过敏性哮喘模型的制备方法,并总结了小鼠哮喘模型的评价标准。

### 1 小鼠品系选择

实验小鼠品系很多,常用的品系有 C57BL/6、

BALB/c、A/J、CBA、NC/Nga 等。其中 C57BL/6 对 HDM(屋尘螨)易致敏,可用于制作由 HDM 诱发的过敏性哮喘模型,但有文献指出用尘螨提取液滴鼻激发 NC/Nga 小鼠诱发哮喘模型症状强于其他品系小鼠<sup>[1]</sup>;而 BALB/c 易对 OVA(卵白蛋白)和花粉致敏产生 AHR 和明显 IgE 超敏反应<sup>[2]</sup>。Jonasson 等<sup>[3]</sup>比较注射与吸入乙酰胆碱在 C57BL/6、BALB/c 两种小鼠体内不同影响,发现在 BALB/c 小鼠注射比吸入方式肺阻力明显增强,而在 C57BL/6 没有太大差异性。

研究发现雌性小鼠比雄性小鼠能产生更显著的过敏性气道炎症<sup>[4]</sup>。Hayashi 等研究显示,在 OVA 诱发成熟雌/雄性 BALB/c 小鼠的迟发性气道

[作者简介] 刘佳(1981-)女,硕士研究生,细胞生物学专业,E-mail: hlelj@sina.com。

[通讯作者] 于涛(1969-)男,讲师,从事生物化学方向研究,E-mail: yangwang0815@126.com。

炎症中,雄性 BALB/c 小鼠其嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润的支气管-细支气管炎症没有雌性 BALB/c 小鼠严重,而且支气管肺泡液中炎症细胞数也较雌性少。由于品系间身体长短和胸围不同,最终得出的哮喘动物模型也各异。另有研究表明,普通级小鼠可能由于与微生物抗原接触的机会大大增加,而降低了其对变应原哮喘炎症的敏感性,因而制备哮喘模型不宜用普通级动物<sup>[5]</sup>。目前,多数选用 6~8 周,体重 18~22 g 的 C57BL/6、BALB/c 雌性无特定病原体(SPF 级)或清洁级小鼠做小鼠哮喘模型。

## 2 佐剂

佐剂是一种免疫增强剂,本身可以有免疫原性,也可以不具免疫原性。常与抗原物质一起注射或预先注入机体后,影响机体免疫调节网络,使机体更早、更有效、更持久地产生免疫应答。常用的具有免疫原性的佐剂有:百日咳杆菌、结核分枝杆菌和枯草杆菌等。非免疫原性佐剂有:Al(OH)<sub>3</sub>(氢氧化铝)、液态铝或明矾等。目前多数文献中选用氢氧化铝作为 OVA 致敏小鼠哮喘模型作为佐剂,但是实验中发现氢氧化铝与 OVA 不能很好混合,放置后出现明显分层;而佐剂与抗原混合的程度对抗原的免疫原性的产生一定影响。田代印等用硫酸铝钾取代氢氧化铝,并用 10 mol/L 氢氧化钠调节 pH 值,使蛋白质变性,两者形成混悬小球后充分混合,增强了 OVA 的致敏效果<sup>[6]</sup>。

## 3 过敏性小鼠哮喘模型的制备

制作过敏性哮喘动物模型的变应原主要有 OVA、尘螨、豚草、花粉、真菌孢子、蟑螂、蛔虫卵等。小鼠哮喘模型制作过程分两阶段:致敏与激发。致敏原的选择,抗原剂量、致敏和激发的时间、频率、方式不同能复制出不同的哮喘模型。即使相同诱导原致敏激发方式、间隔时间,持续时间等亦很难找到完全相同的报道。

### 3.1 OVA

由于 OVA 来源容易,价格低廉,而且具有很强的免疫原性,因此是最常用于制备哮喘模型的致敏剂。程晓明等用 OVA 10 μg 和氢氧化铝凝胶 20 mg 的混合液在第 1 天、第 13 天腹腔注射致敏 BALB/c 小鼠,第 25 天以 1% OVA 雾化激发 20~30 min,制出急性哮喘模型<sup>[7]</sup>。最短成模过程包括在第 1、8 天致敏、第 18~21 天激发,需时 21 d;经典成模过程为

在第 1、15 天致敏、第 25~29 天激发,需时 28 d<sup>[8]</sup>。但这类小鼠模型抗原激发的时间较短,多不超过 1 周,此类模型的不足之处在于产生的是缺乏黏膜的慢性炎症、平滑肌增生、胶原增厚和气道壁结构改变。因此可通过长时间反复雾化激发建立重症哮喘模型。Maud 等在第 1、11 天用 OVA 10 μg 和乳化氢氧化铝凝胶腹腔注射 BALB/c 小鼠,第 22~96 天,用 1% 的 OVA 雾化激发,每周 5 次每次 30 min,建立了小鼠气道重塑模型,并进一步研究长效土霉素通过调节基质金属蛋白酶及细胞因子对小鼠气道重塑模型的作用<sup>[9]</sup>。

致敏多采用腹腔注射、皮下注射或两者结合,越早致敏,越易成模<sup>[10]</sup>。激发方式多采用滴鼻激发或雾化激发。滴鼻激发操作方便,无需使用特殊装置,有人通过一次滴鼻方式成功建立小鼠哮喘模型<sup>[11]</sup>,但易致死。雾化激发小鼠状态较好,激发致死率低,但一次不能激发哮喘模型,需通过多长反复激发的方式建立模型。致敏原通过改变剂量影响细胞因子的类型,进而影响动物模型表型的变化。低剂量抗原进入体内,以 Th2 型细胞因子分泌为主,引起肺内嗜酸粒细胞聚集、粘液过度分泌等哮喘特征性表现。高剂量的抗原致敏时,诱发以 Th1 型细胞为主的反应,抑制了哮喘症状的出现。商艳等采用不同剂量(0、10、100、1 000) g 的 OVA 致敏,反复激发后建立哮喘小鼠模型,发现 10 g 组出现支气管哮喘的典型特征,增加致敏的剂量反而减轻了肺部炎症的程度<sup>[12]</sup>。

### 3.2 尘螨和蟑螂

尘螨是我国哮喘患者最常见过敏原之一,50% 以上过敏患者和 80% 以上哮喘儿童对螨虫过敏原过敏<sup>[13]</sup>。粉尘螨与屋尘螨都是哮喘患者常见的过敏原。目前,国内外主要使用屋尘螨构建变态反应性炎症模型,粉尘螨较少。Tournoy 等用不同浓度屋尘螨(3、30、300 μg/mL)连续 7 d 雾化激发,发现 300 μg/mL 组出现 AHR,大量炎症细胞浸润,血清 IgE 升高。3 μg/mL 和 30 μg/mL 组出现 AHR,血清 IgE 升高,但无气道炎症<sup>[14]</sup>。陈华夏于第 1、3、5、7、9、11 天分别腹腔注射 200 μL 含 50 μg 粉尘螨蛋白和 2.25 mg 氢氧化铝的生理盐水溶液致敏小鼠;第 13、16、19、20 和 21 天分别用 1 mL 4 g/L 的粉尘螨提取液反复雾化激发,成功建立了肺部变态反应性炎症模型<sup>[15]</sup>。Nicholas 等<sup>[16]</sup>研究发现,使用尘螨、豚草等不同致敏原联合作用反复激发雌性 BALB/c

小鼠,建立小鼠气道重塑模型。另外 Narala 用蟑螂变应原致敏激发 BALB/c 小鼠,成功建立哮喘模型<sup>[17]</sup>。Gore 等利用基因重组蟑螂蛋白致敏也成功制作了哮喘模型<sup>[18]</sup>。

### 3.3 真菌和花粉

真菌和花粉是引起季节性哮喘的重要变应原,且在环境中分布广泛。互隔交链孢霉菌容易致敏,是诱发人类哮喘发作的主要霉菌种类之一。徐选用 C57BL/6 小鼠腹腔注射含有 4 mg 氢氧化铝的浓度为  $4 \times 10^7$  /mL 的孢子悬液 50  $\mu$ L,在第 14 ~ 17 天,取 50  $\mu$ L 浓度为  $4 \times 10^6$  /mL 的孢子悬液缓慢鼻滴小鼠,发现小鼠气道顺应性降低、反应性增高,血清总 IgE 和抗原特异性 IgE 升高,炎性细胞浸润;免疫反应机制上表现为细胞因子 IL-4 升高,INF- $\gamma$  降低等<sup>[19]</sup>。

皮下致敏及经鼻吸入花粉能诱导小鼠模型产生特异性 IgG、IgE 抗体、细胞因子、肺部组织炎症浸润、黏液分泌以及非特异性气道高反应性等<sup>[20]</sup>。

## 4 小鼠哮喘模型的一般评价指标

哮喘模型是气道高反应性和炎症细胞浸润为特征慢性气道炎症性疾病,因此,一个理想的哮喘模型应从动物的症状表现、气道反应性及病理学改变 3 个方面来验证。判断哮喘模型是否成功和合格至少应当包括以下 4 个方面:

### 4.1 造模后动物总体外观

小鼠腹腔致敏后出现体重下降,经抗原激发后出现烦躁不安、擦鼻、打喷嚏、呼吸困难或呼吸节律不整、腹肌抽搐、口唇紫绀伴腹式呼吸、毛发竖起、反应迟钝等症状。

### 4.2 肺病理切片观察、炎症细胞浸润、炎性细胞分类(以 EOS 为代表)

可进行苏木精-伊红(HE)染色、髓鞘碱性蛋白(MBP)染色、刚果红染色观察肺组织中炎症细胞,尤其是 EOS 浸润。A. P. Rogerio 等通过苏木精-伊红(HE)染色法观察炎症细胞浸润<sup>[21]</sup>。何胜东等通过碘酸雪夫(PAS)或阿新蓝-过碘酸雪夫(AB-PAS)染色观察气道黏液的产生<sup>[22]</sup>。Masson 三色染色主要是观察胶原沉积。

### 4.3 BALF 中细胞组分的测定

魏国会等收集 BALF 液,离心(3 000 r/min) 10 min 弃去上清液,沉淀细胞加 0.2 mL 缓冲液混悬。吸取 0.1 mL 于血球计数板上,显微镜下计白细胞总

数;吸取 0.01 mL 涂片,瑞氏染色后计嗜酸性粒细胞(EOS)数(至少计数 200 个细胞)。也可将 BALF 通过甩片机制备成细胞涂片,进行瑞氏-吉姆萨染色或 Diff-Quick 染色,计数细胞总数并进行分类计数。

### 4.4 生理功能指标

气道对各种刺激物的高度敏感状态,称为气道高反应性<sup>[24]</sup>。目前采用的有离体气道平滑肌收缩力测定法、有创的肺阻抗或气道峰压测定法和无创整体体积描记法。其中整体体积描记法是根据哮喘时呼气相时间延长、表现为呼气末暂停时间延长即为增强的呼气间歇(enhanced pause, Penh)的现象来定量反映气流受限程度<sup>[25]</sup>。该方法优点在于可使小鼠在清醒状态下测定气道反应性,并通过雾化吸入给予气道收缩剂,是更接近人类气道反应性测定方法,且操作方法较有创方法简单。Penh 并不是反映气道阻力的一个直接指标,但它与有创条件下测得的气道阻力、跨肺压等指标有很好的相关性,且不受小鼠呼吸频率影响。目前该方法是最被认可的小鼠气道反应性测定方法,但有研究认为该指标也有缺陷,很多情况下不能真正反映气道反应性<sup>[26]</sup>。

此外,分子水平评价指标越来越受到学者们的重视。通过酶联免疫吸附测定(ELISA)法测定 BALF 中细胞因子(如 IL-4、IL-5、IL-13、IL-10、INF- $\gamma$ )和血清总 IgE、抗原特异 IgE 含量测定,使人们对小鼠哮喘模型机理有了更加深入的了解。Won-Kyo Jung 等末次激发 24 h 后,处死小鼠离心肺泡灌洗液,取上清液通过 ELISA 测定 IL-4、IL-5、INF- $\gamma$ 、and、TNF- $\alpha$  含量<sup>[27]</sup>。苏新明等通过测定血清总 IgE 和 OVA 特异性 IgE 水平检测是否成功建立小鼠哮喘模型<sup>[28]</sup>。

综上所述,小鼠哮喘模型的建立受到多因素如遗传背景、佐剂的选择、致敏原的剂量与时间的控制,人们可根据自己要求建立不同的哮喘模型。但对模型建立的标准至今没有量化,只是根据对哮喘本质的认识而评价出至少要有气道高反应性和炎症细胞浸润这两大特征。此外,虽然小鼠哮喘模型在哮喘发病机理及新药的研发中发挥重大作用,但仍具有一定的弊端:一方面人类器官远比小鼠器官复杂得多,很多实验结果表明,人类哮喘和小鼠哮喘模型在许多方面如血浆蛋白渗出等有很大差异;另一方面,小鼠哮喘模型是在实验室中通过人为刺激建立,与人类实际的哮喘发病情况有不同。

## 参考文献:

- [1] Shibamori M, Ogino K, Kambayashi Y, et al. Intranasal mite allergen induces allergic asthma-like responses in NC/Nga mice [J]. *Life Sciences* 2006, 78:987-994.
- [2] Pabst R. Animal models for asthma: controversial aspects and unsolved problems [J]. *Pathobiology*, 2002-2003, 70: 252-254.
- [3] Jonasson S, Hedenstierna G, Hedenstrom H, et al. Comparisons of effects of intravenous and inhaled methacholine on airway physiology in a murine asthma model [J]. *Resp Physiol Neurobiol* 2009, 165:229-236.
- [4] Matsubara S, Swasey CH, Loader JE, et al. Estrogen determines gender differences in airway responsiveness after allergen exposure [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008, 38 (5): 501-508.
- [5] 李睿等, 刘恩梅, 杨锡强. 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.
- [6] 田代印, 符州, 张燕, 等. 一种改良型小鼠哮喘模型方法的建立及评价 [J]. *重庆医科大学学报*, 2005, 30 (4): 601-603.
- [7] 程晓明, 王长征, 李淑平, 等. 哮喘致敏小鼠模型的建立及脾脏 CD4<sup>+</sup>T 细胞的分离 [J]. *第三军医大学学报*, 2001, 23 (3): 369-370.
- [8] 王桂芳, 董春玲, 唐古生, 等. 一种复制小鼠哮喘模型的新方法 [J]. *中国免疫学杂志*, 2008, 24 (11): 1025-1027.
- [9] Gueders MM, Bertholet P, Perin F, et al. A novel formulation of inhaled doxycycline reduces allergen induced inflammation, hyperresponsiveness and remodeling by matrix metalloproteinases and cytokines modulation in a mouse model of asthma [J]. *Biochem Pharmacol* 2008, 75 (2): 514-526.
- [10] Matsumoto A, Hiramatsu K, Li Y, et al. Repeated exposure to low-dose diesel exhaust after allergen challenge exaggerates asthmatic responses in mice [J]. *Clin Immunol*, 2006, 121: 227-235.
- [11] Gelfand EW, Joetham A, Cui ZH, et al. Induction and maintenance of airway responsiveness to allergen challenge are determined at the age of initial sensitization [J]. *J Immunol*, 2004, 173 (2): 1298-1306.
- [12] 商艳, 李强, 黄怡, 等. 不同剂量致敏原对小鼠过敏性哮喘模型的影响 [J]. *第二军医大学学报*, 2002, 23: 69-71.
- [13] GeMng U, Heinrich J, Jaeb B, et al. Respiratory symptoms in relation to indoor exposure to mite and cat allergens and endotoxins. Indoor Factors and Genetics in Asthma (GINA) Study Group [J]. *Eur Respir J*, 2001, 18 (3): 555-563.
- [14] Toumoy KG, KIPs JC, Schou C. Airway eosinophilia is not a requirement for allergen-induced airway hyperresponsiveness [J]. *Clin Exp Allergy* 2000, 30:79-85.
- [15] 陈华夏. 粉尘螨提取液致敏 CXCR3 基因敲除小鼠肺部变应性炎症的研究 [D]. 北京, 北京协和医学院, 2009. 1-80.
- [16] Goplen N, Karim MZ, Liang Q, et al. Combined sensitization of mice to extracts of dust mite, ragweed, and *Aspergillus* species breaks through tolerance and establishes chronic features of asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol* 2009, 123 (4): 925-932.
- [17] Narala VR, Raliga R, Smith MR, et al. Pioglitazone is as effective as dexamethasone in a cockroach allergen-induced murine model of asthma [J]. *Respir Res* 2007, 8:90.
- [18] Gore JC, Schal C. Cockroach allergen biology and mitigation in the indoor environment [J]. *Annu Rev Entomol* 2007, 52:439-463.
- [19] 徐用. 气传真菌与尘螨在哮喘中作用的研究 [D]. 上海, 复旦大学, 2009, 1-66.
- [20] Conejero L, Higaki Y, Baeza ML, et al. Pollen-induced airway inflammation, hyperresponsiveness and apoptosis in a murine model of allergy [J]. *Clin Exp Allergy* 2007, 37:331-338.
- [21] Lee MY, Yuk JE, Kwon OK, et al. Anti-inflammatory and anti-asthmatic effects of *Viola mandshurica* W. Becker (VM) ethanolic (EtOH) extract on airway inflammation in a mouse model of allergic asthma [J]. *J Ethnopharmacol* 2010, 127 (1): 159-164.
- [22] 何胜东, 赖克方, 姚卫民, 等. 小鼠哮喘模型气道反应性检测方法的建立 [J]. *广东医学*, 2006, 27 (11): 1659-1661.
- [23] 魏国会, 杜梅素, 宋宁. 艾叶油的平喘作用研究-小鼠卵蛋白复制法 [J]. *时珍国医国药*, 2010, 21 (1): 86-87.
- [24] Byrne P, Inman M. Airway hyperresponsiveness [J]. *Chest*, 2003, 123 (3): 411-416.
- [25] Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K, et al. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997, 156 (3 Pt 1): 766-775.
- [26] Patterson JH, Rodger JE. Expanding role of beta-blockad in the management of chronic heart failure [J]. *Pharmacotherapy*, 2003, 23 (4): 451-459.
- [27] Jung WK, Lee DY, Choi YH, et al. Caffeic acid phenethyl ester attenuates allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in murine model of ovalbumin-induced asthma [J]. *Life Sci*, 2008, 82:797-805.
- [28] 苏新明, 康健. 支气管哮喘小鼠模型的建立 [J]. *中国误诊学杂志*, 2008, 34 (8): 8383-8384.

修回日期) 2010-09-16