

博来霉素不同给药方式致大鼠肺纤维化模型探讨

王鹤^{1,2}, 张广平², 侯红平², 高云航², 高双荣², 马梦², 张海静², 张钟秀²,
陈腾飞², 苏萍², 宋玲², 杨依靠², 李江^{1*}, 叶祖光^{2*}

(1. 贵阳中医学院, 贵阳 550002; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] **目的:**比较博来霉素(BLM)气管灌注、尾静脉注射及雾化吸入致大鼠肺纤维化模型的优劣,以便筛选出最佳的给药途径。**方法:**选择 SPF 级雄性 SD 大鼠 80 只,采用体重随机分组法将其分为正常组,单次气管灌注组(10 mg·kg⁻¹),多次气管灌注组(5 mg·kg⁻¹),单次静脉注射组(150 mg·kg⁻¹),多次静脉注射组(50 mg·kg⁻¹),单次雾化吸入模型组(30 min),多次雾化吸入模型组(30 min)。观察给药后 7,14,28 d 各组大鼠死亡情况及体质量变化。给药后 28 d,观察各组大鼠肺系数,取大鼠肺组织制备石蜡切片并进行苏木素-伊红(HE)及马松(Masson)染色,并通过酶联免疫吸附测定(ELISA)检测肺组织中羟脯氨酸(HYP)和纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)含量,评价各组大鼠肺炎及肺纤维化程度。**结果:**与正常组比较,气管灌注组的大鼠死亡率在所有药物处理组中最高。大鼠肺系数的测定结果显示,与正常组比较,多次静脉注射组和多次雾化吸入组大鼠的肺系数显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。雾化造模组较高于其他模型组,多次雾化模型组高于单次雾化模型组。大鼠 HE 及 Masson 染色结果提示,气管灌注组、静脉注射组和多次雾化吸入组大鼠肺组织中肺间隔增厚和肺间质纤维化程度较高,其中多次雾化模型组较其他组肺纤维化程度最为明显。ELISA 结果发现,与正常组比较,雾化吸入组和气管灌注组大鼠肺组织中 HYP 和 PAI-1 含量显著升高($P < 0.05$)。多次雾化吸入组与单次雾化吸入组显著高于其他造模组。**结论:**多次雾化吸入博来霉素制备肺纤维化模型,造模大鼠的病理损伤和生理指标相对稳定,符合肺纤维化的演变过程,是一种有效的肺纤维化模型制备手段。

[关键词] 博来霉素; 肺纤维化模型; 雾化吸入; 羟脯氨酸; 纤溶酶原激活物抑制剂-1

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)11-0073-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191104

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190219.1327.010.html>

[网络出版时间] 2019-02-20 10:03

Effect of Different Administration Methods with Bleomycin on Pulmonary Fibrosis in Rats

WANG He^{1,2}, ZHANG Guang-ping², HOU Hong-ping², GAO Yun-hang²,
GAO Shuang-rong², MA Meng², ZHANG Hai-jing², ZHANG Zhong-xiu², CHEN Teng-fei²,
SU Ping², SONG Ling², YANG Yi-fei², LI Jiang^{1*}, YE Zu-guang^{2*}

(1. Guiyang University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** Compare the effects of 3 administration methods (tracheal perfusion, tail vein injection and aerosol inhalation) with bleomycin (BLM) in inducing pulmonary fibrosis in rats, in order to find out the optimal administration methods. **Method:** Eighty sprague-dawley (SD) male rats with SPF were randomly divided into aerosol inhalation blank group, single tracheal perfusion group (10 mg·kg⁻¹), multiple tracheal perfusion group (5 mg·kg⁻¹), single intravenous injection group (150 mg·kg⁻¹), multiple intravenous injection group (50 mg·kg⁻¹), single aerosol inhalation group (30 min) and multiple aerosol inhalation group (30 min).

[收稿日期] 20181019(005)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2017ZX09201002-007,2017ZX09201002-006)

[第一作者] 王鹤,在读硕士,从事中药及民族药物新制剂及新剂型的研究,E-mail:1666373441@qq.com

[通信作者] *李江,博士,教授,从事中医方剂配伍和民族药物系统研究与开发,E-mail:13984044866@139.com;

*叶祖光,研究员,从事中药药理与毒理学研究,Tel: 010-84252805,E-mail:yezuguang@sina

The mortality and body weight of rats in each group were observed at 7 d, 14 d and 28 d after the administration. And 28 days later after the administration, the lung coefficients of rats in each group were observed, paraffin sections were prepared, hematoxylin-eosin staining (HE) and Masson staining were performed, and the contents of hydroxyproline (HYP) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) in lung tissues were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), so as to evaluate the alveoli inflammation and pulmonary fibrosis of rats in each group. **Result:** Compared with the aerosol inhalation blank group, the rats in the trachea perfusion group had the highest mortality among the drug treatment groups. The pulmonary coefficients of rats in the multiple intravenous injection group and the multiple inhalation group were significantly higher than those in the blank group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The multiple inhalation group was higher than the other model group and the single atomization model group. The results of HE and Masson staining showed thickening of pulmonary septum and higher degree of pulmonary interstitial fibrosis in tracheal perfusion group, intravenous injection group and multiple inhalation group. The degree of pulmonary fibrosis in the multiple inhalation group was more obvious than that in other groups. The results of ELISA showed that the levels of HYP and PAI-1 in lung tissues of rats in aerosol inhalation group and tracheal perfusion group were significantly higher than those in control group ($P < 0.05$). The multiple inhalation group and the single atomization inhalation group were significantly higher than other modules. **Conclusion:** Bleomycin was inhaled repeatedly to establish pulmonary fibrosis model. The pathological injury and physiological indexes of the model rats were relatively stable, which conforms with the evolution process of pulmonary fibrosis.

[**Key words**] bleomycin; pulmonary fibrosis model; aerosol inhalation; hydroxyproline; plasminogen activator inhibitor-1

肺纤维化是一种以肺泡壁细胞浸润、增厚、间质纤维化为特征,发病机制不明的呼吸系统疾病。中医古籍中没有与肺纤维化完全对应的病名,据其临床表现为咳嗽、咳痰,后期出现进行性加重呼吸困难等症状,且呈慢性、反复发作,多数学者将其归为“肺痿”“肺痹”“肺胀”“络病”“喘证”“咳嗽”等范畴,肺痹与肺痿最为多见^[1-2]。其临床缺乏有效治疗方法,病死率高^[3],不可逆转,是目前医学界迫切需要解决的问题^[4],因此及时建立一种稳定可靠、可重复、病症相似性高的肺纤维化动物模型是研究肺纤维化发病机制及其药效机制的重要环节。

目前用于建立肺纤维化动物模型的诱导剂有博来霉素^[5-6]和百草枯^[7],其中以博来霉素最为常用^[8]。博来霉素是一种氨基糖肽类抗生素,1966年由日本学者梅泽滨夫等首先从轮枝链霉菌的培养液中分离得到,具有良好的抗肿瘤活性,为一线抗肿瘤药物^[9-10],其副作用可引起肺纤维化及其临床症状。1974年 Adamson 等首次采用腹腔多次注射博来霉素的方法建立了肺纤维化动物模型。大量实验证实博来霉素可以经尾静脉注射^[11]、气管灌注^[12]和腹腔注射^[13]等多种途径给药,既可一次性给药^[14],也可多次给药^[11]。气管灌注给予博来霉素是目前国

内外公认的比较成熟的肺纤维化动物模型,有应用剂量小和可重复性强的特点,但这种方法也存在肺纤维化程度不一和病灶分布不均等明显缺点。尾静脉注射给予博来霉素会使模型动物出现胃肠道反应和尾巴肿胀坏死的情况。本文发展一种雾化吸入给药的方法,对气管灌注、尾静脉注射和雾化吸入 3 种给药方式进行比较研究,以说明雾化吸入给药是一种较理想的肺间质纤维化动物模型的造模方法并进一步探究肺间质纤维化发病机制及筛选有效防治药物提供依据和奠定基础。

1 材料

1.1 动物 80 只雄性 SD 大鼠,SPF 级,体质量(180 ± 20) g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。合格证号 SCXK(京)2016-0011。本实验所进行的所有相关操作均在中国中医科学院中药研究所动物伦理委员会的批准下进行,批准号 20172001。

1.2 药物 注射用盐酸博来霉素(海正辉瑞制药有限公司,批号分别为 17001711,16049011,1603381);生理盐水(山东花露制药有限公司,批号 13116040408);大鼠羟脯氨酸(HYP),大鼠纤溶酶原激活物抑制因子-1(PAI-1)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,批号分别为 w21031643,U08038384);马松(Masson)三

色染色液,苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(北京雷根生物技术有限公司,批号分别为 0413A18, 0527A17)。

1.3 仪器 FinePointe 型无创气道动力学研究系统和 FinePointe 型暴露塔(美国 DSI 公司);SpectraMax i3x 型酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);3-18KS 型高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司);BSA3202S-CW 型电子天平(德国 Sartorius 公司);JXFSTPRP-24 型全自动样品快速研磨仪(上海净信科技);ADVIA 2120 型全自动血液分析仪(德国 Simens 公司);

BX51 型显微镜及图像分析系统(日本 Olympus 公司);Finesse 325 型切片机,Excelsior ES 型全自动脱水机, Histocentre3 型石蜡包埋机, Varistain Gemini ES 型全自动染色机(美国 Thermo 公司)。

2 方法

2.1 动物模型制备 雄性 SD 大鼠 80 只,适应性喂养 3 d,采用体质量随机分组法分为空白组、单次气管灌注组、多次气管灌注组、单次静脉注射组、多次静脉注射组、单次雾化吸入模型组、多次雾化吸入模型组,共 7 组,造模方法见图 1。

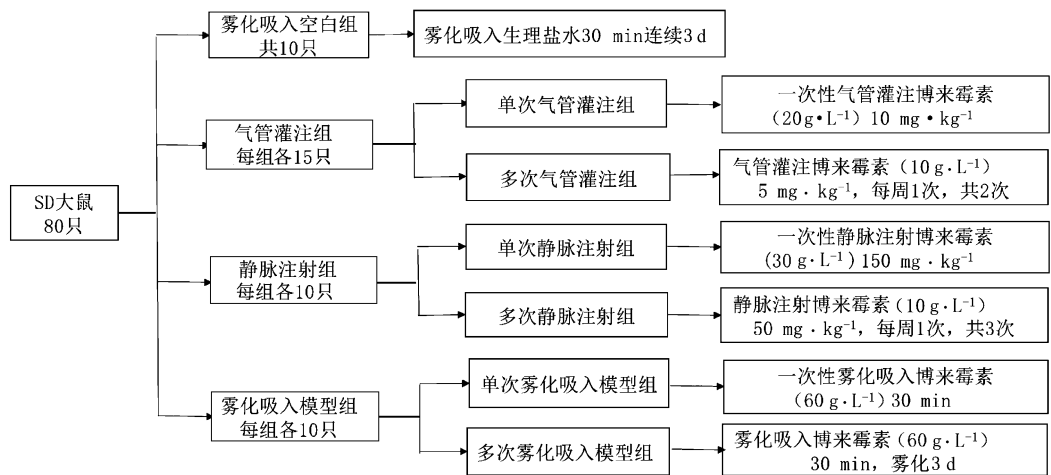


图 1 博来霉素诱导肺纤维化大鼠的造模流程

Fig.1 Modeling flow chart of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats

2.2 生存状态和体质量监测 监测实验期间各组大鼠精神活动、体质量变化、进食、饮水、毛色和死亡率。

2.3 肺系数检测 给药后 28 d,测量各组大鼠的肺湿重,计算肺系数,肺系数 = 肺湿重(mg)/体质量(g) × 100%。

2.4 组织病理学评分 肺组织经固定、脱水,石蜡包埋,制成 4 μm 的切片。肺组织切片经 HE 染色, Masson 染色,参照 Szapiel 等^[15]的方法确定肺泡炎及肺间质纤维化的程度。病变评分见表 1,纤维化程度评分见表 2。

表 1 HE 染色评价肺组织病变程度

Table 1 Degree of lung lesions by HE staining

评分	肺组织病变程度
0	无肺组织炎
1	肺间隔轻微增厚,炎性细胞浸润面积小于全肺的 25%
2	肺间隔轻度增厚,炎性细胞浸润面积介于全肺的 25 ~ 50%
3	肺间隔中度增厚,炎性细胞浸润面积介于全肺的 50 ~ 75%
4	肺间隔中度增厚,受累面积占全肺的 75% 以上

表 2 Masson 染色评价肺组织纤维化程度

Table 2 Evaluation of pulmonary fibrosis degree by Masson staining

评分	肺泡炎症程度
0	无肺纤维化,肺泡结构正常
1	散在的轻度肺纤维化,肺泡间隔增厚 ≤ 3 倍正常值,部分肺泡腔扩大,肺泡壁变薄,无成团的纤维化灶
2	明显的纤维化改变,肺泡间隔厚度 > 3 倍正常值,可见绳结样改变,但彼此不相连,部分肺泡腔扩大,肺泡壁变薄,无成团的纤维化灶
3	视野内主要改变为连续的纤维化(肺泡间隔厚度 > 3 倍正常值),部分肺泡腔扩大,肺泡壁变薄,无成团的纤维化灶
4	出现单个成团的纤维化灶(病变范围 < 10% 视野)
5	融合的成团的纤维化(病变范围介于 10% ~ 50% 视野)
6	大部分肺泡隔消失,大量连续肺纤维化(病变范围 > 50% 视野),大部分肺形态毁损
7	肺泡隔消失,肺泡内几乎全是成团的纤维组织,但仍有至多 5 个气泡样改变
8	成团的纤维组织覆盖满视野

2.5 HYP 及 PAI-1 含量测定 用 ELISA 试剂盒检测肺组织中 HYP 和 PAI-1 的含量,实验按照试剂盒说明书操作。

2.6 统计学分析 数据采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行单因素方差分析,方差齐性用最小显著性差异法检验,方差不齐性用 Tamhane's T2 法检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况观察 空白组大鼠给予生理盐水后,生长正常,精神、食欲均良好。单次气管灌注组、多次气管灌注组、单次静脉注射组、多次静脉注射组、单次雾化吸入模型组和多次雾化吸入模型组给予博来霉素后,第 1 周表现出行动迟缓,精神萎靡,毛色不佳;第 2 周表现出毛发少量脱落;第 3 周表现出背部毛发晦暗,颜色米黄,无光泽;第 4 周表现出毛发蓬松稀疏,弓背,体弱,尤以多次气管灌注组最严重。对上述各种给药方式致大鼠肺纤维化模型比较,发现单次气管灌注组 (26.7%) 和多次气管灌注组 (20%) 大鼠的死亡率最高,多次静脉注射组出现烂尾现象,单次雾化模型组和多次雾化模型组大鼠生存状态稍优于其他模型组。另外,多次雾化模型组有一只大鼠死亡,是因为试验操作不当,而不是药物和给药方式本身的作用。见表 3。

表 3 各组大鼠死亡率

Table 3 Rat mortality in each group

组别	7 d	14 d	28 d	总死亡率/%
空白	0	0	0	0
单次气管灌注	3	1	0	26.7
多次气管灌注	1	2	0	20
单次静脉注射	0	0	0	0
多次静脉注射	0	0	0	0
单次雾化吸入模型	0	0	0	0
多次雾化吸入模型	1	0	0	10

空白组体质量呈递增趋势。单次气管灌注组、多次气管灌注组、单次静脉注射组、多次静脉注射组、单次雾化吸入模型组和多次雾化吸入模型组 3 d 内体质量下降明显,5 d 左右变化趋于平缓,5 d 后开始逐日递增。其中,多次静脉注射组总体增长趋势较其他模型组缓慢,单次静脉注射组 3 d 内体质量急剧下降,最严重的大鼠体质量减轻 35 g,达到总体质量的 18%。最后在给药后 28 d,各组大鼠的体质量均无显著性差异。见图 2。

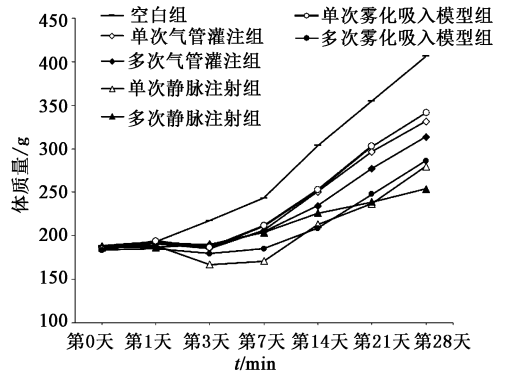


图 2 不同方法给药 BLM 致肺纤维化大鼠及正常大鼠体质量
Fig. 2 Body weight of rats in different methods and normal rats

3.2 造模后肺系数的变化 与空白组比较,仅多次静脉注射组和多次雾化吸入模型组大鼠的肺系数明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$),而其他各组均无显著性差异。见表 4。

表 4 各组大鼠肺系数 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Pulmonary coefficient of each group of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	28 d 后肺系数
空白	10	0.41 ± 0.04
单次气管灌注	11	0.52 ± 0.17
多次气管灌注	12	0.64 ± 0.28
单次静脉注射	10	0.49 ± 0.02
多次静脉注射	10	0.54 ± 0.04 ²⁾
单次雾化吸入模型	10	0.52 ± 0.14
多次雾化吸入模型	9	0.69 ± 0.17 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 5 ~ 7 同)。

3.3 HE 染色观察造模前后肺组织病理变化 空白组大鼠肺组织结构正常,部分肺间隔轻微或轻度增厚,间质可见少量慢性炎症细胞浸润;而造模大鼠可见巨噬细胞、淋巴细胞等浸润,肺泡壁增厚及肺泡间隔增宽,在肺间质区域可见成纤维细胞聚集和胶原基质沉积增加,肺实质结构紊乱。其中单次气管灌注组、单次静脉注射组、多次静脉注射组多数动物的肺间隔中度增厚,少数动物的肺间隔轻度增厚,间质可见不同程度的慢性活动性炎症,与空白组比较有明显差异;多次气管灌注组部分动物肺间隔重度增厚,间质见大量慢性活动性炎症,部分动物肺间隔中度增厚,间质见大量炎症,2 只动物肺间隔轻度增厚,间质见少量慢性活动性炎症,与空白组比较有明显差异;单次雾化吸入模型组多数动物肺间隔轻中度增厚,2 只动物呈中重度增厚,与空白组比较有加重趋势;多次雾化吸入模型组多数动物

的肺间隔中度增厚,个别动物的肺间隔轻度增厚,大部分间质可见相同程度的慢性活动性炎症,与空白组比较差异显著。见图 3,表 5。

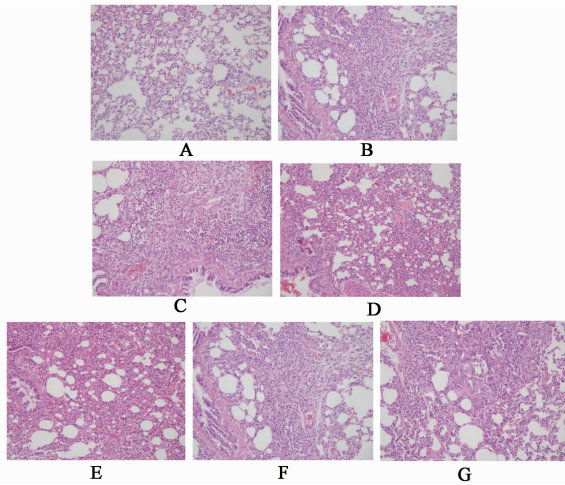


图 3 造模前后大鼠肺组织的病理变化 (HE, ×200)
A. 空白组; B. 单次气管灌注组; C. 多次气管灌注组; D. 单次静脉注射组; E. 多次静脉注射组; F. 单次雾化吸入模型组; G. 多次雾化吸入模型组 (图 2 同)

图 3 Pathological changes of lung tissue in rats before and after modeling (HE, ×200)

表 5 各组大鼠 HE 染色肺脏病理变化评分

Table 5 HE staining of lung lesions in each group of rats

组别	n	病变分级					评分 ($\bar{x} \pm s$)
		-	+	++	+++	++++	
空白	10	0	6	4	0	0	1.40 ± 0.52
单次气管灌注	11	0	2	3	5	1	2.45 ± 0.93
多次气管灌注	12	0	1	0	6	5	3.25 ± 0.87
单次静脉注射	10	0	0	2	8	0	3.00 ± 0.67
多次静脉注射	10	0	0	2	6	2	3.00 ± 0.67
单次雾化吸入模型	10	0	3	5	2	0	1.90 ± 0.74
多次雾化吸入模型	9	0	1	4	4	0	2.33 ± 0.71

3.4 Masson 染色观察造模前后肺组织病理变化

空白组大鼠的肺泡结构正常,间质未见纤维组织增生,而其余各组造模大鼠肺间隔可见不同程度的增厚,肺间质可见不同程度的纤维组织增生。其中多次雾化吸入模型组和多次气管灌注组之间无明显差异,多数动物肺间隔呈中、重度增厚,间质可见成团的纤维组织增生,甚至肺泡结构消失,形成连续的纤维化。见图 4,表 6。

3.5 造模前后大鼠肺组织 HYP, PAI-1 含量的变化

多次气管灌注组、单次雾化吸入模型组和多次雾化吸入模型组大鼠肺组织中 HYP 含量较空白组显

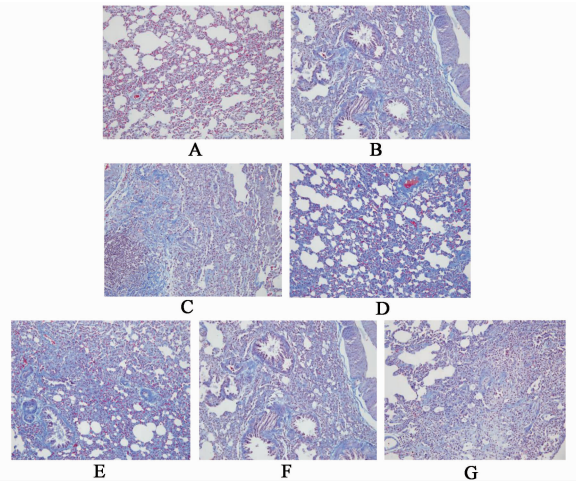


图 4 造模前后大鼠肺组织的病理变化 (Masson, ×200)

Fig. 4 Pathological changes of lung tissue in rats before and after modeling (Masson, ×200)

表 6 各组大鼠 Masson 染色肺脏纤维化评分

Table 6 Statistical results of pulmonary fibrosis by Masson staining in rats of each group

组别	n	大鼠数/只										$\bar{x} \pm s$
		0分	1分	2分	3分	4分	5分	6分	7分	8分	8分	
空白	10	7	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0.30 ± 0.48
单次气管灌注	11	0	1	1	3	2	3	1	0	0	0	3.73 ± 1.49 ²⁾
多次气管灌注	12	0	0	0	2	3	4	0	3	0	0	4.91 ± 1.44 ²⁾
单次静脉注射	10	0	0	3	7	0	0	0	0	0	0	2.70 ± 0.48 ²⁾
多次静脉注射	10	0	0	2	8	0	0	0	0	0	0	2.80 ± 0.42 ²⁾
单次雾化吸入模型	10	0	0	0	1	6	3	0	0	0	0	4.20 ± 0.63 ²⁾
多次雾化吸入模型	9	0	0	0	2	0	2	4	1	0	0	5.22 ± 1.39 ²⁾

著升高,而其他各组均无显著性差异。与空白组比较,单次气管灌注组、单次雾化吸入模型组和多次雾化吸入模型组大鼠肺组织中 PAI-1 含量显著升高,而其他各组 PAI-1 的含量变化无统计学意义。见表 7。

4 讨论

前期实验证实博来霉素可以经尾静脉注射^[11]、气管灌注^[12]和腹腔注射^[13]等多种途径给药,既可一次性给药^[14]也可多次给药^[15]。本研究比较了气管灌注、尾静脉注射及雾化吸入 3 种给药方式致大鼠肺纤维化模型的优劣,以期获得更贴近人肺纤维化演变过程的动物模型。这 3 种给药方式均能建立肺纤维化大鼠模型,其中气管灌注的方法受实验者操作影响较大,动物死亡率较高,客观反应肺纤维化程度的肺系数, HYP 和 PAI-1 含量较对照组均差异

表 7 各组大鼠 HYP, PAI-1 含量 ($\bar{x} \pm s$)

Table 7 Contents of HYP and PAI-1 in rats of each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HYP	PAI-1
空白	10	13.84 ± 4.78	619.75 ± 78.1
单次气管灌注	11	17.74 ± 3.91	884.88 ± 183.13 ¹⁾
多次气管灌注	12	20.37 ± 8.86 ¹⁾	780.10 ± 157.41
单次静脉注射	10	15.57 ± 2.06	787.61 ± 52.19
多次静脉注射	10	17.28 ± 7.81	756.62 ± 46.68
单次雾化吸入模型	10	20.36 ± 5.26	881.40 ± 117.93 ²⁾
多次雾化吸入模型	9	21.41 ± 5.72 ¹⁾	896.55 ± 161.93 ¹⁾

不显著,纤维化分布不均匀且对动物有一定的创伤,模型鼠间肺部损伤程度不均匀、病理变化表现不稳定且较难准确进行药物定量。王健等^[16]在平阳霉素致肺纤维化动物模型的实验中发现气管滴注法虽然操作简单,成本低,然而病变范围比较局限,与人类病变的弥漫性分布有差异,这与本次实验研究结果相符;尾静脉注射组的模型动物生存状态稍好,但造模程度较轻,肺纤维化程度较气管灌注和雾化吸入给药表现最轻,另外多次尾静脉注射引起大鼠尾巴水肿糜烂,这不仅增加了操作难度而且影响大鼠生存状态。张晓晔等^[17]对 C57BL/6 雌性小鼠一次性尾静脉注射博来霉素 150 mg·kg⁻¹,成功复制出肺纤维化模型,但造模后小鼠死亡率高且病变部位主要分布于胸膜下及血管周围,与人类弥漫性分布状况不符。孟婕等^[18-19]研究发现小剂量多次尾静脉注射与气管内滴入 BLM 都能成功制备肺间质纤维化动物模型,两者纤维化形成的部位存在一定的差异,小剂量多次尾静脉给药肺间质纤维化模型更接近特发性肺间质纤维化,但小剂量多次尾静脉给药的小鼠会出现胃肠道反应和尾巴肿胀坏死的情况;雾化吸入给药途径制备的肺纤维化模型,肺组织整体严重程度为中度,肺部损伤程度一致,病理变化稳定,肺纤维化症状分布较气管灌注和静脉注射更为均匀,其中多次雾化吸入模型组较单次雾化吸入模型组各评价指标程度显著。综上所述,采用雾化吸入给药的方法可建立稳定的大鼠肺纤维化模型,模型动物间差异较小具有良好的控制性且个体动物病变分布均匀弥散,较另外 2 种方法有明显的优势。

本研究对气管灌注、尾静脉注射、雾化吸入 3 种给药方式致大鼠肺纤维化模型进行比较。首先,除了病理结果这个金指标外,笔者选择肺组织中 HYP 和 PAI-1 作为客观检测指标。HYP 是机体胶原蛋白

的主要成分之一(约占 13.4%),在弹性蛋白中含量极少,在其他蛋白中均不存在,因此 HYP 含量是反映胶原组织代谢及纤维化程度的一项重要指标。PAI-1 是一种尿激酶型纤维蛋白酶原(urokinase type plasminogen activator, u-PA)的关键抑制剂,在细胞外基质(ECM)的降解中发挥重要的作用,前期研究已证实,PAI-1 基因在博来霉素诱导的肺纤维化大鼠体内过度表达可以加重肺纤维化。综上所述,本次研究中选择病理结果、肺组织中 HYP 和 PAI-1 含量作为检测指标。其次,笔者确定了 3 种给药方式的给药浓度。气管灌注 BLM 5 mg·kg⁻¹是制备这种模型的常用方法。经前期预实验摸索,将气管灌注组分为多次气管灌注组(5 mg·kg⁻¹)及单次器官灌注组(10 mg·kg⁻¹)。杨聪颖等^[20]、肖强等^[21]通过对比不同剂量一次性尾静脉注射及多次尾静脉注射的造模方法,认为尾静脉单次注射博来霉素 200 mg·kg⁻¹可有效诱导肺纤维化,孟婕等^[18-19]研究了连续多次尾静脉注射博来霉素的造模方法,文献中多为小鼠尾静脉注射造模,经剂量转换,课题组将大鼠静脉注射组分为单次静脉注射组(150 mg·kg⁻¹)及多次静脉注射组(50 mg·kg⁻¹)。雾化有效剂量不仅与吸入时药物浓度、吸入时间有关,还与吸入动物本身呼吸参数相关,经过两次预实验,初步筛选出最佳雾化质量浓度为 60 g·L⁻¹,采用暴露塔对动物进行平行雾化吸入 BLM,通过时间单因素变量进一步考察雾化造模程度,因此将雾化组分为单次雾化 30 min 和多次雾化 30 min 进行造模。

综上所述,多次雾化吸入 BLM (60 g·L⁻¹) 30 min 连续 3 d,可建立稳定的大鼠肺纤维化模型。从经济等因素考虑,本课题组今后将从造模剂量及模型检测等方面进一步研究与优化,以期对肺纤维化大鼠模型的建立、呼吸系统疾病发病机制的研究及药物开发提供一定的基础。

[参考文献]

[1] 刘晓,于文涛,靳贺超,等. 补肾通络方对肺纤维化大鼠肺组织 TGF-β₁/Smads 通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(2): 96-102.

[2] 王振兴,孙中莉,王明杰,等. 补阳还五汤对肺纤维化中 HMGB1-RAGE 信号通路的调控作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(13): 138-144.

[3] Williamson J D, Sadofsky L R, Hart S P. The pathogenesis of bleomycin-induced lung injury in animals and its applicability to human idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Exp Lung Res, 2015, 41(2): 57-

- 73.
- [4] 周语平,郭宏亮. 理肺化纤方对肺纤维化 CTGF 和 FN 信号转导通路影响的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(14):201-205.
- [5] 高云星,蒋莉莉,张倩,等. 吴茱萸次碱通过抑制 Notch1/eIF3a 信号通路保护博来霉素诱导的大鼠肺纤维化[J]. 中国中药杂志,2018,43(17):3510-3538.
- [6] Safaeian L, Jafarian A, Rabbani M, et al. The effect of AT1 receptor blockade on bax and bcl-2 expression in bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. DARU, 2009,17(1):53-59.
- [7] 陈丽,钱洁,叶延,等. 百草枯反复小剂量腹腔给药诱导小鼠肺纤维化模型[J]. 中华急诊医学杂志,2011,12(20):1285-1289.
- [8] 周欢. 气管内喷雾注入博来霉素诱导大鼠肺纤维化模型的建立及其评价[D]. 重庆:重庆理工大学,2014.
- [9] 王燕,王真,何琪杨. 博来霉素族抗生素作用机制的研究进展[J]. 国外医药(抗生素分册),2009,30(1):5-8,18.
- [10] 王淑月. 博来霉素类抗生素的构效关系[J]. 河北医学院学报,1995,11(16):50-51.
- [11] 马哈迪,叶燕青,李艳丽. 内毒素与博来霉素所致肺损伤及纤维化的病理改变[J]. 武汉大学学报:医学版,2009,30(3):326-329.
- [12] 张伟,鲁香凤,张晓梅,等. 气管插管快速灌注博来霉素复制大鼠肺间质纤维化模型[J]. 中西医结合学报,2008,6(1):60-67.
- [13] 李丽娜,王华,周蕾,等. 博来霉素诱导小鼠肺间质纤维化造模方式的选择[J]. 中国免疫学杂志,2010,26(3):254-257.
- [14] 郑金旭,夏德刚,田高润,等. 白细胞介素 32 在博来霉素诱导的小鼠肺纤维化组织中的表达及意义[J]. 江苏医药,2010,36(7):799-801,869.
- [15] Szapiel S V, Elson N A, Fulmer J D, et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse. [J]. Am Rev Respir Dis, 1979, 120(4):893-897.
- [16] 王健,黄志兰,王涛,等. 平阳霉素致肺纤维化动物模型高分辨率 CT 的评价[J]. 第三军医大学学报,1998,20(5):419-422.
- [17] 张晓晔,志村早苗,增田辙,等. 博来霉素静脉注射制备小鼠肺间质纤维化模型[J]. 中国实验动物学报,2007,15(4):241-244,230.
- [18] 孟婕,邹叶强. 小剂量多次尾静脉注射博来霉素致小鼠肺纤维化模型的研究[C]//中华医学会第三届全国间质性肺病暨弥漫性泛细支气管炎学术会议论文集汇编,北京:中华医学会,2010:143.
- [19] 孟婕,彭张哲,陶立坚. 小剂量多次尾静脉注射与气管内滴注博来霉素致小鼠肺纤维化模型的比较研究[J]. 中南大学学报:医学版,2013,38(12):1228-1232.
- [20] 杨聪颖,彭雄群,阳惠湘,等. 不同剂量博来霉素诱导小鼠肺纤维化的差异及动态变化[J]. 中国实验动物学报,2013,21(2):45-51,96.
- [21] 肖强,郑晓滨,刘香,等. 静脉注射不同剂量博来霉素诱导小鼠肺纤维化的比较研究[J]. 临床肺科杂志,2015,20(2):251-256.

[责任编辑 周冰冰]