文章编号:1000-5404(2014)22-2283-04

论著

闭塞性细支气管炎小鼠模型的建立与评价

李 松[1],张素倩[1],邹 琳[2],符 州[3],代继宏[3] (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院:儿童发育疾病研究教育部重点实验室[1],重庆市干细胞治疗工程技术研究中心 & 重庆医科大学儿童医院临床分子医学中心[2],呼吸中心[3])

[摘要] **目的** 探讨建立闭塞性细支气管炎(bronchiolitis obliterans, BO)小鼠动物模型的方法。**方法** 将SPF级C57BL/6雄性小鼠(6~8周)按随机数字表法分为两组:对照组和模型组(BO组),每组6只。模型组构建采用初次气管内滴注2,3丁二酮(DA)(490 mg/mL即500 mg/kg)1次,对照组采用初次气管内滴注已消毒的蒸馏水代替,其余实验条件和方法2组相同。饲养于SPF级动物中心,至第3天和第7天收集标本,分别留取支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid,BALF)和左肺行病理学检测。饲养期间观察小鼠一般状态,监测两组体质量变化,用无创肺功能体描仪行小鼠气道高反应监测,支气管肺泡灌洗,细胞计数及炎性细胞分类计数;左肺行病理切片、HE染色、图像分析与采集。**结果** 模型组小鼠给予DA后1 d可出现吼喘、呼吸加快等,监测体质量显著低于对照组($P<0.05$)。与对照组相比,模型组肺功能(雾化乙酰甲胆碱浓度为50 mg/mL时)增强呼气间歇(enhanced pause, Penh)值明显升高($P<0.05$)。模型组小鼠BALF炎性细胞总数及分类计数可见第3天时中性粒细胞总数显著高于对照组($P<0.05$),第7天时淋巴细胞总数、巨噬细胞总数显著高于对照组($P<0.05$)。病理切片HE染色可见典型的BO改变。3 d模型组细支气管腔内及管腔周围大量炎性细胞浸润,管腔严重闭塞,组织急性期出血严重;7 d模型组基底细胞严重坏死,气道上皮细胞虽附着于基底,但可见细胞明显增生肥大,细胞核丢失严重,管腔内炎性细胞浸润,管腔壁增厚,类纤维化表现。**结论** C57BL/6小鼠给予气管内滴注DA(500 mg/kg)1次,可于第7天观察到典型的急性期BO改变,可以成功建立BO小鼠模型。

[关键词] 闭塞性细支气管炎;2,3丁二酮;小鼠;模型
[中图法分类号] R-332;R562.21 [文献标志码] A

Establishment and evaluation of murine model of bronchiolitis obliterans

Li Song[1], Zhang Suqian[1], Zou Lin[2], Fu Zhou[3], Dai Jihong[3] ([1]Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education Key, [2]Chongqing Engineering Research Center of Stem Cell Therapy & Center for Clinical Molecular Medicine, [3]Center of Respiratory Disorders, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the establishment of murine model method for bronchiolitis obliterans (BO). **Methods** C57BL/6 mice(SPF) were randomly divided into normal control group and BO model group and 6 mice per group. The mice of BO group were intratracheal instillated with diacetyl (DA) (490 mg/mL, 500 mg/kg) and the mice in control group with sterile distilled water. The rest of the experimental conditions and methods were the same. The mice were kept in SPF class animal center for 3 or 7 d to collect specimens. The mice were dynamically observed the general status, body weight, pulmonary function, cell counts, inflammatory cell count of bronchoalveolar lavage fluid, as well as the pathological and H&E staining for lung slices. **Results** The model group mice were given DA (500 mg/kg) after 1 d and they presented wheezing, rapid breathing and other symptoms, the weight was significantly lower than the control group ($P<0.05$). Compared with the control group, the lung function (aerosolized methacholine concentration was 50 mg/mL) enhanced pause (Penh) was increased significantly ($P<0.05$). Model mice inflammatory cell count and classification counting neutrophils were significantly higher than the control group ($P<0.05$) in 3 d, and the total cells and lymphocytes, macrophages were significantly higher than that of the control group ($P<0.05$) in 7 d. Pathological section HE staining showed typical BO changes (around the 3 d, model group bronchial lumen and infiltration of inflammatory cells, luminal severe occlusion, tissue in the acute stage of

[基金项目] 重庆市卫生和计划生育委员会医学科研计划重点项目(20141008)
[通信作者] 代继宏,E-mail:danieljh@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141030.0825.001.html(2014-10-30)

severe bleeding; In 7 d, basal cells were severe necrosis, airway epithelial cells were attached to the substrate, but seen obvious cell hyperplasia and hypertrophy, cell nucleus lost seriously, inflammatory cell infiltration in the lumen, and the lumen wall thickening, fibrosis). **Conclusion** The mouse model of bronchiolitis obliterans (BO) should be established successfully by intratracheal instillation DA (500 mg/kg) one time.

[**Key words**] bronchiolitis obliterans; diacetyl; murine; model

Supported by the Key Project of Medical Research of Chongqing Municipal Health and Family Planning Commission(20141008). Corresponding author: Dai Jihong, E-mail: danieljh@163.com

闭塞性细支气管炎(bronchiolitis obliterans, BO)是气道炎性损伤所致的慢性呼吸道疾病[1],表现为小气道纤维增殖性病变使管腔狭窄,并最终闭塞,患者出现进行性、不可逆的气流受阻。BO是严重威胁人类健康的呼吸道疾病,对患者气道造成显著不可逆损害,目前尚无有效防治手段,所带来的患者社会卫生支出较高,应高度重视,积极寻找病因、发病机制及有效治疗手段。成功的动物模型是研究BO发病机制、干预的重要手段。本研究探讨建立BO小鼠模型的方法,观察病理学、炎性浸润等指标改变。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

选取6~8周清洁级雄性C57BL/6小鼠,购于重庆医科大学实验动物研究中心,小鼠饲养于重庆医科大学附属儿童医院实验动物研究中心,SPF动物房;实验时室温(22±1)℃,湿度(47±2)%。实验操作均按照实验动物指南进行。小鼠按体质量随机分为2组(每组6只):BO模型组:初次气管内滴入2,3丁二酮(DA)(500 mg/kg),对照组:以消毒的蒸馏水(500 mg/kg)代替DA气管内滴入。2组均分别于3、7 d处理。每天于同一时间点观察小鼠一般情况及体质量至第7天,并做好记录。

1.2 主要试剂与仪器

戊巴比妥钠粉剂、2,3丁二酮(DA)、乙酰甲胆碱(Mch,Sigma,美国),MPA生物信号采集分析系统(上海奥尔科特生物有限公司),显微外科手术器械(苏州医疗器械厂),光学显微镜(OLYMPUS,Japan),BMJ-Ⅲ型包埋机(常州中威电子仪器厂),石蜡切片机(leica,Germany),制冰机(Cainelius)。

1.3 肺功能测定

分别于第3天和第7天用无创肺功能体描仪行小鼠气道高反应性检测,先测定基础肺功能值,再将待检测的小鼠雾化吸入乙酰甲胆碱(Mch),依次由低浓度开始(0、3.125、6.25、12.5、25、50 mg/mL),每个浓度雾化3 min、休息2 min,连续记录5 min并取其平均值。用增强呼气间歇(enhanced pause, Penh)值表示不同质量浓度乙酰甲胆碱后的气道高反应性。

1.4 外周血和支气管肺泡灌洗液(BALF)的获取

分别于3、7 d后眼球取血,血液静置2 h,2 500 r/min离心10 min,留取血清冻存于-80 ℃待检。颈椎脱臼法处死小鼠,行支气管肺泡灌洗(每次注入已消毒过滤且预冷的PBS 0.5 mL×3次,回抽率达85%以上),置于10 mL EP管中,4 ℃,2 500 r/min 5 min离心,弃上清,沉渣用1 mL预冷的PBS重悬,吸取细胞悬液加入细胞计数板,400倍镜下计数炎性细胞总数;剩余细胞悬液再次离心(4 ℃,2 500 r/min, 5 min),弃上清,取少许沉渣涂片。

1.5 炎性细胞计数及分类计数

将细胞涂片进行瑞士染色,油镜下计数巨噬细胞、淋巴细胞、中性粒细胞及其他炎性细胞数。

1.6 肺组织HE染色及图像分析

取2组小鼠左肺组织,置于10%中性甲醛中固定(至少大于24 h),石蜡包埋,切片4 μm,苏木精-伊红(HE)染色,光镜下观察病理改变。

1.7 统计学处理

计量资料用$\bar{x} \pm s$表示,采用GraphpadPrism 5.03统计软件,两组间均数比较采用两因素方差分析。

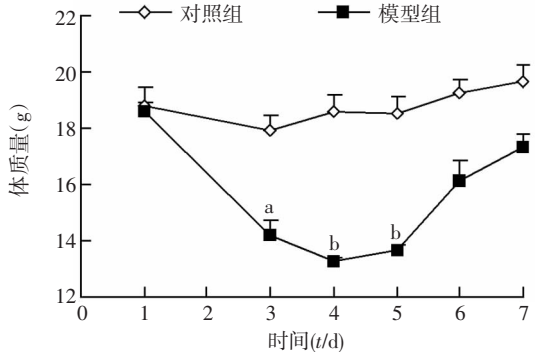
2 结果

2.1 小鼠行为学观察

首次气管内滴注DA 1 d后实验组小鼠可出现吼喘、呼吸加快,抓口鼻等表现,第2天出现少许适应,仍有吼喘加重、呼吸加快等阳性反应;对照组无以上症状。

2.2 小鼠体质量变化

模型组小鼠体质量于第1~3天下降最明显,从第4天后出现回升趋势,监测其体质量显著低于对照组($P<0.05$,图1)。

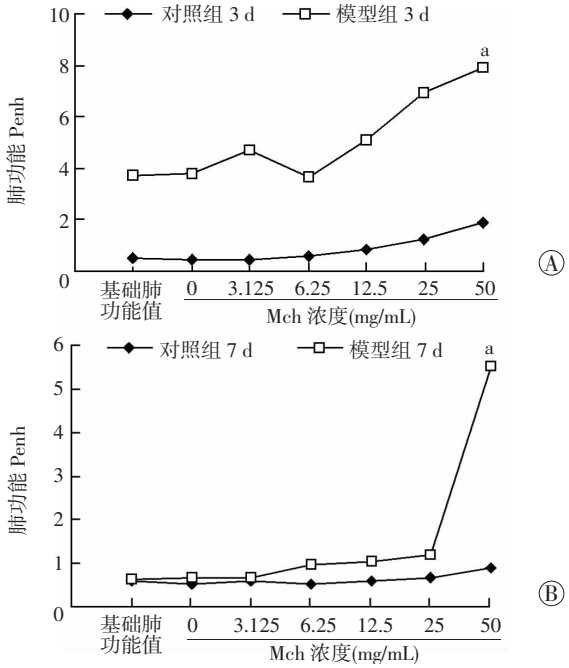


a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与对照组相比

图1 2组小鼠体质量变化比较

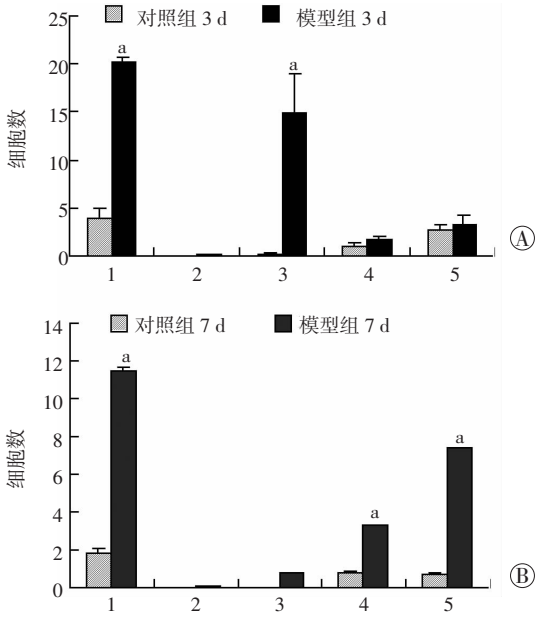
2.3 小鼠气道高反应变化

模型组小鼠的气道阻力均随吸入乙酰甲胆碱质量浓度的增加而呈现上升趋势。与对照组相比,第3天和第7天肺功能(雾化Mch浓度为50 mg/mL时)Penh明显升高,分别为对照组的4倍和5.5倍,差异有统计学意义($P<0.05$,图2)。



A:3 d;B:7 d; a: $P<0.05$,与对照组相比

图 2 2 组小鼠 3、7 d 时肺功能比较



1:总数($\times 10^5$);2:嗜酸性粒细胞;3:中性粒细胞;4:淋巴细胞;5:巨噬细胞 a: $P<0.05$,与对照组相比 A:3 d;B:7 d

图 3 2 组小鼠 3、7 d BALF 中炎性细胞分类计数

2.4 2 组小鼠 BALF 中细胞总数和巨噬、淋巴、中性粒细胞计数及分类计数

模型组小鼠 BALF 炎性细胞总数及分类计数可见,第 3 天时模型组中性粒细胞总数显著高于对照组($P<0.05$),第 7 天时模型组淋巴细胞总数、巨噬细胞总数显著高于对照组($P<0.05$,图 3)。

2.5 2 组小鼠肺组织病理学改变

通过不同浓度的 DA 气管内滴注 1 次后,HE 染色可以看到 500 mg/kg DA 时可以产生典型 BO 病理改变(图 4、5)。3 d 模型组气道上皮细胞扁平,细胞核增大,细支气管腔内及管腔周围大量炎性细胞浸润,管腔严重闭塞,组织急性期出血严重;7 d 模型组基底细胞严重坏死,气道上皮细胞虽附着于基底,但可见细胞明显增生肥大,细胞核丢失严重,管腔内炎性细胞浸润,管腔壁增厚,类纤维化表现。

3 讨论

闭塞性细支气管炎是一种少见的、不可逆的慢性呼吸道疾病[2]。目前,BO 的病因、发病机制还不清楚,因发生、发展过程比较缓慢和严重,在人体深入探讨该病的发病机制、预防及治疗受到一定的限制,建立合适的动物模型对于研究 BO 的病理生理过程和后续的新疗法等非常关键。

制作 BO 动物模型方法有异位气管移植、原位气管移植、异位肺移植、原位肺移植、腺病毒感染、持续高频雾化吸入化学或有毒物质(如 2,3 丁二酮、罂粟碱、萘)等。传统的全肺移植模型需要的技术条件高,操作费时费力,尤其在小动物,血管和气管的吻合非常困

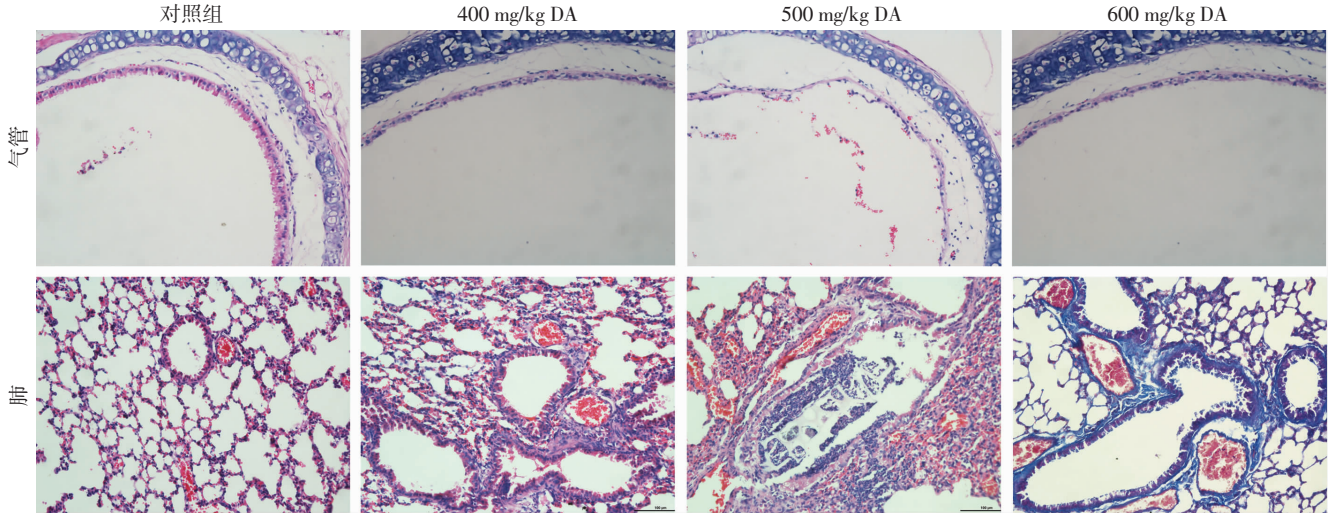


图 4 对照组及不同浓度的 DA 气管内滴注 1 次后的模型组气管和肺部病理改变 (HE ×200)

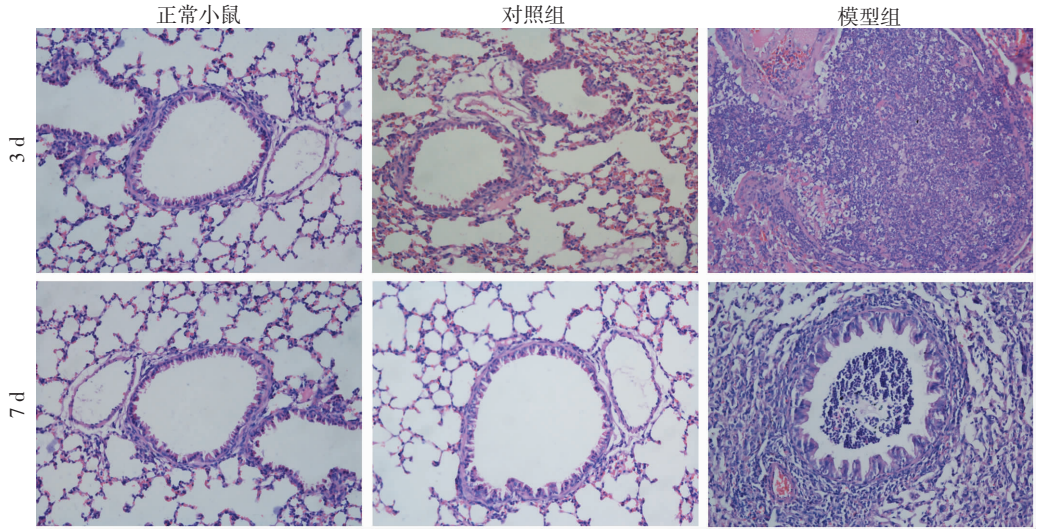


图5 对照组与DA(500 mg/kg)气管内滴注1次后的模型组肺部3、7 d病理改变 (HE ×200)

难。术中和术后动物的死亡率很高,术后较长时间才能形成BO模型。因此我们在高频雾化吸入DA的基础上进行改良,建立了一种更为便捷的气管内滴注DA致BO急性期病变的模型[3]。本实验选用具有实验成本低、有较多的纯系品种可用、免疫遗传背景较为清楚、试剂来源广泛等优点的C57BL/6小鼠作为实验动物。

由于实验中雌性小鼠抵抗力明显低于雄性,且体质量下降明显、死亡率高,本实验选择SPF级C57BL/6雄性小鼠,存活率高达95%以上,以便能更好地模拟BO的发病过程。实验中所用的DA挥发性强,刺激性大,对环境污染重,故选择气管内滴注的方式[4],避开对鼻腔的损害,效率高,病变明显。在C57BL/6小鼠BO模型制备过程中,DA的浓度和给药时间、次数至关重要,当DA浓度是400 mg/kg时,7 d时可见轻度终末细支气管周围炎性细胞浸润;当DA浓度为600 mg/kg时,小鼠于第3天死亡2只,第4天全部死亡,死亡率高。当DA浓度500 mg/kg时(图4),小鼠死亡率低,且可出现典型BO病理改变。从实验结果可以看到,模型组小鼠在滴入DA的过程中出现了明显的类似于气管插管的呼吸症状,表明药物到达肺部。从小鼠生存状态可以看出模型组体质量均低于对照组($P<0.05$);气道高反应检测显示BO组气道炎症明显高于对照组($P<0.05$);第3天时BALF中炎性细胞总数及分类计数显示炎性细胞以中性粒细胞升高为主,第7天则以淋巴和单核升高为主($P<0.05$)。BO是一个病理学概念,病理特征为细支气管及其周围炎症和纤维化导致管腔的闭塞。BO确诊依靠病理学检查,理论上开胸肺活检是确诊的金标准[5]。本实验中肺组织病理切片HE染色可见3 d模型组气道上皮细胞扁平,细胞核增大,细支气管腔内及管腔周围大量炎性细胞浸润,管腔严重闭塞,组织急性期出血严重;7 d模型组基底细胞严重坏死,气道上皮细胞虽附着于基底,但可见细胞明显增生肥大,细胞核丢失严重,管腔内炎性细胞浸润,管腔壁增厚,类纤维化表现,结果与国外文献[6-7]报道一致。机制可能是免疫损伤致上皮破坏后,单核细胞、淋巴细胞浸润释放大量的炎性因子,刺激平滑肌细胞、纤维组织细胞增生,形成管腔阻塞[8-9],但具体机制还有待于进一步研究。

本研究结果证明了在C57BL/6雄性小鼠气管内1次滴入DA 500 mg/kg,可成功复制出BO急性期动物模型,可进一步用于发病机制和干预的实验研究。

参考文献:

[1] 中华医学会儿科学分会呼吸学组、《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童闭塞性细支气管炎的诊断与治疗建议[J]. 中华儿科杂志, 2012, 50(10): 743-745.

[2] Mauck K A, Hosenpud J D. The bronchial epithelium: a potential allogeneic target for chronic rejection after lung transplantation [J]. J Heart Lung transplant, 1996, 15(7): 709-714.

[3] Osier M, Oberdorster G. Intratracheal inhalation vs intratracheal instillation: differences in particle effects [J]. Fundam Appl Toxicol, 1997, 40(2): 220-227.

[4] Palmer S M, Flake G P, Kelly F L, *et al*. Severe Airway Epithelial Injury, Aberrant Repair and Bronchiolitis Obliterans develops after Diacetyl Instillation in Rats [J]. PLoS One, 2011, 6(3): e17644.

[5] 赵德育, 秦厚兵. 儿童闭塞性细支气管炎的研究现状[J]. 中华儿科杂志, 2011, 49(10): 727-729.

[6] Morgan D L, Flake G P, Kirby P J, *et al*. Respiratory Toxicity of Diacetyl in C57BL/6 Mice [J]. Toxicol Sci, 2008, 103(1): 169-180.

[7] O'Koren E G, Hogan B L, Gunn M D. Loss of Basal Cells Precedes Bronchiolitis Obliterans-Like Pathological Changes in a Murine Model of Chlorine Gas Inhalation[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013, 49(5): 788-797.

[8] Mauad T, Van-Schadewijk A, Schrumpf J, *et al*. Lymphocytic inflammation in childhood bronchiolitis obliterans [J]. Pediatr Pulmonol 2004, 38(2): 233-239.

[9] 李栋, 张志泰, 区颂雷. 小鼠闭塞性细支气管炎动物模型的建立[J]. 临床肺科杂志, 2010, 15(9): 1278-1280.

(收稿:2014-07-08;修回:2014-09-18)

(编辑 邓强庭)