

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.01.004

构建小型猪慢性阻塞性肺疾病合并早期肺心病的模型*

杨 智¹, 付 兵¹, 李春平^{2△}, 李 睿², 杨 帆², 杨大兴¹, 王文斌¹

(1. 四川省成都市第五人民医院放射科 611130; 2. 川北医学院附属医院放射科, 四川南充 637000)

[摘要] **目的** 通过复制慢性阻塞性肺疾病(COPD)合并早期肺源性心脏病(肺心病)的小型猪模型来为临床提供预防、诊断及治疗 COPD 合并肺心病的动物实验模型。**方法** 将 15 头小型猪纳入造模组,在气管内注入木瓜蛋白酶和胰蛋白酶 20 周制作 COPD 及早期肺心病模型,分别于造模前、造模第 5、20 周用肺功能分析系统及磁共振成像系统测定小型猪的肺功能及右心室舒张末期容积、右心室射血分数、右心室舒张末期质量,并进行对比研究。**结果** 造模第 5 周,造模组出现慢性支气管炎和肺气肿表现,肺总量、功能残气量较造模前增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);吸气气道阻力及呼气气道阻力均较造模前增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。造模第 20 周,造模组小型猪右心室心肌肥大且右心室舒张末期质量较造模前增加、右心室舒张末期容积较造模前减小、右心室射血分数较造模前降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 木瓜蛋白酶联合胰蛋白酶能成功制备小型猪 COPD 合并早期肺心病的实验模型。

[关键词] 肺疾病,慢性阻塞性;心室重构;疾病模型,动物;猪**[中图法分类号]** R363.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2019)01-0015-03

Establishment of chronic obstructive pulmonary disease combined with early-stage pulmonary heart disease in piglets*

YANG Zhi¹, FU Bing¹, LI Chunping^{2△}, LI Rui², YANG Fan², YANG Daxing¹, WANG Wenbing¹

(1. Department of Radiology, Chengdu Fifth People's Hospital, Chengdu, Sichuan 611130, China; 2. Department of Radiology, the Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China)

[Abstract] **Objective** Established the piglets models of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) combined with early-stage pulmonary heart disease to provide the animal model for exploring the prevention, diagnosis and treatment of COPD with pulmonary heart disease. **Methods** Fifteen piglets were prospectively enrolled in the model group of COPD combined with early-stage pulmonary heart disease. The models of piglets were made by continuous injection of papain and trypsin into the trachea for 20 weeks. The lung function, end-diastolic volume, ejection fraction and mass of right ventricle of piglets were determined by pulmonary function analysis system and magnetic resonance imaging system at the 0, 5th, 20th week. And comparative study was conducted. **Results** At the 5th week after modeling, the model group showed chronic bronchitis and emphysema. Pulmonary function changes such as lung volume, functional residual capacity increased after modeling and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Inspiratory and expiratory airway resistance increased compared with before, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). At the 20th week right ventricular hypertrophy, end-diastolic mass and volume of right ventricular, ejection fraction increased in the model group. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Papain combined with trypsin can successfully establish the model of COPD combined with early-stage pulmonary heart disease in piglets.

[Key words] pulmonary disease, chronic obstructive; ventricular remodeling; disease models, animal; swine

有研究表明,我国每年有将近 100 多万慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease,

* 基金项目:四川省教育厅科技基金资助项目(11ZA186)。 作者简介:杨智(1987—),主治医师,硕士,主要从事心脏磁共振影像研究。

△ 通信作者,E-mail:lichunping_1@163.com。

COPD)患者死亡,同时 COPD 也位于我国疾病负担的第 2 位^[1]。COPD 合并肺源性心脏病(肺心病)是 COPD 疾病发展的必然进程和最终结局,也是严重降低患者劳动能力、生活质量及致死的最重要因素^[2]。虽然对 COPD 合并肺心病目前进行了较多的研究,但是部分发病机制及疾病的相关预防和治疗至今未被完全阐明。因此,建立符合人类病因及病程发展、且能完成临床治疗与随访的 COPD 合并早期肺心病的动物模型一直是国内外学者追求的目标和努力的方向^[3]。本实验主要从肺功能、心脏磁共振成像、病理切片等方法测定肺总量、功能残气量、吸气气道阻力、呼气气道阻力、右心室舒张末期质量、右心室舒张末期容积、肺组织及心肌细胞的组织学改变,来探讨反复气管内滴注木瓜蛋白酶和胰蛋白酶建立 COPD 合并早期肺心病小型猪模型方法的可靠性,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选取小型猪 15 头为造模组,由川北医学院动物实验中心提供,其中雄性 10 头,雌性 5 头,体质量 20~30 kg,猪龄 8~9 个月。

1.2 方法

1.2.1 建立 COPD 合并早期肺心病模型 实验第 1 周制备 COPD 合并早期肺心病模型方法:星期二在所有小型猪麻醉前 30 min 肌肉注射阿托品(0.4 mg/kg),随后于颈部肌肉注射地西洋 20 mg,待小型猪安静后,于小型猪耳缘静脉建立静脉通道,经通道分 3 次注入氯胺酮(20 mg/kg)及异戊巴比妥钠(80 mg/kg)进行麻醉,麻醉满意后将其固定于特定的动物支架上,然后对小型猪进行气管内插管,将木瓜蛋白酶 6 U/kg 稀释成 20 mL 的生理盐水经气管插管内注入;星期五重复上述小型猪麻醉及固定方法将胰蛋白酶 300 U/kg 稀释成 20 mL 生理盐水注入气管内。实验第 2~20 周重复上述第 1 周的造模方法。所有实验动物均饲养于川北医学院动物实验中心,小型猪饲料及饮用水由动物实验中心供应。

1.2.2 小型猪肺功能测定与心脏磁共振检查 于造模的第 0~20 周每周六重复上述麻醉,麻醉后采用 AniRes2003 动物肺功能分析系统(中国北京贝兰博科技有限公司生产)来测定造模小型猪的肺总量(TLC)、功能残气量(FRC)、吸气气道阻力(Ri)、呼气气道阻力(Re)。造模小型猪肺功能测定完成后,将麻醉的小型猪转运入川北医学院附属医院放射科进行心脏磁共振扫描,并测定右心舒张末期容积及右心舒张末期质量,具体扫描及测定方法见文献[4-5]。

1.2.3 病理标本的采取及处理方法 将死亡的造模

小型猪的肺、心脏组织常规采用 4% 甲醛进行组织固定,然后常规脱水、包埋、苏木精-伊红(HE)染色、制成石蜡切片,于光镜下观察肺组织及心脏的病理形态学改变。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用单因素可重复测量资料的方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模小型猪一般情况 造模第 5 周末造模小型猪死亡 2 头,死亡原因为造模后肺部出现感染。造模第 11 周末死亡 2 头,死亡原因为造模过程中引起急性大咯血窒息。造模第 16 周末死亡 1 头,死亡原因为急性肺部感染。造模第 20 周末完成实验后死亡 4 头,为麻醉后的肺部严重感染。造模前小型猪平均体质量为 (27.0 ± 1.31) kg,造模后第 5、20 周造模小型猪平均体质量分别为 (28.1 ± 2.41) 、 (29.5 ± 1.78) kg,造模小型猪造模前后体质量比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。造模第 5 周开始出现夜间咳嗽、呼吸困难等症状。

2.2 造模小型猪肺组织及心脏细胞病理学改变 第 5 周末造模小型猪肺组织表面见血点、肺表面凹凸不平,HE 染色发现造模小型猪第 5 周末肺组织内肺泡扩大,肺泡壁断裂,肺间隔水肿;造模第 20 周对死亡小型猪心脏组织进行 HE 染色发现右心室心肌细胞肥大,乳头肌肥大,见图 1、2。

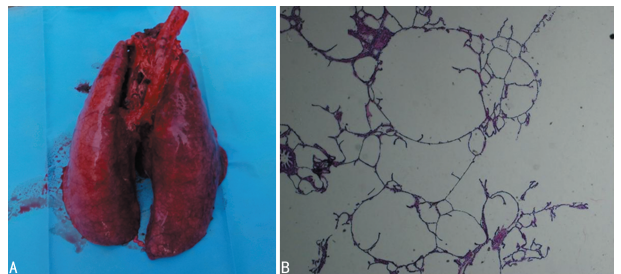


图 1 A:大体观察造模小型猪双肺有陈旧性出血点,肺表面凹凸不平; B:外周肺泡间隔破坏,肺泡腔明显扩大

图 1 造模小型猪第 5 周末大体肺标本及 HE 染色病理图片($\times 10$)

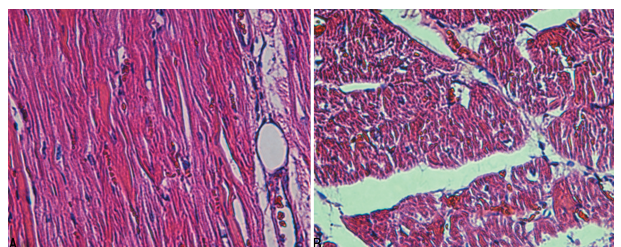


图 2 A:局部心肌细胞肥大; B:横断面示心肌细胞增粗

图 2 造模小型猪第 20 周末左心室 HE 染色病理图片($\times 40$)

2.3 造模小型猪肺功能指标变化 造模第 5、20 周末肺功能与造模前小型猪肺功能比较,造模小型猪造模后 TLC、FRC、Ri、Re 均较造模前升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1、2。

表 1 造模小型猪造模前与造模第 5 周末肺功能比较($\bar{x} \pm s$)

项目	造模前	造模第 5 周末	P
TLC(L)	1.852±0.227	2.116±0.233	0.019
FRC(mL)	60.800±3.700	63.500±3.000	0.015
Ri	0.274±0.046	0.308±0.039	0.002
Re	0.184±0.064	0.287±0.046	0.000

表 2 造模小型猪造模前与造模第 20 周末肺功能比较($\bar{x} \pm s$)

项目	造模前	造模第 20 周末	P
TLC(L)	1.852±0.227	2.535±0.170	0.000
FRC(mL)	60.800±3.700	72.900±2.800	0.000
Ri	0.274±0.046	0.461±0.071	0.000
Re	0.184±0.064	0.484±0.030	0.000

2.4 造模小型猪右心功能指标变化 造模小型猪造模第 20 周右心室舒张末期容积减小、右心室射血分数较造模前降低,右心室舒张末期质量较造模前增加,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

表 3 造模小型猪造模前与造模第 20 周末右心室结构及功能比较($\bar{x} \pm s$)

项目	造模前	造模第 20 周末	P
右心室舒张末期容积(mL)	54.3±4.1	50.9±4.5	0.000
右心室射血分数(%)	54.3±4.1	51.0±4.5	0.001
右心室舒张末期质量(g)	10.2±1.1	11.2±1.1	0.003

3 讨论

COPD 是引起肺心病的最常见的原因,其导致原发性肺心病的病理生理学机制主要为:COPD 导致的人体缺氧,继发肺小血管收缩、痉挛、肺小动脉阻力增加,引起右心后负荷增大、右心室肌肥大,最终导致右心心力衰竭发生^[1,6]。目前的研究认为早期发现 COPD 继发肺动脉高压后右心结构及功能的改变,有助于早期治疗方案的确定^[7-8];同时 COPD 合并早期肺心病动物模型的建立对疾病的发病机制及诊疗方式的探讨,以及新药的开发有着非常重要的作用。目前木瓜蛋白酶能诱导 COPD 模型已经被证实,但是其造模所用的动物均为鼠、兔等小动物,缺乏 COPD 继发早期肺心病的大型动物造模研究,大型动物的造模有助于外科手术治疗及治疗后应用无创性检查仪器

进行疗效观察研究^[9]。

本实验采用木瓜蛋白酶联合胰蛋白酶诱导小型猪 COPD 继发早期肺心病的实验模型^[10]。气管内注入木瓜蛋白酶,会引起小型猪肺泡腔扩大,肺泡间隔断裂的肺气肿征象,同时联合胰蛋白酶能使肺内弹性蛋白酶/抗弹性蛋白酶系统失衡、激活肺组织内弹性蛋白酶活性,另外胰蛋白酶还能分解肺内的弹性蛋白、纤维粘连蛋白,使肺的弹性功能降低、顺应性减低,导致呼气性呼吸困难,加速 COPD 进展^[11]。本实验同时也证实木瓜蛋白酶联合胰蛋白酶诱导小型猪 COPD 模型是可行的。本研究期望降低小型猪 COPD 的建模时间,反复向小型猪气管内注入木瓜蛋白酶及胰蛋白酶,但是出现明显功能受损是在第 5 周,这可能与小型猪、犬类等大型动物肺体积较大,以及肺组织发育较为完善有关^[12]。随着造模时间的推移,造模小型猪的肺功能受损更加严重,第 20 周末小型猪 Re 较造模第 5 周末明显增加。这说明支气管、肺组织反复发生炎症损伤,以及持续的外基质的沉积,加重了肺实质结构的破坏及纤维化^[13-14]。

COPD 逐渐进展导致的肺动脉压力增高,继发右心室后负荷增大,最终导致肺心病及右心心力衰竭^[15]。早期发现、监测、随访 COPD 患者右心室结构及功能的改变对于 COPD 的治疗有着非常重要的作用。小型猪的心脏结构与人类类似,也利于治疗后体外的随访观察,成为 COPD 合并早期肺心病动物模型的首选。本实验发现:小型猪在造模第 20 周末右心室舒张末期容积降低,心肌肥大,右心室舒张末期质量增加,右心室射血分数降低,这符合人类 COPD 合并早期肺心病的病理表现。随着 COPD 的进展,肺动脉压力增大、右心后负荷增加,为保证右心射血功能正常,右心心肌出现代偿性肥大,早期右心室容积缩小,随后容积增大,心脏失代偿,发生右心心力衰竭^[16]。同时,本实验也采用无创性体外检查技术来监测右心室结构及功能变化,减轻了实验动物的伤害,也同时为后续疾病的治疗、随访提供了新的思路与方法。

综上所述,木瓜蛋白酶联合胰蛋白酶可诱导小型猪 COPD 合并早期肺心病模型的建立,能够展现 COPD 及早期肺心病的特征,可以为进一步治疗和预防 COPD 合并早期肺心病的研究提供一定的基础。

参考文献

- [1] 李海玲,李凡. GOLD 2017 更新要点解读及其对中国慢性阻塞性肺疾病分级诊疗的启示[J]. 中国全科医学, 2017,20(18):2171-2175.
- [2] STRIDSMAN C, MÜLLEROVA H, SKÄR L, et al. Fatigue in COPD and the impact of respiratory symptoms and heart disease: a population-based study[J]. COPD, 2013, 10(2):125-132.

- [7] SAHAB N S, KHOOEI A, SAMINI F, et al. Laminin-derived Ile-Lys-Val-ala-Val; a promising bioactive peptide in neural tissue engineering in traumatic brain injury[J]. *Cell Tissue Res*, 2018, 371(2): 223-236.
- [8] CORREIA S C, PREEY G, MOREIRA P I. Mitochondrial traffic jams in Alzheimer's disease-pinning the roadblocks [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1862(10): 1909-1917.
- [9] LEE I S, KOO K Y, JUNG K, et al. Neurogenin-2-transduced human neural progenitor cells attenuate neonatal hypoxic-ischemic brain injury [J]. *Transl Res*, 2017, 183: 121-136.
- [10] NAKANO N, MATSUDA S, ICHIMURA M, et al. PI3K/AKT signaling mediated by G protein-coupled receptors is involved in neurodegenerative Parkinson's disease[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 39(2): 253-260.
- [11] LI D, LUO L, XU M, et al. AMPK activates FOXO3a and promotes neuronal apoptosis in the developing rat brain during the early phase after hypoxia-ischemia[J]. *Brain Res Bull*, 2017, 132: 1-9.
- [12] KO R, LEE S Y. Glycogen synthase kinase β in Toll-like receptor signaling[J]. *BMB Rep*, 2016, 49(6): 305-310.
- [13] VOHNOUTKA R B, BOUMIL E F, LIU Y, et al. Influence of a GSK3 β phosphorylation site within the proximal C-terminus of Neurofilament-H on neurofilament dynamics [J]. *Biol Open*, 2017, 6(10): 1516-1527.
- [14] BEREZHNYAYA E V, BIBOV M Y, KOMANDIROV M A, et al. Involvement of MAPK, Akt/GSK-3 β and AMPK/mTOR signaling pathways in protection of remote glial cells from axotomy-induced necrosis and apoptosis in the isolated crayfish stretch receptor[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2017, 83: 1-5.
- [15] EBRAHIMI S, HOSSEINI M, SHAHIDSALES S, et al. Targeting the Akt/PI3K signaling pathway as a potential therapeutic strategy for the treatment of pancreatic cancer [J]. *Curr Med Chem*, 2017, 24(13): 1321-1331.
- [16] JIANG X, PEREZ-TORRES C J, THOTALA D, et al. A GSK-3 β inhibitor protects against radiation necrosis in mouse brain [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2014, 89(4): 714-721.

(收稿日期: 2018-05-26 修回日期: 2018-08-22)

(上接第 17 页)

- [3] 李进华, 邓敏华, 陈平, 等. 慢性阻塞性肺疾病动物模型的研究进展[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2014, 37(8): 606-609.
- [4] 杨智, 付兵, 李春平, 等. 3.0T MRI 评价早期 COPD 引起的右心改变的实验研究[J]. *放射学实践*, 2016, 31(2): 145-150.
- [5] 杨智. 3.0T MRI 评价由 COPD 引起的右心改变的实验研究[D]. 南充: 川北医学院, 2014.
- [6] GERGES M, GERGES C, NAEIJE R, et al. Pulmonary hypertension due to left heart disease[J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2017, 38(5): 662-676.
- [7] 王秋月, 张明娜. 不容忽视的慢性阻塞性肺疾病合并肺动脉高压[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2013, 36(4): 250-252.
- [8] KANWAR M, RAINA A, APONTE M P, et al. Pulmonary hypertension in potential heart transplant recipients: current treatment strategies[J]. *Curr Opin Organ Transplant*, 2015, 20(5): 570.
- [9] 李进华, 蔡珊, 彭红. 慢性阻塞性肺疾病动物模型研究现状[J]. *中国医师杂志*, 2015, 17(7): 1118-1120.
- [10] 毛旻, 张钰, 章乐尧. 木瓜蛋白酶诱导猪肺气肿模型的建立[J]. *临床肺科杂志*, 2012, 17(6): 1022-1024.
- [11] MACHADO M N, FIGUEIRÁ' A S F, MAZZOLI-ROCHA F, et al. Papain-induced experimental pulmonary emphysema in male and female mice[J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2014, 200(4): 90-96.
- [12] 陈传波, 张宛玉, 马红冰, 等. 犬肺气肿模型的制作[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2005, 40(1): 102-104.
- [13] 段琼, 汪伟民. 不同浓度骨髓间充质干细胞对肺气肿大鼠模型的影响[J]. *中国地方病防治杂志*, 2016(7): 738-739.
- [14] 顾延会, 欧阳瑶. 烟熏联合脂多糖制备大鼠慢性阻塞性肺疾病动物模型[J]. *重庆医学*, 2012, 41(13): 1295-1296.
- [15] LAM C Z, BHAMARE T A, GAZZAZ T A, et al. Diagnosis of secondary pulmonary lymphangiectasia in congenital heart disease: a novel role for chest ultrasound and prognostic implications[J]. *Pediatr Radiol*, 2017, 47(11): 1441-1451.
- [16] GUAZZI M, LABATE V. Pulmonary hypertension in heart failure patients: pathophysiology and prognostic implications[J]. *Curr Heart Fail Rep*, 2016, 13(6): 281-294.

(收稿日期: 2018-06-18 修回日期: 2018-09-01)