

DOI:10.13718/j.cnki.xsxb.2017.10.010

## 小鼠过敏性疾病模型的建立<sup>①</sup>

沈 曦, 李 鸣, 何 苗, 王舒悦, 何 方

四川大学 华西公共卫生学院, 成都 610041

**摘要:** 为探索建立小鼠过敏性疾病模型的最佳条件, 利用 OVA 与 Alum 混合的致敏原致敏 BALB/C 小鼠, 建立过敏性疾病动物模型, 采用正交试验的方法研究 OVA 剂量, Alum 剂量与刺激频率 3 因素的 3 个不同水平对受试小鼠血清总 IgE 的影响, 评价建立小鼠过敏性疾病模型的最佳条件. 经直观计算与统计学分析, 针对 OVA 与 Alum 混合致敏原致敏 BALB/C 小鼠模型, 最佳试验条件为每次每只小鼠注射 50  $\mu\text{g}$  OVA 与含 4 mg  $\text{Al}(\text{OH})_3$  的 Imject Alum 明矾佐剂的混合液 0.2 mL, 每隔 4 d 注射 1 次, 共注射 4 次. 该试验为研究食品抗过敏功能提供了建立过敏性疾病动物模型的简便易行的方法, 并提示在建立模型时应注意多试验因素的合理搭配.

**关键词:** 过敏性疾病; 正交试验; 动物模型

**中图分类号:** R364

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1000-5471(2017)10-0051-05

近年来, 过敏性疾病的发病率呈上升趋势, 随着其发病率的逐渐升高, 过敏性疾病的防治成为研究热点, 研究指出常见的过敏性疾病, 如食物过敏、过敏性哮喘、过敏性鼻炎等主要为 IgE 介导的 I 型变态反应. 在食品科学方面, 无论是抗过敏功能性食品的开发与研究, 还是评价食物本身是否引起过敏反应, 动物模型都是必不可少的. 目前国内外建立过敏性疾病动物模型的方法众多, 其基本原理是使致敏原进入机体与致敏靶细胞上的 IgE 发生特异性结合, 从而引发变态反应<sup>[1]</sup>.

国内外研究中, 常用于建立过敏模型的小鼠品系包括 BALB/C, C57BL/6, A/J 等<sup>[2]</sup>, 大鼠品系包括 SD, Wistar, BN 等, 另外也有利用豚鼠和猪等其他动物的报道<sup>[3]</sup>. 其中 BALB/C 属于高反应性品系, 并且较易获得, 因此本次试验选择该品系. 在致敏原方面, 常用的致敏原包括致敏蛋白、尘螨、花粉、病毒等<sup>[2]</sup>, 本次试验选用的卵清白蛋白(ovalbumin, OVA)是一种经典的致敏蛋白质, 致敏原性强, 易于获得. 但是在 OVA 使用时需与免疫佐剂配合, 本次试验选用 Imject Alum 明矾佐剂成品. 综上, 本研究利用 OVA 与 Imject Alum 混合的复合致敏原对 BALB/C 小鼠多次腹腔注射进行致敏和激发, 通过测定血清总 IgE 质量浓度评价模型建立成功与否.

OVA 剂量, Alum 剂量以及刺激次数是模型建立的几个关键因素, 但国内外研究在剂量及刺激次数方面并无定论. 本实验室参照文献方法进行预试验后发现几个关键因素的剂量搭配非常重要, 因此本试验采用正交试验的方法, 对关键因素进行正交设计, 分析各因素的最佳水平, 旨在探索建立过敏性疾病动物模型的最佳条件, 为抗过敏食品开发提供方法依据.

① 收稿日期: 2016-05-24

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81372982).

作者简介: 沈 曦(1991-), 女, 重庆沙坪坝人, 硕士研究生, 主要从事营养与疾病、肠道菌群的研究.

通信作者: 何 方, 教授, 博士研究生导师.

# 1 材料与方法

## 1.1 试验动物及饲养

SPF 级 BALB/C 小鼠, 雄性, 6~8 周龄(体质量 18~20 g), 购自四川省达硕实验动物有限责任公司[许可证号: SCYK(川)2015-030], 按照正交设计表(表 2)随机分为 9 组, 每组 5 只. 小鼠放入本实验室 SPF 级动物房后, 适应性喂养 1 周. 小鼠均饲养于塑料笼中, 给予标准膳食, 自由饮水. 环境温度:  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , 湿度:  $55\% \pm 10\%$ .

## 1.2 试剂

卵清白蛋白(OVA)(sigma, 美国, A5503-1G), Imject Alum 明矾佐剂(主要成分为氢氧化铝和氢氧化镁)(Thermo, 美国), 磷酸盐缓冲液(PBS)(Thermo, 进口分装), 小鼠总 IgE ELISA 试剂盒(武汉优尔生科技股份有限公司).

## 1.3 卵清白蛋白(OVA)配制

本试验中致敏与激发所用 OVA 均需与明矾佐剂混合后使用, 根据不同组别所需 OVA 与明矾佐剂剂量, 先用 PBS 配制 OVA 溶液并调整明矾佐剂浓度, 再将两种试剂进行 1:1 等体积混合, 混合后置于摇床混匀约 30 min, 现配现用.

## 1.4 试验因素的正交设计与试验分组

见表 1、表 2, 本次试验采用 3 因素 3 水平的正交设计, 考察不同比例搭配的致敏物与致敏频率对小鼠过敏模型的影响(表 1 中各剂量为注射绝对量).

表 1 正交试验因素水平表

水平	致敏频率(A)	佐剂(B) /mg·(次·只) <sup>-1</sup>	OVA(C) /μg·(次·只) <sup>-1</sup>
1	共注射 2 次, 间隔 14 d	含 1.5 mg Al(OH) <sub>3</sub> 的明矾佐剂	20
2	共注射 3 次, 每次之间间隔 7 d	含 2 mg Al(OH) <sub>3</sub> 的明矾佐剂	50
3	共注射 4 次, 每次之间间隔 4 d	含 4 mg Al(OH) <sub>3</sub> 的明矾佐剂	100

表 2 正交表及试验分组

实验组	A	B	C	血清总 IgE( $\bar{x} \pm SD$ ) /(ng·ml <sup>-1</sup> )
1	1	1	1	1.35±1.26
2	1	2	2	1.49±0.61
3	1	3	3	0.69±0.27
4	2	1	2	0.87±0.57
5	2	2	3	1.39±0.98
6	2	3	1	1.31±0.94
7	3	1	3	1.30±0.99
8	3	2	1	3.39±3.42
9	3	3	2	5.87±0.88
K1	3.53	3.52	6.05	
K2	3.57	6.27	8.23	
K3	10.56	7.87	3.38	
K1/3	1.18	1.17	2.02	
K2/3	1.19	2.09	2.74	
K3/3	3.52	2.62	1.13	
极差	2.34	1.45	1.62	
最优条件	A3	B3	C2	

### 1.5 致敏与激发

本次试验致敏与激发均采用腹腔注射的形式, 每只小鼠注射 OVA 与佐剂混合液 0.2 mL/次, 同一组别致敏与激发所用 OVA, 佐剂比例相同, 不同组别致敏次数与间隔时间不同, 视末次腹腔注射为激发过程。

### 1.6 血清采集及血清总 IgE 测定

末次腹腔注射(即激发)后 7 d, 眼球采血法采血, 室温静置 30 min 后, 1 000 r/min 离心 10 min, 收集血清,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冻存备用。

血清总 IgE 的测定, 采用小鼠血清总 IgE ELISA 试剂盒进行测定, 具体测定步骤参照试剂盒说明书。

### 1.7 统计学方法

用 SPSS 17.0 进行统计学分析, 计量资料用  $\bar{x} \pm SD$  表示, 对各组进行直观计算分析和方差分析。

## 2 结 果

### 2.1 直观分析

试验测得各组小鼠血清总 IgE 值与直观分析计算结果见表 2. 3 因素中极差越大的因素影响越大, 3 水平中  $K$  值的平均值最大的水平为最优水平, 因此本次试验所得最佳致敏条件为 A3B3C2, 其中 3 因素对小鼠血清总 IgE 的影响程度由大到小为 A, C, B. 即最佳的致敏频率为每隔 4 d 腹腔注射 1 次, 一共注射 4 次, 前 3 次为致敏, 最后 1 次为激发; 最佳的致敏原剂量为每只小鼠注射含有 4 mg  $\text{Al}(\text{OH})_3$  的明矾佐剂与 50  $\mu\text{g}$  OVA 混合而成的混悬液 0.2 mL/次. 影响最大的因素为致敏频率。

### 2.2 方差分析

对所得数据进行方差分析, 所得结果如表 3. 在 3 因素中致敏频率(A)与 OVA(C)对受试小鼠血清总 IgE 的影响有统计学意义( $p < 0.05$ ), 佐剂(B)对受试小鼠血清总 IgE 的影响无统计学意义( $p > 0.05$ ).

表 3 3 因素的方差分析结果

方差来源	自由度	均方	F 值	P 值
致敏频率(A)	2	24.153	10.051	0.000
佐剂(B)	2	6.385	2.657	0.084
OVA(C)	2	7.942	3.305	0.048
误差	36	2.403		

## 3 讨 论

过敏性疾病包括食物过敏、过敏性哮喘、过敏性鼻炎等多种表现. 通常食物或空气中致敏原进入机体从而引起变态反应, 其中 3% 是由食物性致敏原诱发的, 1%~3% 的成年人以及高达 5%~8% 的儿童对一种或多种食物过敏<sup>[4]</sup>. 经口灌胃与腹腔注射是评价食物致敏性的两个主要致敏途径, 虽然经口灌胃更接近人类的摄食方式, 但有研究指出经口反复灌胃致敏物容易产生经口耐受<sup>[1]</sup>. 国外研究在建立过敏性疾病模型时通常致敏与激发均采用腹腔注射途径<sup>[5]</sup>. 在国内针对过敏性哮喘或鼻炎的研究中, 为了模拟哮喘和鼻炎的发生, 在腹腔注射致敏原致敏的基础上会进行雾化吸入或鼻腔局部刺激以激发试验动物的变态反应<sup>[6-8]</sup>, 但雾化吸入和鼻腔局部激发操作复杂且无法保证致敏原进入剂量. 本研究旨在得到评价变态反应程度的动物模型, 不针对单一过敏性疾病, 因此本研究致敏与激发均采用腹腔注射途径, 从而简化试验操作. 本研究利用正交设计的方法探索针对复合 OVA(含 Alum 佐剂)致敏的 BALB/C 小鼠的最佳试验条件, 成功建立过敏性疾病小鼠模型, 并且在抗过敏食品的开发等相关研究中, 利用该模型可更加简便地进行试验。

本次试验结果经过直观计算与分析得到最佳的 OVA 剂量为每只小鼠 50  $\mu\text{g}$ /次, Alum 佐剂的最佳使

用剂量为每只小鼠注射含 4 mg  $\text{Al}(\text{OH})_3$  的佐剂成品,最佳的致敏频率为每 4 d 腹腔注射 1 次,共注射 4 次.并且,在直观计算后发现 3 个主要影响因素中最主要的因素是致敏频率与次数,其次是 OVA 剂量,最后是 Alum 佐剂剂量.结合方差分析结果提示,只有致敏频率和 OVA 剂量不同的受试小鼠血清总 IgE 不同,有统计学意义( $p < 0.05$ ),因此在选择建立过敏模型的最佳条件时,致敏频率与 OVA 剂量应选择最佳水平,而佐剂剂量可以选择 3 水平的任一水平.

在建立过敏性疾病动物模型时,国内通常采取试验第 1 d 与第 8 d 分别腹腔注射 1 次复合 OVA 致敏,试验第 15 d 左右开始连续 7~10 d 雾化吸入或鼻腔局部激发,通常耗时约 1 个月,才能建立血清 IgE 质量浓度升高的过敏动物模型<sup>[6,9]</sup>.国外研究常间隔 7~14 d 腹腔注射 1 次,共注射 2~3 次,近年的研究也提示增加腹腔注射次数有利于成功建立模型<sup>[5,10-11]</sup>.若以本次试验所得建模最佳刺激条件,共 4 次刺激,建立模型耗时约 12 d,缩短了建模所需时间.但值得注意的是,末次激发后仍需间隔 4~7 d 后采血,以保证试验动物有充足的变态反应发生时间.

国内外研究中,腹腔注射建立过敏模型时,常使用的 OVA 剂量为 10~50  $\mu\text{g}$  不等,且不同动物种类用量不同<sup>[2]</sup>.有研究指出,OVA 纯度可能是影响 OVA 使用剂量的一个重要因素,美国 Sigma 公司的不同级别(I~V)的 OVA 产品所含 OVA 纯度不同,约为 60%~98%以上,因此在使用剂量和致敏效果方面存在差别<sup>[12]</sup>.本次试验选用的 OVA 来自美国 sigma 公司,系 Grade V,纯度 $\geq 98\%$ .

在佐剂方面,OVA 致敏时常需使用免疫佐剂辅助,以产生预期的免疫反应类型,其原理为 OVA 与  $\text{Al}(\text{OH})_3$  不溶性胶状沉淀通过静电结合从而增加 OVA 免疫原性,同时给药 OVA 与  $\text{Al}(\text{OH})_3$  有利于产生 Th2 表型的反应<sup>[13]</sup>.国内外文献通常采用分析纯  $\text{Al}(\text{OH})_3$  自制佐剂,常用  $\text{Al}(\text{OH})_3$  剂量为 1~40 mg 不等,通常与 OVA 混合比例为 100:1,例如国外研究中最常采用剂量组合为 20  $\mu\text{g}$  OVA 与 2 mg  $\text{Al}(\text{OH})_3$ <sup>[2,5,11]</sup>.有研究指出干粉  $\text{Al}(\text{OH})_3$  与凝胶  $\text{Al}(\text{OH})_3$  的致敏效果不同,凝胶  $\text{Al}(\text{OH})_3$  辅助 OVA 致敏效果更佳<sup>[13]</sup>.但本课题组在前期的预试验中发现,自制  $\text{Al}(\text{OH})_3$  混悬液的混悬程度差异较大,重复性较差.为保证建模质量,本研究选用了 Imject Alum 明矾佐剂成品(Thermo,美国),由于其使用剂量仍不确定,遂将其列入正交设计关键因素,但本试验结果显示,Imject Alum 明矾佐剂不同使用剂量对受试小鼠的血清总 IgE 影响不具有统计学意义( $p > 0.05$ ).因此,在后续的试验中,虽然 Imject Alum 明矾佐剂必不可少,但可以采用含 1.5 mg  $\text{Al}(\text{OH})_3$  的佐剂剂量以节约试剂.

本次试验成功建立复合 OVA(含 Alum 佐剂)腹腔注射致敏的 BALB/C 小鼠过敏模型,其最佳试验条件为每次每只小鼠注射 50  $\mu\text{g}$  OVA 与含 4 mg  $\text{Al}(\text{OH})_3$  的 Imject Alum 明矾佐剂混合液 0.2 mL,每隔 4 d 注射 1 次,共注射 4 次.本试验为后续研究提供了建立过敏性疾病动物模型的依据,并提示在建立模型时应注意多试验因素的合理搭配.但在正式利用该条件进行建模前还应进行验证试验,验证该条件能否成功建立过敏性疾病动物模型.

## 参考文献:

- [1] 孙拿拿,梁春来,张倩男,等. BN 大鼠致敏动物模型研究 [J]. 卫生研究, 2012, 41(3): 459-461.
- [2] 马子风,尹磊森,冉 君,等. 小鼠过敏性哮喘模型制备的特点分析 [J]. 东南大学学报(医学版), 2014, 33(5): 650-655.
- [3] 陈一平,李超乾. 支气管哮喘动物模型建立及研究现状 [J]. 医学综述, 2014, 20(5): 840-843.
- [4] 向 钱,贾旭东,王 伟,等. BN 大鼠致敏动物模型研究 [J]. 中国食品卫生杂志, 2008, 20(5): 393-396.
- [5] HE F, MORITA H, KUBOTA, et al. Effect of Orally Administered Non-Viable Lactobacillus Cells on Murine Humoral Immune Responses [J]. Microbiology&Immunology, 2005, 49(11): 993-997.
- [6] 张硕峰,温丽娜,吴金英,等. 气道高反应动物模型的建立与指标检测 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(2): 20-23.
- [7] 王 敏,杨 军,尚 军,等. 肿瘤坏死因子  $\alpha$  诱导蛋白 2 在过敏性鼻炎小鼠模型中的表达及与血管生成的关系 [J].

首都医科大学学报, 2013, 34(6): 790—794.

- [8] 张 华, 赵 娟, 雍 军, 等. 实验性变应性鼻炎鼠类模型的建立 [J]. 新疆医科大学学报, 2006, 29(1): 56—57.
- [9] 覃家春, 李 琴, 罗俊刚, 等. 俞募配穴灸法对支气管哮喘大鼠肺组织 IgE 的影响 [J]. 贵阳中医学院学报, 2014, 36(4): 44—46.
- [10] MEI H C, LIU Y W, CHIANG Y C, et al. Immunomodulatory Activity of Lactococcus lactis A17 from Taiwan Fermented Cabbage in OVA-Sensitized BALB/c Mice [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013(1): 57—65.
- [11] LEE J, BANG J, WOO H J. Immunomodulatory and Anti-allergic Effects of Orally Administered Lactobacillus Species in Ovalbumin-sensitized Mice [J]. Journal of Microbiology & Biotechnology, 2013, 23(5): 724—730.
- [12] 孟鹏飞, 吕 岳. 简述用卵蛋白制作大鼠哮喘模型的要点 [J]. 甘肃中医学院学报, 2011, 28(2): 27—29.
- [13] 董 峰, 唐红卫, 吴小利, 等. 氢氧化铝干粉与凝胶制作大鼠哮喘模型的效果比较 [J]. 解放军医学院学报, 2013, 34(1): 73—75.

## Establishment of Allergic Mice Animal Model

SHEN XI, LI Ming,

HE Miao, WANG Shu-yue, HE Fang

*West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China*

**Abstract:** This study has been conducted to explore the best condition of allergic mice model. Ovalbumin (OVA) and alum have been used to sensitize BALB/C mice to establish allergic animal model. The influence of 3 factors at 3 different levels including the dose of OVA and Alum, the frequency of intraperitoneal injection on serum total IgE of tested mice have been studied by the way of Orthogonal test. The best level of OVA and alum dose was 0.2ml mixture of 50 $\mu$ g OVA with Imject alum containing 4mg Al(OH)<sub>3</sub> every time for each mice. And a total of 4 injections every 4 days was the best frequency. The present study provides a easy way to establish allergic mice model for food research. And it indicates that the balance of every key factor is important when establishing animal model.

**Key words:** allergic disease; orthogonal test; animal model

责任编辑 周仁惠