



清醒挪威褐鼠过敏性哮喘发作全程记录模型

陶婧婧, 徐燕锋, 韩云林, 徐玉环, 秦川, 高虹, 张星东

(卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室,
中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 北京 100021)

【摘要】 目的 建立卵蛋白(OVA)致敏激发后,在挪威褐鼠无创且清醒的状态下,可观察和记录到过敏性哮喘发作全过程(速发相和迟发相)的动物模型。方法 66只挪威褐鼠按致敏液[OVA和Al(OH)₃]不同平均分为11组,单纯注射OVA的4组(0.01、0.1、1.0和10.0 mg/只);OVA混合Al(OH)₃干粉的5组(0.1+100、1.0+100、10.0+100、1.0+52和1.0+4 mg/只);OVA混合Al(OH)₃胶体的1组(10.0+4 mg/只);正常对照组1组。10个致敏组分别于第0天和第5天背部皮下2点注射相应致敏液,每点注射0.2 mL,正常对照组注射等量生理盐水。在第37天雾化吸入5% OVA激发10 min。然后立即放入体积描记器中连续记录16 h呼气相延长参数(penh)值。采集第0、7、14、21、28、35、38天血清,ELISA法检测特异性IgE含量。HE染色观察肺病理变化。结果 除单纯注射OVA 0.01 mg组外,其他各组大鼠血清特异性IgE含量均比正常对照组显著升高($P < 0.05$),且在致敏1周后IgE开始大量产生,直到第5周均呈持续增长趋势。观察到了哮喘发作的速发和迟发双相气道反应,其特点表现在Penh值的显著增高,且与正常对照组相比,模型组(以OVA 10.0 & Al(OH)₃100、OVA 10.0 & Al(OH)₃ gel 4组为例)的速发相/迟发相峰值、面积均显著增大($P < 0.05$)。模型组(以OVA 10.0 & Al(OH)₃100组为例)有以气道周围嗜酸性粒细胞浸润为主的炎症表现。结论 成功建立了无创、清醒状态下挪威褐鼠过敏性哮喘发作全程记录模型。

【关键词】 过敏性哮喘;挪威褐鼠;呼气相延长参数;速发相反应;迟发相反应

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015)06-0001-08

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.006.001

Evaluation of asthma exacerbation in an ovalbumin-sensitized conscious Brown Norway rat model

TAO Jing-jing, XU Yan-feng, HAN Yun-lin, XU Yu-huan, QIN Chuan, GAO Hong, ZHANG Xing-dong

(Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health; Key Laboratory of Human Diseases Animal Model, State Administration of Traditional Chinese Medicine; Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) & Comparative Medical Center, Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To establish an animal model in which both early-phase asthmatic response (EAR) and late-phase asthmatic response (LAR) can be observed after sensitization and subsequent inhalation challenge with ovalbumin (OVA). Animals were conscious with no narcotic used, unrestricted, and fed ad libitum. **Methods** Sixty-six SPF 6-8-week old male Brown Norway rats were divided into eleven equal groups. All groups of rats except normal control group were injected subcutaneously with 0.4 mL (sc in back, 2 sites, 0.2 mL/site) OVA or OVA + Al(OH)₃ solution on day 0

【基金项目】 中国医学科学院医学实验动物研究所人才引进基金(编号: DWS201202); 973计划(2011CB504903); 863计划(2013AA020106)。

【作者简介】 陶婧婧,女,硕士研究生,研究方向:过敏性哮喘治疗研究。

【通讯作者】 张星东,教授,Email: zhangxd@cnilas.org; 高虹,教授,硕士生导师, E-mail: gaohongdws@aliyun.com。

and day 5. Four groups were given OVA only at the dose of 0.01, 0.1, 1.0 or 10.0 mg/rat, five groups were given OVA + Al(OH)₃ powder at the dose of 0.1 + 100, 1.0 + 100, 10.0 + 100, 1.0 + 52 and 1.0 + 4 mg/rat, one group was given OVA + Al(OH)₃ gel at the dose of 10.0 + 4 mg/rat. Normal control group was injected subcutaneously with the same volume of saline. All the groups were challenged for 10 minutes with 5 mL 5% OVA aerosol on day 37. Enhanced pause (Penh) was recorded for 16 hours in a whole-body plethysmography system after challenge. Specific IgE of the serum samples on day 0, 7, 14, 21, 28, 35, 38 were measured by ELISA. Pulmonary pathological changes were observed using HE staining. **Results**

Compared with the normal control group, immunized rats except the group given 0.01 mg OVA produced specific IgE ($P < 0.05$), and the content of IgE grew sharply after 7 days, and always kept growing until 5 weeks. The whole course of asthma exacerbation was recorded successfully. The rats developed EAR and/or LAR within 16 hours following OVA challenge. Especially the groups injected with 10 mg OVA and 100 mg Al(OH)₃ or 4 mg Al(OH)₃ gel showed steady pattern of biphasic airway responses and their EAR or LAR peak, and the area under the curve were increased significantly compared with those of the normal control group ($P < 0.05$). Inflammation characterized by eosinophil infiltration was observed in the rat lung of model group (OVA 10.0 & Al(OH)₃ 100 group as a representative case). **Conclusions** In this work we successfully developed a new model using conscious rats, and the whole time course of asthma exacerbation in this model can be observed after OVA challenge. This model may become a useful tool for further asthma research.

【Key words】 Allergic asthma; Brown Norway rats; Enhanced pause; Early-phase asthmatic response; Late-phase asthmatic response

过敏性哮喘(以下简称哮喘),是一种以可逆性支气管痉挛和气道高反应性为特点的气道慢性炎症。临床表现为反复发作性喘息、带有哮鸣音的呼气性呼吸困难、胸闷、咳嗽等。临床上给患者做特异性抗原激发试验时发现哮喘发作时可出现速发相(early-phase asthmatic response, EAR)和迟发相(late-phase asthmatic response, LAR)。EAR 发生在接触抗原数分钟内,一般持续 1~2 h,肥大细胞释放预合成的活性介质从而导致支气管痉挛和黏膜水肿及血管通透性增加进而引起喘息症状;LAR 时喘息症状加重,持续时间比 EAR 长,可达 10 h 甚至更久,主要是 EAR 时期趋化、募集来的以嗜酸性粒细胞为主的炎症细胞浸润而形成的炎症反应过程^[1]。

目前对哮喘的研究日益增多,但无论是机理研究还是药物筛选,都需要先选择合适的模型才能获得有意义的研究成果。目前用于哮喘研究的模型有麻醉模型和清醒模型。麻醉模型的动物需要在麻醉状态下进行气管插管,接呼吸机后进行气道阻力的检测,主要分为麻醉哮喘模型和麻醉气道高反应性模型 2 种。二者的区别在于麻醉哮喘模型是致敏时的抗原特异激发后进行气道阻力的检测,麻醉气道高反应性模型在抗原特异激发时不作检测,乙酰胆碱等非特异激发时检测^[2]。清醒模型中的动物在检测时为清醒状态,气道无机械损伤,主要以清醒气道高反应性模型为主。清醒气道高反应性模型在特异激发时亦不作检测,乙酰胆碱等非特

异激发后检测^[3],与麻醉气道高反应性模型原理相同。气道高反应性模型关注的是哮喘发作后气道过度敏感的状态,而不是哮喘发作时的状态,所以无法真正说明喘息的变化。而且气道高反应性不是哮喘独有的特异性的反应,在慢性阻塞性肺疾病等疾病中也可能发生,所以在未排除上述干扰因素的情况下,检测精确度会降低。麻醉模型虽然观察了哮喘发作时的变化,但动物处于麻醉状态,可持续记录时间短,主要用于 EAR 阶段的研究,不易观察到几小时后的 LAR^[4-6]。而 LAR 持续时间长,喘息更剧烈,是哮喘发作过程中的重要部分,对 LAR 的研究有利于进一步探索哮喘发病机理和开发有效治疗措施。

本工作正是基于 LAR 的研究需要,拟建立一个能连续观察 EAR 和 LAR 的动物模型。采用挪威褐鼠为模型动物,卵蛋白(ovalbumin, OVA)为变应原,记录并分析 OVA 特异性激发后哮喘发作全过程(EAR 和 LAR),评价不同造模方法的特点,确立挪威褐鼠过敏性哮喘发作全程记录模型构建方案。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性 SPF 级挪威褐鼠 66 只,6~8 周,体重 140~150 g。购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2012-0001】,在本实验室屏障环境的饲养间【SYXK(京)2013-0014】饲养。饲喂无 OVA 的普通灭菌饲料。动物购入后,在屏障设施内

适应 1 周后开始实验。本实验涉及的动物饲养及动物实验方案已得到中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用与管理委员会的批准【ILAS-PL-2013-001】。

1.2 主要试剂和仪器

OVA、牛血清蛋白(albumin from bovine serum, BSA)、氢氧化铝($\text{Al}(\text{OH})_3$)、吐温-20 均购自美国 Sigma 公司。氢氧化铝胶体购自美国 Invivogen 公司。辣根过氧化物酶偶联的羊抗大鼠 IgE 抗体购自美国 Novus Biologicals 公司。TMB 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。PBS 缓冲液购自北京中杉金桥生物技术有限公司。PARI Turbo BOY N 压缩雾化吸入机购自德国百瑞公司。Buxco WBP 大鼠体积描记器购自美国 DSI 公司。FLUOstar Omega 酶标仪购自德国 BMG Labtech 公司。

1.3 动物分组及致敏方法

66 只挪威褐鼠按致敏液(OVA 和 $\text{Al}(\text{OH})_3$)不同平均分为 11 组,单纯注射 OVA 的 4 组(0.01、0.1、1.0 和 10.0 mg/只);OVA 混合 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 干粉的 5 组(0.1 + 100、1.0 + 100、10.0 + 100、1.0 + 52 和 1.0 + 4 mg/只);OVA 混合 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 胶体的 1 组(10.0 + 4 mg/只);正常对照组 1 组。且于第 0 天和第 5 天,在每只挪威褐鼠背部皮下 2 点注射相应致敏液,每点注射 0.2 mL,正常对照组注射等量生理盐水。

1.4 血液采集

正常对照组和 OVA 10.0 & $\text{Al}(\text{OH})_3$ 100 组于第 0、7、14、21、28、35、38 天 7 个时间点,其余组于第 35 天,使用 0.1 mL/只(10 mg)盐酸氯胺酮麻醉后,剪尾采血 200 μL /只,4 $^{\circ}\text{C}$,3 000 r/min 离心 10 min 得血清。

1.5 激发及取材

所有组于第 37 天,给予 5 mL 5% OVA 雾化吸入 10 min。激发后立即放入体积描记器中,每 30 s 记录一个呼气相延长参数(enhanced pause, Penh)值,连续不间断记录 16 h^[7]。动物于第 38 天记录结束后,用 0.5 mL/只(10%)戊巴比妥钠过量麻醉处死,摘取左肺放入 4% 中性甲醛溶液中固定。

1.6 ELISA 法检测 IgE 抗体

先用 OVA 包被 96 孔板,再用 BSA 封闭抗原,然后结合 1.4 血清样本(第 35 天样本稀释比例:正常对照组为 1:100,其余组为 1:4 000;7 个时间点样本稀释比例:正常对照组为 1:100,OVA 10.0 &

$\text{Al}(\text{OH})_3$ 100 组为 1:16 000),再结合辣根过氧化物酶偶联的羊抗大鼠 IgE 抗体(1:25 000),然后用 TMB 显色,最后用 2 mol/L 硫酸终止反应,用酶标仪检测 450 nm 波长时的吸光度(absorbance, A),A 值与板中结合的 IgE 含量成正比^[8]。

1.7 HE 染色观察肺病理变化

使用 1.5 中 4% 中性甲醛固定 24 h 后的左肺,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片(5 μm)。HE 染色后在光镜下观察肺组织嗜酸性粒细胞浸润情况及其他病理变化。

1.8 数据处理及统计分析方法

将激发后记录的 Penh 结果导出 Excel 格式数据。模型组 Penh 值高于正常对照组 Penh 限值($\bar{x} + 3s$)为 Penh 升高。使用 Microsoft Excel 2011 软件计算基线(正常对照组的 16 h Penh $\bar{x} + 3s$),作 16 h Penh 曲线(每 10 个数据的移动平均曲线),读取 LAR(1 h 后至曲线与基线交叉时止)持续时间,计算 EAR(1 h 内)峰值(区间内 Penh 最大值)和 LAR 峰值。使用 Graphpad Prism 6.0 软件,计算 EAR 部分的 Penh 曲线下高于基线的面积(Penh area under the curve and above the baseline, AUC)和 LAR 部分的 AUC。采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析,各组数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 特异性 IgE

由表 1 可以看出,除 OVA 0.01 组,OVA 0.1、OVA 1.0、OVA 10.0、OVA 0.1 & $\text{Al}(\text{OH})_3$ 100、OVA 1.0 & $\text{Al}(\text{OH})_3$ 100、OVA 10.0 & $\text{Al}(\text{OH})_3$ 100、OVA 1.0 & $\text{Al}(\text{OH})_3$ 52、OVA 1.0 & $\text{Al}(\text{OH})_3$ 4、OVA 10.0 & $\text{Al}(\text{OH})_3$ gel 4 组血清 IgE 含量与正常对照组相比均显著升高($P < 0.05$),且随 OVA 剂量增大,IgE 含量升高,加入佐剂组比单一 OVA 组抗体含量高。OVA 10.0 组与相当于其 1% OVA 含量但加入了一定佐剂的 OVA 0.1 & $\text{Al}(\text{OH})_3$ 100 组产生的抗体含量相当,差异无统计学意义。OVA 10.0 & $\text{Al}(\text{OH})_3$ 100 组与 OVA 10.0 & $\text{Al}(\text{OH})_3$ gel 4 组的 IgE 含量差异无显著性,均较其他组高,以 OVA 10.0 & $\text{Al}(\text{OH})_3$ 100 组为最高。以 OVA 10.0 & $\text{Al}(\text{OH})_3$ 100 组为例,从图 1 IgE 含量随时间变化曲线可以看出,致敏后 IgE 水平呈现时间依赖性增长,在

第 1 周内与正常对照组无明显差异,1 周后 IgE 水平开始快速升高,在第 2 周内剧烈增长,2 周后涨幅变缓慢呈现稳定的持续增长,在第 5 周达峰值,第 38 天时略有下降。

表 1 不同致敏方法对第 35 天 IgE 含量的影响

Tab.1 The influence of different sensitization methods on day35 IgE content

组别 Groups	IgE 含量 IgE content
正常对照组 Normal control group	0.05 ± 0.01
OVA 0.01	0.05 ± 0.03
OVA 0.1	0.13 ± 0.06 *
OVA 1.0	0.39 ± 0.17 *
OVA 10.0	1.66 ± 0.42 *
OVA 0.1 & Al(OH) ₃ 100	1.78 ± 0.35 *
OVA 1.0 & Al(OH) ₃ 100	2.08 ± 0.32 *
OVA 10.0 & Al(OH) ₃ 100	2.80 ± 0.33 *
OVA 1.0 & Al(OH) ₃ 52	2.29 ± 0.14 *
OVA 1.0 & Al(OH) ₃ 4	2.31 ± 0.13 *
OVA 10.0 & Al(OH) ₃ gel 4	2.61 ± 0.17 *

注:与正常对照组比, * P < 0.05。血清稀释比例:正常对照组为 1:100,其他组为 1:4 000。 $\bar{x} \pm s, n = 6$ 。

Note. Compared with the normal control group, * P < 0.05. Serum dilution: 1:100 (normal control group) and 1:4000 (other groups). $\bar{x} \pm s, n = 6$.

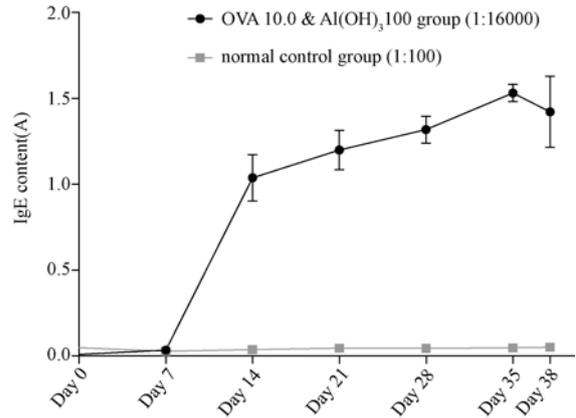
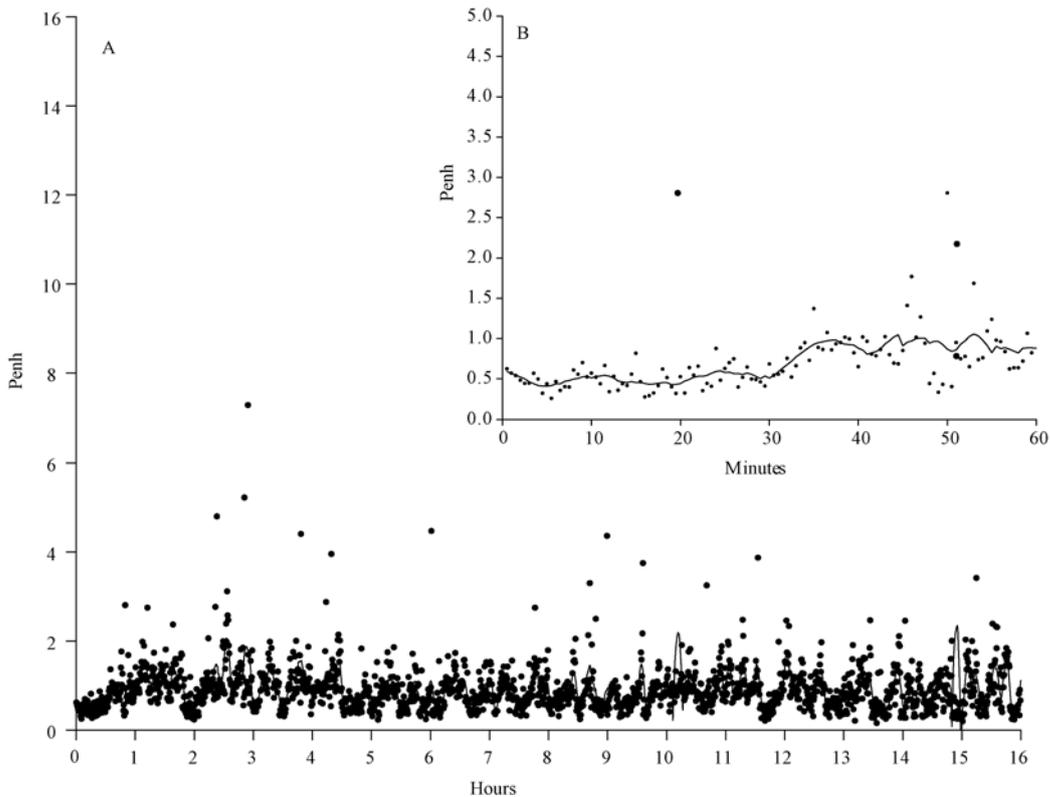


图 1 OVA 注射后血清特异 IgE 水平变化

Fig.1 Time course of serum specific IgE levels after OVA immunization

2.2 哮喘发作速发相和迟发相

正常对照组激发后的 Penh 曲线在 16 h 内较稳定,没有明显波动(图 2A)。其 Penh 限值为 1.14 (0.90 + 3 * 0.08),大于 1.14 即为 Penh 值升高。与正常对照组相比(图 2B),致敏组(OVA 10.0 & Al



注:前 60 min Penh 曲线(图 2B),16 h Penh 曲线(图 2A)。

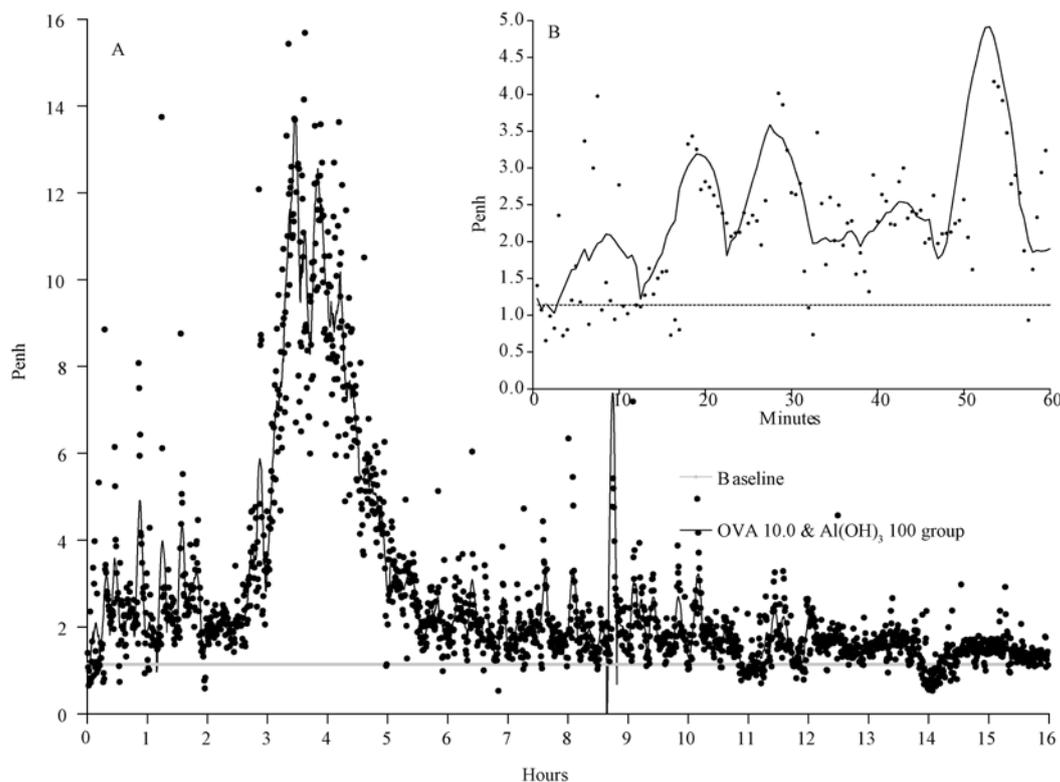
图 2 正常对照组 Penh 移动平均曲线

Note. 2A: 16 hours Penh curve, 2B: The first 60 minutes of Penh curve.

Fig.2 The Penh running average curve of the normal control group

(OH)₃100 组为代表) 激发后 Penh 值立即升高, 其 Penh 曲线在前 1 h 内有明显上升(图 3B)。之后曲线有轻度下降, 再开始剧烈上升达峰值后剧烈下降再缓慢下降至基线水平(图 3A)。如表 2 所示, 单一 OVA 0.1 mg 至 10 mg 致敏, 激发后均出现气道反应。低剂量时仅有 EAR, 随剂量增加, 反应加重, LAR 发生的比例增加。加入 Al(OH)₃ 佐剂致敏后反应进一步加强, EAR 和 LAR 都出现的动物可达半

数以上。如表 3 所示, 正常对照组和 OVA 10.0 & Al(OH)₃100、OVA 10.0 & Al(OH)₃ gel 4 组的 EAR 峰值和 LAR 峰值都有差异, 两个模型组没有差异。两个模型组的 EAR 面积、LAR 持续时间、LAR 面积也无明显差异。OVA 10.0 & Al(OH)₃100 组连续出现 EAR 和 LAR 的动物数为整组 6 只, OVA 10.0 & Al(OH)₃ gel 4 组为 5 只, 另 1 只仅有 EAR。



注: 前 60 min Penh 曲线(图 3B), 16 h Penh 曲线(图 3A)。

图 3 OVA 10.0 & Al(OH)₃100 组 Penh 移动平均曲线

Note: 3A: The 16 hours Penh curve, 3B: The first 60 minutes of Penh curve.

Fig. 3 The Penh running average curve of the OVA 10.0 & Al(OH)₃100 group

表 2 速发、迟发反应次数统计

Tab. 2 The count of EAR and LAR

组别 Groups	仅速发相 Only EAR	仅迟发相 Only LAR	速发相、迟发相都有 Both EAR and LAR
正常对照组 Normal control group	0/6	0/6	0/6
OVA 0.01	0/6	0/6	0/6
OVA 0.1	1/6	0/6	0/6
OVA 1.0	1/6	0/6	2/6
OVA 10.0	1/6	0/6	2/6
OVA 0.1 & Al(OH) ₃ 100	1/6	0/6	5/6
OVA 1.0 & Al(OH) ₃ 100	0/6	0/6	4/6
OVA 10.0 & Al(OH) ₃ 100	0/6	0/6	6/6
OVA 1.0 & Al(OH) ₃ 52	1/6	0/6	4/6
OVA 1.0 & Al(OH) ₃ 4	1/6	0/6	4/6
OVA 10.0 & Al(OH) ₃ gel 4	1/6	0/6	5/6

表 3 OVA 10.0 & Al(OH)₃100、OVA 10.0 & Al(OH)₃ gel 4 组速发相和迟发相
 Tab.3 The EAR and LAR of OVA 10.0 & Al(OH)₃100 and OVA 10.0 & Al(OH)₃ gel 4 groups

组别 Groups	速发相 峰值 EAR Peak	速发相 面积 EAR AUC	迟发相 峰值 LAR Peak	迟发相 时间/h LAR Duration/h	迟发相 面积 LAR AUC	速发相和迟 发相都有 Both EAR and LAR
正常对照组 Normal control group	1.34 ± 0.14	—	2.00 ± 0.22	—	—	0/6
OVA 10.0 & Al(OH) ₃ 100	7.54 ± 1.25*	170.50 ± 76.11	20.78 ± 10.87*	7.58 ± 2.18	2656.00 ± 590.36	6/6
OVA 10.0 & Al(OH) ₃ gel 4	13.26 ± 7.10*	227.50 ± 167.92	15.19 ± 2.53*	7.83 ± 4.18	1787.20 ± 1110.75	5/6

注:峰值是最大 Penh 值;面积是 Penh 曲线下高于基线的面积;迟发相时间是 1 h 后到 Penh 曲线与基线(正常对照组的 16 h Penh 的 $\bar{x} + 3s$)交叉截止的时间;与对照组相比, * $P < 0.05$ 。 $\bar{x} \pm s$, $n = 6$ 。

Note. Peak: The maximum value of Penh; AUC: Penh area under the curve (running average of 10 data points) and above the baseline; LAR duration: the time from the start point (1 hour after challenge) to the end point (LAR Penh crossing the baseline (mean 16 h Penh value of the normal control group plus 3 standard deviations)). Compared with the normal control group, * $P < 0.05$. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$.

2.3 肺组织病理检测结果

如图 4,与正常对照组相比(图 4C、D),OVA 10.0 & Al(OH)₃100 组(图 4A、B)显示血管充血,肺组织有灶性出血,肺泡间隔增宽,肺泡腔内有渗出,分泌物增多(箭头所示),且以嗜酸性粒细胞为主的炎细胞也增多(图 4 见封二)。

3 讨论

哮喘造模动物有大鼠、小鼠、豚鼠、羊和狗等^[9],以啮齿类动物最为常用,大鼠与豚鼠相比不易在哮喘发作中死亡,与小鼠相比更容易出现喘息症状,更利于进行喘息的研究。近交系挪威褐鼠是哮喘研究中常用的大鼠品系,挪威褐鼠与人类在哮喘发作时具有很多类似的特点,如 EAR 和 LAR 状态、对乙酰胆碱非特异激发的反应、IgE 的产生和炎症细胞浸润等方面^[10-11],符合本研究关注哮喘发作全过程的特点,适合作为本研究的模型动物。

OVA 致敏激发引起动物哮喘是现在哮喘动物模型造模最常用的方法^[12],使用“通用变应原”OVA 造模符合本研究拟建立普适性哮喘动物模型的要求。文献中报道的致敏方式多样,有腹腔注射、足底注射、皮下注射等不同注射部位^[13]、OVA 多种不同浓度,Al(OH)₃ 佐剂^[14]和弗氏佐剂^[15]等不同佐剂,致敏的次数也有不同。本研究以观察到典型的 EAR 和 LAR 为目的,参考文献资料,初步确立了采用 OVA 和 Al(OH)₃ 佐剂混合作为致敏液在第 0 天首次皮下注射,第 5 天再次强化致敏,第 37 天雾化激发的实验方案,探索最佳造模方法。

LAR 时期是哮喘炎症反应的主要阶段^[16]。可稳定观察 LAR 的动物模型对哮喘机理研究和治疗

药物研究的意义重大。鉴于目前没有合适的稳定观察 LAR 的 OVA 致敏哮喘动物模型,本研究建立了国内首个 OVA 作为变应原的无创、清醒挪威褐鼠过敏性哮喘发作全程记录模型,可记录和分析哮喘发作时 EAR 和 LAR 的变化,其主要指标 Penh 的升高和气道阻力的增加有很好的相关性^[17-18],可以间接反映支气管的狭窄程度,而且和哮喘发作时呼气相延长也有一致性,本研究发现, Penh 值的变化能很好的反映哮喘发作两相的强弱,可将其作为呼气相延长参数,用于喘息状态判定。

本研究对激发后哮喘发作状态的相关数据进行了 16 h 连续记录,每只动物获得 1920 个 Penh 数值。根据哮喘发作时人类 EAR 的特点为变应原吸入后 10 min 内发生,持续 1 至 2 h,和对挪威褐鼠激发后 Penh 曲线的分析,将本模型的 EAR 定义为激发后前 1 h。在 EAR 结束后立即进入 LAR 时期,可持续十几小时,此时的 Penh 值开始剧烈升高,动物喘息增加,达峰值后开始下降,喘息缓解,最后下降到基线或接近基线水平,降至基线水平以下为哮喘发作状态完全缓解。本模型的 LAR 部分定义为 EAR 结束后至 Penh 曲线与基线交叉时止。基线定义为正常对照组 16 h 的 Penh 均值加上 3 倍标准差,EAR 和 LAR 的有效 Penh 值为高于基线的部分。

IgE 在哮喘激发中起重要作用,是致敏成功的关键,本研究发现加入 Al(OH)₃ 佐剂的致敏液比单纯 OVA 致敏产生的 IgE 更多,在一定剂量范围,IgE 含量均随 OVA 浓度增加而增加,与文献报道相同^[19-20];还发现致敏液中加入等量 Al(OH)₃ 佐剂后,IgE 含量亦均随 OVA 浓度增加而增加。本研究发现,致敏后 IgE 含量在一定时间范围内,有时间依

赖性增长的趋势,在 1 周后 IgE 水平开始快速升高,2 周后涨幅变缓慢呈现稳定的持续增长,第 5 周达到高峰后开始下降。所以在 d 0 致敏后,二次强化致敏的时间应选择在 7 d 以内,此时 IgE 抗体水平较低,机体再次接触 OVA 时仍属于致敏阶段,而不会激发哮喘发作。鉴于已有文献证实高 IgE 含量对哮喘发作有促进作用^[21],所以根据本模型观察哮喘发作的特点,造模的激发时间应控制在第 5 周左右,可在较高 IgE 水平下激发,以获得较好的 EAR 和 LAR 反应图像。在第 38 天时 IgE 含量略有下降,可能是由于第 37 天激发时消耗了一些抗体,也可能是抗体在 5 周后就会出现下降的趋势,其具体原因还需要进一步研究。

本研究发现在低 IgE 含量时,很难观察到哮喘 EAR 和 LAR,高 IgE 含量时,更易观察到哮喘发作,且 EAR 和 LAR 更易连续出现,表明在一定范围内,随 IgE 含量增长,哮喘发作增强,与文献报道的 IgE 含量对哮喘发作有促进作用相符。但 IgE 并不是唯一影响因素,致敏除了产生 IgE 对哮喘发作造成影响外,致敏条件本身也会影响哮喘发作。本研究发现 IgE 含量相当的两组,其中添加 Al(OH)₃ 佐剂的组比未添加组更能促进 EAR 和 LAR 的出现,本研究还发现添加了 Al(OH)₃ 佐剂致敏的 6 组中,每组有超过一半的动物可连续观察到 EAR 和 LAR,未添加组则很难观察到,说明 Al(OH)₃ 佐剂除了促进 IgE 生成,加强致敏反应外,也能促进哮喘发作。与文献报道的 Al(OH)₃ 能促进 Th2 反应增强,即 Al(OH)₃ 有利于哮喘发展^[22]相一致。所以本模型适宜选择能产生较高 IgE 且添加 Al(OH)₃ 佐剂的方法来致敏。

在最佳造模方法的确立方面,本研究发现 OVA 0.01 组显示出低 IgE 水平,与正常对照组没有明显差异,提示单纯使用 0.01 mg OVA 致敏效果欠佳,且激发后无法观察到 EAR 和 LAR,该方法不适合进行造模。IgE 含量高且添加 Al(OH)₃ 佐剂的 OVA 10.0 & Al(OH)₃100 和 OVA 10.0 & Al(OH)₃ gel 4 组相比其他组更易连续观察到 EAR 和 LAR,两组均能产生较好的 EAR,但 LAR 部分,使用 Al(OH)₃ 胶体时有的动物不能出现 LAR,而使用干粉组全部出现 LAR。二组虽然 IgE 水平相近,但使用的佐剂剂型和含量不同,胶体与 OVA 需按照一定体积比混合才能保证稳定性,其最大使用量即为 OVA 10.0 & Al(OH)₃ gel 4 组的用量(含 Al(OH)₃ 4 mg),干粉

只能配成混悬液不受稳定性限制可以按需使用,所以干粉组能全部出现 LAR 可能与其使用的 Al(OH)₃ 含量高,而使 Th2 反应增强有关。同时,在其他组中,OVA 剂量相同佐剂剂量不同时,高剂量佐剂组更易连续观察到 EAR 和 LAR,也从一定程度上说明 Al(OH)₃ 佐剂含量高时更利于促进哮喘发作。对于本研究的模型,想要观察到好的 EAR 和 LAR 图像,不仅要选择较高的 IgE 含量同时还要选择合适的佐剂。当研究主要关注 LAR,特别是关注炎症反应部分的研究时,推荐使用本研究中 OVA 10.0 & Al(OH)₃100 组的造模方法。主要关注 EAR 时,也可将 Al(OH)₃ 干粉换成 Al(OH)₃ 胶体,使用 OVA 10.0 & Al(OH)₃ gel 4 组的造模方法,相比使用干粉,胶体使用量少,且易与 OVA 混合,方便注射,但某些动物有无法产生 LAR 的风险,对 EAR 无影响,所以需根据实际情况选择。

本研究发现,OVA 混合 Al(OH)₃ 联合致敏,其注射点处会形成持久性结节,一直到第 38 天处死时,仍不消退,透过皮肤触摸时结节质硬,不能移动。切开皮肤后看到结节薄膜完整,剪开后内部为湿润粉状,可能是聚集在一起的 Al(OH)₃,起到对 OVA 缓释的作用,减少注射后 OVA 扩散,达到持久致敏的效果(图 5,见封二),此现象也可能与文献报道的铝佐剂能吸附抗原,形成抗原贮存库,增强抗原免疫原性^[23]相关。

本研究遵循哮喘发病机制即 I 型超敏反应,变应原致敏激发后观察到了哮喘发作全过程,和嗜酸性粒细胞浸润为主的炎症反应,成功建立了 OVA 致敏的,在挪威褐鼠无创且清醒的状态下,可观察和记录到过敏性哮喘发作全过程的动物模型。确立了最佳致敏液配比为 OVA10 mg/只混合 Al(OH)₃100 mg/只,第 2 次致敏强化时间为 7 d 以内,激发时间为第 35 天左右。

本模型作为国内首个以 OVA 作为抗原,在动物清醒状态下记录哮喘发作全过程的挪威褐鼠模型,弥补了以往哮喘动物模型需要麻醉的不足,更加贴近人类患者进行哮喘激发试验的情况,能完整模拟哮喘患者发病到缓解的全过程,可连续观察 EAR 和 LAR 反应,进行长达 16 h 或更长的记录,其数值和图像也可同步展示出来,方便进行实时观测。而且,应用该方法可对同一动物进行多次无创伤的检测,可进行手术、药物等干预因素施加前后的自身对比。本模型不仅可用于哮喘机理研究,也为哮喘

治疗药物研究提供了一种新的工具和方法。有望在将来的哮喘研究中发挥重要作用。

参考文献:

- [1] Twentyman OP, Finnerty JP, Holgate ST. The inhibitory effect of nebulized albuterol on the early and late asthmatic reactions and increase in airway responsiveness provoked by inhaled allergen in asthma [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1991, 144(4): 782-787.
- [2] 莫碧文, 王昌明, 张珍祥, 等. 雷公藤对哮喘大鼠气道重构及磷脂酰肌醇 3 激酶表达的影响 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2007, (3): 359-364.
- [3] Chen CG, Wang HY, Dai Y, et al. Tripterygium polyglycosid attenuates the established airway inflammation in asthmatic mice [J]. *Chin J Integr Med*, 2013, 19(4): 282-288.
- [4] Zhao H, Zhang XD, Welinder H, et al. Anaphylactic bronchoconstriction in immunized guinea pigs provoked by inhalation and intravenous administration of hexahydrophthalic anhydride and methyltetrahydrophthalic anhydride [J]. *Allergy*, 1997, 52(1): 18-26.
- [5] Zhang XD, Lötvald J, Arakawa H, et al. Relationship between IgG1 levels and airway responses in guinea pigs actively and passively sensitized to hexahydrophthalic anhydride [J]. *Allergy*, 1998, 53(1): 20-27.
- [6] Moy LY, Jia Y, Caniga M, et al. Inhibition of spleen tyrosine kinase attenuates allergen-mediated airway constriction [J]. *Am J Resp Cell Molecular Biol*, 2013, 49(6): 1085-1092.
- [7] Zhang XD, Fedan JS, Lewis DM, et al. Asthma-like biphasic airway responses in Brown Norway rats sensitized by dermal exposure to dry trimellitic anhydride powder [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2004, 113(2): 320-326.
- [8] ZhangXD, Murray DK, Lewis DM, et al. Dose-response and time course of specific IgE and IgG after single and repeated topical skin exposure to dry trimellitic anhydride powder in a Brown Norway rat model [J]. *Allergy*, 2002, 57(7): 620-626.
- [9] Zosky GR, Sly PD. Animal models of asthma [J]. *Clin Exp Allergy*, 2007, 37(7): 973-988.
- [10] Haczku A, Chung KF, Sun J, et al. Airway hyperresponsiveness, elevation of serum-specific IgE and activation of T cells following allergen exposure in sensitized Brown-Norway rats [J]. *Immunology*, 1995, 85(4): 598-603.
- [11] Martin JG, Tamaoka M. Rat models of asthma and chronic obstructive lung disease [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2006, 19(6): 377-385.
- [12] Hylkema MN, Hoekstra MO, Luinge M, et al. The strength of the OVA-induced airway inflammation in rats is strain dependent [J]. *Clin Exp Immunol*, 2002, 129(3): 390-396.
- [13] Wu CJ, Chou HW, Liou CJ, et al. Prophylactic vaccination with adjuvant monophosphoryl lipid A prevents Th2-mediated murine asthmatic responses [J]. *J Asthma*, 2013, 50(4): 327-333.
- [14] Spiess PC, Kasahara D, Habibovic A, et al. Acrolein exposure suppresses antigen-induced pulmonary inflammation [J]. *Respir Res*, 2013, 14(1): 107.
- [15] Noviello MLM, Batista NV, Dourado LPA, et al. Prolonged ingestion of ovalbumin diet by OVA sensitized mice suppresses mBSA-induced arthritis [J]. *Cell Immunol*, 2013, 284(1): 20-28.
- [16] Taher YA, Henricks PAJ, van Oosterhout AJM. Allergen-specific subcutaneous immunotherapy in allergic asthma: immunologic mechanisms and improvement [J]. *Libyan J Med*, 2010, 5: 5303 - DOI: 10.3402/ljm.v5i0.5303
- [17] 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): 766-775.
- [18] 谢敏, 刘先胜, 徐永健, 等. 一种无创性检测哮喘大鼠气道高反应性的方法[J]. *华中科技大学学报:医学版*, 2007, 36(1): 138-140.
- [19] Pauwels R, Bazin H, Platteau B, et al. The influence of different adjuvants on the production of IgD and IgE antibodies [C]. *Ann Immunol (Paris)*. 1979, 130(1): 49-58.
- [20] 崔红花, 郭娇, 杨超燕, 等. 不同剂量卵蛋白对豚鼠血清中 IgE 的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(6): 141-143.
- [21] Tanaka A, Jinno M, Hirai K, et al. Longitudinal increase in total IgE levels in patients with adult asthma; an association with poor asthma control [J]. *Respir Res*, 2014, 15(1): 144.
- [22] Brewer JM, Conacher M, Hunter CA, et al. Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4-or IL-13-mediated signaling [J]. *J Immunol*, 1999, 163(12): 6448-6454.
- [23] 湛琳丽, 温昊, 祝明, 等. 铝佐剂的特性及影响因素 [J]. *畜牧市场*, 2009, 5: 13-15.

[修回日期] 2015-04-25