

燕苗苗,赵亚昆,王搏,等. 博来霉素诱导大鼠与小鼠肺纤维化模型的评价 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(2):179-186.
Yan MM, Zhao YK, Wang B, et al. Comparison and evaluation of different doses of bleomycin-induced pulmonary fibrosis models in mice and rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(2):179-186.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.02.005

博来霉素诱导大鼠与小鼠肺纤维化模型的评价

燕苗苗^{1,2},赵亚昆^{1,2},王搏^{1,2},邱志广^{1,2},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,郑州 450046;
2. 河南中医药大学河南省中医药防治呼吸病重点实验室,郑州 450046)

【摘要】 目的 采用一次性气管滴注不同剂量博来霉素诱导大、小鼠肺纤维化模型,明确其适宜造模剂量,并比较大、小鼠模型特征。**方法** 将 30 只 SD 大鼠随机分为空白组、博来霉素低剂量组(3 mg/kg, BL-L 组),博来霉素高剂量组(5 mg/kg, BL-H 组),每组各 10 只,30 只 C57BL/6J 小鼠分组同上。观察动物每日精神、饮食等一般情况及每周体重变化,通过非束缚小动物肺功能测量仪检测动物的潮气量(tidal volume, TV)、每分钟通气量(minute ventilation, MV)、50%潮气量呼气流量(50% tidal volume expiratory flow, EF50),采用 HE 和 Masson 染色法观察肺组织病理学改变,采用羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)含量检测试剂盒测定肺组织羟脯氨酸含量。**结果** ①存活率和体重 C57BL/6J 小鼠 BL-L 组和 BL-H 组存活率分别为 70%、80%,SD 大鼠分别为 70%、50%。第 7 天起,C57BL/6J 小鼠 BL-H 组体重显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),SD 大鼠 BL-L 组和 BL-H 组体重均显著下降($P < 0.01$)。②肺功能 与空白组比较,第 10 天,SD 大鼠两剂量组 TV 均降低($P < 0.01$),而 C57BL/6J 小鼠未见显著变化;第 21 天,SD 大鼠 BL-L 组肺功能 TV 和 MV 显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),BL-H 组 TV 显著下降($P < 0.01$),C57BL/6J 小鼠两剂量组 TV、MV 和 EF50 均显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。③肺病理和羟脯氨酸含量第 21 天,C57BL/6J 小鼠和 SD 大鼠 BL-L 组和 BL-H 组肺组织均出现炎性浸润和纤维条索,肺炎泡和纤维化程度评分均显著升高($P < 0.01$),肺组织中 HYP 水平均显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 博来霉素 3 mg/kg 与 5 mg/kg 均可诱导大、小鼠肺纤维化模型。综合存活率、肺功能、肺病理等各项指标,认为 C57BL/6J 小鼠的适宜造模剂量为 5 mg/kg,SD 大鼠的适宜造模剂量为 3 mg/kg。

【关键词】 肺纤维化;博来霉素;动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 02-0179-08

Comparison and evaluation of different doses of bleomycin-induced pulmonary fibrosis models in mice and rats

YAN Miaomiao^{1,2}, ZHAO Yakun^{1,2}, WANG Bo^{1,2}, QIU Zhiguang^{1,2}, 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, Zhengzhou 450046, China. 2. Henan Key Laboratory of Chinese Medicine for Respiratory Disease, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)
Corresponding author: TIAN Yange. E-mail: yange0910@126.com

【Abstract】 Objective To determine the appropriate dose of bleomycin to induce pulmonary fibrosis in rat and mice models via a single intratracheal instillation and to compare model characteristics. **Methods** Thirty SD rats were randomly divided into blank group, bleomycin low-dose group (3 mg/kg, BL-L group), bleomycin high-dose group (5 mg/kg, BL-H group), 10 in each group, and 30 C57BL/6J mice were grouped as above. The animals' general condition and body weight changes were observed. The tidal volume (TV), minute ventilation (MV), and 50% tidal

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81673942),河南省自然科学基金资助项目(202300410262)。
Funded by the National Natural Science Foundation of China(81673942), National Natural Science Foundation of Henan(202300410262).
[作者简介] 燕苗苗(1998—),女,在读硕士研究生,研究方向:中医药防治呼吸系统疾病。Email:YanMM12333@163.com
[通信作者] 田燕歌(1984—),女,博士,副教授,研究方向:中医药防治呼吸系统疾病。Email:yange0910@126.com

volume expiratory flow (EF50) of rats and mice were measured with an animal lung function instrument. HE and Masson's staining were used to observe histological changes to the lung tissues. Lung collagen content was measured with a hydroxyproline (HYP) kit. **Results** In the BL-L and BL-H groups, the survival rates of C57BL/6J mice were 70% and 80% and those of SD rats were 70% and 50%, respectively. From day 7, there was a significant decrease in the body weight of C57BL/6J mice in the BL-H group ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and SD rats in the BL-L and BL-H groups ($P < 0.01$). Compared with the blank group, TV was decreased in SD rats in both dose groups ($P < 0.01$) on day 10, but no significant change was observed in C57BL/6J mice. On day 21, lung function TV and MV were significantly decreased in the BL-L group rats ($P < 0.05$, $P < 0.01$); TV was significantly decreased in the BL-H group rats ($P < 0.01$); and TV, MV, and EF50 were significantly decreased in C57BL/6J mice in both dose groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In the lung tissues of C57BL/6J mice and SD rats in the BL-L and BL-H groups on day 21, inflammatory infiltration and fibrous cords appeared, alveolitis and fibrosis degree scores were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and HYP levels were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusions** Both 3 mg/kg and 5 mg/kg bleomycin induced pulmonary fibrosis models in rats and mice. Based on survival rate, lung function, lung pathology, and other indicators, the optimal dose for C57BL/6J mice was 5 mg/kg and that for SD rats was 3 mg/kg.

【Keywords】 pulmonary fibrosis; bleomycin; animal models

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

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是间质性肺病中最为常见的类型,患病率随年龄增长且预后不良,确诊后中位生存期不足 5 年^[1-2]。间质性肺病 (interstitial lung disease, ILD) 是以弥漫性肺实质、肺泡炎和间质纤维化为基本病理改变,以活动性呼吸困难、限制性通气障碍为临床表现的一类疾病^[3]。IPF 发病原因复杂,发病机制尚未明确,目前除肺移植外尚无有效的根治方式^[4]。因此,建立稳定可靠且易操作的模型对于深入探讨其发病机制、寻求有效的治疗药物具有重要意义。因 IPF 为 ILD 中原因不明的一类疾病,目前的研究多模拟其肺纤维化病理特征,博来霉素 (bleomycin, BLM) 诱导的模型更符合临床病理表现^[5]。然而,动物的种属、博来霉素的剂量差异导致诸多研究者无法成功模拟文献中报道的模型。例如,小鼠种属有 KM 小鼠、C57BL/6J 小鼠、BALB/C 小鼠等,BLM 常用剂量有 2.5 mg/kg^[6]、3 mg/kg^[7-8]、5 mg/kg^[9-10]等;大鼠种属有 Wistar 大鼠、SD 大鼠等,BLM 常用剂量有 3 mg/kg^[11-12]、3.5 U/kg^[13]、5 mg/kg^[14-15]等。不同动物用何剂量 BLM 建立肺纤维化模型、不同模型之间有何差异等未见报道。一次性气管滴注 BLM 为常用模型制备方法,给药 21 d 后可见肺组织出现明显纤维化^[16]。因此,本研究以常用的 C57BL/6J 小鼠和 SD 大鼠为研究对象,采用一次性气管内滴注 BLM 的方法,选取常用的两个剂量 (3 mg/kg 和 5 mg/kg),探索建立肺纤维化模型的博来霉素适宜剂量,比较不同种属动物模型之间的差异,为进一步研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

30 只 SPF 级 SD 雄性大鼠,6 ~ 8 周龄,体重 (200 ± 20) g; 30 只 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠,6 ~ 8 周龄,体重 (20 ± 2) g,购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司【SCXK (京) 2019-0010】。饲养环境:室内保持温度 25℃,湿度 50%,每日昼夜对半循环照明,动物自由摄食及饮用纯净水,饲养于河南中医药大学动物实验室【SYXK (豫) 2020-0004】。本研究通过河南中医药大学实验动物福利伦理审查委员会审查批准 (DWLL202203014)。

1.1.2 药物

硫酸博来霉素 (规格:每瓶 15 mg,批号:410730) 购自日本株式会社公司。

1.1.3 主要试剂与仪器

苏木素伊红 (HE) 染色试剂盒 (批号 20180603)、Masson 三色染色试剂盒 (批号 20180708)、羟脯氨酸 (hydroxyproline, HYP) 含量检测试剂盒 (批号:BC0255) 购自索来宝生物科技有限公司。非束缚小动物肺功能测量仪 (Buxco, USA); Leica-DM6000B 光学显微镜及 LAS V4.7 照相系统 (Leica, Germany); 低温高速离心机 (Eppendorf, Germany); Image-Pro Plus (IPP) 6.0 专业图像分析系统 (Media Cybernetics, USA); ELX800UV 型酶标仪 (Bio Tek, USA); Milli Q Synthesis 超纯水机 (Millipore, USA)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型建立

将大、小鼠按随机数表法分为空白组、博来霉素低剂量组 (BL-L 组) 和博来霉素高剂量组 (BL-H 组), 每组各 10 只。采用一次性气管内滴注博来霉素法^[17]建立肺纤维化模型。腹腔注射 1% 戊巴比妥钠麻醉大鼠 (50 mg/kg)、小鼠 (60 mg/kg), 在咽喉部冷光源照射下经声门裂进行气管插管, BL-L 组和 BL-H 组分别滴入 3 mg/kg 和 5 mg/kg 博来霉素, 空白组滴入生理盐水, 滴入后令大、小鼠悬垂并旋转, 使药物在肺内分布均匀。造模当日记为第 0 天, 正常饲养至第 21 天后取材。

1.2.2 体重增长率

体重增长率 (%) = (第 n 天体重 - 第 0 天体重) / 第 0 天体重

1.2.3 肺功能检测

分别于造模前、第 10 天、第 21 天采用小动物全身体积描记检测系统检测大、小鼠的潮气量 (tidal volume, TV)、每分钟通气量 (minute ventilation,

MV)、50% 潮气量呼气流量 (50% tidal volume expiratory flow, EF50) 等指标。

1.2.4 肺组织病理学观察

左肺置于 4% 的甲醛溶液中固定, 石蜡包埋切片后进行 HE 和 Masson 染色, 于显微镜下观察肺组织病理学变化。采用 Szapiel 等^[18]和 Ashcroft 等^[19]评分体系分别评价肺组织肺泡炎和纤维化严重程度 (表 1, 表 2)。

1.2.5 肺组织羟脯氨酸含量测定

取 20 mg 肺组织于 1.5 mL 离心管中并剪成糜状, 加入 200 μ L 提取液与肺组织混匀, 置于 98 $^{\circ}$ C 水浴锅中加热 5 h, 后续操作参照 HYP 含量检测试剂盒说明书进行检测。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 22.0 统计软件分析数据, 所有数据以平均值 $\pm$ 标准误差 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析方法, 方差齐者采用最小显著值法, 方差不齐者采用 Dunnett's T3 法, 显著性水准取 $\alpha=0.05$ 。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 Szapiel 评分系统
Table 1 Szapiel scoring system

级别 Level	肺泡炎 Alveolitis	计分 Score
无 None	无肺泡炎 No alveolar inflammation	0
轻度 Mild	单核细胞浸润使肺泡间隔增宽, 仅限于局部和近胸膜部, 面积小于全肺 20%, 肺泡结构正常 Monocyte infiltration widened the alveolar septa, which was limited to local and near pleura, and was 20% smaller than that of the whole lung, the alveolar structure was normal	1
中度 Moderate	受累面积占全肺 20%~50%, 近胸膜部较重 The affected area accounted for 20%~50% of the lung, and the area near the pleura was more severe	2
重度 Severe	肺泡炎面积 > 50%, 偶见肺泡腔内由单核细胞及出血造成的实变 Alveolitis area > 50%, with occasional consolidation caused by monocytes and hemorrhage in alveolar cavity	3

表 2 Ashcroft 评分系统
Table 2 Ashcroft scoring system

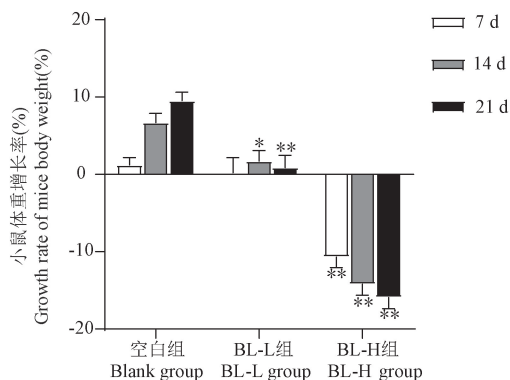
纤维化程度 Degree of fibrosis	组织病理学特征 Histopathological features
0	肺组织正常 Normal lung tissue
1,2	细支气管或肺泡壁轻度纤维化 Mild fibrosis of bronchioles or alveolar walls
3,4	细支气管或肺泡壁中度纤维化, 但无明显肺结构破坏 Moderate fibrosis of the bronchioles or alveolar walls, but no apparent destruction of lung structure
5,6	明显纤维化并伴有肺结构破坏, 形成纤维条带或纤维小结节 There is marked fibrosis with destruction of lung structure, forming fibrous bands or fibrous nodules
7	重度肺组织结构变形或出现大片纤维化区域; 蜂窝肺归于此类 Severe structural deformation of lung tissue or large areas of fibrosis. Honeycombs fall into this category
8	整个区域全部出现纤维化病灶 Fibrotic foci appear throughout the area

2 结果

2.1 一般情况

2.1.1 C57BL/6J 小鼠

空白组毛色光亮、精神状态良好、饮食饮水正常;BL-L 组毛色逐渐干枯、饮食饮水减少、精神倦怠、不喜动,第 6、7、8 天分别死亡 1 只;BL-H 组毛色逐渐干枯、不喜饮食、精神萎靡、形体消瘦、活动减少,第 6、9 天分别死亡 1 只。21 d 后 BL-L 组和 BL-H 组存活率分别为 70%、80%。空白组体重在 21 d 内逐渐增长,与空白组比较,BL-L 组体重第 7 天未见明显变化,第 14、21 天显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),而第 7、14、21 天,BL-H 组体重显著下降($P < 0.01$)(见图 1)。



注:与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。(下图/表同)

图 1 C57BL/6J 小鼠造模后 21 d 内体重增长率变化($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 7 \sim 10$)

Note. Compared with the blank group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures and tables)

Figure 1 Change of body weight growth rate of C57BL/6J mice within 21 days after modeling($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 7 \sim 10$)

2.1.2 SD 大鼠

空白组精神状态良好、毛色光泽、反应灵敏、饮食饮水正常(麻醉操作不当第 0 天死亡 2 只);BL-L 组毛色逐渐干枯、精神倦怠、反应迟钝、饮食饮水减少、形体消瘦,第 9、11、16 天各死亡 1 只;BL-H 组毛色干枯、精神萎靡、反应不灵敏、不喜饮食、形体消瘦,第 5、6、8 天各死亡 1 只,第 9 天死亡 2 只。21 d 后 BL-L 组和 BL-H 组存活率分别为 70%、50%。空白组在 21 d 内体重相对稳定,未见明显变化。与空白组比较,BL-L 组和 BL-H 组第 7、14、21 天体重均显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)(见图 2)。

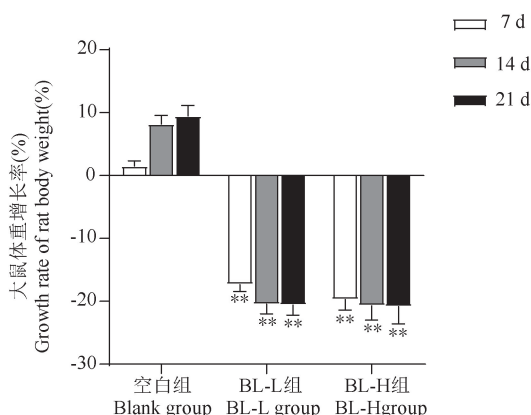


图 2 SD 大鼠造模后 21 d 内体重增长率变化($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 7 \sim 10$)

Figure 2 Change of body weight growth rate of SD rats within 21 days after modeling($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 7 \sim 10$)

2.2 肺功能

2.2.1 C57BL/6J 小鼠

空白组肺功能呈稳定升高趋势,BL-L 组和 BL-H 组肺功能有所升高,但升高缓慢。第 0 天,BL-L 组和 BL-H 组较空白组无明显差异;第 10 天,BL-L 组和 BL-H 组肺功能较空白组有所降低,但无统计差异;第 21 天,BL-L 组和 BL-H 组 TV、MV、EF50 较空白组均显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)(见表 3)。

2.2.2 SD 大鼠

空白组肺功能未见明显变化,BL-L 组和 BL-H 组肺功能呈下降趋势。第 0 天,BL-L 组和 BL-H 组较空白组无明显差异;第 10 天,BL-L 组和 BL-H 组 TV 较空白组显著降低($P < 0.01$);第 21 天,BL-L 组 TV、MV 较空白组显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),BL-H 组 TV 显著降低($P < 0.01$)(见表 4)。

2.3 羟脯氨酸含量

第 21 天取材后进行羟脯氨酸含量检测。与空白组比较,C57BL/6J 小鼠和 SD 大鼠 BL-L 组和 BL-H 组羟脯氨酸含量均显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。可见不同剂量博来霉素刺激后大小鼠羟脯氨酸含量均升高,且呈剂量依赖性(见图 3)。

2.4 肺组织病理学

2.4.1 C57BL/6J 小鼠

空白组肺组织结构完整,未见明显的炎性细胞及纤维化病灶;BL-L 组和 BL-H 组 HE 染色均可见肺组织结构破坏、肺泡壁明显增厚,全肺产生炎性浸润,Masson 染色均可见明显的蓝色染色的纤维条索及胶原沉积,BL-H 组较 BL-L 组纤维条索更密集,蓝色染色的胶原颜色更深,纤维化程度更严重(见

图 4A)。与空白组比较, BL-L 组和 BL-H 组肺泡炎及纤维化程度均显著升高($P < 0.01$) (见图 4B)。

2.4.2 SD 大鼠

空白组肺组织结构完整, 未见明显炎性细胞及纤维化病灶。BL-L 组和 BL-H 组均可见 HE 染色肺组织结构破坏、肺泡壁明显增厚、炎性浸润, Masson 染色均可见明显的蓝色染色的纤维条索形成及胶原沉积, 主要病变部位集中在器官周围, 向边缘扩散(图 5A)。与空白组比, BL-L 组和 BL-H 组肺泡炎及纤维化程度均显著升高($P < 0.01$) (图 5B)。

表 3 C57BL/6J 小鼠肺功能情况($\bar{x} \pm s\bar{x}, n = 7 \sim 10$)

Table 3 Pulmonary function of C57BL/6J mice($\bar{x} \pm s\bar{x}, n = 7 \sim 10$)

组别 Groups	时间 Time	TV (mL)	MV (mL)	EF50 (mL/s)
空白组 Blank group	造模前 Before building	0.28 ± 0.00	94.23 ± 1.51	0.23 ± 0.01
	第 10 天 Day 10	0.27 ± 0.01	121.39 ± 9.14	0.31 ± 0.03
	第 21 天 Day 21	0.45 ± 0.02	188.78 ± 11.78	0.54 ± 0.04
BL-L 组 BL-L group	造模前 Before building	0.27 ± 0.01	96.85 ± 1.82	0.23 ± 0.01
	第 10 天 Day 10	0.24 ± 0.02	93.39 ± 12.71	0.28 ± 0.04
	第 21 天 Day 21	0.35 ± 0.01 **	142.32 ± 4.01 **	0.43 ± 0.02 *
BL-H 组 BL-H group	造模前 Before building	0.30 ± 0.01	96.46 ± 1.86	0.23 ± 0.01
	第 10 天 Day 10	0.28 ± 0.02	103.09 ± 10.98	0.29 ± 0.01
	第 21 天 Day 21	0.28 ± 0.02 **	108.63 ± 10.00 **	0.33 ± 0.04 **

表 4 SD 大鼠肺功能情况($\bar{x} \pm s\bar{x}, n = 5 \sim 10$)

Table 4 Pulmonary function of SD rat($\bar{x} \pm s\bar{x}, n = 5 \sim 10$)

组别 Groups	时间 Time	TV (mL)	MV (mL)	EF50 (mL/s)
空白组 Blank group	造模前 Before building	1.91 ± 0.05	300.25 ± 16.63	0.98 ± 0.07
	第 10 天 Day 10	1.85 ± 0.10	299.31 ± 23.32	0.91 ± 0.13
	第 21 天 Day 21	1.71 ± 0.10	282.18 ± 34.55	0.88 ± 0.15
BL-L 组 BL-L group	造模前 Before building	1.95 ± 0.06	317.21 ± 11.56	1.02 ± 0.05
	第 10 天 Day 10	1.35 ± 0.09 **	249.31 ± 6.67	0.80 ± 0.02
	第 21 天 Day 21	1.08 ± 0.06 **	207.10 ± 9.24 *	0.65 ± 0.05
BL-H 组 BL-H group	造模前 Before building	1.95 ± 0.06	311.66 ± 18.56	1.07 ± 0.08
	第 10 天 Day 10	1.20 ± 0.06 **	275.58 ± 7.78	0.85 ± 0.05
	第 21 天 Day 21	0.92 ± 0.09 **	236.68 ± 12.98	0.62 ± 0.03

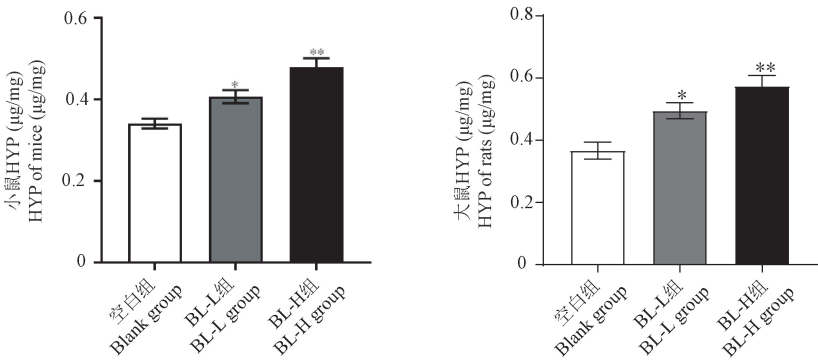


图 3 大、小鼠肺组织中羟脯氨酸水平($n = 5 \sim 6$)

Figure 3 Levels of hydroxyproline in lung tissue of rats and mice($n = 5 \sim 6$)

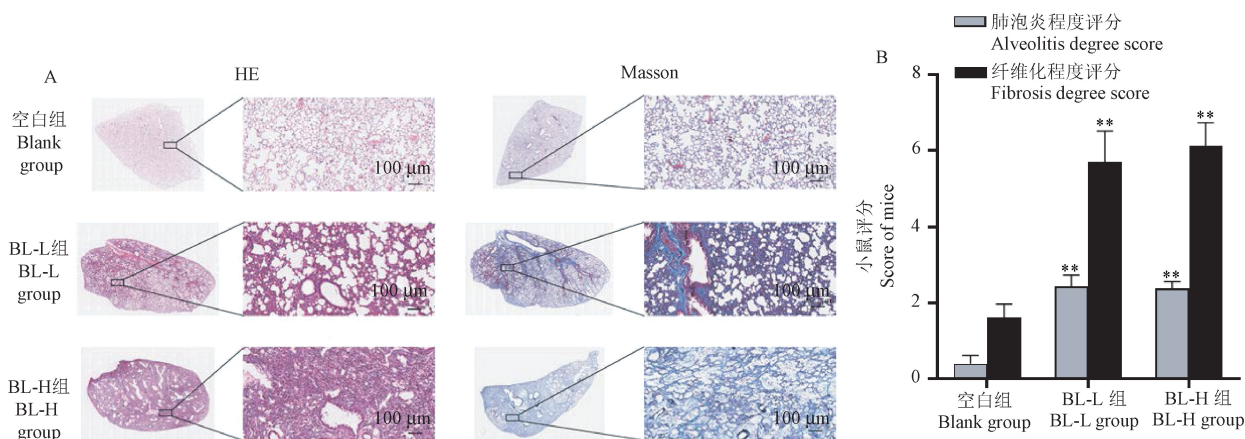


图 4 C57BL/6J 小鼠肺组织病理学变化及评分

Figure 4 Pathological changes of lung tissues in C57BL/6J mice and scoring

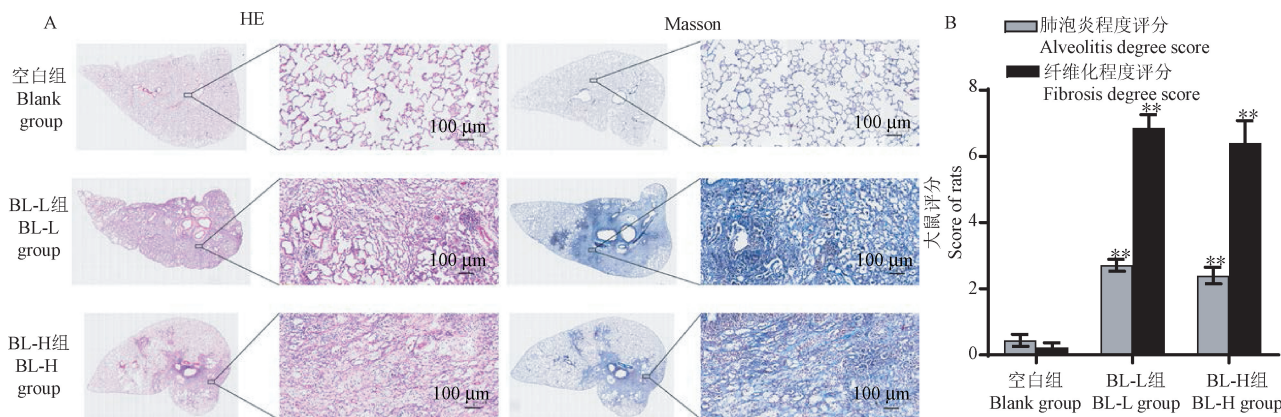


图 5 SD 大鼠肺组织病理学变化及评分

Figure 5 Pathological changes of lung tissues in SD rats and scoring

3 讨论

肺纤维化是指在各种因素刺激下,肺组织发生炎症反应、上皮间质转化、氧化应激等病理过程,导致细胞外基质不断沉积,所造成的具有进行性、不可逆性的瘢痕化病理改变。在临床上主要表现为肺功能下降、呼吸困难,疾病后期发展为呼吸衰竭进而导致死亡。逐年升高的患病率和死亡率给患者和社会造成了沉重的负担。

肺纤维化严重危害公众健康,其机制不明,缺乏有效治疗药物,加强对肺纤维化机制和新药研发的研究具有重要的社会意义,适宜的符合人类病理特征动物模型是探讨发病机制、寻求有效治疗药物的基础。肺纤维化模型可由多种因素诱导建立,如百草枯、二氧化硅、放射刺激和博来霉素等诱导方式。百草枯诱导的毒性大、致死率高,可经鼻吸入对实验人员造成损伤^[20],二氧化硅诱导的肺纤维化模型更符合病因明确的矽肺纤维化^[21],放射刺激

造模法对实验设施要求高且成模周期长^[22]。博来霉素作为一种抗肿瘤药物,其最大的毒副作用是会诱发肺纤维化,且诱导的动物肺纤维化模型的病理过程与临床相近,是目前最为常用的诱导药物^[23]。博来霉素诱导常用的方式有雾化吸入、腹腔注射、滴鼻给药、气管滴注等。雾化吸入法^[24]操作简单且在肺内分布均匀,但吸入量不确定,成模稳定性差;腹腔注射法^[25]致死率低但成模周期长,经济性差;滴鼻给药法^[26]入肺的位置较浅,成模效果差。气管滴注分为经口咽部无创滴注和气管切开滴注两种,王志超等^[27]研究发现气管切开滴注成模率高、病灶分布均匀,但操作复杂且对动物伤害大,经口咽部无创气管滴注具有动物创伤小、成模率高、成模周期短的优点。本研究选用经口咽部无创气管滴注法,在冷光源照射咽喉部下观察到开合的声门裂,经由口咽部可准确插入气管,本课题组经过大量实验已熟练掌握此造模法。目前,对肺纤维化模型的

研究很多,但由于动物种属多样、博来霉素剂量混杂,难以有效模拟同样的模型。因此,本研究基于文献调研和本课题组以往的研究,选定肺纤维化研究的常用鼠种 C57BL/6J 小鼠和 SD 大鼠作为研究对象,使用一次性气管滴注 3 mg/kg、5 mg/kg 两种剂量博来霉素诱导肺纤维化模型,主要探究建立经济、稳定、可行性强的肺纤维大、小鼠模型的最佳博来霉素剂量,以期为进一步研究提供依据。研究普遍认为,博来霉素肺纤维化模型前 7 d 为炎症期,7 ~ 14 d 肺组织胶原蛋白增加,21 d 时肺损伤已处于纤维化期^[28]。本研究发现,C57BL/6J 小鼠和 SD 大鼠经博来霉素诱导后体重在 21 d 观察期间均出现下降,但大鼠下降程度较小鼠明显,两个剂量 BLM 对小鼠死亡率影响不大,而大鼠死亡率较高,呈剂量依赖性,可见 C57BL/6J 小鼠对 BLM 具有一定的耐受性,SD 大鼠对博来霉素刺激更为敏感。肺纤维化导致肺组织弹性及顺应性降低,气道附近的纤维化导致气道阻力增加,表现为肺容积下降和气道受阻等情况,肺容积减小造成肺部限制性功能障碍从而导致 TV 下降^[29-30],MV 代表肺通气功能,EF50 代表气道阻塞程度^[31-32]。本研究发现,C57BL/6J 小鼠和 SD 大鼠经博来霉素诱导后肺功能呈现降低趋势。SD 大鼠不同剂量 BLM 诱导后,肺功能持续下降,对潮气量和肺通气功能影响均较为明显,与体重降低正相关,而 EF50 变化不显著,说明在 21 d 观察期间 BLM 未造成 SD 大鼠气道阻塞。3 mg/kg 博来霉素诱导的小鼠肺功能在第 10 天后呈较为显著的升高趋势,而 5 mg/kg 组小鼠未见明显升高,说明低剂量博来霉素诱导的小鼠模型在 10 d 后肺功能可能出现恢复,博来霉素诱导 21 d 后小鼠 EF50 显著降低,而大鼠未见明显改变,可见小鼠在气道阻塞、肺通气障碍方面改变较为明显,而大鼠可能出现滞后。

在博来霉素刺激下,成纤维细胞向肌成纤维细胞转化,过度增殖的肌成纤维细胞产生大量的细胞外基质,包括形成胶原纤维的主要成分胶原蛋白^[33],HYP 含量测定可判断肺组织内胶原蛋白含量,是反映纤维化程度的重要指标^[34]。本研究发现,大、小鼠经博来霉素诱导后肺组织 HYP 水平均升高,且呈剂量依赖性,说明博来霉素可引起不同种属动物肺组织胶原沉积。不同剂量博来霉素诱导 21 d 大小鼠肺组织均表现出肺泡结构破坏、肺泡壁增厚、炎性细胞浸润、大量纤维条索及胶原沉积,

均表现出明显的肺泡炎和纤维化,但小鼠表现为全肺纤维化,大鼠表现为片状纤维化,以气道周围较为明显。这可能与气管内滴注的模型制备方式和大小鼠生理特点差异有关。

综上所述,博来霉素 3 mg/kg 与 5 mg/kg 均可诱导大、小鼠肺纤维化模型。本研究结合肺功能、羟脯氨酸水平及存活率等指标,认为制备 C57BL/6J 小鼠肺纤维化模型博来霉素的适宜剂量为 5 mg/kg,制备 SD 大鼠肺纤维化模型博来霉素的适宜剂量为 3 mg/kg。但本研究的动物种类仅选用了 SD 大鼠和 C57BL/6J 小鼠,且仅观察到 21 d,对于模型的稳定性尚需进一步研究。

参 考 文 献 (References)

- [1] Marchioni A, Tonelli R, Cerri S, et al. Pulmonary stretch and lung mechanotransduction: implications for progression in the fibrotic lung [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(12): 6443.
- [2] Li S, Zhang H, Chang J, et al. Iron overload and mitochondrial dysfunction orchestrate pulmonary fibrosis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 912: 174613.
- [3] Phan THG, Paliogiannis P, Nasrallah GK, et al. Emerging cellular and molecular determinants of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(5): 2031-2057.
- [4] Somogyi V, Chaudhuri N, Torrisi S, et al. The therapy of idiopathic pulmonary fibrosis: what is next? [J]. *Eur Respir Rev*, 2019, 28(153): 190021.
- [5] Shariati S, Kalantar H, Pashmforoosh M, et al. Epicatechin protective effects on bleomycin-induced pulmonary oxidative stress and fibrosis in mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 114: 108776.
- [6] Pan T, Zhou Q, Miao K, et al. Suppressing Sart1 to modulate macrophage polarization by siRNA-loaded liposomes: a promising therapeutic strategy for pulmonary fibrosis [J]. *Theranostics*, 2021, 11(3): 1192-1206.
- [7] Park SJ, Kim TH, Lee K, et al. Kurarinone attenuates BLM-induced pulmonary fibrosis via inhibiting TGF- β signaling pathways [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 8388.
- [8] Lee TH, Yeh CF, Lee YT, et al. Fibroblast-enriched endoplasmic reticulum protein TXNDC5 promotes pulmonary fibrosis by augmenting TGF β signaling through TGFBR1 stabilization [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4254.
- [9] Yang M, Yin E, Xu Y, et al. CDKN2B antisense RNA 1 expression alleviates idiopathic pulmonary fibrosis by functioning as a competing endogenous RNA through the miR-199a-5p/Sestrin-2 axis [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(3): 7746-7759.
- [10] Lv Q, Wang J, Xu C, et al. Pirfenidone alleviates pulmonary fibrosis *in vitro* and *in vivo* through regulating Wnt/GSK-3 β / β -catenin and TGF- β 1/Smad2/3 signaling pathways [J]. *Mol Med*, 2020, 26(1): 49.
- [11] Harel F, Nguyen QT, Nsaibia MJ, et al. SPECT imaging of pulmonary vascular disease in bleomycin-induced lung fibrosis

- using a vascular endothelium tracer [J]. *Respir Res*, 2021, 22(1): 240.
- [12] Divya T, Velavan B, Sudhandiran G. Regulation of transforming growth factor- β /smad-mediated epithelial-mesenchymal transition by celastrol provides protection against bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2018, 123(2): 122–129.
- [13] Milara J, Hernandez G, Ballester B, et al. The JAK2 pathway is activated in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Respir Res*, 2018, 19(1): 24.
- [14] Zhang Y, Lu W, Zhang X, et al. Cryptotanshinone protects against pulmonary fibrosis through inhibiting Smad and STAT3 signaling pathways [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 147: 104307.
- [15] Yang Y, Tai W, Lu N, et al. lncRNA ZFAS1 promotes lung fibroblast-to-myofibroblast transition and ferroptosis via functioning as a ceRNA through miR-150-5p/SLC38A1 axis [J]. *Aging*, 2020, 12(10): 9085–9102.
- [16] Yanagihara T, Chong SG, Vierhout M, et al. Current models of pulmonary fibrosis for future drug discovery efforts [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2020, 15(8): 931–941.
- [17] 李萌. 基于调控 IKK/I κ B/NF κ B 通路的扶正通络消积方治疗肺纤维化疗效及远后效应机制 [D]. 北京: 北京中医药大学; 2017.
- Li M. Therapeutic effect of Fuzheng Tongluo Xiaoji recipe based on regulating IKK/I κ B/NF κ B pathway on pulmonary fibrosis and its long-term effect mechanism [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine; 2017.
- [18] Szapiel SV, Elson NA, Fulmer JD, et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1979, 120(4): 893–899.
- [19] Ashcroft T, Simpson JM, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale [J]. *J Clin Pathol*, 1988, 41(4): 467–470.
- [20] Anderson T, Merrill AK, Eckard ML, et al. Paraquat inhalation, a translationally relevant route of exposure; disposition to the brain and male-specific olfactory impairment in mice [J]. *Toxicol Sci*, 2021, 180(1): 175–185.
- [21] 蔡婷峰, 宋向荣, 李宏玲, 等. 不同时间点大鼠矽肺模型病理改变观察 [J]. *中国职业医学*, 2020, 47(4): 385–389.
- Cai TF, Song XR, Li HL, et al. Observation of pathological changes in rat silicosis model at different time points [J]. *Chin Occup Med*, 2020, 47(4): 385–389.
- [22] 张彦伟, 张志强, 吴丽贤, 等. 雷公藤内酯醇减少放射性肺纤维化中肌成纤维细胞活化与抑制 TGF- β 1/ERK/Smad3 通路相关 [J]. *中国药理学通报*, 2017, 33(5): 630–636.
- Zhang YW, Zhang ZQ, Wu LX, et al. TPL's suppression on activation of myofibroblasts in radiation induced lung fibrosis related to its inhibition on TGF- β 1/ERK/Smad3 pathway [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2017, 33(5): 630–636.
- [23] 陈淑珍, 甄永苏. 抗肿瘤药物引起肺不良反应的研究进展 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2012, 19(21): 1676–1680.
- Chen SZ, Zhen YS. Pulmonary adverse reactions induced by anticancer drugs: updates [J]. *Chin J Cancer Prev Treat*, 2012, 19(21): 1676–1680.
- [24] de Souza Xavier Costa N, Ribeiro Júnior G, Dos Santos Alemany AA, et al. Early and late pulmonary effects of nebulized LPS in mice: an acute lung injury model [J]. *PLoS One*, 2017, 12(9): e0185474.
- [25] 苏敏红, 江宁, 李洪涛, 等. 腹腔注射博来霉素诱导小鼠肺纤维化模型的长期稳定性 [J]. *中国组织工程研究*, 2017, 21(4): 512–519.
- Su MH, Jiang N, Li HT, et al. Intraperitoneal injection of bleomycin induces pulmonary fibrosis in mice: a long-term stability evaluation [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2017, 21(4): 512–519.
- [26] 吕晓希, 刘姗姗, 李云炫, 等. 一种小鼠无创气管插管的方法及其应用 [J]. *药学报*, 2020, 55(6): 1187–1192.
- Lü XX, Liu SS, Li YX, et al. A simple method and the application of mouse tracheal intubation [J]. *Acta Pharm Sin*, 2020, 55(6): 1187–1192.
- [27] 王志超, 冯凡超, 武琦, 等. 三种方法气管灌注博来霉素诱导小鼠肺纤维化的比较 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(5): 51–57.
- Wang ZC, Feng FC, Wu Q, et al. Comparison of three methods to establish a mouse model of pulmonary fibrosis induced by intratracheal instillation of bleomycin [J]. *Chin J Comp Med*, 2019, 29(5): 51–57.
- [28] Guo J, Hardie WD, Cleveland ZI, et al. Longitudinal free-breathing MRI measurement of murine lung physiology in a progressive model of lung fibrosis [J]. *J Appl Physiol* (1985), 2019, 126(4): 1138–1149.
- [29] 刘莎, 张明香. 潮气呼吸肺功能临床应用中需注意的问题 [J]. *中国实用儿科杂志*, 2021, 36(6): 429–433.
- Liu S, Zhang MX. Issues in clinical application of tidal breathing lung function test [J]. *Chin J Pract Pediatr*, 2021, 36(6): 429–433.
- [30] Winn CB, Hwang SK, Morin J, et al. Automated monitoring of respiratory rate as a novel humane endpoint: a refinement in mouse metastatic lung cancer models [J]. *PLoS One*, 2021, 16(9): e0257694.
- [31] Glaab T, Braun A. Noninvasive measurement of pulmonary function in experimental mouse models of airway disease [J]. *Lung*, 2021, 199(3): 255–261.
- [32] Redente EF, Chakraborty S, Sajuthi S, et al. Loss of Fas signaling in fibroblasts impairs homeostatic fibrosis resolution and promotes persistent pulmonary fibrosis [J]. *JCI Insight*, 2021, 6(1): e141618.
- [33] Karsdal MA, Nielsen SH, Leeming DJ, et al. The good and the bad collagens of fibrosis-Their role in signaling and organ function [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, 121: 43–56.
- [34] Chu KA, Wang SY, Yeh CC, et al. Reversal of bleomycin-induced rat pulmonary fibrosis by a xenograft of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly [J]. *Theranostics*, 2019, 9(22): 6646–6664.