

宋庆华,唐会猛,孙鑫,等. 不同剂量博来霉素诱导的肺纤维化大鼠模型比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(10): 28-37.
Song QH, Tang HM, Sun X, et al. Comparison of pulmonary fibrosis rat models induced by different dosed of bleomycin [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(10): 28-37.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.10.004

不同剂量博来霉素诱导的肺纤维化大鼠模型比较

宋庆华¹, 唐会猛^{1,3}, 孙鑫^{1,3}, 刘杨¹, 谢云云^{1,3}, 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;3.河南中医药大学第一附属医院,郑州 450000)

【摘要】 目的 比较不同剂量博来霉素 (bleomycin, BLM) 气管内滴注诱导的大鼠肺纤维化 (pulmonary disease, PF) 模型的成功率及稳定性。**方法** 150 只 SD 大鼠随机分为空白组、BLM 低剂量组 (BL-L 组, 3 mg/kg) 和 BLM 高剂量组 (BL-H 组, 5 mg/kg), 造模后观察大鼠一般状态、死亡情况、体重变化, 第 28、42、56、84 天检测大鼠深吸气量 (inspiratory capacity, IC)、肺活量 (vital capacity, VC)、肺准静态顺应性 (chord compliance, Cchord) 和肺动态顺应性 (dynamic compliance, Cdyn), 记录肺系数, HE、MASSON 染色观察肺组织病理变化, 检测肺组织羟脯氨酸 (hydroxyproline, HYP) 含量, 免疫组化检测肺组织胶原蛋白 III (collagen type III, COL III) 表达。**结果** BL-L 组与 BL-H 组的死亡率分别为 20% 和 28%。BL-L 组体重在第 0~56 天低于空白组 ($P<0.01$), 第 56 天以后体重恢复。第 0~56 天 BL-H 组体重显著低于空白组和 BL-L 组 ($P<0.01$)。与空白组比较, 第 28 天, BL-L 组肺功能 IC、VC、Cchord、Cdyn 显著降低 ($P<0.01, P<0.05$), BL-H 组 IC 和 Cdyn 显著下降 ($P<0.05$), 第 42 天, BL-L 组 IC、VC、Cchord 显著下降 ($P<0.01, P<0.05$), BL-H 组 IC、VC、Cchord、Cdyn 显著下降 ($P<0.01, P<0.05$), 且 IC、VC、Cchord 与 BL-L 组相比显著降低 ($P<0.01$), 第 56 天, BL-H 组 Cchord 显著低于空白组和 BL-L 组 ($P<0.01$)。第 28 天, BL-L 组和 BL-H 组肺系数显著高于空白组 ($P<0.01$), 第 42~56 天, BL-H 组肺系数显著高于 BL-L 组和空白组 ($P<0.01$)。BL-L 组在第 28~56 天可观察到炎症浸润、纤维化条索和 COL III 表达, 第 84 天纤维化病变几乎消失, BL-H 组在 28~84 天均可观察到显著纤维化病变, COL III 表达程度显著高于空白组 ($P<0.01$)。第 28~42 天, BL-L 组 HYP 含量显著高于空白组 ($P<0.05, P<0.01$), 后逐渐下降, 第 28~84 天, BL-H 组 HYP 含量显著高于空白组 ($P<0.01$)。**结论** 3 mg/kg 与 5 mg/kg 的 BLM 均可成功制备 PF 大鼠模型, BL-L 组在第 28 天形成肺纤维化, 持续至第 42 天; BL-H 组在第 28 天形成更严重的肺纤维化, 持续至第 56 天, 第 84 天仍有半数存在中重度纤维化。

【关键词】 肺纤维化; 博来霉素; 模型比较

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 10-0028-10

Comparison of pulmonary fibrosis rat models induced by different dosed of bleomycin

SONG Qinghua¹, TANG Huimeng^{1,3}, SUN Xin^{1,3}, LIU Yang¹, XIE Yunyun^{1,3}, TIAN Yange^{1,2*}

(1. Henan University of Chinese Medicine, Co-Construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases by Henan & Education Ministry of PR, Henan Key Laboratory of Chinese Medicine for Respiratory Disease, Zhengzhou 450046, China. 2. Henan University of Chinese Medicine, Academy of Chinese Medical Sciences, Zhengzhou 450046. 3. the First Affiliated Hospital, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000)

【基金项目】 河南省科技研发计划联合基金 (优势学科培育类) (232301420020)。

【作者简介】 宋庆华 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中医药防治呼吸系统疾病。E-mail: monaek@163.com

【通信作者】 田燕歌 (1984—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中医药防治呼吸系统机制与配伍规律。E-mail: yange0910@126.com

[Abstract] Objective To compare the success rate and stability of rat pulmonary fibrosis (PF) models induced by intratracheal instillation of different doses of bleomycin (BLM). **Methods** One hundred and fifty Sprague Dawley rats were divided randomly into control, low-dose BLM 3 mg/kg (BL-L), and high-dose BLM 5 mg/kg (BL-H) groups. General status, mortality, and weight changes were observed, and the lung inspiratory capacity (IC), vital capacity (VC), chord compliance (Cchord), and dynamic compliance (Cdyn) were detected on days 28, 42, 56, and 84. Lung coefficients were recorded and pathological changes in lung tissue were observed by hematoxylin and eosin and Masson staining. The lung hydroxyproline (HYP) content was detected and collagen type III (COL III) was detected by immunohistochemistry. **Results** The mortality rates in the BL-L and BL-H groups were 20% and 28%, respectively. Body weight was significantly lower in the BL-L group compared with the control group on days 0~56, and weight recovery after day 56. Body weight was significantly lower in the BL-H group compared with the control and BL-L groups from days 0~56 ($P<0.01$). Regarding lung function, IC, VC, Cchord, and Cdyn were significantly lower in the BL-L group compared with the control group on day 28 ($P<0.01$, $P<0.05$), and IC and Cdyn were significantly lower in the BL-H group ($P<0.01$). IC, VC, and Cchord were significantly decreased in the BL-L group on day 42 ($P<0.01$, $P<0.05$), while IC, VC, Cchord, and Cdyn were significantly decreased in the BL-H group ($P<0.01$, $P<0.05$), and IC, VC, and Cchord were significantly lower compared with in the BL-L group ($P<0.01$). Cchord was significantly lower in the BL-H group compared with the control and BL-L groups on day 56 ($P<0.01$). The lung coefficients on day 28 were significantly higher in the BL-L and BL-H groups compared with the control group ($P<0.01$), and were significantly higher in the BL-H group from days 42~56 compared with the BL-L and control groups ($P<0.01$). Regarding lung histopathology and immunohistochemistry, inflammatory infiltration, fibrotic streaks, and COL III expression were observed in the BL-L group from days 28~56, and almost complete disappearance of the fibrotic lesions on day 84. In contrast, fibrotic lesions could be observed from days 28~84 in the BL-H group, with significantly elevated COL III expression compared with the control group ($P<0.01$). The HYP content was significantly higher in the BL-L group compared with the control group from days 28~42 ($P<0.05$, $P<0.01$), and then gradually decreased, and the HYP content was significantly higher in the BL-H group than in the control group from days 28~84 ($P<0.01$). **Conclusions** Both 3 and 5 mg/kg BLM can successfully induce PF rat models. Rats treated with 3 mg/kg BLM developed fibrosis on day 28, which lasted until day 42 and then gradually recovered. Rats treated with 5 mg/kg BLM developed fibrosis on day 28, and the degree of fibrosis was more severe with the higher compared with the lower dose, with stable fibrotic lesions up to day 56 and moderate-to-severe fibrosis still present in half of the rats until day 84.

[Keywords] pulmonary fibrosis; bleomycin; model comparison

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

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary disease, IPF) 是一种慢性弥漫性肺间质疾病, 临床表现为进展性的呼吸困难, 病理特征为大量成纤维细胞增殖活化, 细胞外胶原广泛沉积, 并伴随大量炎症细胞浸润, 导致正常肺组织结构被破坏, 出现异常瘢痕增生^[1-2]。在亚太地区, IPF 的患病率估计在 57~451/百万人/年^[3], 并且发病率和死亡率正在逐渐上升^[4-6], IPF 患者的中位生存期约为 2.5~3.5 年^[7-8], 疾病进展导致的呼吸衰竭是 IPF 最常见的死亡原因^[9-10]。IPF 不仅威胁患者生命健康, 降低患者生存质量, 而且极大地加重了社会经济负担。目前临床常用药物为吡非尼酮和尼达尼布, 两者虽然能在一定程度上改善患者肺功能, 降低急性加重率, 但不能阻止病情进展或逆转肺部受损的纤维化区域^[11-12], 且存在诸多不良反应^[13-14]。如今 IPF 的

具体发病机制尚未完全明确, 患者对 IPF 新药的开发需求日益迫切, 探究出一种稳定、有效的动物造模方法对 IPF 的发病机制研究和药效评价研究有着重大意义。

现行的 IPF 动物造模方式众多, 常用的造模方法为使用一定剂量的博来霉素 (bleomycin, BLM) 对实验动物进行不同方式的干预^[15], 但大多数相关研究的实验周期较短, 这是由于 BLM 气管滴注所致的肺纤维化 (pulmonary disease, PF) 动物模型存在自限性, 即在造模完成后的一定时间内, 在不对造模动物进行任何干预的情况下, 其肺纤维化病理学改变会逐渐减轻, 肺功能也会逐渐恢复^[16]。目前尚未有研究对 PF 大鼠进行长期观察, 明确其病变消退的规律。目前实验大鼠常用剂量为 3 mg/kg^[17]、5 mg/kg^[18], 观察周期为第 14、21、28、

56 天^[19-21]。虽然有 BLM 诱导的肺纤维化模型存在自限性的报道^[22],但鲜有研究观察其恢复规律,无法为疗程较长的治疗方案(中药、康复等)提供模型参考。

基于此,本研究选用常用的 SD 大鼠为研究对象,采用 3 mg/kg 和 5 mg/kg BLM 气管内滴注诱导肺纤维化大鼠模型,进行为期 84 d 的追踪观察,对比两者成模情况及模型持续时间,为寻求有效疗法并探讨机制提供借鉴。

1 材料和方法

1.1 实验动物

150 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,6~8 周龄,体重 180~220 g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[SCXK(京)2019-0010]。实验大鼠均饲养于河南中医药大学动物实验室[SYXK(豫)2021-0015],保持室温 21~25℃,湿度 50%,每天昼夜对半循环照明,自由饮水进食,每 3 d 更换 1 次垫料。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),遵守实验动物 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

注射用盐酸博来霉素(规格:每瓶 15 mg,批号 620780),购自日本化药株式会社;苏木素染液(北京索莱宝生物科技有限公司,G1120);伊红染色液染色试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司,G1110);Masson 三色染色试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司,G1340);羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)试剂盒(南京建成生物工程研究所,20240321)。非束缚小动物肺功能测量仪(Buxco, 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(Media Cybernetics, 美国);Milli Synthesis 超净纯水机(Millipore,美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 肺纤维化模型建立及分组

采用随机数表法将 150 大鼠分为空白组、BLM 低剂量组(BL-L 组,3 mg/kg)和 BLM 高剂量组(BL-H 组,5 mg/kg),每组各 50 只。第 1 天,BLM 低剂量组和 BLM 高剂量组大鼠接受一次性气管滴注博来霉素法建立肺纤维化模型,空白组给予生理盐水气管滴注。正常饲养,分别于第 28、42、56、84 天分批次取材。

1.3.2 大鼠一般情况

观察并记录各组大鼠造模前后的精神状态、饮水进食情况、外观变化和行为学变化。

1.3.3 死亡情况

造模结束后将各组大鼠归笼,自由饮水进食,正常环境饲养,统计各组大鼠死亡数量并分析。

1.3.4 体重变化

从造模第 1 天开始,每 14 d 称量 1 次大鼠体重并统计分析。

1.3.5 肺功能

分别于造模前、第 28、42、56、84 天采用动物肺功能检测系统检测大鼠深吸气量(inspiratory capacity, IC)、肺活量(vital capacity, VC)、肺准静态顺应性(chord compliance, Cchord)和肺动态顺应性(dynamic compliance, Cdyn)指标。

1.3.6 肺系数

取材前称量大鼠体重,取出肺组织后称量肺湿重,按以下公式计算肺系数=肺湿重/g/体重/kg×100%。

1.3.7 肺组织病理

使用 4% 的甲醛溶液固定左肺,脱水后进行包埋,切片进行 HE 和 MASSON 染色,显微镜下观察肺组织胶原沉积和肺组织炎症等病理变化。使用 Szapiel 评分^[23]评价肺泡炎症,Ashcroft 评分^[24]评价纤维化程度。

1.3.8 肺组织 HYP 含量

按照 HYP 试剂盒说明书取适量肺组织进行 HYP 含量测定。

1.3.9 肺组织免疫组化

采用免疫组织化学法检测肺组织中 COL III 的表达,每张切片显微镜下采集 10 个视野,使用 IPP 6.0 软件对采集到的图像进行定量分析,结果用积分光密度值(integral optical density, IOD)表示。

1.3.10 各组纤维化程度分析

使用 Ashcroft 评分量表反映大鼠的纤维化病变情况,拟定评分在 0~2 分范围的病变为轻度肺纤维化病变,3~6 分范围为中度肺纤维化病变,7~8 分范围为重度肺纤维化病变,统计各组各时间点的纤维化程度。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 27.0 软件进行统计分析。实验数据以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),符合方差齐性的采用最小显著

差异法 (least-significant difference, LSD), 不符合方差齐性的采用 Dunnett T_3 法。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

空白组大鼠活动自如, 精神状态良好, 饮水进食正常, 毛发洁白光亮; 造模第 0~20 天, BLM 低剂量组大鼠懒动, 精神状态稍差, 饮水进食量减少, 毛发枯黄无光泽, 呼吸稍显急促, 口唇及四肢颜色浅白; BLM 高剂量组大鼠活动受限, 精神萎靡, 毛发干枯, 部分大鼠体型明显瘦弱, 呼吸急促, 鼻翼煽动, 胸廓可见明显呼吸起伏, 唇舌及四肢颜色浅淡, 四肢抓力小。第 21 天以后, 大鼠整体状态较前平稳, 少部分大鼠出现四肢纤弱、腹部异常胀大的情况, 追踪观察发现此类大鼠陆续死亡。

2.2 死亡情况

造模后密切观察并统计各组大鼠死亡情况, 实验期间空白组大鼠无死亡; BLM 低剂量组在造模第 2 天死亡 3 只, 第 3~8 天未出现死亡, 第 9~20 天间断出现死亡, 共计死亡 10 只, 死亡率为 20%, 死亡大鼠鼻头有粘液渗出, 解剖可见肺部大量淤血, 胸膜粘连, 少数大鼠肺部可观察到灰白色瘢痕。 BLM 高剂量组在造模第 2~12 天连续出现大鼠死亡, 共计死亡 14 只, 死亡率为 28%, 死亡大鼠鼻头、眼角有少量血液渗出, 气管内可见大量黄色黏性分泌物, 肺部均可见大量淤血。 BLM 低剂量组和 BLM 高剂量组死亡率均显著高于空白组 ($P<0.01$)。见图 1。

2.3 体重变化

实验期间各组大鼠体重整体呈上升趋势, 在第 14 天, BLM 低剂量组体重显著低于空白组 ($P<0.01$), BLM 高剂量组体重显著低于空白组和 BLM 低剂量组 ($P<0.01$); 第 28 天至第 56 天, BLM 低剂量组和 BLM 高剂量组体重增长缓慢, 且 BLM 高剂量组体重显著低于空白组 ($P<0.01$); 第 70 天开始, 3 组大鼠体重差异均无统计学意义, 见图 2。

2.4 肺功能

实验期间空白组和 BLM 低剂量组肺功能随日龄增加稳步提升, 但 BLM 低剂量组肺功能较空白组增长缓慢, 第 28~42 天, BLM 低剂量组大鼠 IC、VC、Cchord、Cdyn 显著低于空白组 ($P<0.01$, $P<0.05$), 第 56~84 天, BLM 低剂量组肺功能仍低于空白组, 但无统计学意义。 BLM 高剂量组大鼠第 28 天 IC

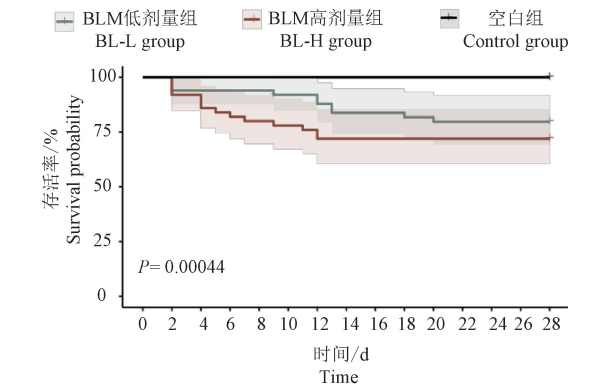
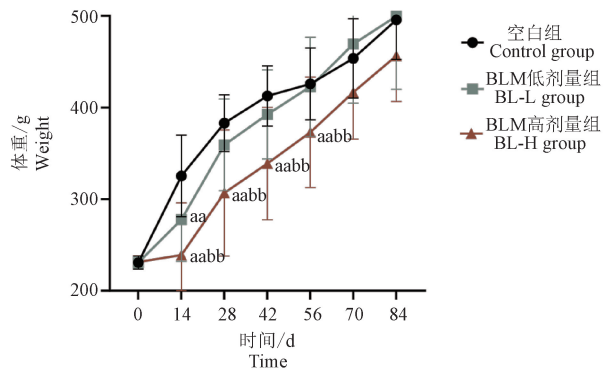


图 1 各组大鼠 28 d 生存曲线
Figure 1 28-day survival curve of each group



注: 与空白组比较, ^{aa} $P<0.01$; 与 BLM 低剂量组比较, ^{bb} $P<0.01$ 。

图 2 各组大鼠体重变化 ($n\geq 8$)

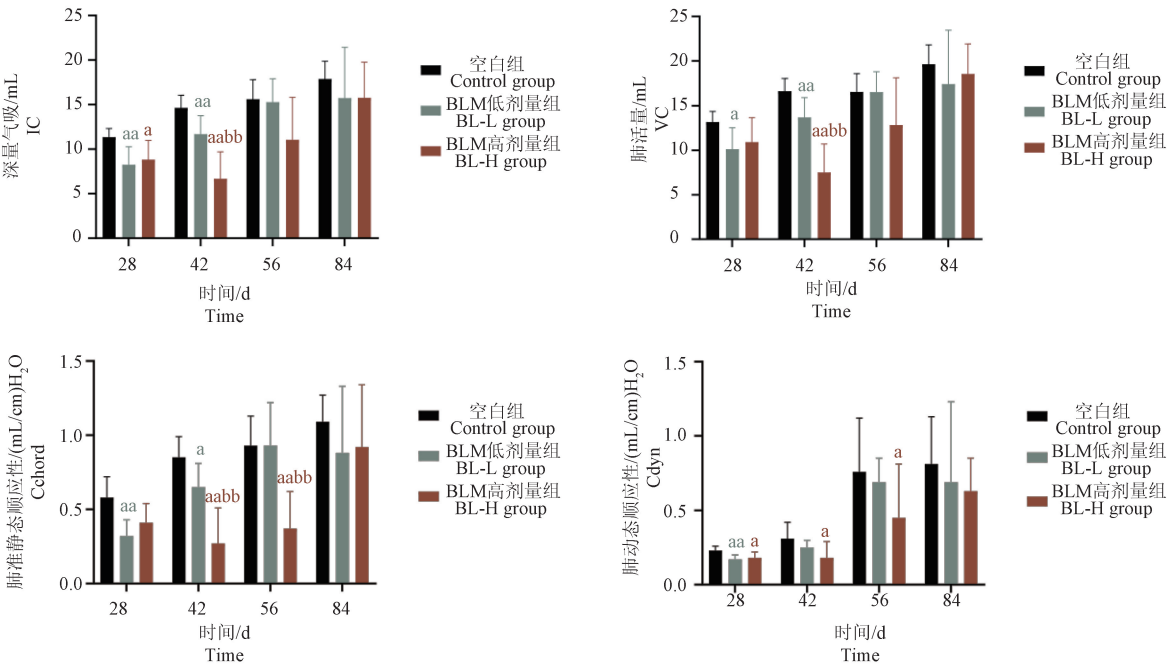
Note. Compared with control group, ^{aa} $P<0.01$. Compared with BL-L group, ^{bb} $P<0.01$.

Figure 2 Changes in body weight of rats

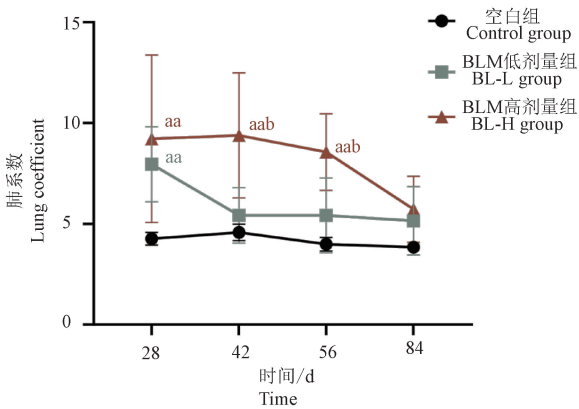
和 Cdyn 显著低于空白组 ($P<0.01$); 第 42 天, IC、VC、Cchord、Cdyn 均显著低于空白组 ($P<0.01$, $P<0.05$), 且 IC、VC、Cchord 显著低于 BLM 低剂量组 ($P<0.01$); 第 56 天, Cchord、Cdyn 显著低于空白组 ($P<0.01$, $P<0.05$); 第 84 天, 肺功能仍低于空白组, 但无统计学意义。两组肺功能均随时间缓慢增长, 增长速度低于空白组, 考虑与动物体重增加有关。见图 3。

2.5 肺系数

观察期间空白组大鼠的肺系数无明显变化。第 28 天, BLM 低剂量组和 BLM 高剂量组肺系数显著高于空白组 ($P<0.01$)。第 42~56 天, BLM 高剂量组肺系数显著高于空白组和 BLM 低剂量组 ($P<0.01$, $P<0.05$), BLM 低剂量组肺系数略高于空白组, 但无统计学意义。第 84 天, 各组肺系数无明显差异, 见图 4。



注:与空白组比较,^a*P*<0.05,^{aa}*P*<0.01;与BLM低剂量组比较,^b*P*<0.01。
图3 各组大鼠肺功能IC、VC、Cchord和Cdyn变化(*n*=6~10)
Note. Compared with control group, ^a*P*<0.05, ^{aa}*P*<0.01. Compared with BL-L group, ^b*P*<0.01.
Figure 3 Changes in IC, VC, Cchord and Cdyn of rat lung function



注:与空白组比较,^a*P*<0.05,^{aa}*P*<0.01;与BLM低剂量组比较,^b*P*<0.05。
图4 各组大鼠肺系数变化(*n*=8~12)
Note. Compared with control group, ^a*P*<0.05, ^{aa}*P*<0.01. Compared with BL-L group, ^b*P*<0.05.
Figure 4 Changes in rat lung coefficient

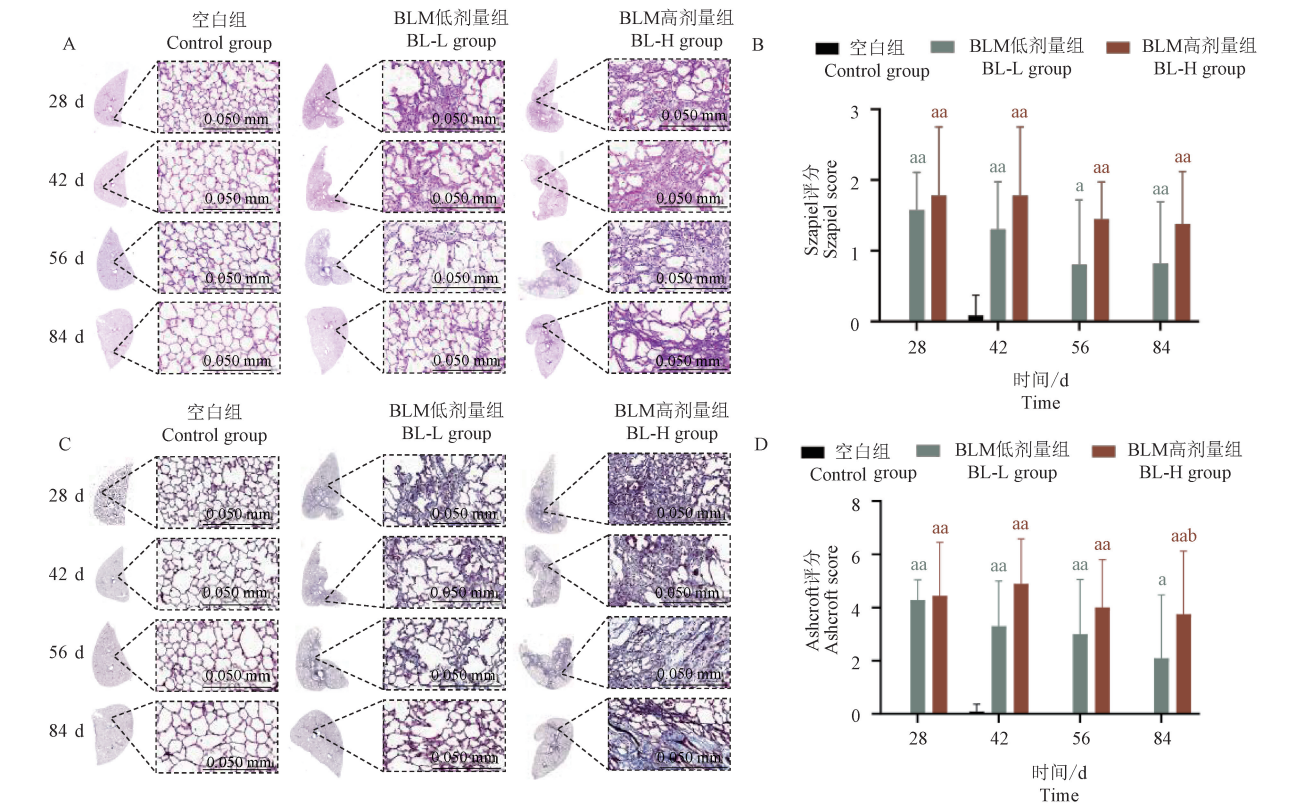
2.6 肺组织病理

肺组织病理结果显示,各时间点的空白组大鼠肺组织结构正常,肺泡壁清晰完整,无损伤。造模第28天,BLM低剂量组和BLM高剂量组大鼠肺组织HE染色可见肺泡腔内有炎性细胞浸润,肺泡壁破裂,肺组织结构紊乱,MASSON染色可见广泛蓝染

的纤维条索和明显胶原沉积。造模第42天,BLM低剂量组大鼠的炎症情况较第28天减轻,多数大鼠纤维化病变依旧严重,但有少数大鼠肺组织纤维化病变出现一定程度的消退,BLM高剂量组大鼠肺组织广泛形成纤维化病变,Ashcroft评分较第28天升高。造模第56天,BLM低剂量组大鼠的肺泡炎症和肺纤维化程度明显减轻,BLM组肺泡炎症改善,多数大鼠肺组织纤维化病变较第42天无明显变化,部分大鼠纤维化病变有所消退。造模第84天,BLM低剂量组大鼠的纤维化病变持续消退,部分大鼠肺组织已无明显纤维化病变,BLM高剂量组大鼠纤维化病变较之前明显改善,但仍有部分大鼠存在严重的纤维化病变。见图5。

2.7 肺组织HYP含量

如图6HYP含量测定结果显示,空白组大鼠肺组织HYP含量在各时间点无明显变化。随着造模时间的推移,BLM低剂量组HYP含量呈现下降趋势,在第28~42天,HYP含量显著高于空白组(*P*<0.05,*P*<0.01),第56~84天HYP含量仍高于空白组,但无统计学意义。而BLM高剂量组HYP含量先呈上升趋势,在第42天达到峰值,后逐渐下降,但都显著高于空白组(*P*<0.01)。

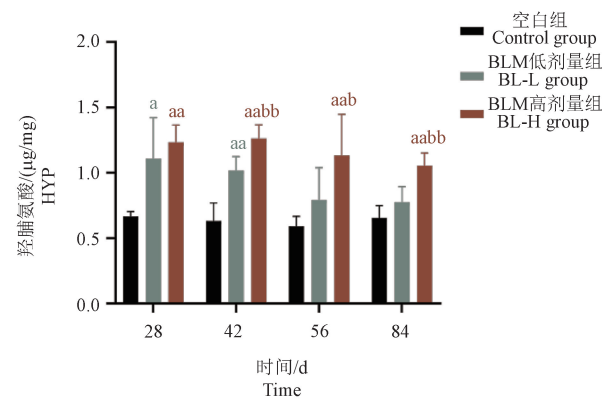


注:A:大鼠肺组织 HE 染色;B:大鼠肺组织 Szapiel 评分;C:大鼠肺组织 MASSON 染色;D:大鼠肺组织的 Ashcroft 评分。与空白组比较,^a $P<0.05$,^{aa} $P<0.01$,与 BLM 低剂量组比较,^b $P<0.05$ 。

图 5 各组大鼠肺组织病理变化及评分

Note. A, HE staining of rat lung tissue. B, Szapiel score of rat lung tissue. C, MASSON staining of rat lung tissue. D, Ashcroft score of rat lung tissue. Compared with control group, ^a $P<0.05$, ^{aa} $P<0.01$. Compared with BL-L group, ^b $P<0.05$.

Figure 5 Histopathologic changes and scores of rat lungs



注:与空白组比较,^a $P<0.05$,^{aa} $P<0.01$,与 BLM 低剂量组比较,^b $P<0.05$,^{bb} $P<0.01$ 。

图 6 各组大鼠肺组织 HYP 含量($n=6$)

Note. Compared with control group, ^a $P<0.05$, ^{aa} $P<0.01$. Compared with BL-L group, ^b $P<0.05$, ^{bb} $P<0.01$.

Figure 6 HYP content in lung tissue of rats

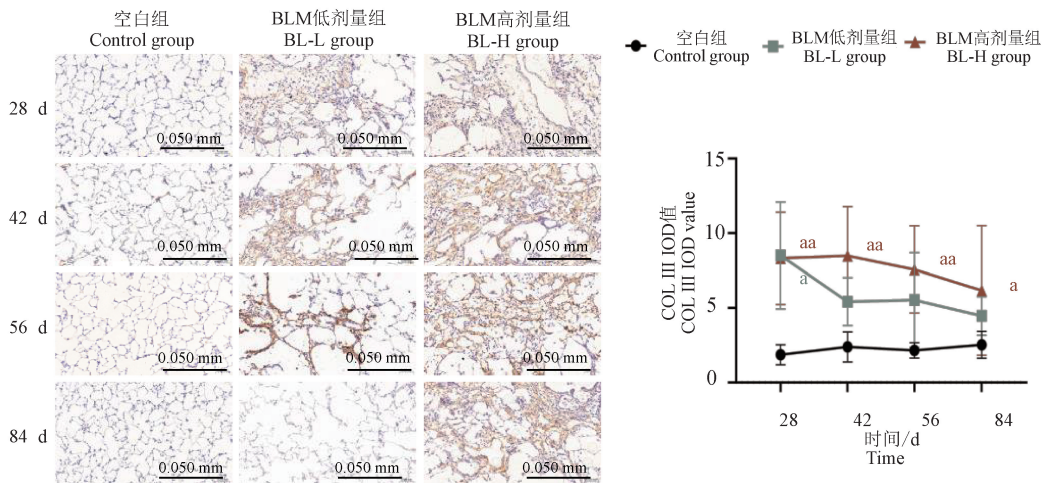
2.8 肺组织 COL III 表达

肺组织免疫组化结果显示,与空白组相比,BLM

低剂量组在造模第 28 天可观察到大鼠肺间质 COL III 高表达($P<0.05$);在第 42、56 天 COL III 表达降低,第 84 天仅可观察到肺泡结构破坏;BLM 高剂量组大鼠在 4 个时间点均可观察到 COL III 高表达($P<0.01$, $P<0.05$)。见图 7。

2.9 各组纤维化程度分析

如图 8 所示,根据各组各时间点 Ashcroft 评分情况评价大鼠的纤维化程度,第 28 天,BLM 低剂量组大鼠均出现中度 PF 病变,BLM 高剂量组则有 11.11%的大鼠轻度 PF 病变,66.67%中度病变,22.22%的大鼠重度病变。第 42 天,BLM 低剂量组有 30.00%大鼠轻度病变,60%的大鼠中度病变,10%重度病变,有明显的纤维化改变,而 BLM 高剂量组大鼠的整体病变情况和第 28 天一致。第 56 天,BLM 低剂量组有 40.00%的大鼠轻度 PF 病变,50%中度病变,10%重度病变,BLM 高剂量组则有 22.22%的大鼠轻度病变,66.67%中度病变,11.11%重度病变,两组肺纤维化病变出现一定程度



注:与空白组比较,^a $P<0.05$,^{aa} $P<0.01$ 。
图 7 肺组织 COL III 蛋白表达($n=8\sim12$)

Note. Compared with control group, ^a $P<0.05$, ^{aa} $P<0.01$.

Figure 7 COL III protein expression in lung tissue

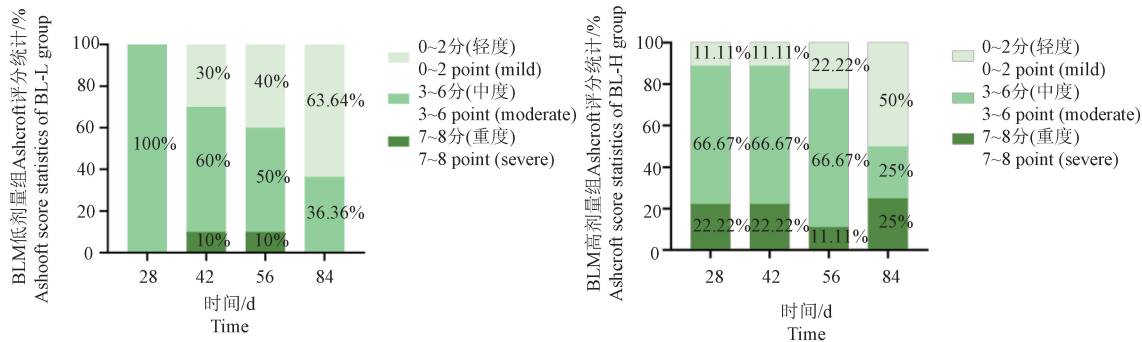


图 8 各组大鼠各时间点 Ashcroft 评分统计

Figure 8 Ashcroft score statistics of different groups of rats at different times

的消退。第 84 天, BLM 低剂量组有 63.64% 的大鼠轻度病变, 多数大鼠的纤维化病变明显减轻, 而 BLM 高剂量组有 50.00% 的大鼠轻度病变, 50% 中重度病变。

3 讨论

稳定的动物模型是研究疾病发病机制、探寻有效防治方法及机制的关键。多种因素可诱导肺纤维化动物模型, 如 BLM、石棉、二氧化硅、百草枯等, 其中 BLM 诱导的肺纤维化模型因其易操作、可复现、成模速度快、与人类疾病典型特征相似等优点而应用广泛, 造模动物包括鼠、猫、狗、马、兔、羊、猪等, 鼠类为最常用的造模动物; 诱导方式有气管内滴注、气管内雾化、尾静脉注射、腹腔注射和经鼻吸入, 以气管内滴注尤为常见^[25], BLM 造模剂量则根

据实验动物品种不同存在差异, 使用剂量大多在 3~5 mg/kg 范围内^[26-30]。BLM 诱导的肺纤维化病变会在一定时间内自行消退, 但其消退时间、消退程度及消退速度与 BLM 剂量的关系尚不清楚, 导致 IPF 的病理机制研究和药物作用评价均受限制。本研究旨在对比 3 mg/kg 和 5 mg/kg 两种 BLM 造模剂量制备的 PF 模型在不同时间节点的肺纤维化整体情况, 明确其病理阶段, 评价其成模特点。

肺功能为判断 PF 模型是否成功制备的重要指标, 由于肺纤维化大鼠肺组织弹性降低, 肺容积下降, 影响了肺通气功能和换气功能, 吸气时肺组织难以充分扩张, 呼气时也难以完全排出气体, 表现为深吸气量 IC 和肺活量 VC 的下降^[31]。纤维化的发生影响肺顺应性变化, 使准静态顺应性 Cchord 和动态顺应性 Cdyn 均降低^[32]。本研究发现, 两种剂

量 BLM 诱导的 PF 大鼠肺容积和肺顺应性第 28 天均显著降低,3 mg/kg BLM 干预 PF 模型肺功能持续到第 42 天,5 mg/kg BLM 干预的 PF 大鼠的肺功能下降持续到第 56 天。

有研究指出,肺纤维化从炎症期到纤维化形成期间的病理阶段可大致分为 3 期:急性炎症期、急性炎症-纤维化交界期、纤维化稳定期^[33-35]。炎症是肺纤维化的启动因素,肺部受到有害物质的刺激时会激活巨噬细胞、中性粒细胞、淋巴细胞等炎症细胞,释放 TGF- β 、TNF- α 、IL-6 等细胞因子,加剧肺部炎症^[36],导致肺组织结构破坏和炎症细胞聚集。若刺激强度过大或者刺激因素持续存在,会刺激成纤维细胞转化为肌成纤维细胞,分泌过多的胶原蛋白和其他的细胞外基质对受损肺组织进行异常修复,表现为肺泡壁增厚,肺组织出现纤维条索或纤维团块,最终导致肺纤维化的发生^[37]。本研究发现,第 28 天,两组大鼠肺泡腔内出现炎症细胞的大量聚集和广泛蓝染的纤维条索,BLM 低剂量组大鼠均处于急性炎症-纤维化交界期,且纤维化病变已基本形成。而 BLM 高剂量组大鼠受到更加强烈持久的炎症刺激,纤维化阶段在时间轴上的变化要滞后于 BLM 高剂量组,处于急性炎症-纤维化交界期,但肺功能尚未完全恶化,纤维化病变正在形成。停止 BLM 刺激一段后,大鼠炎症状态会逐渐消退,进入稳定的肺纤维化病理阶段^[38]。细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 增加是肺纤维化的主要病理特征^[39],胶原蛋白是 ECM 的主要成分,尤其是 I 型和 III 型胶原蛋白^[40],而 HYP 是胶原蛋白特有的氨基酸^[41],其含量变化可以反映肺纤维化的严重程度,肺系数也会随着肺纤维化的发生而上升。第 42 天,BLM 低剂量组多数大鼠已度过炎症期,COL III 大量表达,HYP 含量显著增加,处于肺纤维化稳定期,而 BLM 高剂量组肺组织的纤维化病灶进一步扩大,HYP 含量显著高于空白组和 BLM 低剂量组,进入纤维化稳定期,纤维化病变全面形成。随着观察时间增加,大鼠的 PF 病变逐渐消退,第 56 天,BLM 低剂量组有接近半数的大鼠纤维化病变有显著消退,BLM 高剂量组多数大鼠处于纤维化稳定期,纤维化病变依旧明显。第 84 天,BLM 低剂量组大鼠的肺纤维化病变已出现大范围的消退,BLM 高剂量组有半数大鼠纤维化病变减轻,但仍有部分大鼠纤维化持续存在,少数进行性加重。

本研究结果表明,3 mg/kg 和 5 mg/kg 的 BLM

均可成功制备 PF 模型,但 5 mg/kg 的 BLM 对大鼠造成的刺激更大,会导致更多数量的大鼠死亡,对大鼠的生长抑制也更加明显。同时发现,两种剂量 BLM 诱导的 PF 模型皆存在较大组内差异,即同一剂量 BLM 干预的 PF 大鼠在同一时间点会出现部分大鼠纤维化病变消退,部分大鼠病变进行性加重的情况,提示造模过程应尽可能统一操作者水平,实验过程应充分考虑动物死亡率及个体差异,以免出现较大误差。

同时本研究也对实验设计有一些启示。进行肺纤维化相关实验时可根据实验目的选择不同剂量的博来霉素制备动物模型,选择恰当的时间点进行观察。在进行损伤机制相关研究时,两个剂量均可选用,观察的时间点在第 28 天前;如进行损伤后修复机制探讨,3 mg/kg 的模型研究点可选取第 28~42 天,5 mg/kg 的模型可选取第 42~84 天;在进行疗程相对较长的疗法疗效及机制研究时,可选用 5 mg/kg BLM 诱导的模型。但需注意的是,不同品系动物、不同来源 BLM、不同造模方式等对模型的特点和稳定性均有影响,研究中需注意观察。

参考文献:

- [1] RICHELDI L, COLLARD H R, JONES M G. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Lancet, 2017, 389 (10082): 1941-1952.
- [2] CHENG H, FENG D, LI X, et al. Iron deposition-induced ferroptosis in alveolar type II cells promotes the development of pulmonary fibrosis [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2021, 1867 (12): 166204.
- [3] MAHER T M, BENDSTRUP E, DRON L, et al. Global incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Respir Res, 2021, 22 (1): 197.
- [4] HUTCHINSON J, FOGARTY A, HUBBARD R, et al. Global incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review [J]. Eur Respir J, 2015, 46 (3): 795-806.
- [5] HARARI S, MADOTTO F, CAMINATI A, et al. Epidemiology of idiopathic pulmonary fibrosis in northern Italy [J]. PLoS One, 2016, 11 (2): e0147072.
- [6] DUCHEMANN B, ANNESI-MAESANO I, JACOB DE NAUROIS C, et al. Prevalence and incidence of interstitial lung diseases in a multi-ethnic county of Greater Paris [J]. Eur Respir J, 2017, 50 (2): 1602419.
- [7] American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 161 (2 Pt 1): 646-664.
- [8] American Thoracic Society, European Respiratory Society.

- American thoracic society/European respiratory society international multidisciplinary consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001 [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 165(2): 277-304.
- [9] LEY B, COLLARD H R, KING T E Jr. Clinical course and prediction of survival in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 183(4): 431-440.
- [10] CAI M, ZHU M, BAN C, et al. Clinical features and outcomes of 210 patients with idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Chin Med J*, 2014, 127(10): 1868-1873.
- [11] PETNAK T, LERTJITBANJONG P, THONGPRAYOON C, et al. Impact of antifibrotic therapy on mortality and acute exacerbation in idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review and meta-analysis [J]. *Chest*, 2021, 160(5): 1751-1763.
- [12] DEMPSEY T M, SANGARALINGHAM L R, YAO X, et al. Clinical effectiveness of antifibrotic medications for idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2019, 200(2): 168-174.
- [13] 中华医学会呼吸病学分会间质性肺病学组, 中国医师协会呼吸医师分会间质性肺疾病工作委员会. 特发性肺纤维化急性加重诊断和治疗中国专家共识 [J]. *中华医学杂志*, 2019, 99(26): 2014-2023.
- Interstitial Lung Disease Group of the Respiratory Disease Branch of the Chinese Medical Association, Interstitial Pulmonary Disease Working Committee of the Respiratory Physician Branch of the Chinese Medical Association. China expert consensus on diagnosis and treatment of acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Natl Med J China*, 2019, 99(26): 2014-2023.
- [14] 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.
- [15] MOURATIS M A, AIDINIS V. Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin [J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2011, 17(5): 355-361.
- [16] IZBICKI G, SEGEL M J, CHRISTENSEN T G, et al. Time course of bleomycin-induced lung fibrosis [J]. *Int J Exp Pathol*, 2002, 83(3): 111-119.
- [17] 廖一羲, 王搏, 邱志广, 等. 博来霉素诱导的肺纤维化大鼠肺组织病理和超微结构变化 [J]. *中国病理生理杂志*, 2023, 39(12): 2296-2304.
- LIAO Y X, WANG B, QIU Z G, et al. Lung histopathological and ultrastructural changes in rats with bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2023, 39(12): 2296-2304.
- [18] 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 M M, ZHAO Y K, 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.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 杨兴娜, 舒艳梅, 王金梁. 合并酸误吸的特发性肺纤维化大鼠抑酸治疗研究 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2019, 33(4): 330-332.
- YANG X N, SHU Y M, WANG J L. Effect of acid suppression therapy on idiopathic pulmonary fibrosis in rats with acid aspiration [J]. *J Chin Pract Diagn Ther*, 2019, 33(4): 330-332.
- [22] JENKINS R G, MOORE B B, CHAMBERS R C, et al. An official American thoracic society workshop report: use of animal models for the preclinical assessment of potential therapies for pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2017, 56(5): 667-679.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] ABIDI A, BAHRI S, BEN KHAMSA S, et al. A comparative study of intratracheal and aerosolization instillations of bleomycin inducing experimental lung fibrosis in rat [J]. *Toxicol Mech Methods*, 2019, 29(2): 75-85.
- [27] PAN T, ZHOU Q, MIAO K, et al. Suppressing Sirt1 to modulate macrophage polarization by siRNA-loaded liposomes: a promising therapeutic strategy for pulmonary fibrosis [J]. *Theranostics*, 2021, 11(3): 1192-1206.
- [28] LEE T H, YEH C F, LEE Y T, 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.

[29] 陈孟毅, 孟爱民. 肺纤维化动物模型及研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(6): 88-93.

CHEN M Y, MENG A M. Introduction and research progress of animal models of pulmonary fibrosis [J]. Chin J Comp Med, 2016, 26(6): 88-93.

[30] 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.

[31] 王岚, 柴桦, 梁斌苗, 等. 结缔组织疾病合并肺纤维化-肺气肿综合征 20 例临床分析并文献复习 [J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2017, 16(5): 484-489.

WANG L, CHAI H, LIANG B M, et al. Analysis of clinical characteristics of combined pulmonary fibrosis emphysema syndrome in 20 patients with connective tissue disease [J]. Chin J Respir Crit Care Med, 2017, 16(5): 484-489.

[32] 朱蕾, 刘又宁, 钮善福. 临床呼吸生理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.

ZHU L, LIU Y N, NIU S F. Clinical respiratory physiology [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008.

[33] NOBLE P W, BARKAUSKAS C E, JIANG D. Pulmonary fibrosis: patterns and perpetrators [J]. J Clin Invest, 2012, 122(8): 2756-2762.

[34] WICK G, GRUNDTMAN C, MAYERL C, et al. The immunology of fibrosis [J]. Annu Rev Immunol, 2013, 31: 107-135.

[35] 彭玉华. 特发性肺间质纤维化中医药治疗思路与方法 [J]. 中医药学刊, 2003, 21(10): 1774-1775.

PENG Y H. Thoughts and methods of treating idiopathic pulmonary interstitial fibrosis with traditional Chinese medicine [J]. Study J Tradit Chin Med, 2003, 21(10): 1774-1775.

[36] 孙健, 沈巨信. 炎症与细胞自噬与急性肺损伤关系的研究进展 [J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(17): 2163-2168.

SUN J, SHEN J X. Research progress on relationship between inflammation and autophagy with acute lung injury [J]. Chin J Immunol, 2019, 35(17): 2163-2168.

[37] HERRERA J, FORSTER C, PENG T, et al. Registration of the extracellular matrix components constituting the fibroblastic focus in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. JCI Insight, 2019, 4(1): e125185.

[38] 吕晓东, 庞立健. 博来霉素致大鼠肺纤维化模型肺组织不同时间点的动态演变 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(3): 508-511.

LYU X D, PANG L J. Bleomycin induced rat model of pulmonary fibrosis lung tissue at different time points dynamic evolution process [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2010, 28(3): 508-511.

[39] 陈金燃, 郭凯宁, 谢灵枫, 等. 细胞外基质的异常黏滞力经 talin1-vinculin 结合促进放射性肺纤维化进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2023, 37(z1): 31.

CHEN J R, GUO K N, XIE L F, et al. The aberrant viscosity of the extracellular matrix is promoted by the binding of talin1-vinculin to promote the progression of radiopulmonary fibrosis [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2023, 37(z1): 31.

[40] 李茜, 李小静, 李心怡. 富含半胱氨酸型酸性糖蛋白在皮肤纤维化疾病中的研究进展 [J]. 实用临床医药杂志, 2023, 27(6): 137-140.

LI Q, LI X J, LI X Y. Research progress on secreted protein acidic and rich in cysteine in skin fibrosis disease [J]. J Clin Med Pract, 2023, 27(6): 137-140.

[41] 梁杏梅, 刘喜华, 黄建春, 等. 玉朗伞查尔酮对心肌缺血再灌注损伤大鼠 NF- κ B 信号通路的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(8): 35-41.

LIANG X M, LIU X H, HUANG J C, et al. Effect of Yulangsan Chalcone on the nuclear factor- κ B signaling pathway in rats with myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(8): 35-41.

[收稿日期]2024-06-11