

镇静小鼠的非侵入式气道反应性测定法及药物作用*

陆智勇 张纬萍 吕可真 蒋欣欣 朱朝阳 康 桦 魏尔清(杭州 310031 浙江大学湖滨校区药理教研室, 神经生物学实验室)

摘要 目的:建立并验证镇静小鼠气道反应性的非侵入式测定法,探讨小鼠气道高反应性与气道炎症的关系。方法:观察致敏及药物对小鼠引喘阈浓度的影响,及支气管-肺泡灌洗液(BALF)中白细胞渗出量的变化。结果:与未致敏小鼠相比,致敏小鼠吸入 OA 6h 的 MCh 引喘阈浓度显著降低,BALF 中白细胞渗出量显著增高,地塞米松(7.5 mg/kg)和氨茶碱(37.5 mg/kg)可降低致敏小鼠吸入 OA 引起的气道反应性增高和 BALF 中白细胞渗出的增加。结论:本模型可有效地检测小鼠气道反应性,抗原引起的小鼠气道高反应性与气道炎症有关。

关键词 气道反应性;乙酰甲胆碱;氨甲酰胆碱;地西洋;小鼠

A new non-invasive method for the measurement of airway responsiveness in sedated mice and effects of drugs

Lu Zhiyong(Lu ZY), Zhang Weiping(Zhang WP), Lü Kezhen(Lü KZ), et al(Department of Pharmacology and Laboratory of Neurobiology, Hubin School of Zhejiang University, Hangzhou 310031)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To establish and verify a non-invasive method for quantitative measurement of airway responsiveness(AR) in diazepam-sedated mice, and to investigate the relationship between airway hyperresponsiveness and airway inflammation in mice. **METHOD:** The effects of sensitization and drugs on the wheezing threshold concentration to methacholine(MCh), and the changes of the number of leukocytes in bronchoalveolar lavage fluid(BALF) in mice were observed. **RESULTS:** Lower wheezing threshold concentration to methacholine and more leukocytes in BALF were found in ovalbumin(OA)-sensitized mice than those in non-sensitized mice respectively after repeated antigen inhalation(0.5%, 20 min per day, for 6 days). Dexamethasone(7.5 mg/kg, ip, bid, for 3 days) and aminophylline(37.5 mg/kg, ip, bid, for 3 days) inhibited these effects induced by antigen. **CONCLUSION:** This mouse method is useful to detect the changes in AR of mice, and there was a relationship between the airway hyperresponsiveness and airway inflammation induced by antigen in the sensitized mice.

KEY WORDS airway responsiveness(AR), methacholine(MCh), carbachol(CCh), diazepam, mouse

气道反应性(airway responsiveness)增高是哮喘的重要特征,以往研究气道反应性多在豚鼠和大鼠上进行。近年来,小鼠模型受到了重视,因为小鼠具有品系纯、繁殖快、价廉易得等优点;与人过敏性哮喘相似,小鼠哮喘模型(以卵白蛋白致敏)过敏性反应的抗体主要是 IgE^[1,2],而豚鼠则由 IgG 抗体介导;且小鼠的免疫研究知识和手段远较豚鼠和大鼠丰富;此外用于小鼠的分子生物学技术较成熟,已获得多种转基因和基因敲除小鼠,因此,小鼠模型在哮喘研究中将占越来越重要的地位。但目前对小鼠气道反应性的测定多采用离体

气道平滑肌标本或麻醉气管插管法^[3,4],前者不能反映整体情况;后者需进行开胸手术,操作复杂,且麻醉条件可使小鼠的肺活量降低、呼吸频率减慢,人工正压通气还会影响气道反应性测定的准确性。本实验室在以往镇静大鼠气道反应性测定法基础上^[5],建立了测定镇静小鼠气道反应性的非侵入式方法。

1 材料和方法

1.1 实验动物 NIH 小鼠(18~22g),♂♀各半(浙江

* 本研究得到国家自然科学基金(No. 39770865)资助

大学湖滨校区实验动物中心)。

1.2 药品和试剂 卵白蛋白(OA, Grade V)、氯化乙酰甲胆碱(methacholine chloride, MCh)、氨甲酰胆碱(carbachol, CCh)均为美国Sigma公司产品;其它药物均为市售品。

1.3 动物哮喘模型 参考施焕中等的方法^[6],将OA 10 μ g和氢氧化铝凝胶10mg溶于0.5ml的生理盐水溶液,在小鼠的双足跖、腹股沟、腰共6点皮下各注射0.05ml,同时颈后皮下注射0.1ml,ip 0.1ml进行致敏,2周后同法再注射1次,第2次注射后2周对小鼠以0.5% OA(溶于生理盐水)雾化吸入攻击,每次20min,1次/d,共6d。对照组小鼠以20%的氢氧化铝凝胶同法注射,并同法吸入生理盐雾气雾剂。

1.4 气道反应性的测定 小鼠ip地西洋20mg/kg或乌拉坦1g/kg使之镇静或麻醉后,置于密闭的自制圆柱形体积描记器(直径3cm,长11cm,体积77.7cm³)内,通过压力换能器(MPX 10DP,美国Motorola公司)与平衡记录仪相连,实验时吸入溶液(MCh或CCh)由超声雾化器(402型,上海合力医疗器械厂)雾化,经雾化盒(10 \times 10 \times 10cm)充分混匀后进入体积描记器内,描记器内雾化浓度为0.1066L/m³,根据该参数计算雾化药物浓度(图1)。

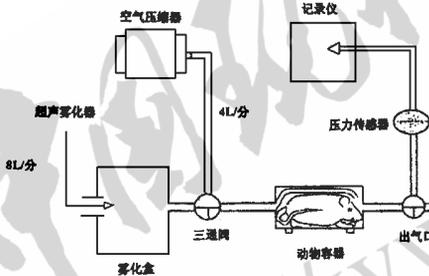


图1 镇静小鼠气道反应性测定系统的示意图

测定呼吸变化时,暂时封闭通气管,记录3min内呼吸变化,测量间期以4L/min气流保持通气。呼吸容量变化以下法定标,将小鼠呼吸抑制后置于体积描记器内,注入不同量的空气,记录描记笔的幅度,得到容量变化(ΔV , μ l)与幅度(X , mm)的线性方程: $\Delta V = -3.2167 + 2.0287 X$, $n = 20$, $r = 0.98$, $P < 0.001$ 。

1.5 麻醉和镇静状态及药物对基础呼吸频率及幅度的作用 小鼠ip地西洋20mg/kg或乌拉坦1g/kg,置于体积描记器内,稳定30min后,测定给药后30、60和90min时小鼠的基础呼吸频率及幅度。

测定镇静小鼠的基础呼吸频率及幅度后,ip地塞米松(7.5mg/kg)、氨茶碱(62.5mg/kg)或生理盐水,1h后测定基础呼吸频率及幅度,比较给药前后的呼吸变

化。

1.6 致敏及未致敏镇静小鼠MCh和CCh的气道反应性 致敏及未致敏小鼠分别以OA和生理盐水攻击6d,最后一次攻击后6h每隔30~40min吸入浓度从低到高的MCh($0.85 \sim 13.6 \times 10^{-4}$ mol/m³)或CCh($10^{-5} \sim 10^{-1}$ mol/m³),观察吸入后3min内呼吸变化。部分小鼠吸入 6.82×10^{-4} mol/m³的MCh、 0.85×10^{-4} mol/m³的CCh或生理盐水,观察20min内的呼吸变化。

1.7 药物对致敏镇静小鼠气道反应性的作用 致敏小鼠0.5% OA攻击6d后,测定气道反应性,然后分别ip生理盐水、地塞米松(7.5mg/kg)、氨茶碱(37.5mg/kg)和62.5mg/kg, bid \times 3,第3天先吸入0.5% OA攻击小鼠20min,吸入后5h给药,6h测定气道反应性,比较给药前后气道反应性的变化。

1.8 OA攻击及药物对小鼠气道炎症的作用 致敏和未致敏小鼠分别以OA和生理盐水攻击6d,最后一次攻击后6h处死,用Krebs液2ml分两次作支气管-肺泡灌洗,回收液进行白细胞计数并比较。致敏小鼠的给药方式同上,OA攻击后6h处死,对支气管-肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)进行白细胞计数并比较。

2 结果

2.1 麻醉和镇静状态对小鼠呼吸频率及幅度的影响

小鼠(16只)ip地西洋后频率为 204 ± 46 ,而ip乌拉坦(15只)后频率为 163 ± 45 ($P < 0.05$,与ip地西洋小鼠比较, t -检验),两组的幅度则无明显差异。

2.2 致敏及未致敏镇静小鼠MCh和CCh气道反应性

随着MCh及CCh的浓度逐渐增加,主要表现为浓度依赖性的频率加快,个别小鼠可出现幅度增加和变异波形(呼吸暂停或呼/吸比改变)(图2),参考Kips等^[7]的方法及本实验室以前所建立的豚鼠和大鼠气道反应性测定法^[5,8],以呼吸频率增加30%、呼吸幅度增加50%或出现变异波形作为喘息的指标,引起这些变化的最低浓度作为引喘阈浓度,其负对数($-\log$ mol/m³)用来表示气道反应性。致敏小鼠的MCh及CCh的气道反应性明显高于未致敏小鼠,表现为引喘阈浓度明显降低,其负对数值明显增高(表1);当激发剂浓度增加,致敏组的喘息发生率明显高于未致敏组(图3),两组效应均与吸入浓度有依赖关系,致敏小鼠MCh及CCh的EC₅₀(引起半数动物喘息所需浓度)分别为1.74和 1.02×10^{-4} mol/m³,未致敏小鼠则分别为3.72和 1.0×10^{-4} mol/m³。

OA攻击的致敏小鼠吸入生理盐水4min后,出现频率显著下降,直至15min后回复,而吸入 6.82×10^{-4}

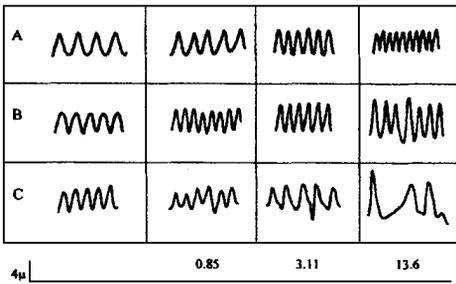


图2 小鼠吸入浓度从低到高的 MCh 气雾出现的三种呼吸事件

A - 呼吸频率增加; B - 呼吸幅度增加; C - 异常呼吸波形

表1 未致敏(生理盐水攻击)和致敏小鼠(OA 攻击) MCh 和 CCh 的引喘阈浓度($-\log \text{ mol/m}^3$) [$\bar{x} \pm s (n)$]

	未致敏组	致敏组
MCh	$3.38 \pm 0.50(15)$	$3.87 \pm 0.45(30)^{*1}$
CCh	$3.32 \pm 0.32(15)$	$4.03 \pm 0.59(27)^{*2}$

注: $^{*1} P < 0.01, ^{*2} P < 0.001$, 与未致敏组比较, t -检验

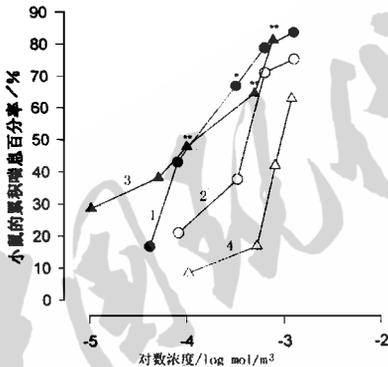


图3 MCh 和 CCh 气雾引起致敏(OA 攻击)和未致敏小鼠(生理盐水攻击)喘息反应的浓度-效应关系

1 - 致敏 + MCh ($n = 42$); 2 - 未致敏 + MCh ($n = 24$); 3 - 致敏 + CCh ($n = 42$); 4 - 未致敏 + CCh ($n = 24$); $^{*} P < 0.05, ^{**} P < 0.01$, 分别与未致敏组比较, t -检验

mol/m^3 MCh 在 60s 内的频率有显著增加, 5min 内显著高于生理盐水吸入组; 未致敏小鼠以生理盐水攻击后, 吸入同样浓度的 MCh 和生理盐水后 20min 内频率未见明显变化(图 4)。致敏小鼠(OA 攻击)吸入 $0.85 \times 10^{-4} \text{ mol/m}^3$ CCh 后在 90s 内频率增加(结果未列出)。各组幅度增加均不显著。

2.3 药物对致敏镇静小鼠气道反应性的影响 地塞米松(7.5mg/kg)及氨茶碱(62.5mg/kg)对镇静小鼠(致敏和未致敏)的基础呼吸频率及幅度无明显影响(结果未列出); 地塞米松(7.5mg/kg)和氨茶碱(37.5mg/kg)能显著降低致敏小鼠对 MCh 的气道反应性, 高剂量的

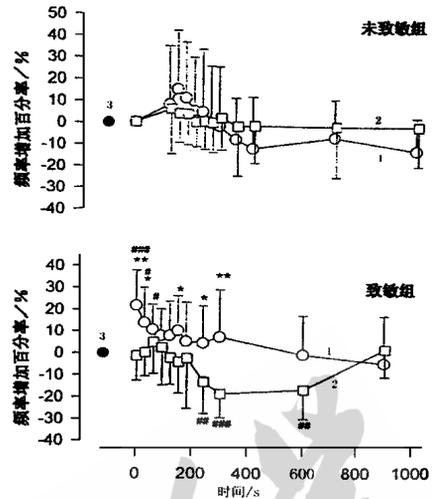


图4 未致敏小鼠(生理盐水攻击)和致敏小鼠(OA 攻击)吸入 MCh ($6.82 \times 10^{-4} \text{ mol/m}^3$) 和生理盐水后呼吸频率的时效关系

每组动物数均为 10 只。1 - 吸入 MCh; 2 - 吸入生理盐水; 3 - 吸入前的基础值; $^{*} P < 0.05, ^{**} P < 0.01, ^{***} P < 0.001$, 与吸入生理盐水组比较; $^{\#} P < 0.05, ^{\#\#} P < 0.01, ^{\#\#\#} P < 0.001$, 与吸入前比较, t -检验

氨茶碱(62.5mg/kg)对致敏小鼠的 MCh 气道反应性无显著影响(表 2)。

表2 药物对致敏小鼠(OA 攻击) MCh 引喘阈浓度($-\log \text{ mol/m}^3$)的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	n	用药前	用药后
对照组		8	3.27 ± 0.34	3.40 ± 0.43
地塞米松	7.5	6	3.40 ± 0.36	$3.16 \pm 0.27^{*}$
氨茶碱	37.5	6	3.36 ± 0.41	$2.94 \pm 0.09^{*}$
氨茶碱	62.5	6	3.49 ± 0.34	3.13 ± 0.41

注: $^{*} P < 0.05$, 与用药前比较, 配对 t -检验

2.4 药物对 OA 攻击后致敏小鼠 BALF 白细胞总数的影响 未致敏小鼠和致敏小鼠分别以生理盐水和 OA 攻击后 6h BALF 中白细胞数目分别为 $0.58 \pm 0.23 \times 10^6$ 个/ml 和 $1.45 \pm 0.50 \times 10^6$ 个/ml ($P < 0.001$); 地塞米松 氨茶碱均能显著抑制 OA 攻击后致敏小鼠 BALF 白细胞渗出的增加(表 3)。

3 讨论

清醒小鼠由于自发活动多, 不能保证呼吸功能稳定的检测; 地西洋和乌拉坦均能抑制小鼠的自发活动, 本实验显示, 注射地西洋的镇静小鼠翻正反射存在, 对外界刺激有反应, 乌拉坦则明显抑制小鼠的自主呼吸, 表明地西洋对呼吸的抑制轻, 能较好地反映呼吸功能状况, 也能保证小鼠呼吸功能稳定的检测, 这也与大鼠

表3 药物对致敏小鼠 OA 攻击后 6 h BALF 中白细胞计数的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	n	(10 ⁶ cells/ml)
对照组		15	3.78 ± 0.72
地塞米松	7.5	6	2.46 ± 0.46*
氨茶碱	37.5	7	2.46 ± 0.52*
氨茶碱	62.5	13	1.48 ± 0.84*

注: * P < 0.05, 与对照组比较, ONE WAY-ANOVA

气道反应性测定条件一致^[5]。

OA 攻击的致敏小鼠吸入生理盐水后 4 min 出现呼吸频率显著下降, 这种呼吸波动机制不明, 有待于进一步研究, 吸入激发剂后均在 2 min 内呼吸发生显著变化, 故本实验观察的时限为吸入激发剂 3 min, 既能有效反映激发剂引起的呼吸变化, 又可避免 3 min 后呼吸波动的干扰。OA 攻击后致敏小鼠的 MCh 和 CCh 的引喘阈浓度及引喘 EC₅₀ 低于未致敏小鼠, 表明致敏小鼠的气道反应性明显高于未致敏小鼠, 这与麻醉状态下气道阻力和肺顺应性及离体气道上的结果相符^[1,3]; 而地塞米松和小剂量氨茶碱等平喘药可显著抑制致敏小鼠的气道反应性增高, 与其平喘效应一致, 表明本法可有效反映气道反应性的变化, 引喘阈浓度是气道反应性的稳定指标。本实验中未见高剂量氨茶碱(62.5 mg/kg) 对小鼠气道高反应性有显著影响, 可能与较大剂量氨茶碱的呼吸兴奋作用有关。

本实验中抗原引起小鼠气道反应性增高的同时, 也引起 BALF 中白细胞渗出增加, 而地塞米松和氨茶碱能显著抑制抗原引起的这两种效应, 与大鼠哮喘模型的结果一致^[9], 也提示气道炎症与哮喘中气道反应性增高有密切关系^[10], Hessel 观察到气道炎症细胞如肥大细胞参与了气道高反应性^[1]; 地塞米松是经典的抗炎药物, 可多环节抑制炎症反应, 氨茶碱除舒张支气管外, 也具有抗炎作用, 本实验中两药降低气道高反应性的作用可能与抑制抗原引起的气道炎症有关, 国外报道糖皮质激素和茶碱可能通过抑制炎症细胞产生的细胞因子降低气道高反应性^[3,11]。

国外研究小鼠哮喘模型多采用 BALB/c 品系^[1,3], 本实验采用较之价廉、国内更易获得且应用较广泛的 NIH 小鼠, 也引发了气道高反应性和气道炎症, 因此具有较大的推广价值。

本实验室建立的非侵入式镇静小鼠气道反应性测定方法, 操作简便、稳定可靠、可重复利用, 相对于国外小鼠的气管插管法, 对呼吸中枢抑制轻, 可保持小鼠的

自主呼吸、无创伤, 更接近临床实际, 通过呼吸频率、幅度和节律变化确定引喘指标, 可测得引喘阈浓度, 从而有效地进行定量分析; 通过本方法我们还验证了地塞米松和氨茶碱对抗原引起小鼠气道高反应性的作用, 为检测药物对气道高反应性的作用提供了简便有效的手段, 表明本方法在呼吸生理和药理研究上将有很大的应用价值。

参考文献

- Hessel EM, Van Oosterhout AJM, Hofstra CL, *et al.* Bronchoconstriction and airway responsiveness after ovalbumin inhalation in sensitized mice. *Eur J Pharmacol*, 1995, 293: 401.
- Kung TT, Jones H, Adams III GK, *et al.* Characterization of a murine model of allergic pulmonary inflammation. *Int Arch Allergy Immunol*, 1994, 105: 83.
- De Bie JJ, Hessel EM, Van Ark I, *et al.* Effect of dexamethasone and endogenous corticosterone on airway hyperresponsiveness and eosinophilia in the mouse. *Bri J Pharmacol*, 1996, 119: 1484.
- Takeda K, Hamelmann E, Joetham A, *et al.* Development of eosinophilic airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mast cell-deficient mice. *J Exp Med*, 1997, 186: 449.
- 魏尔清, 田炯, 陈积榛, 等. 一种测量镇静大鼠气道反应性的非侵入式新方法. *生理学报*, 1997, 49: 471.
- 施焕中, 许辉, 梁国荣, 等. 血小板活化因子拮抗剂 ONO-6240 对抗原引起气道嗜酸性粒细胞浸润的影响. *中华内科杂志*, 1995, 34: 753.
- Kips JC, Cuvelier CA, Pauwels RA. Effect of acute and chronic antigen inhalation on airway morphology and responsiveness in actively sensitized rats. *Am Rev Respir Dis*, 1992, 145: 1306.
- 魏尔清, 张纬萍, 陆智勇, 等. 清醒无拘束豚鼠气道反应性测定方法. *中国应用生理学杂志*, 1997, 13: 86.
- 张纬萍, 赵孟辉, 田炯, 等. 速激肽 NK-1 受体拮抗剂 SR-140333 对抗原引起致敏大鼠气道高反应性的影响. *药理学学报*, 1997, 32: 569.
- Djukanovic R, Roche WR, Wilson JW, *et al.* Mucosal inflammation in asthma. *Am Rev Respir Dis*, 1990, 142: 434.
- Finnerty JP, Lee C, Wilson S, *et al.* Effects of theophylline on inflammatory cells and cytokines in asthmatic subjects: a placebo-controlled parallel group study. *Eur Respir J*, 1996, 9: 1672.

收稿日期: 1998 - 10 - 26