

朱栋伟,赵琪,柏乐,等. 博来霉素诱导小鼠实验性肺纤维化方法的优化 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(12): 1515–1523.
ZHU D W, ZHAO Q, BAI L, et al. Optimized modeling of experimental lung fibrosis induced by bleomycin in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(12): 1515–1523.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.12.002

博来霉素诱导小鼠实验性肺纤维化方法的优化

朱栋伟^{1,2}, 赵琪^{1,2}, 柏乐^{1,2}, 潘婷钰^{1,2}, 王晶¹, 魏云¹, 王志超¹, 徐泳^{3*}, 周贤梅^{1*}

(1. 南京中医药大学附属医院, 南京 210029; 2. 南京中医药大学第一临床医学院, 南京 210023; 3. 南京中医药大学中医学院, 南京 210023)

【摘要】 目的 比较腰穿针气管内滴注及气溶胶气管内雾化两种不同方式, 对博来霉素诱导小鼠肺纤维化模型的影响, 以便探索出更佳的造模方法。**方法** 将 72 只 C57BL/6J 小鼠按体重随机分为空白对照组、腰穿针模型组和气溶胶模型组, 每组 24 只。空白对照组气管内滴注生理盐水, 腰穿针模型组使用腰穿针气管内滴注博来霉素, 气溶胶模型组使用肺部雾化给药装置气管内雾化吸入博来霉素; 分别于造模后第 14 和 21 天检测小鼠的肺部影像学病变、组织病理学改变、羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)、I 型胶原(collogen I, COL I)表达水平和 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)表达量, 以评价各组小鼠肺纤维化程度。**结果** 与空白对照组相比, 腰穿针模型组和气溶胶模型组小鼠均精神萎靡、扎堆喜卧。与空白对照组相比, 腰穿针模型组和气溶胶模型组在 14 和 21 d, 小鼠体重均显著下降($P < 0.001$)。Micro-CT 扫描结果显示腰穿针模型组白色阴影围绕在气管周围, 而气溶胶模型组白色阴影则分布更为弥散。肺组织肺炎及肺纤维化程度均以气溶胶模型组最高, 且以 21 d 更为显著。腰穿针模型组和气溶胶模型组造模后 14 和 21 d 羟脯氨酸含量均显著升高($P < 0.05$), 且 21 d 羟脯氨酸的增加更显著、更稳定($P < 0.001$)。腰穿针模型组和气溶胶模型组造模 21 d 后 COL I 的表达均显著增加, 且以气溶胶模型组更为显著($P < 0.001$)。 α -SMA 蛋白检测结果显示, 腰穿针模型组和气溶胶模型组造模 21 d 后肺组织中 α -SMA 的蛋白表达量较空白对照组均明显升高($P < 0.001$), 但两组间无显著性差异。**结论** 综合多种因素, 气溶胶气管内雾化法可以作为肺纤维化模型构建的优选方案。

【关键词】 造模方法; 肺纤维化; 博来霉素; 动物模型; 气管内雾化

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 12-1515-09

Optimized modeling of experimental lung fibrosis induced by bleomycin in mice

ZHU Dongwei^{1,2}, ZHAO Qi^{1,2}, BAI Le^{1,2}, PAN Tingyu^{1,2}, WANG Jing¹,
WEI Yun¹, WANG Zhichao¹, XU Yong^{3*}, ZHOU Xianmei^{1*}

(1. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 2. the First Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese medicine, Nanjing 210023, China;
3. School of Chinese Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

Corresponding author: ZHOU Xianmei. E-mail: zhouxianmeijs@aliyun.com; XU Yong. E-mail: njzyxyxuyong@163.com

【基金项目】 国家自然科学基金项目(82074358), 国家自然科学基金青年项目(82405312), 江苏省自然科学基金项目(BK20240731), 江苏省研究生科研与实践创新计划项目(SJCX23_0783)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (82074358), Youth Fund of the National Natural Science Foundation (82405312), Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20240731), Postgraduate Research and Practice Innovation Program of Jiangsu Province (SJCX23_0783).

【作者简介】 朱栋伟, 男, 在读博士研究生, 研究方向: 中西医结合治疗呼吸系统疾病。Email: zdongwei777@163.com

【通信作者】 周贤梅, 女, 教授, 研究方向: 中西医结合治疗呼吸系统疾病。Email: zhouxianmeijs@aliyun.com;

徐泳, 男, 讲师, 研究方向: 中西医结合治疗呼吸系统疾病。Email: njzyxyxuyong@163.com。

* 共同通信作者

[Abstract] Objective To compare the effects of intratracheal instillation by lumbar spinal needle and intratracheal atomization on bleomycin-induced pulmonary fibrosis modeling in mice, to determine the optimal modeling method. **Methods** Seventy-two C57BL/6J mice were divided randomly into control, lumbar spinal needle and aerosolization groups, according to body weight ($n = 24$ mice per group). Mice in the control and lumbar spinal needle groups received intratracheal instillation of saline or bleomycin, respectively, and mice in the aerosolization group received aerosolized bleomycin intracheally by microsyringe aerosolizer. Micro-computed tomography (CT), histopathological changes, hydroxyproline (HYP) levels, Collagen I (COL I) and α -smooth muscle actin (α -SMA) protein expression were examined on days 14 and 21 to evaluate the degree of pulmonary fibrosis in each group. **Results** Mice in the two model groups showed listlessness, slow responses, and decreased body weights on days 14 and 21, compared with the control group ($P < 0.001$). Micro-CT showed white shadows surrounding the trachea in the lumbar spinal needle group, while the shadows were more diffuse in the aerosol group. The degrees of alveolitis and pulmonary fibrosis were highest in the aerosolization group, with a time-dependent trend. The hydroxyproline contents were significantly increased in the two model groups on days 14 and 21 after modeling ($P < 0.05$), with the increase on day 21 being more significant and stable ($P < 0.001$). COL I expression was significantly increased in both the lumbar spinal needle group and aerosolization group on days 21 after modeling, especially in the aerosolization group ($P < 0.001$). Expression levels of α -SMA were significantly higher in the lumbar spinal needle group and aerosolization group compared with the control group on days 21 ($P < 0.001$); however, there was no significant difference between the two model groups. **Conclusions** intratracheal atomization of bleomycin is the optimal method for establishing a mouse model of pulmonary fibrosis.

[Keywords] modeling method; pulmonary fibrosis; bleomycin; animal model; intratracheal atomization

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

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是一种病因不明、慢性、不可逆性且预后不良的慢性间质性肺疾病。2009 年 1 月至 2020 年 4 月, 全球特发性肺纤维化发病率和患病率分别约为 0.09 ~ 1.30/1 万、0.33 ~ 4.51/1 万, 其中韩国最高^[1]。在美国, 新诊断为特发性肺纤维化患者的中位年龄为 62 岁, 男性占比 54%^[2]。作为特发性间质性肺炎最常见和最严重的类型, IPF 诊断后的中位生存期仅为 3 ~ 5 年^[3]。此外, 有研究表明, 约三分之一的重症 COVID-19 康复患者出现新冠后肺纤维化, 其肺功能及生活质量受到严重影响^[4]。

目前临床上由于伦理的限制, 很难获得 IPF 患者的肺组织样本。尽管尚无任何一种动物模型能够贴合人类 IPF 的所有特征, 但动物模型仍然可以部分再现 IPF 的临床影像和病理特点, 是进行基础研究的重要先决条件^[5]。因此, 建立稳定且易于操作的动物模型对于探索肺纤维化病理机制、寻求新型有效的治疗药物具有重要意义。

博来霉素 (bleomycin, BLM) 是目前公认且使用最广泛的肺纤维化诱导药物, 其诱导的模型能够体现出肺纤维化患者的典型体征和症状, 且可重复性高、易于操作^[6]。本课题组前期经过反复的比较和研究, 发现腰穿针气管插管造模法是最佳的肺纤维化造模方法^[7]。然而, 腰穿针的进针深度难以控

制, 过短则易引起 BLM 的回流, 过长则容易损伤气管, 增加小鼠的死亡率, 这会引起模型构建的不稳定性。而且, 病理学结果显示腰穿针气管插管造模法获得的病灶分布欠均匀、程度不一, 以气管和支气管周围为主^[7], 不能准确模拟临床特发性肺纤维化病变弥漫性分布的特点。近年来新型肺部液体雾化给药装置的研发, 为药物经口气管灌注提供了更优的方案, 其可以输送定量的气溶胶到小鼠气管内, 提供较好的药物分布^[8]。本研究将构建一种气溶胶气管内雾化的给药方式, 并将其与腰穿针气管内滴注法进行比较。另外, 对于 BLM 给药后小鼠模型制备周期的问题, 之前的诸多基础研究也各不相同^[9-11], 这会增加研究结果的偏倚。因此, 为了优化肺纤维化的建模方法, 本实验研究了博来霉素的两种给药方法和两个周期, 以期提供更稳定且更快捷的造模方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

72 只 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠 (6 ~ 8 周龄, 体重 18 ~ 22 g, 购自浙江省杭州医学院【SCXK (浙) 2019-0002】), 饲养于南京中医药大学动物实验中心的 SPF 级啮齿动物设施中【SYXK (苏) 2023-

0077】，环境温度 20 ~ 22 ℃，相对湿度 40% ~ 70%，12 h 明暗交替，自由获取食物和水，适应性饲养 1 周后进行动物实验。所有动物实验程序均经南京中医药大学实验动物伦理委员会批准后进行（IACUC-202303A084）。

1.1.2 主要试剂与仪器

硫酸博来霉素（TCI, B3972-50MG），PBS 溶液（Servicebio, G4202），4% 多聚甲醛（Biosharp, BL539A），75% 无水乙醇（Macklin, E809056），异氟烷（瑞沃德, R510），羟脯氨酸（hydroxyproline, HYP）试剂盒（南京建成生物工程研究所, A030-2-1），BCA 蛋白定量检测试剂盒（Thermo, 23227），蛋白酶抑制剂（Beyotime, ST506），磷酸酶抑制剂（Biosharp, BL615A），SWE 快速高分辨电泳缓冲液（Servicebio, G2081），快速转膜液（NCM Biotech, WB4600）， α -平滑肌肌动蛋白（ α -smooth muscle actin, α -SMA）（Proteintech, 14395-1-AP）， β -微管蛋白（ β -Tublin）（ImmunoWay, YM3030）。

肺部雾化给药装置（YuYan, YAN30012, 中国），7 号腰穿针（Qionghua, 中国），小型手电筒（掌坤, 中国），小动物麻醉机（YuYan, ABS-4, 中国），小鼠气管插管平台（YuYan, 中国），INFINITE 200 PRO 型多功能酶标仪（Teacan, 瑞士），Quantum GX Micro-CT 型小动物活体 CT 影像系统（PerkinElmer, 美国）。

1.2 方法

1.2.1 动物分组以及模型制备

将 72 只小鼠打耳标编号，适应性饲养 1 周后，按体重随机分为空白对照组、腰穿针模型组和气溶胶模型组，每组 24 只。空白对照组气管内滴注生理

盐水，腰穿针模型组的操作步骤参照课题组前期探索出的方法^[7]，气溶胶模型组采用以下阐述的具体方法进行肺纤维化模型构建。记录小鼠的一般情况、体重变化以及存活率。造模后 14 和 21 d 每组进行 Micro-CT 扫描后处死小鼠，取出一叶肺组织置于多聚甲醛中固定，其余肺组织置于液氮中速冻，后-80 ℃保存。造模后 14 d 小鼠肺组织进行苏木素-伊红（HE）染色、Masson 染色以及 HYP 水平检测。21 d 小鼠肺组织进行 HE 染色、Masson 染色、HYP 水平、免疫组化测定 I 型胶原（collogen I，COL I）以及 α -SMA 蛋白表达量检测。

1.2.2 气溶胶气管内雾化造模方法

将小鼠放入小动物麻醉机中进行异氟烷吸入性麻醉，待小鼠麻醉后将其置于气管插管平台上，呈 45°仰卧正位。麻醉程度的判断：小鼠整个身体开始呈规则的胸腹式呼吸，瞳孔稍扩大、对光反射迟钝，无口腔反射。体位摆好后，主操人员用眼科镊子夹住小鼠舌尖后向外一侧拉出，助手用小型手电筒垂直照射小鼠颈部，同时拉直尾巴避免气管弯曲。然后主操人员通过气溶胶雾化喷射头紧贴小鼠舌根中央同时上压，在光源下找到会厌部不断开合的声门，待声门打开时将喷射头准确插入气管中，随后助手快速推进高压注射器使得 BLM 雾化喷入气管中（5 mg/kg 的剂量溶于 75 μ L 生理盐水中），给药结束后停留 1 ~ 2 s 再缓慢退出喷射头，此雾化过程在 12 s 内进行（见图 1）。之后助手将小鼠立起保持直立姿势，并水平前后左右轻轻摇晃数次，后放置于垫料上，使其呈头高脚低位。待小鼠自然苏醒后，将其归笼。

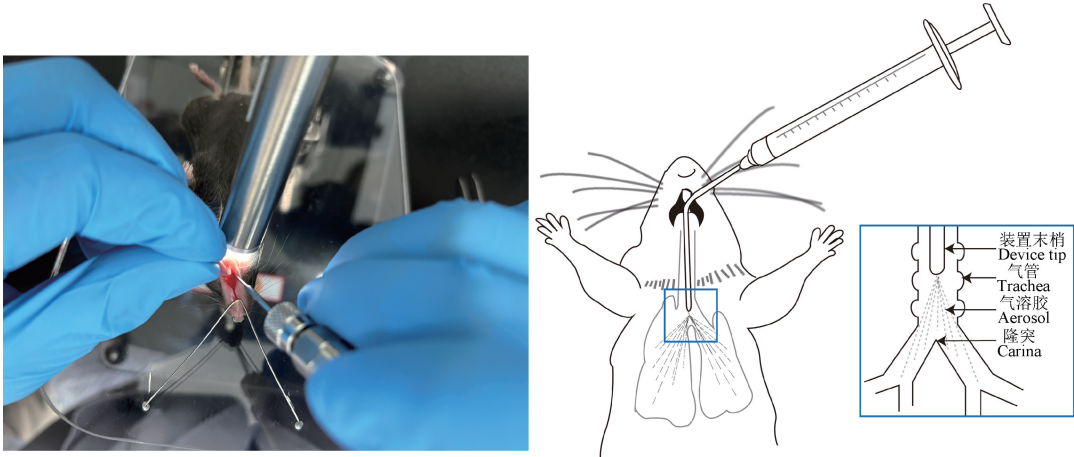


图 1 气溶胶气管内雾化操作示意图和机制图
Figure 1 Schematic and mechanism diagrams of intratracheal atomization

1.2.3 体重、存活率的测量

在整个实验过程中,每天记录小鼠的死亡率,每 3 d 对所有小鼠的体重进行一次测量并记录。

1.2.4 肺部影像学观察

每只小鼠在气麻机中吸入异氟烷麻醉后,将其放入 Micro-CT 仪器中,设置参数:电压 90 kV,电流 88 μ A,调整视野后开始扫描,从而观察小鼠肺部影像学病变。

1.2.5 肺组织病理学分析

将右中肺固定在多聚甲醛中 24 h,用乙醇脱水,使用石蜡包埋固定好的肺组织,降温冷冻后使用石蜡切片机制成 3 ~ 5 μ m 的切片,进行 HE 染色以及 Masson 染色,光学显微镜下观察肺泡炎症及肺组织纤维化程度。

1.2.6 肺组织 HYP 含量检测

取出冻存的肺组织,匀浆,按照南京建成试剂盒说明书的步骤操作,检测 HYP 的含量。

1.2.7 免疫组化法观察肺组织 COL I 表达

将制备好的肺组织蜡块进行切片,然后脱蜡水化、抗原修复、阻断内源性过氧化物酶、封闭、一抗孵育、二抗孵育、DAB 显色、细胞核复染、脱水封片,最后进行封片拍照,以观察肺组织 COL I 表达。

1.2.8 Western Blot 检测肺组织中 α -SMA 蛋白表达水平

肺组织称重后加入蛋白裂解液(RIPA:PMSF = 100:1),利用匀浆机充分研磨,超声后冰上静置 30 min,然后 13 000 r/min 离心 30 min,收集上清。使用 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度以及稀释变性。将得到的上样蛋白样品进行凝胶电泳,随后转膜、封闭,然后与 α -SMA 抗体(1:1000)、 β -Tublin 抗体(1:5000)在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜,第 2 天再

与二抗孵育 1 h。最后使用 ECL 在蛋白成像仪上进行可视化,并借助 Image J 1.54 软件半定量分析 α -SMA 蛋白表达水平。

1.3 统计学分析

实验相关数据采用 GraphPad Prism 9.0 进行统计处理,计量资料以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,并进行正态性检验和方差齐性检验。符合正态分布且方差齐性的数据采用单因素方差分析,多组间两两比较采用 Tukey 检验。 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

2.1.1 生存状况

空白对照组小鼠毛发浓密,皮毛光滑鲜亮,动作敏捷、反应迅速,饮食正常,精神状态正常。BLM 气管灌注后,腰穿针模型组和气溶胶模型组小鼠毛色晦暗,毛发疏松,精神萎靡,行动迟缓、乏力懒动,喜扎堆蜷卧,进食量减少。

2.1.2 体重变化

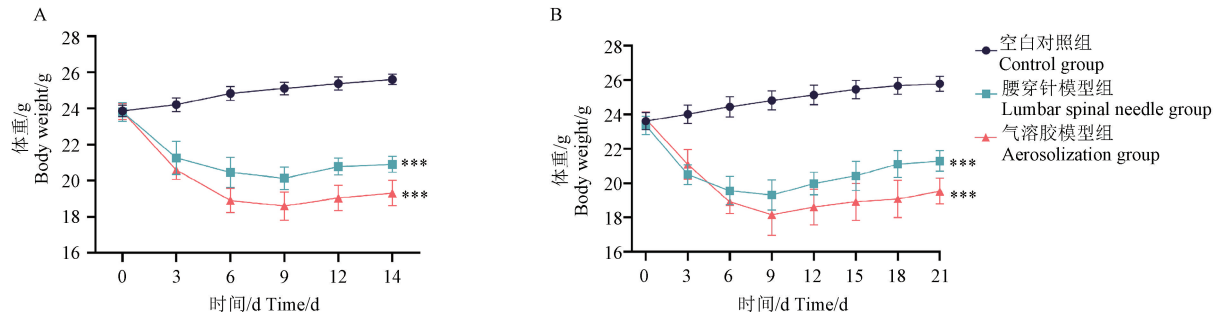
与空白对照组相比,腰穿针模型组和气溶胶模型组在 14 和 21 d,小鼠体重均明显下降,差异具有显著性($P < 0.001$),见图 2。

2.2 存活率

空白对照组小鼠无死亡。腰穿针模型组小鼠 14 和 21 d 存活率均为 66.6%;气溶胶模型组小鼠 14 d 存活率为 83.3%,21 d 存活率为 75%,见图 3。

2.3 Micro-CT 影像学

小鼠 Micro-CT 结果显示,与空白对照组相比,腰穿针模型组和气溶胶模型组肺组织中黑色阴影均减少,而白色阴影均显著增多,提示两组肺纤维

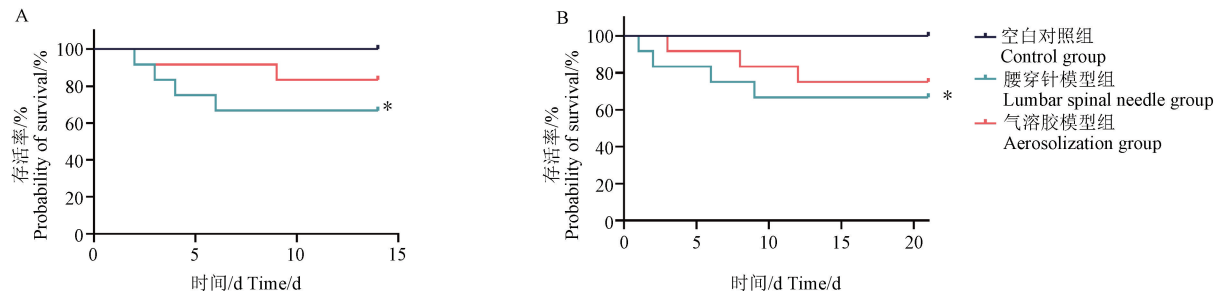


注:A:造模后 14 d 各组小鼠的体重变化;B:造模后 21 d 各组小鼠的体重变化;与空白对照组相比,*** $P < 0.001$ 。(下图同)

图 2 小鼠体重变化情况

Note. A. Body weight changes of mice in each group after modelling for 14 d. B. Body weight changes of mice in each group after modelling for 21 d. Compared with the control group, *** $P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 2 Body weight changes of mice



注:A;造模后 14 d 各组小鼠的存活率;B;造模后 21 d 各组小鼠的存活率;与空白对照组相比, * $P < 0.05$ 。(下图同)

图 3 造模后 14 和 21 d 各组小鼠的存活率

Note. A. Survival rate of mice in each group after modelling for 14 d. B. Survival rate of mice in each group after modelling for 21 d. Compared with the control group, * $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 3 Survival rate of mice in each group after modelling for 14 and 21 d

化模型均构建成功。第 14 和 21 天,气溶胶模型组的白色阴影面积均明显大于腰穿针模型组。而且,腰穿针模型组白色阴影围绕在气管周围,而气溶胶模型组白色阴影则分布更为弥散(见图 4)。

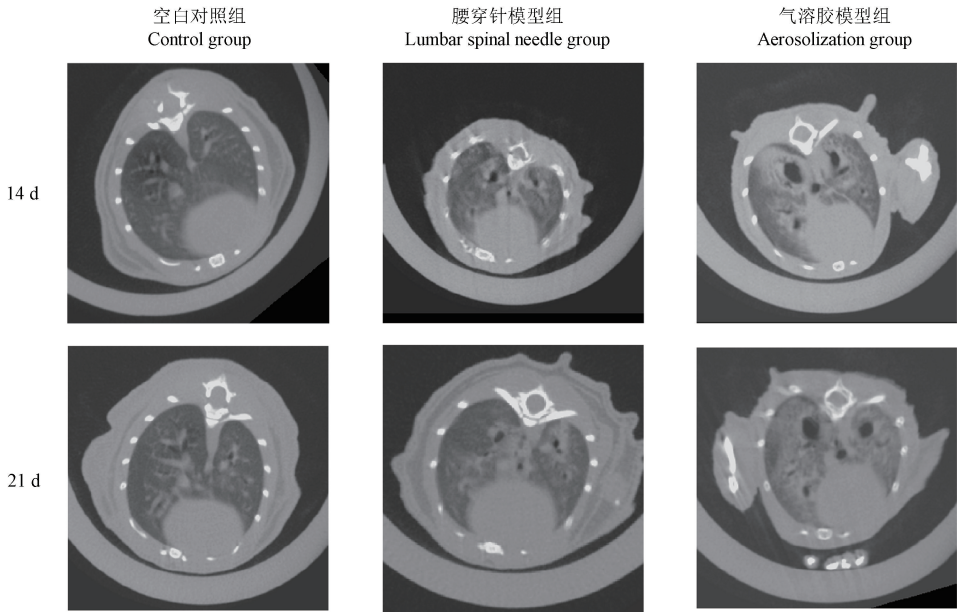


图 4 造模后第 14 和 21 天各组小鼠的 Micro-CT 影像

Figure 4 Micro-CT images of mice in each group on day 14 and 21 after modelling

2.4 组织病理学

HE 和 Masson 染色结果显示,空白对照组小鼠肺泡结构正常,肺泡间隔纤细,无明显淋巴细胞浸润,无明显蓝色纤维组织增生。两个模型组均出现肺纤维化的典型病理特征,包括不同程度的炎症细胞浸润,肺泡壁增厚,肺泡腔增大,肺泡结构紊乱甚至消失,肺泡上皮非典型增生,间质组织中胶原蛋白的过度沉积。其中气溶胶模型组造模后第 21 天的炎症和胶原增殖程度最为严重。对于腰穿针模型组,造模后第 21 天病理特征更明显,病灶分布欠均匀,主要集中在气管附近,向边缘扩散。对于气溶胶模型组,造模后第 21 天病理特征更明显,可见

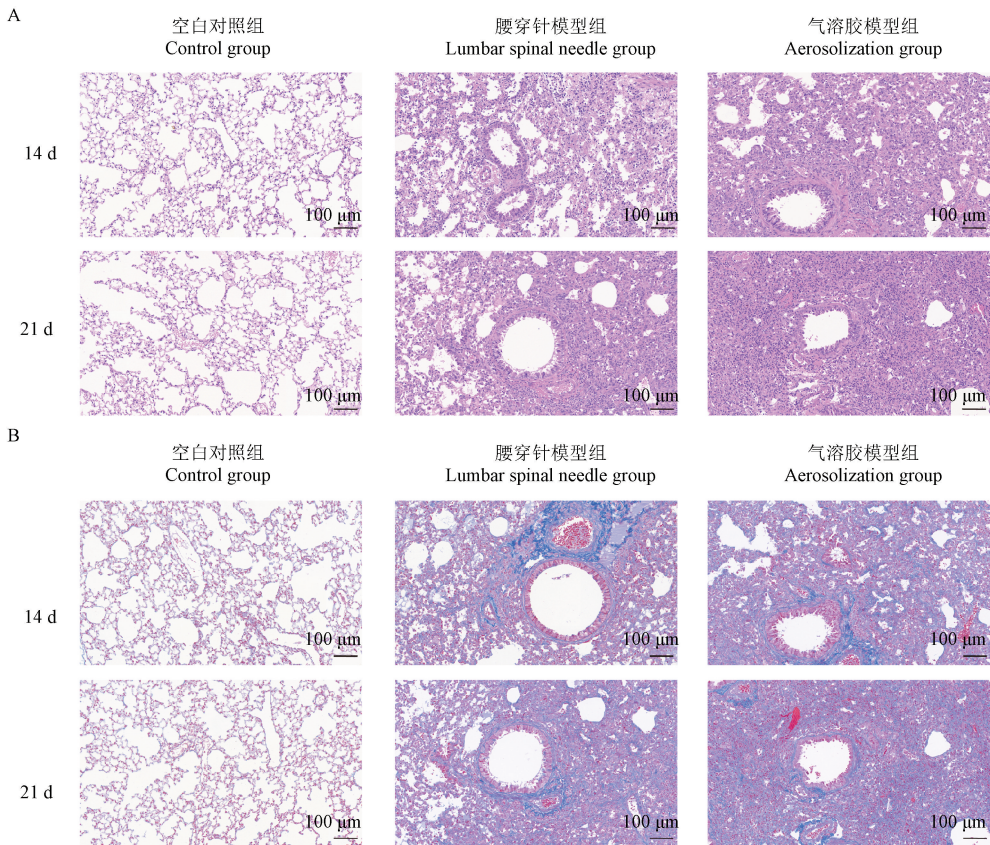
大片的淋巴细胞浸润和蓝色纤维组织增生,且分布比腰穿针模型组更为弥散而均匀,但仍以气管周围最为显著(见图 5)。

2.5 HYP 水平表达

通过碱水法检测肺组织 HYP 水平,发现 14 和 21 d 后,腰穿针模型组和气溶胶模型组 HYP 含量均显著升高($P < 0.05$)。与第 14 天相比,第 21 天两组模型组 HYP 浓度的增加更显著、更稳定($P < 0.001$)(见图 6)。

2.6 免疫组化

胶原蛋白的过度沉积是评价肺纤维化模型的重要证据^[12]。选取 3 组气管内灌注后第 21 天的肺

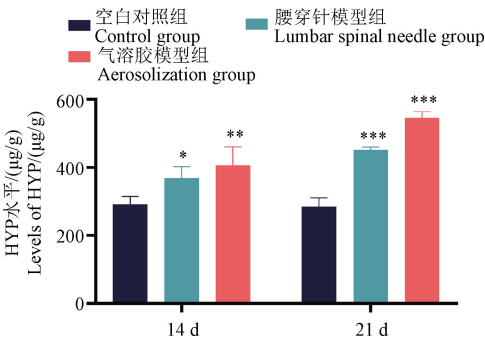


注:A;HE 染色;B;Masson 染色。

图 5 造模后 14 和 21 d 小鼠肺组织的病理变化

Note. A. HE staining. B. Masson staining.

Figure 5 Pathological changes in lung tissue of mice on day 14 and 21 after modelling



注:与空白对照组相比,** $P < 0.01$ 。(下同)

图 6 各组小鼠肺组织中 HYP 水平($n = 3$)

Note. Compared with the control group, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 6 Levels of HYP inlung tissue of mice in each group ($n = 3$)

组织进行 COL I 免疫组化检测。结果显示,与空白对照组相比,腰穿针模型组和气溶胶模型组小鼠肺组织种阳性区域明显增多,说明 COL I 的表达显著增加(见图 7)。而且,COL I 以气溶胶模型组更为显著($P < 0.001$)。

2.7 肺组织 α -SMA 蛋白表达量

选取气管内给药后第 21 天的肺组织进行 α -SMA 蛋白表达量检测。与空白对照组相比,两组模型组小鼠肺组织中 α -SMA 的蛋白表达量明显升高,差异具有显著性($P < 0.001$)。两组模型组之间差异无显著性(见图 8)。

3 讨论

博来霉素是一种由轮枝链霉菌产生的毒素,临床上主要用于治疗多种肿瘤性疾病^[13]。这种物质具有可能致命的肺部副作用,会反复刺激肺间质性炎症,进而诱发严重的肺纤维化^[14]。1978 年,HOLOYE 等^[15]对死于博来霉素的患者肺组织切片进行电镜观察,镜下显示,肺组织中 I 型肺泡上皮细胞减少、II 型肺泡上皮细胞增殖、嗜酸性粒细胞浸润、大量胶原沉积、间质水肿、胸膜纤维化等,这与以往临床发现的 IPF 病变相似。博来霉素诱导的动物肺纤维化模型与人类肺纤维化具有最相似的组织病理学变化^[16],因此成为了目前肺纤维化基础研究最流行的方法。

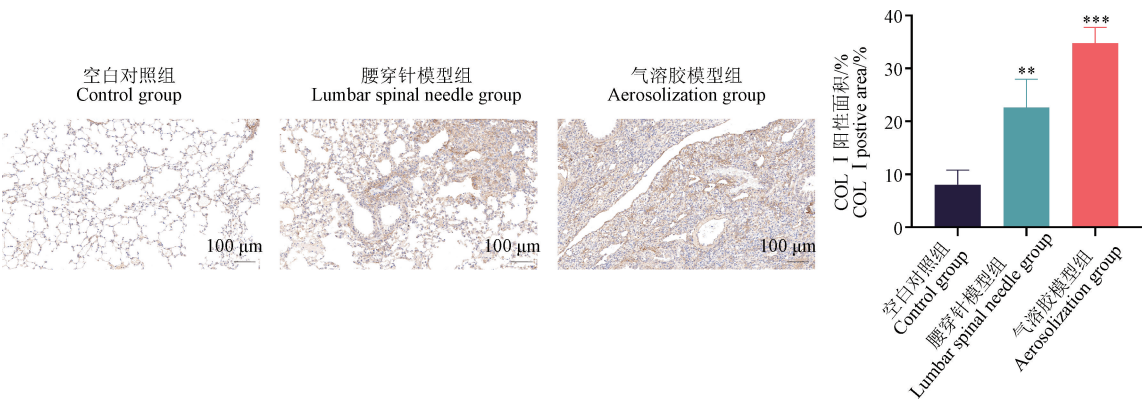


图 7 造模后 21 d 各组小鼠肺组织中 COL I 蛋白水平($n = 3$)

Figure 7 Levels of COL I proteins in lung tissue of mice on day 21 after modelling($n = 3$)

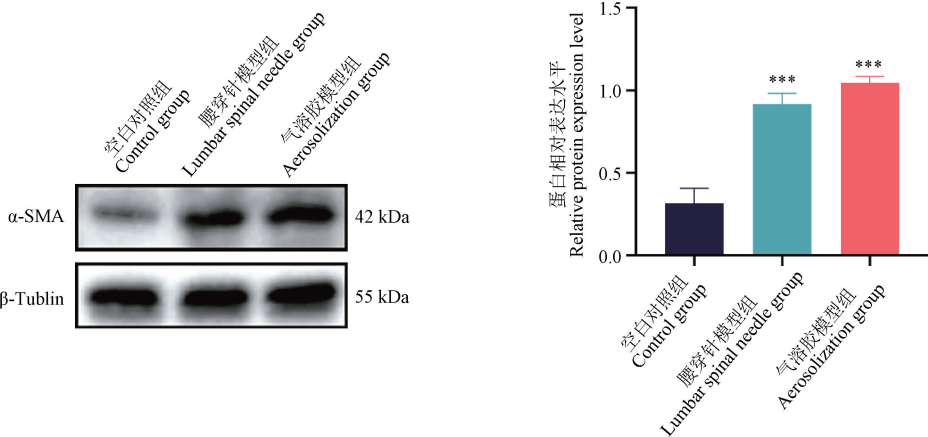


图 8 各组小鼠肺组织中 α -SMA 蛋白表达水平($n = 3$)

Figure 8 α -SMA protein expression levels in lung tissue of mice in each group($n = 3$)

快捷稳定的动物模型是探索肺纤维化发病机制的重要基础,为进一步研究新型有效的治疗药物并实现成果向临床转化提供了重要前提。BLM 可以通过腹膜内、尾静脉、气管内注入、经鼻滴注等方式诱导肺纤维化模型^[17]。目前基础研究中应用最广泛的造模方法是经口咽部无创气管内滴注,然而具体的气管给药途径及周期参差不齐^[18-20]。因此,寻找稳定高效的肺纤维化造模方法至关重要。本课题组前期经反复探索发现,腰穿针气管插管法是 3 种气管内给药法中的最佳造模途径,然而其进针深度难以控制,且滴注范围局限,病灶集中于肺门和气管周围^[7]。近年来本课题组通过进一步多次实验发现,新型肺部雾化给药装置可能具有更优、更稳定的造模效果,且熟练后操作较腰穿针更为简单快捷。因此,本实验首次将这两种建模方法进行比较。

实验结果可见,气溶胶气管内雾化给药 21 d 获得的小鼠肺纤维化模型的组织损伤与纤维化程度

最高,且分布较腰穿针模型组更为弥散、更为均匀。首先,HE 染色显示气溶胶模型组 21 d 的小鼠肺泡炎症水平最高;Masson 染色显示气溶胶模型组小鼠 21 d 的胶原沉积面积最广。重要的是,病理结果可见,气溶胶模型组小鼠 21 d 的病灶分布更为广泛而均匀,而腰穿针模型组的病灶则集中在气管和支气管周围。其次,在存活率方面,气溶胶模型组的存活率要高于腰穿针模型组。紧接着,通过 HYP 检测,发现与 BLM 给药后 14 d 相比,第 21 天 HYP 浓度的增加更显著、更稳定,这表明 BLM 诱导的模型在第 21 天时具有更稳定的纤维化表型。因此,本研究选取 3 组造模后 21 d 的肺组织进行 COL I 免疫组化和 α -SMA 蛋白表达量检测。免疫组化结果显示造模后第 21 天,气溶胶模型组具有更高水平的胶原表达。 α -SMA 是成纤维细胞向肌成纤维细胞转化的标志物^[21]。Western Blot 结果显示,腰穿针模型组和气溶胶模型组造模后 21 d 的小鼠肺组织中 α -SMA 蛋白表达量均上升,但两组之间无显著性差

异。综合各种因素,气溶胶气管雾化法是优于腰穿针气管插管法的建模方法,且 21 d 是较稳定的造模周期。

值得一提的是,研究人员在反复的建模实验中总结了一些观点:(1)肺纤维化造模成功的小鼠当场大多会有呛咳、鼻孔冒泡等表现;其体重主要会在前 6 d 急剧下降,多降至 20 g 左右甚至 20 g 以下,且存在毛发竖立起、反应迟钝等体征;(2)气管内单次给药后 21 d 左右可能是肺纤维化最严重的时段,随后纤维化具有一定自限性;(3)气溶胶气管雾化法和腰穿针气管插管法均属于经口咽部无创气管内给药法,对操作者技术均有一定要求,最大的难点在于操作者能否在光源下看到声门并掌握时机准确从声门插入气管。为方便操作者能够清楚看到声门,掌握好小鼠的麻醉深度则很重要。麻醉深度过浅,则来不及进针操作,且不易看到声门的位置;麻醉深度过深,则小鼠容易死亡。具体操作过程中,当观察到小鼠整个身体开始呈规则的胸腹式呼吸、瞳孔对光反射迟钝时,这种程度下的麻醉则可以便于操作者清晰地看到一张一合的声门;(4)腰穿针针体坚硬、进针深度难以掌握,针身进入过长则容易损伤气管,且整体操作时间较长,这会增加小鼠的死亡率;而肺部雾化给药装置喷射头顶端圆滑的设计,可保证其安全、温和地插入气管内,且进针深度基本固定,一般使针身弯曲的前端部分全部进入小鼠口中即可。另外,肺部雾化给药装置呈手持式一体设计,插入气管后即可快速给药,整体操作时间较短。故气溶胶气管雾化法小鼠存活率高于腰穿针气管插管法;(5)气溶胶气管雾化法和腰穿针气管插管法虽同为经口无创气管给药,但气溶胶雾化给药优势明显。肺部雾化给药装置能够深入气管的同时,以气溶胶的方式将药物温和均匀的喷洒进各个支气管内,并可到达外周肺组织,病变范围显然比腰穿针局部气管滴注法要更为弥散。

研究人员还总结了一些关于肺部雾化给药装置的操作经验:(1)用于肺部雾化的 BLM 剂量和体积一般要根据小鼠的体重和 BLM 的纯度来决定,这需要操作者在预实验中摸索好,以便正式造模后呈现出较稳定的纤维化病变以及较低的死亡率;(2)小鼠麻醉后需使其呈倾斜仰卧位,这可以使得药液充分进入气管内;(3)使用给药装置前,应用药液润洗针体内部 2 ~ 3 次,以减少误差。给药装置推进

时应该迅速果断,否则药物喷洒范围较局限。装置推进完后针头往往会残留一滴药液,因此最后需在气管内停留 1 ~ 2 s;(4)药液雾化完毕后抓取小鼠使其呈直立姿势,并水平前后左右轻轻摇晃,以助 BLM 更均匀分布在气管内,同时避免药液堵塞气道;(5)使用完后针头应及时用 75%乙醇超声清洗,以防下次使用时出现堵针情况。

综上,相对于腰穿针气管插管法,气溶胶气管雾化法构建的模型具有病灶分布更为弥散而均匀、纤维化程度更高、存活率更高等优势,是更为适用于博来霉素诱导小鼠肺纤维化模型建立的选择。

参 考 文 献(References)

- [1] MAHER T M, BENDSTRUP E, DRON L, et al. Global incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Respir Res*, 2021, 22(1): 197.
- [2] MORTIMER K M, BARTELS D B, HARTMANN N, et al. Characterizing health outcomes in idiopathic pulmonary fibrosis using US health claims data [J]. *Respiration*, 2020, 99(2): 108-118.
- [3] SHAPANIS A, JONES M G, SCHOFIELD J, et al. Topological data analysis identifies molecular phenotypes of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Thorax*, 2023, 78(7): 682-689.
- [4] MCGRODER C F, SALVATORE M M, D'SOUZA B M, et al. Improved pulmonary function and exercise tolerance despite persistent pulmonary fibrosis over 1 year after severe COVID-19 infection [J]. *Thorax*, 2024, 79(5): 472-475.
- [5] YE X, ZHANG M, GU H, et al. Animal models of acute exacerbation of pulmonary fibrosis [J]. *Respir Res*, 2023, 24(1): 296.
- [6] GUL A, YANG F, XIE C, et al. Pulmonary fibrosis model of mice induced by different administration methods of bleomycin [J]. *BMC Pulm Med*, 2023, 23(1): 91.
- [7] 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 Z C, FENG F C, 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.
- [8] 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.
- [9] LI J, LI K, TIAN Y, et al. Effective-compounds of Jinshui Huanxian formula ameliorates fibroblast activation in pulmonary fibrosis by inhibiting the activation of mTOR signaling [J]. *Phytomedicine*, 2023, 109: 154604.
- [10] DENG L, OUYANG B, SHI H, et al. Icariside II attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by modulating macrophage

polarization [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 317: 116810.

[11] EZZ ELDEEN N, MOUSTAFA Y M, ALWAILI M A, et al. Synergistic power of piceatannol and/or vitamin D in bleomycin-induced pulmonary fibrosis *in vivo*: a preliminary study [J]. Biomedicines, 2023, 11(10): 2647.

[12] LI R F, CHEN X Y, XU Y, et al. Inhibitory effects of alkaline extract from the pericarp of *Citrus reticulata* Blanco on collagen behavior in bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 269: 113761.

[13] 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.

[14] 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.

[15] HOLOYE P Y, LUNA M A, MACKAY B, et al. Bleomycin hypersensitivity pneumonitis [J]. Ann Intern Med, 1978, 88(1): 47-49.

[16] YANG X, HUANG X J, CHEN Z, et al. A novel quantification method of lung fibrosis based on Micro-CT images developed with the optimized pulmonary fibrosis mice model induced by bleomycin [J]. Heliyon, 2023, 9(3): e13598.

[17] 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.

[18] WU Z, SHI R, YAN S, et al. Integrating network pharmacology, experimental validation and molecular docking to reveal the alleviation of Yinhuang granule on idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Phytomedicine, 2024, 128: 155368.

[19] LI X, WANG Y, LIANG J, et al. Bergenin attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice via inhibiting TGF- β 1 signaling pathway [J]. Phytother Res, 2021, 35(10): 5808-5822.

[20] XUE Z, ZHAO F, SANG X, et al. Combination therapy of tanshinone IIA and puerarin for pulmonary fibrosis via targeting IL6-JAK2-STAT3/STAT1 signaling pathways [J]. Phytother Res, 2021, 35(10): 5883-5898.

[21] XU Y, WANG X, HAN D, et al. Revealing the mechanism of Jiegeng decoction attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via PI3K/Akt signaling pathway based on lipidomics and transcriptomics [J]. Phytomedicine, 2022, 102: 154207.

[收稿日期] 2024-04-09