

# 用 SD 大鼠研究饲养者肺发病机制动物模型的构建

王佳<sup>1</sup> 王文艺<sup>2</sup> 杨晓红<sup>2\*</sup>

1 石河子大学医学院, 新疆 石河子 832001

2 新疆维吾尔自治区人民医院呼吸与危重症医学中心, 新疆 乌鲁木齐 830001

**摘要:**目的 探讨通过鸽子毛皮等脱落物蛋白制作 SD 大鼠饲养者肺动物模型的可行性。方法:通过提取鸽子毛皮等脱落物的蛋白作为致敏原,再随机将大鼠分为实验组和对照组,每组各 40 只,使大鼠暴露在鸽子毛皮等脱落物的蛋白中,通过病理切片 HE 染色和 Mason 染色观察 2 周、4 周及 8 周大鼠肺部组织变化,比较两组大鼠肺部的差异。结果:HE 染色提示实验组大鼠的肺泡腔结构正常,局部充血,肺泡壁有炎性细胞、淋巴细胞浸润及散在非干酪性巨噬细胞性肉芽肿,且炎症反应程度与刺激时间呈正相关,对照组大鼠的肺部组织未见明显异常;Mason 染色提示两组肺组织均未出现肺纤维化改变。结论:鸽子毛皮等脱落物能使得大鼠的肺部组织出现炎症反应,可以通过鸽子毛皮等脱落物构建 SD 大鼠饲养者肺动物模型。

**关键词:**饲养者肺;HE 染色;Mason 染色;动物模型

## 引言

饲养者肺是因为机体敏感性高,在反反复复的吸入鸽子毛皮等脱落物后产生肺部炎症反应,属于外源性过敏性肺炎或过敏性肺炎<sup>[1]</sup>。该病的病理特征可表现为肺间质单核细胞炎性渗出、细胞性支气管炎和散在分布的非干酪样坏死性小肉芽肿<sup>[2]</sup>。近年来,饲养鸽子已经成为很多家庭的主要收入来源,专业饲养的也越来越多。饲养者由于对饲养者肺缺乏认识,常将该病误认为是慢性支气管炎或者支气管哮喘,延误治疗。长期接触可出现肺纤维化、呼吸衰竭、肺动脉高压及肺心病等,严重的影响患者的生命健康<sup>[3]</sup>。由于饲养者肺的发病机制尚未明确,临床上也缺乏对患者肺组织研究的证据。因此,本研究试图通过提取鸽子毛皮等脱落物蛋白制作 SD 大鼠饲养者肺动物模型,从而为临床上在对饲养者肺的病理机制及其治疗等提供一个可用于研究的动物模型。

## 1 资料与方法

### 1.1 主要仪器与试剂

本研究所使用的主要仪器和试剂如下:新鲜的鸽子毛皮及皮屑等脱落物、离心机、15ml 离心管、电子天平、生理盐水、10%水合氯醛、5ml 注射器、载玻片、包埋石蜡、苏木精-伊红试剂。

### 1.2 实验分组

选取 SD 大鼠 60 只,雌雄不限,个体质量(200±20)g,所有大鼠均购自于新疆医科大学动物实验中心。按照随机分配的原则将大鼠分为实验组和对照组,每组 60 只。实验组的大鼠用鸽子毛皮脱落物进行干预;对照组大鼠在常规环境下饲养,无鸽子毛皮脱落物干预。饲养环境:温度 21-25℃,相对湿度 50%-70%,换气次数 1-2 次/天,气流速度 0.1-0.2cm/s,环境噪声控制在 60dB 以下,照明 15-20lx。检疫 1 周后用于实验。两组大鼠在实验前的性别及体重无统计学差异,基线一致。

### 1.3 鸽子毛皮等脱落物蛋白致敏原的制备

提取鸽子毛皮等脱落物蛋白作为致敏原的具体操作步骤是以 Ohtani Y 等<sup>[4]</sup>的方法为参照。将收集到的新鲜鸽子羽毛、皮屑等脱落物以 1:20 的浓度溶于磷酸盐缓冲液(PBS 液, pH 7.4)中充分搅拌 24 小时,经过滤、除去水分等操作后制成鸽子毛皮等脱落物蛋白冻干粉,(1-4)℃低温保存备用。

### 1.4 大鼠饲养者肺动物模型的制作

将上述制作的蛋白冻干粉溶解于生理盐水中,配制浓度为 4g/L 的溶液。采用雾化吸入的方式使得每只实验组大鼠每天均进行两次雾化吸入鸽子毛皮脱落物。自由饲养大鼠,分别于饲养的 2 周、4 周及 8 周进行取大鼠肺部组织。取肺组织时,向大鼠的腹腔注射 10%水合氯醛将大鼠麻醉,待大鼠昏迷后,用剪刀解剖并取出大鼠的双侧肺,收集到 2 周、4 周和 8 周大鼠肺部样本。取双侧肺肺门处中下段组织,用石

蜡包埋后送病理科用苏木精-伊红染色(HE 染色)和 Mason 染色(纤维化),做成病理切片。

### 1.5 观察指标及判定标准

主要是于 20 倍和 40 倍下观察观察实验组和对照组大鼠肺组织中炎性细胞的浸润情况及是否存在纤维化改变等,以评估鸽子毛皮等脱落物对大鼠肺组织的影响。判定动物模型制作成功为标准:病理表现为以肺泡壁为主的淋巴细胞和中性粒细胞浸润、散在的非干酪性肺巨噬细胞性肉芽肿。

## 2 结果

HE 染色提示实验组大鼠的肺泡腔结构正常,局部充血,肺泡壁有炎性细胞、淋巴细胞浸及散在的非干酪性肺巨噬细胞性肉芽肿,随着鸽子毛皮等脱落物的刺激的时间的增加,大鼠肺部组织中的炎症反应更加明显(2W<4W<8W)。对照组大鼠的肺部组织正常,肺泡腔和肺泡壁等组织未见明显异常;Mason 染色提示两组肺组织均未出现肺纤维化改变(图 1)。

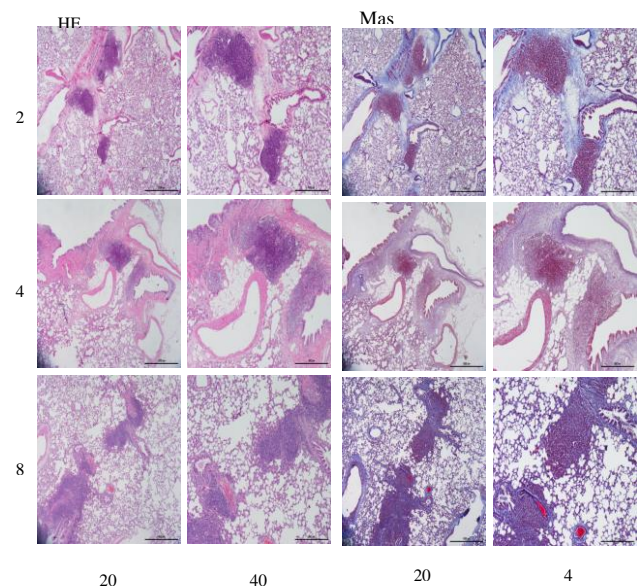


图 1 大鼠肺部组织的病理切片 HE 染色和 Mason 染色结果

## 3 讨论

鸽子的饲养者发生饲养者肺与长期暴露在含有导致发病的致敏抗原等有关,有研究<sup>[5]</sup>报道饲养者肺的患病率约为 8%~30%。饲养者在吸入含有鸽子毛皮等脱落物后,肺部的巨噬细胞识别并吞噬外来的抗原,在多种机制的参与下,宿主对抗原的免疫介导肺部损害<sup>[6-7]</sup>。目前,对于导致发病的相关免疫细胞之间的相互作用机制尚未明确<sup>[8]</sup>。鸽子羽毛、皮屑等脱落物蛋白被肺巨噬细胞识别并吞噬后与特异性 IgG 结合

形成免疫复合物, 免疫复合物通过补体激活途径活化巨噬细胞<sup>[9-10]</sup>。巨噬细胞被激活后释放白介素-8 (Interleukin-8, IL-8)、巨噬细胞炎症蛋白-1 $\alpha$  (Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ ) 等趋化因子, 并在趋化因子作用下向炎症部位迁移、增殖<sup>[11]</sup>, 同时巨噬细胞通过抗原提呈作用促进 CD4+Th0 细胞转化为 Th1 细胞<sup>[12]</sup>。活化的 Th1 细胞通过分泌 IL-2、IFN- $\gamma$  参与细胞免疫应答。对过敏性肺炎患者的临床研究也发现, 支气管肺泡灌洗液中 IL-2、IFN- $\gamma$  以及血清中 TNF- $\alpha$  等促炎性细胞因子的表达显著增加<sup>[13]</sup>。对农民肺等其它过敏性肺炎的研究发现, 与无症状的致敏原暴露者相比, 急性农民肺患者支气管肺泡灌洗液中有较多的淋巴细胞和高水平的 IL-2 表达, 使淋巴细胞在肺部聚集; 同时, 血浆中可溶性 IL-2 受体也呈现较高水平的表达<sup>[14]</sup>。由此可见, 饲鸽者肺因为受到外来抗原的反复刺激, 肺部组织也会反复出现炎症反应, 随着炎症反应的反复以及抗原长期刺激, 肺部向纤维化改变。

在本研究中, 使用鸽子毛皮脱落物反复刺激大鼠肺部组织后, 对大鼠的肺部组织进行 HE 染色可以发现, 切片显示肺泡壁存在大量的炎性细胞和淋巴细胞浸润散在的非干酪性肺巨噬细胞性肉芽肿, 其中炎性细胞以中性粒细胞为主。本研究的结果进一步表明, 鸽子毛皮等脱落物对于 SD 大鼠是一种外来的抗原, 能够引起 SD 大鼠的肺部组织出现炎症反应。本研究发现随着抗原刺激时间的增加, 大鼠肺部炎症反应更为严重, 提示鸽子毛皮脱落物刺激时间与炎症反应呈正相关。本研究也对抗原刺激后的大鼠肺组织纤维化情况进行了验证, 两组大鼠的肺部组织均未出现纤维化改变。这一点与临床上晚期饲鸽者肺的病变不相符, 但这可能是因为本研究刺激的时间最长也仅为 2 个月, 相对饲鸽者而言, 抗原刺激时间较短, 还不足以使得大鼠的肺部组织因长期的炎症反应而发生明显的纤维化改变。晚期饲鸽者由于在疾病的初期常把该病误认为慢性支气管炎或哮喘等疾病, 未能引起足够的重视, 也未能在后期的饲养鸽子的过程中采取有效的防护措施, 使得自己长期暴露于抗原环境中, 经过数年的发展, 疾病最终演变为肺部的纤维化, 丧失肺组织的功能。

本研究的结果是首次证实了采用鸽子毛皮等脱落物可以制作大鼠的饲鸽者肺动物模型, 可以为后续关于饲鸽者肺的研究提供制作相关动物模型的方法, 以期能够探索出饲鸽者肺的病理机制及其有效的治疗方法。但本研究由于实验周期的原因, 未能进行一个长时间的观察, 尚未见到晚期的饲鸽者肺的动物模型。因此, 本研究的动物模型仅为饲鸽者肺的初期模型, 这是本研究的一个不足之处。对于探讨饲鸽者肺晚期的相关研究仍需要进一步增加抗原刺激时间来制作晚期饲鸽者肺的动物模型。

#### 参考文献

- [1]Lacasse Y, Girard M, Cormier Y, et al. Recent advances in hypersensitivity pneumonitis, *Chest*. 2012, 142(1):208-217.
- [2]Woge MJ, Ryu JH, Moua T. Diagnostic implications of positive avian serology in suspected hypersensitivity pneumonitis, *Respir Med*, 2017, 8(129):173-178.
- [3]Soumagne T, Pana-Katatali H, Degano B, et al. Combined pulmonary fibrosis and emphysema in hypersensitivity pneumonitis. *BMJ Case Rep*, 2015, 152(4):198-212.
- [4]Ohtani Y, Kojima K, Sumi Y, et al. Inhalation provocation tests in chronic bird fancier's lung, *Chest*, 2000(118):1382-1389.
- [5]Ito T, Sugino K, Satoh D, Muramatsu Y, et al. Bird fancier's lung which developed in a pigeon breeder presenting organizing pneumonia, *Intern Med*, 2010, 49(23):2605-2608.
- [6]Chiba S, Tsuchiya K, Akashi T, et al. Chronic Hypersensitivity Pneumonitis with a Usual Interstitial Pneumonia (UIP)-like Pattern: Correlation between Histopathological and Clinical Findings, *Chest*, 2016, 147(1):1183-1192.
- [7]Bellanger AP, Pallandre JR, Borg C, et al. Human monocyte-derived dendritic cells exposed to microorganisms involved in hypersensitivity pneumonitis induce a Th1-polarized immune response. *Clin Vaccine Immunol*, 2013, 20(8):1133-1142.
- [8]Suhara K, Miyazaki Y, Okamoto T, et al. Utility of immunological tests for bird-related hypersensitivity pneumonitis. *Respir Investig*, 2015, 53(1):13-21.
- [9]Faerden K, Lund MB, Mogens AT, et al. Hypersensitivity pneumonitis in a cluster of sawmill workers: a 10-year follow-up of exposure, symptoms, and lung function. *Int J Occup Environ Health*, 2014, 20(2):167-173.
- [10]Willems S, Verleden SE, Vanaudenaerde BM, et al. Multiplex protein profiling of bronchoalveolar lavage in idiopathic pulmonary fibrosis and hypersensitivity pneumonitis. *Ann Thorac Med*, 2013, 8(1):38-45.
- [11]Guo N, Xu Y, Cao Z, et al. Absinthin attenuates LPS-induced ALI through MIP-1 $\alpha$ -mediated inflammatory cell infiltration. *Exp Lung Res*, 2015, 41(9):514-524.
- [12]Ukichi K, Okamura T, Fukushima D, et al. Th1/Th2 balance in mouse delayed-type hypersensitivity model with mercuric chloride via skin and oral mucosa. *Bull Tokyo Dent Coll*, 2011, 52(1):13-20.
- [13]Li W, Liu Y, Zhao X, et al. Th1/Th2 Cytokine Profile and Its Diagnostic Value in Mycoplasma pneumoniae Pneumonia. *Iran J Pediatr*, 2016, 26(1):3807-3815.
- [14]Villar A, Muñoz X, Sanchez-Vidaurre S, et al. Bronchial inflammation in hypersensitivity pneumonitis after antigen-specific inhalation challenge, *Respirology*, 2014, 19(6):891-899.