

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.07.012

小鼠胰岛素抵抗哮喘模型的建立与评估*

周宁娟¹ 徐海军¹ 金巧艳¹ 张娟¹ 李秋红¹ 吴海霞¹ 苏慧² 孙新^{1Δ}

(1 第四军医大学西京医院儿科 陕西 西安 710032; 2 西京医院老年病科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨小鼠胰岛素抵抗哮喘模型的建立方法,并进行评估。**方法:**C57BL/6J 小鼠随机分为 4 组:正常对照组(HC)、哮喘组(NIRA)均给予普通饲料喂养;胰岛素抵抗组(IRNA)、胰岛素抵抗+哮喘组(IRA)均给予高脂饲料(D12492)喂养。每周称重,第 6-14 周,每周检测各组小鼠空腹血糖(FPG)、空腹血清胰岛素(FINS)水平,计算稳态模型胰岛素抵抗评价指数(HOMA-IR)评估胰岛素抵抗程度;小鼠胰岛素抵抗模型建立成功后在其基础上诱导哮喘模型,NIRA 组和 IRA 组小鼠给予卵清蛋白(OVA)致敏、激发;HC 组和 IRNA 组小鼠给予生理盐水作为对照,末次激发 24 后,制作肺病理切片,计数肺泡灌洗液(BALF)中白细胞总数及分类,检测血清和 BALF 中相关炎症因子的水平,比较各组小鼠胰岛素抵抗指数与哮喘评价指标,评估模型。**结果:**(1)第 9 周末,IRNA 组、IRA 组小鼠的 HOMA-IR 值均>2.5,表明胰岛素抵抗小鼠模型建立成功;(2)肺组织病理切片中,HC 组、IRNA 组小鼠肺组织无炎症改变,NIRA 组、IRA 组炎细胞浸润明显,尤以 IRA 组更甚。(3)与 HC 组比较,NIRA 组($P<0.01$)、IRA 组($P<0.01$)BALF 中白细胞总数、嗜酸性粒细胞比例明显增高;(4)血清中抗 OVA 特异性 IgE($P<0.01$)和 IgG1($P<0.05$)水平显著升高;(5)血清和 BALF 中 IL-4($P<0.01$)、IL-17($P<0.05$)的水平明显升高,且 IRA 组($P<0.05$)明显高于 NIRA 组;IFN- γ ($P<0.05$)的水平明显降低,且 IRA 组($P<0.05$)明显低于 NIRA 组。**结论:**用高脂饲料喂养 C57BL/6J 小鼠 9 周,可建立稳定的胰岛素抵抗模型,从第 10 周开始用 OVA 致敏、激发诱发哮喘,可成功建立稳定的胰岛素抵抗哮喘小鼠模型,为进一步研究胰岛素抵抗与哮喘相关机制奠定基础。

关键词:胰岛素抵抗;哮喘;动物模型

中图分类号:R-33;R562.25 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)07-1259-05

Establishment of Mouse Insulin Resistance Asthma Model and Its Evaluation*

ZHOU Ning-juan¹, XU Hai-jun¹, JIN Qiao-yan¹, ZHANG Juan¹, LI Qiu-hong¹, WU Hai-xia¹, SU Hui², SUN Xin^{1Δ}

(1 Department of Pediatrics, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of Geriatrics, Xijing Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: We are aimed to establish a model of insulin resistance asthma, and to evaluate its. **Methods:** C57BL/6J mice were randomly divided into four experimental groups. The four groups of mice were treated as follow: The healthy control group (HC) and non-insulin resistance asthmatic group (NIRA) received a standard chow diet. The insulin resistance non-asthmatic group (IRNA) and insulin resistance asthmatic group (IRA) were fed with a high-fat diet (D12492). All animals were weighed peer week. From 6-14 weeks, the fasting blood-glucose (FPG) and fasting insulin (FINS) were tested every week. Systemic insulin sensitivity was assessed by homeostasis model assessment-estimated insulin resistance (HOMA-IR) index. After insulin resistance mouse model was successfully established, NIRA group and IRA group received ovalbumin (OVA) orally and intraperitoneally to induce allergic asthma, HC group and IRNA group were treated with equal normal saline (NS) as control. 24 hours after final challenge, lung tissue was prepared for morphometrical lung analysis and broncho alveolar lavage fluid (BALF) was performed. Leukocyte and its subgroup populations in the bronchoalveolar lavage fluid were counted, and levels of associated inflammatory factors were detected. Whether the model of insulin resistance associated asthma was successfully established was assessed by comparing insulin resistance index and severity of asthma of each group. **Results:** (1) The average of HOMA-IR of IRNA group and IRA group was higher than 2.5. The result demonstrated that the insulin resistance mouse model was successfully established. (2) There was no appreciable inflammatory cells infiltration in lungs of HC group and IRNA group. However, both NIRA group and IRA group showed significant increased inflammatory infiltration, while IRA group exhibited higher numbers of inflammatory cells compared to NIRA group. (3) The significant increase can be observed in the number of total inflammatory cells and eosinophils in NIRA group ($P<0.01$) and IRA group ($P<0.01$) compared to HC group. (4) OVA-specific IgE ($P<0.01$) / IgG1 ($P<0.05$) significantly elevated in NIRA group and IRA group but not HC group. (5) Th2 cytokines in the BALF (IL-4, IL-17) and serum (IL-4, IL-17) were significantly increased in NIRA group ($P<0.05$) and IRA group ($P<0.05$), especially in IRA group. However, the level of IFN- γ decreased in NIRA group ($P<0.05$) and IRA group ($P<0.05$), especially in IRA group. **Conclusion:** Stable insulin resistance mouse model could be established by feeding C57BL/6J mice with high-fat diet for 9 weeks, from the 10th week, it is available to estab-

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81670449;31371151;31271219)

作者简介:周宁娟,硕士研究生,主治医师,主要研究方向:哮喘,电话:15291770179, E-mail: zhounjqm85@163.com

Δ 通讯作者:孙新,博士,副教授,主要从事哮喘研究, E-mail: sunxin6@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2017-06-30 接受日期:2017-07-25)

lish stable insulin resistance asthma model by induce asthma by the time stable insulin resistance mouse model is established, and for the further study of mechanism of insulin resistance associated with asthma.

Key words: Insulin resistance; Asthma; Mouse model

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R562.25 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)07-1259-05

前言

支气管哮喘(bronchial asthma, BA)是一种以慢性气道炎症和气道高反应性为特征的异质性疾病^[1]。哮喘在全球不同国家发病率为1%~18%,并呈逐年增高的趋势,尤其是儿童^[2],与人们的饮食习惯、生活方式和外界环境的改变密切相关。在过去的几十年间,大量流行病学资料表明,儿童期肥胖是哮喘发病的一个重要危险因素,慢性炎症导致机体代谢紊乱可能是导致其发生的原因,但具体作用机制尚不明确^[3,4]。近期有研究显示肥胖不一定都能加重哮喘,只有那些伴有胰岛素抵抗和(或)糖耐量调节异常的,才可能加重哮喘的发生,胰岛素抵抗或代谢综合征是发生肥胖哮喘的重要危险因素^[5,6]。胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)是指机体胰岛素作用的靶器官对胰岛素作用的敏感性下降,即正常剂量的胰岛素产生低于其正常生物学效应的一种状态,它的主要标志是高胰岛素血症,可诱发心肺血管疾病、糖尿病、肥胖、血糖异常、血脂紊乱等疾病或生理紊乱状态^[7]。在IR状态下,大量的胰岛素可加重气道炎症的产生,使气道高反应性增加^[8],气管平滑肌收缩力增加,促使气道重构的发生,加重哮喘。因此,IR在哮喘发生、发展中的作用越来越被重视,研究它们之间的作用机制显得尤为重要,但是人类产生胰岛素抵抗、发生哮喘的自然过程比较长,且具体时间不确定,不便于观察和研究,因此,建立适当的动物模型势在必行。目前国内现有的分别建立胰岛素抵抗动物模型和哮喘动物模型的方法已经成熟,但建立胰岛素抵抗、哮喘一体化的动物模型鲜有研究。

本实验选取高脂饲料喂养C57BL/6J小鼠,诱导建立稳定的胰岛素抵抗模型,在此基础上用OVA致敏、激发,建立哮喘模型,从而构建稳定的胰岛素抵抗哮喘一体化动物模型,为进一步研究胰岛素抵抗与哮喘相关机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

高脂饲料:D12492(60kcal%,开源动物饲料有限公司),卵清蛋白(ovalbumin, OVA)(美国Sigma公司),乙酰甲胆碱(acetyl-β-methylcholinechloride, Mch)(美国Sigma公司),氢氧化铝(天津市天力化学试剂公司),酶联免疫吸附实验试剂盒(RD公司),小鼠肺功能仪(SCIREQ公司),空气压缩雾化器(欧姆龙大连有限公司),酶标分析仪(无锡华卫德郎仪器有限公司),超净工作台(苏州净化设备厂)。

1.2 实验动物及饲料

实验动物:3周龄SPF级雄性C57BL/6J小鼠,体质量(10.93±0.64)g,共60只,购自第四军医大学实验动物中心,饲养于西京医院实验动物中心,恒定室温(21~25℃),湿度50%~65%,光照10~12h/d。饲养过程遵循西京医院实验动物中心动

物保护和使用指南。

饲料共两种:为普通饲料和纯化高脂饲料(D12492)。普通饲料热量构成比:脂肪10%,蛋白质24%,碳水化合物66%,总热量为348 kcal/100 g,由第四军医大学实验动物中心提供;高脂饲料热量构成比:脂肪60%,碳水化合物20%,蛋白质20%,总热量为524 kcal/100 g,由开源动物饲料有限公司提供。

1.3 实验方法

1.3.1 建立胰岛素抵抗模型 60只SPF级3周龄雄性C57BL/6J小鼠,在适应性喂养1周后,按随机数字表法分为4组:正常对照组(HC)、哮喘组(NIRA)、胰岛素抵抗组(IRNA)、胰岛素抵抗+哮喘组(IRA),每组15只。HC组、NIRA组喂食普通饲料,IRNA组、IRA组喂食高脂饲料(D12492),每周称重,并按公式:肥胖度(%)=(实验组实际体重-对照组平均体重)/对照组平均体重×100,计算各组小鼠的肥胖度,若肥胖度超过20%,则认为肥胖。造模第6周时,所有小鼠均禁食12h,断尾采血,用血糖仪检测小鼠空腹血糖(FPG)水平,并收集血液约0.1 mL,静置2h,以3000 r/min离心10 min,将分离出的血清放-80℃冰箱保存,用ELISA法检测空腹血清胰岛素(FINS)水平,采用稳态模型胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)=FBG(mmol/L)×FINS(mIU/L)/22.5,来评估模型是否成功。第6-14周按上述方法分别计算HOMA-IR值,(HOMA-IR)>2.5,可确定胰岛素抵抗,指数越高表示IR程度越重。

1.3.2 建立哮喘模型致敏 在确定胰岛素抵抗模型成功后的第0天、第7天和第14天,NIRA组、IRA组采用含OVA[100 μg OVA + 1.5 mg Al(OH)₃]的生理盐水配成的200 μL致敏液进行腹腔注射致敏。HC组、IRNA组采用仅含有Al(OH)₃,不含OVA的生理盐水200 μL进行腹腔注射,注射方法,部位相同。激发:NIRA组、IRA组于第21-28天用1%OVA雾化液连续雾化吸入激发8天,每天1次,每次30 min,HC组、IRNA组用生理盐水在相同条件下雾化,激发次数、持续时间相同。

1.3.3 采集血清 4组小鼠在末次雾化吸入激发24 h后,采用摘除眼球法收集血液,每只小鼠采集全血约1-2 mL,静置2 h,以3000 r/min离心10 min,分离出血清,-80℃冰箱保存备用。

1.3.4 BALF中白细胞计数及炎性细胞分类 小鼠仰卧位固定,暴露气管,结扎左肺主支气管,进行气管插管并固定。用灭菌的冷PBS溶液0.8 mL进行支气管肺泡灌洗,每次持续10 s后回抽,重复3次(回抽率>80%),将回抽的BALF于4℃,2500 r/min,离心5 min,回收上清置于-80℃冰箱保存备用。离心后的沉淀用1 mL无菌PBS溶液重悬,并取0.1 mL重悬液涂片,并进行瑞氏染色,计数白细胞总数及炎性细胞分类。

1.3.5 肺组织病理切片染色 支气管肺泡灌洗完毕后,暴露小鼠肺部,取小鼠左肺组织浸泡在4%多聚甲醛溶液中24 h以上,使肺组织充分固定,常规石蜡包埋、切片,进行HE染色,在光学显微镜下观察其病理改变。

1.3.6 细胞因子的检测 用酶联免疫吸附实验(ELISA)法检测血清中抗 OVA 特异性 IgE 及 IgG1 水平;用 ELISA 法检测血清及肺泡灌洗液中 IL-4、IL-10、IL-17、INF- γ 的水平。

1.4 统计学分析

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 来表示,统计结果采用 SPSS17.0 统计软件进行分析。若数据符合正态分布且方差齐者,多组间比较采用 One-Way ANOVA 法,组间两两比较采用 LSD 法;反之,数据不符合正态分布者,组间两两比较采用 Mann-Whitney U 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义

2 结果

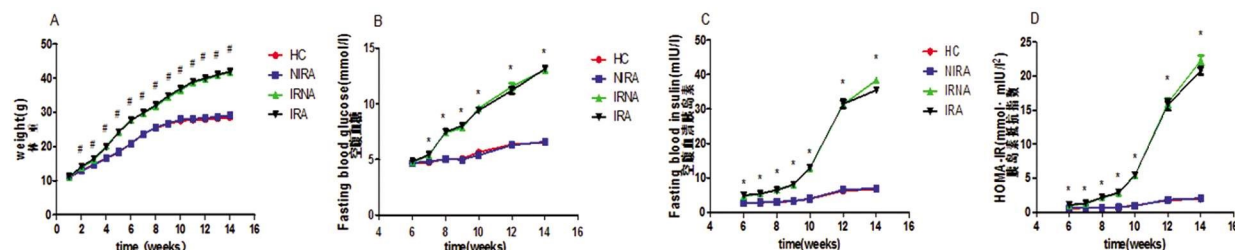


图1 4组小鼠体重、FPG、FINS 及 HOMA-IR 的变化

Fig.1 Comparison of the weight, FPG, FINS and HOMA-IR among different groups

Note: Data are expressed as $\bar{x} \pm s$, $n=15$. A. # $P < 0.01$, IRNA vs HC; IRA vs HC. B.FPG: * $P < 0.05$, IRNA vs HC; IRA vs HC. C.FINS: * $P < 0.05$, IRNA vs HC; IRA vs HC. D. HOMA-IR: * $P < 0.05$, IRNA vs HC; IRA vs HC.

2.2 哮喘急性发作症状

在雾化过程中 NIRA 组和 IRA 组小鼠均出现不同程度的烦躁或安静少动、全身瘙痒、抓脸、呼吸加快、点头呼吸、弓背直立、前肢缩抬、腹肌抽搐等哮喘速发相表现,而 HC 组和 IRNA 组小鼠在雾化过程中活动自如,无上述异常表现。

2.1 各组小鼠体重、空腹血糖、空腹胰岛素、胰岛素抵抗指数的比较

从第 2 周开始,与 HC 组相比,IRNA 组($P < 0.01$)、IRA 组($P < 0.01$)小鼠体重明显增加。第 5 周末,IRNA 组、IRA 组小鼠肥胖度均超过 20%,可认为肥胖。造模第 6-14 周,FPG、FINS 呈动态变化,均逐渐升高,HOMA-IR 亦逐渐增高。第 6-8 周末时,IRNA 组、IRA 组 HOMA-IR 值均 < 2.5 ;第 9 周末,HOMA-IR 值 IRNA 组(2.82 ± 0.30)、IRA 组(2.89 ± 0.37)均 > 2.5 ,可确定胰岛素抵抗模型成功。第 10-14 周末时 HOMA-IR 值 IRNA 组、IRA 组均 > 2.5 ,且显著高于 HC 组和 NIRA 组,差异具有统计学意义($P < 0.01$)(见图 1)。

2.3 肺组织病理损害

HC 组、IRNA 组小鼠肺组织整体结构基本正常,肺泡无明显萎缩或扩张,肺泡隔正常,组织无明显炎症细胞浸润。NIRA 组、IRA 组可见细小支气管及伴行血管周围有较多的炎性细胞浸润,IRA 组炎症细胞浸润更明显(如黑色箭头所示)。

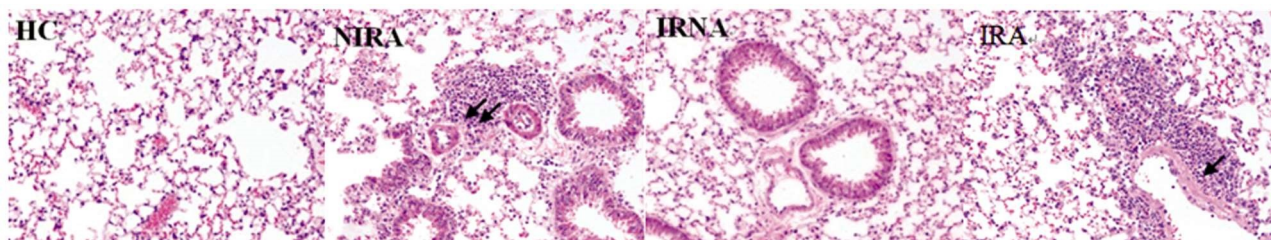


图2 各组小鼠肺组织病理变化(HE 染色, $\times 200$)

Fig.2 Pathological changes of lung tissues from each group (HE staining, $\times 200$)

2.4 支气管肺泡灌洗液中白细胞总数及炎性细胞分类

与 HC、IRNA 组小鼠相比,NIRA、IRA 组小鼠白细胞总数均明显增多($P < 0.01$),主要表现为嗜酸粒细胞、中性粒细胞的增多;与 NIRA 组相比,IRA 组小鼠白细胞总数增多更为明显($P < 0.01$),其中嗜酸性粒细胞的增高更明显($P < 0.05$)(见图 3、4)。

2.5 血清中抗 OVA 特异性 IgE 及 IgG1 水平

与 HC、IRNA 组相比,NIRA、IRA 组小鼠血清中 IgE ($P < 0.01$)及 IgG1($P < 0.05$)水平显著升高,证实小鼠哮喘模型复制成功。与 NIRA 组相比,IRA 组小鼠血清中 IgE ($P < 0.01$)及 IgG1 ($P < 0.05$)水平升高更显著,差异具有统计学意义(见图 5)。

2.6 小鼠血清中 IL-4、IL-17、INF- γ 的浓度

与 HC 组、IRNA 组相比,NIRA 组、IRA 组小鼠血清中 IL-4

($P < 0.01$)、IL-17($P < 0.05$)的浓度明显升高,而 INF- γ ($P < 0.05$)的浓度明显降低;与 NIRA 组相比,IRA 组小鼠 BALF 中 IL-4 ($P < 0.01$)、IL-17($P < 0.05$)的升高更明显,INF- γ ($P < 0.05$)的降低更明显($P < 0.05$)(见图 6)。

3 讨论

胰岛素抵抗和哮喘的关系越来越密切,研究它们之间具体作用机制已成为焦点问题,但是人类产生胰岛素抵抗和发生哮喘的自然过程比较长,有很多的限制,且具体时间不确定,不利于观察和研究,因此建立胰岛素抵抗哮喘实验动物模型将为我们研究发病机制及治疗手段提供重要保障。目前建立单一的小鼠胰岛素抵抗模型和哮喘模型的方法已经很成熟了,但国内尚

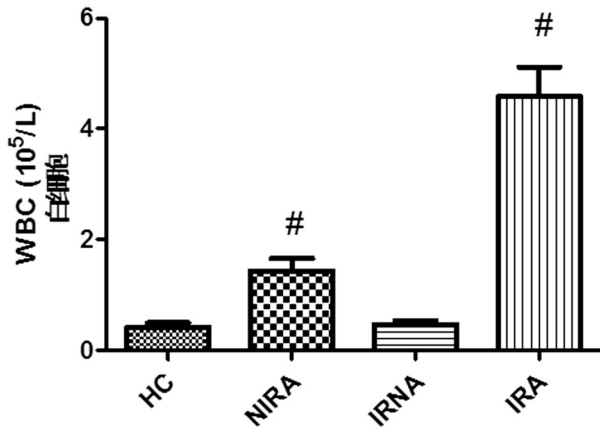


图3 4组小鼠BALF中白细胞计数结果

Fig.3 The total white blood cell count in the BALF in four groups

Note: Data are expressed as $\bar{x} \pm s$, n=9. *P<0.01, NIRA vs HC; IRA vs HC; IRA vs NIRA.

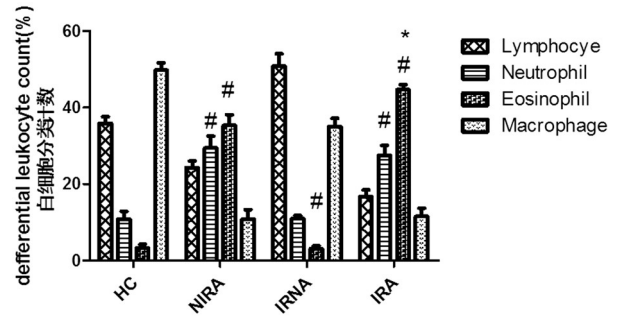


图4 4组小鼠BALF中白细胞分类计数结果

Fig.4 The differential leukocyte count in the BALF in four groups

Note: Data are expressed as $\bar{x} \pm s$, n=9. Neutrophil: *P<0.01, NIRA vs HC; IRA vs HC. Eosinophil: *P<0.01, NIRA vs HC; IRA vs HC; IRNA vs NIRA. *P<0.05 IRA vs NIRA.

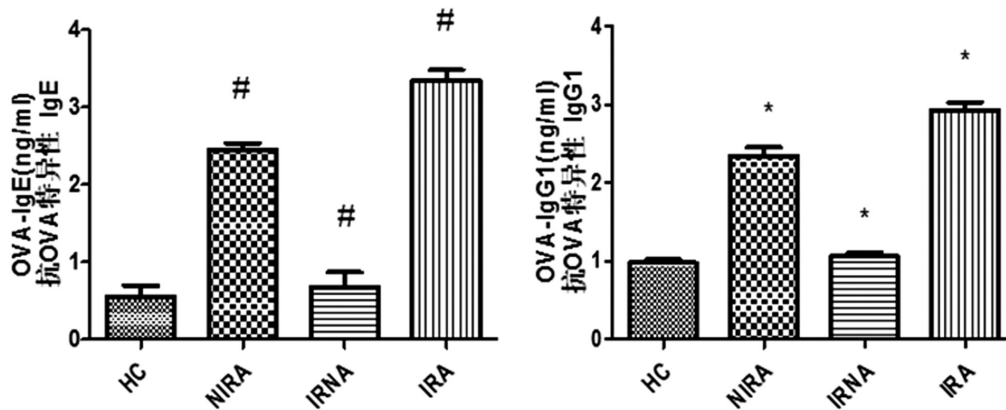


图5 4组小鼠血清抗OVA特异性IgE和IgG1水平

Fig.5 The levels of serum OVA specific IgE and IgG1 in four groups

Note: Data are expressed as $\bar{x} \pm s$, n=9. *P<0.01, *P<0.05, NIRA vs HC; IRA vs HC; IRNA vs NIRA; IRA vs NIRA.

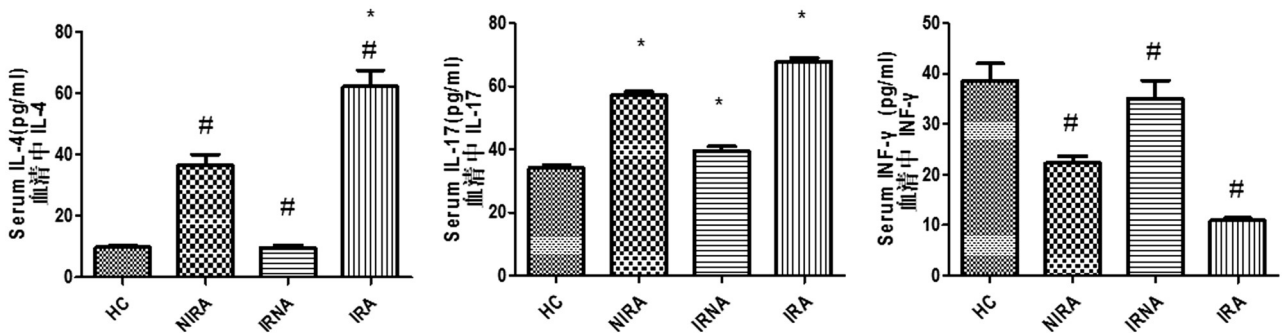


图6 4组小鼠血清中IL-4、IL-17、INF-γ的浓度

Fig.6 The concentrations of IL-4, IL-17 and INF-γ in the serum in four groups

Note: Data are expressed as $\bar{x} \pm s$, n=9. *P<0.01, *P<0.05, NIRA vs HC; IRA vs HC; IRNA vs NIRA; IRA vs IRNA.

无胰岛素抵抗和哮喘一体化动物模型,因此探寻建立胰岛素抵抗哮喘一体化动物模型的方法十分必要。建立模型需要满足3个条件:①该动物种系必须易产生胰岛素抵抗和哮喘这两种疾病;②选择恰当的胰岛素抵抗模型和哮喘模型的建立方法;③明确在胰岛素抵抗的基础上诱发哮喘的准确时间。

目前建立胰岛素抵抗动物模型时多用SD大鼠、Wistar大鼠、ob/ob小鼠、C57BL/6J小鼠,但前三者建立的哮喘模型重复稳定性欠佳,而用于建立哮喘模型时常应用的BALB/c小鼠、

C57BL/6J小鼠、BN大鼠、豚鼠等^[9],除C57BL/6J小鼠外,其他种系对高脂饮食诱导的肥胖又不敏感。C57BL/6J小鼠是一种具有ob/ob遗传背景的变异系小鼠,代谢缓慢,对高脂饲料敏感,与人类代谢性疾病的代谢特征相似,常被用来诱导胰岛素抵抗模型^[10-13],同时C57BL/6J小鼠对OVA诱导的过敏性疾病敏感,常用来建立哮喘模型^[14],因此本实验选取既对高脂饲料敏感,又常用于哮喘研究的C57BL/6J小鼠作为建立模型的动物。

目前建立胰岛素抵抗的动物模型主要有三类:遗传性模型

^[15]、特殊药物模型^[16]和特殊饮食喂养模型^[17],其中高脂饮食引起胰岛素抵抗模型与人类肥胖时出现的胰岛素抵抗病因学类似,当用高脂饲料喂养小鼠时,其摄入脂肪过多使血浆游离脂肪酸水平持续增高,引起细胞凋亡,同时抑制外周组织对葡萄糖摄取,降低肝细胞胰岛素受体对胰岛素的结合,减少肝糖原利用,干扰胰岛素信号的传导,引起葡萄糖转运酶和葡萄糖激酶水平降低而导致高胰岛素血症和胰岛素抵抗^[18]。高脂饮食诱导的胰岛素抵抗模型具有饲养方便、模型稳定、可靠性高、价格相对较低等优点,也使它成为较为理想的探讨胰岛素抵抗病理生理机制常用的动物模型^[19]。纯化高脂饲料(D12492)是国际标准化纯化配方饲料,含 60%的脂肪,多用于诱导动物肥胖、胰岛素抵抗、二型糖尿病和高脂血症等疾病,在饲料的配料上更好控制,排除混杂因素。本研究选用 D12492 高脂饲料来诱导正常小鼠发生胰岛素抵抗,模拟人类胰岛素抵抗自然发病的过程和模式,建立稳定的小鼠胰岛素抵抗模型。

目前国际上广泛采用 HOMA-IR 指数来评估胰岛素抵抗发生的程度^[20,21]。胰岛素抵抗动物模型建立所需要的时间与诸多因素相关,选取的动物种类、建立模型的方法不同,成功建立模型的时间亦不一样,周期从 4-12 周不等。从本实验检测结果可以看出:随着饲养时间的延长,4 组小鼠体重逐渐增加,FPG、FINS 呈动态变化,均呈逐渐升高的趋势,HOMA-IR 亦逐渐增高。从本实验第 2 周开始,高脂饲料组小鼠体重增加比普通饲料组明显增快,差异具有统计学差异($P<0.01$);第 5 周,高脂组小鼠肥胖率已达到 100%;第 6-8 周末时,IRNA 组、IRA 组 HOMA-IR 值均 <2.5 ;第 9 周末,HOMA-IR 值 IRNA 组(2.82 ± 0.30)、IRA 组(2.89 ± 0.37)均 >2.5 ,可确定胰岛素抵抗模型成功。第 10-14 周末时 HOMA-IR 值 IRNA 组、IRA 组均 >2.5 ,随着饲养时间的延长,HOMA-IR 值逐渐增高,且显著高于 HC 组和 NIRA 组($P<0.01$);说明从第 10 周起,稳定的胰岛素抵抗模型已经建成,且随着饲养时间的延长,胰岛素抵抗程度随之加重。

目前尚无哮喘动物模型的统一评价标准,本实验参照现有的 BALC/C 小鼠哮喘模型建立成功的评价指标和人类哮喘急性发作的症状来判断小鼠哮喘模型是否成功:急性哮喘发作症状,气道高反应性,气道炎症细胞增多,Th2 相关细胞因子以及血清抗 OVA 特异性 IgE 及 IgG1 水平增加^[22]。考虑到胰岛素抵抗模型的稳定性,继发糖尿病、代谢综合征、冠心病等可能干扰实验,整个模型的周期不易太长,因此选择建立急性哮喘模型。根据实验结果选择从第 10 周开始建立哮喘模型,第 0 天为第 10 周的第一天,以此类推。实验结果表明:经 OVA 致敏、激发,NIRA 组和 IRA 组小鼠均出现不同程度的哮喘速发相表现:如烦躁或安静少动、全身瘙痒、抓脸、呼吸加快、点头呼吸、弓背直立、前肢缩抬、腹肌抽搐等,而 HC 组和 IRNA 组小鼠活动自如,无上述表现;与 HC 组相比,NIRA、IRA 组小鼠血清中 IgE ($P<0.01$)及 IgG1($P<0.05$)水平显著升高,与 NIRA 组相比,IRA 组小鼠血清中 IgE ($P<0.01$)及 IgG1($P<0.05$)水平升高更显著,表明在小鼠胰岛素抵抗模型基础上哮喘模型建立成功。HC 组和 IRNA 组小鼠肺组织基本无炎症改变,NIRA 组和 IRA 组炎症浸润明显,其中 IRA 组更甚;IRA 组 BALF 中白细胞总数、嗜酸性粒细胞百分比明显高于其他各组($P<0.01$);与 HC 组

比较,血清中 IL-4($P<0.01$)、IL-17($P<0.05$)的水平明显升高,且 IRA 组($P<0.01$)明显高于 NIRA 组;IFN- γ ($P<0.05$)的水平明显降低,且 IRA 组($P<0.05$)明显低于 NIRA 组。以上数据表明本次实验中胰岛素抵抗哮喘模型建立成功,且与单纯哮喘(NIRA 组)小鼠相比,胰岛素抵抗哮喘(IRA 组)小鼠上述改变更为显著,证实了胰岛素抵抗和哮喘间可能有关联,此模型可以用于胰岛素抵抗与哮喘相关机制的进一步研究。

本实验选择兼顾哮喘、胰岛素抵抗 2 种疾病的 C57BL/6J 小鼠,采用高脂饲料(D12492)喂养 9 周,可建立稳定的胰岛素抵抗小鼠模型,从第 10 周开始在其基础上用 OVA 致敏、激发诱导哮喘,成功建立了胰岛素抵抗哮喘一体化模型。采用本实验方法建立的胰岛素抵抗哮喘模型稳定,经济成本较低,实用性和操作性强,为进一步研究胰岛素抵抗与哮喘相关机制奠定了坚实基础,并可以广泛推广在相关研究中运用。

参考文献(References)

- [1] Horak F, Doberer D, Eber E, et al. Diagnosis and management of asthma - Statement on the 2015 GINA Guidelines[J]. Wien Klin Wochenschr, 2016, 128(15-16): 541-554
- [2] Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention [J]. http://ginasthma.org/2017-gina-report/wmsGINA-2017-main-report-final_V2
- [3] Lang J E, Feng H, Lima J J, et al. Body mass index-percentile and diagnostic accuracy of childhood asthma [J]. J Asthma, 2009, 46(3): 291-299
- [4] Ross K R, Hart M A, Storfer-Isser A, et al. Obesity and obesity related co-morbidities in a referral population of children with asthma[J]. Pediatr Pulmonol, 2009, 44(9): 877-884
- [5] Zhang Y, Zhang J, Tian C, et al. The -308 G/A polymorphism in TNF-alpha gene is associated with asthma risk: an update by meta-analysis[J]. J Clin Immunol, 2011, 31(2): 174-185
- [6] Karampatakis N, Karampatakis T, Galli-Tsinopoulou A, et al. Impaired glucose metabolism and bronchial hyperresponsiveness in obese prepubertal asthmatic children [J]. Pediatric Pulmonology, 2017, 52(2): 160-166
- [7] Gast K B, Tjeerdema N, Stijnen T, et al. Insulin resistance and risk of incident cardiovascular events in adults without diabetes: meta-analysis[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e52036
- [8] Kim K, Kim S, Lee S, et al. Association of insulin resistance with bronchial hyperreactivity[J]. Asia Pacific Allergy, 2014, 4(2): 99
- [9] 刘佳,郑健,于涛.小鼠过敏性哮喘模型的研究进展及评价[J].中国比较医学杂志, 2011, (02): 65-68
- [9] Liu Jia, Zheng Jian, Yu Tao. Progress and evaluation of research on mouse models of allergic asthma [J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2011, (02): 65-68
- [10] De Leeuw Van Weenen J E, Hu L, Jansen-Van Zelm K, et al. Four weeks high fat feeding induces insulin resistance without affecting dopamine release or gene expression patterns in the hypothalamus of C57Bl6 mice[J]. Brain Res, 2009, 1250: 141-148
- [11] Black B L, Croom J, Eisen E J, et al. Differential effects of fat and sucrose on body composition in A/J and C57BL/6 mice[J]. Metabolism, 1998, 47(11): 1354-1359
- [12] Surwit R S, Kuhn C M, Cochrane C, et al. Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice[J]. Diabetes, 1988, 37(9): 1163-1167

- 者认知的影响[J]. 医学临床研究, 2016, 33(12): 2461-2462
- Chu Kai-yun, Pan Ya-juan, Shi Hong. Effect of hypothermia on Department of orthopedics operation under general anesthesia for hip replacement patients cognition [J]. Journal of Clinical Research, 2016, 33(12): 2461-2462
- [14] 王中林, 田春, 丁佳慧, 等. 单侧腰部麻醉和全身麻醉对老年患者髋关节置换术应激反应影响的对比研究[J]. 重庆医学, 2016, 45(19): 2641-2643
- Wang Zhong-lin, Tian Chun, Ding Jia-hui, et al. Comparative study of the effects of unilateral lumbar anesthesia and general anesthesia on stress response in elderly patients undergoing hip replacement [J]. Chongqing Medicine, 2016, 45(19): 2641-2643
- [15] 张明德, 王敏. 静吸复合全麻与靶控输注对老年高血压患者麻醉深度的影响[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(20): 5748-5749
- Zhang Ming-de, Wang Min. Effect of combined static and general anesthesia and target controlled infusion on the depth of anesthesia in elderly hypertensive patients [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2014, 34(20): 5748-5749
- [16] 吴友华, 曹伟. 老年股骨颈骨折手术患者腰硬联合麻醉和全身麻醉的效果比较[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(15): 4296-4297
- Wu You-hua, Cao Wei. Effect of combined spinal and epidural anesthesia and general anesthesia on elderly patients with femoral neck fracture[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2015, 35(15): 4296-4297
- [17] C Fabio, DB Romualdo, AF Eugenio, et al. Thoracic Unilateral Spinal Cord Injury After Spinal Anaesthesia for Total Hip Replacement: Fate or Mistake?[J]. Turk J Anaesthesiol Reanim, 2017, 45(2): 116-118
- [18] A Harsten, H Kehlet, P Ljung, et al. Total intravenous general anaesthesia vsspinal anaesthesia for total hip arthroplasty: a randomised, controlled trial[J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2015, 59(3): 298-309
- [19] T Mencke, S Soltész. General anaesthesia vs spinal anaesthesia for total hip arthroplasty[J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2015, 59(4): 541-542
- [20] YNTVD Eeden, BJGD Turck, FMCVD Eeden. 24 hours stay after hip replacement: Implementation of a patient-centered time-based fast-track program[J]. Acta Orthopaedica, 2017, 88(1): 24-28
-
- (上接第 1263 页)
- [13] Paul D S, Hernandez-Zavala A, Walton F S, et al. Examination of the effects of arsenic on glucose homeostasis in cell culture and animal studies: development of a mouse model for arsenic-induced diabetes [J]. ToxicolApplPharmacol, 2007, 222(3): 305-314
- [14] Kosaka S, Tamauchi H, Terashima M, et al. IL-10 controls Th2-type cytokine production and eosinophil infiltration in a mouse model of allergic airway inflammation [J]. Immunobiology, 2011, 216 (7): 811-820
- [15] Fu J H, Xie S R, Kong S J, et al. The combination of a high-fat diet and chronic stress aggravates insulin resistance in Wistar male rats[J]. ExpClinEndocrinol Diabetes, 2009, 117(7): 354-360
- [16] Renshaw J, Orr R M, Walton M I, et al. Disruption of WT1 gene expression and exon 5 splicing following cytotoxic drug treatment: antisense down-regulation of exon 5 alters target gene expression and inhibits cell survival[J]. Mol Cancer Ther, 2004, 3(11): 1467-1484
- [17] Wang C Y, Liao J K. A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance[J]. Methods MolBiol, 2012, 821: 421-443
- [18] Kharroubi I, Ladriere L, Cardozo A K, et al. Free fatty acids and cytokines induce pancreatic beta-cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor-kappaB and endoplasmic reticulum stress[J]. Endocrinology, 2004, 145(11): 5087-5096
- [19] Park S Y, Cho Y R, Kim H J, et al. Unraveling the temporal pattern of diet-induced insulin resistance in individual organs and cardiac dysfunction in C57BL/6 mice[J]. Diabetes, 2005, 54(12): 3530-3540
- [20] Garg M K, Dutta M K, Mahalle N. Study of beta-cell function (by HOMA model) in metabolic syndrome[J]. Indian J EndocrinolMetab, 2011, 15(Suppl 1): S44-S49
- [21] Van der Aa M P, Knibbe C A, Boer A, et al. Definition of insulin resistance affects prevalence rate in pediatric patients: a systematic review and call for consensus [J]. J Pediatr Endocrinol Metab, 2017, 30 (2): 123-131
- [22] Oliver A J, Covar R A, Goldfrad C H, et al. Randomised trial of once-daily vilanterol in children with asthma on inhaled corticosteroid therapy[J]. Respiratory Research, 2016, 17(1): 37