

烟雾加气管内滴入 PPE 诱发非均质性肺气肿模型

陈建新 赵玉石 成 军 卢红光 李 野[△]

(哈尔滨医科大学附属第四医院 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的 探讨烟雾与弹性蛋白酶(PPE)联合应用在兔阻塞性肺气肿模型形成过程中对肺组织 X 线、动脉血气、肺组织形态学结构的影响以及如何在较短时间内诱发出类似于人类疾病的非均质性肺气肿模型。方法 将 40 只小白兔随机分为吸烟组、注酶组、联合组及对照组 4 组,分别给予单纯香烟熏吸、气管内注入猪胰弹性蛋白酶、烟雾加气管内注入弹性蛋白酶及单纯气管内注入生理盐水作为对照组。7 周后分别进行肺组织 X 线、动脉血气和肺组织形态学检查。结果 注酶组和联合组的平均肺泡数(Na)、肺泡隔面密度(Ds)及 PaO₂ 减少,PaCO₂、肺总容积(TLC)和肺泡直径(Da)增加,与对照组比较,差异有显著性(P<0.05)。注酶组和联合组大鼠平均肺泡数(MAN)与正常对照组大鼠相比明显减少(P<0.05),平均肺泡面积(MAA)、平均内衬间隔(Lm)明显大于正常对照组(P<0.05),而吸烟组与正常对照组无统计学差异(P>0.05)。结论 烟雾可强化弹性蛋白酶在诱发肺气肿模型过程中的作用,二者联合应用可加快兔肺气肿模型的诱导过程。

关键词 兔 肺气肿 香烟 弹性蛋白酶 疾病模型

中图分类号:Q95-3 R563 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)25-4837-04

Induction of Heterogenous Emphysema by Cigarette Inhalation and Elastase Tracheal Instillation

CHEN Jian-xin, ZHAO Yu-shi, CHENG Jun, LU Hong-guang, LI Ye[△]

(The Fourth Hospital of Harbin Medical University, Heilongjiang, Harbin, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of smog and elastase on the pulmonary functions and histology during the pathogeny of rabbits' chronic obstructive pulmonary emphysema and to induce the pulmonary model which is similar to the human disease. **Methods:** Forty rabbits were divided into four group: smoking, elastase, elastase combined smoking and control group and treated respectively with smoking only, inject elastase into trachea, elastase combined smoking and inject normal saline respectively. Seven weeks later, pulmonary-X, artery blood gas analysis and pulmonary histology were detected. **Results:** Compared with the control group, in both elastase and combined groups, density of alveolar septum (Ds), number of alveolus (Na) and PaO₂ decreased, PaCO₂, total lung capacity (TLC) and diameter of alveolus (Da) increased on the contrary (P<0.05), while in both elastase and combined groups, Mean alveolar number (MAN) decreased and Mean alveolar area (MAA), Meanlinear intercept, Lm (Lm) increased (P<0.05), but no change happened in smoking group (P>0.05). **Conclusions:** Rabbits obstructive pulmonary emphysema can be induced by elastase.

Key words: Rabbit; Emphysema; Smog; Elastase; Disease models

Chinese Library classification (CLC): Q95-3, R563 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)25-4837-04

前言

肺气肿是一种慢性进展性疾病,对人体进行直接研究有一定的局限性,因此动物模型的研究显得非常重要。吸烟是人类肺气肿发病的主要原因,香烟烟雾的刺激能较好地模拟人类肺气肿的发病过程,但存在实验周期长、动物个体差异较大的缺点,广泛应用于实验研究有困难^[1]。自从 Gross 等发现气管内滴入木瓜蛋白酶可诱发实验动物的肺气肿后,已经用多种蛋白水解酶滴入许多小动物和大动物的肺内并成功地复制了肺气肿的动物模型^[2]。目前常用气管内滴入 PPE 建立肺气肿模型,该

方法是 PPE 直接造成周边肺组织肺泡间隔的破坏而形成肺气肿,不能较好地反映吸烟所致肺气肿中肺内慢性炎症和气道重构的病理生理过程^[3]。

肺气肿是一种临床上表现为进行性发展的不可逆气流受限,病理学上表现为肺部终末细支气管远端气腔出现异常持久的扩张并伴有肺泡壁和细支气管的破坏而无明显纤维化的疾病。因此 2001 年意大利肺气肿动物模型会议确认一种肺气肿动物模型应同时反映功能学和组织病理学的特征,即功能上有气流受限的肺功能改变,病理学上有肺内的炎症和肺实质的损伤的组织学表现^[4]。

作者简介: 陈建新(1982-),男,医学硕士,住院医师,主要研究方向:肺气肿的外科治疗, E-mail: chenjianxin_123@163.com

△通讯作者: 李野,男,教授、主任医师,硕士研究生导师,主要研究方向:肺气肿的外科治疗,电话: 0451-82576633,

E-mail: li_ye_123@163.com

(收稿日期: 2012-03-10 接受日期: 2012-04-07)

1 材料与方法

1.1 实验材料

40 只健康小白兔,体重约 1500 克~2000 克,雌雄不限,由哈尔滨医科大学附属第一医院动物实验中心提供。随即分成四组,即正常对照组、烟雾组、PPE 组和烟雾加 PPE 组,每组 10 只。

1.2 方法

1.2.1 将 40 只小白兔随机分为吸烟组、注酶组、联合组及对照组,分别给予香烟熏吸、气管内注入猪胰弹性蛋白酶或生理盐水。7 周后进行肺组织 CT、动脉血气和肺组织学检查。

1.2.2 各组计量资料均以均数± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,使用 SPSS14.0 进行数据处理,多组间比较采用单因素方差分析,方差分析有统计学差异时进一步用 SNK 法比较各组样本均值。检验结果 $P<0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 一般情况

正常对照组大鼠进食正常,皮毛光滑,生长良好,无明显的呼吸道症状,无死亡。烟熏组由于早期造模经验不足致窒息死亡 1 只,PPE 组大量泡沫样分泌物阻塞气道致死亡 1 只,烟熏加 PPE 组肺内出血窒息致死亡 2 只。烟熏组、PPE 组和烟熏加 PPE 组后期饲养中出现皮毛干涩、体重生长减缓,有气促、流涕、打喷嚏等呼吸道症状。

2.2 HRCT 检查

在 64 排 CT 上行 HRCT 扫描发现正常对照组(图 1a)和烟熏组兔子胸廓形状、气管支气管结构无明显变化,肺组织密度

均匀,无明显肺气肿样变化;PPE 组和烟熏加 PPE 组(图 1b)兔子左侧胸腔容积增大,肺组织出现不均匀的肺纹理,肺野透光度明显增强,呈现出肺气肿的影像学改变。

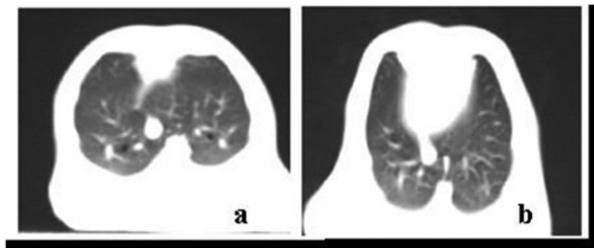


图 1 家兔肺组织 CT 扫描结果 a:正常家兔肺组织;b:肺气肿家兔肺组织

Fig.1 The CT of the normal rabbit:a: normal rabbit;b: the emphysematous rabbit

2.3 动脉血气分析

各组实验对象动脉血气分析结果见表 1,结果烟熏组动脉血气分析各项值与正常对照组无明显差异 ($P>0.05$),PPE 和烟熏加 PPE 组 pH、 PaO_2 和 SaO_2 值均明显低于正常对照组($P<0.05$), $PaCO_2$ 值明显高于正常对照组($P<0.05$)。

表 1 各组实验对象动脉血气分析结果比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 The arterial blood gas analysis of each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Ph	PaO_2 (mmHg)	$PaCO_2$ (mmHg)	SaO_2 (%)
A	10	7.42 ± 0.05	85.18 ± 2.08	38.88 ± 0.49	98.36 ± 6.42
B	9	$7.41 \pm 0.03^*$	$83.81 \pm 1.11^*$	$39.39 \pm 0.61^*$	$95.59 \pm 5.98^*$
C	9	$7.33 \pm 0.04^\Delta$	$81.21 \pm 1.54^\Delta$	$47.00 \pm 0.57^\Delta$	$88.92 \pm 5.45^\Delta$
D	8	$7.30 \pm 0.03^\Delta$	$79.63 \pm 2.10^\Delta$	$47.64 \pm 1.01^\Delta$	$88.02 \pm 5.42^\Delta$

Note: $*$ $P>0.05$,vs group A $^\Delta P<0.05$,vs group A.

2.4 组织病理学

2.4.1 光镜下的一般情况 正常对照组兔子细支气管粘膜下及血管周围和周边肺泡内无明显的炎性细胞浸润,肺泡排列整齐,结构完整,无明显的破坏(图 2A),烟熏组兔子细支气管粘膜下及血管周围和周边肺泡内可见炎性细胞浸润,但仅有少量肺泡间隔断裂(图 2B),PPE 组兔子细支气管粘膜下及血管周围和周边肺泡内可见少量炎性细胞浸润,肺泡结构紊乱,肺泡间隔大量破坏,肺泡腔融合扩大(图 2C),烟熏加 PPE 组细支气管粘膜下及血管周围和周边肺泡内可见较多炎性细胞浸润,肺泡间

隔大量断裂,肺泡腔融合扩大形成较多肺大疱(图 2D)。

2.4.2 肺泡形态计量学比较 各组兔子右肺下叶肺泡形态计量学结果见表 2。结果烟熏组 MAN、MAA、Lm 与正常对照组无统计学差异 ($P>0.05$),PPE 和烟熏加 PPE 组大鼠 MAN 与正常对照组大鼠相比明显减少($P<0.05$),MAA 和 Lm 明显大于正常对照组($P<0.05$),表明 PPE 和烟熏加 PPE 组大鼠肺泡间隔出现破坏、断裂,肺泡腔融合扩大形成肺大疱,出现了肺气肿的病理学变化。

表 2 各组兔子右肺下叶肺泡形态计量学观测结果 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 The morphology result of the inferior lobe of right lung ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	MAN	MAA(μm^2)	Lm(μm)
A	10	119.20 ± 3.39	1403.12 ± 12.18	40.68 ± 2.84
B	9	$116.78 \pm 3.49^*$	$1547.57 \pm 22.99^*$	$42.97 \pm 3.69^*$
C	9	$86.56 \pm 1.81^\Delta$	$3215.16 \pm 52.26^\Delta$	$63.80 \pm 3.91^\Delta$
D	8	$84.00 \pm 2.88^\Delta$	$3321.60 \pm 51.55^\Delta$	$66.24 \pm 4.70^\Delta$

Note: $*$ $P>0.05$,vs group A $^\Delta P<0.05$,vs group A,MAA Mean alveolar area 平均肺泡面积;
MAN Mean alveolar number 平均肺泡数, Lm Meanlinear intercept, Lm 平均内衬间隔。

从表 2 中可以看到 , 与 A 组比较 B 组无统计学意义 ,C 中可以看到 ,与 A 组比较 B、C、D、E 组均有统计学意义 ,但 B、组、D 组有统计学意义 ,C 组与 D 组之间无统计学意义。从表 3 C、D、E 组之间无统计学意义。

表 3 烟熏加弹性蛋白酶组兔子各个肺叶间肺泡形态计量学结果 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 The morphology result of the each lobe lung of be smoked and PPE ($\bar{x} \pm s$)

各肺叶	n	MAN	MAA(μm^2)	Lm(μm)
右下(A) Inferior lobe of left lung (A)	8	84.00 $\pm$ 2.88	2803.74 $\pm$ 85.71	66.21 $\pm$ 1.41
右中(B) Middle obe of right lung (B)	8	113.13 $\pm$ 6.99 Δ	2127.21 $\pm$ 65.22 Δ	45.73 $\pm$ 2.19 Δ
右上(C) Upper lobe of right lung (C)	8	116.75 $\pm$ 4.77 Δ	2071.41 $\pm$ 64.13 Δ	45.37 $\pm$ 1.18 Δ
左上(D) Upper lobe of left lung(D)	8	117.50 $\pm$ 4.44 Δ	2161.73 $\pm$ 51.87 Δ	44.36 $\pm$ 0.63 Δ
左下(E) Inferior lobe of left lung (E)	8	114.38 $\pm$ 4.07 Δ	2122.44 $\pm$ 55.43 Δ	45.27 $\pm$ 2.08 Δ

Note: ※P>0.05,vs group A Δ P<0.05,vs group A.

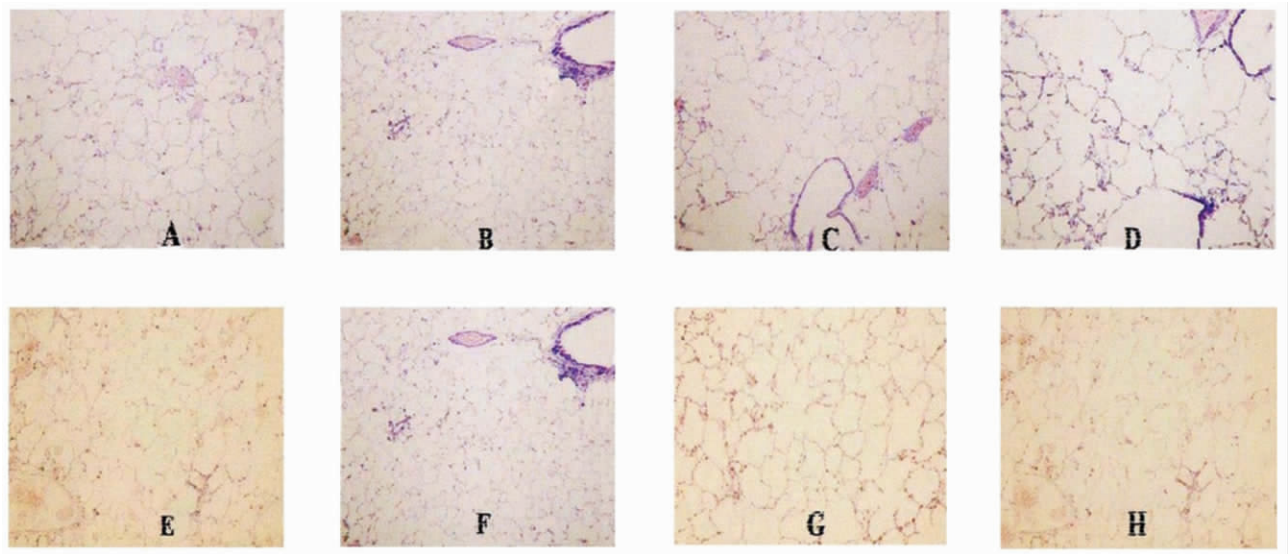


图 2 兔子肺组织 HE× 100

Fig.2 The lung tissue HE× 100

图 A 正常肺组织 HE× 100 Fig.A The normal lung tissue HE× 100

图 B 烟熏组兔子肺组织 HE× 100 Fig.B The lung tissue of being smoked HE× 100

图 C PPE 组兔子肺组织 HE× 100 Fig.C The lung tissue of PPE HE× 100

图 D 烟熏 +PPE 组兔子肺组织 HE× 100 Fig.D The lung tissue of being smoked and PPE HE× 100

图 E 烟熏加 PPE 组左肺下叶肺组织 HE× 100

Fig.E The inferior lobe of left lung tissue of being smoked and PPE HE× 100

图 F 烟熏加 PPE 组左肺上叶肺组织 HE× 100

Fig.F The upper lobe of left lung tissue of being smoked and PPE HE× 100

图 G 烟熏加 PPE 组右肺上叶肺组织 HE× 100

Fig.G The upper lobe of right lung tissue of being smoked and PPE HE× 100

图 H 烟熏加 PPE 组右肺中叶肺组织 HE× 100

Fig.H The middle lobe of right lung tissue of being smoked and PPE HE× 100

3 讨论

肺气肿是一种严重威胁人类健康的常见慢性疾病,吸烟是引起肺气肿发病的最主要原因,全球 80 %的肺气肿患者与长期大量吸烟有关,但仅有 10 %~20 %的长期大量吸烟者发生肺气肿^[5,6]。目前肺气肿的发病机制和病理生理学的关键环节仍未

阐明,肺内弹性纤维的破坏造成肺泡间隔断裂、肺泡腔融合扩大,气体交换面积减少、同时肺的弹性回缩力学机制受损,是肺气肿发病的中心环节。肺气肿的发病过程一旦启动即表现为不可逆的进行性发展,目前尚无一种药物能够有效地逆转或阻滞肺气肿的进行性发展过程,有学者报告 ATRA 能够促进 PPE 诱发的肺气肿兔子中已破坏肺泡的再生修复,但临床初步应用

未获得肺功能学和影像学的改善,仍需进一步深入研究^[7-9]。近年来发展起来的减容术能够明显改善重度肺气肿患者的肺功能、呼吸困难程度和生活质量,但维持一段时间以后又开始出现病情加重,其治疗肺气肿的病理学基础和病理生理学机制尚需进一步研究^[10,11]。肺气肿的动物模型是实验室的体外实验研究成果用于人体实验并最终临床应用的桥梁。因此有必要建立一种与人类吸烟所致肺气肿相似的实验动物模型对肺气肿的发病机制和各种防治方法进行深入研究。

肺气肿的发病过程是一个慢性炎症过程,表现为肺实质内的中性粒细胞、肺泡巨噬细胞和T淋巴细胞的增多,激活的炎症细胞释放一系列炎性介质,包括LTB₄、IL-8、TNF- α 和其它能够破坏肺泡结构的酶或维持中性粒细胞炎症的介质。但关于炎症反应在肺气肿发病和疾病进展中的机制尚未完全阐明^[12,13]。近年来HRCT的发展为肺气肿提供了可靠有效的影像诊断方法,在特别为小动研究设计的高分辨CT扫描系统中可行层厚50 μ m~100 μ m的超薄层扫描用于小鼠肺能和形态学的研究,因此在动物模型的建立过程中不需将动物活杀行组织病理查,通过HRCT即可明确肺气肿的形成^[14]。本研究采用64排螺旋CT对兔子肺进行CT全肺扫描,图像采集时间相对较长,由于兔子不能屏气,呼吸次数较人类快,易造成扫描中的伪影,因此采用2 mm层厚的薄层扫描,初步判定肺气肿的发生情况,发现PPE和烟熏加PPE组大鼠周边肺组织透光度增强,肺纹理消失,出现明显的肺气肿改变。

目前认为吸烟、环境污染和遗传因素是肺气肿发病的主要原因,但肺气肿的发病机制是多因素综合作用的结果^[15,16]。

肺气肿是COPD在肺实质内的一种病理形态学的变化,主要表现为肺泡结构的紊乱和肺泡间隔断裂,肺泡腔融合扩大^[17]。现代生物学的研究要求能够数字化地准确反映肺泡的发育、损伤、修复和生长的变化,因此肺泡形态计量学发展成为肺气肿病理学研究中的重要指标^[18]。通常采用光学显微镜下二维平面测量Lm和MAN,来反映肺泡的大小和密度,然后根据肺总量计算出肺泡表面积,反映肺的气体交换面积^[19,20]。但目前研究认为,肺泡是一个三维形态的结构,肺泡表面积除受肺泡体积的影响外,还受肺泡三维形状结构的影响,因此有的学者开始在三维空间研究肺泡的形态计量学,但还未获得广泛应用^[21,22]。本研究仍采用常用的二维平面光镜下的方法观察肺泡的形态计量学指标,结果发现PPE和烟熏加PPE组MAN较正常对照组明显减少,MAA和Lm均较正常对照组显著增加,表明肺泡间隔出现破坏,肺泡融合扩大形成肺大疱,出现了肺气肿的形态学变化,而单纯烟熏组大鼠则未出现肺气肿的形态学改变。

由此可见,烟熏加气管内滴入PPE的方法不仅可减少PPE的用量,减少动物死亡,还能缩短单纯烟熏诱发肺气肿动物模型的时间,在3月内可稳定地诱发类似于人类因长期吸烟所致肺气肿的兔子模型。

参考文献(References)

- [1] Yao H, Edirisinghe I, Rajendrasozhan S. Cigarette smoke mediated inflammatory and oxidative responses are strain dependent in mice [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 294(6): 1174-1186
- [2] Cai S, Zhang C, Chen P, et al. Oral N-acetylcysteine attenuates pulmonary emphysema and alveolar septal cell apoptosis in smoking-induced COPD in rats [J]. *Respirology*, 2009, 14(3): 354-359
- [3] Van der SBW, Postma DS, Brandsma CA, et al. Cigarette smoke-induced emphysema: A role for the B cell [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 173(7): 751-758
- [4] Zhang C, Cai S, Chen P, et al. Inhibition of TNF- α reduces alveolar septal cell apoptosis in passive smoking rats [J]. *Chin Med J*, 2008, 121(7): 597-601
- [5] Valenca SS, Da HK. Emphysema and metalloelastase expression in mouse lung induced by cigarette smoke [J]. *Toxicol Pathol*, 2004, 32(3): 351-356
- [6] Fishman AP. One hundred years of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005; 171(19): 941-948
- [7] 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
- [8] Goldin JG. Hight 2 resolution CT of the lung II: quantitative CT of the lung [J]. *Radiol Clin North Amer*, 2002, 40(1): 145
- [9] Blanco I, Fernandez BE, Miravittles M. Estimated numbers and prevalence of PI*S and PI*Z alleles of alpha1-antitrypsin deficiency in European countries [J]. *Eur Respir J*, 2006, 27(1): 77-84
- [10] Janciauskiene S, Stevens T, Blanco I. New insights into the biology of alpha1-antitrypsin and its role in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Current Respiratory Medicine Reviews*, 2007, 3: 147-158
- [11] Janoff A. Inhibition of human granulocyte elastase by serum alpha-1-antitrypsin [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1972, 105(1): 121-122
- [12] Lieberman J, Kaneshiro W. Inhibition of leukocytic elastase from purulent sputum by alpha 1-antitrypsin [J]. *Lab Clin Med* 1972, 80(1): 88-101
- [13] Travis J, Salvesen GS. Human plasma proteinase inhibitors [J]. *Annu Rev Biochem*, 1983, 52: 655-709
- [14] Potempa J, Korzus E, Travis J. The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function and regulation [J]. *J Biol Chem* 1994, 269(23): 57-60
- [15] Stockley RA, Burnett D. Alpha-antitrypsin and leukocyte elastase in infected and noninfected sputum [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1979, 120(5): 1-6
- [16] Korkmaz B, Attucci S, Jourdan ML. Inhibition of neutrophil elastase by alpha1-protease inhibitor at the surface of human polymorphonuclear neutrophils [J]. *J Immunol*, 2005, 175(5): 3329-3338
- [17] Duranton J, Bieth JG. Inhibition of proteinase 3 by alpha1-antitrypsin in vitro predicts very fast inhibition in vivo [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003, 29(1): 57-61
- [18] Dowd SK, Rodgers GC, Callen JP. Effective treatment with alpha 1-protease inhibitor of chronic cutaneous vasculitis associated with alpha 1-antitrypsin deficiency [J]. *Am Acad Dermatol*, 1995, 33(5 Pt 2): 913-916
- [19] Smith KC, Pittelkow MR, Su WP. Panniculitis associated with severe alpha 1-antitrypsin deficiency [J]. *Treatment and review of the literature*, 1987, 123(12): 55-61
- [20] Furey NL, Golden RS, Potts SR. Treatment of alpha-1-antitrypsin deficiency, massive edema, and panniculitis with alpha-1 protease inhibitor [J]. *Ann Intern Med*, 1996, 125(8): 699
- [21] O'Riordan K, Blei A, Abecassis M. Alpha 1-antitrypsin deficiency-associated panniculitis: resolution with intravenous alpha 1-antitrypsin administration and liver transplantation [J]. *Transplantation*, 1997, 63(3): 24-26