·论著·

应用烟草烟雾口鼻暴露联合脂多糖方法建造慢性阻塞性肺疾病及相关肺动脉高压小鼠模型

舒家泽 卢文菊 李德富 梁志浩 徐小明 张波 王健

【摘要】 **目的** 通过烟草烟雾口鼻暴露联合脂多糖的方法，建立慢性阻塞性肺疾病及相关肺动脉高压(COPD-PH)的小鼠模型。**方法** 雄性 C57B6 小鼠 24 只，按随机数字表法分为对照组和模型组，每组 12 只，模型组小鼠在第 1 天和第 14 天使用细菌脂多糖进行鼻内滴注，置于动物口鼻暴露系统中进行烟草烟雾暴露，对照组小鼠使用生理盐水鼻腔滴注并置于动物口鼻暴露系统中进行正常空气暴露。8 周造模结束后，检测肺功能和右心压力，收集小鼠 BALF 计数炎症细胞总数及细胞类型，观察气道和肺组织病理改变。**结果** 模型组和对照组小鼠的功能残气量(FRC)分别为(0.402 ± 0.057)和(0.243 ± 0.064) ml ($P < 0.05$)，吸气阻力分别为(1.056 ± 0.121)和(0.789 ± 0.063) $cmH_2O \cdot ml^{-1} \cdot s^{-1}$ (1 cmH_2O = 0.098 kPa, $P < 0.05$)，肺静态顺应性(Cchord)分别为(0.084 ± 0.007)和(0.056 ± 0.004) cmH_2O/ml ($P < 0.05$)，右心室平均压(mRVP)分别为(11.3 ± 1.3)和(7.9 ± 1.1) mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa, $P < 0.05$)，右心室肥厚指数[RV/(LV + S)]分别为(0.267 ± 0.019)和(0.195 ± 0.023, $P < 0.05$)，肺组织切片 PAS 染色显示模型组杯状细胞增生。模型组小鼠肺组织病理切片可观察到炎症细胞浸润，气管壁和肺细小血管壁平滑肌增厚，提示气管和肺血管重塑的发生。**结论** 通过应用烟草烟雾口鼻暴露联合脂多糖的方法可以在短时间内建立 COPD-PH 小鼠模型，并且这种方法更符合于人类的吸烟行为习惯。

【关键词】 肺疾病，慢性阻塞性； 高血压，肺性； 动物模型； 口鼻暴露

Nose-only cigarette smoke exposure plus airway lipopolysaccharide inhalation induced chronic obstructive pulmonary disease and associated pulmonary hypertension in mice

Shu Jiaze, Lu Wenju, Li Defu, Liang Zhihao, Xu Xiaoming, Zhang Bo, Wang Jian. Guangzhou Institute of Respiratory Disease, State Key Laboratory of Respiratory Diseases, the 1st Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510120, China

Corresponding author: Wang Jian, Email: jianwang1986@yahoo.com

【**Abstract**】 **Objective** To establish a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and associated pulmonary hypertension (COPD-PH) induced by nose-only cigarette smoking exposure plus airway lipopolysaccharide (LPS) inhalation. **Methods** There were 24 male C57B6 mice divided into a control group and a model group at random. The model group was given LPS by intranasal inhalation on day 1 and day 14 and exposed to the cigarette smoke in a nose-only exposure system, while the control group was given physiological saline and exposed to normal air. The model establishment was evaluated according the following parameters: the lung function and the right heart pressure, the total and differential cell numbers in bronchial alveolar lavage fluid (BALF), and the pathological changes of lung tissues. **Results** The functional residual capacity data of the model group and the control group were (0.402 ± 0.057) and (0.243 ± 0.064) ml respectively ($P < 0.05$). The inspiratory resistance data of the model group and the control group were (1.056 ± 0.121) and (0.789 ± 0.063) $cmH_2O \cdot ml^{-1} \cdot s^{-1}$ (1 cmH_2O = 0.098 kPa) respectively ($P < 0.05$). The static lung compliance data of the model group and

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2015.12.008

基金项目：国家自然科学基金重大国际合作项目(81220108001)；国家自然科学基金面上项目(81173112)；广东省自然科学基金团队项目(1035101200300000)；广州市属高校羊城学者“首席科学基金”项目(12A001S)；广州市科技计划项目(科技惠民专项)(2014Y2-00167)

作者单位：510120 呼吸疾病国家重点实验室(广州医科大学附属第一医院)广州呼吸疾病研究所

通信作者：王健，Email: jianwang1986@yahoo.com

万方数据

the control group were (0.084 ± 0.007) and (0.056 ± 0.004) cmH_2O/ml respectively ($P < 0.05$). The right ventricular mean pressure of the model group and the control group were (11.3 ± 1.3) and (7.9 ± 1.1) mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa) respectively ($P < 0.05$), while the right ventricular hypertrophy index of the model group and the control group were (0.267 ± 0.019) and (0.195 ± 0.023) respectively ($P < 0.05$). Moreover, the histological staining showed that goblet cell hyperplasia, lung inflammation and thickening of smooth muscle layers of bronchial and pulmonary small vessels occurred in the model group, which indicated ongoing airway and blood vessel remodeling. **Conclusions** A COPD-PH mouse model was established by nose-only cigarette smoking exposure plus airway LPS inhalation in a short period of time, and this method was more similar to the smoking behavior of human.

【Key words】 Pulmonary disease, chronic obstructive; Hypertension, pulmonary; Mouse model; Nose-only exposure

慢性阻塞性肺疾病(慢阻肺)是一种常见的以持续性气流受限为特征的可以预防和治疗的疾病,气流受限进行性发展,与气道和肺脏对有毒颗粒或气体的慢性炎性反应增强有关,急性加重和并发症影响着疾病的严重程度和对个体的预后[1]。预计到2020年,慢阻肺将发展为全球范围内第三大致死性疾病[2]。慢阻肺的病因复杂,目前较为明确的是吸烟及气道感染[3]。肺动脉高压(pulmonary artery hypertension, PH)作为慢阻肺常见的并发症之一,其严重程度是影响慢阻肺相关肺动脉高压(COPD-PH)患者预后的重要因素[4]。同时,由肺部细菌感染所引起的慢阻肺急性加重也会促进 COPD-PH 患者并发症的产生[3]。

建立与临床患者疾病发生发展和病理基础相符合的动物模型,是研究 COPD-PH 发病机制的重要基础。目前建立 COPD-PH 动物模型主要采用烟草烟雾全身暴露的方法[5-7],但尼古丁等烟草物质可能通过动物的皮肤、黏膜或在动物清理自身皮毛时摄入到体内[8]。根据人类行为学,吸烟时烟草烟雾只经过口鼻直接进入肺脏,因此烟草烟雾口鼻暴露的方法避免了上述问题并且更符合人类的吸烟行为习惯[9-10]。单纯熏烟建立的动物模型缺少慢阻肺急性加重的过程,更无法模拟细菌感染等因素在 COPD-PH 发病机制中的作用。综合国内外相关文献报道,本研究尝试通过烟草烟雾口鼻暴露联合脂多糖鼻腔内滴注的方法建立 COPD-PH 小鼠动物疾病模型,现报道如下。

材料与方法

1. 主要仪器和试剂:SPF 级雄性 C57B6 小鼠:鼠龄 6 ~ 8 周,体重 22 ~ 27 g,南京医科大学南京生物医药研究院提供[许可证号:SCXK(苏)2010-0001];动物口鼻暴露系统(北京慧荣和科技有限公司),小动物有创肺功能仪(美国 BUXCO 公司),16 通道小动物生理仪(美国 BIOPAC 公司),毛细血管高速离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司),波长多功能酶标仪(美国 Thermo 公司);红玫牌卷烟购于广东中烟工业有限责任公司,细菌脂多糖购于美国 Sigma 公司,过碘酸-雪夫(PAS)染色试剂盒(批号:512NO65)购于上海太阳生物技术有限公司,Masson 三重染色试剂盒(批号:KGMST-8003)购于南京凯基生物科技发展有限公司,小鼠 IL6 ELISA 试剂盒和小鼠 KC ELISA 试剂盒购于美国 eBioscience 公司。

2. 建立模型:选取 22 ~ 27 g 的雄性 C57B6 小鼠 24 只,按随机数字表达法分为对照组和模型组,每组 12 只。模型组于第 1 天和第 14 天鼻腔内滴注脂多糖,每只用量为 7.5 μg/50 μl,对照组同期使用生理盐水滴鼻。除去第 1 天和第 14 天外,模型组置于动物口鼻暴露系统中进行烟草烟雾口鼻暴露,2 次/d,上下午各 1 次,每次 2 h(间隔换气 10 min),使用自动抽烟机依次点燃烟草 10 支/h,上下午间隔 4 h,6 d/周,连续 8 周,暴露期间氧浓度控制为(20.5 ± 0.5)%,空气湿度控制为(80 ± 5)%。同期对照组以相同条件置于上述系统中,进行正常空气暴露,氧浓度和空气湿度控制与模型组保持一致。实验过程中每周定时称量小鼠体重。在建模过程中各组均未出现死亡。

3. 小鼠肺功能指标测定:小鼠称重并给予 1% 戊巴比妥钠(70 mg/kg)麻醉,小动物手术台固定,暴露气管,切开气管并插管,使用小动物有创肺功能仪测定小鼠的功能残气量(FRC)、吸气阻力(RI)和肺静态顺应性。参数设定为:潮气量(10 ml/kg),吸气压力 8 ~ 12 cmH_2O(1 cmH_2O = 0.098 kPa),呼吸 140 次/min。待动物与呼吸机完全协调后,测定肺通气功能。

4. 血流动力学指标测定:将小鼠麻醉后,置于小动物手术台固定,打开腹腔,暴露横膈,用肝素钠处理过的针头通过隔膜插入右心室,连通压力换能器,使用小动物生理仪测量右心室收缩压(RVSP)

万方数据