

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.
Zhang D, Xia Y, Fan L, et al. Establishment and evaluation of rat models of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(2): 230-235.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.02.012

慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的建立与评价

张迪,夏艺,范丽,刘士远,管宇*

(海军军医大学附属长征医院,上海 200003)

【摘要】 目的 通过烟熏法、蛋白酶滴注及两者相结合的方法构建大鼠慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 模型,并从炎症水平、影像及病理等方面评价造模效果,对三种建模方法进行比较。**方法** 使用烟熏、蛋白酶滴注及两者相结合的方法进行 COPD 大鼠造模,每组大鼠分别为 60 只、30 只、30 只,同时设置对照组 20 只。每周对大鼠进行体重测量。烟熏组及对照组大鼠于造模 24 h、1、2、4、8、12、16、20、24 周,蛋白酶组及蛋白酶+烟熏组大鼠于造模 24 h、1、2、4、8、12 周接受细胞因子检测、Micro-CT 检查及病理检查。采用方差分析或 Kruskal-Wallis H 检验进行统计分析。**结果** 第 7 周起烟熏组大鼠及蛋白酶+烟熏组大鼠体重增长较对照组明显减缓 ($P < 0.05$)。蛋白酶组及蛋白酶+烟熏组大鼠第 24 h、1、2、4 周的白细胞介素-10 水平显著低于对照组 ($P < 0.05$)。蛋白酶组及蛋白酶+烟熏组大鼠第 24 h 的基质金属蛋白酶-9 浓度显著大于对照组 ($P < 0.05$)。蛋白酶组、蛋白酶+烟熏组第 4 周及烟熏组第 8 周大鼠在 Micro-CT 图像及病理图像上均可观察到肺气肿改变。**结论** 使用烟熏、蛋白酶及蛋白酶+烟熏的方法均可成功构建大鼠 COPD 模型。Micro-CT 可灵敏真实的反应肺部病理改变。

【关键词】 动物模型;肺疾病,慢性阻塞性;体层摄影术,X 线计算机

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 02-0230-06

Establishment and evaluation of rat models of chronic obstructive pulmonary disease

ZHANG Di, XIA Yi, FAN Li, LIU Shiyuan, GUAN Yu*

(Changzheng Hospital of the Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

Corresponding author: GUAN Yu. E-mail: guan.yu8635@163.com

【Abstract】 Objective To establish rat models of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) with smoking, protease instillation and smoking + protease instillation, and to evaluate and compare inflammation, imaging and pathology between these groups. **Methods** Rat models of COPD were established with smoking, protease instillation and smoking + protease instillation. There were 60 rats in the smoking group, 30 rats in the protease group and 30 rats in the smoking + protease group. The control group contained 20 rats. Body weight was measured every week. In the smoking and control groups, five and two rats were euthanized, respectively at 24 h, and weeks 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 and 24 during the modeling process, and in the protease and smoking + protease groups, five rats were euthanized in each group at 24 h, and weeks 1, 2, 4, 8 and 12. Rat lung tissues subjected to cytokine detection, micro-CT examination and pathological examination. **Results** The weight gain of rats in the smoking and smoking + protease group was significantly slower than the control group at week 7 ($P < 0.05$). The levels of IL-10 at 24 h, and weeks 1, 2 and 4 were significantly lower in the protease group and the smoking + protease group compared with the control group ($P < 0.05$). The concentration of MMP-9 at 24 h was significantly higher in the protease group and the smoking + protease group than the control group ($P < 0.05$).

【基金项目】 国家自然科学基金(81871321, 8137003, 81501618, 81501470)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81871321, 81370035, 81501618 and 81501470).

【作者简介】 张迪 (1993—), 女, 住院医师, 硕士, 研究方向: COPD 影像诊断。Email: rinzy369@163.com

【通信作者】 管宇 (1986—), 女, 主治医师, 在读博士研究生, 研究方向: 胸部影像诊断。Email: guan.yu8635@163.com

Emphysema was observed on the micro-CT images and pathological images in the protease group and smoking + protease group at week 4, and in the smoking group at week 8. **Conclusions** Rat models of COPD can be successfully established by smoking, protease instillation and smoking + protease instillation. Micro-CT reflects changes in lungs with high sensitivity and validity.

【Keywords】 animal model; Pulmonary disease, chronic obstructive; tomography, X-ray computed

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种慢性气道炎性疾病,以持续气流受限为特征。据预测,COPD 将在 2020 年成为全球主要死亡原因第三位及世界疾病经济负担第五位^[1-3]。COPD 主要由吸烟、二手烟暴露、燃料燃烧产生的烟雾、基因因素等导致^[4]。COPD 呈进行性发展,即使戒烟,病情仍然会进一步恶化,但早期诊断干预可以有效延缓病程。目前缺乏 COPD 早期诊断及治疗的有效手段,为解决这一问题,需要进一步了解 COPD 病程中的病理生理变化。COPD 动物模型可在短期内呈现出疾病特点,有助于揭示早期 COPD 发生发展过程中的动态变化。因此,越来越多的学者致力于构建稳定的、与人类病理生理变化类似的动物模型。

被用来制作 COPD 模型的动物有很多种,如豚鼠、小鼠、大鼠、猴、羊、牛、猪等^[5]。其中大鼠可在烟熏等诱因下快速构建稳定模型,且呈现出与人类相似的病程,因此被广泛应用^[6-7]。由于吸烟是 COPD 的主要诱因,在多种 COPD 动物模型建立方法中,烟熏模型表现出与人类患者最相似的病理生理特征,包括气道炎症、肺气肿、气道重塑和肺功能受损等。烟熏模型应用广泛,但造模方法(如实验中香烟种类、数量、烟熏频率、总时间等)缺乏统一标准,使研究间的比较相对困难,实验的可重复性不佳,蛋白酶模型也存在这一不足。不同造模方法的结合同样需要标准指导实验,以满足不同的实验需求。此外,目前缺乏不同造模方法的对比研究,造模方法的选择存在困难。

本研究拟采用烟熏、气管内滴注蛋白酶以及两者结合的方式分别建立 COPD 大鼠模型,对比三者的造模效果,以期 COPD 的研究提供稳定可靠的建模方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

雄性 II 级 Wistar 大鼠 140 只,体重(190 ± 10)g,

周龄 6 ~ 7 周,由海军军医大学动物中心提供【SCXK(沪)2018-0006】,饲喂设施由中国人民解放军海军医学研究所【SYXK(军)2017-0041】提供。饲养环境温度控制在(22 ± 2)℃,正常饲养 7 d 后进行实验。随机分为 4 组:(1)正常对照组 $n = 20$;(2)烟熏组 $n = 60$;(3)蛋白酶组 $n = 30$;(4)蛋白酶+烟熏组 $n = 30$ 。

1.1.2 试剂与仪器

弹性蛋白酶(南京奥多福尼生物科技有限公司,中国),香烟(大前门,焦油含量 10 mg/根),1%戊巴比妥钠(天津兰洪新能源科技有限公司,CAS:57-33-0),4%多聚甲醛溶液(武汉楚江浩宇化工科技发展有限公司,CAS:30525-89-4),0.9%氯化钠溶液(华润双鹤药业股份有限公司,CAS 号:7647-14-5),无水乙醇(上海处泰化工科技有限公司,CAS 号 64-17-5),纯净水等。

微型计算机 D7K67PA(惠普,美国),SCANCO uCT80 Micro-CT(SCANCO medical AG,瑞士)。

1.2 方法

1.2.1 体重测量

每周测量大鼠的体重,监测各组大鼠体重动态变化规律。

1.2.2 建立模型

烟熏组使用 PAB-S200 被动吸烟动物染毒系统(烟熏箱大小:80 cm × 60 cm × 58 cm)及香烟进行造模。烟熏过程中使用试管及抽吸装置对大鼠进行间歇烟雾暴露,模拟人类吸烟过程中烟雾暴露模式。每次烟熏同时点燃香烟 20 根,直至完全燃烧且烟雾基本散尽,共持续 40 min,每天烟熏 2 次,两次间隔时间不少于 4 h,一周烟熏 6 d。

将蛋白酶组大鼠颈部皮肤及肌肉分离,暴露主气管,使用注射器向主气管内滴注弹性蛋白酶一次,剂量为 50 IU/100 g。蛋白酶+烟熏组将气管滴注蛋白酶与烟熏相结合,气管内滴注弹性蛋白酶(50 IU/100 g)后第二天起,按烟熏组的方法进行烟熏处理。

1.2.3 标本制备

烟熏组于烟熏 24 h,1、2、4、8、12、16、20、24 周处理大鼠各 5 只,对照组于对应时间处理大鼠各 2 只,蛋白酶+烟熏组于烟熏 24 h,1、2、4、8、12 周处理大鼠各 5 只,蛋白酶组于相应时间处理大鼠各 5 只。经气管向两侧肺内反复缓慢注入并抽回生理盐水共 4.5 mL 左右,进行支气管肺泡灌洗。离体肺标本用 4%多聚甲醛溶液固定 48 h 后进行乙醇梯度脱水获得干燥肺标本(图 1)。

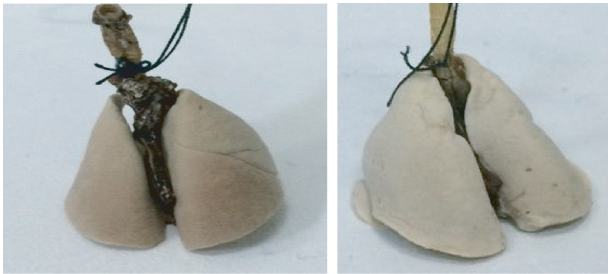


图 1 脱水后的干燥肺标本
Figure 1 Dried lung specimen after dehydration

1.2.4 标本 Micro-CT 检查及图像分析

肺标本行 Micro-CT 检查。Micro-CT 扫描参数:管电压 70 kV,管电流 144 μ A,分辨率 18 μ m。主观评价 CT 图像是否出现肺大泡,肺密度减低,炎症等 COPD 表现,并记录出现时间。

1.2.5 标本病理学检查及图像分析

标本经石蜡包埋后,每个肺叶选取 3 张切片,行 HE 染色,镜下观察标本是否出现肺泡扩张、融合,间隔变窄、断裂等改变,并记录出现时间。

肺泡灌洗液 1500 r/min 离心 10 min,留取上清液。采用大鼠白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)及基质金属蛋白酶-9(matrix metalloprotein-9, MMP-9)ELISA 试剂盒(深圳欣博盛生物科技有限公司)检测细胞因子 IL-10、MMP-9 水平。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件。比较组间体重及细胞因子差异时,若数据分布符合正态分布,采用方差分析;否则采用 Kruskal-Wallis H 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体重

对 4 组大鼠进行体重测量,结果如图 2、3 所示。与对照组相比,烟熏组大鼠及蛋白酶+烟熏组大鼠体重增长缓慢,第 7 周起烟熏组、蛋白酶+烟熏组大

鼠体重增长值与对照组出现差异($P < 0.05$)。蛋白酶组与对照组体重增长无显著差异,但蛋白酶组大鼠 1~4 周体重增长较对照组稍缓慢。

2.2 细胞因子

本研究中蛋白酶组及蛋白酶+烟熏组大鼠第 24 h、1、2、4 周 IL-10 水平显著低于对照组($P < 0.05$,图 4)。蛋白酶组及蛋白酶+烟熏组第 24 h MMP-9 浓度显著大于对照组($P < 0.05$),此后,蛋白酶组及蛋白酶+烟熏组 MMP-9 浓度与对照组虽无显著差异,但较对照组稍高(图 5)。烟熏组及对照组间 IL-10 及 MMP-9 未见明显差异。

2.3 Micro-CT 及病理

对照组 Micro-CT 图像及病理图像均未见明显异常(图 6a),蛋白酶组、蛋白酶+烟熏组第 4 周及烟熏组第 8 周 Micro-CT 图像均可见肺大泡,局部肺组织密度减低,部分可见炎症,肺内病变分布均匀(图 6b1-d1 红色箭头标注部分);病理图像均可见肺泡扩张,间隔变窄,部分肺泡间隔断裂,肺泡融合等(图 6b2-d2 黑色箭头标注部分)。四组 Micro-CT 结果与病理结果一致。

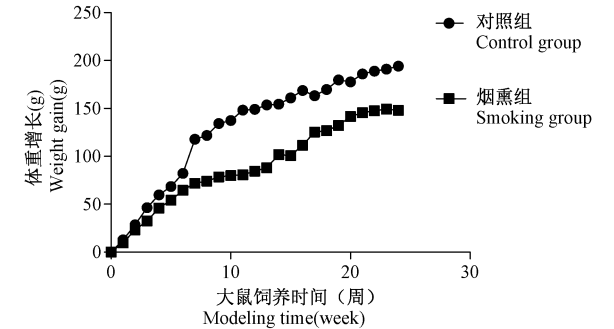


图 2 烟熏组大鼠及对照组大鼠体重变化
Figure 2 Weight gain changes in the smoking group and the control group

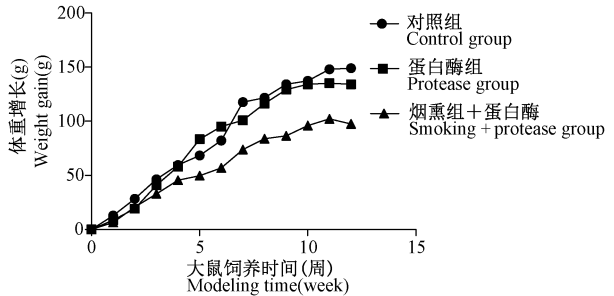


图 3 蛋白酶组、蛋白酶+烟熏组及对照组大鼠体重变化
Figure 3 Weight gain changes in the protease group, the smoking + protease group and the control group

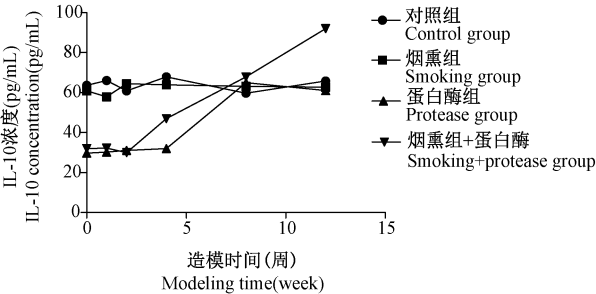


图 4 四组大鼠 IL-10 水平变化

Figure 4 Changes of IL-10 concentrations in the four groups

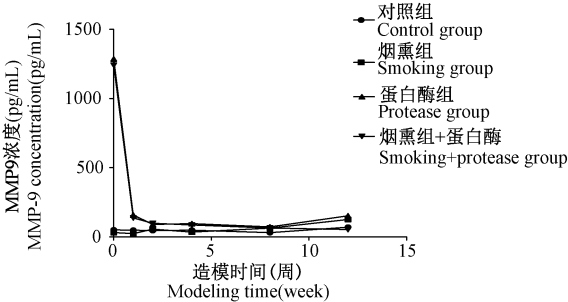


图 5 四组大鼠 MMP-9 水平变化

Figure 5 Changes of MMP-9 concentrations in the four groups

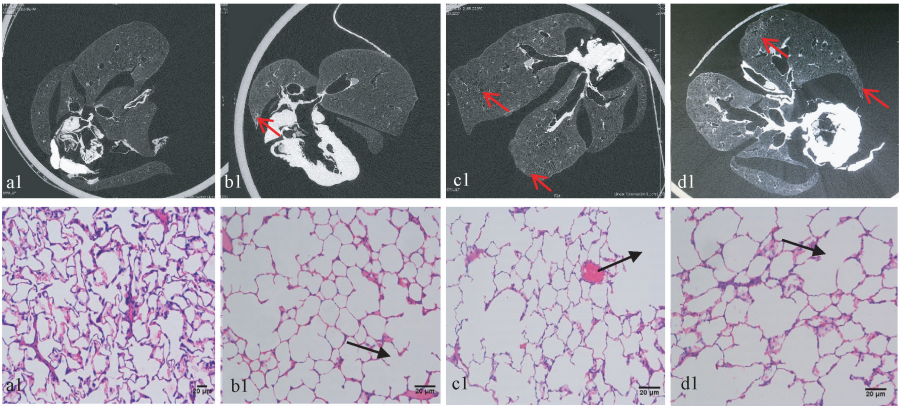


图 6 四组大鼠 Micro-CT 及病理表现(HE 染色,对照组×200,其他×400)

注:a;正常对照组;b;烟熏组;c;烟熏+蛋白酶组;d;蛋白酶组。红色箭头:肺大泡,局部肺组织密度减低,可见炎症;黑色箭头:肺泡扩张,间隔变窄,部分肺泡间隔断裂,肺泡融合。

Note. a, Control group. b, Smoking group. c, Smoking+protease group. d, Protease group. Red arrow; pulmonary bullous, reduced density of lung and inflammation. Black arrow; alveolar ectasia, alveolar fusion and alveolar septal destruction.

Figure 6 Micro-CT images and photographs of HE-stained lung tissue under optical microscopes (control group, ×200; others, ×400)

3 讨论

理想的动物模型需表现出人类疾病的特点,尽可能使模型发病机理与人类疾病同源,此外还需满足模型制备可重复性高,动物成活率高等条件。目前尚无理想 COPD 动物模型。啮齿类动物、猴、羊、狗等均可用于 COPD 动物模型制备,其中大鼠因基因、行为特征及易进行实验干预的特点成为建造 COPD 模型,模拟人类 COPD 病程的常用动物。

大鼠是否适用于 COPD 造模仍存在争议。有研究报道大鼠不易诱发产生 COPD^[8],也有研究显示,仅需 2 个月的烟熏就可观测到大鼠的肺气肿改变^[9]。人类对 COPD 并不易感,需多年的烟熏才会造成 COPD。因此,造模时间并非选择造模动物的决定性因素。

COPD 造模方法有很多,如烟熏、蛋白酶或脂多糖气管滴注、基因水平造模等^[10-12]。本研究选择较

常用的烟熏、气管滴注蛋白酶及两者相结合的造模方法。烟熏造模效果与香烟类型,烟雾暴露方法及暴露时间有关,但三者均无统一标准^[13-14]。Churg 等^[15]研究表明产生肺气肿需 6 个月,而 Leberl 等^[9]只需 2 个月。本研究采用大前门香烟(焦油含量每根 10 mg)及全身暴露的模式对大鼠进行烟熏。蛋白酶—抗蛋白酶失衡学说是 COPD 发病机制的经典学说,基于此,弹性蛋白酶被广泛应用于 COPD 模型制作。本研究采用气管内滴注弹性蛋白酶(南京奥多福尼生物科技有限公司)的方法进行造模。

有研究表明 IL-10 分布广泛,可抑制炎症反应^[16-17]。其在 COPD 病程中的变化过程及作用目前仍存在争议。曾华东等^[18]对支气管肺泡灌洗液细胞进行培养,并测定细胞培养上清液中 IL-10 含量,结果表明 COPD 组与对照组无明显差异。有研究^[19]认为 COPD 组与正常对照组间血清 IL-10 水平亦无显著差异。但也有研究^[20]发现与正常对照组

相比, COPD 患者血清 IL-10 水平下降, 说明 IL-10 参与 COPD 炎症反应。梁柱等人发现肺泡灌洗液中 COPD 组 IL-10 水平明显高于对照组^[21]。本研究对烟熏组及对照组的支气管肺泡灌洗液 IL-10 水平进行测定, 发现两组间无显著差异。而蛋白酶组及蛋白酶+烟熏组大鼠 24 h、1、2、4 周 IL-10 水平显著低于对照组。这可能因为 24 h~4 周蛋白酶产生炎症导致 IL-10 水平下降, 随后蛋白酶逐渐降解, 炎症消退。因存在检测误差或试剂盒灵敏度不够可能, 不能排除烟熏导致炎症可能。MMP-9 为促炎细胞因子, 可分解气道和肺组织的细胞外基质及基底膜, 参与气道和肺组织的重塑过程。Li 等^[22] 分析 923 名 COPD 患者及 641 名健康受检者细胞因子水平, 发现 COPD 患者血清 MMP-9 水平显著高于健康对照组。Aneta 等^[23] 的研究表明 COPD 患者痰液中 MMP-9 水平亦高于健康对照组。本研究中烟熏组与对照组 MMP-9 水平虽无显著差异, 但从第 8 周开始, 烟熏组 MMP-9 水平均较对照组高。表明烟熏组 MMP-9 存在升高趋势, 支持烟熏导致气道炎症。蛋白酶组及蛋白酶+烟熏组 24 h 的 MMP-9 浓度显著大于对照组, 此后, 蛋白酶组及蛋白酶+烟熏组 MMP-9 浓度与对照组虽无显著差异但较对照组稍高。细胞因子检测结果表明蛋白酶致炎作用较烟熏显著, 可诱导大鼠产生急性炎症; 烟熏诱导的炎症发展缓慢, 与人类 COPD 更相似。

COPD 患者常存在体重减轻, 而体重减轻可能会对 COPD 患者肌肉功能、健康状态甚至预后产生影响^[24-25]。本研究对大鼠体重进行检测, 发现烟熏组大鼠及蛋白酶+烟熏组大鼠体重增长较对照组缓慢, 这与临床患者表现一致。COPD 患者体重减轻原因很多, 如炎症^[26], 肌肉修复能力受损^[27], 低氧血症及二氧化碳潴留引起厌食^[28]等。

CT 是诊断 COPD 的重要手段, 可直接观察 COPD 形态学改变, 并在吸烟者肺功能受损前发现肺部损害^[29]。其中 Micro-CT 分辨率达到微米级别, 可无创、清晰的观测样本内部显微结构, 展示疾病动态过程。本研究使用 Micro-CT 与病理联合评估大鼠肺部改变, 发现第 4 周蛋白酶组、蛋白酶+烟熏组及第 8 周烟熏组出现 COPD 表现, 同时 4 周蛋白酶+烟熏组 Micro-CT 及病理改变程度均高于蛋白酶组。说明烟熏法、蛋白酶气管滴注法及两者相结合构建大鼠 COPD 模型分别需 8 周、4 周及 4 周。此外, 蛋白酶+烟熏法诱导 COPD 病变程度高于蛋

白酶滴注法。

Micro-CT 与病理同步观测到模型大鼠肺部改变, 表明 Micro-CT 对肺部改变非常灵敏, 可用于无创动态监测肺部病理变化。总之, 本研究表明使用烟熏、蛋白酶及蛋白酶+烟熏的方法均可成功构建大鼠 COPD 模型。烟熏大鼠模型可更好的模拟人类 COPD 病程, 蛋白酶模型更加快速高效, 而蛋白酶+烟熏模型更适于快速模拟中重度 COPD。Micro-CT 可灵敏真实的反应肺部病理改变。

致谢 感谢于志峰博士(上海市第九人民医院)提供图像后处理帮助。

参 考 文 献 (References)

- [1] Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global strategy for the diagnosis, management and prevention of COPD [J/OL]. <http://www.goldcopd.org>.
- [2] Health World Organisation. The global burden of disease: 2004 update. 2004. [J/OL] http://www.hoint/healthinfo/global_burden_disease/2004_report_update/en/indexhtml.
- [3] Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 [J]. *Lancet*, 2012, 380(9859): 2095-2128.
- [4] Decramer M, Janssens W. Chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Lancet*, 2012, 379: 1341-1351. DOI: 10.1016/S0140-6736(11)60968-9
- [5] Ghorani V, Boskabady MH, Khazdair MR, et al. Experimental animal models for COPD: a methodological review [J]. *Tob Induc Dis*, 2017, 15: 25.
- [6] Kratzer A, Salys J, Nold-Petry C, et al. Role of IL-18 in second-hand smoke-induced emphysema [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 48(6): 725-732.
- [7] Wang L, Yang J, Guo L, et al. Use of a soluble epoxide hydrolase inhibitor in smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012, 46(5): 614-622.
- [8] Stevenson CS, Docx C, Webster R, et al. Comprehensive gene expression profiling of rat lung reveals distinct acute and chronic responses to cigarette smoke inhalation [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 293(5): L1183-1193.
- [9] Leberl M, Kratzer A, Taraseviciene-Stewart L. Tobacco smoke induced COPD/emphysema in the animal model—are we all on the same page? [J]. *Front Physiol*, 2013, 4: 91.
- [10] Goldklang MP, Marks SM, D'Armiento JM. Second hand smoke and COPD: lessons from animal studies [J]. *Front Physiol*, 2013, 4: 30.
- [11] 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*, 2013, 9(2): 210-218.

- [12] Kao ST, Liu CJ, Yeh CC. Protective and immunomodulatory effect of flos *Lonicerae japonicae* by augmenting IL-10 expression in a murine model of acute lung inflammation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 168: 108–115.
- [13] Zheng H, Liu Y, Huang T, et al. Development and characterization of a rat model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) induced by sidestream cigarette smoke [J]. *Toxicol Lett*, 2009, 189(3): 225–234.
- [14] Liu ZB, Song NN, Geng WY, et al. Orexin-A and respiration in a rat model of smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2010, 37(10): 963–968.
- [15] Chung A, Cosio M, Wright JL. Mechanisms of cigarette smoke-induced COPD: insights from animal models [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 294(4): L612–631.
- [16] Jiang S, Shan F, Zhang Y, et al. Increased serum IL-17 and decreased serum IL-10 and IL-35 levels correlate with the progression of COPD [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2018, 13: 2483–2494.
- [17] Caramori G, Groneberg D, Ito K, et al. New drugs targeting TH2 lymphocytes in asthma [J]. *J Occup Med Toxicol*, 2008, 3 (suppl 1): S6.
- [18] 曾华东, 徐虹, 李理, 等. 慢性阻塞性肺疾病大鼠模型肺泡巨噬细胞炎症及调控机制探讨 [J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2012, 11(2): 133–137.
- Zeng HD, Xu H, Li L, et al. The role of alveolar macrophages in airway inflammation of COPD rats [J]. *Chin J Resp Crit Care Med*, 2012, 11(2): 133–137.
- [19] 张健全, 钟小宁, 柳广南, 等. 白细胞介素-10 在慢性阻塞性肺疾病中作用探讨 [J]. *广西医科大学学报*, 2008, 25(1): 30–31.
- Zhang JQ, Zhong XN, Liu GN, et al. The role of interleukin-10 in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *J Guangxi Med Univ*, 2008, 25(1): 30–31.
- [20] Lage VKS, Lacerda ACR, Neves CDC, et al. Acute effects of whole-body vibration on inflammatory markers in people with chronic obstructive pulmonary disease: A pilot study [J]. *Rehabil Res Pract*, 2018, 2018: 5480214.
- [21] 梁柱, 陈捷, 林立尧, 等. 阻塞性肺气肿大鼠血清和支气管肺泡灌洗液中 MMP-9、TNF- α 、TGF- β 1、IL-10 水平变化 [J]. *广东医学院学报*, 2013, 31(2): 117–120.
- Liang Z, Chen J, Lin LY, et al. Levels of MMP 9, TNF, TGF 1 and IL 10 in serum and bronchoalveolar lavage fluid from rats with obstructive emphysema [J]. *J Guangdong Med Coll*, 2013, 31(2): 117–120.
- [22] Li Y, Yang L, Zhuo Z, et al. Relationships of MMP-9 and TIMP-1 proteins with chronic obstructive pulmonary disease risk: A systematic review and meta-analysis [J]. *J Res Med Sci*, 2016, 21(1): 12.
- [23] Kleniewska A, Walusiak-Skorupa J, Piotrowski W, et al. Comparison of biomarkers in serum and induced sputum of patients with occupational asthma and chronic obstructive pulmonary disease [J]. *J Occup Health*, 2016, 58(4): 333–339.
- [24] Engelen MP, Schols AM, Does JD, et al. Skeletal muscle weakness is associated with wasting of extremity fat-free mass but not with airflow obstruction in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Clin Nutr*, 2000, 71(3): 733–738.
- [25] Mohamed-Hussein AAR, Makhlof HA, Selim ZI. 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.
- [26] 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.
- [27] Ceelen JJM, Schols AMWJ, van Hoof SJ, et al. Differential regulation of muscle protein turnover in response to emphysema and acute pulmonary inflammation [J]. *Respir Res*, 2017, 18(1): 75.
- [28] Nguyen LT, Bedu M, Caillaud D, et al. Increased resting energy expenditure is related to plasma TNF- α concentration in stable COPD patients [J]. *Clin Nutr*, 1999, 18(5): 269–274.
- [29] Takayanagi S, Kawata N, Tada Y, et al. Longitudinal changes in structural abnormalities using MDCT in COPD: do the CT measurements of airway wall thickness and small pulmonary vessels change in parallel with emphysematous progression? [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2017, 12: 551–560.

[收稿日期] 2019-08-17