

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00246

脂多糖结合熏烟法和单纯熏烟法建立慢性阻塞性肺病大鼠模型的比较

宋小莲^{1,2}, 王昌惠², 白冲^{1*}

1. 第二军医大学长海医院呼吸内科, 上海 200433
2. 同济大学附属第十人民医院呼吸科, 上海 200072

[摘要] **目的** 比较熏香烟加气道内注入脂多糖(LPS)法和单纯熏香烟法建立慢性阻塞性肺病(COPD)大鼠模型的效果。**方法** 8周龄 Wistar 大鼠 24 只, 随机分为 3 组, 每组 8 只。其中 1 组作健康对照, 另 2 组分别进行熏香烟加气道内注入 LPS 和单纯熏香烟处理建立 COPD 模型。观察动物一般情况和肺组织病理学, 测定肺组织平均内衬间隔 (MLI) 和平均肺泡数 (MAN); 检测外周血常规和支气管肺泡灌洗液 (BALF) 常规。**结果** 两个模型组大鼠消瘦, 伴有间歇咳嗽和气促, 外周血和 BALF 中的白细胞总数及中性粒细胞百分比均较对照组明显增高 ($P < 0.01$); 肺组织 H-E 染色显示两个模型组大鼠均具有慢性支气管炎和肺气肿的典型病变, MLI 较对照组明显增高, 而 MAN 较对照组明显下降 ($P < 0.01$), 但两个模型组间差异无统计学意义; 熏香烟加气道内注入 LPS 组比单纯熏香烟组气道及肺组织的炎症浸润更明显, 单纯熏香烟组主要表现为肺泡过度扩张。**结论** 熏香烟加气道内注入 LPS 和单纯熏香烟两种方法均可成功制备大鼠 COPD 模型, 其病理生理改变与人类 COPD 类似, 前者比后者更符合 COPD 自然发病过程。

[关键词] 慢性阻塞性肺疾病; 动物模型; 炎症; 脂多糖; 烟草暴露

[中图分类号] R 563 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)03-0246-04

Establishment of rat chronic obstructive pulmonary disease model: a comparison between exposure to cigarette smoke alone and in combination with intra-tracheal injection of lipopolysaccharide

SONG Xiao-lian^{1,2}, WANG Chang-hui², BAI Chong^{1*}

1. Department of Respiratory Diseases, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Respiratory Diseases, The Tenth People's Hospital of Shanghai, Tongji University, Shanghai 200072, China

[Abstract] **Objective** To compare the efficacies of exposure to cigarette smoke alone and in combination with intra-tracheal injection of lipopolysaccharide in establishing rat models of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods** A total of 24 8-week-old healthy Wistar rats were randomly divided into 2 model groups and a control group (Group C). The rat COPD models were established by two ways: intratracheal injection of lipopolysaccharide (LPS) twice + exposure to cigarette smoke for 1 month (Group A), and cigarette smoke inhalation for 80 days only (Group B). The pathologic characteristics of animal models, including the mean lining interval (MLI) and the mean alveoli number (MAN), were determined. The total and different white blood cell counts in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and blood samples were determined. **Results** The rats in the two model groups presented with cough or breathlessness periodically, and the white blood cell counts and neutrophil counts in the peripheral blood and BALF were significantly higher than those in the control group ($P < 0.01$). H-E staining showed that the lung tissues of rats in Group A and B had typical pathological features of COPD and emphysema. MLI were significantly higher and MAN were significantly lower in Group A and B than those in group C (both $P < 0.01$), but there was no statistical difference between the two model groups. Group A had more severe inflammatory response in the bronchial and lung tissues than Group B. And Group B was characterized by alveolar overdistension. **Conclusion** Both the two methods can successfully establish rat COPD model, with its pathophysiological changes similar to those of human COPD, with intra-tracheal injection of lipopolysaccharide being more consistent to the natural development of disease.

[Key words] chronic obstructive pulmonary disease; animal model; inflammation; lipopolysaccharide; exposure to cigarette smoke

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(3): 246-249]

[收稿日期] 2009-09-27 **[接受日期]** 2010-01-27

[基金项目] 国家自然科学基金(30871133). Supported by National Natural Science Foundation of China(30871133).

[作者简介] 宋小莲, 博士, 主治医师. E-mail: alian818@sohu.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-81873232, E-mail: bc7878@sohu.com

慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是常见的慢性呼吸系统疾病,发病率和病死率高,严重威胁人类健康。国内外研究人员通过建立 COPD 动物模型对该病进行了大量研究工作。但由于 COPD 的病变累及气道、肺实质乃至肺血管等多级结构^[1],发病机制、临床发展过程复杂,迄今尚无公认的理想动物模型。近数十年随着对 COPD 发病机制的认识不断深入,其动物模型也逐步改进。本研究参考文献^[2],采用熏香烟结合气管注入脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)法和单纯熏香烟法分别复制 COPD 大鼠模型,比较两者的效果,探求更合理的造模方案。

1 材料和方法

1.1 动物分组和模型复制 清洁级 8 周龄 Wistar 大鼠 24 只,雌雄不限,体质量 200~220 g,上海斯莱克实验动物有限公司提供,随机分为 3 组,每组 8 只。(1)A 组:采用熏香烟加气管注入 LPS 法造模,给药剂量参考文献^[3],大鼠 d1(即造模第 1 天,以下相同)、d14 经气管注入 LPS(O55:B5, Sigma 公司) 200 μ g(300 μ l),d2~d30 (d14 除外)置入玻璃熏烟染毒箱(50 cm \times 40 cm \times 40 cm, 80 L)内熏红旗渠牌香烟烟雾(烤烟型,焦油含量 14 mg/支,尼古丁含量 1.1 mg/支),40 min/次,2 次/d(每次 8 支烟),每周休息 1 d;(2)B 组:d1~d80 单纯熏烟,熏烟方法同 A 组,其中 d1、d14 经气管注入 300 μ l 生理盐水;(3)C 组:健康对照组,d1、d14 经气管注入 300 μ l 生理盐水,其余时间无特殊处理。各组动物均饲养至 d80 时处死并采集标本。

1.2 标本采集、处理和检测 大鼠称重,腹腔注射 10%水合氯醛(0.3 ml/100 g)麻醉后,以真空抗凝采血管经腹主动脉取血约 1~2 ml,于 2 h 内送检血常规。然后放血处死大鼠,开胸暴露气管和肺门,于右主支气管处结扎右肺,左肺以生理盐水 2 ml \times 3 次行肺泡灌洗,回收率约 80%,肺泡灌洗液(BALF)存入可防止细胞附壁的硅塑管内静置 1 h 后,取 1 ml BALF 以 400 \times g 离心 10 min,弃去上清液,收集细胞计数,沉淀细胞涂片并晾干后行瑞氏染色,检测各种有核细胞百分率。左肺灌洗完毕后弃用,切取右侧肺剖开,置于 4 $^{\circ}$ C 磷酸缓冲液(0.01 mol/L PBS, pH 7.3)中洗去血液,浸入 10%甲醛溶液中固定 24~48 h,取右下肺常规石蜡包埋, H-E 染色。每只动物随机选取 2 张肺组织 H-E 染色病理切片,每张切片随机选取上、中、下、左和右 5 个视野(避开大血管和支气管),100 \times 显微镜下观察,数码相机摄像。在每个视野正中心划十字交叉线,计算与交叉线相

交的肺泡间隔数(N_s)和每个视野内肺泡数(N_a),同时测量十字线总长(L)和每个视野面积(S)。根据以下公式计算肺组织平均内衬间隔(MLI)和平均肺泡数(MAN): $MLI=L/N_s$ (其数值反映肺泡平均直径)、 $MAN=N_a/S$ (其数值反映肺泡密度)。

1.3 统计学处理 计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,用 SPSS 13.0 软件进行分析,组间比较采用方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物一般情况观察 各组大鼠均未出现死亡。A 组和 B 组大鼠在每次熏烟初始喜聚集成堆闭目静卧,熏烟较长时间后逐渐出现张口喘息、流涎、大汗,腹式呼吸加剧;A 和 B 组动物分别在造模开始的第 1 周和第 2 周前后逐渐出现间歇咳嗽,呼吸急促,精神萎靡,拱背蜷缩,皮肤松弛,皮毛无光泽且脱落严重,消瘦。A、B 两组造模结束时的外观无明显差异,体质量增加分别为(35.0 \pm 2.7) g 和(46.4 \pm 1.1) g。C 组大鼠实验前后活动正常,无明显气促,体质量增加(58.0 \pm 1.1) g,与 A、B 两组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 血常规和 BALF 检测情况 A 组和 B 组外周血中白细胞总数和中性粒细胞分类升高,与 C 组相比差异有显著差异($P<0.01$);A、B 两组间的外周血白细胞总数和中性粒细胞比例差异则无统计学意义(表 1)。与 C 组相比,A 组和 B 组的 BALF 白细胞总数及中性粒细胞数均明显增高($P<0.01$),单核-巨噬细胞所占构成比明显降低($P<0.01$);A 组 BALF 中的白细胞总数、中性粒细胞和淋巴细胞分类稍高于 B 组,但两者差异无统计学意义(表 1)。

2.3 肺组织病理学观察 大体标本:C 组大鼠肺脏肉眼观表面光滑平整,呈淡红色,弹性好,切面见肺泡大小均一。A 组和 B 组大鼠的两肺外观膨胀,体积明显增大,弹性差,肺表面略显不平,并可见小囊泡状突起,肺脏切面可见多量较大的肺泡腔,大小、形状不一。

H-E 染色:由图 1A、1B 可见,C 组切片见支气管和肺泡结构清晰,气道黏膜上皮完整,纤毛排列整齐,肺泡大小均匀;COPD 模型组(A 和 B 组,图 1C~1F)则表现为支气管黏膜上皮脱落,腺体增生,管壁有淋巴细胞、浆细胞为主的炎细胞浸润;细支气管痉挛,周围平滑肌细胞增生,肺泡腔不规则扩大,可见炎细胞浸润和肺大疱;小血管管壁增厚。此外,A 组较 B 组更常见气道管壁及周围,以及肺间质内不同程度的炎症细胞浸润,支气管黏膜皱襞增多更为明显,突入管腔,导致管腔变窄或闭塞,腔内可见黏液

栓及炎性渗出;B组细支气管壁有时可见不同程度的炎细胞浸润,主要表现为肺泡广泛扩大,肺泡间隔变薄及断裂。

MLI及MAN结果:单位面积内,A组和B组

MAN低于C组,而MLI大于C组,差异有统计学意义($P < 0.01$);A组MLI绝对值较B组稍低,MAN绝对值较B组稍高,但差异无统计学意义(表2)。

表1 A、B、C三组大鼠血常规和BALF检测情况

Tab 1 Blood routine and bronchoalveolar lavage fluid(BALF) examination of rats in Group A, B, and C

($n=8, \bar{x} \pm s$)

Group	Blood		BALF			
	WBC($\times 10^9/L$)	N(%)	WBC($\times 10^9/L$)	N(%)	M(%)	L(%)
A	18.9 \pm 4.0**	42.1 \pm 7.7**	3.57 \pm 0.17**	22.57 \pm 1.76**	73.24 \pm 0.92**	4.18 \pm 1.01
B	17.2 \pm 3.9**	35.2 \pm 46.3**	3.46 \pm 0.42**	21.94 \pm 1.65**	73.91 \pm 1.81**	4.15 \pm 1.36
C	8.3 \pm 2.1	15.3 \pm 43.2	2.13 \pm 0.24	8.30 \pm 0.85	87.10 \pm 1.13	4.60 \pm 1.07

Group A: Intratracheal instillation of lipopolysaccharide (LPS) twice + exposure to cigarette smoke for 1 month(Group A); Group B: Cigarette smoke inhalation for 1 month only; Group C: Control. WBC: White blood cell;N: Neutrophilic granulocyte;M: Monocyte;L: Lymphocyte. ** $P < 0.01$ vs group C

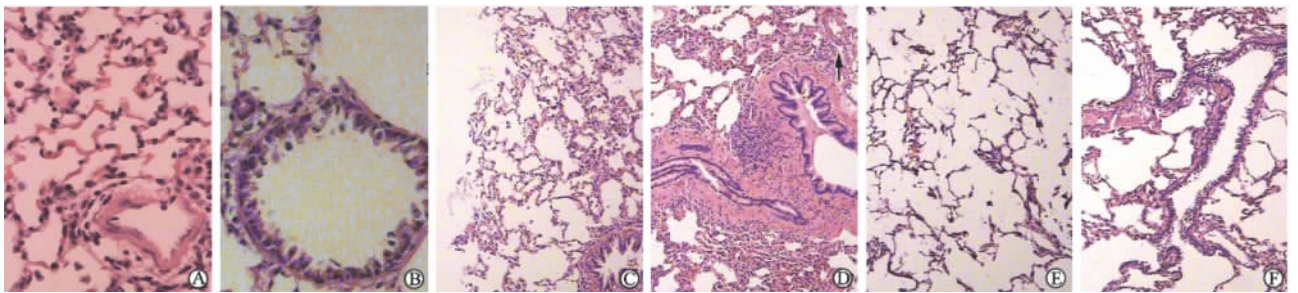


图1 各组大鼠肺组织病理学改变

Fig 1 Pathological changes of rat lung in Group A, B, and C

A,B: Group C; C,D: Group A; E,F: Group B. Arrow points to the pathological change of blood vessel in D. Original magnification: $\times 40$ (C, E); $\times 100$ (D, F); $\times 400$ (A, B)

表2 A、B、C三组大鼠肺组织MLI和MAN结果

Tab 2 MLI and MAN of rats in Group A, B, and C

($n=5, \bar{x} \pm s$)

Group	MLI $l/\mu m$	MAN (μm^{-2})
A	52.34 \pm 3.12**	3.13 \pm 0.27**
B	50.90 \pm 3.70**	3.02 \pm 0.34**
C	42.52 \pm 4.41	4.24 \pm 0.29

** $P < 0.01$ vs group C. MLI: Mean lining interval; MAN: Mean alveoli number

3 讨论

动物模型是进行COPD研究的重要基础,但COPD是一种发病机制和临床病理非常复杂的疾病,这使得建立模拟COPD多方面病理变化和临床特征的理想动物模型十分困难。目前人们常用的COPD造模方法有:(1)大气污染法,如吸入SO₂法[4]和氯化镉诱导法[5]等。(2)单纯熏香烟法。吸烟是目前引起COPD的最主要因素,烟雾能导致黏

膜纤毛系统结构和功能异常,引起支气管痉挛,直接损伤肺泡上皮导致肺血管内皮细胞及肺泡巨噬细胞聚集、活化,逐渐呈现相应的病理和病理生理学改变[6]。各种动物、甚至不同种系的大鼠对香烟敏感性有很大差异。我们曾比较SD大鼠和Wistar大鼠发现,后者对香烟的耐受性不及前者,熏烟如果过浓过久(>10支/次,每次1h),Wistar大鼠更易出现COPD症状。此外,熏烟法难以控制烟雾浓度,且多数报道认为诱发周期往往需4~13个月[7]。但我们建立单纯熏烟的COPD模型仅用了80d,效果亦较好。(3)弹性蛋白酶法[2]。该法简便且稳定,但它造成的病变与人类常见的由长期吸烟引起的并不完全一致,且病变往往分布不均。(4)LPS诱发[8]。它只可短时间内复制出与COPD所造成相似的呼吸道损伤,并不能复制出渐进性慢性的病理过程。(5)基因调控的肺气肿动物模型[9]。另外,现人们常用药物诱导配合烟熏法[3],相对易于操作且造模效果与

人类 COPD 类似。

由于人们对大鼠基因组研究较深入,且大鼠基因组与人较为相似,故而是最常用的模型动物。我们选用 Wistar 大鼠,它种系较纯,利于模型的可重复性及比较,且大鼠体形较小、适应性强,生命周期较短,成本低。但它也有一定的缺陷,例如啮齿类动物气管内纤毛的分布较少,气管黏膜下的腺体不发达,且缺乏有呼吸功能的细支气管。我们的结果显示,在模型组大鼠都有典型的小气道炎症、渗出反应和气道重塑、血管壁增厚等表现,说明总体上大鼠仍是较理想的 COPD 造模选择。

我们采用了熏香烟加 LPS 法及较长期单纯熏香烟法两种方式,所得模型均较理想,表现为各级支气管黏膜上皮损伤,气道内分泌物增多,气道与肺实质炎细胞浸润,气道壁增厚和小气道痉挛,肺小动脉壁增厚,肺大疱形成等多层次改变^[10]。A 组使用 2 次气管内注入 LPS 模拟细菌感染和炎症,这是 COPD 病程中重要的病理生理过程,也是 COPD 急性加重常见因素。我们比文献^[11]适当增加气道滴入液体的体积,是为减少用药误差和便于药物在大鼠肺部更均匀分布,而动物能良好耐受。B 组采用国际通用单纯熏烟法,但我们仅用 80 d 而非 3 个月,所得结果也很理想,我们认为可能与动物种属敏感性以及年龄较小有关。比较 A、B 组发现,二者在共性中还有一些各自特点:A 组病理切片中气道及肺实质的炎症浸润较 B 组更常见,支气管黏膜改变更显著,而 B 组则以肺泡腔扩大和肺泡及血管床破坏为主。此外,动物模型也显示出 COPD 的全身炎症反应和营养障碍等表现:动物体形消瘦,外周血和 BALF 中炎性细胞增多,特别是中性粒细胞数量明显增多。

总之,COPD 模型的建立方法仍然在探索中。根据本研究我们认为,采用熏烟加 LPS 气管注入法复制 COPD 模型,较单纯熏烟所得的模型更省时,并更好重现了 COPD 的组织炎症特征,小气道病变

和气道重塑更为明显。

[参考文献]

- [1] Rabe K F, Hurd S, Anzueto A, Barnes P J, Buist S A, Calverley P, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 176: 532-555.
- [2] Mahadeva R, Shapiro S D. Chronic obstructive pulmonary disease: experimental animal models of pulmonary emphysema [J]. *Thorax*, 2002, 57: 908-914.
- [3] 宋一平, 崔德健, 茅培英, 王德文. 慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的建立及药物干预的影响[J]. *中华内科杂志*, 2000, 39: 556-557.
- [4] Xu J, Zhao M, Liao S. Establishment and pathological study of models of chronic obstructive pulmonary disease by SO₂ inhalation method[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2000, 113: 213-216.
- [5] Rubio M L, Sánchez-Cifuentes M V, Peces-Barba G, Verbanck S, Paiva M, González Mangado N. Intrapulmonary gas mixing in panacinar and centriacinar-induced emphysema in rats[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 157: 237-245.
- [6] Wright J L, Churg A. A model of tobacco smoke-induced airflow obstruction in the guinea pig[J]. *Chest*, 2002, 121 (Suppl 5): 188S-191S.
- [7] Shore S, Kobzik L, Long N C, Skornik W, Van Staden C J, Boulet L, et al. Increased airway responsiveness to inhaled methacholine in a rat model of chronic bronchitis[J]. *Respir Crit Care Med*, 1995, 151: 1931-1938.
- [8] Soler N, Ewig S, Torres A, Filella X, Gonzalez J, Zaubet A. Airway inflammation and bronchial microbial patterns in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Eur Respir J*, 1999, 14: 1015-1022.
- [9] Hokuto I, Perl A K, Whitsett J A. Prenatal but not postnatal inhibition of fibroblast growth factor receptor causes emphysema[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 415-421.
- [10] Wright J L, Farmer S G, Churg A. A neutrophil elastase inhibitor reduces cigarette smoke-induced remodelling of lung vessels [J]. *Eur Respir J*, 2003, 22: 77-81.
- [11] 马楠, 崔德健, 梁延杰, 佟欣, 李玲, 杨建发. 气管内注入脂多糖法建立大鼠慢性支气管炎模型[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 1999, 22: 371-372.

[本文编辑] 孙岩