

# 昆明小鼠放射性肺炎病理观察

杨 铃 冯玛莉 朱丽娜 仝立国

(山西省中医药研究院临床药理研究室,太原 030002)

**摘要:**目的 阐明昆明小鼠放射性肺炎发生发展过程的病理变化。方法 采用 6MV 的 X 射线 20Gy 单次全胸照射造模,分别于照射后第 7、14、28 天取材进行 HE 染色、病理观察,并应用 Image-Pro Plus 图像分析系统对肺泡壁厚度、肺泡腔面密度、肺间质面密度进行定量测定分析。结果 辐照后随时间延长,肺泡萎缩、肺间隔增宽、炎细胞浸润程度加重,28 d 后可见肺泡塌陷实变,轻度纤维化改变。肺泡壁厚度、肺泡腔面密度、肺间质面密度测量结果差异极显著。结论 采用上述方法复制的昆明小鼠放射性肺炎模型,病理变化过程符合放射性肺炎病程发展。

**关键词:**放射;肺炎;病理观察

中图分类号: R-332 文献标识码: A 文章编号: 1006-6179(2019)01-0077-04

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.01.016

放射性肺损伤是胸部肿瘤放疗、骨髓移植等预处理后常见的并发症,严重时加速患者死亡<sup>[1]</sup>。病程可分为早期急性肺炎和晚期放射性肺纤维化 2 期<sup>[2]</sup>。本研究模拟临床放疗条件,制备昆明小鼠放射性肺炎模型,阐明疾病发生发展过程肺部病理变化,为中药治疗奠定研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本(对象)选择及分组

昆明小鼠,雌雄各半,5 周龄,体质量为(20±2)g,SPF 级,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证号:[SCXK(京)2014-0004]。动物饲养条件:同时分笼饲养于山西省中医药研究院中心实验室,自然光照,自由进水,室内温度 18~29℃,湿度 36%~60%。

将实验小鼠随机分为 4 组:空白对照组以及模型组照射后 7th、14th、28th 3 组。每组 10 只,雌雄各半。

### 1.2 模型制备

动物经 3%戊巴比妥麻醉后,采用 6MV 的 X 射线 20Gy 单次全胸照射(图 1)造模,照射位置为头部下方、剑突以上,照射野面积 2 cm×3 cm,剂量率:

2 Gy/min,放射源距皮 100 cm。空白组不做任何处理。

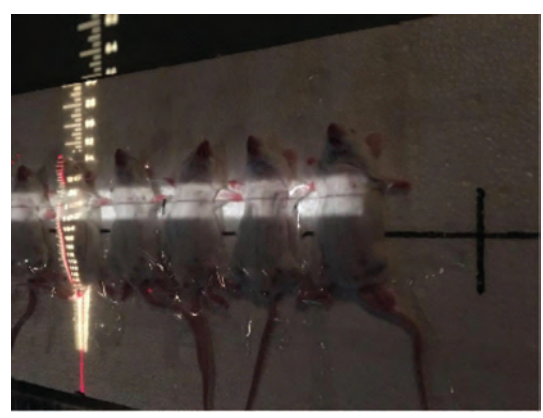


图 1 6MV 的 X 射线 20Gy 单次全胸照射,放射源距皮 100 cm

Fig.1 20 Gy cumulative dose of 6MV X-ray irradiation of full chest once, and source-skin distance=100 cm

### 1.3 取材及常规病理观察

分别于照射后第 7、14、28 天后杀检取材,肺脏经宏观观察后,与心脏一起包入纱布中置于 10%中性甲醛溶液进行固定。取左肺叶和右肺中叶,常规脱水、石蜡包埋、切片后,经 HE 染色后显微镜下观察肺脏组织病理学形态改变。

1.4 HE 染色步骤

二甲苯 I-1 10 min→二甲苯 I-2 10 min→二甲苯 I-3 10 min→无水乙醇 I 5 min→95%乙醇 I 5 min→75%乙醇 I 5 min→苏木素 4 min→自来水清洗→0.5%盐酸 5 s→自来水清洗→1%氨水 5 s→自来水清洗→伊红 2 min→75%乙醇 II 5 s→85%乙醇 5 s→95%乙醇 II 5 s→无水乙醇 II 10 min→二甲苯 II-1 10 min→二甲苯 II-2 10 min→二甲苯 II-3 10 min<sup>[3]</sup>。

1.5 图像分析

采用 Image Pro Plus 图像分析系统检测组织切片中肺泡壁厚度、肺泡腔面密度(肺泡腔面积/视野单位面积)、肺间质面密度(肺间质面积/视野单位面积)<sup>[4]</sup>。每张切片随机选取 5 个视野测量。

1.6 统计方法

文中数据用统计软件 SPSS 22.0 进行分析,均

以( $\bar{x}\pm s$ )表示,采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 照射后 KM 小鼠临床表现

照射 3 d 后,KM 小鼠背部胸段照射野被毛脱落,状态萎靡。

2.2 组织病理学形态变化

空白对照组肺实质与间质部分病理组织学结构均正常(图 2-A)。模型组照射 7 d 后可见轻度肺炎,肺泡间隔增宽、少量炎细胞浸润(图 2-B)。照射 14 d 后表现为轻-中度肺炎,肺泡塌陷,炎细胞浸润肺泡间隔,破坏肺泡结构,轻度渗出(图 2-C)。照射 4 周后可见重度肺炎,肺泡塌陷实变,炎细胞大量浸润,轻度纤维化改变,毛细血管充血,气管支气管上皮杂乱、脱落(图 2-D)。

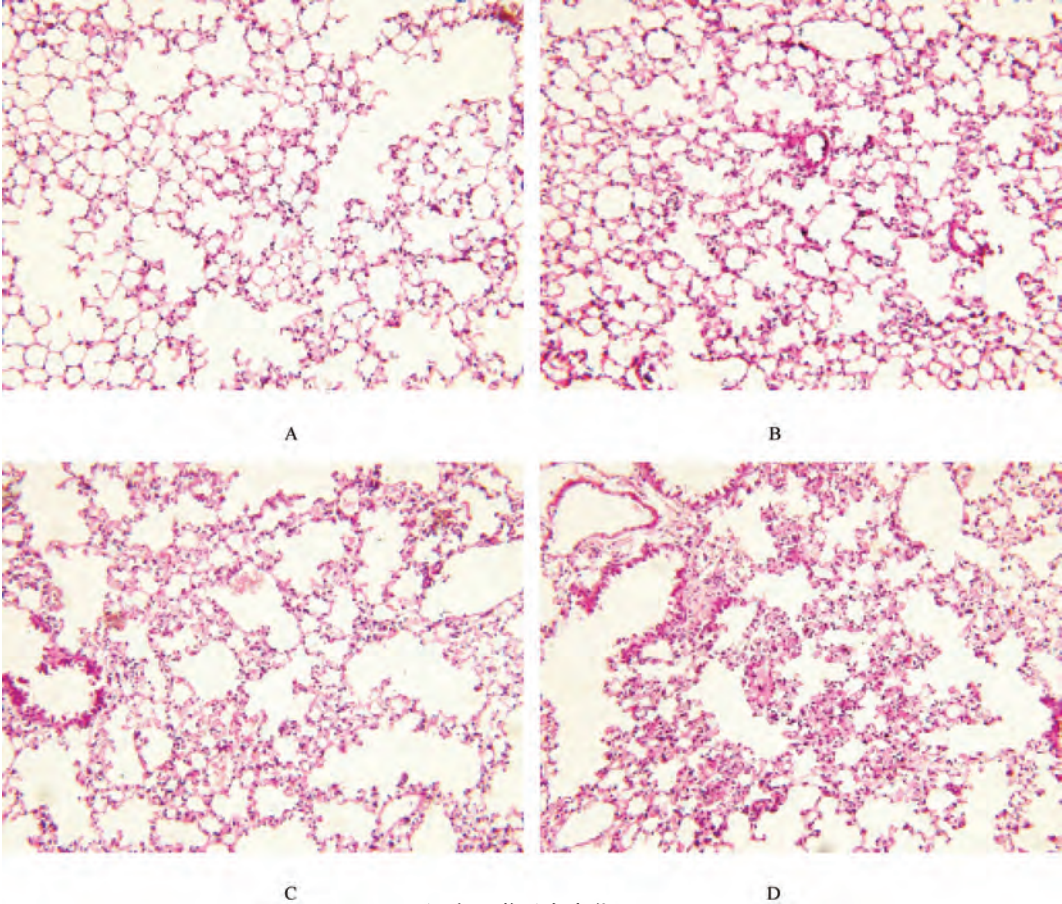


图 2 组织病理学形态变化 HE×100

注:A: 空白对照组;B: 20Gy 照射后 7 d;C: 20Gy 照射后 14 d;D: 20Gy 照射后 4 周

Fig.2 Lung histopathological changes HE×100

Note:A: Blank control group; B: 7 d after 20Gy irradiation; C: 14 d after 20Gy irradiation; D: 4 weeks after 20Gy irradiation

2.3 定量测定

正常对照组与模型组肺泡壁厚度、肺泡腔面密

度、肺间质面密度变化见表 1。照射 20Gy 后,随时间延长,肺泡壁增厚,第 7、14、28 天测量结果差异显

著 ( $P<0.01$ );肺泡腔萎缩,面积减小,第 7 天后差异显著 ( $P<0.05$ ),第 14、28 天后差异极显著 ( $P<0.01$ );肺间质增宽,面积增大,第 14、28 天后测量差异极显著 ( $P<0.01$ )。

表 1 肺泡壁厚度、肺泡腔面密度、肺间质面密度测量结果

Table 1 The determination of thickness of alveolar walls and surface mass density of alveolar spaces and interstitial tissue

| 测量指标   | 正常对照组           | 模型组(照射后)        |                  |                 |
|--------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|
|        |                 | 第 7 天           | 第 14 天           | 第 4 周           |
| 肺泡壁厚度  | 7.92 ±0.72      | 14.01 ±0.95 **  | 21.22 ±1.82 **   | 32.33 ±2.33 **  |
| 肺泡腔面密度 | 0.712 ±0.176    | 0.604 ±0.143 *  | 0.389 ±0.123 **  | 0.132 ±0.093 ** |
| 肺间质面密度 | 0.00204±0.00178 | 0.00296±0.00448 | 0.0107±0.0220 ** | 0.0243±0.047 ** |

注: \*  $P<0.05$ ; \*\*  $P<0.01$   
Note: \*  $P<0.05$  vs control, \*\*  $P<0.01$  vs control

3 讨论

放射性肺炎系由肺癌、食管癌、乳腺癌或胸部其他恶性肿瘤经放射治疗后,在放射野内的正常肺组织受到损伤而引起的炎症反应,该病的发生率为 5%~50%,严重肺炎发生率为 10%~20%,病死率高达 50%<sup>[5]</sup>。尽管近年来治疗手段不断进步,尤其是中医辨证治疗放射性肺炎具有较好的疗效<sup>[6]</sup>,但是该病的发生率仍高达 30%。放射性肺炎的发生发展对机制研究及防治措施的优化至关重要,综合遗传背景、研究费用及操作难易程度等因素,选择昆明种小鼠作为实验动物<sup>[7-8]</sup>。模拟临床放疗条件建立放射性肺炎模型,阐明放射性肺炎发生发展过程的病理变化。

参照周仟等、白蕴红等<sup>[9-10]</sup>方法,采用 6MV 的 X 线单次大剂量 20Gy 照射复制小鼠放射性肺损伤模型,分别于照射后第 7、14、28 天,观察小鼠一般体征,并进行病理 HE 染色观察。射线照射 3 d 后出现活动减少、精神萎靡、体质量减轻、胸背部脱毛等状况。此外,随着观察时间的延长,肺泡,肺间质均出现进行性病变,

通过实验发现,6MV 的 X 线 20Gy 辐照对肺部病变有明显影响。昆明小鼠辐照第 7 天后,肺间质增宽,炎细胞轻度浸润;辐照第 14 天后,肺泡塌陷,肺间质进一步增厚,炎细胞浸润明显,红细胞轻度渗出,表明肺部病变已初步出现;而辐照第 28 天后,肺泡萎缩实变,炎细胞大量浸润,毛细血管充血,气管支气管上皮杂乱、脱落,出现轻度纤维化改变,表明肺部病变已经非常明显。此外,通过统计学定量分析结果,显示辐照第 14、28 天后肺泡壁厚度、肺泡腔面积、肺间质面积变化极显著 ( $P<0.01$ )。本次实验主要偏向于从宏观、表观方向选择表征放射性肺炎

病变的关键指标,如肺泡壁厚度、肺泡腔面积、肺间质面积等进行观察描述,下一步应从分子生物学角度对放射性肺炎的病理机理予以进一步观察和验证。综上所述,病理学研究结果符合放射性肺炎的病变规律<sup>[8]</sup>,可用于进一步药理研究。

参 考 文 献

[ 1 ] 刘泰福. 现代放射肿瘤学[M]. 上海:上海医科大学出版社, 2001.

[ 2 ] 杜雪梅, 柳晓兰, 崔玉芳, 等. 放射性肺损伤小鼠动物模型的建立及其病变规律[J]. 中国体视学与图像分析, 2003, 8 (4): 203-206.

[ 3 ] 杨东, 仇玮祎, 张畅, 等. 地塞米松治疗 LPS 诱导急性肺炎模型小鼠病理学评价方法的建立[J]. 实验动物科学, 2013, 30 (4): 9-12, 65.

[ 4 ] 白蕴红, 王德文, 张震声, 等. 大鼠放射性肺纤维化病理过程的形态计量学研究[J]. 中国体视学与图像分析, 1997, 2 (3): 147-150.

[ 5 ] 戴芳芳, 崔勇, 李冠龙, 等. 放射性肺炎的发病机制及中西医结合治疗进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2018, 27 (6): 678-681.

[ 6 ] 时美伶, 燕晓茹, 徐筱青, 等. 放射性肺炎的中医研究进展[J]. 吉林中医药, 2018, 38 (12): 1476-1479.

[ 7 ] Tucker S L, Liao Z X, Travis E L. Estimation of the spatial distribution, of target cells for radiation pneumonitis in mouse lung[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1997, 38 (5): 1055-1066.

[ 8 ] Travis E L, Liao Z X, Tucker S L. Spatial heterogeneity of the volume effect for radiation pneumonitis in mouse lung[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1997, 38 (5): 1045-1054.

[ 9 ] 周芊, 王东, 李梦侠, 等. 小鼠放射性肺损伤动物模型的建立与鉴定[J]. 重庆医学, 2010, 39 (19): 2553-2554, 2557.

[ 10 ] 白蕴红, 王德文, 徐在海, 等. 放射性间质性肺炎病变规律及其机理研究[J]. 解放军医学杂志, 1993, 18 (1): 14-16.

1959 年 Kilham 和 Olivier<sup>[5]</sup>发现在大鼠肿瘤细胞系中存在一种污染性物质,经分离发现该污染物为病毒,并称为 Kilham rat virus (KRV) 或 Rat Virus (RV)。1960 年 Toolan 等<sup>[6]</sup>总结前人研究,通过移植人类肿瘤的无细胞 (Cell-free) 游离成份,会导致仓鼠出现病变,认为这种可滤过性因子是病毒引起的,并从大鼠中分离该因子,移植到人肝癌细胞 1 (HEp-1) 中,最终鉴定为病毒,这种病毒称之为 Toolan 病毒,通常称之为 H-1 病毒。

1998 年 Ball-Goodrich 等<sup>[7]</sup>发现了一种新的大鼠细小病毒 PRV-1,通过克隆、DNA 序列分析来与其他细小病毒进行比对发现,PRV-1 的编码衣壳蛋白的 VP1 序列和其他细小病毒的 VP1 序列相似度不超过 69%,这就解释了 PRV-1 的抗原差异性。同时,Ball-Goodrich 进行抗体检测分析发现,其有别于 KRV 和 H-1 不同的血清型,是第三种血清型。2002 年 Wan 等<sup>[8]</sup>发现了之前三种大鼠细小病毒不同的 RMV 毒株,分别是 RMV-1a,RMV-1b,RMV-1c,通过基因组核苷酸序列分析和蛋白质氨基酸序列预测的方法,发现三种 RMV 毒株它们有着共同的启动子和剪切区域,转录起始密码子和终止密码子,它们基因序列的同源性约 97%,氨基酸序列的相似性约 95%,RMV 与 KRV 和 H-1 的基因序列差异性小,但是与 PRV-1 存在较大差异。通过 HAI 试验发现,RMV 有着与 KRV、H-1 和 RPV-1 不同的血清型。

## 2 大鼠细小病毒检测方法

### 2.1 毒株分离与鉴定

对疑似感染细小病毒的大鼠进行组织取材,取材部位根据可能感染毒株的不同而不同。将取材的组织进行培养,获取上清液,用滤膜过滤,滤过液接种特定细胞进行培养,然后进行病毒检测,如动物回归实验、分子生物学鉴定、血清学鉴定等。

国外一般采用 NB-324 K 细胞对 H-1 毒株进行分离培养<sup>[9-11]</sup>,如 Leuchs 等在研究如何高质量大规模纯化生产 H-1 毒株时,采用由 SV40 转化的新生儿肾细胞 NB-324 K,来提高 H-1 作为 DNA 病毒的复制扩增能力。对 KRV 株一般采用 DMEM 培养基培养大鼠肾细胞 (NRK 细胞)<sup>[12-13]</sup>,KRV 病毒在 NRK 细胞上会形成吞噬斑,所以可以通过病毒空斑实验检测 KRV 毒株。

刘先菊等<sup>[14-15]</sup>分别建立了大鼠细小病毒 KRV

株和 H-1 株的细胞培养方法。采用大鼠胶质瘤细胞系 (Rat glial cell line C6) 培养大鼠细小病毒 KRV 和 H-1,待细胞病变达到测定标准后,进行 FITC 鉴定所培养病毒的抗原,用 HA 测定培养物上清效价,用 DNA 测序鉴定所培养病毒,结果发现采用 C6 细胞系可以大量培养 KRV 和 H-1。

### 2.2 血清学检测

血清学检测是诊断和鉴定病毒的重要方法之一。我国实验动物标准规定了四种方法用于大鼠细小病毒的检测<sup>[2]</sup>:血凝抑制试验 (HI)、免疫酶试验 (IEA)、免疫荧光试验 (IFA)、酶联免疫吸附试验 (ELISA)。

吴小闲等<sup>[16]</sup>采用 HI 方法检测大鼠细小病毒 RV 株 (也称 KRV) 和 H-1 株,均发现存在阳性感染的情况。贺争鸣等<sup>[17]</sup>采用 ELISA、IEA 和 HI 这三种方法进行比较,检测了大鼠细小病毒 RV 株,发现 ELISA 和 IEA 在重复性和抗体阳性检出率方面均优于 HI ( $P < 0.05$ )。王翠娥等<sup>[18]</sup>采用 ELISA 方法对 2012 年至 2013 年国内 36 家单位的大鼠和小鼠血清进行病毒抗体检测,检测出来的阳性样品再用免疫荧光试验 (IFA) 进行复检,大鼠细小病毒检测项目按照查尔斯河实验室的检测项目进行,发现大鼠细小病毒毒株 RPV、H-1、KRV、RMV 均呈阳性。李晓波等<sup>[19]</sup>报道,在 16 个实验动物质量检测实验室进行比对中,14 个实验室采用 ELISA,占 87.5%,3 个实验室采用 IFA 方法,另有 1 个实验室同时采用 IFA 和 ELISA 方法。目前,对大鼠细小病毒进行检测的进口 ELISA 试剂盒一般采用 Charles River、Biotech Trading Partners、XpressBio Life Science 等公司产品。国产 ELISA 大鼠细小病毒检测试剂盒主要采用中国食品药品检定研究院产品。付瑞等<sup>[20]</sup>建立了 H-1 细小病毒抗体 ELISA 检测方法,经试验发现与大鼠 KRV 病毒有交叉反应。

不同国家或地区检测大鼠细小病毒毒株类型不同,初检和复检的方法也有所差异。如美国查尔斯河实验室的动物诊断研究服务部<sup>[21]</sup>对近五年北美地区和西欧 (主要是法国) 的大鼠和小鼠流行病学情况进行研究。共收集了 50 万份小鼠样品和 8 万份大鼠样品。采用血清学方法检测大鼠细小病毒 (病毒毒株为 KRV、RMV、H-1 和 RPV)。初步检测采用多重免疫荧光方法 (Multiplexed Fluorometric Immunoenzyme Assay, MFIA) 或 ELISA,对于检测出的阳性样品复检采用 IFA 或 HAI,具体见表 2。