

ICR小鼠吸烟诱导肺部炎症模型的建立及其特征

王秦川, 陈宇, 汤慧芳, 汤锦菲, 陆建菊, 陈季强

(浙江大学医学院, 浙江杭州 310058)

[摘要] 目的: 观察ICR小鼠对急性吸烟暴露的敏感性, 建立ICR小鼠急性吸烟引起肺损伤的模型。方法: 小鼠每天被动吸烟3次, 一次暴露两支, 持续20 min, 分别急性吸烟0 d、1 d、3 d、7 d, 观察小鼠肺组织的支气管肺泡灌洗液(BALF)细胞计数及分类计数、肺组织干湿重比, 肺组织病理切片炎症情况, 肺组织TNF- α 含量、MMP-12含量, MPO活性, 评价该品系小鼠对吸烟的耐受性与敏感性和适宜的暴露时间。结果: 随着吸烟天数的增加, 肺干湿重比、白细胞计数、MPO、MMP-12均呈时间依赖性上升($P < 0.01$), 以3 d为最高。TNF- α 吸烟1 d即明显升高, 吸烟7 d时仍持续高水平。结论: ICR小鼠急性吸烟3 d为急性炎症的高峰, 之后迁延进入慢性炎症, 本品系对于吸烟暴露的耐受性与敏感性均较佳, 为急性吸烟建模的良好模型。

[关键词] 肺炎/病理学; 吸烟/副作用; 疾病模型, 动物; 急性肺部炎症; 中性粒细胞; 香烟烟雾; MMP-12; TNF- α ; MPO

[中图分类号] R 563.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2008)04-0328-05

Establishment and characteristics of acute lung injury model induced by cigarette smoke in ICR mice

WANG Qin-chuan, CHEN Yu, TANG Hui-fang, TANG Jin-fei, LU Jian-ju, CHEN Ji-qiang
(College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a mouse model of acute lung injury induced by cigarette smoke (CS) and to investigate inflammatory changes with the model. **Methods:** ICR mice exposed to CS for 20-min, 3/d. Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and lung tissue were harvested at d 0, d 1, d 3 and d 7 after CS exposure. Neutrophil count in BALF, TNF- α and MMP-12 levels, the activity of MPO in lung tissue were determined. **Results:** Neutrophil count in BALF, MMP-12 and MPO levels in lung tissue were increased after CS exposure in a time-dependent manner with a peak at d3. TNF- α level sharply increased at d1, and remained high level until d7. **Conclusion:** ICR mice are tolerant and sensitive to CS exposure, which may be used as an appropriate animal model for acute lung injury induced by cigarette smoke.

收稿日期: 2008-04-07 修回日期: 2008-05-29

基金项目: 浙江省自然科学基金重点资助项目(Z204198); 浙江省教育厅项目(20061416)

作者简介: 王秦川(1985-), 男, 浙江大学医学院临床三系03级七年制学生。

通讯作者: 陈季强(1946-), 教授, 博导, 研究方向: 呼吸药理学, 抗炎免疫药理学及临床药理学; E-mail: chenjq@zju.edu.cn

[Key words] Pneumonia/pathol; Smoking/adv eff; Disease models, animal; Acute lung inflammation; Neutrophils; Cigarette smoke; MMP-12; TNF- α ; MPO

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2008, 37(4): 328-332.]

吸烟对人体有害已被普遍公认,香烟烟雾中含有CO、尼古丁、酚类、醛类等多种有害物质,其中有的具有强烈的刺激性与伤害性,烟雾的刺激可使肺局部巨噬细胞凋亡^[1]、中性粒细胞聚集和激活,并释放大量的炎症介质IL-1 β 等^[2],导致肺毛细血管壁通透性升高,出血及间质性肺水肿。

不同品系的小鼠对于吸烟暴露的敏感性与特异性不同,如DBA/2和C57BL/6J系列的小鼠表现为血清中 α_1 -抗胰蛋白酶减少,引起的自发性肺气肿和形态学改变,而ICR小鼠不表现出该症状^[3]。但ICR小鼠是国际通用的封闭群小鼠,繁殖力强,生长速度快,实验重复性较好,价格低廉,如能用于研究急性吸烟的部分病理过程,也是吸烟研究或COPD发病机制研究的重要动物模型。本研究从肺部病理表现和细胞因子两方面,研究该品系小鼠对于吸烟暴露的反应,为吸烟相关疾病的动物模型研究提供理论依据。

1 材料

1.1 实验动物 ICR小鼠,雄性,体重20g左右,由浙江省实验动物中心提供。合格证号: SXK(浙)2003-0001。

1.2 药品 Marlboro香烟(焦油含量12mg,烟碱含量0.9mg,USA),TNF- α ELISA试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司),MMP-12 ELISA试剂盒(美国RB公司),MPO试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.3 仪器 Thermo全波长酶标仪,光学显微镜,细胞计数板,40cm $\times$ 40cm $\times$ 20cm(32L)密闭玻璃吸烟箱,真空负压抽吸泵,Eppendorf高速低温离心机,高速匀浆机,电热恒温鼓风干燥箱。

2 方法

2.1 ICR小鼠急性吸烟模型制备

2.1.1 将40只小鼠随机分为4组,每组10只,

分别为a、b、c、d组。a组不进行急性吸烟,b组进行1d急性吸烟,c组进行3d急性吸烟,d组进行7d急性吸烟。将小鼠置于密闭玻璃中吸烟箱中,将2支香烟插在多道接头上点燃后,连在玻璃箱顶盖的通气孔(直径1.0cm)上,吸烟箱外连一负压泵抽吸,将烟雾注入箱内达到5%左右浓度,使小鼠吸烟,持续20min后,通气10min后,再次吸入20min,如此重复3次,一日6支香烟。其余时间正常喂养。吸烟箱周围装有单向阀,抽吸结束后打开,箱内负压时会自动开启,保持箱内氧气供给。

2.1.2 吸烟后24h,处死小鼠,结扎一侧肺组织,气管插管,用D-Hank's液进行小鼠肺灌洗,取得小鼠肺泡灌洗液,采用白细胞计数液进行细胞计数,离心取细胞沉淀涂片,瑞氏染色后进行细胞分类计数。

2.1.3 留取小鼠肺组织,部分做酶学测定,部分测定TNF- α ,髓过氧化物酶(MPO),MMP-12;部分做肺组织病理切片,部分测定干湿肺重比(干湿肺重=肺干重/肺湿重)。

2.2 指标测定 采用白细胞计数液进行支气管肺泡灌洗液(BALF)的细胞计数;观察肺组织病理切片、炎症情况评分:常规HE染色;ELISA试剂盒测定肺组织MMP-12含量、肺组织TNF- α 含量;MPO试剂盒测定肺组织中MPO含量。

2.3 统计学处理 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计方法采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 有统计学显著性。所有数据用SPSS 10.0统计软件处理。

3 结果

3.1 小鼠急性吸烟模型的肺干湿重比 急性吸烟1d,3d,7d组小鼠肺组织干湿重明显增高,较正常对照组有显著性差异($P < 0.05$),以3d干湿重增加最为明显($P < 0.001$,图1A)。可见小鼠急性吸烟后,吸入的烟雾颗粒对肺部产生刺激作用,导致肺部发生炎症、渗出水肿而

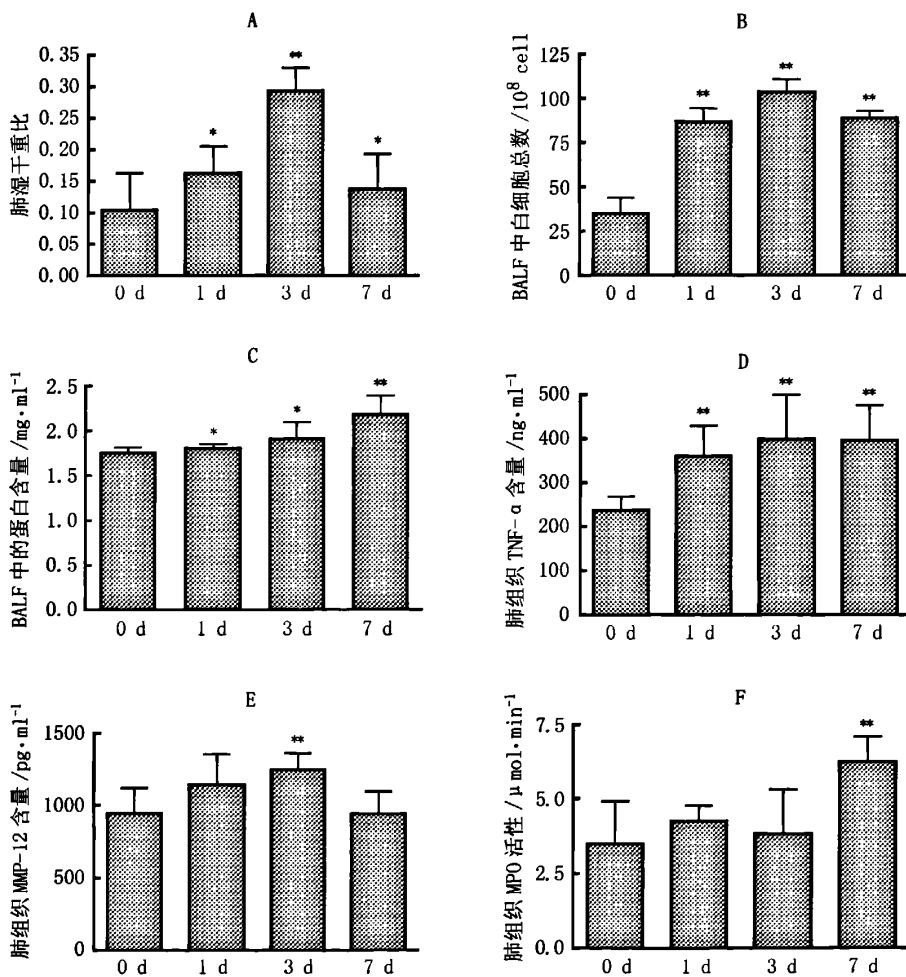
质量增加。

3.2 小鼠急性吸烟模型 BALF 中白细胞计数及 BALF 中的蛋白含量 急性吸烟小鼠 BALF 中白细胞计数结果显示,小鼠吸烟 1 d 后 BALF 中炎症细胞渗出即明显增加($P<0.01$),以 3 d 最为显著,7 d 时有回落(图 1B)。BALF 中的蛋白渗出随吸烟时间的延长,呈增加趋势,且以 7

d 时最为显著($P<0.01$,图 1C)。

3.3 急性吸烟小鼠模型的肺组织 TNF α 活性变化 肺组织匀浆 TNF- α 水平在吸烟 1 d 即明显升高,吸烟 7d 时仍持续高水平。与正常组比较差异显著($P<0.01$,图 1D)。

3.4 急性吸烟小鼠模型的肺组织 MMP-12 活性变化 MMP-12 在吸烟 3 d 后达到峰值($P<$



0 d 组即非吸烟暴露组;1 d 组吸烟暴露 1 d;3 d 吸烟暴露 3 d;7 d 吸烟暴露 7 d。与 0 d 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

图 1 急性吸烟对 ICR 小鼠肺湿干重比、BALF 中白细胞总数、蛋白含量,肺组织中 MMP-12、TNF- α 、MPO 活性的影响

Fig. 1 Effects of *in vivo* smoke exposure on dry/wet lung weight ratio, leukocyte number and protein content in BALF, MMP-12, TNF- α , MPO production in whole lung from ICR mice

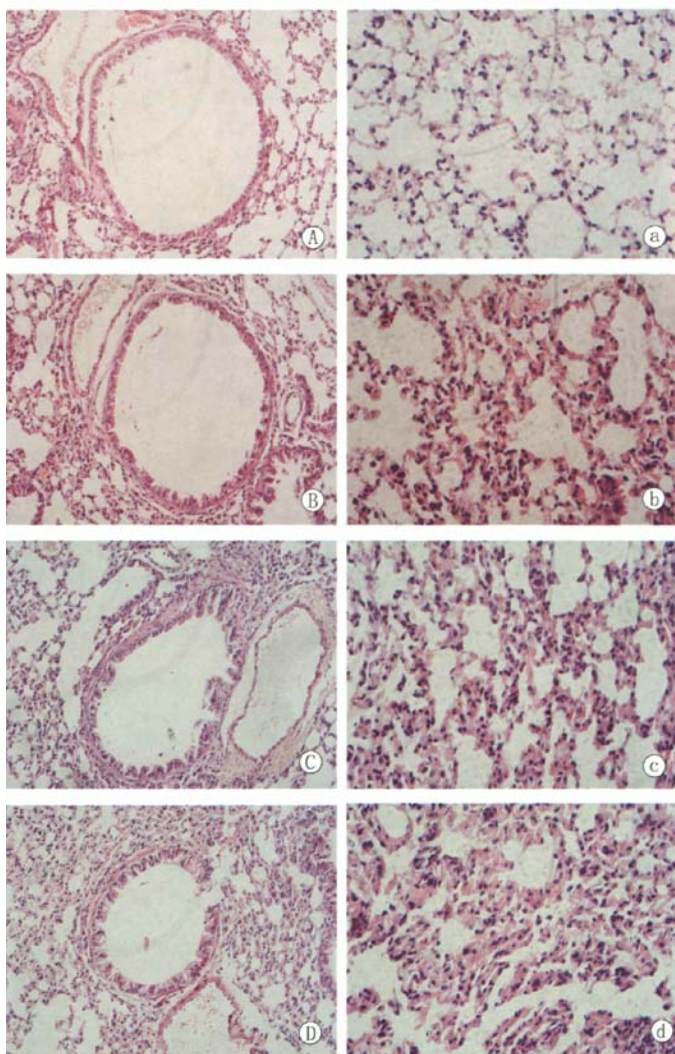
0.01),随后下降至正常水平(图1E)。提示急性吸烟组小鼠MMP-12出现在急性炎症反应早期。

3.5 急性吸烟小鼠模型的肺组织MPO活性变化 MPO在吸烟1 d即有升高,但1 d,3 d与0 d组比较,无显著性差异,7 d组升高显著($P<0.011$,图1F)。提示MPO也是一个比较灵敏的肺部炎症指标。

3.6 急性吸烟小鼠模型的肺组织病理切片 光镜下可见正常对照组肺泡大小均匀,结构完整,肺泡隔血管无充血、淤血,肺泡腔及间质隙内未见出血、水肿及炎细胞浸润。吸烟1 d组:肺泡隔明显增宽,微血管扩张、充血,组织间隙中有渗出的红细胞,可见以中性粒细胞为主的中等量炎症细胞浸润,各级支气管周围可见中性粒细胞浸润,管腔内有分泌物;吸烟3 d组:肺泡隔明显增宽,微血管扩张、充血,组织间隙中有渗出的红细胞,局灶性肺不张,间质隙充满红染的水肿液及中性粒细胞为主的炎细胞浸润,肺泡腔未见明显的水肿液,各级支气管周围可见中性粒细胞浸润,管腔内有分泌物。吸烟7 d组:肺部炎症有向慢性过渡表现,肺泡隔明显增宽,中性粒细胞为主的中等量炎症细胞浸润,肺泡腔未见明显的水肿液,各级支气管周围可见淋巴细胞浸润,管腔内有分泌物(图2)。

4 讨论

ICR 小鼠急性吸烟模型对于吸烟暴露的反应主要表现在肺部的急性炎症反应。肺部病理切片表明,肺泡周围有炎症细胞渗出,而肺间质



A-D:气道(HE染色, $\times 200$); a-d:肺间质(HE染色, $\times 400$);
A/a:0 d组;B/b:1 d组;C/c:3 d组;D/d:7 d组)

图2 急性吸烟后各组气道和肺间质的病理变化

Fig. 2 The pathological changes in airways and lung parenchyma after cigarette smoke

也存在大量炎症细胞,并以中性粒细胞及淋巴细胞为主。肺部的急性炎症反应主要表现在干湿肺重比、白细胞计数与各种炎症因子的大量增加。干湿肺重比随着吸烟天数的增加而显著增加,在3 d时达到峰值($P<0.001$),随后有所下降,可见3 d是ICR 小鼠急性吸烟肺部渗出水

肿的高峰期,之后渐渐转入慢性炎症,与 COPD 发病机制与过程的早期有所类似^[4];白细胞数目较正常组增加明显($P < 0.01$),3 d 达峰值,随后有所下降,趋势与干湿肺重比一致,这一点与 C57BL/6 型小鼠相一致^[5];炎症因子我们着重测量了 MPO、TNF- α 、MMP-12 的活性变化,除 TNF- α 呈持续增长的趋势之外,均在 3 d 达到峰值,与之前的指标相一致。

MPO 为中性粒细胞髓过氧化物酶,为中性粒细胞所特有酶类,反映中性粒细胞浸润及活性。由实验结果可见,MPO 活性随吸烟时间增加而增加,在 3d 达到峰值,与病理所见相一致。TNF- α 是一类由激活的巨噬细胞,淋巴细胞等细胞所分泌的细胞因子,具有广泛的生物学活性。TNF- α 具有双重的生物学活性,一方面它是机体免疫防护的重要介质,另一方面可参与机体的免疫生理损伤,在免疫性疾病的发病机理中具有十分重要的临床价值。在正常情况下,TNF- α 具有抗肿瘤,抗感染等作用,对机体有利,但如果释放过多或其它细胞因子的关系失调,又会引起机体的发热、休克、恶液质等。在肺部的炎症反应中,它一方面可以促进纤维组织的形成,另一方面可以阻止纤维组织的降解^[6],加强 MMP-12、MMP-9 的致炎作用^[7]。在本模型中,吸烟组与正常组 TNF- α 水平有着显著的差异($P < 0.01$),呈持续增长的趋势。

MMP-12 是基质金属蛋白酶的一种,由巨噬细胞产生,其作用底物为弹性纤维,以水解酶原形式分泌至胞外,在外源性酶(例如:纤溶酶、激肽释放酶、组织蛋白酶等)作用下,切断活性前区片段,使酶激活,在气道重塑中有重要的作用。它与 MMP-1、MMP-9 一起在 COPD 发展中有重要的作用^[4]。MMP-12 与肺部中性粒细胞的趋化,细胞因子的释放等早期炎症反映有着密切的关系,并且已有实验证明糖皮质激素、PDE4 抑制剂咯利普兰(rolipram)与 MMP 抑制剂 marimastat 可以较好的抑制它的致炎作用^[8]。在急性肺损伤中,MMP-12 为早期炎症反应的重要指标^[9]。本实验中,它在 3 d 吸烟后达到峰值($P < 0.01$),符合急性模型的要求。

综上所述,ICR 小鼠对于急性吸烟的敏感性与耐受性均较好,主要表现为肺部的急性炎

症与 MMP-12、TNF- α 及 MPO 活性的增加,为药物实验的良好模型。

References:

- [1] AOSHIBA K, TAMAOKI J, NAGAI A. Acute cigarette smoke exposure induces apoptosis of alveolar macrophages [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, 281: L 1392-L 1401.
- [2] Paulo Castroa, Alexandre Legora-Machadoa. Inhibition of interleukin-1h reduces mouse lung inflammation induced by exposure to cigarette smoke [J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 498: 279-286.
- [3] CAVARRA E, BARTALESI B, LUCATELLI M, et al. Effects of cigarette smoke in mice with different levels of alpha (1)-proteinase inhibitor and sensitivity to oxidants [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 164(5): 886-890.
- [4] ORTIZ L A, LASKY J, GOZAL E, et al. Tumor necrosis factor receptor deficiency alters matrix metalloproteinase 13/tissue inhibitor of metalloproteinase 1 expression in murine silicosis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163(1): 244-252.
- [5] THATCHER T H, McHUGH N A, EGAN R W, et al. Role of CXCR2 in cigarette smoke-induced lung inflammation [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005, 289(2): L 322-328.
- [6] STEVENSON C S, COOTE K, WEBSTER R, et al. Characterization of cigarette smoke-induced inflammatory and mucus hypersecretory changes in rat lung and the role of CXCR2 ligands in mediating this effect [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005, 288(3): L 514-522.
- [7] MARIANI T J, SANDEFUR S, ROBY J D, et al. Collagenase-3 induction in rat lung fibroblasts requires the combined effects of tumor necrosis factor- α and 12-lipoxygenase metabolites; a model of macrophage-induced, fibroblast-driven extracellular matrix remodeling during inflammatory lung injury [J]. *Mol Biol Cell*, 1998, 9: 1411-1424.
- [8] JOOS L, HEJQ, SHEPHERDSON M B, et al. The role of matrix metalloproteinase polymorphisms in the rate of decHne in lung function [J]. *Hum Mol Genet*, 2002, 11(5): 569-576.
- [9] NENAN S, LAGENTE V, PLANQUOIS J M, et al. Metalloelastase (MMP-12) induced inflammatory response in mice airways: effects of dexamethasone, rolipram and marimastat [J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 559(1): 75-81.