

唐会猛,宋庆华,谢云云,等. 单双次气管内滴注博来霉素诱导肺纤维化大鼠模型的比较[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(9): 1139-1148.

TANG H M, SONG Q H, XIE Y Y, et al. Comparison of rat models of pulmonary fibrosis induced by one or two intratracheal bleomycin instillation [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(9): 1139-1148.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.09.005

单双次气管内滴注博来霉素诱导肺纤维化大鼠模型的比较

唐会猛^{1,2}, 宋庆华³, 谢云云^{1,2}, 孙鑫^{1,2}, 杨帆^{1,2}, 杨曙光¹, 田燕歌^{3*}

(1. 河南中医药大学第一附属医院呼吸科, 郑州 450000; 2. 河南中医药大学第一临床医学院, 郑州 450046; 3. 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)

【摘要】 目的 采用单次及两次气管内滴注博来霉素(bleomycin, BLM)构建肺纤维化大鼠模型,比较2种造模方式的成模率及稳定性。**方法** 150只SPF级SD大鼠随机分成空白对照组(Control组)、单次气管内滴注博来霉素组(BLM-S组)、两次气管内滴注博来霉素组(BLM-M组)。BLM-S组第1天采用无创气管内滴注BLM(3 mg/kg, 单次)诱导;BLM-M组第1、14天分别气管内滴注BLM(3、2 mg/kg)诱导,Control组采用无创气管内滴注0.9%氯化钠注射液(1 mL/kg);于造模后第28、42、56、84天分批取材。检测大鼠深吸气量(inspiratory capacity, IC)、肺活量(vital capacity, VC)、静态肺顺应性(static compliance of lung, Cchord)及动态肺顺应性(dynamic lung complication, Cdyn);观察大鼠肺组织病理变化,并对肺泡炎及纤维化程度进行评分;采用免疫组化检测大鼠肺组织Ⅲ型胶原蛋白(collagen-Ⅲ, COL-Ⅲ)表达。**结果** (1)一般状态及生存情况:Control组、BLM-S组和BLM-M组生存率分别为:100%、80%、66%。第14~42天,BLM-S组与BLM-M组大鼠体重显著低于Control组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。第28~42天,BLM-M组体重显著低于Control组、BLM-S组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。(2)肺功能:与Control组比较,第28天BLM-S组肺功能IC、VC、Cchord、Cdyn均显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),BLM-M组IC、VC、Cchord显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);第42天BLM-S组大鼠IC、VC、Cchord显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);第42~84天BLM-M组大鼠IC、VC、Cchord明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。(3)肺病理:第28~84天,BLM-S组大鼠出现炎性浸润及纤维条索后逐渐减少($P < 0.05$, $P < 0.01$);BLM-M组大鼠出现纤维化及肺泡炎后较为稳定($P < 0.05$, $P < 0.01$)。(4)胶原沉积:各时间点BLM-S组、BLM-M组大鼠肺组织内COL-Ⅲ表达显著高于Control组($P < 0.05$, $P < 0.01$);第42~84天BLM-S组COL-Ⅲ含量显著低于28 d($P < 0.05$)。**结论** 2种造模方式均可成功建立肺纤维化模型,其中单次法操作简便,大鼠死亡率更低,28 d时纤维化程度明显,但在42 d之后会逐渐恢复;两次法造模成功率更高,模型稳定性更好,至84 d仍有超半数大鼠存在明显纤维化。

【关键词】 肺纤维化;动物模型;博来霉素;单次及两次给药

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 09-1139-10

Comparison of rat models of pulmonary fibrosis induced by one or two intratracheal bleomycin instillations

TANG Huimeng^{1,2}, SONG Qinghua³, XIE Yunyun^{1,2}, SUN Xin^{1,2}, YANG Fan^{1,2},
YANG Shuguang¹, TIAN Yange^{3*}

【基金项目】 河南省科技研发计划联合基金(优势学科培育类)项目(232301420020),国家自然科学基金项目(82305138)。

Funded by the Scientific and Technological Research and Development Plan of Henan Province (Cultivation of Dominant Disciplines) (232301420020), National Natural Science Foundation of China (82305138).

【作者简介】 唐会猛,男,在读硕士研究生,研究方向:中医药防治呼吸系统相关疾病。Email:2252422689@qq.com

【通信作者】 田燕歌,女,博士,副教授,研究方向:中医药防治呼吸病。Email:yange0910@126.com

- (1. Respiratory Department of the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China;
2. the First Clinical Medical College of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;
3. Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases Co-Constructed by Henan Province and Education Ministry of People's Republic of China, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)
- Corresponding author: TIAN Yange. E-mail: yange0910@126.com

【Abstract】 Objective A rat model of pulmonary fibrosis was constructed using a single or two intratracheal drops of bleomycin (BLM) and the modeling rate and stability of the two modeling modalities were compared. **Methods** A total of 150 specific pathogen-free SD rats were divided randomly into blank control (control), single intratracheal drop of bleomycin (BLM-S), and two intratracheal drops of bleomycin (BLM-M) groups. Rats in the BLM-S group received a single dose of 3 mg/kg BLM by noninvasive intratracheal instillation, and rats in BLM-M group received 3 mg/kg BLM on day 1 and BLM 2 mg/kg on day 14. Rats in the control group were given intratracheal instillation of 0.9% sodium chloride (1 mL/kg). The rats were euthanized on days 28, 42, 56, and 84 after modelling, respectively. Deep inspiratory capacity (IC), vital capacity (VC), static lung compliance (Cchord), and dynamic lung complication (Cdyn) were measured in all rats. Pathological changes in lung tissue were observed, and the extent of alveolitis and fibrosis was graded. Collagen-III (COL-III) expression in rat lung tissue was detected by immunohistochemistry. **Results** (1) The survival rates in the control, BLM-S, and BLM-M groups were 100%, 80%, and 66%, respectively. Rats in the BLM-S and BLM-M groups had significantly lower body weights on days 14 ~ 42 compared with the control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and rats in the BLM-M group had significantly lower body weight on days 28 ~ 42 than rats in the control and BLM-S groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). (2) Regarding lung function, IC, VC, Cchord, and Cdyn were all markedly decreased in the BLM-S group compared with the control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and IC, VC, and Cchord were significantly decreased in the BLM-M group ($P < 0.05$, $P < 0.01$) on day 28. IC, VC, and Cchord were significantly decreased in rats in the BLM-S group on day 42 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and were also significantly decreased in rats in the BLM-M group on days 42 ~ 84 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). (3) In terms of lung pathology, inflammatory infiltration and fibrous cords appeared in the BLM-S group from days 28 ~ 84 and then gradually decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while fibrosis and alveolitis were relatively stable in the BLM-M group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). (4) COL-III expression levels in lung tissue were significantly higher in rats in the BLM-S and BLM-M groups compared with the control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the COL-III content in the BLM-S group was significantly lower at 42 ~ 84 days than at 28 days ($P < 0.05$). **Conclusions** Both method are capable of effectively creating pulmonary fibrosis models. The single-dose approach is straightforward, has a lower death rate, and the degree of fibrosis is clearly visible by day 28, but progressively recovers after 42 days. In contrast, the two-dose instillation model has a greater success rate and better stability, with over half the rats still exhibiting visible fibrosis on day 84.

【Keywords】 pulmonary fibrosis; animal model; bleomycin; single administration, double administration

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

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是一种慢性进行性的呼吸系统疾病,其特征是肺组织不可逆的瘢痕、纤维病灶形成^[1-2],临床上主要表现为不明原因的干咳、气喘、不断加重的呼吸困难,预后较差^[3-4]。IPF 严重危害公共身心健康,其发病率、病死率逐年升高^[5],中位生存期短至 3 ~ 5 年^[6],5 年生存率甚至不足 50%^[7]。近年来中西医结合抗纤维化治疗 IPF 取得了一些进展,然而 IPF 发病机制并未明确,截止目前,除肺移植外,仍无一种彻底根治 IPF 的方法^[8]。

IPF 机制不明,限制了有效防治的研究。稳定的、符合临床病理特征的动物模型是探索 IPF 发病机制、寻求有效治疗药物的关键。目前,反映 IPF 病

理特征动物模型主要有细胞因子过表达法^[9]、药物法^[10]、毒物诱导法^[11]、环境诱导法^[12]等多种造模方法,各种造模方法各有利弊,造模效果不一,与临床上 IPF 患者的特征相比,仍有差异^[13-14]。其中,以气管内滴注博来霉素诱导的肺纤维化模型最为常见^[15]。但滴注方式、频次、剂量等方面尚未形成统一的标准,本研究以 SD 大鼠为研究对象,通过气管内滴注 BLM 造模,对比单次及两次给药诱导大鼠肺纤维化的成模率、稳定性和生存率等指标,为进一步研究提供模型依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

150 只 SPF 级 SD 雄性大鼠,体重(200 ± 20)g,6 ~ 8 周龄,购自北京斯贝福生物技术有限公司【SCXK(京)2019-0010】。实验全程均在河南中医药大学动物实验室【SYXK(豫)2020-0004】饲养。饲养环境舒适,饲养温度控制在(22 ± 3)℃,相对湿度 40% ~ 60%,实验室环境保持安静,昼夜各半循环交替照明。大鼠自由进食标准饲料,饮用纯净水,所有实验操作均符合河南中医药大学实验动物伦理委员会审查标准(DWLL202203014)。

1.1.2 主要试剂与仪器

注射用盐酸博来霉素(BLM,每瓶 15 mg,产品批号:Y20801)购自日本株式会社;苏木素-伊红(HE)染色剂试剂盒(产品批号:C220901)、Masson 染色剂试剂盒(产品批号:C221201)购自珠海贝索生物技术有限公司;兔 IgG 免疫组化试剂盒 SABC 即用型(产品批号:SA1022-1KIT)购自博士德生物工程公司;COL-Ⅲ 抗体(货号:AF01336)购自 Affinity 公司。

Mill Q Synthesls 型超净纯水仪(Millipore, USA);PFT 动物肺功能检测系统(Buxco, USA);3DHISTECH 病理切片扫描仪(丹吉尔,中国);Histcore Autocut 全自动切片机(Leica, Germany);高速离心机(Eppendorf, Germany);DM6000B 光学显微镜(Leica, Germany)。

1.2 方法

1.2.1 分组及动物模型制备

150 只大鼠购回后适应性喂养 5 d。将所有大鼠随机分为空白对照组(Control 组)、单次气管内滴注博来霉素组(BLM-S 组)、两次气管内滴注博来霉素组(BLM-M 组),每组各 50 只。造模前采用腹腔注射 0.1% 50 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉大鼠,经气管内滴注博来霉素制备肺纤维化大鼠模型^[16]。具体操作方法:采用 1 mL 注射器抽取 BLM 备用,将大鼠麻醉后仰面固定于鼠板上。将白色冷光源垂直照射于大鼠咽喉部,一手提起大鼠舌头,另一手持气管插管。伴随大鼠呼吸,待咽喉部白色亮点出现时,迅速插入气管插管,拔出针芯。堵住大鼠口鼻,把棉球薄片放于针口,此时棉球薄片随大鼠呼吸前后摆动。再将 1 mL 注射器向上倾斜约 60°,推注 BLM 悬液,立即打入 0.5 mL 空气,随后直立旋转大鼠,使 BLM 均匀分布于大鼠肺部。Control 组分别于造模第 1、14 天气管内滴注 0.1 mL/100 g 0.9%生理

盐水。BLM-S 组分别于造模第 1 天气管内滴注 3 mg/kg 博来霉素,第 14 天气管内滴注 0.1 mL/100 g 0.9%生理盐水。BLM-M 组分别于实验第 1、14 天气管内滴注 3、2 mg/kg 博来霉素。

1.2.2 一般状态及死亡情况

大鼠进驻动物房后,详细观察记录各组大鼠精神状态、饮食和二便、毛发、体重增长变化等情况。实验期间监测大鼠的死亡情况,分析记录大鼠可能的死亡原因。

1.2.3 样本采集及处理

分别于造模第 28、42、56、84 天 4 个时间点取材,取材前 12 h 内禁水禁食。大鼠麻醉后,暴露胸腔,分离肺组织,拍照记录肺外观,称量肺湿重。切分肺组织,左肺用 4%多聚甲醛溶液灌注 20 min 后置于组织固定液中固定备用。

1.2.4 肺系数测定

计算各大鼠肺系数:大鼠肺系数 = 肺湿重(g)/处死前体重(kg) × 100%。

1.2.5 肺功能检测

造模 28、42、56、84 d,大鼠麻醉后,剪开颈部皮肤,钝性分离皮下肌肉组织,充分暴露大鼠气管,在气管上部剪一“T”字形切口,将气管插管带有金属的一端插入大鼠气管,结扎固定,另一端与 PFT 肺功能检测系统连接。待大鼠呼吸相对平稳后检测大鼠的深吸气量(inspiratory capacity, IC)、肺活量(vital capacity, VC)、静态肺顺应性(static compliance of lung, Cchord)、动态肺顺应性(dynamic lung complication, Cdyn)等指标。

1.2.6 肺组织病理观察

大鼠左肺固定 72 h 后,在近肺门处横切厚度约 3 mm 的组织,常规脱水,石蜡包埋,使用 Histcore Autocut 全自动切片机切片(厚度统一为 4 μm),脱蜡,水化后分别行 HE、Masson 染色,染色后,晾干封片。借助病理切片扫描仪,在镜下观察左肺组织病理形态变化和胶原纤维沉积情况。分别以 SZAPIEL 等^[17]和 ASHCROFT 等^[18]的评分方法为参考标准,2 人互盲评定肺泡炎和纤维化程度,当评分区别较大时借助第 3 人评分后讨论,确保无异议再确定最终分数。根据 Ashcroft 纤维化最终评分情况,将纤维化严重程度划分为轻度(0 ~ 2 分)、中度(3 ~ 6 分)、重度(7 ~ 8 分),比较各组不同时间点纤维化情况。

1.2.7 肺组织胶原蛋白表达检测

采用免疫组化法检测大鼠肺组织中 COL-Ⅲ 的表达。大鼠肺组织包埋脱蜡,经抗原修复、滴加抗体等步骤后显色、复染脱水、封片。利用 3DHISTECH 病理切片扫描仪扫描玻片,在软件 Slide Viewer2.6 中截片,每张切片截取 8 ~ 10 个视野,截取的每个视野不重叠。借助 Image-Pro Plus 6.0 软件计算每个视野下的 COL-Ⅲ 的积分光密度的平均值(integrated optical density, IOD)。

1.3 统计学分析

利用软件 SPSS 26.0 进行统计学分析,实验结果以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用单因素方差分析评估组间差异,若方差齐选用最小显著差法(least significant difference, LSD),若不齐则采用 Dunnett's T3 法。并借助 Graph Pad Prism 8.0 将分析后的实验数据做可视化升级。以 $\alpha = 0.05$ 为显著性标准,且当 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般状态及死亡情况比较

2.1.1 一般状态

造模前各组大鼠一般状态良好。造模后,Control 组大鼠较活跃,喜跑动、毛发白亮有光泽、饮食佳、呼吸平稳;BLM-S 组、BLM-M 组大鼠呼吸急促,喜静、喜卧、毛发一般、精神萎靡,饮食少。BLM-M 组第 2 次造模后精神较差,毛发晦暗枯槁、不思饮食、常卧、不喜跑动,与 Control 组相比、BLM-S 组生命状态差。如图 1A 所示,Control 组大鼠体重随时间逐渐增长,BLM-S 组第 14 天体重较 Control 组显

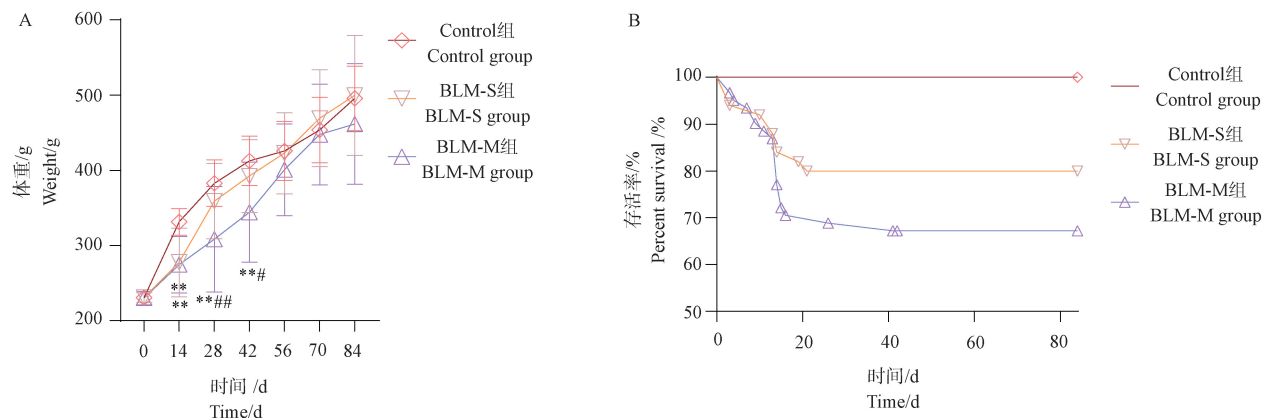
著降低($P < 0.01$),但 28 ~ 42 d 后虽然体重随时间也逐渐增长,但仍低于 Control 组($P < 0.05$),56 d 后体重基本与 Control 组一致。与 Control 组相比,BLM-M 组第 14 天体重显著下降($P < 0.01$),持续到第 42 天($P < 0.01$),56 d 后体重增长明显,但仍低于 Control 组($P > 0.05$),无统计学意义。与 BLM-S 组比较,BLM-M 组第 28、42 天显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

2.1.2 死亡情况

Control 组大鼠生命体征较平稳,未见死亡。造模后,模型组大鼠生命状态不平稳,死亡大鼠鼻部、眼部有明显黑色分泌物,腹部胀大,解剖后可见肺部有大量瘀血,部分大鼠胃肠胀气。大鼠死亡原因包括:气管插管滴注 BLM 后大鼠呼吸急促,鼻部、口部有药物及痰液溢出,考虑造模操作不当;麻醉大鼠苏醒后,大鼠死亡,解剖后可见肺部有大量淤血、瘀痕组织形成,考虑 BLM 细胞毒性较大,大鼠不耐受,感染后死亡。如图 1B 所示,最终 Control 组、BLM-S 组、BLM-M 组大鼠存活率分别为 100%、80%、66%。

2.2 肺外观及肺系数情况

肺外观如图 2A 所示:Control 组大鼠肺组织光滑柔软,颜色红润,结构正常;BLM-S 组、BLM-M 组大鼠肺结构紊乱,颜色晦暗,表面凹凸不平,可见大小不一的瘀点瘀斑,部分有灰黑色囊肿,质地较硬。与 BLM-S 组比较,BLM-M 组大鼠肺部纤维病灶面积更大,肺结构损伤更严重。随时间增加,BLM-S 组大鼠纤维病灶有所恢复,BLM-M 组大鼠肺纤维化程度未见明显消退。



注:与 Control 组相比, ** $P < 0.01$; 与 BLM-S 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。(下图/表同)

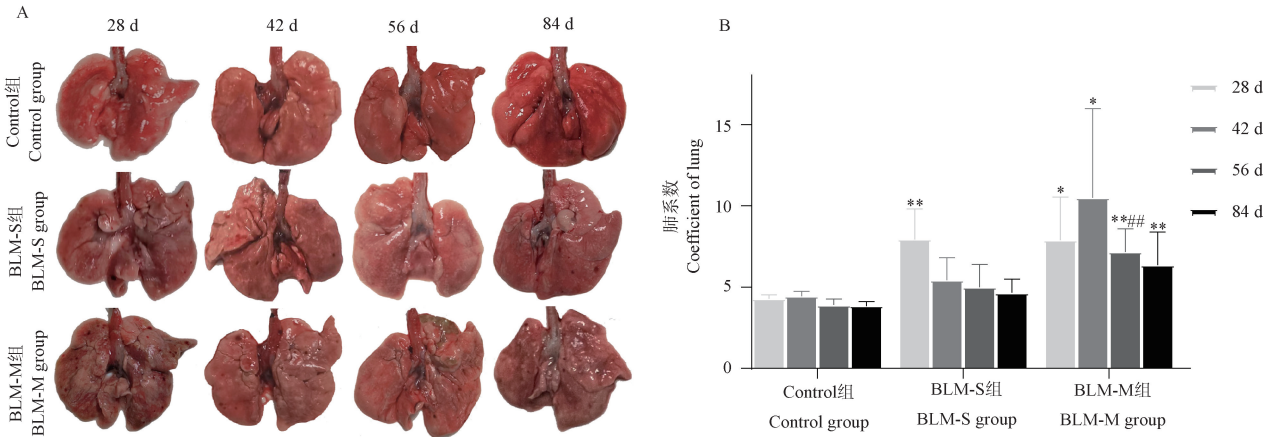
图 1 大鼠体重变化情况及存活率($n \geq 8$)

Note. Compared with the control group, ** $P < 0.01$. Compared with BLM-S group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. (The same in the following figures and tables)

Figure 1 Plot of changes in body weight and survival rate of rats($n \geq 8$)

肺系数结果如图 2B 所示,与 Control 组相比, BLM-S 组在不同时间点的肺系数均升高,其中在第 28 天时升高最为显著($P < 0.01$),随后随时间逐渐递减。与 BLM-M 组相比, BLM-S 组肺系数较低,但

无统计学意义。与 Control 组对比, BLM-M 组肺系数在第 28 ~ 84 天均显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),且在第 42 天时达到高峰,此后随时间的增加,肺系数逐渐减低。



注:与 Control 组相比, * $P < 0.05$ 。(下图/表同)
图 2 不同时间点大鼠肺组织形态及肺系数情况($n = 8 \sim 10$)
Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$. (The same in the following figures and tables)

Figure 2 Lung tissue morphology and Situation of rat lung coefficients of rats at different time points($n = 8 \sim 10$)

2.3 肺功能

造模 28 d,与 Control 组相比, BLM-S 组 IC、VC、Cchord、Cdyn 显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$), BLM-M 组 IC、VC、Cchord 显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), Cdyn 明显下降,但无统计学意义。造模 42 d,与 Control 组相比, BLM-S 组、BLM-M 组 IC、VC、Cchord 显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$); BLM-M 组 IC、VC、Cchord 下降较 BLM-S 组显著($P < 0.05$, $P < 0.01$)。造模 56 d,与 Control 组相比, BLM-M 组

VC、Cchord 显著降低($P < 0.05$), BLM-S 组 IC、VC、Cchord、Cdyn 均降低,但无统计学意义。造模 84 d,与 Control 组相比, BLM-M 组 IC、VC、Cchord 显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$), BLM-S 组 IC、VC、Cchord、Cdyn 均降低,但无统计学意义。随着时间的增加, Control 组、BLM-S 组 IC、VC、Cchord、Cdyn 逐渐增加,但无统计学意义。BLM-M 组第 28、42 天 IC、VC、Cchord、Cdyn 降低显著,后逐渐增长,但仍低于 Control 组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 1。

表 1 各组大鼠不同时间点肺功能比较($\bar{x} \pm s$, $n = 6 \sim 10$)

Table 1 Comparison of pulmonary function at different time points in each group($\bar{x} \pm s$, $n = 6 \sim 10$)

组别 Groups	时间/ d Time/d	IC/mL	VC/mL	Cchord/ (mL/cmH ₂ O)	Cdyn/(mL/cmH ₂ O)
Control 组 Control group	28	11.35 ± 0.96	13.86 ± 0.77	0.61 ± 0.10	0.25 ± 0.02
	42	14.67 ± 1.34	16.68 ± 1.38	0.86 ± 0.14	0.41 ± 0.31
	56	15.48 ± 1.28	17.27 ± 1.88	1.02 ± 0.15	0.64 ± 0.12
	84	19.18 ± 0.89	21.07 ± 1.16	1.25 ± 0.13	0.81 ± 0.29
BLM-S 组 BLM-S group	28	8.25 ± 2.02 *	10.72 ± 1.86 *	0.32 ± 0.11 **	0.18 ± 0.02 **
	42	11.99 ± 2.17 *	14.03 ± 2.32 *	0.69 ± 0.20 *	0.30 ± 0.14
	56	14.82 ± 2.38	16.03 ± 1.94	0.90 ± 0.30	0.63 ± 0.09
	84	17.3 ± 2.03	19.05 ± 2.19	0.99 ± 0.17	0.70 ± 0.55
BLM-M 组 BLM-M group	28	8.22 ± 2.21 **	10.28 ± 3.35 *	0.34 ± 0.19 **	0.19 ± 0.06
	42	8.40 ± 2.78 ***	10.16 ± 3.29 ***	0.35 ± 0.12 **	0.20 ± 0.07
	56	11.86 ± 2.24	13.64 ± 2.77 *	0.72 ± 0.20 *	0.50 ± 0.08
	84	14.79 ± 4.75 *	16.94 ± 5.06 *	0.71 ± 0.33 **	0.51 ± 0.17

2.4 大鼠肺组织病理变化情况

2.4.1 HE 染色及肺泡炎评分

HE 结果如图 3A 所示; Control 组大鼠肺组织完整,肺结构清晰,肺泡内未见炎性细胞浸润,无充血

无水肿。与 Control 组比较, BLM-M 组、BLM-S 组大鼠肺组织结构均有不同程度的紊乱, 肺泡壁明显增厚可见塌陷, 肺泡腔内有大量细胞聚集, 出现炎性浸润, BLM-M 组更为显著。随着时间的增加, BLM-S 组病理改变有所恢复。肺泡炎评分结果如图 3B 所示: 造模 28 d, 与 Control 组比较, BLM-S 组、BLM-M 组肺泡炎评分显著升高($P < 0.01$); 造模 42 d, 与

Control 组比较, BLM-S 组、BLM-M 组肺泡炎评分显著升高($P < 0.05$); 造模 56、84 d, 与 Control 组比较, BLM-S 组肺泡炎程度升高, 但无统计学意义, BLM-M 组肺泡炎评分显著升高($P < 0.01$)。42 d 后, BLM-S 组肺泡炎评分有所恢复, BLM-M 组第 42 天肺泡炎评分达到高峰, 至第 84 天仍处于较高水平。

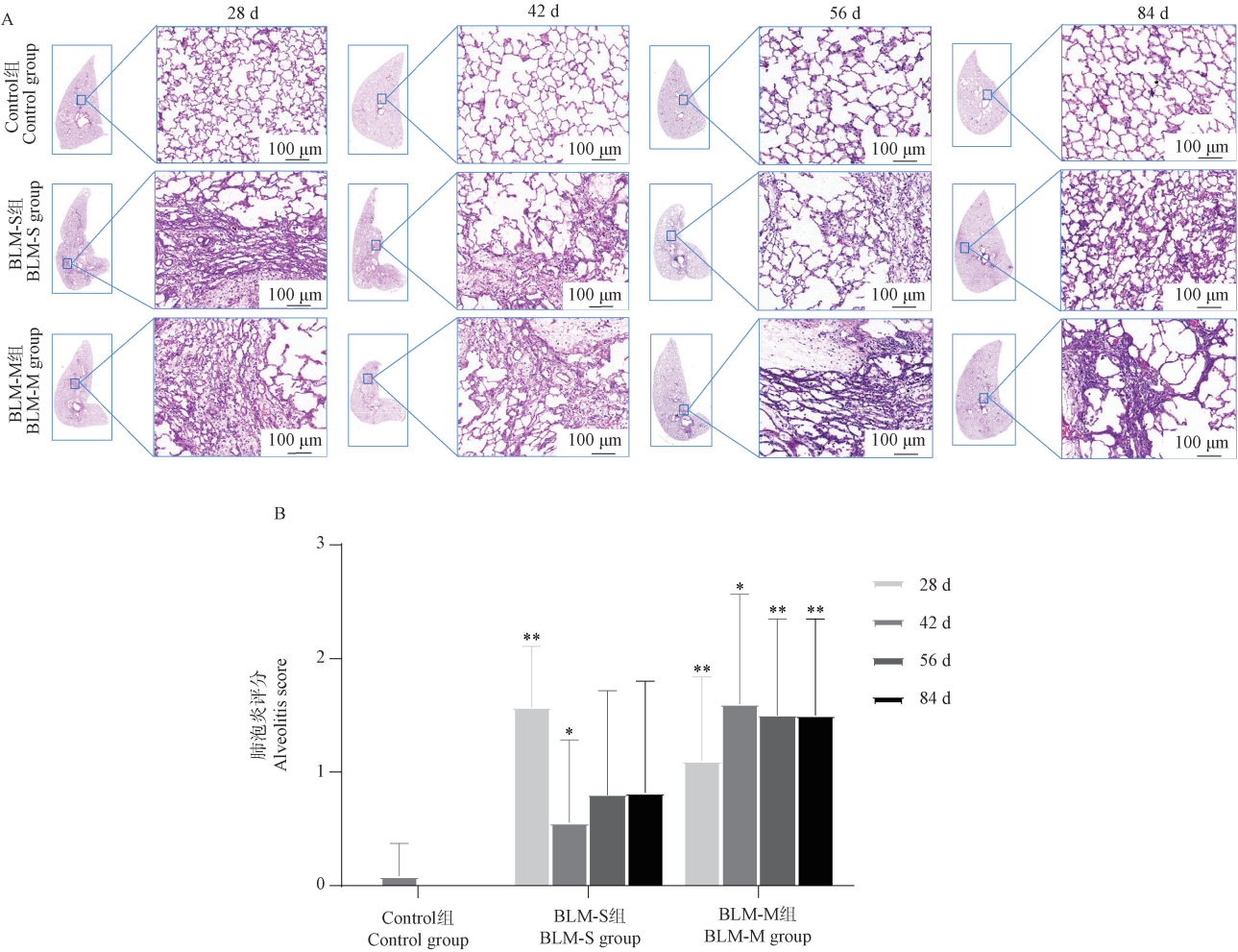


图3 不同时间点大鼠 HE 染色及肺泡炎评分情况($n = 7 \sim 12$)

Figure 3 HE staining of rats and alveolitis scores at different time points($n = 7 \sim 12$)

2.4.2 Masson 染色及纤维化评分情况

Masson 染色结果如图 4A 所示: Control 组大鼠肺组织完整, 肺结构清晰, 肺泡壁无增厚、无塌陷, 肺间隔内仅存在少量纤维。与 Control 组比较, BLM-M 组、BLM-S 组大鼠肺组织结构损坏, 肺泡壁明显增厚, 气道周围和肺间隔可见交错分布的纤维条索和瘢痕组织, 胶原沉积明显。与 BLM-S 组比较, BLM-M 组纤维条索与瘢痕组织更为明显, 病变面积更大。纤维化评分结果如图 4B 所示: 与

Control 组比较, BLM-S 组第 28 ~ 56 天纤维化评分显著升高($P < 0.01$), BLM-M 组第 28 ~ 84 天纤维化评分显著升高($P < 0.01$)。BLM-M 组纤维化评分高于 BLM-S 组, 但组间无显著性差异。BLM-S 组纤维化评分第 28 天后随时间延长有所降低, BLM-M 组第 42 天的纤维化评分达到高峰, 56 d 后有所降低, 但仍高于 Control 组($P < 0.01$)。

纤维化评分不同分数段占比统计结果如图 4C, 4D 所示: 造模 28 d, BLM-S 组均集中在中度 3 ~ 6

分段, BLM-M 组轻、中、重度纤维化占比分别为 33%、56%、11%。造模 42 d, BLM-S 组中度纤维化占比降低至 60%, 轻、重度纤维化占比较低, 分别为 30%、10%; BLM-M 组纤维化中、重度占比较 28 d 有所升高, 分别占 60%、30%。造模 56 d, BLM-S 组纤维化轻、中、重度比例分别为 40%、50%、10%; BLM-

M 组纤维化轻、中度纤维化分别为 33%、67%。造模 84 d, BLM-S 组轻度纤维化比例最高为 64%, 中度为 36%, 未见重度纤维化; BLM-M 组轻、中、重度纤维化均有分布, 但以中度为主占 50%, 轻、重度纤维化分数段分别占 40%、10%。

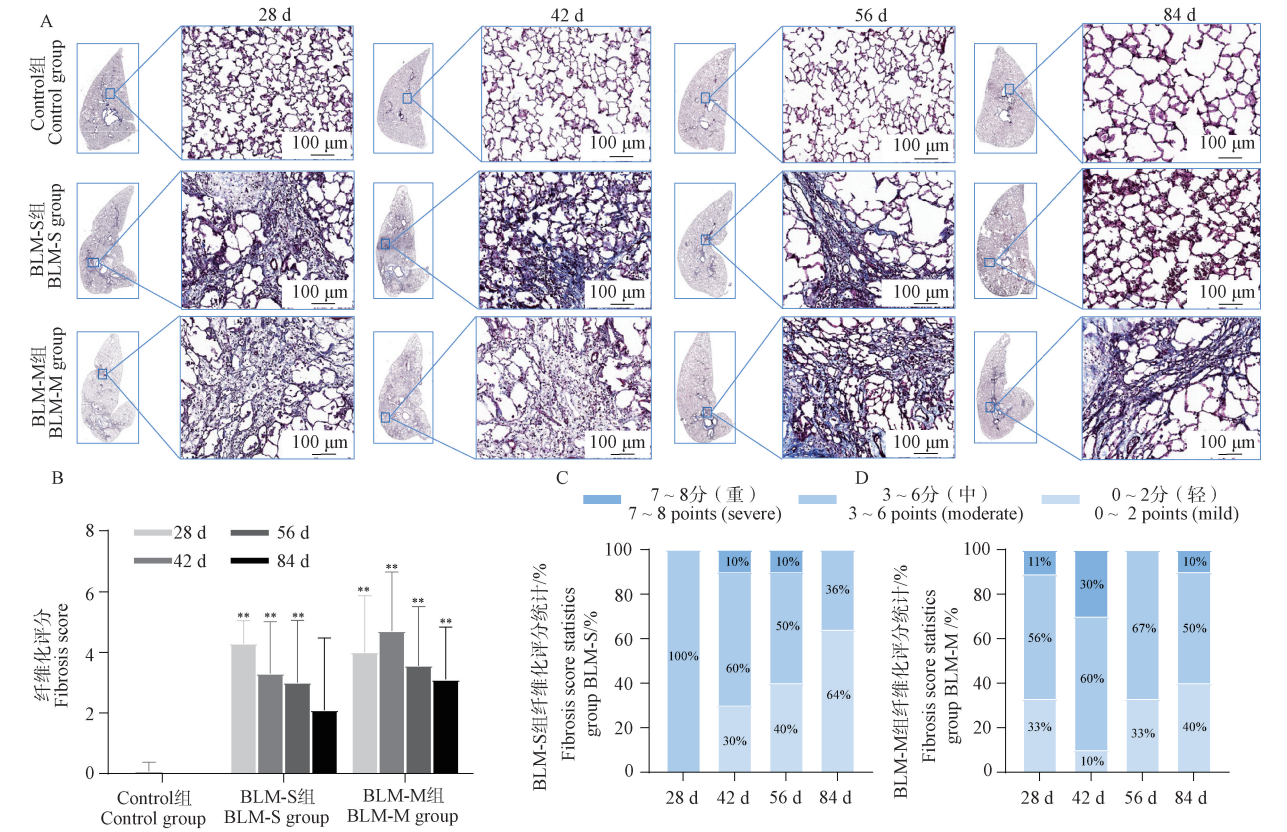


图 4 不同时间点 Masson 染色及纤维化评分情况($n = 7 \sim 12$)

Figure 4 Masson staining and fibrosis scores at different time points($n = 7 \sim 12$)

2.5 各组大鼠肺组织 COL-III 沉积情况

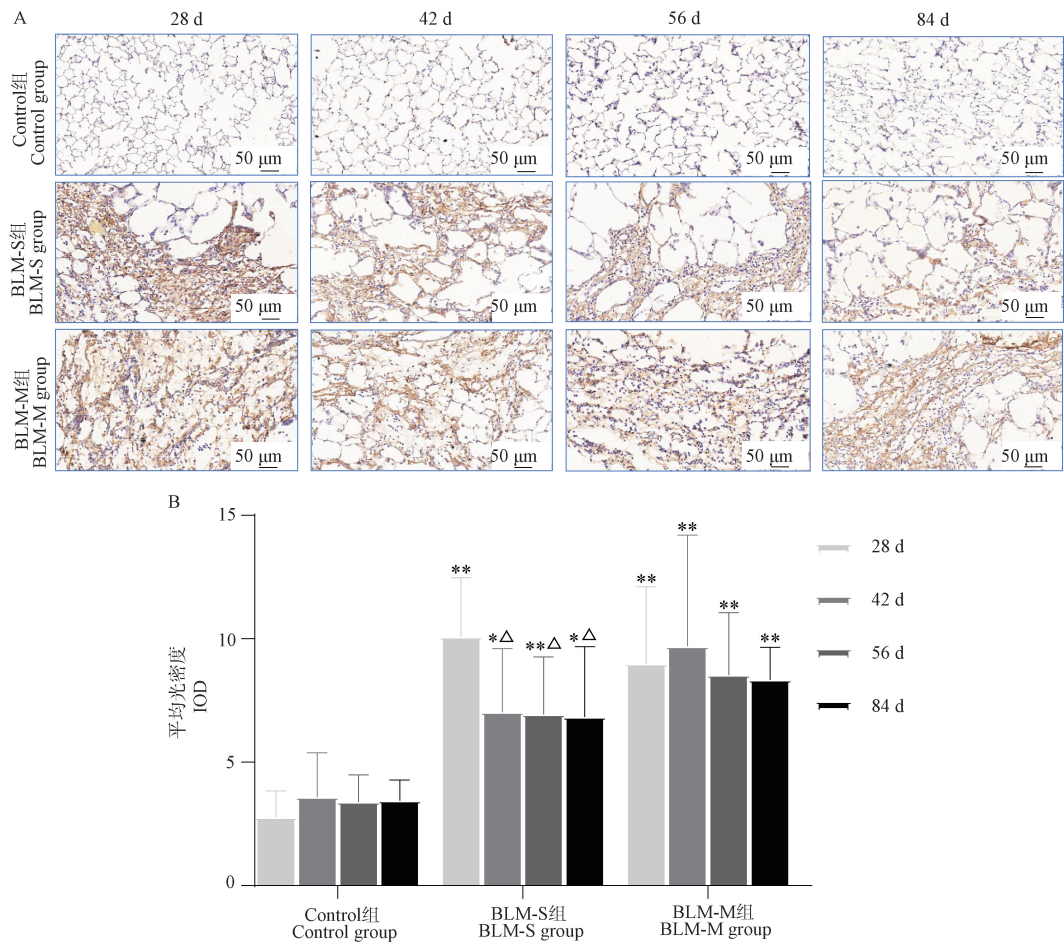
免疫组化结果显示(见图 5):COL-III 主要分布在肺间质、气管、支气管和大血管周围。Control 组 COL-III 的含量较低,仅在气管、支气管周围有少许分布。模型组 COL-III 分布较为广泛,在肺间质和大气管周围尤其突出。第 28 ~ 84 天,与 Control 组相比,BLM-S 组、BLM-M 组的 IOD 值更高,差异具有显著性($P < 0.05$, $P < 0.01$)。造模 28 d,与 BLM-S 组比较,BLM-M 组 IOD 值较小,但无统计学意义。造模 42 d,与 BLM-S 组比较,BLM-M 组 IOD 值升高,但无统计学意义。造模 28 d,BLM-S 组 COL-III 含量达到了高峰,随后随时间的延长,胶原含量呈逐渐递减的趋势($P < 0.01$)。造模 42 d,BLM-M 组 COL-III 含量达到了高峰,但并未随时间的延长,出

现递减的趋势,COL-III 的水平较为稳定,可持续至第 84 天。

3 讨论

IPF 是一种多发于 60 岁以上老年男性的间质性肺部疾病,其病理基础主要是胶原纤维过度堆积和细胞外基质弥漫性的异常分布^[19],患者常表现为进行性加重的呼吸困难,最终因呼吸衰竭而死亡^[20]。IPF 异质性较大,治疗措施有限,发病机制尚未明确,亟需开展新的机制研究。

动物模型是深入研究疾病机制,开发新药的前提,优化动物模型对攻克 IPF 具有重要意义。不同的动物类型诱导的肺纤维化模型不尽相同,目前使用较多的动物主要有:鼠^[21]、兔^[22]、狗^[23]等,其中



注:与 28 d 相比, $\Delta P < 0.05$

图 5 大鼠肺组织不同时间点 COL-III 表达情况

Note. Compared with 28 days, $\Delta P < 0.05$

Figure 5 Expression of COL-III in rat lung tissue at different time points

鼠类价格便宜、个体差异性较小是最为常用的物种。研究证实,包括 BLM、二氧化硅、辐射等多种因素均可诱导动物肺纤维化。BLM 诱导的动物模型与人类肺纤维化的典型特征较为相近,是目前应用最为广泛的一种诱导剂。BLM 致使动物肺纤维化的方式主要有:气管内滴注、雾化鼻吸入、腹腔注射、尾静脉注射等。大量研究表明,给予动物不同频次、不同剂量的 BLM 均可导致动物不同程度的肺纤维化。目前报道的 BLM 诱导大鼠肺纤维化造模方式有:一次性滴注 3.5 U/kg^[24]、3^[25]、5^[26] mg/kg BLM,2 次滴注 5 mg/kg BLM^[27] 等。其中一次性气管内滴注 BLM 方便操作、易于重复、价格便宜。但有研究报道一次性无创性气管内滴注 BLM 造模成功率较低,且模型不稳定,模型可持续时间仅为 21 d^[28]。两次造模法诱导动物肺纤维化,模型稳定,造模成功率较高,弥补了操作技术造成的 BLM 未进入

动物气管的缺陷,模型更加稳定,肺纤维化可持续时间长。但两次气管内滴注法较单次法操作复杂、价格昂贵,对动物造成了 2 次伤害。目前,虽然有部分研究对单多次气管内滴注 BLM 诱导大鼠肺纤维化这一造模方法进行了探索,但多数研究集中于比较模型的成功率和动物的死亡率,却未动态观察动物的自愈性^[29],忽视了模型的稳定性和可持续性,对于不同时间点适宜的造模方法研究较少。

基于此,本研究以 SD 大鼠为研究对象,采用气管内插管滴注 BLM 方法,对比单次及两次给药诱导大鼠肺纤维化的成模率、稳定性和生存率等,明确不同时间点适宜造模方式。将模型组分为单次气管内滴注博来霉素组(3 mg/kg BLM)、两次气管内滴注博来霉素组(首次 3 mg/kg BLM,14 d 时再给 2 mg/kg BLM),并选取 28、42、56、84 d 4 个不同的时间节点,动静态结合,多角度的评价成模情况。旨

在选取合适的造模方法,为构建理想的肺纤维化动物模型提供参考,为探索 IPF 的发生发展机制和有效治疗药物的开发奠定实验基础。

外科肺活检是评价 IPF 的重要指标。本研究表明,造模 28 d 模型组大鼠肺部出现弥漫性的肺损伤,显微镜下可见大量炎性浸润,肺部满布瘢痕组织,肺间隔增宽有纤维病灶形成。单次造模大鼠纤维化程度在造模 28 d 达到了高峰,以中度为主,至第 42 天,10%转为重度,30%转为轻度,后纤维化随时间开始减轻。多次造模大鼠第 28 天纤维化程度以中重度为主,部分处于轻度纤维化,但肺泡炎评分较高。该时间点为第 2 次气管内滴注 BLM 后 14 d,此时肺泡炎和纤维化均存在,与个体差异有关,部分大鼠肺泡炎表现明显;第 42 天纤维病灶面积显著增大并达到高峰,且中重度纤维化达到 90%,表明多次诱导加重了大鼠的肺部损伤,但 56 d 后也有部分大鼠纤维化程度减轻;至 84 d,仍有 60% 大鼠存在明显纤维化病灶,处于中重度纤维化状态。

肺功能是诊断呼吸系统疾病的重要辅助工具,IPF 患者肺组织弹性和扩张能力降低,可表现为限制性的通气功能障碍伴弥散功能降低^[20]。限制性通气功能障碍患者肺容量显著降低,其中 VC、IC 是反映肺容量的重要指标。造模 28,42 d 模型组大鼠 VC、IC 显著降低,提示 BLM 致使大鼠肺容量减低,该结果与 IPF 患者肺容量指标表征一致。造模 56 d BLM-S 组大鼠 VC、IC 有所恢复,但是 BLM-M 组在 84 d 时未见恢复。此外 IPF 患者肺泡结构损伤,纤维病灶形成,可严重影响气体交换供能,常出现肺顺应性降低^[19],Cchord 与 Cdyn 是反映肺部顺应性的常用评价指标。造模 28 d,模型组大鼠肺部动静态顺应性均出现明显降低,其中 BLM-S 组在造模 56 d 时顺应性明显回升,而 BLM-M 组大鼠肺顺应性降低持续至 84 d。

BLM 可诱导肌成纤维细胞大量增殖,肌成纤维细胞增多后产生大量的胶原蛋白,促进细胞外基质堆积,COL-Ⅲ 含量可反映胶原纤维的严重程度^[30]。BLM 刺激后 BLM-S、BLM-M 组大鼠肺组织 COL-Ⅲ 表达显著升高,提示单次及两次气管内滴注 BLM 均成功诱导大鼠胶原纤维增多。组内比较结果表明,BLM-S 组大鼠胶原含量在 42 d 后显著下降,而 BLM-M 组大鼠胶原表达较为稳定。

综上,本研究认为 2 种造模方式均可建立肺纤维化模型。其中造模第 1 天一次性气管内滴注 3

mg/kg BLM,在 28 d 内纤维化程度更高,方便操作、价格便宜、可重复性强,对大鼠气道的损伤较小,死亡率较低,但该种造模方法,在 42 d 后大鼠纤维化明显消退,适合损伤相关机制及疗程较短的疗法机制探索研究。两次滴注 BLM 诱导的大鼠模型,成模率更高,在造模第 42 天纤维化程度达高峰,模型持续时间较长,至 84 d 仍存在明显纤维化,是长周期实验更为理想的造模方法,但该模型操作较单次组复杂,对大鼠气道进行了 2 次损伤,死亡率更高,实验设计时应充分考虑大鼠个体差异及死亡率。但本研究的物种仅选用 SD 大鼠,且观察时间仅 84 d,对于模型的稳定性和持续性尚需进一步优化。

参 考 文 献 (References)

- [1] RICHELDI L, COLLARD H R, JONES M G. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Lancet*, 2017, 389 (10082): 1941-1952.
- [2] SPAGNOLO P, KROPSKI J A, JONES M G, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: disease mechanisms and drug development [J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 222: 107798.
- [3] PODOLANCZUK A J, THOMSON C C, REMY-JARDIN M, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: state of the art for 2023 [J]. *Eur Respir J*, 2023, 61(4): 2200957.
- [4] LYNCH D A, SVERZELLATI N, TRAVIS W D, et al. Diagnostic criteria for idiopathic pulmonary fibrosis: a fleischner society white paper [J]. *Lancet Respir Med*, 2018, 6(2): 138-153.
- [5] RYERSON C J, KOLB M. The increasing mortality of idiopathic pulmonary fibrosis: fact or fallacy? [J]. *Eur Respir J*, 2018, 51(1): 1702420.
- [6] STRONGMAN H, KAUSAR I, MAHER T M. Incidence, prevalence, and survival of patients with idiopathic pulmonary fibrosis in the UK [J]. *Adv Ther*, 2018, 35(5): 724-736.
- [7] GAO J, KALAFATIS D, CARLSON L, et al. Baseline characteristics and survival of patients of idiopathic pulmonary fibrosis: a longitudinal analysis of the swedish IPF registry [J]. *Respir Res*, 2021, 22(1): 40.
- [8] SOMOGYI V, CHAUDHURI N, TORRISI S E, et al. The therapy of idiopathic pulmonary fibrosis: what is next? [J]. *Eur Respir Rev*, 2019, 28(153): 190021.
- [9] TASHIRO J, RUBIO G A, LIMPER A H, et al. Exploring animal models that resemble idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Front Med*, 2017, 4: 118.
- [10] MOURATIS M A, AIDINIS V. Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin [J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2011, 17(5): 355-361.
- [11] RASOOLI R, POURGHOLAMHOSEIN F, KAMALI Y, et al. Combination therapy with pirfenidone plus prednisolone ameliorates paraquat-induced pulmonary fibrosis [J]. *Inflammation*, 2018, 41(1): 134-142.
- [12] QIU M, YANG Z, BIAN M, et al. Protective effects of

- isorhynchophylline against silicon-dioxide-induced lung injury in mice [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2020, 48(1): 1125–1134.
- [13] 郭琦琦, 李毅, 翁桓泽, 等. 生物及非生物因素诱导肺纤维化动物模型研究的特点 [J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26(14): 2273–2278.
- GUO Q Q, LI Y, WENG H Z, et al. Advances in animal models of pulmonary fibrosis induced by biotic and abiotic factors [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2022, 26(14): 2273–2278.
- [14] 李智慧, 余学庆, 杨曙光, 等. 特发性肺纤维化实验模型研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2024, 32(1): 118–127.
- LI Z H, YU X Q, YANG S G, et al. Research progress on experimental models of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2024, 32(1): 118–127.
- [15] 王搏, 宋庆华, 唐会猛, 等. 博来霉素诱导的肺纤维化动物模型研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(12): 1617–1628.
- WANG B, SONG Q H, TANG H M, et al. Progress in animal models of bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(12): 1617–1628.
- [16] 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 and long-term effect mechanism of Fuzheng Tongluo Xiaoji recipe on pulmonary fibrosis based on regulating IKK/I κ B/NF κ B pathway [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine; 2017.
- [17] SZAPIEL S V, ELSON N A, FULMER J D, et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1979, 120(4): 893–899.
- [18] ASHCROFT T, SIMPSON J M, TIMBRELL V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale [J]. *J Clin Pathol*, 1988, 41(4): 467–470.
- [19] BENEGAS URTEAGA M, RAMÍREZ RUZ J, SÁNCHEZ GONZÁLEZ M. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Radiologia (Engl Ed)*, 2022, 64: 227–239.
- [20] RAGHU G, REMY-JARDIN M, RICHELDI L, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis (an update) and progressive pulmonary fibrosis in adults; an official ATS/ERS/JRS/ALAT clinical practice guideline [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2022, 205(9): e18–e47.
- [21] TASHIRO J, RUBIO G A, LIMPER A H, et al. Exploring animal models that resemble idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Front Med*, 2017, 4: 118.
- [22] 郑向鹏, 滑炎卿, 张国桢, 等. III 型胶原纤维在实验性特发性肺纤维化早期的动态研究 [J]. *上海医学*, 2002, 25(4): 205–209.
- ZHENG X P, HUA Y Q, ZHANG G Z, et al. Expression of type III collagen in bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. *Shanghai Med J*, 2002, 25(4): 205–209.
- [23] 王健. 平阳霉素致犬肺纤维化的影像学基础研究 [D]. 西安: 第四军医大学; 1998.
- WANG J. Basic imaging study on pulmonary fibrosis induced by Pingyangmycin in dogs [D]. Xi'an: The Fourth Military Medical University; 1998.
- [24] MILARA J, HERNANDEZ G, BALLESTER B, et al. The JAK2 pathway is activated in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Respir Res*, 2018, 19(1): 24.
- [25] HAREL F, NGUYEN Q T, NSAIBIA M J, 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.
- [26] 陈广瑞, 李俭, 梁笛, 等. 肺纤维化大鼠模型造模方法的优化 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(2): 201–207.
- CHEN G R, LI J, LIANG D, et al. Optimization of modeling method for pulmonary fibrosis rat model [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(2): 201–207.
- [27] 王鹤, 张广平, 侯红平, 等. 博来霉素不同给药方式致大鼠肺纤维化模型探讨 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(11): 73–79.
- WANG H, ZHANG G P, HOU H P, et al. Effect of different administration methods with bleomycin on pulmonary fibrosis in rats [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2019, 25(11): 73–79.
- [28] CHUNG M P, MONICK M M, HAMZEH N Y, et al. Role of repeated lung injury and genetic background in bleomycin-induced fibrosis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003, 29(3): 375–380.
- [29] LI S, SHI J, TANG H. Animal models of drug-induced pulmonary fibrosis: an overview of molecular mechanisms and characteristics [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2022, 38(5): 699–723.
- [30] KARSDAL M A, NIELSEN S H, LEEMING D J, 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.

[收稿日期] 2024-04-13