文章编号:1000-5404(2010)15-1673-03

短篇论著

大鼠气管原位移植建立闭塞性细支气管炎模型

曹 浩,史 乾,牛永胜,兰 琴,刘 刚,刘 建,范慧敏,刘中民 (200120 上海,同济大学附属东方医院胸心外科)

【摘要】 目的 建立大鼠同种异体原位气管移植模拟肺移植后发生的闭塞性细支气管炎(obliterative bronchiolitis,OB)的病变过程,为研究 OB 提供动物模型。方法 选用近交系 Brown Norway(BN)和 Lewis 大鼠进行原位气管移植,同系移植组:Lewis(供体)→Lewis(受体),18 只;异系移植组:BN(供体)→Lewis(受体),18 只。于移植后 7、14、30、60 d 通过 Micro-CT 扫描观察移植气管影像学变化,并评价阻塞情况;7、30、60 d 取出移植气管,HE 染色观察移植物的组织病理变化。结果 各时间点,同系移植组移植气管内膜均无明显增厚,炎症细胞浸润少,气道阻塞率在 8% 左右;异系移植组移植气管内膜明显增厚,早期有大量中性粒细胞、淋巴细胞浸润,晚期主要是淋巴细胞浸润伴纤维组织增生,气道明显狭窄、阻塞,其中以第 7 天阻塞最重,随后渐改善,7、14、30、60 d 气道阻塞率分别为(56.8 ± 9.04)%、(51.05 ± 9.79)%、(44.01 ± 7.92)% 和(42.97 ± 8.82)%,各时间点异系移植组和同系移植组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 原位气管移植能够稳定形成可模拟肺移植后 OB 的气道阻塞性病变,克服了肺移植和异位气管移植用于 OB 研究的一些限制,可更好地作为 OB 的动物模型应用于实验研究中。

【关键词】 原位气管移植;疾病模型;肺移植;闭塞性细支气管炎;近交系大鼠
【中图法分类号】 R-33;R562.21;R655.3 【文献标志码】 A

肺移植是治疗终末期肺病的有效方法,而闭塞性细支气管炎(obliterative bronchiolitis,OB)是影响肺移植患者的长期生存主要原因。OB 是指组织病理学上的炎症和纤维增生表现,在临床上称为闭塞性细支气管炎综合征(bronchiolitis obliterans syndrome,BOS),表现为肺功能下降[1]。OB 严重影响患者的肺功能和生活质量,目前却不能得到有效治疗。本实验通过大鼠的同种异体气管原位移植发生的气道阻塞性病变(obliterative airway disease,OAD)来模拟肺移植后发生的 OB,旨在为国内肺移植后 OB 研究提供了一种新的模型选择。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

近交系 BN 和 Lewis 大鼠(SPF 级),雄性,体质量 200 ~ 250 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司(北京)。同系移植组:Lewis→Lewis,18 只;异系移植组:BN→Lewis,18 只。受体按随机数字表法分组,术后未予免疫抑制治疗。

1.2 原位气管移植

1.2.1 供体手术 大鼠用水合氯醛(350 mg/kg)腹腔注射麻醉。麻醉成功后,大鼠取仰卧位,四肢、头颈固定于手术台上。颈前正中切口,分离、暴露颈部的气管,切取气管,长 13 ~ 15 个气管环。置于冷生理盐水中冲洗,并将其分为有 5 个气管环的两段气管,每段气管移植到 1 个受体中。

1.2.2 受体手术 麻醉和固定同供体。颈前正中切口,小心止血。分离颈前带状肌,暴露颈部气管。仔细分离气管周围的颈部食管和血管,注意避免出血和损伤喉返神经。自然呼吸状况下,切除第 5、6 气管环。在第 3 和第 8 气管环各缝一针(7-0 丝线),将两端轻轻向上牵拉,可防止气道回缩和术野出血流入气道。将供体气管与受体气管端端吻合,先用 7-0 丝线连续外翻吻合气管膜部,然后间断吻合近端气管软骨部(近心端),如果没有呼吸困难,最后吻合远端气管软骨部。注意放正移植气管位置,皮肤切口用 1-0 丝线缝合。整个过程保持自然呼吸,不需要机械通气。术后置于安静环境,正常予水和食物。

1.3 CT 扫描和三维重建

将原位气管移植后 7、14、30、60 d 的大鼠麻醉后,行 Micro-CT(美国 GE 公司)扫描,并进行三维重建,通过 GEHC MicroView software(美国 GE 公司)测量气道阻塞面积,并计算气道阻塞率。阻塞率 = (软骨环内面积 - 实际剩余管腔面积)/软骨环内面积 × 100%[2]。因为在正常气管软骨内的上皮和黏膜下组织也占有一定的面积,按以上方法计算,占 5% ~ 10%。

1.4 组织病理学

每组 6 只,分别于移植后 7、30、60 d,将移植气管段取出,固定于 10% 中性甲醛溶液,常规石蜡包埋,制成 3 μm 厚切片,行苏木精-伊红(HE)染色观察。

1.5 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件两组间比较行独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 实验动物手术结果

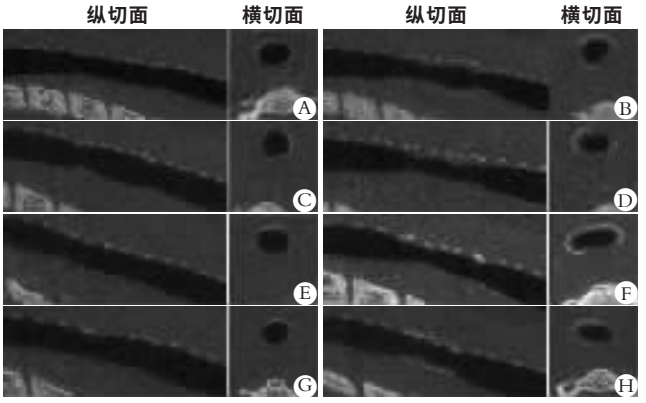
同系移植组大鼠行原位气管移植术后无明显症状。异系移植组大鼠在移植后第 2 ~ 3 天,开始出现呼吸急促,活动减少,第 5 ~ 7 天达到最重,然后稍有缓解,活动量渐正常。

2.2 移植气管 CT 扫描及三维重建

术后 7、14、30 d 和 60 d,移植气管行 Micro-CT 扫描及三维

【基金项目】 国家自然科学基金(30872557);上海市优秀学科带头人项目(08XD14033)
【通信作者】 范慧敏,E-mail:frankfan64@hotmail.com
刘中民,E-mail:zhongmin_liu@sina.com

重建,异系移植气管出现明显的管腔阻塞,其中以第7天阻塞最重,随后渐改善,而同系移植气管没有气道阻塞(图1)。根据CT影像,计算移植气管阻塞率。异系移植组术后7、14、30 d和60 d气道阻塞率分别为(56.8±9.04)%、(51.05±9.79)%、(44.01±7.92)%和(42.97±8.82)%,而各时间点同系移植组气管阻塞率均在8%左右,同一时间点异系移植气管气道阻塞率均显著高于同系移植气管($P<0.01$)。



A、C、E、G:同系移植组;B、D、F、H:异系移植组;A、B:术后7 d;C、D:术后14 d;E、F:术后30 d;G、H:术后60 d

图1 CT扫描及三维重建观察2组大鼠移植气管内膜变化

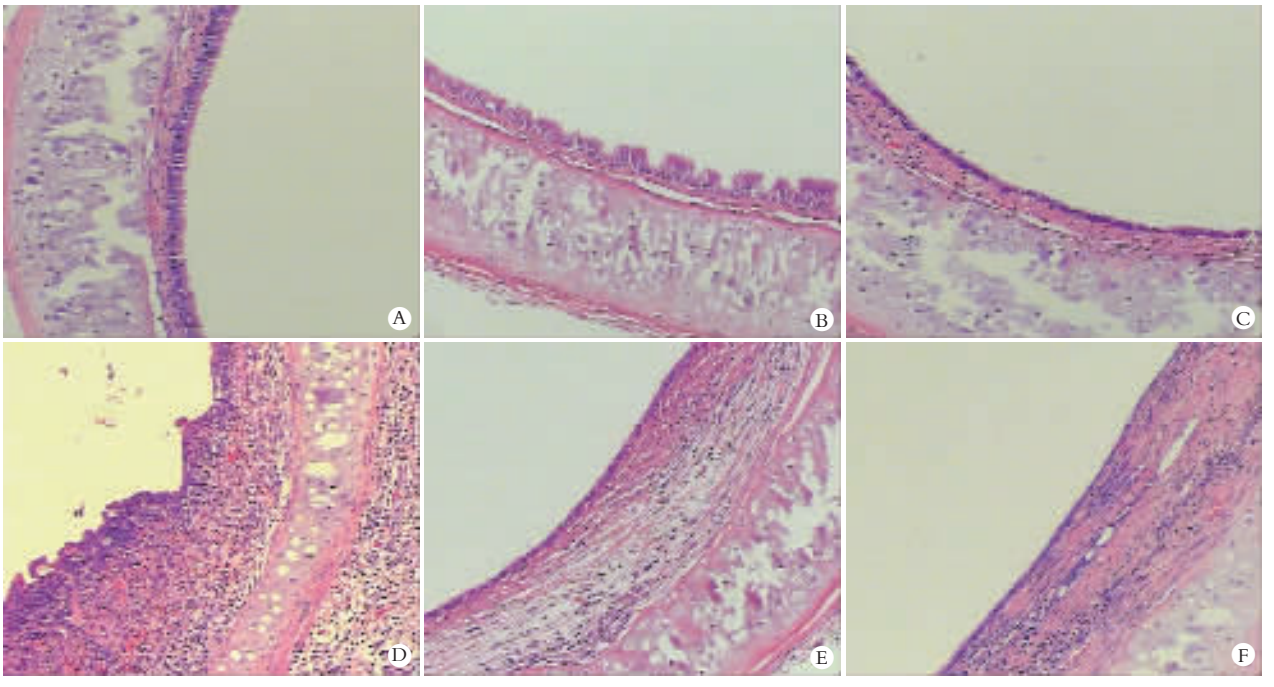
2.3 多植气管组织病理学检查

病理HE染色观察见图2。移植气管内膜变化:同系移植组移植气管术后7 d内膜轻度水肿,术后30、60 d水肿消退,内膜纤毛柱状上皮细胞均生长良好,无纤维组织增生;异系移植组移植气管术后7 d内膜严重水肿,内膜无纤毛柱状上皮细胞生长,无纤维组织增生,术后30、60 d水肿消退,部分纤毛柱状上皮细胞生长(为上皮细胞的50%左右),余为扁平上皮和立方上皮细胞,内膜下见梭状核的成纤维细胞,出现纤维组织增生。

移植气管炎症细胞浸润情况:同系移植组移植气管术后7 d内膜有少量中性粒细胞、淋巴细胞浸润,术后30、60 d未见明显炎症细胞;异系移植组移植气管术后7 d内膜大量中性粒细胞、淋巴细胞浸润,术后30、60 d气管内膜以淋巴细胞浸润为主。

3 讨论

对于肺移植和心肺移植患者来说,OB是其长期生存的重要威胁。肺移植后引发固有免疫反应和适应性免疫反应,导致继发性呼吸道损害。临床OB的病理表现为细支气管黏膜下外周炎性细胞浸润和基质沉积、纤维增生致管腔狭窄,管腔内可有肉芽组织形成[3]。OB研究的主要障碍就是缺少一个理想的动物模型。虽然大鼠左肺移植模型已成功用于缺血再灌注研究中[4],但用于肺移植后OB研究还有一些不足,如时间长、技术要求高、在气道病变形成过程中,组织学变化大,不能稳定的形成OB[5]。同时,异位气管移植因其简单、方便、易复制,而被广泛用于OB的研究[6]。但是这种模型模拟OB也有一些缺点:①移植气管所处的细胞因子微环境与胸腔环境是不同的[7];②宿主来源细胞的再上皮化过程不会出现,原位气管移植移植物上皮细胞会被宿主来源的上皮细胞替代,表现出再上皮化过程[8];③气道的自净作用消失,增加发生纤维化风险;④缺少气流,不能观察空气中各种病原对移植物的影响;⑤不能观察呼吸道给药对免疫排斥的治疗效果。通过移植气管CT扫描和三维重建以及组



A、B、C:同系移植组;D、E、F:异系移植组;A、D:术后7 d;B、E:术后30 d;C、F:术后60 d

图2 2组大鼠移植气管不同时间的病理变化 (HE ×100)

织病理检查,我们发现原位气管移植模型中,异系移植气管可以看到明显的管腔阻塞,但不是完全的阻塞;而同系移植气管保存完好的、具有纤毛柱状上皮的生理结构,这证实了排斥反应过程中的免疫学本质。在原位气管移植中移植物发生气道阻塞性病变的过程较慢,肉芽组织的存在证实了这一过程。同种异体原位气管移植后发生的 OAD 用于模拟肺移植后 OB 可以克服肺移植和异位气管移植的一些缺点更好的用于实验研究。但其亦有缺点:①人体肺移植 OB 发生在末端细支气管而不是气管;②与肺移植不同,原位气管移植不是再血管化的器官。

本实验我们成功建立了同种异体原位气管移植模型。该模型简单、实用、重复性好,能够很好模拟肺移植后 OB 的病理变化,并且由于移植动物采用近交系大鼠,其遗传背景明确,有利于进一步研究的展开。

参考文献:

[1] Belperio J A, Weigt S S, Fishbein M C, *et al*. Chronic lung allograft rejection: mechanisms and therapy [J]. Proc Am Thorac Soc, 2009, 6(1): 108 - 121.

[2] Reichenspurner H, Soni V, Nitschke M, *et al*. Obliterative airway disease after heterotopic tracheal xenotransplantation: pathogenesis and prevention using new immunosuppressive agents [J]. Transplantation, 1997, 64(3): 373 - 383.

[3] Laohaburanakit P, Chan A, Allen R P. Bronchiolitis obliterans [J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2003, 25(3): 259 - 274.

[4] Yamane M, Liu M, Kaneda H, *et al*. Reperfusion-induced gene expression profiles in rat lung transplantation [J]. Am J Transplant, 2005, 5(9): 2160 - 2169.

[5] Wiebe K, Fraund S, Steinmuller C, *et al*. Rat cytomegalovirus and Listeria monocytogenes infection enhance chronic rejection after allogenic rat lung transplantation [J]. Transpl Int, 2005, 18(10): 1166 - 1174.

[6] Hertz M I, Jessurun J, King M B, *et al*. Reproduction of the obliterative bronchiolitis lesion after heterotopic transplantation of mouse airways [J]. Am J Pathol, 1993, 142(6): 1945 - 1951.

[7] Dutly A E, Andrade C F, Verkaik R, *et al*. A novel model for post-transplant obliterative airway disease reveals angiogenesis from the pulmonary circulation [J]. Am J Transplant, 2005, 5(2): 248 - 254.

[8] Deuse T, Schrepfer S, Reichenspurner H, *et al*. Techniques for experimental heterotopic and orthotopic tracheal transplantations-When to use which model? [J]. Transpl Immunol, 2007, 17(4): 255 - 261.

(收稿:2010-01-19;修回:2010-03-18)
(编辑 汪勤俭)

文章编号:1000-5404(2010)15-1675-03

短篇论著

新型甲型 H_1N_1 流感毒株 NA 基因特征和进化

钟 静[1],黄 平[2],倪汉忠[2],李昕洁[1],张 欣[2],廖家政[2] (510095 广州,广州市胸科医院内科[1];510300 广州,广东省疾病预防控制中心广东省应急病原学检测重点实验室[2])

【摘要】 目的 通过对新型甲型 H_1N_1 流感毒株神经氨酸酶(NA)基因序列的变异分析,揭示毒株 NA 基因变异与进化。方法 检测广东地区分离毒株 NA 基因核苷酸序列,同时对全球新型甲型 H_1N_1 流感毒株 NA 基因进行检索下载,采用 Lasergene 7.1 软件比对和分析 NA 基因核苷酸和氨基酸序列,结合临床资料分析变异基因进化,同时分析糖基化位点。结果 2009 年 4 - 12 月 69 株毒株 NA 基因 16 个氨基酸位点置换,占 3.41%(16/469);NA 蛋白主要置换位点在 $V_{106}I/H$ 和 $N_{248}D$。毒株 GD-801-2009(H_1N_1)和 GD-1202-2009 的 NA 基因明显受到的感染宿主选择性作用,而毒株 GD-1-2009 的 NA 基因明显受到的感染宿主负选择性作用。与毒株 GD-1-2006(H_5N_1) NA 基因比较,毒株 GD-801-2009 的 NA 基因插入 $Nt_{145-204}$,导致 H_1N_1 NA 蛋白增加第 49 ~ 68 位氨基酸(CNQSVITYENNTWVNQTYVN),其中包括 4 个糖基化位点。结论 广东新型甲型 H_1N_1 流感毒株 NA 基因正向不同方向进化;新型甲型 H_1N_1 流感 NA 蛋白新增 4 个糖基化位点。

【关键词】 新型甲型 H_1N_1 毒株;NA 基因;特性;进化;糖基化
【中图法分类号】 Q373.13;Q933 **【文献标志码】** A

2009 年 4 月出现于墨西哥和美国的新型甲型 H_1N_1 流感病毒属于新型猪流感甲型 H_1N_1 流感病毒(novel swine-origin influenza A H_1N_1 virus,S-OIV)[1],目前正持续在全球人群中传播。据分析,该毒株神经氨酸酶(NA)属于欧亚猪流感基因系,是基因重配所致[2];其中欧亚基因系 NA 节段病毒可能源于禽流感病毒,于 1979 年介入并传播于欧亚猪群(西班牙)[3]。神经氨酸酶又称唾液酸酶,由流感病毒节段 6 编码,是分布于流感病毒被膜上的一种糖蛋白,具有抗原性,可以催化唾液酸水解,并协助成熟流感病毒脱离宿主细胞感染新的细胞,在流感病毒的生活周期中扮演了重要的角色[4]。神经氨酸酶负责催化唾液酸与糖蛋白之间糖苷键的水解。

本课题组曾研究人禽流感 H_5N_1 流感 NA 基因的特征,发现一些有意义线索[5]。为了解新型甲型 H_1N_1 流感病毒 NA 基因的特征,我们检测广东地区毒株并

【基金项目】 国家自然科学基金(30972757)
【通信作者】 黄 平,电话:(020)89104500,E-mail:pphuang1@163.com