DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.19.039
第26卷第19期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 19
1788 2004年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2004

经验交流

文章编号:1000-5404(2004)19-1788-02

烟雾和弹性蛋白酶诱导大鼠肺气肿模型的实验研究

An obstructive emphysema model in rats induced by smog and elastase

谭群友,龚太乾,李东亮,王如文,蒋耀光 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所全军胸外科中心,重庆 400042)

阻塞性肺气肿是一种常见的、以气流受限为特征的呼吸道疾病[1],其发病机制和动物模型仍在探讨中。本研究旨在观察烟雾和弹性蛋白酶在肺气肿形成过程中的作用及相互影响,为相关的实验研究复制出较理想的阻塞性肺气肿动物模型。

1 材料和方法

1.1 动物分组及模型制作

48只纯种雄性SD大鼠(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供),体质量280~343 g,完全随机等分为4组,每组12只。吸烟组和复合组大鼠置于自制有机玻璃箱内被动吸烟,每次点燃香烟(银象牌)15支,1次/d,持续30 min,每周5次,连续7周。第4周时吸烟组气管内注入生理盐水1 ml,复合组气管内注入猪胰弹性蛋白酶(SURVA公司)溶液1 ml(50 U/100 g)。注酶组正常喂养7周,第4周时气管内注入猪胰弹性蛋白酶溶液1 ml(50 U/100 g)。对照组正常喂养7周,第4周时气管内注入生理盐水1 ml。

1.2 血气分析与肺功能测定

7周后,肌注速眠新(0.04 ml/100 g)全麻大鼠,颈动脉采血1 ml,血气分析。气管切开插管,参照文献[2],应用AniRes2003动物肺功能分析系统(北京鑫奥成科技有限公司)测定潮气量(VT)、最大自主通气量(MVV)、0.3 s用力呼气容积(FEV0.3)、FEV0.3/FVC(用力肺活量)和功能残气量(FRC)。其中FEV0.3和FVC的测定采用外加压力法迫使大鼠深呼气和深吸气。

1.3 病理标本制备及形态定量分析

主动脉放血处死大鼠,完整取出肺脏,肉眼观察肺部改变。经气管用4%多聚甲醛溶液灌注固定,保持20 cmH_2O压力30 min,所灌注的液体量为肺总容积(TLC)。4%多聚甲醛溶液固定肺脏24 h以上,矢状面取材4块,脱水,HE染色和Weigert弹力纤维染色,光学显微镜下观察。每张切片均随机选取上、中、下、左和右5个视野,用HIPS-1000多功能真彩色病理图文分析系统对标本(10×10)进行每视野的平均肺泡数(Na)、肺泡直径(Da)、肺泡表面积(Sa)和肺泡隔密度(Ds)测定与计算。

1.4 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS8.0统计软件行方差分析及均数间多重比较。

2 结果

2.1 呼吸功能及血气分析

注酶组和复合组VT、MVV、FEV0.3、FEV0.3/FVC和PaO_2降低,而FRC和$PaCO_2$增加,与对照组比较,差异显著(注酶组$P<0.05$,复合组$P<0.01$),而吸烟组无明显变化($P>0.05$)。

2.2 病理观察及形态学定量

肉眼观察大体标本吸烟组和复合组肺脏略变黄,复合组的肺脏可见有局部区域脏层胸膜下气腔增大,而注酶组仅有轻度变化,对照组及吸烟组肉眼见无肺气肿征象。光镜下,吸烟组和复合组可见有肺泡巨噬细胞及中性白细胞在终末细支气管内聚集。复合组动物出现肺泡管、肺泡囊及肺泡发生扩张及破坏,弹力纤维减少、破碎,巨噬细胞及中性粒细胞在终末细支气管内聚集。注酶组有同样但程度较轻的变化。对照组无变化。注酶组和复合组Na、Ds和弹力纤维含量均降低,而TLC、Sa和Da增加,与对照组比较,差异有显著性(注酶组$P<0.05$,复合组$P<0.01$),而吸烟组无明显变化($P>0.05$)。

3 讨论

目前常采用吸烟,气管内吸入或注射蛋白酶的方法复制阻塞性肺气肿动物模型,但烟雾主要诱导小气道炎症(慢性支气管炎)且所需时间较长,而单纯给予蛋白酶主要破坏肺泡壁(肺气肿)而无明显的气道阻塞性改变,并且若要复制严重肺气肿而给予大剂量蛋白酶易致动物的高病死率[3]。本研究同时给予大鼠烟雾和弹性蛋白酶,复制出了功能学和病理学均较理想的阻塞性肺气肿模型。本组将猪胰弹性蛋白酶溶于生理盐水后滴入大鼠气管内,破坏了终末细支气管和肺泡壁,肺功能、动脉血气分析显示V_T、MVV、$FEV_{0.3}$、$FEV_{0.3}$/FVC、PaO_2降低,而FRC和$PaCO_2$增加。病理观察及组织学定量检测表明,肺总容积、肺泡数、肺泡间隔密度和弹力纤维含量均降低,而肺泡表面积和直径增加,符合阻塞性肺气肿的特征性改变,但改变尚不明显。吸烟已被公认为肺气肿的主要致病因素,它可引起蛋白酶/抗蛋白酶平衡失调导致肺气肿的发生[4,5]。经弹性蛋白酶处置后的动物暴露于香烟雾中,肺气肿程度明显大于单纯气管内注入弹性蛋白酶的动物,而单纯暴露于香烟雾中的动物只有肺泡炎性细胞浸润,无明显的肺气肿病变,从而证明香烟吸入可促进弹性蛋白酶诱发的肺气肿进展。其可能的机制是:动物由气管内注入弹性蛋白酶后,肺内弹力纤维断裂、破坏,引起肺泡腔扩大,肺弹性回缩力下降[3];吸烟可引起弹性蛋白酶的主要来源的肺泡巨噬细胞和中性白细胞聚集[5,6];香烟的气相烟

基金项目:第三军医大学校管课题(2001)
Supported by the Scientific Research Foundation of Third Military Medical University (2001)
作者简介:谭群友(1971—),男,重庆市人,博士,主治医师,讲师,主要从事肺、食管和纵隔疾病外科治疗的基础与临床方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68757241
收稿日期:2003-10-21;修回日期:2004-01-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

雾中富含氧化剂，后者可抑制α1-抗胰蛋白酶的活性，从而引起肺内弹性蛋白酶/抗蛋白酶失衡，致使肺弹力纤维破坏[5]；同时，吸烟可以抑制弹性蛋白的合成和修复，加重肺气肿的病变。肺气肿的自然发展是一个慢性过程。本组结果表明，吸烟作为一个辅助因素，不但可引起小气道炎症，而且能强化弹性蛋白酶的作用，加快肺气肿的病程。这有利于科研工作者在相对短期内制作出理想的阻塞性肺气肿动物模型，为利用这一模型完成其它重要的科研项目赢得宝贵的时间。

关键词：烟雾；弹性蛋白酶；大鼠；肺气肿，阻塞性；疾病模型
中图法分类号：R563.3 文献标识码：B

参考文献：

[1] Pauwels R A, Buist A S, Calverley P M, *et al*. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(5): 1256-1276.

[2] Chen J C, Serna D L, Brenner M, *et al*. Diffusing capacity limitations of the extent of lung volume reduction surgery in an animal model of emphysema[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1999, 117(4): 728-735.

[3] Aoshiba K, Yokohori N, Nagai A. Alveolar wall apoptosis causes lung destruction and emphysematous changes[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003, 28(5): 555-562.

[4] Ofulue A F, Ko M. Effects of depletion of neutrophils or macrophages on development of cigarette smoke-induced emphysema[J]. Am J Physiol, 1999, 277(1 Pt 1): 97-105.

[5] 安 立，张洪玉，庞宝森，等. 维A酸对大鼠实验性阻塞性肺气肿的预防作用及其机制探讨[J]. 中华结核和呼吸杂志，2002，25(6)：356-359.

[6] Cendon S P, Battlehner C, Lorenzi Filho G, *et al*. Pulmonary emphysema induced by passive smoking: an experimental study in rats[J]. Braz J Med Biol Res, 1997, 30(10): 1241-1247.

（编辑 薛国文）

文章编号：1000-5404(2004)19-1789-02

经验交流

兔肾体外灌注的形态学变化及损伤机制

Morphologic changes of perfused rabbit kidney and its corresponding mechanisms

王贵波，吴 军 （第三军医大学西南医院烧伤研究所，创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室，重庆 400038）

由于目前待移植肾脏采取单纯冷藏法保存[1]，其较短的保存时限以及低温状态使得目前在实验研究中非常有效的以基因治疗为主减轻移植器官排斥反应和诱导受者免疫耐受状态的方法不能在临床实施。本实验即对待移植肾脏进行常温下体外灌注，观察不同灌注液对肾脏的形态学影响并探讨其损伤机制，为进一步的常温下待移植肾脏的免疫修饰条件研究提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

健康成年大耳白兔 50 只（第三军医大学实验动物中心提供），雌雄不拘，体质量 2.5～3.0 kg，随机分为正常对照（5 只）、DMEM 组（15 只）、血浆组（15 只）、血液＋DMEM 组（15 只）。观察时相点为灌注后 1、3、6 h，每组每时相点 5 只动物。

1.2 主要试剂

DMEM（Gibco），Bcl-2 小鼠 IgG1 单抗、Bax 小鼠 IgG2b 单抗（Santa Cruz），细胞凋亡 POD 试剂盒（Roche），DAB 显色试剂盒、SP9002 免疫组化试剂盒（北京中山生物技术有限公司）。

1.3 实验模型及方法

实验兔 3％戊巴比妥钠耳缘静脉麻醉（1 ml/kg）后无菌条件下取左肾，肝素钠抗凝冲洗残存血液，迅速接入灌注系统。灌注系统由可调式蠕动泵（2 台）、氧合器、储液器、器官保存器及连接管道组成[2]。将肾脏的动静脉插管接头分别与灌注装置动静脉管接头相连，将输尿管接头与排尿管连接。氧合器供氧浓度为 99.9％，氧流量为 2 L/h，氧分压大于 95 mmHg，灌注液经过两道过滤装置滤除杂质后供给离体肾，流量调节为 20 ml/min[3]，灌注温度控制在 21～25 ℃。DMEM 组灌注液为 DMEM，血浆组灌注液为新鲜的猪血浆，血液＋DMEM 组灌注液为两者 1∶3 混合液。

1.4 检测指标及方法

在确定的时相点终止灌注，观察肾脏大小、色泽和形态变化。将离体肾脏用 4％多聚甲醛固定，常规脱水、透明、包埋、5 μm 切片，HE 染色后光镜下观察分析。

凋亡原位末端标记法（terminal deoxynucleotidyl transferase TdT-mediated biotin dUTP nick end-labeling，TUNEL）染色并苏木素复染行凋亡率分析，每时相点各 5 张切片，在 10× 40 倍视野下计阳性细胞率。

Bcl-2、Bax LAB-SA 法（labeled strept avidin-biotin）免疫组化染色及半定量分析，按试剂盒说明书行 Bcl-2、Bax 免疫组化染色。每时相点各 5 张切片，MIG2000 图像分析软件（重庆大学）行其

基金项目：第三军医大学西南医院院管课题（2002）
Supported by the Research Project Sponsored by Southwest Hospital of Third Military Medical University (2002)
作者简介：王贵波（1969－），男，安徽省涡阳县人，博士，医师，主要从事移植免疫方面的研究，发表论文 20 篇。电话：(023)68752688，E-mail：wangguibo2002@yahoo.com.cn
通信作者：吴 军，电话：(023)68754006，E-mail：Juneupro@public.cta.cq.cn
收稿日期：2003-11-18；修回日期：2004-04-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net