研究报告

# 模拟舰船火灾烟雾吸入致急性肺损伤大鼠模型的建立与评估

宋立成,程浩,奂剑波,陈丽娜,韩志海*

(中国人民解放军海军总医院呼吸与危重症医学科,北京 100048)

【摘要】 **目的** 建立一种以多种复合材料为燃烧物,且温度可控的舰船火灾烟雾吸入性急性肺损伤大鼠模型。**方法** 设计独立的产烟箱与舱室模拟箱,将清醒的大鼠限制在舱室模拟箱体内指定区域的鼠笼内。实验过程中通过检测并控制试验箱内进烟量达到致伤因素稳定的目的。实验分两部分进行,第一部分为不同烟雾吸入时间组,观察各组烟雾吸入 48 h 的生存率;第二部分是选取烟雾吸入 30 min 为致伤因素,对烟雾吸入后 1,6,24 h 的血气分析、肺损伤病理评分、肺泡灌洗液、外周血白细胞、主要炎症因子、信号通路中主要信号因子、肝肾功能的变化进行检测。**结果** 1)不同烟雾吸入时间组生存率结果为:84.21%(15 min 组);25%(30 min 组),0(50 min 组);(2)烟雾吸入 30 min 后 1 h 碳氧血红蛋白、二氧化碳分压、乳酸值在烟雾吸入后 1 h 内显著升高($P < 0.05$),此后可逐渐恢复到正常水平;与对照组相比,烟雾吸入后 1,6,24 h 肺损伤评分(LIS)、肺泡灌洗液(BALF)中蛋白含量显著增高;BALF 中白细胞总数于烟雾吸入后显著升高,其中肺泡巨噬细胞比例呈现先降低后升高而中性粒细胞先升高后降低的趋势。对多种炎症因子及信号通路的研究发现,烟雾吸入 1 h 内即可出现多种信号因子的活化,WB 及免疫荧光显示 6 h 活化最显著,24 h 逐渐降低。烟雾吸入后的肝肾功能无特异性改变。**结论** 建立了一种稳定可靠且高致死率的模拟舰船火灾烟雾吸入肺损伤模型,烟雾吸入急性期存在多条炎症通路的广泛激活,伴有典型的炎性细胞改变及肺部损伤特点,可为此后的深入研究奠定基础。

【关键词】 烟雾吸入性肺损伤;模型;肺泡灌洗液;巨噬细胞

【中图分类号】Q95 - 33 【文献标识码】A 【文章编号】1005-4847(2018) 05-0631-08

Doi:10.3969/j.issn.1005 - 4847.2018.05.015

# Assessment of a rat model of battleship fire-related smoke inhalation injury

SONG Licheng, CHENG Hao, HUAN Jianbo, CHEN Lina, HAN Zhihai*

(Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Naval General Hospital, Beijing 100048, China)

Corresponding author: HAN Zhihai. E-mail: hanzhihai@sohu.com

【Abstract】 **Objective** To develop a rat model of battleship fire-related smoke inhalation-induced acute lung injury using combustion of composite materials with a controllable temperature. **Methods** We designed a smoke-generating chamber and a test chamber. Sober rats were restricted to cages located inside the chamber during the experiments. In aim one, we investigated the survival rates at different inhalation times (15, 30, and 50 min). In aim two, we evaluated blood gas values, lung pathological scores, pro-inflammatory molecules, and protein concentrations in the bronchoalveolar lavage fluid, circulating white cells, and liver and renal functions at 1 h, 6 h, and 24 h after 30 min smoke inhalation. **Results** The survival rates at the different inhalation periods were 84.21% (15 min), 25% (30 min), and 0% (50 min). There

[基金项目]军队后勤科研计划重点项目(BHJ16J011)。

Funded by Key Scientific Project of Military Logistics(BHJ16J011).

[作者简介]宋立成(1989—)男,硕士研究生,研究方向:呼吸与危重症医学。Email: songlicheng@tom.com。

[通信作者]韩志海(1970—)男,教授,硕士生导师。Email: hanzhihai@sohu.com

was a significant increase in carboxyhaemoglobin (COHB), lactate, and partial pressure of carbon dioxide ($PCO_2$) at 1 h post injury ($P < 0.05$), which then gradually returned to normal. In the bronchoalveolar lavage fluid (BALF), the protein concentration and lung injury were score increased immediately after smoke inhalation, and persisted until 24 h. In the BALF, the total number of leukocytes cells significantly increased after smoke inhalation, while the proportion of macrophages significantly decreased at 6 h, then slightly recovered at 24 h; neutrophils showed the opposite trend. By western blot, there was a significant increase in signal pathway factors and inflammatory factors at 6 h recovery. There were no changes in the liver or renal functions after smoke inhalation. **Conclusions** This stable and reliable rat smoke inhalation injury model induced using our novel smoke generators is characterized by activation of inflammatory signaling pathways, inflammatory cell changes, and lung injury. This model may be useful for studies examining acute and chronic lung injury.

【**Keywords**】 smoke inhalation-induced lung injury; model; bronchoalveolar lavage fluid; macrophage
Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

烟雾吸入性肺损伤是战时或平时火灾中常见的致命性的损伤因素,是烧伤病人的独立预测因子,特别是在表面烧伤面积大于 50% 的病人中,其预计死亡率比不伴有吸入性损伤的病人高 20%,如果继发肺炎,死亡率超过 60% [1]。虽然近年来针对烟雾吸入性损伤的机制研究及治疗取得许多进展,但是由于舰船火灾现场的复杂环境、不同类型材料燃烧形成的不同种类的烟雾成分、合并伤情的区别及烟雾吸入时间的长短等因素的差别,需要进一步研究探讨,特别是随着舱室内建筑材料的日益丰富,燃烧产生的烟雾成分多达上百种,单纯木材、棉花等模拟的烟雾损伤模型已难以模拟真实世界的伤情特点。既往的烟雾吸入导致肺损伤模型中,研究者曾采用多种类型动物进行试验,包括成年犬、绵羊、猪、兔、啮齿类动物等[2-3],大鼠具有操作简便、易获取、应用范围广等特点,可以模拟大批烟雾吸入性肺损伤伤情特点的分析,是目前各种类型肺损伤中常用的实验动物[4-5]。本研究构建等比例模拟舰船舱室,以成年 SD 大鼠为实验动物,以舰船火灾常见的 7 种复合材料作为燃烧物,模拟真实世界舰船火灾发生后烟雾吸入情况,通过建立稳定的恒温烟雾吸入性肺损伤模型,为进一步研究室内火灾的真实情况奠定基础。

# 1 材料与方法

## 1.1 材料

### 1.1.1 实验动物

2~3 月龄清洁级成年雄性 SD 大鼠 200 只,体重 180~220g,军事医学科学院实验动物中心提供【SCXK(京)2014-0013】,海军总医院实验动物中心饲养【SYXK(军)2016-0011】,饲养环境温度 20~25 ℃,环境相对湿度 50%~70%,昼夜交替,温度恒定,各组大鼠体重经统计分析差异无统计学意义。遵守实验动物条例处置动物,所有实验过程经海军总医院伦理学会审核通过(HJZYY20160901)。

### 1.1.2 主要实验试剂

Pierce™ BCA 蛋白检测试剂盒(Thermo, 23225),抗-IL6 抗体(Abcam, ab9324),抗-IL10 抗体(Abcam, ab9969),抗-TNF α 抗体(Abcam, ab6671),抗-Myeloperoxidase 抗体(Abcam, ab208670),抗-p38 抗体[M138](Abcam, ab31828),抗-Erk1/2 抗体(Abcam, ab50011),抗-NF-kB p65 抗体(Abcam, ab16502),山羊抗兔 IgG H&L(Alexa Fluor® 568)(Abcam, ab175471)。

### 1.1.3 主要实验仪器

电泳仪(DYY-5D 型,中国),离心机(Thermo Pico17,美国),电热恒温干燥箱(上海上迈电子仪器有限公司,中国),恒温水浴锅(XMTD-7000 型,中国),水平空气摇床(北京市沃德生物医学仪器公司,中国),倒置荧光显微镜(Olympus IX73,日本),血气分析仪(ABL800 Radiometer,丹麦),全自动生化分析仪(贝克曼库尔特 AU680,美国),可燃有毒有害气体探测仪(瑞凯雷 PNT400,中国)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 自制烟雾产生装置

(1)装置的组成及原理:本次实验采用自行研制的密封性良好的产烟装置和实验装置一体化的集成系统,主要组成部分为烟雾生成单元(不锈钢材质,内含 1 个控温电磁炉、4 个排风扇、1 个温度检测器,一个烟雾成分检测器),动物染毒单元(舰船舱室模拟箱,不锈钢材质,包含一个水循环冷却系统,可控制箱内温度 20~25℃,1 个温度检测器,一个烟雾成分检测器,单侧箱体为玻璃材质,可以实时监测箱内动物活动状态)。两个单元通过联通管

道连接。

(2)烟雾吸入方案:经本课题组现场调查研究,目前舰船内装常见的易燃材料有:聚双马泡沫材料、发泡橡塑绝热制品、阻燃白胶、阻尼材料、无卤电缆、硅丙乳胶漆、装饰板这 7 种。将发烟材料研磨成粉等比例混合(各 20 g)后,置于电磁炉上方的托盘中,控制电磁炉温度为 300℃,待产烟箱中烟雾充盈后用排风机将烟雾通过管道排入试验箱中,同时用烟气检测仪检测箱内气体的浓度,各种气体控制范围为:CO 400 ~ 550 ppm, $H_2S$ 10 ~ 15 ppm, $O_2$ 18%~20%,上述成分的含量通过控制排风机进行维持。

1.2.2　实验流程设计

(1)不同烟雾吸入时间组:80 只大鼠随机分为 4 组,对照组 20 只,烟雾吸入 15 min 组 20 只,烟雾吸入 30 min 组 20 只,烟雾吸入 50 min 组 20 只,观察 7 d,记录每组的生存情况,计算生存曲线。

(2)稳定烟雾吸入时间组:以烟雾吸入 30 min 为实验组,120 只大鼠于烟雾吸入后根据存活时间(T = 1,6,24 h)随机分为 3 组,每组各 30 只,对照组大鼠 30 只,在相应时间点,用戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉后进行标本采集。

### 1.3　观察指标与方法

1.3.1　肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)

抽取动脉血气后的大鼠放血致死,从大鼠胸正中线开胸后分离并夹闭气管,剥离大血管,完整取出全肺,结扎右主支气管,取长 4 cm、22 g 硅胶管行气管插管灌注冷无菌生理盐水行左肺灌洗,1 mL 注入,缓慢回抽 3 次,回收 0.4 ~ 0.6 mL,其中抽取 10 μL 滴于细胞计数板上于显微镜下进行细胞计数,剩余灌洗液先以 1500 r/min 离心 3 min,沉淀进行细胞分类,上清液再次以 3000 r/min 4℃ 离心 10 min。BALF 中的蛋白质含量通过微量 BCA 蛋白试剂盒测定。

1.3.2　蛋白质免疫印迹试验(Western blot, WB)检测

将液氮中的肺组织取出后进行低温下研磨,使用 RIPA 裂解肺组织研磨液,冰上孵育 30 min 后,收集裂解细胞的液体, 4℃ 离 10 min,留取上清,蛋白定量至 5 g/L,行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰氨凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后,蛋白转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,封闭液孵育 2 h 后,加入 MPO 单抗、IL-6 单抗、IL-10 单抗、TNF-α 单抗、ERK 1/2 单抗、P38 单抗或 P65 单抗 4℃ 孵育过夜,洗膜,与二抗室温孵育 1 h,3,3′-二氨基联苯胺(DAB)显色。

1.3.3　免疫荧光

液氮中的肺组织经冰冻切片后,用 5% 的胎牛血清封闭,分别用 ERK 1/2、P38、P65 作为一抗染色 1 h;然后用山羊抗鼠 IgG (H + L) Alexa Fluor 568 染色 1 h;细胞核用 DAPI 进行染色;用荧光显微镜捕捉图像。

1.3.4　血气分析

将大鼠麻醉后,暴露腹主动脉用血气针进行采血,检测指标为 PH、氧分压、二氧化碳分压、碳氧血红蛋白、乳酸。

1.3.5　病理损伤评估

对右肺主支气管进行结扎后,收集右肺下叶于 4% 的甲醛中,48 h 后进行石蜡包埋,然后进行切片,厚度为 6 μm,脱蜡后进行苏木素伊红(hematoxylin and eosin, H&E)染色,通过单盲法由两名病理科医生光镜下进行组织学观察。我们采用了美国胸科学会(American Thoracic Society, ATS)制定的肺损伤评分标准,参数包括肺泡内中性粒细胞计数、肺泡间隔内中性粒细胞计数、透明膜形成与否、肺泡腔内是否残存蛋白质、肺泡间隔的厚度。每个病理医生对每张切片至少选取 20 个随机高倍视野(400 × total magnification) 进行评分。

1.3.6　肝肾功能评估

对照组和烟雾吸入后 1,6,24 h 的各组大鼠通过腹主动脉收集全血 1 mL 至柠檬酸钠抗凝管中(血液与抗凝剂比例为 9∶1)。全血于 4℃ 中离心 10 min(3000 r/min),收集血浆,通过全自动生化检测仪检测丙氨酸氨基转移酶、总胆红素、白蛋白、球蛋白、血肌酐、尿素氮。

### 1.4　统计学方法

使用 SPSS 24.0 软件分析数据,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,经方差齐性检验后,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),方差齐时两两比较采用 LSD 检验,方差不齐时采用 Tamhane T2 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2　结果

### 2.1　不同烟雾吸入时间对生存率的影响

烟雾吸入 15 min(A 组)、30 min(B 组)、50 min

(C 组)各 20 只大鼠,观察时间段为 48 h。A 组总体生存率为 84.21%;B 组总体生存率为 25%,其中烟雾吸入后的前 6 h 内生存率变化最显著(43.75%);C 组现场死亡 17 只,烟雾吸入后 1 h 死亡 2 只,3 h 死亡一只,总体生存率为 0(图 1)。

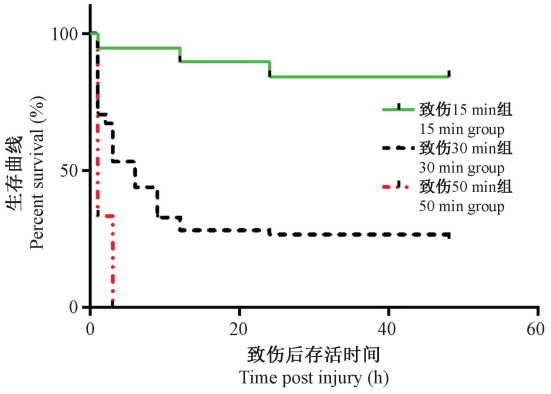



**图 1** 不同烟雾吸入时间对 24 h 生存率的影响

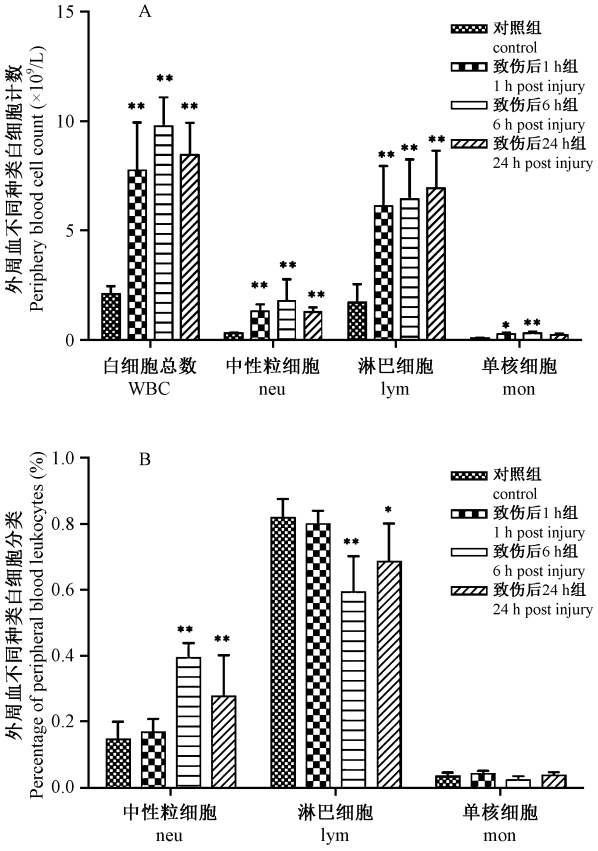
**Figure 1** Survival rate for different smoke inhalation times at 24 h recovery

## 2.2 动脉血气分析的变化

对烟雾吸入 30 min 组进行进一步分析,烟雾吸入后的 1 h,氧分压下降,与对照组相比,差异有显著性($P < 0.01$),6 h 氧分压继续下降,24 h 逐渐回升;碳氧血红蛋白(carboxyhemoglobin, COHB)于烟雾吸入后立即升高,与对照组相比,差异有显著性($P < 0.01$),6 h 已出现显著下降,24 h 时与对照组相比,差异无显著性。二氧化碳分压的变化与氧分压变化的趋势相同。动脉血乳酸于烟雾吸入后 1 h 内显著增高,与对照组相比,差异有显著性($P < 0.01$),在 6 h 及 24 h 基本恢复正常,与对照组相比,差异无显著性($P > 0.05$)。(表 1)

## 2.3 外周血白细胞变化

外周血白细胞于烟雾吸入后 1 h 内较对照组出现显著升高($P < 0.01$),于 6 h 达到高峰,24 h 逐渐下降,与对照组相比,差异有显著性($P < 0.01$);中性粒细胞于烟雾吸入后第 6 h 达到最高值,与对照组相比 $P < 0.01$,此时中性粒细胞比例也达到最高值。(图 2)




注:A. 烟雾吸入后外周血白细胞(WBC)、中性粒细胞(neu)、淋巴细胞(lym)、单核细胞(mon)计数的变化情况;B. 烟雾吸入后中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞比例的变化情况。与对照组相比,$^{**}P < 0.01$, $^{*}P < 0.05$。

**图 2** 烟雾吸入后外周血白细胞数量及比例变化情况

Note. A. Counts of circulating white blood cells, neutrophil, lymphocytes, and monocytes after smoke inhalation. B. Percentages of circulating neutrophils, lymphocytes, and monocytes after smoke inhalation. $^{**}P < 0.01$, $^{*}P < 0.05$, compared with the control group.

**Figure 2** Changes in cell counts and proportion of peripheral blood leukocytes after smoke inhalation

**表 1** 烟雾吸入后不同时间组血气的变化情况($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

**Table 1** Changes in blood gas parameters after smoke inhalation($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

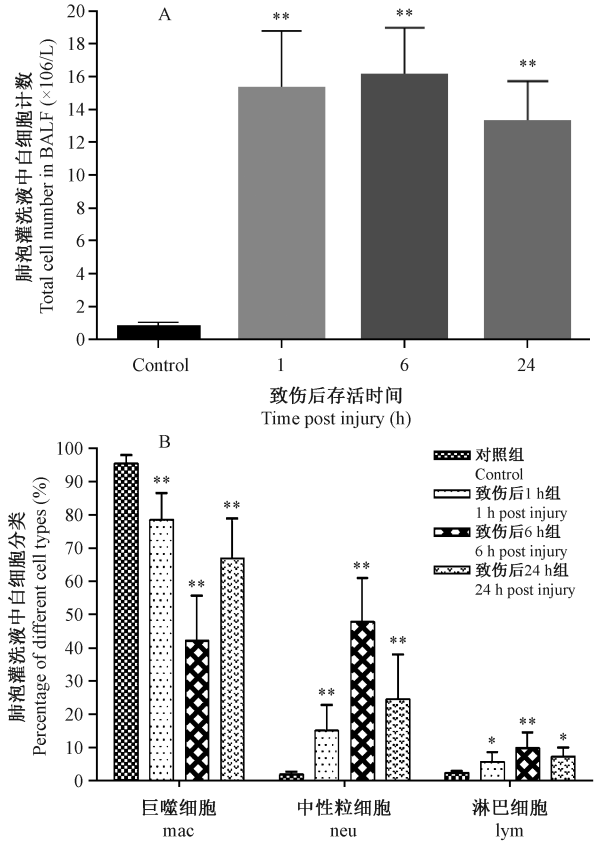
| 组别 Groups | pH | 二氧化碳分压 $PCO_2$ (mmHg) | 氧分压 $PO_2$ (mmHg) | 乳酸 Lac (mmol/L) | 钙离子 $Ca^{2+}$ (mmol/L) | 碳氧血红蛋白 COHB(%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 对照组 Control | 7.394 ± 0.044 | 40.100 ± 6.986 | 101.907 ± 14.804 | 1.970 ± 0.973 | 1.279 ± 0.086 | 0.179 ± 0.058 |
| 1 h | 7.298 ± 0.123 * | 55.178 ± 16.504 * | 55.094 ± 12.573 * | 3.824 ± 1.901 | 1.272 ± 0.092 | 11.453 ± 1.735 |
| 6 h | 7.349 ± 0.069 | 46.294 ± 16.686 | 64.541 ± 19.359 | 1.465 ± 0.231 | 1.261 ± 0.078 | 0.506 ± 0.186 |
| 24 h | 7.346 ± 0.061 | 45.036 ± 12.041 | 85.146 ± 8.337 | 1.521 ± 0.182 | 1.223 ± 0.058 * | 0.246 ± 0.069 |

注:与对照组比较,$^{*}P < 0.05$。

Note. Compared with the control group, $^{*}P < 0.05$.

### 2.4　BALF 中白细胞及蛋白含量变化

通过测定 BALF 中白细胞总数及细胞分类和蛋白含量来评估肺损伤严重程度。结果提示，与对照组相比，烟雾吸入后 BALF 中白细胞总数显著增高，烟雾吸入后不同时间组之间差异无显著性；白细胞分类结果显示，对照组细胞分类以巨噬细胞为主，而烟雾吸入后，随着时间变化，巨噬细胞比例先降低再升高；中性粒细胞于烟雾吸入 6 h 后其比例达到最高，此后逐渐降低。（图 3）




注：A. 烟雾吸入后 BALF 内白细胞总数的变化情况；B. 烟雾吸入后 BALF 内巨噬细胞、中性粒细胞、淋巴细胞比例的变化情况。与对照组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

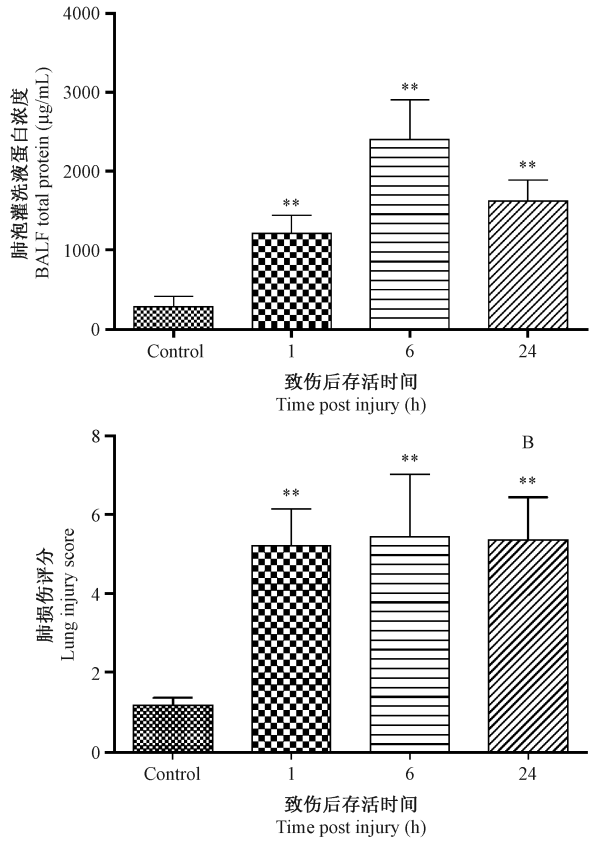
**图 3**　烟雾吸入后 BALF 内白细胞总数及比例的变化情况

Note. A. White blood cell counts in BALF after smoke inhalation. B. Percentages of neutrophils, lymphocytes, and macrophages in BALF after smoke inhalation. $^{**}P < 0.01$, $^{*}P < 0.05$, compared with the control group.

**Figure 3**　Changes in cell counts and leukocyte ratio in the BALF after smoke inhalation

### 2.5　烟雾吸入后组织病理学变化

烟雾吸入后，BALF 内蛋白含量显著升高；肺组织病理切片提示烟雾吸入后 1 h 内出现弥漫性肺泡内水肿，伴有巨噬细胞广泛聚集；6 h 肺泡内出血明显加重，中性粒细胞逐渐增加；24 h 可见肺泡内水肿液逐渐减少，肺泡间隔明显增厚，中性粒细胞比例下降，巨噬细胞比例开始升高。肺损伤评分显示，烟雾吸入后 1 h 内出现显著肺损伤，一直持续至 24 h，与肺损伤最严重的第 6 h 相比，差异有显著性（$P$ 值均小于 0.01）。（图 4、5）




注：A. 烟雾吸入后 BALF 内蛋白浓度的变化情况；B. 烟雾吸入后肺损伤评分的变化情况。与对照组相比，$^{**}P < 0.01$。

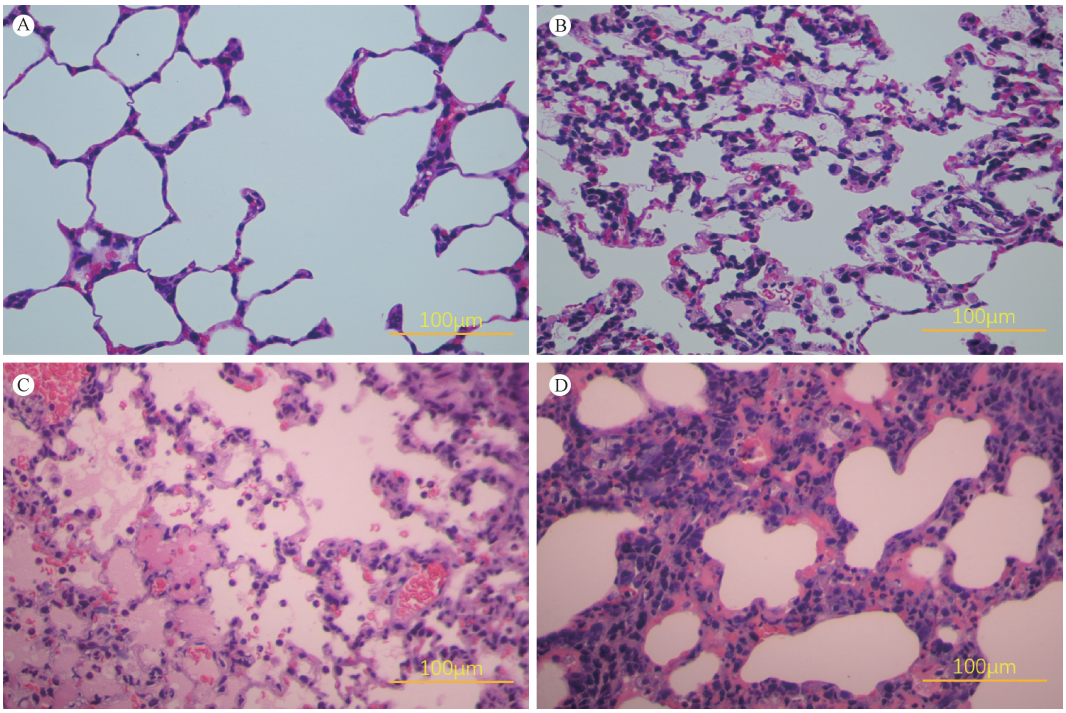
**图 4**　烟雾吸入后 BALF 内蛋白浓度及肺损伤评分的变化

Note. A. Protein concentrations in BALF after smoke inhalation. B. Lung injury scores after smoke inhalation. $^{**}P < 0.01$ compared with the control group.

**Figure 4**　Changes in protein concentrations in the BALF and lung injury scores after smoke inhalation

### 2.6　三条主要信号通路蛋白的变化

western blot 及免疫荧光结果显示，烟雾吸入后，ERK、P65、P38 在肺泡 I 型、II 型上皮细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、血管平滑肌细胞、内皮细胞等部位均有广泛的表达，第 6 h 表达最显著，第 24 h 后表达量逐渐降低。（图 6、7）




注:A-D 分别为对照组肺组织、烟雾吸入后 1、6、24 h 肺组织的 H&E 染色。

**图 5** 烟雾吸入后肺组织病理学变化( ×400)

Note. A-D. The groups of control, and 1, 6, and 24 h post smoke inhalation. HE staining

**Figure 5** Histopathology of the lung tissues after smoke inhalation ( ×400)

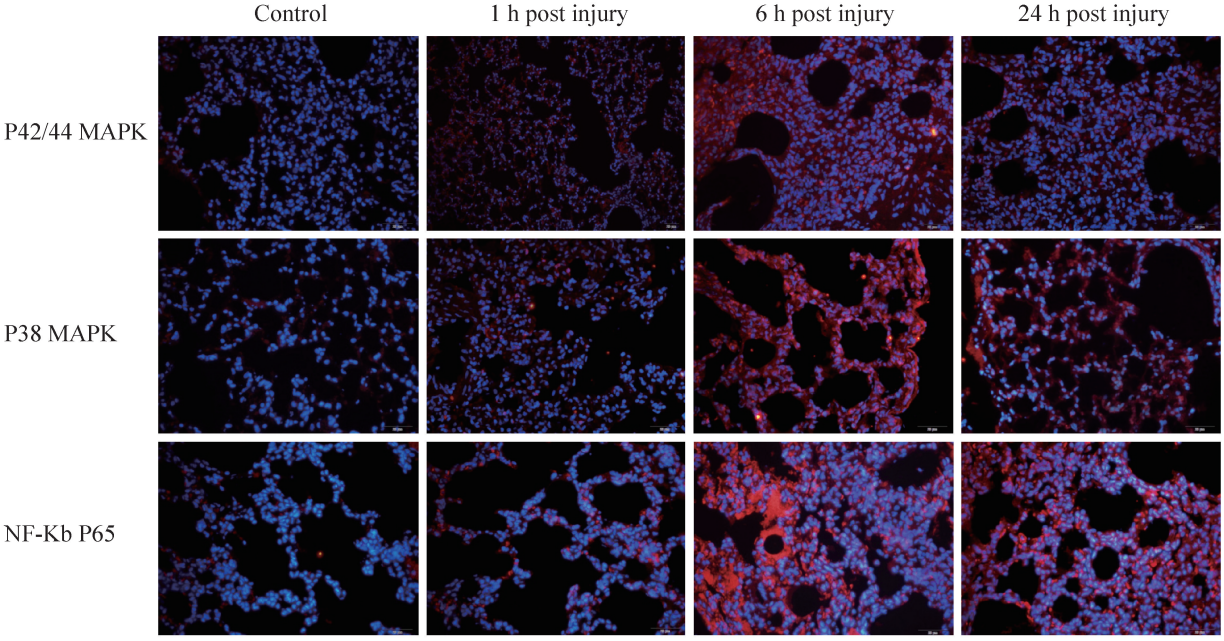



**图 6** 免疫荧光显示烟雾吸入后通路信号分子 P42/44 MAPK、P38 MAPK、NF-κB P65 随时间变化表达情况

**Figure 6** Expression of P42/44 Mitogen-activated protein kinase (MAPK), P38 MAPK, and nuclear factor -kappaB (NF-κB) P65 after smoke inhalation by immunofluorescence assay

### 2.7 炎症因子表达的变化

Western blot 结果显示,烟雾吸入后 1 h 即可出现 IL-6 的升高,IL-10、TNF-α 及 MPO 在 6 h 出现显著升高,各炎症因子均在 6 h 升高最为显著,24 h 略有下降。(图 7)

### 2.8 肝肾功能变化

烟雾吸入后第 1 h,谷丙转氨酶出现一过性升高,与对照组相比差异有显著性($P < 0.05$),第 6 h

及第 24 h 逐渐恢复,与对照组相比,差异无显著性;总胆红素在对照组和烟雾吸入后各组之间无显著性差异;总蛋白在烟雾吸入后 1 h 显著增高,第 6 h 稍降低,与对照组相比,差异有显著性($P < 0.01$);白蛋白及球蛋白的变化与总蛋白呈相同的趋势;肾功能在烟雾吸入前后均无统计学差异。(表 2,3)

## 3　讨论

无论是森林火灾、室内火灾烟雾还是其他类型的烟雾,其成分是复杂多样的[6-8],致伤因素也各不相同。舰船火灾是威胁舰艇及船员生命力的极其重要因素,而由于存在空间密闭、狭小,可燃物多,毒性大等现实情况,肺损伤的严重程度及病理生理变化需要进一步探讨。

烟雾吸入后产生强烈的复杂的炎症反应,局部表现包括支气管、血管痉挛、支气管粘液溢、肺泡淹溺、支气管渗出、支气管内铸型、通气血流失衡。气管内大量的液体渗出造成有效循环量的降低[9]。据统计,伴有吸入性损伤的烧伤病人,所需的液体复苏量较不伴有吸入性损伤的病人显著增高[10]。

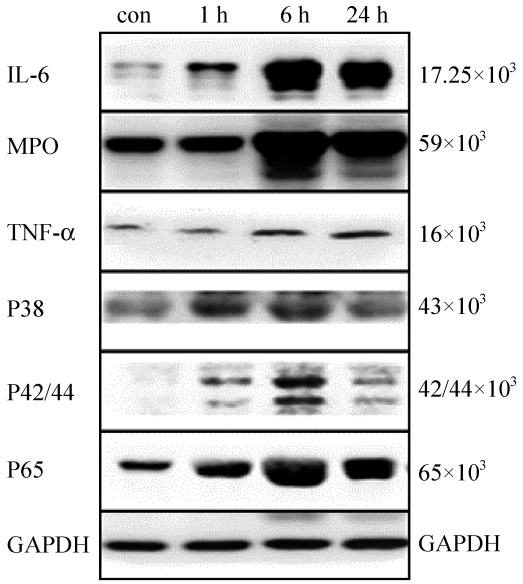



**图 7**　烟雾吸入后通路信号分子 P42/44 MAPK、P38 MAPK、NF-κB P65 及炎症因子 IL-6、IL-10、MPO、TNF-α 随时间变化表达情况

**Figure 7**　Expression of interleukin-6(IL-6), IL-10, TNF-α, P42/44 MAPK, P38 MAPK, Myeloperoxidase (MPO), and NF-κB P65 after smoke inhalation detected by Western blot

**表 2**　烟雾吸入后不同时间组肝功能的变化情况($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

**Table 2**　Changes in liver function after smoke inhalation($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

| 组别 Groups | 总胆红素 TBil (μmol/L) | 丙氨酸氨基转移酶 ALT (U/L) | 总蛋白 TP (g/L) | 白蛋白 ALB(g/L) | 球蛋白 GLB (g/L) |
|---|---|---|---|---|---|
| 对照组 Control | 0.851 ± 0.327 | 52.472 ± 9.823 | 49.573 ± 3.224 | 26.738 ± 4.323 | 22.824 ± 3.010 |
| 1 h | 0.623 ± 0.281 | 69.849 ± 17.147 * | 56.721 ± 5.192 | 29.644 ± 3.762 | 27.082 ± 2.093 |
| 6 h | 0.611 ± 0.203 | 69.121 ± 25.610 * | 55.240 ± 2.091 | 29.400 ± 1.265 | 25.844 ± 1.476 |
| 24 h | 0.378 ± 0.112 | 43.077 ± 7.552 | 52.824 ± 1.890 | 26.923 ± 4.286 | 25.901 ± 1.476 |

注:与对照组比较,* $P < 0.05$.

Note. TBil, total bilirubin; ALT, alanine aminotransferase; TP, total protein; ALB, albumin, GLB, globulin. Compared with the control group, * $P < 0.05$.

**表 3**　烟雾吸入后不同时间组肾功能的变化情况($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

**Table 3**　Changes in renal function after smoke inhalation($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

| 组别 Groups | 肌酐 CRE(μmol/L) | 尿素氮 BUN(mmol/L) |
|---|---|---|
| 对照组 Control | 40.923 ± 9.462 | 5.19 ± 1.391 |
| 1 h | 39.314 ± 5.907 | 4.63 ± 1.537 |
| 6 h | 38.969 ± 7.945 | 5.11 ± 1.832 |
| 24 h | 42.071 ± 10.349 | 4.47 ± 0.866 |

注:与对照组比较,$P > 0.05$.

Note. CRE, creatinine; BUN, blood urea nitrogen. Compared with the control group, $P > 0.05$.

我们通过对不同烟雾吸入时间的比较发现,短期烟雾吸入与长期烟雾吸入生存率存在显著差别,提示烟雾吸入后应尽早脱离烟雾环境能显著降低死亡率。对烟雾吸入后的早期死亡大鼠(6 h 内死亡)进行解剖,结果提示,早期死亡最重要的因素是大量水肿液溢出导致的大气道阻塞,以及肺泡的淹溺使大鼠窒息死亡。因此,如何在早期通过药物或机械手段有效缓解烟雾吸入急性期的肺水肿或通畅气道,避免大量水肿液淹溺肺泡及阻塞气道是急性期治疗的一个关键问题。

肺泡巨噬细胞(alveolar macrophages, AM)是肺组织重要组成部分,外源性刺激物及病原体可以引起 AM 表型和功能的改变[11-12]。本研究发现,烟雾吸入初期巨噬细胞仍有较高比例,随着氧化应激及炎症反应的发展,中性粒细胞向肺泡内的分泌逐渐增多。烟雾吸入后存在显著的巨噬细胞为优势的 BALF 向中性粒细胞为优势的 BALF 的转变,可以导致后期的免疫失衡、感染蔓延[13]。但后期由于肺泡

及第 24 h 逐渐恢复,与对照组相比,差异无显著性;总胆红素在对照组和烟雾吸入后各组之间无显著性差异;总蛋白在烟雾吸入后 1 h 显著增高,第 6 h 稍降低,与对照组相比,差异有显著性($P < 0.01$);白蛋白及球蛋白的变化与总蛋白呈相同的趋势;肾功能在烟雾吸入前后均无统计学差异。(表 2,3)

## 3　讨论

无论是森林火灾、室内火灾烟雾还是其他类型的烟雾,其成分是复杂多样的[6-8],致伤因素也各不相同。舰船火灾是威胁舰艇及船员生命力的极其重要因素,而由于存在空间密闭、狭小,可燃物多,毒性大等现实情况,肺损伤的严重程度及病理生理变化需要进一步探讨。

烟雾吸入后产生强烈的复杂的炎症反应,局部表现包括支气管、血管痉挛、支气管粘液溢、肺泡淹溺、支气管渗出、支气管内铸型、通气血流失衡。气管内大量的液体渗出造成有效循环量的降低[9]。据统计,伴有吸入性损伤的烧伤病人,所需的液体复苏量较不伴有吸入性损伤的病人显著增高[10]。

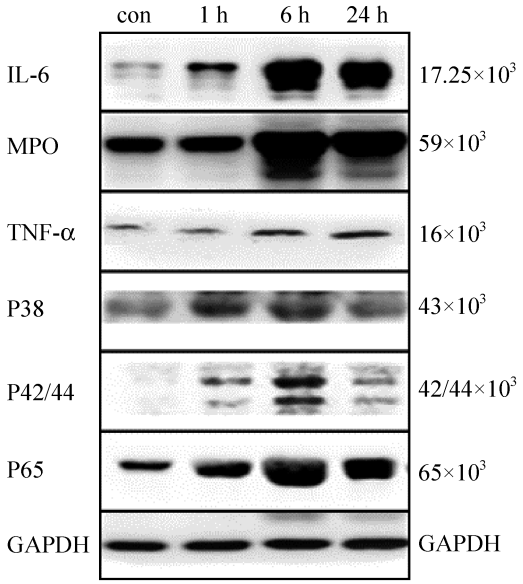



**图 7**　烟雾吸入后通路信号分子 P42/44 MAPK、P38 MAPK、NF-κB P65 及炎症因子 IL-6、IL-10、MPO、TNF-α 随时间变化表达情况

**Figure 7**　Expression of interleukin-6(IL-6), IL-10, TNF-α, P42/44 MAPK, P38 MAPK, Myeloperoxidase (MPO), and NF-κB P65 after smoke inhalation detected by Western blot

**表 2**　烟雾吸入后不同时间组肝功能的变化情况($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

**Table 2**　Changes in liver function after smoke inhalation($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

| 组别 Groups | 总胆红素 TBil (μmol/L) | 丙氨酸氨基转移酶 ALT (U/L) | 总蛋白 TP (g/L) | 白蛋白 ALB(g/L) | 球蛋白 GLB (g/L) |
|---|---|---|---|---|---|
| 对照组 Control | 0.851 ± 0.327 | 52.472 ± 9.823 | 49.573 ± 3.224 | 26.738 ± 4.323 | 22.824 ± 3.010 |
| 1 h | 0.623 ± 0.281 | 69.849 ± 17.147 * | 56.721 ± 5.192 | 29.644 ± 3.762 | 27.082 ± 2.093 |
| 6 h | 0.611 ± 0.203 | 69.121 ± 25.610 * | 55.240 ± 2.091 | 29.400 ± 1.265 | 25.844 ± 1.476 |
| 24 h | 0.378 ± 0.112 | 43.077 ± 7.552 | 52.824 ± 1.890 | 26.923 ± 4.286 | 25.901 ± 1.476 |

注:与对照组比较,* $P < 0.05$.

Note. TBil, total bilirubin; ALT, alanine aminotransferase; TP, total protein; ALB, albumin, GLB, globulin. Compared with the control group, * $P < 0.05$.

**表 3**　烟雾吸入后不同时间组肾功能的变化情况($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

**Table 3**　Changes in renal function after smoke inhalation($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

| 组别 Groups | 肌酐 CRE(μmol/L) | 尿素氮 BUN(mmol/L) |
|---|---|---|
| 对照组 Control | 40.923 ± 9.462 | 5.19 ± 1.391 |
| 1 h | 39.314 ± 5.907 | 4.63 ± 1.537 |
| 6 h | 38.969 ± 7.945 | 5.11 ± 1.832 |
| 24 h | 42.071 ± 10.349 | 4.47 ± 0.866 |

注:与对照组比较,$P > 0.05$.

Note. CRE, creatinine; BUN, blood urea nitrogen. Compared with the control group, $P > 0.05$.

我们通过对不同烟雾吸入时间的比较发现,短期烟雾吸入与长期烟雾吸入生存率存在显著差别,提示烟雾吸入后应尽早脱离烟雾环境能显著降低死亡率。对烟雾吸入后的早期死亡大鼠(6 h 内死亡)进行解剖,结果提示,早期死亡最重要的因素是大量水肿液溢出导致的大气道阻塞,以及肺泡的淹溺使大鼠窒息死亡。因此,如何在早期通过药物或机械手段有效缓解烟雾吸入急性期的肺水肿或通畅气道,避免大量水肿液淹溺肺泡及阻塞气道是急性期治疗的一个关键问题。

肺泡巨噬细胞(alveolar macrophages, AM)是肺组织重要组成部分,外源性刺激物及病原体可以引起 AM 表型和功能的改变[11-12]。本研究发现,烟雾吸入初期巨噬细胞仍有较高比例,随着氧化应激及炎症反应的发展,中性粒细胞向肺泡内的分泌逐渐增多。烟雾吸入后存在显著的巨噬细胞为优势的 BALF 向中性粒细胞为优势的 BALF 的转变,可以导致后期的免疫失衡、感染蔓延[13]。但后期由于肺泡

巨噬细胞的凋亡以及间质内肺泡巨噬细胞的补充，导致随时间发展呈先降低后升高的趋势，其中巨噬细胞表型变化、吞噬及分泌功能的改变是我们下一步建立在此模型基础上的研究的重点。对 M1/M2 平衡在肺部炎症性疾病中具体机制的研究，有利于临床发现潜在的药物作用靶点。

对肺内炎症细胞及肺损伤评分等分析发现本模型损伤最严重的时间点是烟雾吸入后第 6 h，故本模型总体采用烟雾吸入后 1、6、24 h 作为急性期研究的三个时间点，同时对烟雾吸入导致体内多种炎性细胞激活后释放出的 TNF-a、IL-10、IL-6、核因子-κB(nuclear factor kappa B, NF-κB)、细胞外信号调节激酶(extra-cellular signal-regulated kinases, ERKs)、P38 及髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)等在内的多种炎性介质及信号通路进行研究[14-15]。本研究发现上述通路在烟雾吸入后显著表达，而这些通路在调节巨噬细胞极化过程中均发挥重要作用，并且与 M1 相关的 IL-6 及与 M2 相关的 IL-10 也存在过表达的现象，这些均提示巨噬细胞的活化参与肺损伤调节的过程。具体机制是我们下一步的研究重点。

MPO 主要由活化的中性粒细胞分泌，而且是中性粒细胞中含量最高的蛋白[16]。本研究发现，烟雾吸入后肺组织中 MPO 出现明显的升高，并且与 BALF 中中性粒细胞变化趋势相同，外周血中性粒细胞于烟雾吸入后也呈现出显著升高的趋势，这与其他烟雾吸入模型中中性粒细胞大量聚集的趋势相同[17]，因此，如何降低中性粒细胞聚集造成的损伤是烟雾吸入性肺损伤治疗的一个靶点。

本次实验的另一项发现是烟雾吸入急性期不伴有实质性的肾功能损害。肌酐与尿素氮检测提示烟雾吸入后 24 h 内与对照组相比无显著差异，而肝功能检测提示，总蛋白、白蛋白、球蛋白及 ALT 于烟雾吸入后 1 h 显著升高，此后逐渐降低并恢复正常，总胆红素无显著改变，考虑到烟雾吸入后出现严重肺水肿，大量循环中的液体渗入肺实质中[18]，所以上述物质急性期的升高很可能与循环血量迅速降低导致的血液浓缩有关，随着大鼠自行进食、进水，及肺水肿的自行吸收，上述指标可很快恢复，故本研究认为烟雾吸入急性期并不引发肝肾功能的损害。

本模型存在燃烧成分、染毒空间等方面的不同，对动物造成的损伤接近真实世界舰艇火灾现场情况，并且本模型重复性好，监测数据全面，可以作为烟雾吸入肺损伤机制研究的平台。

## 参 考 文 献(References)


[1] Sheridan RL. Fire-related inhalation injury [J]. N Engl J Med, 2016, 375(5): 464-469.

[2] Burmeister DM, Mcintyre MK, Beely B, et al. A model of recovery from inhalation injury and cutaneous burn in ambulatory swine [J]. Burns, 2017, 43(6): 1295-1305.

[3] Perng DW, Chang TM, Wang JY, et al. Inflammatory role of AMP-activated protein kinase signaling in an experimental model of toxic smoke inhalation injury [J]. Crit Care Med, 2013, 41(1): 120-132.

[4] Chai JK, Liu W, Deng HP, et al. A novel model of burn-blast combined injury and its phasic changes of blood coagulation in rats [J]. Shock, 2013, 40(4): 297-302.

[5] Abdullahi A, Amini-Nik S, Jeschke MG. Animal models in burn research [J]. Cell Mol Life Sci, 2014, 71(17): 3241-3255.

[6] Zhang F, Li MY, Lan YT, et al. Imbalance of Th17/Tregs in rats with smoke inhalation-induced acute lung injury [J]. Sci Rep, 2016, 6:21348.

[7] De Carvalho FO, Felipe FA, De Melo Costa AC, et al. Inflammatory mediators and oxidative stress in animals subjected to smoke inhalation: a systematic review [J]. Lung, 2016, 194(4): 487-499.

[8] Cancio, LC. Current concepts in the pathophysiology and treatment of inhalation injury[J]. Trauma, 2005,7:19-35.

[9] Albright JM, Davis CS, Bird MD, et al. The acute pulmonary inflammatory response to the graded severity of smoke inhalation injury[J]. Crit Care Med 2012,40:1113-1121.

[10] Endorf FW, Gamelli RL. Inhalation injury, pulmonary perturbations, and fluid resuscitation [J]. J Burn Care Res 2007,28:80-83.

[11] Vlahos R, Bozinovski S. Role of alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Front Immunol,2014,5:435.

[12] Arora S, Dev K, Agarwal B, et al. Macrophages: their role, activation and polarization in pulmonary diseases [J]. Immunobiology,2018. 223(4-5):383-396.

[13] Wong J, Magun BE, Wood LJ. Lung inflammation caused by inhaled toxicants:a review[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2016,11:1391-1401.

[14] Jessica S, Eusebio P, Pura MC. Regulation of muscle stem cell functions: a focus on the p38 MAPK signaling pathway [J]. Front Cell Dev Biol, 2016,4(36): 91.

[15] Hellweg CE. The nuclear factor kappaB pathway: a link to the immune system in the radiation response[J]. Cancer Lett 2015, 368: 275-289.

[16] Davies MJ. Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention[J]. J Clin Biochem Nutr, 2011,48(1):8-19.

[17] Toon MH, Maybauer MO, Greenwood JE, et al. Management of acute smoke inhalation injury [J]. Crit Care Resusc, 2010, 12:53.

[18] Murakami K, Traber DL. Pathophysiological basis of smoke inhalation injury[J]. News Physiol Sci, 2003(18):125 - 129.


[收稿日期] 2018-03-30