

博来霉素和内毒素诱导两种品系小鼠 肺纤维化模型的比较研究*

何文涓 吴小瑜 袁志坚 黄 寅

(无锡卫生高等职业技术学校, 无锡 214028)

摘要:目的 通过比较博来霉素和内毒素诱导 ICR、C57BL/6 两个品系小鼠的肺纤维化程度,从而建立合适的小鼠肺纤维化模型。方法 分别将 ICR、C57BL/6 两个品系小鼠随机分为对照组、博来霉素组、内毒素组。博来霉素组向气管注射博来霉素(5 mg/kg 体质量),内毒素组尾静脉注射内毒素(40 EU/kg 体质量),对照组气管注射等量生理盐水。两个品系的对照组、博来霉素组、内毒素组分别于造模后第 7、14、28 天各处死 8 只,观察小鼠一般情况,测量小鼠肺系数;采用 HE 染色观察肺组织病理学变化;ELISA 法检测肺组织中羟脯氨酸的含量。结果 与对照组相比,两个品系的博来霉素组和内毒素组的肺系数、肺组织羟脯氨酸含量均不同程度增加,有显著性差异($P < 0.05$)。其中对于同一种肺纤维化诱导剂,C57BL/6 品系小鼠的肺系数、肺组织羟脯氨酸含量与 ICR 品系小鼠相比,有显著性差异($P < 0.05$)。对于同一品系小鼠,博来霉素组在不同时间点的肺系数、肺组织羟脯氨酸含量和内毒素组相比,无显著性差异($P > 0.05$)。结论 C57BL/6 小鼠对博来霉素和内毒素更敏感。博来霉素、内毒素均能够制备小鼠急性肺损伤肺纤维化模型。

关键词:博来霉素;内毒素;ICR;C57BL/6;小鼠

中图分类号: R-33 文献标识码: A 文章编号: 1006-6179(2019)06-0039-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.06.008

特发性肺纤维化(Idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是一种原因不明的慢性间质性肺疾病^[1-2]。其病理特征主要为弥漫性肺泡炎、成纤维细胞病理性增长和细胞外基质在肺间质及肺泡腔沉积等,造成肺组织结构的破坏,最终导致慢性呼吸衰竭。肺纤维化是肺受损后的一种并发症,其预后极差,5 年生存率不到 50%,目前对于肺部纤维化类疾病的治疗手段有限,建立稳定而可靠的肺间质纤维化模型是探索其发病机制和开发有效治疗药物的重要保障^[3-5]。

目前肺纤维化动物模型采用的主要是啮齿类动物,如小鼠、大鼠、仓鼠等,小鼠具有繁殖快、饲养管理费用低等特点,是科研工作者最常选用的动物^[6]。肺纤维化诱导剂主要包括博来霉素(Bleomycin, BLM)、内毒素、胺碘酮、百草枯、石棉、二氧化硅、放射线、高浓度氧、野百合碱、呼吸

道肠道病毒等,其中以博来霉素和内毒素最为常用^[7-9]。本研究以 ICR、C57BL/6 两个品系小鼠为研究对象,以博来霉素和内毒素为肺纤维化诱导剂,寻找最适合复制肺纤维化模型的小鼠及诱导剂。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级 ICR 小鼠 90 只、清洁级 C57BL/6 小鼠 90 只,雄性,6~8 周龄,体质量 18~22 g,浙江省实验动物中心提供,合格证号:SCXK(浙)2017-0001。

1.2 试剂与仪器

博来霉素:海正辉瑞制药有限公司;内毒素:湛江安度斯生物有限公司;羟脯氨酸试剂盒:南京建成生物研究所。

收稿日期:2019-05-30

* 基金项目:江苏省无锡市卫生健康委员会医学科研项目(No.MS201658)

作者简介:何文涓(1962—),女,教授,研究方向:药理学.E-mail:hewenjuan301@163.com

通信作者:吴小瑜(1982—),女,讲师,研究方向:生物制药.E-mail:615685049@qq.com

1.3 方法

1.3.1 分组:将 ICR 小鼠随机分为对照组、博来霉素组、内毒素组,每组 30 只;将 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、博来霉素组、内毒素组,每组 30 只。

1.3.2 小鼠肺纤维化模型建立

博来霉素组:腹腔注射 2%戊巴比妥钠(50 mg/kg 体质量),小鼠麻醉后将其固定在 30° 倾角的鼠板上,在颈部开一个小口暴露气管,用微量进样器插入气管注博来霉素(5 mg/kg),注射完毕后小鼠直立左右轻微摇晃 10 min,使药液均匀分布于双肺,完毕后缝合皮肤,在伤口处擦碘酒消毒。

内毒素组:内毒素以生理盐水溶解,按 40 EU/kg 剂量一次性尾静脉注射。

对照组:用与博来霉素同体积的生理盐水气管灌注。

分别于造模后第 7、14、28 天每组随机处死 8 只小鼠进行后续试验。

1.4 肺系数测定

将各组小鼠沿腹部剪开,完整分离肺组织,用生理盐水冲洗肺组织 3 遍,用滤纸吸干后称得肺湿重,计算肺系数,肺系数=肺湿重(g)/体质量(kg)。右肺置于 4% 甲醛溶液中固定,其余肺组织放于冻存管中,先浸没于液氮 1 h,后转移至 -80 °C 冰箱中保存。

1.5 小鼠肺组织病理学检查

取右肺组织,用 4% 甲醛浸泡过夜固定,制备石蜡切片,做 HE 染色。在光学显微镜下观察肺组织病理学改变。

1.6 ELISA 检查肺组织羟脯氨酸

取部分肺组织,称重剪碎后与对应体积的 PBS (质量体积比 1 g:9mL) 加入玻璃匀浆器中,在冰上

充分研磨 2 min,5 000×g 离心 10 min,取上清,用 BCA 法将不同组上清溶液调至相同蛋白浓度。采用 ELISA 法检测各组小鼠肺组织中羟脯氨酸(HYP)含量。

1.7 统计方法

统计学分析软件采用 spss19.0 进行分析,数据均采用($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差分析及独立样本 *t* 检验进行分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两个品系小鼠一般情况

ICR 和 C57BL/6 小鼠中的对照组均状态良好,饮食饮水正常,体质量不同程度增加。相比于对照组,两个品系的博来霉素和内毒素组小鼠在造模后均出现不同程度的体质量减轻,活跃度减少等情况。其中 C57BL/6 的博来霉素组和内毒素组小鼠体质量下降最显著。ICR 博来霉素组小鼠在第 7 天开始出现死亡,直至第 28 天共 3 例死亡;C57BL/6 博来霉素组小鼠在第 4 天开始出现死亡,直至第 28 天共 5 例死亡。ICR 的内毒素组和 C57BL/6 的内毒素组小鼠无死亡现象。

2.2 小鼠肺系数

肺系数可以反映单位质量下肺湿重的变化,是反映肺纤维化程度的一个重要指标。两个品系的博来霉素组和内毒素组小鼠的肺系数在第 7、14、28 天均高于对照组($P<0.05$)。其中对于同一种肺纤维化诱导剂,C57BL/6 品系的小鼠肺系数在第 14、28 天与 ICR 品系小鼠相比,肺系数升高($P<0.05$)。对于同一品系小鼠,博来霉素组肺系数与内毒素组相比,无显著性差异($P>0.05$)。结果见表 1。

表 1 两个品系小鼠肺系数的比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 1 Comparison of lung coefficient between two strains of mouse($\bar{x}\pm s, n=8$)

鼠品系	分组	肺系数/(g/kg)		
		第 7 天	第 14 天	第 28 天
ICR	对照组	5.31±0.94	5.28±0.88	5.17±0.83
	博来霉素组	7.55±1.45*	7.75±1.73*	8.16±1.74*
	内毒素组	7.23±1.18*	7.63±1.52*	7.96±1.43*
C57BL/6	对照组	5.74±0.78	5.82±0.81	5.83±0.89
	博来霉素组	7.85±1.71*	10.64±2.54*#	12.74±3.16*#
	内毒素组	8.24±1.48*	11.24±2.79*#	11.56±2.10*#

注:两个品系分别与对应的对照组小鼠比较,* $P<0.05$;与另一品系对应的相同组别小鼠比较,# $P<0.05$

Note:The two strains were compared in the corresponding control mice,* $P<0.05$; compared with the same group of mice corresponding to another strain,# $P<0.05$

2.3 肺病理形态改变

ICR 和 C57BL/6 的对照组小鼠细支气管和肺泡结构完整,衬附正常纤毛柱状上皮及肺泡上皮,间质仅见少量炎性细胞浸润,毛细血管正常;两个品系的博来霉素组和内毒素组小鼠均出现不同程度的肺纤维化,肺组织支气管和肺泡结构紊乱,间质见较多

慢性炎细胞浸润,并可见纤维组织增生。相比于 ICR 博来霉素组和内毒素组的小鼠,C57BL/6 博来霉素组和内毒素组小鼠肺纤维化程度更高,肺组织内炎性细胞浸润、肺泡壁断裂及肺泡腔融合不同程度增加。结果见图 1。

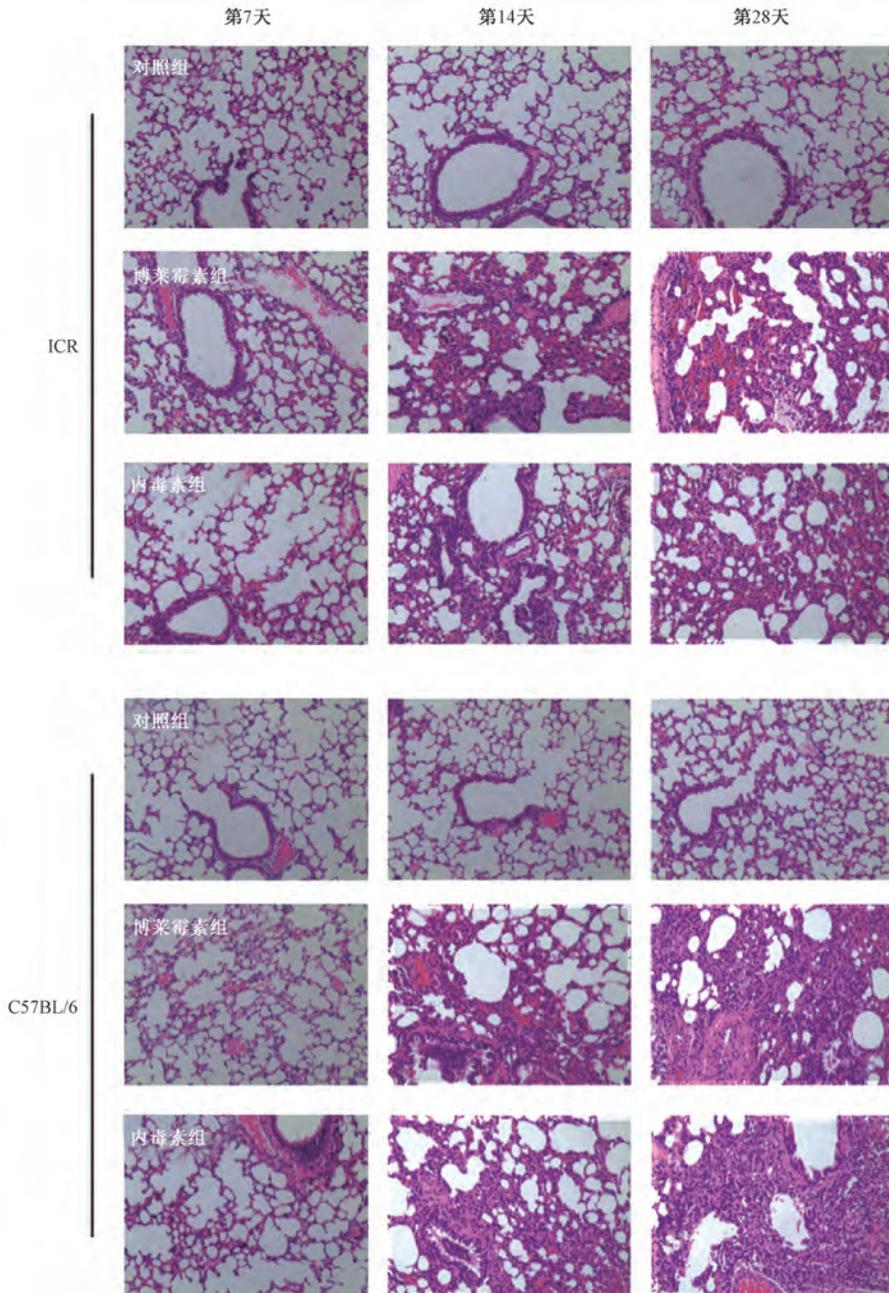


图 1 小鼠肺组织 HE 染色病理图片 (×200)

Fig.1 HE staining pathology picture of mouse lung tissue (×200)

2.4 小鼠肺组织中羟脯氨酸含量的比较

ICR 和 C57BL/6 的博来霉素组和内毒素组小鼠肺组织中羟脯氨酸含量在第 14、28 天均高于对照组 ($P < 0.05$)。其中对于同一种肺纤维化诱导剂, C57BL/6 品系的小鼠肺组织中羟脯氨酸含量在

第 7、14、28 天与 ICR 品系小鼠相比, 含量升高 ($P < 0.05$)。对于同一品系小鼠, 博来霉素组小鼠的肺组织中羟脯氨酸含量与内毒素组小鼠相比, 无显著性差异 ($P > 0.05$)。结果见图 2。

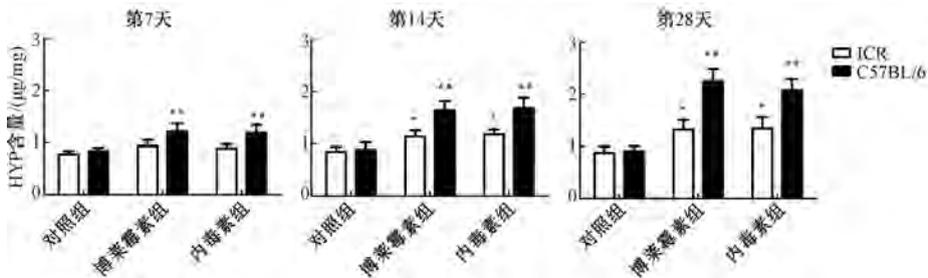


图 2 两个品系小鼠肺组织 HYP 含量 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

注: 两个品系分别于对应的对照组小鼠比较, * $P < 0.05$; 与另一品系对应的相同组别小鼠比较, # $P < 0.05$

Fig.2 HYP content in lung tissue of two strains of mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Note: The two strains were compared in the corresponding control mice, * $P < 0.05$; compared with the same group of mice corresponding to another strain, # $P < 0.05$

3 讨论

博来霉素是从轮状链霉菌 (*Streptomyces verticillatus*) 中分离出来的, 可有效对抗鳞状细胞癌和皮肤肿瘤, 然而其抗肿瘤作用具有引起肺纤维化的副作用^[10]。博来霉素诱导的动物肺纤维化模型与人类肺纤维化过程相似度较高, 是国内外常用的肺纤维化诱导剂, 常用的方法是通过气管给药^[11]。

内毒素是革兰阴性菌细胞壁成分, 其化学性质为脂多糖 (LPS), 耐热而稳定, 不易被破坏, 在动物体内可引起发热反应、白细胞反应甚至内毒素性休克, 是临床上引起急性肺损伤的重要因素^[12-13]。国内外已有一些学者采用内毒素制备急性肺损伤肺纤维化模型, 可通过气道、腹腔及静脉等多种途径给药^[8,14]。

C57BL/6 是一种常用的近交品系实验鼠, 群体反应性比较均一。C57BL/6 小鼠肺组织的组织学结构接近于人类, 其作为肺纤维化的模型能够模拟人的肺纤维化的发病机制和过程^[15-16]。ICR 小鼠是一类繁殖力、抗病力和适应力均很强的远交群小鼠, 被广泛应用于药理学、毒理学等多种领域的研究^[17]。

本研究显示在造模后的第 14、28 天, C57BL/6 的博来霉素组和内毒素组均出现不同程度的肺纤维化, 其中对于同一种肺纤维化诱导剂, C57BL/6 品

系小鼠的肺纤维化程度与 ICR 品系小鼠相比, 有显著差异。对于同一品系小鼠, 博来霉素组的肺纤维化程度与内毒素组相比, 无显著差异。实验结果表明, C57BL/6 小鼠较 ICR 小鼠更适合复制博来霉素和内毒素诱导的肺纤维化动物模型, 但这两种肺纤维化动物模型形成机制的差异性及适用条件需要进一步研究。

参考文献

- [1] 钟长军, 李琳, 李俊, 等. 氧化应激在特发性肺纤维化中的作用及其机制研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2012, **28** (2): 169-172.
- [2] 王恺京, 陆英, 赵倩, 等. 特发性肺纤维化的发病机制和临床治疗 [J]. 中国医药导报, 2015, **12** (12): 32-35+39.
- [3] Richeldi L, Collard H R, Jones M G. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Lancet (London, England). May 13 2017; **389** (10082): 1941-1952.
- [4] Martinez F J, Collard H R, Pardo A, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Nature reviews. Disease primers, 2017, **3**: 17074.
- [5] Raghu G, Richeldi L. Current approaches to the management of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Respiratory medicine, 2017, **129**: 24-30.
- [6] 宋桂芹, 徐志伟, 李泽, 等. 不同品系小鼠肺纤维化模型比较研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2017, **27** (4): 13-16.
- [7] 陈孟毅, 林帅, 杜朋, 等. 博来霉素气管多次给药诱导小鼠肺纤维化模型 [J]. 中国医药导报, 2017, **14** (2): 8-11+182.
- [8] 贾先红, 朱红梅, 吴瑕, 等. 内毒素腹腔注射法制备小鼠急

- 性肺损伤肺纤维化模型及中药干预研究 [J]. 中医临床研究, 2014, 6(30):139-141.
- [9] Suzuki T, Tada Y, Gladson S, *et al.* Vildagliptin ameliorates pulmonary fibrosis in lipopolysaccharide-induced lung injury by inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition [J]. *Respir Res*, 2017, 18(1):177.
- [10] 王燕, 王真, 何琪杨. 博来霉素族抗生素作用机制的研究进展 [J]. 国外医药(抗生素分册). 2009, 30(1):5-8+18.
- [11] 宋桂芹, 徐志伟, 王文栋, 等. 阻断白介素-17 对博来霉素诱导小鼠肺纤维化及肺组织 Bax/Bcl-2 表达的影响 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2018, 38(3):317-321.
- [12] Hu R, Xu H, Jiang H, *et al.* The role of TLR4 in the pathogenesis of indirect acute lung injury [J]. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 2013, 18:1244-1255.
- [13] 曹志敏, 唐明美, 文强, 等. 内毒素所致急性肺损伤动物模型的研究进展 [J]. *实验动物科学*, 2017, 34(1):62-65+70.
- [14] Li Y, Li H, Liu S, *et al.* Pirfenidone ameliorates lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation and fibrosis by blocking NLRP3 inflammasome activation [J]. *Molecular immunology*, 2018, 99:134-144.
- [15] 艾必燕, 陈俊颖, 邓玉江, 等. C57BL6 小鼠呼吸系统组织学特征研究 [J]. 局解手术学杂志, 2012, 21(02):117-119.
- [16] 练高建, 杨神书, 何理平, 等. C57BL/6 小鼠实验性变态反应性脑脊髓炎模型的建立 [J]. *实验动物科学*, 2018, 35(6):52-56.
- [17] 宋淑范, 张晓晔. 博来霉素诱导 G57BL/6 与 ICR 小鼠肺间质纤维化模型的比较 [J]. *中国实验动物学报*, 2010, 18(4):289-291+366.

Comparative Study on Pulmonary Fibrosis Model Induced by Bleomycin and Endotoxin in Two Strains of Mice

HE Wenjuan, WU Xiaoyu, YUAN Zhijian, HUANG Yin

(Wuxi Higher Health Vocational Technology School, Wuxi 214028, China)

Abstract: Objective A suitable mice pulmonary fibrosis model was established by comparing the degree of pulmonary fibrosis induced by bleomycin and endotoxin in two strains of ICR and C57BL/6 mice. **Method** Two strains of ICR and C57BL/6 mice were randomly divided into control group, bleomycin group and endotoxin group, respectively. The bleomycin group received a single intratracheal instillation of 5 mg/kg body weight of BLM to induce pulmonary fibrosis, the endotoxin group was Intravenously injected with endotoxin of 40 EU/kg, while normal control groups were administrated the same amount of normal saline. On the 7th, 14th and 28th day, 8 mice were respectively sacrificed in each model group. The general condition of the mice was observed, and the lung coefficient of the mice was measured. The pathological changes of the lung tissues were observed by HE staining. The content of hydroxyproline in the lung tissues was detected by ELISA. **Result** Compared to the control group, the lung coefficient and lung hydroxyproline content of each model group increased to different degrees ($P < 0.05$). The lung coefficient, lung hydroxyproline content of the bleomycin group and endotoxin group of C57BL/6 were significantly different from the bleomycin group and endotoxin group of ICR ($P < 0.05$). The lung coefficient, lung hydroxyproline content of the bleomycin group of C57BL/6 was no difference from the endotoxin group of C57BL/6 ($P > 0.05$). **Conclusion** C57BL/6 mice are more sensitive to bleomycin and endotoxin. Both bleomycin and endotoxin can prepare lung fibrosis models of acute lung injury in mice.

Key words: Bleomycin; Endotoxin; ICR; C57BL/6; mouse