

• 基础实验研究论著 •

支气管肺泡灌洗术在哮喘小鼠模型中的应用*

鄧孟洁,邱 晨[△],刘雯雯

(暨南大学第二临床医学院/深圳市人民医院呼吸内科,广东深圳 518020)

摘要:目的 探讨哮喘小鼠模型支气管肺泡灌洗术标准化操作方法。方法 构建哮喘小鼠模型,使用 24 G 静脉留置针对小鼠全肺进行支气管肺泡灌洗术,共 3 次,每次 0.8 mL,反复抽注 3 次。支气管肺泡灌洗液(BALF)离心后取细胞沉淀进行涂片 HE 染色检查。结果 每只小鼠可顺利回收 1.8~2.1 mL BALF,回收率 75%~87.5%;哮喘小鼠 BALF 涂片可见大量嗜酸性粒细胞。结论 采用该方法可成功收集哮喘小鼠模型 BALF,可推广应用于其他疾病小鼠模型。

关键词:哮喘; 插管法; 气管内; 气管切开术; 小鼠; 支气管肺泡灌洗液

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.19.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)19-2305-02

Application of broncho-alveolar lavage in murine model of asthma*

Feng MengJie, Qiu Chen[△], Liu Wenwen

(Department of Respiratory Diseases, Second Clinical Medical College of Jinan University/Shenzhen People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518020, China)

Abstract: **Objective** To summarize a standard operating procedure(SOP) to gain broncho-alveolar lavage fluid(BALF) in murine model of asthma. **Methods** The murine model of asthma was generated. Broncho-alveolar lavage fluid(BALF) was taken by injecting saline solution through 24 G superficial vein catheter into murine airways, and slowly redrew the BALF into the connected syringe. 0.8 mL normal saline was used in every lavage, and the procedure was repeated 3 times. A mouse was lavaged three times. The collected BALF was centrifuged, and the resuspended cell pellet was used to perform cytopspins. **Results** 1.8—2.1 mL BALF was collected in every mouse, the recovery rate was 75%—87.5%. There were a lot of eosinophils in BALF of asthma murine model. **Conclusion** The SOP could provide a reliable and easy method to collect BALF from mice.

Key words: asthma; intubation, intratracheal; tracheotomy; mice; bronchoalveolar lavage fluid

哮喘是一种以可逆性气流受限为特征的气道 Th2 炎症,常伴有支气管肺泡灌洗液(BALF)相应改变,表现为嗜酸性粒细胞增多及 Th2 细胞因子[如白细胞介素(IL)-4、IL-5、IL-13 等]分泌增加^[1-2]。以动物模型进行哮喘机制研究时,常以 BALF 改变来判断造模是否成功、治疗是否有效^[3-4]。小鼠是最常用的哮喘模型动物^[5-6],因此小鼠 BALF 是最常用标本之一。但小鼠气管具有管径小、管壁薄、长度短、周围血管丰富等特点,不易获得合格的 BALF 标本。目前国内外尚未见专门针对小鼠肺泡灌洗术的报道。本课题组借鉴大鼠 BALF 灌洗方法^[7-8],对哮喘小鼠模型肺泡灌洗术进行了探讨。

1 材料与与方法

1.1 一般资料 取 6~8 周龄 SPF 级 Balb/c 雌性小鼠 20 只,按体质量编号后,按随机数字表法随机分为正常组和哮喘组,每组各 10 只。哮喘造模方法参考文献[9]。正常组小鼠以等量生理盐水(NS)替代卵清蛋白(OVA)作为致敏液及激发液,其余处理方法同哮喘组。所有小鼠在末次激发 48 h 后切开气管,插管后提取小鼠 BALF。

1.2 支气管肺泡灌洗 (1)小鼠腹腔注射水合氯醛(400 mg/kg),使小鼠快速过量麻醉致死。将处死的小鼠仰卧位置于解剖盘(蜡盘)上,图钉固定四肢末端。(2)用 70%乙醇消毒小鼠颈部皮肤,沿颈部正中纵行切开 1.0 cm 皮肤,切口下缘至胸腔入口处;用止血钳钝性分离皮下结缔组织和肌肉,暴露气管;分离气管两侧及气管与食管间结缔组织,游离气管;穿两根约

20 cm 长外科缝线于气管食管之间。(3)术者左手持眼科镊,夹住小鼠气管环状软骨远端气管,提起气管至略呈弧形;术者右手持 24 G 静脉留置套管针,以 30 度角从甲状软骨与环状软骨间结缔组织膜处进针,朝气管隆突方向送静脉留置针,进入气管约 3 mm;左手放下眼科镊,改握住静脉留置针尾端针翼,右手拔出留置针不锈钢针芯;左手使套管针以与气管平行的方向,轻柔缓慢向气管隆突方向递送,如有可感阻力,提示遇到气管隆突,此时应将套管向后退 2~3 mm。(4)将置于气管食管间的手术缝线拿起,分别在套管进入气管处、套管远端处结扎,尽可能扎紧以固定套管和气管。(5)以 1 mL 注射器抽吸 0.8 mL NS,接在静脉套管针进液端,将 NS 缓缓注入气管,停留 30 s 后将 NS 缓缓回抽,可见回抽出带乳白色泡沫状液体,重复灌洗 3 次,最后可回抽出 0.6~0.7 mL NS,转移至 EP 管中;重复以上步骤 2 次。(6)以 1 500 r/min 将 BALF 离心 10 min,可见离心管底部出现乳白色细胞沉淀,取上清液用于细胞因子检测,细胞沉淀经 100 μ L NS 重悬后涂片,在无菌操作台中风干后,用 75%乙醇固定,行 HE 染色。

2 结果

20 只小鼠气管插管均一次性成功,成功回收 BALF,成功率为 100%。每只小鼠实验过程耗时约 10 min,单人操作即可完成。气管套管与气管结合牢固,未发生滑脱。灌洗液回抽顺利,每只小鼠可收集 BALF 约 1.8~2.1 mL,回收率约 75%~87.5%,离心后可获得细胞(0.5~1) $\times 10^6$ 个,未见血液污染。

* 基金项目:广东省自然科学基金资助项目(No.10151802001000004)。 [△] 通讯作者, E-mail: szchester@163.com。

BALF 涂片检查,正常组见少量巨噬细胞(图 1),哮喘组见大量嗜酸性粒细胞(图 2)。

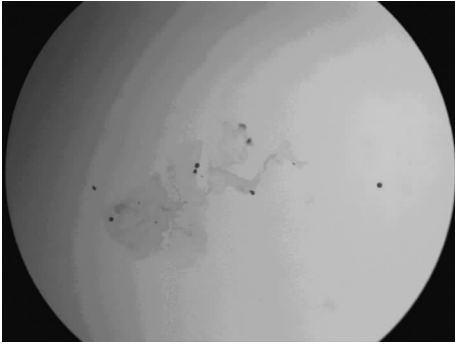


图 1 正常组 BALF 涂片(可见少量巨噬细胞,未见嗜酸性粒细胞)

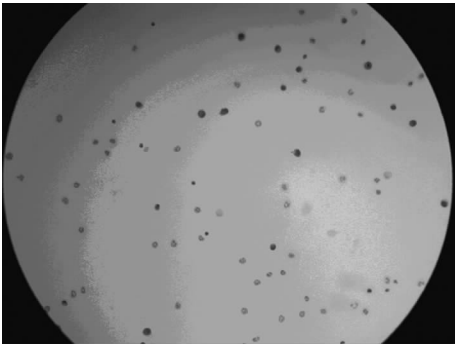


图 2 哮喘组 BALF 涂片(可见嗜酸性粒细胞和淋巴细胞,以嗜酸性粒细胞为主)

3 讨论

支气管肺泡灌洗术是研究呼吸系统疾病基本技术,本研究分别对哮喘小鼠和正常小鼠实施了支气管肺泡灌洗术,所得 BALF 涂片检查显示正常组 BALF 可见少量巨噬细胞,哮喘组则见大量嗜酸性粒细胞。笔者前期研究已证实,哮喘小鼠 BALF 炎性细胞总数、嗜酸性粒细胞数及 IL-4 水平均高于正常小鼠^[9]。上述结果提示哮喘造模成功,为后续研究打奠定了良好的基础。

回顾小鼠肺泡灌洗全过程,与大鼠肺泡灌洗术相比,基本过程相似,但须注意以下几点:(1)“净”,分离小鼠气管时,要注意保证气管与周围组织剥离干净,尽可能完全游离颈部气管。气管周围有较大的血管,若没有剥离干净,在行气管插管时,血管可能被眼科镊夹破或静脉套管针挑破,导致血液流出而干扰插管的视野,且血液进入气管将导致 BALF 污染,影响 BALF 细胞成分和炎性因子分析。此外,若周围组织剥离不净,则外科线结扎气管一套管时不易扎牢,套管易滑脱出小鼠气管,导致肺泡灌洗术失败。(2)“小”:小鼠气管直径(1.5 mm)小于大鼠气管(2~2.5 mm),因此要注意选取相应直径的套管针。24 G 静脉留置针常用于儿童输液,分为不锈钢针芯和套管两部分,套管外径约 0.7 mm,长度为 20 mm,针芯长于套管 1 mm,因此适用于小鼠气管插管。(3)“稳”:小鼠气管长度短于大鼠,因此 24 G 静脉套管易被送入气管深处,穿破气管,因此静脉套管一旦进入小鼠气管,需以与气管平行的方向,轻柔缓慢向气管隆突方向递送。如果有可感阻力,提示遇到气管隆突,此时应将套管向后退 2~3 mm,防止出现意外。此外,在进行肺泡灌洗时,要特别注意保护气管套管不被随手拔出,除使用外科

手术线固定气管和静脉套管外,以手握住气管套管的针翼也非常重要。(4)“少”:大鼠肺组织容量大于小鼠,因此大鼠单侧肺肺泡灌洗所用 NS 可达 2.5 mL,但小鼠肺泡灌洗量明显减少。笔者建议小鼠双侧肺的灌洗液量采用 0.8 mL,单肺的灌洗液量为 0.4 mL 左右。灌洗液量过大将导致肺内压力急剧升高,严重时可导致灌洗液由肺组织包膜渗入胸腔中。

若遇到一些意外情况,也需仔细分析原因,以便采取相应措施。(1)回抽不出 BALF 可能与以下原因有关:①气管套管送入气道太深;②在插管过程中,套管戳破气管,致使气道穿孔,注射器注入的液体由穿孔处漏入胸腔;③注射器回抽力度过大,导致静脉套管远端及气管远端变形,阻碍回抽 BALF。(2)BALF 被血液污染可能与以下原因有关:①气管周围血管损伤,血液渗漏入气管中;②肺部炎症性疾病导致血管通透性增加,使 BALF 中出现红细胞。后一种情况可通过观察肺组织切片是否存在出血性炎症而鉴别。(3)BALF 涂片发现细胞数量少可能与气管插管过深,导致灌洗肺叶减少有关。(4)BALF 涂片发现细胞破裂,胞浆丢失,仅剩细胞核,可能与气管套管管径太小,而 BALF 反复抽吸过频、速度过快,导致细胞受挤压而变形有关。

参考文献

- [1] Walsh GM. Targeting eosinophils in asthma: current and future state of cytokine- and chemokine-directed monoclonal therapy[J]. Expert Rev Clin Immunol, 2010, 6(5): 701-707.
- [2] Kim HY, DeKruyff RH, Umetsu DT. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity[J]. Nat Immunol, 2010, 11(7): 577-584.
- [3] Mattes J, Collison A, Plank M, et al. Antagonism of microRNA-126 suppresses the effector function of TH2 cells and the development of allergic airways disease[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(44): 18704-18706.
- [4] Lu TX, Hartner J, Lim EJ, et al. MicroRNA-21 limits in vivo immune response-mediated activation of the IL-12/IFN-gamma pathway, Th1 polarization, and the severity of delayed-type hypersensitivity[J]. J Immunol, 2012, 187(6): 3362-3365.
- [5] Kang JY, Kim JW, Kim JS, et al. Inhibitory effects of anti-immunoglobulin E antibodies on airway remodeling in a murine model of chronic asthma[J]. J Asthma, 2010, 47(4): 374-377.
- [6] Locke NR, Royce SG, Wainwright JS, et al. Comparison of airway remodeling in acute, subacute, and chronic models of allergic airways disease[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007, 36(5): 625-629.
- [7] 史菲, 邱晨. 大鼠支气管肺泡灌洗术标准化操作的探讨[J]. 中国现代医学杂志, 2002, 12(24): 67-68.
- [8] 刘文彬, 刘贵颖. 大鼠支气管肺泡灌洗方法的研究进展[J]. 临床肺科杂志, 2012, 17(4): 704-706.
- [9] 鄢孟洁, 史菲, 邱晨. 哮喘小鼠 CD4⁺ T 细胞中 microRNA-31 和 FOXP3 mRNA 的表达及相互关系的研究[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(5): 419-422.

(收稿日期: 2012-06-18)