

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.22.003

变应性鼻炎模型小鼠鼻黏膜的形态学观察*

温立婷¹ 陈福权¹ 王洁² 王焱¹ 石照辉¹ 李晓媛¹ 刘英祥³ 邱建华^{1△}

(1 第四军医大学西京医院耳鼻咽喉-头颈外科 陕西 西安 710032; 2 陕西省西安市儿童医院 陕西 西安 710003;

3 河北省乐亭县卫协医院 河北 唐山 063600)

摘要 目的:建立小鼠变应性鼻炎模型,观察小鼠鼻腔黏膜组织的重塑情况。**方法:**20只BALB/c小鼠被随机分为致敏组和对照组,使用卵清蛋白(OVA)诱导建立小鼠变应性鼻炎模型。通过HE染色观察小鼠鼻黏膜的大体重塑情况,吉姆萨染色观察嗜酸性粒细胞,阿辛蓝-过碘酸-希夫染色观察杯状细胞;酶联免疫吸附(ELISA)法检测小鼠血清中白细胞介素-4(IL-4)的水平。**结果:**小鼠变应性鼻炎模型的生物学行为评分为 6.5 ± 1.3 ,提示造模成功。与对照组相比,致敏组鼻腔黏膜出现上皮细胞脱落、坏死,杯状细胞增生,鳞状上皮化生,固有层和黏膜下层腺体增生、血管扩张,组织水肿,固有层内可见特征性的嗜酸性粒细胞浸润,造模后鼻腔黏膜结构存在重塑。致敏组小鼠鼻黏膜嗜酸性粒细胞计数及杯状细胞计数分别为 (26.4 ± 5.72) 和 (24.14 ± 3.12) ,而对照组分别是 (8.31 ± 2.42) 和 (9.41 ± 1.22) ,两组比较均具有统计学差异($P < 0.05$);致敏组血清中白细胞介素4(IL-4)水平为 (18.9 ± 3.1) pg/ml,对照组为 (8.3 ± 1.4) pg/ml,致敏组显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**通过卵清蛋白诱导建立的小鼠变应性鼻炎模型鼻腔黏膜存在组织重塑。

关键词:变应性鼻炎;组织重塑;白细胞介素-4

中图分类号:Q95-3;R765.21 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)22-4210-05

Observation on the Nasal Mucosa Remodeling in Mouse Model of Allergic Rhinitis*

WEN Li-ting¹, CHEN Fu-quan¹, WANG Jie², WANG Ye¹, SHI Zhao-hui¹, LI Xiao-yuan¹, LIU Ying-xiang², QIU Jian-hua^{1△}

(1 Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China; 2 Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Xian children's hospital, Xi'an, Shaanxi, 710003, China;

3 Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Leting Weixie hospital, Tangshan, Hebei, 063600, China)

ABSTRACT Objective: To observe the nasal tissue remodeling in a mouse model of allergic rhinitis. **Methods:** Twenty BALB/c mice were randomly divided into the allergic rhinitis group and control group. Ovalbumin (OVA) was used to establish the mouse allergic rhinitis model. Hematoxylin-eosin (HE) staining, Giemsa staining and Alcianblue-periodicacid-Schiff staining were carried out to observe the tissue remodeling, eosinophils and goblet cells, respectively. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the serum interleukin 4 (IL-4) level. **Results:** The mouse allergic rhinitis model was successfully established, the score of biological behaviour was (6.5 ± 1.3) . Structural remodeling occurred in nasal mucosa of allergic rhinitis group. Compared with the control group, there were obviously cell desquamation, necrosis, squamous metaplasia and goblet cell hyperplasia in epithelial layer. In the lamina propria and submucosa, glandular hyperplasia, vasodilatation, edema and characteristic eosinophils infiltration were also found in the allergic rhinitis group. The eosinophils and goblet cell counts were 26.4 ± 5.72 and 24.14 ± 3.12 in allergic rhinitis group respectively, which were 8.31 ± 2.42 and 9.41 ± 1.22 in the control group respectively ($P < 0.05$). The serum IL-4 level was (18.9 ± 3.1) pg/ml in allergic rhinitis group and (8.3 ± 1.4) pg/ml in control group, which was significantly higher in allergic rhinitis group than that of the control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Structural remodeling occurred in the nasal mucosa of allergic rhinitis mouse induced by OVA.

Key words: Allergic rhinitis; Tissue remodeling; IL-4

Chinese Library Classification: R765.21 **Documents Code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)22-4210-05

前言

变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)又称过敏性鼻炎,是特异性个体接触变应原后由免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)E介导

的2型辅助性T细胞(type 2 helper T cell, Th2)免疫反应为主的鼻黏膜局部变态反应性疾病,表现为鼻痒、打喷嚏、流清涕和鼻塞等临床症状,常并发哮喘,严重影响患者的生活质量。AR的患病率呈逐年上升趋势,仅次于高血压,目前全球用于AR治

* 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(81200731);陕西省科学技术研究发展计划项目(2013K12-12-02)

作者简介:温立婷(1981-),女,本科,主治医师,主要研究方向:变态反应性鼻炎,电话:029-84775385, E-mail: belong_young@139.com

△ 通讯作者:邱建华, E-mail: qiujh@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2014-02-16 接受日期:2014-03-12)

疗的费用每年都在递增,最近 20 年的医疗费用已经超过肺结核与艾滋病的总和,造成沉重的社会经济负担,是一个全球性的健康问题^[1]。AR 已经成为全球多实验室研究的重点。本研究拟建立 AR 小鼠模型,运用多种染色方法系统地观察变应性鼻炎小鼠鼻腔黏膜的重塑情况,观察代表性炎症细胞——嗜酸性粒细胞、杯状细胞的变化以及血清中 Th2 反应的代表因子 IL-4 水平的变化,旨在为进一步研究变态反应提供可靠稳定的 AR 模型。

1 材料和方法

1.1 动物及试剂

1.1.1 实验动物 20 只雌性 BALB/c 小鼠,4 周龄,SPF 级(Specific pathogen free),由第四军医大学实验动物中心提供,随机分成致敏组 and 对照组(10 只/组)。

1.1.2 主要试剂 Albumin Egg 购于 Sigma 公司,货号 #A5253;小鼠 IL-4 ELISA 试剂盒购于上海西唐生物科技有限公司。

1.2 变应性鼻炎动物模型的建立

1.2.1 基础致敏 致敏组小鼠使用 20 μ g OVA+2 mg AL(OH)₃ 加入 0.5 mL 0.01 % PBS 混悬,于造模第 1、3、6、8 天腹腔注射混悬液 0.5 mL。对照组小鼠使用 2 mg AL (OH)₃ 加入 0.5 mL 0.01 % PBS 混悬,于造模第 1、3、6、8 天腹腔注射混悬液 0.5 mL。

1.2.2 激发阶段 致敏组小鼠使用 0.01 %PBS 配制终浓度为 10 %的 OVA 混悬液 20 μ L,于造模第 15-24 天连续滴鼻。对照组小鼠使用 0.01 % PBS 溶液 20 μ L,于造模第 15-24 天连续滴鼻。

1.3 项目观察

1.3.1 生物学行为评分标准 记分标准:1 分:喷嚏 1-3 个,清涕流至前鼻孔,单前肢偶有挠鼻。2 分:喷嚏 4-10 个,清涕超过前鼻孔,双前肢挠鼻。3 分:喷嚏 10 个以上,清涕流至面部,不停到处擦鼻。末次激发后,每只动物观察 30 分钟,3 个症状叠加

量化记分,总分超过 5 分表明造模成功。

1.3.2 组织学观察 小鼠末次激发 24 小时后,麻醉后脱颈处死,去除鼻部附着肌肉组织,取骨性鼻腔整体甲醛溶液内固定,脱钙后石蜡包埋,常规切片,厚度 4 μ m。

采用苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色观察鼻黏膜的整体炎症变化和结构重塑;吉姆萨(Giemsa)染色观察嗜酸性粒细胞并进行计数^[2,3];阿辛蓝-过碘酸-希夫(Alcian blue-periodic acid-Schiff, AB-PAS)染色^[4]观察杯状细胞并进行计数杯状细胞数。

小鼠末次激发 24 小时后,麻醉后眼球采血,静置 60 分钟后 4 $^{\circ}$ C 离心,留存血清,-70 $^{\circ}$ C 冰箱保存。实验步骤参照试剂盒说明书进行,所有样品均采用双复孔检测,计算均值。

1.4 统计学分析

计数结果以均数 $\pm$ 标准差表示($\bar{x} \pm s$),应用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组小鼠的生物学评分比较

致敏组动物频繁挠鼻、喷嚏及水样涕多,评分都大于 5 分,平均评分为 (6.5 $\pm$ 1.3),提示造模成功。对照组平均评分为 (2.0 $\pm$ 1.2),未能造模成功。两组的生物学评分比较有统计学差异($P < 0.05$)。

2.2 两组小鼠的鼻黏膜结构和形态比较

2.2.1 HE 染色 致敏组小鼠鼻黏膜上皮细胞脱落、杯状细胞增生,基底膜增厚、黏膜下小血管扩张,固有层内可见特征性的 EOS 浸润(图 A)。对照组小鼠鼻黏膜结构完整,上皮细胞排列均匀,基底膜无明显水肿和血管充血,仅见少量炎症细胞浸润(图 B)。

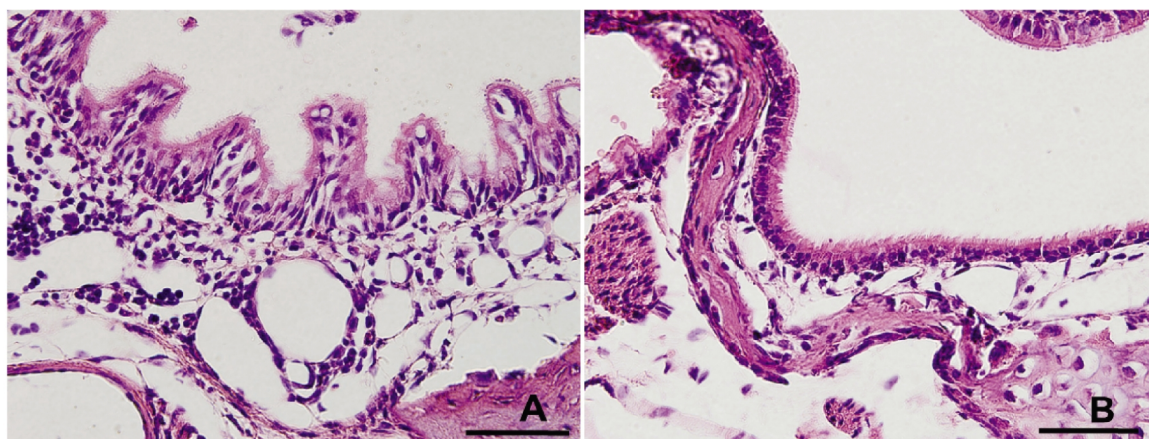


图 A 致敏组见纤毛脱落,组织水肿,小血管增生,固有层内 EOS 浸润,淋巴细胞浸润(60 $\times$ Bar=50 μ m)

Fig. A Cilia fall off, tissue edema, small blood vessels, eosinophil in lamina propria infiltration, lymphocyte infiltration were found in the allergic rhinitis group(60 $\times$ Bar=50 μ m)

图 B 对照组见纤毛排列整齐,无脱落缺失现象,固有层未见明显 EOS 浸润(60 $\times$ Bar=50 μ m)

Fig. B Neat cilia was found in the control group, no missing falls off phenomenon, obvious eosinophil infiltration in lamina propria were found(60 $\times$ Bar=50 μ m)

2.2.2 嗜酸性粒细胞计数 两组鼻黏膜内 EOS 计数分别为 对照组($P<0.05$)。
 26.4 ± 5.72 、 8.31 ± 2.42 , 致敏组小鼠鼻黏膜 EOS 浸润显著高于

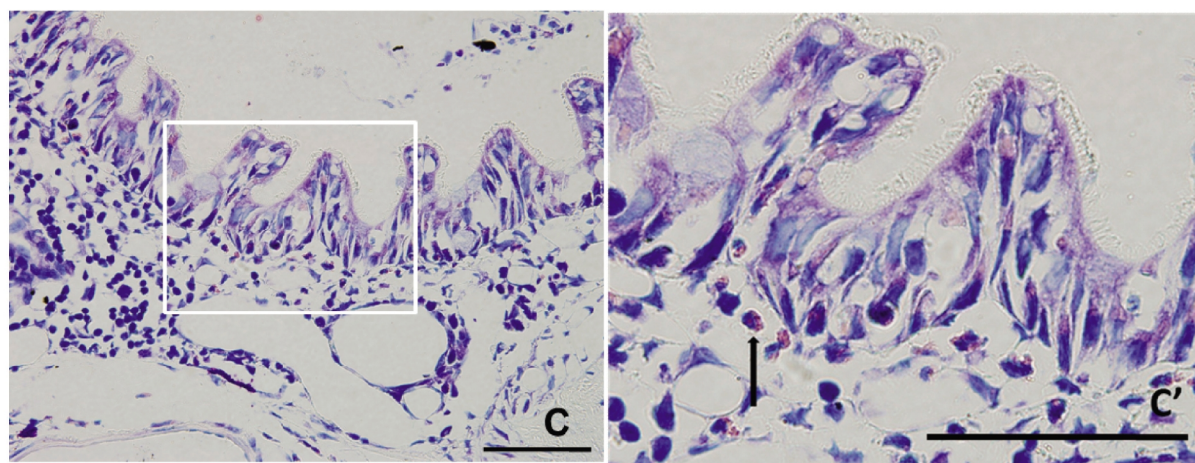


图 C C' 致敏组黏膜固有层内大量 EOS 浸润($60\times$, Bar= $50\mu\text{m}$)

Fig. C C' A large amount of EOS infiltration was found in the mucosa lamina propria of allergic rhinitis group($60\times$, Bar= $50\mu\text{m}$)

2.2.3 杯状细胞计数 两组鼻黏膜内杯状细胞计数分别为 (P<0.05)。
 24.14 ± 3.12 、 9.41 ± 1.22 , 致敏组杯状细胞数量显著多于对照组

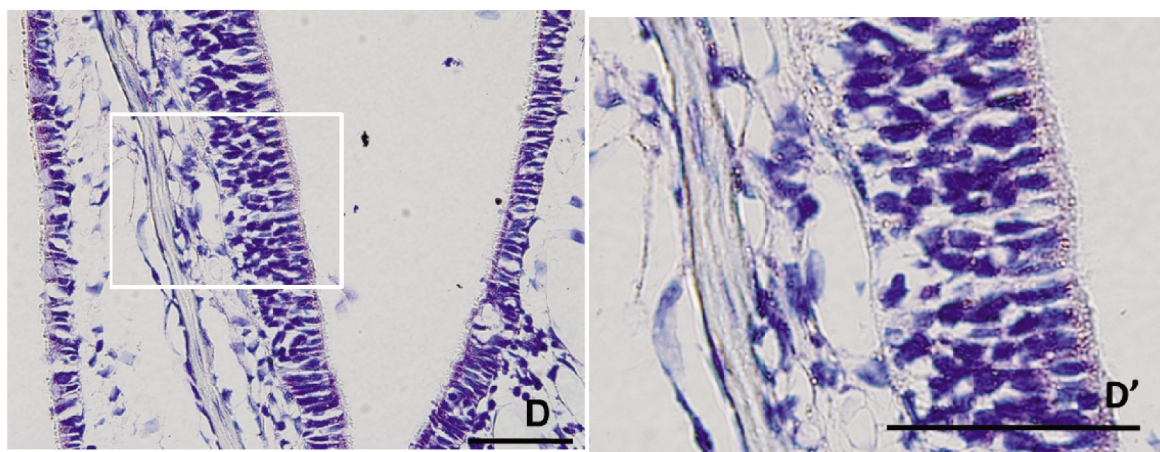


图 D D' 对照组组织黏膜结构完整, 少见或未见 EOS 浸润($60\times$, Bar= $50\mu\text{m}$)

Fig. D D' Few or no EOS infiltration was found in the control group, the mucous structure was completed ($60\times$, Bar= $50\mu\text{m}$)

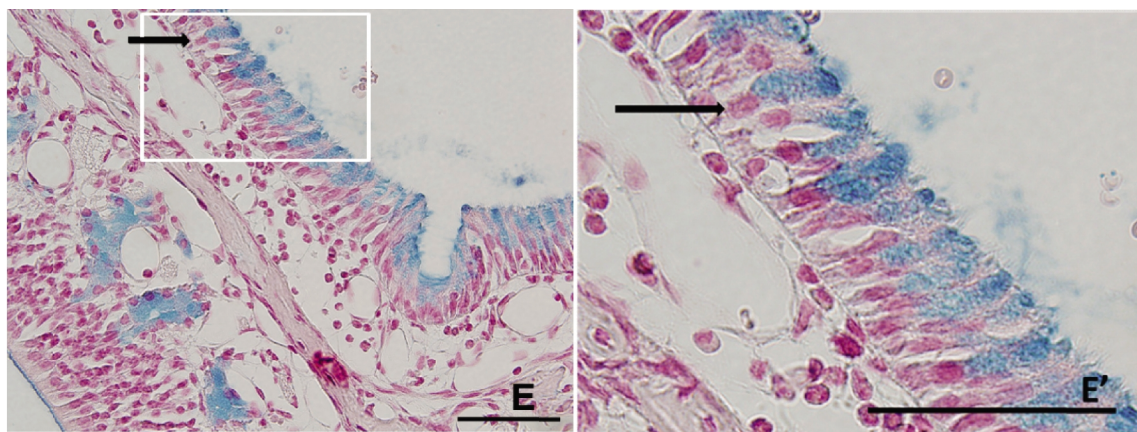


图 E E' 致敏组黏膜大量杯状细胞, 体积增大, 黏液丰富($60\times$, Bar= $50\mu\text{m}$)

Fig E E' A large number of goblet cells with increased volume, and abundant mucus were found in the allergic rhinitis group($60\times$, Bar= $50\mu\text{m}$)

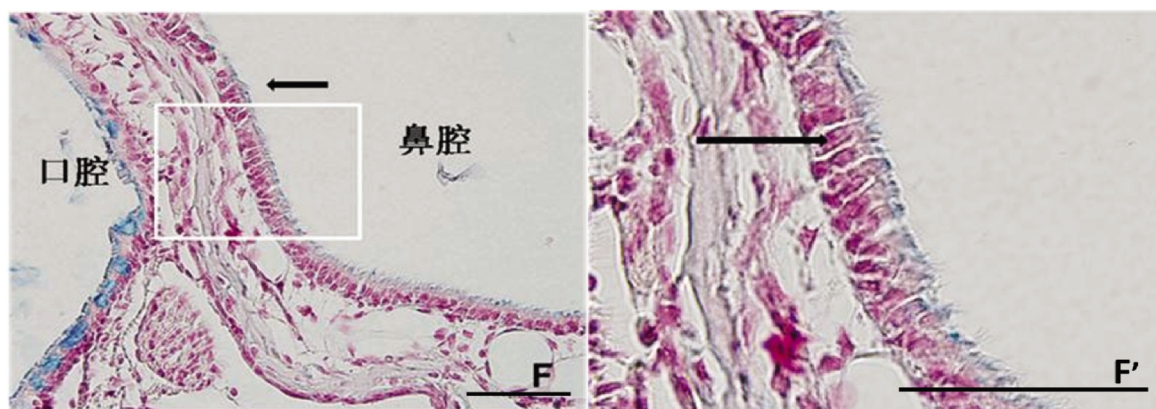


图 F F' 对照组组织黏膜结构完整,杯状细胞体积小(60×, Bar=50μm)

Fig. F F' Integrated mucous membrane structure, small goblet cells were found in the control group(60×, Bar=50μm)

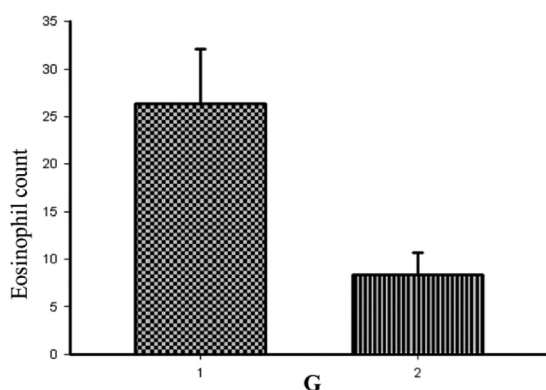


图 G 致敏组和对照组 EOS 浸润数量的比较(P<0.05)

Fig. G Comparison of the EOS infiltration quantity between the control group and allergic rhinitis group(P<0.05)

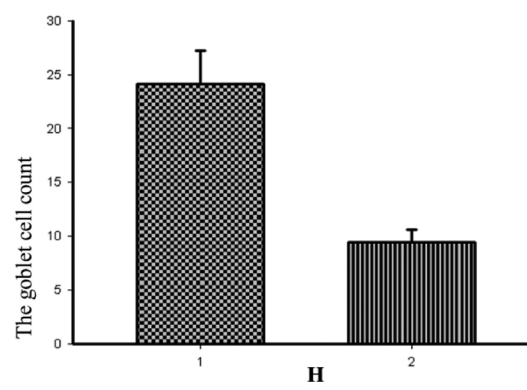


图 H 致敏组和对照组杯状细胞数量的比较(P<0.05)

Fig. H Comparison of the goblet cell number between the control group and allergic rhinitis group(P<0.05)

2.3 两组血清 IL-4 水平的比较

致敏组和对照组血浆 IL-4 含量分别为(18.9±3.1)pg/ml 和 (8.3±1.4)pg/ml,致敏组明显高于对照组(P<0.05)。

3 讨论

变应性鼻炎又称过敏性鼻炎(AR),其发病与个体、遗传和环境等多方面因素有关,机制尚未完全明确^[5,7]。研究认为变态反应的发生包括两个阶段:①诱导阶段:变应原进入体内,由树突状细胞捕获呈递抗原给 T 细胞,T 淋巴细胞激活,B 淋巴细胞激活,特异性 IgE 分泌增加,与肥大细胞表面 FcεRI 特异性结合;②效应阶段:变应原再次进入特异性个体并与肥大细胞表面的 IgE 结合,肥大细胞脱颗粒,病理过程被启动,产生一系列临床症状^[8]。发病过程涉及多个免疫环节,故病理生理学机制至今尚未完全明确。

稳定的过敏性鼻炎动物模型应包含以下特点:①相似性:使用的动物应尽可能接近人类变应性鼻炎;②重复性:可重复,应是可标准化的;③可靠性:动物模型应真实可靠稳定的再现过敏性鼻炎的特点,并通过一系列检测得以证明;④适用性和可控性:模型的选择需考虑到日后临床应用的可能及便于控制疾病的发展;⑤易行性和经济性:动物模型的复制,应尽量做到方法容易执行和经济实惠。目前,尚没有统一及标准化制备过敏性鼻炎模型的方法,造模所使用的动物、方法、致敏原等也不完全相同,但造模的共同原则都是努力符合以上 5 点。豚鼠是

最早被用来建立 AR 模型的动物,也已成功建立了相应的豚鼠模型,但目前对于豚鼠的基因,免疫系统的信息所知相对较少,因而不是研究变态反应免疫机制的理想动物^[9,10]。目前,可以成功复制 AR 动物模型的变应原很多,如豚草花粉、二异氰酸酯、卵清白蛋白(OVA)等^[11]。OVA 因刺激性较小,更广泛应用于 AR 各方面的研究。目前,采用 OVA 制备的 AR 模型已被国内外学者广泛采用,是一种相当成熟的造模方法。

本实验选取 4 周 BALB/C 小鼠,选用 OVA 行基础致敏及鼻内激发两个阶段,建立 AR 小鼠模型。造模结束后的行为学评分,鼻粘膜组织形态学观察,嗜酸性粒细胞、杯状细胞计数结果均提示 AR 模型造模成功,其血清中 TH2 反应的代表因子白细胞介素 4(IL-4)水平进一步证实 AR 模型建立成功。AR 的发生涉及多种细胞因子及炎性细胞的改变^[12,13],单一的染色方法往往难以充分展示鼻腔黏膜的重塑情况。本实验通过 3 种不同的染色方法观察 AR 模型小鼠的鼻腔黏膜情况^[14],希望能够丰富变态反应发生后形态学研究的思路和方法。

AR 是鼻腔黏膜 TH2 免疫反应占优势的变应性炎症反应,与 Th1/Th2 之间平衡被打破^[15,16],Th0 向 Th2 方向分化偏移有着密切的关系。Th0 细胞向 Th2 方向分化偏移,使 Th2 淋巴细胞产生过多并释放其特征性细胞因子,如 IL-4、IL-5、IL-13 等,从而引起嗜酸性粒细胞^[17]、肥大细胞等炎性细胞聚集和浸润,血清 IgE 合成增加^[18],进而促进 AR 的发生。HE 染色是组织学、胚胎学、病理学教学与科研中最基本、使用最广泛的技术方法,

本研究应用 HE 染色观察 AR 模型鼻黏膜的重塑情况,发现致敏组小鼠的鼻黏膜上皮细胞脱落、杯状细胞增生,基底膜增厚,黏膜下间质水肿,小血管扩张,固有层内可见特征性的嗜酸性粒细胞浸润。按 Ponikau(2003)分级法将上皮细胞状态分 4 级(0 级:纤毛上皮无损伤,纤毛完整;1 级:纤毛缺失,无上皮细胞剥脱;2 级:上皮细胞剥脱,但未至基底膜;3 级:上皮细胞全部剥脱,基底膜暴露)^[19],本研究中致敏组鼻黏膜上皮细胞呈现 2 级、3 级改变。选用吉姆萨法观察嗜酸性粒细胞是考虑到其对细胞核着色较好,EOS 核大,呈分叶,两叶居多,其出现与鼻黏膜炎症的病理改变密切相关,释放的多种细胞因子可以进一步使组织损伤及纤维化^[20],致敏组黏膜固有层内可见大量 EOS 浸润,可进一步加重黏膜重塑。杯状细胞是典型的黏蛋白分泌细胞,正常情况下分泌黏液,保护上皮组织。黏膜上皮杯状细胞增生是 AR 黏膜改变的一个重要特征,阿辛蓝染液是显示酸性粘液物质的特征性染料,我们利用不同 pH 值的阿辛蓝染液可区分不同化学组成的酸性粘液物质,本研究采用 AB-PAS 法反映了致敏组鼻腔黏膜上皮杯状细胞的化生情况,可见大量杯状细胞浸润,体积增大,黏液丰富。

综上所述,本实验选取 4 周 BALB/C 小鼠,采用 OVA 致敏激发成功建立了 AR 小鼠模型;通过 HE 染色、吉姆萨染色、阿辛蓝-过碘酸-希夫染色对鼻腔黏膜进行形态学观察,特征性地反映了鼻腔黏膜的重塑情况及嗜酸性粒细胞、杯状细胞等特征性炎性细胞的变化迁徙,对形态学的研究有一定的指导意义。

参考文献(References)

- [1] Brozek JL, Bousquet J, Baena-Cagnani CE, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines[J]. J Allergy Clin Immunol, 2010,126(3):466-476
- [2] 余文煜,董震.实验性变应性鼻炎鼻黏膜组织重塑的特点[J].中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2006,41(1):48-53
She Wen-yu, Dong Zhen. Nasal mucosa remodeling in guinea pig model of allergic rhinitis [J]. Chinese Journal of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, 2006,41(1):48-53
- [3] 余文煜,董震.普尔司特对实验性变应性鼻炎鼻黏膜组织重塑的影响[J].中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2006,41(7):483-487
She Wen-yu, Dong Zhen. Effect of Pranlukast on tissue remodeling in experimental guinea pig allergic rhinitis model [J]. Chinese Journal of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, 2006,41(7):483-487
- [4] 王莹,王华英,谢强敏,等.哮喘小鼠气道上皮杯状细胞增生模型[J].中国药理学通报,2006,22(2):251-253
Wang Ying, Wang Hua-ying, Xie Qiang-min, et al. A novel model of goblet cell hyperplasia on airway epithelium in asthmatic mouse[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2006,22(2):251-253
- [5] Ziegler S F. The role of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) in allergic disorders [J]. Curr Opin Allergy Clin Immunol,2010, 22(7): 795-799
- [6] Y L, Li H J, Ji F, et al. Thymic stromal lymphopoietin promotes lung inflammation through activation of dendritic cells [J]. J Asthma, 2010,47(2):117-123
- [7] Harada M, Hirota T, Jodo A I, et al. Thymic stromal lymphopoietin gene promoter polymorphisms are associated with susceptibility to bronchial asthma[J]. Am J Respir Cell Mol Biol,2011,44(6):787-793
- [8] Holt PG, Macaubas C, Stumbles PA, et al. The role of allergy in the development of asthma[J]. Nature, 1999, 402(6760 Suppl):B12-7
- [9] 赵宇,C.Andrew vanHasselt,吴港生,等.卵白蛋白经鼻致敏建立变应性鼻炎动物模型 [J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2005,40 (3): 176-180
Zhao Yu, C.Andrew vanHasselt, Wu Gang-sheng, et al. Establishment of a modified in tranasally ovalbumin induced animal model of allergic rhinitis[J]. Chinese Journal of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, 2005,40 (3):176-180
- [10] Kularl, Pakradouni J, Kitabgip, et al. The CCN family:a new class of inflammation modulators[J]. Biochimie, 2011,93(3) :377-388
- [11] 杨瑞嘉,黄志纯.变应性鼻炎动物模型的建立及评价[J].国际耳鼻咽喉头颈外科杂志,2007,31(2): 87-89
Yang Rui-jia, Huang Zhi-chun. The establishment of animal model of allergic rhinitis and evaluation[J]. International Journal of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, 2007,31(2): 87-89
- [12] 任卉,崔丽英. IL-4 和 IL-8 与支气管哮喘及慢性阻塞性肺疾病的相关性研究[J].内蒙古医学院学报,2011,33(4):168-172
Ren Hui, Cui Li-ying. The progression of the correlation of IL-4 and IL-8 with bronchial asthma and COPD [J]. Journal of Inner Mongolia Medical College, 2011,33(4):168-172
- [13] 林志斌,李添应,陈东.白介素细胞因子在变应性鼻炎的作用机理 [J].当代医学,2010,16(24):15-16
Lin Zhi-bin, Li Tian-ying, Chen Dong. The mechanism of the interleukin cytokines in allergic rhinitis [J]. Contemporary Medicine, 2010,16(24):15-16
- [14] 郑铭,王妍,周兵,等. RNAi 阻断 GATA-3 表达治疗小鼠过敏性鼻炎的实验研究[J]. 军事医学,2011,35(12):896-901
Zheng Ming, Wang Yan, Zhou Bing, et al. Suppression of GATA-3 expression by RNAi in treatment of murine allergic rhinitis [J]. Journal of Navy Medicine, 2011,35(12):896-901
- [15] Ito T, Wang Y H, Duramado, et al. TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand[J]. J Exp Med, 2005,202(9):1213-1223
- [16] 徐志鸿,杨成章.Th1/Th2 失衡与变应性鼻炎[J].临床耳鼻咽喉科杂志,2004, 18(8): 510-512
Xu Zhi-hong, Yang Cheng-zhang. Th1 / Th2 imbalance with allergic rhinitis [J]. Journal of Clinical Otorhinolaryngology,2004, 18 (8): 510-512
- [17] Ponikau JU, Sherris DA, Kephart GM, et al. Features of airway remodeling and eosinophilic inflammation in chronic rhinosinusitis: is the histopathology similar to asthma [J]. J Allergy ClinImmunol, 2003, 112(5): 877-8821
- [18] Palomares O, Yaman G, Azkur AK, et al. Role of Treg in immune regulation of allergic diseases [J]. Eur J Immunol, 2010,40(5):1232-1240
- [19] Matsuoka H, Niimi A, Matsumoto H, et al. Inflammatory subtypes in cough-variant asthma: association with maintenance doses of inhaled corticosteroids[J]. Chest, 2010,138(6) :1418-1425
- [20] Haldar P, Brightling C E, Hargadon B, et al. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma [J]. N Engl J Med, 2009,360(10): 973-984