

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.01284

呼吸道合胞病毒感染加重哮喘模型小鼠气道炎症及气道阻力的观察

景晓平¹,程伟伟¹,刘芳²,杨华²,何丽^{1*}

1. 上海市儿童医院,上海交通大学附属儿童医院中医科,上海 200040
2. 复旦大学附属公共卫生临床中心科学研究部,上海 202508

[摘要] **目的** 探讨呼吸道合胞病毒(RSV)感染加重哮喘模型小鼠气道炎症及气道阻力变化的影响。**方法** 6~8周龄雄性 BALB/c 小鼠 30 只,随机分为空白组、卵清蛋白(OVA)组(哮喘模型组)、OVA/RSV 组(RSV+哮喘模型组),每组 10 只。OVA 组用 OVA 致敏和激发;OVA/RSV 组在 OVA 致敏后隔日用 RSV 滴鼻,连续 3 次,复制急性病毒感染哮喘模型;空白组予等量 PBS。末次激发 24 h 后,用小鼠动物呼吸机(Buxco RC 系统)检测小鼠气道阻力;收集支气管肺泡灌洗液(BALF)进行细胞学分析;留取肺组织进行 H-E 染色、PAS 染色、VG 染色,观察肺组织炎症反应。**结果** OVA 组小鼠肺组织有炎性细胞浸润,气道可见黏液分泌物,气道周围可见胶原增生。OVA/RSV 组小鼠肺组织有明显炎性细胞浸润,肺泡腔明显狭窄,毛细血管扩张充血,气道可见明显黏液分泌物,气道周围胶原增生明显。OVA 组、OVA/RSV 组肺功能和 BALF 嗜酸粒细胞比例(EOS%)与空白组相比差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$),OVA/RSV 组气道阻力及 BALF 中 EOS%与 OVA 组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** RSV 感染能明显加重哮喘模型小鼠肺部组织炎症反应,同时使小鼠气道阻力明显增高。

[关键词] 呼吸道合胞病毒;哮喘;气道炎症;气道阻力

[中图分类号] R 562.25 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2015)12-1284-05

Aggravated airway inflammation and resistance in a respiratory syncytial virus infected murine asthma model

JING Xiao-ping¹, CHENG Wei-wei¹, LIU Fang², YANG Hua², HE Li^{1*}

1. Department of TCM, Shanghai Children's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200040, China
2. Department of Scientific Research, Public Health Clinical Center Affiliated to Fudan University, Shanghai 202508, China

[Abstract] **Objective** To explore the role of respiratory syncytial virus (RSV) infection in aggravating airway inflammation and airway resistance in murine asthma model. **Methods** A total of 30 6-8-week-old male BALB/c mice were equally divided into three groups randomly: the control group, ovalbumin (OVA) group (asthma group), and respiratory syncytial virus (RSV)/OVA group (RSV+asthma group). In OVA group, murine asthma model was established using an OVA sensitization; in OSV/RSV group, mice were firstly sensitized by OVA and subsequently infected with RSV intranasally for three times to make acute viral infection asthma model; and in control group, the mice received equal volume of PBS treatment. Twenty-four hours after the last challenge, the airway resistance was evaluated by mouse ventilator (Buxco RC). Inflammatory cell infiltration was measured in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). Pulmonary tissue samples were collected and stained with H-E, PAS or VG to observe inflammation of pulmonary tissues. **Results** Pulmonary tissue of mice in OVA group had inflammatory cell infiltration, airway mucus secretions were visible, and collagen was seen around the airway. Pulmonary tissue of mice in OVA/RSV group had significant inflammatory cell infiltration, alveolar stenosis, telangiectasia congestion, airway mucus secretions and collagen deposition. Lung function and the proportion of BALF eosinophils (EOS%) in OVA group and OVA/RSV group were significantly different from that of the control group ($P<0.05$, $P<0.01$). Airway resistance and the EOS% in OVA/RSV group were significantly different from those of the OVA group ($P<0.05$). **Conclusion** RSV infection can aggravate the airway inflammation and result in airway resistance in murine asthma model.

[Key words] respiratory syncytial viruses; asthma; airway inflammation; airway resistance

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(12):1284-1288]

[收稿日期] 2015-04-29 **[接受日期]** 2015-10-20

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(81303005),上海市自然科学基金(12ZR1425700)。Supported by National Natural Science Foundation of China for Young Scientists (81303005) and Natural Science Foundation of Shanghai (12ZR1425700)。

[作者简介] 景晓平,博士,主治医师。E-mail: xiaopingjdoctor@126.com

* 通信作者 (Corresponding author)。Tel: 021-62475103, E-mail: heli29@126.com

呼吸道感染是引起哮喘急性发作与加重的主要原因,近 80% 的儿童哮喘急性发作或加重与呼吸道感染有关^[1]。呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)是一种 RNA 病毒,属于副黏病毒科,是小儿呼吸道感染最重要的病原之一。RSV 感染与哮喘的发作存在明显的相关性^[2]。流行病学研究提示婴幼儿期 RSV 感染不仅是哮喘发生的危险因素,还是导致哮喘病情加重甚至死亡的重要原因。研究表明 RSV 感染对哮喘病理生理变化的影响受感染的时间、量以及气道免疫炎症本身状态影响,但由于缺乏标准化的疾病动物模型,目前有关 RSV 参与哮喘气道炎症的机制仍存在较多争议^[3-5]。本实验成功建立了哮喘合并 RSV 感染的 BALB/c 小鼠模型,从气道功能及炎症变化角度探讨了 RSV 感染在哮喘病理机制中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物 6~8 周龄雄性 BALB/c 小鼠(SPF 级)30 只,平均体质量(20±2) g,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供[SCXK(沪)2013-0016],实验在生物安全 2 级实验室进行。

1.2 主要试剂 卵清蛋白(OVA, V 级),美国 Sigma 公司。氢氧化铝,分析纯,美国 Sigma 公司,批号:030M1549。RSV A2 株,ATCC;喉癌细胞 Hep-2,中国科学院上海细胞库。戊巴比妥钠、乙酰甲胆碱(Mch),上海化学试剂公司;H-E、PAS、VG 染色液,上海化学试剂公司。切片机,德国 Leica 公司;超声雾化器,上海鱼跃医疗设备有限公司,型号:402AI;显微镜,德国 Leica 公司,型号:DFC320。小鼠动物呼吸机,Buxco RC 系统,美国 Buxco 公司。

1.3 病毒的细胞培养 Hep-2 细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 中培养,培养箱条件为 37℃、5% CO₂,细胞铺满单层后,将 RSV 接种于 Hep-2 细胞。继续在原条件下的维持液中培养,3~5 d 即可出现细胞病变,待病变达 100% 时收获病毒。参照臧娜等^[6]的方法,采用空斑试验测定病毒滴度,以空斑形成单位(PFU)表示,取 1×10⁶ PFU 病毒冻存于-80℃冰箱中,反复冻融 2 次,离心后取上清备用。

1.4 哮喘动物模型的建立及分组 30 只 BALB/c 小鼠随机分为 3 组,每组 10 只。参照并改良 Sun 等^[7]的方法建立哮喘模型:OVA/RSV 组分别于第 1、7、14 天腹腔注射 OVA 致敏液 0.2 mL[OVA 20

μg+氢氧化铝 2 mg,溶于 PBS,pH 7.2],休息 1 周,第 21 天起将实验小鼠置于特制的容器中,以 1% OVA(V 级)溶液 30 mL 雾化吸入,每日 1 次,每次 30 min,连续雾化激发 7 d,雾化过程中出现了较明显的头面抓痒、前肢缩抬、弓背、呼吸加深加快、安静少动等哮喘急性发作症状;第 29、31 天隔日予相同上述 OVA 雾化;第 28、30、32 天隔日给予浓度 1×10⁶ PFU、体积 50 μL/次,将 RSV 鼻腔滴入,共 3 次。OVA 组致敏、激发同 OVA/RSV 组,PBS 鼻腔滴入,激发频次、时间同上。空白组以 PBS 代替 OVA 致敏、激发和 PBS 鼻腔滴入,激发频次、时间同上。

1.5 支气管肺泡灌洗液(BALF)的细胞学变化 每次注入 1 mL 预冷无菌 PBS 液,按 0.4、0.3、0.3 mL 反复灌洗 3 次,回收 BALF,2 000×g 离心 5 min,细胞沉淀用 1 mL PBS 液重悬后进行检测。

1.6 小鼠肺组织病理学变化的观察 取各组小鼠的肺组织,经固定、脱水、包埋、切片后,按操作常规行 H-E、PAS、VG 染色,分别观察气道周围嗜酸粒细胞、气道黏液分泌物及气道周围胶原增生的变化。

1.7 小鼠气道阻力测定 每只小鼠腹腔注射 0.5~0.8 mL 1.5% 戊巴比妥钠麻醉后,平放于试验台,以 Y 型管作为气管插管,一端连接动物微型呼吸机,另一端连接生理记录仪,记录气管内压力的变化。待呼吸平稳后,以 0.04 mg/mL 磷酸组胺溶液雾化吸入,依次在 30、60、120、120、120 s 喷入后记录气管内压力;在 60 s 喷入生理盐水作为对照,作标准曲线作为对照。在小鼠一侧静脉置入特制的静脉插管,依次给予 3.125、6.25、12.50 mg/L Mch,每次间隔 4 min,观察给药后小鼠气道阻力变化。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间行 *t* 检验;计数资料采用 χ^2 检验。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 RSV 与 Hep-2 细胞孵育后的变化 感染前 Hep-2 细胞贴壁生长,形成单层细胞时镜下可见细胞铺满底壁,排列规则紧密,互相嵌合成多边形,呈铺路石状;RSV A2 感染细胞后,出现典型的融合病变,镜下可见细胞边界不清,病变细胞相互融合呈“多核巨细胞”的合胞体(图 1)。

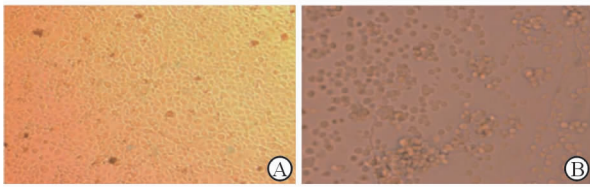


图 1 RSV 与 Hep-2 细胞孵育后的变化

Fig 1 Changes of Hep-2 cells after treatment with RSV

A: Hep-2 cells; B: Syncytium. RSV: Respiratory syncytial virus. Original magnification: $\times 100$

2.2 BALF 的炎症细胞变化 与空白组相比, OVA 组和 OVA/RSV 组小鼠 BALF 中嗜酸粒细胞比例 (EOS%) 升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), OVA/

RSV 组与 OVA 组相比亦升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 肺组织病理变化 空白组小鼠肺间质无炎性细胞浸润, 肺泡壁光滑, 毛细血管无扩张, 气道无黏液分泌物, 气道周围胶原无增生 (图 2A₁、2A₂、3A₁、3A₂、4A₁、4A₂)。OVA 组小鼠肺间质已有炎性细胞浸润, 气道可见黏液分泌物, 气道周围可见胶原增生 (图 2B₁、2B₂、3B₁、3B₂、4B₁、4B₂)。OVA/RSV 组小鼠肺组织出现典型间质性肺炎表现, 肺泡腔明显狭窄, 炎性细胞浸润明显, 毛细血管扩张充血, 气道可见明显黏液分泌物, 气道周围胶原增生明显 (图 2C₁、2C₂、3C₁、3C₂、4C₁、4C₂)。

表 1 各组小鼠 BALF 的炎症细胞变化

Tab 1 Changes of inflammatory cells in bronchial alveolar lavage fluid (BALF) in mice of different groups

Group	Eosinophilic granulocyte	Mononuclear cell	Neutrophile granulocyte	Lymphocyte
Control	0.00 ± 0.00	86.40 ± 4.22	3.80 ± 1.84	8.85 ± 3.42
OVA	24.20 ± 7.66*	40.14 ± 12.61*	5.60 ± 3.24	30.08 ± 5.28
OVA/RSV	41.82 ± 5.20** Δ	30.60 ± 7.25** Δ	7.20 ± 4.42	20.81 ± 4.72

%, $n=10$, $\bar{x} \pm s$

OVA: Ovalbumin; RSV: Respiratory syncytial virus. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs OVA group

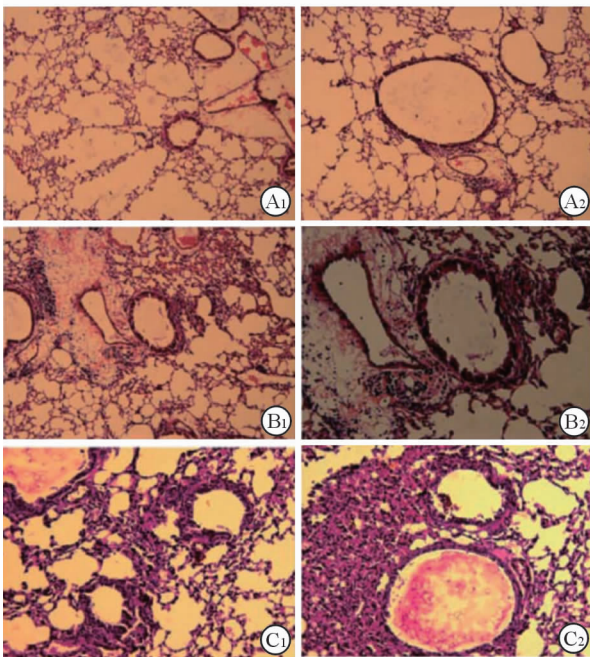


图 2 各组小鼠气道周围嗜酸粒细胞 (EOS) 浸润情况 (H-E 染色)

Fig 2 Peripheral airway eosinophils (EOS) infiltration in mice of different groups (H-E staining)

A₁, A₂: Control group; B₁, B₂: OVA group; C₁, C₂: OVA/RSV group. OVA: Ovalbumin; RSV: Respiratory syncytial virus. Original magnification: $\times 100$ (A₁, B₁, C₁), $\times 200$ (A₂, B₂, C₂)

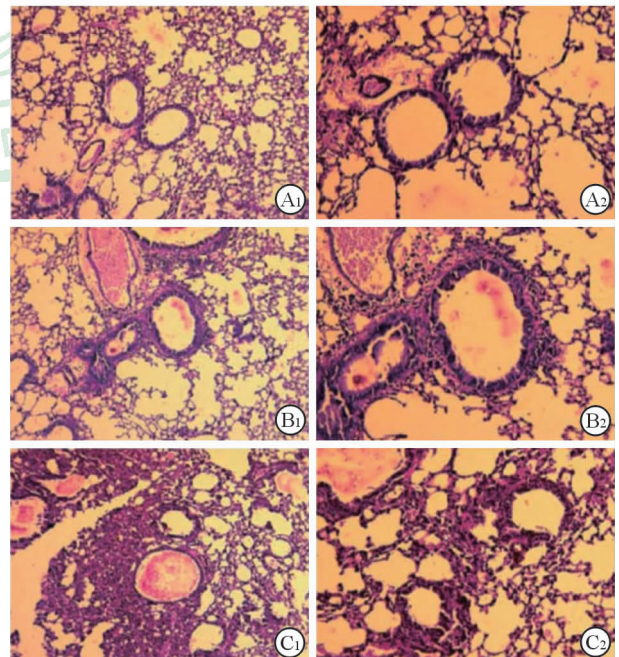


图 3 各组小鼠气道黏液分泌情况 (PAS 染色)

Fig 3 Airway mucus secretion in mice of different groups (PAS staining)

A₁, A₂: Control group; B₁, B₂: OVA group; C₁, C₂: OVA/RSV group. OVA: Ovalbumin; RSV: Respiratory syncytial virus. Original magnification: $\times 100$ (A₁, B₁, C₁), $\times 200$ (A₂, B₂, C₂)

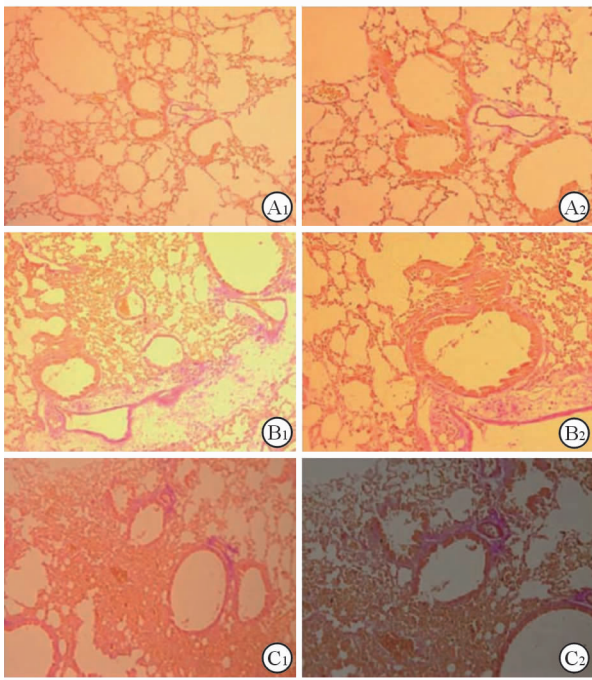


图 4 各组小鼠气道周围胶原增生情况 (VG 染色)

Fig 4 Airway collagen hyperplasia in mice of different groups (VG staining)

A₁, A₂: Control group; B₁, B₂: OVA group; C₁, C₂: OVA+RSV group. OVA: Ovalbumin; RSV: Respiratory syncytial virus. Original magnification: $\times 100$ (A₁, B₁, C₁), $\times 200$ (A₂, B₂, C₂)

2.4 小鼠气道阻力变化 与空白组相比, OVA 组和 OVA/RSV 组小鼠的气道阻力增高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), OVA/RSV 组与 OVA 组相比亦升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 2)。

表 2 各组小鼠气道阻力变化情况

Tab 2 Changes of airway resistance in mice of different groups

Methacholine $\rho_B / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	p / mmHg , $n=3$, $\bar{x} \pm s$		
	Control	OVA	OVA/RSV
0	0	0	0
3.125	18.45 \pm 2.51	25.32 \pm 7.04*	37.44 \pm 8.09** Δ
6.25	26.16 \pm 6.39	34.21 \pm 6.22*	44.17 \pm 6.42** Δ
12.5	34.13 \pm 9.83	48.61 \pm 9.12*	59.71 \pm 11.10** Δ

1 mmHg = 0.133 kPa. OVA: Ovalbumin; RSV: Respiratory syncytial virus. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs OVA group

3 讨论

哮喘是一种以慢性气道炎症为特征的异质性疾病, 具有喘息、气促、胸闷和咳嗽等呼吸道症状, 伴有可变的呼气气流受限, 呼吸道症状和强度可随时间

变化^[8]。近年来, 世界各国儿童哮喘的患病率总体上仍在上升, 尤其是年幼儿童^[9-10]。我国流行病学调查研究结果显示, 儿童哮喘的患病率呈显著上升趋势^[11-14], 严重威胁儿童的健康。RSV 是引起全球婴幼儿下呼吸道感染的首要病毒, 几乎所有儿童在 2 岁之前均至少感染过 1 次 RSV^[15]; 儿童年龄越小, 感染 RSV 后的病情越重, 且容易再次感染^[16]。也有研究表明, RSV 可以导致哮喘急性发作且发生严重喘息并发症^[17]。

研究 RSV 导致哮喘急性发作并加重喘息的病理机制关键环节之一是如何成功复制 RSV 感染的哮喘动物模型。哮喘是一种以嗜酸粒细胞浸润为特征的气道炎症性疾病, 既往主要以肺组织中嗜酸粒细胞明显浸润来判断哮喘模型建立成功, 但嗜酸粒细胞性支气管炎却无气道高反应性^[5], 所以 BALF 中嗜酸粒细胞比例的增加并不能完全判断哮喘模型建立, 气道高反应性是判断哮喘模型建立的重要指标, 鼠肺功能仪是目前检测小鼠气道高反应性的金指标^[18]。本实验采用 Buxco RC 系统测定气道阻力^[19-20], 该系统为有创小鼠肺功能检测仪, 通过定量组胺类药物进行小鼠气道激发, 其气道压力和气流信号经 Buxco 应用软件处理后输出数据, 该检测的小鼠气道高反应性结果可靠。

用 OVA 致敏和雾化激发可以成功建立哮喘模型^[7, 21-22]。OVA 致敏剂量及级别各不相同: 大多剂量 10~100 μg , 级别为 III~V 级。本实验采用 OVA (V 级) 20 μg 致敏和 1% OVA (V 级) 雾化激发, 结果显示小鼠肺部组织 EOS% 较空白组增加 ($P < 0.05$), 小鼠气道阻力也较空白组增加 ($P < 0.05$), 表明哮喘模型建立成功, 同时该组小鼠肺间质有炎性细胞浸润, 气道可见黏液分泌物, 气道周围可见胶原增生。本研究还发现, 用 RSV 感染后的哮喘小鼠与 OVA 组比较, 小鼠肺部 EOS%、气道阻力差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。OVA/RSV 组小鼠肺部病理学变化较 OVA 组更加显著: 肺泡腔明显狭窄, 炎性细胞浸润明显, 毛细血管扩张充血, 气道可见明显黏液分泌物, 气道周围胶原增生明显。

综上所述, 本实验成功建立了在病理机制上高度符合哮喘合并 RSV 感染的生理病理状态的动物模型; 并证实了 RSV 急性感染诱发的哮喘急性发作的病理改变以气道高反应性增高及炎症反应加重为

特征,但仍以嗜酸粒细胞为主要效应细胞。

[参考文献]

- [1] Kumar A, Grayson M H. The role of viruses in the development and exacerbation of atopic disease [J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2009, 103:181-186.
- [2] Hacking D, Hull J. Respiratory syncytial virus-viral biology and the host response [J]. *J Infect*, 2002, 45:18-24.
- [3] Newcomb D C, Boswell M G, Reiss S, Zhou W, Goleniewska K, Toki S, et al. IL-17A inhibits airway reactivity induced by respiratory syncytial virus infection during allergic airway inflammation [J]. *Thorax*, 2013, 68:717-723.
- [4] Krishnamoorthy N, Khare A, Oriss T B, Raundhal M, Morse C, Yarlagadda M, et al. Early infection with respiratory syncytial virus impairs regulatory T cell function and increases susceptibility to allergic asthma [J]. *Nat Med*, 2012, 18:1525-1530.
- [5] Aeffner F, Davis I C. Respiratory syncytial virus reverses airway hyperresponsiveness to methacholine in ovalbumin-sensitized mice [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e46660.
- [6] 臧娜,王莉佳,陈伟超,谢晓虹,邓旻,刘恩梅,等.呼吸道合胞病毒空斑检测方法的建立及应用[J]. *中国生物制品学杂志*, 2010, 23:192-195.
- [7] Sun J, Li L, Wu J, Liu B, Gong W, Lv Y, et al. Effects of baicalin on airway remodeling in asthmatic mice [J]. *Planta Med*, 2013, 79(3-4):199-206.
- [8] 尚云晓,冯雍. 2014版全球哮喘防治倡议(GINA)解读——与儿童哮喘相关内容[J]. *中国实用儿科杂志*, 2014, 29:669-672.
- [9] Global Initiative for Asthma. Pocket guide for asthma management and prevention [EB/OL]. (2012-12) [2013-05-25] http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA_Pocket_2013_May15.pdf.
- [10] Global Initiative for Asthma. Global strategy for the diagnosis and management of asthma in children 5 years and younger [EB/OL]. [2013-05-25]. http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA_Under5_2009_Corx-Aug11_1.pdf.
- [11] 全国儿科哮喘协作组. 全国90万0~14岁儿童中支气管患病情况调查 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 1993, 16(增刊):64-68.
- [12] 全国儿童哮喘防治协作组. 中国城区儿童哮喘患病率调查 [J]. *中华儿科杂志*, 2003, 41:123-127.
- [13] 全国儿科哮喘协作组. 2000年与1990年儿童支气管哮喘患病率的调查比较 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2004, 27:112-116.
- [14] 全国儿科哮喘协作组, 中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所. 第三次中国城市儿童哮喘流行病学调查 [J]. *中华儿科杂志*, 2013, 51:729-735.
- [15] Black C P. Systematic review of the biology and medical management of respiratory syncytial virus infection [J]. *Respir Care*, 2003, 48:209-233.
- [16] Simões E A. RSV disease in the pediatric population: epidemiology, seasonal variability, and long-term outcomes [J]. *Manag Care*, 2008, 17(11 Suppl 12):3-6, 18-19.
- [17] 吴让琼,陈宇宁. 儿童哮喘发作与呼吸道合胞病毒感染关系研究 [J]. *国际病毒学杂志*, 2014, 21:277-279.
- [18] Gibson P G, Dolovich J, Denburg J, Ramsdale E H, Hargreave F E. Chronic cough: eosinophilic bronchitis without asthma [J]. *Lancet*, 1989, 1:1346-1348.
- [19] 沈潞,赖克方,姜华,洪燕华,钟南山. 不同激发方式对小鼠过敏性支气管哮喘模型的影响 [J]. *中华哮喘杂志(电子版)*, 2009, 3:404-408.
- [20] Locke N R, Royce S G, Wainwright J S, Samuel C S, Tang M L. Comparison of airway remodeling in acute, subacute, and chronic models of allergic airways disease [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007, 36:625-632.
- [21] Trujillo-Vargas C M, Werner-Klein M, Wohlleben G, Polte T, Hansen G, Ehlers S, et al. Helminth-derived products inhibit the development of allergic responses in mice [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 175:336-344.
- [22] Ju Y, Choi S J, Lee H, Kim H S, Won S, Chun Y H, et al. Effect of respiratory syncytial virus infection on regulated on activation, normal T-cells expressed and secreted production in a murine model of asthma [J]. *Korean J Pediatr*, 2011, 54:456-462.

[本文编辑] 周燕娟