

· 基础研究 ·

流感嗜血杆菌感染致慢性阻塞性肺病急性发作动物模型的建立

王 东¹, 王 瑛², 刘又宁²

(¹空军总医院呼吸内科, 北京 100142; ²解放军总医院呼吸病研究所, 北京 100853)

【摘要】目的 建立金黄地鼠肺气肿模型和流感嗜血杆菌感染致慢性阻塞性肺病急性发作(AECOPD)的动物模型。方法 采用气管内注入弹性蛋白酶法建立金黄地鼠肺气肿模型, 制作流感嗜血杆菌琼脂小珠, 将其注入肺气肿动物肺内建立AECOPD的动物模型, 测定随感染时间延长肺组织炎症程度和菌落数量的变化。结果 肺气肿动物模型病理学检查可见肺泡管、肺泡囊和肺泡明显扩张, 与正常组相比, 模型组的肺泡数/视野明显减少, 平均肺泡面积和平均内衬间隔明显增大($P < 0.01$)。在此基础上经气管注入流感嗜血杆菌构建AECOPD的动物模型, 随时间延长, 组织病理学显示肺气肿动物肺内炎症持续存在; 肺气肿模型组动物感染后1~3周内肺泡灌洗液和肺组织匀浆中细菌数明显高于正常组动物感染后($P < 0.05$)。结论 肺气肿金黄地鼠气管内注入流感嗜血杆菌可建立AECOPD的动物模型, 并且随时间延长, 下呼吸道内细菌数量仍维持在较高水平, 提示细菌可在肺气肿模型肺组织内长期定植, 并导致局部慢性感染和炎症反应持续存在。

【关键词】嗜血菌, 流感; 肺疾病; 肺疾病, 慢性阻塞性; 肺气肿; 疾病模型, 动物

【中图分类号】 R378.3; R563

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-5403(2011)02-0156-05

A golden hamster model of acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease infected by *Haemophilus influenzae*

WANG Dong,¹ WANG Ying,² LIU Youning²

(¹Department of Respiratory Diseases, Airforce General Hospital, Beijing 100142, China; ²Institute of Respiratory Diseases, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

【Abstract】Objective To establish golden hamster models of pulmonary emphysema and acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary diseases (AECOPD) infected by *Haemophilus influenzae*. **Methods** Firstly, golden hamster model of pulmonary emphysema was prepared by intratracheal instillation of porcine pancreatic elastase, which was then infected by agar beads enclosing *Haemophilus influenzae* to establish animal model of AECOPD. Temporal alterations of inflammation and viable bacteria cell counting in lung tissue were determined. **Results** Animal model of pulmonary emphysema was successfully established, whose pathological characteristics included obvious enlargement of alveolar duct, alveolar sacs and alveoli, and formation of bullae, which matched the features of panacinar emphysema. Compared with normal animals, number of alveoli per field in pulmonary emphysema animals was significantly decreased; while mean alveolar area and mean linear intercept were significantly increased ($P < 0.01$). The inflammation was longer and more severe in AECOPD animal models than in normal animals. Viable bacteria quantity in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and lung tissue homogenate of emphysema animals were significantly higher than that of normal animals in 1-3 weeks after infection ($P < 0.05$). **Conclusion** AECOPD animal models were established by infecting pulmonary emphysema animals intratracheally with *Haemophilus influenzae*. Pathophysiology of AECOPD animal model is very similar to clinical manifestations of acute exacerbations and stable phase of COPD. It is determined positively that bacteria cells in lower respiratory tracts keep at a high level along with time, suggesting colonization of *Haemophilus influenzae* in lung tissue of pulmonary emphysema animals, which is one of the most important mechanisms for occurrence of repeated infections, chronicity of disease and unsatisfactory outcomes of antibiotics therapy.

【Key words】 *Haemophilus influenzae*; pulmonary disease; chronic obstructive pulmonary disease; pulmonary emphysema; disease model, animal

This work was supported by National Natural Science Foundation of China (30670927)

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)急性发作大部分是由细菌感

染引起^[1], 其中流感嗜血杆菌占感染致病原的20%~30%。由于COPD患者下呼吸道解剖结构的破

收稿日期: 2010-01-23; 修回日期: 2010-09-16

基金项目: 国家自然科学基金(30670927)

通讯作者: 刘又宁, Tel: 010-66936184, E-mail: liuyouning@301hospital.com

坏等因素,细菌可长期定植在下呼吸道,不易得到清除而成为COPD患者病情迁延不愈、反复发生及加重的重要原因^[2]。国内外对慢性阻塞性肺病急性发作(acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease, AECOPD)的动物模型研究不多,由细菌感染导致的AECOPD动物模型国内外未见报道。本研究拟首先建立COPD——肺气肿的动物模型,然后感染流感嗜血杆菌构建AECOPD的动物模型,从而更好的研究细菌感染致AECOPD的发病机制。

1 材料与方 法

1.1 肺气肿模型的建立

雄性金黄地鼠(解放军总医院实验动物中心提供),体质量(100±10)g。将动物以戊巴比妥钠(60 mg/kg)腹腔注射麻醉后,暴露气管,气管内注入300 μl弹性蛋白酶溶液(18.27 u/ml, Sigma公司)。每10 d滴入一次,共3次,造模时间30 d。正常对照组按相同的手术方法进行,气管内滴入等量生理盐水。

1.2 形态学定量分析

应用IMAGE-Pro PLUS(Version 5.0 for Windows)图像分析软件进行分析(空军总医院病理科提供),每只金黄地鼠观测两张切片,每张切片选择八个视野。计算机彩色图像处理系统测量肺泡周长和最大直径,并通过计算得到下列参数:平均内衬间隔(mean linear intercept, MLI)和平均肺泡面积(mean alveolar area, MAA)^[3]。

1.3 扫描电镜观察

取4 mm×4 mm×2 mm肺组织块标本进行观察前处理:2.5%戊二醛磷酸盐缓冲液中固定4 h,1%四氧化锇浸泡90 min,乙醇浓度梯度脱水,醋酸异戊酯浸泡过夜,临界点干燥,离子溅射喷金镀膜,扫描电镜(SEM)观察各组肺组织的微观形态。

1.4 制备流感嗜血杆菌琼脂珠悬液^[4]

流感嗜血杆菌临床株自AECOPD患者痰标本中分离得到,过夜振荡培养,调整细菌浓度为 $2 \times 10^9 \sim 6 \times 10^9$ CFU/ml,取浓缩菌液与45℃溶化的琼脂溶液等量混合,迅速注入4℃快速搅拌的脑心浸液培养基(Difco公司)中,制成由琼脂包裹细菌的流感嗜血杆菌琼脂珠悬液。悬浮液包含细菌浓度为 $1 \times 10^8 \sim 3 \times 10^8$ CFU/ml的不定形琼脂珠。

1.5 AECOPD动物模型的建立

金黄地鼠腹腔麻醉,右主支气管内注入细菌琼脂珠悬液或单纯琼脂珠悬液100 μl,直立动物10 s,使其流入肺内。肺气肿模型金黄地鼠滴入不含细菌

的琼脂小珠作为阴性对照组。

1.6 肺组织标本的留取和病理标本制作

1.6.1 肺标本收集 注菌后的第1,4,8,21 d放血处死金黄地鼠,支气管肺泡灌洗后,在无菌条件下开胸完整取出肺脏,分离右肺,做病原学检测及组织病理学检查。

1.6.2 肺部细菌学检查 分别计数灌洗液中游离菌数和肺组织匀浆中菌落数。结果以菌落形成单位(colony-forming unit, CFU)/ml灌洗液或CFU/g肺表示。

1.6.3 肺组织病理标本的制作 以2.5%戊二醛30 cmH₂O压力下固定肺脏30 min,浸入2.5%戊二醛固定72 h以上。于右下肺取材,常规脱水,石蜡包埋、切片、HE染色,镜下观察各组肺组织病理形态学的改变。

1.7 统计学处理

应用SPSS 11.0进行统计,计量资料结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,形态定量结果以及接种细菌后不同时间点组间肺内活菌数取log₁₀值进行t检验,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肺气肿金黄地鼠的一般状况

正常组金黄地鼠活泼正常,体质量增加迅速;肺气肿模型组动物活动减少,蜷缩倦怠,毛发失去光泽,呼吸急促,时有喷嚏,体质量增加缓慢。

2.2 肺气肿金黄地鼠肺脏病理改变

2.2.1 大体观察 肺气肿模型组肺体积较正常对照组明显增大,颜色苍白,表面有数量不等的肺泡融合形成过度充气大泡,肺弹性减弱。正常组金黄地鼠肺组织大体改变不明显。

2.2.2 光镜下观察 肺气肿模型组肺泡结构紊乱,肺泡大小不等,肺泡管、肺泡囊和肺泡明显扩张,肺泡壁变薄,肺泡间隔不同程度的断裂,肺泡腔融合增大,部分融合成肺大疱。正常组肺泡壁完整,大小基本正常(图1)。

图1 光镜下肺组织形态学观察(HE×100)
A:正常组;B:肺气肿模型组

2.2.3 形态学定量分析 与正常组相比,模型组的肺泡数/视野明显减少,MAA、MLI、肺泡周长和直径明显增大($P < 0.001$),MAA 增长幅度达 200%以上(表 1)。

2.2.4 超微结构观察 正常组肺泡壁完整,大小基本正常,视野内可见较多肺泡;肺气肿模型组肺泡结构紊乱,气腔大小不等,肺泡管、肺泡囊和肺泡明显扩张,肺泡间隔断裂导致肺泡腔融合增大,部分融合成肺大疱(图 2)。

表 1 肺气肿模型组与正常组形态学测量数据 t 检验结果 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	平均内衬间隔 (μm)	最大直径 (μm)	周长 (μm)	肺泡面积 (μm^2)
正常组	30 ± 4	37 ± 5	121 ± 22	623 ± 161
肺气肿模型组	58 ± 7**	82 ± 8**	265 ± 46**	2424 ± 669**

注:与正常组比较,** $P < 0.001$

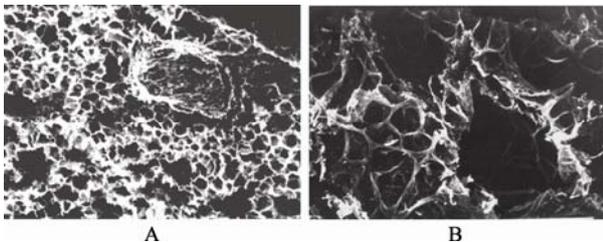


图 2 肺组织超微结构观察 (SEM ×100)
A: 正常组; B: 肺气肿模型组

2.3 肺气肿模型组和正常和非正常动物组注菌后的大体状况

注菌后 3 d 动物普遍活动减少,咳嗽症状明显,肺气肿模型组还伴有较为明显的喘息;一周后正常组动物几无感染症状,基本恢复常态,模型动物组在感

染三周后仍可见到呼吸急促,偶有咳嗽。

2.4 病理学观察结果

2.4.1 大体病变 正常动物肺脏为浅红色,其纹理清晰均匀。感染后动物肺脏色泽为深红色,表面颜色不均匀,可见较多深红色斑状浸润(图 3)。

图 3 肺脏外观的比较

A: 正常肺脏的背侧面; B: 感染肺脏的背侧面。箭头所示为感染的右下肺

2.4.2 镜下观察 肺气肿模型组与正常组金黄地鼠在感染后均表现不同程度的支气管肺炎,肺气肿模型组动物感染后在肺泡腔扩大等肺气肿病理基础上出现较重的炎性改变,正常组动物感染后炎症较轻。肺气肿模型组动物感染后 1 d 炎症最重,支气管周围及肺泡内有大量中性粒细胞浸润,间质毛细血管充血;感染后 8 d,炎症较前减轻,但可见炎性细胞片状或灶性浸润;感染 21 d 时仍可见炎细胞浸润,提示炎症持续存在,呈慢性病程。正常组感染病程持续约 15 d,炎症程度较轻,且恢复较快,8 d 时炎症表现明显减轻,21 d 时与正常对照组没有明显差异(图 4)。无菌琼脂小珠注入组肺内炎症轻微,3 d 后未见炎性改变。

图 4 感染后肺组织内炎症随时间变化的观察 (HE ×200)

A, B, C: 正常组感染第 1, 8, 21 天; D, E, F: 肺气肿模型组感染第 1, 8, 21 天

2.5 菌落计数

2.5.1 支气管肺泡灌洗液中浮游菌菌落计数的比较

正常组动物随感染时间的延长肺组织内灌洗出的流感嗜血杆菌浮游菌数量逐渐减少, 21 d 时仍能分离出少量细菌; 肺气肿模型组动物随感染时间的延长, 菌落数也逐渐减少, 但第 8, 21 天时菌落数明显高于正常动物组感染后(表 2)。

表 2 流感嗜血杆菌感染后支气管肺泡灌洗液中菌落计数的比较
[(n=4, log₁₀(菌落计数), $\bar{x} \pm s$)]

组别	第 1 天	第 4 天	第 8 天	第 21 天
正常组	7.23 ± 0.21	5.68 ± 0.39	3.4 ± 0.3	2.47 ± 0.32
肺气肿模型组	7.34 ± 0.71	6.30 ± 0.28	5.4 ± 0.4*	4.14 ± 0.26*

注: 与正常组比较, *P < 0.05

2.5.2 组织匀浆中菌落计数的比较

正常组动物随感染时间延长肺组织匀浆内流感嗜血杆菌数量逐渐减少, 21 d 时未分离出细菌; 模型组动物感染后菌落数也逐渐减少, 但第 8 天后菌落数变化不明显, 但均明显高于正常组动物感染后(表 3)。

表 3 流感嗜血杆菌感染后肺组织匀浆中菌落计数的比较
[(n=4, log₁₀(菌落计数), $\bar{x} \pm s$)]

组别	第 1 天	第 4 天	第 8 天	第 21 天
正常组	7.42 ± 0.28	6.38 ± 0.55	3.6 ± 1.0	0.00 ± 0.00
肺气肿模型组	7.50 ± 0.76	8.02 ± 0.17	6.1 ± 0.8*	6.05 ± 0.14*

注: 与正常组比较, *P < 0.05

3 讨论

COPD 是一种具有气流受限特征的疾病, 气流受限不完全可逆、呈进行性发展, 与肺部对有害气体或有害颗粒的异常炎症反应有关。COPD 的特点是肺泡数量减少, 不能为丰富的气体交换提供足够的表面面积。其中肺气肿是 COPD 主要的病理表现之一, 肺泡壁和细支气管的进行性破坏、肺泡功能的丧失、肺部终末细支气管远端气腔出现异常持久的扩张是其特征性病变。目前, 国内外常用的鼠类 COPD 动物模型大体分为以下几大类: 自然基因肺气肿模型、各种转基因肺气肿模型和各种理化因子刺激产生的肺气肿模型等。已知的各种理化因子包括外源性蛋白酶、二氧化硫、氯化镉、二氧化氮、臭氧、脂多糖、无机粉尘、高浓度吸氧、香烟烟雾暴露等均可诱发实验肺气肿的发生。

AECOPD 定义为在 COPD 自然病程当中, COPD 患者的呼吸困难、咳嗽和(或)咳痰等基础症状发生变化, 这种变化超出正常情况下的每日变异, 急骤发生, 可能需要改变常规的治疗。AECOPD 最常见的原因

为细菌感染, 其中流感嗜血杆菌在 AECOPD 患者中的分离率在 20%以上, 居第一位。因此本研究首先建立了 COPD——肺气肿的动物模型, 然后利用流感嗜血杆菌感染尝试建立 AECOPD 的动物模型。

3.1 AECOPD 动物模型构建的难点

国内外对构建 AECOPD 动物模型的研究甚少, 至今仍没有较为成熟的方法建立在病因、病程变化、严重程度、炎症反应等方面类似人类 AECOPD 发病情况的动物模型, 研究较多的是利用人类鼻病毒感染导致 COPD 的急性加重^[5,6], 但在 COPD 动物模型基础上感染流感嗜血杆菌造成 AECOPD 模型的研究未见报道。细菌感染致 AECOPD 动物模型的难点在于模拟细菌长期在下呼吸道的定植, 并形成局部慢性长期的感染, 因为鼠类对人类常见的呼吸道致病菌, 如流感嗜血杆菌、肺炎链球菌、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌等具有天然的免疫力, 将菌悬液注入动物肺部, 动物可在 1~2 d 内将病菌完全清除, 因此在通常情况下很难引起动物的肺部感染^[7]。

3.2 肺气肿金黄地鼠流感嗜血杆菌感染模型的建立

本研究尝试首先制作 COPD——肺气肿的动物模型, 造成肺组织解剖结构的紊乱后, 再对流感嗜血杆菌进行琼脂包埋, 琼脂毒性小, 损伤轻, 其固有的凝胶性质使其容易粘附于气道表面, 避免细菌在粘附阶段被过早清除, 延长了细菌在下呼吸道表面存留的时间。该模型成功造成肺气肿金黄地鼠的急慢性感染, 病理形态学上和人类支气管肺炎的特点类似, 且 3 周后肺气肿金黄地鼠下呼吸道仍可见菌落生长, 提示细菌得以长期定植。

本实验中 AECOPD 模型的特点在于成功建立肺气肿金黄地鼠模型后, 在此基础上, 气管内注入流感嗜血杆菌, 在细菌感染的初期, 动物出现喘息咳嗽的症状, 肺组织内可培养出大量细菌, 此阶段与人类 AECOPD 的表现类似; 三周后正常动物体内形成的急性感染已基本痊愈时, 在模型动物的肺组织匀浆内仍可分离到较多的细菌, 说明细菌长期留存在下呼吸道, 形成慢性感染, 而恰恰人类 AECOPD 稳定期时下呼吸道也可分离出细菌, 细菌的定植导致局部呈现慢性炎症过程, 当细菌数量超过一定阈值可导致急性发作的再次出现, 是 AECOPD 反复发作和病情迁延的重要原因, 我们构建的动物模型在这点上十分类似人类 AECOPD 的发病过程, 基本模拟了 AECOPD 急性期和稳定期的下呼吸道细菌数量和炎症的变化情况。

3.3 存在的问题及展望

实验动物模型不可能 100%复制人体的细菌性炎症, 根据研究目的制作符合实验要求的动物模型十分重要。研究发现, 流感嗜血杆菌可在体外培养的呼吸道上皮细胞表面形成生物被膜^[8], 这也许是流感嗜血杆菌长期定植于 COPD 患者下呼吸道的重要原因之一。本研究建立的动物模型, 为进一步观察细菌是否在体内形成生物被膜, 以及研究药物对感染及生物被膜的影响提供了基础。

【参考文献】

- [1] Sethi S. Pathogenesis and treatment of acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2005, 26(2): 192-201.
- [2] 王东, 刘又宁. 流感嗜血杆菌在慢性阻塞性肺病急性加重和进展中的意义[J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2009, 8(2): 189-192.
- [3] Dunnill MS. Quantitative methods in the study of pathology[J]. *Thorax*, 1962, 17: 320.
- [4] Slater LN. A rat model of prolonged pulmonary infection due to nontypable *Haemophilus influenzae*[J]. *Am Rev Respir Dis*, 1990, 142(6 Pt 1): 1429-1435.
- [5] Contoli M, Caramori G, Mallia P, *et al.* A human rhinovirus model of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations[J]. *Contrib Microbiol*, 2007, 14(2): 101-112.
- [6] Gaschler GJ, Bauer CM, Zavitz CC, *et al.* Animal models of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations[J]. *Contrib Microbiol*, 2007, 14(2): 126-141.
- [7] O'Reilly T. Relevance of animal models for chronic bacterial airway infections in humans[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995, 151(6): 2101-2108.
- [8] Starner TD, Zhang N, Kim G, *et al.* *Haemophilus influenzae* forms biofilms on airway epithelia: implications in cystic fibrosis[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 174(2): 213-220.

· 消 息 ·

《心血管病防治知识》征稿启事

《心血管病防治知识》(半月刊)是由国家新闻出版总署批准, 中华人民共和国卫生部、中国科学技术协会、中华医学会心血管病学会、卫生部心血管病防治研究中心指导, 广东科学技术协会主管、主办的国家一级专业性学术刊物。

《心血管病防治知识》创刊于 2002 年, 2010 年 7 月 5 日经广东省新闻出版局批准为半月刊, 每月出版两期, 上半月为科普, 下半月为专业学术。本刊以广大心脑血管疾病的预防与临床工作者为主要读者对象, 报道最新专业领域资讯及临床领先的科研成果和经验, 以及对临床有指导作用且与临床紧密结合的基础理论研究。本刊国际刊号: ISSN1672-3015, 国内刊号: CN44-1581/R, 邮发代号: 46—192, 定价: 8 元, 月刊。全国各大邮局均可订阅。

办刊宗旨: 贯彻党和国家的卫生工作方针政策, 贯彻理论与实践、普及与提高相结合的方针, 反映我国疾病预防及临床与科研工作的重大进展, 促进国内外的学术交流。

本刊栏目有论著、临床观察/研究、综述与进展、专题报告、理论探讨、经验交流、病例讨论、临床护理等, 欢迎投稿。

投稿邮箱: 100871 北京市北京大学 100871-009 信箱

投稿邮箱: xxgbfz@163.com

咨询电话: 010-52580688

网址: <http://www.hao910.com/xxgfz>