

DOI:10. 11798/j. issn. 1007 - 1520. 202222034

· 论 著 ·

小鼠鼻腔灌洗及鼻黏膜获取方法的改进

张俊艳,刘雪婷,何颖,李林梅

(广州医科大学附属第二医院 广东省过敏反应与免疫重点实验室 呼吸疾病国家重点实验室,广东 广州 510260)

摘 要: **目的** 小鼠变应性鼻炎模型在变应性鼻炎发生发展及治疗手段疗效评估的研究中具有重要的作用,本研究在现有方法的基础上对小鼠鼻腔灌洗以及鼻黏膜的获取方法进行了改进,以提高小鼠鼻腔灌洗以及鼻黏膜获取的效率与质量。**方法** 经后鼻道的鼻腔灌洗方法,并将它与经气管插管的鼻腔灌洗进行了比较,通过比较灌洗液回收率以及操作耗时,以确定两种方法的优劣。另外本研究还提出了两种小鼠鼻黏膜获取方法:即从鼻骨和上颌两个开放的窗口获取鼻黏膜,以及分部位获取鼻黏膜的方法,并通过图片的形式对过程予以了展示。**结果** 经过简单培训的实验员用后鼻道鼻腔灌洗法收集的灌洗液量要显著高于颇有经验的实验员用气管插管鼻腔灌洗法获取的灌洗液量,平均回收率达 93%,而且操作耗时明显缩短。通过从鼻骨和上颌两个开放的窗口获取鼻黏膜,以及分部位获取鼻黏膜的方法,可以分别实现最大化的获取小鼠鼻黏膜。**结论** 经后鼻道的鼻腔灌洗,从鼻骨和上颌两个开放的窗口获取鼻黏膜,以及分部位获取鼻黏膜的方法,操作简单,效率高,容易掌握,将会为小鼠变应性鼻炎模型研究的取材方法提供重要参考。

关 键 词:变应性鼻炎;动物模型;鼻腔灌洗;鼻黏膜
中图分类号:R765. 21

Improvement on methods to obtain nasal lavage fluid and mucosa from mice

ZHANG Junyan, LIU Xueting, HE Ying, LI Linmei

(the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Allergy & Clinical Immunology, the State Key Laboratory of Respiratory Disease, Guangzhou 510260, China)

Abstract: **Objective** The mouse model of allergic rhinitis plays an important role in the research on the occurrence and development of AR and the evaluation of the therapeutic effect. However, the difficulty in obtaining samples from nasal lavage and nasal mucosa in mice limits the application of this model. In this study, we improved the methods to obtain nasal lavage fluid and nasal mucosa from mice. **Methods** An easy method to obtain the nasal lavage fluid of mouse through the postnasal way was proposed and compared with the method through tracheal way. In addition, two methods (i. e. dual windows through nasal bone and palate, subsite obtainment) were proposed for obtaining the nasal mucosa of mice and the processes were demonstrated in the form of pictures. **Results** The recovery of lavage fluid collected by the simple-trained experimenter using the postnasal way was significantly higher than that obtained by the experienced experimenter using the tracheal way. The average recovery rate of nasal lavage fluid was up to 93% in this new method, and the operation time was significantly shortened. In the process of obtaining the nasal mucosa of mice, the two methods proposed in this study could achieve the maximum obtainment of nasal mucosa or nasal mucosa from different locations respectively. **Conclusion** The methods to obtain nasal lavage fluid and the nasal mucosa of mice proposed in this study are simple to operate, efficient and easy to grasp, and will provide an important reference for the study of the mouse model of AR.

Keywords:Allergic rhinitis; Animal model; Nasal lavage fluid; Nasal mucosa

基金项目:广州市科技计划项目市校(院)联合资助项目(202102010104);广东省自然科学基金面上项目(2021A1515012551);国家自然科学基金面上项目(82171764)。
第一作者简介:张俊艳,男,博士,主管药师。
通信作者:李林梅,Email: lilinmei0915@163. com

变应性鼻炎是最常见的过敏性疾病。在欧美国家其人群发病率甚至已经达到了40%，在中国其发病率也接近20%^[1]。变应性鼻炎不仅严重降低患者的生活质量，而且还会引起一系列并发症，甚至会迁延发展为哮喘。变应性鼻炎动物模型作为一种有力的研究工具，在探讨变应性鼻炎发生发展的机制中，以及在对潜在的干预手段及治疗药物的疗效进行评价中都具有重要的应用价值^[2-3]。小鼠因为与人的同源性较高，而且容易构建基因敲除品系，在疾病模型研究中更具优势。然而因为小鼠个体较小，模型制备后期的取材操作均具有较高的难度，比如：收集小鼠鼻腔灌洗液以及获取小鼠鼻黏膜。通常小鼠鼻腔灌洗是经气管插管逆向灌注，然后收集从鼻孔流出的灌洗液。然而该方法不易掌握，对于初学者而言，很容易出现灌洗液从小鼠口中漏出，而导致灌洗失败或灌洗液回收率低的情况。另外在小鼠鼻黏膜的获取方法上，也鲜有文章能从方法学的角度提供具体而直观的参考。因此本研究对小鼠鼻腔灌洗的方法进行了改良，以提高灌洗的效率。同时，对小鼠鼻黏膜完整获取，以及分部位获取的两种方式进行了具体而直观的描述，以满足研究者不同的实验目的与要求，并提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

0.2% 甲紫溶液，PBS 缓冲溶液，眼科剪刀，镊子，1 mL 注射器，平口针头/管，手术刀片，莱卡体视显微镜（拍照用）等。

1.2 实验动物

约8周龄 C57/BL6 雌性小鼠9只，购于广东药康生物科技有限公司（SCXK（粤）2020-0054），在广州医科大学附属第二医院 SPF 级动物实验中心饲养（SYXK（粤）2018-0192）。本研究实验方案获得广州医科大学附属第二医院动物伦理委员会的批准。

1.3 小鼠后鼻道鼻腔灌洗操作步骤

二氧化碳麻醉处死小鼠，沿颈部剪下小鼠头部。将剪刀伸进口腔沿一侧下颌剪开小鼠脸颊部，并将舌根及咽喉部的组织掀开并移至另一侧（或剪掉），分离暴露小鼠上颌，可见软腭内有一管道（后鼻道），并可见开孔，在正常位置时此孔正对小鼠气管入口上方，位置接近舌根部。用纱布吸干头部残端的血液。将含灌注液的注射器（平头的针口）沿后

鼻道开孔，插入后鼻道约3~5 mm，推注液体，在小鼠鼻孔处用1.5 mL EP管回收灌洗液（图1）。

1.4 两种鼻腔灌洗方法的比较

为了评估新方法的优势，我们将其与气管插管鼻腔灌洗法进行了比较。小鼠气管插管鼻腔灌洗方法操作流程是：二氧化碳麻醉处死小鼠，剪开颈部皮肤和组织，暴露小鼠气管，在气管上剪一小孔，向小鼠头部的方向插入灌洗针头，将针头抵近小鼠咽喉部，推注注射器，使灌洗液从鼻孔流出，并予以收集。注意控制好灌洗针头的位置，避免灌洗液从小鼠口腔流出，导致灌洗失败。我们安排了一名对气管插管法颇有经验的实验员用气管插管法对9只小鼠进行鼻腔灌洗，之后安排另一名之前未做过鼻腔灌洗，但经过简单培训（训练了2只小鼠）的实验员用后鼻道鼻灌洗法也对这9只小鼠进行了鼻腔灌洗，灌洗液是300 μ L，分别记录两种方法灌洗液的回收量以及操作耗时。为了避免鼻腔残留液体的影响，我们在气管插管灌注后往气管里灌注了空气，排出了鼻腔残留液体，前后两种方法间隔时间约30 min。

1.5 从鼻骨及上颌两个窗口获取小鼠鼻黏膜的方法

为了更好的显示小鼠全部鼻黏膜的区域，我们用0.2%的甲紫溶液经后鼻道灌洗鼻部，灌洗时用镊子稍夹紧鼻孔，使染色剂分布在整个鼻腔中。钝性分离小鼠头部皮肤组织，暴露小鼠头骨，用镊子沿鼻孔向上撬开鼻骨。用镊子分离披覆在上颌的软组织，暴露鼻腔的底部。用镊子将小鼠左右侧上颌牙齿与牙槽骨截断外翻，用镊子撬开上颌位于后气道底部的骨片，暴露整个后鼻道。在甲紫溶液的示踪下，可以看到整个鼻腔被染上蓝色的黏膜。用镊子从鼻腔顶部及底部两个窗口分别取下鼻黏膜及软骨，并将软骨上的黏膜取干净。位于后鼻道的黏膜组织也可以根据研究者的目的予以单独获取。由这种方法获取的鼻黏膜可以进行后续鼻黏膜蛋白与组织RNA的提取等实验（图2）。

1.6 分部位获取小鼠鼻黏膜的方法

钝性分离小鼠头部皮肤组织，暴露小鼠头骨。将小鼠头骨两侧颧骨与上颌骨连接的位置用剪刀剪开；用镊子沿鼻孔向上撬开鼻骨。用镊子分离披覆在上颌的软组织，暴露鼻腔的底部。用镊子将小鼠两侧上颌牙槽骨截断；用剪刀将小鼠上门齿及鼻尖部的骨质剪掉。在上颌骨的底部，用刀片或剪刀断开骨鼻中隔与左右两侧上颌骨的骨质连接；用镊子夹住上颌骨前端，分别往左右两侧撬开上颌骨，镊子夹住骨鼻中隔的底部并取下骨鼻中隔，小心不要破

坏鼻黏膜。可见披覆在左右侧上颌骨上的鼻黏膜；以及披覆在骨鼻中隔两侧的鼻黏膜；后续可以根据研究者的兴趣与研究目的,分部位获取鼻黏膜进行

相关的检测,也可以将所获取的 3 个部位的鼻黏膜进行组织固定后进行后续的脱钙以及组织染色等(图 3)。

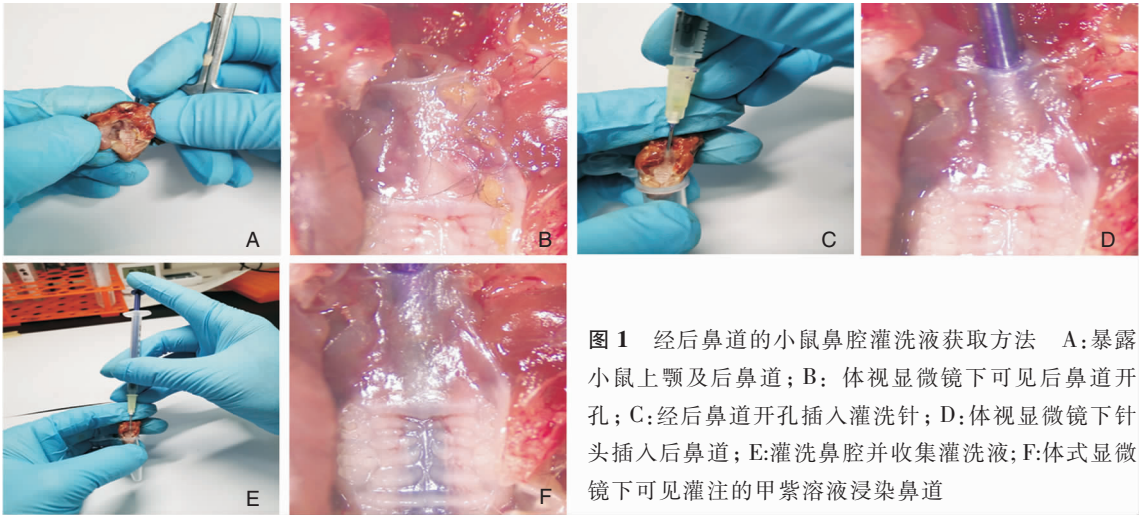


图 1 经后鼻道的小鼠鼻腔灌洗液获取方法 A:暴露小鼠上颌及后鼻道;B:体视显微镜下可见后鼻道开口;C:经后鼻道开口插入灌洗针;D:体视显微镜下针头插入后鼻道;E:灌洗鼻腔并收集灌洗液;F:体式显微镜下可见灌注的甲紫溶液浸染鼻道

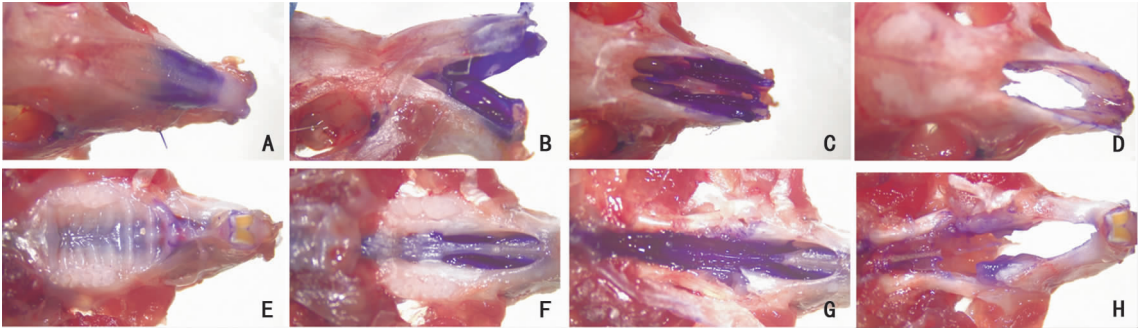


图 2 从鼻骨及上颌两个窗口获取小鼠鼻腔黏膜 A:从鼻骨上方可见被甲紫染色的鼻腔黏膜;B:沿鼻孔向上撬开鼻骨;C:从撬开的鼻骨窗口向下观察鼻黏膜;D:从鼻骨窗口向下观察鼻黏膜获取干净的效果;E:从上颌观察被甲紫染色的鼻腔黏膜;F:撕开上颌软组织暴露鼻腔黏膜;G:撬开上颌牙槽骨及上颌支撑鼻道的骨质部分暴露鼻腔黏膜;H:从上颌底部的窗口观察鼻黏膜获取干净的效果

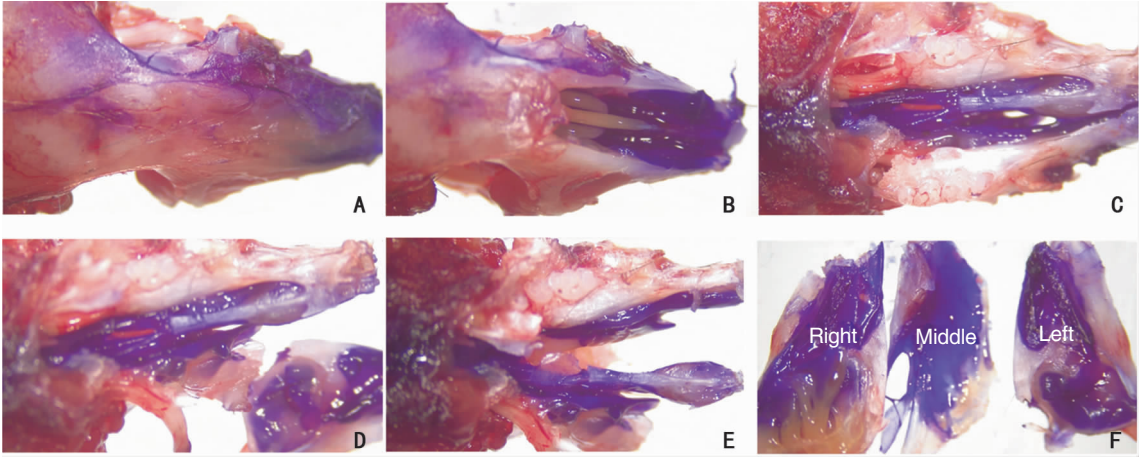


图 3 分部位获取小鼠鼻黏膜组织 A:断开颧骨与上颌骨的连接;B:撬开鼻骨;C:断开骨鼻中隔与左右两侧上颌骨的骨质连接;D:撬开左右两侧上颌骨;E:分离并取出鼻中隔;F:披覆在左右两侧上颌骨以及骨鼻中隔两侧的鼻黏膜

2 结果

2.1 两种鼻腔灌洗方法比较

我们将后鼻道鼻腔灌洗与气管插管鼻腔灌洗法进行了比较。先后对同一小鼠分别经 2 名不同经验的实验员进行灌洗操作,并比较两种方法灌洗液的回收量以及操作耗时。结果显示,对经气管插管法颇有经验的实验员,在灌注 300 μ L 洗液后,鼻腔灌洗液的回收量均值为 254 μ L,平均回收率为 84.7%,而只是经过简单培训的实验员用后鼻道鼻腔灌洗法的灌洗液回收量均值为 280 μ L,要高于颇有经验的实验员用气管插管鼻腔灌洗法获取的灌洗液回收量($t = 5.319, P < 0.01$),平均回收率高达 93%。在操作耗时上,经气管插管鼻腔灌洗操作平均耗时为 139.5 s,经后鼻道鼻腔灌洗操作平均耗时为 83 s,经后鼻道鼻腔灌洗在操作耗时上比用气管插管鼻腔灌洗法节省约 57 s,差异具有统计学意义($t = 4.878, P < 0.01$)。

2.2 两种鼻黏膜获取方法的比较

我们用甲紫溶液对鼻黏膜进行了灌注染色,并采用上述两种方法对鼻黏膜进行了获取。从鼻骨及上颌两个窗口获取鼻黏膜的方法能够最大化的获取小鼠鼻黏膜组织,取完鼻黏膜后,从上下两个窗口观察整个鼻腔,未见明显的鼻黏膜残留(图 2)。通过分部位获取鼻黏膜的方法,我们最后能够成功获得披覆在两侧上颌骨以及骨鼻中隔两侧的鼻黏膜组织(图 3)。该方法对披覆在上述部位的鼻黏膜基本不会造成人为的损坏,方便进行后续的包括病理学在内的诸多分析。我们从后续样品的用途上,将两种获取小鼠鼻黏膜的方法进行了比较,结果如表 1 所示,分部位获取鼻黏膜的方法后续能够进行组织病理学的检测,两种方法获取的鼻黏膜都可以进行包括细胞学以及分子生物学在内的进一步分析。

表 1 两种小鼠鼻黏膜获取方法的比较

两种小鼠鼻黏膜获取方法的比较	从鼻骨及上颌两个窗口获取鼻黏膜	分部位获取鼻黏膜
是否可以最大化的获取鼻黏膜组织?	是	否
是否可以实现分部位获取鼻黏膜?	否	是
黏膜是否可用于组织病理学分析?	否	是
黏膜是否可用于后续细胞学分析?	是	是
黏膜组织是否可用于分子生物学分析(如蛋白质,mRNA 等)?	是	是

3 讨论

变应性鼻炎的主要临床表现是鼻塞、鼻痒,打喷嚏、和流清涕,因此它是以局部为主要表现的变应性疾病。在临床上血清变应原特异性 IgE 的检出,对变应性鼻炎通常具有重要的诊断价值。然而有一部分患者是局部变应性鼻炎^[4],除了能在局部检测出变应原特异性 IgE,血清学中并没有变应原特异性 IgE 的明显升高^[5-6]。另外,Watts 等^[7]在对变应性鼻炎的研究中发现,患者的血液和鼻腔灌洗液样本显示出了截然不同的基因表达谱及基因信号通路。因此围绕鼻腔及鼻黏膜是变应性鼻炎研究的重点区域。

鼻腔灌洗以及鼻黏膜获取是变应性鼻炎模型研究中的重要步骤^[8]。啮齿类动物,如兔,大鼠,豚鼠,小鼠等都可用于变应性鼻炎的研究^[9-10]。然而,目前研究 AR 多以大鼠或豚鼠为多见。如果排除了取材困难的因素,小鼠模型用于研究变应性鼻炎则更为合适^[11]。主要原因有:①小鼠模型造模操作相对简单;②小鼠价格相对便宜,而且方便饲养;③小鼠种属的商业试剂和检测试剂盒选择性较多,方便研究;④易于构建基因缺陷或培育特定品系小鼠,方便深入研究^[12];⑤遗传背景清晰,而且小鼠基因的同源性与人更高。因此,解决小鼠在鼻腔灌洗以及鼻黏膜组织取材方面的瓶颈,将为小鼠变应性鼻炎模型的研究提供重要帮助。

本研究我们在参考原有小鼠鼻腔灌洗方法的基础上,提出了一种简易的鼻腔灌洗方法,即经后鼻道的鼻腔灌洗方法。该方法操作简单,灌洗的效率高,而且容易掌握。在小鼠变应性鼻炎模型研究中,研究者可对鼻腔灌洗液的成分,包括细胞因子以及收集的细胞进行进一步分析。研究者可以根据自身的实验条件,选择合适的灌洗液量,比如 50 ~ 100 μ L,甚至更少的灌洗液,或重复灌洗,以提高回收的灌洗液中相关指标的检出水平。在这种情况下经后鼻道的鼻腔灌洗方法的优势就会更明显,因为它的灌洗液回收得率更高,而且容易掌握,基本上不会出现漏出的情况。

在小鼠鼻黏膜获取方法方面,David 在 2013 年曾提出一种通过固定,脱钙去骨的方式获取完整小鼠鼻组织的方法^[13],该方法步骤相对繁琐,因为能够较完整的保持鼻组织的解剖结构,所以比较适用于病理以及组织形态学的观察。然而因为鼻组织已经被固定,所以该方法并不能实现对新鲜的鼻黏膜组织进行分析研究。而其他模型或研究类文章对小鼠鼻黏膜获取方法的描述都比较含糊,缺少具体而

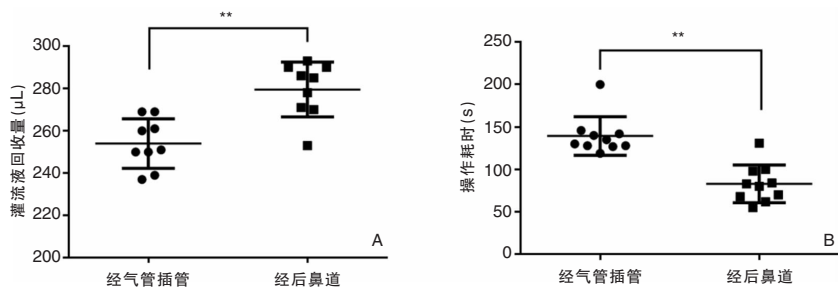


图4 经气管插管及经后鼻道获取小鼠鼻腔灌洗液的方法比较 A:灌洗液回收量的比较; B:两种方法操作耗时的比较 注:**表示经配对 t 检验分析,两种方法的差异 $P<0.01$ 。

直观的方法学参考。因此基于以上情况,我们提供了两种直观的解决方案,一种是最大程度地获取新鲜鼻黏膜的方法,该方法从鼻骨及上颌两个窗口暴露鼻黏膜,通过这两个窗口能够最大化地获取小鼠鼻黏膜组织,而且根据研究需要,可以选择是否获取后鼻道及鼻咽部的黏膜组织。该方法获取的鼻黏膜组织可以用于蛋白提取,组织匀浆,以及RNA提取等后续操作。另外一种是分部位获取鼻黏膜,通过该方法可以获取披覆在左右两侧上颌骨上的鼻黏膜;以及披覆在骨鼻中隔两侧的鼻黏膜。研究者可以在保持黏膜相对完整的情况下,对取出的黏膜予以固定及后续的组织染色等。也可以撕下不同部位的鼻黏膜进行后续的目标蛋白及mRNA的分析等。研究表明鼻中隔黏膜和鼻腔外侧壁黏膜的组织结构有所不同^[14],不同区域的鼻黏膜血管通透性及血管分布也会有一定差异^[15],因此不同部位的鼻黏膜应对环境物质及变应原的刺激可能会有所差别。因此选择不同部位的鼻黏膜,或者变化最为明显的鼻黏膜进行分析研究,或者在小鼠变应性鼻炎模型中通过比较同一只模型小鼠单侧鼻孔变应原刺激与未刺激侧鼻黏膜的变化差异,将会有助于解析变应性鼻炎发生发展的机制。

总之,小鼠变应性鼻炎模型在变应性鼻炎发生发展及治疗手段干预的评价研究中具有重要的作用,本研究提出的经后鼻道的鼻腔灌洗方法以及两种小鼠鼻黏膜获取方法,将会为小鼠变应性鼻炎模型研究提供重要参考。

参考文献:

[1] Cheng L, Chen J, Fu Q, et al. Chinese Society of Allergy Guidelines for diagnosis and treatment of allergic rhinitis[J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2018,10(4):300-353.

[2] Park JY, Choi JH, Lee SN, et al. Protein arginine methyltransferase 1 contributes to the development of allergic rhinitis by promoting the production of epithelial-derived cytokines[J]. J Allergy Clin Immunol, 2021 147(5):1720-1731.

[3] Zhang W, Tang R, Ba G, et al. Anti-allergic and anti-inflammatory effects of resveratrol via inhibiting TXNIP-oxidative stress pathway in a mouse model of allergic rhinitis[J]. World Allergy Organ J, 2020, 13(10):100473.

[4] Eguluz-Gracia I, Testera-Montes A, Rondon C. Medical algorithm: Diagnosis and treatment of local allergic rhinitis[J]. Allergy, 2021,76(9):2927-2930.

[5] Eguluz-Gracia I, Pérez-Sánchez N, Bogas G, et al. How to diagnose and treat local allergic rhinitis: A challenge for clinicians[J]. J Clin Med, 2019,8(7):1062.

[6] 葛欣宜, 张迎宏, 刘俊秀,等. 局部变应性鼻炎的研究进展[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2021, 27(1):114-118.

[7] Watts AM, West NP, Cripps AW, et al. Distinct gene expression patterns between nasal mucosal cells and blood collected from allergic rhinitis sufferers[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2018,177(1):29-34.

[8] 夏翠, 祝康, 郑国玺. DAPT对变应性鼻炎小鼠模型及相关细胞因子表达的影响[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2020, 26(5):512-516.

[9] Kar M, Bayar Muluk N, Bafaqeh SA, et al. Consensus on the methodology for experimental studies in allergic rhinitis[J]. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2019,121:68-71.

[10] 苗明三, 项丽玲, 苗艳艳. 变应性鼻炎动物模型制备规范(草案)[J]. 中草药, 2018, 49(1):50-57.

[11] 栾兆磊, 王雨农, 王洪田. 变应性鼻炎动物模型的研究进展[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2016, 30(13):1090-1094.

[12] 匡颖, 费俭. 小鼠,模式生物中的“常青树”[J]. 自然杂志, 2013,35(6):422-430.

[13] Dunston D, Ashby S, Krosnowski K, et al. An effective manual deboning method to prepare intact mouse nasal tissue with preserved anatomical organization[J]. J Vis Exp, 2013(78):50538.

[14] Uraih LC, Maronpot RR. Normal histology of the nasal cavity and application of special techniques[J]. Environ Health Perspect, 1990,85:187-208.

[15] Kumar NN, Gautam M, Lochhead JJ, et al. Relative vascular permeability and vascularity across different regions of the rat nasal mucosa: implications for nasal physiology and drug delivery[J]. Sci Rep, 2016,6:31732.

(收稿日期:2022-01-28;网络首发:2022-09-29)

本文引用格式:张俊艳,刘雪婷,何颖,等. 小鼠鼻腔灌洗及鼻黏膜获取方法的改进[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2022,28(6):87-91. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202222034

Cite this article as:ZHANG Junyan, LIU Xueting, HE Ying, et al. Improvement on methods to obtain nasal lavage fluid and mucosa from mice[J]. Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg, 2022,28(6):87-91. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202222034