

烟熏联合内毒素构建 COPD 大鼠模型

方苏榕, 谷 伟, 谭 焰, 孙丽华*

(南京医科大学附属南京医院呼吸内科, 江苏 南京 210006)

[摘要] 目的:分别通过气道内注入内毒素、单独香烟烟熏以及烟熏联合内毒素3种方法构建慢性阻塞性肺病(COPD)大鼠模型,寻找经济、便捷、成功率高的COPD建模方法。方法:将雄性SD大鼠随机分为健康对照组、烟熏组、内毒素组和烟熏+内毒素组,每组10只。90d后HE染色观察大鼠肺、支气管的病理改变。酶联免疫吸附试验(ELISA)检测各组大鼠血清及肺组织匀浆中白细胞介素-8(IL-8)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、磷脂酶A2(PLA2)含量的变化。结果:烟熏+内毒素组大鼠肺、支气管的HE染色符合COPD的病理改变;其血清及肺组织中IL-8、TNF- α 、PLA2含量较其他3组明显增多,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论:烟熏加气管内注入内毒素法用于建立大鼠COPD模型优于单独烟熏法及单独气道内注入内毒素法。

[关键词] 慢性阻塞性肺病;大鼠;内毒素;香烟烟熏

[中图分类号] R563

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)09-1226-05

doi:10.7655/NYDXBNS20130910

Establishment of COPD rat model using the airway infused with lipopolysaccharide (LPS) and fumed by cigarettes

Fang Surong, Gu Wei, Tan Yan, Sun Lihua*

(Department of Respiratory Medicine, Nanjing First Hospital, NJMU, Nanjing 210006, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an economical, convenient and effective approach to establish chronic obstructive pulmonary disease (COPD) rat model using lipopolysaccharide (LPS) infusion of the airway, cigarette exposure alone, and cigarette exposure joined with LPS infusion of the airway, respectively. **Methods:** The male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly assigned into the healthy control, smoke exposure, LPS, and smoke plus LPS groups with 10 rats in each group. Ninety days later, we used hematoxylin-eosin (HE) staining to investigate the pathological changes in the lung and bronchus, and ELISA to measure the changes in the level of interleukin-8 (IL-8), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and phospholipase A2 (PLA2) in the serum and lung tissue homogenates. **Results:** In the smoke-LPS group, HE staining revealed that the pathological changes of the lung and bronchus were similar to those observed in human COPD. There was a remarkable increase of IL-8, TNF- α , and PLA2 in serum and pulmonary tissues as compared to the other three groups, with a statistically significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion:** COPD rat model established by the airway infused with LPS and fumed by cigarettes is proved to be successful and better than the two other approaches.

[Key words] chronic obstructive pulmonary disease; rat; lipopolysaccharide; smoke exposure

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(9): 1226-1230]

自 Gross 等^[1]用木瓜蛋白酶滴入大鼠气道成功复制了慢性阻塞性肺病(COPD)大鼠模型以来,利用实验大鼠对 COPD 进行研究甚多,但由于 COPD 确切病因和发病机制至今尚未完全清楚,使得如何建立一种制作简便经济易行,且与人类 COPD 的病理生理改变和临床特征相似的大鼠 COPD 模型成为

国内外众多研究者探索的课题。

COPD 是一个复杂的、多因素的疾病,它的致病因素有吸烟、感染、氧化应激等,其中,最关键的是对吸入的颗粒和气体的炎症反应(最主要的是烟草)^[2]。当前研究证实,COPD 的主要致病因素有:慢性气道炎症、氧化/抗氧化失衡、蛋白酶/抗蛋白酶失衡等。根据其致病因素及发病机制,目前常用的造模方法有:烟雾熏吸法、呼吸道感染法、二氧化硫熏吸法、气道内滴入刺激法、常压缺氧法等。由于 COPD 是一个

[基金项目] 南京市卫生局科技发展计划(YKK10103)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: nfhun@sina.com

慢性疾病过程,单一方法耗时较长,故国内多采用多因素造模法,如宋一平等^[3]应用气管内 2 次注入内毒素(LPS, 200 $\mu\text{g}/\text{次}$)及熏香烟法 28 d 制作大鼠 COPD 模型。但近两年,对于 COPD 的造模时间存在较多的争议,认为 28 d 不足以形成 COPD 的病理生理学改变。国内夏锦芳等^[4]应用烟熏联合气道内注入小剂量内毒素法成功制作了 COPD 模型用于进一步的实验研究。

本实验通过比较 90 d 香烟烟熏加气管内注入内毒素、单独香烟烟熏及单独气道内注入内毒素 3 种方法复制 COPD 模型的效果,寻找有效的建模方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物分组与处理

将 40 只体重(200 \pm 10)g 的 SD 雄性大鼠(SPF 级,浙江省实验动物中心提供)采用随机数字表法分为健康对照组、单纯烟熏组、单纯内毒素组和烟熏联合内毒素组,每组 10 只。单纯烟熏组、烟熏联合内毒素组大鼠放入被动吸烟密封箱(江苏省泰州医疗器械有限公司,规格:47.0 cm \times 31.5 cm \times 49.0 cm,并自行改装)内,实验用烟为江苏中烟工业有限责任公司出品的一品梅牌过滤嘴香烟(焦油量 11 mg,烟烟气碱量 0.8 mg,烟气一氧化碳量 14 mg),以 5% 烟雾浓度进行烟熏,2 次/d,0.5 h/次,2 次间隔时间为 8 h,共 90 d。第 30、60 天不给予烟熏,气管内分别注入 200 μl 生理盐水和内毒素(LPS, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)。健康对照组及单纯内毒素组大鼠放入密闭箱内但不进行烟熏,2 次/d,0.5 h/次,2 次间隔时间为 8 h,共 90 d。第 30、60 天气管内分别注入等量生理盐水和 LPS。除在密闭箱内时间外,4 组大鼠在相同环境中饲养,所有大鼠均于第 91 天处死。

1.1.2 主要试剂

LPS(Sigma 公司,美国);HE 染色试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司);RM6240B/C 型生物信号采集处理系统(成都仪器厂);ELISA 检测试剂盒(武汉优尔生科技股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 肺组织病理学检查

大鼠饲养第 91 天,禁食 12 h 后予 4%水合氯醛(0.3 ml/100 g)腹腔注射麻醉后固定,腹主动脉取血 5 ml 后放血处死大鼠,开胸,暴露气管及肺。结扎左主支气管取左下肺组织,冰生理盐水冲洗后置于冻存管中并立即存放于液氮中备用。向右主支气管内

灌注 10%中性福尔马林溶液,结扎固定 0.5 h,后取下右肺浸泡于 10%中性福尔马林固定 24 h;常规石蜡包埋、切片,行 HE 染色观察肺组织的病理改变。

1.2.2 平均肺泡直径(LM)及平均肺泡数(MAN)测定

每张 HE 切片随机选取 3 个视野($\times 200$),计数每个视野内的肺泡数,测量每个肺泡的直径,算出平均值,即得 LM。将肺泡数除以该视野的面积,即得 MAN。

1.2.3 肺功能检测

2%(30 mg/kg)戊巴比妥钠麻醉大鼠后,仰卧位固定四肢和头部,经气管插管,并连接呼吸流量换能器测定呼吸流量。食管内插管连接压力换能器测定食道内压以代替胸内压,大鼠呼吸稳定后连续记录 30 min,采样频率 10 kHz,时间常数 0.001,使用 RM6240B/C 型生物信号采集处理系统,计算肺顺应性、气道阻力和每分钟通气量。

1.2.4 血清中白细胞介素-8(IL-8)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、磷脂酶 A2(PLA2)含量测定

将留取的腹主动脉血 5 ml,置于预冷的负压真空采血管中,静置 2 h 后,1 000 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min,收集上清液-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存待测。用 ELISA 法检测各组大鼠血清 IL-8、TNF- α 、PLA2 的含量,操作步骤严格按照试剂盒说明书执行。

1.2.5 肺组织中 IL-8、TNF- α 、PLA2 含量测定

称取每只大鼠肺组织 100 mg,加入 0.9%冰生理盐水 1 ml,用组织匀浆器制成 10%的肺组织匀浆^[6],3 000 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min,取上清液-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存待测。用 ELISA 法检测各组大鼠肺组织 IL-8、TNF- α 、PLA2 的含量,操作步骤严格按照试剂盒说明书执行。

1.3 统计学方法

采用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析,所有数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,4 组间比较采用单因素方差分析,方差齐时两两比较采用 LSD 法,方差不齐时选用 Dunnett's T3 检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 建模结束后 4 组大鼠症状体征

建模结束后烟熏联合内毒素组大鼠神情倦怠,拱背蜷缩,皮毛发黄,毫无光泽,脱毛严重,活动能力下降,进食及饮水量较健康对照组明显减少,出现咳嗽、呼吸急促、哮喘、呼吸困难等症状,体型消瘦,灵敏度降低,大便干涩,小便色暗黄。单纯烟熏组及内

毒素组大鼠症状及体征均较烟熏联合内毒素组要轻。健康对照组未见明显异常症状及体征。4组大鼠剖腹后未见腹水增多及腹膜粘连等。

2.2 4组大鼠肺组织病理形态学改变

4组大鼠肺组织 HE 染色病理切片见图 1。健康对照组大鼠支气管管腔、上皮及肺泡结构完整,纤毛排列整齐,管壁未见增厚,黏膜下层未见炎性细胞浸润。内毒素组大鼠支气管管腔稍变形,上皮细胞脱

落不明显,管壁轻度增厚,黏膜下可见较多炎性细胞浸润,肺泡腔有扩大融合现象。烟熏组支气管管腔局部变形,上皮细胞有脱落,纤毛少量脱落倒伏,排列不整齐,黏膜下少量炎性细胞浸润。烟熏联合内毒素组大鼠支气管管腔严重变形,上皮细胞明显脱落,肺泡壁变薄,肺泡腔扩大融合成肺大泡,纤毛脱落缺失,支气管壁杯状细胞增生,管壁破坏、增厚,黏膜下腺体增生肥大,管壁周围可见大量炎性细胞浸润。

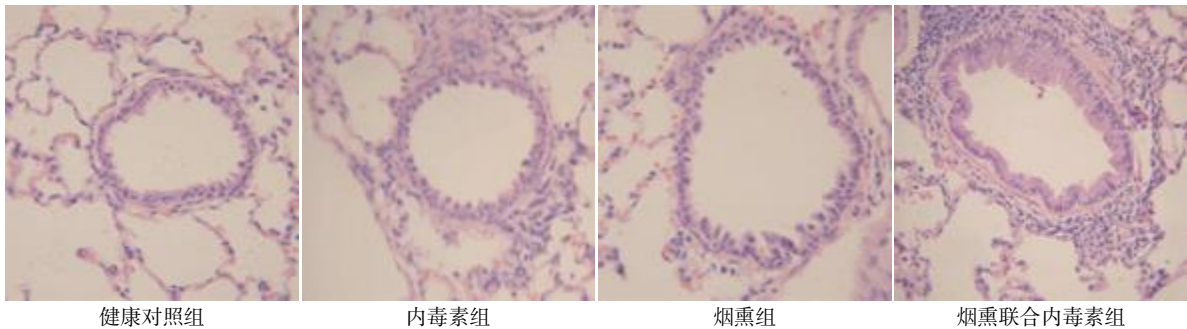


图 1 大鼠肺组织病理改变(HE,×200)

Figure 1 Pathologic changes of the lung in rats(HE,×200)

2.3 4组大鼠肺组织 LM 和 MAN 测量结果

采用 LM 及 MAN 进一步定量评估肺气肿严重程度,LM 反映肺泡大小,MAN 反映肺泡密度。结果显示烟熏联合内毒素组 LM 最大,MAN 最少,与其他 3 组相比,差别有显著统计学意义(P < 0.01),肺气肿表现最明显(表 1)。

表 1 平均肺泡直径和平均肺泡数

Table 1 Morphological changes of lung tissue (n=10, X ± s)

组别	平均肺泡直径(μm)	平均肺泡数(10 ⁶ /m ²)
健康对照组	26.6 ± 1.7	22.2 ± 1.6
内毒素组	31.7 ± 4.2 ^a	16.1 ± 1.4 ^a
烟熏组	36.7 ± 3.1 ^{ab}	15.9 ± 1.8 ^{ab}
烟熏联合内毒素组	47.6 ± 3.7 ^{abc}	12.7 ± 1.5 ^{abc}
F 值	72.058	61.002
P 值	< 0.01	< 0.01

与健康对照组比较,^aP < 0.01;与内毒素组比较,^bP < 0.01;与烟熏组比较,^cP < 0.01。

2.4 4组大鼠肺功能的变化

使用 RM6240B/C 型生物信号采集处理系统检测 4 组大鼠肺顺应性、肺弹性阻力、气道阻力,结果显示,烟熏联合内毒素组肺顺应性下降,肺弹性阻力及气道阻力升高,差别有明显统计学意义(表 2)。

2.5 4组大鼠血清及肺组织匀浆中炎症因子 IL-8、TNF-α、PLA2 含量的变化

表 2 肺功能变化

Table 2 Changes of lung function

组别	(ml/cm H ₂ O, n=10, X ± s)		
	肺顺应性	肺弹性阻力	气道阻力
健康对照组	29.28±2.03	82.06±7.38	39.98±3.15
内毒素组	20.86±2.06 ^a	93.98±7.80 ^a	49.42±2.13 ^a
烟熏组	16.93±2.63 ^{ab}	97.56±6.61 ^{ab}	53.44±3.14 ^{ab}
烟熏联合内毒素组	8.50±0.38 ^{abc}	117.52±9.81 ^{abc}	61.25±5.53 ^{abc}
F 值	192.89	34.06	57.05
P 值	< 0.01	< 0.01	< 0.01

与健康对照组比较,^aP < 0.01;与内毒素组比较,^bP < 0.01;与烟熏组比较,^cP < 0.01。

用 ELISA 法检测大鼠血清及肺组织匀浆中 IL-8、TNF-α、PLA2 的含量。健康对照组、内毒素组、烟熏组和烟熏联合内毒素组间比较,烟熏联合内毒素组的血清及肺组织匀浆中 IL-8、TNF-α、PLA2 含量最高,差别有显著统计学意义(P < 0.01,表 3,表 4)。

3 讨论

COPD 是一种可以预防和治疗的常见疾病,其特征是持续存在的气流受限,气流受限呈进行性发展,伴有气道和肺对有害颗粒或气体所致慢性炎症反应的增加。急性加重和合并症影响患者整体疾病的严重程度^[5]。吸烟及被动吸烟等烟雾暴露均可能

表 3 各组大鼠血清中 PLA2、IL-8、TNF-α 含量测定结果比较

组别	血清 PLA2 含量	血清 IL-8 含量	血清 TNF-α 含量
健康对照组	119.09 + 3.06	235.23 + 14.90	46.97 + 2.84
内毒素组	141.02 + 5.49 ^a	338.26 + 25.82 ^a	70.69 + 2.32 ^a
烟熏组	138.31 + 3.23 ^a	383.02 + 30.82 ^{ab}	82.44 + 4.80 ^a
烟熏 + 内毒素组	159.76 + 4.77 ^{abc}	428.98 + 29.48 ^{abc}	114.28 + 6.66 ^{abc}
F 值	15.24	101.36	38.78
P 值	< 0.01	< 0.01	< 0.01

与健康对照组比较, ^a*P* < 0.01; 与内毒素组比较, ^b*P* < 0.01; 与烟熏组比较, ^c*P* < 0.01。

表 4 各组大鼠肺组织中 PLA2、IL-8、TNF-α 含量测定结果比较

组别	肺组织 PLA2 含量	肺组织 IL-8 含量	肺组织 TNF-α 含量
健康对照组	209.38 + 3.32	386.74 + 5.30	145.05 + 8.77
内毒素组	250.34 + 8.14 ^a	428.90 + 11.75 ^a	159.10 + 6.66
烟熏组	276.96 + 9.92 ^{ab}	446.68 + 10.06 ^a	183.56 + 3.84 ^{ab}
烟熏 + 内毒素组	317.47 + 10.24 ^{abc}	487.10 + 16.73 ^{abc}	222.58 + 5.63 ^{abc}
F 值	29.44	16.73	27.49
P 值	< 0.01	< 0.01	< 0.01

与健康对照组比较, ^a*P* < 0.01; 与内毒素组比较, ^b*P* < 0.05; 与烟熏组比较, ^c*P* < 0.01。

是导致 COPD 发生的危险因素^[6]。Lee 等^[7]认为吸烟和被动吸烟后,烟草的毒素在气道上皮细胞衬液快速溶解,从而对宿主免疫产生广泛的效应。吸烟最有害的是烟草燃烧后产生的氧自由基,这种氧自由基不能够被过滤嘴所滤过,它通过诱发脂类和其他细胞膜成分的过氧化,激活氧化应激细胞途径,诱发损坏 DNA 而破坏气道的上皮细胞^[8]。COPD 的病理基础是慢性气道炎症,以气道中的中性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞浸润为主,伴随全身的慢性炎症反应^[9]。其痰液、肺泡灌洗液及血清中的炎症因子(TNF-α、IFN-γ、PLA2 及 IL-8)显著增高^[10]。

Rinalde 等^[11]用单纯烟熏 6 个月制造大鼠 COPD 模型。但是,6 个月造模耗时较长,且大鼠死亡率较高。本实验采用单纯烟熏 3 个月造模,结果显示烟熏的大鼠模型的平均肺泡直径均较健康对照组明显增大,肺顺应性下降,弹性阻力及气道阻力增高,血清及肺组织中的 PLA2、IL-8、TNF-α 等炎症因子的含量均高于健康对照组(即非烟熏组),差别有统计学意义。但是,HE 染色虽然见到支气管管腔有变形,纤毛有脱落倒伏等现象,但管腔变形不明显,炎症细胞增加不显著,显然造模时间有欠缺,单独烟熏 3 个月并不足以造成慢性支气管炎和肺气肿的病理生理改变。

内毒素是革兰阴性菌细胞壁的成分^[12],它可以刺激气道上皮细胞、内皮细胞、单核细胞及中性粒细

胞等合成一系列炎症介质,引起气道黏膜和黏膜下层的炎性细胞浸润和上皮细胞化生^[13]。本实验设立了单独小剂量的内毒素组。实验结果显示,与健康对照组相比,内毒素组大鼠模型的平均肺泡直径增大,肺顺应性下降,气道阻力与弹性阻力增加,HE 染色见支气管腔周围有较多炎细胞浸润,血清中 PLA2、IL-8、TNF-α 及肺组织中 PLA2、IL-8 等炎症因子的含量均增加,差别有统计学意义。但是,内毒素组大鼠模型的血清 PLA2、TNF-α 含量,肺组织 IL-8 含量变化与烟熏组模型相比无明显统计学差异,而且平均肺泡直径的增加、肺顺应性的下降、气道阻力及弹性阻力的增加均不如烟熏组,差别具有明显统计学意义。此结果显示单独小剂量内毒素尚不足以制造 COPD 大鼠模型。因为 COPD 是一个慢性炎症过程,大剂量内毒素造模是用于短时间制造急性肺损伤的模型^[14],而不是慢性炎症。单独小剂量内毒素造模不能呈现慢性支气管炎和肺气肿的病理生理表现。

感染也是慢性炎症的一个重要的致病因素, Meng^[15] 以及 Lee^[7]等的研究显示,联合烟熏和内毒素比单纯烟熏法或单纯内毒素法有更好的炎症反应。于是,本实验尝试采用香烟烟雾吸入联合气道注入小剂量内毒素 90 d 诱导 COPD 大鼠模型,实验结果显示大鼠支气管管腔变形,上皮细胞脱落,管腔融合成肺大泡,大量炎性细胞浸润,肺顺应性下降,

气道阻力及弹性阻力增加,血清及肺组织中的PLA₂、IL-8、TNF- α 等炎症因子的含量增多,呈现慢性支气管炎和肺气肿的病理生理表现。与单独烟熏或单独小剂量内毒素气道内注射比较,差别有显著统计学意义。

本实验结果显示,香烟烟熏联合内毒素诱导COPD大鼠模型,与单独烟熏相比较,可以明显缩短COPD的造模时间,减少造模过程中的大鼠死亡率,提高COPD大鼠造模的成功率。此方法优于单独烟熏法及单独气道内注入内毒素法。

[参考文献]

- [1] Gross P, Pfitzer EA, Tolker E, et al. Experimental emphysema: Its production with papain in normal and silicotic rats[J]. Arch Environ Health, 1965, 7(11): 50-58
- [2] Agusti A, Sobradillo P, Celli B. Addressing the complexity of chronic obstructive pulmonary disease: from phenotypes and biomarkers to scale-free networks, systems biology, and P4 medicine[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 183(9): 1129-1137
- [3] 宋一平, 崔德健, 茅培英, 等. 慢性阻塞性肺疾病大鼠模型气道重塑及生长因子的研究[J]. 中华结核与呼吸杂志, 2001, 24(5): 5-9
- [4] 夏锦芳, 王 研, 唐法娣, 等. 留兰香油对慢性阻塞性肺疾病大鼠的气道炎症反应与白细胞介素-8和CCR2受体表达的影响[J]. 中国药学杂志, 2010, 45(6): 423-428
- [5] 柳 涛, 蔡柏蓓. 慢性阻塞性肺疾病诊断、处理和预防全球策略(2011年修订版)介绍[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2012, 11(1): 1-12
- [6] Malerba M, Montuschi P. Non-invasive biomarkers of lung inflammation in smoking subjects [J]. Curr Med Chem, 2012, 19(2): 187-196
- [7] Lee J, Taneja V, Vassallo R. Cigarette smoking and inflammation cellular and molecular mechanisms [J]. J Dent Res, 2012, 91(2): 142-149
- [8] Valavanidis A, Vlachogianni T, Filtakis K. Tobacco smoke: involvement of reactive oxygen species and stable free radicals in mechanisms of oxidative damage, carcinogenesis and synergistic effects with other respirable particles [J]. Int J Environ Res Public Health, 2009, 6(2): 445-462
- [9] Jeffery PK. Lymphocytes, chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease [J]. Novartis Found Symp, 2001, 234: 149-161
- [10] Barnes PJ. Mechanisms in COPD: difference from asthma [J]. Chest, 2000, 117(1): 10-14
- [11] Rinaldi M, Maes K, De Vleeschauwer S, et al. Long-term nose-only cigarette smoke exposure induces emphysema and mild skeletal muscle dysfunction in mice [J]. Dis Model Mech, 2012, 5(3): 333-341
- [12] Ngkelo A, Meja K, Yeadon M, et al. LPS induced inflammatory responses in human peripheral blood mononuclear cells is mediated NOX4 and Gi α dependent PL-3kinase signalling [J]. Inflamm (Lond), 2012, 9(1): 1-7
- [13] Fu PK, Yang CY, Tsai TH, et al. Moutan cortex radices improves lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats through anti-inflammation [J]. Phytomedicine, 2012, 19(13): 1206-1215
- [14] Cabrera-Benitez NE, Pérez-Roth E, Casula M, et al. Anti-inflammatory activity of a novel family of aryl ureas compounds in an endotoxin-induced airway epithelial cell injury model [J]. PLoS One, 2012, 7(11): e48468
- [15] Meng QR, Gideon KM, Harbo SJ, et al. Gene expression profiling in lung tissues from mice exposed to cigarette smoke, lipopolysaccharide, or smoke plus lipopolysaccharide by inhalation [J]. Inhal Toxicol, 2006, 18(8): 555-568

[收稿日期] 2013-04-09

本刊现已启用网上稿件管理系统, 作者登陆
<http://jnmn.njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询稿件
审理情况。