

doi:10.3969/j.issn.1674-4616.2023.02.004

• 实验研究 •

慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的建立与比较*

欧阳桂兰¹ 游柏稳^{2△}¹湖南中医药大学,长沙 410208²湖南中医药大学第二附属医院,长沙 410005

摘要 目的 通过单独烟草烟雾暴露(cigarette smoke exposure,CSE)或 CSE 联合脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)、猪胰弹性蛋白酶(porcine pancreatic elastase,PPE)气管内滴注 2 种方法构建慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease,COPD)大鼠模型并比较造模效果。**方法** SPF 级雄性 SD 大鼠 30 只,随机分为对照组、烟熏组、联合组,每组 10 只,分别予正常环境饲养、CSE、CSE 联合 LPS 及 PPE 气管内滴注。每周检测大鼠体重,4 周后检测大鼠肺功能,HE 染色观察肺组织病理变化,测定血清肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α)、白细胞介素-8(interleukin-8,IL-8)及肺组织中黏蛋白 5AC(mucin 5 subtype AC,MUC5AC)水平。**结果** 烟熏组、联合组大鼠体重显著低于对照组($P<0.05$);联合组大鼠体重明显低于烟熏组($P<0.05$)。联合组用力肺活量(forced vital capacity,FVC)显著低于对照组($P<0.05$),烟熏组、联合组大鼠第 0.3 s 用力呼气量(forced expiratory volume in 0.3 s,FEV_{0.3})、FEV_{0.3}/FVC 水平显著低于对照组($P<0.05$);联合组大鼠 FEV_{0.3}、FVC、FEV_{0.3}/FVC 水平显著低于烟熏组($P<0.05$)。烟熏组与联合组肺泡腔均呈扩大融合;联合组可见间隔变薄、断裂,融合成肺大泡。烟熏组、联合组大鼠血清 TNF- α 、IL-8 及肺组织 MUC5AC 水平明显高于对照组($P<0.05$);联合组大鼠血清 TNF- α 、IL-8 及肺组织 MUC5AC 水平明显高于烟熏组($P<0.05$)。**结论** 以上 2 种方法均能成功构建 COPD 大鼠模型,CSE 联合 LPS、PPE 气管内滴注建立的模型比单纯 CSE 建立的模型更符合 COPD 患者的临床特点及病理特点。

关键词 慢性阻塞性肺疾病;动物模型;烟草烟雾暴露;脂多糖;猪胰弹性蛋白酶

中图分类号 R563.9;R-332 **文献标志码** A

Establishment and Comparison of Rat Model of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*

OUYANG Guilan¹,YOU Baiwen^{2△}¹Hunan University of Traditional Chinese Medicine,Changsha 410208,China²The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine,Changsha 410005,China

Abstract Objective To establish the rat model of chronic obstructive pulmonary disease(COPD)by cigarette smoke exposure(CSE)alone or CSE combined with lipopolysaccharide(LPS)and porcine pancreatic elastase(PPE)intratracheal instillation,and the effects of the two models was compared. **Methods** Thirty SPF grade male SD rats were randomly divided into control group,smoking group and combination group,with 10 rats in each group,respectively given normal environment feeding,CSE,CSE combined with LPS and PPE intratracheal instillation. The weight of rats was measured every week,the lung function of rats was measured after 4 weeks,the pathological changes of lung tissue were observed by HE staining,and the serum tumor necrosis factor- α (TNF- α),interleukin-8(IL-8)and mucin 5 subtype AC(MUC5AC)levels in lung tissue was measured. **Results** The weight of rats in smoking group and combination group was significantly lower than that in control group($P<0.05$),and the weight

* 湖南省中医药科研计划项目(No. 2021003)

△通信作者,Corresponding author,E-mail:1067343998@qq.com

of rats in the combination group was significantly lower than that in the smoking group ($P < 0.05$). The forced vital capacity (FVC) of the combined group was significantly lower than that of the control group ($P < 0.05$), the forced expiratory volume in 0.3 s ($FEV_{0.3}$) and $FEV_{0.3}/FVC$ levels of rats in the smoking group and the combination group were significantly lower than those in the control group ($P < 0.05$), and the levels of $FEV_{0.3}$, FVC and $FEV_{0.3}/FVC$ in the combination group were significantly lower than those in the smoking group ($P < 0.05$). The alveolar cavity of both smoking group and combination group showed enlarged fusion, and in the combined group, the septa became thinner, fractured and fused into pulmonary bullae. The levels of serum TNF- α , IL-8 and MUC5AC in lung tissues of rats in smoking group and combination group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$), and the levels of serum TNF- α , IL-8 and MUC5AC in lung tissues of rats in combination group were significantly higher than those in smoking group ($P < 0.05$). **Conclusion** The above two methods could successfully construct COPD rat models. The model established by CSE combined with LPS and PPE intratracheal instillation is more consistent with the clinical and pathological characteristics of COPD patients than the model established by simple CSE.

Key words chronic obstructive pulmonary disease; animal model; cigarette smoke exposure; lipopolysaccharide; porcine pancreatic elastase

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 简称慢阻肺, 特点是持续存在的气流受限及呼吸系统症状, 主要由于长期暴露于有害颗粒或气体中所引起^[1]。根据世界卫生组织 (world health organization, WHO) 预测, 到 2030 年, COPD 将成为全球三大死因之一^[2]。建立与临床患者疾病发生发展及病理变化相符合的动物模型, 是研究 COPD 发病机制与治疗药物的基础^[3]。COPD 造模动物主要为小鼠、大鼠、豚鼠^[4], 其中大鼠能在烟草烟雾暴露 (cigarette smoke exposure, CSE) 等方法下快速构建稳定模型, 且疾病病程与人类患者相似, 因此被广泛应用^[5-6]。CSE 法所建立的大鼠模型有着与 COPD 患者相似的病理生理特征, 因此成为常见的造模方法, 但存在肺泡病变轻、造模时间总体偏久的问题^[7]。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导模型或猪胰弹性蛋白酶 (porcine pancreatic elastase, PPE) 诱导模型只是短时间内造成肺损伤, 不会出现渐进性通气障碍, 因此只符合 COPD 患者的部分特征^[8]。基于此, 本研究拟采用 CSE 联合 LPS、PPE 气管内滴注建立 COPD 大鼠模型, 并与 CSE 诱导模型相对比, 以期 COPD 的实验研究提供造模周期短、稳定可靠的造模方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取健康 7 周龄无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级雄性 SD 大鼠 30 只, 体重 (200 ± 20) g。大鼠由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 实验

动物生产许可证号为 No. SCXK (湘) 2019-0004。饲养设施由湖南中医药大学第一附属医院医学创新实验中心提供, 使用许可证号为 No. SYXK (湘) 2020-0010。饲养环境温度控制在 (22 ± 2) °C, 适应性饲养 7 d 后进行实验。本实验所涉及的动物实验操作均经过湖南中医药大学第一附属医院医学创新实验中心实验动物伦理委员会批准, 伦理编号为 No. ZY-FY20211220。

1.2 主要试剂与仪器

PPE 购自上海 Acme 公司; LPS 及 1% 戊巴比妥钠购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 香烟购自湖南中烟工业有限责任公司 (焦油含量 10 mg/根); 4% 多聚甲醛溶液购自 Biosharp 公司; 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-8 (interleukin-8, IL-8)、肺组织中黏蛋白 5AC (mucin 5 subtype AC, MUC5AC) 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自长沙乐丰生物科技有限公司。

自制烟熏箱 (80 cm $\times$ 60 cm $\times$ 80 cm 透明有机玻璃箱); 电子天平 (松净 ZG-TP101); 动物肺功能检测仪器 (英国 EMMS 公司, 型号 CRFM100)。

1.3 造模方法

将 30 只大鼠随机分为 3 组, 对照组、烟熏组、联合组各 10 只。3 组大鼠适应性饲养 1 周后, 烟熏组采用 CSE 法, 联合组采用 CSE 联合 LPS、PPE 气管内滴注法制备 COPD 大鼠模型。

对照组在正常环境下饲养 4 周。

烟熏组大鼠置于烟熏箱内, 每天上午、下午各进

行 60 min 被动吸烟处理;每次给予 10 支香烟,分 2 批燃烧,点燃后放进烟箱,自行燃尽为止,2 次烟熏间隔时间 ≥ 5 h,共烟熏 4 周。

联合组大鼠与烟熏组大鼠熏烟方式基本相同,但香烟量减半,烟熏时间为第 2~13 d 及 15~28 d;并于第 1 d 及第 14 d 行气管内滴注 PPE、LPS,给予 LPS、PPE 气管内滴注当天不进行 CSE。首先使用 1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔内注射麻醉,将大鼠头高尾低仰卧位固定于鼠板上,予聚维酮碘溶液皮肤消毒,纵向切开颈部皮肤约 2 cm,逐层钝性分离。暴露气管后,用 1 mL 注射器先抽取 0.3 mL 空气,再分别抽取 LPS(0.1 mg/0.1 mL)及 PPE(10 U/0.1 mL)快速注入气管内。青霉素冲洗伤口后缝合肌肉及皮肤,将大鼠左右摇晃数分钟,使药物均匀分布于左右两肺,最后放入笼盒待其苏醒,术后 7 d 每日用青霉素冲洗伤口预防感染。

1.4 大鼠一般情况

观察各组大鼠体重变化,实验开始前称量大鼠体重,此后每 1 周称量 1 次。除此之外,还有观察各组大鼠呼吸情况(是否有咳嗽、气喘等)、口鼻分泌物、精神状态、皮毛色泽、活动情况、进食量等。

1.5 大鼠肺功能检测

大鼠麻醉后固定,剥离暴露气管,行气管插管,连接固定后,置于小动物肺功能检测仪上检测肺功能。测定第 0.3 s 用力呼气量(forced expiratory volume in 0.3 s, FEV_{0.3})、用力肺活量(forced vital capacity, FVC)、第 0.3 s 用力呼气量/用力肺活量(FEV_{0.3}/FVC)等指标。

1.6 大鼠肺组织病理学观察

肺功能测定完成后,将左肺叶组织置于 4%多聚甲醛溶液中,固定后脱水、透明处理、石蜡包埋、连续切片,采用苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色,光学显微镜(100 倍视野)下观察大鼠肺组织病理变化。

1.7 大鼠血清 TNF- α 、IL-8 水平检测

剖开大鼠腹部,将针尖平行于腹主动脉取血,室温静置后 3000 r/min 离心 10 min,抽取上清液 1~2 mL,使用 ELISA 法检测血清 TNF- α 、IL-8 水平,严格按试剂盒说明书进行操作。

1.8 大鼠肺组织 MUC5AC 水平检测

大鼠右肺叶组织充分匀浆后,离心机 3000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,ELISA 法检测肺组织 MUC5AC 水平,严格按试剂盒说明书进行操作。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析,计量资料以

均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况比较

对照组大鼠呼吸状况、精神状态良好,无口鼻分泌物,皮毛清洁有色泽,活动灵敏,进食量无改变。烟熏组、联合组大鼠出现咳嗽、气喘等症状,精神萎靡,有口鼻分泌物,皮毛枯黄无光泽,活动缓慢,不喜动,进食量明显变少;且联合组较烟熏组改变更明显。

从第 1 周开始,烟熏组、联合组大鼠体重显著低于对照组($P<0.05$)。联合组大鼠体重明显低于烟熏组($P<0.05$)。见图 1。

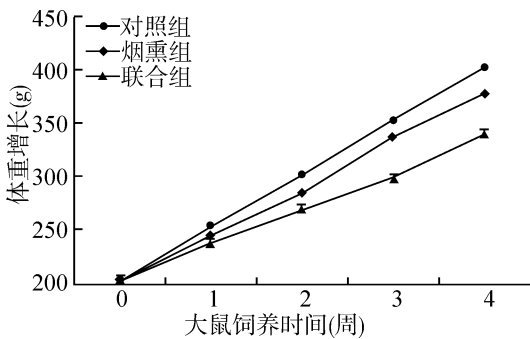


图 1 各组大鼠体重变化

2.2 肺功能指标比较

烟熏组、联合组大鼠 FEV_{0.3}、FEV_{0.3}/FVC 水平显著低于对照组($P<0.05$),联合组 FVC 显著低于对照组($P<0.05$)。联合组大鼠 FEV_{0.3}、FVC、FEV_{0.3}/FVC 水平显著低于烟熏组($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠肺功能指标比较($n=10, \bar{x}\pm s$)

组别	FEV _{0.3} (mL)	FVC(mL)	FEV _{0.3} /FVC(%)
对照组	5.35 $\pm$ 0.36	5.68 $\pm$ 0.36	94.20 $\pm$ 0.57
烟熏组	4.67 $\pm$ 0.28*	5.37 $\pm$ 0.29	86.79 $\pm$ 0.68*
联合组	3.06 $\pm$ 0.38* Δ	3.67 $\pm$ 0.43* Δ	83.34 $\pm$ 0.81* Δ

与对照组比较* $P<0.05$;与烟熏组比较 $\Delta P<0.05$

2.3 肺组织病理形态学比较

对照组大鼠肺组织肺泡结构正常连续,未见明显炎性细胞浸润,肺泡间隔整齐无断裂,肺泡腔无病理性扩大。烟熏组大鼠小气道支气管壁增厚,可见炎性细胞浸润,肺泡间隔增宽,肺泡腔融合、扩张。联合组大鼠肺组织病理改变较烟熏组变化更明显,支气管壁明显增厚,大量炎性细胞浸润,肺泡间隔明显扩大,还有部分肺泡间隔变薄、断裂,形成肺大泡。见图 2。

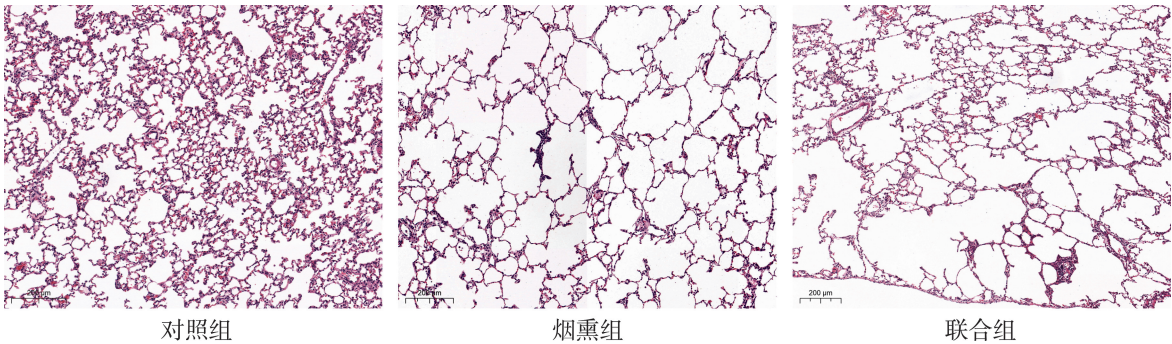


图 2 各组大鼠肺组织病理学表现(×100)

2.4 血清 TNF-α、IL-8 水平比较

烟熏组、联合组大鼠血清 TNF-α、IL-8 水平明显高于对照组($P<0.05$)。联合组大鼠血清 TNF-α、IL-8 水平明显高于烟熏组($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠血清中 TNF-α、IL-8 水平比较($n=10$, ng/L, $\bar{x}\pm s$)

组别	TNF-α	IL-8
对照组	197.56±4.17	75.16±4.98
烟熏组	329.50±5.09*	102.51±4.33*
联合组	556.67±3.11*△	156.36±5.39*△

与对照组比较* $P<0.05$;与烟熏组比较△ $P<0.05$

2.5 肺组织 MUC5AC 水平比较

烟熏组、联合组大鼠肺组织 MUC5AC 水平明显高于对照组($P<0.05$)。联合组大鼠肺组织 MUC5AC 水平明显高于烟熏组($P<0.05$)。见表 3。

表 3 各组大鼠肺组织 MUC5AC 水平比较($n=10$, ng/L, $\bar{x}\pm s$)

组别	MUC5AC
对照组	0.26±0.04
烟熏组	0.72±0.05*
联合组	1.48±0.08*△

与对照组比较* $P<0.05$;与烟熏组比较△ $P<0.05$

3 讨论

理想的动物模型需要满足以下条件:符合人类疾病的病理生理特点、制备过程可重复性高及动物存活率高等。目前有各种各样的 COPD 动物模型,包括绵羊^[9]、狗^[10]、猪^[10]、兔^[11]、猴子^[12]、豚鼠^[13]、小鼠^[14]、大鼠^[15]和松鼠。尽管人类和大鼠在生理、免疫和解剖系统上有差异,但凭借体型小、繁殖成本低、繁殖周期短、基因组与人类相似等优点,大鼠成为研究人类 COPD 的常用动物模型^[16]。

目前存在多种 COPD 的造模方法,如 CSE 诱导、LPS 诱导、PPE 诱导、基因调控和多因素诱导等^[17-18]。

吸烟是 COPD 患者最重要的危险因素之一,CSE 可以尽可能地模拟 COPD 患者的发病机制,但不足之处有暴露周期长、肺泡病变轻、稳定性差等^[16]。PPE 或 LPS 气管内滴注可引起肺部病理改变,同时也可引起肺部炎症,但不足的是 PPE 或 LPS 诱导的 COPD 模型与临床患者发病机制存在出入。相比常用方法,为缩短造模时间,且更符合 COPD 患者发病机制,本研究采用 CSE 联合 LPS、PPE 气管内滴注建立 COPD 大鼠模型,并与单纯 CSE 法建立的模型进行比较。

消瘦是 COPD 患者常见的临床表现,可能与炎症反应、肌肉修复能力下降、低氧血症及 CO₂ 潴留引起厌食等有关^[19],消瘦会对患者健康状况及预后产生不良影响^[20]。本研究通过每周测量大鼠体重,发现烟熏组、联合组大鼠体重明显低于对照组,这与患者消瘦的临床表现相一致。

气道炎症和黏液高分泌是 COPD 发展的重要因素。大量黏液分泌为病毒、细菌等微生物繁殖提供了生存条件,引起感染的同时也产生了大量炎症细胞,而这反过来又促进黏液大量分泌,形成恶性循环^[21]。TNF-α、IL-8 是重要的促炎因子,TNF-α 可促进中性粒细胞向肺组织黏附及渗出,促进炎症反应,也可调节 MUC5AC 的分泌^[22];IL-8 可调节肺部炎症反应^[23]。黏蛋白是气道黏液的重要组成部分,与黏液的性质及功能密切相关,其中 MUC5AC 与气道黏液高分泌关系最为密切^[24]。本研究发现,烟熏组、联合组大鼠血清 TNF-α、IL-8 及肺组织 MUC5AC 水平显著高于对照组,符合 COPD 气道炎症及黏液高分泌的特点。

截至目前,COPD 动物模型评估系统尚未有统一标准。与肺功能指标、气道炎症指标和氧化应激指标相比,肺组织病理学发生相应改变是评价 COPD 动物模型成功建立的最重要参数^[16]。本实验结果显示,采用以上 2 种方法建立 COPD 动物模型后,大鼠体重增长缓慢,FEV_{0.3} 和 FEV_{0.3}/FVC 水平下降,血清 TNF-

α 、IL-8 及肺组织 MUC5AC 水平升高;肺组织 HE 染色结果进一步证实支气管壁增厚,有炎性细胞浸润,肺泡间隔增宽,肺泡腔不同程度融合、扩张;表明以上 2 种方法均能成功构建 COPD 大鼠模型。相比烟熏组,联合组大鼠体重增长更为缓慢,肺功能下降更显著,支气管壁增厚更明显,有大量炎性细胞浸润,肺泡腔更大程度融合、扩张,出现肺大泡。因此,CSE 联合 LPS、PPE 气管内滴注建立的模型比单纯 CSE 建立的模型更符合 COPD 患者的临床特点及病理特点。

综上所述,以上 2 种方法均能成功构建 COPD 大鼠模型,CSE 联合 LPS、PPE 气管内滴注建立的模型比单纯 CSE 建立的模型更符合 COPD 患者的临床特点及病理特点。

参 考 文 献

- [1] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组,中国医师协会呼吸医师分会慢性阻塞性肺疾病工作委员会.慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2021 年修订版)[J].中华结核和呼吸杂志,2021,44(3):170-205.
- [2] Hillas G,Perlikos F,Tsiligianni I,et al. Managing comorbidities in COPD[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2015,10:95-109.
- [3] 卢心鹏,刘蓉,黄文博,等.不同方法建立大鼠慢性阻塞性肺疾病模型的比较研究[J].实验动物与比较医学,2022,42(3):201-206.
- [4] Ghorani V,Boskabady MH,Khazdair MR,et al. Experimental animal models for COPD:a methodological review [J]. Tob Induc Dis,2017,15:25.
- [5] 陈锦标,王慧贤,卢杰伦,等.清金化痰汤通过 P38 MAPK 信号通路对 COPD 痰热证大鼠气道炎症反应及黏液高分泌的影响[J].中药材,2021,44(4):970-974.
- [6] 傅慧婷,平键,吴冬梅,等.泽漆化痰方对慢性阻塞性肺疾病气道黏液高分泌模型大鼠肺组织 EGFR 信号通路相关蛋白表达的影响[J].中医杂志,2021,62(9):802-807.
- [7] 张迪,夏艺,范丽,等.慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的建立与评价[J].中国实验动物学报,2020,28(2):230-235.
- [8] 刘迪,张洪春.慢性阻塞性肺疾病动物模型的造模方法[J].中国比较医学杂志,2020,30(3):108-114.
- [9] Abraham WM. Modeling of asthma,COPD and cystic fibrosis in sheep[J]. Pulm Pharmacol Ther,2008,21(5):743-754.
- [10] Chapman RW. Canine models of asthma and COPD[J]. Pulm Pharmacol Ther,2008,21(5):731-742.
- [11] Mata JF,Altes TA,Cai J,et al. Evaluation of emphysema severity and progression in a rabbit model:comparison of hyperpolarized ^3He and ^{129}Xe diffusion MRI with lung morphometry[J]. J Appl Physiol(1985),2007,102(3):1273-1280.
- [12] Plopper CG,Hyde DM. The non-human primate as a model for studying COPD and asthma[J]. Pulm Pharmacol Ther,2008,21(5):755-766.
- [13] Wright JL,Churg A. Animal models of cigarette smoke-induced COPD[J]. Chest,2002,122(6 Suppl):301S-306S.
- [14] Serban KA,Petrache I. Mouse models of COPD [J]. Methods Mol Biol,2018,1809:379-394.
- [15] Martin JG,Tamaoka M. Rat models of asthma and chronic obstructive lung disease [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2006,19(6):377-385.
- [16] Liang GB,He ZH. Animal models of emphysema[J]. Chin Med J(Engl),2019,132(20):2465-2475.
- [17] Goldklang MP,Marks SM,D'Armiento JM. Second hand smoke and COPD:lessons from animal studies[J]. Front Physiol,2013,4:30.
- [18] Longhini-Dos-Santos N,Barbosa-de-Oliveira VA,Kozma RH,et al. Cell therapy with bone marrow mononuclear cells in elastase-induced pulmonary emphysema[J]. Stem Cell Rev Rep,2013,9(2):210-218.
- [19] Ceelen JJM,Schols AMWJ,Kneppers AEM,et al. Altered protein turnover signaling and myogenesis during impaired recovery of inflammation-induced muscle atrophy in emphysematous mice[J]. Sci Rep,2018,8(1):10761.
- [20] Mohamed-Hussein AAR,Makhlouf HA,Selim ZI,et al. Association between hand grip strength with weaning and intensive care outcomes in COPD patients: A pilot study [J]. Clin Respir J,2018,12(10):2475-2479.
- [21] 付海晶,曲妮妮.苏子降气汤对 COPD 气道黏液高分泌大鼠 MUC5AC、AQP5 的影响[J].中国中医急症,2018,27(6):1019-1022.
- [22] 曾勉,刘凌云,王辉,等.慢性阻塞性肺疾病患者痰中 TNF- α 及其受体水平与气流受限的关系[J].中山大学学报(医学科学版),2008,29(1):82-86.
- [23] Ung TT,Nguyen TT,Lian S,et al. Nicotine stimulates IL-6 expression by activating the AP-1 and STAT-3 pathways in human endothelial EA. hy926 cells[J]. J Cell Biochem,2019,120(4):5531-5541.
- [24] 陈玉梅,童瑾.气道黏液高分泌机制的研究进展[J].基础医学与临床,2016,36(11):1573-1577.

(收稿日期:2022-10-23)