

应用弹性蛋白酶诱导构建新型慢性阻塞性肺疾病合并骨质疏松症的动物模型

陈文祥¹, 王雍立¹, 谢子昂², 范顺武², 蒋雪生¹

(1.湖州市中心医院 浙江大学湖州医院骨科, 浙江 湖州 313003; 2.浙江大学医学院附属邵逸夫医院骨科, 浙江 杭州 310020)

【摘要】 目的: 建立并评价弹性蛋白酶诱导小鼠慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)合并骨质疏松症模型。方法: 24 只健康雌性 8 周龄 C57BL/6 小鼠(重约 18 g)随机分为 3 组, 对照组予以气管内滴注生理盐水, 实验 1 组和实验 2 组气管内滴注弹性蛋白酶, 对照组和实验 1 组继续饲养 8 周后处死, 实验 2 组继续饲养 12 周后处死。HE 染色评估对照组和实验组小鼠肺组织与胫骨组织病理学改变。ELISA 检测支气管肺泡灌洗液与血清相关炎症因子含量。Micro-CT 检测小鼠股骨骨量相关参数。实时荧光定量 PCR 实验检测破骨与成骨相关基因表达情况。结果: 肺组织病理显示实验组肺泡结构紊乱, 肺泡壁变薄或断裂, 肺泡腔扩大。肺泡灌洗液炎症因子 IL-6 与 TNF- α 较对照组明显升高($P<0.001$), 血清炎症因子 IL-1 β 与 TNF- α 较对照组明显上升($P<0.001$)。实验组 BV/TV(骨体积分数)、Tb.Th(平均骨小梁厚度)与 Tb.N(平均骨小梁数)较对照组均明显降低($P<0.05$), 实验组 Tb.Sp(平均骨小梁分离度)和 BS/BV(骨表面积分数)较对照组明显增加($P<0.01$)。与对照组相比, 实验组小鼠胫骨组织破骨相关标志基因表达增加($P<0.05$), 成骨相关标志基因表达下降($P<0.05$)。实验 1 组与实验 2 组结果均呈时间依赖。结论: 该研究应用弹性蛋白酶成功构建 COPD 合并骨质疏松症模型, 为今后探究 COPD 合并骨质疏松症的发病机制提供合适的动物模型。

【关键词】 弹性蛋白酶; 肺疾病, 慢性阻塞性; 骨质疏松症; 小鼠

中图分类号: R681.8

DOI: 10.12200/j.issn.1003-0034.2020.04.013

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Establishment of a novel mouse mode of elastase-induced chronic obstructive pulmonary disease related osteoporosis
CHEN Wen-xiang, WANG Yong-li, XIE Zi-ang, FAN Shun-wu, and JIANG Xue-sheng. Department of Orthopaedics, Huzhou Central Hospital/Zhejiang University Huzhou Hospital, Huzhou 313003, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To establish and evaluate the model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) with osteoporosis induced by elastase in mice. **Methods:** Twenty-four healthy female 8-week-old C57BL/6 mice (weighing about 18 g) were randomly divided into three groups. The control group was given intratracheal drip of normal saline, the experimental group 1 and the experimental group 2 were given intratracheal drip of elastase, the control group and the experimental group 1 were kept for 8 weeks and then killed, the experimental group 2 was kept for 12 weeks and then killed. HE staining was used to evaluate the histopathological changes of lung and tibia in the control and experimental groups. The levels of serum inflammatory factors and broncho alveolar lavage factors (BALF) were detected by ELISA. Micro CT was used to detect the bone mass related parameters of mouse femur. The expression of osteoclastic and osteogenic genes was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. **Results:** Lung histopathology showed that the structure of alveoli in the experimental group was disordered, the walls of alveoli became thin or broken, and the alveoli cavity expanded. IL-6 and TNF- α in BALF were significantly higher than those in control group ($P<0.001$), while IL-1 β and TNF- α in serum inflammatory factors were significantly higher than those in control group ($P<0.001$). BV/TV (bone volume fraction), TB.Th (average bone trabecular thickness) and TB.N (average bone trabecular number) in the experimental group were significantly lower than those in the control group ($P<0.05$), TB.Sp (average bone trabecular separation) and BS/BV (bone surface area fraction) in the experimental group were significantly higher than those in the control group ($P<0.01$). Compared with the control group, the expression of osteoclast related marker genes increased in the experimental group ($P<0.05$), but decreased in the experimental group ($P<0.05$). The results of experiment 1 and experiment 2 were time-dependent. **Conclusion:** In this study, elastase was used to construct a COPD model

基金项目: 浙江省科技厅公益技术应用研究项目(编号: 2017C37119)

Fund program: Public Welfare Technology Application Research Project of Science and Technology Department of Zhejiang Province (No. 2017c37119)

通讯作者: 蒋雪生 E-mail: jiangxuesheng2000@163.com

Corresponding author: JIANG Xue-sheng E-mail: jiangxuesheng2000@163.com

with osteoporosis successfully, which provides a suitable animal model for the future study of the pathogenesis of COPD with osteoporosis.

KEYWORDS Elastase; Pulmonary disease, chronic obstructive; Osteoporosis; Mice

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是临床常见的呼吸系统疾病, 其发病率和病死率较高^[1-3]。随着 COPD 病程的进展, 相继出现多种并发症, 除了肺部并发症, 如气胸、呼吸衰竭, 也常常伴随肺外并发症, 而骨质疏松症是最常见的肺外并发症之一。据报道, COPD 患者发生椎体骨折的风险明显增加, 高达 24%~63%, 并且胸椎发生骨折的风险高于腰椎^[4]。另外, 对于继发性骨质疏松的发病因素, COPD 也是最常见的病因之一。COPD 及骨质疏松症均为老年人群高发疾病。老年骨质疏松症的发生, 尤其是骨质疏松症相关的下肢和脊柱骨折, 所带来的长期卧床对肺部打击较大, COPD 与骨质疏松症相互影响, 最终导致病情恶性循环^[5-7]。然而, 目前 COPD 合并骨质疏松症的发病机制尚不清楚, 其根本原因之一在于缺乏合适的动物模型, 因而难以深入进行机制研究。以往有研究^[8-9]使用烟熏的方式建立 COPD 合并骨质疏松症模型, 然而该模型存在较多不足。由于吸烟不仅诱发 COPD, 还是骨质疏松症等疾病的发病因素, 在研究 COPD 对骨质疏松症的影响时, 无法排除是否由吸烟引起。当前 COPD 合并骨质疏松症模型少且可靠性较差, 需要继续研究造模周期较短、可靠及有效的动物模型, 从而为探究该疾病的发病机制提供更优的模型选择。弹性蛋白酶可激活肺泡巨噬细胞, 诱发并维持支气管肺泡长久的炎症反应, 从而促进 COPD 的发生发展。此外, 控制弹性蛋白酶的作用时间可以诱导不同严重程度的 COPD 小鼠模型。2018 年 1 月至 2019 年 5 月, 笔者为建立新型 COPD 合并骨质疏松症小鼠模型, 应用弹性蛋白酶诱导, 结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

雌性健康 C57BL/6 小鼠购于浙江大学实验动物中心。猪弹性蛋白酶 (Sigma-Aldrich 公司, 美国), Trizol 试剂盒 (北京康为世纪公司), PrimeScript RT Master Mix 和 SYBR Green QPCR Master Mix (Takara Bio 公司, 日本), Primary antibodies (Abcam 公司, 英国), ELISA 试剂盒 (Cusabio 公司, 武汉)。PCR 仪 (Applied Biosystems 公司, 美国), PCR 引物 (北京擎科生物科技有限公司)。

1.2 小鼠 COPD 合并骨质疏松症模型的建立

制备猪弹性蛋白酶溶液, 将 0.1U 的猪弹性蛋白酶溶解于 50 ml 生理盐水^[10]。取健康 8 周龄 C57BL/6

小鼠 24 只 (重约 18 g), 随机设置对照组、实验 1 组与实验 2 组, 每组 8 只, 随机实验 1 组和实验 2 组给予 0.1 U 猪弹性蛋白酶溶液。将制备好的猪弹性蛋白酶溶缓慢液滴注入小鼠的气管中, 对照组滴注 50 ml 生理盐水。小鼠置于 SPF 级屏障内饲养, 室温 (24±2)°C, 湿度 (50±5)%, 每隔 12 h 昼夜循环, 给予常规饮食饲养。造模 8 周后处死对照组与实验 1 组小鼠, 12 周后处死实验 2 组小鼠。取血液、肺泡灌洗液、肺组织、股骨与胫骨组织。

1.3 观察项目与方法

1.3.1 组织学分析 小鼠肺组织与骨组织 肺组织使用 4% 的多聚甲醛固定, 然后进行石蜡包埋与切片。固定后的胫骨标本在放在 10% 的 EDTA 中脱钙 3 周, 随后进行石蜡包埋与切片。肺组织与胫骨组织切片分别行 HE 染色, 并在光学显微镜下观察分析。

1.3.2 Micro-CT 分析骨量变化 使用高分辨率 Micro-CT 扫描仪 (Skyscan, 1072) 对固定的小鼠股骨标本进行扫描分析。层厚 9 μm, X 线能量设置为 80 kV 和 80 μA。比较 BV/TV (骨体积分数)、Tb.Th (平均骨小梁厚度)、Tb.N (平均骨小梁数) 和 Tb.Sp (平均骨小梁分离度) 等参数^[11]。

1.3.3 qRT-PCR 检测骨组织相关基因表达情况 将小鼠胫骨组织从液氮中取出, 于组织研磨仪中充分研磨, 随后参照说明书提取总 RNA。应用逆转录试剂盒进行逆转录反应。反应条件: 95 °C 变性, 60~65 °C 退火, 35~45 个循环。以 GAPDH 为内参, 做相对定量分析, 即所扩增的目的基因片段的相对表达水平。小鼠 GAPDH, 组织蛋白酶 K (cathepsin K, CTSK), 抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP), c-Fos, nuclear factor of activated T-cells c1 (NFATc1), runt 相关转录因子 2 (runt-related transcription factor 2, Runx2), (alkaline phosphatase, ALP), I 型胶原 α (collagen type 1α, COL1α) 及骨钙素 (osteocalcin, OCN) 引物见表 1。

1.3.4 免疫组织化学分析胫骨组织 CTSK 表达情况 将石蜡包埋的胫骨组织切片用二甲苯脱蜡, 然后用梯度乙醇脱水, 并在含有 3% 过氧化氢溶液的 37 °C 去离子水中孵育 15 min, 去除内源性过氧化物。切片置于 pH 6.0 的柠檬酸盐缓冲液中进行微波进行抗原修复。然后滴加 10% 非免疫性动物血清, 室温孵育 10 min, 倾去勿洗。加入 CTSK 一抗工作液 (ab19027, Abcam 公司, 英国) 4 °C 过夜。滴加生物素标记的二抗, 37 °C 下孵育 15 min。滴加过氧化物酶标

表 1 引物序列

Tab.1 Primers used in the real-time PCR

基因名称	引物序列(5'-3')
GAPDH	正向:ACCCAGAAGACTGTGGATGG
	反向:CACATTGGGGGTAGGAACAC
CTSK	正向:ACCCAGAAGACTGTGGATGG
	反向:CACATTGGGGGTAGGAACAC
TRAP	正向:CTGGAGTGCACGATGCCAGCGACA
	反向:TCCGTGCTCGGCGATGGACCAGA
c-Fos	正向:CCAGTCAAGAGCATCAGCAA
	反向:AAGTAGTGCAGCCCGAGTA
NFATc1	正向:CCGTGCTTCCAAAATAACA
	反向:TCTGGGATGTGAACTCGGAA
ALP	正向:CCAACTCTTTTGTGCCAGAGA
	反向:GGCTACATTGGTGTGAGCTTTT
COL1a	正向:CCCAGAGTGGAAACAGCGATT
	反向:ATGAGTTCTTTCGCTGGGGTG
OCN	正向:GAGGCAATAAGTGTAGTGA ACAGA
	反向:AAGCCATACTGTTTGATAGCTCG
Runx2	正向:TTCTCCAACCCACGAATGCAC
	反向:CAGGTACGTGTGCTAGTCACT

记的链霉亲和素,37℃下孵育 15 min。然后用二氨基联苯胺(DAB)显色,在显微镜下观察并控制显色,自来水终止反应。苏木精再染色、洗涤、脱水、透明、中性树脂封片。以上步骤除封闭外,其余各步骤间均用 PBS 洗涤 3 次(每次 3 min)。然后在光学显微镜下进行观察并拍照。

1.3.5 ELISA 检测肺泡灌洗液及血清炎症因子 采用摘除眼球取血,处死小鼠后插入灌流针,用预冷的 1 ml PBS 行肺部支气管肺泡灌洗,吸出支气管肺泡灌洗液,血液与肺泡灌洗液离心后取上清置于 -80℃冰箱保存,实验前室温下解冻。使用 ELISA 试

剂盒检测相应蛋白,按照说明书操作,酶标仪测定 450 nm OD 值。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。定量资料采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)形式表示。多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用两独立样本 *t* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 弹性蛋白酶诱导小鼠 COPD 模型的建立

对照组小鼠气管予以生理盐水滴注,8 周后取材观察肺组织病理变化;实验组予以 0.1 U 弹性蛋白酶滴注,实验 1 组和实验 2 组分别于处理后 8 周、12 周观察肺组织病理变化。对照组小鼠肺组织无明显异常变化,实验组肺组织均显示肺泡结构紊乱,肺泡壁变薄或断裂,肺泡腔扩大,部分融合成肺大泡(图 1)。另外,检测了 3 组小鼠肺泡灌洗液 IL-1β 与 TNF-α 浓度,实验 1 组与实验 2 组两种炎症因子的含量均显著高于对照组,差异有统计学意义($P<0.001$),并且实验 2 组的 IL-1β 与 TNF-α 浓度较实验 1 组增加(表 2)。随后检测了 3 组小鼠血清 IL-6 与 TNF-α 浓度,实验组 IL-6 与 TNF-α 表达水平较对照组明显上升($P<0.001$),随着饲养时间的延长,该炎症因子的含量也随之增加(表 2)。

2.2 小鼠 COPD 诱发的骨质疏松症模型的建立

小鼠胫骨近端组织病理学结果显示实验 1 组与实验 2 组较对照组骨量明显降低(图 2a,2b,2c)。随后对 3 组小鼠股骨行三维 CT 重建并对相关参数进行分析。Micro-CT 图像显示实验组较对照组小鼠股骨骨量显著降低,表现为骨小梁变细、数量较少、间隙增宽(图 2d,2e,2f)。实验 1 组与实验 2 组 BV/TV(骨体积分数)、Tb.Th(平均骨小梁厚度)与 Tb.N(平均骨小梁数)较对照组均明显降低,差异有统计学意义

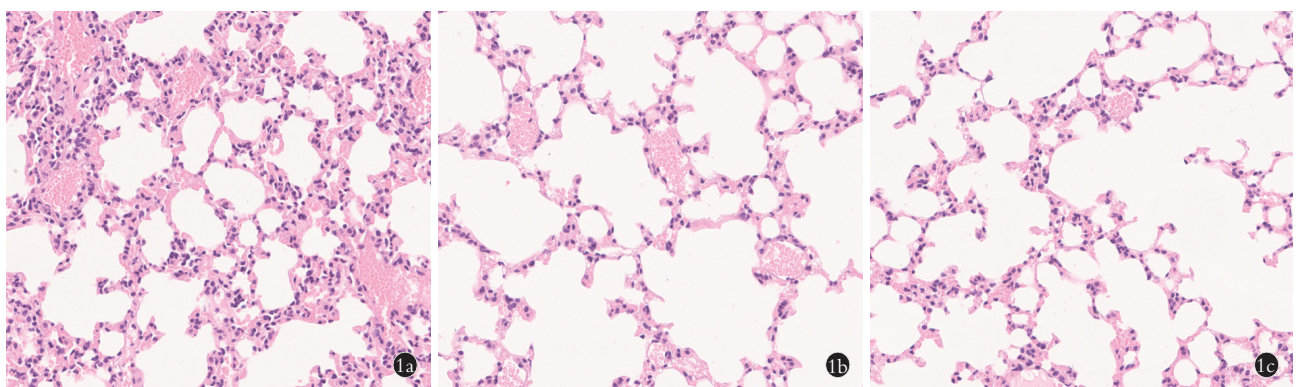


图 1 弹性蛋白酶诱导小鼠 COPD 模型的建立 气管内滴注生理盐水后饲养 8 周 (1a, 对照组) 与滴注 0.1 U 弹性蛋白酶后分别饲养 8 周 (1b, 实验 1 组) 和 12 周 (1c, 实验 2 组), 三组肺组织 HE 染色(×100)

Fig.1 Establishment of COPD model induced by elastase in mice After intratracheal instillation of normal saline for 8 weeks (1a, control group) and 0.1 U elastase for 8 weeks (1b, experimental group 1) and 12 weeks (1c, experimental group 2), HE staining of lung tissue in three groups (×100)

表 2 各组小鼠肺泡灌洗液与血清炎症因子含量($\bar{x}\pm s$, pg/ml)

Tab.2 Alveolar lavage fluid and serum inflammatory factor content in 3 groups of mice($\bar{x}\pm s$, pg/ml)

组别	鼠数	肺 IL-6	肺 TNF- α	血清 IL-1 β	血清 TNF- α
对照组	5	6.400 \pm 1.565	2.100 \pm 0.570	6.300 \pm 1.681	34.040 \pm 1.940
实验 1 组	5	27.920 \pm 1.653	6.200 \pm 0.933	29.640 \pm 2.023	55.680 \pm 3.831
实验 2 组	5	36.280 \pm 3.852	8.960 \pm 1.328	34.800 \pm 2.703	71.600 \pm 3.947
F 值		178.058	60.419	243.203	156.709
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:肺 IL-6:与对照组比较,实验 1 组 $t=-21.139, P<0.001$;实验 2 组 $t=-16.070, P<0.001$;肺 TNF- α :与对照组比较,实验 1 组 $t=-8.387, P<0.001$;实验 2 组 $t=-10.016, P<0.001$;血清 IL-1 β :与对照组比较,实验 1 组 $t=-19.842, P<0.001$;实验 2 组 $t=-20.023, P<0.001$;血清 TNF- α :与对照组比较,实验 1 组 $t=-11.268, P<0.001$;实验 2 组 $t=-19.096, P<0.001$

Note:IL-6 in lung:compared with the control group, the 8-week group, $t=-21.139, P<0.001$; the 12-week group, $t=-16.070, P<0.001$; TNF- α in lung: compared with the control group, the 8-week group, $t=-8.387, P<0.001$; the 12-week group, $t=-10.016, P<0.001$; IL-1 β in serum: compared with the control group, the 8-week group, $t=-19.842, P<0.001$; the 12-week group, $t=-20.023, P<0.001$; TNF- α in serum: compared with the control group, the 8-week group, $t=-11.268, P<0.001$; the 12-week group, $t=-19.096, P<0.001$

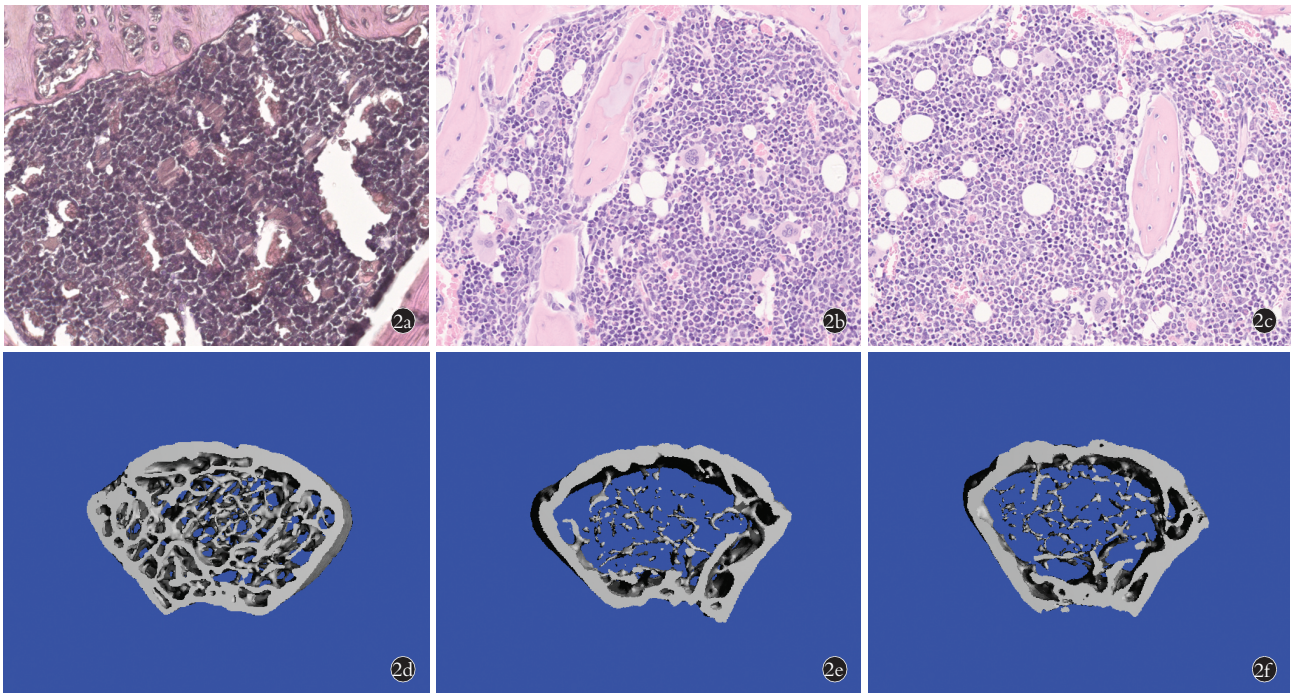


图 2 小鼠 COPD 诱发的骨质疏松症模型评价 2a,2b,2c. 气管内滴注生理盐水后饲养 8 周(2a. 对照组)与滴注 0.1 U 弹性蛋白酶后分别饲养 8 周(2b. 实验 1 组)和 12 周(2c. 实验 2 组),3 组胫骨组织 HE 染色($\times 100$) 2d,2e,2f. 3 组小鼠股骨远端三维 CT 重建(2d. 对照组;2e. 实验 1 组;2f. 实验 2 组)

Fig.2 Evaluation of osteoporosis model induced by COPD in mice 2a,2b,2c. After intratracheal instillation of normal saline for 8 weeks(2a. control group) and 0.1 U elastase for 8 weeks (2b. experimental group 1) and 12 weeks (2c. experimental group 2), the tibial tissues of three groups were stained with he ($\times 100$) 2d,2e,2f. Three dimensional CT reconstruction of distal femur in three groups of mice (2d. control group;2e. experimental group 1;2f. experimental group 2)

($P<0.05$),实验 2 组测量值低于实验 1 组(表 3)。此外,实验 1 组与实验 2 组 Tb.Sp(平均骨小梁分离度)和 BS/BV(骨表面积分数)较对照组明显增加,差异有统计学意义($P<0.01$),且实验 2 组测量值高于实验 1 组(表 3)。以上结果表明,小鼠 COPD 诱发骨质疏松症的发生发展,并随时间延长,严重程度增加。

2.3 小鼠 COPD 对破骨与成骨的影响

为了进一步了解弹性蛋白酶诱发的小鼠 COPD 对骨代谢的影响,使用实时荧光定量 PCR 技术分析破骨相关基因与成骨相关基因 mRNA 的表达情况。实验 1 组与实验 2 组小鼠胫骨组织破骨相关基因 NFATc1、c-Fos、CTSK 与 TRAP mRNA 表达水平较

表 3 各组小鼠股骨远端 micro-CT 形态计量学参数定量($\bar{x}\pm s$)

Tab.3 Quantitative morphometric parameters of micro CT of distal femur in three groups of mice($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	BV/TV (%)	Tb.N(mm ⁻¹)	Tb.Th(mm)	Tb.Sp(mm)	BS/BV (mm ⁻¹)
对照组	5	12.280±1.665	3.972±0.429	0.040±0.006	0.248±0.036	46.920±3.848
实验 1 组	5	4.822±0.807	2.363±0.356	0.029±0.004	0.376±0.063	56.349±2.844
实验 2 组	5	3.140±0.508	1.826±0.260	0.028±0.004	0.475±0.040	61.988±4.476
F 值		96.403	49.451	9.450	28.188	20.248
P 值		<0.001	<0.001	0.003	<0.001	<0.001

注:BV/TV:与对照组比较,实验 1 组 $t=9.013, P<0.001$;实验 2 组 $t=11.741, P<0.001$;Tb.N:与对照组比较,实验 1 组 $t=6.454, P<0.001$;实验 2 组 $t=9.572, P<0.001$;Tb.Th:与对照组比较,实验 1 组 $t=3.190, P=0.014$;实验 2 组 $t=3.896, P=0.005$;Tb.Sp:与对照组比较,实验 1 组 $t=-3.936, P=0.007$;实验 2 组 $t=-9.374, P<0.001$;BS/BV:与对照组比较,实验 1 组 $t=-4.406, P=0.003$;实验 2 组 $t=-5.708, P<0.001$

Note:BV/TV:compared with the control group,the 8-week group, $t=9.013, P<0.001$;the 12-week group, $t=11.741, P<0.001$;Tb.N:compared with the control group,the 8-week group, $t=6.454, P<0.001$;the 12-week group, $t=9.572, P<0.001$;Tb.Th:compared with the control group,the 8-week group, $t=3.190, P=0.014$;the 12-week group, $t=3.896, P=0.005$;Tb.Sp:compared with the control group,the 8-week group, $t=-3.936, P=0.007$;the 12-week group, $t=-9.374, P<0.001$;BS/BV:compared with the control group,the 8-week group, $t=-4.406, P=0.003$;the 12-week group, $t=-5.708, P<0.001$

表 4 各组小鼠胫骨组织破骨相关基因 mRNA 表达水平及 CTSK 免疫组化相对定量($\bar{x}\pm s$)

Tab.4 mRNA expression level of osteoclast related genes in tibia and the relative quantitation of CTSK immunohistochemistry in three groups of mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	NFATc1 mRNA	c-Fos mRNA	CTSK mRNA	TRAP mRNA	CTSK Protein
对照组	3	1.000±0.078	1.000±0.069	1.000±0.105	1.000±0.113	1.000±0.131
实验 1 组	3	2.180±0.102	1.780±0.066	3.333±0.392	1.910±0.168	2.733±0.551
实验 2 组	3	2.960±0.259	2.070±0.196	5.180±0.316	2.730±0.218	3.867±0.306
F 值		104.459	58.515	149.34	71.062	45.340
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:NFATc1:与对照组比较,实验 1 组 $t=-15.960, P<0.001$;实验 2 组 $t=-12.515, P<0.001$;c-Fos:与对照组比较,实验 1 组 $t=-14.162, P<0.001$;实验 2 组 $t=-8.962, P=0.001$;CTSK:与对照组比较,实验 1 组 $t=-9.963, P=0.006$;实验 2 组 $t=-21.731, P<0.001$;TRAP mRNA:与对照组比较,实验 1 组 $t=-7.771, P=0.003$;实验 2 组 $t=12.196, P<0.001$;CTSK Protein:与对照组比较,实验 1 组 $t=-5.304, P=0.027$,实验 2 组 $t=-14.941, P=0.001$

Note:NFATc1 mRNA:compared with the control group,the 8-week group, $t=-15.960, P<0.001$;the 12-week group, $t=-12.515, P<0.001$;c-Fos mRNA:compared with the control group,the 8-week group, $t=-14.162, P<0.001$;the 12-week group, $t=-8.962, P=0.001$;CTSK mRNA:compared with the control group,the 8-week group, $t=-9.963, P=0.006$;the 12-week group, $t=-21.731, P<0.001$;TRAP mRNA:compared with the control group,the 8-week group, $t=-7.771, P=0.003$;the 12-week group, $t=12.196, P<0.001$;CTSK Protein:compared with the control group,the 8-week group, $t=-5.304, P=0.027$;the 12-week group, $t=-14.941, P=0.001$

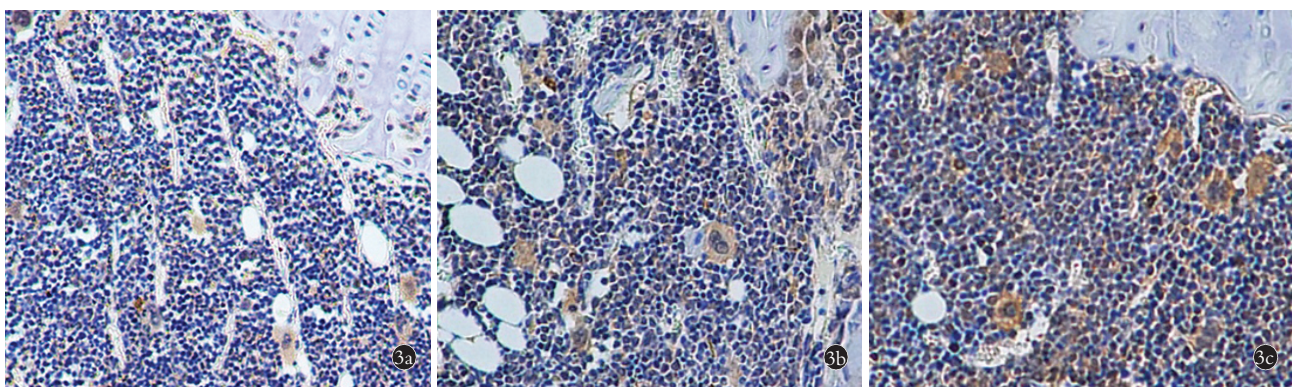


图 3 小鼠胫骨组织破骨相关蛋白 CTSK 免疫组织化学分析(HE×100) 3a.对照组 3b.实验 1 组 3c.实验 2 组

Fig.3 CTSK immunohistochemical analysis of osteoclast related protein in mouse tibia (HE×100) 3a. control group 3b. experimental group 1 3c. experimental group 2

对照组明显升高,差异有统计学意义($P<0.01$) (表 4)。胫骨组织 CTSK 免疫组织化学结果显示实验 1 组与实验 2 组 CTSK 表达水平较对照组明显升高($P<0.05$) (图 3, 表 4)。与之对应,检测发现实验 1 组与实验 2 组小鼠胫骨组织成骨相关基因 COL1 α 、Runx2、ALP 与 OCN mRNA 表达水平较对照组明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$) (表 5)。实验组破骨与成骨相关基因表达水平均呈时间依赖。以上结果在一定程度上表明,弹性蛋白酶诱发的小鼠 COPD 既促进骨吸收又抑制骨形成。

3 讨论

COPD 合并骨质疏松症一般病情复杂,病死率较高,给患者家庭与社会带来沉重的负担^[12]。然而国内外很少有研究报道 COPD 合并骨质疏松症动物模型的构建方法,尽管独立的骨质疏松症模型或 COPD 模型的建立方法较多,该现状严重限制了该疾病的进一步深入研究。因而,试图采用小鼠气管内滴注弹性蛋白酶的方法诱导 COPD,进而诱发骨质疏松症,从而构建小鼠 COPD 合并骨质疏松症模型。

在使用弹性蛋白酶诱导 COPD 形成过程中,使用相同浓度的弹性蛋白酶处理不同观察时间组别的实验小鼠。本研究不同于 Tsukamoto 等^[10]研究,该研究实验组小鼠使用不同浓度的弹性蛋白酶处理,观察时间相同。相比于该项研究,本研究的优势在于观察不同病程的 COPD 对骨平衡的影响。本研究实验组分别于处理后 8 周和 12 周,取小鼠肺组织进行 HE 染色,观察肺组织病理变化,结果显示予以弹性蛋白酶刺激的小鼠,肺泡腔增大,肺泡壁破坏增加。这与 Li 等^[9]的研究结果类似,该研究使用单纯烟熏或烟熏结合细菌感染的方式作用于大鼠,两种方式分别作用 12 周及 20 周后观察肺组织病理。尽管该

研究使用大鼠作为实验动物,造模后的肺组织病理表现与本研究相似。随后,检测了小鼠支气管肺泡腔灌洗液与血清炎症相关细胞因子的含量。弹性蛋白酶诱导的两组支气管肺泡腔灌洗液 IL-1 β 与 IL-6 含量较对照组明显升高,血清 IL-1 β 与 TNF- α 表达水平也明显上调。Cai 等^[12]在使用 LPS 诱导大鼠 COPD 后,发现大鼠血清炎症因子,如 TNF- α ,含量明显升高,该结果与本研究结果一致。弹性蛋白酶作用于气道弹性蛋白,并激活肺泡巨噬细胞,从而引起炎症相关细胞因子的表达增加^[13-14]。另外,本研究小鼠肺组织的炎症变化,肺泡腔破坏增加,这些改变与人 COPD 的肺组织病理变化相一致^[15-16]。

为了验证骨质疏松症模型是否成功构建,从组织病理、影像学及分子生物学角度进行分析。组织病理结果显示与对照组相比,弹性蛋白酶诱导 COPD 组小鼠的胫骨组织骨量减少。为了进一步分析骨质疏松的变化情况,应用 Micro-CT 分析各组小鼠胫骨组织的相关参数,包括骨体积分数、平均骨小梁厚度、平均骨小梁数、骨表面积分数和平均骨小梁分离度等。结果显示弹性蛋白酶处理组小鼠胫骨骨体积分数、平均骨小梁厚度及平均骨小梁数均明显降低,而骨表面积分数和平均骨小梁分离度显著降低。影像学数据支持胫骨病理组织学结果,均提示弹性蛋白酶气管内处理后,实验组小鼠出现骨质疏松表现。尽管根据以上结果,已验证小鼠骨质疏松模型的建立,对于弹性蛋白酶诱导骨质疏松症是引起成骨降低还是导致破骨增加抑或是两者均存在,仍需进一步探究。因此,分析了骨组织的相关基因表达情况,包括成骨相关标志基因和破骨相关标志基因。结果显示成骨相关标志基因表达上调,而破骨相关标志基因表达下降。根据上述结果,发现弹性蛋白酶诱发

表 5 各组小鼠胫骨组织成骨相关基因 mRNA 表达水平($\bar{x}\pm s$)
Tab.5 mRNA expression level of osteogenic related genes in mouse tibia($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	COL1 α mRNA	Runx2 mRNA	ALP mRNA	OCN mRNA
对照组	3	1.000 \pm 0.125	1.000 \pm 0.114	1.000 \pm 0.121	1.000 \pm 0.101
实验 1 组	3	0.303 \pm 0.045	0.343 \pm 0.055	0.500 \pm 0.053	0.257 \pm 0.040
实验 2 组	3	0.210 \pm 0.026	0.033 \pm 0.047	0.410 \pm 0.052	0.230 \pm 0.030
F 值		90.989	85.136	44.793	133.966
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:COL1 α mRNA:与对照组比较,实验 1 组 $t=9.061, P=0.006$; 实验 2 组 $t=10.685, P<0.001$; Runx2 mRNA:与对照组比较,实验 1 组 $t=9.011, P=0.003$; 实验 2 组 $t=10.794, P<0.001$; ALP mRNA:与对照组比较,实验 1 组 $t=6.547, P=0.010$; 实验 2 组 $t=7.725, P=0.006$; OCN mRNA:与对照组比较,实验 1 组 $t=11.786, P<0.001$; 实验 2 组 $t=12.602, P<0.001$

Note:COL1 α mRNA:compared with the control group,the 8-week group, $t=9.061, P=0.006$;the 12-week group, $t=10.685, P<0.001$;Runx2 mRNA:compared with the control group,the 8-week group, $t=9.011, P=0.003$; the 12-week group, $t=10.794, P<0.001$;ALP mRNA:compared with the control group,the 8-week group, $t=6.547, P=0.010$;the 12-week group, $t=7.725, P=0.006$;OCN mRNA:compared with the control group,the 8-week group, $t=11.786, P<0.001$;the 12-week group, $t=12.602, P<0.001$

的 COPD 既可以促进骨吸收又会抑制骨形成。最后,检测所有实验对象血清部分炎症指标,发现 COPD 组小鼠较正常小鼠明显增加。炎症是骨质疏松症发生发展的重要因素,弹性蛋白酶诱发 COPD 导致血液炎症因子表达增加,可以在一定程度上解释本模型骨质疏松症的发生^[17]。然而,除了炎症因素,COPD 引起骨质疏松症的具体发病机制非常复杂,还需进行大量基础实验深入探究。

大量实验构建弹性蛋白酶诱导 COPD 合并骨质疏松症模型并加以验证,研究仍存在一些不足。首先,采用小鼠作为实验动物,未对其他实验动物进行研究。多种实验动物的成功构建对本模型的推广应用更有意义。其次,虽然本研究证明了 COPD 的构建成功,如果小鼠进行呼吸功能检测,可以了解 COPD 的严重程度。今后我们针对这些不足,进一步研究加以完善。

本研究应用弹性蛋白酶成功构建 COPD 合并骨质疏松症模型,为今后探究 COPD 合并骨质疏松症的发病机制提供合适的动物模型。针对发病机制,研发新药及其他治疗手段预防 COPD 引起的骨质疏松症发生,达到降低骨折发生风险的目的。

参考文献

- [1] Aboumatar H, Naqibuddin M, Chung S, et al. Effect of a program combining transitional care and long-term self-management support on outcomes of hospitalized patients with chronic obstructive pulmonary disease: a randomized clinical trial [J]. *JAMA*, 2018, 320(22): 2335–2343.
- [2] Dwyer-Lindgren L, Bertozzi-Villa A, Stubbs RW, et al. Trends and patterns of differences in chronic respiratory disease mortality among US counties, 1980–2014 [J]. *JAMA*, 2017, 318(12): 1136–1149.
- [3] Bon J. Acute chronic obstructive pulmonary disease exacerbations and cardiovascular risk: A time for lung disease-specific screening strategies [J]. *Ann Am Thorac Soc*, 2018, 15(8): 913–915.
- [4] Jaramillo JD, Wilson C, Stinson DS, et al. Reduced bone density and vertebral fractures in smokers. Men and COPD patients at increased risk [J]. *Ann Am Thorac Soc*, 2015, 12(5): 648–656.
- [5] Graat-Verboom L, van den Borne BE, Smeenk FW, et al. Osteoporosis in COPD outpatients based on bone mineral density and vertebral fractures [J]. *J Bone Miner Res*, 2011, 26(3): 561–568.
- [6] Ryan CS, Petkov VI, Adler RA. Osteoporosis in men: the value of laboratory testing [J]. *Osteoporos Int*, 2011, 22(6): 1845–1853.
- [7] 管军辉, 郑文标, 黄皆和, 等. 骨质疏松性椎体压缩性骨折椎体后凸成形术后隐性失血及其影响 [J]. *中国骨伤*, 2019, 32(5): 439–443.
- [8] GUAN JH, ZHENG WB, HUANG JH, et al. Analysis of hidden blood loss after percutaneous kyphoplasty for osteoporotic vertebral compression fracture and its influencing factors [J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2019, 32(5): 439–443. Chinese with abstract in English.
- [8] Yang T, Ya L, Jiansheng L, et al. Effects of therapies for regulating and reinforcing lung and kidney on osteoporosis in rats with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *J Tradit Chin Med*, 2015, 35(2): 175–183.
- [9] Li Y, Li SY, Li JS, et al. A rat model for stable chronic obstructive pulmonary disease induced by cigarette smoke inhalation and repetitive bacterial infection [J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35(10): 1752–1760.
- [10] Tsukamoto M, Mori T, Wang KY, et al. Systemic bone loss, impaired osteogenic activity and type I muscle fiber atrophy in mice with elastase-induced pulmonary emphysema: Establishment of a COPD-related osteoporosis mouse model [J]. *Bone*, 2019, 120: 114–124.
- [11] Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography [J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 25(7): 1468–1486.
- [12] Cai C, Zhang HY, Le JJ, et al. Inflammatory airway features and hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in asthmatic rats combined with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2010, 123(13): 1720–1726.
- [13] 徐保平, 姚敏, 王晓涛, 等. 巨噬细胞极化在脊髓损伤中的作用机制 [J]. *中国骨伤*, 2018, 31(1): 88–92.
- [13] XU BP, YAO M, WANG XT. Mechanism of macrophage polarization on spinal cord injury [J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2018, 31(1): 88–92. Chinese with abstract in English.
- [14] 刘国印, 赵建宁, 王瑞. 磨损微粒诱导细胞凋亡与无菌性松动的研究进展 [J]. *中国骨伤*, 2013, 26(9): 791–796.
- [14] LIU GY, ZHAO JN, WANG R. Progress on the relationship between wear debris-induced apoptosis and aseptic loosening of prosthesis [J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2013, 26(9): 791–796. Chinese with abstract in English.
- [15] Hulina-Tomaškovic A, Heijink IH, Jonker MR, et al. Pro-inflammatory effects of extracellular Hsp70 and cigarette smoke in primary airway epithelial cells from COPD patients [J]. *Biochimie*, 2019, 156: 47–58.
- [16] Vitenberga Z, Pilmane M, Babjoniševa A. The evaluation of inflammatory, anti-inflammatory and regulatory factors contributing to the pathogenesis of COPD in airways [J]. *Pathol Res Pract*, 2019, 215(1): 97–105.
- [17] Chen X, Zhi X, Pan P, et al. Matrine prevents bone loss in ovariectomized mice by inhibiting RANKL-induced osteoclastogenesis [J]. *FASEB J*, 2017, 31(11): 4855–4865.

(收稿日期: 2019-08-20 本文编辑: 王玉蔓)