

• 综 述 •

小鼠耳肿胀模型及药理应用*

周 娟¹, 张梦军², 郭嘉伟²综述, 李 滨³, 张惠静^{1,2△} 审校

(1. 重庆大学化学化工学院, 重庆 400044; 2. 第三军医大学药学院药物分析与分析化学教研室, 重庆 400038; 3. 重庆市科学技术研究院, 重庆 401123)

关键词: 耳肿胀模型; 炎症; 佛波酯; 花生四烯酸; 小鼠; 综述
DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.17.026 文献标识码: A 文章编号: 1673-4130(2012)17-2102-03

炎症是损伤和抗损伤的统一过程。尽管炎性反应过程中, 通过实质和间质细胞的再生使受损的组织得以修复和愈合, 但损伤因子直接或间接造成组织和细胞的破坏, 也会给机体带来损伤。目前的抗炎药物仍存在许多问题, 如选择性较差、会引起胃肠道不适、肾衰竭和心功能衰竭等副作用。因此寻找安全有效的抗炎药物, 以及选择合适的动物模型评价抗炎药物的药效和机制仍是众多学者共同关注的问题。

炎症根据感染的途径分为感染性炎症和非感染性炎症。非感染性炎症又包括非特异性炎症(无菌性炎症)和变态反应性炎症。目前, 研究者通过构建不同的动物炎症模型来模拟非特异性炎症不同时期的病理表现, 如小鼠耳肿胀模型、足跖肿胀模型和肉芽肿模型等评价药物的抗炎作用。其中小鼠耳肿胀模型因其操作简单、模型稳定且小鼠价格便宜等优点, 在评价一些合成化合物和植物有效成分的抗炎活性时应用更为广泛^[1-3]。小鼠耳肿胀模型常用的致炎物质有二甲苯、花生四烯酸(AA)、佛波酯(TPA)、巴豆油、组胺和辣椒素等。本文将总结、阐述不同致炎物质诱导的小鼠耳肿胀模型的造模方法、机制、应用和特点。

1 二甲苯诱导的小鼠耳肿胀模型

二甲苯诱导的小鼠耳肿胀模型造模方法简单, 一般在涂抹二甲苯 30~60 min 后达到最大肿胀度, 90 min 后肿胀基本消除。实验中通常选择在给予二甲苯 1 h 左右断颈处死小鼠^[4-5], 用打孔器取双侧耳部同一部位的耳片, 称重后计算两耳片的重量差作为检测指标; 也可通过测厚仪测量小鼠耳肿胀前后的耳厚度, 从而计算出药物对炎症的抑制率。二甲苯模型主要机制是致使某些炎症介质如组胺、激肽和纤维蛋白溶解释放, 引起局部血管扩张, 毛细管通透性增加, 炎症细胞浸润, 造成耳部急性渗出性炎症水肿^[6]。一般皮质类固醇如地塞米松、氢化可的松和部分非甾体类抗炎药如阿司匹林等, 都能有效抑制这种炎症, 常作为此模型的阳性药物。国内广泛用于评价植物有效成分和合成化合物的抗炎作用, 如: 宣木瓜有机酸、三叶青藤醇提取物、土甘草正丁醇提取物、花椒生物碱、原花青素和合成的去甲丹皮酚衍生物等^[7-10]。尽管该模型在国内应用广泛, 但国外则很少采用。本组在实验过程中发现该模型与其他耳肿胀模型相比, 小鼠耳肿胀率个体差异比较大, 模型不够稳定, 这可能是国外应用不广泛的原因之一。

2 佛波酯诱导的小鼠耳肿胀模型

TPA 诱导的小鼠耳肿胀模型分为单次刺激和多次刺激两种。TPA 单次刺激诱导的小鼠耳肿胀模型是一个亚急性模

型, 其造模方法和二甲苯诱导的耳肿胀模型类似, 一般以丙酮为溶剂, 每只小鼠使用的 TPA 剂量多为 2.0 μg/ear 或 2.5 μg/ear^[11]。本组在用 TPA 诱导耳肿胀模型时, 发现 TPA 涂抹后 3 h 之内, 小鼠耳朵厚度几乎无变化, 随后耳朵逐渐增厚变红, 6 h 左右达到最大肿胀度, 实验结果与文献一致^[12]。实验过程中多数研究者选择涂抹 TPA 6 h 后处死小鼠^[11], 也有选择 4 h 后处死小鼠的^[13]。TPA 诱导的小鼠耳肿胀模型的主要机制^[14-15]: (1) TPA 能诱导小鼠耳组织角质形成细胞产生 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 等炎症细胞因子, 另外, TNF-α 的存在会促进继发性炎症细胞因子生成, 促使炎性反应进一步扩大; (2) TPA 刺激磷脂酶(PLA₂)诱导 AA 释放, 在环氧合酶(COX)和 5-脂氧化酶(5-LOX)作用下, AA 代谢成为前列腺素 E₂ (PGE₂) 和白三烯(LTB₄), 加重炎症; (3) TPA 促进组胺和 5-羟色胺释放。因此, H1 和 H2 受体拮抗剂、皮质类固醇如地塞米松和环氧合酶抑制剂如吲哚美辛, 都能不同程度地抑制单次 TPA 诱导的炎症。

TPA 多次刺激诱导的小鼠耳肿胀模型是一个慢性模型, 造模方法和给药时间如图 1 所示^[15], 最后 1 天给药 6 h 后处死小鼠, 用 TPA 单次刺激实验相同的方法采集实验数据。TPA 多次刺激模型的初始阶段和 TPA 单次模型类似, 小鼠耳朵重量的增加主要归咎于表皮的水肿和急性炎症; 而后阶段是水肿、表皮增生、细胞浸润和表皮纤维化共同作用产生的慢性炎症。H1 受体拮抗剂如甲地嗪, 环氧合酶抑制剂如吲哚美辛、布洛芬和萘普生等对 TPA 多次刺激诱导的炎症没有抑制作用, 而 5-LOX 抑制剂能有效减轻该模型的淋巴细胞浸润。此外, 局部涂抹自体抗炎药物, 可治疗 TPA 多次刺激诱导的小鼠耳肿胀、髓过氧化物酶增多和表皮增生的症状^[16]。

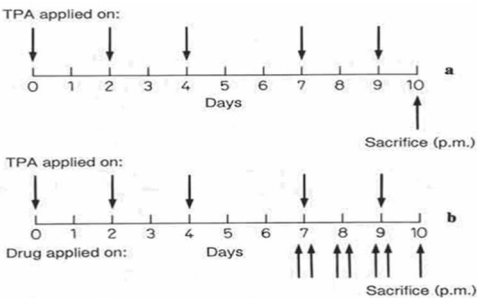


图 1 TPA 多次刺激诱导小鼠耳肿胀的实验方法^[15]

近年来, 常采用 TPA 诱导的耳肿胀模型评价许多植物提取成分和合成化合物的抗炎作用, 如恩贝灵^[17]、合成化合物

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31100653); 重庆市科技攻关计划资助项目(CSTC, 2010AB5099)。△ 通讯作者, E-mail: zhj715@yahoo.com。

ASB16165 磷酸二酯酶 7A 抑制剂^[18]、酒神菊属植物的乙醇提取物^[11]、假葎拔的乙醇提取物^[19]、元参的乙醇提取物^[20]、天冬的乙醇提取物^[21]和化合物 LDP-392^[22]等。国内常用巴豆油诱导小鼠耳肿胀,实际上巴豆油的主要活性成分即 TPA,而 TPA 诱导的小鼠耳肿胀模型在国外应用更为广泛。TPA 诱导的小鼠耳肿胀模型,因其具有广泛的作用机制,且模型很稳定,持续时间较长,是筛选抗炎药物最常用的模型。

3 AA 诱导的小鼠耳肿胀模型

AA 诱导的小鼠耳肿胀模型其造模方法和二甲苯类似,一般将 AA 溶于丙酮中,每只小鼠使用的 AA 剂量多为 2.0 mg/ear^[23]。在小鼠的耳两侧涂抹 AA 5 min 后,会诱导产生血管舒张和红斑,40~60 min 后发展为炎症且达到最大肿胀度,之后水肿开始消退并且炎症细胞也逐渐离开此炎症组织,6 h 后小鼠耳朵基本恢复到正常状态。AA 诱导的小鼠耳朵肿胀度呈剂量依赖性^[24]。AA 诱导小鼠耳肿胀的机制主要为白三烯和其他脂肪氧化酶介导,而在白三烯存在的情况下前列腺素会促进小鼠耳肿胀。AA 作为小鼠耳肿胀模型的致炎剂时,其代谢途径和使用的剂量密切相关。当以较低剂量(0.5 mg/ear)刺激时,AA 以环氧合酶为主要代谢途径,COX 抑制剂与 COX 和 LOX 双重抑制剂能有效抑制 AA 诱导的耳肿胀;而当 AA 的剂量为 4.0 mg/ear 时,则主要通过 5-脂氧化酶途径代谢,所以 5-脂氧化酶抑制剂能有效抑制该炎症^[24]。由于 AA 致炎过程还伴随着一系列炎症介质的释放,如血清素、组胺和激肽,所以抗组胺药也能减轻 AA 诱导的小鼠耳水肿^[14]。

Young 等^[25]运用 AA 模型比较了同等剂量下化合物 KR-33749 和齐留通(皆为 5-LOX 抑制剂)的抗炎药效。近年来,越来越多的研究者利用该模型评价植物提取物的抗炎活性如:铁线蕨属浸出物^[26]、芒果皮的水提取物^[22]、斑鸠菊属乙醇提取物^[27]和亚氏风铃木的内皮水提取物^[28]等。AA 诱导的小鼠耳肿胀模型造模方法简单,模型稳定,是筛选抗炎药物的重要模型。

4 辣椒素诱导的小鼠耳肿胀模型

辣椒素是典型的神经性刺激剂,其诱导的小鼠耳肿胀模型为急性模型。实验中辣椒素的剂量为 0.2 mg/ear^[29],小鼠耳朵在 30 min 左右达到最大肿胀度,随后肿胀不断消除,24 h 后恢复正常。辣椒素诱导的小鼠耳水肿的形成主要由神经肽介导,如降钙素基因相关肽、P 物质、神经激肽 A 和血管活性肠肽。H1 组胺拮抗剂、血清素拮抗剂和 P 物质拮抗剂等对辣椒素诱导的小鼠耳肿胀有良好的抑制作用。Rogério 等^[29]实验结果表明局部涂抹油桃的果皮提取物,对该模型小鼠耳肿胀没有抑制作用。

5 组胺诱导的小鼠耳肿胀模型

组胺诱导的小鼠耳肿胀模型其造模方法比较特殊,一般通过在小鼠耳外侧皮内注射组胺的方法来诱导炎症。每只小鼠注射剂量一般为 0.5 mg/ear^[29-30]。组胺诱导的小鼠耳肿胀模型也是急性模型,一般在 15 min 左右达到最大肿胀度,然后逐渐消退。此模型中,风团及潮红是组胺诱导的皮肤炎症的主要症状,这种症状的发展往往伴随着瘙痒,所以在实验过程中可以看到小鼠抓挠的现象。Clough 等^[31]早期实验证明 H1 受体拮抗剂可以不同程度地抑制风团、潮红和瘙痒症状。目前,组胺诱导的小鼠耳肿胀模型广泛用于抗炎药物的筛选。Gerlania 等^[30]通过此模型证明石梓皮的水提取物也不能抑制组胺诱导的炎症。组胺作为炎症诱导剂不仅广泛地应用于小鼠耳肿胀

模型,而且在诱导大鼠足肿胀模型中也常常被用到^[32-33]。

6 结 语

综上所述,小鼠耳肿胀模型由于选择的致炎物质不同,其产生的病理机制和病理过程也不完全相同,操作程序和持续时间也会有所差别。因此,需先清楚所用致炎剂诱导的小鼠耳肿胀模型的主要机制,根据实验的目的来选择合适的致炎剂,才能从实验结果中推断受试化合物的可能作用机制。小鼠耳肿胀模型因价格便宜、操作简便、易于测量和稳定等特点,近年来常被选用。本组总结了几种国内外常用且成熟的小鼠耳肿胀模型的造模方法及其主要机制、应用和特点,希望能为初步评价抗炎药物的药效和机制研究提供新的思路。

参考文献

- [1] Hernández V, Mánez S, Recio MC, et al. Anti-inflammatory profile of dehydrocostic acid, a novel sesquiterpene acid with a pharmacophoric conjugated diene [J]. Eur J Pharm Sci, 2005, 26(2): 162-169.
- [2] Mehrotra A, Shanbhag R, Chamallamudi MR, et al. Ameliorative effect of caffeic acid against inflammatory pain in rodents [J]. Eur J Pharmacol, 2011, 666(1/3): 80-86.
- [3] Xian YF, Mao QQ, Ip SP, et al. Comparison on the anti-inflammatory effect of Cortex Phellodendri Chinensis and Cortex Phellodendri Amurensis in 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate-induced ear edema in mice [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 137(3): 1425-1430.
- [4] Wang SJ, Tong Y, Lu S, et al. Anti-inflammatory activity of myricetin isolated from Myrica rubra Sieb. et Zucc. leaves [J]. Planta Med, 2010, 76(14): 1492-1496.
- [5] Wu YH, Zhou CX, Song LY, et al. Effect of total phenolics from Lagera alata on acute and chronic inflammation models [J]. J Ethnopharmacol, 2006, 108(2): 243-250.
- [6] 杨巧芳, 孟庆刚. 炎症动物模型探要 [J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(3): 516-517.
- [7] 闫芸, 孙晓迪, 刘守成, 等. 海金护卫散微粉对小鼠抗炎及镇痛作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 157-159.
- [8] 陈美璐, 梁统, 周克元, 等. 原青花素的抗炎作用及其作用机制的探讨 [J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(12): 1080-1082.
- [9] 杨东爱, 郭力城, 余胜明, 等. 土甘草正丁醇提取物抗炎镇痛作用研究 [J]. 中医学报, 2011, 39(2): 36-37.
- [10] 侯丙波, 郑丽玲, 绪广林, 等. 去甲丹皮酚衍生物的合成及其抗炎活性 [J]. 合成化学, 2011, 19(1): 28-31.
- [11] Boller S, Soldi C, Marques MC, et al. Anti-inflammatory effect of crude extract and isolated compounds from Baccharis illinita DC in acute skin inflammation [J]. J Ethnopharmacol, 2010, 130(2): 262-266.
- [12] Murakawa M, Yamaoka K, Tanaka Y, et al. Involvement of tumor necrosis factor(TNF)-α in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)-induced skin edema in mice [J]. Biochem Pharmacol, 2006, 71(9): 1331-1336.
- [13] Hernández I, Márquez L, Martínez I, et al. Anti-inflammatory effects of ethanolic extract and alkaloids-derived from Heliopsis longipes roots [J]. J Ethnopharmacol, 2009, 124(3): 649-652.
- [14] Blazso G, Gabor M. Effects of prostaglandin antagonist phloretin derivatives on mouse ear edema induced with different skin irritants [J]. Prostaglandins, 1995, 50(3): 161-168.
- [15] Stanley PL, Steiner S, Havens M, et al. Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol

13-acetate [J]. Skin Pharmacol, 1991, 4(4): 262-271.

[16] 邹国英, 蒋洪敏. 髓过氧化物酶与颅脑损伤[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(9): 977-979.

[17] Kumar G, Dhamotharan R, Kulkarni NM, et al. Embelin reduces cutaneous TNF- α level and ameliorates skin edema in acute and chronic model of skin inflammation in mice[J]. Eur J Pharmacol, 2011, 662(1/3): 63-69.

[18] Kadoshima-yamaoka K, Goto M, Murakawa M, et al. ASB16165, a phosphodiesterase 7A inhibitor, reduces cutaneous TNF- α level and ameliorates skin edema in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced skin inflammation model in mice [J]. Eur J Pharmacol, 2009, 613(1/3): 163-166.

[19] Rodrigues Silva D, Baroni S, Svidzinski AE, et al. Anti-inflammatory activity of the extract, fractions and amides from the leaves of Piper ovatum Vahl (Piperaceae) [J]. J Ethnopharmacol, 2008, 116(3): 569-573.

[20] Giner RM, Villalba ML, Recio MC, et al. Anti-inflammatory glycoterpenoids from Scrophularia auriculata [J]. Eur J Pharmacol, 2000, 389(2/3): 243-252.

[21] Lee do Y, Choo BK, Yoon T, et al. Anti-inflammatory effects of Asparagus cochinchinensis extract in acute and chronic cutaneous inflammation [J]. J Ethnopharmacol, 2009, 121(1): 28-34.

[22] Qian C, Hwang SB, Libertine-Garahan L, et al. Anti-inflammatory activities of LDP-392, a Dual PAF receptor antagonist and 5-Lipoxygenase inhibitor [J]. Pharmacol Res, 2001, 44(3): 214-220.

[23] Garrido G, Gonzalez D, Lemus Y, et al. Protective effects of a standard extract of Mangifera indica L. (VIMANG) against mouse ear edemas and its inhibition of eicosanoid production in J774 murine macrophages [J]. Phytomedicine, 2006, 13(6): 412-418.

[24] Young JM, Spire DA, Bedord CJ, et al. The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid [J]. J Invest Dermatol, 1984, 82(4): 367-371.

[25] Cho YS, Kim CH, Surh JH, et al. Identification of 4-[4-(4-fluorophenyl)-thiazol-2-ylamino]-2, 6-dimethyl-phenol (KR-33749) as an inhibitor of 5-lipoxygenase with potent antiinflammatory activity [J]. Pharmacology, 2010, 86(2): 65-72.

[26] Nonato FR, Nogueira TM, Barros TA, et al. Antinociceptive and antiinflammatory activities of Adiantum latifolium Lam; Evidence for a role of IL-1 β inhibition [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 136(3): 518-524.

[27] Rauh LK, Horinouchi CD, Loddi AM, et al. Effectiveness of Veronia scorpioides ethanolic extract against skin inflammatory processes [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 138(2): 390-397.

[28] Bveon SE, Chung JY, Lee YG, et al. In vitro and in vivo anti-inflammatory effects of taheebo, a water extract from the inner bark of Tabebuia avellanedae [J]. J Ethnopharmacol, 2008, 119(1): 145-152.

[29] Saraiva RA, Araruna MK, Oliveira RC, et al. Topical anti-inflammatory effect of Caryocar coriaceum Wittm. (Caryocaraceae) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritants [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 136(3): 504-510.

[30] Gerlania OL, Laura HIL, Renata SS, et al. Modulation of topical inflammation and visceral nociception by Vanillosmopsis arborea essential oil in mice [J]. Biomed & Preventive Nutrition, 2011, 1(3): 216-222.

[31] Clough GF, Bennett AR, Church MK. Effects of H1 antagonists on the cutaneous vascular response to histamine and bradykinin: a study using scanning laser Doppler imaging [J]. Br J Dermatol, 1998, 138(5): 806-814.

[32] Qing TY, Ping KJ, Zhou LL, et al. Anti-inflammatory effects of aqueous extract from Radix Liriope muscari and its major active fraction and component [J]. Chin J Natural Med, 2011, 9(3): 222-226.

[33] Marinho DG, Alviano DS, Matheus ME, et al. The latex obtained from Hancornia speciosa Gomes possesses anti-inflammatory activity [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 135(2): 530-537.

(收稿日期: 2012-04-24)

• 综 述 •

肾移植急性排斥反应尿液中标志物的研究进展*

林建敏¹, 王开宇²综述, 赵 猛², 兰小鹏^{2△}审校

(1. 福建医科大学福总临床医学院, 福建福州 350001; 2. 中国人民解放军南京军区福州总医院检验科, 福建福州 350025)

关键词: 肾移植; 移移植排斥; 尿; 生物学标记; 综述
DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 17. 027 文献标识码: A 文章编号: 1673-4130(2012)17-2104-03

虽然过去十几年间肾移植患者的生存率和移植肾脏的存活率都有显著提高, 但是相对肾移植的短期存活率, 长期存活率并没有得到明显改善, 主要由于移植后患者长期接受免疫抑制剂治疗。目前诊断急性排斥反应(AR)的金标准是肾穿刺活检^[1], 可这有一定的局限性: 费用高、侵入性穿刺、并发症风险和抽样误差等; 而且肾穿刺活检并不能完全正确反映肾功能变化^[2]。因此需要找到非侵入性的、能早期诊断 AR 的标志物, 帮助临床医生诊断患者是否发生同种免疫排斥反应, 以减少甚

至直接取消免疫抑制剂的使用, 为患者提供个性化治疗^[3]。本文将对该方面的研究进展进行综述。

1 尿液用于检测标志物

1.1 尿液的优势 体液(血液或尿液)中的小分子代谢物可作为检测肾功能和 AR 标志物的来源, 但作为一种检测 AR 的标志物的来源, 血液存在一些局限性。最近研究认为尿液是寻找非侵入性、早期诊断肾移植 AR 的有效标志物的理想来源^[4], 相对于血液, 尿液更稳定, 分析前处理更简便, 这对于减少样本

* 基金项目: 南京军区医学科学技术研究“十一五”计划课题项目(06Z47)。 △ 通讯作者, E-mail: lanxp@sina. com。