

· 论 著 ·

## TDI 诱发变应性鼻炎豚鼠模型的建立

肖红兵<sup>1</sup>, 谢彦兵<sup>1</sup>, 李宝国<sup>2</sup>, 李海兵<sup>1,3</sup>, 邱婵娟<sup>3</sup>, 胡 明<sup>3</sup>, 刘永学<sup>3</sup>

**[摘要]** **目的** 建立甲苯-2,4-二异氰酸酯(TDI)诱发的变应性鼻炎(AR)豚鼠模型。**方法** 模型组和布地奈德治疗组动物,利用 10% 的 TDI 经鼻通过反复致敏和激发两个步骤诱发 AR 模型。致敏和激发均采用 TDI 双侧鼻孔滴鼻(每侧鼻孔以 12.5  $\mu\text{L}/\text{kg}$  计算),其中,致敏过程共 7 d,每天 1 次;激发过程共 14 d,隔天 1 次。自致敏开始,记录动物临床评分和喷嚏数。待实验结束后,分离鼻黏膜并制备血清,观察鼻黏膜组织病理学变化,检测鼻黏膜组织胺含量及血清中 IgE 含量。布地奈德治疗组动物,自致敏结束次日开始通过双侧鼻孔滴鼻给药(每侧鼻孔给药为 10  $\mu\text{L}/\text{kg}$ ),每天 1 次,连续 14 d;模型组按相同方式给予等体积生理盐水。正常对照组动物,以橄榄油替代 10% TDI,其余处理同模型组。**结果** 与正常对照组比较,模型组豚鼠的临床评分、鼻黏膜组织组胺含量及血清 IgE 含量均明显升高( $P < 0.05$ ),鼻黏膜组织出现嗜酸性粒细胞浸润、小血管扩张、组织水肿及上皮脱落等典型的炎性病理变化;布地奈德给药则可显著改善以上病变。**结论** TDI 在豚鼠体内能够诱发典型的变应性鼻炎模型,具有方法简便可靠、成功率高的优点。

**[关键词]** 变应性鼻炎;甲苯-2,4-二异氰酸酯;豚鼠;模型

**[中图分类号]** R765.213 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-271X(2012)01-0023-04

### Establishment and characteristics of a TDI-induced model of allergic rhinitis in guinea pigs

XIAO Hong-bing<sup>1</sup>, XIE Yan-bing<sup>1</sup>, LI Bao-guo<sup>2</sup>, LI Hai-bing<sup>1,3</sup>, QIU Chan-juan<sup>3</sup>, HU Ming<sup>3</sup>, LIU Yong-xue<sup>3</sup>. 1. Department of Pharmacy, 184 Hospital of PLA, Yingtan, Jiangxi 335000, China; 2. No. 96163 of PLA, Leping, Jiangxi 333300, China; 3. Beijing Institute of Radiation Medical, Beijing 100850, China

**[Abstract]** **Objective** To establish an allergic rhinitis (AR) model of guinea pigs induced by 2,4-toluene diisocyanate (TDI). **Methods** The AR model of guinea pigs were induced by intranasal instillation with 10% TDI solution through the two steps of sensitization and challenge consequently. For the sensitization, animals were intranasal instilled with 10% TDI at a dose of 12.5  $\mu\text{L}/\text{kg}$  in each nasal hole one time per day for 7 days. For the challenge, animals were treated with the same method from the 8th day but one time the other day for 14 days. From the first day of the sensitization, clinical scores of the animals were recorded everyday till the end of the challenge. When the records were completed, the nasal mucosa of guinea pigs was dissected for the pathological observation and the blood was collected from the abdominal aorta for the detection of IgE. For evaluation of the responses of the model animals to drug treatment, budesonide was intranasal instilled at 10  $\mu\text{L}/\text{kg}$  each nasal hole one time per day from the 8th day to the 20th day. Accordingly, the normal group of guinea pigs was intranasal instilled olive oil instead of 10% TDI but the others the same as the model group. **Results**

Compared with that of the normal group, guinea pigs of the model group were increased markedly in their clinical scores, levels of the nasal mucosa histamine and blood IgE ( $P < 0.05$ ), and shown some pathological alterations such as vasodilatation, hyperplasia of glands, edema and increased eosinophil infiltration in the lamina propria of the nasal mucosa, and part of epithelium mucosa exuviated levels increased after challenges. However, the budesonide treatment could improve the above changes of guinea pigs of the model group. **Conclusion** The guinea pig model of allergic rhinitis can be induced by TDI intranasal instillation. The method was simple, time-saving and must be useful in the study of allergic rhinitis.

**[Key words]** allergic rhinitis; 2,4-toluene diisocyanate; guinea pig; model

**作者简介:** 肖红兵(1968-),女,江西赣州人,本科,主管护师,从事药品采购及管理工作

**作者单位:** 1. 335000 江西鹰潭,解放军 184 医院药械科; 2. 333300 江西乐平,解放军 96163 部队; 3. 100850 北京,军事医学科学院放射与辐射医学研究所

**通讯作者:** 刘永学, E-mail: liuyx@nic.bmi.ac.cn

变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)是一种特异性呼吸道疾病,发病率一直呈上升趋势,其临床的特征是鼻充血、鼻塞、鼻涕、喷嚏、鼻痒,有时也会失去嗅觉<sup>[1]</sup>,严重影响人们的身体健康和生活质量。

开展 AR 的实验研究,往往离不开理想的动物模型。就 AR 动物模型而言,目前国内外公认的方法

即甲苯-2,4-二异氰酸酯(TDI)或卵清蛋白(OVA)诱导法<sup>[2-3]</sup>。前者具有建模周期短、操作方便、试剂便宜等优点,但目前大多文献报道的实验方案不够详尽和完善,并且在实验过程中经常有动物死亡等现象。本研究在前期预实验的基础上,优化了 TDI 诱发 AR 豚鼠模型的方案,取得了满意的结果。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** SPF 级 Hartley 豚鼠 30 只,雌雄各半,体重 400~450 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号:SCXK(京)2006-0009。由军事医学科学院丰台动物中心饲养,每笼 5 只,环境温度:(23±2)℃,湿度:(55±5)%,动物自由摄食饮水。

**1.2 试剂** TDI(天津市津科精细化工研究所,批号:20031012),橄榄油(国药集团化学试剂有限公司,批号:F20081006),布地奈德鼻喷雾剂(阿斯利康制药有限公司,批准文号:国药准字 J20090079,批号:F20081006),乌来糖(氨基甲酸乙酯)(国药集团化学试剂有限公司,批号:T20080917),生理盐水(石家庄四药有限公司,批号:100427117),豚鼠免疫球蛋白 E(IgE)ELISA 试剂盒(北京中昊时代生物技术有限公司,批号:20100817),磷酸组胺对照品(中国药品生物制品检定所批号:150510-200412)等。

**1.3 仪器及器械** 微量移液器(法国 GILSON),台式高速离心机(Sigma 公司),海尔超低温保存箱(青岛海尔特种电器有限公司),全自动酶标仪(Thermo Multiskan M K3 公司),高效液相 Waters2695 及多通道荧光检测器 Waters 2475(沃特世科技有限公司)。

### 1.4 动物分组及模型制作方法

**1.4.1 分组** 将 30 只 SPF 级豚鼠根据体重随机分为三组,分别为正常对照组、AR 模型组,布地奈德喷鼻剂治疗组,每组 10 只,雌雄各半。

**1.4.2 建模** 致敏方案遵照 Tanaka 等<sup>[3]</sup>报道方法,部分作修改。除正常对照组外,其他两组豚鼠用 10% TDI(分别取 0.1ml TDI 和 0.9ml 橄榄油,在常温下将两者充分混匀即得浓度为 10%的 TDI 溶液,现配现用)进行双侧鼻孔滴鼻,用量按每侧 12.5 μl/kg 计算,每日 1 次,连续 7 d 后,改为隔日 1 次,直至第 21 天结束。从第一次给予 TDI 开始,每天观察并记录每只动物的临床症状,根据症状评分标准,计算临床评分。在 TDI 滴鼻第 7 天,致敏动物评分若超过 5 分,则表明动物模型制作成功。正常对照组豚鼠,以橄榄油替代 10% TDI,用法、用量与上述模

型组相同。

**评分标准:**以鼻部症状和体征为主要观察内容,自给 10% TDI 开始,依据鼻痒、喷嚏、流涕等出现的时间长短、轻重程度、次数多少为评分标准并记录。鼻痒程度:轻擦鼻几次,记 1 分;连续抓挠鼻、面部记 2 分。喷嚏:1~3 个为 1 分,4~10 个为 2 分,11 个以上为 3 分。流涕:流至鼻前孔为 1 分,超过鼻前孔为 2 分,流涕满面为 3 分。各症状记分累加,即为临床评分。其症状观察时间为每次给致敏物开始计时,共 30 min。

**1.5 给药方案** 布地奈德给药组豚鼠从第 8 天开始给药,经双侧滴鼻给药,每侧鼻孔给药用量为 10 μl/kg,每天给药 1 次,连续 14 d。若给药当天动物需 TDI 激发,则在给药 60min 后再用 TDI,随后进行相应的症状评分。正常对照、模型组动物,按照给药组相同的方案均给予等体积生理盐水。

最后一次给药、评分完毕,以 25%的乌拉坦(1 g/kg)经腹腔注射麻醉动物,腹主动脉取血 3~5 ml 于离心管中,再经离心制备血清,-80℃保存,用于检测血清 IgE 含量。然后沿豚鼠鼻道切开,暴露鼻中隔,小心分离取出鼻中隔两侧的鼻黏膜组织,一部分组织立即经甲醛固定,按常规步骤制片并进行 HE 染色,用以观察鼻黏膜组织病理学变化,另一部分置-80℃保存,用以测定组胺含量。

**1.6 病理标本及切片制作方法** 病理标本按常规组织制片技术制片,HE 染色<sup>[4]</sup>。

**1.7 血清中 IgE 含量测定方法** 采用 ELISA 法检测血清中 IgE 含量,详细步骤见说明书及有关文献<sup>[5]</sup>。

**1.8 鼻黏膜组织中组胺测定方法** 采用荧光分光光度法检测组胺含量<sup>[6]</sup>。

**1.9 统计学处理** 所得数据用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,用 Excel 软件对不同组间实验数据进行 *F* 检验和 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 豚鼠临床评分变化** 致敏 7 d 后,模型组及治疗组每只动物出现典型的 AR 症状,其临床评分均超过 5 分,说明造模成功。正常对照组仅少数动物出现轻抓鼻。治疗组从第 8 天给药开始至第 21 天给药结束,其临床评分逐渐出现明显下降,即随着治疗时间的延长,症状明显缓解(表 1)。

**2.2 豚鼠喷嚏数量变化** 喷嚏系 AR 的典型症状之一。随着致敏时间的延长,模型组及治疗组豚鼠的喷嚏数明显增加,从第 8 天开始,治疗组给予治疗

表 1 各组动物的临床评分动态结果

组别	第 1 天	第 11 天	第 13 天	第 15 天	第 17 天	第 19 天	第 21 天
正常对照组	0.6±1.0 <sup>*</sup>	1.3±0.8 <sup>*</sup>	2.2±0.6 <sup>*</sup>	0.7±1.0 <sup>*</sup>	0.8±1.0 <sup>*</sup>	1.3±1.2 <sup>*</sup>	2.4±1.0 <sup>*</sup>
模型组	6.8±1.1	7.3±1.0	7.5±0.7	7.7±0.5	7.6±0.5	7.6±0.7	7.7±0.5
治疗组	6.3±1.1	5.8±1.5 <sup>*</sup>	6.1±1.2 <sup>*</sup>	5.2±1.6 <sup>*</sup>	5.5±1.1 <sup>*</sup>	5.1±1.1 <sup>*</sup>	4.7±0.9 <sup>*</sup>

注:与模型组比较,<sup>\*</sup>*P*<0.01

药物后,喷嚏数逐渐明显减少,症状明显缓解。而在实验期间,正常对照组动物几无喷嚏。

**2.3 豚鼠鼻黏膜组织病理学改变** 光镜下可见:模型组鼻黏膜损伤较严重,表现为部分黏膜上皮脱落,固有层血管扩张充血,组织水肿,伴嗜酸性粒细胞及其他炎症细胞浸润;空白对照组黏膜上皮呈柱状排列,未见炎症细胞浸润;治疗组鼻黏膜损伤较轻,仅见少量嗜酸性粒细胞浸润(图 1)。

**2.4 豚鼠血清中 IgE 含量变化** 模型组血清 IgE 含量(1.46 μg/ml)较高,正常对照组血清 IgE 含量(1.25 μg/ml)较低,治疗组血清 IgE 含量(1.41 μg/ml)较模型组为低,与模型组比较,*P*<0.05。

**2.5 豚鼠鼻黏膜组胺含量变化** 正常对照组鼻黏膜组织组胺平均含量(3.02 ng/mg)较低,模型组(4.76 ng/mg)较高,治疗组(3.51 ng/mg)较模型组为低,与模型组比较,*P*<0.05。

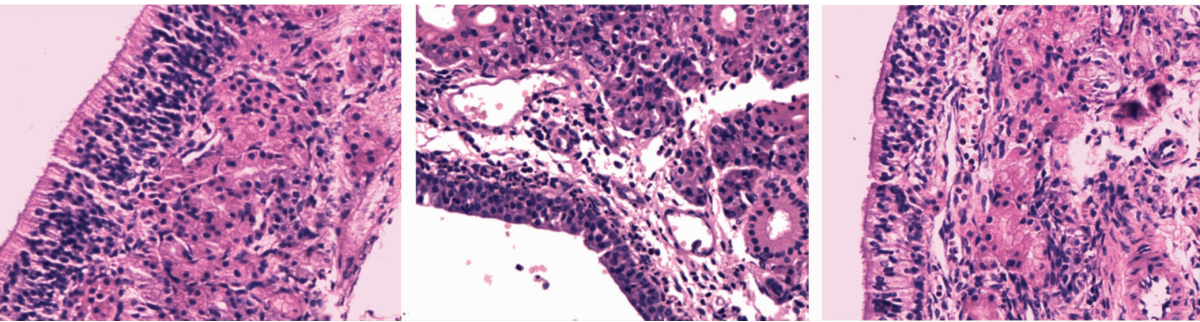
3 讨 论

选择并建立合适的 AR 动物模型,对于 AR 治疗药物药效学的研究具有十分重要的意义,其他有关 AR 的研究内容,如病因学、发病机制、预后等,也都离不开成功的动物模型。本实验建立 TDI 诱导的 AR 豚鼠模型,是目前国际上公认的模型之一<sup>[7]</sup>。此外,卵白蛋白和日本雪松花粉诱导的 AR 动物模型亦常被选用。但与后两者相比,本研究的模型具有周期短、操作简单、经济、容易成功等优点。关于

建模动物,文献报道较多。有报道表明豚鼠最适于 AR 模型的建立,被广泛应用于病理机制、新药研究等<sup>[8-9]</sup>。品系方面,Dunken Hartley 品系使用最为广泛<sup>[10]</sup>。

结合本研究前期预实验结果,提示选择豚鼠进行 AR 模型制作时应注意以下问题:动物级别和品系最好选择 SPF 级 Dunken Hartley 品系豚鼠,体重达到 400 g 以上;动物饲养条件要求在 SPF 级动物房饲养,严格保持恒定的温度和湿度,环境应整洁安静。否则,动物容易死亡。我们第一次预实验结束时,10 只豚鼠仅存 3 只;第二次预实验结束时,20 只豚鼠仅存 11 只。分析原因:两次预实验选用的豚鼠为清洁级,体重在 250 ~ 300 g 之间;且饲养条件达不到 SPF 级;建模试剂 TDI 属有毒有机化合物,而且其剂量为每侧鼻孔 14.5 μl/kg,对豚鼠损伤大。因此正式实验中选择了 SPF 级豚鼠,饲养在 SPF 级动物房,并将 TDI 剂量调整为每侧鼻 12.5 μl/kg。许多文献报道 TDI 剂量为每侧鼻 5 μl/kg,在实验中发现随着动物体重的增长,5 μl/kg 的剂量激发动物表现的症状并不明显。经实践证明,12.5 μl/kg 剂量使动物模型症状明显而又不致死亡。

目前,国际上评价 AR 的药效学指标主要包括:临床症状评分,喷嚏数,鼻痒次数,血清 IgE 含量,鼻黏膜组织病理学变化,鼻黏膜组胺含量,血管渗透性,鼻充血等<sup>[11]</sup>。本研究采用其中 5 个指标用于评价 AR 模型,以保证模型的可靠性。



A(正常对照组) B(模型组) C(治疗组)

图 1 各组动物鼻黏膜病理学改变(HE ×200)

A:鼻黏膜完好;B:鼻黏膜损伤较严重,表现为血管扩张,上皮脱落,嗜酸性粒细胞浸润等;C:鼻黏膜损伤较轻

实验所选择的布地奈德鼻喷雾剂,是目前治疗 AR 的一线药物<sup>[12]</sup>,结果表明其能有效地缓解豚鼠变应性鼻炎的鼻症状,改善鼻黏膜组织病理学的损伤,抑制血中 IgE 和鼻黏膜中组胺的生成,阻止局部嗜酸性粒细胞的浸润等。而实验模型对药物的治疗反应明确,亦证实 TDI 诱发的豚鼠模型可较大幅度地反映人类 AR 的发病特点,方法简便易行且成功率高,为今后开展 AR 防治药物的药效学研究奠定了良好的基础。

#### 【参考文献】

- [1] Bousquet J, Vignola AM, Campbell AM, et al. Pathophysiology of allergic rhinitis [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 1996, 110 (3): 207-218.
- [2] Yousuf M, Al Sulemani, Michael JA. Walker. Allergic rhinitis and its pharmacology [J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2007, 114 (2): 233-260.
- [3] Tanaka K, Okamoto Y, Nagaya Y, et al. A nasal allergy model developed in the guinea pig by intranasal application of 2,4-toluene diisocyanate [J]. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1988, 85 (4): 392-397.
- [4] 王伯沅, 李玉松. 病理学技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 122-125.
- [5] 刘云霞, 黄家森, 宗晓福, 等. COPD 与哮喘体外过敏原血清特

异性 IgE 检测的结果分析 [J]. *东南国防医药*, 2007, 9 (2): 84-85.

- [6] 王素敏, 章如新, 于雁灵, 等. 变应性鼻炎豚鼠鼻黏膜组胺含量对血流量的影响 [J]. *第二军医大学学报*, 2000, 21 (1): 1130-1132.
- [7] Ogawa M, Tsumuro T, Takubo M, et al. Effect of mometasone furoate on nasal congestion model in rats [J]. *Pharmacology*, 2009, 84 (4): 99-103.
- [8] Zhao Y, Woo JK, Leung PC, et al. Symptomatic and pathophysiological observations in a modified animal model of allergic rhinitis [J]. *Rhinology*, 2005, 43 (1): 47-54.
- [9] Fukuda S, Midoro K, Gyoten M, et al. Effects of TAK-427 on acute nasal symptoms and nasal obstruction in guinea pig model of experimental allergic rhinitis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, 476 (3): 239-247.
- [10] Kemp AS. Allergic rhinitis [J]. *Paediatr Respirat Rev*, 2009, 10 (2): 63-68.
- [11] Takahashi Y, Kagana Y, Lzana K, et al. Effect of histamine H<sub>4</sub> receptor antagonist on allergic rhinitis in mice [J]. *Intern Immunopharmacol*, 2009, 9: 734-738.
- [12] Inoue N, Hashino A, Kageyama K, et al. Pharmacological profile of the novel anti-inflammatory corticosteroid Ns-126, a therapeutic agent for allergic rhinitis [J]. *J Pharmacol Sci*, 2010, 112 (1): 73-82.

(收稿日期: 2011-08-08; 修回日期: 2011-09-26)

(本文编辑: 张仲书; 英文编辑: 王建东)

## · 个 案 ·

### 结肠癌宫颈转移 1 例

吴 曼, 骆文香, 崔向华, 张 坚

【关键词】 宫颈癌; 转移; 结肠癌

【中图分类号】 R737.33 【文献标志码】 B

【文章编号】 1672-271X(2012)01-0026-02

#### 1 病例报告

患者女, 44 岁, 因不规则阴道流血半年, 加重 0.5 h 于 2010 年 12 月 16 日入院。既往月经规则, 5 ~ 6/30 d, 量中等, 无痛经。3 年前出现性生活后阴道流血, 量少, 无异常阴道排液, 未重视。2010 年 4 月因结肠癌在外院行右半结肠切除术, 术后病理: 右半结肠隆起型黏液肿瘤, 癌组织侵及全层, 脉管见癌栓, 肠周淋巴结 3/15 见癌转移。诊断为结肠癌 IIIb 期, 术后给予化疗。同年 6 月无明显诱因出现少量阴道流血, 多为一过性, 常在咳嗽、大小便时出现, 10 月中旬大量阴道流血在当地医院行诊断性刮宫术, 自诉病理未见子宫内

膜恶变(未见报告单)。术后阴道流血淋漓不净, 并逐渐出现下腹坠痛, 入院前 0.5 h 出现大量阴道流血。妇科检查: 阴道内大量积血及血块, 宫颈外口见一直径约 1.5 cm 的增生组织, 表面出血明显, 宫颈增粗, 质地较硬。阴道镜: 宫颈上唇见不规则肿物突出, 质地脆, 触之易出血, 醋酸染色变白, 不褪色, 碘不着色。MRI: 宫颈管占位, 局部累及后壁基质, 宫颈管腔内见较多液体信号, 盆腔少量积液。入院即行分段诊刮 + 宫颈活检术, 病理示: 宫颈内膜及宫颈赘生物为高中分化腺癌。宫腔刮出物为出血性子宫内膜, 有分泌, 其中见小块腺癌组织, 形态同颈管内膜及宫颈赘生物。免疫组化提示高中分化腺癌, 考虑结肠来源。术前诊断: 宫颈癌(转移性)、结肠癌术后。于 12 月 28 日在全麻下行全子宫 + 双侧附件切除术 + 盆腔粘连松解术 + 双侧卵巢动静脉高位结扎术, 术中盆腹腔未见其他肿瘤病灶, 术后病理示: 宫颈管腺癌(中分化), 结合肠癌病史及免疫组化检查考虑为转移性黏液腺癌伴坏死, 癌组织直径约 2 cm, 宫颈外环完整, 子宫