



# 大气细颗粒物致炎动物模型系统评价

侯天芳<sup>1</sup>, 马元元<sup>2</sup>, 王广发<sup>1\*</sup>

(1. 北京大学第一医院呼吸和危重症科, 北京 100034; 2. 北京大学第一医院实验动物中心, 北京 100034)

**【摘要】** **目的** 探索大气污染对动物的致病机制, 对 BALB/c 小鼠采用无创性气管滴注 PM<sub>2.5</sub> 颗粒悬浮液的方法, 构建大气污染致炎动物模型。 **方法** 将 150 只 SPF 级 BALB/c 小鼠随机分成空白对照组、生理盐水组、PM<sub>2.5</sub> 低剂量组 (2.5 mg/kg)、PM<sub>2.5</sub> 中剂量组 (5 mg/kg) 和 PM<sub>2.5</sub> 高剂量组 (10 mg/kg) 共 5 组, 各剂量组气管滴注第 3 天, 第 7 天、第 21 天、第 35 天、第 49 天, 气管滴注操作完成后 24 h 采取组织样本, 采用 ELISA、肺组织病理 HE 染色的方法, 来验证无创性气管滴注方法的可行性和致炎模型构建成功与否。 **结果** 本建模方法, 成功率高达 96%。采用气管滴注法, 建模小鼠肺组织炎症评分与气道滴注时间的延长和剂量呈正相关。PM<sub>2.5</sub> 暴露后, 肺内有大量淋巴细胞聚集及吞噬颗粒的巨噬细胞浸润, 肺泡间隔增宽。各暴露组分别与生理盐水对照组、空白组比较, 肺泡灌洗液中炎症因子 IL-6、肺组织匀浆中 TNF- $\alpha$  水平增高, 高剂量组差异最显著。 **结论** 本实验用气管滴注法建立小鼠致炎模型成功, 并证明此方法简单、可靠, 可广泛用于小鼠呼吸系统重复滴注, 有利于进一步研究大气污染及其他致炎机制。

**【关键词】** PM<sub>2.5</sub>; 大气污染; 气管滴注; 模型; 小鼠

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 01-0065-07

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2018.01.010

## Systematic evaluation of pulmonary inflammation induced by fine particulate matter in a mouse model

HOU Tianfang<sup>1</sup>, MA Yuanyuan<sup>2</sup>, WANG Guangfa<sup>1\*</sup>

(1. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China.

2. Department of Laboratory Animal Center, Peking University First Hospital, Beijing 100034)

Corresponding author: WANG Guangfa. E-mail: wangguangfa@hotmail.com

**【Abstract】** **Objective** The aim of this study was to establish a PM<sub>2.5</sub> air pollution-induced mouse model of pulmonary inflammation and investigate its pathogenetic mechanism. **Methods** 150 specific pathogen-free BALB/c mice were subjected to intratracheal instillation of 2.5, 5, or 10 mg/kg PM<sub>2.5</sub> suspension to construct airborne inflammation models. The blank group and saline group were taken as a control group. Mice were euthanized after 3rd, 7th, 21st, 35th and 49th days to assess the pathological changes in lung tissues using HE staining and ELISA. **Results** The success rate of tracheal instillation was 96%. With the time prolongation and increasing doses of intratracheal PM<sub>2.5</sub> instillation, the histopathological scores of lung tissue increased gradually, showing alveolar macrophages with engulfed particles and lymphocyte accumulation in bronchiole and widened inter-alveolar space. The levels of BALF IL-6 and TNF- $\alpha$  of lung tissue homogenate were

**【基金项目】** 国家自然科学基金面上项目 (No. 81370106); 首都卫生发展专项研究重点攻关项目 (No. 2016-1-4071); 国家重点研发计划: 慢病专项课题 (No. 2017YFC1309500); 北京市自然科学基金重点项目 (No. 7161013); 北京大学临床研究项目项目编号 (PUCRP201303)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (No. 81370106); Capital Medical Development and Scientific Research Fund (No. 2016-1-4071); The State Key Development Program (No. 2017YFC1309500); Beijing Municipal Natural Science Foundation (No. 7161013); Peking University Clinical Research Project (No. PUCRP201303).

**【作者简介】** 侯天芳 (1988 -), 女, 博士研究生, 专业: 大气污染与气道疾病。Email: tf\_hou@126.com

**【通信作者】** 王广发 (1963 -), 男, 主任医师, 博士生导师, 研究方向: 大气污染与气道疾病。Email: wangguangfa@hotmail.com

significantly increased in the high dose PM<sub>2.5</sub> (10 mg/kg) group, compared with the control groups. **Conclusions** A mouse model of PM<sub>2.5</sub> air pollution-induced lung inflammation is successfully established by intratracheal instillation of PM<sub>2.5</sub> suspension. This method is proved to be simple, safe and reliable, and is useful for further study of air pollution-induced and other inflammatory mechanisms.

**[Key words]** PM<sub>2.5</sub>; air pollution; intratracheal instillation; model; mice

**Conflict of interest statement:** We declare that we have no conflict of interest statement.

大气污染已成为世界各国面临的重大环境和公共卫生问题,大气污染成分中危害首当其冲的是大气细颗粒物(PM<sub>2.5</sub>),PM<sub>2.5</sub>(空气动力学直径小于或等于 2.5 μm 的颗粒物)由于表面积大,占可吸入颗粒物比重的 2/3,在空气中存留时间长,其表面吸附的有害物质多,对人体健康的危害最大<sup>[1]</sup>,大气颗粒物表面成分复杂,研究发现不同季节和不同地区的颗粒物成分差异很大,引发炎症反应和氧化应激反应的程度亦有差别<sup>[2]</sup>。大气细颗粒物引发疾病的发病机制、病理生理过程等至今尚未完全阐明,使用动物模型是现代生物医学研究中的一个极为重要的实验方法和手段,动物模型的建立对于研究其发病机制、病理生理改变、治疗、预防等方面的实验研究有重要意义,因此,呼吸道暴露是职业医学、环境医学及毒理学等研究领域常用的一个重要暴露途径,呼吸道染毒、呼吸道给药已经成为动物实验不可或缺的手段<sup>[3]</sup>,本实验通过建立一种廉价、高效、无创的呼吸道给药或染毒方法,并对动物模型进行系统炎症评价,为今后的相关研究提供帮助。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

选用 SPF 级雄性 BALB/c 小鼠 150 只,体重(25 ± 2)g,8 周龄,购于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2012-0001】,在北京大学第一医院实验动物中心【SYXK(京)2014-0010】饲养。小鼠自由进食<sup>60</sup>CO 照射消毒过的颗粒饲料及小动物饮水机消毒处理过的水,小鼠饲养在 IVC 笼盒内,盒内的垫料为高压消毒过的玉米芯垫料。饲养间内温度 23~25℃,12 h 光/12 h 黑暗,湿度 40%~70%。小鼠适应性饲养一周后开始实验,本课题研究内容通过了北京大学第一医院实验动物福利伦理委员会的审查(项目批准编号:J201609)。

#### 1.1.2 PM<sub>2.5</sub> 颗粒的采集、提取和悬液制备

颗粒物采集:采样点为北京大学第一医院内科楼楼顶,应用 Staplex PM<sub>2.5</sub> 大流量采样器,流量为

1.13 m<sup>3</sup>/min,流量精度 3%,玻璃纤维滤膜(20.3 cm × 25.4 cm)收集颗粒物,于 2016 年 1 月连续采样 96 h。颗粒物提取:将附有 PM<sub>2.5</sub> 颗粒的玻璃纤维滤膜剪成小块,放入 250 mL 烧杯;加入无菌超纯水,低温超声 1 h,每隔 5 min 轻轻摇晃烧杯,以混匀悬浮液;将烧杯中的悬浮液倒至已称重的离心管中;然后用超纯水清洗留在烧杯中的膜 2~3 次,收集悬浮液至同一个离心管中;使用 6 层纱布过滤悬液,低温冷冻干燥离心管,称重,计算收获颗粒物质量,回收颗粒于 -20℃ 冰箱保存。PM<sub>2.5</sub> 颗粒物悬液的制备:根据实验小鼠的体重称取 PM<sub>2.5</sub> 颗粒物,于动物实验前一天用生理盐水配置不同浓度的细颗粒物混悬液,超声振荡混匀,4℃ 冰箱保存备用,使用前再次超声振荡混匀。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 实验动物分组和染毒

将小鼠随机分成三个实验组和两个对照组,每组 6 只。分别为空白对照组(blank group)、生理盐水组(NS control group)、低度组 PM<sub>2.5</sub>(low dose group, 2.5 mg/kg)、中度组 PM<sub>2.5</sub>(medium dose group, 5 mg/kg)、高度组 PM<sub>2.5</sub>(high dose group, 10 mg/kg),建模方法采用气管滴注,气管滴注量为每次每只 50 μL,用 5% 水合氯醛麻醉处理,一周滴注两次,最长连续滴注时间为 7 周,气管滴注操作完成后 24 h 取材,分别在第 3 天、7 天、21 天、35 天、49 天为时间点处死动物。

#### 1.2.2 24 号 GY 型静脉留置针改进处理方法

退出移除留置针针芯,用消毒处理后的眼科剪把留置针端两侧手柄翼沿中轴剪掉,使整个留置针前段平滑无阻挡,便于深入小鼠声门裂部位,可在距离塑料套管远端约 1 cm 处用布胶布缠绕一圈,模拟楔形装置用于控制插入咽部的深度(小鼠声门裂至气管分叉的距离约为 1~1.5 cm),以免插入过深损伤气道。自制咽拭子(粗细适合小鼠咽腔大小),麻醉后用于快速清理呼吸道分泌物,以免窒息。透射灯可使用冷光源投射灯,透过皮肤在可视下清晰看到声门裂。

操作方法:(1) 5% 水合氯醛以 6~7 mL/kg 剂量进行安全麻醉,麻醉标准为舌头可以拉出口腔外,不自行回缩。(2)将麻醉后的小鼠仰卧固定于操作板,将小鼠颈部置于冷光源灯下,充分清理呼吸道分泌物,冷光源透视下,可清晰看到声门裂,此时观察小鼠声门裂开闭频度。(3)用 1 mL 注射器与改装后的留置针吻合固定,吸取 50  $\mu$ L 滴注剂量,此时滴注液体位于留置针软管内,液面水平静止。(4)快速插入留置针软管,此时可清晰观察到留置针软管内液注浮动,说明成功插入气管,推注滴注量后,再次推入稍许空气,辅助颗粒物悬液进入肺内。(5)迅速从气道拔出套管针,再次清理呼吸道,观察声门裂开闭频度加快,关闭光源,悬挂约 5~10 s,随后可观察到小鼠呼吸幅度明显加快,可闻及小鼠湿啰音。将小鼠侧卧位放置于保温毯上,注意避免小鼠误吸。

### 1.2.3 肺组织病理学观察

染毒结束后,立即取肺组织,置甲醛溶液固定,石蜡包埋后切片,作 HE(苏木素-伊红)染色。光镜下观察肺组织的病理学改变(见图 3),并进行肺组织光学显微镜病理学观察:每只小鼠随机选 2 张切片,对每张切片进行肺组织病理光镜下定性分析,并予炎症评分。观察指标包括:气管及支气管黏膜上皮的脱落,杯状细胞的增生,嗜酸粒细胞的浸润;上皮基底膜的增厚;管壁及伴行小血管周围炎细胞的浸润;肺泡结构的改变,肺泡间隔的宽度,肺泡间隔及肺泡巨噬细胞内颗粒物质的沉积等。

肺组织炎症评分:由两名病理科医师独立双盲观察病理切片,对支气管周围及小血管周围的炎症程度进行客观评分<sup>[4]</sup>。0 分:未见炎症细胞浸润;1 分:偶尔可见成套状的炎症细胞浸润;2 分:大部分支气管或血管周围可见薄层(1~5 个细胞厚度)的炎症细胞浸润;3 分:大部分支气管或血管周围可见厚层(大于 5 个细胞厚度)的炎症细胞浸润。取支气管周围和小血管周围炎症评分的平均值作为总的肺脏病理炎症评分(见表 1 及图 4)。

### 1.3 数据处理和统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件对资料进行统计学分析。所有数据均以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ ),用 Levenes 检验方差分析,对于方差齐的实验数据采用单因素方差分析 ANOVA 及 LSD 检对各指标的组间差别进行比较;方差不齐的数据采用独立样本的非参数检验和 Kruskal-Wallis H Test 对各指标的组间差别进行比较。当  $P < 0.05$  时,差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 一般体征的变化

在 BALB/c 小鼠造模后饲养的过程中,PM<sub>2.5</sub> 暴露后的小鼠烦躁不安,呼吸急促,腹式呼吸幅度明显增强,这种现象在中、高度组小鼠更为明显,且在造模后第 7 天最为严重,小鼠毛发逐渐失去光泽,背部毛发变稀疏。小鼠气管滴注后,随着造模时间延长,小鼠活动状态减低、灵敏度下降。

### 2.2 气管滴注 PM<sub>2.5</sub> 后各组小鼠体重变化

随着气管滴注时间的延长,小鼠体重会增加,在各组小鼠组内体重无明显差异改变(见图 1)。

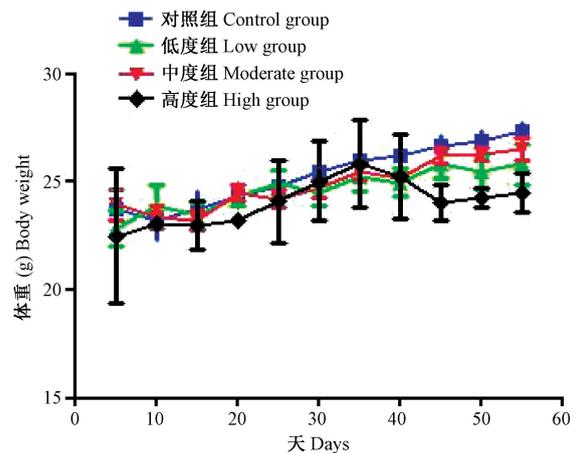


图 1 气管滴注 PM<sub>2.5</sub> 小鼠体重变化

Fig. 1 Changes of body weight of the mice after intratracheal instillation of PM<sub>2.5</sub> suspension

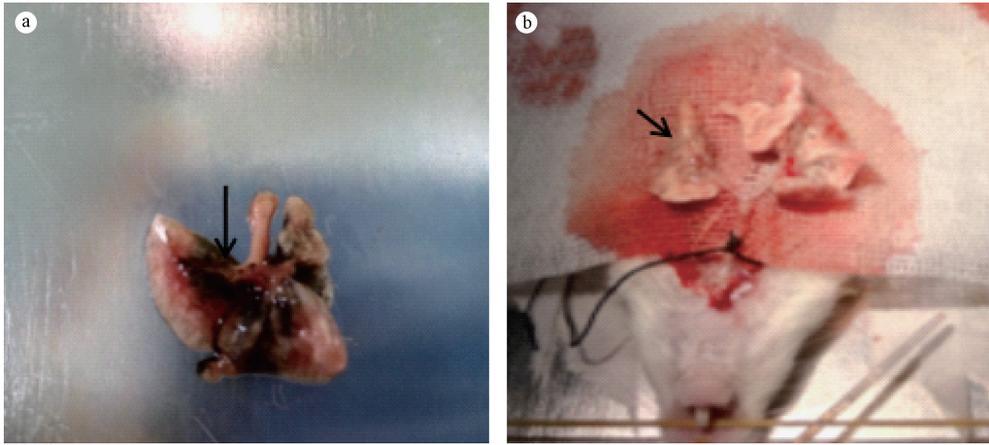
### 2.3 成功操作气管滴注后的小鼠存活率及解剖大体观

实验小鼠共 150 只,操作成功后至取材时间点,144 只成功进行气管插管、滴注,总的处理存活率高达 96%。其中麻醉意外死亡小鼠为 6 只。气管插管、滴注操作本身耗时为每只动物 30 s~1 min,加之麻醉及其他操作,平均每只动物耗时 3~5 min,末次气管滴注结束后,过量麻醉处死动物,解剖可见双肺弥漫黑色颗粒物,小鼠双肺进行肺泡灌洗后仍可见 PM<sub>2.5</sub> 浸润沉积于肺内,见图 2。

### 2.4 小鼠肺组织病理学改变

#### 2.4.1 肺组织 HE 染色

图 3 可见对照组小鼠细支气管和肺泡结构正常,支气管黏膜上皮完整,支气管腔和肺泡腔内未见炎性渗出,支气管腔和肺泡腔内未见吞噬颗粒物质的巨噬细胞和明显的炎细胞浸润,无平滑肌的增生和基底膜的增厚。



注: a. 气管滴注  $PM_{2.5}$  后第 49 天的肺解剖大体观, 可见  $PM_{2.5}$  沉积(长箭头); b. 气管滴注  $PM_{2.5}$  后第 49 天双肺灌洗后的解剖大体观, 可见  $PM_{2.5}$  浸润沉积肺内(短箭头)。

图 2 气管滴注  $PM_{2.5}$  后的肺解剖观

Note. a.  $PM_{2.5}$  material deposit visible on the lung surface (long arrow) at 49 days after intratracheal  $PM_{2.5}$  instillation (long arrow). b. Air pollutant deposit on the lung cut surface (short arrow) after whole lung lavage, at 49 days after intratracheal instillation of  $PM_{2.5}$  suspension.

Fig. 2 Gross appearance of the lungs after intratracheal instillation of  $PM_{2.5}$  suspension

$PM_{2.5}$  暴露后的小鼠可见弥漫性细小支气管和血管周围炎性细胞的浸润, 包括中性粒细胞和淋巴细胞浸润, 有淋巴滤泡的形成, 未见明显嗜酸粒细胞增多。气道上皮有不同程度的脱落, 支气管黏膜上皮未见杯状细胞的增生。上述改变在中高剂量组小鼠的肺组织较为明显, 且在  $PM_{2.5}$  暴露后 21 d 尤为明显。高度组小鼠  $PM_{2.5}$  暴露后第 21 天, 细小支气管黏膜上皮增生明显, 支气管腔内可见脱落的黏膜上皮, 肺组织内见灶性纤维母细胞增生, 内见大量淋巴细胞聚集及吞噬颗粒的巨噬细胞浸润, 肺泡间隔增宽, 可见大量吞噬了颗粒物质的肺泡巨噬细胞(尘细胞), 有的尘细胞已经浸润到肺泡腔中。对各

组小鼠肺组织炎症浸润的情况进行评分(表 1 及图 4)后发现,  $PM_{2.5}$  暴露后的小鼠肺组织支气管和小血管周围的炎症评分显著高于对照组, 且高度剂量比低剂量量的  $PM_{2.5}$  能够诱导更严重的炎症反应。

#### 2. 4. 2 气管滴注不同组小鼠肺组织炎症病理学评分结果

不同组小鼠进行气管滴注后肺组织炎症病理中, 与对照组进行比较, 各处理组中差异有显著性表达( $P < 0.05$ ), 且随着气道滴注时间的延长和剂量增大, 小鼠肺组织炎症评分逐渐增大。见表 1。

#### 2. 4. 3 气管滴注小鼠存在明显的时间和剂量依赖性, 见图 4。

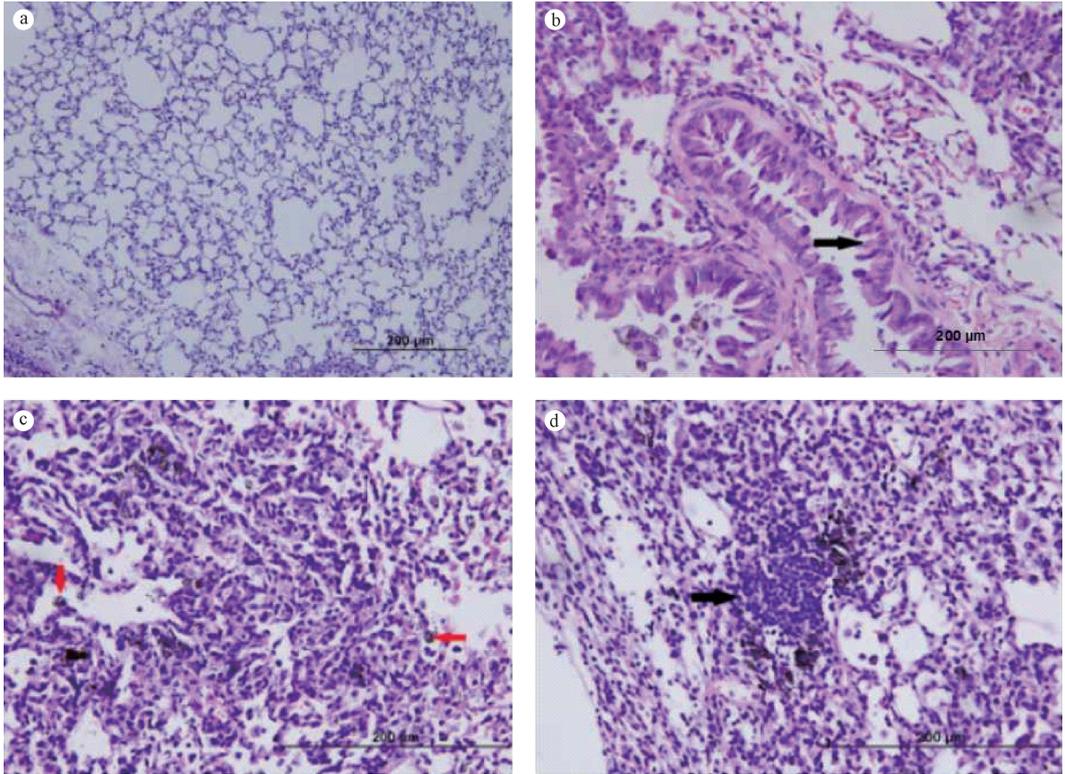
表 1 气管滴注不同组小鼠肺组织炎症病理学评分结果

Tab. 1 Histopathological scoring of the inflammatory changes in the mouse lung tissues

分组 Groups		评分 Score( $\bar{x} \pm s$ )	
	control	0.3333	0.57735
剂量依赖性 Dose-effect dependence (第 21 天 Day 21)	2.5 mg/kg	1	0
	5 mg/kg	2.3333 * &	0.57735
	10 mg/kg	3 * &	0
时间依赖性 Time-effect dependence (中度组 5 mg/kg)	Day 3	1	0
	Day 7	1.3333	1.1547
	Day 21	2.3333 * §	0.57735
	Day 35	2.6667 * §	0.57735
	Day 49	3 * §	0

注: \*  $P < 0.05$  与对照组相比; &  $P < 0.05$  与低剂量组相比; §  $P < 0.05$  与第 3 天处死组相比。

Note. \*  $P < 0.05$ , versus the control group; &  $P < 0.05$ , versus the 2.5 mg/kg group; §  $P < 0.05$  versus the mice killed at day 3 group.

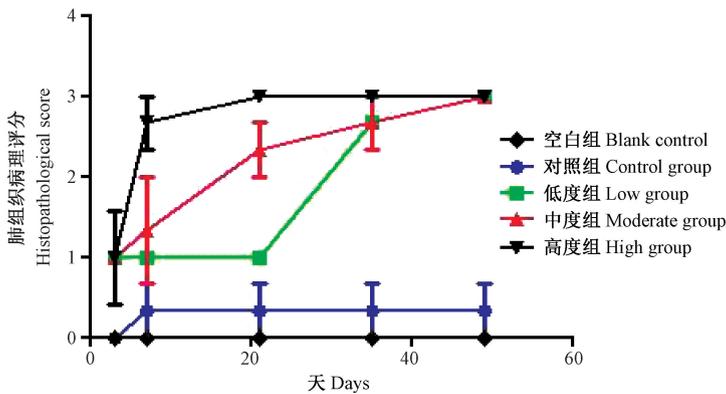


注:a. 正常肺细小支气管和肺泡上皮细胞表现。b. 气管滴注 5 mg/kg PM<sub>2.5</sub>后第 21 天镜下可见细支气管周围炎症,部分肺间隔增宽,支气管腔内可见脱落的黏膜上皮细胞(黑色箭头)。c 和 d. 气管滴注 10 mg/kg PM<sub>2.5</sub>后第 35 天镜下可见大量吞噬颗粒的巨噬细胞浸润(红色箭头),肺间隔及肺泡腔内见大量吞噬颗粒的巨噬细胞及淋巴细胞聚集(黑色箭头)。

图 3 气管滴注 PM<sub>2.5</sub>后肺组织 HE 染色病理改变

Note. a. A control lung showing normal terminal bronchioles and alveolar epithelial cells. b. A mouse lung tissue showing bronchioles with inflammation, widened interalveolar space and falling off of bronchiolar epithelial cells (black arrow) at 21 days after instillation of 5 mg/kg PM<sub>2.5</sub> suspension. c and d. Mouse lung tissues showing alveolar macrophages with engulfed particles (red arrows) and inflammatory cell infiltration in bronchiole and alveoli (black arrow) at 35 days after instillation of 10 mg/kg PM<sub>2.5</sub> suspension. Scale bar = 200 μm.

Fig. 3 Histopathological changes in the lung tissues after intratracheal instillation of PM<sub>2.5</sub> suspension



注:随着气道滴注时间的延长和剂量增大,小鼠肺组织炎症评分逐渐增大,说明气管滴注致炎具有剂量的依赖性(第 21 天)和时间的依赖性(5 mg/kg)。

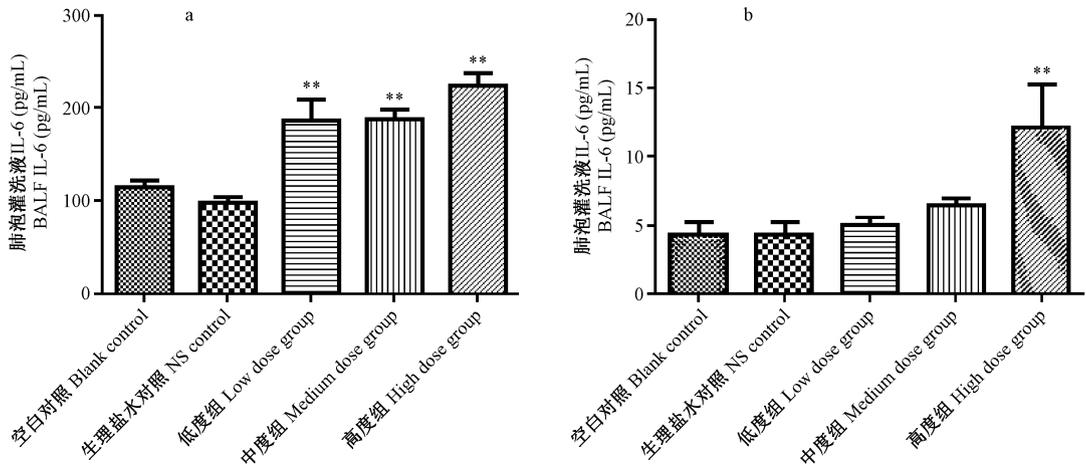
图 4 气管滴注后小鼠存在明显的时间和剂量依赖性

Note. Following the increasing time and doses, the histopathological scores of the lung tissues are getting higher, showing a time-effect dependence (day 21) and dose-effect dependence (5 mg/kg) after intratracheal instillation of PM<sub>2.5</sub> suspension.

Fig. 4 Dose- and time-dependent effects of intratracheal instillation of PM<sub>2.5</sub> suspension on histopathological changes of the lungs

## 2.5 气管滴注 PM<sub>2.5</sub> 后小鼠肺泡灌洗液和肺组织匀浆的炎症细胞因子表达

小鼠肺泡灌洗液中各剂量组 IL-6 水平高于对照组, 差异有显著性 ( $P < 0.01$ ), 提示 PM<sub>2.5</sub> 气管滴



注: a. 各组小鼠肺泡灌洗液 IL-6 含量; b. 各组小鼠肺组织匀浆 TNF- $\alpha$  肺含量。与对照组相比, \*\*  $P < 0.01$ 。

图 5 气管滴注 PM<sub>2.5</sub> 后各组小鼠肺泡灌洗液 IL-6 和肺组织匀浆 TNF- $\alpha$  的含量比较

Fig. 5 Comparison of BALF IL-6 (a) levels and lung tissue TNF- $\alpha$  (b) of mice after intratracheal instillation of PM<sub>2.5</sub> suspension (\*\*  $P < 0.01$  versus the control group)

## 3 讨论

本研究采用多个时间点多组进行构建小鼠无创性气管滴注 PM<sub>2.5</sub> 致炎动物模型, 对实验数据进行比较和分析, 实验结果差异显著, 致炎期持续时间长, 大气颗粒物致炎模型炎症评分存在时间剂量依赖性, 构建大气污染致炎动物模型成功。

目前, 国内外学者在呼吸道染毒用到的气管滴注方法尚不统一, 主要方案包括暴露式和非暴露式气管滴注及其改进方法。有创性暴露式操作创伤性大, 不易把控操作, 难以均衡操作本身对建模的影响。另外全身吸入暴露舱、经鼻吸入暴露装置等自然吸入暴露装置的涌现, 但依然在短期内难以替代气管滴注法。使用暴露舱存在如下问题: 设备费用高, 购置维护费用昂贵; 经雾化的给药或染毒物质在舱内分布不均匀, 从而较难评价身处舱内不同位置的动物的外暴露浓度<sup>[3]</sup>。既往非暴露式气管滴注虽然可弥补以往暴露式气管滴注法有创性的不足, 但插管操作很容易增加动物的痛苦和不适, 由于小鼠气管生理结构脆弱、狭窄, 因此, 既往非暴露式气管滴注法应用于小鼠会更加困难与复杂, 滴注的精确性和成功率降低<sup>[5-6]</sup>。近年来, 国内外学者对非暴露式气管滴注法进行了不断的改进。贾晓峰等<sup>[3]</sup>

注小鼠后导致炎症水平增高(见图 5a)。小鼠肺组织匀浆中高剂量组 TNF- $\alpha$  水平高于对照组, 差异有显著性 ( $P < 0.01$ ), 提示 PM<sub>2.5</sub> 气管滴注小鼠后导致炎症水平增高(见图 5b)。

建立了透射灯下用普通注射器经口直视气管滴注法, 成功完成了 162 次小鼠插管、滴注操作, 晋乐飞等<sup>[7]</sup>在透射灯下用移液器建立了吸入式气管滴注方法, 但运用普通注射器和移液器进行滴注其精确度远不如自制小鼠气管插管, 同样会增加小鼠的痛苦与不适。Spoelstra 等<sup>[8]</sup>运用喉镜、自制塑料支架和吸入麻醉设备建立了一套快速插管的气管滴注法; 喉镜的使用能够精确定位气管的位置, 大大保证了滴注的成功率; 但是, 该方法对操作要求比较高, 操作比较复杂, 其他研究者难以快速掌握。

本研究创新使用了改良后的静脉留置针软管作为气管插管工具, 蛇形冷光源灯照射小鼠颈部, 在清晰视野下观察到小鼠声门裂, 细小软管可轻松插入小鼠气管, 整个操作装置可保证滴注量的精确性, 又可将操作不适降到最低, 当观察到软管中液体随着小鼠的呼吸而上下移动即证明气管插入成功, 可推注药液, 推注后观察小鼠呼吸频度加快, 呼吸幅度加深, 声门开闭频度加快, 可闻及肺部湿啰音。该方法操作快速准确, 简单易学, 使用设备常见易得, 对小鼠气道的损伤很小, 可反复多次进行操作。如果小鼠麻醉技术恰当成熟, 该方法的成功率可达 100%。

本实验建模分组设计严谨合理, 实验中以生理盐水组作为实验 (PM<sub>2.5</sub> 悬浮液) 对照组和不进行任

何处理的空白对照组进行比较,肺组织病理评分和炎症因子结果均显示未见明显的统计学差异,表明肺滴注生理盐水和气管滴注操作对检测的各指标没有显著影响,肺部致炎主要是  $PM_{2.5}$  引起,为后续的致炎机制研究提供科学依据支撑。造模小鼠肺组织病理提示  $PM_{2.5}$  滴注后小鼠肺内有大量淋巴细胞聚集及吞噬颗粒的巨噬细胞浸润,肺泡间隔增宽,存在明显的时间和剂量依赖性表现,既往本课题组北京大学第一医院 Zhao 等<sup>[9]</sup>采用急性暴露  $PM_{2.5}$  后,病理组织学评分在  $PM_{2.5}$  暴露后第 24 h 达到最高,之后逐渐下降,至第 7 天达到最低水平,但在暴露后第 14 天出现了轻度的反弹,考虑因模型急性慢性暴露不同及  $PM_{2.5}$  颗粒采集时间及成分的差异引起病理上改变趋势不完全相符。

在实验过程中,我们要注意做好麻醉及气管滴注操作后小鼠的保暖措施,否则易引起意外死亡。另外,小鼠在实验过程中意外死亡的原因有待进一步研究,但是由于样本量大,可大大减少这种偏倚带来的影响。从肺组织病理和肺功能改变情况结果可以看出实验结果可靠,从 ELISA 检测肺泡灌洗液炎症因子结果可以证明本研究成功,为下一步深入研究大气污染致病机理奠定了基础。本实验使用了便于操作的无创气管滴注方法,易操作,达到精确滴注,减少了实验误差,提高了成功率,大大缩短了实验时间,是本研究获得成功的关键。

本次实验初步探讨了炎症反应在  $PM_{2.5}$  致肺损伤中的作用,在今后的研究中对  $PM_{2.5}$  的时间效应和系统效应予以进一步的关注,为深入研究大气污染对机体的致病机理奠定了基础。

#### 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] Christoforou CS, Salmon LG, Hannigan MP, et al. Trends in fine particle concentration and chemical composition in southern California [J]. J Air Waste Manag Assoc, 2000, 50(1): 43 - 53.
- [ 2 ] Feng S, Gao D, Liao F, et al. The health effects of ambient  $PM_{2.5}$  and potential mechanisms [J]. Ecotoxicol Environ Saf. 2016. 128: 67 - 74.
- [ 3 ] 贾晓峰, 郭新彪. 改进型快速小鼠气管滴注法——透射灯下经口直视滴注法研究 [J]. 环境与健康杂志, 2012, 29(3): 217 - 219.  
Jia XF, Guo XB. Improved technique for rapid endotracheal instillation in mice: direct viewing intubation through oropharynx under the trans-illumination [J]. J Environ Health, 2012, 29(3): 217 - 219.
- [ 4 ] Tournoy K, Kips J, Schou C, et al. Airway eosinophilia is not a requirement for allergen-induced airway hyperresponsiveness [J]. Clin Exp Allergy, 2000; 30(1): 79 - 85.
- [ 5 ] 彭康琳, 周玉庆, 周正适, 等. 剂量精确的大鼠无创气管滴注方法 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(9): 61 - 63.  
Peng KL, Zhou YQ, Zhou ZS. A high accuracy method for non-invasive intratracheal instillation in rats [J]. Chin J Comp Med, 2013, 23(9): 61 - 63.
- [ 6 ] 苗雨丹, 董春玲, 刘玲, 等. 暴露式与非暴露式气管滴注方法建立小鼠急性肺损伤模型及其效果比较 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2012, 38(3): 414 - 418.  
Miao YD, Dong, Liu L, et al. Establishment of mouse model of acute lung injury with exposed and non-exposed intratracheal instillations and effectiveness comparison [J]. J Jilin Univ (Medicine Edition), 2012, 38(3): 414 - 418.
- [ 7 ] 晋乐飞, 吴卫东, 张巧, 等. 吸入式气管滴注法的建立 [J]. 郑州大学学报(医学版), 2015, 50(1): 75 - 78.  
Jin YF, Wu WD, Zhang Q, et al. Establishment of an inhalable intratracheal instillation [J]. J Zhengzhou Univ (Med Sci), 2015, 50(1): 75 - 78.
- [ 8 ] Spoelstra EN, Ince C, Koeman A, et al. A novel and simple method for endotracheal intubation of mice [J]. Lab Anim, 2007, 41(1): 128.
- [ 9 ] Zhao C, Liao J, Chu W, et al. Involvement of TLR2 and TLR4 and Th1/Th2 shift in inflammatory responses induced by fine ambient particulate matter in mice [J]. Inhalat toxicol, 2012, 24(13): 918 - 927.

[收稿日期] 2017 - 04 - 21