

三种不同诱因建立肺纤维化小鼠模型的研究

赵丰娟^{1,2} 王淳^{2,3} 邓江婷^{2,3} 谭婉莹^{2,4} 谭正怀²

1 西南医科大学药学院

2 四川省中医药科学院, 四川省中药药理学重点学科, 中药材品质及创新中药研究四川省重点实验室

3 成都中医药大学 4 四川大学华西医院

DOI:10.12238/fcmr.v6i3.9249

[摘要] 目的: 对比博来霉素(BLM)、脂多糖(LPS)和异硫氰酸荧光素酯(FITC)诱导的小鼠肺纤维化模型。方法: 通过气管滴注BLM、LPS和FITC建立模型,并在第21天和28天测量肺、脾、胸腺的重量及计算脏器指数,检测肺组织羟脯氨酸(HYP)含量,并进行病理分析。结果: BLM和LPS降低小鼠体重,增加肺重和肺指数($P<0.05$); BLM和FITC升高肺组织HYP含量($P<0.05$); FITC增加脾重和脾指数($P<0.01$ 或 $P<0.001$)。HE染色显示LPS引起中度肺纤维化。结论: BLM、FITC和LPS均能诱导不同程度的肺纤维化,表现各异,提示在药物评价中应根据其特性选择合适的模型。

[关键词] 博来霉素; 脂多糖; 异硫氰酸荧光素酯; 肺纤维化

中图分类号: Q946.885+.5 文献标识码: A

A Mouse Model of Pulmonary Fibrosis induced by Three Different Inducements

Fengjuan Zhao^{1,2} Chun Wang^{2,3} Jiangting Deng^{2,3} Wanying Tan^{2,3} Zhenghuai Tan²

1 School of Pharmacy, Southwest Medical University

2 Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Key discipline of traditional Chinese medicine pharmacology in Sichuan Province, Sichuan Provincial Key Laboratory of Chinese Materia Medica Quality and Innovative Chinese Medicine Research

3 Chengdu University of Traditional Chinese Medicine

4 West China Medical Center, Sichuan Medical University

[Abstract] Objective To compare pulmonary fibrosis models induced by bleomycin (BLM), lipopolysaccharide (LPS), and fluorescein isothiocyanate (FITC) in mice. Methods Models were established by intratracheal instillation of BLM, LPS, and FITC, followed by measuring lung, spleen, and thymus weights, calculating organ indexes, and analyzing hydroxyproline (HYP) content in lung tissue on days 21 and 28. Histopathological analysis was also conducted. Results BLM and LPS reduced body weight and increased lung weight and index ($P<0.05$); BLM and FITC elevated lung HYP content ($P<0.05$); FITC increased spleen weight and index ($P<0.01$ or $P<0.001$). LPS caused moderate fibrosis as shown by HE staining. Conclusions BLM, FITC, and LPS can induce varying degrees of pulmonary fibrosis with different manifestations, suggesting the need for careful selection of models based on drug characteristics in evaluations.

[Key words] Bleomycin; Lipopolysaccharide; Fluorescein isothiocyanate; Pulmonary fibrosis

肺纤维化是一种与慢性炎症和组织重塑相关的间质性肺病,可能由直接肺损伤、遗传缺陷或职业、环境暴露引起,但许多病例的病因尚不明确。这种疾病的特征是肺间质细胞外基质的积聚,导致肺顺应性丧失、气体交换受损、纤维化、肺功能下降、呼吸衰竭甚至死亡^[1,2]。现有的抗纤维化和免疫抑制疗法效果有限,深入研究其致病机制对未来治疗至关重要。近年来,老年人纤维性肺病的发病率上升,引起了广泛关注^[3]。

目前,博来霉素(BLM)作为抗肿瘤药物,常用于建立小鼠或大鼠的肺纤维化模型,以模拟人类的特发性肺纤维化或其他相关肺疾病。然而,部分博来霉素模型中纤维化可能会随时间减轻^[4]。脂多糖(LPS)常用于诱导全身性炎症反应,并在特定条件下引发肺纤维化,尤其是在与其他促纤维化因素结合时^[5]。异硫氰酸荧光素酯(FITC)作为一种荧光染料,通过与载体结合可以诱导小鼠产生纤维化模型,其荧光特性也有助于跟踪这些分

子的分布和作用部位^[6]。

使用LPS、BLM和FITC建立的动物模型能够有效模拟人类疾病中的炎症、纤维化和免疫反应,为研究疾病机制、评估药物疗效以及开发治疗策略提供了重要的实验基础。

1 实验材料

1.1 实验试剂和配制

硫酸博莱霉素,货号B802467-100mg,批号C14869917,CAS:9041-93-4,购于上海麦克林生化科技有限公司,临用前用生理盐水配制成所需浓度的溶液备用;脂多糖,货号L2880-100 MG,批号0000135218,购于SIGMA. ALDRICH. Co,称取所需重量用生理盐水溶解涡旋混匀;异硫氰酸荧光素酯,货号F8070,批号2231019006,规格50mg,购于Solarbio;生理盐水(批号:L122070408),四川科伦药业股份有限公司。

1.2 生化指标测定试剂盒

肺组织检测:羟脯氨酸(HYP)试剂盒(货号:A030-2-1,批号:20230828、20231114、20240116),由南京建成生物工程研究所提供。

1.3 仪器

JA1003A电子天平(最大称量:100g,编号:0309006),购于上海精天电子仪器有限公司;LQ-C3002电子天平(最大称量300g,编号:9191711,d=0.01g,e=0.1g),购于上海瑶新电子科技有限公司;Varioskan Flash全波长多功能酶标仪,美国Thermo公司;TGL-16台式高速冷冻离心机(最高转速:16000r/min,最大相对离心力:17800Xg),长沙湘仪离心机仪器有限公司;一次性使用静脉留置针(I型22G,22G25mm,33mL/min,批号20230411),购于威海洁瑞医用制品有限公司。

1.4 实验动物

SPF级昆明种小鼠,由北京华阜康生物科技有限公司提供,生产许可证号为:SCXK(京)2019-0008;C57BL/6J小鼠,由四川维通利华实验动物技术有限公司提供,生产许可证号为:SCXK(川)2023-0040,本实验中所有动物实验均通过四川省中医药科学院动物伦理委员会审查,伦理编号为:DWSYLL-2023-030。

1.5 饲养环境

动物饲养于四川省中医药科学院实验动物中心SPF屏障系统中,许可证号:SYXK(川)2023-0100,室温为20~22℃,相对湿度40~70%,12h明暗交替照明,试验期间小鼠自由饮水和摄食。

2 实验方法

2.1 动物分组与模型建立

2.1.1 BLM肺纤维化模型

SPF级昆明种小鼠,随机分为对照组和模型组,对照组滴注等体积生理盐水,模型组气管插管滴注BLM3.5mg/kg(给药体积均为10 μ L/10g),造模后,逐日观察各组小鼠一般情况(食欲、毛发、大便、活动量等)及有无死亡,每周称一次体重并记录,造模后第28天对动物进行取材。取肺组织、胸腺,称取脏器湿重并计算肺指数和胸腺指数。

2.1.2 LPS肺纤维化模型

取18-22g雄性KM小鼠,随机分为对照组和模型组。适应性喂养3天后造模,采用气管插管的方法,对照组滴注生理盐水(10 μ L/10g,下同),模型组第1天滴注LPS10mg/kg,第8天滴注5.0mg/kg,第15天滴注LPS5.0mg/kg,第22天滴注5.0mg/kg,逐日观察各组小鼠一般情况(食欲,毛发,大便,活动量等)及有无死亡,每周称1次体重并记录。在第21天、28天分别处理一半动物进行观察。取肺组织、胸腺,称取脏器湿重并计算肺指数和胸腺指数。

2.1.3 FITC肺纤维化模型

取22~24g雄性C57BL/6J小鼠,随机分为对照组、FITC2.8mg/kg和FITC4.2mg/kg,每组各10只。适应性喂养3天后造模,采用气管插管的方法,对照组滴注生理盐水(10 μ L/10g,下同),模型组分别滴注FITC2.8mg/kg、4.2mg/kg,逐日观察各组小鼠一般情况(食欲,毛发,大便,活动量等)及有无死亡,每周称1次体重并记录。在造模后21天处理动物,取肺、脾脏、胸腺组织,称量脏器湿重并计算脏器指数。

2.2 肺组织HYP含量测定

羟脯氨酸在氧化剂的作用下所产生的氧化产物与二甲氨基苯甲醛作用呈现紫红色,根据其颜色的深浅可预算出其含量。BLM/LPS诱导小鼠肺纤维化模型实验均称取肺组织湿重80mg,FITC诱导小鼠肺纤维化模型实验称取肺组织湿重60mg。按照说明书操作步骤加入相应试剂,在波长550nm下测定羟脯氨酸(HYP)含量。

2.3 肺组织病理HE染色

LPS对照组和模型组,将造模后28天处理的小鼠左肺固定于4%甲醛溶液,做HE染色。

2.4 数据统计分析

采用SPSS26.0软件对数据进行统计分析。使用Graphpad Prism 9.3.1版本对数据进行作图。正态定量数据用“平均值 \pm 标准差”(x \pm s)表示,P<0.05为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 BLM对小鼠的影响

3.1.1 BLM对小鼠体重的影响

实验结果显示,博莱霉素(BLM)处理后,模型组小鼠体重在第7天开始逐渐低于对照组,并在第21天达到最大差异。到第28天时,两组体重差距缩小,但模型组仍略低于对照组。这表明,BLM诱导的小鼠在21天至28天之间病变可能最为严重。

3.1.2 BLM对小鼠脏器及肺组织HYP的影响

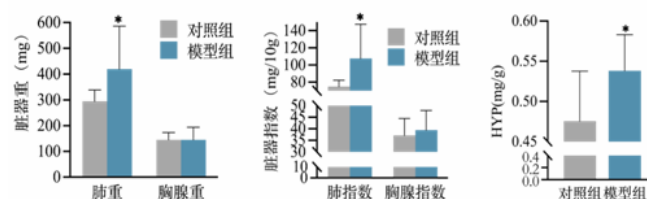


图1 博莱霉素对小鼠脏器及肺组织HYP的影响

由图1可知,与对照组相比,BLM组的肺重和肺指数均增大,肺重比对照组高三分之一,肺指数比对照组高一半,差异具有统

计学意义($P < 0.05$);就胸腺重量和胸腺指数而言,两组无明显差异,BLM组胸腺指数比对照组略有增大,差异没有统计学意义。与对照组相比,模型组肺组织的羟脯氨酸含量明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$),说明BLM能够升高小鼠肺组织HYP水平。

3.1.3 BLM对小鼠肺组织的影响

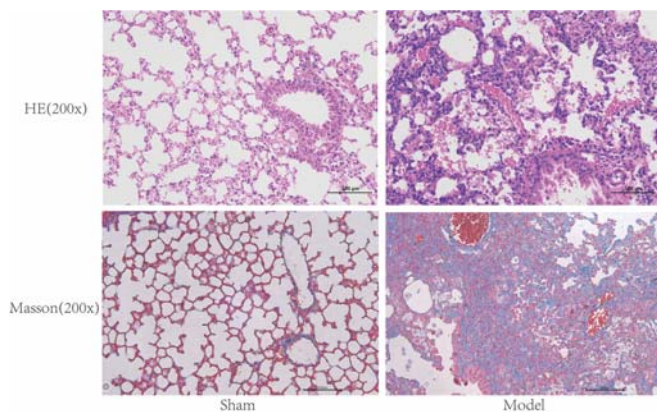


图2 博来霉素对小鼠肺组织的影响

由图2知,对照组肺泡结构清晰,无异常改变,模型组肺泡结构紊乱,炎性细胞堆积,肺蓝染面积较对照组明显增大,提示模型组发生了炎症反应,并呈纤维化改变。

3.2 LPS对小鼠的影响

3.2.1 LPS对小鼠体重的影响

LPS处理后,模型组小鼠在前两周内体重显著下降,与对照组相比差异具有统计学意义($P < 0.001$)。第7天和第14天,模型组体重显著低于对照组,表明LPS诱导的小鼠在前两周进入了急性反应期。

3.2.2 LPS对小鼠脏器及脏器指数的影响

LPS处理3周和4周后,模型组小鼠的肺湿重和肺指数显著高于对照组。4周时,肺湿重较3周时有所降低,但肺指数升高,提示LPS对肺部损伤可能具有时间依赖性。此外,4周时模型组的胸腺湿重和胸腺指数显著高于对照组,显示免疫反应更为强烈。

3.2.3 LPS对小鼠肺组织的影响

对照组小鼠肺组织结构正常,未见明显炎性细胞浸润和纤维化。LPS处理4周后,模型组肺泡壁增厚、部分区域实质化并伴有中度纤维化,且结缔组织增生、粒细胞浸润及细支气管上皮细胞坏死、脱落现象显著,提示LPS诱导的炎症反应和纤维化增强。

3.2.4 LPS对小鼠肺组织HYP水平的影响

LPS处理4周后,对照组和模型组的HYP水平均较3周后增加,其中4周时对照组和模型组的HYP含量分别为 $0.582 \pm 0.087 \mu\text{g}/\text{mg}$ 和 $0.508 \pm 0.082 \mu\text{g}/\text{mg}$ 。同一时间点,模型组HYP水平低于对照组,提示LPS诱导的肺纤维化程度较低,可能与炎症占主导地位有关。

3.3 FITC对小鼠的影响

3.3.1 FITC对小鼠体重的影响

FITC处理后,各组小鼠在不同时间点的体重变化无显著差异。第21天时,2.8mg/kg组和4.2mg/kg组的小鼠体重分别为 $26.78 \pm 1.12\text{g}$ 和 $26.94 \pm 1.81\text{g}$,对照组为 $26.2 \pm 1.39\text{g}$,差异无统计学意义($P > 0.05$)。表明FITC对小鼠体重几乎无影响。

3.3.2 FITC对小鼠脏器的影响

FITC2.8mg/kg组小鼠的肺和胸腺重量较对照组略有减少,但脾脏重量显著增加($P < 0.001$)。FITC4.2mg/kg组的小鼠肺和脾脏重量显著高于对照组($P < 0.001$),胸腺重量有所减少。随着FITC剂量的增加,肺重和脾重呈增大趋势,胸腺重量减小,显示免疫反应增强。FITC2.8mg/kg和4.2mg/kg组的小鼠脾指数分别显著增加($P < 0.01$ 和 $P < 0.001$)。

3.3.3 FITC对小鼠肺组织HYP含量的影响

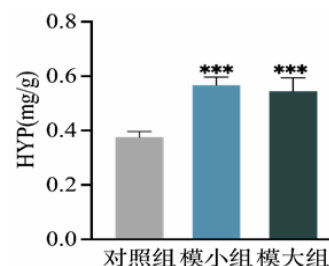


图3 FITC对小鼠肺组织HYP含量的影响

与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

由图3可知,与对照组比较,FITC 2.8 mg/kg与FITC4.2mg/kg组小鼠HYP含量均明显增多,差异具有统计学意义($P < 0.001$),说明FITC可以升高小鼠肺组织HYP水平,其中FITC2.8mg/kg组小鼠肺组织HYP含量略高于FITC4.2mg/kg组。就升高肺组织HYP含量而言,FITC2.8mg/kg比FITC4.2mg/kg更好。

4 讨论

肺纤维化的诱因多种多样,如百草枯、二氧化硅和放射线等均可引起肺纤维化。适应性组织修复减少、慢性炎症和细胞衰老是进行性肺纤维化的关键特征。参与肺纤维化的关键细胞包括上皮细胞(肺泡2型细胞、基底细胞等)、成纤维细胞和免疫细胞,其在纤维化中的表型变化及机制尚不明确^[7,8]。

博来霉素(BLM)是一种用于治疗肿瘤的药物,因其可引起脏器纤维化,常用于建立肺纤维化模型^[9]。研究表明,使用5mg/kg的BLM一次性给药,经过28天可引起明显的肺组织纤维化,这与文献报道一致^[10]。BLM诱导的小鼠肺纤维化表现出与人类肺纤维化类似的临床特征,如B细胞在纤维化区域的突出聚集。研究发现,B细胞在BLM诱导的肺纤维化过程中起重要作用,通过消耗浆细胞的硼替佐米治疗可降低纤维化水平,这表明浆细胞是肺纤维化的重要效应细胞^[11]。

FITC是一种特征明确的荧光半抗原,常用于诱导小鼠慢性肺纤维化模型^[12]。气管滴注FITC后,小鼠会经历急性肺损伤,继而发展为慢性炎症。21天后,模型组小鼠的肺部胶原蛋白含量显著增加,即使在缺乏T细胞的动物中,胶原蛋白含量的增加也与免疫正常组相似,表明FITC诱导的肺纤维化不依赖于T细

胞免疫^[13]。该模型中,急性肺损伤和持续性慢性炎症是纤维化发展的主要原因。慢性纤维化过程涉及粒细胞浸润的急性炎症反应,随后被T淋巴细胞主导的慢性单核浸润取代。几个月内,斑片状纤维化伴随单核间质浸润局限于FITC沉积部位,而其他肺组织保持正常^[12]。

LPS常用于炎症反应,脂多糖(LPS)诱导的小鼠ALI已被广泛用作研究人类ALI/ARDS的模型。使用LPS诱导的ALI,在ALI后期发生肺纤维化。虽然在野生型和Ism1-/-小鼠的LPS造模后第7天,先天免疫细胞在很大程度上消退到基线,但Ism1-/-肺从LPS治疗后第9天开始,ALI纤维化后出现增加,肌纤维母细胞增加,胶原蛋白积累过多和TGF- β 上调。肺纤维化加剧仍停留在LPS后的第28天^[14]。使用LPS 4周后,与对照组比较,模型组肺组织炎症细胞聚集,肺泡结构明显紊乱,呈现中度肺纤维化,说明使用LPS是可以引起炎症后肺纤维化的。

BLM和LPS诱导的肺纤维化主要体现在肺湿重和肺指数的变化上,而FITC则在脾脏和胸腺上显示出更显著的影响。LPS和FITC均可引发免疫反应,且BLM和FITC均能显著升高小鼠肺组织的HYP含量。相较于LPS需要多次给药,BLM和FITC均可通过一次性给药诱导肺纤维化,具有简单便捷的特点。

[项目基金]

四川省中医药管理局重点项目(2024zd015)。

[参考文献]

[1] O'Dwyer DN, Moore BB. Animal Models of Pulmonary Fibrosis[J]. *Methods Mol Biol*. 2018;1809:363-378.

[2] Prêle CM, Miles T, Pearce DR, et al. Plasma cell but not CD20-mediated B-cell depletion protects from bleomycin-induced lung fibrosis[J]. *Eur Respir J*. 2022;60(5):2101469. Published 2022Nov24.

[3] Parimon T, Hohmann MS, Yao C. Cellular Senescence: Pathogenic Mechanisms in Lung Fibrosis[J]. *Int J Mol Sci*. 2021;22(12):6214. Published 2021Jun9.

[4] 王搏,宋庆华,唐会猛,等.博来霉素诱导的肺纤维化动物模型研究进展[J]. *中国实验动物学报*,2023,31(12):1617-1628.

[5] 任亦频,周厚荣,李亚骥,等.过表达miR-203a-3p对脂多糖致大鼠急性肺损伤后肺纤维化的影响及其机制[J]. *安徽医科*

大学学报,2022,57(4):563-568.

[6] 郭琦琦,李毅,翁桓泽,等.生物及非生物因素诱导肺纤维化动物模型研究的特点[J]. *中国组织工程研究*,2022,26(14):6.

[7] Yu Y, Chu C, Wang K, et al. YAP/TAZ activation mediates PQ-induced lung fibrosis by sustaining senescent pulmonary epithelial cells[J]. *Respiratory Research*, 2024, 25(1).

[8] Su J, Morgani SM, David CJ, et al. TGF- β orchestrates fibrogenic and developmental EMTs via the RAS effector RREB1 [published correction appears in *Nature*. 2020Jan 15][J]. *Nature*. 2020;577(7791):566-571.

[9] 王搏,宋庆华,唐会猛,等.博来霉素诱导的肺纤维化动物模型研究进展[J]. *中国实验动物学报*,2023,31(12):6.

[10] 谢健龙,区泳芳,陈永华,等. MiR-23b通过调节TGF- β 1/SMAD3信号通路对博来霉素所致大鼠肺纤维化及自噬水平的影响[J]. *临床与病理杂志*,2022,42(6):1263274-1261274.

[11] Prêle CM, Miles T, Pearce DR, et al. Plasma cell but not CD20-mediated B-cell depletion protects from bleomycin-induced lung fibrosis[J]. *Eur Respir J*. 2022;60(5):2101469. Published 2022Nov24.

[12] Roberts SN, Howie SE, Wallace WA, et al. A novel model for human interstitial lung disease: hapten-driven lung fibrosis in rodents[J]. *J Pathol*. 1995;176(3):309-318.

[13] Christensen PJ, Goodman RE, Pastoriza L, et al. Induction of lung fibrosis in the mouse by intratracheal instillation of fluorescein isothiocyanate is not T-cell-dependent[J]. *Am J Pathol*. 1999;155(5):1773-1779.

[14] Nguyen N, Xu S, Lam TYW, et al. ISM1 suppresses LPS-induced acute lung injury and post-injury lung fibrosis in mice[J]. *Mol Med*. 2022;28(1):72. Published 2022Jun25.

作者简介:

赵丰娟(1995--),女,汉族,河南邓州人,硕士研究生,从事中药药理与毒理研究。

通讯作者:

谭正怀(1964--),男,汉族,重庆人,博士,研究员,研究方向:中药药理。