

刘春慧, 梁群. 脓毒症急性肺损伤模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(11): 113-120.

Liu CH, Liang Q. Research progress in acute lung injury models of sepsis [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(11): 113-120.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.11.015

脓毒症急性肺损伤模型研究进展

刘春慧, 梁 群*

(黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

【摘要】 急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是严重危及生命的脓毒症并发症之一,其发病机制尚不明确。建立稳定、可靠的脓毒症 ALI 临床前模型是明确其发病机制、发掘潜在治疗靶点、检测新研发药物安全性、治疗效果的必要手段,目前,脓毒症急性肺损伤在体动物模型已相对成熟,随着科研技术的增进,世界各地研究者还构建出多种不同的细胞模型、肺器官芯片模型用以该疾病的研究。全文将对脓毒症相关急性肺损伤的动物、细胞及器官芯片三种临床前模型的研究进展予以综述,为实验模型的优化和选择提供参考依据。

【关键词】 脓毒症;急性肺损伤;动物模型;细胞模型;肺器官芯片模型;综述

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 11-0113-08

Research progress in acute lung injury models of sepsis

LIU Chunhui, LIANG Qun*

(Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

【Abstract】 Acute lung injury (ALI) is one of the many life-threatening complications of sepsis, but its pathogenesis is still unclear. Establishing a stable and reliable preclinical model of sepsis ALI is a productive way to clarify its pathogenesis, explore potential therapeutic targets, and detect the safety and therapeutic effects of newly developed drugs. At present, the animal model of sepsis ALI *in vivo* is relatively mature. With improvements in scientific research technology, researchers around the world have built a variety of different cell models and lung organ chip models for studying the disease. In this paper, the research progress of three preclinical models of sepsis-related ALI, including animal, cell and lung-on-a-chip models, will be reviewed to provide a reference for those optimizing and selecting experimental models.

【Keywords】 sepsis; acute lung injury; animal model; cell model; lung-on-a-chip model; review

脓毒症(sepsis)是机体对感染反应失调所引发危及生命的器官功能障碍^[1]。急性肺损伤(acute lung injury, ALI)被定义为,由肺内外、直接或间接多种致病因素(例如感染、创伤、烧伤、中毒、肺炎、输血、免疫反应等)引发肺毛细血管内皮细胞和肺泡上皮细胞结构功能损害,肺毛细血管通透性增加造成非心源性肺间质和肺泡弥漫性水肿。以进行性低氧血症和急性呼吸困难为主要临床特征^[2]。ALI 是脓毒

症患者临床常见并发症,病情恶化可出现急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS),是脓毒症病人死亡的重要原因^[3]。据相关流行病学调查发现脓毒症患者中 ALI 发生率为 68.2%,合并 ALI 的病人 90 d 的病死率高达 35.5%^[4]。脓毒症 ALI 作为医学界棘手问题之一,对其发病机制的研究从未停止,但其临床治疗效果不佳。因此,建立稳定、可靠的脓毒症 ALI 临床前模

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(81974557);黑龙江中医药大学校级科技创新研究平台项目(2018pt06)。

【作者简介】 刘春慧(1986—),女,在读硕士研究生,研究方向:中西医结合治疗急危重症。E-mail: liu18946429580@163.com

【通信作者】 梁群(1968—),女,博士,主任医师,博士生导师,研究方向:中西医结合治疗急危重症。E-mail: liangqun1@sina.com

型是明确其发病机制、发掘潜在治疗靶点、检测新研发药物安全性、治疗效果的必要手段。当前,现有各种脓毒症 ALI 模型中,除了在体动物模型不断完善外,体外的离体细胞模型、肺器官芯片模型也逐渐受到大家的认可和应用。全文将对脓毒症 ALI 模型的创建方法、依据机制及其造模优缺点进行综述,为临床前实验设计及造模方法的选择提供参考。

1 脓毒症 ALI 在体动物模型

肺部或非肺部感染引起的脓毒症是 ALI/ARDS 的主要原因^[5]。现有脓毒症 ALI 实验模型中,在体动物模型的研究与应用相对成熟。用于构建在体模型的动物常使用啮齿类(大鼠^[6]、小鼠^[7])、哺乳类(家兔^[8]、猪^[9]、羊^[10])、灵长类恒河猴^[11]等进行实验。对比于其他实验动物来说,鼠类具有与人类基因组高度同源性、繁殖周期迅速性、价格低廉性、易于操作性等优点,成为制备该疾病模型的首选。在此,在体动物模型主要以鼠类模型为例进行说明。在动物模型中,创建脓毒症 ALI 模型方法主要包括:宿主屏障破坏—以盲肠结扎穿孔(cecal ligation and puncture, CLP)为代表、内毒素注入—以脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)为例、“双重”打击模型等。

1.1 宿主屏障破坏模型——CLP 模型

建立脓毒症所致 ALI/ARDS 的模型,CLP 常用于腹膜炎继发的脓毒症肺损伤。CLP 脓毒症相关性肺损伤在 18~72 h 内发生,表现为低氧血症、中性粒细胞炎症和间质及肺泡水肿^[12]。CLP 模型是指在全麻下经开腹暴露动物盲肠,按 50% 比例结扎并使用 8 号针头穿刺完成手术操作,使含有多重菌的肠内容物由穿刺孔流入腹腔。手术创伤、结扎后肠道坏死、含菌粪便多重原因诱发多细菌性腹膜炎感染,感染无法控制,随后 24 h 内动物出现经典脓毒症临床症状:背部毛发竖立、自主活动减少、对声音刺激无反应、对触碰刺激反应减弱、眼睛闭合、眼角明显浑浊分泌物、呼吸频率减少、呼吸困难等^[13-15]。脓毒症动物模型造模成功后,通过肺组织病理学、支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)及血清、肺组织中炎性介质浓度评估、肺干湿比计量、微计算机断层扫描成像等多种完整评价方法确认脓毒症 ALI 模型造模成功^[16]。

CPL 造模方法之所以可成功用于脓毒症肺损伤模型的创建,近似真实的模拟临床脓毒症 ALI/

ARDS 患者,主要是基于肺微生物组的改变是脓毒性 ALI/ARDS 发病机制之一。脓毒性肺损伤时,肠道紧密连接蛋白表达、肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)活性、内皮细胞增殖和凋亡的调节均受细胞因子风暴的影响,导致肠道通透性增高。肠道通透性增加导致肠道微生物移位,引起肠道炎症等一系列炎症反应,炎症细胞因子增加引起肠道屏障功能障碍、肠道通透性增高、细菌移位和炎症反应增大诱发急性肺损伤。肠道菌群及其代谢产物的改变通过调节局部和全身炎症、氧化应激和细胞浸润、活化水平,影响脓毒症 ALI/ARDS 的严重程度^[17]。同类造模方法腹腔持续置管引流(continuous indwelling catheter drainage in abdominal cavity, CASP)模型也被认为是脓毒症的高度标准化模型,但在脓毒症 ALI 动物模型的研究中却很少被提及。Xiong 等^[18]在 CLP 多菌性脓毒症炎症性肺损伤模型研究中,证实白细胞介素-1(interleukin-1 β , IL-1 β)诱导环磷酸腺苷(cAMP)-cAMP 反应元件结合蛋白(cyclic-AMP response binding protein, CREB)-血管内皮细胞钙黏蛋白(vascular endothelial-cadherin, VE-Cadherin)即 CAMP-CREB-VE-cadherin 通路下调是脓毒症引起肺内皮屏障损伤和肺损伤的关键机制,提出了增加内皮细胞 CREB 介导的 VE-Cadherin 转录能力可能有助于预防脓毒症诱导的 ARDS 肺血管损伤的新发现。目前,为了更好的验证实验结果,大部分专家学者常常一个实验中应用两种造模方法;Chen 等^[19]同时建立 CLP 诱导的脓毒症 ALI 和 LPS 诱导 ALI 两种小鼠模型,更加充分验证了 Sirtuin-3(Sirt3)可通过调节 VE-Cadherin 和 β -连环蛋白(β -Catenin)的相互作用,维持微血管内皮细胞、黏着小带的完整性,从而达到减轻脓毒症引起的肺部炎症的治疗作用。但 Chimenti 等^[12]有不同的发现,其实验中没有发现 CLP 大鼠肺损伤的证据。脓毒症模型引起的肺损伤首先局限于血管和间质部,在最初的小时内很少累及肺泡部。基于此观点,实验中观测指标、时间节点的选择及确定需要得到更多的关注和研究。

1.2 内毒血症模型——LPS 模型

LPS 作为革兰氏阴性细菌细胞壁的关键成分,可引起以显著肺微血管受损为病理特征的严重肺损伤。而且 LPS 诱导的体内实验模型与临床 ALI/ARDS 高度相似。因此在 ALI 的动物模型建立中,以 LPS 为代表的诱导脓毒症致 ALI 最为普遍。

主要依据经典的炎症与免疫反应机制:LPS 在脂多糖结合蛋白(LBP)辅助作用下被运输至分化簇 14(CD14)蛋白上,CD14 承载 LPS 到达细胞外,经髓样分化蛋白 2(medullary differentiation protein,MD2)识别,LPS 与 Toll 样受体 4(toll like receptor-4,TLR4)相结合形成新受体复合体。该复合体通过衔接蛋白 88(My88)刺激转录因子核因子- κ B(nuclear factor- κ B,NF- κ B)激活免疫细胞,诱导炎症反应,各种促炎细胞因子,包括肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α)、IL-1 β 、白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6)和高迁移率族蛋白 B1(high mobility group protein B1,HMGB1)、巨噬细胞炎症蛋白-1 β (macrophage inflammatory protein-1 β ,MIP-1 β)等被释放,受到 LPS 刺激后同时增加的还有抗炎细胞因子白细胞介素-10(interleukin-10,IL-10)的产生^[20]。与此同时,LPS 通过病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns,PAMPS)或损伤相关的分子模式(damage associated molecular patterns,DAMPS)激活先天免疫系统引发大量趋化因子、促炎细胞因子和抗炎细胞因子的产生。前炎性细胞因子可有效清除病原体发挥积极作用,但当前炎性细胞因子水平过高时就会使内皮层(循环细胞因子)或上皮层(肺泡液细胞因子)遭到永久性损伤,打破肺泡-毛细血管屏障固有完整性功能。肺泡液中前炎症效应物通过血管屏障缺口处,释放入循环中,引发进一步炎症和免疫反应。失控的炎症与失衡的免疫反应加重肺毛细血管内皮细胞和肺泡上皮细胞损伤,肺泡毛细血管膜通透性增加,形成肺水肿,发生脓毒症 ALI。

对于 LPS 诱导这种脓毒症 ALI 动物模型的造模方式,权威机构美国胸科协会^[15]推荐使用内毒素吸入、气管内滴入、静脉注射等不同干预方法。具体实验研究及操作流程包括:(1)LPS 雾化吸入造模法^[21]:将小鼠周身暴露在可实施 LPS 雾化吸入的容器内,以 3 mg/mL 浓度,24 h 后给予安乐死,观测 LPS 诱导 ALI 的短期急性效应。(2)气管内滴注造模法:又分为直接无创伤性经鼻滴注法和间接创伤性经气管滴入两种方法,陈朝阳等^[22]首先应用戊巴比妥钠麻醉小鼠,然后将 10 μ g LPS 经鼻孔滴入小鼠呼吸道中,成功造模。张毅等^[23]经气管滴注法造模成功步骤为:将腹腔注射 3%戊巴比妥钠(1 mL/kg)麻醉后大鼠于手术台板上固定,碘伏清洁颈部,切开颈部充分暴露气管,用 50 μ L 微量进药器插入

气管,按 2 mg/kg 计量缓慢均匀滴入 LPS,滴注完毕后立刻将大鼠呈头上尾下垂直正立体位,小幅度左右摇动,使 LPS 充分流入整个气管内,正立姿势保持 1 min。(3)LPS 静脉注射造模法^[24]:大鼠腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉,背侧固定,分离右股静脉,置入股静脉注射给药 8 mg/kg 的 LPS,24 h 后大鼠 ALI 模型造模成功,实施安乐死进一步采集观测标本。以上各种方法注入 LPS 均可引起内毒素攻击所导致的肺组织损伤。静脉注射 LPS 会导致肺部的变化,包括粒细胞变形能力的改变和迁移到气道内的少量多型核中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophils,PMN)的作用。相反,气管内给予 LPS 方式,气道中 PMN 则表现为大量增加^[25]。在具体应用中,Zhang 等^[26]先用载体处理小鼠 60 min 后,鼻内给药 200 μ g LPS 诱导肺损伤创建模型证明赖氨酸对脓毒症诱导的急性肺损伤有效。Chimenti 等^[12]明确指出:直接气管内注射 LPS 致肺损伤大鼠 ALI 模型比间接损伤 CLP 致 ALI 大鼠模型更能有效地再现人 ARDS 急性期的特征。除了动物模型,更多的研究者,采取 LPS 同时诱导体内、体外两种脓毒症 ALI 模型来相互印证、进一步研究其分子层面的病理机制。LPS 单一提供的肺部活菌影响不够完整,双重打击模型可能更好地反映脓毒症 ALI 患者存在的共性和危险因素。

1.3 双重打击模型

大多数动物模型是基于一种或最多两种方法来诱发损伤,但是人类脓毒症相关性 ALI/ARDS 常常是多种原因共同作用的结果。和 ALI 的失血+内毒素、缺血再灌注+CLP、休克+LPS、肺挫伤+LPS、酸吸入+CLP、烟尘+CLP 等“二次打击”动物模型相似,在脓毒症诱发 ALI/ARDS 的临床前模型中,“双重打击”的造模方式更接近临床实际情况,如:脓毒症后给予免疫复合物或 LPS 直接导致肺损伤时,中性粒细胞向肺部的聚集浸润明显增加。机械通气与脓毒症或单用机械通气相关性肺损伤(mechanical ventilation-related lung injury,VILI)相比产生协同损伤^[27-28]。这些被称为“双重打击”模型,镜像人类脓毒症 ALI 的过程^[29]。Liu 等^[30]在实验中采用 CLP+中等潮气量(moderate tidal volume,MTV)双重打击模型,发现本身不引起 ALI 机械通气的 MTV,不但增强了此前 CLP 脓毒症小鼠肺泡毛细血管通透性,相对应的组织病理学评分和肺脏炎症指标也得到了明显增高,这种两次打击模型可完

成脓毒症重症肺损伤模型的创建。此外还发现该模型在 TLR4 敲除小鼠中无法造模成功。为了更好的模拟临床,脓毒症急性肺损伤后给予液体复苏或抗生素干预治疗的动物模型也逐渐得到应用。

2 脓毒症 ALI 离体细胞模型

脓毒症相关 ALI 疾病过程精密而又复杂,致病环节众多,细胞层面暂时无法模拟疾病的全过程。目前,在细胞水平只能复制疾病机制中个别部位损伤的某一阶段的病理特征。虽有个别研究者应用 TNF- α 诱导构建脓毒症相关 ALI 细胞模型,但 LPS 仍被世界公认为最常用细胞模型诱导剂。脓毒症 ALI 的发病机制主要包括炎症与免疫反应^[31]、氧化应激^[32]、细胞焦亡^[33]、细胞凋亡^[34]、细胞自噬^[35]、凝血功能异常^[36]、肺微生物组改变^[17]、肠-肺-淋巴介导^[37]以及肺血管内皮糖萼(vascular endothelial glycocalyx, VEG)结构功能障碍^[38]等多种原因导致的肺血管内皮损伤和肺泡上皮损伤^[39]。因此体外细胞模型所选用细胞种类:也主要分为肺微血管内皮细胞(pulmonary microvascular endothelial cells, PMVECs)和肺泡上皮细胞(alveolar epithelial cells, AEC)系两种。此外,肺泡巨噬细胞(pulmonary alveolar macrophages, PAM)也常用于模拟肺损伤模型的创建。

2.1 PMVECs 模型

PMVECs 是肺组织中的主要细胞之一。它与一系列生理和炎症反应密切相关,包括再生、发育、伤口愈合等。由 PMVECs 形成的一个半选择性屏障,对肺部气体交换、调节血液与肺间质之间液体和可溶性物质的流动具有重要意义。肺组织的功能取决于 PMVECs 的活性。机体遭受外界不良刺激后,肺内皮细胞可以合成多种生物活性物质。这些生物活性物质吸引中性粒细胞和单核巨噬细胞汇集、激活并在局部炎症中发挥作用。同时,肺内皮细胞发挥防御作用,调节免疫功能。因此,PMVECs 在急性肺损伤的发生发展中起着重要作用。PMVECs 模型是肺损伤研究中常用的模型。主要包括小鼠来源的和人来源的人肺微血管内皮细胞(human pulmonary microvascular endothelial cells, HPMECs)。在最新的一项研究报道中,Xu 等^[40]应用 LPS 诱导的 HPMECs 作为脓毒症肺损伤的细胞模型,证明了 jte-013 作为鞘氨醇-1-磷酸受体 2(sphingosine-1-phosphate receptor 2, S1PR2)的拮抗剂,在体内外均

能减轻脓毒症引起的炎症损伤和内皮功能障碍,减轻肺损伤。发现了 jte-013 可能是治疗脓毒症相关肺损伤的有效靶向药物。

2.2 AEC 模型

肺疾病一旦发生,AEC 一方面阻止富蛋白液体漏入肺泡腔,另一方面在肺水肿的回吸收中发挥积极作用。但是 ALI 和 ARDS 时 AEC 大量凋亡,ALI 时 AEC 不仅参与分泌炎症因子(如 TNF- α 、IL-1 和 IL-6 等),它还能增加细胞相关粘附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, TCAM-1)的表达并促进中性粒细胞肺内浸润。多项实验资料提示,AEC 在 ALI 病程中参与了肺内的炎症反应。常用体外实验模型的细胞包括:体外培养人 AEC 源性肿瘤 a549 细胞、人支气管上皮细胞(BEAS-2B)、人小气道上皮细胞(human small airway epithelial cells, HSAECS)3 种人类来源细胞模拟脓毒症引起的肺损伤。LPS 处理的小鼠肺泡上皮细胞系(MLE)-12、LPS 刺激的大鼠肺泡上皮 II 型细胞(AECII)两种鼠类细胞建立脓毒症急性肺损伤细胞模型。Hao 等^[41]通过分析 gse16650 基因组,在以人肺上皮细胞 AEC 源性肿瘤 a549 细胞模型的肺损伤细胞模型中检测到上调的酮戊二酸脱氢酶(oxoglutarate dehydrogenase, OGDH)基因。在 CLP 建立的脓毒症动物模型和肺损伤细胞模型中,发现 OGDH 在 CLP 肺损伤细胞模型和肺组织中高表达,OGDH 下调可减轻脓毒症 ALI。在动物模型和细胞模型中,OGDH 的表达与促炎因子的表达呈正相关。OGDH 可能通过丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)途径起作用。Xu 等^[42]采取 LPS 诱导人肺泡上皮细胞 a549 建立脓毒症肺损伤模型,得出葛根素可抑制 LPS 诱导的小儿肺上皮细胞铁沉积和脓毒症肺损伤炎症反应的观点。Liu 等^[43]用 LPS 诱导 BEAS-2B 细胞模拟体外肺损伤。采用免疫印迹法和逆转录定量 PCR 法检测细胞转染效果。免疫印迹法检测 LPS 诱导的 BEAS-2B 细胞 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平。结果随着 W/D 比值和炎症细胞因子表达的增加,脓毒症引起的肺组织出现明显炎症反应。在脓毒症中,神经轴突导向因子 1(Netrin-1)及其受体不协调同源基因 5B(UNC5B)减少。但是,Netrin-1 的上调减轻了 BEAS-2B 细胞的炎症水平,增加了细胞内的 UNC5B 水平。结论 Netrin-1 通过抗炎作用对脓毒症大鼠肺损伤具有保护作用,可能为预防脓毒症肺损伤提供一种新的治

疗方法。Yang 等^[44]采用 CLP 和 LPS 处理的小鼠肺泡上皮细胞系 (MLE)-12 建立脓毒症急性肺损伤模型,发现 miR-129-5p 通过降低 HMBL1 的表达,对脓毒症引起的急性肺损伤具有保护作用,为脓毒症的诊治提出了新的靶点。

2.3 PAM 模型

PAM 是存在于肺泡腔内的一种多功能间质细胞,它大量分布于肺泡内及气道上皮表面,承担免疫防护免疫损伤二重功能,PAM 根据对环境刺激的反应,通常极化为 M1(促炎症)和 M2(抗炎症)两种类型,是 ALI/ARDS 发病机制中的关键协调者^[45]。当脓毒症 ALI 发生早期,炎症反应起着关键的作用。常见的革兰氏阴性细菌 (gram negative bacteria, G^-) 感染被认为是 ALI 的主要诱因, G^- 毒性和致病性是与紧密结合在细菌外膜的生物大分子物质即 LPS 密切相关,LPS 介导了革兰氏阴性细菌诱发疾病的众多病理生理反应。实验可通过小鼠 PAM 体外培养技术,采用 LPS 刺激离体培养的小鼠 PAM,使得在细胞水平模拟 ALI 的初期发病成为可能。小鼠肺泡巨噬细胞 MH-S 暴露于内毒素,可成功建立脓毒症体外模型。Hou 等^[46]通过检测巨噬细胞 TNF- α 、IL-6、IL-1 β mRNA、诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 蛋白和环氧化酶-2 (cyclooxygenase-2, cox-2) 的表达,探讨巨噬细胞活化的机制。采用相同方法观察杨梅素对 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞炎症反应的影响。最后,用 Western blot 方法检测 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NF- κ B 和 MAPK 信号通路。证实杨梅素通过抑制 NF- κ Bp65 和蛋白激酶 (protein kinase b, AKT) 的活化,抑制 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK)、磷酸化细胞外信号调节激酶 (P-ERK) 和 p38 在丝裂原活化蛋白激酶信号通路中的表达,发挥抗炎作用。杨梅素通过抑制巨噬细胞活化,抑制体内外炎症反应而减弱 ALI。这可能是预防炎症性疾病的潜在诊疗备选药物。Ling 等^[47]体外培养大鼠肺泡巨噬细胞 NR8383,同样应用 LPS 诱导建立急性肺损伤模型探讨出曲古抑菌素 A (trichostatin A, TSA) 对 LPS 诱导的小分子 RNA-146a (miR-146a) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的影响,得出 LPS 诱导的急性肺损伤模型中具有抗炎作用,其机制可能与抑制 TNF- α 分子和上调 miR-146a 表达有关。研究结果提示 TSA 有望成为治疗急性肺损伤的潜在治疗剂。

3 肺器官芯片模型

人肺血管内皮细胞与人肺泡上皮细胞共培养的肺芯片由三个平行通道组成,中间夹有一层基质膜,概括了人肺泡毛细血管屏障的主要特征。细胞-细胞相互作用、细胞-基质相互作用和血管力学信号协同作用,促进了肺芯片模型的屏障功能。经典文献报道在 2010 年,哈佛大学的 Huh 等^[48]成功构建的肺器官芯片在 Science 上发表,该芯片模型分为上下两层,中间被生物膜所分开,上层为肺细胞,流通的是空气,而在下层为肺毛细血管细胞,流通的是培养液。而两边为真空侧室,通过循环吸力来使得两侧的真空通道进行伸缩,进而带动膜上细胞的收缩,从而达到与人体肺细胞呼吸时的状态,实现传统培养皿不可能实现的呼吸功能。该肺芯片可模拟人体肺泡中的呼吸伸缩生理过程,是肺部器官体外生理功能的最优模型。该肺模型之所以很经典,是因为该模型可以对微环境进行精准操控,如剪切力、张力、压力等。因为这些物理性的因素对于细胞在微环境中是很重要的,很大程度上影响细胞的分化以及组织的功能。正是由于这些因素的存在才促成了器官功能的显现^[49]。Zhang 等^[50]创建了一个仿生芯片上的人类疾病模型,可以重现新型冠状病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 在体外器官水平诱导的肺损伤和免疫反应。通过人肺泡上皮细胞、微血管内皮细胞和循环免疫细胞在流体流下共培养,再现了肺泡毛细血管屏障的关键特征。在 SARS-CoV-2 感染时,上皮对病毒的敏感性高于内皮细胞。转录分析显示,感染后 3 d,上皮细胞和内皮细胞的细胞因子依赖通路激活了天然免疫反应,不同细胞类型的免疫反应各不相同。值得关注的是,病毒感染引起免疫细胞招募,内皮剥离,增加炎症细胞因子的释放,提示免疫细胞不但参与肺泡屏障损伤还是加重炎症的关键因素。

4 各模型的特点评价

CLP 模型和 LPS 模型被认为最常用的脓毒症 ALI 动物模型。CLP 模型模拟机体内源性多种细菌移位、感染诱发的 ALI 过程,与临床上疾病进程、进展最高相似,被广泛引用。CLP 模型和 LPS 模型各有优缺点,具体如表 1。针对临床前模型中动物模型、细胞模型、芯片模型的各自特点进行对比,具体如表 2。

5 总结与展望

对于脓毒症相关 ALI 研究探索虽从未停止,但至今人们仍无法准确清晰阐述发病过程中复杂的分子机制。脓毒症 ALI 的病理生理学的理解进展相

对缓慢,相对应有效的治疗和特异性药物匮乏。目前公认的脓毒症相关 ALI 在体和离体模型种类繁多,在体动物模型的应用和研究已趋于成熟;而随着多种肺部疾病细胞系模型的建立,ALI 体外细胞模型研究逐渐增多。尤其是人源细胞的发现应用,

表 1 两种常用脓毒症 ALI 鼠类动物模型对比
Table 1 Comparison of two commonly used animal models of sepsis ALI mice

模型 Model	适合研究方向 Suitable research direction	特点 Characteristic	缺点 Disadvantage
CLP-ALI 模型 CLP-ALI model	适合血管内皮肺上皮屏障损伤和脓毒症免疫抑制机制研究。 Suitable for the study of immunosuppressive mechanism of vascular endothelial lung epithelial barrier injury and sepsis.	操作技术规范成熟。 与人类临床脓毒症 ALI 患者的病理生理过程相似度高。 Mature technical specifications. It is highly similar to the pathophysiological process of ALI patients with human clinical sepsis.	易形成腹腔内脓肿,建模后处死动物来验证造模成功。 建模时操作者的技术等外部因素导致脓毒症 ALI 严重程度不统一。 It is easy to form abdominal abscess. After modeling, the animals were killed to verify the success of modeling. External factors such as the operator's technique during modeling lead to the non-uniform severity of sepsis ALI.
LPS-ALI 模型 LPS-ALI model	适合研究包括肺泡巨噬细胞或肺上皮细胞介导的先天性免疫反应。 Suitable research includes the innate immune response mediated by alveolar macrophages or pulmonary epithelial cells.	模型重复性强、诱导物 LPS 可定性、定量,易于标准化。 The model has strong repeatability, qualitative and quantitative inducer LPS, and is easy to standardize.	LPS 诱导信号通路传达多依赖 Toll 单一样受体细胞因子和血流动力学等变化迅速较人类疾病过程发展过快。 LPS-induced signaling pathway relies on Toll-like receptor. Cytokines and hemodynamics change more rapidly than human diseases.

注:CLP:盲肠结扎穿孔术;ALI:急性肺损伤;LPS:脂多糖。

Note. CLP, Cecal ligation and perforation. ALI, Acute lung injury. LPS, Lipopolysaccharide.

表 2 动物模型、细胞模型、器官芯片模型对比
Table 2 Comparison of animal model, cell model and organ chip model

模型 Model	优点 Advantage	缺点 Disadvantage
动物模型 Animal model	应用广泛,技术成熟,操作简单,易复制,易推广。可供选择动物种属丰富。 Wide application, mature technology, simple operation, easy replication and easy popularization. The available animal species are abundant.	实验室实验程序和饲养动物的环境条件会发生一定程度的变化、生理过程中也存在种间变异以及遗传等因素,导致动物体内环境出现异常。 Laboratory procedures and environmental conditions of raising animals will change to a certain extent, and there are also interspecific variation and genetic factors in physiological process, which lead to abnormal environment in animals.
细胞模型 Cell model	培养周期短、标准化程度高,细胞来源广泛,观测指标更精准,结果确切。 The culture period is short, the degree of standardization is high, the cell sources are extensive, the observation indexes are more accurate, and the results are accurate.	细胞模型是二维(2D)的,不能模拟组织和器官的固有复杂性,所以这些标准的 2D 模型不能重现人体组织的结构、力学和功能特性。 Cell models are two-dimensional (2D) and can't simulate the inherent complexity of tissues and organs, so these standard 2D models can't reproduce the structural, mechanical and functional characteristics of human tissues.
器官芯片模型 Organ chip model	更好地复制微架构、微环境和组织-组织界面,可实现细胞动态下观测,帮助研究复杂的人类器官-细胞生理过程。 Copying the micro-architecture, micro-environment and tissue-tissue interface better can realize the observation of cell dynamics and help to study the complex human organ-cell physiological process.	制作过程复杂,技术水平要求高,研究经费大。 The manufacturing process is complicated, the technical level is high, and the research funds are large.

突破人类细胞来源受限和动物种属差异的缺点,为脓毒症肺损伤人源细胞模型的建立奠定了坚实的基础。数十年来,研究者通过以上各种模型的创建及应用,逐步展现了脓毒症相关 ALI 的复杂机制,试行探究各种药物,尤其是传统中药对脓毒症相关 ALI 治疗,不断取得新的发现。但是,这些模型不能完全模拟人体脓毒症 ALI 发生发展全过程,还有必要的进一步的优化,坚信伴随基因编辑、组织工程和 3D 技术等的逐渐发展,将会有越来越多的模型被开发出来。例如:肺活体内显微镜 (*in vivo* lung microscope, IVM) 是研究肺免疫细胞相互作用的实时活体动物的黄金标准。这项技术可以应用于不同的炎症模型,包括细菌和病毒感染,脓毒症引起的 ALI,吸入和囊性纤维化,以揭示生理参数和细胞行为的动态变化相对于非炎症状态^[51]。先进的三维培养系统可以模拟不同器官的微环境,不仅限于单一细胞类型,而且可以模拟多种细胞类型之间的交流,这对器官功能研究至关重要。其中肺芯片的应用弥补了目前用于呼吸道疾病建模和药物开发的传统体外模型的局限性。肺芯片是目前呼吸道疾病体外建模一大新的研究重点,具有广泛的科研前景和应用空间。

参考文献:

- [1] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3) [J]. JAMA, 2016, 315(8): 775-787.
- [2] Hughes KT, Beasley MB. Pulmonary manifestations of acute lung injury: more than just diffuse alveolar damage [J]. Arch Pathol Lab Med, 2017, 141(7): 916-922.
- [3] Mark-Christensen A, Mie Dilling Kjær, Ganesalingam S, et al. Increasing incidence of pelvic sepsis following ileal pouch-anal anastomosis for ulcerative colitis in denmark: a nationwide cohort study [J]. Dis Colon Rectum, 2019, 62(8): 965-971.
- [4] Xie J, Wang H, Kang Y, et al. The epidemiology of sepsis in Chinese ICUs: a national cross-sectional survey [J]. Crit Care Med, 2020, 48(3): e209-e218.
- [5] Mohsin M, Tabassum G, Ahmad S, et al. The role of mitophagy in pulmonary sepsis [J]. Mitochondrion, 2021, 59: 63-75.
- [6] 黄钟, 孙洁, 姚振滨, 等. 下调 miR-128-3p 缓解脓毒症大鼠急性肺损伤的炎症反应和肺组织形态学的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(12): 9-16.
- [7] Chen L, Li L, Song Y, et al. Blocking SphK1/S1P/S1PR1 signaling pathway alleviates lung injury caused by sepsis in acute ethanol intoxication mice [J]. Inflammation, 2021, 44(6): 2170-2179.
- [8] Hu L, Chai Y, Xi R, et al. Pathophysiologic characterization of a novel rabbit model of biliary tract infection-derived sepsis [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 11947.
- [9] Mehaffey JH, Charles EJ, Schubert S, et al. *Ex vivo* lung perfusion rehabilitates sepsis-induced lung injury [J]. Ann Thorac Surg, 2017, 103(6): 1723-1729.
- [10] Passmore MR, Byrne L, Obonyo NG, et al. Inflammation and lung injury in an ovine model of fluid resuscitated endotoxemic shock [J]. Respir Res, 2018, 19(1): 231.
- [11] Rosado-Franco JJ, Ramos-Benitez MJ, Parodi LM, et al. Outlining key inflammation-associated parameters during early phase of an experimental gram-negative sepsis model in rhesus macaques (*Macaca mulatta*) [J]. Animal Model Exp Med, 2019, 2(4): 326-333.
- [12] Chimenti L, Morales-Quinteros L, Puig F, et al. Comparison of direct and indirect models of early induced acute lung injury [J]. Intensive Care Med Exp, 2020, 8(S1): 62.
- [13] 荆喜中, 贾欢欢, 罗挺, 等. 小鼠脓毒症模型的建立和评价 [J]. 中国实验动物报, 2016, 24(2): 158-163.
- [14] Drechsler S, Osuchowski M. Cecal ligation and puncture [J]. Methods Mol Biol, 2021, 2321: 1-8.
- [15] Kulkarni HS, Lee JS, Bastarache JA, et al. Update on the features and measurements of experimental acute lung injury in animals: an official American thoracic society workshop report [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2022, 66(2): e1-e14.
- [16] 付静怡, 汪雷, 杨昇. 急性肺损伤动物模型建立的研究进展 [J]. 上海交通大学学报(医学版), 2021, 41(5): 690-694.
- [17] Zhou X, Liao Y. Gut-Lung crosstalk in sepsis-induced acute lung injury [J]. Front Microbiol, 2021, 12: 779620.
- [18] Xiong S, Hong Z, Huang LS, et al. IL-1 β suppression of VE-cadherin transcription underlies sepsis-induced inflammatory lung injury [J]. J Clin Invest, 2020, 130(7): 3684-3698.
- [19] Chen DQ, Shen MJ, Wang H, et al. Sirt3 maintains microvascular endothelial adherens junction integrity to alleviate sepsis-induced lung inflammation by modulating the interaction of VE-Cadherin and β -Catenin [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 8978795.
- [20] Meng L, Song Z, Liu A, et al. Effects of lipopolysaccharide-binding protein (LBP) single nucleotide polymorphism (SNP) in Infections, inflammatory diseases, metabolic disorders and cancers [J]. Front Immunol, 2021, 12: 681810.
- [21] de Souza Xavier Costa N, Ribeiro Júnior G, Dos Santos Alemany AA, et al. Early and late pulmonary effects of nebulized LPS in mice: an acute lung injury model [J]. PLoS One, 2017, 12(9): e0185474.
- [22] 陈朝阳, 姚茹, 王璐, 等. 莲心碱对 LPS 诱导小鼠急性肺损伤的保护作用 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(3): 343-348.
- [23] 张毅, 程晨, 苏景超, 等. 急性肺损伤大鼠模型制备及不同时段肺损伤比较 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(1): 27-34.
- [24] Li X, Jamal M, Guo P, et al. Irisin alleviates pulmonary epithelial barrier dysfunction in sepsis-induced acute lung injury

- via activation of AMPK/SIRT1 pathways [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 118: 109363.
- [25] Jiang Y, Xia M, Huang Q, et al. Protective effect of dexmedetomidine against organ dysfunction in a two-hit model of hemorrhage/resuscitation and endotoxemia in rats [J]. Braz J Med Biol Res, 2019, 52(3): e7905.
- [26] Zhang Y, Yu W, Han D, et al. L-lysine ameliorates sepsis-induced acute lung injury in a lipopolysaccharide-induced mouse model [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 118: 109307.
- [27] Wu X, Zheng R, Zhuang Z. Effect of transpulmonary pressure-guided positive end-expiratory pressure titration on lung injury in pigs with acute respiratory distress syndrome [J]. J Clin Monit Comput, 2020, 34(1): 151-159.
- [28] Zampieri FG, Mazza B. Mechanical ventilation in sepsis: a reappraisal [J]. Shock, 2017, 47(Suppl 1): 41-46.
- [29] Englert JA, Bobba C, Baron RM. Integrating molecular pathogenesis and clinical translation in sepsis-induced acute respiratory distress syndrome [J]. JCI Insight, 2019, 4(2): e124061.
- [30] Liu S, Deng M, Pan P, et al. Mechanical ventilation with moderate tidal volume exacerbates extrapulmonary sepsis-induced lung injury via IL33-WISP1 signaling pathway [J]. Shock, 2021, 56(3): 461-472.
- [31] Jiang WY, Ren J, Zhang XH, et al. CircC3P1 attenuated pro-inflammatory cytokine production and cell apoptosis in acute lung injury induced by sepsis through modulating miR-21 [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(19): 11221-11229.
- [32] Zhan Y, Yang C, Zhang Q, et al. Silent information regulator type-1 mediates amelioration of inflammatory response and oxidative stress in lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome [J]. J Biochem, 2021, 169(5): 613-620.
- [33] Mitra S, Exline M, Habyarimana F, et al. Microparticulate caspase-1 regulates gasdermin-D and pulmonary vascular endothelial cell injury [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2018, 59(1): 56-64.
- [34] Wang Y, Yang Y, Chen L, et al. Death-associated protein kinase 1 mediates ventilator-induced lung injury in mice by promoting alveolar epithelial cell apoptosis [J]. Anesthesiology, 2020, 133(4): 905-918.
- [35] Qiu P, Liu Y, Chen K, et al. Hydrogen-rich saline regulates the polarization and apoptosis of alveolar macrophages and attenuates lung injury via suppression of autophagy in septic rats [J]. Ann Transl Med, 2021, 9(12): 974.
- [36] Xu S, Pan X, Mao L, et al. Phospho-Tyr705 of STAT3 is a therapeutic target for sepsis through regulating inflammation and coagulation [J]. Cell Commun Signal, 2020, 18(1): 104.
- [37] Jin C, Chen J, Gu J, et al. Gut-lymph-lung pathway mediates sepsis-induced acute lung injury [J]. Chin Med J (Engl), 2020, 133(18): 7.
- [38] 陈加弟, 龚迪, 易玉虎, 等. 血管内皮糖萼在脓毒症急性肺损伤病理机制及诊断治疗中的作用 [J]. 解放军医学杂志, 2021, 46(4): 6.
- [39] 张宇, 卢笑晖, 连新宝. 脓毒症急性肺损伤的发生机制及治疗研究进展 [J]. 解放军医学杂志, 2021, 46(11): 1159-1164.
- [40] Xu Q, Chen J, Zhu Y, et al. JTE-013 Alleviates inflammatory injury and endothelial dysfunction induced by sepsis *in vivo* and *in vitro* [J]. J Surg Res, 2021, 265: 323-332.
- [41] Hao Y, Wang Z, Wang X, et al. OGDH is involved in sepsis induced acute lung injury through the MAPK pathway [J]. J Thorac Dis, 2021, 13(8): 5042-5054.
- [42] Xu B, Wang H, Chen Z. Puerarin inhibits ferroptosis and inflammation of lung injury caused by sepsis in LPS induced lung epithelial cells [J]. Front Pediatr, 2021, 9: 706327.
- [43] Liu J, Du J, Cheng X, et al. Effect of netrin-1 anti-inflammatory factor on acute lung injury in sepsis rats [J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 7928-7935.
- [44] Yang P, Xiong W, Chen X, et al. Overexpression of miR-129-5p mitigates sepsis-induced acute lung injury by targeting high mobility group box 1-sciencedirect [J]. J Surg Res, 2020, 256: 23-30.
- [45] Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease [J]. J Cell Physiol, 2018, 233(9): 6425-6440.
- [46] Hou W, Hu S, Su Z, et al. Myricetin attenuates LPS-induced inflammation in RAW 264.7 macrophages and mouse models [J]. Future Med Chem, 2018, 10(19): 2253-2264.
- [47] Ling T, Xie J, Shen YS, et al. Trichostatin A exerts anti-inflammation functions in LPS-induced acute lung injury model through inhibiting TNF- α and upregulating micorRNA-146a expression [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(7): 3935-3942.
- [48] Huh D, Matthews BD, Mammoto A, et al. Reconstituting organ-level lung functions on a chip [J]. Science, 2010, 328(5986): 1662-8.
- [49] Zhang M, Cong X, Lei J, et al. A 3D human lung-on-a-chip model for nanotoxicity testing [J]. Toxicol Res (Camb), 2018, 7(6): 1048-1060.
- [50] Zhang M, Wang P, Luo R, et al. Biomimetic human disease model of SARS-CoV-2 induced lung injury and immune responses on organ chip system [J]. Adv Sci (Weinh), 2020, 8(3): 2002928.
- [51] Alizadeh-Tabrizi N, Hall S, Lehmann C. Intravital imaging of pulmonary immune response in inflammation and infection [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 8: 620471.

[收稿日期]2022-04-01