

· 综述 ·

慢性阻塞性肺病动物模型在药理研究中的应用

于绍帅^{1,2}, 陈明苍¹, 季宇彬², 谭英姿⁴, 俞仲毅^{3*}, 张炜^{4*}

(1. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203; 2. 哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心, 哈尔滨 150076; 3. 上海中医药大学, 上海 201203; 4. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海 201203)

[摘要] 对慢性阻塞性肺病(COPD)动物模型研究的国内外报道进行文献整理,对 COPD 模型的建立以及 COPD 治疗药物开发提供新的思路。通过中科院上海药物研究所图书数据库平台查阅近几年国内外有关慢性阻塞性肺病和动物模型为关键字的研究报道 30 余篇,进行分析综合。总结了多种动物作为 COPD 动物模型的优势和缺陷,并归纳建立 COPD 模型的相关方法和评价建模成功的判断相关指标,为 COPD 模型的建立提供参考。COPD 疾病的发病过程复杂至今没能有国际统一的标准建模方法,报道多是几种方法联合进行建模;希望能为 COPD 的研究者选择模型提供一点参考,为新的治疗 COPD 的药物的开发铺路,期望在不远的将来能够建立标准化统一的 COPD 治疗与研究方法。

[关键词] 慢性阻塞性肺疾病; 动物模型; 药理

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0275-04

Animal Models of Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Pharmacological Research

YU Shao-shuai^{1,2}, CHEN Ming-cang¹, JI Yu-bin², TAN Ying-zi⁴, YU Zhong-yi^{3*}, ZHANG Wei^{4*}

(1. Shanghai Institute of Materia Medica Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China;

2. Postdoctoral Research Station of Institute of Materia Medica, Research Center of Life Science and Environment Science, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China;

3. Experimental Center of Science and Technology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

4. Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] The animal models of chronic obstructive pulmonary disease were reviewed and analyzed. It is hoped to provide a new train of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) therapeutic drug development. Data on COPD and animal models in recent years were searched by the CAS Shanghai institute of materia database platform. The advantages and disadvantages of several animals as a COPD animal model were summarized, and the methods for COPD model and the relevant indicators to judge the successfulness of COPD model were established. Because of the complex pathogenesis of the COPD, it was failed to approach a unified COPD modeling standard. The article reported that several method unions are mostly used. This review hopes to provide some reference for the new treatments for COPD drug development. We expect to establish a standardized model of COPD for the disease treatment and research in the future

[Key words] chronic obstructive pulmonary disease; animal models; pharmacological

[收稿日期] 20110720(008)

[基金项目] 国家科技重大专项“重大新药创制”课题(2009ZX09301-001)

[第一作者] 于绍帅, 硕士, 从事中药药理和毒理学研究, Tel: 18817338894, E-mail: 1020518318@qq.com

[通讯作者] * 俞仲毅, 博士, 硕士研究生导师, 从事中药药理和毒理学研究, Tel: 13564034128, E-mail: zhongyiyu2002@hotmail.com; 张炜, 博士, 硕士研究生导师, 从事呼吸系统疾病临床治疗的研究, Tel: 13023153958, E-mail: zhangw1190@sina.com

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是位于心脑血管疾病、恶性肿瘤和急性呼吸道感染之后,与艾滋病并列的全球第 4 大死亡原因。近年来由于人类生存环境的恶化, COPD 的发病率和死亡率逐年攀升,带来了巨大的医疗负担,医学界科学家预计到 2020 年可能成为全球第三大死亡原因。COPD 是一种不完全可逆的肺通气气流受限,渐进性肺功能恶化,多与气道及肺实质对有害颗粒或气体所产生的伴有炎症性损伤的慢性非特异性炎症反应,临床主要特征为小气道阻力增加,肺顺应性下降等。其发病机制较为复杂,主要与肺部的炎症反应、蛋白酶系统失衡、氧化应激反应有关。

由于 COPD 病理过程及复杂的发病机制,至今缺乏可以逆转病情进展的药物。目前,临床上西医主要治疗方法以内科药物治疗为主^[1],如 β_2 -受体激动剂、M 胆碱受体阻滞剂、磷酸二酯酶 IV 抑制剂、糖皮质激素等。传统中医则采用辨证治疗,主要疗法有祛痰理肺,益气固表,活血化瘀,温阳散寒,健脾补肾,扶正补虚,培土生金,补益肺脾综合治疗 COPD^[2];特色治疗方法针灸治疗以及穴位注射、穴位敷贴等^[3]。

1 常见 COPD 实验动物模型

实验性动物模型提供了一个了解疾病病理过程和评价新治疗方法的途径,为候选药物进入临床前的研究提供必要的有效性和安全性评价^[4]。

1.1 啮齿类动物模型

1.1.1 大鼠 大鼠是 COPD 研究中最常用的实验动物。其优点主要有^[5]:大鼠遗传背景明确,体内存在着很多酶基因的互补抗体及探针,使对这些酶进行的量化及定位研究更为方便;大鼠性情温和、生命周期较短、繁殖速度快,可以大大缩短研究周期;大鼠的体形较小,饲养繁殖以及药物使用的成本较低。此外,SD 大鼠呼吸道抵抗力较强,接受气道注射 LPS 及被动香烟熏染的耐受力较好。研究显示雌性小鼠对香烟烟雾较为敏感,其骨髓细胞 DNA 更易发生突变。为排除雌激素对实验结果的干扰,建议实验使用雄性 Wistar 大鼠。主要缺点有:大鼠气管内纤毛的分布较少,其气管黏膜下腺体不发达,且无杯状细胞;大鼠属于专性鼻呼吸的动物,鼻纤毛对烟的滤过功能较低;大鼠支气管的分支较少,并且缺乏呼吸功能的细支气管;此外,大鼠支气管炎的炎症介导物与人也存在差异。

1.1.2 豚鼠 豚鼠的主要优势是对激动剂和拮抗剂和人类有相似的气道反应和生理过程,尤其是气道自律性控制和对过敏原的反应与人类更有相似之处。豚鼠缺点:由于豚鼠种族类型有限,缺少转基因方法进行比较研究;还有豚鼠呼吸道存在的对外界有害气体刺激敏感的突触轴突反射。豚鼠广泛用于哮喘病的模型,也有少数报道用于肺气肿和慢性支气管炎的造模型^[6]。

1.1.3 小鼠 小鼠最大的优势是基因组测序已经完成、遗传背景明确。研究人员可以利用转基因小鼠研究 COPD 相关基因的生理及病理功能,有利于解开 COPD 的发病机制和

研发治疗 COPD 的靶向药物。缺点是由于小鼠气道腺体不发达,难以复制出 COPD 腺体增生肥大等重要病理表现^[7]。

1.2 非啮齿类大型动物模型

1.2.1 小型猪 小型猪的优点是肺组织比较发达,且与人的肺结构较为相似,均为右侧三叶,左侧两叶,使得研究者可以对其肺组织进行分区研究;小型猪存在人患 COPD 时气道阻力升高的主要原因的呼吸性细支气管;其呼吸道黏膜下腺体较其他动物而言相对发达,更容易诱导与感染和呼吸道相关 COPD 疾病;此外,小型猪的气管直径较大,在对其进行气管内滴注药物或进行呼吸功能评价时便于插管操作等^[8]。

1.2.2 羊 羊作为 COPD 模型动物主要优势是在其受到抗原或其他刺激后能反复准确地评估与测量肺功能,包括纤毛功能和鼻功能等^[9]。此外,羊气道功能和整体病理生理反应过程与人很相似,已经被广泛用于哮喘和过敏性鼻炎药物临床前研究中。国外有人用羊进行了 COPD 的黏膜纤毛的功能紊乱相关研究的报道。

1.2.3 灵长类动物猴子 猴子是人类的亲缘物种,其肺组织结构功能都与人最接近,其发病机制和过程也跟人极为相似,用它来造模有这独特的优势,所以猴子是最合适研究人类气道过敏性疾病和 COPD 典型机制的模型动物^[10]。

大型动物模型缺点^[11]:大型动物相对鼠科等小型动物体型较大,饲养繁殖以及药物使用的成本较高;生命周期较长且繁殖速度和数量太少造成研究周期较长;实验操作起来也较费事费力,实际应用也比较少。对于疾病的发病机制过程的研究大型动物模型不如小型动物,只有一些在小型动物研究中疗效非常好且有可能用于临床,才推荐用大型动物来做实验得到最接近人类的疾病模型,为新药的开发做好临床前研究。

2 建立 COPD 动物模型常用方法

2.1 蛋白酶诱导的 COPD 模型 肺气肿病人的肺泡壁细胞外基质破坏的确切机制虽然尚不清楚,但大量研究发现肺组织中蛋白酶系统失衡是造成肺组织进行性破坏和肺泡功能丧失的主要原因,从而确立了体内蛋白酶系统失衡导致肺气肿学说^[12]。

用于造模的蛋白酶主要有中性粒细胞弹性蛋白酶、胰弹性蛋白酶、蛋白水解酶及木瓜蛋白酶等。国外有人^[13]用新型的卵清蛋白干粉诱发慢性阻塞性肺疾病样动物模型,结果显示大鼠肺和气管内粒细胞浸润尤其是中性粒细胞是正常大鼠的 11 倍,肺损伤敏感的生物标志物骨髓过氧化物酶活性和乳酸脱氢酶在血浆中亦明显增高。

2.2 化学药物诱导的 COPD 模型 许多化学药物都可以引起肺炎和肺气肿,这些药物主要包括:氯化镉、二氧化硫、脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 和臭氧等。LPS 进入肺脏后可以刺激中性粒细胞、单核细胞及内皮细胞,合成与释放一系列炎症介质并介导肺组织及气道的炎症反应,导致蛋白酶平衡破坏,从而形成肺气肿^[14]。张炜等^[15]采用二氧化硫气体熏吸联合腺嘌呤饲料喂饲成功制造出慢阻肺复合肾虚证模型。

此类方法的缺点仅可以复制出与 COPD 所造成相似的

呼吸道损伤,而不能复制出真正的 COPD 气管渐进性发生重塑,逐步出现通气障碍的慢性病理过程。

2.3 被动吸烟诱导的 COPD 模型 流行病学表明了吸烟与 COPD 存在着密切关联。研究人员^[16]通过对烟熏大鼠的肺功能,气道阻力和呼吸系统顺应性的测定以及肺组织病理观察,发现支气管上皮细胞增生,气管纤维化,黏液分泌过多的慢性支气管炎病理改变。

对烟熏刺激最敏感的动物是豚鼠,大鼠对烟熏刺激有一定的抵抗力,不同种系的大鼠对烟熏刺激的敏感性也是不同的,此外,动物经被动吸烟诱导建立 COPD 模型周期较长,稳定性相对较差等缺点。

2.4 自发性 COPD 动物模型 目前越来越多的资料证明了 COPD 是一种多基因遗传性疾病,因此了解 COPD 的基因多态性对以后从分子水平了解 COPD 有很大的帮助^[17]。金属蛋白酶(MMPs)基因多态性与 COPD 发生相关性受到了密切关注。研究发现,若 COPD 的患者存在 MMP-12 (rs2276109 and rs652438)单核苷酸多态性(SNPs)的单倍体时,就会明显增高患者病情发展成严重病变的几率,这主要与存在于上述两条 SNPs 上的普通 A—A 单体有关,但当它们中任意一条存在小 G 变异体时病情发展成严重病变的可能性会减小^[18]。

2.5 转基因 COPD 动物模型 通过将相关产物基因表达插入实验动物的基因组中去或者通过基因剔除,可以使动物获得不同的基因特性,通常这样的动物模型被称为“功能获得性”模型。谷胱甘肽 S 转移酶(GST-S)能对香烟中各种毒性物质进行解毒,防止机体组织细胞损害,防御氧化应激。近年来有研究人员对 GST-S 基因多态性与 COPD 易感性间的相关性研究发现 GSTM1 与 GSTT1 基因纯合性缺失与 COPD 发生密切相关^[19]。

2.6 其他方法 由于 COPD 发病过程较为复杂,到目前为止尚无一种公认的建立 COPD 动物模型的方法。研究人员只能联合几种方法一起来构建 COPD 模型,尽量模拟真实的 COPD 的发病过程。使用蛋白酶或化学药物诱导,同时配合使用烟熏是最常用的方法。蛋白酶系统失衡是肺气肿的主要原因,而短期的烟雾刺激虽不能促进肺气肿的发展,但能够复制出慢性支气管炎的病理过程,两者的结合便能够很好的模拟 COPD 的病理过程。胡蓉等^[20]通过比较模型组与空白组大鼠肺功能、肺组织病理学改变、支气管肺泡灌洗液细胞分类计数以及检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)浓度等指标评价大鼠被动吸烟联合气道内滴注脂多糖建立 COPD 模型的有效性。

3 COPD 动物模型的评价

一个理想的符合临床实际的 COPD 动物模型应具备以下特点:致病因素与临床 COPD 常见诱因基本一致;必须有气流受限存在,气道重塑,小气道阻力增高、肺动态顺应性下降,肺呼吸功能改变;伴有气道高反应性;病理检查有炎症病变。由于 COPD 发病过程复杂,评价相对较难,通常选择几种指标一起评价,其中病理学检查最能够确诊。同时临床上诊断最为常用是肺呼吸功能检测,其他的生化指标对发病机

制和药物作用机制的探讨很有帮助,大家可以在试验时根据试验目的自行选择。

3.1 动物整体观察 观察造模组动物的皮毛色泽;痰鸣音;咳嗽、喷嚏现象,鼻部分泌物;呼吸节律;测定动物体重与进食量等方面,与正常空白对照组比较初步判断模型的成败,此方法主观性较大。

3.2 病理学形态检查 肉眼观测动物双肺表面,色泽,气管、支气管内膜下腺分泌情况。光镜下观察各级支气管及肺泡数量大小及炎性细胞的侵入情况,肺泡间隔形态结构、纤毛细胞、气道黏膜下腺体、黏膜上皮增生和化生情况。电镜观察支气管纤毛柱状上皮细胞、纤毛情况、II 型肺泡上皮细胞以及肺泡腔内各种细胞。对病理切片进行半定量分析,观察各组肺平均内衬间隔(MU)、平均肺泡数(MAN)变化。

3.3 肺功能检查 肺功能检查主要包括对肺容量[肺活量(VC),肺总量(TLC),残气量(RV)等]的测定和对气流阻塞改变指标[1 秒用力呼气量(FEV₁)用力肺活量(FVC),FEV₁/FVC 等]的测定。此外临床上将 COPD 引起 FEV₁ 的下降作为判定 COPD 的严重程度指标^[22]。李金田等^[23]用特定的呼吸功能检测仪检测有关指标的数值,换算出吸气阻力(Ri)、呼气阻力(Re)、肺顺应性(Cldyn)等与正常对照组相关指标的比较,通过统计学处理看药物处理前后 COPD 模型肺功能的变化。

3.4 肺泡灌洗液和动脉血中炎性细胞的分析 对支气管肺泡灌洗液(BALF)和血清中白细胞总数、中性粒细胞绝对计数、中性粒细胞百分比^[24],嗜酸性粒细胞,巨噬细胞的吞噬活性^[25]等与空白组比较。

3.5 一些酶蛋白和炎性介质表达检测 用些免疫学方法对 MMPs,金属蛋白酶组织抑制因子(TIMPs)^[21],单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)^[26]和血中超氧化物歧化^[25]抗胰蛋白酶 a1. AT 等进行检测,炎性介质主要也用相关免疫学方法对转化因子转化生长因子- β (TGF- β),血管内皮生长因子(VEG)^[27],肿瘤坏死因子(TNF- α),白介素(IL)^[28]等进行检测,统计学处理后与空白对照组比较分析。

3.6 动脉血气分析检查 由于 COPD 多伴有缺氧,轻度时期,首先表现为轻、中度低氧血症,随疾病加重,低氧血症逐渐加重,并可能出现高碳酸血症,在临床上有必要对病人的监测并给一定的氧疗,在动物造模中很少用到。

4 小结

COPD 是多因素诱发的发病机制复杂的临床综合征,对 COPD 的病理变化和临床特征的模拟十分困难。目前国内外虽然对其发病机制进行了较多研究,但至今仍未完全阐明,未能建立公认的标准化的、能够模拟 COPD 的发病因素、病理过程和临床特征的模型^[29]。但随着对 COPD 病理的认识提高,已经确定慢性的肺部炎症与 COPD 的严重程度密切相关,减少肺部发炎症的新型抗炎剂可能成为治疗这种疾病的潜在待开发的药物^[30]。本文就现在国内外 COPD 模型动物的选择、方法的建立以及相关评价模型的指标做以介绍,希望能为 COPD 的研究者提供研究思路,为新的治疗 COPD

的方法和药物开发铺路。期望在不远的将来能够建立标准化的 COPD 模型,为该病的治疗与研究统一方法。

[参考文献]

[1] 邓万定,余琪,金方. 治疗哮喘或慢性阻塞性肺病慢性阻塞性肺疾病药物的研究进展[J]. 中国医药工业杂志,2008,39(11):855.

[2] 郭美珠,杨志新,肖燕倩. 中药治疗慢性阻塞性肺病慢性阻塞性肺疾病机理研究进展[J]. 中医学报,2009,37(5):105.

[3] 丁旭春,王真. 慢性阻塞性肺病慢性阻塞性肺疾病稳定期中医药治疗的现状[J]. 浙江中医药大学学报,2008,32(1):131.

[4] J Craig Fox, Mary F Fitzgerald. Models of chronic obstructive pulmonary disease: a review of current status [J]. Drug Discovery Today,2004,3:319.

[5] Wriglht J L,Churg A. Animal models of cigarette smoke-induced COPD[J]. Chest,2002,122:301.

[6] Brendan J, Canning, Yangling. Using guinea pigs in studies relevant to asthma and COPD [J]. Pulmonary Pharmacology & Therapeutics, 2008,21:702.

[7] Brusselle G G,Bracke K R,Maes T,et al. Murine models of COPD [J]. Pulm Pharmacol Ther,2006,19:155.

[8] 陈丕仁,崔立,侯加法. 慢性阻塞性肺病动物模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报,2007,15(3):3238.

[9] William M Abraham. Modeling of asthma, COPD and cystic fibrosis in sheep[J]. Pulm Pharmacol Ther,2008,21:743.

[10] Charles G Plopper, Dallas M Hyde. The non-human primate as a model for studying COPD and asthma[J]. Pulmonary Pharmacology & Therapeutics,2008,21:755.

[11] Joanne Van der Velden, Kenneth J Snibson. Airway disease: the use of large animal models for drug discovery[J]. Pulm Pharmacol Ther,2011;72(12):1.

[12] Fehrenbach H. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease: some critical remarks [J]. Pathobiology,2002,70:277.

[13] Shingen Misaka, Hideyuki Sato, Yukinori Yamauchi, et al. Novel dry powder formulation of ovalbumin for development of COPD-like animal model. Physicochemical characterization and biomarker profiling in rats [J]. Eur J Pharm Sci,2009,37: 469.

[14] Dawkins P A, Stockley R A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Thorax, 2001,56:972.

[15] 张炜,毕小利. 慢性阻塞性肺病复合肾虚证大鼠模型的建立[J]. 实验动物与比较医学,2005,25(3):157.

[16] Zheng Hongao, Liu Yuening, Huang Tian, et al. Development and characterization of a rat model of

chronic obstructive pulmonary disease (COPD) induced by sidestream cigarette smoke [J]. Toxicol Letters, 2009,189:225.

[17] 刘贤兵,陈传辉,张伟. 基因多肽性在慢性阻塞性肺病研究中的新进展[J]. 实用临床医学,2010,11(5):32.

[18] Haq I, Chappell S, Johnson S R, et al. Association of MMP-12 polymorphisms with severe and very severe COPD: a case control study of MMPs-1,9 and 12 in a European population [J]. BMC Med Genet, 2010,11(1):7.

[19] Cheng S L, Yu C J, Chen C J, et al. Genetic polymorphism of epoxide hydrolase and glutathione S-transferase in COPD [J]. Eur Respir J, 2004,23(6):818.

[20] 胡蓉,严国锋,姜虹,等. 改良吸烟复合气道内注入 LPS 法 COPD 大鼠模型的建立[J]. 实验动物与比较医学,2009,29(3):153.

[21] 孙广仁,高博,巩会利,等. 慢性阻塞性肺病寒饮蕴肺证大鼠模型病理机制的初步研究[J]. 中华中医药学刊,2010,28(12):2469.

[22] Groneberg D A, Chung K F. Models of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Resp Res, 2004,5:18.

[23] 李金田,田永衍,梁晶,等. 芪蛭皱肺无糖颗粒对 COPD 大鼠模型呼吸功能和肺组织形态影响的实验研究[J]. 北京中医药,2009,28(5):380.

[24] 杨月,侯继申,池红井,等. 黄芪对慢性阻塞性肺病大鼠气道炎症干预作用实验研究[J]. 山东医药,2010,50(20):49.

[25] 王杰. 加味黄芪合剂治疗慢性阻塞性肺病的药效学研究[J]. 山东中医杂志,2007,26(8):569.

[26] 王慧,张永,程德云. 泼尼松对 MCP-1 及 IL-8 在 COPD 大鼠气道表达的影响[J]. 西部医学,2009,21(8):1273.

[27] 夏敬文,陈小东,张斯为,等. 大鼠慢性阻塞性肺病模型体内 TNF-和 VEGF 含量的变化及其意义[J]. 复旦大学学报,2006,33(3):372.

[28] 张葵,刘良丽,欧江琴,等. COPD 肺气虚证模型大鼠血清 TNF- α ,IL-8 的表达和意义[J]. 辽宁中医药大学学报,2008,10(6):200.

[29] Canning B J. Modeling asthma and COPD in animals: a pointless exercise [J]. Cur Opinion Pharmacol, 2003,3:244.

[30] Mary F Fitzgerald, J Craig Fox. Emerging trends in the therapy of COPD: novel anti-inflammatory agents in clinical development [J]. Drug Discov Today, 2007,12:479.

[责任编辑 邹晓翠]