

宋玲,高云航,李晗,等. 雾化吸入脂多糖导致的大鼠急性肺炎模型不同标本中炎症因子比较研究 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(1): 89-98.

SONG L, GAO Y H, LI H, et al. Comparative research of inflammatory factors in different specimens from a rat model of aspiration pneumonia induced by lipopolysaccharide [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(1): 89-98.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.01.009

雾化吸入脂多糖导致的大鼠急性肺炎模型不同标本中炎症因子比较研究

宋玲,高云航,李晗,陈腾飞,侯红平,叶祖光*,张广平*

(中国中医科学院中药研究所,北京 100700)

【摘要】 目的 探究通过雾化吸入脂多糖(LPS)所诱发的大鼠急性肺炎模型中,肺泡灌洗液、肺组织以及血清中炎症因子的变化情况。**方法** 通过连续 3 d、每天雾化吸入 15 min 4 mg/mL 的 LPS 来诱导大鼠急性肺炎模型,并同步监测 LPS 的粒径分布及气溶胶浓度,苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠肺病理学形态变化,显微镜观察肺泡灌洗液涂片白细胞及计数;超敏多因子电化学发光法测肺组织、血清及肺泡灌洗液干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、角质形成细胞衍生趋化因子(keratinocyte-derived chemokine/growth-regulated oncogene,KC/GRO)炎症因子。**结果** LPS 诱导的肺炎模型组织病理学,肺可见局灶或弥漫、肺泡上皮坏死伴脱落、炎性细胞浸润。测定雾化 LPS 累积粒度分布达到 10%、50% 及 90% 对应的粒径(diameter of 10%, 50% and 90% volume distribution, Dv(10), Dv(50) 及 Dv(90)) 分别为 0.6974 μm 、3.387 μm 和 8.836 μm ,气溶胶浓度为 4.08 g/m³,计算大鼠的吸入剂量为 47.10 mg/kg。在肺泡灌洗液中,模型组的中性粒细胞数量显著增加($P < 0.01$);同时模型组肺组织中的炎症因子 IL-1 β 、IL-6、KC/GRO 水平显著上升($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$)。肺泡灌洗液中的炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的含量也显著增高($P < 0.05$, $P < 0.001$, $P < 0.001$)。而血清中的炎症因子则未见明显变化。**结论** 在雾化吸入 LPS 构建的急性肺炎模型中,IL-1 β 、IL-6、KC/GRO 以及 TNF- α 等炎症因子在肺组织和肺泡灌洗液中均出现了显著变化,而血清中的炎症因子则未见明显变化。这表明该模型主要引发的是肺部局部的炎症反应。

【关键词】 急性肺炎模型;脂多糖;雾化吸入;炎症因子;白细胞分类计数

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 01-0089-10

Comparative research of inflammatory factors in different specimens from a rat model of aspiration pneumonia induced by lipopolysaccharide

SONG Ling, GAO Yunhang, LI Han, CHEN Tengfei, HOU Hongping, YE Zuguang*, ZHANG Guangping*

【基金项目】 中药研究所中药药理创新团队项目(CI2021B015),中国中医科学院创新工程项目(CI2021A04615),国家自然科学基金青年项目(82204740)。

Funded by Scientific and Technological Innovation Project of China Academy of Chinese Medical Sciences (CI2021B015), Innovation Project of China Academy of Chinese Medical Sciences (CI2021A04615), Youth Project of the National Natural Science Foundation of China (82204740).

【作者简介】 宋玲,女,硕士,助理研究员,研究方向:中药呼吸系统药理。Email:lsong@icmm.ac.cn

【通信作者】 叶祖光,男,硕士,研究员,研究方向:中药药理与毒理学。Email:yezuguang@sina.com;

张广平,男,博士,研究员,研究方向:中药呼吸系统药理。Email:gpszhang@icmm.ac.cn。

* 共同通信作者

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 10070, China)

Corresponding author: YE Zuguang. E-mail: yezuguang@sina.com; ZHANG Guangping. E-mail: gpzhang@icmm.ac.cn

【Abstract】 Objective To investigate the changes of inflammatory factors in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), lung tissue, and serum of a rat pneumonia model induced by inhalation of lipopolysaccharides (LPS). **Methods** Three days after modeling by LPS 4 mg/mL inhalation, 15 min/d, was conducted while monitoring the particle size distribution and aerosol concentration of LPS, the degree of inflammation in lung tissues of rats in each group was observed via HE staining, and neutrophils in BALF were counted by microscope. The contents of interferon gamma (IFN- γ), interleukin-1 beta (IL-1 β), IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), and KC/GRO in lung tissue, serum, and BALF were detected by Meso Scale Discovery. **Results** The lung histopathology of model rats displayed focal and diffuse alveolar epithelial necrosis with shedding and the aggregation and infiltration of inflammatory cells. The particle size distribution of atomized LPS was as follows, $D_v(10) = 0.6974 \mu\text{m}$, $D_v(50) = 3.387 \mu\text{m}$, $D_v(90) = 8.836 \mu\text{m}$. The aerosol concentration of LPS was 4.08 g/m^3 , and the calculated inhalation dose for rats was 47.10 mg/kg . The neutrophil count ($P < 0.01$) and contents of IL-1 β , IL-6, and TNF- α ($P < 0.05$, $P < 0.001$, $P < 0.001$) in the BALF, and the contents of IL-1 β , IL-6, and KC/GRO in lung tissue ($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$), of model rats were significantly increased. No biologically significant changes were observed in inflammatory factor levels in the serum. **Conclusions** In the acute pneumonia model induced by inhalation of LPS, significant changes in inflammatory factors such as IL-1 β , IL-6, KC/GRO, and TNF- α were observed in both lung tissue and bronchoalveolar lavage fluid (BALF), while no notable changes in these inflammatory factors were detected in serum. This indicates that the inflammation responses are primarily localized in the lungs.

【Keywords】 acute pneumonia model; lipopolysaccharide; aspiration; inflammatory factors; neutrophils count
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)/急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)是由于各种致病因素导致肺泡毛细血管内皮细胞和肺泡上皮细胞受到损伤。这些损伤进而引发肺泡的弥漫性损伤,包括肺水肿和透明膜的形成。临床上主要表现为呼吸窘迫和低氧血症。最近的研究揭示炎症反应在 ALI/ARDS 的发病过程中起着关键作用,尽管其确切发病机制尚未完全明确。在疾病过程中大量促炎因子、迁移因子和炎性介质过表达,形成免疫应激反应,诱发炎症风暴,严重者出现呼吸窘迫综合征。其中,促进炎症反应的平衡作用,避免炎症因子过度活跃,对于恢复机体正常生理功能至关重要。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰氏阴性细菌细胞壁外膜的主要成分,可诱使炎症因子的释放^[1-2],常作为 ALI 的诱导剂,也是目前公认的诱导动物急性肺炎模型的药物^[3-4]。已有研究表明 LPS 进入生物体内后,可以激活相关炎症信号通路^[5],导致炎症联级反应^[6],从而促进炎症因子的释放,如 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等均在 ALI/

ARDS 病程进展中有非常重要的作用^[7]。但是在 LPS 诱导的肺损伤模型炎症因子检测的样本灌洗液、肺组织、血清和炎性因子的选择不尽相同。本课题组前期构建了雾化吸入 LPS 致大鼠肺炎模型,大鼠肺部损伤程度一致,病理变化表现稳定^[8],本研究比较 LPS 诱导的肺炎模型肺组织、肺泡灌洗液和血清中炎性因子的影响,较系统研究了模型炎症变化特点,在此基础上进一步确定了 LPS 致大鼠急性肺炎模型的建立方法,为后续的肺炎发病机制研究以及发病早期诊断等提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

30 只 SPF 级 Wistar 大鼠,6 ~ 8 周龄,170 ~ 190 g,雄性,购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2021-0006】,饲养于中国中医科学院中药研究所 SPF 级动物房【SYXK(京)2023-0077】。饲养条件为 12 h 明暗交替,温度

(23 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 湿度(50 ± 15)%, 自由饮水及进食。饲料购自北京科澳协力饲料有限公司。本研究通过中国中医科学院中药研究所实验动物伦理委员会的审查(2019B021)。

1.1.2 主要试剂与仪器

LPS(Sigma, 127M4030V, 美国), 地塞米松磷酸钠注射液(贵州天地药业有限责任公司, 19110802A, 中国), 戊巴比妥钠(北京索莱宝科技有限公司, 20150412, 中国), 甲醛(福晨(天津)化学试剂有限公司, 20190920, 中国), 生理盐水(石家庄四药有限公司, 2006192110, 中国), V-PLEX Proinflammatory Panel 2 大鼠试剂盒(Meso Scale Discovery, K15059D-1, 美国), 蛋白浓度测定(bicinchoninic Acid Assay, BCA)试剂盒(赛默飞世尔科技有限公司, VJ312549, 美国), RIPA 裂解液(北京康为世纪生物生物科技有限公司, 01406/17923, 中国)。口鼻暴露吸入塔(上海梅理实验科技有限公司, Melton Inhalogic NIES, 中国), 离心机(Eppendorf, Centrifuge 5810R, 德国), 电子天平(Sartorius, BSA3202S-CW, 德国), 显微镜及图像分析系统(Olympus, BX51, 日本), 雾化器(PARI, Turbo BOY N, 德国), CEL-712 Microdust Pro 监测仪(CASELLA 公司, CEL-712, 英国), Spraytec 实时喷雾粒度分析仪(马尔文, Spraytec, 英国), 多因子电化学发光分析仪(Meso Scale Discovery, MSD)(MSD 公司, SQ120, 美国), 脱水机(樱花, VIP-6, 日本), 包埋机(科迪仪器设备有限公司, KD-BM, 中国), 病理切片机(徕卡, RM2016, 德国), 组织摊片机(科迪仪器设备有限公司, KD-P, 中国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与模型制备

Wistar 大鼠适应性喂养 5 d, 根据体质量随机分为 3 组: 空白对照组、模型组、阳性对照组, 每组 10 只。模型组和阳性对照组均吸入 LPS 溶液(4 mg/mL) 15 min 进行造模, 每次雾化药液体积约为 5 mL, 连续 3 d, 空白对照组雾化吸入生理盐水 15 min, 阳性对照组连续 3 d 静脉注射地塞米松(3.6 mg/kg), 第 4 天早上即第 3 次造模后 16 h 各组进行取材。

1.2.2 LPS 雾化气溶胶浓度测定及粒径测定

将 CEL-712 Microdust Pro 监测仪插入到

Melton Inhalogic NIES 口鼻式吸入暴露系统的暴露孔, 对雾化气溶胶进行浓度分析, 待气溶胶浓度即时值基本稳定后再测量 5 min, 测量完毕后计算气溶胶浓度的平均值。激光衍射仪的配置方式如下: 维持雾化器与雾化压缩机稳定连接, 避免两者脱离, 并在设定的气体流速和压力下工作。将 4 mg/mL 的 LPS 溶液装入雾化器中。激光衍射仪进口与雾化气溶胶的出口相连, 出口则与外置过滤器相接, 外置过滤器与真空泵相连。进口连接流量计, 用真空泵调控入口气体流速至($15 \pm 5\%$) L/min。启动计算机上的 Spraytec software 软件(版本 3.20), 并按照以下标准作业程序进行设置: 选择连续模式, 设定颗粒的折光系数为 1.33, 指定分散介质为空气且其折光系数为 1.00。完成设置后即可开始执行光路背景的测试。在背景测试通过后, 需将雾化器与入口端进行连接。然后, 启动压缩机开始雾化, 在此过程中, 对气溶胶的粒径进行测试, 当气溶胶浓度出现明显下降时, 应立即停止测试, 并关闭雾化器。在分析过程中, 需对 $D_v(10)$, $D_v(50)$ 及 $D_v(90)$ 和激光强度进行持续性的监测。

1.2.3 样本采集

造模后 16 h 用 0.8% 戊巴比妥钠(经 0.22 μm 滤膜过滤除菌)麻醉(0.6 mL/100 g), 腹主动脉采血, 暴露胸腔, 右叶结扎, 用生理盐水灌洗左肺, 缓缓打入, 静止平衡 30 s, 缓缓抽出, 每次 1 mL, 灌洗 2 次, 灌洗速度 2 mL/min(每次 30 s), 合并灌洗液(回收率 > 70%)。从腹主动脉抽取的动脉血静置数分钟后, 3000 r/min 离心 15 min, 分离血清, 分装后保存。瑞氏-姬姆萨染色法观察肺泡灌洗液中炎症细胞(巨噬细胞、中性粒细胞)含量。右肺用 4% 甲醛固定, 室温保存, 待进一步病理检测, 制备石蜡切片供组织学检查。取适量肺组织, 用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗去血污, 剪成小块放入研磨管中并加入适量 PBS, 加入钢珠放入组织研磨仪中制成匀浆, 6861 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 10 min 后取上清, 用于炎症因子检测。同时采用 Bicinchoninic Acid Assay BCA 法对上清液进行蛋白定量。

1.2.4 检测指标与方法

(1) 肺组织病理形态学检查: 将肺组织进行梯度乙醇脱水 70%、80%、95%、100% 各 30 min。

置于二甲苯进行组织透明,共 2 次,每次 20 min。石蜡浸蜡共 2 次,每次 12 min。石蜡包埋,切片厚度约 4 μm 。苏木素-伊红(HE)染色:①脱蜡,二甲苯脱蜡 2 次,每次 8 min;100%乙醇脱蜡 2 次,每次 8 min;90%乙醇、80%乙醇、60%乙醇各 8 min;②苏木素染色 4 min,流水清洗;③盐酸乙醇分化 2 ~ 3 s,流水清洗;④0.5%氨水 20 s,流水清洗,上镜观察;⑤0.5%伊红染色 1 min;⑥80%乙醇、90%乙醇各分化 3 ~ 5 s,95%乙醇分化 5 min,100%乙醇分化 3 次,每次 5 min,二甲苯分化 2 次,每次 5 min;⑦中性树脂胶封固后镜观。制成的肺组织病理切片在光学显微镜下进行观察,进行肺组织病理损伤评分。

(2)肺泡灌洗液中性粒细胞计数:肺泡灌洗液离心,将重悬后的肺泡灌洗液稀释,制成均匀的细胞悬液,取 10 μL 加至细胞计数板上,静止 3 min,待细胞完全沉淀后,在低倍镜下数四角中 10 个小方格的细胞数,记为 N 。有核细胞总数 = $(N/4) \times 10 \times 20 \times 10^6/\text{L}$,计算肺泡灌洗液中白细胞总数。将离心后的细胞沉淀用生理盐水重悬,沉淀混匀后,吸取 10 μL 细胞悬液涂片,待涂片风干后,至无水乙醇中固定 10 min 晾干,进行瑞氏-吉姆萨染色,于显微镜(油镜)下计数 100 个细胞,计算中性粒细胞所占百分比,再乘以白细胞总数计算肺泡灌洗液中性粒细胞量。

(3)炎症因子检测:采用 MSD 分别检测肺组织、血清及肺泡灌洗液中的 $\text{IFN-}\gamma$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-4 、 IL-5 、 IL-6 、 IL-10 、 IL-13 、 $\text{TNF-}\alpha$ 和 KC/GRO 。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 20.0 统计软件对实验数据进行独立样本 T 检验(T -检验),统计数据以平均值 $\pm$ 标

准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 雾化 LPS 浓度及粒径测定结果

检测结果显示,雾化 LPS 气溶胶平均浓度为 4.08 g/m^3 ,即代表单位体积中所含雾化 LPS 气溶胶的质量为 4.08 g,根据公式,计算得出大鼠吸入 LPS 的剂量为 47.10 mg/kg 。

粒径测定结果显示,LPS 雾化气溶胶粒径: $D_v(10) = 0.6974 \mu\text{m}$, $D_v(50) = 3.387 \mu\text{m}$, $D_v(90) = 8.836 \mu\text{m}$,透过率 = 39.4%,结果见图 1。 $D_v(10)$ 、 $D_v(50)$ 及 $D_v(90)$ 指的是累积粒度分布达到 10%、50% 及 90% 时对应的粒度,可以反映雾化粒径的均匀程度。 $D_v(50)$ 为中位粒径,雾化 LPS 气溶胶中位粒径可达 3 μm ,表明该条件下的 LPS 气溶胶可以较稳定地沉积到大鼠肺部。

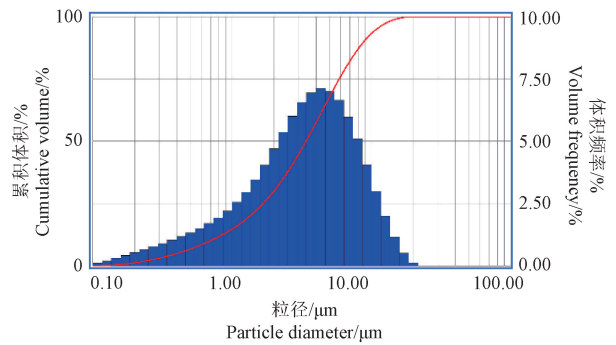


图 1 雾化 LPS 气溶胶粒径分布图

Figure 1 Particle size distribution of LPS aerosols

雾化 LPS 气溶胶粒径持续监测图见图 2。从图中可以看出,随着雾化时间的增加,雾化粒径逐渐平稳,最终保持稳定。

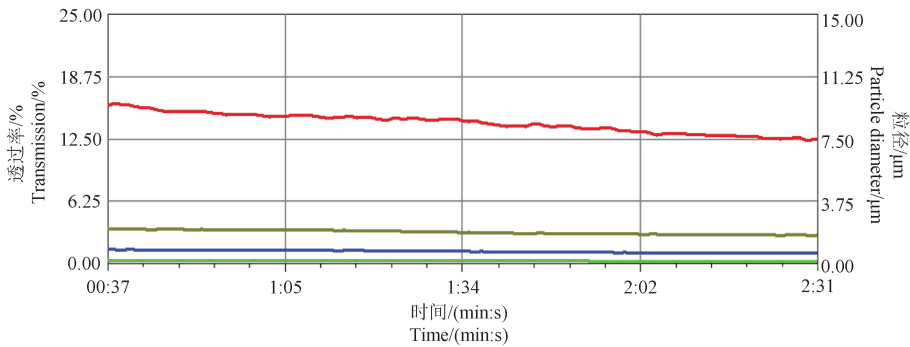


图 2 雾化 LPS 气溶胶粒径持续监测图

Figure 2 Continuous monitoring map of aerosol size during LPS atomization

2.2 肺组织病理学结果比较

光镜病理观察:镜下显示空白对照组各结构正常,连续、清晰,支气管上皮完整,粘膜光滑,各层结构清晰,偶见散在炎性细胞,无渗出。模型组肺可见局灶或弥漫性肺泡上皮变性坏死伴脱落,炎细胞浸润(中性粒细胞和单核细胞为主)等改变,整体上呈现出明显的肺损伤。阳性对照组未见上皮细胞坏死脱落,有轻度炎性细胞浸润。

肺组织病理半定量评分比较:模型组、阳性对照组上皮细胞坏死脱落发生率分别为:8/10、0/10。从损伤程度来看,模型组 2 只动物为重度肺

泡上皮坏死脱落,阳性对照组未见肺泡上皮坏死脱落及炎性细胞浸润。模型组、阳性对照组中性粒细胞浸润在全部动物肺出现,但从程度上来看,模型组中性粒细胞浸润发生率为 10/10,均为中度以上,阳性对照组主要为轻度以下,模型组中度中性粒细胞浸润发生率为 8/10。可见,阳性对照组可不同程度减轻炎性细胞浸润的程度,其中,阳性对照组炎性细胞浸润为轻度改变,多数动物肺泡上皮坏死脱落轻度以下,治疗保护较好。模型组局灶性化脓性坏死发生率为 2/10,阳性对照组未见局灶性化脓性坏死。见表 1,图 3。

表 1 急性肺炎大鼠肺主要病变统计

Table 1 Statistics of main pathological changes in lungs of rats with acute pneumonia				
脏器 Organs	病变 Pathology	程度 Grade	模型组 Model group	阳性对照组 Positive control group
肺 Lung	中性粒细胞浸润 Neutrophil infiltration	+	0	4
		++	0	6
		+++	8	0
		++++	2	0
		合并 Total	10/10	10/10
	上皮细胞坏死脱落 Epithelial cells necrotic shedding	+	0	0
		++	0	0
		+++	6	0
		++++	2	0
		合并 Total	8/10	0/10

注: + :轻微; ++ :轻度; +++ :中度; ++++ :重度。
Note. + . Slight. ++ . Mild. +++ . Moderate. ++++ . Severe.

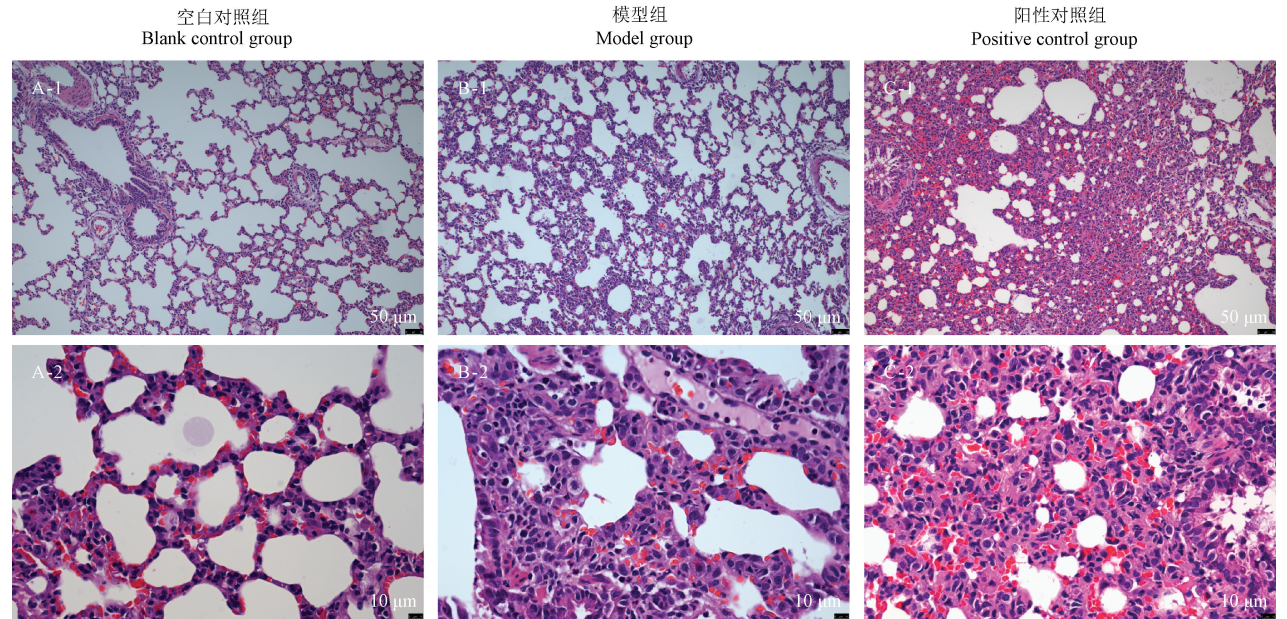


图 3 急性肺炎大鼠肺病理图片

Figure 3 Pathological picture of lung in rats with acute pneumonia

2.3 肺泡灌洗液中性粒细胞数

与空白对照组比较,模型组中性粒细胞显著升高($P < 0.01$)。从模型组的肺泡灌洗液涂片可以看出,模型组涂片出现了较多的中性粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞。见表 2 和图 4。

2.4 炎症因子

2.4.1 肺组织炎症因子的变化

与空白对照组比较,模型组的 IL-1 β 、IL-6 和 KC/GRO 含量显著性升高($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$)。模型组 TNF- α 含量虽有升高,但差异无显著性($P > 0.05$)。其他炎症因子变化较小,均无显著性变化。见表 3。

2.4.2 肺泡灌洗液炎症因子的变化

与空白对照组比较,模型组的 IL-1 β 、IL-6 和

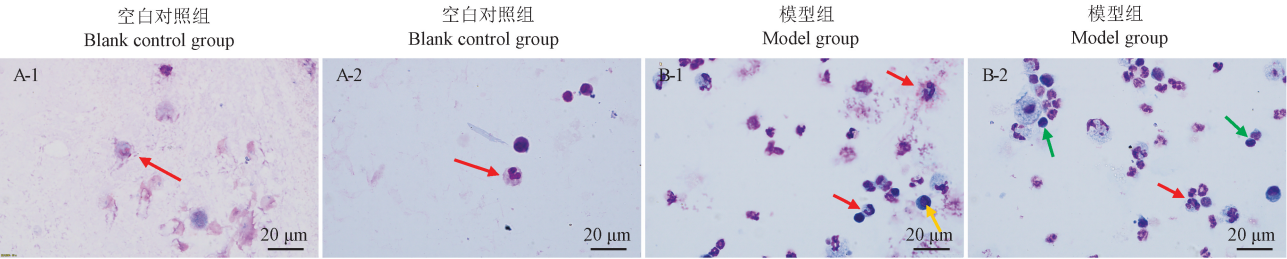
TNF- α 含量明显升高($P < 0.05$, $P < 0.001$, $P < 0.001$), IL-13 与 IL-4 在肺泡灌洗液中未检出。模型组其他炎症因子均无显著性变化。对比表 3 发现,模型组肺泡灌洗液的炎症因子含量均比肺组织的低。见表 4。

表 2 急性肺炎大鼠肺泡灌洗液中性粒细胞数($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Number of bronchoalveolar lavage fluid neutrophil in rats with acute pneumonia($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

分组 Groups	中性粒细胞数/($\times 10^9/L$) Number of neutrophil/($\times 10^9/L$)
空白对照组 Blank control group	0.19 $\pm$ 0.06
模型组 Model group	1.24 $\pm$ 0.43**

注:与空白对照组相比, ** $P < 0.01$ 。(下表同)
Note. Compared with the blank control group, ** $P < 0.01$. (The same in the following tables)



注:红色箭头:中性粒细胞;黄色箭头:巨噬细胞;绿色箭头:淋巴细胞。

图 4 肺泡灌洗液涂片

Note. Red arrow. Neutrophil. Yellow arrow. Macrophages. Green arrow. Lymphocyte.

Figure 4 Bronchoalveolar lavage fluid smear

表 3 肺组织炎症因子统计结果($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 3 Statistical results of inflammatory factors in lung tissue($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

炎症因子 Inflammatory factor	空白对照组/(pg/mL) Blank control group/(pg/mL)	模型组/(pg/mL) Model group/(pg/mL)
IFN- γ	12.33 $\pm$ 2.47	11.88 $\pm$ 3.23
IL-10	2.24 $\pm$ 0.52	2.15 $\pm$ 1.41
IL-13	1.62 $\pm$ 0.45	1.33 $\pm$ 1.06
IL-1 β	43.07 $\pm$ 5.12	227.96 $\pm$ 107.18**
IL-4	2.34 $\pm$ 0.40	2.01 $\pm$ 0.18
IL-5	14.97 $\pm$ 2.58	13.92 $\pm$ 4.82
IL-6	408.22 $\pm$ 270.13	1391.75 $\pm$ 1416.57*
KC/GRO	131.68 $\pm$ 49.29	1113.29 $\pm$ 711.09**
TNF- α	7.46 $\pm$ 1.97	25.87 $\pm$ 22.08

注:与空白对照组相比, * $P < 0.05$ 。(下表同)
Note. Compared with the blank control group, * $P < 0.05$. (The same in the following tables)

2.4.3 血清炎症因子的变化

与空白对照组相比,模型组血清炎症因子均

未见显著性变化。说明该模型对血清炎症因子影响较小,全身炎症反应较轻。见表 5。

表 4 肺泡灌洗液炎症因子统计结果($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 4 Statistical results of inflammatory factors in bronchoalveolar lavage fluid($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

炎症因子 Inflammatory factor	空白对照组/(pg/mL) Blank control group/(pg/mL)	模型组/(pg/mL) Model group/(pg/mL)
IFN- γ	0.59 $\pm$ 0.27	0.67 $\pm$ 0.58
IL-10	0.45 $\pm$ 0.63	0.40 $\pm$ 0.66
IL-13	-	-
IL-1 β	13.80 $\pm$ 15.51	32.98 $\pm$ 18.80*
IL-4	-	-
IL-5	5.04 $\pm$ 2.95	5.57 $\pm$ 1.49
IL-6	32.78 $\pm$ 22.53	136.18 $\pm$ 75.87***
KC/GRO	167.31 $\pm$ 39.92	220.66 $\pm$ 105.49
TNF- α	2.86 $\pm$ 2.73	12.83 $\pm$ 5.95***

注:与空白对照组相比, *** $P < 0.001$ 。
Note. Compared with the blank control group, *** $P < 0.001$.

表 5 血清炎症因子统计结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Statistical results of inflammatory factors
in serum ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

炎症因子 Inflammatory factor	空白对照组/(pg/mL) Blank control group/(pg/mL)	模型组/(pg/mL) Model group/ (pg/mL)
IFN- γ	5.08 $\pm$ 0.13	4.99 $\pm$ 0.27
IL-10	6.00 $\pm$ 0.57	5.48 $\pm$ 0.43
IL-13	5.98 $\pm$ 0.46	5.99 $\pm$ 0.30
IL-1 β	0.58 $\pm$ 0.23	1.10 $\pm$ 1.42
IL-4	1.67 $\pm$ 0.16	1.65 $\pm$ 0.18
IL-5	18.68 $\pm$ 2.71	21.23 $\pm$ 1.48
IL-6	399.57 $\pm$ 32.90	412.39 $\pm$ 39.13
KC/GRO	89.30 $\pm$ 27.40	80.70 $\pm$ 14.99
TNF- α	2.34 $\pm$ 0.40	2.01 $\pm$ 0.18

3 讨论

ALI 不仅仅是一个独立的疾病,其导致的炎症是很多肺部疾病(如急性呼吸窘迫综合征、慢阻肺及肺纤维化等)的早期病变和启动的诱因。在呼吸道疾病的发生发展过程中炎症是其最为基本的病理变化,而 LPS 诱导的肺损伤模型是研究肺部炎症最为常用的动物模型之一。前期通过比较 LPS 不同的给药方式成功的构建了雾化吸入给药的模型^[8],雾化吸入法是通过自主呼吸给药,操作简单、成模率高、重复性好,接近肺炎发病的过程,在造模中具有一定的优势^[9]。在雾化吸入给药中,雾化粒径大小与其沉积的部位密切相关。一般而言,粒径 < 5 μm 的颗粒能到达肺气管、各级支气管及肺部。当吸入气溶胶粒径在 1 ~ 4 μm 时,随着粒径的增大,肺部的药物沉积量会减少^[10]。而粒径大小与药物浓度、理化性质有关。因此后续筛选确定 LPS 浓度为 4 mg/mL,保证溶液有较好的溶解性且容易满足。实验中对雾化气溶胶浓度的监测结果显示雾化 1 min 内给药腔体的气溶胶浓度达到饱和并呈现稳定浓度。

LPS 诱导的 ALI 模型除了肺系数、肺功能等评价指标外,炎症因子检测也是非常重要的指标。目前对于炎症因子指标的评价标本包括肺组织、肺泡灌洗液和血清。雾化给药为肺部靶向给药,药物作用于气管和肺组织,同时肺作为呼吸器官,其炎症反应可能还会反应在全身,因此本实验系统观察比较了肺泡灌洗液、肺组织和血

清炎症因子的改变以确定该造模方式下的炎症因子指标及其敏感指标。

炎症因子是一类由免疫细胞分泌的可以调节免疫、调控细胞迁移及炎症反应的小分子蛋白质。机体受到外界刺激后,原始的 CD4⁺T 辅助细胞分化为 Th1 细胞和 Th2 细胞。Th1 免疫反应介导细胞毒性和局部炎症有关的免疫应答,促进炎症;Th2 免疫反应则是通过分泌 Th2 细胞因子刺激 B 细胞增生,产生抗体,抑制炎症反应^[11]。感染肺炎后,细胞因子构成的调节网络失控,促炎和抑炎因子平衡失调。IFN- γ 属于特征型的 Th1 型细胞因子,促进 Th 细胞分化成 Th1 细胞,抑制 Th 细胞向 Th2 细胞转化^[11]。IL-10 也是一种强免疫抑制因子,它可以抑制很多细胞因子的合成及分泌^[12-13]。IL-13 促进嗜酸性趋化因子的释放,诱导血管内皮细胞黏附分子的表达^[14-15]。IL-1 β 属于早期的促炎细胞因子,可以激活内皮细胞,促进完成多形核白细胞 (poly morphonuclear neutrophil, PMN) 黏附行为^[16-17]。IL-4 可以使 Th2 型细胞因子过度表达^[18] 导致气道慢性炎症。IL-5 可以特异性的选择并趋化嗜酸性粒细胞,引导其向呼吸道炎症部位聚集,增强对炎症部位的浸润作用;还可以选择性的作用于血管内皮及嗜酸性细胞,增加它们之间的粘附性,使其更容易脱颗粒,引起气道炎症及高反应性^[19]。IL-6 是急性期合成的重要介质^[20],可以诱导细胞毒性 T 淋巴细胞的增殖分化,增强自然杀伤细胞 (NK 细胞) 活性,参与炎症反应^[21]。研究表明,IL-6 升高是最早出现的感染指标^[22]。KC/GRO 是一种强效的嗜中性趋化因子,为单核细胞和中性粒细胞的化学诱导物,可能在炎症中以自分泌方式对内皮细胞发挥作用^[23]。TNF- α 是由活化的单核巨噬细胞产生的^[24],可以促进局部炎症反应,改变血管内皮细胞通透性,趋化中性粒细胞,从而启动炎症反应^[25]。TNF- α 还可以诱发其他炎症因子(如 IL-5、IL-6 等)的释放,活化单核、巨噬细胞,强化抗原呈递能力^[25]。LPS 诱发的肺损伤,其形成机制主要涉及两个方面。首先,LPS 可以直接对内皮细胞产生作用,通过增加细胞因子、粘附分子和组织因子的表达,引发内皮细胞的损伤及凋亡。其次,LPS 还能激活宿主的获得性防御反应,这一过程中涉及细胞因子和体液因子的

广泛参与,最终引发大规模的炎症介质释放^[26-28]。其过程涉及大量血管外 PMN 的聚集与活化,进而释放出大量的炎症因子,所以本研究选取了 IFN- γ 、IL-10、IL-13、IL-1 β 、IL-4、IL-5、IL-6、KC/GRO、TNF- α 炎症因子进行检测。

本实验中模型的炎症具体观察指标包括组织病理显微观察、肺泡灌洗液白细胞计数以及肺组织、肺泡灌洗液和血清中的炎性因子。病理结果显示,模型组大鼠出现了较严重的上皮细胞脱落坏死以及肺中性粒细胞浸润,偶见局灶性化脓性坏死。同时,肺泡灌洗液中的中性粒细胞数量对肺炎的评价也非常重要^[29]。对肺泡灌洗液炎性细胞进行统计,与空白对照组比较,模型组的中性粒细胞总数显著升高($P < 0.01$)。上述结果提示模型成功。

炎性因子检测结果显示,模型组血清所测 9 种炎性因子均未出现显著性变化,而在肺组织中,IL-1 β 、IL-6 和 KC/GRO 都明显升高,肺泡灌洗液中 IL-1 β 、IL-6 以及 TNF- α 均明显升高。肺组织和肺泡灌洗液中产生变化的炎性因子主要是 IL-1 β 、IL-6、KC/GRO 以及 TNF- α ,推测主要是 Th1 细胞因子占主导作用,Th2 细胞因子分泌相对较少,导致机体朝着炎症方向发展。结合 LPS 的致炎机理进一步分析推断,LPS 吸入肺部后,与脂多糖结合蛋白(lipopolysaccharide binding protein, LBP)、LPS 受体 14(cluster of differentiation 14, CD14)分子结合形成 LPS-LBP-CD14 复合物,再与 Toll 样受体 4(toll like receptor 4, TLR4)结合,信号传至细胞内,激活转接分子髓样分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MyD88),使白细胞介素-1 受体(interleukin-1 β receptor, IL-1R)相关蛋白激酶磷酸化,传递信号至核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)这两条通路,最终诱导产生了 TNF- α 、IL-6 以及一些趋化因子等。同时 NF- κ B 还可以激活 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)炎性小体,进一步促进含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-1(cysteinyl aspartate specific proteinase-1, caspase-1)的激活,对 IL-1 β 进行加工,释放促炎细胞因子 IL-1 β ,激

活内皮细胞,促进完成 PMN 黏附行为^[30]。而趋化因子 KC/GRO 的升高,会诱导中性粒细胞等募集至肺部,加重肺炎的炎症程度。这也说明 LPS 吸入诱导的肺炎为局部靶向模型,其病变部位主要是在肺部局部,全身的炎症反应并不明显。从检测结果还可以看出,与空白对照组相比,早期促炎因子 IL-1 β 在肺组织中的变化比在肺泡灌洗液中的变化更显著(肺组织中 $P < 0.01$,肺泡灌洗液中 $P < 0.05$),即 IL-1 β 在肺组织中的变化更敏感;而 IL-6 和 TNF- α 则是在肺泡灌洗液中的变化比肺组织中的变化更显著(IL-6 在肺泡灌洗液中($P < 0.001$),在肺组织中($P < 0.05$));TNF- α 在肺泡灌洗液中($P < 0.001$),在肺组织中($P > 0.05$),说明 IL-6 和 TNF- α 在肺泡灌洗液中的变化更敏感。趋化因子 KC/GRO 在肺组织中有显著性变化($P < 0.01$),肺泡灌洗液中则无显著性变化($P > 0.05$),说明 KC/GRO 主要在肺组织中起作用。

LPS 诱导的 ALI 是一个非常复杂的过程,机制尚不完全清楚。本实验炎性因子检测结果发现,雾化吸入 LPS 诱导大鼠 ALI 模型中血清炎性因子无明显变化,说明该模型全身反应较轻;肺组织和肺泡灌洗液中炎性因子变化都比较明显,但是不同炎性因子在二者中的敏感性并不相同。具体可根据实验需要选择合适的样本对相关的炎性因子进行检测。

参 考 文 献(References)

- [1] KAPOOR K, SINGLA E, SAHU B, et al. PARP inhibitor, olaparib ameliorates acute lung and kidney injury upon intratracheal administration of LPS in mice [J]. Mol Cell Biochem, 2015, 400(1/2): 153-162.
- [2] XU X P, HUANG L L, HU S L, et al. Genetic modification of mesenchymal stem cells overexpressing angiotensin II type 2 receptor increases cell migration to injured lung in LPS-induced acute lung injury mice [J]. Stem Cells Transl Med, 2018, 7(10): 721-730.
- [3] KONG G, HUANG X, WANG L, et al. Astilbin alleviates LPS-induced ARDS by suppressing MAPK signaling pathway and protecting pulmonary endothelial glycocalyx [J]. Int Immunopharmacol, 2016, 36: 51-58.
- [4] LV H, LIU Q, WEN Z, et al. Xanthohumol ameliorates lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury via induction of AMPK/GSK3 β -Nrf2 signal axis [J]. Redox Biol, 2017, 12: 311-324.

- [5] ZHANG Y, XU T, PAN Z, et al. Shikonin inhibits myeloid differentiation protein 2 to prevent LPS-induced acute lung injury [J]. Br J Pharmacol, 2018, 175(5): 840-854.
- [6] LU Y C, YE H W C, OHASHI P S. LPS/TLR4 signal transduction pathway [J]. Cytokine, 2008, 42(2): 145-151.
- [7] CHEN X, TANG J, SHUAI W, et al. Macrophage polarization and its role in the pathogenesis of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome [J]. Inflamm Res, 2020, 69(9): 883-895.
- [8] 唐思璇, 肖芳. 脂多糖诱导肺炎动物模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 864-869.
- TANG S X, XIAO F. Research progress on lipopolysaccharide-induced pneumonia animal models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(6): 864-869.
- [9] 张亚平, 张广平, 苏萍, 等. 不同途径吸入脂多糖致大鼠急性肺炎模型的优选 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(7): 82-88.
- ZHANG Y P, ZHANG G P, SU P, et al. Selection of acute pneumonia rat models induced by lipopolysaccharide with different inhalation pathways [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2018, 24(7): 82-88.
- [10] 张鹏飞, 余珊珊, 曹瑾, 等. 吸入药物非临床毒性评价特点与要求 [J]. 中国药物警戒, 2021, 18(6): 570-574, 578.
- ZHANG H F, YU S S, CAO J, et al. Features and requirements of non-clinical toxic evaluation of inhalable drugs [J]. Chin J Pharmacovigil, 2021, 18(6): 570-574, 578.
- [11] 韩光, 张慧, 谢丛华, 等. Th1/Th2 免疫失衡与放射性肺损伤 [J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2011, 5(11): 3241-3244.
- HAN G, ZHANG H, XIE C H, et al. Th1/Th2 immune imbalance and radiation-induced lung injury [J]. Chin J Clin (Electron Ed), 2011, 5(11): 3241-3244.
- [12] 潘黎明, 王跃, 张海英. IL-10 在小儿支原体肺炎发病机制中的作用 [J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(3): 376-378.
- PAN L M, WANG Y, ZHANG H Y. The effects of IL-10 on Mycoplasma pneumonia in children [J]. Chin J Lab Diagn, 2009, 13(3): 376-378.
- [13] 王振华, 李丽红, 于侠. 肺炎支原体性肺炎患儿血清中 IL-6、IL-10 水平测定及意义 [J]. 中国妇幼保健, 2005, 20(21): 2802-2803.
- WANG Z H, LI L H, YU X. Detection and significance of serum interleukin 6 (IL-6), interleukin 10 (IL-10) in children with Mycoplasma pneumoniae pneumonia [J]. Matern Child Health Care Chin, 2005, 20(21): 2802-2803.
- [14] 邓连瑞, 金辉. 血清 IL-13、IL-18 及 TNF- α 在支原体肺炎儿童血清中的表达及临床价值 [J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(20): 2832-2834.
- DENG L R, JIN H. Expression in the serum and the instruction value of interleukin-13, interleukin-18 and tumor necrosis factor- α in children with Mycoplasma pneumoniae pneumonia [J]. Int J Lab Med, 2017, 38(20): 2832-2834.
- [15] 酆银芳, 张莉. IL-13 和 VEGF 在肺炎支原体肺炎伴喘息儿童血清中检测及意义 [J]. 临床肺科杂志, 2014, 19(1): 92-94.
- LI Y F, ZHANG L. Expression and its significance of IL-13 and VEGF in serum of infants with Mycoplasma pneumoniae pneumonia complicated with wheezing [J]. J Clin Pulm Med, 2014, 19(1): 92-94.
- [16] 桂明珠, 王俊芳, 曾娜, 等. 白细胞介素-6、-8、-1 β 在不同肺炎患儿血清及支气管肺泡灌洗液中的变化及临床意义 [J]. 儿科药科学杂志, 2020, 26(7): 1-4.
- GUI M Z, WANG J F, ZENG N, et al. Changes and clinical significance of interleukin in serum and bronchoalveolar lavage fluid of children with different pneumonia [J]. J Pediatr Pharm, 2020, 26(7): 1-4.
- [17] 丁军颖, 丁雪霏, 卢幼然, 等. 芪归银对铜绿假单胞菌致肺炎大鼠免疫调节作用初探 [J]. 河北中医药学报, 2019, 34(2): 1-5.
- DING J Y, DING X F, LU Y R, et al. Preliminary study on the immunomodulatory effect of qiguiyin on *Pseudomonas aeruginosa*-induced pneumonia in rats [J]. J Hebei Tradit Chin Med Pharmacol, 2019, 34(2): 1-5.
- [18] 郭玲, 刘伟, 刘丰梅. 哮喘患者 IFN- γ /IL-4 的失衡及相应肺功能变化 [J]. 临床肺科杂志, 2005, 10(4): 497-498.
- GUO L, LIU W, LIU F M. Investigation of the changes of IFN- γ /IL-4 levels and pulmonary function of asthmatic patients [J]. J Clin Pulm Med, 2005, 10(4): 497-498.
- [19] 夏云芳, 陈敬国, 林蕾, 等. 蒲地蓝消炎口服液对肺炎支原体肺炎喘息患儿血清 IL-5 的影响 [J]. 航空航天医学杂志, 2013, 24(7): 840-841.
- XIA Y F, CHEN J G, LIN Q, et al. Effect of pudilan Xiaoyan oral liquid on serum IL-5 in children with Mycoplasma pneumoniae pneumonia and wheezing [J]. J Aerosp Med, 2013, 24(7): 840-841.
- [20] 钱建刚, 马云宝, 张晓懿. 支气管肺炎患儿血清 6 种细胞因子测定 [J]. 放射免疫学杂志, 2005, 18(5): 333-335.
- QIAN J G, MA Y B, ZHANG X Y. Measurement of serum levels of six cytokines (IL-2, IL-5, IL-6, IL-10, TNF- α , IGF-II) in pediatric patients with bronchopneumonia [J]. J Radioimmunology, 2005, 18(5): 333-335.

[21] 李国保, 李沛. 动态监测重症肺炎患者血液和支气管肺泡灌洗液中 IL-6、IL-8、IL-10 的含量及其意义 [J]. 中国实用医药, 2009, 4(16): 6-8.
LI G B, LI P. The dynamic monitor critically ill pneumonia patient blood and the bronchial tube pulmonary alveolus fill in the cleaning solution IL-6, IL-8, the IL-10 content and significance [J]. Chin Pract Med, 2009, 4(16): 6-8.

[22] 曾赛丽, 游晓星, 刘良专, 等. 衣原体肺炎患者支气管肺泡灌洗液中 TNF- α 、IL-6 及 IL-10 的检测及临床意义 [J]. 当代医学, 2011, 17(34): 15-16.
ZENG S L, YOU X X, LIU L Z, et al. Detection and clinical significance of TNF- α , IL-6 and IL-10 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with chlamydia pneumonia [J]. Contemp Med, 2011, 17(34): 15-16.

[23] WUYTS A, GOVAERTS C, STRUYF S, et al. Isolation of the CXC chemokines ENA-78, GRO α and GRO γ from tumor cells and leukocytes reveals NH₂-terminal heterogeneity. Functional comparison of different natural isoforms [J]. Eur J Biochem, 1999, 260(2): 421-429.

[24] 刘斌, 何礼贤, 瞿介明. 大鼠卡氏肺孢菌肺炎肺泡灌洗液中炎性细胞及 TNF α 水平变化 [J]. 上海免疫学杂志, 2000, 20(2): 110-112.
LIU B, HE L X, QU J M. Significances of assesement for the inflammatory cells and the concentration of TNF α in bronchial aleveolar lavage fluids of rats with *Pneumocystis carinii* pneumonia and bacterial pneumonia [J]. Shanghai J Immunol, 2000, 20(2): 110-112.

[25] 赵少岚, 张德雄, 邱木桐. 肺炎支原体肺炎血清 TNF- α 水平测定及临床意义 [J]. 现代医院, 2006, 6(7): 70-71.
ZHAO S L, ZHANG D X, QIU M T. Measurement of cellular cytokine (TNF- α) with Mycoplasma Pneumonia and its clinical meaning [J]. Mord Hospit, 2006, 6(7): 70-71.

[26] BANNERMAN D D, GOLDBLUM S E. Mechanisms of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003, 284(6): L899-L914.

[27] K L B, MEYRICK B. Endotoxin and lung injury [J]. Am Rev Respir Dis, 1986, 133(5): 913-927.

[28] WELBOURN C R, YOUNG Y. Endotoxin, septic shock and acute lung injury: neutrophils, macrophages and inflammatory mediators [J]. Br J Surg, 1992, 79(10): 998-1003.

[29] MATUTE-BELLO G, DOWNEY G, MOORE B B, et al. An official American thoracic society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011, 44(5): 725-738.

[30] CIESIELSKA A, MATYJEK M, KWIATKOWSKA K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling [J]. Cell Mol Life Sci, 2021, 78(4): 1233-1261.

[收稿日期] 2024-01-17