

崔莉莉,梅晓峰,卢瑞龙,等.不同刺激因素诱导的慢性阻塞性肺疾病小鼠模型肺小血管重塑的比较研究[J].中国比较医学杂志,2022,32(12):24-31.

Cui LL, Mei XF, Lu RL, et al. Comparative study of pulmonary vascular remodeling in chronic obstructive pulmonary disease mouse models induced by different stimuli [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(12): 24-31.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.12.004

不同刺激因素诱导的慢性阻塞性肺疾病小鼠模型 肺小血管重塑的比较研究

崔莉莉¹,梅晓峰¹,卢瑞龙¹,徐可心¹,田燕歌^{1,2*}

(1.河南中医药大学呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心,河南省中医药防治呼吸病重点实验室,郑州 450046;
2.河南中医药大学中医药科学院,郑州 450046)

【摘要】 目的 比较香烟烟雾(cigarette smoke,CS)、肺炎克雷伯杆菌(*Klebsiella pneumoniae*,KP)和CS联合KP(CS+KP)三种方法建立的慢性阻塞性肺疾病(COPD)小鼠模型肺小血管重塑变化,为进一步研究提供依据。**方法** 将72只雄性小鼠随机分为正常组(Normal组)、细菌组(KP组)、香烟烟雾组(CS组)、香烟烟雾联合细菌组(CS+KP组),每组18只。CS组采用CS暴露(3000 ± 500 ppm),KP组采用KP稀释液(5×10^9 CFU/L,每7d一次)滴鼻,CS+KP组给予联合处理,Normal组给予生理盐水滴鼻,共8周。停止刺激后观察至第16周,分别于第4、8、16周结束后取材。检测肺功能呼气中期流速(50% expiratory flow,EF50)、潮气量(tidal volume,TV),观察肺组织病理及肺小血管结构,包括管壁厚度百分比(WT%)、管腔面积百分比(LA%)和管壁面积百分比(WA%)变化,免疫组化法检测肺组织血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)表达。**结果** 与Normal组比较,CS组TV第8~12周降低,EF50第8~16周降低($P<0.05$),WT%第8~16周升高,WA%及VEGF蛋白表达仅第8周升高、LA%仅第8周降低($P<0.05$);KP组肺功能无显著变化,WT%仅第8周升高,LA%第8周降低($P<0.05$);CS+KP组TV第4~12周降低,EF50第8~16周降低($P<0.05$),WT%、WA%、VEGF蛋白表达在第4~16周升高,LA%第4~16周降低($P<0.05$)。与CS组比较,CS+KP组WT%及VEGF蛋白表达第8~16周升高,WA%第16周升高,LA%第16周降低($P<0.05$)。与KP组比较,CS+KP组WT%、WA%及VEGF表达第8~16周升高,LA%第4~16周降低($P<0.05$);CS组WT%第8周升高、LA%第8周降低,VEGF蛋白表达第16周升高($P<0.05$)。**结论** CS、KP及其联合刺激8周小鼠均出现肺泡破裂、炎性细胞浸润、肺血管重塑等COPD病理特征,但各有特点:CS组第8周出现肺功能下降、肺泡结构断裂融合增厚,并在第16周仍存在,但肺血管重塑仅第8周明显;KP组肺功能下降不明显,肺组织炎症细胞浸润明显并持续存在,肺泡结构改变及肺血管重塑仅第8周存在;CS+KP组第4周即出现肺功能下降、肺泡结构的破坏及肺血管重塑,第16周仍持续存在。

【关键词】 慢性阻塞性肺疾病;肺血管重塑;香烟烟雾;肺炎克雷伯杆菌

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 12-0024-08

Comparative study of pulmonary vascular remodeling in chronic obstructive pulmonary disease mouse models induced by different stimuli

CUI Lili¹, MEI Xiaofeng¹, LU Ruilong¹, XU Kexin¹, TIAN Yange^{1,2*}

(1. Co-construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases by
Henan Education Ministry of P. R, Henan University of Chinese Medicine, Henan Key Laboratory of Chinese
Medicine for Respiratory Disease, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China.
2. Academy of Chinese Medicine Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

【基金项目】河南省自然科学基金项目(202300410262);国家自然科学基金项目(82074406)。

【作者简介】崔莉莉(1995—),女,硕士研究生,研究方向:中医药防治呼吸系统疾病。E-mail:cuilili022022@163.com

【通信作者】田燕歌(1984—),女,博士,副教授,研究方向:中医药防治呼吸疾病机制及配伍规律。E-mail:yange0910@126.com

【Abstract】 Objective To compare differences in pulmonary vascular remodeling among chronic obstructive pulmonary disease (COPD) mouse models established via different method, cigarette smoke (CS) exposure, *Klebsiella pneumoniae* (KP) infection, and CS combined with KP (CS+KP), at different time points and to provide the basis for further study. **Methods** A total of 72 male mice were randomly divided into normal, CS, KP and CS+KP groups, with 18 per group. Mice in the CS group were exposed to cigarette smoke (3000 ± 500 ppm) twice per day. KP was dripped into the nasal cavities of mice in the KP group (5×10^9 CFU/L, times/7 d). Mice in the CS+KP group were subjected to CS exposure and KP nasal administration. Stimulation was stopped at the end of week 8. The mice were observed until week 16 and sacrificed at the end of weeks 4, 8, and 16. Lung function, including 50% expiratory flow (EF50) and tidal volume (TV), was measured every 4 weeks. Pulmonary small-vessel structures, including wall thickness percentage (WT%), lumen area percentage (LA%), and wall area percentage (WA%), were assessed by lung histopathology. Vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in lung tissue were detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with the normal group, the CS group showed decreased TV from weeks 8 to 12, decreased EF50 from weeks 8 to 16, increased WT% from weeks 8 to 16, increased WA% and VEGF in week 8 only, and decreased LA% in week 8 only ($P < 0.05$). In the CS+KP group, TV decreased from weeks 4 to 12; EF50 decreased from weeks 8 to 16; WT%, WA%, and VEGF increased from weeks 4 to 12; and LA% decreased from weeks 4 to 16 ($P < 0.05$). In the KP group, lung function did not change significantly, WT% increased only in week 8, and LA% decreased only in week 8 ($P < 0.05$). Compared with the CS group, the CS+KP group showed increased WT% and VEGF from weeks 8 to 16, increased WA% in week 16, and decreased LA% in week 16 ($P < 0.05$). Compared with the KP group, the CS+KP group showed increased WT%, WA%, and VEGF from weeks 8 to 16 and decreased LA% from weeks 4 to 16 ($P < 0.05$). In the CS group, WT% increased in week 8, VEGF increased in week 16, while LA% decreased in week 8 ($P < 0.05$). **Conclusions** Mice in the CS, KP, and combination groups had significant pathological COPD characteristics, including alveolar destruction, inflammatory infiltration, and pulmonary vascular remodeling, but each had its own characteristics. In the CS group, lung function decreased, and alveolar structure showed destruction and thickening in week 8 and were still observed in week 16, while pulmonary vascular remodeling was only observed in week 8. In the KP group, lung function did not decrease significantly, inflammatory infiltration was evident and persistent in lung tissue, but alveolar structure destruction and pulmonary vascular remodeling were only observed in week 8. In the CS+KP group, lung function decreased and alveolar structure destruction and pulmonary vascular remodeling were observed in week 4 and were still observable in week 16.

【Keywords】 chronic obstructive pulmonary disease; pulmonary vascular remodeling; cigarette smoke; *Klebsiella pneumoniae*

肺血管结构和功能的改变是慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 的主要病理特征,可损害气体交换功能、引起肺动脉高压,影响患者预后^[1]。研究发现,在轻度 COPD 患者或肺气肿易感的吸烟人群中即出现肺小血管血流异常,且随疾病进展而恶化^[2]。香烟烟雾、细菌等有害物质进入机体,细小颗粒随气体交换进入肺小血管,促进炎症细胞的募集及血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的释放,引起内皮和血管平滑肌增殖,形成肺血管重塑,终致肺动脉高压、肺源性心脏病^[3-6]。通过 CT 观察发现,肺小血管的改变能反映患者肺气肿程度及是否存在肺动脉高压,且对于判断患者预后具有重要意义^[7]。可见,肺小血管改变发生较早,并与 COPD 疾病进展及预后关系密切。本研究在前期研究基础上^[8],比较了在香烟烟雾、细菌及其联合的刺激

因素下,不同时间点肺小血管重塑情况,以期为进一步研究 COPD 合并肺血管病变机制及相关治疗提供模型依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 BALB/c 小鼠 72 只,雄性,体重为 20~22 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK(京)2021-0006],并饲养于河南中医药大学实验动物实验中心 [SYXK(豫)2021-0015]。本实验均通过河南中医药大学实验动物福利伦理审查委员会审查 (DWLL202003210),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.1.2 细菌

肺炎克雷伯杆菌 (46114) 由中国生物制品检验

鉴定所提供,使用前将细菌浓度调整为 5×10^9 CFU/L。

1.2 主要试剂与仪器

红旗渠牌过滤嘴香烟,由河南中烟工业有限责任公司生产,焦油量 10 mg,烟气烟碱量 0.8 mg,烟气一氧化碳量 12 mg。

SABC 免疫组化试剂盒 (Boster, 批号: 16K13E28J0922); DAB 显色试剂盒 (Boster, 批号: 16K04A27); VEGF 抗体 (proteintech, 批号: 00062384)。动物肺功能检测系统 (FinePointe, 美国); Leica-DM6000B 光学显微镜及 LAS V4.7 照相系统 (Leica, 德国); Image-Pro Plus (IPP) 6.0 专业图像分析系统 (Cybernetics, 美国); CaseViewer (C. V) 2.4 切片浏览分析系统 (3D histech, 匈牙利)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及小鼠模型制备

72 只 SPF 级 BALB/c 雄性小鼠,适应性饲养 7 d 后,通过随机数字法分为 4 组:正常组 (Normal 组)、细菌组 (KP 组)、香烟烟雾组 (CS 组)、香烟烟雾联合细菌组 (CS+KP 组),每组 18 只。CS 暴露方法:使用烟熏系统装置进行烟雾暴露,使烟雾浓度达到 (3000 ± 500) ppm,每次 40 min,每天 2 次 (早晚各 1 次); KP 感染方法:每只小鼠鼻腔滴入 20 μ L KP 稀释液,每 7 d 一次。正常组给予过滤空气加生理盐水滴鼻,CS 组给予香烟烟雾暴露及生理盐水滴鼻, KP 组给予过滤空气和 KP 稀释液滴鼻,香烟烟雾联合细菌组,采用上述 CS 暴露和反复 KP 感染法联合处理。第 1~8 周造模,观察至第 16 周。分别于第 4、8、16 周结束后各组随机选取 6 只,进行分批取材。

1.3.2 肺功能测定

第 0、4、8、12、16 周末采用全身体积描记系统,检测小鼠肺功能,观察呼气中期流速 (50% expiratory flow, EF50) 和潮气量 (tidal volume, TV) 指标。

1.3.3 肺组织病理改变

左肺经 10% 中性甲醛固定,石蜡包埋切片并采用 HE 染色。光学显微镜下观察 $100 \mu\text{m} \leq \text{直径} \leq 300 \mu\text{m}$ 肺小动脉的形态变化,测量肺血管直径 (vessel diameter, VD)、管壁厚度 (wall thickens, WT),血管总面积 (total area, TA)、管壁面积 (wall area, WA=TA-LA)、管腔面积 (luminal area, LA),计算管壁厚度占血管直径百分比 ($\text{WT}\% = \text{WT}/\text{VD} \times$

100%)、管壁面积占血管总面积百分比 ($\text{WA}\% = \text{WA}/\text{TA} \times 100\%$) 及管腔面积占血管总面积百分比 ($\text{LA}\% = \text{LA}/\text{TA} \times 100\%$) 进行量化分析。

1.3.4 免疫组化检测血管 VEGF 的蛋白表达

肺组织石蜡包埋切片后,进行烤片、脱腊、抗原修复、血清封闭后,加 VEGF 一抗 (1:5000) 4℃ 过夜,次日滴加二抗、DAB 显色液、苏木素复染后,采用 Leica-DM6000B 光学显微镜及 LAS V4.7 照相系统进行观察 VEGF 血管阳性表达并拍照记录。Image-Pro-Plus6.0 软件计算光密度并量化比较。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计软件进行各组数据分析。数据处理结果以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示;不同组间采用单因素方差分析,符合正态分布且方差齐者采用 LSD 分析,方差不齐者采用 Dunnett's T_3 进行分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

实验观察期间,正常组小鼠毛色光亮、呼吸均匀、精神良好且食量正常,CS 组从第 8 周出现毛发微黄、精神不振且呼吸浅快, KP 组仅第 8 周出现精神不振、食量减少,CS+KP 组从第 4 周出现毛发干枯发黄、呼吸急促、精神萎靡且食量减少。各组观察至第 16 周,未出现动物死亡现象。

2.2 各组小鼠肺功能变化

第 0~16 周,各组小鼠肺功能 TV、EF50 随时间均有升高趋势,但正常组升高较为显著,其余组升高缓慢。与正常组比较,CS 组 TV 在第 8 周显著降低并持续到第 12 周,EF50 在第 8 周显著降低且持续到第 16 周 ($P < 0.05$); CS+KP 组 TV 在第 4 周显著降低并持续到第 16 周 ($P < 0.05$), EF50 在第 8 周显著降低且持续到第 16 周 ($P < 0.05$); KP 组无显著差异。见表 1、表 2。

2.3 各组小鼠肺组织病理变化

正常组各时期镜下观察肺泡结构完整、间隔均匀,无炎性细胞浸润。CS 组第 8 周肺泡间隔破裂明显且有炎性细胞浸润持续到第 16 周; KP 组第 8 周肺泡出现部分破裂融合且有少量炎性细胞浸润,炎症浸润第 16 周仍存在; CS+KP 组第 4 周肺泡腔已出现不规则扩张融合、炎性细胞浸润并持续到第 16 周。见图 1。

表 1 各组小鼠不同时间点 TV 的比较($\bar{x}\pm s$, mL/s, $n=6$)
Table 1 Comparison of TV in each group of mice at different time points

组别 Groups	第 0 周 0 week	第 4 周 4 weeks	第 8 周 8 weeks	第 12 周 12 weeks	第 16 周 16 weeks
正常组 Normal group	0.21±0.05	0.24±0.03	0.26±0.04	0.28±0.02	0.30±0.02
香烟烟雾组 CS group	0.20±0.03	0.22±0.03	0.23±0.02 [#]	0.24±0.03 [#]	0.27±0.02
细菌组 KP group	0.22±0.01	0.22±0.03	0.23±0.04	0.25±0.03	0.27±0.03
香烟烟雾联合细菌组 CS+KP group	0.21±0.02	0.19±0.02 [#]	0.21±0.01 [#]	0.24±0.04 [#]	0.26±0.05 [#]

注:与正常组比较, [#] $P<0.05$ 。
Note. Compared with normal group, [#] $P<0.05$.

表 2 各组小鼠不同时间点 EF50 的比较($\bar{x}\pm s$, mL/s, $n=6$)
Table 2 Comparison of EF50 in each group of mice at different time points

组别 Groups	第 0 周 0 week	第 4 周 4 weeks	第 8 周 8 weeks	第 12 周 12 weeks	第 16 周 16 weeks
正常组 Normal group	0.17±0.05	0.18±0.04	0.22±0.02	0.22±0.18	0.22±0.03
香烟烟雾组 CS group	0.17±0.03	0.16±0.02	0.18±0.03 [#]	0.18±0.03 [#]	0.19±0.04 [#]
细菌组 KP group	0.17±0.05	0.17±0.02	0.19±0.02	0.19±0.03	0.20±0.02
香烟烟雾联合细菌组 CS+KP group	0.17±0.04	0.16±0.03	0.16±0.03 [#]	0.18±0.02 [#]	0.18±0.03 [#]

注:与正常组比较, [#] $P<0.05$ 。
Note. Compared with normal group, [#] $P<0.05$.

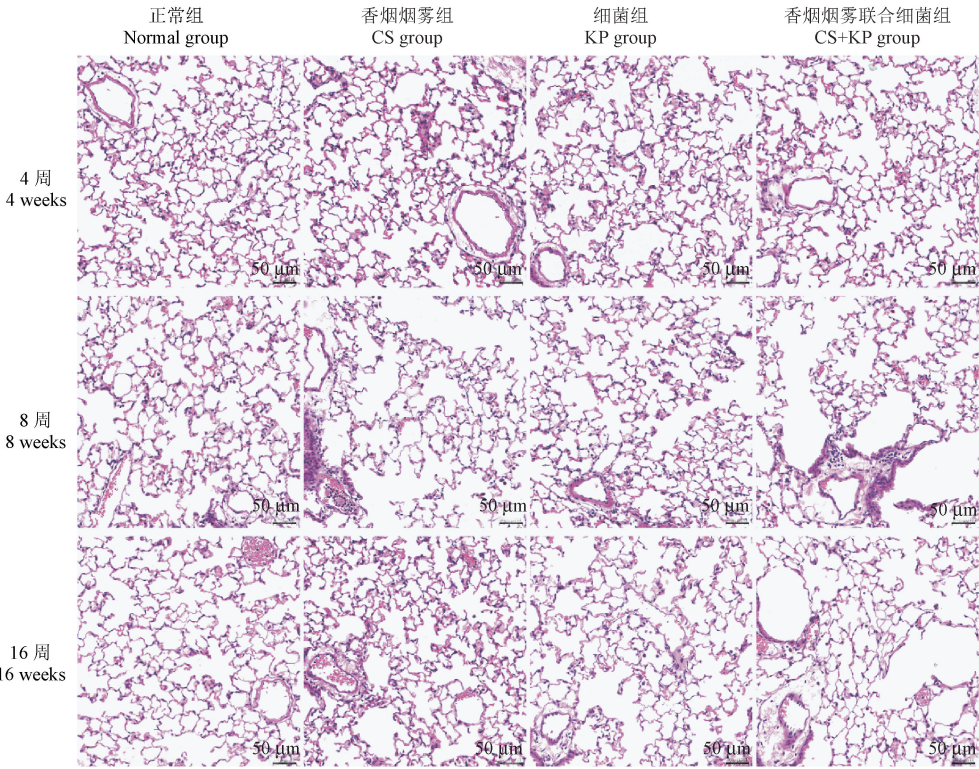


图 1 不同时期各组小鼠肺组织病理变化(HE 染色)

Figure 1 Histopathological changes of lung in each group of mice in different periods(HE staining)

2.4 各组小鼠肺组织血管结构变化

正常组各时期镜下观察小鼠肺血管未见明显的病理改变,血管管腔形态及管壁厚度正常,未见

明显的炎性浸润;CS 组在第 8 周,肺小动脉可见中膜增厚、管腔狭窄、周围炎性浸润明显并持续到第 16 周;KP 组仅第 8 周,肺小动脉出现管壁增厚、管

腔狭窄等病理变化;CS+KP 组在第 4 周,肺小动脉就已出现中膜增厚且呈肌化、管腔狭窄及大量炎性细胞浸润并持续到第 16 周。

与正常组比较,CS 组 WT% 在第 8 周显著升高并持续到第 16 周,WA% 仅第 8 周显著升高、LA% 仅第 8 周显著降低 ($P<0.05$);CS+KP 组 WT%、WA% 自第 4 周显著升高且并持续到第 16 周,LA% 自第 4 周显著降低且持续到第 16 周 ($P<0.05$);KP 组 WT% 仅第 8 周显著升高,LA% 仅在第 8 周显著降低 ($P<0.05$);CS+KP 组较 CS 组,WT% 在第 8 周持续显著升高并持续到第 16 周,WA% 第 16 周显著升

高,LA% 第 16 周显著降低 ($P<0.05$);CS+KP 组较 KP 组,WT%、WA% 在第 8 周持续显著升高且持续到第 16 周,LA% 在第 4 周持续显著降低且持续到第 16 周 ($P<0.05$),CS 组较 KP 组,WT% 仅第 8 周升高、LA% 仅第 8 周降低 ($P<0.05$)。见图 2、表 3、表 4、表 5。

2.5 各组小鼠肺组织 VEGF 蛋白表达变化

与正常组比较,CS 组 VEGF 阳性表达仅第 8 周显著增加 ($P<0.05$);CS+KP 组 VEGF 阳性表达自第 4 周显著升高并持续到第 16 周 ($P<0.05$);KP 组 VEGF 阳性表达无显著趋势。见图 3、表 6。

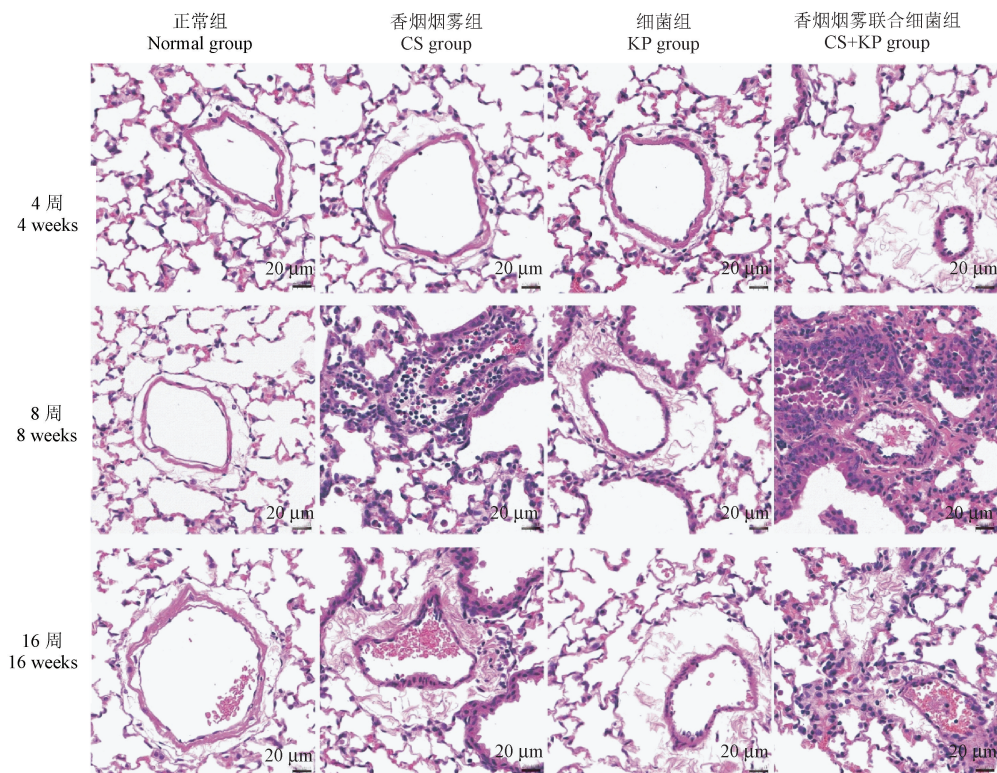


图 2 不同时期各组小鼠肺血管病理变化(HE 染色)

Figure 2 Changes in pulmonary vascular pathology in each group of mice at different periods(HE staining)

表 3 各组小鼠不同时间点 WT% 比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 3 Comparison of WT% in each group of mice at different time points

组别 Groups	第 4 周 4 weeks	第 8 周 8 weeks	第 16 周 16 weeks
正常组 Normal group	26.85±2.45	27.03±1.15	27.00±2.12
香烟烟雾组 CS group	28.97±2.41	30.72±0.47 ^{#Δ}	29.56±2.20 [#]
细菌组 KP group	28.88±2.32	29.13±1.11 [#]	28.26±2.55
香烟烟雾联合细菌组 CS+KP group	31.41±2.03 [#]	33.80±1.85 ^{#**Δ}	34.50±0.83 ^{#**Δ}

注:与正常组比较, [#] $P<0.05$;与香烟烟雾组比较, ^{*} $P<0.05$;与细菌组比较, ^Δ $P<0.05$ 。

Note. Compared with normal group, [#] $P<0.05$. Compared with CS group, ^{*} $P<0.05$. Compared with KP group, ^Δ $P<0.05$.

表 4 各组小鼠不同时间点 WA% 比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 4 Comparison of WA% in each group of mice at different time points

组别 Groups	第 4 周 4 weeks	第 8 周 8 weeks	第 16 周 16 weeks
正常组 Normal group	77.52±2.72	78.10±3.41	76.08±4.55
香烟烟雾组 CS group	80.58±3.23	83.91±2.31 [#]	78.04±3.76
细菌组 KP group	79.82±3.33	80.43±4.56	76.69±1.11
香烟烟雾联合细菌组 CS+KP group	84.55±3.08 [#]	87.72±3.62 ^{#Δ}	90.46±1.57 ^{#*Δ}

注:与正常组比较, [#] $P<0.05$;与香烟烟雾组比较, ^{*} $P<0.05$;与细菌组比较, ^Δ $P<0.05$ 。
Note. Compared with normal group, [#] $P<0.05$. Compared with CS group, ^{*} $P<0.05$. Compared with KP group, ^Δ $P<0.05$.

表 5 各组小鼠不同时间点 LA% 比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 5 Comparison of LA% in each group of mice at different time points

组别 Groups	第 4 周 4 weeks	第 8 周 8 weeks	第 16 周 16 weeks
正常组 Normal group	22.22±1.69	24.63±2.29	25.55±4.84
香烟烟雾组 CS group	19.42±2.93	14.16±1.48 ^{#Δ}	22.15±4.35
细菌组 KP group	19.70±3.47	19.68±3.31 [#]	23.13±2.47
香烟烟雾联合细菌组 CS+KP group	16.53±1.54 ^{#Δ}	12.73±2.48 ^{#Δ}	11.6±1.86 ^{#*Δ}

注:与正常组比较, [#] $P<0.05$;与香烟烟雾组比较, ^{*} $P<0.05$;与细菌组比较, ^Δ $P<0.05$ 。
Note. Compared with normal group, [#] $P<0.05$. Compared with CS group, ^{*} $P<0.05$. Compared with KP group, ^Δ $P<0.05$.

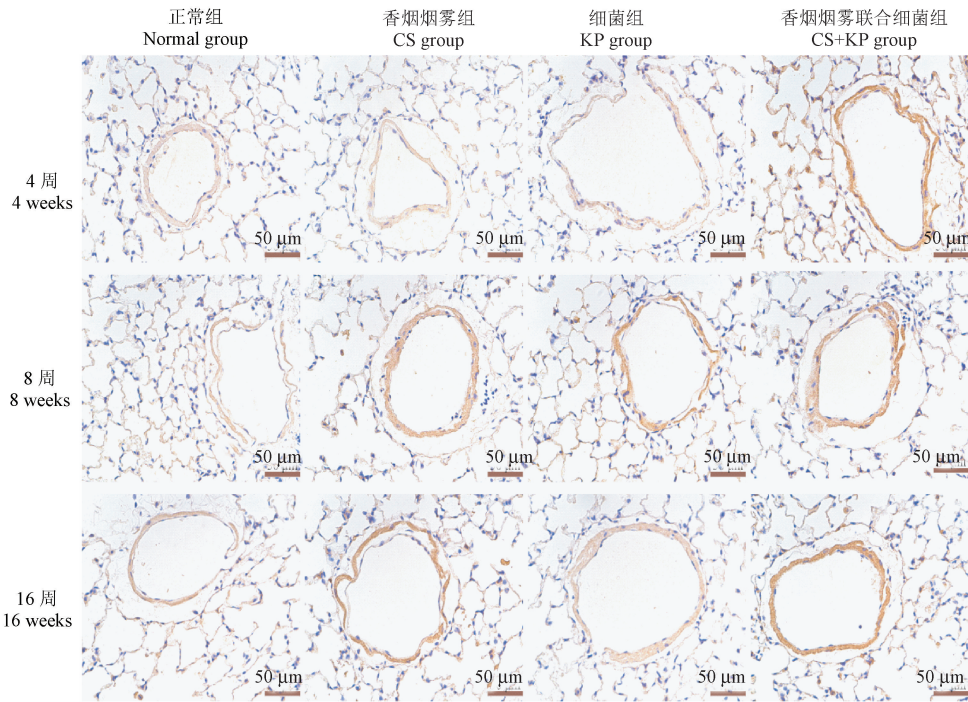


图 3 各组小鼠肺组织 VEGF 表达变化(IHC)
Figure 3 Changes in VEGF expression in lung tissues in each group of mice

表 6 各组小鼠不同时间点 VEGF 比较 ($\bar{x} \pm s, n=5 \sim 6$)
Table 6 Comparison of VEGF in each group of mice at different time points

组别 Groups	第 4 周 4 weeks	第 8 周 8 weeks	第 16 周 16 weeks
正常组 Normal group	2.98±0.24	3.88±0.46	3.34±0.89
香烟烟雾组 CS group	4.37±0.96	5.03±1.21 [#]	4.94±1.26 ^Δ
细菌组 KP group	4.35±0.94	4.93±1.00	3.37±0.42
香烟烟雾联合细菌组 CS+KP group	4.73±0.64 [#]	6.19±0.90 ^{#*Δ}	6.43±1.38 ^{#*Δ}

注:与正常组比较, [#] $P<0.05$;与香烟烟雾组比较, ^{*} $P<0.05$;与细菌组比较, ^Δ $P<0.05$ 。
Note. Compared with normal group, [#] $P<0.05$. Compared with CS group, ^{*} $P<0.05$. Compared with KP group, ^Δ $P<0.05$.

3 讨论

COPD 是一种以气流受限、慢性进行性气道炎症为特点的肺部疾病,肺血管病变在 COPD 患者中普遍存在^[2]。临床研究发现,约 30%~70% 的 COPD 患者存在显著肺血管病变,加重疾病恶化程度^[9]。此外,肺小动脉缺氧性收缩可促进血管内膜增厚、平滑肌增生,导致血管结构改变,最终形成肺动脉高压^[10]。香烟烟雾、环境污染等多种致病因素可引起肺小血管的改变^[11]。香烟烟草中含有大量有毒成分,长期香烟烟雾刺激引起气道平滑肌细胞增殖的同时,还可通过血小板衍生生长因子诱导肺小动脉平滑肌层的增厚、管腔变窄、增加右心室收缩压,从而引起肺血管重构,继发肺动脉高压^[12-13]。细菌感染也是 COPD 发生发展的重要致病因素,其中,肺炎克雷伯杆菌为常见的病原菌,可导致支气管炎、气道重塑及肺小动脉管壁增厚明显等病理特征,与患者进展和预后密切相关^[14-16]。目前,COPD 模型制备方法包括单一因素诱导的模型,例如 CS 暴露^[17]、细菌感染^[18]、病毒感染^[19],及复合因素诱导的模型,例如 CS 联合细菌^[15,20-21]或病毒感染^[8]、CS 联合脂多糖^[22]等。课题组前期比较了香烟、细菌、病毒及香烟联合细菌或病毒因素建立的 COPD 小鼠模型,发现均可引起肺功能下降、肺组织结构损伤^[8]。本研究在此基础上,选取 CS、KP 及其联合三种方法诱导 COPD 小鼠模型,以肺血管结构变化为主要指标,观察不同诱导因素下肺血管的动态变化,为深入探讨 COPD 血管病变机制、药物对肺血管的作用及远后效应评价、药物作用机制研究提供模型依据。

肺功能下降不仅反映气流受限程度,还与肺血管重构程度有关,当肺实质破坏和血管管壁发生异常改变时,损害了肺泡腔中气体交换功能,导致肺功能逐渐下降^[23-24]。EF50 作为衡量气道阻力指标,反映小鼠支气管阻塞程度,TV 反映肺通气功能^[25-26]。本研究发现,单独香烟烟雾暴露在第 8 周,TV 明显降低,小鼠出现呼吸浅快,在第 16 周仍存在;EF50 在第 8 周降低,出现明显气道阻塞并在第 16 周仍存在。单独细菌感染 EF50、TV 降低并不明显,提示小鼠无明显气道阻力,且呼吸无明显异常。香烟烟雾联合细菌感染在第 4 周,TV 明显降低,小鼠即出现呼吸浅快,在第 16 周持续存在;EF50 在第 8 周降低,出现明显气道阻力且在第 16

周仍持续存在。说明香烟烟雾或其联合细菌感染可明显降低小鼠肺通气功能,引起气道阻塞,且在去除刺激因素(比如戒烟)后难以逆转。

多种刺激因素导致的缺氧、慢性炎症,促进血管壁分泌 VEGF 等细胞因子,并通过肺血管平滑肌细胞表型转化,刺激血管病理性生成,破坏血管内皮屏障,从而出现管壁内膜增厚、管腔狭窄甚至闭塞等病理表现,最终导致肺血管结构重塑^[27-30]。本研究以管壁厚度、管壁面积、管腔面积为肺血管重塑指标,并选取直径小于 300 μm 的接近于肺小动脉范围的血管,通过测量分析发现,单独香烟烟雾暴露在第 8 周,出现肺小动脉管壁增厚、管腔狭窄,VEGF 表达明显增加,第 16 周管壁增厚仍存在,而管腔狭窄仅第 8 周存在;单独细菌感染仅第 8 周出现管壁增厚、管腔狭窄的病理变化;香烟烟雾联合细菌感染 4 周即出现肺小动脉管壁增厚、管腔狭窄及 VEGF 表达明显现象,并在第 16 周仍存在。说明香烟烟雾、细菌及其联合均可引起肺小动脉重塑,但复合因素诱导的模型肺小动脉重塑发生较早,持续时间较长。

综上,香烟烟雾、肺炎克雷伯杆菌及其联合刺激 8 周均能诱导小鼠出现肺泡破裂、炎性细胞浸润、肺血管重塑等 COPD 病理特征,但各有特点:单独香烟刺激 8 周出现肺功能下降、肺泡结构断裂融合,并在第 16 周仍存在,但肺血管重塑仅第 8 周明显;单独细菌感染肺功能下降不明显,肺组织炎症细胞浸润明显并持续存在,肺泡结构改变及肺血管重塑仅第 8 周存在;香烟烟雾联合细菌感染复合刺激 4 周即出现肺功能下降、肺泡结构的破坏及肺血管重塑,第 16 周仍持续存在。因此,对于 COPD 合并肺血管病理机制及药物作用机制的研究可选用单独香烟暴露或者香烟烟雾联合细菌感染模型,对于药物作用特点、远后效应评价的研究选用香烟烟雾联合细菌感染复合模型较为妥当。

参考文献:

- [1] Westergren-Thorsson G, Bagher M, Andersson-Sjöland A, et al. VEGF synthesis is induced by prostacyclin and TGF- β in distal lung fibroblasts from COPD patients and control subjects: Implications for pulmonary vascular remodelling [J]. *Respirology*, 2018, 23(1): 68-75.
- [2] Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease [EB/OL]. [2021-11-15]. [http://www. goldcopd](http://www.goldcopd).

- [3] Shi J, Yang Y, Cheng A, et al. Metabolism of vascular smooth muscle cells in vascular diseases [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2020, 319(3): H613-H631.
- [4] Jolly AJ, Lu S, Strand KA, et al. Heterogeneous subpopulations of adventitial progenitor cells regulate vascular homeostasis and pathological vascular remodeling [J]. Cardiovasc Res, 2022, 118(6): 1452-1465.
- [5] Hassoun PM. Pulmonary arterial hypertension [J]. N Engl J Med, 2021, 385(25): 2361-2376.
- [6] You L, Niu H, Huang K, et al. Clinical features and outcomes of acute exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease patients with pulmonary heart disease; a multicenter observational study [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2021, 16: 2901-2910.
- [7] Ma J, Yu N, Shen C, et al. A three-dimensional approach for identifying small pulmonary vessels in smokers [J]. J Xray Sci Technol, 2017, 25(3): 391-402.
- [8] 梅晓峰, 赵鹏, 卢瑞龙, 等. 慢性阻塞性肺疾病小鼠模型制备方法的比较研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2022, 38(1): 178-185.
- [9] Rahaghi FN, Wells JM, Come CE, et al. Arterial and venous pulmonary vascular morphology and their relationship to findings in cardiac magnetic resonance imaging in smokers [J]. Comput Assist Tomogr, 2016, 40(6): 948-952.
- [10] Sakao S, Voelkel NF, Tatsumi K. The vascular bed in COPD: pulmonary hypertension and pulmonary vascular alterations [J]. Eur Respir Rev, 2014, 23(133): 350-355.
- [11] Sapey E, Bafadhel M, Bolton CE, et al. Building toolkits for COPD exacerbations: lessons from the past and present [J]. Thorax, 2019, 74(9): 898-905.
- [12] Sun X, Feng X, Zheng D, et al. Ergosterol attenuates cigarette smoke extract-induced COPD by modulating inflammation, oxidative stress and apoptosis *in vitro* and *in vivo* [J]. Clin Sci, 2019, 133(13): 1523-1536.
- [13] Su Y, Han W, Kovacs-Kasa A, et al. HDAC6 activates ERK in airway and pulmonary vascular remodeling of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2021, 65(6): 603-614.
- [14] Riquelme SA, Ahn D, Prince A. *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* adaptation to innate immune clearance mechanisms in the lung [J]. J Innate Immun, 2018, 10(5-6): 442-454.
- [15] Li Y, Li SY, Li JS, et al. A rat model for stable chronic obstructive pulmonary disease induced by cigarette smoke inhalation and repetitive bacterial infection [J]. Biol Pharm Bull, 2012, 35(10): 1752-1760.
- [16] Fei ZY, Wang J, Liang J, et al. Analysis of bacterial spectrum, activin A, and CD64 in chronic obstructive pulmonary disease patients complicated with pulmonary infections [J]. World J Clin Cases, 2022, 10(8): 2382-2392.
- [17] Scholl A, Ndoja I, Jiang L. *Drosophila trachea* as a novel model of COPD [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(23): 12730.
- [18] Wen W, Wang AM, Liu DL, et al. Expression of connective tissue growth factor and bone morphogenetic protein-7 in *Pseudomonas aeruginosa*-induced chronic obstructive pulmonary disease in rats [J]. COPD, 2013, 10(6): 657-666.
- [19] Marsh EK, Prestwich EC, Williams L, et al. Pellino-1 regulates the responses of the airway to viral infection [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 10: 456.
- [20] Zhang LX, Tian YG, Zhao P, et al. Network pharmacology analysis uncovers the effect on apoptotic pathway by Bu-Fei formula for COPD treatment [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 289: 115022.
- [21] Zhang LX, Tian YG, Zhao P, et al. Electroacupuncture attenuates pulmonary vascular remodeling in a rat model of chronic obstructive pulmonary disease via the VEGF/PI3K/Akt pathway [J]. Acupunct Med, 2022, 40(4): 389-400.
- [22] 丁念, 郑承红. 慢性阻塞性肺疾病合并骨质疏松大鼠模型建立与评价 [J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(7): 1470-1473.
- [23] Harkness LM, Kanabar V, Sharma HS, et al. Pulmonary vascular changes in asthma and COPD [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2014, 29(2): 144-155.
- [24] 李树民, 张敏, 王朋, 等. 小鼠无创性肺功能的测定及其意义 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(5): 548-553.
- [25] Glaab T, Braun A. Noninvasive measurement of pulmonary function in experimental mouse models of airway disease [J]. Lung, 2021, 199(3): 255-261.
- [26] Ramírez-Ramírez E, Torres-Ramírez A, Alquicira-Mireles J, et al. Characteristic plethysmographic findings in a guinea pig model of COPD [J]. Exp Lung Res, 2017, 43(2): 57-65.
- [27] Luo L, Liu Y, Chen D, et al. CD30 is highly expressed in chronic obstructive pulmonary disease and induces the pulmonary vascular remodeling [J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 3261436.
- [28] Morris HE, Neves KB, Montezano AC, et al. Notch3 signalling and vascular remodelling in pulmonary arterial hypertension [J]. Clin Sci (Lond), 2019, 133(24): 2481-2498.
- [29] Laddha AP, Kulkarni YA. VEGF and FGF-2: Promising targets for the treatment of respiratory disorders [J]. Respir Med, 2019, 156: 33-46.
- [30] de Mendonça L, Felix NS, Blanco NG, et al. Mesenchymal stromal cell therapy reduces lung inflammation and vascular remodeling and improves hemodynamics in experimental pulmonary arterial hypertension [J]. Stem Cell Res Ther, 2017, 8(1): 220.

[收稿日期] 2022-05-17