



气道高反应动物模型的建立与指标检测

张硕峰,温丽娜,吴金英,贾占红,丁岩,孙建宁

(北京中医药大学中药学院,北京 100102)

【摘要】 **目的** 通过重新评价卵蛋白致小鼠哮喘模型,寻找一种简便易行的气道高反应动物模型和相应的检测指标,为研发治疗本类疾病药物和研究气道高反应发病机制提供新的实验手段。**方法** 小鼠采用卵蛋白(OVA)致敏;致敏后(15~21)d给予10% OVA雾化吸入激发哮喘,在末次激发24 h内测量小鼠辣椒素引咳的半数有效浓度,处死小鼠取肺组织测定匀浆中NO、IL-13、ET-1的含量。**结果** 卵蛋白致敏模型小鼠随辣椒素浓度的升高其咳嗽反应阳性率、咳嗽次数明显增加(与对照组相比较 $P < 0.01$)。模型组辣椒素引咳的半数有效浓度为89.39 $\mu\text{mol/L}$,对照组、地塞米松组分别为204.84、220.02 $\mu\text{mol/L}$;小鼠肺匀浆NO、ET-1、IL-13含量均明显增加,地塞米松可明显抑制NO的升高(与对照组相比较 $P < 0.01$)。**结论** 小鼠经卵蛋白致敏并连续激发7 d与临床气道高反应性(AHR)的多种特征相似,操作简便易行,稳定性高,故可作为气道高反应性的模型。辣椒素引咳阈值的测定、动物肺组织中NO、IL-13、ET-1含量的变化,可作为评价模型严重程度的指标。

【关键词】 气道高反应性;辣椒素;NO;IL-13;ET-1;小鼠

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014)02-0020-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.002.005

Establishment of mouse models of airway hyperresponsiveness and their evaluation indicators

ZHANG Shuo-feng, WEN Li-na, WU Jin-ying, JIA Zhan-hong, DING Yan, SUN Jian-ning
(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

【Abstract】 **Objective** To reappraise the mouse model of ovalbumin (OVA)-induced asthma and to develop a new model of airway hyperresponsiveness (AHR) and its evaluation indicators. **Methods** Mice were sensitized with ovalbumin (OVA) and induced asthma by inhalation of 10% OVA at 15–21 days after the sensitization. The threshold value of capsaicin cough sensitivity test, and content of NO, ET-1, IL-13 in the lung homogenate were measured at 24 h after the last inhalation. **Results** The positive rate of cough reflex aroused by capsaicin was significantly increased with the raise of concentration of capsaicin (compared with the control group, $P < 0.01$). The ED_{50} of capsaicin cough of the model group was 89.39 $\mu\text{mol/L}$, significantly lower than that of the control group (204.84 $\mu\text{mol/L}$) and dexamethasone group (220.02 $\mu\text{mol/L}$). The contents of NO, ET-1, IL-13 in the lung homogenate of the model group were significantly increased, and dexamethasone significantly inhibited the increase of NO (compared with the control group, $P < 0.01$). **Conclusions** The characteristics of the OVA-sensitized mouse model are resemble to that of clinical airway hyperresponsiveness. This model is simple to generate and stable, therefore, can be used as a model of AHR. The threshold value of capsaicin cough sensitivity test and the content of NO, ET-1, IL-13 in the lung homogenate can be used to evaluate the disease severity of the mouse models.

[基金项目]北京中医药大学科研创新团队资助项目(编号:2011-CXTD-12)。

[作者简介]张硕峰(1969-),男,副教授,研究方向:中药防治重大疾病创新药物研究,E-mail: shuofengzhang@sina.com。

[通讯作者]孙建宁(1952-),女,教授,研究方向:中药防治重大疾病创新药物研究,E-mail: jn_sun@sina.com。

【Key words】 Airway hyperresponsiveness; Capsaicin; NO; IL-13; ET-1; Mouse

气道高反应性 (airway hyperresponsiveness, AHR) 指因气道炎症而处于的过度反应状态,表现出敏感而过强的支气管平滑肌收缩反应,引起气道狭窄和阻力增加,从而引发咳嗽、胸闷、呼吸困难和喘息等症状。常见于上呼吸道感染恢复后期,出现咳嗽等呼吸道症状,可持续数周至数月,经常被误诊为支气管炎、喘息性支气管炎或肺炎。近年来其药物治疗已经倍受关注。但目前尚无经典的气道高反应动物模型,人们经常针对气道高反应发病病理过程的不同环节使用食管盐酸滴入、臭氧吸入应激、卵蛋白致敏等动物模型替代^[1,2],缺乏系统评价。本研究试图通过使用临床常用的辣椒素检测,重新评价卵蛋白致小鼠哮喘模型的气道反应性,寻找一种简便易行的气道高反应动物模型和相应的检测指标,为研发治疗本类疾病药物和研究气道高反应发病机制提供新的实验手段。

1 材料和方法

1.1 动物

Balb/c 小鼠,雌雄各半,体重(12~14)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号:SCXK(京)2006-0009,合格证号:0157200。

1.2 药物与试剂

醋酸地塞米松片:天津太平洋制药有限公司产品。批号:070404。规格:0.75 mg/片。人用量为 1~4 片/次,2~4 次/日;即 1.5~12 mg/60 kg/日。小鼠受试剂量为:0.5 mg/kg。氢氧化铝(AR):国药集团化学试剂有限公司,批号:20080428。鸡卵白蛋白(OVA):V 级(美国 Sigma 公司产品)。辣椒素(250 mg):美国 Sigma 公司,批号:00919EJ。IL-13 ELISA 试剂盒:美国 BG 公司,批号:091202。NO ELISA 试剂盒:上海森雄公司,批号:0912002。ET-1 试剂盒由东直门医院放免实验室提供。

1.3 仪器

YLS-8A 多功能诱咳引喘仪,山东省医学科学院设备站产品。Denley Dragon Wellscan MK 酶标仪:Thermo 公司产品(芬兰)。Wellwash 4 MK2 洗板机:Thermo 公司产品(芬兰)。TGL-168 型离心机:上海安亭科学仪器厂产品。A02AI 超声波雾化器:上海鱼跃医疗设备有限公司产品。

1.4 模型的制备及分组给药

小鼠随机分成 3 组(对照组、模型组、地塞米松

组)。第 1 日模型及给药组每只小鼠腹腔注射 20 μ g 卵白蛋白(OVA)和 2 mg 氢氧化铝(混合于 0.5 mL 生理盐水中),对照组腹腔注射等量生理盐水;第 8 日模型及给药组注射 20 μ g OVA 和 2 mg 氢氧化铝(混合于 0.5 mL 生理盐水中),对照组腹腔注射等量生理盐水。第 15 日开始将模型及给药组小鼠置于封闭容器中,给予 10% OVA 雾化吸入激发哮喘;对照组小鼠给予等量生理盐水,每日 1 次,每次 30 min,连续 7 d;并在 24 h 内处死动物。给药方法:从哮喘模型致敏的第 8 日开始,地塞米松组小鼠喂饲地塞米松 0.5 mg/kg/d,模型组及对照组小鼠灌服等量饮用水。

1.5 模型动物辣椒素咳嗽敏感性试验

辣椒素 30.5 mg + 吐温 80 1 mL 及无水乙醇 1 mL 溶解,然后加入生理盐水 8.0 mL,配成 1 mmol/L 的辣椒素溶液,用生理盐水稀释至 62.5、100、125、200、250 μ mol/L 的 5 个浓度溶液。将 20 mL 不同浓度的辣椒素分别放入多功能诱咳引喘仪的药物池中,于末次给药后 24 h 内将各组小鼠放入诱咳引喘仪,引咳。从低浓度开始,依次雾化吸入上述浓度的辣椒素溶液 15 s(间隔 10 min),停止给药,观察开始吸入辣椒素 3 min 内小鼠咳嗽次数,以咳嗽次数大于 10 次为阳性标准,计算阳性率,并行卡方检验;运用 DAS 软件计算辣椒素引咳的半数有效浓度。

1.6 模型动物肺组织 NO、ET-1、IL-13 含量的测定

末次给药后 24 h 内,处死小鼠,取肺组织,称重,加入生理盐水配制成 10% 的匀浆,于 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,将肺匀浆样品于 -20 $^{\circ}$ C 条件下冻存,备用。采用 ELISA 法测定匀浆中 NO、IL-13 的含量,采用放免法测定 ET-1 的含量。

1.7 统计学方法

咳嗽次数计算阳性率,并行卡方检验;其它数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析,各组数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA),组间比较方差齐者用 LSD 检验,不齐者用 Dunnett's T3 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 模型动物对辣椒素咳嗽敏感性的测定

结果表明,随辣椒素浓度的升高动物的咳嗽反

表 1 不同剂量辣椒素对气道高反应模型小鼠的致咳作用的发生率($\bar{x} \pm s$)Tab. 1 The incidence of cough reflex induced by capsaicin of the mouse models of AHR($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	剂量 Dose	辣椒素(阳性动物数/动物数) Capsaicin(positive number / Mouse number)				
		62.5 $\mu\text{mol/L}$	100 $\mu\text{mol/L}$	125 $\mu\text{mol/L}$	200 $\mu\text{mol/L}$	250 $\mu\text{mol/L}$
对照组 Control group	-	0/26	0/26 **	1/26 **	13/26 **	19/26 *
模型组 Model group	-	1/26	20/26	23/26	26/26	26/26
地塞米松组 Dexamethasone group	0.5 mg/kg	0/26	0/26 **	1/26 **	10/26 **	17/26 **

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与模型组比较

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the model group.

应阳性率相映升高。经卵蛋白致敏并连续激发 7 d 的小鼠咳嗽反应阳性率、咳嗽次数较对照组明显增加(与对照组相比较 $P < 0.01$)。运用 DAS 软件计算辣椒素引咳的半数有效浓度,表明模型组辣椒素引咳的半数有效浓度为 89.39 $\mu\text{mol/L}$,对照组、地塞米松组分别为 204.84、220.02 $\mu\text{mol/L}$,提示小鼠经卵蛋白致敏并连续激发 7 d 后气道高反应性明显升高,使用地塞米松可抑制这一反应过程(表 1、2)。

表 2 气道高反应模型小鼠辣椒素引咳的半数有效浓度($\bar{x} \pm s$, $n = 26$)Tab. 2 ED_{50} of cough induced by capsaicin of the mouse models of AHR($\bar{x} \pm s$, $n = 26$)

组别 Groups	剂量 Dose	辣椒素引咳半数有效浓度($\mu\text{mol/L}$)
		ED_{50} ($\mu\text{mol/L}$)
对照组 Control group	-	204.84 \pm 19.67
模型组 Model group	-	89.39 \pm 7.71
地塞米松组 Dexamethasone group	0.5 mg/kg	220.02 \pm 23.80

2.2 模型动物肺组织 NO、ET-1、IL-13 含量的测定

结果表明:经卵蛋白致敏并连续激发 7 d 的小鼠肺匀浆 NO、ET-1、IL-13 含量均明显增加,地塞米松可明显抑制这些指标的升高(与对照组相比较 $P < 0.01$)。结果见表 3。

3 讨论

气道反应性是指气道对各种化学、物理或药物刺激的收缩反应。气道高反应性(AHR)是指气道对正常不引起或仅引起轻度应答反应的非抗原性刺激物出现过度的气道收缩反应。AHR 引起气道狭窄和阻力增加,从而引发咳嗽、胸闷和喘息

等症状。AHR 常有家族倾向,受遗传因素影响,但外因性的作用更为重要。目前普遍认为气道炎症是导致气道高反应性最重要的机制之一^[3]。故本研究选用地塞米松作为验证模型的阳性药^[4]。

临床上经常选用辣椒素来检测患者的气道反应性,且临床研究表明辣椒素在咳嗽激发试验过程是安全的^[5]。辣椒素作为咳嗽刺激剂,它的引咳机制较为明确:主要通过兴奋辣椒素感受体(vanilloid type 1, VR1)诱发咳嗽^[6-9]。故本研究通过测定小鼠对辣椒素的敏感性,来评价其气道反应性的高低。实验结果表明,小鼠经卵蛋白致敏并连续激发 7 d 后能明显增加降低辣椒素引咳的阈值,咳嗽次数,提高咳嗽反应的阳性率,提示小鼠的气道反应性的升高。

IL-13 在 AHR 的发生过程中起决定性作用。研究表明,引入外源性 IL-13 可直接引起 AHR 的途径,但是如果 IL-13 缺失,则 AHR 不能产生^[10]。IL-13 可激活趋化因子,诱导和加重呼吸道炎症。IL-13 直接作用于气道平滑肌细胞产生 NO,可以在没有气道炎症的情况下诱发 AHR^[11]。IL-13 还能引起呼吸道杯状细胞增生及黏液过度分泌^[12],参与维持气道黏膜 Th2 细胞因子的表达,促进嗜酸性粒细胞聚集,诱导 5-脂加氧酶的表达,从而导致半胱氨酰白三烯的增加,提高气道反应性^[13]。此外,IL-13 能够促进 B 细胞分化,减少凋亡并诱导 B 细胞合成过多的 IgE。IgE 可以介导变应性炎症,结合许多效应细胞表面的受体,引起炎性介质的释放,从而导致 AHR 和增强粘液分泌^[11]。因此抑制 IL-13 或其受体的表达可以降低 AHR。

表 3 气道高反应模型小鼠肺匀浆 NO、ET-1、IL-13 的含量($\bar{x} \pm s$, $n = 26$)

Tab. 3 The contents of NO, ET-1, IL-13 in the lung homogenate of the mouse models of AHR

组别 Groups	剂量 Dose	NO (pg/g pro)	ET-1 (pg/g pro)	IL-13 (pg/g pro)
对照组 Control group	-	1.70 \pm 0.79 **	134.1 \pm 48.1 **	297.78 \pm 49.30 *
模型组 Model group	-	15.78 \pm 4.25	395.9 \pm 79.0	341.01 \pm 46.40
地塞米松组 Dexamethasone group	0.5 mg/kg	3.23 \pm 0.72 **	348.4 \pm 111.7	341.38 \pm 52.94

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 表示同模型组比较。

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the model group.

气道上皮细胞在各种细胞因子及环境刺激因素的作用下可分泌内皮素-1 (ET-1) 及基质金属蛋白酶(MMP)并活化各种生长因子,这些因子共同作用于上皮下成纤维细胞和平滑肌细胞,使之增殖而引起气道重塑^[14]。研究认为气道基质细胞 ET-1 的自分泌及旁分泌以及细胞因子与 ET-1 的相互作用,在 AHR 的形成过程中具有重要作用^[15]。气道重构是导致 AHR 的直接因素,此时气道壁的厚度与气道开始收缩的阈值成反比关系,轻微的刺激即可引起明显的收缩反应,而轻度的支气管收缩亦引起气道阻力的明显增加。NO 在 AHR 的发生发展过程中具有双重作用,一方面 NO 在气道平滑肌张力调节和肺部免疫防御中发挥重要作用;另一方面,局部大量的 NO 产生可扩张支气管粘膜血管,增强毛细血管渗出,导致气道粘膜水肿,加重气道阻塞、组织损害,气道平滑肌肥大、增生而使支气管对刺激的收缩反应更强烈并最终诱发 AHR^[16,17]。因此 NO 是影响气道重建的重要因素。

本研究结果证实小鼠经卵蛋白致敏并连续激发 7 d 后肺组织匀浆中 IL-13、NO 以及 ET-1 含量的明显增加。与 AHR 发生机制相符。

由此可见,小鼠经卵蛋白致敏并连续激发 7 d 与临床气道高反应性(AHR)的多种特征相似,操作简便易行,稳定性高,故可作为气道高反应性的模型。辣椒素引咳阈值的测定、动物肺组织中 NO、IL-13、ET-1 含量的变化,可作为评价模型严重程度的指标。

参考文献:

- [1] 张星东. 过敏性哮喘动物模型在致敏、哮喘发作和气道高反应性等方面的应用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(9):1-7.
- [2] 李翔, 王笑梅, 张坚松. 两种气道高反应大鼠模型的建立与比较 [J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2009, 6(1):17-22.
- [3] 徐玉民, 朱敏敏, 戎海波, 等. 氯胺酮雾化吸入对哮喘大鼠气道高反应性的影响 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2007, 27(3):235-238.
- [4] 张印, 李绍旦, 杨明会, 等. 气道高反应性咳嗽的发病机制与中西医治疗现状 [J]. 北京中医药, 2013, 32(5):336-338.
- [5] 陈如冲, 赖克方, 刘春丽, 等. 辣椒素咳嗽激发试验方法的建立及其安全性评价 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2005, 28(11):751-754.
- [6] Jung J, Hwang SW, Kwak J, et al. Capsaicin binds to the intracellular domain of the capsaicin-activated ion channel [J]. J Neurosci, 1999, 19(2):529-538.
- [7] Alawi K, Keeble J. The paradoxical role of the transient receptor potential vanilloid 1 receptor in inflammation [J]. Pharmacol Ther, 2010, 125(2):181-195.
- [8] Gunthorpe MJ, Szallasi A. Peripheral TRPV1 receptors as targets for drug development: new molecules and mechanisms [J]. Curr Pharm Des, 2008, 14(1):32-41.
- [9] 李魁君, 李春刚, 刘兴君. 辣椒素受体 (TRPV1) 的生物学作用及其作为药物靶点的研究进展 [J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28(11):917-927.
- [10] 魏亚强, 王丽丽, 赵红, 等. 抗 IL-5 抗体联合抗 IL-13 抗体对支气管哮喘小鼠气道炎症及气道高反应性的影响 [J]. 中华哮喘杂志(电子版), 2010, 4(6):398-401.
- [11] 辛琪, 李浩斌. IL-13 与气道高反应的作用机制及研究进展 [J]. 中国医药指南, 2012, 10(17):88-89.
- [12] Morcillo EJ, Cortijo J. Mucus and MUC in asthma [J]. Curr Opin Pulm Med, 2006, 12(1):1-6.
- [13] 吴为群, 江宏志, 吴忠道, 等. 血清白细胞介素 IL-13、17 与气道高反应性的关系 [J]. 热带医学杂志, 2004, 4(5):539-541.
- [14] 李中燕. 气道上皮细胞在支气管哮喘发病机制中的研究进展 [J]. 实用医学杂志, 2012, 28(20):3485-3487.
- [15] 向旭东, 周淮英, 陈平, 等. 一氧化氮、内皮素与支气管哮喘气道高反应性的关系 [J]. 湖南医科大学学报, 1999, 24(5):445-447.
- [16] Walters EH, Reid D, Soltani A, et al. Angiogenesis: a potentially critical part of remodelling in chronic airway diseases [J]. Pharmacol Ther, 2008, 118(1):128-137.
- [17] 王明婕, 张罗. NO 在呼吸系统的生物学作用 [J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2012, 26(3):138-141.

[修回日期] 2013-12-05