

• 模型制备规范 •

变应性鼻炎动物模型制备规范（草案）

中华中医药学会中药实验药理专业委员会

摘要：变应性鼻炎（allergic rhinitis, AR）是机体暴露于变应原后由免疫球蛋白（IgE）介导的鼻黏膜非感染性慢性炎症性疾病，其以突然发作的鼻痒、喷嚏、过量的鼻分泌物和鼻塞症状为主要临床表现，间断性、常年性或季节性发作。现变应性鼻炎动物模型为病理性模型，以西医指标为主。基于对变应性鼻炎中西医临床病症特点分析及对现有动物模型大量实验研究，形成变应性鼻炎动物模型制备规范（草案）。

关键词：变应性鼻炎；动物模型；规范；草案；病症特点

中图分类号：R965.1 **文献标志码：**A **文章编号：**0253-2670(2018)01-0050-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.01.006

Specification for preparation of allergic rhinitis animal model (draft)

The Chinese Medicine Pharmacology Experiment Professional Committee of China Association of Chinese Medicine

Abstract: Allergic rhinitis (AR) is a non infectious chronic inflammatory disease of nasal mucosa mediated by IgE after exposure to allergens. The main clinical manifestations is of sudden onset of nasal itching, sneezing, excessive nasal secretions, and nasal congestion symptoms with intermittent, perennial or seasonal attacks. The AR animal model is a pathological model based on Western medicine indexes. According to the characteristics of AR clinical symptoms of traditional Chinese medicine and Western medicine and a large number of experimental researches on existing animal models, the preparation specification (draft) of AR animal models was formed.

Key words: allergic rhinitis; animal model; specification; draft; characteristics of clinical symptoms

变应性鼻炎（allergic rhinitis, AR）是指特异性个体接触致敏原后由免疫球蛋白（IgE）介导的介质（主要是组胺）释放，并有多种免疫活性细胞、促炎细胞和细胞因子等参与的鼻黏膜变态反应性疾病，目前该病的发病机制尚不明确。关于 AR 动物模型多种多样，但其实验技术与方法还缺少一系列标准化规范如指标体系、系统化的评价方法等，在大量动物实验基础上，并经专家多次讨论形成本规范（草案）。本规范建立了合理的模型量化标准，完善了一套系统完整的模型评价方法，为变应性鼻炎的机制深入研究、临床诊断及治疗提供有力的方法及依据。

1 造模动物

现用于制备变应性鼻炎模型的动物有大鼠、小鼠、豚鼠、兔、羊、狗等，常用的是豚鼠、大鼠。一般选用成年动物，雌雄各半。

2 造模方法

2.1 卵白蛋白(OVA)全身及局部攻击制备豚鼠(大鼠)变应性鼻炎模型^[1-2]

2.1.1 原理 OVA 溶液刺激鼻黏膜时，可产生喷嚏，同时释放神经肽类物质，导致鼻黏膜血管扩张，通透性增加。

2.1.2 方法 3~4 月龄豚鼠，体质量 400~450 g（或体质量 200~220 g 大鼠），雌雄各半，用 30 mg OVA 作抗原，氢氧化铝 [Al(OH)₃] 粉末 3 g 作佐剂，加生理盐水 100 mL 制成混悬液，每只豚鼠 ip 1 mL，隔日 1 次，共 7 次进行基础致敏。配制 2% OVA 生理盐水滴入双侧鼻腔，每侧 0.05 mL，每日 1 次，共 7 次，进行滴鼻激发。造模成功后，隔天给予 OVA 1 g/L 滴鼻以维持对鼻黏膜的刺激，可制备变应性鼻炎模型。本模型持续不少于 37 d。

收稿日期：2017-10-19

基金项目：国家“十一五”支撑计划项目（2008BAI53B09）；国家中医药管理局中医药标准化专项（2017-149-11）

2.2 2,4-二异氰酸甲苯酯 (TDI) 橄榄油溶液滴鼻制备豚鼠 (家兔) 变应性鼻炎模型^[3]

2.2.1 原理 TDI 作为半抗原, 与体内血清蛋白结合, 通过变态反应机制, 引起鼻超敏反应, 形成变应性鼻炎模型。

2.2.2 方法 3~4 月龄豚鼠, 体质量 400~450 g (或体质量 2.0~2.5 kg 新西兰兔), 雌雄各半, 用 0.1 mL TDI 和 0.9 mL 橄榄油, 在常温下充分混匀配制成浓度为 10% 的 TDI 溶液, 现配现用。给豚鼠 (新西兰兔) 用 10% TDI 溶液进行双侧鼻孔滴鼻, 用量每侧 12.5 $\mu\text{L}/\text{kg}$, 每日 1 次, 连续 7 d 后, 隔日 1 次, 激发从第 9 天开始, 直至第 21 天结束。可制备变应性鼻炎模型。本模型持续不少于 22 d。

2.3 肺气虚型变应性鼻炎模型^[4-5]

2.3.1 烟熏+OVA 致敏制备大鼠 (豚鼠) 肺气虚型变应性鼻炎模型

(1) 原理: 物理烟熏使肺功能受损可致肺气虚模型, OVA 致敏可致变应性鼻炎模型, 两者结合, 可形成肺气虚型变应性鼻炎模型。

(2) 方法: 3~6 月龄大鼠, 体质量 150~200 g (或豚鼠体质量 300~400 g), 雌雄各半, 将大鼠放入烟熏箱, 体积 60 cm \times 40 cm \times 40 cm, 特制烟熏艾条 (长 120 mm, 内含 7 g 硫磺粉、30 g 艾绒)。点燃艾条, 烟熏 30 min, 每天 2 次, 连续熏烟 15 d。在造肺气虚大鼠模型第 1 天, 以 OVA 0.3 mg、Al(OH)₃ 粉末 30 mg, 加生理盐水 1 mL, 配制成 1 mL 混悬液, 对大鼠 ip 进行基础致敏, 隔日 1 次, 连续 8 次, 共 15 d, 完成后再以 0.25 mg 的 OVA、2 mL 生理盐水超声雾化吸入, 每日 1 次, 连续 3 d, 强化致敏。确定 OVA IgE 抗体效价升高后, 用 5% OVA 的生理盐水溶液滴入双侧鼻腔, 每侧 0.05 mL, 每日 1 次, 共 7 次。可制备大鼠 (豚鼠) 肺气虚型变应性鼻炎复合模型。本模型持续不少于 36 d。

2.3.2 烟熏+10% TDI 致敏制备豚鼠 (大鼠) 肺气虚型变应性鼻炎模型

(1) 原理: 烟熏法使肺功能受损可致肺气虚模型, TDI 可致变应性鼻炎模型, 两者结合, 可制备肺气虚型变应性鼻炎模型。

(2) 方法: 2~3 月龄豚鼠, 体质量 300~400 g (或体质量 200~250 g 大鼠), 雌雄各半, 特制玻璃烟熏造模箱, 体积 60 cm \times 40 cm \times 40 cm, 特制烟熏艾条 (长 120 mm, 内含 7 g 硫磺粉、30 g 艾绒)。将豚鼠放入烟熏箱, 点燃艾条, 烟熏 30 min, 每天

2 次, 连续熏烟 15 d。制备肺气虚大鼠模型后, 用 0.1 mL TDI 和 0.9 mL 橄榄油常温下充分混匀, 配制成 10% 的 TDI 溶液, 现配现用; 用 10% TDI 橄榄油溶液对豚鼠进行鼻内给药, 用微量加样器抽取 10% TDI 橄榄油溶液 10 μL 分别滴于豚鼠双侧前鼻孔, 每侧 5 μL , 每日 1 次, 连续 7 d 后, 改为隔日给药 (维持致敏), 直至实验结束。可制备豚鼠 (大鼠) 肺气虚型变应性鼻炎模型。本模型持续不少于 32 d。

2.4 脾气虚型变应性鼻炎模型^[6-7]

2.4.1 ig 大黄冷浸液+游泳力竭+饥饿+ip OVA+鼻腔激发制备大鼠 (豚鼠) 脾气虚型变应性鼻炎模型

(1) 原理: 大黄为苦寒之药损伤脾胃、饮食不节及劳倦过度可致脾气虚模型, OVA 可致变应性鼻炎模型, 两者结合, 可制备脾气虚型变应性鼻炎模型。

(2) 方法: 大鼠, 体质量 200~250 g (或体质量 350~450 g 豚鼠), 雌雄各半, 每日上午给大鼠 ig 大黄制剂 (3 mL/只, 100% 大黄制剂: 取生大黄按 1:5 比例加水, 浸泡 24 h, 文火煎 15 min, 自然冷却, 4 层纱布滤过, 于 80 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴浓缩成生药 1 g/mL 的溶液), 每日 1 次; 每日下午于大鼠尾部缠绕质量为该大鼠体质量 10% 的保险丝, 放入水深 50 cm、水温 20 $^{\circ}\text{C}$ 的水槽中游泳, 以大鼠鼻尖没入水面下 10 s 为力竭标准, 每日 1 次; 控制饮食, 每日上午 10 点给食, 下午 4 点撤食, 共 21 d。然后给大鼠 ip OVA 液 (OVA 0.3 mg 作抗原, Al(OH)₃ 粉末 30 mg 作佐剂, 加生理盐水 1 mL 形成混悬液), 隔日 1 次, 共 7 次。ip 完成后第 2 天, 于末次 ip OVA 后, 分别在各组动物中随机选取 3 只, 进行被动皮肤免疫反应 (PCA) 实验 (于眼球后静脉丛采血 0.3 mL, 离心分离出血清, 取 40 μL 并用生理盐水稀释配成 1:4、1:16、1:64、1:256 浓度。取大鼠, 背部剃毛, 将上述不同浓度的血清分别 sc 于大鼠背部, 间隔 2 cm, 并作记一号; 72 h 后, 以 OVA 1 mg、伊文思蓝 5 mg, 溶于 1 mL 生理盐水中, 于大鼠锁骨下 iv, 30 min 后观察结果, 蓝斑直径超过 5 cm 为阳性), 确定 OVA IgE 抗体效价升高后, 每侧鼻腔均以 5% OVA 10 μL 局部免疫, 每日 1 次, 共 7 次。第 43 天, 可制备脾气虚变应性鼻炎复合模型。本模型持续不少于 42 d。

2.4.2 ig 大黄冷浸液+ip OVA+鼻腔激发制备豚鼠 (大鼠) 脾气虚型变应性鼻炎模型

(1) 原理: 大黄苦寒之药可致脾气虚模型, OVA

可致变应性鼻炎模型,两者结合,可制备脾气虚型变应性鼻炎模型。

(2) 方法: 3~4 月龄豚鼠, 体质量 350~450 g (或体质量 200~250 g 大鼠), 雌雄各半, 给豚鼠 ip OVA 液 (配制方法同“2.4.1”项, 0.3 mg/只), 隔日 1 次, 共 7 次, ip 完成后的第 2 天, 行 PCA 实验, 确定 OVA IgE 抗体效价升高后, 将 OVA 稀释液 (OVA 8 mg+生理盐水 20 μ L) 用微量加样器滴入双侧鼻腔, 每侧 10 μ L, 每日 1 次, 共 7 d。在造变应性鼻炎模型同时, 每日 ig 大黄制剂 14 g/kg (100%大黄冷浸液: 取生大黄按 1:5 比例加水, 浸泡 24 h, 文火煎 15 min, 自然冷却, 4 层纱布滤过, 于 80 $^{\circ}$ C 的恒温水浴里浓缩成相当于生药 1 g/mL 溶液), 在鼻腔局部攻击开始的第 1 天, 停止 ig 大黄制剂。第 21 天, 可制备脾气虚型变应性鼻炎模型。本模型持续不少于 25 d。

2.4.3 饮食不节+过劳伤气法+ip OVA+鼻腔激发制备大鼠脾气虚型变应性鼻炎模型

(1) 原理: 饮食不节可致脾气虚模型, OVA 致敏可致变应性鼻炎模型, 两者结合, 可制备脾气虚型变应性鼻炎模型。

(2) 方法: 3 月龄大鼠, 体质量 200~250 g, 雌雄各半, 单日喂饲甘蓝, 每只 10~15 g, 自由饮水; 双日 ig 猪脂 2 mL/只, 自由进食、饮水, 共 8 d; 于第 1 天开始, 将大鼠放入 20 $^{\circ}$ C 水池中游泳至疲劳过度 (以驱赶无力游泳或大鼠鼻尖没入水面下 10 s 为指征), 每天 1 次, 共 8 d, 造脾气虚模型。然后大鼠 ip OVA 液 (OVA 0.3 mg 作抗原, Al(OH)₃ 粉末 30 mg 作佐剂, 加生理盐水 1 mL 形成混悬液), 隔日 1 次, 共 7 次。完成后, 每只大鼠鼻腔均给 5% OVA 10 μ L, 每侧 5 μ L, 滴入大鼠双侧前鼻孔, 局部激发, 每日 1 次, 共 7 次。第 7 天, 可制备脾气虚型变应性鼻炎模型。本模型持续不少于 29 d。

2.5 肾阳虚型变应性鼻炎模型^[8-10]

2.5.1 im 醋酸强的松龙+ip OVA+鼻腔激发制备豚鼠肾阳虚型变应性鼻炎模型

(1) 原理: 摄入大剂量糖皮质激素时, 可抑制下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴的反馈作用, 突然停药, 可使机体对外界环境变化的应激、适应能力显著下降, 水、电解质代谢失调, 同时产生免疫抑制, 出现肾阳虚变化; 以 OVA 致敏法可致变应性鼻炎模型, 两者结合, 可制备肾阳虚型变应性鼻炎复合模型。

(2) 方法: 3~4 月龄豚鼠, 体质量 350~450 g,

雌雄各半, 每日 im 醋酸强的松龙注射液 (醋酸泼尼松龙注射液), 第 1 周每天按 50 mg/kg、第 2 周每天按 40 mg/kg、第 3 周每天按 30 mg/kg 剂量分别注射, 每个剂量使用 1 周。同时给豚鼠 ip OVA 液致敏 (OVA 0.3 mg 作抗原, Al(OH)₃ 粉末 30 mg 作佐剂, 加生理盐水 1 mL 形成混悬液), 隔日 1 次, 共 7 次。ip 完成后的第 2 天行 PCA 实验, 确定 OVA IgE 抗体效价升高后, 将 OVA 稀释液 (OVA 8 mg+生理盐水 20 μ L) 用微量加样器滴入双侧鼻腔, 每侧 10 μ L, 每日 1 次, 共 7 d。第 21 天, 可制备肾阳虚型变应性鼻炎模型。本模型持续不少于 22 d。

2.5.2 ig 腺嘌呤水溶液+ip OVA+鼻腔激发制备豚鼠肾阳虚型变应性鼻炎模型

(1) 原理: 摄入大剂量腺嘌呤时, 产生极难溶于水的 2,8-二羟基腺嘌呤, 沉积形成结晶, 损伤肾小管引起纤维化, 使肾功能衰竭; 以 OVA 致敏法制备变应性鼻炎模型, 两者结合, 可制备肾阳虚型变应性鼻炎模型。

(2) 方法: 3~4 月龄豚鼠, 体质量 350~450 g, 雌雄各半, 每日 ig 腺嘌呤水溶液 (300 mg/kg, 10 mL/kg), 每天给药 1 次, 连续给药 21 d。于给药第 1 天, 给豚鼠 ip OVA 液致敏 (OVA 0.3 mg 作致敏原, Al(OH)₃ 30 mg 作佐剂, 溶于 1 mL 生理盐水配制成混悬液), 隔日 1 次, 共 7 次; ip 完成第 2 天, 行 PCA 实验, 确定 OVA IgE 抗体效价升高后, 将 OVA 稀释液 (OVA 20 mg+生理盐水 20 μ L) 用微量加样器滴入豚鼠双侧鼻腔, 每侧 10 μ L, 每日 1 次, 共 7 次。第 21 天, 可制备肾阳虚型变应性鼻炎模型。本模型持续不少于 22 d。

2.5.3 ig 羟基脲+ip OVA+鼻腔激发制备豚鼠肾阳虚型变应性鼻炎模型

(1) 原理: 羟基脲是一种核苷酸还原酶抑制剂, 能抑制豚鼠体内脱氧核糖核酸的合成, 使脂肪、蛋白质代谢发生相应的改变, 产生一系列虚损症状而建立肾阳虚模型; OVA 致敏可建立变应性鼻炎模型, 两者结合, 可制备肾阳虚型变应性鼻炎模型。

(2) 方法: 2~3 月龄豚鼠, 体质量 300~400 g, 雌雄各半, 豚鼠每日 ig 羟基脲混悬液 (239 mg/kg), 每天给药 1 次, 连续给药 2 周。于给药第 1 天, 给豚鼠 ip OVA 液致敏 (OVA 0.3 mg 作抗原, Al(OH)₃ 粉末 30 mg 作佐剂, 加生理盐水 1 mL 形成混悬液), 隔日 1 次, 共 7 次。ip 完成后的第 2 天进行 PCA

实验, 确定 OVA IgE 抗体效价升高后, 将 OVA 稀释液 (OVA 8 mg+0.9% NS 20 μ L) 用微量加样器滴入双侧鼻腔, 每侧 10 μ L, 每日 1 次, 共 7 d。第 21 天, 可制备肾阳虚型变应性鼻炎模型。本模型持续不少于 22 d。

2.6 豚草花粉变应原全身及局部攻击法制备豚鼠变应性鼻炎模型^[11]

2.6.1 原理 豚草花粉中的可溶性蛋白变应原被鼻分泌物浸出, 通过黏膜屏障引起免疫反应。

2.6.2 方法 成年豚鼠, 体质量 350~450 g, 雌雄各半, 豚鼠注射豚草花粉变应原进行人工免疫接种, 先采用豚草花粉变应原 0.75 mL 与等量弗氏完全佐剂 (FCA) 混匀, ip 0.5 mL; 四肢 (腋下、腹股沟) 各 sc 注射 0.25 mL, 共 1.5 mL; 每周 1 次, 连续 2 周。2 周后改为豚草花粉变应原 0.75 mL 与等量弗氏不完全佐剂 (FIA) 混匀, 进行免疫, 每周 1 次, 连续 2 周; 注射剂量、部位与首次相同。免疫后第 4 周, 给豚鼠鼻腔过敏原激发, 给豚鼠双侧鼻孔滴入 0.5% 豚草花粉变应原生理盐水液, 每侧 10 μ L, 每日 1 次, 连续 5 d。第 33 天, 可制备豚鼠变应性鼻炎模型。本模型持续不少于 33 d。

豚草花粉用 pH 7.4 的 PBS 缓冲液在冰浴条件下将花粉匀浆后超声粉碎, 再经高速冷冻离心机, 15 000 r/min 离心 30 min, 弃上层脂质, 下层即为豚草花粉变应原。

2.7 2,4-二硝基氯苯丙酮溶液滴鼻制备变应性鼻炎模型^[12]

2.7.1 原理 2,4-二硝基氯苯是具有半抗原性质的有毒化学物质, 在与组织蛋白结合后, 能诱发 T 细胞依赖性细胞介导的免疫反应。经过多次接触, 动物可对其产生变态反应, 形成变应性鼻炎模型。

2.7.2 方法 SD 大鼠, 体质量 150~200 g, 雌雄各半, 分别于第 7、14 天给大鼠鼻腔内滴入 1% 2,4-二硝基氯苯丙酮液 0.1 mL, 进行致敏; 于第 28 天再将 0.1% 2,4-二硝基氯苯丙酮液 0.1 mL 滴入大鼠鼻腔, 进行攻击。可制备大鼠变应性鼻炎模型。本模型持续不少于 30 d。

3 观测指标

3.1 表观指标

变应性鼻炎动物模型主要表观指标: ①出现擦鼻、喷嚏、流涕、鼻塞等局部过敏症状; ②滴鼻激发后症状是否明显增加; ③按过敏反应行为的评分标准进行评分。

表观指标可量化积分或半量化分级。喷嚏次数: 1~3 次为 1 分, 4~10 次为 2 分, 大于等于 11 次为 3 分; 抓鼻次数: 1~4 次为 1 分, 4 次以上为 4 分; 清涕: 流至前鼻孔为 1 分, 超出前鼻孔为 2 分, 涕流满面为 3 分。进行积分累加, 其症状观察时间为每次给致敏物开始计时, 共 30 min, 总分是否大于等于 5 分。

变应性鼻炎动物模型制备成功后可见动物擦鼻、喷嚏、流涕、鼻塞等局部过敏症状; 滴鼻激发后症状明显增加; 评分总分均大于等于 5 分。

表观指标在变应性鼻炎临床诊断中占有重要地位, 也应是变应性鼻炎模型是否制备成功的核心指标, 权重系数 0.4。

3.2 病理指标

鼻黏膜组织形态是判断变应性鼻炎模型是否制备成功的依据之一。变应性鼻炎动物模型制备成功后, 可见鼻黏膜嗜酸性粒细胞增多, 杯状细胞增多; 鼻黏膜表面纤毛不完整, 上皮细胞及细胞间质水肿明显, 部分黏膜上皮细胞坏死脱落, 边缘不清; 皮下疏松组织腺泡增生, 黏膜下层血管扩张明显, 管腔周围以嗜酸性细胞为主的炎性细胞浸润; 电镜下见基膜增厚, 胶原沉积及少量纤维增生。

鼻黏膜局部组织病理指标是变应性鼻炎的直接反应, 是直接相关指标, 权重系数 0.3。

3.3 生化指标

变应性鼻炎动物模型制备成功后会有相应生化指标变化, PCA 实验后动物背部致敏点处出现蓝斑, 血清浓度越高, 蓝斑直径越大。血清中组胺、总 IgE、特异性 IgE (sIgE) 升高, 血清中白细胞介素-4 (IL-4)、 γ 干扰素 (IFN- γ)、白细胞介素-12 (IL-12)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、细胞间黏附因子 (ICAM-1) 升高。

生化指标是模型发生、发展、康复过程的机体反映, 指标较多, 有一定特异性, 是直接相关指标, 权重系数 0.3。

4 备注

本制备规范 (草案) 介绍的是与变应性鼻炎中西医临床病症特点吻合度较高且应用较多的动物模型。还有一些变应性鼻炎模型, 如日本雪花花粉、粉尘螨、真菌、花粉、蛔虫、艾蒿花粉、蟑螂及血吸虫蛋白抗原等诱导的变应性鼻炎动物模型, 因应用较少, 或与临床病症特点吻合度较低, 未纳入本制备规范 (草案)。

5 变应性鼻炎动物模型制备规范(草案)起草说明

5.1 造模动物

应用于变应性鼻炎的模型的动物一般选用与人体结构、功能、代谢及疾病特征相似的动物,有大鼠、小鼠、豚鼠、兔、羊、狗等,因成本及造模耗时长等限制,很少选择羊和狗。以豚鼠、大鼠较为常用。

5.2 饲养环境

动物饲养环境应符合《GB 14925-2010 实验动物环境与设施》《实验动物管理条例》《实验动物国家标准》《关于善待实验动物的指导性意见》《中华人民共和国动物保护法》等要求,符合相应标准及等级动物饲养环境的要求^[13-14]。

5.3 造模原理及评价依据

关于变应性鼻炎的发病机制目前尚无明确定论,变应性鼻炎发病主要有环境和遗传两种因素,目前变应性鼻炎主要在免疫学方面的经典学说为 Th1/Th2 平衡失调学说^[15-16]。现有动物模型多是模拟临床的某一部分特征。常用的有 OVA 全身及局部攻击法和 TDI 橄榄油溶液滴鼻法,可较好模拟变应性鼻炎典型临床特征^[17-19]。

现有变应性鼻炎动物模型是病理性模型,主要体现的是西医临床指标,动物模型的评价也以西医标准为主,中医标准为参考。西医标准依据的是 2004 年中华医学会耳鼻喉科科学分会诊断标准中“变应性鼻炎”的诊断标准:①鼻痒、多次阵发性喷嚏(3~5 个,或十几个);②大量鼻涕,擤鼻次数多;③双侧性鼻塞,可呈间歇性或交替性阻塞;④伴有眼、咽部和软腭发痒;⑤暂时性嗅觉减退;⑥鼻黏膜苍白或暗红、水肿,鼻甲肿大,并有眼睑肿胀,结膜充血;鼻水样分泌物增多,浆液性或浆液黏性涕;⑦间断性或常年性发作,发作时间不定。

变应性鼻炎的中医标准依据的是王士贞教授主编的《中医耳鼻喉咽喉科学》中变应性鼻炎的诊断标准,①肺气虚型主症:鼻痒,喷嚏,流涕,鼻塞,鼻内肌膜肿胀、苍白,鼻下甲水肿;次症:神疲乏力,畏风怕冷,气短音低,少气懒言,自汗,面色淡白,咳嗽痰白。舌淡,苔薄白,脉虚弱;②肺经伏热型主症:喷嚏、流清涕、鼻塞鼻胀、酸痒不适、喷嚏频作,鼻窍肌膜肿胀、色红或暗红;次症:全身或可见咳嗽,咽痒,恶风身热,头痛肢楚,咽干痒,口干烦热。舌质红,苔白,脉弦或弦滑;③脾气虚弱型主症:阵发性鼻痒,鼻塞,涕清稀,

淋漓而下,嗅觉迟钝,双下甲肌膜肿胀苍白或灰白;次症:头重头昏,神疲气短,面色萎黄或黄白,四肢困倦,胃纳欠佳,大便稀溏,头重头昏,神疲气短,面色萎黄或黄白,四肢困倦,胃纳欠佳,大便稀溏。舌质淡或淡胖,边有齿痕,苔白,脉濡缓;④肾阳不足型主症:鼻痒嚏多,清涕难敛,早晚较甚,鼻腔肌膜苍白、水肿;次症:畏风怕冷,四肢不温,面色苍白,精神萎靡,或腰膝酸软,大便溏薄,小便清长,夜尿多,舌淡苔白,脉沉细弱。具备以上主症及次症 2 项以上者,可诊断为该证候。

5.3.1 OVA 全身及局部攻击法制备变应性鼻炎模型 (1)原理:OVA 溶液刺激鼻黏膜时,可产生喷嚏,同时释放神经肽类物质,导致鼻黏膜血管扩张,通透性增加,再将抗原溶液局部滴鼻激发产生变应性鼻炎症状,如鼻痒搔鼻动作,模拟变应性鼻炎局部表现。(2)与临床指标吻合情况:符合西医指标①②③④⑤⑥,吻合度 $\geq 70\%$ 。(3)注意事项:应注意 OVA 易溶于水,局部刺激性很少,粉末状 OVA 易发生变性或凝结,必须现用现配;Al(OH)₃ 必须严格按照规定的量和剂型,若使用过量,可能会导致免疫抑制,若是凝胶,则易产生异物肉芽肿和腹水。

5.3.2 TDI 橄榄油溶液滴鼻法制备变应性鼻炎模型 (1)原理:TDI 作为半抗原,与体内血清蛋白结合,通过变态反应机制,引起鼻超敏反应,形成变应性鼻炎模型。(2)与临床指标吻合情况:符合西医指标①②③④⑤⑥,吻合度 $\geq 70\%$ 。(3)注意事项:应注意 TDI 属有毒有机化合物,实验操作过程应小心谨慎,另豚鼠的饲养环境应整洁安静,以降低动物死亡率。

5.3.3 肺气虚型变应性鼻炎复合模型

(1)烟熏+OVA 致敏法制备变应性鼻炎复合模型:(a)原理:利用物理方法烟熏法使肺功能受损造肺气虚模型,然后以 OVA 致敏法进行变应性鼻炎模型的建立,可制备肺气虚型变应性鼻炎复合模型。(b)与临床指标吻合情况:符合西医指标①②③④⑤⑥,吻合度 $\geq 70\%$;符合中医肺气虚型主症,吻合度 $\geq 70\%$ 。(c)注意事项:应注意 OVA 致敏动物常需加用免疫佐剂以增强其免疫原性。

(2)烟熏+10%TDI 致敏法制备变应性鼻炎复合模型:(a)原理:利用物理方法烟熏法使肺功能受损造肺气虚模型,然后以 TDI 致敏法进行变应性鼻炎模型的建立,可制备肺气虚型变应性鼻炎复合

模型。(b)与临床指标吻合情况:符合西医指标①②③④⑥,吻合度 $\geq 70\%$;符合中医肺气虚型主次症,吻合度 $\geq 70\%$ 。(c)注意事项:应注意 TDI 属有毒有机化合物,实验操作过程应小心谨慎,另豚鼠的饲养环境应整洁安静,以降低动物死亡率。

5.3.4 脾气虚变应性鼻炎复合模型

(1) ig 大黄冷浸液+游泳力竭法+饥饿法+ip OVA+鼻腔激发制备脾气虚变应性鼻炎复合模型:(a)原理:以大黄为苦寒之药损伤脾胃、饮食不节法及劳倦过度导致脾虚造脾气虚模型,然后以 OVA 致敏法进行变应性鼻炎模型的建立,可制备脾气虚型变应性鼻炎复合模型。(b)与临床指标吻合情况:符合西医指标①②③④⑤⑥,吻合度 $\geq 70\%$;符合中医脾气虚弱型主次症,吻合度 $\geq 70\%$ 。(c)注意事项:应注意根据动物的种属,给予不同浓度、剂量的药物,基础致敏阶段多使用低浓度,激发阶段采用高浓度。

(2) ig 大黄冷浸液+ip OVA+鼻腔激发制备脾气虚变应性鼻炎复合模型:(a)原理:以大黄为苦寒之药损伤脾胃导致脾虚,然后以 OVA 致敏法进行变应性鼻炎模型的建立,可制备脾气虚变应性鼻炎复合模型。(b)与临床指标吻合情况:符合西医指标①②③④⑤⑥,吻合度 $\geq 70\%$;符合中医脾气虚弱型主次症,吻合度 $\geq 70\%$ 。(c)注意事项:应注意基础致敏阶段多采用腹腔注射,鼻腔激发滴鼻方式,勿用雾化吸入,雾化吸入容易入下呼吸道导致支气管哮喘。

(3) 饮食不节+过劳伤气法+ip OVA+鼻腔激发制备脾气虚变应性鼻炎复合模型:(a)原理:饮食不节法导致脾虚造脾气虚模型,然后以 OVA 致敏法进行变应性鼻炎模型的建立,可制备脾气虚型变应性鼻炎复合模型。(b)与临床指标吻合情况:符合西医指标①②③④⑤⑥,吻合度 $\geq 70\%$;符合中医脾气虚弱型主次症,吻合度 $\geq 70\%$ 。(c)注意事项:应注意出现脾虚典型症状后如食量减少、便溏、体质量减轻方可进行致敏实验。

5.3.5 肾阳虚变应性鼻炎复合模型

(1) im 醋酸强的松龙+ip OVA+鼻腔激发制备肾阳虚变应性鼻炎复合模型:(a)原理:摄入大剂量糖皮质激素时,可抑制下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴的反馈作用,断然停药,下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴的抑制状态使的机体对外界环境变化的应激、适应能力显著下降,水、电解质代谢失调,同时产生免

疫抑制作用,使肾功能虚损,然后以 OVA 致敏法进行变应性鼻炎模型的建立,可制备肾阳虚变应性鼻炎复合模型。(b)与临床指标吻合情况:符合西医指标①②③④⑤⑥,吻合度 $\geq 70\%$;符合中医肾阳不足型主次症,吻合度 $\geq 70\%$ 。(c)注意事项:应注意糖皮质激素剂量问题,严格执行规定的剂量,避免本身具有抗炎和免疫抑制作用干扰实验结果。

(2) ig 腺嘌呤水溶液+ip OVA+鼻腔激发制备肾阳虚型变应性鼻炎复合模型:(a)原理:当摄入大剂量腺嘌呤时,产生极难溶于水的 2,8-二羟基腺嘌呤,沉积形成结晶损伤肾小管引起纤维化,使肾功能衰竭,然后以 OVA 致敏法进行变应性鼻炎模型的建立,可制备肾阳虚变应性鼻炎复合模型。(b)与临床指标吻合情况:符合西医指标①②③④⑤⑥,吻合度 $\geq 70\%$;符合中医肾阳不足型主次症,吻合度 $\geq 70\%$ 。(c)注意事项:应注意 OVA 易溶于水,局部刺激性很少,粉末状 OVA 易发生变性或凝结,必须现用现配。

(3) ig 羟基脲+ip OVA+鼻腔激发制备肾阳虚型变应性鼻炎复合模型:(a)原理:羟基脲是一种核苷酸还原酶抑制剂,能抑制豚鼠体内脱氧核糖核酸的合成,使脂肪、蛋白质代谢发生相应的改变,产生一系列虚损症状而建立肾阳虚模型,然后以 OVA 致敏法进行变应性鼻炎模型的建立,可制备肾阳虚变应性鼻炎复合模型。(b)与临床指标吻合情况:符合西医指标①②③④⑤⑥,吻合度 $\geq 70\%$;符合中医肾阳不足型主次症,吻合度 $\geq 70\%$ 。(c)注意事项:应注意 OVA 致敏动物常需加用免疫佐剂以增强其免疫原性。

5.3.6 豚草花粉变应原全身及局部攻击法制备豚鼠变应性鼻炎模型 (1)原理:豚草花粉中的可溶性蛋白变应原被鼻分泌物浸出,通过黏膜屏障引起免疫反应。(2)与临床指标吻合情况:符合西医指标①②③④⑥,吻合度 $\geq 70\%$ 。(3)注意事项:应注意入下呼吸道造成支气管哮喘模型。

5.3.7 2,4-二硝基氯苯丙酮溶液滴鼻法制备变应性鼻炎模型 (1)原理:2,4-二硝基氯苯具有半抗原性质的有毒化学物质,在与组织蛋白结合后能诱发 T 细胞依赖性细胞介导的免疫反应。经过多次接触,实验动物可对其产生变态反应,形成变应性鼻炎模型。(2)与临床指标吻合情况:符合西医指标①②③④⑥,吻合度 $\geq 70\%$ 。(3)注意事项:应注意 2,4-二硝基氯苯丙酮溶液属有毒有机化合物,实验操作

过程应小心谨慎，另豚鼠的饲养环境应整洁安静，以降低动物死亡率。

5.4 观测指标

5.4.1 表观指标 I类指标（核心指标），表观指标变化是变应性鼻炎最直接的判定标准，是变应性鼻炎临床诊断的重要依据，也应是变应性鼻炎动物模型制备成功与否判定的核心指标。临床上

以局部表现为诊断标准。模型建立后出现鼻痒、喷嚏、鼻涕及鼻塞等鼻变态反应症状等。根据表观指标的特点，分别对表观指标进行积分累加，即为临床评分，其症状观察时间为每次给致敏物开始计时，共 30 min。此法更有利于判断模型成功与否，各症状表观指标权重系数 0.4。主要表观指标的分类见表 1。

表 1 变应性鼻炎及证型动物模型主要表观指标的分类

Table 1 Classification of main apparent indexes of allergic rhinitis and syndrome model animal models

分级	指标			
	喷嚏	流涕	鼻痒	呼吸频率
0 分	无	无	无	正常
1 分	1~3 个	流到鼻前孔	轻擦鼻几次	急促
2 分	4~10 个	超过鼻前孔	反复挠鼻面部不止	明显喘息
3 分	11 个以上	流涕至面部	鼻面部不断擦磨	严重喘息

5.4.2 病理指标 II类指标（直接相关指标），变应性鼻炎动物模型局部鼻黏膜组织病理变化是模型成功与否的直接证据，模型制备成功后，鼻道切开，暴露鼻中隔，小心分离取出鼻中隔两侧的鼻黏膜组织，镜检可见鼻黏膜组织损伤较严重，表现为部分黏膜上皮脱落，固有层血管扩张充血，组织水肿，伴嗜酸性粒细胞及其他炎症细胞浸润等。

变应性鼻炎局部鼻黏膜组织病理变化分级参考标准为“-”：鼻黏膜组织正常，组织结构完整；“+”：轻度组织水肿，但无嗜酸性粒细胞浸润；“++”：水肿较严重，血管扩张，可见肥大细胞和嗜酸性粒细胞在上皮和血管周围浸润；“+++”：水肿严重，血清渗出，动脉血管严重扩张，嗜酸性细胞大量浸润；“++++”：组织破坏严重，部分区域坏死，炎性细胞布满视野。

病理学观察可以准确、直接、客观说明变应性鼻炎的具体变化情况，权重系数 0.3。

5.4.3 生化指标 III类指标（间接相关指标），生化指标如 PCA、组胺含量、总 IgE、sIgE、IgG1、sIgG、IL-4、IL-12、IFN- γ 、IL-4、TNF、ICAM-1 等与变应性鼻炎模型的成功与否密切相关，是模型发生、发展、康复过程的机体反映，有一定价值，但特异性不强，是间接相关指标，权重系数 0.3。

将变应性鼻炎动物模型各类指标进行分类，并确定各类权重系数，其中 I类指标即表观指标（核心指标）权重系数为 0.4，II类指标即病理指标（直接相关指标）为 0.3，III类指标即其他指标（间接

相关指标）为 0.2。变应性鼻炎动物模型 I、II、III类指标可参照文献方法^[20-21]，均按整体为 1 进行各自的量化积分，同一类的指标如表观指标（I类）是由喷嚏次数、流涕程度、挠鼻频率等多项指标组成的，目前是按同一贡献度计算的；如观察的表观指标有 4 项，积分时各项小指标均为 1/4，该指标最高分值为 1/4。如具体每一类指标中有特殊重要的指标，可参照指标分类时的权重，再对同一类指标中的小指标进行不同的权重分类。II、III类指标的计算同此。

每一类指标造模后的总积分，乘以相应指标的权重，将 3 类指标积分相加，即变应性鼻炎动物模型制备成功时的总积分。按上述方法计算，OVA 全身及局部攻击法制备变应性鼻炎模型总积分为 0.95，TDI 橄榄油溶液滴鼻法制备变应性鼻炎模型总积分为 0.875，烟熏+OVA 致敏法制备变应性鼻炎复合模型总积分为 0.78，烟熏+10% TDI 致敏法制备变应性鼻炎复合模型总积分为 0.825，ig 大黄冷浸液+游泳力竭法+饥饿法+ip OVA+鼻腔激发制备脾气虚变应性鼻炎复合模型总积分为 0.85，ig 大黄冷浸液+ip OVA+鼻腔激发制备脾气虚变应性鼻炎复合模型总积分为 0.85，饮食不节+过劳伤气法+ip OVA+鼻腔激发制备脾气虚变应性鼻炎复合模型总积分为 0.85，im 醋酸强的松龙+ip OVA+鼻腔激发制备肾阳虚变应性鼻炎复合模型总积分为 0.85，ig 腺嘌呤水溶液+ip OVA+鼻腔激发制备肾阳虚型变应性鼻炎复合模型总积分为

0.85, ig 羟基豚+ip OVA+鼻腔激发制备肾阳虚型变应性鼻炎复合模型总积分为 0.825, 豚草花粉变应原全身及局部攻击法制备豚鼠变应性鼻炎模型总积分为 0.75, 2,4-二硝基氯苯丙酮溶液滴鼻法制备变应性鼻炎模型总积分为 0.75。变应性鼻炎动物模型制备成功率相对高, 每次造模可能会出现不同的总积分, 为保证每次制备变应性鼻炎动物模型的基本一致, 建议总积分可以有 20%左右的偏差, 以此作为评价变应性鼻炎动物模型成功与否的标准。所得总积分大于 0.7, 可认为该模型制备成功。本草案所采用的计算方法及所得总积分可供参考, 研究者可根据不同制备模型方法对所观测指标另行设定、计算, 适当调整。

5.5 说明

本草案及起草说明中的权重系数提示的仅是该类指标在变应性鼻炎模型制备及判定中的重要性, 不是绝对的。研究者可根据具体变应性鼻炎模型防治的实际, 适当进行调整。

表观指标、病理指标所采用的分类方法, 可能因在不同的变应性鼻炎模型中采用标准不一致, 分类也会有所差异; 所列生化指标也可能未全面涵盖变应性鼻炎相关的所有指标。上述标准及指标重点是给研究者提示, 应根据各类指标对变应性鼻炎模型的贡献度不同进行分类, 尽量将单纯的定性描述转变成可量化或半量化的指标, 提高判定的可控性; 所列的具体分类、指标等是供参考的, 可根据具体变应性鼻炎实验研究的特点, 增加、减少, 或另行设定。

(起草人: 苗明三, 项丽玲, 苗艳艳)

参考文献

- [1] 曾斌, 刘洋, 李昕蓉, 等. 变应性鼻炎豚鼠动物模型文献研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2016, 18(2): 323-327.
- [2] 邸娟娟, 李海兵, 韩春光, 等. 卵白蛋白诱发变应性鼻炎豚鼠模型的特点及鉴定 [J]. 癌变·畸变·突变, 2012, 24(6): 440-443.
- [3] 肖红兵, 谢彦兵, 李宝国, 等. TDI 诱发变应性鼻炎豚鼠模型的建立 [J]. 东南国防医药, 2012, 14(1): 23-26.
- [4] 卢健敏. 温肺止流丹对肺气虚变应性鼻炎模型大鼠鼻黏膜组织 IL-4 mRNA 表达和血清 IL-4 的影响 [J]. 陕西中医学院学报, 2013, 36(3): 95-96.
- [5] 王宇, 严道南. 脾气虚与变应性鼻炎模型大鼠相关机理的研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2011, 27(2): 140-143.
- [6] 李莉珠, 吴卿, 易欣, 等. 变应性鼻炎中医证候动物模型的研究进展 [J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2017, 31(3): 60-63.
- [7] 付文祥, 谢慧, 熊大经, 等. 脾虚型 AR 大鼠鼻黏膜白介素 mRNA 的活性表达 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(12): 2486-2488.
- [8] 潘利叶, 马重阳, 刘敏, 等. 变应性鼻炎肾阳虚复合豚鼠模型筛选与评价 [J]. 世界中医药, 2016, 11(12): 2741-2746.
- [9] 钟筱华, 张海丹. 肾阳虚变应性鼻炎动物模型的研究 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2010, 8(4): 168-170.
- [10] 徐慧贤, 阮岩, 王世贞, 等. 豚鼠肾阳虚变应性鼻炎模型的建立 [J]. 中药新药与临床药理, 2005, 16(6): 427-429.
- [11] 赵冬菊, 王珮华. 变应性鼻炎中西医动物模型建造方法 [J]. 中国中西医结合耳鼻喉科杂志, 2013, 21(3): 227-231.
- [12] 李佳锋, 徐佳俊, 高翔, 等. 变应性鼻炎大鼠动物模型的建立及评价 [J]. 四川解剖学杂志, 2016, 24(1): 4-6.
- [13] 实验动物环境及设施. GB14925-2010 [S]. 2011.
- [14] 国家科学技术委员会. 实验动物管理条例 [EB/OL]. 2017-03-01. http://www.gov.cn/gongbao/content/2017/content_5219148.html.
- [15] 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.
- [16] 胡艳菲, 唐方. 过敏性鼻炎动物模型研究进展 [J]. 医学研究生学报, 2012, 25(5): 540-543.
- [17] 苗明三. 常用医药研究动物模型 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007.
- [18] 苗明三. 实验动物与动物实验技术 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 1997.
- [19] 陈奇, 张伯礼. 中药药效研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2016.
- [20] 苗明三, 白明. 中药外用药理实验技术规范 (草案) [J]. 中药药理与临床, 2014, 30(4): 128-131.
- [21] 马瑞雪, 苗明三. 一种中药药效的多指标评价新方法—综合权重法 [J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(5): 569-572.