

以SPF级早产猪建立肺发育模型的初步实验研究*

王秋^{1,2}, 周丹^{2,3}, 谢亮^{3,4,5}, 石芳^{3,4,5}, 张伟坚^{2,3}, 伏洪玲^{2,3}, 刘瀚旻^{2,3,4,5}△, 丁玉春⁶

1. 四川大学华西第二医院 康复医学科(成都 610041);

2. 四川大学华西第二医院/复旦大学生命科学学院 肺发育与相关疾病联合实验室(成都 610041);

3. 四川大学华西第二医院 小儿呼吸免疫科(成都 610041); 4. 出生缺陷与相关妇女儿童疾病教育部重点实验室(四川大学)(成都 610041);

5. 国家卫生健康委员会时间生物学重点实验室(四川大学)(成都 610041); 6. 重庆市畜牧科学院(重庆 402460)

【摘要】 目的 探究在排除高氧、机械通气、药物等医学干预的条件下,建立无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级巴马早产猪肺发育动物模型的最佳剖宫产时间。方法 选择胎龄113天(gestational days, GD)、GD107、GD104、GD101和GD98的SPF级巴马猪系母猪分别进行剖宫产,观察早产仔猪存活情况。根据早产猪的一般资料、存活情况和肺石蜡切片HE染色观察结果,寻找最佳的建立SPF级早产猪肺发育模型的剖宫产时间。结果 剖宫产7只母猪,共获取仔猪55只,其中产后3 h仍存活的共25只。GD98和GD101的仔猪全部死亡, GD104的仔猪存活7只,存活率为33.33%(7/21), GD107和GD113的仔猪全部存活。GD98的仔猪已具备完整的外形和肺部形状; GD104仔猪的肺部开放度已较大,薄壁型肺泡密度更高; GD107仔猪的肺基本处于开放状态,薄壁肺泡密度基本与正常足月猪相同。结论 本研究提示可以利用无医疗干预的GD104 SPF级早产猪建立SPF级早产猪肺发育模型。

【关键词】 早产 动物模型 肺 发育

Preliminary Experimental Study of Establishing a Lung Development Model with Specific Pathogen Free Preterm Pigs WANG Qiu^{1,2}, ZHOU Dan^{2,3}, XIE Liang^{3,4,5}, SHI Fang^{3,4,5}, ZHANG Wei-jian^{2,3}, FU Hong-ling^{2,3}, LIU Han-min^{2,3,4,5}△, DING Yu-chun⁶. 1. Department of Rehabilitation Medicine, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. The Joint Laboratory for Lung Development and Related Diseases of West China Second University Hospital, Sichuan University and School of Life Sciences of Fudan University, Chengdu 610041, China; 3. Department of Pediatric Pulmonology and Immunology, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 4. Key Laboratory of Birth Defects and Related Diseases of Women and Children of the Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 5. Key Laboratory of Chronobiology of the National Health Commission, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 6. Chongqing Academy of Animal Sciences, Chongqing 402460, China

△ Corresponding author, E-mail: hanmin@vip.163.com

【Abstract】 Objective To determine the best time for conducting cesarean section for the establishment of an animal model of lung development with specific pathogen free (SPF) preterm Bama minipigs under the condition of not making medical interventions such as hyperoxia, mechanical ventilation, or medication. **Methods** SPF Bama sows at gestational day (GD) 113, GD107, GD104, GD101, and GD98 were selected and cesarean sections were performed. Then, the viability of the preterm piglets were observed. Based on their general data, viability, and paraffin sections stained with hematoxylin and eosin, the best time for performing cesarean section in order to build a SPF preterm pig model of lung development was determined. **Results** Cesarean sections were performed on a total of 7 sows and 55 piglets were delivered, among which 25 were still alive 3 hours after delivery. Seven piglets of GD104 and all piglets of GD107 and GD113 survived, while piglets of GD98 and GD101 all died. The survival rate of piglets of GD104 was 33.33% (7/21). Piglets of GD98 already possessed fully developed physical appearance and lung shape. Piglets from GD104 had better lung expansion and higher density of thin-walled alveoli. The lungs of GD107 piglets were basically fully expanded, and the density of thin-walled alveoli was almost the same as that of normal full-term piglets. **Conclusions** Findings of this study suggest that SPF preterm piglets of GD104 with no specific pathogen exposure and no medical intervention can be used to establish a SPF preterm pig model of lung development.

【Key words】 Preterm Animal model Lung Development

近年来,随着围产医学和新生儿医学的发展,早产和

低体质量儿的存活率越来越高,尤其是早产儿中极低出生体质量儿和超低出生体质量儿存活率也有所提高,但同时早期发生急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)及经过各种干预措施(特别是呼

* 国家自然科学基金(No. 81941007)和四川省科技计划重点研发项目(No. 2019YFS0037)资助

△ 通信作者, E-mail: hanmin@vip.163.com

吸支持)存活的早产儿在后期发生慢性肺部疾病(最常见的为支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD))的发病率也在增高^[1-2]。因此,研究这些早产儿肺部在生命早期的生理病理变化,有助于对肺部疾病的认识,同时对肺部疾病的治疗及预后具有指导意义。但以人类新生儿为研究对象有悖于医学伦理,选择合适的动物模型来研究早产儿肺部早期的生理病理变化显得尤为重要。目前最常见的动物模型来自大小鼠等啮齿类动物,但鼠的肺部在解剖、生理等方面与人的差别较大^[3],而非人类灵长类动物虽然在遗传、生理及行为等表现上与人类高度相似,但价格昂贵且来源有限。有研究表明猪在遗传性、生理学和解剖学上与人类相似^[4-5]。猪作为实验模型动物具有较多优势,对研究生命早期各组织器官在不同状态下的生理病理状态具有重要意义^[5-7]。我国特有的巴马小型猪,具有遗传性稳定、繁殖力强、体型较矮小、性成熟早、器官结构及部分生理生化指标与人类相似等生物学特性,是理想的实验动物模型,在探索和研究人类疾病的发病机制、预防及治疗方面有其独特的优势^[8]。同时,无特定病原体(specific pathogen free, SPF)猪因没有携带主要的潜在感染及对科学研究干扰大的病原体,比普通猪更适于建立动物模型^[9]。

产前使用糖皮质激素、出生后使用外源性肺表面活性物质、高浓度给氧和机械通气等措施在抢救胎儿的同时也可能造成肺损伤及重塑,因此,本研究期望建立没有医疗干预的SPF级早产猪模型,即在剖宫产后,仅对仔猪进行呼吸道清理、保温等必要的措施,减少对仔猪肺发育的额外干扰,为研究肺发育的机制和肺部疾病的发生发展提供条件。

1 材料与方法

1.1 实验动物

经重庆市畜牧科学院实验动物伦理委员会批准,选用重庆市畜牧科学院提供的巴马猪进行建立早产猪肺发育模型的实验,母猪及仔猪遗传背景明确,来源清楚,有相应的动物生产合格证。经人工饲养,控制其病原微生物和寄生虫,检测其血清、抗凝血、咽拭子、鼻腔拭子、直肠拭子等,检测标准符合中国实验动物学会团体标准(T/CALAS 33-2017)的SPF级猪微生物学监测。

1.2 SPF级早产猪的获取

以配种日期作为妊娠起始日(GD0),母猪的平均预产期为114 d(GD114),根据妊娠期仔猪发育周期,妊娠期小于107 d的为早产仔猪。母猪的品种(巴马猪)、耳号、体质量、胎次、数量及购入时间等明确。选择外观健康

且预产期前1个月垂直病原菌抗原检测为阴性的怀孕巴马母猪进行剖宫产。实验用巴马母猪按照重庆市畜牧科学院SPF级实验用猪基地规章制度喂养,分别于母猪预产期前7 d、10 d、13 d、16 d(即GD107、GD104、GD101、GD98)按SPF仔猪生产标准行剖腹取胎手术,同时剖宫产1只GD113的母猪作为足月产仔猪。计算产后3 h仍存活的仔猪存活率。

1.3 SPF级早产猪的饲养与管理

由于饲养SPF级猪的猪舍与手术间在不同屏障环境下,因此采用无菌运输隔离器将剖腹产获得的新生仔猪转移进入饲养用屏障环境内进行人工饲养。SPF级早产猪的营养需求与普通级足月猪类似。用于饲养的代乳粉、日粮和饮水都需要分装、真空后辐照灭菌(Co60)处理,并按照T/CALCAS71-2019中饲料和饮水微生物检测方法进行检测无微生物生长的用于屏障环境下SPF级猪饲养。

1.4 早产猪肺组织的收集及处理

产后3 h内死亡的仔猪在死亡后立即取肺组织,产后3 h仍存活的仔猪采用1%戊巴比妥按2.5 μL/g的剂量于腹腔内注射麻醉,倒“T”字型切口剪开巴马猪胸部皮肤,暴露胸腔里的肺组织。将左肺剥离,用弯剪去除左肺多余的系膜,用针头在气管上方刺入气管,并用止血钳固定针头。将体积分数为4%多聚甲醛(PFA)溶液置于连接上述针头的开口容器中,固定高度差20 cm,使4% PFA溶液自然滴入肺组织中至溶液不再滴入肺组织,此时整个肺组织处于自然扩张状态,结扎住气管,拔出针头。用结扎线沿着左肺门结扎,小心取出完整的左肺组织放入装有4% PFA溶液的容器中固定,置4 °C冰箱固定16~24 h。将固定后肺组织取出放入冰PBS溶液中洗3次,取左下叶肺组织用于制作石蜡切片。

1.5 石蜡切片及HE染色

将取得的仔猪左肺肺组织放置于石蜡包埋盒中,依次将肺组织进行酒精浸泡、脱水浸蜡、包埋、切片、烘片等处理形成石蜡切片并保存于4 °C冰箱中。最后按HE染色步骤染色,分别在40倍和200倍显微镜下观察肺组织结果和肺泡结果。

2 结果

2.1 早产猪的一般情况

根据实验计划,首期实验剖宫产GD107、GD104、GD101和GD98母猪各1只,GD98和GD101剖宫产的仔猪全部死亡,GD104剖宫产获得仔猪6只,其中3只存活3 h以上。GD107剖宫产获得仔猪5只,全部存活3 h以上。结合既往文献和实验情况,初步认为GD104的仔猪有存活的

可能性,因此再次剖宫产GD104的母猪2只,共获得仔猪15只,其中4只存活3 h以上。剖宫产1只GD113足月产母猪,共获得12只仔猪,全部存活(表1)。

从表1可以看出胎龄小于107 d的早产仔猪存活率较低,且胎龄越小存活率越低。所有死亡的仔猪均显示出

相似的临床症状如口唇发绀、呼吸浅快、精神萎靡、四肢肌张力降低。而GD107和GD113剖宫产的仔猪全部存活,情况良好。解剖GD98的仔猪后可观察到其肺部已具有完整的外部形状,但与足月(GD113)剖宫产后即处死的仔猪相比较,其肺部体积较小,肺部广泛塌陷,但仍能经4% PFA溶液灌注成形(图1)。

表 1 各组仔猪一般情况

Table 1 General information of the piglets in each group

Group	n	Live piglets/case (%)	Body mass/g	Gender (male/female)
GD98	5	0 (0)	240±29.15	1/4
GD101	12	0 (0)	234±53.51	4/8
GD104	21	7 (33.3)	391±90.91	9/12
GD107	5	5 (100)	546±51.77	2/3
GD113	12	12 (100)	615±101.22	8/4

GD: Age in gestational days.

2.2 肺组织结构比较

按照实验计划对不同胎龄早产猪的左肺肺组织石蜡切片进行HE染色。在低倍镜下(图2)可见, GD98时肺组织已有基本结构,但开放区域较少,随着胎龄的增加,开放区域增多,到GD107,肺基本处于开放状态。高倍镜下(图3)可见, GD98时肺泡结构没有表现出正常成年肺典型的薄壁,并且存在小部分肺泡不是均匀开放的。随着

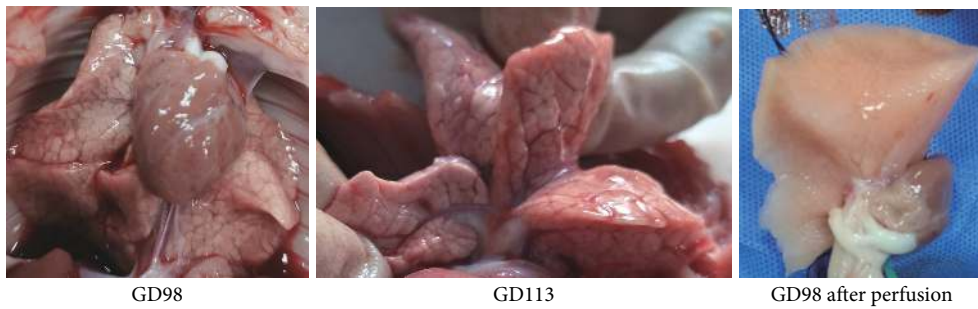


图 1 GD98和GD113仔猪的肺部外形

Fig 1 External appearance of the lungs of GD98 and GD113 piglets

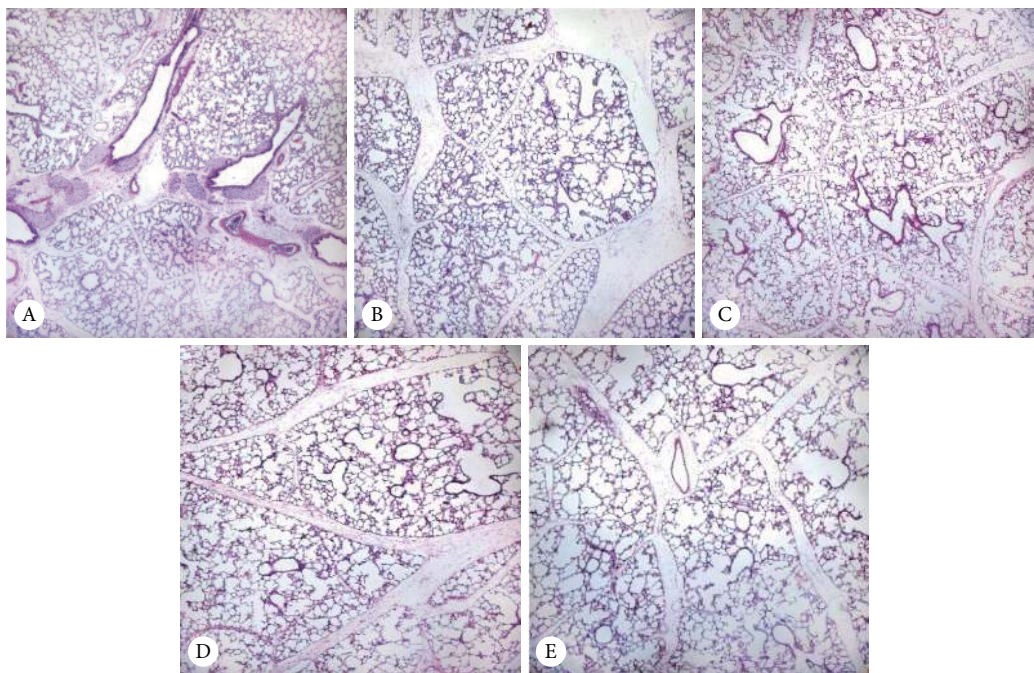


图 2 不同胎龄肺组织在低倍镜下的观察结果。HE染色 ×40

Fig 2 Observation of lung tissue of different gestational ages at low magnification. HE staining ×40

A: GD98; B: GD101; C: GD104; D:GD107; E: GD113.

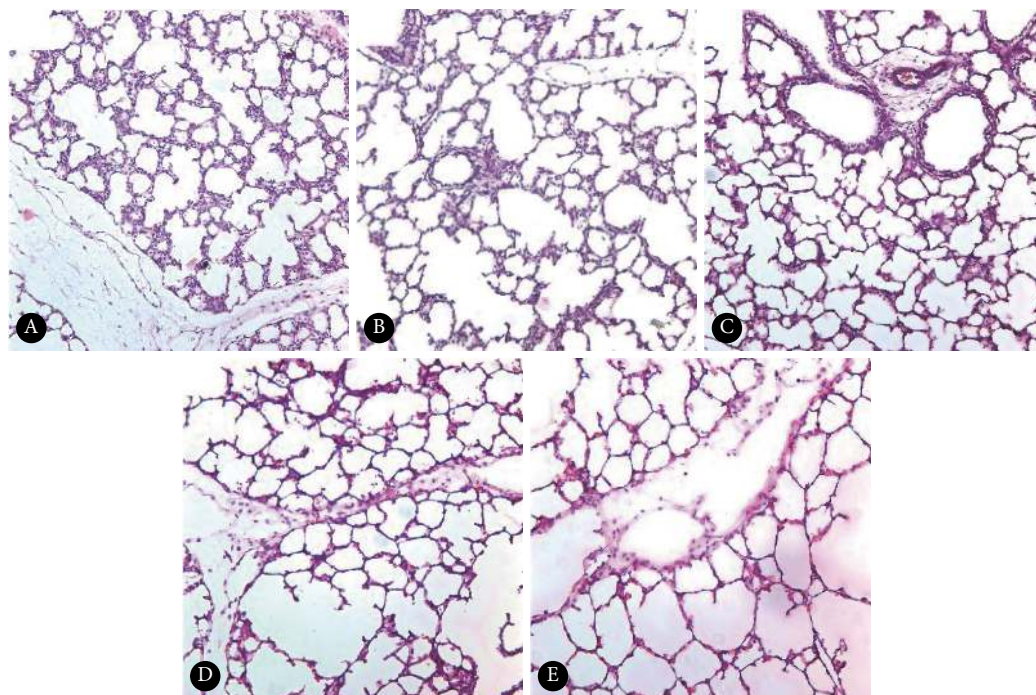


图 3 不同胎龄肺组织在高倍镜下的观察结果。HE染色 $\times 200$

Fig 3 Observation of lung tissue of different gestational ages at high magnification. HE staining $\times 200$

A: GD98; B: GD101; C: GD104; D:GD107; E: GD113.

胎龄的增加,具有薄壁的肺泡比例也逐渐增加,到GD107,薄壁肺泡的密度基本同正常足月猪,GD113的肺泡壁均匀且较薄。因此,我们可以看出仔猪胎龄越小,其肺泡发育越不成熟,表现为肺泡数目更少,肺泡壁越厚,肺泡间隔较宽,毛细血管数量较少。

3 讨论

3.1 不同胎龄早产猪剖宫产存活率的挑战

在妊娠期,仔猪的肺部发育与人类胎儿接近^[10-12],且多个器官和系统在解剖结构、生理特性及遗传性上与人相似^[13-14],一些关键器官(如脑、心脏、肠道等)的发育轨迹也相似^[13]。但早产猪肺发育模型能否成功建立,其中胎龄是影响早产猪肺发育模型成功建立的重要因素。猪胎龄 \leq GD98的肺发育阶段相当于人类肺发育的小管期或更早期,而GD98 $<$ 猪胎龄 \leq GD104相当于人类肺发育的原始肺泡期,猪胎龄 $>$ GD104可相当于人类肺发育肺泡期^[4]。目前临床上的早产儿出生时,肺往往还处于小管期后期或原始肺泡期,肺泡发育程度低^[15],这些早产儿往往需要较强的呼吸支持才能得以存活,但不恰当的呼吸支持亦会增加早产儿后期慢性肺部疾病发生的风险。

CAMINITA等^[4]为GD98、GD100、GD102和GD104剖宫产的早产猪提供24 h的新生儿重症监护、监测。实验结果显示GD98和GD100的猪已有完整的肺组织,未完全

成熟的肺泡结构,以及少量的SP-B表达,GD104早产猪的肺泡细胞已经分泌有高密度表面活性物质于肺泡壁,因此,机械通气对于GD104早产猪不是必需的。在GD98和GD102之间的早产猪有通气不足和呼吸窘迫综合征风险,类似于在肺发育原始肺泡期出生的早产儿,符合新生儿重症监护标准,可以作为替代胎儿的进行实验的非人灵长类动物。但研究人员也意识到使用小于GD104早产猪有巨大的挑战,需要许多具有新生儿重症监护(NICU)功能的监护设备和抢救措施,包括通气设备、营养支持、生命体征监测及影像检查等设备和操作。甚至需要插管和使用外源性肺表面活性物质等相关药物,为处于肺发育原始肺泡期的早产猪提供长期治疗和护理。

本研究中的早产猪生后未予呼吸支持及相关药物治疗,但仍有存活者,说明这些存活的早产猪有自主呼吸功能。其中小胎龄(GD98、GD101)的早产猪生后全部死亡;GD104的早产猪有部分存活,且并不是偶然存活一只,我们可以提出这样的假设:GD104的早产猪肺发育情况尚可,在未提供呼吸支持的条件下可进行自主呼吸,这与国外相关研究结果一致^[4]。因此本研究旨在观察早产猪生后未予特殊医疗干预的自然状态下肺的发育情况,可将早产猪建模时间定于GD104(原始肺泡期末期或肺泡期早期),为今后更好模拟生后早产儿未给予呼吸支持及其他医疗干预下肺发育的情况奠定理论基础,为研究

早产猪相关疾病模型提供参考价值。

3.2 无医疗干预的SPF级早产猪建模

在原始肺泡期甚至小管期末期出生的早产儿和极早产儿, 肺的形态和结构已足以支持通气, 在新生儿重症监护和药物支持下, 存活的可能性得到极大的提高。但在对其进行重症监护及治疗的同时, 肺损伤和重塑仍会影响肺泡的发育及肺毛细血管的形成, 导致慢性肺部疾病(例如BPD)^[16]。不管是处于肺发育小管期还是原始肺泡期的早产儿, 肺泡发育都不成熟, 肺发育程度低^[15]。氧中毒和保护性通气会引起肺泡上皮细胞水平的损伤, 肺部炎症和应用糖皮质激素可抑制正常的肺泡化发育进程, 出现异常的修复和重塑, 其结果是肺泡化程度低, 肺泡体积大、数量少、结构相对简单, 导致通气功能降低, 气体有效交换减少^[17-19]。因此, 对早产猪不采用机械通气和药物治疗等医疗干预, 仅进行呼吸道清理、保温等必要的措施, 可减少对肺发育的额外干扰, 避免医疗干预引起的异常修复和结构重塑, 在此状态下探讨早产猪肺发育的机制和相关疾病的发生发展机制^[20]。

同时, SPF级猪的生产和喂养已完全成熟, 并有相关的生产和检测标准, 是生命科学研究和生物制品研发的重要实验对象及原材料^[9]。根据SPF级猪养殖和检测标准, 严格对母猪饲养、剖宫产、仔猪饲养等进行控制和操作, 排除致病病原微生物和寄生虫的影响, 可避免对早产猪肺发育的影响。因此, 建立没有医疗干预的SPF级早产猪模型有利于研究早产猪肺发育的调控机制和相关疾病的发生发展机制。

综上, 排除致病病原微生物和寄生虫, 避免医疗干预的SPF级早产猪在GD104有部分存活, 可根据SPF级猪养殖和检测标准, 以GD104作为建模时间点, 建立没有医疗干预的SPF级早产猪肺发育模型, 探讨肺发育的调控机制和肺部细胞的功能, 为研究早产肺发育的病理生理提供一定的研究基础。也有利于下一步以SPF级早产猪模型探讨不同干预下肺发育机制和肺功能的相关变化, 研究肺部相关疾病的发生和发展机制。但目前大小鼠等啮齿类动物作为最常见的动物模型已非常成熟, 费用相对小型猪低, 一些检测抗体也更易于获得, 因此, 使用小型猪作为肺发育研究的动物模型, 尚有待进一步研究和推广。

* * *

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

[1] VOYNOW J A. "New" bronchopulmonary dysplasia and chronic lung disease. *Paediatr Respir Rev*, 2017, 24(1): 17-18.

- [2] 刘瀚旻, 陆权. 生命早期起源的慢性阻塞性肺病之研究. *中华儿科杂志*, 2019, 57(4): 244-247.
- [3] NARDIELLO C, MIŽÍKOVÁ I, MORTY R E, *et al*. Looking ahead: Where to next for animal models of bronchopulmonary dysplasia? *Cell Tissue Res*, 2017, 367(3): 457-468.
- [4] CAMINITA F, MERWE M, HANCE F, *et al*. A preterm pig model of lung immaturity and spontaneous infant respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015, 308(2): 118-129.
- [5] BUDDINGTON R K, SANGILD P T, HANCE B, *et al*. Prenatal gastrointestinal development in the pig and responses after preterm birth. *J Anim Sci*, 2012, 90(Suppl 4): 290-298.
- [6] ODLE J, LIN X, JACOBI S K, *et al*. The suckling piglet as an agrimedical model for the study of pediatric nutrition and metabolism. *Annu Rev Anim Biosci*, 2014, 2(1): 419-444.
- [7] SANGILD P T, THYMAN T, SCHMIDT M, *et al*. Invited review: The preterm pig as a model in pediatric gastroenterology. *J Anim Sci*, 2013, 91(10): 4713-4729.
- [8] 邹迪莎, 于健. 巴马小型猪动物模型在医学领域的研究进展. *中国畜牧兽医*, 2017, 44(4): 1128-1134.
- [9] 高彩霞, 辛畅, 陈洪岩. 畜禽疫病防控用SPF猪的开发. *实验动物与比较医学*, 2018, 38(4): 245-249.
- [10] MCPHERSON R L, JI F, WU G, *et al*. Growth and compositional changes of fetal tissues in pigs. *J Anim Sci*, 2004, 82(9): 2534-2540.
- [11] SZPINDA M, SIEDLACZEK W, SZPINDA A, *et al*. Volumetric growth of the lungs in human fetuses: an anatomical, hydrostatic and statistical study. *Surg Radio Anat*, 2014, 36(8): 813-820.
- [12] PAEPE M E D, FRIEDMAN R M, GUNDOGAN F, *et al*. Postmortem lung weight/body weight standards for term and preterm infants. *Pediatr Pulmonol*, 2005, 40(5): 445-448.
- [13] EIBY Y A, WRIGHT L L, KALANJATI V P, *et al*. A pig model of the preterm neonate: anthropometric and physiological characteristics. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68763[2021-08-11]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068763>.
- [14] HIGUCHI M, HIRANO H, MAKI M. The thromboplastic activity of lung surfactant in amniotic fluid and its application to prenatal assessment of fetal lung maturity. *Tohoku J Exp Med*, 1981, 133(3): 267-273.
- [15] MIURA T. Models of lung branching morphogenesis. *J Biochem*, 2015, 157(3): 121-127.
- [16] MORTY R E. Recent advances in the pathogenesis of BPD. *Semin Perinatol*, 2018, 42(7): 404-412.
- [17] JENSEN E A, SCHMIDT B. Epidemiology of bronchopulmonary dysplasia. *Birth Defects Res*, 2014, 100(3): 145-157.
- [18] JOBE A H. Mechanisms of lung injury and bronchopulmonary dysplasia. *Am J Perinatol*, 2016, 33(11): 1076-1078.
- [19] SILVA D M, NARDIELLO C, POZARSKA A, *et al*. Recent advances in the mechanisms of lung alveolarization and the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015, 309(11): 1239-1272.
- [20] NIEDERMAIER S, HILGENDORFF A. Bronchopulmonary dysplasia: An overview about pathophysiologic concepts. *Mol Cell Pediatr*, 2015, 2(1): 2-9.

(2021-05-12收稿, 2021-08-12修回)

编辑 汤 洁