

博莱霉素致单侧肺纤维化大鼠模型 的建立

完成人
常石初

指导小组成员

臧奕 研究员

目 录

摘要	I
Abstract	II
一、前 言	1
二、材料与方法	3
2.1 材料.....	3
2.1.1 实验动物	3
2.1.2 实验器材	3
2.2 试剂.....	3
2.2.1 动物组织 RNA 抽提试剂	3
2.2.2 反转录与实时荧光定量 PCR 试剂	3
2.2.3 羟脯氨酸含量测定试剂.....	4
2.2.4 大鼠的造模手术和牺牲所用试剂.....	4
2.2.5 给药实验所用药品.....	5
2.3 实验方法.....	6
2.3.1 技术路线图.....	6
2.3.2 博莱霉素致单侧肺损伤纤维化大鼠模型.....	6
2.3.3 RNA 抽提与实时定量荧光 PCR	7
2.3.4 肺组织切片的制备及评分.....	7

2.3.5	羟脯氨酸含量测定	8
2.3.6	血生化指标的测量	9
2.3.7	统计学分析	9
三、	研究结果	10
3.1	大鼠总死亡率较低，给药时期体重稳定上升	10
3.2	IPF 大鼠左肺损伤并严重萎缩	11
3.3	模型组大鼠左肺病理切片表明纤维化程度严重，给药能缓解纤维化程度	12
3.4	Vehicle 组羟脯氨酸含量较 WT 显著升高	13
3.5	纤维化和炎症相关基因的表达在 Vehicle 组显著升高，并随给药剂量升高而降低	14
3.6	血液生化指标表征肺纤维化严重程度的初探索	15
四、	讨论	16
4.1	模型的建立与稳定性验证	16
4.2	血清生物标志物的确定与分组方法的改善	16
4.3	总结与展望	17
	参考文献	18

摘 要

特发性肺纤维化(IPF)是一种慢性、逐步发展且通常是致命的肺部疾病，诊断后的平均生存期仅有 2-3 年，其病理机制尚不清晰，目前也缺乏显著有效的治疗药物。现阶段，建立一个科学、可重复的肺纤维化动物模型，能够作为研究其发病机制和新药开发的坚实基础。本课题以博莱霉素致单侧肺纤维化的 SD 大鼠为研究对象，采用肺脏系数测定、组织病理学评价、羟脯氨酸含量测定和基因表达检测的方法验证大鼠模型的可靠性，并通过血液生物标志物的检测探索非侵入式检测纤维化程度的方法，希望为肺纤维化的药物研发提供基础和保障。

关键词： 博莱霉素，肺纤维化，大鼠

Abstract

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a sort of chronic, processive and usually deadly lung disease. The average survival period of IPF patients after diagnosis is only about 2-3 years. Its pathogenesis is unclear and currently effective drug treatment is lacking. At the present stage, the establishment of a scientific and replicable animal model of pulmonary fibrosis is the basis for exploring its pathogenesis and developing effective drugs. In this study, the SD rats with unilateral pulmonary fibrosis caused by bleomycin were selected as the research object, and the reliability of the rat model was verified by means of lung coefficient measurement, histopathological evaluation, determination of hydroxyproline content and gene expression detection. We also explored non-invasive methods to detect the degree of fibrosis through blood biomarkers, thus expecting to provide the basis and guarantee for the drug discovery of pulmonary fibrosis.

Key words: bleomycin, pulmonary fibrosis, rat

一、前言

间质性肺疾病(interstitial lung disease, ILD), 是一系列非均质性、非肿瘤性的肺部疾病^[1]。ILD 的病理改变包括不同程度的间质纤维增生, 各种急性和慢性的炎症细胞浸润形成复杂多样的、相互交叠的组织结构^[2]。

肺纤维化是各种间质性肺病的最后阶段, 其主要特征在于肺内各级支气管, 以及其终端的肺泡的结构破坏和细胞外基质在肺内各处的累积。而特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)则是一类致病机制不完全明确, 病情更加严重的肺纤维化。该疾病在高龄(70 岁以上)人群中预后严重不良, 且病人的诊断后中位生存期仅为 2.5 ~ 3.5 年^[3]。

截止至 2021 年, 获 FDA 批准上市的肺纤维化治疗药物仅有吡非尼酮和尼达尼布两种。其中吡非尼酮靶点不明, 目前认为是转化生长因子- β (TGF- β)的抑制剂, 能够影响成纤维细胞增殖和胶原合成; 尼达尼布则是一种小分子三重酪氨酸激酶抑制剂, 作用于 pDGFR、vEGFR 和 bFGFR 三种生长因子受体^[4]。然而, 这两种上市药物虽能部分改善肺功能指标如用力肺活率和一氧化碳弥散量, 却并不能改善死亡率, 目前 IPF 尚无确定显著有效的治疗药物和治疗方法, 远不足以满足临床需要^[5]。因此, 建立一个科学、可重复的肺纤维化动物模型作为研究 IPF 发病机制和开展新药研发的坚实基础, 具有非常重要的意义。

尽管在部分家养动物(如猫、狗等)中, 存在自发性肺纤维化的发生, 但在发病机制研究和临床前治疗评估中, 啮齿类动物模型仍是最不可或缺的模式^[6]。根据诱导方式的不同, 肺纤维化啮齿类动物模型又可分为博来霉素诱导^[7]、二氧化硅诱导^[8]、辐射诱导^[9]和石棉肺^[10]等类型。其中博来霉素诱导的肺纤维化模型是目前应用最广、临床前试验中最具特征的模式^[11], 该模型的优势包括: 模型建立周期短、早期分子特征与人 IPF 急性加速期最相似, 而不足之处则在于: 年轻的实验动物接受造模手术后容易发生自愈^[6]。C57BL/6J 小鼠由于其易感性, 是博来霉素诱导肺纤维化造模中最主要的实验动物^[12], 而气管注射博来霉素造成双侧肺损伤则是最常用的造模方法^[13]。然而, 在实际操作中, 气管注射博来霉素诱导的双侧肺损伤肺纤维化小鼠模型存在动物死亡率高、组内纤维化分布及程度差异大的问题, 而本课题所研究的博来霉素致单侧肺损伤肺纤维化大鼠模型, 由

于纤维化区域仅分布于大鼠左肺最大叶，能够很好地避免死亡率高和纤维化分布不均的问题。总而言之，我们希望通过建立和优化博莱霉素致单侧肺损伤肺纤维化大鼠模型，避免双侧肺损伤纤维化模型中的缺陷，从而更有效地辅助肺纤维化发病机理的探索和治疗药物的研发。

二、材料与方法

2.1 材料

2.1.1 实验动物

66 只雄性 SD(Sprague Dawley)大鼠, 6-8 周龄, 体重 180-220 g (实验前体重达到 350 g 左右), 北京维通利华。

2.1.2 实验器材

手术器械 (眼科剪、组织剪、弯尖头维纳斯剪、直头眼科镊、弯头眼科镊、PE 管、带针缝合线); 手术垫布; 生理盐水; 5 mL 注射器; 1 mL 注射器; 酒精棉球; 碘伏棉球; 剃毛器; 小动物呼吸机 VentElite (带保温垫); 动物体重天平 (精度: 0.01 g); 电子天平 (精度: 0.001 g)。

2.2 试剂

2.2.1 动物组织 RNA 抽提试剂

TRIzol 试剂 (宝日医生物); 氯仿; 异丙醇; 70%乙醇 (由无水乙醇+RNase-Free H₂O 配制); RNase-Free H₂O。

2.2.2 反转录与实时荧光定量 PCR 试剂

Prime script RT Master Mix (宝日医生物)。

表 1 反转录反应体系

组成	反转录体系 (20 μ L)
RT Master Mix	4 μ L
RNA	1 μ g
加 RNase-Free 水定容至	20 μ L

SYBR GREEN (诺唯赞生物); qPCR 引物 (生工生物)。

表 2 Real-time fluorescent quantitative PCR(qPCR)体系

组成	实时荧光定量 PCR 体系 (11 μ L)
SYBR GREEN	5.5 μ L
Forward Primer(10 μ M)	0.3 μ L
Reverse Primer(10 μ M)	0.3 μ L
cDNA	5 μ L

表 3 Real-time fluorescent quantitative PCR(qPCR)引物序列

引物名称	序列 (5'-3')
<i>GAPDH-F</i>	AAGGTGGTGAAGCAGGCGGC
<i>GAPDH-R</i>	GAGCAATGCCAGCCCCAGCA
<i>Col1a1-F</i>	GACATGTTTCAGCTTTGTGGACCC
<i>Col1a1-R</i>	AGGGACCCTTAGGCCATTGTGTA
<i>α-SMA-F</i>	TCCAGAGTCCAGCACAAATACCAG
<i>α-SMA-R</i>	AATGACCCAGATTATGTTTGAGACC
<i>IL-6-F</i>	TGTTGACAGCCACTGCCTTCCC
<i>IL-6-R</i>	ACTGGTCTGTTGTGGGTGGTATCCT

2.2.3 羟脯氨酸 (hydroxyproline, hyp) 含量测定试剂

表 4 储备液与工作液配方

氯铵 T 缓冲液	柠檬酸三钠	0.2738 g
	柠檬酸	0.0402 g
	无水乙酸钠	0.4162 g
	异丙醇	2.88 mL
	ddH ₂ O	定容至 14.6 mL
ER 储备液	对二氨基苯甲醛	9.8 g
	70%高氯酸	10.79 mL
氯铵 T 储备液	氯铵 T	0.1869 g
	ddH ₂ O	定容至 0.9346 mL
T 工作液	氯铵 T 缓冲液	13.9428 mL
	氯铵 T 储备液	0.4016 mL
ER 工作液	ER 储备液	19.6262 mL
	异丙醇	52.3364 mL
50%异丙醇	异丙醇	45 mL
	ddH ₂ O	45 mL

表 5 标准曲线的溶液配方

组成	体积(μL)					
Hyp(0.01 μg/μL)	0	40	80	160	480	640
50%异丙醇	1200	1160	1120	1040	720	560
氯铵 T 工作液	200	200	200	200	200	200
ER 工作液	1000	1000	1000	1000	1000	1000

2.2.4 大鼠的造模手术和牺牲所用试剂

造模：舒泰-50（麻醉用），博莱霉素溶液（造模组气管滴注用），生理盐水（WT 组气管滴注用）。

表 6 舒泰-50 配方

组成	舒泰-50（1 mL）
舒泰 50（冻干粉末）	5 mg
加生理盐水定容至	1 mL

表 7 博莱霉素溶液（4 mg/mL）配方

组成	博莱霉素溶液（10 mL）
博莱霉素（粉末）	40 mg
加生理盐水定容至	10 mL

牺牲：心尖灌流采用 PBS 缓冲液（pH = 7.4）；肺组织固定液采用 4% Paraformaldehyde(PFA)溶液（pH = 7.4）。

表 8 PBS 灌流液配方

组成	PBS 缓冲液（1 L）
氯化钠	8.0 g
磷酸氢二钠	1.44 g
磷酸二氢钾	0.24 g
氯化钾	0.2 g
加 ddH ₂ O 定容至	1 L
调节溶液 pH 至	7.4

表 9 PFA 溶液配方

组成	PFA 溶液（1 L）
多聚甲醛（粉末）	40 g
加 PBS 缓冲液定容至	1 L
调节溶液 pH 至	7.4

2.2.5 给药实验所用药品

0.5%羧甲基纤维素钠溶液（CMC-Na solutoin）；尼达尼布混悬液（浓度：3，6，9 mg/mL）

表 10 羧甲基纤维素钠溶液（CMC-Na solution）

组成	CMC-Na 溶液 (1 L)
羧甲基纤维素钠 (粉末)	5 g
加 ddH ₂ O 缓冲液定容至	1 L
65℃烘箱放置过夜	

表 11 尼达尼布混悬液配方（以 3 mg/mL 为例）

组成	尼达尼布 (3 mg/mL, 100 mL)
尼达尼布 (粉末)	300 mg
加 CMC-Na 溶液定容至	100 mL

注：1. 尼达尼布粉末需先转移到研钵中，混合少量 CMC-Na 溶液，充分研磨至无颗粒状态，再转移至蓝盖试剂瓶中。

2.3 实验方法

2.3.1 技术路线图

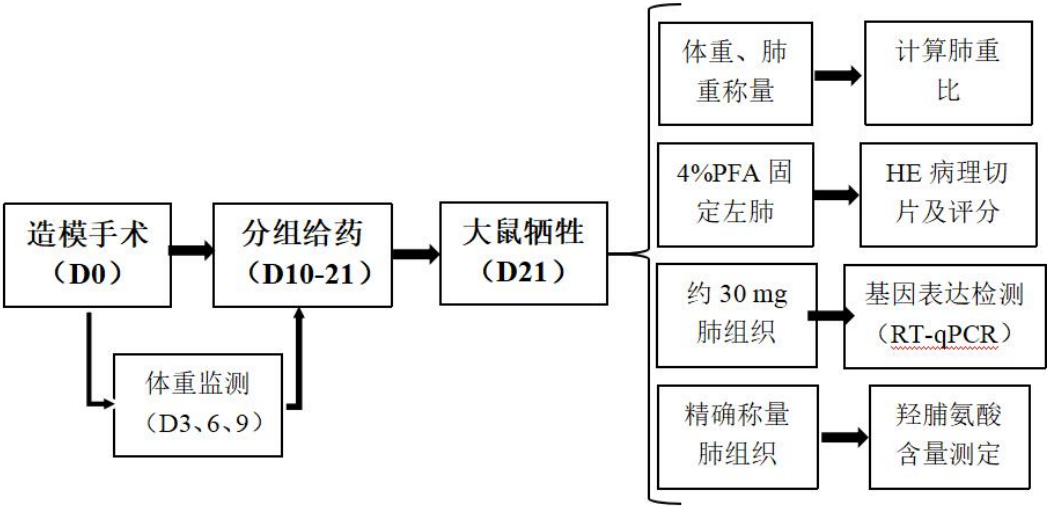


图 1. 技术路线图

本研究的流程包括：于第 0 天开展造模手术，手术后第 3，6，9 天称量大鼠体重，第 10 天分组给药，第 21 天牺牲大鼠。称取大鼠体重、肺重，计算肺重比；用 4% PFA 固定大鼠左肺大部，做 HE 病理切片及评分；称取约 30 mg 肺组织，抽提总 RNA 做基因表达检测；精确称量 30 mg 肺组织，用于测定组织中羟脯氨酸含量。

2.3.2 博莱霉素致单侧肺损伤纤维化大鼠模型

所有动物实验均按照上海药物研究所动物保护与使用委员会批准的程序进行。雄性 SD 大鼠在动物房（12 hr 光照+12 hr 黑暗，给予充足的食物和水）适应

一周后，开始造模。首先，肌肉注射舒泰-50（50 mg/kg）麻醉大鼠使其进入深度睡眠。随后，剃毛并对气管周围皮肤用酒精棉球消毒三次，割开大鼠气管，插管至左支气管，滴注博来霉素(2 mg/kg, 0.5ml/kg)或生理盐水(0.5ml/kg)，缝合伤口并用碘伏消毒，送回动物房。

造模(第 0 天)后第十天(第 10 天)，按照（初始重量-10 天后重量）/初始重量的值进行分组，剔除未发病与状态较差大鼠，分为 6 组：野生型组(WT)，模型对照组(Vehicle)，尼达尼布给药组(30, 60, 90 mg/kg)，WT 组 8 只，其余每组 10 只大鼠。给药从第 10 天持续至第 21 天，每天灌胃一次，共 12 天。第 21 天 PBS 心尖灌流后取大鼠肺组织，进行左右叶分别称重，另取部分左肺用 4%多聚甲醛/PBS（PFA）溶液固定，部分-80℃冰箱冻存用于 RT-qPCR 和 hyp 含量测定。实验流程图详见：图 3A。

2.3.3 RNA 抽提与实时定量荧光 PCR

使用 TRIzol 试剂从动物组织中提取总 RNA，取约 30 mg 组织样品于 2 mL ep 管中，加入 300 μ L 预冷的 TRIzol 和 3 颗 beads，低温组织研磨仪：70 Hz，运行 30 s，暂停 15 s，研磨 3 次，随后冰上静置 30 min 充分裂解组织。接着，向样品中加入 60 μ L 氯仿，vortex 至少 15 s 混匀，4℃，12000 rpm 离心 15min。取上清约 150 μ L 于灭菌的 ep 管中，加入 150 μ L 异丙醇，混匀后-20℃静置 6 h 以上，使得 RNA 充分沉淀。随后 4℃，12000 rpm 离心 15min，弃去上清，使用 70%乙醇清洗沉淀去除有机溶剂，离心弃去乙醇。最后，将洗涤干净的 RNA 沉淀置于通风橱中放置约 20 min，充分挥干乙醇，待沉淀被吹干后，加入 150 μ L RNase-Free 水溶解。

使用 Nanodrop 2000 测定全部 RNA 样品浓度（ng/ μ L）。总 RNA (1000 ng)用 prime script 反转录 Master Mix 在 20 μ L 反应体系中逆转录为 cDNA，然后加入 ddH₂O 至 200 μ L，用于后续的 Real-time 荧光 PCR 反应。反应以 *GAPDH* 作为内参基因，采用 SYBR GREEN 进行实时定量荧光 PCR。

2.3.4 肺组织切片的制备及评分

取部分大鼠左肺后，用 4% Paraformaldehyde(PFA)溶液溶液固定，随后嵌入石蜡中，制成 5 μ m 厚的切片，并用 H&E 或 Masson 染色，随后使用多光谱组织成像仪对组织切片进行拍摄，最后采用细化的 Ashcroft 标准对纤维化评分，或采用 HALO 软件进行胶原面积的量化。

表 12 Ashcroft 评分标准（经过细化）

纤维化分级	Ashcroft 评分标准
0	肺泡隔：无纤维化病灶； 肺结构：正常。
1	肺泡隔：孤立性单纯纤维化改变（肺泡隔增厚，但小于正常肺的三倍）； 肺结构：肺泡腔部分增大，少量渗出物，无纤维化物质存在。 肺泡隔：明确的纤维化改变（肺泡隔增厚，大于正常肺的三倍）
2	形成小结节； 肺结构：同 1。
3	肺泡隔：每个高倍镜视野下几乎所有肺泡壁可见非间断性纤维化，（肺泡隔增厚，大于正常肺的三倍）； 肺结构：同 1。
4	肺泡隔：仍然可见肺泡隔； 肺结构：肺泡腔出现孤立的纤维化结节（小于等于 10%的高倍视野）。
5	肺泡隔：仍然可见肺泡隔； 肺结构：肺泡腔出现融合性的纤维化结节（大于 10%和小于等于 50%的高倍视野），肺组织结构部分受损，但尚存结构。
6	肺泡隔：可见，但几乎不存在； 肺结构：大片不间断纤维化结节（大于 50%的高倍视野），肺组织结构几乎不存在。
7	肺泡隔：不存在； 肺结构：肺泡腔几乎充满纤维化物质，但是仍存在 5 个以内空泡样结构
8	肺泡隔：不存在； 肺结构：高倍镜下肺泡腔充满纤维化组织。

2.3.5 羟脯氨酸含量测定

精确称量约 30 mg 的大鼠肺组织并记录，加入 2 mL 浓盐酸水解组织，随后补加至 5 mL 浓盐酸于玻璃管中，关闭管盖，置于 120℃烘箱中反应 22-24 h，使得组织中的羟脯氨酸充分溶于浓盐酸中。取出反应后产物，过滤除去不溶性杂质，过滤后溶液储存于新的 5 mL 离心管中。取 100 uL 过滤液于离心管中，开盖置于 40℃烘箱中 3 天直至烘干。

取出烘干后的样品，按表 4 中的方法配制并依次向玻璃管中加入 1.2 mL 50% 异丙醇、200 uL 氯铵 T 工作液(混匀，室温放置 10 min) 和 1 mL ER 工作液，并配制羟脯氨酸标准液（表 5），在 50℃水浴中反应 90 min，其间注意避光。取出 200 uL 反应后溶液加入酶标板中，使用 BioTek ELx800 plate reader 测量样品 560

nm 吸光度, 标准品扣除 Blank 吸光度, 绘制标准曲线, 根据标准曲线 ($A = k \cdot \text{conc.} + b$) 拟合的斜率和截距及样品吸光度值, 可计算得样品中羟脯氨酸含量 (μg), 除以第一步中称得的肺组织重量, 得每毫克肺组织样品中 hyp 含量 ($\mu\text{g}/\text{mg lung}$)。

2.3.6 血生化指标的测量

牺牲大鼠当日 (Day 21), 深度麻醉大鼠后, 眼球后静脉丛取血于抗凝管 (管壁带有乙二胺四乙酸粉末) 中, 暂存于冰上。随后所有样品 12,000 g 离心 3 min, 取上清 (弃去血细胞) 得血浆。取 200 μL 血浆于干净的 1.5 mL ep 管中, 通过生化分析仪进行血生化指标的检测。

2.3.7 统计学分析

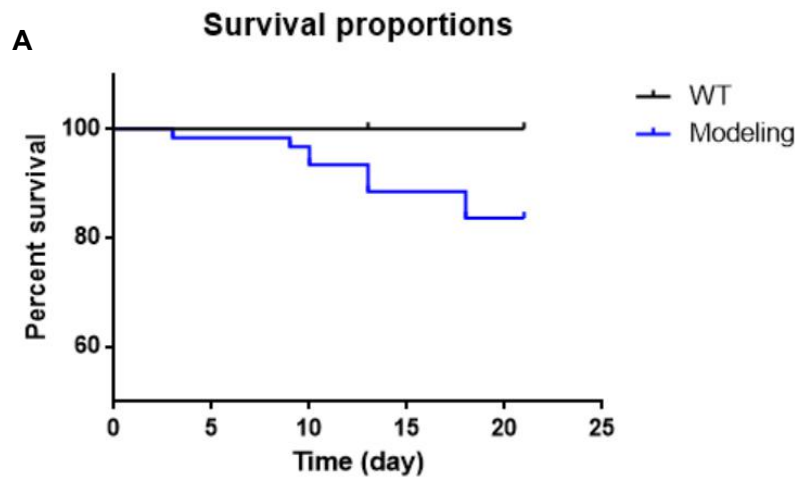
大鼠 WT 组 $n = 8$, Vehicle 组、OFEV-30 组、OFEV-60 组和 OFEV-90 组 n 均为 10。全部柱形图采用平均值 $\pm$ 标准误 (SEM) 表示。Vehicle 组和 WT 组之间显著性分析采用 Student's t test, 各尼达尼布给药组和 Vehicle 组之间采用 one-way ANOVA, 两两之间采用 Fisher's 精确检验确定显著性。

三、研究结果

3.1 大鼠总死亡率较低，给药时期体重稳定上升

通过统计大鼠的死亡情况以及持续监测大鼠体重，我们绘制了大鼠的生存曲线图以及体重变化趋势图。从 Day 0 到 Day 21，WT 组死亡率为 0%，造模组总死亡率为 16.4%，即总生存率达 83.6%（图 2A）。对于分组中未被剔除的大鼠，自第 10 天入组到第 21 天牺牲，大鼠死亡率为 0%，这有效地避免了双侧肺纤维化模型中，动物大量死亡所导致的，存活动物组内纤维化程度偏轻，组间纤维化程度不一致等问题。剔除组死亡的大鼠中，部分体重持续降低继而死亡，死后解剖发现存在双侧纤维化的现象，可能是由于手术中未能成功插管入左支气管，导致博莱霉素流入左右两肺所致。

除此之外，不论是 WT 组、Vehicle 组还是尼达尼布给药组，其体重均在造模后第 10-21 天持续上升（图 2B）。以上数据表明，在手术操作纯熟的情况下，博莱霉素诱导的单侧肺损伤肺纤维化模型具有实验动物死亡率低、肺纤维化对动物生存影响较小的优势。



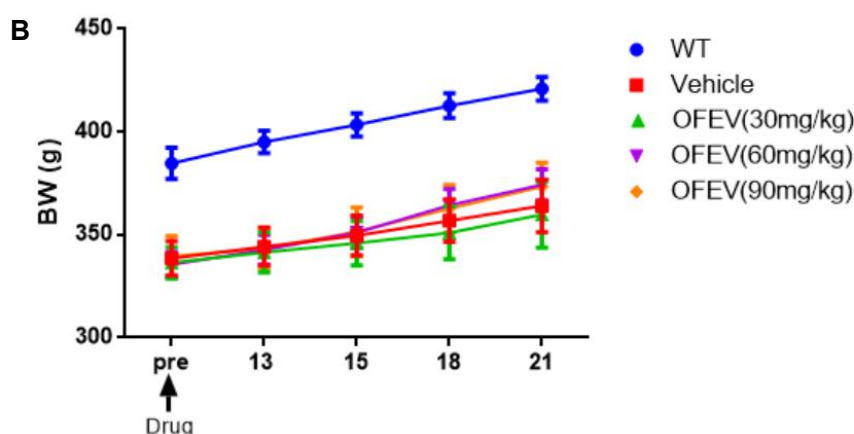


图 2. 大鼠死亡率及体重数据

(A) 野生型 (WT) 与 IPF 造模 (Modeling) 大鼠生存曲线。其中不论大鼠在后期分组中被剔除与否，其死亡率均纳入“Modeling”统计。(B) SD 大鼠给药后体重变化图。持续时间：Day 10 - Day 21。

3.2 IPF 大鼠左肺损伤并严重萎缩

按照如图 2A 的流程开展造模、分组、给药实验后，在第 21 天牺牲大鼠（舒泰-50 深度麻醉），PBS 心尖灌流后取出大鼠肺组织，称量其全肺重与左肺重。由图 1B 可见，与 WT 组相比，Vehicle 组大鼠左肺呈现出损伤和萎缩的外观。

同时由左肺系数（图 2C），可知气管滴注博莱霉素的造模组（包括 Vehicle, OFEV-30, OFEV-60 和 OFEV-90），不论给药与否，其左肺占全肺的比重相较于气管滴注生理盐水的 WT 组均呈现显著降低，这与造模组左肺的严重萎缩密切相关。

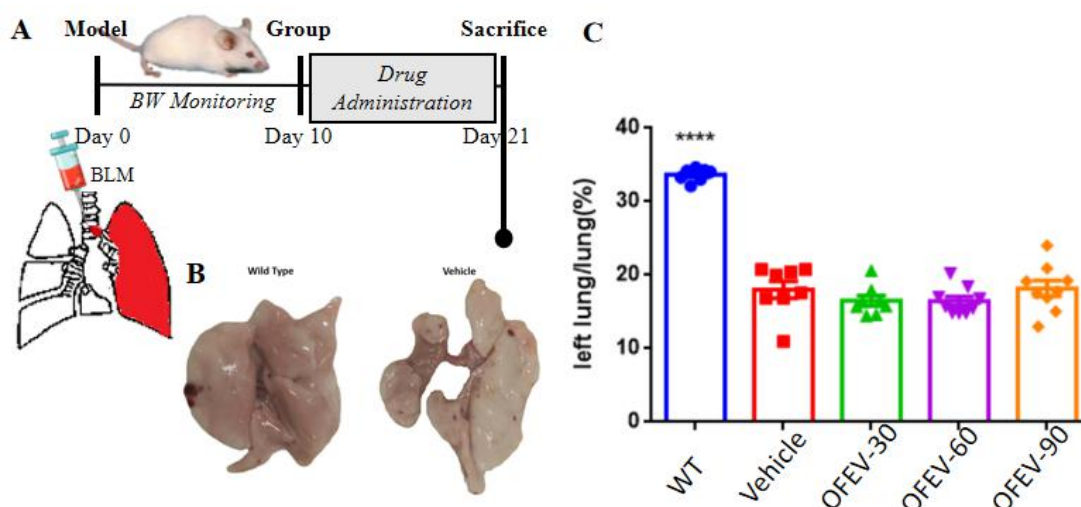


图 3. IPF 大鼠肺部外观与左肺系数

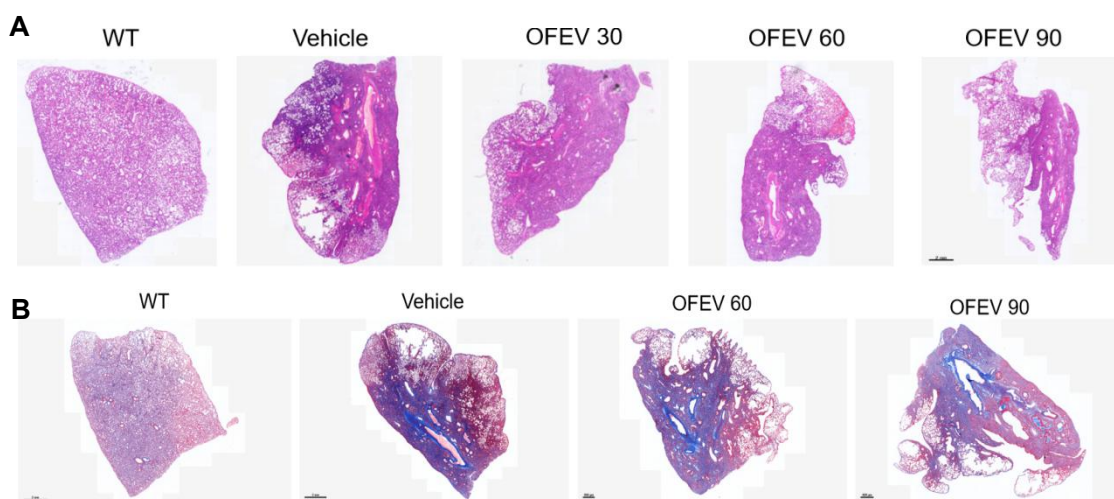
(A) 单侧肺纤维化大鼠模型建立与检测流程。在 Day 0 开展造模手术，在 Day 3, Day 6, Day

9 和 Day 10 分别监测大鼠的体重，在 Day 10 对大鼠按体重变化进行分组并口服给药，随后 Day 10 - Day 21 每天口服给药一次，并于 Day 21 牺牲全部大鼠。BLM：博莱霉素；BW：体重。(B) WT 和 Vehicle 组大鼠肺部外观示意。其中 Vehicle 组大鼠左肺与 WT 相比，出现了明显的损伤。(C) 左肺系数的测定。左肺系数 = 左肺重/全肺重*100%，OFEV-30：尼达尼布 30 mg/kg。造模组(Vehicle, OFEV)左肺系数相对于 WT 均出现显著降低。**** $P < 0.0001$ 。

3.3 模型组大鼠左肺病理切片表明纤维化程度严重，给药能缓解纤维化程度

我们采用 Ashcroft 评分标准^[14]对 H&E 染色的 IPF 大鼠左肺病理切片进行评分，其中 0 分代表无纤维化的正常肺组织，8 分代表视野内呈现 100% 纤维化(详见材料与amp;方法，表 12)。由图 4C 可知，模型对照组 (Vehicle) 的 HE 病理切片评分的均值在 6 分左右，说明绝大多数切片视野中的纤维化面积大于总面积的 50%，纤维化程度较为严重，而当尼达尼布的给药剂量达到 90 mg/kg 时，大鼠肺部纤维化的程度能够被部分缓解。

Masson 染色利用大分子量的苯胺蓝能够渗透进结构疏松的结缔组织的原理，将胶原纤维特异性染成蓝色。因此，通过定量分析 Masson 染色的切片中蓝色所占面积，能够判断胶原的含量，从而推知纤维化严重程度。由图 4D，Vehicle 组肺组织切片中胶原面积显著高于 WT 组，且当尼达尼布的给药剂量达到 90 mg/kg 时，胶原面积相较于 Vehicle 组显著减小。



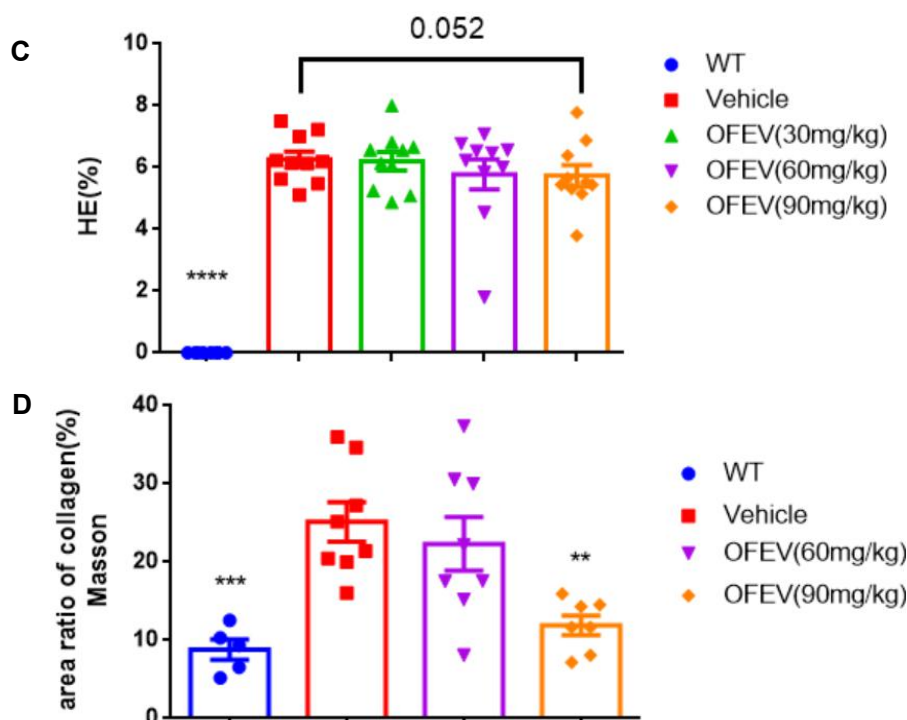


图 4. H&E 与 Masson 染色的肺组织切片及评分

取出大鼠左肺大部，用 PFA 固定、石蜡包埋，制成 5 μm 厚的切片，并用 H&E/Masson 染色，拍摄切片的显微图像，最后采用 Ashcroft 评分标准进行评分/使用 HALO 软件对胶原面积进行定量分析。(A, B) H&E、Masson 染色的肺组织切片。Scale Bar = 2 mm (C) 肺组织切片纤维化程度评分。(D) 胶原面积定量。**** $P < 0.0001$ ，*** $P < 0.001$ ，** $P < 0.01$ 。

3.4 Vehicle 组羟脯氨酸含量较 WT 显著升高

羟脯氨酸是胶原质组成的主要成份之一，当体内结缔组织大量增生时，hyp 含量也会随之升高。羟脯氨酸含量能够很好地表征大鼠肺组织中胶原的沉积^[15]，从而体现肺纤维化的严重程度。羟脯氨酸含量测定的具体步骤见：实验方法 2.3.5。

由图 5 可知，Vehicle 组和尼达尼布三个给药剂量组的羟脯氨酸含量均较 WT 有显著提高，而 Vehicle 组和三个给药组之间无显著差异，可能与给药时间较短（12 天），且阳性药尼达尼布本身无法逆转肺部既有的胶原沉积有关。除此之外，为了提高羟脯氨酸含量测定实验的准确性，日后还可以考虑采用更耐压、密封性更好的玻璃瓶用于盛放样品，从而减少高温裂解后液体被烘干所带来的误差。

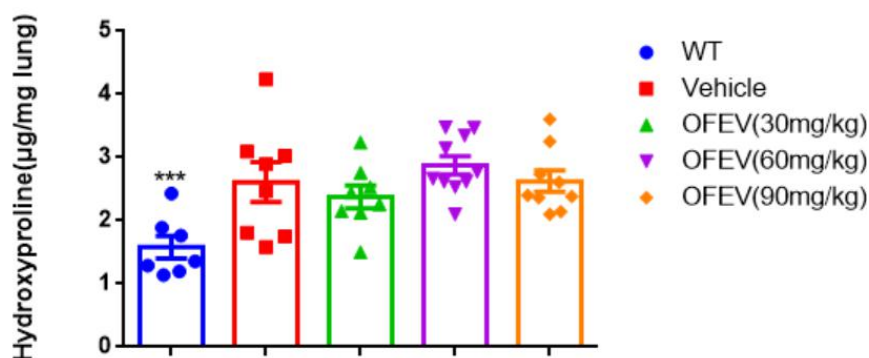


图 5. 羟脯氨酸含量测定结果

肺组织样品由浓盐酸水解产生游离的羟脯氨酸，经过氧化与呈色反应产生红色化合物，在 560 纳米处有特征吸收峰。用 hyp 标准品点样作标准曲线，并根据样品的吸光度 A560，在标准曲线上找到对应的 hyp 含量，再将 hyp 含量除以测定使用的肺组织重量，可得每毫克肺组织中的 hyp 含量 (μg/mg lung)。*** $P < 0.001$ 。

3.5 纤维化和炎症相关基因的表达在 Vehicle 组显著升高，并随给药剂量升高而降低

通过大鼠肺组织中总 RNA 的提取、逆转录和 qPCR 技术，我们检测了纤维化和炎症相关基因在大鼠左肺中的表达。主要选取的基因包括：1. *Col1α1*：纤维化发生基因，能够表征 I 型胶原蛋白的表达量；2. α -SMA： α -平滑肌肌动蛋白，可表征肺间质中成肌纤维细胞数量^[16]；3. IL-6：炎症因子，可表征肺部炎症的严重程度。由图 6 可知，以上三个基因在 IPF 大鼠肺部的表达水平呈现一致的趋势，即：三个基因的相对表达量在 Vehicle 组相对 WT 显著升高，并且随给药剂量的升高而逐渐降低。说明博莱霉素诱导的肺纤维化能够诱发纤维化和炎症相关基因的表达上调，且阳性药物尼达尼布的 12 日给药能够剂量依赖性地下调这些基因的表达。

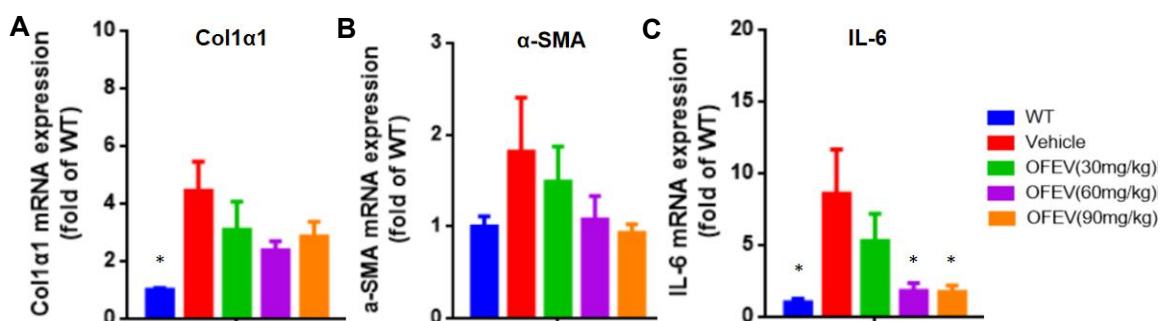


图 6. *Col1α1*, α -SMA 和 IL-6 的 mRNA 表达

从肺组织样品中提取总 RNA，反转录得 cDNA，以之为模板进行实时荧光定量 PCR。(A) *Collagen1 α1* (*Col1α1*)。(B) α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)。(C) 白介素 6 (IL-6)。以 *GAPDH*

为内参基因，相对表达量 = $2^{-(Ct_{\text{内参}} - Ct_{\text{基因}})}$ ，各组别基因表达水平都根据 WT 组相对表达量归一化。 $*P < 0.05$ 。

3.6 血液生化指标表征肺纤维化严重程度的初探索

牺牲大鼠当日，通过对大鼠进行眼球后静脉丛取血和血样离心，我们采集了每只 IPF 大鼠的血浆样本，随后使用生化仪检测了部分可能与肺纤维化相关的指标（图 7）。尽管对于验证肺纤维化动物模型建立的有效性而言，组织病理切片评分和羟脯氨酸含量测定被公认为是能够更加准确地判定肺纤维化严重程度的方法，但血液生化指标的检测也为我们提供了一种通过非侵入式方法判断大鼠肺纤维化进展情况/严重程度的思路，这种思路也将在给药前分组的环节，帮助我们提高分组的准确性和科学性。

现有研究表明，肺纤维化大鼠肺泡灌洗液（BALF）中的总蛋白（TP）和乳酸脱氢酶（LDH）含量与野生型大鼠相比，均会出现显著升高（TP：3 倍窗口，LDH：2.5 倍窗口）^[17]。因此，我们尝试检测这两个生化指标在 IPF 大鼠血液中是否同样存在上升的趋势。

如图 7A，对于 TP 而言，Vehicle 组与 WT 组相比没有显著的上升或下降，且各个给药组与 Vehicle 组之间也无明显的变化趋势。如图 7B，对于 LDH 而言，在 Vehicle 组可以观察到约 2 倍的窗口，且给药能够显著降低 LDH 的水平，只是这种降低缺乏剂量依赖性。总而言之，根据这次实验的结果，我们认为血浆 TP，不同于 BALF TP，并不能够很好地判定肺纤维化的严重程度；血浆 LDH 则能够部分反映肺纤维化的严重程度，若要提高精确度，可能还需要进一步的探索。

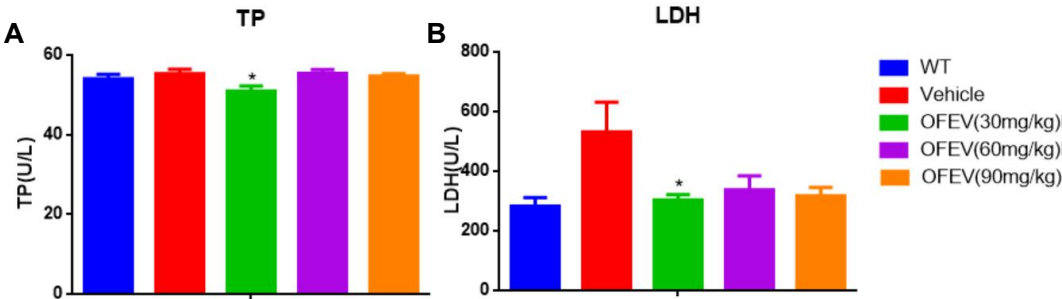


图 7 IPF 大鼠血液生化指标的检测。

(A) TP：总蛋白（Total Portein）；U/L：单位/升，表示每升液体含有酶活力的单位。（B）LDH：乳酸脱氢酶（Lactate Dehydrogenase）。 $*P < 0.05$ 。

四、讨 论

4.1 模型的建立与稳定性验证

与双侧纤维化大/小鼠模型相比，大鼠的单侧肺纤维化模型的优势在于：1. 实验动物死亡率较低；2. 纤维化分布的组内差异较小，与之相对照，双侧模型的纤维化区域往往不会均匀分布在左右肺的每一叶中。而单侧模型缺点在于：造模手术更加复杂，对手术操作（包括消毒、插管、缝合等）的要求更高。在本课题中，造模组中有 85%（34/40）的大鼠纤维化仅分布于左肺或以左侧纤维化为主，能够较好地实现纤维化分布的组内差异较小的优势。

与此同时我们发现，阳性药物尼达尼布给药 12 天后，大鼠左肺中纤维化和炎症相关基因的表达得到了显著的缓解，而左肺系数、病理切片和羟脯氨酸含量与 Vehicle 组相比没有明显的改善，其原因可能在于博莱霉素剂量偏大导致造模组左肺纤维化程度十分严重，12 天的治疗性给药虽能缓解纤维化相关基因表达，从而抑制纤维化的进展，却无法逆转原有的纤维化水平。这也暗示着疗效更强的治疗性 IPF 药物研发依然任重道远。

4.2 血清生物标志物的确定与分组方法的改善

为了对新药的疗效进行准确的评价，我们需要保证 Vehicle 组和每个给药组在给药实验开始前，肺纤维化平均严重程度一致且标准偏差基本一致。然而，目前现有的关于大鼠单侧肺纤维化造模的文献中采用的随机分组的方法^[18]，并不能够完全满足这一点。

因此，在后续的实验中，我们还可以尝试在分组（Day 10）前采用眼眶取血的方法，检测大鼠血液中与肺纤维化密切相关的生物标志物，从而在给药前通过非侵入方法确定大鼠肺纤维化的严重程度。在图 6 的实验中，我们发现血浆 TP 并不能够用于判定肺纤维化的严重程度，而血浆 LDH 则能够部分反映肺纤维化的严重程度，但准确度不高，若要提高精确度，还需进一步的探索。通过查阅总结现有的文献报道，我们认为金属基质蛋白酶 7（MMP7）；II 型肺泡细胞表面抗原-6（KL-6）和趋化因子 18（CCL-18）是三个对 IPF 进展预测更有前景的血清生物标志物^[19]。理由如下：

MMP-7: 经过大量队列研究证实，MMP-7 即将作为研究最充分的肺纤维化血清标志物之一应用于临床诊断。MMP-7 的作用机理与细胞外基质重塑和纤维

增生密切相关，与健康人群相比，IPF 患者血清中的 MMP-7 水平显著提高，同时也显著高于非 IPF 间质性肺炎患者^[20]。

KL-6: 在 IPF 患者的血清和肺泡灌洗液中，KL-6 水平均检测到显著升高^[21]。在博莱霉素诱导的肺损伤中，II 型肺泡上皮细胞大量增殖，以便分化为 I 型肺泡细胞从而开展损伤修复。之后，随着 IPF 的进展，先前增殖的 II 型肺泡细胞发生坏死，其表面抗原和内容物被释放到肺泡腔和血管中。因此，血液中 KL-6 的显著升高同样被认为可以很好地反映 IPF 的严重程度。

CCL-18: CCL-18 是一种趋化因子，趋化因子的分泌能够在肺泡和毛细血管损伤部位周围形成促纤维化的环境，起到招募成纤维细胞的作用。随后成纤维细胞将增殖分化为成肌纤维细胞，释放过量的细胞外基质，细胞外基质逐渐累积，最终将促成肺纤维化的表型。研究表明，IPF 患者血清 CCL-18 水平高于健康对照，且 CCL-18 水平的升高与预后不良相关，提示 CCL-18 也是 IPF 的一种潜在的血清生物标志物^[22]。

4.3 总结与展望

在本项研究中，我们通过气管插管至左侧支气管滴注博莱霉素，建立了博莱霉素诱导的单侧肺损伤大鼠肺纤维化模型，通过肺脏系数测定、病理学评价、羟脯氨酸含量测定和基因表达检测的方法验证了该模型的可靠性，最后，通过血生化指标的测量，对非侵入式方法检验大鼠肺纤维化严重程度开展了初探索。该模型的建立降低了实验动物的死亡率、减小了纤维化程度的组内差异，模型组纤维化程度严重但基因表达层面能够被尼达尼布给药显著缓解，总体而言是一个较为有效可靠的肺纤维化动物模型。通过非侵入式方法在分组前探明大鼠肺纤维化的严重程度，从而进行更加科学的分组，则是该单侧肺损伤大鼠肺纤维化模型未来的改进方向。

参考文献

- [1] 易祥华: 重视间质性肺疾病的病理学[J], 中华病理学杂志, 2006, 35(7): 3。
- [2] 孟凡青, 章宜芬, 王景美: 间质性肺病的病理诊断[J], 诊断病理学杂志, 2012, 19(01): 62-64。
- [3] King TE Jr, Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Lancet, 2011, 378(9807): 1949-61.
- [4] 耿艳艳,周植星,胡倩倩,于冰,徐为人,汤立达: 特发性肺纤维化治疗靶点及药物研究进展[J], 中国新药杂志, 2015, 24(01): 46-51。
- [5] 特发性肺纤维化急性加重诊断和治疗中国专家共识[J], 中华医学杂志, 2019(26): 2014-2023。
- [6] Tashiro J, Rubio GA, Limper AH, Williams K, Elliot SJ, Ninou I et al. Exploring Animal Models That Resemble Idiopathic Pulmonary Fibrosis[J]. Front Med (Lausanne), 2017, 28(4): 118.
- [7] Harrison JH Jr, Lazo JS. High dose continuous infusion of bleomycin in mice: a new model for drug-induced pulmonary fibrosis[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1987, 243(3): 1185-94.
- [8] Davis GS, Leslie KO, Hemenway DR. Silicosis in mice: effects of dose, time, and genetic strain[J]. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 1998, 17(2): 81-97.
- [9] Karvonen RL, Fernandez-Madrid F, Maughan RL, Palmer KC, Fernandez-Madrid I. An animal model of pulmonary radiation fibrosis with biochemical, physiologic, immunologic, and morphologic observations[J]. Radiat Res, 1987, 111(1):68-80.
- [10] Roggli V, Gibbs AR, Attanoos R, Churg A, Popper H, Corrin B et al. Pathology of Asbestosis: An Update of the Diagnostic Criteria Response to a Critique[J]. Arch Pathol Lab Med, 2016, 140(9): 950-2.
- [11] Jenkins RG, Moore BB, Chambers RC, Eickelberg O, Königshoff M, Kolb M et al; ATS Assembly on Respiratory Cell and Molecular Biology. An Official American Thoracic Society Workshop Report: Use of Animal Models for the Preclinical Assessment of Potential Therapies for Pulmonary Fibrosis[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2017, 56(5): 667-679.
- [12] Stefanov AN, Fox J, Depault F, Haston CK. Positional cloning reveals strain-dependent expression of Trim16 to alter susceptibility to bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice[J]. PLoS Genet, 2013, 9(1): e1003203.
- [13] Moore BB, Hogaboam CM. Murine models of pulmonary fibrosis[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008, 294(2): L152-60.
- [14] Ashcroft T, Simpson JM, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale[J]. J Clin Pathol, 1988, 41(4): 467-70.
- [15] Pei X, Zheng F, Li Y, Lin Z, Han X, Feng Y et al. Niclosamide Ethanolamine Salt Alleviates Idiopathic Pulmonary Fibrosis by Modulating the PI3K-mTORC1 Pathway[J]. Cells, 2022, 11(3): 346.
- [16] Adler KB, Callahan LM, Evans JN. Cellular alterations in the alveolar wall in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. An ultrastructural morphometric study[J]. Am Rev Respir Dis, 1986, 133(6): 1043-8.

- [17] Saber S, Nasr M, Kaddah MMY, Mostafa-Hedeab G, Cavalu S, Mourad AAE et al. Nifuroxazide-loaded cubosomes exhibit an advancement in pulmonary delivery and attenuate bleomycin-induced lung fibrosis by regulating the STAT3 and NF- κ B signaling: A new challenge for unmet therapeutic needs[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 148: 112731.
- [18] Liu ZW, Zhao MY, Su XL, Ye TH, Zhuang YJ, Zhang Y et al. The antifibrotic effect and mechanism of a novel tyrosine kinase inhibitor, ZSP1603, in preclinical models of pulmonary fibrosis[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(3): 1481-1491.
- [19] Ni S, Song M, Guo W, Guo T, Shen Q, Peng H. Biomarkers and their potential functions in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Expert Rev Respir Med*, 2020, 14(6): 593-602.
- [20] Bauer Y, White ES, de Bernard S, Cornelisse P, Leconte I, Morganti A et al. MMP-7 is a predictive biomarker of disease progression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *ERJ Open Res*, 2017, 3(1): 0074-2016.
- [21] Sokai A, Tanizawa K, Handa T, Kanatani K, Kubo T, Ikezoe K et al. Importance of serial changes in biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *ERJ Open Res*, 2017, 3(3): 00019-2016.
- [22] Hamai K, Iwamoto H, Ishikawa N, Horimasu Y, Masuda T, Miyamoto S et al. Comparative Study of Circulating MMP-7, CCL18, KL-6, SP-A, and SP-D as Disease Markers of Idiopathic Pulmonary Fibrosis[J]. *Dis Markers*, 2016, 2016: 4759040.