

小鼠鼻气道阻力检测方法的建立[▲]

谢佳星 张清玲 罗 炜 赖克方

(广州呼吸疾病研究所、广州医科大学附属第一医院、

呼吸疾病国家重点实验室、呼吸疾病国家临床研究中心,广州市 510120, E-mail: jiaxingxie@126.com)

【摘要】 目的 建立简单易行的小鼠鼻气道阻力检测方法及鼻灌注方法。**方法** 雌性小鼠16只,随机分为两组,每组8只,变应性鼻炎组(AR组)采用卵清蛋白+氢氧化铝生理盐水混悬液腹腔注射致敏及滴鼻激发致敏,建立变应性鼻炎小鼠模型,对照组用生理盐水腹腔注射致敏和滴鼻激发。致敏后小鼠麻醉分离气管,近喉部切开气管插入18 G插管至鼻咽部,插管连接“T”形管,再分别连接实验精密注射泵和压力传感器,应用灌注/吸引模型模拟呼气/吸气,检测鼻气道的压力,计算鼻阻力。对小鼠鼻腔进行组胺雾化激发,检测鼻气道反应性。采用一侧鼻腔插管灌注,对侧鼻腔收集灌注液的方法,对鼻腔灌注液进行中性粒细胞、嗜酸性粒细胞计数;处死小鼠后取鼻黏膜组织进行病理组织学观察。**结果** 对照组小鼠的基础鼻气道阻力、反应性及鼻激发后的鼻气道阻力、反应性均低于AR组(P 均 <0.01);AR组鼻腔灌注液中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、细胞总数均显著高于对照组(P 均 <0.01);AR组的鼻黏膜有明显的嗜酸性粒细胞浸润,血管轻度充血水肿。对照组小鼠鼻黏膜无明显异常。**结论** 成功建立了简单易行的小鼠鼻气道阻力检测方法及鼻灌注方法。

【关键词】 变应性鼻炎;鼻气道阻力;鼻灌注;小鼠

【中图分类号】 R 765.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 0253-4304(2014)04-0409-04

DOI:10.11675/j.issn.0253-4304.2014.04.01

New Method for Measurement of Nasal Airway Resistance in Mice

XIE Jia-xing, ZHANG Qing-ling, LUO Wei, LAI Ke-fang

(Guangzhou Institute of Respiratory Disease, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University,

National Key Laboratory of Respiratory Disease, National Clinical Research Center for Respiratory Disease, Guangzhou 510120, China)

【Abstract】 Objective To introduce a simple and available method for measurement of nasal airway resistance (RNA) and nasal lavage in mice. **Methods** Sixteen female mice were randomly divided into 2 groups: allergic rhinitis (AR) group and control group, with 8 mice in each group. AR mice were immunized by intraperitoneal injection of ovalbumin plus suspension of aluminum hydroxide and normal saline as well as challenged with intranasal ovalbumin plus the suspension above. Control mice were sensitized by systemic intraperitoneal injection of normal saline and then challenged with intranasal normal saline. All mice were anesthetized after challenge. A cannula (18 G) was inserted into the trachea. A blunt needle connected with a T tube was inserted into nasopharynx. One end of the T tube was connected to a syringe pump which provided consistent air flow to the nasal passages. Another end of the T tube was connected to a pressure transducer for measurement of pressure difference across nasal passage. Pressure difference was divided by air flow to give values of RNA. Histamine was nebulized into nasal cavity to measure nasal response. A polyethylene catheter connected to a syringe was gently inserted into one nostril and the fluid was simultaneously collected from the contralateral nostril. Nasal lavage cytology and nasal histology were measured. **Results** The basic and postchallenge RNA values as well as nasal response values for AR group were higher than those of control group (all $P < 0.01$). Eosinophils and neutrophils in nasal lavage fluid increased significantly in the AR group compared with the controls (all $P < 0.01$).

[▲]基金项目:国家自然科学基金资助项目(81100028,81070019)

作者简介:谢佳星(1977~),男,博士,讲师,研究方向:气道炎症。

通信作者:赖克方(1966~),男,博士,教授,研究方向:慢性咳嗽, E-mail: klai@163.com。

Obvious infiltration of eosinophils and mild edema were observed in the nasal mucosa in the AR group, but weren't observed in the control group. **Conclusion** We establish a relatively simple and available method for measuring nasal airway resistance and nasal lavage in mice.

【Key words】 Allergic rhinitis; Nasal airway resistance; Nasal lavage; Mouse

在变应性鼻炎 (allergic rhinitis, AR) 动物模型的研究中,鼻功能检查始终是最大的难题之一^[1]。实验动物,特别是用来进行大批量实验的小动物(如小鼠)测定其鼻气道阻力更加困难。对于小动物的鼻气道阻力没有确切的量化结果,而对于反应性,一直以来人们都是通过直接观察动物的鼻部症状(如打喷嚏等),或观察引起打喷嚏的组胺浓度等主观指标反映鼻气道阻力^[2],缺乏客观指标,不能准确反映鼻气道反应性的高低以及鼻气道阻力的大小。本研究旨在探讨一种新的简单易行的小鼠鼻气道阻力、鼻气道反应性检测方法及鼻灌洗方法,为变应性鼻炎动物模型实验打下基础。

1 实验与方法

1.1 实验动物及其分组 无特定病原体级 BALB/c 小鼠,雌性,5~6 周龄,体重 18~20 g,广东省实验动物中心提供。动物饲养环境符合 SPF 级环境设施标准,可以自由进食去卵白蛋白的饲料和三蒸水。

1.2 模型制备 小鼠随机分为两组:变应性鼻炎组 (AR 组) 和对照组,每组 8 只。AR 组:分别于实验流程第 0、7、14 天腹腔注射 20 μg 卵清蛋白 + 1.3 mg 氢氧化铝生理盐水混悬液 200 μl 致敏。于实验流程第 28 天滴鼻激发,用 20 μl 移液器抽取 1% 卵清蛋白激发液 20 μl 经鼻逐滴滴入,每侧鼻孔滴入 10 μl。对照组:用生理盐水腹腔注射致敏和滴鼻激发,实验方法同 AR 组。

1.3 鼻阻力及反应性检测法

1.3.1 小鼠鼻阻力检测方法:用 1% 戊巴比妥钠 60 mg/kg 麻醉小鼠后,仰卧位固定于操作平台,颈部正中做一个 15 mm 切口,小心分离气管;胸廓开口处用眼科结膜剪做一切口,气管内插管自然通气;咽喉部做一切口,插入 18 G 插管 (BUXCO 公司) 至鼻咽部,插管一端连接“T”形管,“T”形管分别连接实验精密注射泵和压力传感器 (TRD 4515);实验精密注射泵采用注射/回抽模式,流量 1 ml/s,注射 10 ml,回抽量 10 ml,压力传感器测出鼻后压 (图 1);应用 Bucos 公司的鼻阻力软件包记录参数。小鼠口腔塞入湿小棉球起密闭作用。鼻气道压力差 = 鼻后压 - 鼻孔处

压力 (大气压),根据阻力 = 压力差/流量,可获得总阻力,小鼠鼻气道阻力 = 总阻力 - 插管阻力。

1.3.2 小鼠鼻气道反应性检测方法:获得基础阻力后,应用雾化器 (REF AG-AL1000) 在小鼠鼻孔处雾化 0.5% 组胺 20 μl,同时注射泵回抽 (流量 1 ml/s),设置屏障避免气雾进入下气道。3 min 后注射泵注射/回抽模式再次记录阻力变化。

1.4 鼻病理的观察

1.4.1 鼻灌洗液 (nasal lavage fluid, NLF) 细胞计数分析:测定气道反应性后,取小鼠仰卧位,过量麻醉后摘除眼球放血处死;24 G 留置针插入小鼠一侧鼻孔,1 ml 磷酸盐缓冲液 (PBS) 灌洗鼻腔,用 EP 管置于对侧鼻孔的下方回收全部的鼻灌洗液,并记录每次回收量;回收的鼻灌洗液摇匀后,取 100 μl 液体进行中性粒细胞、嗜酸性细胞计数 (图 2)。4℃ 离心 3 000 rpm × 10 min,上清液 -80℃ 保存;细胞沉淀重悬后制备涂片,10% 甲醛固定液固定,苏木素 - 伊红 (HE) 染色 (已固定的细胞涂片 → 流水冲洗 5 min → 苏木素染色 3 min → 流水冲洗 1 min → 1% 盐酸酒精脱色 2 s → 流水冲洗 10 min → 伊红染色 5 s → 流水冲洗 1 min → 烘干后中性树胶封片),光学显微镜下进行细胞学分类计数,每张涂片计数 100~200 个细胞,求出各分类计数细胞所占百分比,随机选择视野进行显微摄影。

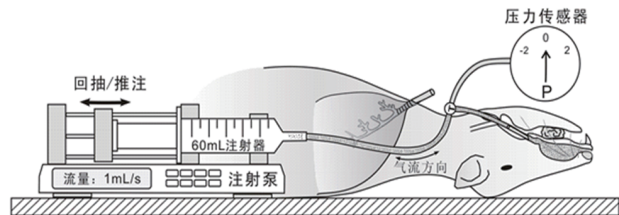
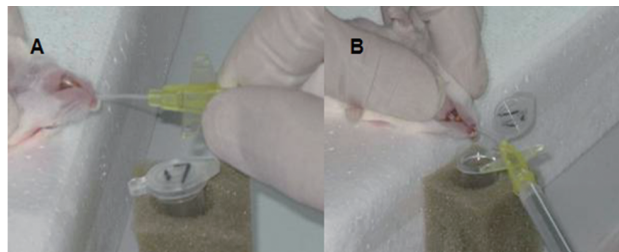


图 1 鼻阻力检测示意图



1.4.2 组织形态学观察:小鼠处死后取鼻黏膜组织,置于 10% 中性甲醇固定液中固定 24 h 以上。常

规取材、脱水、石蜡包埋、制备石蜡切片、HE染色,光学显微镜下观察组织形态、鼻甲黏膜嗜酸性粒细胞(EOS)浸润情况,于20×物镜下随机选择视野进行观测。选择视野进行显微摄影。

1.5 统计学分析 实验数据采用SPSS 12.0统计分析软件包进行分析,计量资料符合正态分布的以($\bar{x} \pm s$)表示,两组样本均数比较用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AR组与对照组鼻气道阻力及反应性比较 对照组小鼠的基础鼻气道阻力、反应性及鼻激发后的鼻气道阻力、反应性均低于AR组(P 均 < 0.01)。见表1。

表1 两组小鼠的鼻气道阻力及反应性比较 [$\bar{x} \pm s$, cmH₂O/(ml·s)]

| 组别 | n | 基础值 | | 鼻激发后 | |
|-------|---|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | | 呼气 | 吸气 | 呼气 | 吸气 |
| 对照组 | 8 | 1.72 ± 0.08 | 1.79 ± 0.08 | 2.84 ± 0.43 | 3.04 ± 0.48 |
| AR组 | 8 | 3.07 ± 0.29 | 3.66 ± 0.39 | 6.90 ± 1.05 | 7.64 ± 1.41 |
| t 值 | | 12.76 | 11.18 | 9.369 | 8.747 |
| P 值 | | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 |

2.2 两组鼻灌洗液细胞计数的比较 AR组鼻灌洗液中,中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、细胞总数比率均显著高于对照组(P 均 < 0.01),见表2、图3。

表2 AR组及对照组鼻灌洗液各细胞计数及总数比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 中性粒细胞(%) | 嗜酸性粒细胞(%) | 细胞总数($\times 10^3$ /ml) |
|-------|--------------|-------------|--------------------------|
| AR组 | 19.45 ± 1.86 | 7.26 ± 1.05 | 244.00 ± 25.00 |
| 对照组 | 9.33 ± 0.87 | 0.00 ± 0.00 | 1.63 ± 0.15 |
| t 值 | 13.94 | 19.56 | 7.858 |
| P 值 | <0.01 | <0.01 | <0.01 |

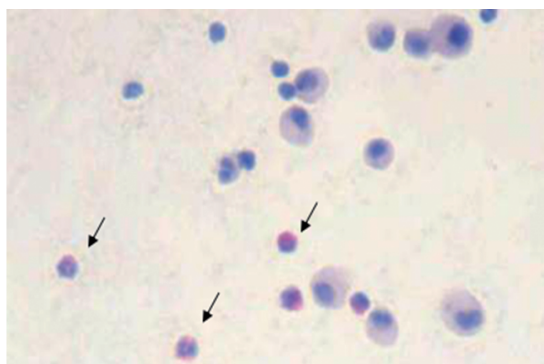


图3 AR组的NLF可见EOS(HE×400,箭头为嗜酸性粒细胞)

2.3 鼻组织病理学 AR组在鼻、鼻咽部(主要在鼻甲、鼻中隔)均可见部分黏膜上皮脱落、黏膜下嗜酸性粒细胞浸润,血管轻度充血水肿。对照组小鼠鼻、咽部黏膜纤毛上皮排列整齐,气管/血管周围无炎症细胞的浸润、无充血水肿。

3 讨论

鼻黏膜含有大量血管和腺体,并受丰富的感觉神经和自主神经末梢支配,鼻黏膜又是整个机体黏膜免疫系统——黏膜相关淋巴样组织的主要部位之一,因而构成一精细、敏感和活跃的终末器官^[1,3]。这种特点使其对内源性或外源性刺激通过神经、体液和细胞介导等产生生理性反应,以维持上呼吸道内外环境的平衡。这类反应包括血管的舒缩、腺体的分泌和喷嚏反射。鼻高反应性则是指鼻黏膜对某些刺激因子过度敏感而产生超出生理范围的过强反应^[1]。根据刺激因子的性质和发病机制,高反应性鼻病可表现为多种形式,其中最常见的是变态反应性鼻炎和血管运动性鼻炎。

在变应性鼻炎动物模型的研究中,鼻功能检查始终是一个最大的难题^[1],实验动物,特别是用来进行大批量实验的小动物(如小鼠)不能自主深吸气和深呼吸,且易受温度和湿度的影响,测定更加困难,国外极少文献报告^[4-5]。而对于反应性,一直以来人们都是通过直接观察动物的鼻部症状(如打喷嚏等),或观察引起打喷嚏的组胺浓度等主观指标反映^[2,6-7],缺乏客观指标,不能准确反映鼻气道反应性的高低以及鼻气道阻力的大小。

近年来有学者应用全身体积描记系统反映小鼠鼻阻力的变化,前提是排除实验动物存在下气道炎症。日本学者Nakaya等^[4]的研究显示,单纯鼻炎增强的呼吸间歇(Penh)的变化与鼻的炎症程度呈正相关,雾化醋甲胆碱后鼻炎小鼠呼吸间歇明显上升。Miyahara等^[5]研究发现,可应用全身体积描记系统监测鼻炎小鼠的呼吸频率、潮气量,这些指标与鼻炎程度呈正相关。Tsumuro等^[8]报告成功使用呼吸间歇反映二甲苯二异氰酸酯(TDI)致敏后大鼠的鼻充血致鼻阻力增高的程度。应用呼吸间歇来反映鼻阻力变化,首先要排除下气道炎症的干扰,另外呼吸间歇是一个没有单位的指标,是一个时间常数,而且呼吸间歇在国内外的应用仍然存在很多争议,因此只能粗略反映鼻阻力变化。Miyahara等^[5]应用强迫振荡技术检测小鼠的鼻阻力和反应性,但强迫振荡小动物呼

吸机必须向厂家定做,价格昂贵,并且该方法测得的小鼠鼻阻力明显偏低,结果有待进一步探讨。

本研究中,我们应用一台可以灌注和回抽的实验型精密注射泵给小鼠鼻腔通气(可以精确调节流量),用T形管连接鼻咽部,测鼻咽部的压力,鼻咽部的压力减去鼻孔处的压力(等于大气压)就获得压力差,再根据气道阻力计算公式:阻力=压力差/流量,就能获得鼻阻力。该方法相当于人鼻阻力测定的被动后鼻测压法。同时在吸气状态下雾化组胺激发,激发后鼻黏膜充血水肿,测定激发后的鼻气道阻力变化,再与对照组比较,即可了解鼻反应性。该方法操作简易,无需复杂昂贵的实验仪器,只需要实验精密泵、压力传感器、超声雾化器、信号放大及处理器即可完成本实验。本研究结果显示,变应性鼻炎组(AR组)小鼠基础鼻气道阻力明显高于对照组($P < 0.01$),提示存在鼻气道炎症(黏膜充血、肿胀),因此鼻气道阻力增加;组胺激发后鼻气道黏膜水肿更明显,分泌物增加,鼻气道阻力明显增高($P < 0.01$),提示模型组小鼠存在鼻气道高反应性。

由于小鼠生理解剖结构微小,对其进行鼻灌洗较为困难,国内外大多数文献均采用从咽部插管两侧鼻腔同时灌洗,再从鼻孔收集灌洗液的方法^[9-12]。该方法存在较大缺点:(1)两侧的鼻腔灌洗不均匀,因为一侧鼻腔堵塞而出现只能灌洗一侧鼻腔的情况,导致灌洗液里面的细胞计数量较少,灌洗液炎症介质浓度低于多数检测试剂盒的灵敏度下限;(2)操作较复杂,需要切开小鼠颈部皮肤分离气管,切开气管后进行插管固定。我们结合国外文献,采用的是从一侧鼻孔插管灌洗,对侧鼻孔收集灌洗液的方法,该方法具有以下优点:(1)使得两侧鼻腔均能得到均匀灌洗,而且鼻腔的灌洗量也较以往提高1倍;(2)灌洗更充分,从而提高了灌洗液的细胞数量,也提高了灌洗液上清的炎症介质浓度。(3)操作简单,无需分离气管。

本研究中,变应性鼻炎组小鼠鼻腔灌洗液中的中性粒细胞、嗜酸性粒细胞百分率显著高于对照组($P < 0.01$),提示变应性鼻炎组存在明显的鼻气道炎症,符合变应性鼻炎模型的特征。

小鼠变应性鼻炎模型价格相对低廉、易操作、抗体来源充足,是良好的实验对象,但一直以来缺乏客观评价鼻阻力和鼻反应性的方法;相对于支气管肺泡灌洗,既往的鼻灌洗技术获得的细胞数少,炎症介质浓度低,因此限制了小鼠作为鼻炎模型的研究推广。

本实验为小鼠变应性鼻炎模型提供了一种简单可靠的评价鼻阻力、鼻黏膜反应性及鼻灌洗的方法,将有助于以后小鼠变应性鼻炎模型的应用和推广。

参 考 文 献

- [1] Wagner JG, Harkema JR. Rodent models of allergic rhinitis; relevance to human pathophysiology [J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2007, 7(2): 134-140.
- [2] McCusker CT. Use of mouse models of allergic rhinitis to study the upper and lower airway link [J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2004, 4(1): 11-16.
- [3] Tiniakov RL, Tiniakova OP, McLeod RL, et al. Canine model of nasal congestion and allergic rhinitis [J]. *J Appl Physiol*, 2003, 94(5): 1821-1828.
- [4] Nakaya M, Dohi M, Okunishi K, et al. Noninvasive system for evaluating allergen-induced nasal hypersensitivity in murine allergic rhinitis [J]. *Lab Invest*, 2006, 86(9): 917-926.
- [5] Miyahara S, Miyahara N, Takeda K, et al. Physiologic assessment of allergic rhinitis in mice; role of the high-affinity IgE receptor (FcεpsilonRI) [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 116(5): 1020-1027.
- [6] 马靖, 刘涛. 小鼠 SEB/OVA 变应性鼻炎模型的实验研究 [J]. *医学研究杂志*, 2010, 39(3): 101-104.
- [7] 刘晓宇, 张强, 吉坤美, 等. 粉尘螨疫苗免疫治疗过敏性鼻炎小鼠鼻黏膜的电镜观察 [J]. *江西师范大学学报(自然科学版)*, 2011, 35(5): 532-536.
- [8] Tsumuro T, Alejandra Hossen M, Kishi Y, et al. Nasal congestion model in Brown Norway rats and the effects of some H1-antagonists [J]. *Int Immunopharmacol*, 2006, 6(5): 759-763.
- [9] Sato J, Asakura K, Murakami M, et al. Topical CTLA4-Ig suppresses ongoing mucosal immune response in presensitized murine model of allergic rhinitis [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 1999, 119(3): 197-204.
- [10] Wang H, Lu X, Cao PP, et al. Histological and immunological observations of bacterial and allergic chronic rhinosinusitis in the mouse [J]. *Am J Rhinol*, 2008, 22(4): 343-348.
- [11] Mo JH, Park SW, Rhee CS, et al. Suppression of allergic response by CpG motif oligodeoxynucleotide-house-dust mite conjugate in animal model of allergic rhinitis [J]. *Am J Rhinol*, 2006, 20(2): 212-218.
- [12] Sejima T, Madoiwa S, Mimuro J, et al. Protection of plasminogen activator inhibitor-1-deficient mice from nasal allergy [J]. *J Immunol*, 2005, 174(12): 8135-8143.

(收稿日期:2013-12-17 修回日期:2014-02-28)