

任周新,赵鹏,李建生. 烟雾暴露联合克雷伯杆菌感染诱导大鼠肺小动脉病变的评估 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(8): 27-36.

Ren ZX, Zhao P, Li JS. Evaluation of pulmonary arteriolar lesions in rats induced by cigarette smoke exposure combined with *Klebsiella* infection [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(8): 27-36.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.08.004

# 烟雾暴露联合克雷伯杆菌感染诱导大鼠肺小动脉病变的评估

任周新<sup>1,2</sup>, 赵鹏<sup>1,2</sup>, 李建生<sup>1,2\*</sup>

(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.河南中医药大学中医药科学院, 郑州 450046)

**【摘要】** 目的 分析烟雾暴露联合克雷伯杆菌感染诱导大鼠的肺小动脉形态结构的变化, 评估肺小动脉病变的严重程度。方法 对烟雾暴露联合克雷伯杆菌感染大鼠的肺组织切片(对照组和模型组)进行分析。维多利亚蓝染色切片用于肺小动脉肌化、血管壁厚度、血管阻塞分值、肌性血管的内膜和中膜厚度以及新生内膜增殖度的检测; HE染色切片用于血管周围炎症细胞浸润及丛状病变等形态的观察和检测; VG染色切片用于内膜胶原纤维和肺小动脉胶原纤维面积百分率的观察和检测。综合以上结果, 按照 Heath-Edwards 标准对肺小动脉病变程度进行评级。结果 对于血管直径 $\leq 50 \mu\text{m}$ 的肺小动脉, 与对照组比较, 模型组非肌性血管百分率显著减少( $P < 0.01$ ), 肌性血管百分率显著增加( $P < 0.01$ ), 部分肌性血管百分率无显著性差异( $P > 0.05$ ), 非肌性血管壁厚度和肌性血管壁厚度均显著增加( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 非肌性和肌性肺小动脉血管的阻塞分值均显著增加( $P < 0.05, P < 0.01$ )。对于  $50 \mu\text{m} < \text{血管直径} \leq 100 \mu\text{m}$  的肺小动脉, 与对照组比较, 模型组的非肌性血管百分率显著减少( $P < 0.05$ ), 肌性血管百分率和部分肌性血管百分率均无显著性差异( $P > 0.05$ ), 肌性血管壁厚度和血管阻塞分值均显著增加( $P < 0.05$ ), 非肌性血管壁厚度和血管阻塞分值均无显著性差异( $P > 0.05$ )。对于血管直径 $\leq 50 \mu\text{m}$ 或  $50 \mu\text{m} < \text{血管直径} \leq 100 \mu\text{m}$  的肺肌性小动脉, 与对照组比较, 模型组内膜厚度和中膜厚度均显著增加( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 血管周围炎症浸润分值均显著增加( $P < 0.05, P < 0.01$ )。对照组( $n=9$ )仅1个切片发现新生内膜, 新生内膜增殖度为1.61%。模型组( $n=10$ ), 5个切片存在新生内膜, 新生内膜增殖度从1.04%到17.14%。所有切片均未发现丛状病变。对于血管直径 $\leq 100 \mu\text{m}$ 的肺小动脉, 与对照组比较, 模型组内膜胶原纤维表达未观察到变化, 血管胶原纤维面积百分率无显著性差异( $P > 0.05$ )。按照 Heath-Edwards 标准, 模型大鼠的肺小动脉病变未达到 III 级。结论 模型大鼠出现了肺小动脉肌化、内膜和中膜增厚等病理表现, 血管周围存在轻度到中度的炎症反应。较低的新生内膜增殖度和未出现胶原纤维表达的变化及未出现丛状病变, 提示该模型属于 Heath-Edwards 标准的 II 级病变。

**【关键词】** 肺小动脉重构; II 级病变(Heath-Edwards 分级); 病理学评估; 新生内膜; 丛状病变; 香烟烟雾暴露复合克雷伯杆菌感染; 大鼠

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 08-0027-10

## Evaluation of pulmonary arteriolar lesions in rats induced by cigarette smoke exposure combined with *Klebsiella* infection

REN Zhouxin<sup>1,2</sup>, ZHAO Peng<sup>1,2</sup>, LI Jiansheng<sup>1,2\*</sup>

(1. Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases Co-constructed by Henan Province and Education Ministry, 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】** 国家中医临床研究基地业务建设第二批科研专项项目(JDZX2015156); 河南省高等学校重点科研项目(24A360013)。

**【作者简介】** 任周新(1969—), 男, 高级实验师, 博士, 研究方向: 呼吸系统疾病中医药防治基础研究。E-mail: renzhouxin123@126.com

**【通信作者】** 李建生(1963—), 男, 教授, 博士, 研究方向: 中医药防治呼吸疾病。E-mail: li\_js8@163.com

**[Abstract] Objective** To analyze the morphological and structural changes to pulmonary arterioles in rats induced by smoke exposure combined with *Klebsiella* infection, and to evaluate the severity of the pulmonary arteriolar lesions. **Methods** Pulmonary arteriolar images from lung sections of control and model rats treated with smoke exposure combined with *Klebsiella* infection were analyzed by qualitative and quantitative method. Victorian-blue-stained sections were used for the detection of pulmonary arteriolar muscularization, vascular wall thickness, vascular occlusion score, the intima thickness and media thickness of muscular arterioles, and neointima proliferation. Hematoxylin and eosin-stained sections were used for the observation and detection of inflammatory cell infiltration and plexiform lesions around arterioles. Van Gieson-stained sections were used for the observation of collagen fibers in the intima and detection of the percentage of collagen fiber area in the arteriolar wall. Based on the above analyses, the degree of pulmonary arteriolar pathology was rated according to Heath-Edwards criteria. **Results** For  $\leq 50 \mu\text{m}$  diameter arterioles, the percentage of non-muscular vessels was significantly decreased ( $P < 0.01$ ), the percentage of muscular vessels was increased ( $P < 0.01$ ), the percentage of partial muscular vessels was not significantly different ( $P > 0.05$ ), the thicknesses of the non-muscular vessel walls and muscular vessel walls were significantly increased ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), and the occlusion scores of both non-muscular and muscular pulmonary arterioles were significantly increased in the model group compared with the Control group ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). For  $50 \mu\text{m} < \text{diameter} \leq 100 \mu\text{m}$  arterioles, the percentage of non-muscular vessels was significantly decreased ( $P < 0.05$ ), the percentages of muscular vessels and partial muscular vessels were not significantly different ( $P > 0.05$ ), the wall thickness and occlusion score of muscular vessels were significantly increased ( $P < 0.05$ ), and the wall thickness and occlusion score of non-muscular vessels were not significantly different in the model group compared with the Control group ( $P > 0.05$ ). Compared with the Control group, the model group showed significantly increased intimal thickness and media thickness and significantly increased perivascular inflammatory infiltration score in both muscular arterioles of  $\leq 50 \mu\text{m}$  diameter and  $50 \mu\text{m} < \text{diameter} \leq 100 \mu\text{m}$  ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). In the Control group ( $n = 9$ ), only one section with two neointimal lesions was found, and the degree of neointima proliferation was 1.61%. In the model group ( $n = 10$ ), five sections had neointima lesions, and the degree of neointima proliferation was 1.04% to 17.14%. No plexiform lesions were found in any section. For pulmonary arterioles with a diameter of  $\leq 100 \mu\text{m}$ , there was no change in the expression of intimal collagen fibers in the model group compared with the Control group, and there was no significant difference in the percentage of collagen fiber area in the vessel walls ( $P > 0.05$ ). According to Heath-Edwards criteria, the pulmonary arteriole lesions in the model rats did not reach grade III. **Conclusions** The model rats showed pathological manifestations such as pulmonary arteriolar muscularization, thickening of the intima and media, and mild to moderate inflammatory reactions around arterioles. The low amount of neointimal proliferation and collagen fibers in the vascular wall and the absence of plexiform lesions suggest that the model may be up to grade II lesions, according to the Heath-Edwards criteria.

**[Keywords]** pulmonary arterioles remodeling; grade II lesions (Heath-Edwards classification); pathological evaluation; neointima; plexiform lesions; cigarette smoke exposure combined with *Klebsiella* infection; rats

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

肺动脉高压 (pulmonary hypertension, PH) 常见于慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 患者。香烟烟雾及致病菌等侵袭肺血管, 导致血管壁及其周围的炎症细胞浸润、血管内皮损伤、平滑肌异常增殖和胶原纤维增生等, 形成肺血管的异常重构和 PH<sup>[1]</sup>。烟雾暴露联合克雷伯杆菌感染的大鼠或小鼠具有典型的 COPD 和 PH 的病理学和病理生理学表现<sup>[2-5]</sup>。多项研究发现造模 8 周是一个重要的节点, 此时大鼠肺小动脉表现出管壁异常增厚、管腔狭窄和肺小动脉肌化等病

变, 形成肺动脉高压; 之后, 在正常饲养环境中, 肺小动脉异常病变持续一定时间<sup>[2-5]</sup>。

在药效学等研究和临床诊断中, 病理学是评估肺动脉重塑的金标准<sup>[1]</sup>。但以往研究在上述模型肺小血管的病理学方面存在不足, 未能阐释肺小动脉是否出现如丛状病变等不可逆性的严重血管病变、未比较不同直径大小的肺小动脉血管的病变程度以及缺乏血管壁纤维化程度及周围炎症程度的量化评估等。本研究在前期研究的基础上, 应用定性和定量相结合的方法, 对模型大鼠肺小动脉进行

病理形态学的检测与分析,评估肺小动脉异常重构的严重程度,重点诠释肺小动脉的病理损伤相当于 Heath-Edwards 标准的等级,以期为 COPD 相关 PH 的肺小动脉重构的机制及药效学研究提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

健康雌性 SD 大鼠,SPF 级,19 只,体重(164.0±17.7)g,购自江苏青龙山生物科技有限公司[SCXK(苏)2017-0001]。大鼠饲养于河南中医药大学动物实验中心[SYXK(豫)2015-0005],饲养和实验过程均符合 3R 原则。本实验经河南中医药大学实验动物伦理委员会审核批准(DWLL2018030063)。

### 1.2 主要试剂与仪器

克雷伯杆菌(*Klebsiella pneumoniae*, Kp)购自中国食品药品检定研究院,使用前配成 $6 \times 10^8$  CFU/mL 的混悬液。红旗渠牌过滤嘴香烟(烤烟型,焦油量 10 mg,烟气烟碱量 0.8 mg,烟气一氧化碳量 12 mg)由河南中烟工业有限责任公司提供。

戊巴比妥钠购自 Merck 公司;苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色液购自 Beyotime Biotechnology;维多利亚蓝弹力纤维(TANAKE Victoria blue)染色液和 Van Gieson(VG)染色液购自北京索莱宝公司。PE50 导管购自英国 Smith Medical 公司;Leica-DM6000B 光学显微镜及 LAS V4.7 照相系统购自德国 Leica 公司;Image-Pro Plus (IPP) 6.0 专业图像分析系统购自美国 Media Cybernetics 公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 模型制备和分组

大鼠适应环境 7 d,随机分为对照组( $n=9$ )和造模组( $n=10$ ),对照组大鼠正常饲养;其余大鼠采用香烟烟雾暴露联合细菌感染的方法制备模型<sup>[2]</sup>:大鼠吸气时,经鼻腔滴入 Kp 液 $6 \times 10^8$  CFU/mL,0.1 mL,每 5 d 1 次,持续 8 周;点燃香烟并使烟熏箱烟雾浓度保持(3000±500) mL/m<sup>3</sup>,每次 40 min,每天两次,两次烟熏间隔至少 3 h,持续 8 周。造模结束后 4 周处死动物。

#### 1.3.2 实验动物的麻醉、处死和灌注

采用戊巴比妥钠(9 g/L 生理盐水溶液)腹腔注射的方式麻醉大鼠。按照文献<sup>[2]</sup>方法分离颈动脉及右颈外静脉;把含肝素的 PE50 导管经右颈外静脉插入肺动脉;之后,戊巴比妥钠腹腔注射麻醉致

死大鼠;剪断腹主动脉和静脉,经 PE 管先后灌注磷酸缓冲盐溶液和 4% 多聚甲醛,直到腹主动脉无血液流出。

#### 1.3.3 肺组织切片的染色

采用 4% 多聚甲醛固定左肺,乙醇脱水、石蜡包埋和制片,切片厚度 4 μm。采用 HE、TANAKE Victoria blue 和 VG 染色液,分别按照说明书染色切片。

#### 1.3.4 肺小动脉图像的获取

每个样本的 3 种染色的病理切片,分别在 200 倍或 400 倍的光学显微镜下,拍摄并保存所有的肺小血管,以减少人为的选择偏差。按照图 1 所示,对肺小血管进行病理形态学检测和分析。

#### 1.3.5 肺小动脉肌化的评估

维多利亚蓝弹力纤维染色的切片用于肺小动脉肌化的检测。参照文献<sup>[6-7]</sup>并略作修改,选择最长直径(外层弹力板围绕)≤50 μm 或 50 μm<最长直径≤100 μm 的血管并且最长/最短直径比<2 的血管,用于肺小动脉肌化程度的评估。肺动脉肌化程度按如下标准分类:肌性动脉,含有双层弹力板且超过血管周长的一半;部分肌性动脉,含有双层弹力板但不足血管周长的一半;非肌性动脉,含有一层弹力板。计算各型小动脉数量占总小动脉数量的百分率。

#### 1.3.6 肺小动脉壁厚度和肺小动脉阻塞的评估

参照文献<sup>[6]</sup>,选择维多利亚蓝弹力纤维染色的切片,选择最长直径(外层弹力板围绕)≤50 μm 或 50 μm<最长直径≤100 μm 的血管,排除最长/最短直径比>2、圆形不完整或塌陷超过血管壁 1/4 的血管。合格的血管应用 Image Pro Plus 6.0 软件描记血管的外弹力板,闭合曲线的面积为血管的面积(area 1)。以 $2 \times \sqrt{\text{area}1/\pi}$ 作为该面积的直径,标识为 outer Φ。描记血管腔,获得相应的面积(area 2),以 $2 \times \sqrt{\text{area}2/\pi}$ 作为该面积的直径,标识为 lumen Φ。按照公式 $(\text{outer } \Phi - \text{lumen } \Phi)/2$ 计算血管壁厚度,按照公式 $100 \times [(\text{outer } \Phi - \text{lumen } \Phi)/\text{outer } \Phi]$ 计算血管阻塞分值。

#### 1.3.7 肺肌性小动脉内膜及中膜厚度的评估

选择维多利亚蓝弹力纤维染色的切片,选择最长直径(外层弹力板围绕)≤50 μm 或 50 μm<最长直径≤100 μm 的血管,排除最长/最短直径比>2、圆形不完整或塌陷超过血管壁 1/4 的血管。采用 Image Pro Plus 6.0 软件描记内弹力板,获得闭合曲

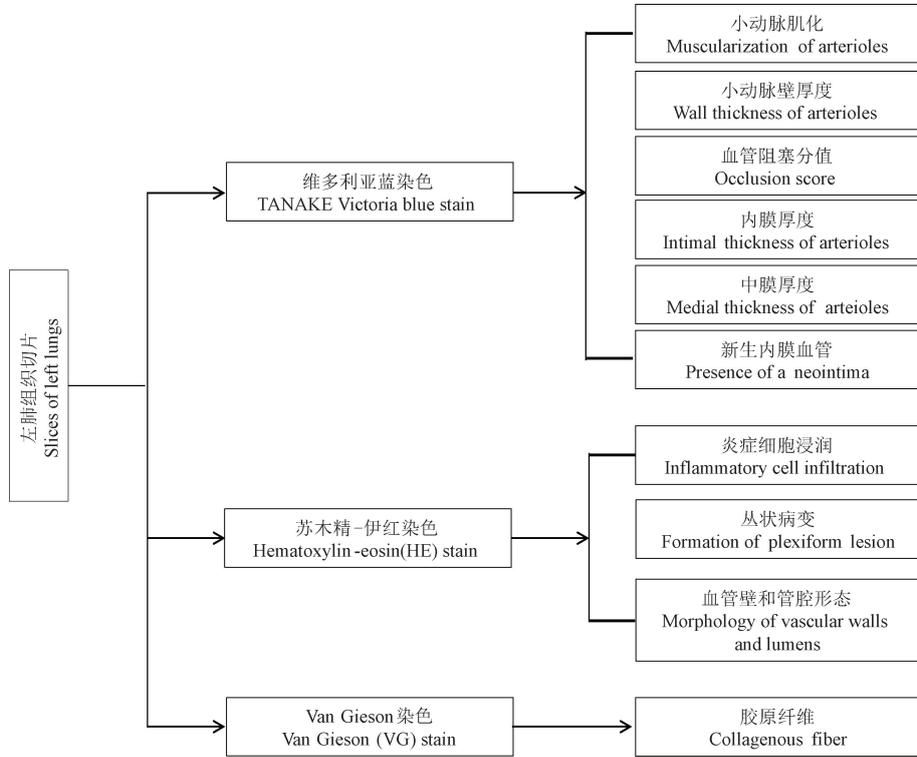


图 1 肺小血管病理形态学检测流程图

Figure 1 Process of pathomorphological examination of pulmonary arterioles

线的面积( area 3);以  $2 \times \sqrt{\text{area}3/\pi}$  作为该面积的直径,标识为 Inner  $\Phi$ 。按照公式  $(\text{outer } \Phi - \text{Inner } \Phi)/2$  计算血管中膜厚度,  $(\text{Inner } \Phi - \text{lumen } \Phi)/2$  计算血管内膜厚度。

### 1.3.8 新生内膜血管的判断

选择维多利亚蓝弹力纤维染色的切片,分析直径  $\leq 100 \mu\text{m}$  的肺小动脉,计算新生内膜增殖度<sup>[6,8]</sup>。新生内膜增殖度/% = 新生内膜血管数/总血管数  $\times 100\%$ 。新生内膜的判别标准<sup>[6]</sup>为:含有外弹力板,内弹力板不完整,在内弹力板内侧与内皮之间存在新生内膜,并存在管腔阻塞。

### 1.3.9 血管周围炎症细胞浸润的评估

选择 HE 染色的切片,选择最长直径(外层弹力板围绕)  $\leq 50 \mu\text{m}$  或  $50 \mu\text{m} <$  最长直径  $\leq 100 \mu\text{m}$  的血管,排除最长/最短直径比  $> 2$ 、圆形不完整或塌陷超过血管壁 1/4 的血管。参照文献<sup>[9]</sup>,半定量评价小动脉壁炎症细胞浸润程度,即:无:记 0 分;轻度:记 1 分,炎症细胞浸润血管壁周围不超过 25%;中度:记 2 分,炎症细胞浸润血管壁周围在 25% ~ 50%;重度:记 3 分,炎症细胞浸润血管壁周围在 50% ~ 75%;极重度:记 4 分,炎症细胞浸润血管壁周围在 75% 以上。

### 1.3.10 血管腔狭窄及丛状病变的观察

选择 HE 染色的切片,选择最长直径(外层弹力板围绕)  $\leq 50 \mu\text{m}$  或  $50 \mu\text{m} <$  最长直径  $\leq 100 \mu\text{m}$  的血管,排除最长/最短直径比  $> 2$ 、圆形不完整或塌陷超过血管壁 1/4 的血管。计数管腔狭窄并且具有多个狭小通道或单个狭小通道的血管,计算其占检测血管的百分率。参照文献的描述<sup>[10-12]</sup>判断样本中肺小动脉丛状病变出现的百分率,丛状病变的组织形态为茎样血管腔内生长(stalk-like)型丛状病变或动脉瘤样血管腔外生长(aneurysm-like)丛状病变,后者病变呈血管球状结构;丛状病变的病灶内细胞核深染卵圆形,相邻细胞之间存在“缝隙样”通道(slit-like channel)。

### 1.3.11 血管胶原纤维增生的检测

选择 VG 染色的切片,按照染色结果判断:胶原纤维呈鲜红色,肌纤维和红细胞呈黄色,细胞核呈蓝色或蓝黑色。选择直径  $\leq 100 \mu\text{m}$  的肺小动脉,排除最长/最短直径比  $> 2$ 、圆形不完整或塌陷超过血管壁 1/4 的血管。观察胶原纤维的表达。参照文献<sup>[13]</sup>,应用 Image Pro Plus 6.0 软件检测胶原纤维面积、血管壁面积,计算二者比值。即胶原纤维面积百分率/% = 胶原纤维面积/血管壁面积  $\times 100\%$ 。

### 1.3.12 Heath-Edwards 评估

以临床 PH 的肺血管病理形态学的 Heath-Edwards 分类标准为基础<sup>[14]</sup>,参照 PH 大鼠的研究资料<sup>[6,11-12]</sup>,将大鼠的肺小动脉病理损伤分为 4 级,即:I 级,血管中膜肥厚,内膜没有增生;II 级,血管中膜肥厚,伴有内膜增厚;III 级,内膜纤维增生或多数血管(至少 50%)具有新生内膜;IV 级,丛状病灶。

### 1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计学分析。计量资料用平均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间样本均数比较采用两样本均数的 Unpaired *t* test 检验,以  $P < 0.05$  为有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 两组大鼠的肺小动脉血管分型

维多利亚蓝染色大鼠肺动脉壁弹力纤维,按照弹力纤维完整程度,将肺小动脉区分为非肌性血管(non-muscular pulmonary arterioles, N-MPA)、部分肌性血管(partial muscular pulmonary arterioles, P-MPA)和肌性血管(muscular pulmonary arterioles, MPA),见图 2。对于血管直径  $\leq 50 \mu\text{m}$  的肺小动脉,与对照组比较,模型组的非肌性血管百分率显著减少( $P < 0.01$ ),肌性血管百分率显著增加( $P < 0.01$ ),部分肌性血管百分率无显著性差异( $P >$

$0.05$ )。对于  $50 \mu\text{m} < \text{直径} \leq 100 \mu\text{m}$  的肺小动脉,与对照组比较,模型组的非肌性血管百分率显著减少( $P < 0.05$ ),肌性血管百分率和部分肌性血管百分率均无显著性差异( $P > 0.05$ )。见表 1。

### 2.2 两组大鼠的肺小动脉壁厚度和血管阻塞分值

对于血管直径  $\leq 50 \mu\text{m}$  的肺小动脉,与对照组比较,模型组的非肌性血管壁厚度和肌性血管壁厚度均显著增加( $P < 0.05, P < 0.01$ ),模型组的非肌性和肌性肺小动脉血管的阻塞分值均显著增加( $P < 0.05, P < 0.01$ )。对于  $50 \mu\text{m} < \text{血管直径} \leq 100 \mu\text{m}$  的肺小动脉,与对照组比较,模型组的肌性血管壁厚度和血管阻塞分值均显著增加( $P < 0.05$ ),非肌性血管的血管壁厚度和血管阻塞分值均无显著性差异( $P > 0.05$ )。见图 3,表 2、表 3。

### 2.3 两组大鼠的肺肌性小动脉内膜厚度和中膜厚度

对于血管直径  $\leq 50 \mu\text{m}$  的肺小动脉,与对照组比较,模型组的内膜厚度显著增加( $P < 0.01$ ),中膜厚度显著增加( $P < 0.01$ )。对于  $50 \mu\text{m} < \text{血管直径} \leq 100 \mu\text{m}$  的肺小动脉,与对照组比较,模型组的内膜厚度显著增加( $P < 0.05$ ),中膜厚度显著增加( $P < 0.05$ )。见表 4 和图 3。

### 2.4 两组大鼠的肺小动脉新生内膜的观察结果

按照 van der Feen 等<sup>[6]</sup>原则判断肺小动脉的新

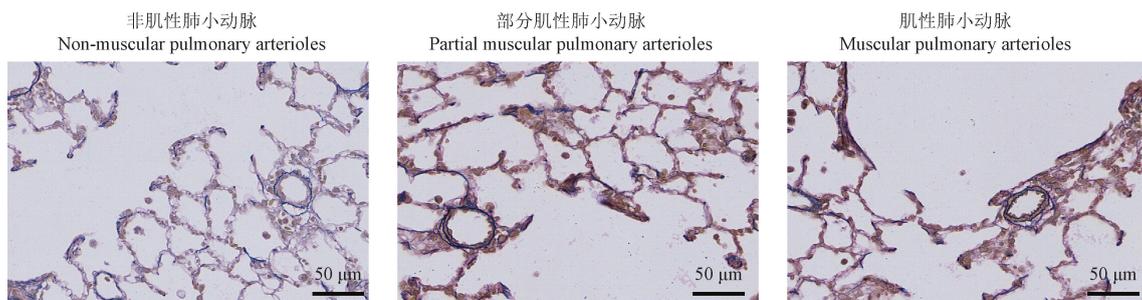


图 2 非肌性、部分肌性和肌性肺小动脉的形态(维多利亚蓝弹力纤维染色)

Figure 2 Morphology of non-muscular, partial muscular and muscular pulmonary arterioles (TANAKE Victoria blue stain)

表 1 两组大鼠的肺小动脉中非肌性、部分肌性和肌性血管百分率( $\bar{x} \pm s, \%$ )  
Table 1 Percentages of N-MPA, P-MPA and MPA of rats between the two groups

直径/ $\mu\text{m}$ Diameter, <i>D</i>	组别 Groups	非肌性血管 N-MPA	部分肌性血管 P-MPA	肌性血管 MPA
$50 \leq D$	对照组 Control group	81.31±9.25	7.79±4.37	10.90±9.14
	模型组 Model group	64.68±11.55**	10.01±5.91	25.31±9.37**
$50 < D \leq 100$	对照组 Control group	49.70±10.27	9.85±4.68	40.45±11.55
	模型组 Model group	38.67±12.08*	11.45±5.85	49.61±13.01

注:与对照组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

Note. Compared with Control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

生内膜,见图 4。对照组 9 只大鼠中,1 只发现 2 个小动脉出现新生内膜,新生内膜增殖度为 1.61%,其它大鼠未发现新生内膜形成。模型组 10 只大鼠中,5 只大鼠未发现肺小动脉的新生内膜形成;5 只大鼠的肺小动脉存在新生内膜,新生内膜增殖度依次为:1.04%、1.12%、10.17%、11.44%和 17.14%。

## 2.5 两组大鼠的血管周围炎症细胞浸润及丛状病变等形态观察结果

对于血管直径 $\leq 50 \mu\text{m}$ 的肺小动脉,与对照组比较,模型组的血管周围炎症浸润评分显著增加( $P < 0.01$ );对于 $50 \mu\text{m} < \text{血管直径} \leq 100 \mu\text{m}$ 的肺小动脉,与对照组比较,模型组的血管周围炎症浸润评分显著增加( $P < 0.05$ )。该结果提示,模型大鼠的肺血管周围具有明显的炎症浸润现象。在较为严重的血管腔狭窄的形态上,两者区别明显,对于血管直径 $\leq 50 \mu\text{m}$ 的肺小动脉,管腔狭窄且具有多个狭小的通道或单个狭小通道的百分率,对照组与模型组分别为 0.90%和 5.54%;对于 $50 \mu\text{m} < \text{血管直径} \leq 100 \mu\text{m}$ 的肺小动脉,管腔狭窄且具有多个狭小的

表 2 两组大鼠的肺小动脉壁厚度( $\bar{x} \pm s, \mu\text{m}$ )

Table 2 Small pulmonary arterial wall thickness of rats between the two groups

直径/ $\mu\text{m}$ Diameter, <i>D</i>	组别 Groups	非肌性血管 N-MPA	肌性血管 MPA
$50 \leq D$	对照组 Control group	2.400 $\pm$ 0.555	4.213 $\pm$ 1.160
	模型组 Model group	3.405 $\pm$ 1.230*	6.767 $\pm$ 1.537**
$50 < D \leq 100$	对照组 Control group	5.418 $\pm$ 2.180	6.000 $\pm$ 1.298
	模型组 Model group	6.497 $\pm$ 3.352	8.709 $\pm$ 3.160*

注:与对照组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

Note. Compared with Control group,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ .

通道或单个狭小通道的百分率,对照组与模型组分别为 0.56%和 3.86%。所有样本的血管,均未发现丛状病变。见表 5 和图 5。

## 2.6 两组大鼠肺小动脉胶原纤维的表达

如图 6 所示,胶原纤维在血管壁均有分布,模型组血管内膜(血管腔到内弹力膜之间)的胶原纤维

表 3 两组大鼠的肺小动脉血管阻塞分值( $\bar{x} \pm s, \%$ )

Table 3 Occlusion score of small pulmonary arterioles of rats between the two groups

直径/ $\mu\text{m}$ Diameter, <i>D</i>	组别 Groups	非肌性血管 N-MPA	肌性血管 MPA
$50 \leq D$	对照组 Control group	16.64 $\pm$ 3.87	24.10 $\pm$ 7.48
	模型组 Model group	23.40 $\pm$ 6.17*	39.15 $\pm$ 9.50**
$50 < D \leq 100$	对照组 Control group	20.67 $\pm$ 7.29	21.73 $\pm$ 5.39
	模型组 Model group	23.38 $\pm$ 10.61	30.16 $\pm$ 8.76*

注:与对照组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

Note. Compared with Control group,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ .

表 4 两组大鼠的肺肌性小动脉内膜和中膜厚度( $\bar{x} \pm s, \mu\text{m}$ )

Table 4 Small pulmonary arterial wall thickness of rats between the two groups

直径/ $\mu\text{m}$ Diameter, <i>D</i>	组别 Groups	内膜厚度 Intima thickness	中膜厚度 Media thickness
$50 \leq D$	对照组 Control group	1.860 $\pm$ 0.413	2.354 $\pm$ 0.816
	模型组 Model group	2.826 $\pm$ 0.903**	3.940 $\pm$ 0.906**
$50 < D \leq 100$	对照组 Control group	2.308 $\pm$ 0.718	3.588 $\pm$ 0.875
	模型组 Model group	3.276 $\pm$ 1.078*	5.433 $\pm$ 2.302*

注:与对照组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

Note. Compared with Control group,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ .

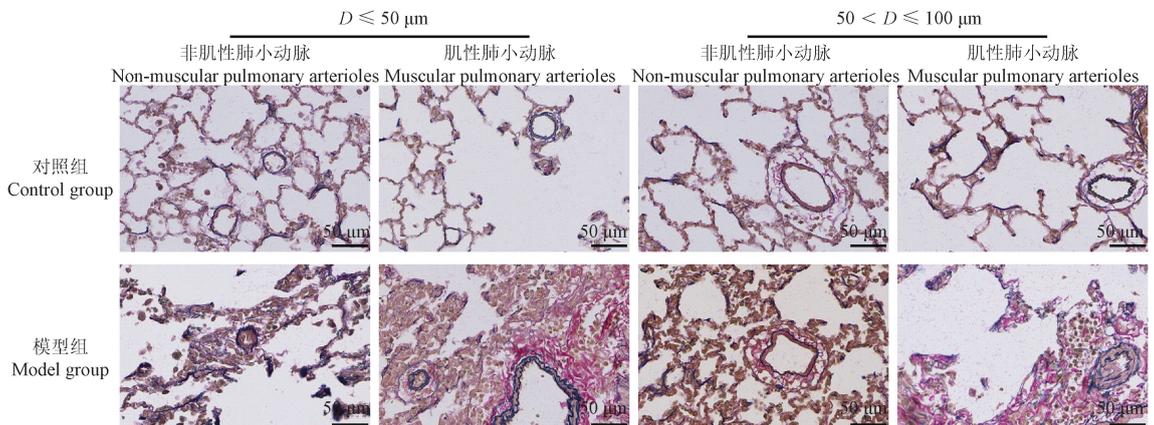


图 3 大鼠肺小动脉壁的形态表现(维多利亚蓝弹力纤维染色)

Figure 3 Morphology of pulmonary arterial wall in rats (TANAKE Victoria blue stain)

未见明显变化。另外,模型组的外弹力膜周围有炎症细胞浸润的部分血管,外弹力膜完全被胶原纤维包绕(模型组 1)或几乎无胶原纤维包绕(模型组 2)。对照组部分血管的外弹力膜周围没有或较少炎症细胞,但也存在完全包绕(对照组 1)或无包绕(对照组 2)的表现。检测血管直径  $\leq 100 \mu\text{m}$  的肺小动脉血管胶原纤维面积百分率,与对照组 ( $9.28 \pm 4.19\%$ ) 比较,模型组 ( $11.28 \pm 3.84\%$ ) 未见显著变化 ( $P > 0.05$ )。

### 2.7 模型大鼠肺小动脉的 Heath-Edwards 等级评估

综合上述分析结果,与对照组比较,模型组大鼠的肺小动脉血管中膜增厚,伴有内膜增厚等,按照 Heath-Edwards 标准,属于 II 级。未出现丛状病灶的形态结果,确认没有 IV 级病理改变。未发现明显的内膜胶原纤维增生;部分样本出现新生内膜,但在全部检测的肺小动脉血管中,具有新生内膜的血管的百分率较低,根据上述形态结果判断未达到 III 级标准。

表 5 两组大鼠的肺小动脉炎症评估及丛状病变观察结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 5 Inflammation scores of small pulmonary arterioles and plexiform lesions of the vessels between the two groups

直径/ $\mu\text{m}$ Diameter, $D$	组别 Groups	炎症分值 Inflammation score (score/avessel)	丛状病变 百分率/% Plexiform lesions
$50 \leq D$	对照组 Control group	$1.228 \pm 0.590$	0
	模型组 Model group	$2.005 \pm 0.552^{**}$	0
$50 < D \leq 100$	对照组 Control group	$1.611 \pm 0.551$	0
	模型组 Model group	$2.271 \pm 0.525^*$	0

注:与对照组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。  
Note. Compared with Control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

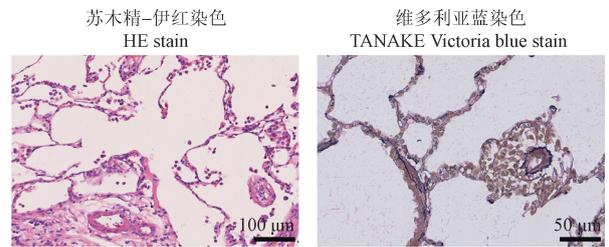


图 4 肺小动脉新生内膜的形成

Figure 4 Neointima formation in a arteriole

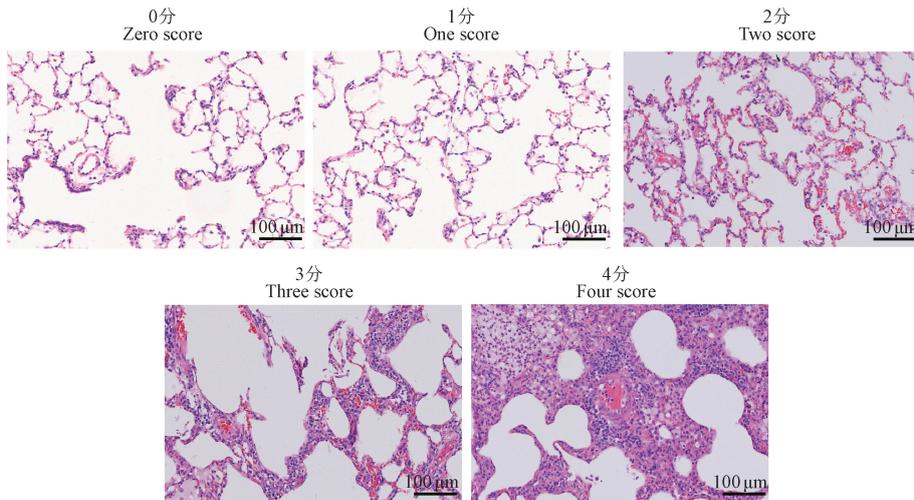


图 5 肺小动脉周围的炎症细胞浸润评分(HE 染色)

Figure 5 Scores of inflammatory cells infiltration around a pulmonary arteriole (HE stain)

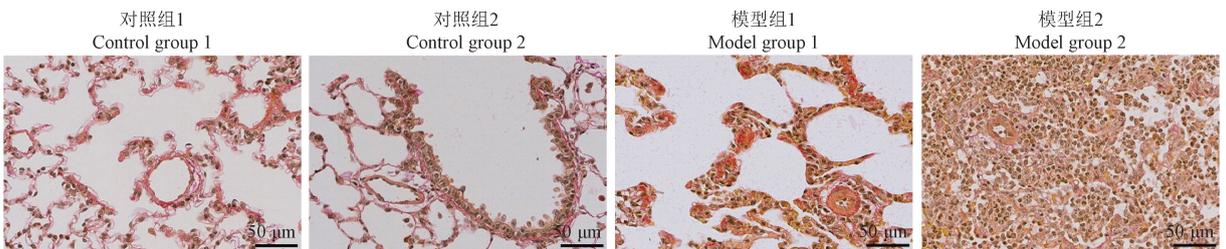


图 6 肺小动脉胶原纤维的表达(Van Gieson 染色)

Figure 6 Collagen fibers of pulmonary arterioles (Van Gieson stain)

### 3 讨论

烟草烟雾暴露是人类和多种实验动物 COPD 的主要病因之一。两者的病理表现具有高度的相似性。其中,烟雾的有害气体成分及有害颗粒损害肺血管,进而发展成肺动脉高压。病因相同和基本病理过程的相似性,使烟草烟雾暴露成为 COPD 合并肺动脉高压的理想造模方法,在药效学评估及疾病机制研究中得到广泛的应用。细菌感染加重肺血管周围的炎症反应等,进一步恶化肺小血管的异常重构。因此,烟草烟雾暴露结合细菌感染的复合打击,加速了肺小血管异常重构的形成与发展,恶化了肺小血管的损伤程度<sup>[3]</sup>。前期的研究发现,烟雾暴露联合克雷伯杆菌感染大鼠或小鼠具有典型的 COPD 和 PH 的病理学和病理生理学表现,多项研究发现造模 8 周是一个重要的节点,此时肺小动脉表现出管壁异常增厚、管腔狭窄和肺小动脉肌化等病变,形成肺动脉高压;之后,在正常饲养环境中,肺小动脉病变能够至少持续 4 周<sup>[2-5]</sup>。

在前期研究的基础上,本研究取得了一些新的发现。其一为不同直径的肺小动脉的肌化程度存在差异。文献中用于评估肺小动脉肌化的血管直径(直径)主要分为 $\leq 50 \mu\text{m}$ <sup>[6-7]</sup>和 $\leq 100 \mu\text{m}$ <sup>[2,15-16]</sup>的两类。本次研究发现,与对照组比较,模型组直径 $\leq 50 \mu\text{m}$ 和 $50 \mu\text{m} < \text{直径} \leq 100 \mu\text{m}$ 肺小动脉的非肌性血管百分率均显著降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),模型组直径 $\leq 50 \mu\text{m}$ 肺小动脉的肌性百分率显著升高( $P < 0.01$ );但模型组 $50 \mu\text{m} < \text{直径} \leq 100 \mu\text{m}$ 肺小动脉的肌性百分率未见显著升高( $P > 0.05$ )。该结果提示,较小的肺小动脉对于外界不良刺激的敏感性更高而更易于肌化。该结果与张蕙等<sup>[17]</sup>的发现一致。另外,小静脉的直径 $> 50 \mu\text{m}$ <sup>[18]</sup>可能出现平滑肌层和弹力膜<sup>[19]</sup>,形态与非肌性小动脉易于混淆。因此,选择直径 $\leq 50 \mu\text{m}$ 的血管能减少小静脉计数为非肌性小动脉的错误,分析结果更为可靠。综上所述,建议选择 $\leq 50 \mu\text{m}$ 的肺小动脉用于肺小动脉肌化的评估。其二则是发现肌性的肺小动脉血管壁的增厚,不仅包括中膜增厚,还表现为内膜增厚。这产生了新的问题:增厚的内膜是否出现某些重度的异常形态,如新生内膜形成、纤维增生,甚至丛状病灶。

目前认为,炎性细胞在受损血管周围浸润,随后释放趋化、黏附和生长因子,刺激血管平滑肌细

胞通过内弹力膜迁移到内皮下,化生为新生内膜并增生。此过程中,内弹力膜的受损而丧失完整性是新生内膜形成的重要条件<sup>[20]</sup>。因此,内弹力膜不完整和内壁至内弹力膜之间存在新生组织是判断肺小动脉新生内膜的标准<sup>[6]</sup>。对照组中罕见新生内膜的血管(在 11.1% 的样本发现;发现样本中,新生内膜增殖度仅为 1.61%);模型组中,50% 的样本中发现新生内膜的血管,这些样本中,最高的新生内膜增殖度达到 17.1%。新生内膜属于 Heath-Edwards 分级的 III 级病变,是进行性 PH 区别于可逆轻症 PH 的病理学标志<sup>[6,20]</sup>。尽管部分模型大鼠中出现该病变,但具有新生内膜的大鼠个体在整个群体中的比例未超过 50%;即使出现新生内膜,最高个体的新生内膜增殖度过低,达不到文献报道的至少 50% 的水平<sup>[6,8]</sup>。

模型大鼠的肺小动脉的血管周围存在明显的炎症细胞浸润,部分血管的外膜破坏,炎症细胞聚集在外弹力膜的局部,甚至出现外弹力膜缺失而被增生的胶原纤维修复的现象。但 VG 染色的图像定量分析的结果表明,与对照组比较,尽管模型大鼠的血管壁胶原纤维面积百分率有所升高,但两组之间的差异无统计学意义。另外,血管腔到内弹力膜之间区域也未观察到胶原纤维的变化。这可能反映了炎症细胞分泌的某些酶等对纤维成分的破坏和胶原增生之间,达到了平衡状态。该结果也支持模型大鼠的病变血管未达到 III 级水平。

按照 Heath-Edwards 的分级,经典的 PH 动物模型,如单纯的野百合碱或低氧肺动脉高压大鼠或小鼠的肺血管异常重构,归类于 I 级到 II 级。在自然环境下,这些病变能够自然逆转而恢复<sup>[21-22]</sup>。因此,这些模型不能模拟不可逆性或进行性的肺血管异常重构,即 III 级和 IV 级的病变。为了建立严重的模型,人们发现采取复合攻击的模式,是建立严重肺血管重构的有效方法。如左肺切除+野百合碱注射的大鼠出现普遍的新生内膜增生,新生内膜增殖度达到 54.5% ~ 88.5%<sup>[6,8]</sup>;皮下注射 3-[(2,4-dimethylpyrrol-5-yl)methylidene]-indolin-2-one (SU-5416)+慢性低压低氧环境的大鼠出现新生内膜病变和严重的丛状病变,达到了 IV 级别<sup>[12]</sup>。那么,烟草烟雾暴露复合克雷伯杆菌感染是否导致大鼠出现严重的病变呢? 本研究的结果表明,大鼠的肺血管异常重构属于 II 级标准,未达到 III 级标准。但已经出现了一定程度的新生内膜,这为后续开展以

烟草烟雾暴露为基础,建立严重肺小动脉异常重构(至少 III 级)为特征的 COPD 大鼠模型奠定了基础。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 廖艺璇, 陈亚红, 米文君. 慢性阻塞性肺疾病肺血管重塑的研究进展 [J]. 生理科学进展, 2016, 47(4): 295-299.  
LIAO Y X, CHEN Y H, MI W J. Research progress of pulmonary vascular remodeling in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Prog Physiol Sci, 2016, 47(4): 295-299.
- [ 2 ] 任周新, 余海滨, 梅晓峰, 等. 补肺益肾组方 III 对大鼠实验性肺动脉高压的改善作用 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2023, 49(2): 280-288.  
REN Z X, YU H B, MEI X F, et al. Improvement effect of Bufei Yishen prescription III on experimental pulmonary hypertension of rats [J]. J Jilin Univ Med Ed, 2023, 49(2): 280-288.
- [ 3 ] 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 L L, MEI X F, LU R L, 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.
- [ 4 ] 李建生, 秦燕勤, 田燕歌, 等. 补肺益肾组方 II 活性成分优化及组方 III 的建立 [J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(6): 2526-2532.  
LI J S, QIN Y Q, TIAN Y G, et al. Optimization of active ingredients of effective-component compatibility of Bufei Yishen Formula(ECC-BYF) II and the establishment of ECC-BYF III [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2023, 38(6): 2526-2532.
- [ 5 ] ZHANG L, TIAN Y, 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.
- [ 6 ] VAN DER FEEN D E, WELJ M, SMIT-VAN OOSTEN A, et al. Shunt surgery, right heart catheterization, and vascular morphometry in a rat model for flow-induced pulmonary arterial hypertension [J]. J Vis Exp, 2017(120): 55065.
- [ 7 ] MAVROGIANNIS E, HAGDORN Q A J, BAZIOTI V, et al. Pirfenidone ameliorates pulmonary arterial pressure and neointimal remodeling in experimental pulmonary arterial hypertension by suppressing NLRP3 inflammasome activation [J]. Pulm Circ, 2022, 12(3): e12101.
- [ 8 ] 刘斌, 王献民, 魏丽, 等. 4 种肺动脉高压动物模型肺血管重构模式的差异研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(2): 289-293.  
LIU B, WANG X M, WEI L, et al. Differentiation of pulmonary vascular remodeling pattern in 4 models of pulmonary hypertension [J]. Chin J Pathophysiol, 2008, 24(2): 289-293.
- [ 9 ] 丁永杰, 张本炎, 李敏. 辛伐他汀早期与后期干预野百合碱诱导肺动脉高压大鼠的研究 [J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2017, 16(1): 64-70.  
DING Y J, ZHANG B Y, LI M. Protective effects of simvastatin on monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats [J]. Chin J Respir Crit Care Med, 2017, 16(1): 64-70.
- [ 10 ] GERGES C, GERGES M, FRIEWALD R, et al. Microvascular disease in chronic thromboembolic pulmonary hypertension: hemodynamic phenotyping and histomorphometric assessment [J]. Circulation, 2020, 141(5): 376-386.
- [ 11 ] 蒋晓敏, 周陵, 陈绍良. 肺动脉高压肺血管丛状病变的研究进展 [J]. 中国病理生理杂志, 2014, 30(8): 1519-1522.  
JIANG X M, ZHOU L, CHEN S L. Progress in plexiform lesion of pulmonary hypertension [J]. Chin J Pathophysiol, 2014, 30(8): 1519-1522.
- [ 12 ] ABE K, TOBA M, ALZOUBI A, et al. Formation of plexiform lesions in experimental severe pulmonary arterial hypertension [J]. Circulation, 2010, 121(25): 2747-2754.
- [ 13 ] 何骑伟, 徐勇刚, 廖艳彪, 等. 薯蓣皂苷元干预对野百合碱诱导肺动脉高压大鼠的影响 [J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2015, 12(2): 21-24.  
HE Q W, XU Y G, LIAO Y B, et al. The effects of diosgenin on monocrotaline induced pulmonary arterial hypertension in rats [J]. J Hunan Norm Univ Med Sci, 2015, 12(2): 21-24.
- [ 14 ] 马胜军, 刘桂清, 马增山, 等. 先天性心脏病伴肺动脉高压患者血清血管内皮生长因子与肺细小动脉形态变化的关系 [J]. 中华心血管病杂志, 2004, 32(1): 40-43.  
MA S J, LIU G Q, MA Z S, et al. Relationship of serum vascular endothelial growth factor and the pulmonary vessel micromorphometric indexes in patients with congenital heart disease complicated by pulmonary hypertension [J]. Chin J Cardiol, 2004, 32(1): 40-43.
- [ 15 ] 樊梅, 邓俊, 王宋平. 阿奇霉素对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺血管重构的影响 [J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2018, 17(2): 128-133.  
FAN M, DENG J, WANG S P. The effect of azithromycin on pulmonary vascular remodeling in chronic obstructive pulmonary disease rats [J]. Chin J Respir Crit Care Med, 2018, 17(2): 128-133.
- [ 16 ] 刘晓黎, 王昌明, 蒋明, 等. NF- $\kappa$ B 在大鼠 COPD 中的表达及 PDTC 与肺血管重构的关系 [J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(10): 1503-1508.  
LIU X L, WANG C M, JIANG M, et al. The expression of NF- $\kappa$ B in rats with COPD and the correlation between PDTC and pulmonary vascular remodeling [J]. Acta Univ Med Anhui, 2018, 53(10): 1503-1508.
- [ 17 ] 张蕙, 刘宏津, 黄文辉, 等. 左心疾病所致的肺动脉高压大鼠模型中肺血管重构特点 [J]. 中华医学杂志, 2018, 98(28): 2269-2274.  
ZHANG H, LIU H J, HUANG W H, et al. Characteristics of pulmonary vascular remodeling in rat model of pulmonary

- hypertension in left heart disease [J]. Natl Med J China, 2018, 98(28): 2269-2274.
- [18] 田牛. 微循环学 [M]. 北京: 原子能出版社, 2004.  
TIAN N. Microcirculation [M]. Beijing: Atomic Energy Press, 2004.
- [19] 河北医学院《人体解剖学》编写组. 人体解剖学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1978.  
Writing group of Hebei Medical College for human anatomy. Human anatomy [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1978.
- [20] 袁吉祥, 张亮, 魏述军. 血管损伤对新生内膜增生的影响 [J]. 中国循环杂志, 2016, 31(12): 1210-1214.  
YUAN J X, ZHANG L, WEI S J. Impact of vascular injury on neointimal hyperplasia in experimental rabbit model [J]. Chin Circ J, 2016, 31(12): 1210-1214.
- [21] RUITER G, DE MAN F S, SCHALIJ I, et al. Reversibility of the monocrotaline pulmonary hypertension rat model [J]. Eur Respir J, 2013, 42(2): 553-556.
- [22] 刘云, 孙增先. 肺动脉高压动物模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(2): 236-241.  
LIU Y, SUN Z X. Research progress in animal models of pulmonary arterial hypertension [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(2): 236-241.

[收稿日期]2024-03-01



## 综述:斑马鱼模型在肠道微生物研究中的应用

斑马鱼作为一种可靠的肠道微生物研究模型,由于其成本低、遗传和发育一致性强、无菌胚胎制备的高效性、高通量化学筛选的有效性、体内活体成像的便利性及生物学重复程度高等优势,已被广泛用于微生物-宿主的相互作用和评估环境污染物的毒性研究。本文首先比较了斑马鱼模型与常见动物模型应用于宿主稳态和肠道微生物研究中存在的优势和局限性;重点对斑马鱼模型在肠道微生物与宿主发育、肠脑轴、免疫应答和代谢途径等方面研究的应用进行总结;同时,详细汇总了斑马鱼肠道微生物与环境污染物的毒理学评价、病原感染过程的探索以及益生菌应用等方面研究的进展情况。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊(*Animal Models and Experimental Medicine*, 2022, 5(4): 323-336. <https://doi.org/10.1002/ame2.12227>)。