

## 不同剂量脂多糖在不同作用时间下诱导小鼠急性肺损伤的效果评价

陶一帆<sup>1a</sup> 田方敏<sup>2</sup> 郭向阳<sup>1a</sup> 朱怀球<sup>2</sup> 朱曦<sup>1b</sup>

(1. 北京大学第三医院 ④ 麻醉科, ① 危重医学科, 北京 100191; 2. 北京大学工学院, 北京 100871)

**【摘要】 目的** 观察脂多糖(LPS)诱导急性肺损伤(ALI)小鼠的炎症因子变化,探讨不同剂量 LPS 在 ALI 发生发展过程中不同时间点对肺损伤的影响。**方法** 将 210 只 C57BL/6 小鼠按气管内滴注 LPS 剂量分为 2.5、5.0、7.5、10.0 mg/kg 组,采用气管内滴注 LPS 的方法复制 ALI 模型;并设正常对照组、生理盐水对照组,每组 10 只。LPS 损伤后 1、2、4、8 h 观察小鼠的肺组织湿/干质量(W/D)比值、肺损伤评分及肺组织病理学的变化,同时检测血清和支气管肺泡灌洗液(BALF)中去甲肾上腺素(NE)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6(IL-6)和蛋白含量。**结果** ① LPS 所致肺损伤呈剂量依赖性增加和时间依赖性增加。② 随 LPS 剂量增加和作用时间延长, LPS 组肺组织 W/D 比值、肺损伤评分增加,血清和 BALF 中 NE、TNF- $\alpha$ 、IL-6 及 BALF 中蛋白含量均显著增加, LPS 5.0 mg/kg 组作用 4 h 是出现急性呼吸窘迫综合征(ARDS)显著特征的剂量和时间点[肺 W/D 比值:  $4.97 \pm 0.41$ , 肺损伤评分(分):  $5.60 \pm 1.52$ ; 血清 NE (ng/L):  $379.99 \pm 27.65$ , TNF- $\alpha$  (ng/L):  $159.15 \pm 20.62$ , IL-6 (ng/L):  $177.15 \pm 29.13$ ; BALF 中 NE (mg/kg):  $105.85 \pm 13.66$ , TNF- $\alpha$  (mg/kg):  $227.22 \pm 48.01$ , IL-6 (mg/kg):  $251.55 \pm 54.08$ , 总蛋白含量 (g/L):  $1.59 \pm 0.37$ ],但上述指标的变化以 LPS 10.0 mg/kg 组作用后 8 h 较 LPS 7.5、5.0、2.5 mg/kg 组相同时间点更显著[肺组织 W/D 比值:  $5.10 \pm 0.18$  比  $5.01 \pm 0.43$ 、 $5.01 \pm 0.19$ 、 $4.91 \pm 0.30$ , 肺损伤评分(分):  $9.20 \pm 1.48$  比  $8.00 \pm 1.00$ 、 $6.00 \pm 1.22$ 、 $4.40 \pm 0.89$ ; 血清 NE (ng/L):  $447.43 \pm 34.63$  比  $419.23 \pm 30.62$ 、 $391.16 \pm 54.91$ 、 $372.59 \pm 51.52$ , TNF- $\alpha$  (ng/L):  $205.99 \pm 31.31$  比  $181.01 \pm 25.11$ 、 $161.01 \pm 13.98$ 、 $138.83 \pm 28.95$ , IL-6 (ng/L):  $233.76 \pm 34.84$  比  $206.21 \pm 26.68$ 、 $186.58 \pm 26.54$ 、 $156.99 \pm 28.83$ ; BALF 中 NE (mg/kg):  $190.82 \pm 41.75$  比  $153.30 \pm 35.42$ 、 $122.64 \pm 25.15$ 、 $80.23 \pm 13.69$ , TNF- $\alpha$  (mg/kg):  $305.24 \pm 72.99$  比  $292.77 \pm 38.07$ 、 $249.60 \pm 35.20$ 、 $193.63 \pm 10.83$ , IL-6 (mg/kg):  $354.81 \pm 67.79$  比  $303.02 \pm 54.24$ 、 $272.43 \pm 32.34$ 、 $197.64 \pm 12.35$ , BALF 总蛋白含量 (g/L):  $2.31 \pm 0.30$  比  $2.02 \pm 0.26$ 、 $1.62 \pm 0.19$ 、 $1.10 \pm 0.24$ ,  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ]。**结论** LPS 诱导的小鼠 ALI 程度与剂量和时间呈正相关。LPS 5.0 mg/kg 作用 4 h 是出现 ARDS 显著特征的剂量和时间点。

**【关键词】** 脂多糖; 肺损伤,急性; 炎症因子

**An evaluation of effects on induction of acute lung injury in mice by different doses of lipopolysaccharide and different durations** Tao Yifan\*, Tian Fangmin, Guo Xiangyang, Zhu Huaiqiu, Zhu Xi. \*Department of Anesthesiology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China  
Corresponding author: Zhu Xi, Email: xizhuccm@163.com

**【Abstract】 Objective** To observe the changes of inflammatory factors in acute lung injury (ALI) in mice induced by lipopolysaccharide (LPS), and to explore the influence of different doses of LPS on ALI onset and progress at different time points. **Methods** Intratracheally, LPS at the dosages of 2.5, 5.0, 7.5 and 10.0 mg/kg were administered to a total of 210 C57BL/6 mice, and according to the difference in dosage, they were divided into four groups. The ALI model was replicated by intratracheally dropping of LPS. And a normal control group and a normal saline control group were established (each,  $n=10$ ). The changes of index of pathological lung tissue and lung tissue wet/dry (W/D) ratio were observed at 1, 2, 4, and 8 hours after injury, and simultaneously, the levels of norepinephrine (NE), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6) and protein in serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were detected. **Results** ① The degree of lung injury induced by LPS was dose- and time-dependent. ② With the increase of LPS dosage and prolongation of time, in LPS group, the lung W/D ratio and the index of pathological lung tissue were increased; additionally, the levels of NE, TNF- $\alpha$ , IL-6 and protein in serum or BALF were also significantly increased. The critical occurrence point of acute respiratory distress syndrome (ARDS) with specific characteristics was at 5.0 mg/kg of LPS acting for 4 hours [lung W/D ratio:  $4.97 \pm 0.41$ , index of pathological changes of lung tissue (score):  $5.60 \pm 1.52$ ; serum NE (ng/L):  $379.99 \pm 27.65$ , TNF- $\alpha$  (ng/L):  $159.15 \pm 20.62$ , IL-6 (ng/L):  $177.15 \pm 29.13$ ; BALF NE (mg/kg):  $105.85 \pm 13.66$ , TNF- $\alpha$  (mg/kg):  $227.22 \pm 48.01$ , IL-6 (mg/kg):  $251.55 \pm 54.08$ , total protein (g/L):  $1.59 \pm 0.37$ ]. The injury induced by LPS acting for 8 hours in the dosage group 10.0 mg/kg was the most significant in

comparisons with other groups of dosages at the same time points [lung W/D ratio:  $5.10 \pm 0.18$  vs.  $5.01 \pm 0.43$ ,  $5.01 \pm 0.19$ ,  $4.91 \pm 0.30$ ; index of pathological changes of lung tissue (score):  $9.20 \pm 1.48$  vs.  $8.00 \pm 1.00$ ,  $6.00 \pm 1.22$ ,  $4.40 \pm 0.89$ ; serum NE (ng/L):  $447.43 \pm 34.63$  vs.  $419.23 \pm 30.62$ ,  $391.16 \pm 54.91$ ,  $372.59 \pm 51.52$ ; TNF- $\alpha$  (ng/L):  $205.99 \pm 31.31$  vs.  $181.01 \pm 25.11$ ,  $161.01 \pm 13.98$ ,  $138.83 \pm 28.95$ ; IL-6 (ng/L):  $233.76 \pm 34.84$  vs.  $206.21 \pm 26.68$ ,  $186.58 \pm 26.54$ ,  $156.99 \pm 28.83$ ; BALF NE (mg/kg):  $190.82 \pm 41.75$  vs.  $153.30 \pm 35.42$ ,  $122.64 \pm 25.15$ ,  $80.23 \pm 13.69$ ; TNF- $\alpha$  (mg/kg):  $305.24 \pm 72.99$  vs.  $292.77 \pm 38.07$ ,  $249.60 \pm 35.20$ ,  $193.63 \pm 10.83$ ; IL-6 (mg/kg):  $354.81 \pm 67.79$  vs.  $303.02 \pm 54.24$ ,  $272.43 \pm 32.34$ ,  $197.64 \pm 12.35$ ; total protein (g/L):  $2.31 \pm 0.30$  vs.  $2.02 \pm 0.26$ ,  $1.62 \pm 0.19$ ,  $1.10 \pm 0.24$ ,  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ]. **Conclusions** The severity of ALI induced by LPS in mice was positively correlated to LPS dosage and duration of its action. After administration of LPS 5 mg/kg for 4 hours, remarkable characteristic manifestations of ARDS occur in mice, reaching the critical point.

**【Key words】** Lipopolysaccharide; Acute lung injury; Inflammatory factor

急性肺损伤 (ALI) 是多种因素导致的急性低氧性呼吸功能不全或衰竭, 病死率高, 发病机制不明; 其病理表现为肺毛细血管内皮细胞和肺泡上皮细胞损伤而造成弥漫性肺间质及肺泡水肿<sup>[1-2]</sup>。ALI 多诱发或合并多器官功能障碍综合征 (MODS)<sup>[3]</sup>, 甚至多器官衰竭 (MOF)<sup>[4]</sup>, 预后极差。近年来对 ALI 的研究虽在其发病机制、病理生理和呼吸支持治疗方面有一定提高, 但对 ALI 的治疗和预防仍无突破性进展, 其病死率高达 25% ~ 30%, 主要原因是由于 ALI 的发病机制迄今尚未完全阐明<sup>[5-8]</sup>。因此对其发病机制进行研究, 为治疗 ALI 提供新的理论依据, 具有重大意义。

脂多糖 (LPS) 可诱导动物 ALI 的发生, 通常可用于复制与细菌感染有关的实验动物模型<sup>[9-10]</sup>。本研究采用递增剂量 LPS 诱导肺损伤, 观察小鼠肺组织病理学改变、肺组织湿/干质量 (W/D) 比值, 同时检测血清和支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中的去甲肾上腺素 (NE)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6 (IL-6) 含量和 BALF 中蛋白含量, 探讨不同剂量 LPS 在不同时间点对小鼠肺损伤严重程度的影响及其在 ALI 发生发展过程中的意义。

## 1 材料与方法

**1.1 动物分组及处理:** C57BL/6 雄性小鼠 210 只, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 体重  $(18 \pm 2)$  g, 动物合格证号: SCXK (京) 2012-001。戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔麻醉小鼠, 经气管滴入 LPS (O111:B4, 美国 Sigma 公司) 制备 ALI 模型, 按 2.5、5、7.5、10 mg/kg LPS 及作用 1、2、4、8 h 分组, 并设生理盐水对照组和正常对照组, 每组 10 只。

**1.2 检测指标及方法:** 各时间点收集小鼠的支气管肺泡灌洗液 (BALF), 心脏取血, 最后取肺脏。

**1.2.1 肺组织 W/D 比值测定:** 取小鼠左肺称湿质量, 经 70 °C 烤箱中烤干脱水 48 h 后再称干质量, 计算左肺组织 W/D 比值。

**1.2.2 肺组织病理形态学观察和肺损伤评分:** 取右肺上叶, 10% 甲醛水溶液固定、石蜡包埋、切片、苏木素-伊红 (HE) 染色, 光镜下观察肺组织病理学变化。按肺间质水肿、肺泡水肿、炎性细胞浸润、肺泡出血、透明膜形成、肺不张改变的等级进行分析。

肺损伤评分: 按照 Smith 评分体系<sup>[11]</sup>, 依据肺水肿、肺泡及间质炎症细胞浸润、肺泡及间质出血、肺不张和透明膜的形成等 5 项指标分别进行肺损伤严重程度评分。肺血管、肺泡、间质及支气管均正常为 0 分; 病变范围小于整个视野面积的 25% 为 1 分; 病变范围为整个视野面积的 25% ~ 50% 为 2 分; 病变范围为整个视野面积的 50% ~ 75% 为 3 分; 病变范围大于整个视野面积的 75% 为 4 分; 总的肺部损伤评分为上述各项之和。

**1.2.3 血清和 BALF 中 NE、TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 BALF 中蛋白含量的测定:** 用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测 NE、TNF- $\alpha$ 、IL-6 含量, 用 BCA 法检测 BALF 中蛋白含量, 具体操作参照试剂盒说明书进行。

**1.3 统计学分析:** 使用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 各组与对照组的比较采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 肺组织 W/D 比值变化比较 (表 1):** 与正常对照组和生理盐水对照组比较, LPS 组肺组织 W/D 比值于给药 1 h 后开始显著升高 (均  $P < 0.05$ )。随着 LPS 剂量增加和作用时间延长, 肺组织 W/D 比值显著升高 (均  $P < 0.05$ ), 以 LPS 10 mg/kg 组升高最显著。

**2.2 肺组织病理学观察和肺损伤评分:** LPS 组肺损伤评分均显著高于正常对照组和生理盐水对照组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ; 表 1)。光镜下可见与正常对照组和生理盐水对照组比较, LPS 组肺组织充血明显增多, 并伴有大量的炎性细胞浸润; 同时, 随着 LPS 剂量增加和处理时间延长, LPS 诱导的肺部损



伤程度呈明显加重趋势,肺泡隔增宽、肺泡融合、炎性细胞浸润和出血等症状逐渐加重,且肺组织结构异常更加严重(图 1)。

LPS 5.0 mg/kg 组处理 4 h 时,出现典型的肺损伤表现,间质及部分肺泡腔有较多中性粒细胞,间质增宽,毛细血管淤血,肺泡腔出血水肿在 35% ~ 40%。此时,肺损伤评分显著高于其他低剂量组和

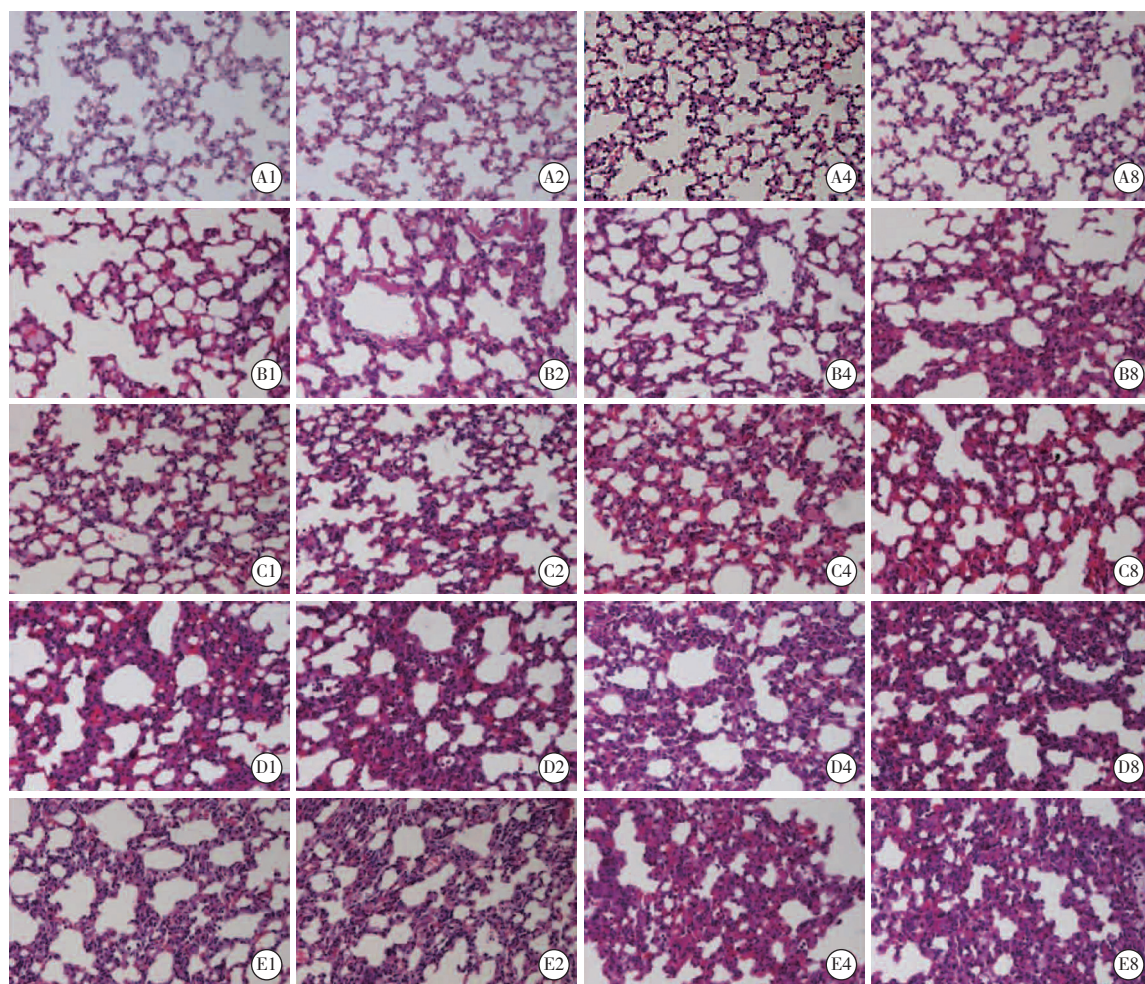
较短作用时间组( $P < 0.05$ ; 表 1)。

**2.3 血清中 NE、TNF- $\alpha$  和 IL-6 含量的变化比较**(表 2): 与正常对照组和生理盐水对照组相比, LPS 组血清 NE、TNF- $\alpha$ 、IL-6 含量在 1 h 后开始即显著升高(均  $P < 0.01$ )。随着 LPS 剂量增加和作用时间延长,血清中 NE、TNF- $\alpha$ 、IL-6 含量均逐渐升高,且以 LPS 10.0 mg/kg 组升高最显著。

表 1 各组肺组织 W/D 比值、肺损伤评分比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数 (只)	肺组织 W/D 比值				肺损伤评分(分)			
		给药后 1 h	给药后 2 h	给药后 4 h	给药后 8 h	给药后 1 h	给药后 2 h	给药后 4 h	给药后 8 h
正常对照组	5	4.26 $\pm$ 0.16				0.00 $\pm$ 0.00			
生理盐水对照组	5	4.29 $\pm$ 0.06	4.26 $\pm$ 0.19	4.32 $\pm$ 0.19	4.35 $\pm$ 0.09	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.80 $\pm$ 0.84	1.20 $\pm$ 0.84 <sup>c</sup>
LSP 2.5 mg/kg 组	5	4.55 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>	4.65 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>	4.77 $\pm$ 0.30 <sup>b</sup>	4.91 $\pm$ 0.30 <sup>bc</sup>	3.80 $\pm$ 1.10 <sup>b</sup>	3.80 $\pm$ 1.30 <sup>b</sup>	4.20 $\pm$ 1.64 <sup>b</sup>	4.40 $\pm$ 0.89 <sup>bc</sup>
LPS 5.0 mg/kg 组	5	4.72 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>	4.84 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	4.97 $\pm$ 0.41 <sup>bc</sup>	5.01 $\pm$ 0.19 <sup>bc</sup>	4.60 $\pm$ 0.55 <sup>b</sup>	4.60 $\pm$ 0.89 <sup>b</sup>	5.60 $\pm$ 1.52 <sup>bc</sup>	6.00 $\pm$ 1.22 <sup>bd</sup>
LPS 7.5 mg/kg 组	5	4.82 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>	4.90 $\pm$ 0.31 <sup>b</sup>	4.95 $\pm$ 0.49 <sup>b</sup>	5.01 $\pm$ 0.43 <sup>b</sup>	6.80 $\pm$ 0.84 <sup>b</sup>	7.40 $\pm$ 1.82 <sup>b</sup>	7.80 $\pm$ 0.84 <sup>bc</sup>	8.00 $\pm$ 1.00 <sup>bc</sup>
LPS 10.0 mg/kg 组	5	4.92 $\pm$ 0.28 <sup>b</sup>	4.95 $\pm$ 0.30 <sup>b</sup>	5.02 $\pm$ 0.40 <sup>b</sup>	5.10 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>	6.80 $\pm$ 2.17 <sup>b</sup>	8.40 $\pm$ 0.89 <sup>bd</sup>	8.60 $\pm$ 1.14 <sup>bd</sup>	9.20 $\pm$ 1.48 <sup>bd</sup>

注:与正常对照组和生理盐水对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ;与给药后 1 h 比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ,<sup>d</sup> $P < 0.01$ ;空白代表无此项



A 为生理盐水组; B、C、D、E 为 LPS 2.5、5.0、7.5、10.0 mg/kg 组; 1、2、4、8 分别为给药 1、2、4、8 h

图 1 各组肺组织病理学改变(HE 染色 中倍放大)

表 2 各组血清 NE、IL-6、TNF- $\alpha$  及 BALF 中 NE、IL-6、TNF- $\alpha$ 、总蛋白的变化比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	给药 后时间	动物数 (只)	血清 (ng/L)			BALF			
			NE	TNF- $\alpha$	IL-6	NE (mg/kg)	TNF- $\alpha$ (mg/kg)	IL-6 (mg/kg)	总蛋白 (g/L)
正常对照组	1 h	5	211.40 $\pm$ 31.00	20.83 $\pm$ 3.86	56.81 $\pm$ 9.77	49.83 $\pm$ 15.55	10.18 $\pm$ 3.89	14.34 $\pm$ 4.24	0.48 $\pm$ 0.13
生理盐水对照组	1 h	5	201.28 $\pm$ 23.52	20.77 $\pm$ 2.80	59.08 $\pm$ 9.27	48.59 $\pm$ 7.71	10.07 $\pm$ 3.89	15.17 $\pm$ 4.06	0.50 $\pm$ 0.14
	2 h	5	202.18 $\pm$ 20.97	21.60 $\pm$ 2.63	60.64 $\pm$ 5.58	49.14 $\pm$ 9.81	10.23 $\pm$ 1.98	15.40 $\pm$ 5.45	0.44 $\pm$ 0.05
	4 h	5	202.39 $\pm$ 17.04	21.16 $\pm$ 5.00	59.78 $\pm$ 15.67	49.42 $\pm$ 7.92	9.41 $\pm$ 2.54	16.79 $\pm$ 4.79	0.48 $\pm$ 0.08
	8 h	5	202.67 $\pm$ 20.98	22.42 $\pm$ 5.19	59.02 $\pm$ 13.93	48.04 $\pm$ 9.06	9.85 $\pm$ 1.99	16.01 $\pm$ 4.69	0.48 $\pm$ 0.12
LPS 2.5 mg/kg 组	1 h	5	358.14 $\pm$ 30.26 <sup>a</sup>	84.43 $\pm$ 25.11 <sup>a</sup>	107.38 $\pm$ 28.30 <sup>a</sup>	67.17 $\pm$ 11.55	52.96 $\pm$ 8.32 <sup>b</sup>	60.38 $\pm$ 9.62 <sup>b</sup>	0.88 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>
	2 h	5	365.40 $\pm$ 40.84 <sup>a</sup>	111.38 $\pm$ 22.65 <sup>ac</sup>	134.02 $\pm$ 23.64 <sup>ac</sup>	74.15 $\pm$ 12.85 <sup>b</sup>	87.43 $\pm$ 5.11 <sup>a</sup>	94.60 $\pm$ 9.94 <sup>a</sup>	0.93 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>
	4 h	5	369.80 $\pm$ 30.89 <sup>a</sup>	121.41 $\pm$ 24.95 <sup>ad</sup>	142.21 $\pm$ 21.78 <sup>ad</sup>	84.44 $\pm$ 13.61 <sup>a</sup>	130.60 $\pm$ 11.99 <sup>ad</sup>	137.97 $\pm$ 10.03 <sup>ad</sup>	0.97 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>
	8 h	5	372.59 $\pm$ 51.52 <sup>a</sup>	138.83 $\pm$ 28.95 <sup>ad</sup>	156.99 $\pm$ 28.83 <sup>ad</sup>	80.23 $\pm$ 13.69 <sup>a</sup>	193.63 $\pm$ 10.83 <sup>ad</sup>	197.64 $\pm$ 12.35 <sup>ad</sup>	1.10 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>
LPS 5.0 mg/kg 组	1 h	5	360.94 $\pm$ 39.62 <sup>a</sup>	128.42 $\pm$ 23.30 <sup>a</sup>	147.98 $\pm$ 27.76 <sup>a</sup>	78.22 $\pm$ 16.32 <sup>b</sup>	146.36 $\pm$ 33.48 <sup>a</sup>	155.21 $\pm$ 34.09 <sup>a</sup>	1.08 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
	2 h	5	373.57 $\pm$ 45.05 <sup>a</sup>	135.43 $\pm$ 17.46 <sup>a</sup>	158.66 $\pm$ 24.32 <sup>a</sup>	86.58 $\pm$ 18.75 <sup>a</sup>	189.20 $\pm$ 34.35 <sup>ac</sup>	200.82 $\pm$ 52.27 <sup>ac</sup>	1.24 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>
	4 h	5	379.99 $\pm$ 27.65 <sup>a</sup>	159.15 $\pm$ 20.62 <sup>ac</sup>	177.15 $\pm$ 29.13 <sup>ac</sup>	105.85 $\pm$ 13.66 <sup>ac</sup>	227.22 $\pm$ 48.01 <sup>ad</sup>	251.55 $\pm$ 54.08 <sup>ad</sup>	1.59 $\pm$ 0.37 <sup>ad</sup>
	8 h	5	391.16 $\pm$ 54.91 <sup>a</sup>	161.01 $\pm$ 13.98 <sup>ad</sup>	186.58 $\pm$ 26.54 <sup>ad</sup>	122.64 $\pm$ 25.15 <sup>ad</sup>	249.60 $\pm$ 35.20 <sup>ad</sup>	272.43 $\pm$ 32.34 <sup>ad</sup>	1.62 $\pm$ 0.19 <sup>ad</sup>
LPS 7.5 mg/kg 组	1 h	5	377.83 $\pm$ 27.90 <sup>a</sup>	145.07 $\pm$ 48.67 <sup>a</sup>	173.59 $\pm$ 29.51 <sup>a</sup>	100.05 $\pm$ 21.94 <sup>a</sup>	220.66 $\pm$ 31.53 <sup>a</sup>	208.41 $\pm$ 42.11 <sup>a</sup>	1.51 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>
	2 h	5	402.82 $\pm$ 56.49 <sup>a</sup>	168.63 $\pm$ 32.76 <sup>a</sup>	191.44 $\pm$ 27.44 <sup>a</sup>	121.60 $\pm$ 26.13 <sup>a</sup>	251.19 $\pm$ 43.30 <sup>a</sup>	272.43 $\pm$ 45.25 <sup>ad</sup>	1.70 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>
	4 h	5	411.76 $\pm$ 52.14 <sup>ac</sup>	173.99 $\pm$ 38.28 <sup>ac</sup>	197.37 $\pm$ 16.19 <sup>ac</sup>	133.62 $\pm$ 35.80 <sup>ad</sup>	258.84 $\pm$ 47.71 <sup>ac</sup>	288.56 $\pm$ 42.34 <sup>ad</sup>	1.89 $\pm$ 0.19 <sup>ac</sup>
	8 h	5	419.23 $\pm$ 30.62 <sup>ac</sup>	181.01 $\pm$ 25.11 <sup>ad</sup>	206.21 $\pm$ 26.68 <sup>ad</sup>	153.30 $\pm$ 35.42 <sup>ad</sup>	292.77 $\pm$ 38.07 <sup>ad</sup>	303.02 $\pm$ 54.24 <sup>ad</sup>	2.02 $\pm$ 0.26 <sup>ad</sup>
LPS 10.0 mg/kg 组	1 h	5	404.57 $\pm$ 36.62 <sup>a</sup>	170.60 $\pm$ 23.09 <sup>a</sup>	180.22 $\pm$ 27.84 <sup>a</sup>	130.03 $\pm$ 19.14 <sup>a</sup>	252.99 $\pm$ 36.10 <sup>a</sup>	291.85 $\pm$ 36.32 <sup>a</sup>	1.81 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>
	2 h	5	420.35 $\pm$ 24.44 <sup>a</sup>	187.58 $\pm$ 29.88 <sup>a</sup>	191.98 $\pm$ 36.41 <sup>a</sup>	155.38 $\pm$ 32.98 <sup>ac</sup>	286.80 $\pm$ 50.19 <sup>a</sup>	314.00 $\pm$ 19.58 <sup>a</sup>	1.97 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>
	4 h	5	435.98 $\pm$ 34.31 <sup>ac</sup>	190.65 $\pm$ 28.95 <sup>ac</sup>	219.04 $\pm$ 41.01 <sup>ad</sup>	176.45 $\pm$ 30.53 <sup>ad</sup>	295.39 $\pm$ 36.23 <sup>ac</sup>	333.04 $\pm$ 45.62 <sup>ac</sup>	2.13 $\pm$ 0.33 <sup>ac</sup>
	8 h	5	447.43 $\pm$ 34.63 <sup>ad</sup>	205.99 $\pm$ 31.31 <sup>ad</sup>	233.76 $\pm$ 34.84 <sup>ad</sup>	190.82 $\pm$ 41.75 <sup>ad</sup>	305.24 $\pm$ 72.99 <sup>ad</sup>	354.81 $\pm$ 67.79 <sup>ad</sup>	2.31 $\pm$ 0.30 <sup>ad</sup>

注:与正常对照组和生理盐水对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与给药后 1 h 比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ ,<sup>d</sup> $P<0.01$

**2.4 BALF 中 NE、TNF- $\alpha$ 、IL-6 蛋白含量及总蛋白含量的变化(表 2):**与正常对照组和生理盐水对照组比较,LPS 组 BALF 中 NE、TNF- $\alpha$ 、IL-6 蛋白含量及总蛋白含量在给药 1 h 后即升高。随着 LPS 剂量增加和作用时间延长,BALF 中 NE、TNF- $\alpha$ 、IL-6 蛋白含量及总蛋白含量均逐渐升高,且以 LPS 10.0 mg/kg 组升高最显著。

### 3 讨论

急性呼吸窘迫综合征(ARDS)是 ALI 的严重阶段,是临床上常见的危重病,其临床特征是呼吸窘迫、低氧血症等,主要是由内毒素血症引起<sup>[12-14]</sup>。LPS 是脂质和多糖的复合物,是内毒素的主要成分,位于革兰阴性(G<sup>-</sup>)菌的细胞壁外膜,是强有力的致伤剂。G<sup>-</sup>菌感染而产生的内毒素血症是引发 ALI/ARDS 的主要原因。研究表明,内源性炎症因子过度释放是 ALI/ARDS 重要的发病机制之一<sup>[15]</sup>,在 ALI/ARDS 发病过程中,TNF- $\alpha$ 、IL-6 等炎症因子增多,并可进一步引起淋巴细胞、单核/巨噬细胞释放其他细胞因子,进而引起肺毛细血管通透性增加、肺间质水肿等一系列肺损伤表现,增加 BALF 中的

蛋白含量<sup>[16-20]</sup>,引起严重的肺损伤,并可导致 MOF。

通常,使用 LPS 复制 ALI 模型时,LPS 可通过静脉注射或气管内滴入<sup>[21]</sup>。本研究采用 LPS 气管滴入法致伤 C57BL/6 小鼠,通过使用不同浓度的 LPS 在多个时间点进行观察,模拟临床严重感染引发 ALI 的发生发展过程。LPS 引起肺损伤时,促炎因子和肿瘤坏死因子的水平均出现升高<sup>[22]</sup>,出现以 TNF- $\alpha$  为中心的大量炎症因子的释放<sup>[23]</sup>。同时,有研究显示,在给予 LPS 后,血清 NE 浓度明显升高,且与 IL-6 浓度呈显著正相关,与动脉血氧分压(PaO<sub>2</sub>)呈显著负相关<sup>[24]</sup>,这与另一研究中给予 LPS 后,血清儿茶酚胺含量增加与肺部炎症反应密切相关的结论基本一致<sup>[25]</sup>。另外,ALI 早期血管内皮细胞和肺泡上皮细胞受损,肺泡上皮细胞和血管内皮细胞凋亡导致血管壁和肺泡壁通透性增加,渗出增加<sup>[26]</sup>,BALF 中蛋白含量变化可反映肺组织通透性的改变及肺损伤严重程度。因此,观察不同剂量 LPS 诱导的 ALI 小鼠肺组织病理学变化,以及血清、BALF 中 NE、IL-6、TNF- $\alpha$  含量以及 BALF 中总蛋白含量变化,对于研究 ALI 的发生发展有着十分重要



要的意义。

本研究结果表明:不同剂量的 LPS 可引起 C57BL/6 小鼠不同程度的 ALI。本研究的特点在于通过观察肺组织 W/D 比值及病理学变化,结合血清和 BALF 中 NE、炎症因子含量变化以及 BALF 中蛋白含量来判断 ALI 的发生发展,可根据实验目的不同来选择 LPS 的剂量和作用时间点,更有利于研究的进行。本研究结果显示,当 LPS 在 5.0 mg/kg 作用 4 h 时,小鼠肺组织含水量显著高于较低 LPS 剂量和较短作用时间组,其病理变化显著加重,基本符合 ARDS 的特征。同时,血清和 BALF 中炎症因子以及 BALF 中蛋白含量也较其他较低 LPS 剂量和较少作用时间组显著增多。这说明气管内滴注 LPS 5.0 mg/kg 后 4 h 是诱导小鼠发生 ARDS 的临界剂量和作用时间点,可作为后续复制 ALI 小鼠模型的优选方案。

## 参考文献

- [1] Dengler V, Downey GP, Tudor RM, et al. Neutrophil intercellular communication in acute lung injury. Emerging roles of microparticles and gap junctions [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 49(1): 1-5.
- [2] Vlaar AP, Juffermans NP. Transfusion-related acute lung injury: a clinical review [J]. *Lancet*, 2013, 382(9896): 984-994.
- [3] Tang BM, Craig JC, Eslick GD, et al. Use of corticosteroids in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a systematic review and meta-analysis [J]. *Crit Care Med*, 2009, 37(5): 1594-1603.
- [4] Quilez ME, López-Aguilar J, Blanch L. Organ crosstalk during acute lung injury, acute respiratory distress syndrome, and mechanical ventilation [J]. *Curr Opin Crit Care*, 2012, 18(1): 23-28.
- [5] Lalu MM, Moher D, Marshall J, et al. Efficacy and safety of mesenchymal stromal cells in preclinical models of acute lung injury: a systematic review protocol [J]. *Syst Rev*, 2014, 3: 48.
- [6] 马明明,李岩,朱委委,等. 芹菜素对脂多糖致小鼠急性肺损伤的作用机制研究[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2014, 21(3): 170-174.
- [7] Reiss LK, Uhlig U, Uhlig S. Models and mechanisms of acute lung injury caused by direct insults [J]. *Eur J Cell Biol*, 2012, 91(6-7): 590-601.
- [8] 刘芬,江榕,李勇,等. 微小 RNA-132 在脂多糖诱导大鼠肺泡巨噬细胞炎症反应中的表达变化[J]. *中华危重病急救医学*, 2014, 26(2): 80-83.
- [9] Tuinman PR, Dixon B, Levi M, et al. Nebulized anticoagulants for acute lung injury: a systematic review of preclinical and clinical investigations [J]. *Crit Care*, 2012, 16(2): R70.
- [10] Chen H, Bai C, Wang X. The value of the lipopolysaccharide-induced acute lung injury model in respiratory medicine [J]. *Expert Rev Respir Med*, 2010, 4(6): 773-783.
- [11] Smith KM, Mrozek JD, Simonton SC, et al. Prolonged partial liquid ventilation using conventional and high-frequency ventilatory techniques: gas exchange and lung pathology in an animal model of respiratory distress syndrome [J]. *Crit Care Med*, 1997, 25(11): 1888-1897.
- [12] Toufekoula C, Papadakis V, Tzaganos T, et al. Compartmentalization of lipid peroxidation in sepsis by multidrug-resistant gram-negative bacteria: experimental and clinical evidence [J]. *Crit Care*, 2013, 17(1): R6.
- [13] 于农,金欣,陈建魁,等. 内毒素血症与革兰阴性菌感染的关系[J]. *中国误诊学杂志*, 2008, 8(13): 3096-3097.
- [14] 徐丽艳,刘瑶,韩文文,等. 生长抑素对内毒素致小鼠急性肺损伤中炎症反应的影响和机制[J]. *中华危重病急救医学*, 2014, 26(5): 315-320.
- [15] Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS [J]. *Crit Care Med*, 1996, 24(7): 1125-1128.
- [16] Bhargava R, Janssen W, Altmann C, et al. Intratracheal IL-6 protects against lung inflammation in direct, but not indirect, causes of acute lung injury in mice [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e61405.
- [17] Kolliputi N, Waxman AB. IL-6 cytoprotection in hyperoxic acute lung injury occurs via PI3K/Akt-mediated Bax phosphorylation [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009, 297(1): L6-16.
- [18] Patel BV, Wilson MR, O'Dea KP, et al. TNF-induced death signaling triggers alveolar epithelial dysfunction in acute lung injury [J]. *J Immunol*, 2013, 190(8): 4274-4282.
- [19] 左祥荣,曹权,阙军,等. 白藜芦醇对内毒素性急性肺损伤小鼠核转录因子- $\kappa$ B 及炎症反应的影响[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2013, 20(1): 16-19.
- [20] Sutherasan Y, D'Antini D, Pelosi P. Advances in ventilator-associated lung injury: prevention is the target [J]. *Expert Rev Respir Med*, 2014, 8(2): 233-248.
- [21] Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 295(3): L379-399.
- [22] 冯英凯,杨庆华,徐剑铖,等. 炎症介质与内毒素肺损伤[J]. *国外医学呼吸系统分册*, 2004, 24(5): 329-331, 335.
- [23] 李国福,佟欣,栾婷,等. 异丙酚后处理对急性肺损伤大鼠肺组织 Toll 样受体 4 表达的影响[J]. *中华危重病急救医学*, 2012, 24(10): 620-623.
- [24] 林英,朱曦,和宇,等. 颈脊髓切断对内毒素血症大鼠急性肺损伤的影响[J]. *中华危重病急救医学*, 2008, 20(10): 621-624.
- [25] Molina PE, Abumrad NN. Differential effects of hemorrhage and LPS on tissue TNF- $\alpha$ , IL-1 and associate neuro-hormonal and opioid alterations [J]. *Life Sci*, 2000, 66(5): 399-409.
- [26] 李立萍,张建新,李兰芳. NG- 硝基 -L- 精氨酸对脂多糖诱导大鼠肺损伤时肺表面活性物质和细胞凋亡的影响[J]. *中华危重病急救医学*, 2010, 22(7): 397-400.

(收稿日期: 2015-02-17)

(本文编辑: 李银平)

## • 读者 • 作者 • 编者 •

### 本刊对论文中实验动物描述的有关要求

在医学论文的描述中,凡涉及到实验动物应符合以下要求:①品种、品系描述清楚;②强调来源;③遗传背景;④微生物学质量;⑤明确体质量;⑥明确等级;⑦明确饲养环境和实验环境;⑧明确性别;⑨有无质量合格证明;⑩有对饲养的描述(如饲料类型、营养水平、照明方式、温度、湿度要求);⑪所有动物数量准确;⑫详细描述动物的状况;⑬对动物实验的处理方式有单独清楚的交代;⑭全部有对照,部分可采用双因素方差分析;⑮尤其是要注明本实验的动物处置过程是否符合动物伦理学要求。