

·基础研究·

二甲苯致小鼠耳肿胀急性炎症模型的建立

谷捷¹,李鑫¹,余黄合^{1,2},王宝新¹,黄惠勇¹,曾嵘^{2*},蔡雄^{1,3*}

(1.湖南中医药大学中医诊断学湖南省重点实验室,湖南长沙 410208; 2.湖南中医药大学药学院,湖南长沙 410208;

3.湖南中医药大学中医方证研究转化医学湖南省高校重点实验室,湖南长沙 410208)

【摘要】目的 通过对二甲苯的用量和保留时间进行研究,优选二甲苯致小鼠耳肿胀急性炎症模型的最佳成模条件。**方法** 二甲苯涂抹昆明系小鼠右耳廓上下两面,诱导建立急性耳肿胀,对二甲苯剂量(20、30、40 μL)和保留时间(30、45、60、75、90 min)进行优选,并采用阳性药对优选建立的小鼠耳肿胀急性炎症模型进行验证。**结果** 二甲苯用量对鼠耳肿胀率影响不明显($P>0.05$);但随保留时间延长,耳肿胀度呈下降趋势,且90 min组与30 min组比较有显著性差异($P=0.045$)。与模型组比较,经吲哚美辛治疗后,耳肿胀度显著降低($P=0.007$),TNF- α 含量亦明显下降($P<0.001$)。**结论** 二甲苯用量20 μL ,保留时间30 min,可成功建立最佳的小鼠耳肿胀急性炎症模型。

【关键词】 二甲苯;耳肿胀急性炎症;致炎剂用量;保留时间**【中图分类号】**R285.5;R76**【文献标识码】**A**【文章编号】**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.05.008

Establishment of Acute Inflammation Mice Models with Ear Edema Induced by Dimethylbenzene

GU Jie¹, LI Xin¹, YU Huanghe^{1,2}, WANG Baoxin¹, HUANG HuiYong¹, ZENG Rong^{2*}, CAI Xiong^{1,3*}

(1.Hunan Provincial Key Laboratory of Diagnostics in Chinese Medicine, 2. School of Pharmacy,

3.Hunan Department of Education's Key Laboratory of Translational Chinese Medicine, Hunan University

Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

【Abstract】Objective To investigate the optimal dosage and retention time of dimethylbenzene for the induction of a mouse ear edema. **Methods** Dimethylbenzene was applied evenly on the surface of both sides of the auricle of mice to induce acute inflammation. Different dosages (20, 30, 40 μL) and retention time (30, 45, 60, 75, 90 min) of dimethylbenzene were compared to optimize these main variables for the induction of ear edema in mice. For verifying the model parameters a positive drug was performed. **Results** Increase in the dosage of dimethylbenzene resulted in no significant increase in the ear edema ($P>0.05$); while the ear edema rate was decreased with the retention time prolonged, and marked reduction in the rate of ear edema was attained between 30 and 90 min. Compared with the vehicle-control mice, the ear edema rate ($P=0.007$) and serum values of TNF- α ($P<0.001$) decreased significantly in mice treated with indomethacin. **Conclusion** The optimal mouse model of ear edema is induced by applying 20 μL dimethylbenzene with 30 min retention.

【Keywords】 dimethylbenzene; acute inflammation of ear edema; dosage; retention time.

炎症是机体对各种致炎因子引起损伤所产生的以防御反应为主的病理过程^[1],局部表现为红、肿、热、痛和功能障碍等。炎症见于多种疾病的病理过

程,前期多以急性炎症为主,迁延不愈则转为慢性炎症,严重影响疾病预后和患者生活质量^[2]。因此,开发安全有效的抗炎药物临床价值巨大,而药物的

【收稿日期】2015-07-03**【基金项目】**国家自然科学基金项目(81373540);湖南省中医药科研计划项目(201308);湖南省教育厅科学研究重点项目(12A107);湖南中医药大学中医诊断国家重点学科开放基金重点项目(2014-8);湖南省大学生创新性实验计划项目(2014202)。**【作者简介】**谷捷,女,在读硕士研究生,研究方向:中药抗炎免疫药理研究。**【通讯作者】***蔡雄,男,教授,博士研究生导师,E-mail:caix12@qq.com;曾嵘,女,教授,硕士研究生导师,E-mail:472719275@qq.com。

研发多以选择病变程度适中、容易复制、重现性好、经济的疾病动物模型,全面、客观地评价药效作用为前提。

二甲苯是常用的化学致炎剂,可诱导组胺、激肽及纤维蛋白溶解酶等炎症介质释放,进而引起局部毛细血管通透性的增加、炎症细胞的浸润、急性渗出性炎性水肿等^[3]。中药创新药物研发中,常以二甲苯诱发小鼠耳壳急性肿胀,模拟机体急性炎症的病理状态,以评价药物抗炎作用,然而由于二甲苯涂抹剂量和保留时间缺乏统一的标准^[4-7],导致模型诱导的成功率低,且稳定性差,从而限制了模型在抗炎中药新药研究中的应用。基于此,本研究对二甲苯涂抹剂量和保留时间等模型诱导的关键参数进行了比较研究,以期建立成功率高、稳定性强、易于复制的小鼠耳肿胀急性炎症模型,为中药新药研究的抗炎作用评价提供科学、可靠的实验动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物

昆明系小鼠,SPF级,体质量(20±2)g,雌雄各半,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,合格证号:43004700007921。

1.2 试剂及仪器

二甲苯(批号:20140108,天津恒兴试剂有限公司);吡哌美辛(批号:A14070,山西云鹏制药有限公司);肿瘤坏死因子 α (TNF- α)单抗由长沙维尔生物科技有限公司提供;打孔器、移液枪、灌胃器。

1.3 二甲苯涂耳剂量的优选

取昆明小鼠30只,分层随机化分为3组,每组10只,分别精密吸取均匀二甲苯涂布于各鼠右耳上、下两面,剂量分别为20、30、40 μ L,左耳不涂作对照。于涂耳30min后,处死小鼠,沿耳廓基线剪下两耳,采用6mm直径打孔器于左右耳对称部位打下耳片,用精密电子天平称取各鼠耳质量,并计算鼠耳肿胀率[肿胀率=(右耳质量-左耳质量)/左耳质量 \times 100%]。

1.4 涂耳保留时间的优选

取昆明小鼠50只,分层随机化分为5组,每组10只,分别吸取“1.3”实验确定的最佳剂量二甲苯均匀涂布于各鼠右耳上、下两面,左耳不涂作对照。分

别于涂布后30、45、60、75、90min,处死小鼠,余下操作同“1.3”处理。

1.5 模型验证

取昆明小鼠60只,分层随机化分为空白组、模型组、阳性药物(吡哌美辛)组3组,每组20只。吡哌美辛组给予吡哌美辛药液一次性灌胃,给药剂量(10mg/kg),空白组、模型组给等容积蒸馏水。给药1h后,吸取20 μ L的二甲苯均匀涂布于各鼠右耳上、下两面,左耳不涂作对照。涂布30min后,每组取10小鼠处死,余下操作同“1.3”处理。每组另10只行摘眼球取血,将血放入4 $^{\circ}$ C,3500r/min环境离心,15min后取血清检测TNF- α 。

1.6 统计分析

实验数据用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。多组间两两比较采用单因素方差分析法,方差齐采用LSD检验,方差不齐用Dunnett's T3检验。所有数据均采用SPSS 19.0软件进行分析。

2 实验结果

2.1 二甲苯涂耳剂量的优选结果

小鼠耳肿胀率随着二甲苯用量的增加(20、30、40 μ L)呈上升趋势,但三组数据差异无统计学意义($P>0.05$)。综合考虑小鼠耳廓的覆盖能力及二甲苯的毒性,我们确定最佳涂耳剂量为20 μ L。见图1。

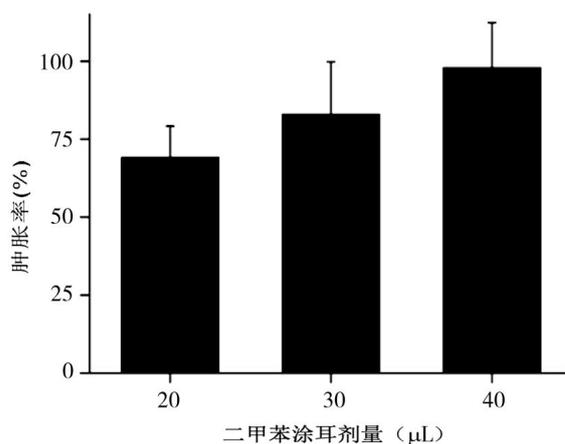
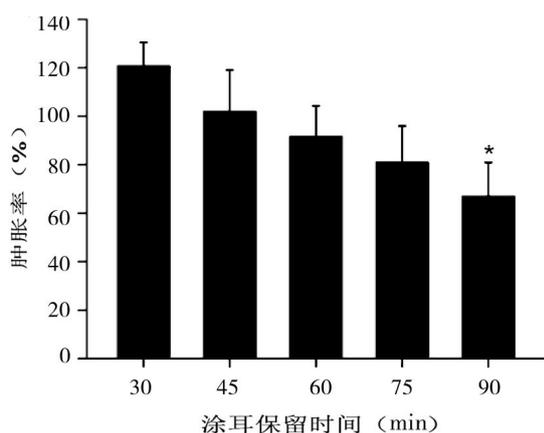


图1 二甲苯涂耳剂量的优选($\bar{x}\pm s, n=10$)

2.2 二甲苯涂耳保留时间的优选结果

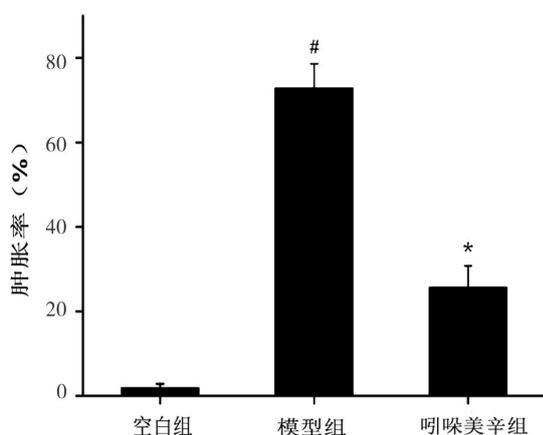
随着涂耳保留时间的推移,各组鼠耳的肿胀率呈下降趋势,其中30min组的肿胀率与90min组比较差异有显著性($P=0.045$)。因此,选择最佳时间为30min。见图2。



注:与30 min组比较,* $P=0.045$ 。

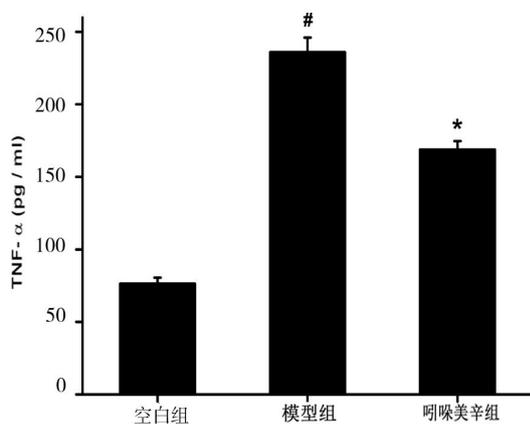
图2 二甲苯涂耳保留时间的优选($\bar{x} \pm s, n=10$)。

2.3 二甲苯致小鼠耳肿胀急性炎症模型条件的验证
实验结果显示,与模型组相比,吲哚美辛组小鼠耳肿胀率显著降低($P=0.007$),血清中TNF- α 含量亦明显减少($P<0.001$)。见图3-5。



注:与空白组比较,# $P=0.002$;与模型组比较,* $P=0.007$ 。

图3 二甲苯致小鼠耳肿胀急性炎症模型的评价($\bar{x} \pm s, n=10$)



注:与空白组比较,# $P<0.001$;与模型组比较,* $P<0.001$ 。

图4 不同组中血清 TNF- α 浓度($\bar{x} \pm s, n=10$)



图5 模型组和吲哚美辛组自身左右耳对比图

3 讨论

炎症动物模型的成功构建是影响中药抗炎创新药物研究的重要因素之一。急性炎症模型常以二甲苯、TPA、花生四烯酸等物质作为致炎剂^[8-13],而二甲苯由于致炎机制与临床常见急性炎症相似、操作简单、不需要特殊设备、见效快、复制成功率高且实验动物价格低廉等优点,广泛用于中药抗炎创新药物的抗炎效应评价和抗炎活性目标化合物的筛选等^[13-15],也常被药理学等课程实验教学所选用。然而,查阅相关研究文献,研究团队发现决定二甲苯致小鼠耳急性肿胀模型成功构建的关键因素——二甲苯涂抹剂量和保留时间缺乏统一的标准^[4-7],涂抹剂量和保留时间的不规范,不但影响了该模型的成功构建,而且影响了中药创新药物研发。

研究团队在实验操作过程中,发现二甲苯涂抹用量为20 μL 时即可完全覆盖鼠耳上、下两面,而超过20 μL ,由于“虹吸效应”二甲苯渗透到小鼠背部及眼周,引起小鼠的极度不适,进而影响实验成功。且二甲苯涂抹用量在20~40 μL 时,鼠耳肿胀率随着涂抹剂量增加成上升趋势,但无统计学差异($P>0.05$)。综合上述因素,研究团队认为,二甲苯涂抹剂量以20 μL 为宜。二甲苯引起的耳肿胀急性炎症模型可能主要引起组胺、缓激肽等炎症介质的释放,引起局部血管扩张、毛细血管通透性增加、炎症细胞浸润,造成耳部急性渗出性炎症水肿,具有自愈性、自横性的特点^[16-18],因此二甲苯涂耳保留时间亦需要进行考察。结果表明,随着二甲苯保留时间的延长,鼠耳肿胀呈下降趋势。因此,研究团队认为保留时间30 min为佳。

吲哚美辛是一种常用有效的非甾体抗炎药,TNF- α 作为一种促炎症因子和免疫调节因子,在炎症的初始阶段中起核心作用,是启动炎症的重要细胞因子^[19-22]。基于所筛选的二甲苯涂抹剂量20 μL 、保留时间30 min,采用吲哚美辛进行模型评价,选

择 TNF- α 作为炎症反应的指标。研究显示,吡啶美辛组鼠耳肿胀率明显低于模型组($P=0.007$), TNF- α 含量亦显著降低($P<0.001$)。提示,经过优化筛选的实验参数二甲苯为致炎剂,精密吸取 20 μL ,均匀涂布于各鼠右耳上、下两面,保留时间为 30 min 可以成功构建小鼠耳肿胀急性炎症模型。

参考文献:

- [1] 刘可勋.中、西医学的“炎症”观及其诊疗学思想[J].贵阳中医学院学报,2003,25(4):8-10.
- [2] 刘万隆.炎症简介[J].生物学教学,2002,27(11):32-33.
- [3] 熊玉兰,叶加.化学试剂二甲苯的毒性研究[C].乌鲁木齐:第二届全国试剂与应用技术交流会论文集,2007:52-53.
- [4] 邵红山,王洮惠,程自银,等.秦艽不同配伍对小鼠耳肿胀的影响[J].新疆中医药,2013,31(5):64-65.
- [5] Tong L, Chen T, Chen Z, et al. Anti-inflammatory activity of omphalocarpin isolated from Radix Toddaliae Asiaticae [J]. J Ethnopharmacol. 2014,155(3):1553-1560.
- [6] Ishola IO, Awodele O, Olusayero AM, et al. Mechanisms of Analgesic and Anti-inflammatory Properties of Annona muricata Linn. (Annonaceae) Fruit Extract in Rodents [J]. J Med Food. 2014,17(12):1 375-1 382.
- [7] Basting RT, Nishijima CM, Lopes JA, et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and gastroprotective effects of a hydroalcoholic extract from the leaves of Eugenia punicifolia (Kunth) DC. in rodents[J]. J Ethnopharmacol, 2014,157:257-267.
- [8] 曾光,梁清华,刘韶,等.钻地风挥发油化学成分及抗炎活性的研究[J].天然产物研究与开发,2009,21(1):129-131.
- [9] Schmeda-Hirschmann G, Delporte C, Valenzuela-Barra G, et al. Anti-inflammatory activity of animal oils from the Peruvian Amazon[J]. J Ethnopharmacol. 2014,156:9-15.
- [10] Ali NM, Mohd Yusof H, Yeap SK, et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of untreated, germinated, and fermented mung bean aqueous extract[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014:350 507.
- [11] Pacheco NR, Pinto Nde C, da Silva JM, et al. Cecropia pachystachya: a species with expressive in vivo topical anti-inflammatory and in vitro antioxidant effects [J]. Biomed Res Int, 2014:301 294.
- [12] Chibli LA, Rodrigues KC, Gasparetto CM, et al. Anti-inflammatory effects of Bryophyllum pinnatum (Lam.) Oken ethanol extract in acute and chronic cutaneous inflammation [J]. J Ethnopharmacol, 2014,154(2):330-338.
- [13] Wang Y, Chen P, Tang C, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of extract and two isolated flavonoids of Carthamus tinctorius L[J]. J Ethnopharmacol, 2014,151(2):944-950.
- [14] Wen L, Xia N, Chen X, et al. Activity of antibacterial, antiviral, anti-inflammatory in compounds andrographolide salt [J]. Eur J Pharmacol, 2014,740:421-427.
- [15] 李艳丽,胡彦武.紫花地丁抗炎作用及机制研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(24):244-247.
- [16] 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.
- [17] 张小丽,张明发,杨智锋,等.祛风湿中药镇痛抗炎的药性研究[J].中华中医药学刊,2008,26(11):2 386-2 396.
- [18] 潘文,张锁庆,马骏,等.归甲疏通胶囊对急性渗出性炎症和慢性增生性炎症影响的实验研究[J].卫生职业教育,2009,27(23):108-109.
- [19] 李鑫,郭建生,师振予,等.妇科千金片对慢性盆腔炎大鼠血清炎症细胞因子表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(10):225-228.
- [20] 仇湘中,蒋盛昶,张信成,等.补肝肾腰方对腰椎间盘突出大鼠髓核组织 TNF- α 、IL-1 β 干预作用的研究 [J]. 湖南中医药大学学报,2015,35(4):17-19,23.
- [21] 罗亦石,石磊,王颖钰,等.复方龙葵颗粒对四氯化碳诱发肝损伤模型大鼠血清 TNF- α 、IL-6 与 IL-10 的影响[J].吉林中医药,2014,34(6):618-620.
- [22] 仕丽,胡少丹,王檀,等.温肺通痹颗粒对间质性肺病患者血清 TNF- α 的影响[J].长春中医药大学学报,2014,30(4):288-289.

(本文编辑 匡静之)