

大气细颗粒物吸入动物模型建立及适用性评价

邓元荣¹, 李泳宁¹, 黄晓敏¹, 徐驯宇^{2*}

(1. 福建卫生职业技术学院, 福州 350101; 2. 福建省立医院胸外科, 福建医科大学省立临床医学院, 福州 350001)

【摘要】 目的 建立大气细颗粒物(PM_{2.5})气溶胶慢性吸入致机体损伤的动物模型。**方法** 制备PM_{2.5}气溶胶连续吸入装置。分别考察不同浓度(100 ± 10 μg/m³、150 ± 10 μg/m³、200 ± 10 μg/m³)、不同时间(1周、2周、4周、8周、12周)、不同方法(非暴露气管内灌注法和气溶胶吸入法)和不同动物(Wistar大鼠、BN大鼠和豚鼠)对模型建立的影响。观察动物一般状态并计算体重增长率与死亡率;检测肺功能包括呼吸频率、用力呼气量占用力肺活量比值(FEV₁/FVC)与动脉氧分压(PO₂);计数支气管肺泡灌洗液(BALF)细胞分类;光镜检查气管、肺组织病理。以气管、肺组织病理可见到肺炎为建立成功模型标准,确定建立模型的影响因素。**结果** 不同浓度PM_{2.5}气溶胶连续吸入8周,Wistar大鼠出现中毒现象,体重增长缓慢,支气管肺泡灌洗液(BALF)中白细胞总数和单个核细胞计数增加、巨噬细胞比率上升,肺功能指标中呼吸频率增高、动脉血PO₂和FEV₁/FVC降低,病理示气管、肺组织出现炎症及肺纤维化变化,炎症变化与染毒浓度呈正相关但高浓度死亡率高。持续不同时间(1周、2周、4周、8周和12周)吸入相同浓度,Wistar大鼠染毒动物气管肺组织病变8周起显著但与12周无差异。不同方法(非暴露气管内灌注法和气溶胶吸入法)Wistar大鼠连续吸入8周,两法染毒效果相当但吸入法动物死亡率低。Wistar大鼠、BN大鼠和豚鼠不同动物连续吸入8周,三种动物效果相当但Wistar大鼠死亡率低。**结论** 选用Wistar大鼠吸入浓度为150 ± 10 μg/m³的PM_{2.5}气溶胶连续8周可建立合适的PM_{2.5}致机体损伤动物模型,研究制备一个与PM_{2.5}损伤机体相似的致病环境,率先建立既适合全国大范围,同时具有福建地区特点PM_{2.5}致机体损伤动物的模型,将促进PM_{2.5}预防与治疗措施研究的开展。

【关键词】 PM_{2.5};气溶胶吸入;大鼠;豚鼠;模型

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)09-0042-08

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.09.008

Establishment and evaluation of animal model induced by inhalation injury of airborne fine particulate matter

DENG Yuan-rong¹, LI Yong-lin¹, HUANG Xiao-min¹, XU Xun-yu^{2*}

(1. Fujian Health College, Fuzhou 350101, China; 2. Department of Thoracic Surgery, Fujian Provincial Hospital; Provincial Clinical Medical College of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China;)

【Abstract】 Objective To establish and evaluate the animal model induced by inhalation injury of airborne fine particulate matter (PM_{2.5}). **Methods** We manufactured equipment for rats aerosol inhalation with PM_{2.5}. The effects of several factors such as concentrations (100 ± 10 μg/m³、150 ± 10 μg/m³、200 ± 10 μg/m³)、time (1w、2w、4w、8w、12w)、method (non-exposed intratracheal instillation method and aerosol inhalation) and animals (Wistar rats, BN rats and guinea pigs) were investigated to establish the model. The respiratory rate, forced vital capacity ratio of forced expiratory

[基金项目] 福建省实验动物研究科技计划重点项目(2013Y0085);福建省科技计划引导性项目(2015Y0004)。

[作者简介] 邓元荣(1979-)男,硕士,副教授,专业:新药药理研究。E-mail: dyr777@163.com。

[通讯作者] 徐驯宇(1968-)男,博士,主任医师,副教授,专业:心胸外科。E-mail: xunyu@126.com。

volume (FEV_1/FVC) and arterial partial pressure of oxygen (PO_2) were measured, the pathological changes of bronchial and lung tissues under light microscope were observed. The success animal model was built as the pneumonia was observed from the pathological changes of lung tissue. **Results** The Wistar rats exposed to PM2.5 aerosol inhalation for 8 weeks, we can see that the weight growth rate of rat decreased, WBC count and mononuclear cells count increased, the macrophages ratio decreased in BALF, the respiratory rate of lung increased while arterial PO_2 and FEV_1/FVC decreased, inflammation and pulmonary fibrosis changes were observed by bronch and pulmonary pathology, inflammatory changes with a dose-response relationship were observed. Exposed to PM2.5 aerosol inhalation for different time (1 w, 2 w, 4 w, 8 w, 12 w) with same dose, the score issue lesions of lung and bronchus in Wistar rats increased and the 8w group is obvious. The Wistar rats exposed to PM2.5 with different method (aerosol inhalation and non-exposed intratracheal instillation method) for 8w, the aerosol inhalation worked as effectively as perfusion while mortality rate of aerosol inhalation is lower. Different animals (Wistar rats, BN rats and guinea pigs) exposed to PM2.5 aerosol inhalation for 8w, the same results were observed with three method respectively while mortality rate of Wistar rats lower. **Conclusions** The optional conditions that the Wistar rats were continuously inhaled for 8w PM2.5 with a dose of $150 \pm 10 \mu g/m^3$ were established. The animal model could be used on a national scale, especially in Fujian province. The results would be useful for the development of the research of the prevention and countermeasures of PM2.5 pollution.

【Key words】 PM2.5; Aerosol inhalation; Rat; Guinea pigs; Model

大气灰霾细颗粒物 (airborne fine particulate matter, PM2.5) 指大气总悬浮颗粒物中直径等于或小于 $2.5 \mu m$ 的细颗粒物, 来源于人为或自然污染源, 其成分复杂而可变^[1]。人长期暴露在灰霾环境中可导致呼吸、心血管等多系统疾病, 患癌风险增加并可引发早死, 其长期效应远远高于短期效应^[2-4], 近年来相关研究日见增多。现有一次性、短时间、大浓度暴露法所制建立动物模型, 很难动态、系统观察到 PM2.5 对机体损伤这一长期慢性疾病的病理发生发展全过程, 目前国内外均未见 PM2.5 损害机体的标准动物模型, 缺乏稳定的动物模型成为 PM2.5 损害机体研究的瓶颈问题, 限制其防治措施的研究和应用。因此, 建立一个适合动物模型和研究方法, 可为评价 PM2.5 损害机体研究提供客观、准确的研究手段, 同时为探讨机制研究提供新思路。本研究针对①选用动物②染毒途径③染毒浓度④染毒持续时间四个核心问题, 主要以气管、肺脏组织炎症病理改变为制模成功的标准, 总结其变化特点及趋势, 研究各相关指标间的相关性, 筛选出适合评价 PM2.5 致机体损伤的动物模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级 Wistar 大鼠 200 只, 体重 ($160 \sim 180$) g, 2 月龄; 清洁级 BN 大鼠 30 只, 体重 ($160 \sim 180$) g, 2 月龄; 普通级豚鼠 30 只, 体重 ($130 \sim 160$) g, 2 月龄。以上动物均雌雄各半, 购自上海斯莱克实验动物有限公司 [SCXK (沪) 2012-0011]。饲养于福建

卫生职业技术学院 SPF 级屏障系统动物实验室 [SYXK (闽) 2012-0006]。

1.2 实验仪器

TH-150C 大流量 PM2.5 环境采样器 (美国 Thermo 公司); KQ-100DB 型超声波清洗机 (昆山超声仪器有限公司); Alpha2-4 型冷冻干燥机 (德国 Christ 公司); 超细匀浆机 (上海洽姆仪器科技有限公司); 日立 7080 全自动生化分析仪 (日本日立公司); Model J2-21 低温高速离心机 (德国贝克曼公司); RM6240-BD 生物信号采集分析系统 (成都仪器厂); yuyuE402AI 多功能超声雾化器 (江苏鱼跃医疗设备有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 PM2.5 的采集及处理

大流量 PM2.5 环境采样器在福州市市区连续采样, 收集全年所采样品^[5]。将载有细颗粒物的玻璃纤维滤膜滤膜剪成约 1 cm 小块, 浸泡于纯化水中, 超声震荡 30 min, 共 4 次, 洗脱颗粒物, 6 层纱布过滤震荡液, 集中滤液于 $4^\circ C$ 、3000 r/min 离心 20 min 后收集下层悬液。采用减量法计算, 用生理盐水稀释至所得悬液浓度为 $555.6 \mu g/mL$, 一部分悬液密封, 剩余部分悬液置于玻璃平皿中并冷冻真空干燥, 均置于低温冰箱保存备用。

1.3.2 Wistar 大鼠吸入 PM2.5 动物模型的建立

1.3.2.1 动物分组与染毒

Wistar 大鼠 50 只, 随机分为正常组、空白组、染毒高浓度组、染毒中浓度组和染毒低浓度组 5 组, 每组 10 只, 标记并分笼饲养。正常组不作处理, 空白

组和染毒各组动物均采用气溶胶吸入法:用生理盐水配制 PM_{2.5} 混悬液并灭菌,多功能雾化器将混悬液以 1.8 mL/min 流速向自制密封容器(容积约 5 L)开始喷雾,容器另一端有一个出口以保证容器内气雾正常流动,到玻璃容器内全部充满白色雾为准,气溶胶达到要求浓度,按实验前拉丁方方法安排好的顺序依次将动物放入吸入装置中,自然呼吸,接受染毒,每天 6 h(9:00 ~ 15:00),每周 5 d,连续 8 周。染毒浓度根据国标大气中 24 h 平均浓度必须小于 75 $\mu\text{g}/\text{m}^3$,取 (200 $\pm$ 10) $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、(150 $\pm$ 10) $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、(100 $\pm$ 10) $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 分别为高、中、低浓度组。空白组换成生理盐水吸入。

1.3.3 观察指标

1.3.3.1 一般状态

每日染毒后观察动物的精神状态、饮食情况、活动及死亡变化。计算动物死亡率和实验结束时体重增长率。

1.3.3.2 肺功能检测

室温控制于 22℃ ~ 25℃,动物体温维持约 37℃,采用 2% 巴比妥钠(12 mg/kg)腹腔注射麻醉动物。固定动物, RM6240-BD 生物信号采集分析系统观察并记录大鼠呼吸频率、幅度;再解剖暴露气管,检测动物肺功能包括呼吸频率、用力呼气量占用力肺活量比值(FEV_1/FVC);而后暴露腹腔,少许肝素钠抗凝,行腹主动脉穿刺取血,血气分析动脉氧分压(PO_2)。

1.3.3.3 支气管肺泡灌洗液(BALF)制备和指标检测

脱臼处死大鼠,将肺脏完整取出,结扎左侧肺叶并分 4 次共注入 12 mL 的预冷 PBS 缓冲液,按摩肺部以尽量回收 BALF。回收液 1800 r/min 离心 10 min,收集底部细胞悬液,取悬液 1 滴于载玻片上并与预滴 1 滴的 PBS 均匀混合,涂血涂片,自然干燥,行吉瑞染色,显微镜下观察,计数白细胞总数、单个核细胞数(主要包括淋巴细胞和单核细胞)。

1.3.3.4 支气管、肺组织处理与病理检查

将气管和右侧肺组织浸入福尔马林溶液中固定,石蜡包埋,常规 HE 染色,制备 5 μm 切片,光镜下观察气管、肺组织病理学形态变化。气管、肺组织病理改变评价标准:“-”气管和肺组织未见明显病变;“+”气管和肺间质有少量炎症细胞,气管粘膜下腺体轻度扩张,肺间质有不多的炎症细胞浸润;“++”气管间质有较多的炎症细胞浸润,部分

气管粘膜上皮脱落,固有层腺体中度扩张,肺间质有较多的炎症细胞浸润,部分肺泡代偿性扩张;“+++”气管纤毛柱状上皮增生,间质有大量炎症细胞浸润,固有层腺体增生、扩张,肺间质有大量炎症细胞浸润,肺泡代偿性扩张,部分肺泡融合。

1.3.4 不同染毒时间对动物模型建立的影响

Wistar 大鼠 70 只,随机分为正常组、空白组、染毒大组(1 周、2 周、4 周、8 周和 12 周组)7 组,每组 10 只。采用气溶胶吸入法,染毒时间分别为 1 周、2 周、4 周、8 周和 12 周,浓度均为 150 $\pm$ 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 。观察指标为死亡率、体重增长率、气管和肺组织病理变化。

1.3.5 不同染毒方法对动物模型建立的影响

Wistar 大鼠 50 只,随机分为 5 组,正常组、吸入法大组、灌注法大组,各大组再分别设空白组与染毒组,每组 10 只。采用气溶胶吸入法和非暴露气管内灌注法,染毒时间 8 周。吸入法浓度(150 $\pm$ 10) $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 。非暴露气管内灌注法:采用乙醚麻醉,动物竖立以保持直立体位,将预吸好的 PM_{2.5} 悬液 1 mL 迅速经气管插管注入,左右来回旋转并按摩双肺 10 次,使 PM_{2.5} 进入肺内并均匀分布,每天 1 次,每周 5 d。观察指标为死亡率、体重增长率、气管和肺组织病理变化。

1.3.6 不同染毒实验动物对动物模型建立的影响

Wistar 大鼠、BN 大鼠和豚鼠各 30 只,随机分为 Wistar 大鼠大组、BN 大鼠大组和豚鼠大组,各大组再分别设正常组、空白组与吸入组,每组 10 只。采用 PM_{2.5} 气溶胶吸入持续 8 周,浓度(150 $\pm$ 10) $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 。观察指标为死亡率、体重增长率、气管和肺组织病理变化。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 11.5 进行统计分析,实验数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,经方差齐性分析后采用完全随机设计的单因素方差分析,气管、肺组织病理评分比较采用秩和检验方法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Wistar 大鼠 PM_{2.5} 吸入动物模型的建立

2.1.1 一般状态

染毒各组持续吸入 PM_{2.5} 气溶胶共 8 周,前 4 周动物表现活动减少、精神稍差、静伏少动、食量下降,后 4 周症状加重,出现明显的精神倦怠、活动减

表 1 Wistar 大鼠体重与死亡率变化结果
Tab.1 Results of weight growth rate and mortality rate in Wistar rat

组别 Group	n	大鼠体重 Weight of rat			死亡率(%) Mortality rate
		染毒前体重(g) BW before	染毒后体重(g) BW after	体重增长率(%) Weight growth rate	
正常组 Normal group	10	163.2 ± 10.6	217.8 ± 17.4	31.8 ± 7.9	0(0/10)
空白组 Control group	10	168.7 ± 13.7	211.8 ± 16.3	25.6 ± 4.9	0(0/10)
高浓度组 High group	9	164.8 ± 9.4	193.6 ± 11.6	18.5 ± 1.9 *	10.0(1/10)
中浓度组 Middle group	10	167.8 ± 15.3	207.6 ± 16.1	23.9 ± 5.4	0(0/10)
低浓度组 Low group	10	160.8 ± 10.5	200.8 ± 16.8	25.4 ± 7.2	0(0/10)

注: * $P < 0.05$, 与正常组比较。
Note. * $P < 0.05$, compared with the normal group.

表 2 Wistar 大鼠肺功能指标检测结果
Tab.2 Results of pulmonary function in Wistar rat

组别 Group	n	肺功能指标 Pulmonary function		
		呼吸频率(次·min ⁻¹) Respiratory rate	FEV ₁ /FVC(%)	PaO ₂ (mmHg)
正常组 Normal group	10	97.2 ± 6.7	22.8 ± 1.8	124.7 ± 8.9
空白组 Control group	10	99.9 ± 4.5	21.2 ± 5.1	122.1 ± 9.7
高浓度组 High group	9	116.1 ± 6.3 *	16.1 ± 2.6 *	99.8 ± 6.2 *
中浓度组 Middle group	10	104.2 ± 9.4 *	17.8 ± 5.3 *	115.7 ± 5.5 *
低浓度组 Low group	10	98.9 ± 11.5	19.3 ± 2.1	126.9 ± 4.5

注: * $P < 0.05$, 与正常组比较。
Note. * $P < 0.05$, compared with the normal group.

表 3 大鼠气管肺泡灌洗液(BALF)细胞分类计数检测结果
Tab.3 Levels of leukocyte count in BALF in Wistar rat

组别 (Group)	n	白细胞总数计数(×10 ⁷ /L) WBC count	单个核细胞计数(×10 ⁷ /L) Mononuclear cells count	巨噬细胞比率(%) Macrophages Ratio
正常组 Normal group	10	5.9 ± 0.9	7.1 ± 2.8	79.4 ± 16.7
空白组 Control group	10	5.4 ± 0.7	7.9 ± 3.4	68.7 ± 13.7
高浓度组 High group	9	15.5 ± 2.6 *	21.6 ± 7.7 *	95.3 ± 11.4 *
中浓度组 Middle group	10	12.6 ± 1.8 *	20.1 ± 8.1 *	85.1 ± 14.9 *
低浓度组 Low group	10	12.1 ± 0.9 *	18.7 ± 8.6 *	78.0 ± 13.8

注: * $P < 0.05$, 与正常组比较。
Note. * $P < 0.05$, compared with the normal group.

少、皮毛无光泽;动物体重均出现增长缓慢,高浓度组与正常组比较有显著差异性($P < 0.05$);高浓度组动物死亡率 10.0%(1/10)。正常组与空白组动物未见明显异常。(表 1)

2.1.2 动物肺功能测定

染毒大鼠出现呼吸频率显著加快、FEV₁/FVC 升高、PaO₂ 减小,高、中浓度组与正常组具有显著性差异($P < 0.05$)。空白组与正常组比较无差异性($P > 0.05$)(表 2)。

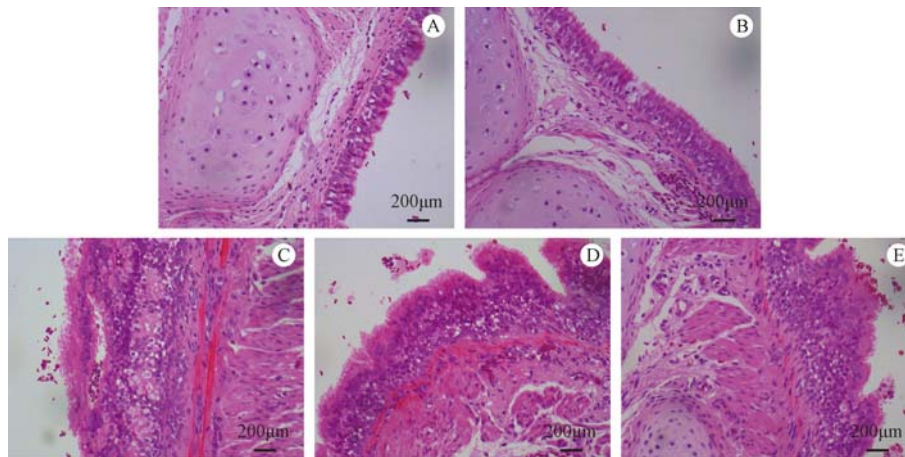
2.1.3 气管肺泡灌洗液(BALF)细胞分类计数

肉眼观察 BALF,正常组与空白组较清,而染毒动物组较混浊,但均无明显颗粒沉积。BALF 细胞计数中,三个染毒浓度组白细胞总数计数和单个核细胞计数均增加,巨噬细胞比率以高、中浓度组上升,均具有显著性差异($P < 0.05$)。空白组与正常组比较无差异性($P > 0.05$)(表 3)。

2.1.4 气管、肺组织病理变化

病理光镜观察示:正常组与空白组大鼠气管、肺组织结构较为正常,气管可见柱状上皮细胞,肺泡结构完整,细胞排列较整齐,肺间质偶见炎性细胞;染毒部分动物气管扩张,腔内有炎性细胞和黏性分泌物,柱状上皮细胞出现增生,严重呈假复层状态,出现明显的炎症反应,肺组织肺间质有大量的炎性细胞浸润,间质瘀血水肿,肺间隔增厚,可见成纤维细胞,呈轻度纤维化,以上病理改变随浓度的增加而明显(图 1,2)。

气管、肺组织病变发生率随染毒浓度升高各组动物均升高(50%、80%、100%和 50%、90%、100%),均值与正常组比较有显著差异性($P < 0.05$),说明 PM2.5 吸入可以造成气管和肺组织炎症变化且与浓度呈一定正相关关系。空白组与正常组比较,各指标均无显著差异性($P > 0.05$)。进行秩和检验发现三

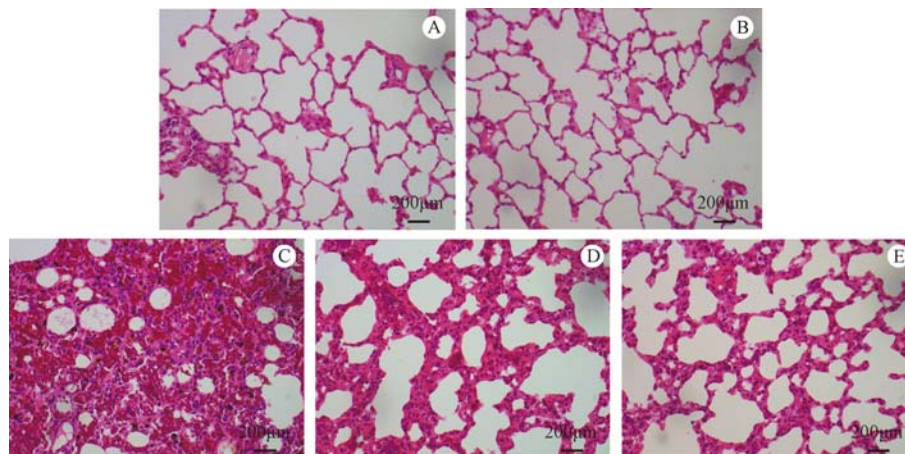


注: (A) 正常组; (B) 空白组; (C) 高剂量组; (D) 中剂量组; (E) 低剂量组。

图 1 各组 Wistar 大鼠气管组织病理光镜观察 (bar = 200 μm)

Note. (A) normal group; (B) control group; (C) high group; (D) middle group; (E) low group.

Fig. 1 The pathological changes of bronchial tissues under light microscope



注: (A) 正常组; (B) 空白组; (C) 高剂量组; (D) 中剂量组; (E) 低剂量组。

图 2 各组 Wistar 大鼠肺组织病理光镜观察 (bar = 200 μm)

Note. (A) normal group; (B) control group; (C) high group; (D) middle group; (E) low group.

Fig. 2 The pathological changes of lung tissues under light microscope

个浓度组间均值有显著差异性 ($P < 0.05$), 两两比较发现低浓度组与高、中浓度组比较有显著差异性 ($P < 0.05$), 综合高浓度组动物出现死亡 (死亡率 10%), 实验考虑使用中浓度为佳 (表 4)。

2.2 不同染毒时间对 PM_{2.5} 吸入动物模型的建立影响

随染毒时间延长, 染毒动物死亡率呈升高, 染毒 8 周死亡率 10%, 染毒 12 周死亡率达 30%; 体重增长率也增长延缓; 各组动物气管组织和肺组织病变发生率呈升高 (30%、50%、80%、100%、100% 和 30%、40%、80%、100%、100%); 均值连续染毒 4 周起变化显著, 较正常组有显著差异性 ($P < 0.05$), 且与染毒时间呈一定正相关。空白组与正常组比较, 各指标均

无显著差异性 ($P > 0.05$)。进行各染毒时间组间均值秩和检验发现气管病变无显著差异性 ($P > 0.05$), 而肺组织病变有显著差异性 ($P < 0.05$), 结合死亡率考虑染毒时间以 8 周为佳 (表 5)。

2.3 不同染毒方法对 PM_{2.5} 吸入动物模型的建立影响

采用不同染毒方法: 灌注法与吸入法染毒组动物死亡率分别为 30% 和 10%; 两染毒组气管和肺组织病变均值都较正常组高且有显著差异性 ($P < 0.05$)。各空白组与正常组比较, 各指标均无显著差异性 ($P > 0.05$)。进行两染毒组间均值秩和检验发现无显著差异性 ($P > 0.05$), 考虑两种方法效果相当, 因灌注法死亡率高, 可选择吸入法为佳 (表 6)。

表 4 Wistar 大鼠气管、肺病理变化结果($n=10$)
Tab. 4 The pathological changes of bronchial and lung tissues under light microscope in Wistar rat

组别 Group	气管病变/只 Tissue lesions of bronchus					肺组织病变/只 Tissue lesions of lung				
	-	+	++	+++	均值 Means	-	+	++	+++	均值 Means
正常组 Normal group	10	0	0	0	0±0	10	0	0	0	0±0
空白组 Control group	9	0	1	0	0.2±0.6	9	1	0	0	0.1±0.3
高浓度组 High group	0	1	1	8	2.7±0.6*	0	1	1	8	2.7±0.6*
中浓度组 Middle group	2	2	2	4	1.8±1.2*	1	2	2	5	2.1±1.1*
低浓度组 Low group	5	2	2	1	0.9±1.1*	5	2	2	1	0.9±1.1*

注: * $P < 0.05$, 与正常组比较。
Note. * $P < 0.05$, compared with the normal group.

表 5 不同染毒时间对 PM2.5 吸入动物模型建立影响结果($n=10$)
Tab. 5 Results of different time to model induced by inhalation injury of PM2. 5

组别 Group	死亡率 (%) Mortality rate	体重增长率 (%) Weight growth rate	气管病变/只 Tissue lesions of bronchus					肺组织病变/只 Tissue lesions of lung				
			-	+	++	+++	均值 Means	-	+	++	+++	均值 Means
正常组 Normal group	0(0/10)	36.7±16.5	9	1	0	0	0.1±0.3	9	1	0	0	0.1±0.3
空白组 Control group	0(0/10)	32.9±19.5	9	0	1	0	0.2±0.6	9	0	1	0	0.2±0.6
1w	0(0/10)	8.2±4.2	7	2	1	0	0.4±0.6	7	2	1	0	0.4±0.6
2w	10(1/10)	14.8±6.2	5	2	2	1	0.9±1.1	6	1	2	1	0.8±1.1
4w	0(0/10)	18.9±14.8	2	2	3	3	1.7±1.1*	2	2	3	3	1.7±1.1*
8w	10(1/10)	25.7±25.1	0	1	1	8	2.7±0.6*	0	1	2	7	2.6±0.6*
12w	30(3/10)	26.2±22.9	0	1	2	7	2.6±0.6*	0	1	1	8	2.7±0.6*

注: * $P < 0.05$, 与正常组比较。
Note. * $P < 0.05$, compared with the normal group.

表 6 不同染毒方法对 PM2.5 吸入动物模型的建立影响结果($n=10$)
Tab. 6 Results of different method to model induced by inhalation injury of PM2. 5

组别 Group	死亡率 (%) Mortality rate	体重增长率 (%) Weight growth rate	气管病变/只 Tissue lesions of bronchus					肺组织病变/只 Tissue lesions of lung				
			-	+	++	+++	均值 Means	-	+	++	+++	均值 Means
正常组 Normal group	0(0/10)	23.3±15.2	9	1	0	0	0.1±0.3	10	0	0	0	0±0
空白组 Control group	0(0/10)	25.7±11.2	1	0	1	0	0.2±0.6	10	0	0	0	0±0
灌注法 (perfusion) 灌注染毒组 perfusion group	30(3/10)	18.9±22.6	1	3	3	3	1.8±1.0*	1	3	3	3	1.8±1.0*
空白组 Control group	0(0/10)	21.5±16.5	1	0	1	0	0.2±0.6	10	0	0	0	0±0
吸入法 (inhalation) 吸入染毒组 inhalation group	10(1/10)	18.0±19.1	2	1	4	3	1.8±1.1*	2	1	3	4	1.9±1.1*

注: * $P < 0.05$, 与正常组比较。
Note. * $P < 0.05$, compared with the normal group.

2.4 不同染毒实验动物对 PM2.5 吸入动物模型的建立影响

选用 Wistar 大鼠、BN 大鼠和豚鼠作为实验动物吸入染毒结果:死亡率分别为 0%、20%、60%;BN 大鼠和豚鼠体重增长率较小;气管和肺组织病变发生率分别为 80%、80%、90% 和 90%、80%、90%。

各染毒组间的气管与肺组织病变均值进行组间秩和检验发现无显著差异性($P > 0.05$),考虑三种动物效果相当,综合动物死亡率情况,考虑选择 Wistar 大鼠。各空白组与正常组比较,各指标均无显著差异性($P > 0.05$)(表 7)。

表 7 不同染毒实验动物对 PM2.5 吸入动物模型的建立影响结果($n=10$)
Tab. 7 Results of different animal to model induced by inhalation injury of PM2.5

组别 Group		死亡率 (%) Mortality rate	体重增长率 (%) Weight growth rate	气管病变/只 Tissue lesions of bronchus					肺组织病变/只 Tissue lesions of lung				
								均值 Means					均值 Means
				-	+	++	+++		-	+	++	+++	
Wistar 大鼠 Wistar rat	正常组 Normal group	0(0/10)	25.3 ± 14.0	10	0	0	0	0 ± 0	10	0	0	0	0 ± 0
	空白组 Control group	0(0/10)	23.6 ± 23.1	10	0	0	0	0 ± 0	10	0	0	0	0 ± 0
	吸入染毒组 Inhalation group)	0(0/10)	19.1 ± 27.5	2	1	4	3	1.8 ± 1.1 *	1	1	4	4	2.1 ± 0.9 *
BN 大鼠 BN rat	正常组 Normal group	0(0/10)	22.1 ± 14.0	10	0	0	0	0 ± 0	10	0	0	0	0 ± 0
	空白组 Control group	10(1/10)	24.3 ± 14.1	10	0	0	0	0 ± 0	10	0	0	0	0 ± 0
	吸入染毒组 Inhalation group)	20(2/10)	17.5 ± 22.9	2	1	4	3	1.8 ± 1.1 *	2	1	3	4	1.9 ± 1.1 *
豚鼠 Guinea Pig	正常组 Normal group	0(0/10)	26 ± 19.1	9	0	1	0	0.2 ± 0.6	9	0	1	0	0.2 ± 0.6
	空白组 Control group	10(1/10)	22.6 ± 10.5	10	0	0	0	0 ± 0	10	0	0	0	0 ± 0
	吸入染毒组 Inhalation group)	60(6/10)	17.4 ± 24.9	1	2	3	4	2.0 ± 1.0 *	1	2	3	4	2.0 ± 1.0 *

注: * $P < 0.05$, 与正常组比较。
Note. * $P < 0.05$, compared with the normal group.

3 讨论

PM2.5 可对机体产生多器官、多靶点的损伤,是一个慢性、长期的病理变化过程,呼吸系统是主要的靶器官,近年来有关其损伤研究多以肺组织病理可见到肺炎为标准^[6-8],损伤机理主要考虑与氧化应激损伤、炎性反应、体液免疫应答和局部粘膜免疫有关。本研究采用 PM2.5 气溶胶吸入法,结果发现 Wistar 大鼠经吸入染毒后,出现全身中毒表现,BALF 中白细胞总数计数、单个核细胞计数和巨噬细胞比率上升,气管、肺组织病理学检查结果显示出现明显炎症反应和肺间质出现纤维化病变,病理学改变与肺功能相关性发现随着肺泡炎及肺纤维化程度的加重,动物呼吸频率增高,FEV₁/FVC 和动脉血 PO₂ 降低,此结果也反映肺部病理变化与肺功能改变的一致性,并进一步证实 PM2.5 吸入同时引起限制性通气障碍和(或)阻塞性通气障碍、通气/血流比失调及肺间质纤维化肺泡-毛细血管膜增厚而致弥散功能障碍如慢性气管炎、肺气肿等。以气管、肺组织出现炎症病理改变为建立动物模型标准,结果表明 PM2.5 气溶胶吸入染毒法可引起明显炎症病理改变,动物模型建立合适。

研究考察不同吸入浓度、不同染毒时间、不同

品系动物和不同方法对模型的影响。结果吸入浓度与动物病变严重程度、死亡情况呈正相关,高、中浓度动物病变明显且相似,但高浓度动物死亡率较高。考察不同染毒时间实验中,连续染毒 8 周起动物死亡率和气管、肺组织病变变化显著,但与 12 周无差异,而染毒 12 周死亡率达 30%。选用目前常用的动物,Wistar 大鼠是使用最广泛的大鼠品系之一,其生活习性繁殖规律容易受到外界的气温、气压、湿度、噪声等方面的影响,BN 大鼠血清中 IgE 表达水平较高,更容易模拟过敏的生理状态,在 I 型超敏反应研究中应用较多,豚鼠有 IgG 和 IgE 两种类型的变态反应抗体,适于研究迟发型过敏性和速发型过敏反应,是最常用的评价药物过敏反应的动物模型,结果发现三种动物的气管与肺组织病变相当,但死亡率豚鼠最高,Wistar 大鼠最低,考虑豚鼠对 PM2.5 过于敏感,BN 大鼠死亡率较高,以选用 Wistar 大鼠建模为佳。现有研究的染毒途径主要采用 PM2.5 悬液经暴露气管注入法或非气管暴露气管内灌注,前者会对动物产生有创损伤,后者则动物可有麻醉过深、气管粘膜损伤出血、混悬液窒息、纵隔血肿、肺部感染等,且两者的死亡率高,也难以模拟实际的病理过程,若采用 PM2.5 气溶胶吸入法,与实际引起的损伤病理过程更为类同,死亡率

也可大大降低,实验比较非气管暴露气管内灌注和慢性气溶胶吸入法,发现气管、肺组织病变率相似,故认为两者效果相似,吸入法较灌注法动物死亡率低,且可更真实的反映病理过程,更适合用于建立模型。

本研究制备一个与自然条件相似的致病环境进行 PM_{2.5} 气溶胶吸入,结果表明选用 Wistar 大鼠吸入浓度为 $(150 \pm 10) \mu\text{g}/\text{m}^3$ 的 PM_{2.5} 气溶胶持续 8 周可建立合适的 PM_{2.5} 致机体损伤动物模型。模型可适合全国大范围使用,同时 PM_{2.5} 成分因不同地区的有所不同,采用本地区来源的 PM_{2.5} 建模具有地区特色,为本地区 PM_{2.5} 的预防和治疗方法开展研究奠定基础。PM_{2.5} 致机体损伤是多靶器官的,除呼吸系统外其它的靶器官确立及其损伤机理研究均有待后续研究。

参考文献:

[1] 李子萌. 福州市区可吸入颗粒物污染特征与控制措施[J]. 海

峡科学,2012,6(66):38-40.

- [2] 孙志豪,崔燕平. PM_{2.5} 对人体健康影响研究概述[J]. 环境科技,2013,4(2):169-171.
- [3] Madrigano J, Kloog I, Goldberg R, Coull BA. Long-term exposure to PM_{2.5} and incidence of acute myocardial infarction[J]. Environ Health Perspect, 2013, 121(2):192-196.
- [4] 刘晓莉,李红,孟紫强. PM_{2.5} 对大鼠心、肺、睾丸的氧化损伤作用[J]. 中国环境科学,2005,25(2):160-161.
- [5] 王宏,陈晓秋,隋平,等. PM_{2.5} 简介及福州市 PM_{2.5} 污染分布特征[J]. 海峡科学,2012,8(66):20-22.
- [6] 姜智海,宋伟民. 核转录因子-kappa B 在 PM_{2.5} 染毒小鼠急性肺损伤中的作用[J]. 环境与职业医学,2005,12,22(6):483-485.
- [7] 曹强,宋伟民,阿斯亚. 大鼠慢性气管炎模型在颗粒物 PM_{2.5} 毒性研究中的应用[J]. 卫生研究,2005,11(6):667-669.
- [8] 庞卫乾,吕吉元,张明升. PM_{2.5} 不同成分在体染毒对大鼠血流动力学和心肌组织 Ang II 含量的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2012,6,10(10):714-716.

[修回日期]2016-04-01

(上接第 41 页)

- [10] 黄昕,崔磊,曹谊林. STZ 诱导裸鼠糖尿病模型的建立及观察[J]. 组织工程与重建外科杂志, 2007(04): 186-188.
- [11] 李兰芳,郭玉,唐国涛,等. 高脂饮食导致大鼠肝胰胰岛素抵抗的作用机制研究[J]. 中国病理生理杂志, 2011(02): 310-314.
- [12] Odegaard AO, Jacobs DJ, Sanchez OA, et al. Oxidative stress, inflammation, endothelial dysfunction and incidence of type 2 diabetes[J]. Cardiovasc Diabetol, 2016, 15(1): 51.
- [13] 殷峻,陈名道,周丽斌,等. 长程高脂饮食对实验大鼠糖尿病形成的影响[J]. 中国医师杂志, 2004(01): 47-49.
- [14] 姜骊,陈辉,何勇,等. 高脂饮食加低剂量链脲霉素建立小鼠 2 型糖尿病模型[J]. 中国比较医学杂志, 2010(03): 35-38.
- [15] 张毅,李慧颖,董玲,等. 链脲佐菌素诱导模拟 2 型糖尿病动物模型的研究进展[J]. 中华糖尿病杂志, 2011, 03(5): 433-435.
- [16] 陆洁,刘静,裴天仙,等. 自发性 2 型糖尿病模型 db/db 小鼠生物学特性研究[J]. 药物评价研究, 2013(05): 341-345.
- [17] 穆松牛,高云,万福生,等. 链尿佐菌素加高糖高脂饮食复制大鼠 2 型糖尿病模型[J]. 中国比较医学杂志, 2008(02): 19-22.
- [18] Islam MS, Prof. Imai Y, Dr. Morris MA, et al. Inflammatory Pathways Linked to Beta Cell Demise in Diabetes[Z]. Islam M

S. Springer Netherlands, 2014:1-50.

- [19] Muller YD, Golshayan D, Ehrichtou D, et al. Immunosuppressive effects of streptozotocin-induced diabetes result in absolute lymphopenia and a relative increase of T regulatory cells[J]. Diabetes, 2011, 60(9): 2331-2340.
- [20] Lee MY, Shim MS, Kim BH, et al. Effects of spironolactone and losartan on diabetic nephropathy in a type 2 diabetic rat model[J]. Diabetes Metab J, 2011, 35(2): 130-137.
- [21] Ivanac-Jankovic R, Coric M, Furic-Cunko V, et al. BMP-7 protein expression is downpression is downregulated in human diabetic nephropathy[J]. Acta Clin Croat, 2015, 54(2): 164-168.
- [22] Esser N, Paquot N, Scheen AJ. Inflammatory markers and cardiometabolic diseases[J]. Acta Clin Belg, 2015, 70(3): 193-199.
- [23] 成细华,喻嵘,明霞,等. 左归降糖益肾方对高脂饮食 2 型糖尿病 MKR 小鼠糖脂代谢及炎症反应的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010(12): 98-101.
- [24] Silva LR, Stefanello JM, Pizzi J, et al. Atherosclerosis subclinical and inflammatory markers in obese and nonobese children and adolescents[J]. Rev Bras Epidemiol, 2012, 15(4): 804-816.

[修回日期]2016-03-29