

·基础研究·

二甲双胍和孟鲁司特在急性和慢性过敏性哮喘小鼠模型中的作用

郭妍蓉, 严彦

(广东省生物医学影像重点实验室//中山大学附属第五医院分子影像中心, 广东 珠海 519000)

摘要:【目的】对比分析屋尘螨(HDM)诱导的过敏性哮喘小鼠模型26 d的急性模型和59 d的慢性模型,评价二甲双胍和孟鲁司特对气道炎症和气道重塑病理效应的改善作用。【方法】HDM致敏和激发构建急性和慢性过敏性哮喘小鼠模型,设置药物干预组包括阳性药物对照组(HDM+布地奈德)、二甲双胍组(HDM+二甲双胍)和孟鲁司特钠组(HDM+孟鲁司特钠),干预药物于每次HDM激发前1 h或30 min,经滴鼻(布地奈德1 mg/kg)或腹腔注射(二甲双胍200 mg/kg、孟鲁司特钠10 mg/kg)给药。各实验组小鼠处死后苏木素-伊红染色和马松染色分析小鼠的肺部病理特征;采用Image J软件进行气道炎症细胞浸润评分和胶原沉积评分,以及分析支气管形态参数,包括支气管壁厚度和支气管平滑肌厚度;采用ELISA方法检测小鼠血清总IgE水平,qRT-PCR检测炎症因子*IL-4*、*IL-5*、*IL-13* mRNA转录水平。【结果】慢性模型小鼠的血清总IgE水平、气道周围胶原沉积程度、气道平滑肌厚度显著高于急性模型小鼠($P<0.05$)。布地奈德干预可以显著改善急性组小鼠的气道炎症($P<0.05$);和HDM造模组相比,二甲双胍干预对HDM诱导急性哮喘小鼠有明显的气道炎症改善($P<0.05$)作用,对气道重塑无显著作用($P>0.05$),对慢性模型小鼠的气道炎症和气道重塑均无显著作用($P>0.05$);在慢性组的孟鲁司特钠干预组中,小鼠的气道炎症和气道重塑均无明显的改善($P>0.05$)。【结论】相比26 d的急性模型,59 d的慢性哮喘模型有更高水平的炎症反应和气道重塑效应,二甲双胍能有效改善HDM诱导急性哮喘小鼠中的气道炎症,孟鲁司特钠对慢性哮喘小鼠气道炎症和气道重塑均无显著作用。

关键词: HDM哮喘小鼠模型;气道炎症;气道重塑;二甲双胍;孟鲁司特

中图分类号: R392.8

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2022)06-0905-11

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2022.0606

Effects of Metformin and Montelukast in Acute and Chronic Allergic Asthma Mouse Models

GUO Yan-rong, YAN Yan

(Guangdong Provincial Engineering Research Center of Molecular Imaging//Guangdong Provincial Key Laboratory of Biomedical Imaging//The Fifth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, China)

Correspondence to: YAN Yan; E-mail: yanyan35@mail.sysu.edu.cn

Abstract: 【Objective】 To compare the effects of metformin and montelukast on airway inflammation and remodeling in the acute and chronic house dust mite (HDM)-induced asthma mouse models. 【Methods】 HDM-induced acute and chronic asthma mouse models were established and treated with 1 mg/kg of budesonide, 200 mg/kg of metformin, or 10 mg/kg of montelukast, respectively. The drugs were administrated via intranasal instillation or intraperitoneal injection 1 h or 30 min prior to each HDM challenge. Hematoxylin-Eosin and Masson's trichrome staining were used to analyze the lung-

收稿日期: 2022-06-30

基金项目: 国家自然科学基金(81870019)

作者简介: 郭妍蓉, 硕士生, 研究方向: 气道炎症性疾病机制及其药物靶点研究, E-mail: guoyr5@mail2.sysu.edu.cn; 严彦, 通信作者, E-mail: yanyan35@mail.sysu.edu.cn

pathological characteristics of mice. The score analysis of airway inflammatory cell infiltration and collagen deposition and the measurement of bronchial morphological parameters including bronchial wall thickness and bronchial smooth muscle thickness were determined by Image J software. Total serum IgE level, mRNA transcription level of inflammatory factors *IL-4*, *IL-5*, and *IL-13* were detected by ELISA and qRT-PCR.【Results】HDM-induced chronic model had significantly increased total serum IgE level, airway collagen deposition and thickness of airway smooth muscle than the acute model ($P < 0.05$). Budesonide significantly attenuated airway inflammation in the HDM-induced acute model ($P < 0.05$). Metformin significantly improved airway inflammation ($P < 0.05$) and had no significant effect on airway remodeling ($P > 0.05$) in the HDM-induced acute model. Both metformin and montelukast had no significant effect on airway inflammation and remodeling ($P > 0.05$) in the chronic model.【Conclusion】Compared with the 26-day acute model, the 59-day chronic asthma mouse model has a higher level of serum IgE, pulmonary Th2 cytokine transcripts and airway collagen deposition. Metformin can effectively ameliorate airway inflammation in the HDM-induced acute mouse model, and montelukast has no significant effect on airway inflammation and remodeling in the HDM-induced chronic mouse model.

Key words: chronic house dust mite (HDM)-induced asthma mouse model; airway inflammation; airway remodeling; metformin; montelukast

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2022, 43(6):905-915]

哮喘是常见的慢性呼吸道疾病,中国20岁以上人群的哮喘总患病率为4.2%^[1],其病理特征为气道炎症、气道重塑和气道高反应性等,50%的成人哮喘^[2]和80%的儿童哮喘^[3]由过敏原引起的。目前临床哮喘的治疗方案为糖皮质激素,结合支气管舒张药物来缓解哮喘的急性发作^[4],但哮喘的发病机制和治疗靶点仍有待深入的探究。建立哮喘的动物模型有利于更全面、动态和深入地理解哮喘的发生发展。哮喘动物模型研究中常用过敏原包括蛋白抗原卵清蛋白(ovalbumin, OVA)、屋尘螨(house dust mite, HDM)、甲苯二异氰酸酯,不同过敏原诱导的哮喘小鼠其哮喘样病理特征存在差异^[5]。研究显示高达85%的哮喘患者对HDM过敏^[6],且HDM诱导哮喘小鼠表现为以嗜酸性粒细胞、2型辅助性T淋巴细胞(Th2)细胞因子、IgE升高为主的气道炎症和变态反应,具有气道重塑和气道高反应性的典型病理特点^[7],与人类过敏性哮喘病理特征相吻合。结合文献与前期成果^[5, 8],我们建立了26 d的急性模型和59 d的慢性模型,探究不同建模周期的过敏性哮喘小鼠的病理效应,观察气道炎症和气道重塑的不同表现;筛查哮喘可能相关的药物靶点,发现二甲双胍^[9]和孟鲁司特^[10]在肺部疾病中具有抗纤维化和抗炎作用,本研究初探二甲双胍和孟鲁司特在急性和慢性过敏性哮喘中的药理作用。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

屋尘螨(HDM)提取物购自美国Geer Laboratories公司;氢氧化铝($\text{Al}(\text{OH})_3$)购自美国Sigma公司;布地奈德和孟鲁司特钠购自美国MCE公司;二甲双胍购自美国Millipore公司;异氟烷购自中国瑞沃德公司;三溴乙醇购自中国麦克林公司;右美托咪定购自中国麦克林公司;40 g/L多聚甲醛溶液、苏木素-伊红(H&E)染色试剂盒购自中国飞净公司;小鼠IgE ELISA检测试剂盒购自美国BD Bioscience公司;马松(Masson's trichrome)三色染色试剂盒购自中国索莱宝公司;逆转录试剂盒和SYBR green RT-qPCR提取试剂盒购自中国近岸公司。轮转切片仪、恒温水浴器、恒温烘干器购自德国Leica公司,高通量组织研磨仪购自中国露卡公司, Panoramic 数字扫片机购自匈牙利3D HISTECH公司,多功能酶标仪购自美国PerkinElmer公司,PCR仪和CFX96 Real-Time System购自美国Bio-Rad公司。

1.2 实验动物与分组

本研究采用无病原体(SPF)级别健康的BALB/c雌性小鼠,6~8周龄,体质量18~20 g,购买于北京维通利华实验动物中心[实验动物生产许可证SCXK(粤)2018-0002],饲养于中山大学附属第五医院广东省生物医学影像重点实验室实验动物中

心,小鼠经一周检疫合格后转至常规饲养,温度(24 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度40%~60%。本研究获得中山大学附属第五医院广东省生物医学重点实验室动物中心伦理委员会审批通过(审批号:2018073101.00119),动物实验操作符合实验动物福利和动物实验的伦理要求。本研究同时建立急性和慢性两批哮喘小鼠模型,随机将2批小鼠分别分为4组($n=5$):正常组(Saline)、HDM哮喘组(HDM)、药物对照组(HDM + BD)和二甲双胍干预组(HDM + Met),以及在HDM哮喘慢性模型中单独加一组孟鲁司特钠干预组(HDM + Mont)。

1.3 哮喘小鼠模型的建模方案和药物干预

1.3.1 急性过敏性哮喘小鼠模型 过敏性哮喘小鼠模型的建立包括致敏和激发两个过程。急性过敏性哮喘小鼠模型为期26 d(图1A),具体建模方法如下:在第0天和第14天,给予每只小鼠100 μL 致敏HDM混悬液(含20 μg HDM,1 mg 氢氧化铝,溶于生理盐水)或等量生理盐水空白对照,于小鼠

右下腹腔注射;第21天、第23天和第25天隔天给药进行激发,先将小鼠放入小动物气体麻醉装置中,10 min后小鼠进入稳定麻醉状态,给予每只小鼠30 μL HDM混悬液(含10 μg HDM,溶于生理盐水)或等量生理盐水空白对照滴鼻给药。在第26天,即最后一次激发24 h后,收取建模小鼠。

1.3.2 慢性过敏性哮喘小鼠模型 慢性过敏性哮喘小鼠模型为期59 d(图1B),具体建模方法如下:在第0天和第14天,给予每只小鼠100 μL 致敏HDM混悬液(含20 μg HDM,1 mg 氢氧化铝,溶于生理盐水)或等量生理盐水空白对照,于小鼠右下腹腔注射;第21天至第58天,每周3次,隔天给药进行激发,先将小鼠放入小动物气体麻醉装置中,10 min后小鼠进入稳定麻醉状态,给予每只小鼠30 μL HDM混悬液(含10 μg HDM,溶于生理盐水)或生理盐水空白对照滴鼻给药。在第59天,即最后一次激发24 h后,收取建模小鼠。

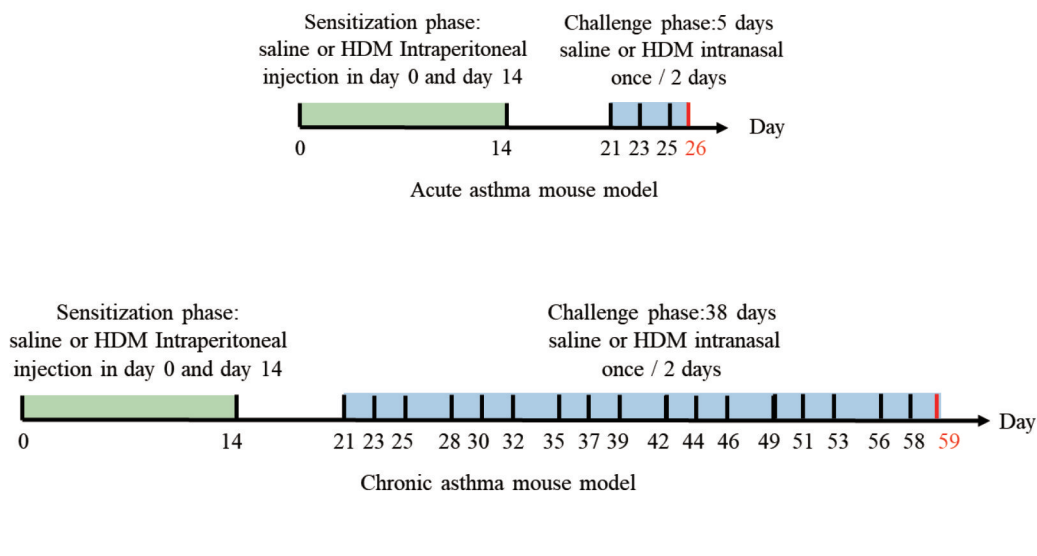


图1 HDM诱导急性和慢性哮喘小鼠模型的建模方案

Fig. 1 Protocol of HDM-induced acute and chronic asthma mouse models

1.3.3 药物干预 药物对照组(HDM + BD),在每次HDM激发哮喘小鼠前,提前1 h对小鼠进行1 mg/kg的布地奈德溶液滴鼻给药;二甲双胍干预组(HDM + Met),在每次HDM激发哮喘小鼠前,提前1 h对小鼠进行200 mg/kg的二甲双胍溶液腹腔注射给药;孟鲁司特钠干预组(HDM + Mont)在每次HDM激发哮喘小鼠前,提前30 min对小鼠进行

10 mg/kg的孟鲁司特钠溶液腹腔注射给药。

1.3.4 标本采集 在最后1次激发后24 h,腹腔注射给予各组小鼠200 μL 麻醉预混液(50 mg/kg的三溴乙醇和0.5 mg/kg的右美托咪定),小鼠麻醉状态下打开胸腔进行心尖取血后,小鼠全血在室温下静置2~4 h,在4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机1 000 $\times g$,离心10 min,取上清分装保存至-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱,以备后续血清学检查;

留取小鼠右肺中叶,放入40 g/L多聚甲醛固定24 h后,进行石蜡包埋,以备后续病理检验。

1.4 肺部组织苏木素-伊红染色和气道炎症评分方法

苏木素-伊红(H&E)染色步骤如下:小鼠肺组织石蜡切片脱蜡复水,苏木素染色8 min,冲洗5 s,盐酸乙醇分化2 s,冲洗20 s,蓝化液中返蓝30 s,冲洗30 s,伊红染色液染色5 min,冲洗5 s,进入梯度酒精和二甲苯快速脱水和透明化,中性树胶封片,晾干后,使用Pannoramic数字扫片机扫描获取图像。小鼠气道炎症等级评分具体细则如下:0分,支气管或血管周围未见炎症细胞浸润;1分,支气管或血管周围局灶性炎症细胞,未达完整一圈;2分,支气管或血管周围有一层完整的炎性细胞;3分,支气管或血管周围有2~4层炎性细胞;4分,支气管或血管周围有4层以上的炎性细胞。

1.5 外周血清总IgE的测定

采用ELISA检测试剂盒检测小鼠血清中总IgE

水平,在试剂盒说明书推荐下进行实验操作,具体步骤如下:提前1天进行IgE抗体包被,4℃孵育过夜;第2天,弃去溶液,洗板3次,甩干,加入封闭液,37℃孵育1 h;弃去溶液,洗板3次,甩干,加入标准品和待测样品,37℃孵育2 h;弃去溶液,洗板5次,甩干,加入HRP标记的检测抗体工作液,37℃孵育1 h;弃去溶液,浸泡洗板7次,甩干,加入底物,避光37℃孵育30 min后,加入终止液。在450 nm波长下检测样品OD值。

1.6 qRT-PCR检测小鼠肺组织炎症因子水平

剪取约20 mg小鼠肺组织研磨,根据细胞/组织总RNA提取试剂盒说明书指导,提取RNA,逆转录1 000 ng RNA样品为cDNA,稀释cDNA模板,上样浓度为10 ng/μL进行Real-time PCR反应,反应条件如下:第一步,95℃反应30 s,第二步,95℃反应10 s,第三步,60℃反应30 s,第二步和第三步连续重复40个循环,95℃反应15 s,60℃反应1 min,反应终止。炎症因子小鼠引物序列见表1。

表1 qRT-PCR引物序列

Table 1 Primer sequences for qRT-PCR

Gene	Forward	Reverse
<i>IL-4</i>	5'-CTGGATTCATCGAGAAGCTG-3'	5'-TTTGCATGATGCTCTTTAGG-3'
<i>IL-5</i>	5'-CTCTGTTGACAAGCAATGAGACG-3'	5'-TCTTCAGTATATCTAGCCCCTG-3'
<i>IL-13</i>	5'-CTTAAGGAGCTTATTGAGGAG-3'	5'-CATTGCAATTGGAGATGTTG-3'
<i>Rpl13a</i>	5'-CCTATGACAAGAAAAAGCGG-3'	5'-CAGGTAAGCAAACCTTTCTGG-3'

1.7 肺部组织马松染色和胶原沉积评分

小鼠石蜡切片常规脱蜡复水后,根据马松(Masson's trichrome)染色试剂盒说明书推荐进行操作,具体步骤如下:Weigert铁苏木素染色8 min,酸性乙醇分化5 s,水洗5 s,蓝化液返蓝5 min,水洗1 min,丽春红品红溶液染色7 min,弱酸工作液洗1 min,磷钼酸溶液洗1 min,弱酸工作液洗1 min,苯胺蓝溶液染色2 min,酸工作液洗1 min;95%乙醇快速脱水,无水乙醇脱水3次,每次5 s,二甲苯透明3次,每次1 min,最后中性树胶封片,待片子过夜晾干后,使用Pannoramic数字扫片机扫描获取图像。小鼠肺组织胶原沉积评分具体细则如下:1分,支气管或血管周围可见一层蓝染的胶原纤维;2分,胶原纤维穿过支气管黏膜下层浸润1~3层细胞;3

分,胶原纤维穿过支气管黏膜下层浸润3~5层细胞;4分,胶原纤维浸润至5层以上的支气管周围细胞。

1.8 肺部组织气管腔形态学的指标检测

每张切片选取3个视野,采用Image J软件对气道进行形态学参数分析,测定气管腔的内周长、支气管壁面积、支气管平滑肌层面积,分别用气管腔的内周长对支气管壁面积和支气管平滑肌层面积进行标准化,计算得到支气管壁厚度和支气管平滑肌层厚度。

1.9 统计学分析

本研究采用GraphPad Prism软件(9.3.0版)进行统计学分析及制图。各指标以均数±标准误(Mean±SEM)表示,如数据符合正态分布,两独立

样本比较进行 t 检验或带 Welch 校正的非配对 t 检验, 各组间进行单因素方差分析(ANOVA), 随后采用 Tukey 多重比较检验进行两两比较, 若数据不满足正态性和方差齐性, 则采用 Kruskal Wallis 检验, $P < 0.05$ 时, 为差异具有统计学意义。

2 结果

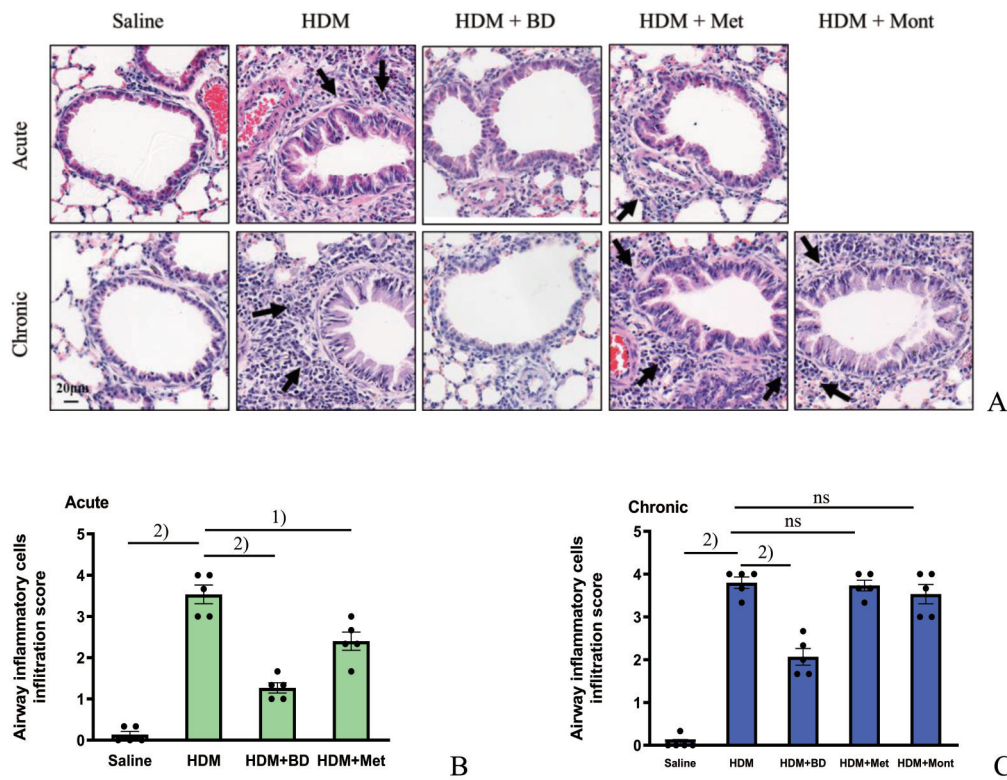
2.1 哮喘小鼠肺组织的典型病理学特征

H&E 染色结果显示, 相比正常组(Saline)小鼠, HDM 诱导过敏性哮喘小鼠的肺组织表现出典型的哮喘病理特征, 包括气道及伴行血管周围可见大量炎症细胞浸润; 可见气道壁增厚、气道平滑肌层增厚、气道黏膜皱襞增加, 管腔狭窄以及黏膜脱落; 肺泡区域可见肺泡壁变薄(图 2A)。布地奈德(Budesonide)是临床哮喘治疗的一线药物, 本研究中其作为药物对照组。与急性或慢性的 HDM 组相比, 观察到药物对照组(HDM + BD)的气道炎症细胞浸润水平均有所减轻; 而二甲双胍干预组(HDM + Met)中, 急性组可见气道炎症细胞浸润减少, 慢性组仍可见明显的气道炎症细胞浸润。接着, 我们分别对急性组和慢性组的小鼠气道炎症细胞进行等级评分, 进行 ANOVA 分析后两两进行 Tukey 多重比较检验。在急性组小鼠模型($F_{acute} = 70.060, P < 0.000 1$; 图 2B)中, 相比正常组小鼠, HDM 组小鼠肺组织气道炎症浸润分数升高(0.13 ± 0.08 vs. $3.53 \pm 0.23, P < 0.000 1$; 图 2B); 相比 HDM 组小鼠, HDM + BD 组小鼠气道炎症浸润分数降低(3.53 ± 0.23 vs. $1.27 \pm 0.13, P < 0.000 1$; 图 2B), HDM + Met 组小鼠气道炎症浸润分数同样降低(3.53 ± 0.23 vs. $2.40 \pm 0.22, P = 0.00 2$; 图 2B), HDM + BD 组小鼠气道炎症浸润分数降低程度更大。在慢性组小鼠模型($F_{chronic} = 101.500, P < 0.000 1$; 图 2C)中, 相比正常组小鼠, HDM 组小鼠肺组织气道炎症浸润分数升高(0.07 ± 0.07 vs. $3.80 \pm 0.13, P < 0.000 1$; 图 2C); 相比 HDM 组小鼠, HDM + BD 组小鼠气道炎症浸润分数降低(3.80 ± 0.13 vs. $2.07 \pm 0.19, P < 0.000 1$; 图 2C), 而 HDM + Met 组和 HDM + Mont 组小鼠气道炎症浸润分数差异没有统计学意义(3.80 ± 0.13 vs. $3.73 \pm 0.13, P > 0.05$; 3.80 ± 0.13 vs. $3.53 \pm 0.23, P > 0.05$; 图 2C)。

2.2 二甲双胍显著降低急性哮喘小鼠的 IgE 水平和 2 型炎症因子转录水平

采用 ELISA 方法检测小鼠血清总 IgE 水平, 以评估哮喘小鼠模型中各组小鼠的过敏状态, 即小鼠体内因 HDM 诱导以及药物干预等引起的变态反应的不同水平。急性和慢性模型各处理组与其对应正常组平均 IgE 水平标准化, 得出对应的变化倍数, 在急性组小鼠模型($F_{acute} = 104.400, P < 0.000 1$; 图 3A)中, 相比正常组小鼠, HDM 组小鼠血清总 IgE 水平增高倍数增大, 差异具有统计学意义(1.00 ± 0.08 vs. $9.89 \pm 0.63, P < 0.000 1$; 图 3A); 相比 HDM 组小鼠, HDM + BD 组小鼠血清总 IgE 水平降低, 差异具有统计学意义(9.89 ± 0.63 vs. $1.67 \pm 0.09, P < 0.000 1$; 图 3A), HDM + Met 组小鼠血清总 IgE 水平降低, 差异具有统计学意义(9.89 ± 0.63 vs. $2.99 \pm 0.47, P < 0.000 1$; 图 3A), HDM + BD 组小鼠血清总 IgE 水平降低程度更大。在慢性组小鼠模型($F_{chronic} = 11.640, P < 0.000 1$; 图 3B)中, 相比正常组小鼠, HDM 组小鼠血清总 IgE 水平增高倍数增高, 差异具有统计学意义(1.00 ± 0.06 vs. $59.07 \pm 10.20, P < 0.000 1$; 图 3B); 相比 HDM 组小鼠, HDM + BD 组小鼠血清总 IgE 水平降低, 差异具有统计学意义(59.07 ± 10.20 vs. $13.60 \pm 3.82, P = 0.00 1$; 图 3B), 而 HDM + Met 组和 HDM + Mont 组小鼠血清总 IgE 水平, 差异没有统计学意义(59.07 ± 10.20 vs. $38.74 \pm 7.12, P > 0.05$; 59.07 ± 10.20 vs. $34.68 \pm 7.15, P > 0.05$; 图 3B), 该结果与气道炎症评分相一致。二甲双胍的干预在急性过敏性哮喘模型中可显著抑制 HDM 诱导的总 IgE 水平, 在慢性模型中二甲双胍和孟鲁司特钠不能抑制总 IgE 水平。我们还对急性和慢性过敏性哮喘模型各处理组小鼠血清总 IgE 水平增高水平进行非配对 t 检验, 可见相比急性过敏性哮喘模型, 慢性模型小鼠血清总 IgE 水平增高水平更显著(HDM 组: $P = 0.001$, HDM + BD 组: $P = 0.014$, HDM + Met 组: $P = 0.001$; 图 3C)。

结合前文中急性和慢性过敏性哮喘模型各处理组中不同的炎症细胞浸润表现和总 IgE 水平, 急性模型中, 可见二甲双胍和孟鲁司特钠的干预显著改善 HDM 诱导的炎症效应和过敏反应, 而在慢性模型中则未观察到显著的作用。我们进一步对急性过敏性哮喘小鼠各组 2 型炎症因子转录水平进



(A) showed representative pictures of H&E staining lung sections of each group. The black arrows indicated the infiltrated inflammatory cells. B&C showed the airway inflammatory cells infiltration score of acute (B) and chronic (C) HDM-induced asthma model, respectively. Data were presented as mean \pm SEM ($n=5$ /group). Tukey's multiple comparison test after ANOVA was used to compare different treatment groups in acute or chronic. Unpaired t-test was used for comparison between the same treatment groups of acute and chronic. ¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.0001$, ns stands for no significance. S: Saline; H: HDM; H+B: HDM+Budesonide; H+M: HDM+Metformin; H+Mo: HDM+Montelukast.

图2 HDM 诱导急性和慢性哮喘小鼠模型的肺组织病理学特征和炎症评分

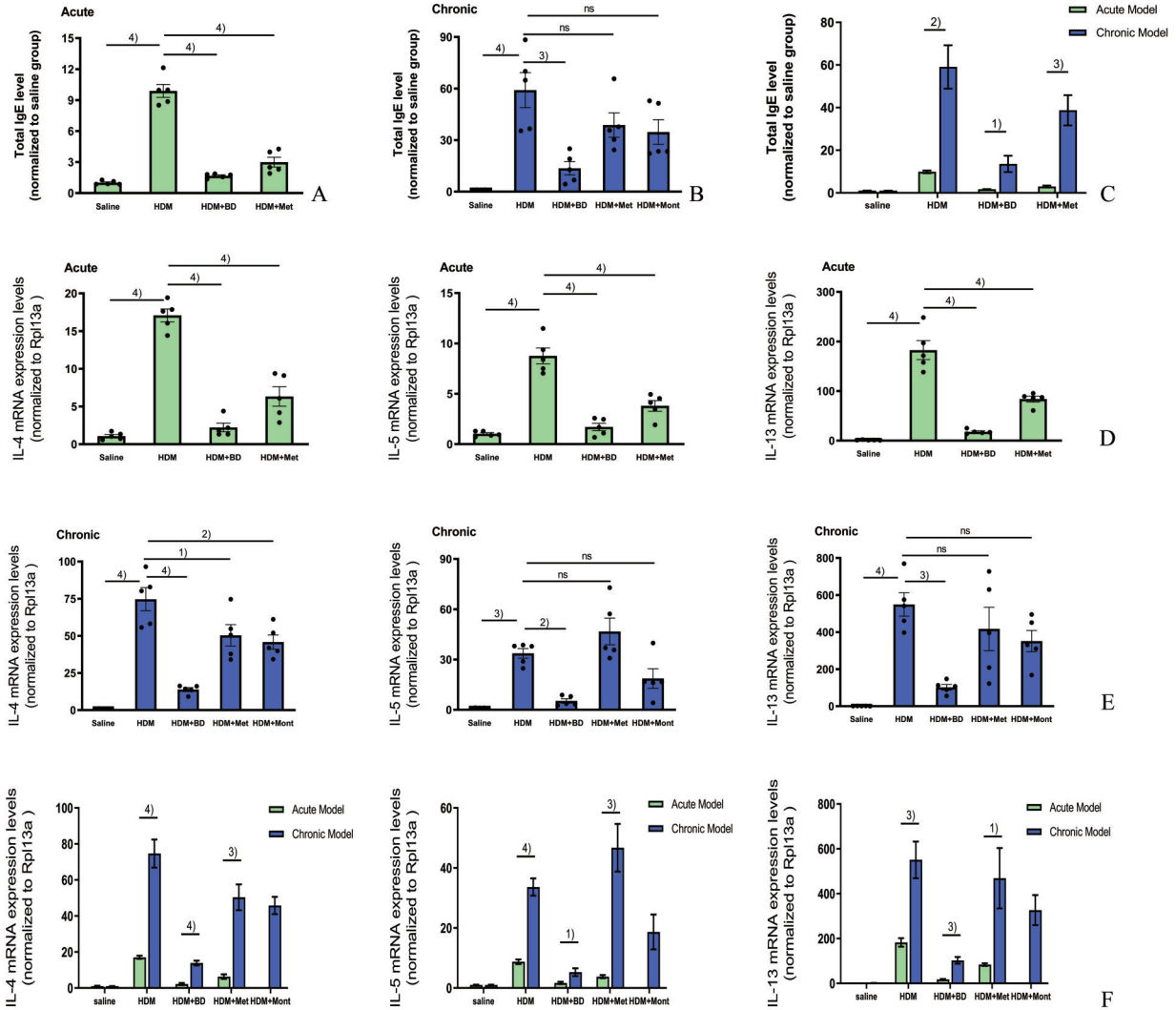
Fig. 2 Lung histopathology and inflammatory score of acute and chronic HDM-induced asthma mouse models

行验证,可见相比 Saline 组, HDM 组的 2 型炎症因子包括 *IL-4*、*IL-5*、*IL-13* 的 mRNA 转录水平均有升高 (*IL-4*: 1.08 ± 0.21 vs. 17.07 ± 0.86 ; *IL-5*: 1.03 ± 0.12 vs. 8.76 ± 0.79 ; *IL-13*: 1.08 ± 0.24 vs. 182.57 ± 19.05 , $P < 0.0001$; 图 3D); 相比 HDM 组, HDM + BD 组 *IL-4*、*IL-5*、*IL-13* 的 mRNA 转录水平均有降低 (*IL-4*: 17.07 ± 0.86 vs. 2.23 ± 0.57 ; *IL-5*: 8.76 ± 0.79 vs. 1.70 ± 0.37 ; *IL-13*: 182.57 ± 19.05 vs. 17.87 ± 1.94 , $P < 0.0001$; 图 3D); 相比 HDM 组, HDM + Met 组 *IL-4*、*IL-5*、*IL-13* 的 mRNA 转录水平均有降低 (*IL-4*: 17.07 ± 0.86 vs. 6.33 ± 1.30 ; *IL-5*: 8.76 ± 0.79 vs. 3.80 ± 0.53 ; *IL-13*: 182.57 ± 19.05 vs. 83.85 ± 5.98 , $P < 0.0001$; 图 3D)。在慢性过敏性哮喘的各处理组中, 相比 Saline 组, HDM 组的 2 型炎症因子包括 *IL-4*、*IL-5*、*IL-13* 的 mRNA 转录水平均有升高 (*IL-*

4: 1.02 ± 0.05 vs. 74.69 ± 7.78 ; *IL-5*: 1.04 ± 0.09 vs. 33.65 ± 2.86 ; *IL-13*: 1.18 ± 0.25 vs. 548.94 ± 63.26 , $P < 0.001$; 图 3E); 相比 HDM 组, HDM + BD 组 *IL-4*、*IL-5*、*IL-13* 的 mRNA 转录水平均有降低 (*IL-4*: 74.69 ± 7.78 vs. 13.87 ± 1.30 ; *IL-5*: 33.65 ± 2.86 vs. 5.26 ± 1.30 ; *IL-13*: 548.94 ± 63.26 vs. 102.57 ± 15.13 , $P < 0.01$; 图 3E); 相比 HDM 组, HDM + Met 组 *IL-4* mRNA 转录水平降低 (*IL-4*: 74.69 ± 7.78 vs. 50.36 ± 7.18 , $P < 0.05$; 图 3E), *IL-5*、*IL-13* mRNA 转录水平差异无统计学意义 (*IL-5*: 33.65 ± 2.86 vs. 46.71 ± 7.95 ; *IL-13*: 548.94 ± 63.26 vs. 416.99 ± 116.74 , $P > 0.05$; 图 3E); 相比 HDM 组, HDM + Mont 组 *IL-4* mRNA 转录水平降低 (*IL-4*: 74.69 ± 7.78 vs. 45.82 ± 4.79 , $P < 0.01$; 图 3E), *IL-5*、*IL-13* mRNA 转录水平差异无统计学意义 (*IL-5*: 33.65 ± 2.86 vs. $18.68 \pm$

5.80; *IL-13*: 548.94±63.26 vs. 351.32±57.56, $P > 0.05$;图3E)。我们对急性和慢性过敏性哮喘模型各处理组小鼠2型炎症因子*IL-4*、*IL-5*、*IL-13*转录水平进行非配对*t*检验,可见相比急性过敏性哮喘模型,慢性模型小鼠*IL-4* mRNA转录水平增高(HDM组: $P < 0.0001$,HDM+BD组: $P < 0.0001$,

HDM+Met组: $P=0.0002$;图3F);慢性模型小鼠*IL-5* mRNA转录水平增高(HDM组: $P < 0.0001$,HDM+BD组: $P=0.031$,HDM+Met组: $P=0.0007$;图3F);慢性模型小鼠*IL-13* mRNA转录水平增高(HDM组: $P=0.0005$,HDM+BD组: $P=0.0005$,HDM+Met组: $P=0.022$;图3F)。



A&B showed the total IgE level in serum of acute (A) and chronic (B) HDM-induced asthma model, respectively. (C) showed the different total IgE levels from each treatment group of between acute and chronic HDM-induced asthma mouse. D&E showed the mRNA expression level of type 2 cytokines, including *IL-4*, *IL-5* and *IL-13* in acute (D) and chronic (E) HDM-induced asthma model, respectively. (F) showed the different type 2 cytokines mRNA expression levels, including *IL-4*, *IL-5* and *IL-13* from each treatment group of between acute and chronic HDM-induced asthma mouse. Data were presented as mean ± SEM ($n=5$ /group). Tukey's multiple comparison test after ANOVA was used to compare different treatment groups in acute or chronic model. Unpaired *t*-test was used for comparison between the same treatment groups of acute and chronic. ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$, ⁴⁾ $P < 0.0001$, ns stands for no significance. S: Saline; H: HDM; H+B: HDM+Budesonide; H+M: HDM+Metformin; H+Mo: HDM+Montelukast.

图3 HDM诱导急性和慢性哮喘小鼠模型的总IgE水平和2型炎症反应比较

Fig. 3 Comparison of total IgE level and type 2 response in acute and chronic HDM-induced asthma mouse models

2.3 哮喘小鼠的胶原沉积染色和评分

我们用马松染色试剂盒进行小鼠模型肺组织中的胶原染色,表征在急性和慢性过敏性哮喘小鼠模型肺组织中气道重塑的病理特征变化。马松染色结果显示,相比正常组(Saline)小鼠,HDM诱导过敏性哮喘小鼠的肺组织表现出典型的哮喘气道及血管周围胶原沉积的重塑现象,布地奈德干预一定程度减轻了过敏性哮喘小鼠肺组织的胶原沉积(图4A)。我们分别对急性组和慢性组的小鼠气道胶原沉积水平进行等级评分,采用ANOVA分析并两两进行Tukey多重比较检验。在急性组小鼠模型($F_{acute}=19.730, P<0.0001$;图4B)中,相比正常组小鼠,HDM组小鼠气道胶原沉积分数升高(1.07 ± 0.07 vs. $2.40\pm 0.16, P<0.0001$;图4B);相比HDM组小鼠,HDM+BD组小鼠气道胶原沉积分数降低(2.40 ± 0.16 vs. $1.20\pm 0.08, P<0.0001$;图4B),HDM+Met组小鼠气道胶原沉积分数减低,差异没有统计学意义(2.40 ± 0.16 vs. $1.87\pm 0.20, P=0.067$;图4B)。在慢性组小鼠模型($F_{chronic}=33.090, P<0.0001$;图4C)中,相比正常组小鼠,HDM组小鼠气道胶原沉积分数升高(1.13 ± 0.08 vs. $3.07\pm 0.19, P<0.0001$;图4C);相比HDM组小鼠,HDM+BD组小鼠气道胶原沉积分数降低(3.07 ± 0.19 vs. $1.93\pm 0.22, P=0.002$;图4C),HDM+Met组和HDM+Mont组小鼠气道胶原沉积分数,差异没有统计学意义(3.07 ± 0.19 vs. $3.80\pm 0.13, P>0.05$; 3.07 ± 0.19 vs. $3.00\pm 0.24, P>0.05$;图4C)。二甲双胍和孟鲁司特钠的干预在过敏性哮喘模型中不能抑制HDM诱导的气道重塑效应。我们对急性和慢性过敏性哮喘模型各处理组小鼠气道胶原沉积分数进行非配对 t 检验,可见与急性过敏性哮喘模型相比,慢性模型小鼠气道胶原沉积效应增强(HDM组: $P=0.030$,HDM

+BD组: $P=0.014$,HDM+Met组: $P<0.0001$;图4D)。

2.4 各组小鼠气道形态学改变

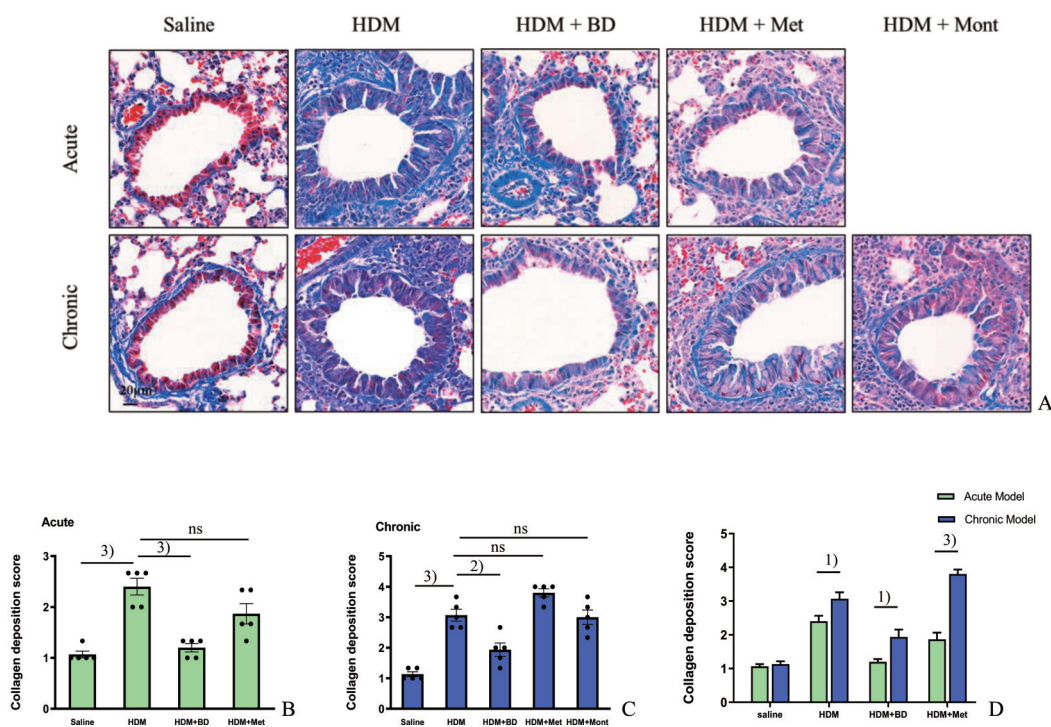
我们采用Image J软件,对急性和慢性各处理组小鼠的肺组织马松染色的病理切片的3个不同视野中的气道进行形态学参数检测,计算得到不同处理组小鼠的支气管壁厚度和支气管平滑肌层厚度。结果显示,在急性过敏性哮喘小鼠的支气管壁厚度比较中($F_{acute}=6.259, P=0.005$;表2),相比正常组,HDM组支气管壁厚度增加($P=0.003$;表2);相比HDM组,HDM+BD组和HDM+Met组支气管壁厚度差异均无统计学意义($P>0.05$;表2);在急性过敏性哮喘小鼠的支气管平滑肌厚度比较中($F_{acute}=6.778, P=0.004$;表3),相比正常组,HDM组支气管平滑肌厚度增加($P=0.002$;表3);相比HDM组,HDM+BD组和HDM+Met组支气管平滑肌厚度差异均无统计学意义($P>0.05$;表3)。在慢性过敏性哮喘小鼠的支气管壁厚度比较中($F_{chronic}=12.270, P<0.0001$;表2),相比正常组,HDM组支气管壁厚度增加($P=0.009$;表2);相比HDM组,HDM+BD组、HDM+Met组和HDM+Mont组小鼠支气管壁厚度差异均无统计学意义($P>0.05$;表2);在慢性过敏性哮喘小鼠的支气管平滑肌厚度比较中($F_{chronic}=14.770, P<0.0001$;表3),相比正常组,HDM组支气管平滑肌厚度增加($P<0.0001$;表3);相比HDM组,HDM+BD组和HDM+Met组支气管平滑肌厚度降低,差异具有统计学意义($P=0.006, P=0.033$;表3),而HDM+Mont组支气管平滑肌厚度差异均无统计学意义($P>0.05$;表3)。我们对急性和慢性过敏性哮喘模型各处理组小鼠支气管形态学参数进行非配对 t 检验,差异均无统计学意义($P>0.05$)。

表2 急性和慢性过敏性哮喘小鼠各组的支气管壁厚度

Table 2 Bronchial wall thickness between acute and chronic allergic asthma mice [$(\bar{x} \pm s), n=5, \text{mm}$]

Groups	Acute	Chronic
Saline	0.014 61 \pm 0.001 12	0.018 00 \pm 0.000 79
HDM	0.038 03 \pm 0.006 42 ¹⁾	0.038 64 \pm 0.003 94 ¹⁾
HDM+BD	0.024 08 \pm 0.001 03 ^{ns}	0.031 02 \pm 0.004 58 ^{ns}
HDM+Met	0.024 37 \pm 0.003 98 ^{ns}	0.036 71 \pm 0.005 16 ^{ns}
HDM+Mont		0.055 22 \pm 0.003 20 ^{ns}

¹⁾ $P<0.01$, ns: stands for no significance.



(A) showed representative pictures of Masson’s trichrome staining lung sections of each group. B&C showed the collagen deposition score of acute (B) and chronic (C) HDM-induced asthma model, respectively. D showed the different collagen deposition score every same treatment group of between acute and chronic HDM-induced asthma mice. Data was presented as mean ± SEM (n=5/group). Tukey’s multiple comparison test after ANOVA was used to compare different treatment groups in acute or chronic. Unpaired t-test was used for comparison between the same treatment groups of acute and chronic. ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01, ³⁾P<0.000 1, ns: stands for no significance. S: Saline; H: HDM; H+B: HDM+Budesonide; H+M: HDM+Metformin; H+Mo: HDM+Montelukast.

图4 HDM 诱导急性和慢性哮喘小鼠模型的胶原沉积水平比较

Fig. 4 Comparison of collagen deposition levels in HDM-induced acute and chronic asthma mouse models.

表3 急性和慢性过敏性哮喘小鼠各组的支气管平滑肌层厚度

Table 3 Bronchial smooth muscle thickness between acute and chronic allergic asthma mice [(x̄ ± s), n=5, mm]

Groups	Acute	Chronic
Saline	0.007 05 ± 0.000 48	0.008 49 ± 0.000 66
HDM	0.025 46 ± 0.005 34 ²⁾	0.036 73 ± 0.004 48 ³⁾
HDM+BD	0.014 01 ± 0.001 33 ^{ns}	0.019 99 ± 0.003 10 ²⁾
HDM+Met	0.015 56 ± 0.001 88 ^{ns}	0.023 31 ± 0.003 00 ¹⁾
HDM+Mont		0.034 11 ± 0.002 22 ^{ns}

Tukey’s multiple comparison test after ANOVA was used to compare different treatment groups in acute or chronic. Unpaired t-test was used for comparison between the same treatment groups of acute and chronic. ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01, ³⁾P<0.000 1, ns: stands for no significance.

3 讨论

近年来哮喘患病率在全球范围内有逐年增加的趋势,据统计,2019年全球超过3.39亿人患哮

喘,造成42万人死亡^[11],哮喘是一种严重危害公众健康的慢性呼吸道疾病,其发生发展机制非常复杂,构建哮喘动物模型对研究哮喘疾病发生发展的内在机制、药物治疗以及疗效评估提供重要理论依据和实验数据支撑。本研究使用了真实世界的过

敏原屋尘螨,成功构建了过敏性哮喘的小鼠模型,通过病理切片表征观察到HDM组小鼠典型的气道炎症和气道重塑病理特征,以及血清学检测显示小鼠体内的IgE水平显著升高。对比26 d的急性模型和59 d的慢性模型,慢性组小鼠较急性组小鼠气道炎症水平更高,支气管平滑肌层更厚。布地奈德的干预可以显著抑制急性组小鼠的气道炎症,但对急性组小鼠和慢性组小鼠的气道重塑效应均无显著改善作用。

传统观点认为气道炎症是哮喘发生发展的始动因素,气道炎症表现既是哮喘典型的病理特征,又是介导其他效应如气道重塑、气道高反应性的重要介质。下呼吸道炎症的发生可能由多种因素参与,如遗传易感性、环境暴露、可能存在的微生物影响或者生物系统内的一些小分子代谢物等^[12]。而大多数哮喘患者的气道炎症属于2型炎症^[13],由2型T淋巴细胞及相关的细胞因子(如IL-4、IL-5和IL-13等),以及其他各种炎症细胞(如嗜酸性粒细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞)介导。哮喘患者气道长期处于一个慢性炎症的状态,表现为常驻细胞和浸润细胞活性增加,相关细胞因子以及细胞外基质蛋白产生增加或过量存在^[12],而组织环境的改变,尤其是各种细胞因子和生长因子的增加,导致细胞内信号通路的激活,哮喘气道炎症的病理发生发展是个复杂的调控网络。

二甲双胍可活化AMP活化蛋白激酶^[14],促进肌成纤维细胞的自噬作用和细胞外基质的更新,下调 α -平滑肌动蛋白和胶原蛋白的表达,从而减轻博来霉素诱导的小鼠肺纤维化。二甲双胍还参与其他药理作用^[9, 15-16],如抗肿瘤、抗衰老、预防心血管疾病和神经保护作用等。主要是通过参与自噬作用发挥重要效应,但其具体作用机制或二甲双胍其他生物效应尚不明确。发现其对急性过敏性哮喘小鼠的气道炎症有显著改善,而对气道重塑效应没有显著改善作用,我们推测其抗炎作用可能与其增强自噬作用介导有关,其内在深入的作用机制值得我们继续探究。

孟鲁司特在临床上属于口服类白三烯受体拮抗剂,研究表明,孟鲁司特可以显著降低机体早期和晚期对过敏原的气道反应,在儿童哮喘中也有效^[17],孟鲁司特在哮喘患者中辅助使用可以减少皮

质类固醇剂量,可作为轻度持续性哮喘患者的单一疗法,或作为吸入性皮质类固醇的辅助药物。本研究观察到孟鲁司特钠的干预无法显著抑制慢性过敏性哮喘小鼠疾病的进展。考虑孟鲁司特虽然作用位点较明确,但由于哮喘是一种慢性异质性疾病,参与组分复杂多样,仅拮抗白三烯对限制哮喘疾病进展的作用有限。综上,在本研究中二甲双胍可显著降低急性哮喘小鼠炎症反应,而孟鲁司特临床上已纳入哮喘治疗的辅助药物,两者在本研究中慢性哮喘小鼠中有限的抗炎作用值得后续我们进行相关探讨和讨论。

尽管哮喘的气道炎症和气道重塑两大病理效应有着密不可分的联系,但近来在儿童哮喘研究中发现^[18],哮喘的气道炎症和气道重塑在发病的初期可能是两个相对独立的过程,即气道重塑指标在气道炎症指标升高前就可检测出。因此尽管本研究中布地奈德和两种药物对哮喘小鼠气道重塑并无显著的改善作用,但仍无法排除激素或相关靶向药物在哮喘早期对气道重塑形成的影响,因此急性哮喘模型小鼠仍可作为探讨哮喘早期病理效应,不仅是气道炎症还包括气道重塑的形成研究的有价值的重要研究工具。

我们的研究仍然存在不足。首先,模型炎症的持续强度和药物的给药时间点和剂量,均可能影响最终的药物疗效,因此需进一步对比分析不同给药方式和建模方案对药物药效的影响。其次,我们未在体外细胞实验中进行深入的药物作用机制的探究。另外,小鼠病理特征包括气道炎症细胞浸润和胶原沉积的观察和半定量统计分析存在一定观察者的主观偏差。最后,与大多数动物研究类似,我们在小鼠中进行相关的哮喘研究,动物实验与人体试验之间仍存在较大的差异,如何将动物实验中显示出疗效的药物进行临床转化仍有很长一段路。

综上所述,我们成功建立了急性和慢性两种HDM诱导的过敏性哮喘小鼠模型,观察到59 d的慢性模型相较于26 d的急性模型有更高水平的过敏性炎症反应和气道重塑效应;二甲双胍干预在急性哮喘模型组可以显著减轻气道炎症效应,但对急性模型和慢性模型小鼠的气道重塑均无显著改善作用;孟鲁司特在HDM慢性哮喘模型中对气道重塑无显著作用。

参考文献

- [1] Huang K, Yang T, Xu J, et al. Prevalence, risk factors, and management of asthma in China: a national cross-sectional study[J]. *Lancet (London, England)*, 2019, 394(10196): 407-418.
- [2] Olivieri M, Zock JP, Accordini S, et al. Risk factors for new-onset cat sensitization among adults: a population-based international cohort study[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2012, 129(2): 420-425.
- [3] Permaul P, Hoffman E, Fu C, et al. Allergens in urban schools and homes of children with asthma[J]. *Pediatr Allergy Immunol*, 2012, 23(6): 543-549.
- [4] McCracken JL, Veeranki SP, Ameredes BT, et al. Diagnosis and management of asthma in adults: a review[J]. *JAMA*, 2017, 318(3): 279-290.
- [5] Nials AT, Uddin S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge[J]. *Dis Model Mech*, 2008, 1(4-5): 213-220.
- [6] Gregory LG, Lloyd CM. Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung[J]. *Trends Immunol*, 2011, 32(9): 402-411.
- [7] Kuruvilla ME, Lee FE, Lee GB. Understanding asthma phenotypes, endotypes, and mechanisms of disease[J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2019, 56(2): 219-233.
- [8] Tan YY, Zhou HQ, Lin YJ, et al. FGF2 is overexpressed in asthma and promotes airway inflammation through the FGFR/MAPK/NF- κ B pathway in airway epithelial cells[J]. *Mil Med Res*, 2022, 9(1): 7.
- [9] Guo Y, Shi J, Wang Q, et al. Metformin alleviates allergic airway inflammation and increases Treg cells in obese asthma[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(4): 2279-2284.
- [10] Davino-Chiovatto JE, Oliveira-Junior MC, MacKenzie B, et al. Montelukast, leukotriene inhibitor, reduces LPS-Induced acute lung inflammation and human neutrophil activation[J]. *Arch Bronconeumol (Engl Ed)*, 2019, 55(11): 573-580.
- [11] WHO. Global Asthma Report 2019[EB/OL]. (2021-05-11) [2022-06-15]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/asthma>.
- [12] Bunyavanich S, Schadt EE. Systems biology of asthma and allergic diseases: a multiscale approach[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2015, 135(1): 31-42.
- [13] Fahy JV. Type 2 inflammation in asthma--present in most, absent in many[J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15(1): 57-65.
- [14] Rangarajan S, Bone NB, Zmijewska AA, et al. Metformin reverses established lung fibrosis in a bleomycin model[J]. *Nat Med*, 2018, 24(8): 1121-1127.
- [15] Bharath LP, Agrawal M, McCambridge G, et al. Metformin enhances autophagy and normalizes mitochondrial function to alleviate aging-associated inflammation[J]. *Cell Metab*, 2020, 32(1): 44-55.
- [16] Xue J, Li X, Liu P, et al. Inulin and metformin ameliorate polycystic ovary syndrome via anti-inflammation and modulating gut microbiota in mice[J]. *Endocr J*, 2019, 66(10): 859-870.
- [17] Glockler-Lauf SD, Finkelstein Y, Zhu J, et al. Montelukast and neuropsychiatric events in children with asthma: a nested case-control study[J]. *J Pediatr*, 2019, 209: 176-182.e4.
- [18] Malmström K, Pelkonen AS, Mäkelä MJ. Remodeling, inflammation and airway responsiveness in early childhood asthma[J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2013, 13(2): 203-210.

(编辑 余菁)