

· 基础研究 ·

大鼠慢性鼻-鼻窦炎模型的建立 及其生物学特性观察

俞晨杰, 陆 玲, 顾亚军, 崔昕燕, 高 下

(南京大学医学院附属鼓楼医院 耳鼻咽喉头颈外科, 江苏 南京 210008)

摘 要: **目的** 建立大鼠慢性鼻-鼻窦炎模型的成熟方法, 观察模型建立过程中各阶段炎症发生、发展的规律和特点。**方法** SD大鼠60只随机分成实验组(A、B、C、D组)和对照组(E), 实验组分别将膨胀海绵片置入大鼠左侧鼻腔, 距离前鼻孔约15 mm, 位于窦口鼻道复合体处, 金黄色葡萄球菌标准菌株悬浊液左侧鼻腔内灌注。于术前及术后3 d、4周、8周、12周行内眦静脉/腹主动脉取血查血常规。实验组分别于术后3 d、4周、8周、12周处死, 解剖并取双侧上颌窦黏膜行病理切片及双侧鼻腔分泌物培养。对照组直接处死, 取双侧上颌窦黏膜行病理切片及双侧鼻腔分泌物培养。**结果** 大鼠慢性鼻-鼻窦炎造模过程中, 实验组术后3 d、4周、8周血常规白细胞计数值均显著高于术前和对照组($P < 0.01$), 并在4周之内保持高水平。术后12周时血常规白细胞计数值较术前和对照组无明显差异($P > 0.05$)。实验组大鼠95.7% (44/46)发生鼻中隔穿孔, 多位于鼻中隔前下部, 术后3 d内即可发生。解剖发现3 d以上各实验组双侧鼻窦均有大量脓性分泌物, 术后8~12周各鼻窦脓性分泌物明显减少。病理切片显示, 术后第4~12周, 实验组左侧上颌窦黏膜炎症由亚急性向慢性迁延。C、D组右侧上颌窦黏膜8、12周同左侧上颌窦黏膜有相似程度的炎症。分泌物培养显示, 术后第4周36.4%双侧鼻腔均培养出金黄色葡萄球菌, 其他培养结果均为条件致病菌。术后12周所有培养均未检出金黄色葡萄球菌。66.7%的双侧鼻腔培养为条件致病菌, 其余未检出细菌。**结论** 鼻腔膨胀海绵填塞可有效建立大鼠慢性鼻-鼻窦炎模型, 术后约4周的急性期, 逐渐转向慢性炎症, 至12周形成稳定的慢性炎症。此时是进行进一步干预研究的成熟时机。细菌感染与慢性鼻-鼻窦炎的炎症持续状态并无明确相关性。

关键词: 大鼠; 慢性鼻-鼻窦炎; 动物模型

中图分类号: R765.4

文献标识码: A

文章编号: 1007-1520(2011)06-0419-06

Development of a rat model of chronic rhinosinusitis and observation of biological characteristics

YU Chen-jie, LU Ling, GU Ya-jun, et al.

(Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Affiliated Drum Tower Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, China)

Abstract: **Objective** To develop a rat model of rhinogenic chronic rhinosinusitis (CRS) and observe biological characteristics during succession of inflammation. **Methods** Animals ($n = 48$) that underwent unilateral maxillary sinus ostial obstruction using Merocel nasal packing with standard staphylococcus aureus inoculation were examined for blood routine examination before operation and at 3 days, 4, 8 and 12 weeks after

基金项目:江苏省卫生厅医学重点人才(RC2007010);南京市医学科学发展项目(QYK09171)。

作者简介:俞晨杰,男,主治医师。

通讯作者:高 下, Email:xiagao213@yahoo.com.cn.

operation. Following sacrifice at 3 days, 4, 8 and 12 weeks, the obtained maxillary sinuses were prepared for histologic investigation and bacterial culture. Experimental interventions were compared with normal controls ($n = 12$) and with contralateral control sinuses within each animal. **Results** White blood cell counts (WBC) at 3 days, 4, and 8 weeks were significant higher than that of controls ($P < 0.01$), and the peak was in 4 weeks, while WBC at 12 weeks descended to the normal ($P > 0.05$). Perforation of nasal septum, was observed in 95.7% of the animals (44/46), within 3 days, which almost located in anteroinferior of the nasal septum. Anatomical and histologic characteristics of chronic sinonasal inflammation were gradually present and stable from 4 to 12 weeks. The similar inflammation happened in the contralateral control sinuses within each animal as compared with the experimental sinuses. Standard staphylococcus aureus was detected in 36.4% of bilateral sinuses at 4 weeks, while none at 12 weeks but conditional pathogenic bacterium in 66.7% of bilateral sinuses. **Conclusion** Unilateral maxillary sinus ostial obstruction using Merocel nasal packing with standard staphylococcus aureus inoculation results in a persistent, stable CRS in rat until 12 weeks after operation, when further investigations into disease pathophysiology would be appropriate. No more evidence demonstrates that infection contributes to the persistence and stability of inflammation of CRS.

Key words : Rat ; Chronic rhinosinusitis ; Animal model

慢性鼻-鼻窦炎是鼻科临床常见疾病,其发病机制至今未能完全阐明。近年来,炎症在慢性鼻-鼻窦炎发生、发展过程中的地位受到越来越多的重视,但相关的分子和蛋白水平在以往的动物模型上的研究受到诸多限制,本研究探索以SD大鼠为慢性鼻-鼻窦炎模型材料的可行性并对其生物学特点进行了系统观察。

1 材料与方 法

1.1 材 料

选取清洁级SD大鼠60只,雄性,体重250~300g,由南京大学医学院附属鼓楼医院动物实验中心提供。金黄色葡萄球菌标准菌株由南京大学医学院附属鼓楼医院检验科提供。膨胀海绵(Merocel),显微直镊,眼科剪,耳科显微剥离子,XiON 2.7mm,0°耳内镜(德国),佳能EOS500D数码单反相机。

1.2 方 法

SD大鼠60只随机分5组,每组各12只,A、B、C、D组为实验组,E组为对照组。金黄色葡萄球菌标准菌株从血平板收集菌落,用生理盐水稀释成1麦氏单位的悬浊液备用。氯胺酮(50mg/kg)及地西洋(5mg/kg)行大鼠腹腔注射麻醉。实验组以膨胀海绵片(3mm×5mm)置入大鼠左侧鼻腔,距离前鼻孔约15mm,位于窦口鼻

道复合体处。用1ml注射器抽取0.5ml细菌悬浊液缓慢小心注入左侧鼻腔内。对照组未接受实验干预。于术前及术后3d、4周、8周、12周内眦静脉/腹主动脉取血查血常规。A、B、C、D组分别于术后3d、4周、8周、12周处死,无菌操作解剖并取双侧上颌窦黏膜行病理切片,棉签于双侧鼻腔蘸取鼻腔分泌物培养,解剖过程中经内镜采图。对照组术前直接处死取双侧上颌窦黏膜行病理切片,并行双侧鼻腔分泌物培养。

1.3 统 计 学 处 理

数据以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS 11.0统计软件进行t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

实验组造模术后3d、4周、8周、12周白细胞计数值(表1),均显著高于术前和对照组($P < 0.01$),并在4周之内保持高水平。术后12周时血常规白细胞计数值较术前和对照组无明显差异($P > 0.05$)。实验组大鼠95.7%(44/46)发生鼻中隔穿孔(B、C组各1只大鼠分别于术后3、10d死亡),穿孔多位于鼻中隔前下部,术后3d内即可发生,且鼻中隔偏向右侧(图1)。比较正常上颌窦腔,解剖发现3d以上各实验组双侧鼻窦均有脓性分泌物,术

后3 d时,左侧上颌窦大量脓性分泌物(图2),右侧上颌窦脓性分泌物稍少(图3)。术后第4周,双侧上颌窦均有较多脓性分泌物(图4),术后8~12周各鼻窦脓性分泌物明显减少(图5、6)。HE病理切片显示,对照组大鼠左侧上颌窦黏膜镜下未见炎症细胞浸润,上皮纤毛形态完好,黏膜下腺体排列整齐(图7);术后第4周大鼠左侧上颌窦黏膜表面柱状上皮纤毛尚基本完整,稍低矮,黏膜下部分腺体结构破坏缺失,大量淋巴细胞及少许中性粒细胞浸润,血管明显扩张(图8);术后8周大鼠左侧上颌窦黏膜表面柱状上皮纤毛尚基本完整,部分缺失,明显低矮,相对稀少,黏膜下较多区域腺体结构破坏缺失,上皮细胞之间及腺

体破坏区域大量淋巴细胞及少许中性粒细胞浸润,血管扩张(图9);术后12周大鼠左侧上颌窦黏膜表面柱状上皮纤毛明显低矮、倒伏,部分脱落,相对稀少,排列无规则,黏膜下较多区域腺体结构缺失,上皮细胞之间及腺体缺失区域淋巴细胞散在浸润,上皮下间质明显水肿,可见纤维化改变,未见中性粒细胞聚集(图10)。C、D组右侧上颌窦黏膜在8、12周同左侧上颌窦黏膜有相似程度的炎症。分泌物培养显示,术后第4周36.4%双侧鼻腔均培养出金黄色葡萄球菌。其他培养结果均为条件致病菌。术后12周所有培养均未检出金黄色葡萄球菌。66.7%的双侧鼻腔培养为条件致病菌,其余未检出细菌(表2)。



图1

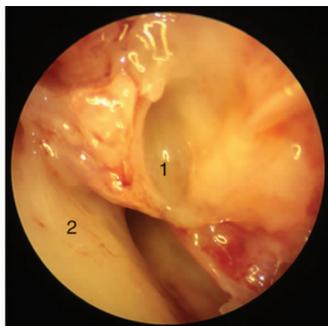


图2



图3

图1 鼻中隔前下部穿孔,鼻中隔偏向右侧(1. 鼻中隔穿孔,2. 鼻中隔,3. 膨胀海绵) 图2 术后3 d左侧上颌窦内大量脓性分泌物(1. 上颌窦,2. 鼻中隔) 图3 术后3 d右侧上颌窦内少量脓性分泌物(1. 上颌窦,2. 鼻中隔)



图4



图5



图6

图4 术后4周左侧上颌窦内、总鼻道大量脓性分泌物,窦腔黏膜肿胀明显(1. 上颌窦,2. 鼻中隔,3. 左侧总鼻道) 图5 术后8周右侧上颌窦内少量脓性分泌物,黏膜增厚(1. 上颌窦,2. 鼻中隔) 图6 术后12周左侧上颌窦内少量脓性分泌物,黏膜稍增厚(1. 上颌窦,2. 鼻中隔)

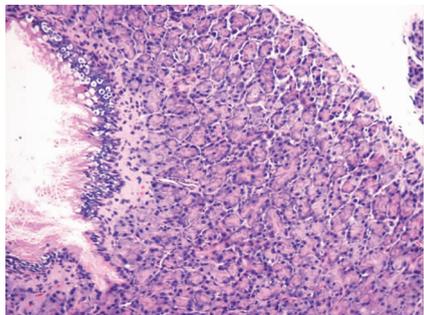


图 7 对照组大鼠左侧上颌窦黏膜 (HE 染色, $\times 200$)

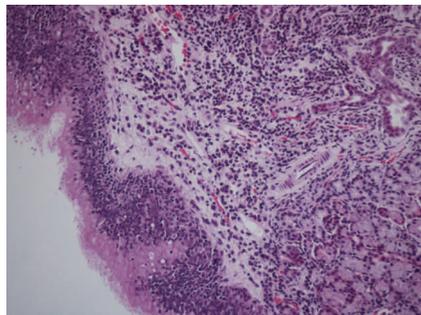


图 8 术后 4 周大鼠左侧上颌窦黏膜 (HE 染色, $\times 200$)

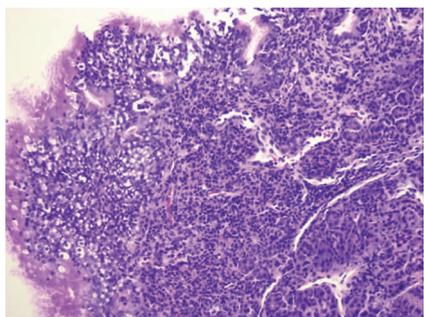


图 9 术后 8 周大鼠左侧上颌窦黏膜 (HE 染色, $\times 200$)

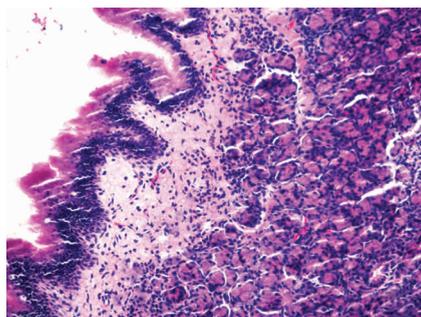


图 10 术后 12 周大鼠左侧上颌窦黏膜 (HE 染色, $\times 200$)

表 1 术前及术后各阶段大鼠血常规白细胞计数 ($\bar{x} \pm s$)

	术前和对照组 (n=30)	实验组			
		术后 3 d (n=21)	术后 4 周 (n=28)	术后 8 周 (n=10)	术后 12 周 (n=9)
白细胞计数	8.53 \pm 1.71	14.31 \pm 2.27 *	14.26 \pm 3.83 *	11.02 \pm 2.77 *	9.54 \pm 2.42

注:各阶段中,内眦静脉取血部分标本发生凝血,样本量少于当时大鼠总数。* $P < 0.01$,与术前和对照组比较

表 2 术后各阶段大鼠双侧鼻腔鼻窦分泌物培养 ($\bar{x} \pm s$)

	对照组(n=12)	实验组			
		术后 3 d(n=12)	术后 4 周(n=11)	术后 8 周(n=11)	术后 12 周(n=12)
金黄色葡萄球菌	0(0/12)	100% (12/12)	36.4% (4/11)	9.1% (1/11)	0(0/12)
条件致病菌	0(0/12)	0	54.5% (6/11)	72.7% (8/11)	66.7% (8/12)
未检出细菌	100% (12/12)	0	9.1% (1/11)	18.2% (2/11)	33.3% (4/12)

注:检出的条件致病菌包括:奇异变形菌,普通变形杆菌,大肠埃希菌,酵母样真菌等。双侧鼻腔培养结果基本一致。部分检出金黄色葡萄球菌和其他条件致病菌双重感染记为金黄色葡萄球菌感染

3 讨论

理想的慢性鼻-鼻窦炎动物模型应满足下列要求:①与人类慢性鼻-鼻窦炎的病因

及病理生理相符合,建模过程没有直接损害窦腔。②在病理学上具有炎症分期分级的征象。③方法简便,建模成功率高,可复制性强。④能满足实验需要,达到实验目的。目前较常用的建模方法有:①直接向窦腔注

入细菌,不填塞窦口。②单纯填塞窦口,不接种细菌。③填塞窦口,同时向窦腔接种细菌。④上颌窦内留置异物。考虑到导致慢性鼻-鼻窦炎的窦口鼻道复合体引流不畅和感染的多重因素^[1],前2种方法单纯地制造感染或填塞窦口显然不及第3种方法更为符合慢性鼻-鼻窦炎的病理生理特点。而上颌窦内留置异物手术过程复杂,创伤过大,并直接损害了窦腔黏膜,影响后续的实验研究。

本实验选用膨胀明胶海绵片涂以金黄色葡萄球菌标准菌株置入大鼠左侧鼻腔,主要考虑几点因素:①兼顾了窦口引流不畅和感染的多重因素。②膨胀明胶海绵较好的组织相容性利于鼻腔内的长期留置,避免引流不畅因素所导致的慢性炎症。③金黄色葡萄球菌标准菌株造成鼻腔鼻窦的急性感染向慢性炎症的迁延,大大提高了造模的成功率,而且由于非耐药的菌株在炎症的迁延过程中逐步自洁,在慢性炎症形成并稳定时感染的因素逐步居于次要地位。强调了慢性鼻-鼻窦炎是炎症,而不是感染的概念^[2]。尽管慢性鼻-鼻窦炎病因十分复杂,许多慢性鼻窦炎患者并不一定继发于急性细菌性鼻窦炎,任何原因导致鼻黏膜上皮损害,纤毛运动功能障碍,环境致病因素均可以作用于鼻腔,导致复合性炎症的发生。但只有成功建立了一个理想的动物模型,才能以此为平台进行进一步的深入研究。因此笔者首先考虑的是最简便和可控的干预手段,即填塞导致的引流障碍和感染来作为建立稳定的慢性鼻-鼻窦炎的诱因。而选取上颌窦及其黏膜作为观察对象主要是考虑到其窦腔相对较大,易于解剖显露,便于进行内镜下的观察比较;此外较大的上颌窦黏膜标本的留取利于后期的分子生物学研究和比较。

本实验通过检测术前和造模术后各阶段的血白细胞计数,比较发现白细胞计数于术后即可显著增高,并在4周之内保持高水平,为感染性炎症急性期的典型表现,术后4~8周逐步降低,但仍高于术前正常对照,直至术后12周回复至术前正常水平,考虑为感染性的急性炎症逐步消退,经亚急性炎

症阶段向慢性炎症转归。结合HE染色病理检查所见,术后4~8周以淋巴细胞为主的炎性细胞浸润较重,仍可见少许中性粒细胞浸润的急性炎症征象,至术后12周完全以淋巴细胞的散在浸润为主,纤毛明显低矮、倒伏,排列无序,且可见到黏膜下纤维组织玻璃样变性等慢性炎症特征,符合一个炎症从急性期向慢性炎症迁延的典型过程。可以认为,鼻腔膨胀明胶海绵填塞可有效建立大鼠慢性鼻-鼻窦炎模型,至12周形成稳定的慢性炎症。针对慢性鼻-鼻窦炎的进一步研究在12周以后为成熟恰当的时机。

实验解剖发现,术后3d 83.3%大鼠发生鼻中隔穿孔,术后4周以后各组100%发生鼻中隔穿孔,穿孔部位均位于鼻中隔前下部。术后3d至4周上颌窦内及鼻道内脓性分泌物较多,术后8~12周上颌窦及鼻道内脓性分泌物不明显,双侧鼻腔鼻窦炎症程度类似。笔者认为压迫、引流不畅以及持续的急性感染可能是导致鼻中隔穿孔的主要原因,鼻中隔穿孔的发生本身和左侧(膨胀明胶海绵填塞侧)慢性鼻-鼻窦炎的形成并无直接相关,具体原因将后续讨论。但是感染经鼻中隔穿孔波及右侧鼻腔可导致对侧鼻腔鼻窦炎症的产生,而左侧鼻腔留置的膨胀明胶海绵推动鼻中隔严重偏向右侧,同样导致右侧鼻窦炎迁延不愈^[3],转向慢性炎症阶段,病理切片显示8周以上双侧上颌窦黏膜在术后各阶段表现为类似程度炎症状态。根据各阶段上颌窦和鼻道内脓性分泌物量的观察,与上述炎症的转归阶段完全符合。此外,笔者还通过行双侧鼻腔鼻窦分泌物培养,结果发现随着病程的迁延,细菌的检出率由术后3d内的100%,降至术后12周的66.7%;且术后12周所检出的细菌均为条件致病菌。由此笔者认为,大鼠的鼻腔鼻窦具有强大自洁功能,尤其是对于非耐药、未经突变的金黄色葡萄球菌标准菌株,一般情况下机体能完全自行清除急性感染性的炎症。这从另一个角度证实了单独的细菌感染因素与慢性鼻-鼻窦炎的产生和持续状态并无明确相关性^[4]。之所以急性炎症向慢性迁延,更多的是因为在早期引起急性感染之后,常合并有窦口鼻道复合体功

能障碍导致鼻腔鼻窦微环境的改变致使炎症反应迁延不愈,这种窦口鼻道复合体功能障碍可能由于膨胀明胶海绵等异物存留,鼻中隔偏曲等解剖畸形或纤毛功能障碍等各种原因所致。鼻腔鼻窦的引流是导致慢性鼻-鼻窦炎发生的核心因素,急性感染只是导致或者加重引流障碍的原因之一,即使未主动给予细菌感染而单纯行窦口完全或不完全阻塞在其他动物中也证实获得鼻窦炎的产生^[5,6]。而在慢性炎症迁延期检出的各种条件致病菌可以认为是由于鼻腔鼻窦引流障碍,导致鼻咽、口咽部或鼻腔鼻窦内本身存在的条件致病菌的定植,它并非慢性鼻-鼻窦炎发生发展的始动因素,而是鼻腔鼻窦引流障碍的间接结果,并与引流障碍形成恶性循环,导致慢性炎症的迁延。这和慢性鼻-鼻窦炎治疗以恢复鼻腔鼻窦的正常通气引流的概念是一致的^[7]。

比较既往的慢性鼻-鼻窦炎动物模型,主要是兔和小鼠,从病理生理角度讲,兔能更有效的模仿人类鼻窦炎的发生。主要是因为兔的体型相对较大,便于进行更精确的外科操作,获得更好的实验控制^[8],既往对兔慢性鼻-鼻窦炎动物模型已进行了较为系统的研究和观察,并获得了成熟的模型^[9]。应该说如果是基于鼻腔、鼻窦的引流,纤毛运动等组织器官乃至细胞水平的研究,兔的慢性鼻-鼻窦炎模型无疑是一个很好的选择。但随着对慢性鼻-鼻窦炎的研究逐渐深入到分子和基因水平,特别是炎症概念的更新,兔源性抗体和相关标准试剂的缺乏妨碍了对炎症机制的进一步分子生物学研究。而基于小鼠的模型国外见少量报道^[10-11],而国内仅见于急性鼻窦炎的研究^[12],笔者认为主要是小鼠体型太小,造模操作难度较大,对手术技巧和实验器械均有较高要求。即便造模成功,获取鼻窦黏膜等进一步的实验材料量少,且取材困难可导致获取材料的均一性变差,影响后继的实验结论。笔者选择的 SD 大鼠能有效的建立慢性慢性鼻-鼻窦炎的动物模型,其体型亦便于手术操作,能提供足够的鼻窦黏膜样本,利用标准化的鼠源性实验试剂进行深入研究其分子生物

学机制。

慢性鼻-鼻窦炎病因不明确,建立动物模型有利于研究其发生发展及转归的规律。本实验利用 SD 大鼠成功建立动物模型,初步系统性的观察了大鼠慢性鼻-鼻窦炎的形成过程,为深入研究其发病机制和干预手段提供了理想的实验平台。

参考文献:

- [1] Wood AJ, Douglas RG. Pathogenesis and treatment of chronic rhinosinusitis [J]. *Postgrad Med J*, 2010, 86 (1016): 359 - 364.
- [2] Fokkens W, Lund V, Mullol J, et al. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2007 [J]. *Rhinol suppl*, 2007, (20): 1 - 136.
- [3] 顾兆伟,曹志伟,王韞秀. 鼻中隔偏曲与慢性鼻-鼻窦炎相关性分析[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2008, 14(4): 301 - 302.
- [4] Ahn SK, Jeon SY, Khalmuratov R, et al. Rat model of staphylococcal enterotoxin B-induced rhinosinusitis [J]. *Clin Exp Otorhinolaryngol*, 2008, 1(1): 24 - 28.
- [5] Ha KR, Psaltis AJ, Tan L, Wormald PJ. A sheep model for the study of biofilms in rhinosinusitis [J]. *Am J Rhinol*, 2007, 21(3): 339 - 345.
- [6] 林彬,王挥戈,林心强,等. 兔慢性鼻窦炎模型建模方法的比较与优化改良[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2005, 40(5): 343 - 346.
- [7] 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编委会鼻科学组,中华医学会耳鼻咽喉头颈外科学分会鼻科学组 [J]. 慢性鼻-鼻窦炎诊断和治疗指南(2008年,南昌). *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2009, 44(1), 6 - 7.
- [8] Liang KL, Jiang RS, Wang J, et al. Developing a rabbit model of rhinogenic chronic rhinosinusitis [J]. *Laryngoscope*, 2008, 118(6): 1076 - 1081.
- [9] 王鹏举,沈莹. 实验性鼻窦炎的病理及细菌学变化 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2008, 14(4): 268 - 272.
- [10] Jacob A, Faddis BT, Chole RA. Chronic bacterial rhinosinusitis: description of a mouse model [J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2001, 127(6): 657 - 664.
- [11] Lindsay R, Slaughter T, Britton-Webb J, et al. Development of a murine model of chronic rhinosinusitis [J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2006, 134(5): 724 - 732.
- [12] 胡松群,吉建,余洪猛,等. 肺炎链球菌诱发小鼠细菌性鼻腔鼻窦炎模型 [J]. *中国比较医学杂志*, 2004, 14(2): 105 - 107.

(修回日期:2011-10-30)