

Balb/c与DO11.10小鼠哮喘模型的建立

邓学泉^{1,2}, 姚银^{1,2}, 郭洁波¹, 高文翔^{1,2}, 孙悦奇^{1,2}, 付清玲^{1,2}(中山大学附属第一医院, ¹耳鼻咽喉科医院, ²耳鼻咽喉科研究所, 广东省广州市 510080)

文章亮点:

- 1 哮喘的发病率逐年上升, 不过大量相关研究尚无法在人体上直接开展, 因此进一步优化、拓展和深入了解动物模型将有助于深入了解此类疾病的发病机制, 将会进一步促进临床治疗的发展。
- 2 优化通过卵清蛋白致敏和激发诱导的 Balb/c 小鼠哮喘模型, 建立了稳定的 DO11.10 小鼠哮喘模型。
- 3 结果发现 1 次致敏和 4 次雾化就能引起 DO11.10 小鼠明显的炎症反应, 包括: 气道反应性增高, 肺部炎症细胞浸润, 支气管杯状上皮黏液分泌增加, 肺泡灌洗液中炎症细胞和嗜酸性粒细胞数量显著上升, 同时肺泡灌洗液中 Th2 型细胞因子水平也升高; 然而, 相同的条件却不能引起 Balb/c 小鼠明显的炎症反应; 3 次致敏和 4 次雾化后 Balb/c 小鼠出现了明显的炎症反应, 而这种条件下 DO11.10 小鼠的炎症反应反而明显减轻。

关键词:

实验动物模型; 心肺及血管损伤动物模型; 哮喘; DO11.10 小鼠; BALB/c 小鼠; 卵清蛋白; 致敏; 激发; 气道反应; 炎症; 国家自然科学基金

主题词:

哮喘; 卵清蛋白; 炎症; 免疫法; 组织工程

基金资助:

国家自然科学基金(81170896); 广东省科技计划(2012B031800045)

摘要

背景: 哮喘的发病率逐年增高, 建立和完善可以反映这种疾病的动物模型对于疾病研究具有重大意义。

目的: 探讨 Balb/c 与 DO11.10 小鼠哮喘模型的诱导方法, 比较两者的差异。

方法: 24 只 Balb/c 小鼠按随机数字表法等分为 A-D 组; 用同样的方法把 24 只 DO11.10 小鼠等分为 E-H 组。A 和 E 组小鼠第 1 天以 PBS 致敏, 第 8-11 天以 PBS 雾化; B 和 F 组小鼠第 1 天以卵清蛋白致敏, 第 8-11 天以卵清蛋白雾化; C、G 组小鼠第 1, 7, 14 天以 PBS 致敏, 第 22-25 天以 PBS 雾化; D 和 H 组小鼠第 1, 7, 14 天以卵清蛋白致敏, 第 22-25 天以卵清蛋白雾化。

结果与结论: 1 次致敏加上 4 次雾化只能引起 Balb/c 小鼠轻度的炎症反应, 在经历 3 次致敏和 4 次雾化后 Balb/c 小鼠出现了气道反应性增高, 肺部炎症细胞浸润, 支气管杯状上皮黏液分泌增加, 肺泡灌洗液炎症细胞和嗜酸性粒细胞数量显著上升, 同时肺泡灌洗液中 Th2 型细胞因子水平也升高。DO11.10 小鼠经过 1 次致敏和 4 次雾化即出现了显著的炎症反应, 值得注意的是, 其肺泡灌洗液中中性粒细胞的数量也显著上升; 而在经过 3 次致敏和 4 次雾化后, DO11.10 小鼠炎症反应反而明显减轻。提示卵清蛋白可成功诱导出 Balb/c 和 DO11.10 小鼠的哮喘模型, 不过两者在诱导方案和病理表现上有所差异。

邓学泉, 姚银, 郭洁波, 高文翔, 孙悦奇, 付清玲. Balb/c 与 DO11.10 小鼠哮喘模型的建立[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(49):7914-7919.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.49.008

Establishment of an asthma model in Balb/c and DO11.10 mice

Deng Xue-quan^{1,2}, Yao Yin^{1,2}, Guo Jie-bo¹, Gao Wen-xiang^{1,2}, Sun Yue-qi^{1,2}, Fu Qing-ling^{1,2}

(¹Otorhinolaryngology Hospital, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China; ²Otorhinolaryngology Institute, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: The incidence of asthma increases year by year. Therefore, establishment and improvement of optimized animal models of asthma are important for the investigation of asthma.

OBJECTIVE: To induce asthma method in Balb/c and DO11.10 mice and to compare their difference.

METHODS: A total of 24 Balb/c mice were equally and randomly divided into groups A-D and 24 DO11.10 mice were equally divided into groups E-H. Mice in the groups A and E were induced to sensitization using PBS on day 1, and atomization using PBS on days 8-11. Mice in the groups B and F were induced to sensitization using ovalbumin on day 1, and atomization using ovalbumin on days 8-11. Mice in the groups C and G were induced to sensitization using PBS on days 1, 7 and 14, and atomization by PBS on days 22-25. Mice in the groups D and H were induced to sensitization using ovalbumin on days 1, 7 and 14, and atomization using ovalbumin on days 22-25.

邓学泉, 男, 1989 年生, 广东省佛山市, 汉族, 中山大学在读硕士, 主要从事间充质干细胞对气道变态反应的免疫调节方面的研究作用

通讯作者: 付清玲, 中山大学附属第一医院, 耳鼻咽喉科医院, 耳鼻咽喉科研究所, 广东省广州市 510080

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2015)49-07914-06

稿件接受: 2015-10-14

http://www.crter.org

Deng Xue-quan, Studying for master's degree, Otorhinolaryngology Hospital, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China; Otorhinolaryngology Institute, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Corresponding author: Fu Qing-ling, Otorhinolaryngology Hospital, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China; Otorhinolaryngology Institute, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Accepted: 2015-10-14

RESULTS AND CONCLUSION: One time of sensitization and four times of atomization only caused mild inflammatory reaction in the lungs in Balb/c mice. Three times of sensitization and 4 times of atomization caused clear airway hyperreactivity, inflammatory cell infiltration in lung, increased mucus secretion in bronchial goblet epithelium in Balb/c mice. Simultaneously, the number of inflammatory cells and eosinophils significantly increased in bronchoalveolar lavage fluid. Th2 type cytokine levels also increased in the bronchoalveolar lavage fluid. In DO11.10 mice, one time of sensitization and four times of atomization induced significant inflammatory response. Specially, the number of neutrophils obviously increased in the bronchoalveolar lavage fluid. However, after three times of sensitization and four times of atomization, inflammatory reaction significantly decreased in DO11.10 mice. These findings indicate that asthma model could be successfully induced with ovalbumin in both Balb/c and DO11.10 mice. There were some differences in the induction and pathological features for asthma model between the two species of mice.

Subject headings: Asthma; Ovalbumin; Inflammation; Immunization; Tissue Engineering

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81170896; the Science and Technology Foundation of Guangdong Province of China, No. 2012B031800045

Deng XQ, Yao Y, Guo JB, Gao WX, Sun YQ, Fu QL. Establishment of an asthma model in Balb/c and DO11.10 mice. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2015;19(49):7914-7919.

0 引言 Introduction

哮喘是一种以气道高反应、肺组织炎性细胞浸润、气道重塑为特点的复杂性临床疾病, 全球大约有300万患者, 过去20年其发病率逐年增加, 目前已成为全球性的公共健康问题^[1-3]。尽管近些年来临床上对哮喘的诊疗水平已有了很大的提高, 机制也从多方面进行了研究和探讨^[4], 但目前尚不能从根本上治愈这种疾病。由于伦理问题, 许多研究尚无法在人体上直接开展。以上这些因素都极大的限制了对哮喘发病机制的深入探讨和相关治疗的研究。因此进一步优化、拓宽和深入了解这种疾病的动物模型将有助于深入了解哮喘的发病机制^[5], 为进一步的临床治疗打下坚实的基础。作者在Balb/c小鼠呼吸道变应性炎症模型的基础上进行改良^[6], 并建立了稳定的DO11.10小鼠哮喘模型。通过比较这2种小鼠造模方案及病理表现的不同, 来说明两者的差异, 为哮喘小鼠模型的研究应用提供了更多选择和依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2014年6月至2015年4月在广州中山大学附属第一医院耳鼻咽喉科研究所完成。

1.3 材料 SPF级4-6周龄雌性Balb/c和DO11.10小鼠各24只, 体质量15-20 g, 分别由广东省医学实验动物中心[SCXK(粤)2013-0002]和南京大学-南京生物医药研究院[SCXK(苏)2015-0001]提供种系并在中山大学实验动物中心繁殖饲养。以上实验由中山大学动物实验伦理委员会批准(No.20110228002), 动物均饲养于中山大学动物实验中心SPF级动物房。

随机数字表法将2种小鼠各等分为4组, 一共8组:

1.4 方法

1.4.1 造模方法 采用卵清蛋白致敏(含有40 μg卵清蛋白, 4 mg氢氧化铝, PBS定容至200 μL)腹腔注射, 随后雾化吸入卵清蛋白(体积分数5%卵清蛋白溶液, 1次/d, 30 min/次)的方法诱导哮喘模型。B和F组第1天卵清蛋白致敏, 第

动物分组:

组别 干预方法

| | |
|----|---|
| A组 | Balb/c 小鼠第1天PBS致敏, 第8-11天PBS雾化 |
| B组 | Balb/c 小鼠第1天卵清蛋白致敏, 第8-11天卵清蛋白雾化 |
| C组 | Balb/c 小鼠第1, 7, 14天PBS致敏, 第22-25天PBS雾化 |
| D组 | Balb/c 小鼠第1, 7, 14天卵清蛋白致敏, 第22-25天卵清蛋白雾化 |
| E组 | DO11.10 小鼠第1天PBS致敏, 第8-11天PBS雾化 |
| F组 | DO11.10 小鼠第1天卵清蛋白致敏, 第8-11天卵清蛋白雾化 |
| G组 | DO11.10 小鼠第1, 7, 14天PBS致敏, 第22-25天PBS雾化 |
| H组 | DO11.10 小鼠第1, 7, 14天卵清蛋白致敏, 第22-25天卵清蛋白雾化 |

呼吸道变应性炎症模型建立及检测使用的主要试剂及仪器:

| 试剂及仪器 | 来源 |
|----------------------|-------------------------|
| 卵清蛋白、乙酰甲胆碱 | 美国 Sigma 公司 |
| 氢氧化铝凝胶 | 美国 Thermo Scientific 公司 |
| 苏木精-伊红染液 | 美国 DAKO 公司 |
| Diff-quick 快速染色试剂盒 | 珠海 Baso Diagnostics 公司 |
| 白细胞介素 4、13 酶联免疫吸附试剂盒 | 美国 R&D 公司 |
| 雾化器 | 江苏鱼跃公司 |
| 小鼠无创肺功能仪 | 美国 Buxco 公司 |
| 正立显微成像系统(DM 2500B) | Leica 公司 |

8-11天卵清蛋白雾化; D和H组第1, 7, 14天卵清蛋白致敏, 第22-25天卵清蛋白雾化。A和E组第1天PBS致敏, 第8-11天PBS雾化; C和G组第1, 7, 14天PBS致敏, 第22-25天PBS雾化。末次雾化当天取材。

1.4.2 气道反应性检测 小鼠无创肺功能仪检测小鼠的Penh值^[7]。设定间歇期为10 min, 首先测定正常状态下的Penh值作为基线, 依次雾化吸入递增浓度的乙酰甲胆碱, 并记录Penh的变化, 激发质量浓度依次为0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 g/L, 记录各质量浓度乙酰甲胆碱激发下的平均Penh值。将每个乙酰甲胆碱激发浓度下的Penh值转换

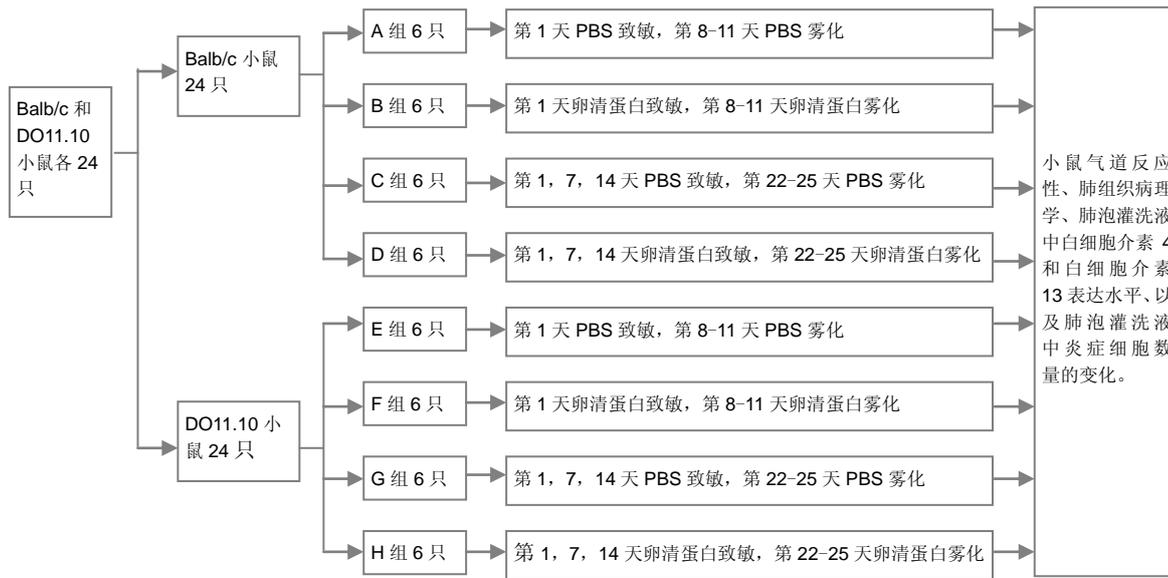


图 1 哮喘小鼠模型的造模流程图
Figure 1 Flow diagram of mouse model establishment of asthma

为与正常状态下Penh值的百分比(乙酰甲胆碱激发的Penh值/基础Penh值×100%)作为小鼠气道反应性的评价指标。

1.4.3 肺组织病理形态学评价 取肺组织制成石蜡切片后行苏木精-伊红和碘酸-雪夫染色。正立显微成像系统(DM 2500B)下观察小鼠肺组织支气管周围炎性浸润情况, 以及支气管腔杯状上皮黏液分泌情况^[6]。

1.4.4 肺泡灌洗液炎症细胞计数 获取的肺泡灌洗液于4℃、2 000 r/min离心10 min, 沉淀细胞用1 mL冷PBS重悬, 取10 μL用上海求精血球计数板计算细胞总数; 余离心后再取沉淀, 50 μL冷PBS重悬后常规涂片, 约30 min晾干后进行Diff-Quick快速染色, 显微镜下计算每毫升细胞悬液中细胞总数和嗜酸性粒细胞、中性粒细胞的数量。

1.4.5 肺泡灌洗液中白细胞介素4, 13的检测 末次雾化后当天收集肺泡灌洗液, 按照试剂说明书进行检测。

1.4.6 不良反应评价标准 诱导哮喘动物模型最常见的不良反应为腹腔致敏后动物出现死亡, 多次致敏后产生腹水及测定气道高反应时动物出现死亡。

1.5 主要观察指标 小鼠气道反应性、肺组织病理学、肺泡灌洗液中白细胞介素4和白细胞介素13表达水平、以及肺泡灌洗液中炎症细胞数量的变化。

1.6 统计学分析 所有实验数据采用SPSS 19.0软件进行统计分析, 每组实验数据资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。符合正态分布, 且方差齐的两组数据用t检验比较指标间差异; 不符合上述条件的两组数据用Mann-Whitney U检验比较指标间差异。

2 结果 Results

2.1 造模成功动物数量及过程 实验中小鼠无异常死亡, 所有48只小鼠进入结果分析。实验流程见图1。

2.2 模型方法的改进 在小鼠呼吸道变应性炎症模型的

基础上进行改进^[6], 减少了Balb/c小鼠致敏和激发次数, 并引入对卵清蛋白特异性敏感的DO11.10小鼠构建耗时更短的哮喘模型。

2.3 模型更接近临床实践 2种小鼠建立的模型能比较好地模拟人类哮喘病情。Balb/c小鼠建模过程优化了致敏及激发次数, 使干扰因素减少, DO11.10小鼠建模所需最佳致敏次数仅1次, 且所需时间更短, 干扰因素更少, 重复性更好。2种小鼠哮喘模型不良反应现象出现概率极小, 且均能诱导哮喘发生。

2.4 主要观察结果和次要观察结果

2.4.1 气道反应性 相对于A, E组和Balb/c卵清蛋白致敏1次的B组, 致敏1次的DO11.10小鼠(F组)气道反应性显著升高。相对于致敏3次的C和G组, 卵清蛋白致敏3次的Balb/c小鼠(D组)气道反应性增高显著升高, 致敏3次的DO11.10小鼠(H组)虽有气道反应性增高趋势, 但较致敏1次的F组气道反应性明显降低(图2)。

2.4.2 肺组织形态 卵清蛋白致敏1次的Balb/c小鼠(B组)炎症反应不明显, Balb/c小鼠在卵清蛋白致敏3次并激发后(D组)气道周围出现大量的炎症细胞浸润, 气道内杯状细胞分泌多量的黏液。DO11.10小鼠卵清蛋白致敏1次组(F组)肺内气管旁即出现了明显炎症细胞浸润, 气道内杯状细胞增生分泌明显; 有趣的是, DO11.10小鼠卵清蛋白致敏3次组(H组)肺组织反而只有轻度的炎症反应。用PBS代替卵清蛋白致敏和激发的小鼠肺组织均未见明显炎症细胞, 气道内未见杯状细胞增生(图3, 4)。

2.4.3 肺泡灌洗液炎症细胞数量 致敏1次的B组小鼠肺泡灌洗液内未见明显的炎症细胞, 致敏3次的D组小鼠肺泡灌洗液中炎症细胞显著增加, 嗜酸性粒细胞占了很大的比例。卵清蛋白致敏1次的F组小鼠肺泡灌洗液炎症细胞数量增多, 特别是嗜酸性粒细胞和中性粒细胞的数量均有显著

增加;卵清蛋白致敏3次的H组小鼠肺泡灌洗液炎症细胞数量较F组明显下降。A, C, E和G组小鼠肺泡灌洗液中少见炎症细胞(图5)。

2.4.4 肺泡灌洗液细胞因子 只接受1次卵清蛋白致敏的B组小鼠Th2型细胞因子白细胞介素4, 13表达水平略有上升, 而卵清蛋白致敏3次的Balb/c小鼠(D组)白细胞介素4, 13表达水平升高显著。卵清蛋白致敏1次的DO11.10小鼠(F组)肺泡灌洗液内白细胞介素4, 13表达水平已经出现显著升高, 而卵清蛋白致敏3次的小鼠(H组)肺泡灌洗液中这2种细胞因子的表达水平低于F组(图6)。

2.5 不良反应分析 实验未出现不良反应。

3 讨论 Discussion

小鼠作为实验动物用于哮喘模型的复制有着独特的优点: ①基因图谱与人类类似^[8]。②哮喘的发生发展特点与人类相似^[9-10]。③生长周期短、繁殖力强、遗传背景明确。④伦理问题少、便于操作^[11-21]。

DO11.10小鼠是以Balb/c小鼠为基础, 向T细胞TCR基因组中特异性导入识别鼠OVA肽段的TCR基因而建立的特殊小鼠品系, 对卵清蛋白特异性的敏感, 主要用于建立免疫耐受模型和特定机制的研究^[22-23]。作者沿用了卵清蛋白配合氢氧化铝致敏, 加上卵清蛋白溶液激发的方案^[6], 在以往建立的成熟的小鼠上下呼吸道变应性炎症模型的基础上进行改进^[24], 并引入所需造模时间更短, 致敏次数更少的DO11.10小鼠, 对哮喘模型进行探讨和比较。

不同小鼠的气道反应性和炎症反应存在明显的差异。卵清蛋白诱导的Balb/c小鼠较易出现明显的气道高反应, 而C57BL/6小鼠则不然; 同等的条件下Balb/c也往往表现出较C57BL/6明显的炎症浸润^[25]。针对于本次实验, 作者首先检测小鼠的气道反应性, 结果显示, 1次卵清蛋白致敏加上连续4次卵清蛋白雾化吸入没有引起Balb/c小鼠明显的气道高反应, 而3次卵清蛋白致敏加上4次雾化激发后Balb/c小鼠气道反应性显著增强。然而对于DO11.10小鼠, 1次致敏加上4次激发就能使其气道反应性显著升高, 不过3次卵清蛋白致敏和4次雾化吸入后气道反应性反而明显下降。接着对哮喘症状进行了全面的评估, 都发现了与气道反应性相似的趋势。值得注意的是, DO11.10小鼠引起的哮喘模型肺泡灌洗液除了有大量的嗜酸性粒细胞还有多量的中性粒细胞, 这可能与其对卵清蛋白特异性敏感有关, 有研究甚至用DO11.10去诱导中性粒细胞炎症^[26-27]。这些结果说明了Balb/c和DO11.10小鼠对卵清蛋白的反应存在巨大的差异, 卵清蛋白可以很快诱导出DO11.10小鼠的哮喘模型, 不过也较容易出现免疫耐受, 而Balb/c小鼠哮喘模型的建立至少要经历4周的时间。

本实验中制备的哮喘模型有以下特点: ①气道反应性显著升高。②气道旁、血管旁有大量炎性细胞浸润。③支气管上皮黏膜脱落, 同时杯状上皮细胞增生, 管腔内有大

量黏液分泌。④肺泡灌洗液内大量炎症细胞及Th2型炎症因子浸润。所以, 本模型能很好的反应人类哮喘炎症及上皮改变的病理特征。

综上, 本实验用不同方案成功诱导了Balb/c和DO11.10小鼠哮喘模型。作者发现卵清蛋白诱导Balb/c小鼠哮喘模型耗时较长, 主要表现为嗜酸性粒细胞炎症, 更接近临床病人的病理表现, 适用一般的哮喘研究; 而DO11.10小鼠造模周期短, 炎症类型为嗜酸性粒细胞和中性粒细胞混合型, 不过DO11.10供应不普遍, 花费较高, 且因为对卵清蛋白特异性敏感, 较易产生免疫耐受, 其更适合做短期研究和深入的机制探讨。上述研究为小鼠哮喘模型的建立与应用提供了更多的参考和选择。

作者贡献: 实验设计为第六作者, 实验实施为第一、二作者, 资料收集为第五作者, 评估为第三、四作者。第一作者成文, 第六作者审核。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 实验方案经中山大学动物实验伦理委员会批准, 批准号为20110228002。实验过程中尽一切努力最大限度地减少动物疼痛、痛苦和死亡。

文章查重: 文章出版前已经过CNKI反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 本刊实行双盲外审制度, 文章经国内小同行外审专家审核, 符合本刊发稿宗旨。

学术术语: 小鼠哮喘模型的优势? 与其他动物相比, 小鼠哮喘模型具有许多优势, 如成本较低、易于获得、繁殖力强、遗传背景清楚、相关研究较为丰富等。尤其是小鼠可以利用基因剔除技术和转基因技术方便地获得各种突变体, 易于研究哮喘的分子机制。实验小鼠品系很多, 常用的品系有C57BL/6、129Sv、BALB/c、CBA等。不同小鼠品系在气道反应性、T淋巴细胞免疫等方面有自身不同的特点。如C57BL/6小鼠对尘螨和豚草抗原的反应性较强, 而BALB/c小鼠较易产生针对卵白蛋白和花粉的气道高压反应和高滴度IgE。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Kupczyk M, Wenzel S. U.S. and European severe asthma cohorts: what can they teach us about severe asthma? J Intern Med. 2012;272(2):121-132.
- [2] Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. Nature. 2008;454(7203):445-454.
- [3] Papaioannou AI, Kostikas K, Zervas E, et al. Control of asthma in real life: still a valuable goal? Eur Respir Rev. 2015;24(136): 361-369.

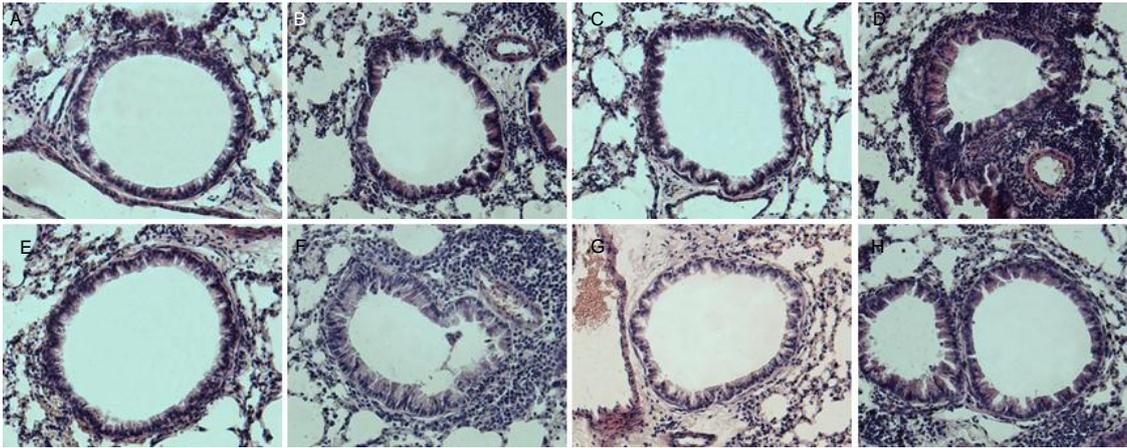


图3 Balb/c 与 DO11.10 小鼠哮喘模型肺组织形态变化(苏木精-伊红染色, ×200)

Figure 3 Morphological changes in lung tissue of mouse models of Balb/c and DO11.10 (Hematoxylin-eosin staining, ×200)

图注: A-D 组为 Balb/c 小鼠, E-H 组为 DO11.10 小鼠, B, F 组致敏 1 次, D, H 组致敏 3 次。A, C, E, G 组小鼠未见炎症浸润; B 组小鼠支气管、血管旁可见少量炎症浸润; D 组小鼠支气管、血管旁大片炎症聚集; F 组小鼠可见支气管、血管旁大片炎症聚集; H 组小鼠支气管、血管旁炎症浸润减少。

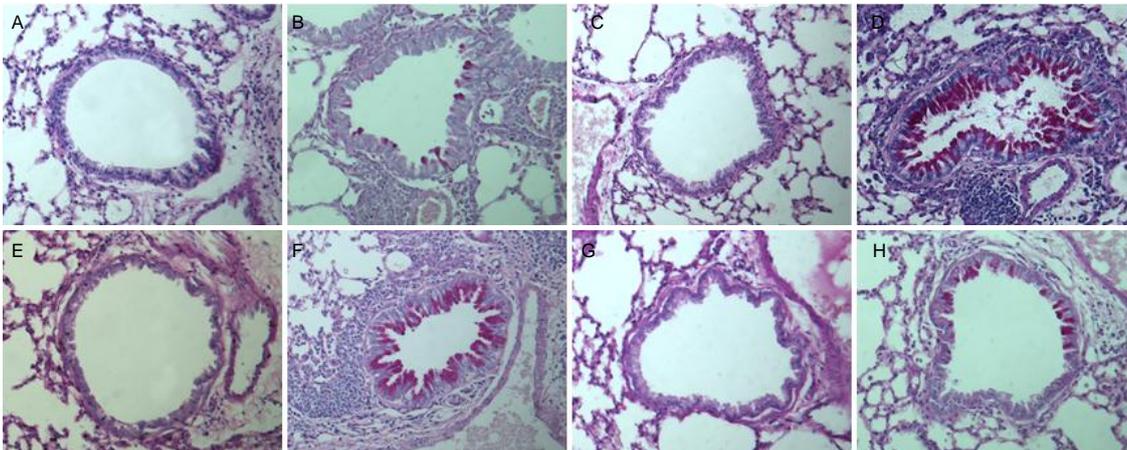


图4 Balb/c 与 DO11.10 小鼠哮喘模型肺组织气道杯状细胞增生及黏液分泌的变化(碘酸-雪夫染色, ×200)

Figure 4 Changes of goblet cell hyperplasia and mucus secretion in lung tissue of mouse models of Balb/c and DO11.10 (periodic acid and Schiff staining, ×200)

图注: A-D 组为 Balb/c 小鼠, E-H 组为 DO11.10 小鼠, B, F 组致敏 1 次, D, H 组致敏 3 次。A, C, E, G 组小鼠未见杯状细胞; B 组小鼠支气管内可见少量杯状细胞增生; D 组小鼠支气管围绕成圈增生的杯状细胞; F 组小鼠支气管杯状细胞增生已经十分明显, H 组小鼠支气管杯状细胞增生减少。

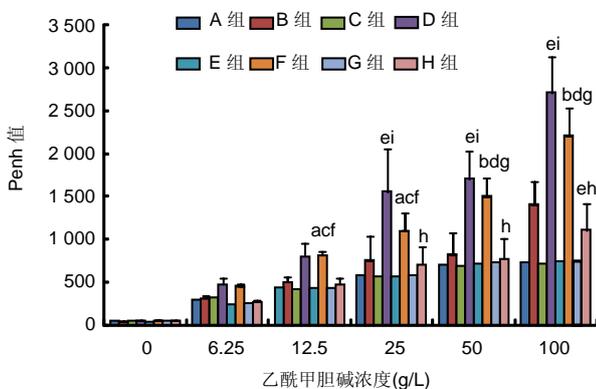


图2 Balb/c 和 DO11.10 小鼠气道反应性

Figure 2 Airway responsiveness in Balb/c mice and DO11.10 mice

图注: A-D 组为 Balb/c 小鼠, E-H 组为 DO11.10 小鼠, B, F 组致敏 1 次, D, H 组致敏 3 次。与 A 组相比, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与 B 组相比, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$; 与 C 组相比, ^e $P < 0.01$; 与 E 组相比, ^f $P < 0.05$, ^g $P < 0.01$; 与 F 组相比, ^h $P < 0.01$; 与 G 组相比, ⁱ $P < 0.01$ 。

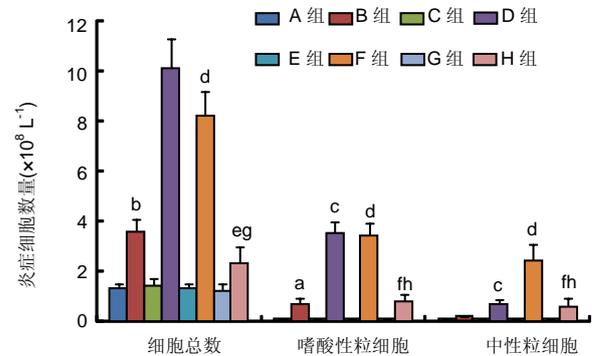


图5 Balb/c 小鼠和 DO11.10 小鼠肺泡灌洗液中炎症细胞的数量

Figure 5 Number of inflammatory cells in alveolar lavage fluid of Balb/c mice and DO11.10 mice

图注: A-D 组为 Balb/c 小鼠, E-H 组为 DO11.10 小鼠, B, F 组致敏 1 次, D, H 组致敏 3 次。与 A 组相比, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与 C 组相比, ^c $P < 0.01$; 与 E 组相比, ^d $P < 0.01$; 与 F 组相比, ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$; 与 G 组相比, ^g $P < 0.05$, ^h $P < 0.01$ 。

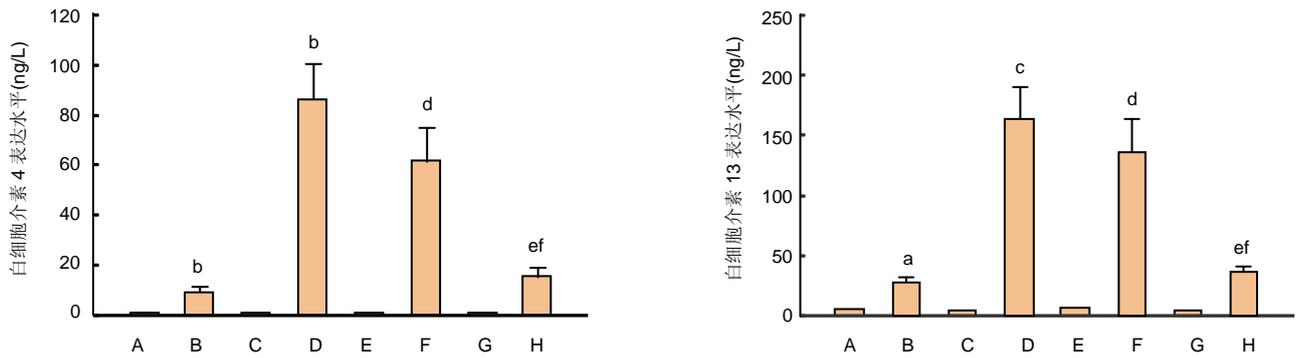


图6 Balb/c 小鼠和 DO11.10 小鼠肺泡灌洗液中白细胞介素 4 和 13 的表达水平

Figure 6 Interleukin-4 and interleukin-13 expression levels in the alveolar lavage fluid of Balb/c mice and DO11.10 mice

图注: A-D 组为 Balb/c 小鼠, E-H 组为 DO11.10 小鼠, B, F 组致敏 1 次, D, H 组致敏 3 次。与 A 组相比, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与 C 组相比, ^c $P < 0.01$; 与 E 组相比, ^d $P < 0.01$; 与 F 组相比, ^e $P < 0.01$; 与 G 组相比, ^f $P < 0.01$ 。

- [4] Fahy JV. Type 2 inflammation in asthma--present in most, absent in many. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(1):57-65.
- [5] 施焕中. 正确认识和合理应用支气管哮喘的动物模型[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2005, 28(11): 749-750.
- [6] Sun YQ, Deng MX, He J, et al. Human pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells prevent allergic airway inflammation in mice. *Stem Cells.* 2012;30(12): 2692-2699.
- [7] Chen ZG, Zhang TT, Li HT, et al. Neutralization of TSLP inhibits airway remodeling in a murine model of allergic asthma induced by chronic exposure to house dust mite. *PLoS One.* 2013;8(1):e51268.
- [8] Kips JC, Anderson GP, Fredberg JJ, et al. Murine models of asthma. *Eur Respir J.* 2003;22(2):374-382.
- [9] Boverhof DR, Billington R, Gollapudi BB, et al. Respiratory sensitization and allergy: current research approaches and needs. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008;226(1):1-13.
- [10] Finkelman FD, Wills-Karp M. Usefulness and optimization of mouse models of allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(3):603-606.
- [11] Bullone M, Lavoie JP. Asthma "of horses and men"--how can equine heaves help us better understand human asthma immunopathology and its functional consequences? *Mol Immunol.* 2015;66(1):97-105.
- [12] Marcelino MY, Fuoco NL, de Faria CA, et al. Animal models in chronic obstructive pulmonary disease--an overview. *Exp Lung Res.* 2014;40(6):259-271.
- [13] Fricker M, Deane A, Hansbro PM. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Opin Drug Discov.* 2014;9(6):629-645.
- [14] Pérez-Rial S, Girón-Martínez Á, Peces-Barba G. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Bronconeumol.* 2015;51(3):121-127.
- [15] Mullane K, Williams M. Animal models of asthma: reprise or reboot? *Biochem Pharmacol.* 2014;87(1):131-139.
- [16] Wright D, Sharma P, Ryu MH, et al. Models to study airway smooth muscle contraction in vivo, ex vivo and in vitro: implications in understanding asthma. *Pulm Pharmacol Ther.* 2013;26(1):24-36.
- [17] Nakajima H. Murine asthma model. *Arerugi.* 2010;59(11): 1539-1545.
- [18] Chen T, Xiao L, Zhu L, et al. Anti-Asthmatic Effects of Ginsenoside Rb1 in a Mouse Model of Allergic Asthma Through Relegating Th1/Th2. *Inflammation.* 2015;38(5): 1814-1822.
- [19] Guest IC, Sell S. Bronchial lesions of mouse model of asthma are preceded by immune complex vasculitis and induced bronchial associated lymphoid tissue (iBALT). *Lab Invest.* 2015;95(8):886-902.
- [20] Nie H, Yang Q, Zhang G, et al. Invariant NKT cells act as an adjuvant to enhance Th2 inflammatory response in an OVA-induced mouse model of asthma. *PLoS One.* 2015; 10(4): e0119901.
- [21] Zhang R, Kubo M, Murakami I, et al. L-Arginine administration attenuates airway inflammation by altering l-arginine metabolism in an NC/Nga mouse model of asthma. *J Clin Biochem Nutr.* 2015;56(3):201-207.
- [22] Hegazy AN, Klein C. Ex vivo priming of CD4 T cells converts immunological tolerance into effective antitumor immunity in a murine model of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2008;22(11):2070-2079.
- [23] Nakagome K, Matsushita S, Nagata M. Neutrophilic inflammation in severe asthma. *Int Arch Allergy Immunol.* 2012; 158 Suppl 1:96-102.
- [24] 韩灵, 孙悦奇, 付清玲, 等. 呼吸道变应性炎症反应小鼠模型的建立[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2013, 48(3): 224-228.
- [25] Gueders MM, Paulissen G, Crahay C, et al. Mouse models of asthma: a comparison between C57BL/6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production. *Inflamm Res.* 2009;58(12):845-854.
- [26] Zhang Y, Zhang L, Wu J, et al. Heme oxygenase-1 exerts a protective role in ovalbumin-induced neutrophilic airway inflammation by inhibiting Th17 cell-mediated immune response. *J Biol Chem.* 2013;288(48):34612-34626.
- [27] Takagi R, Kawano M, Nakagome K, et al. Wogonin attenuates ovalbumin antigen-induced neutrophilic airway inflammation by inhibiting th17 differentiation. *Int J Inflamm.* 2014;2014:571508.