内毒素致新生 SD 大鼠肺损伤模型的建立及鉴定*

贺务实,燕旭东,周克英
(暨南大学第二临床医学院、深圳市人民医院 儿科, 广东 深圳 518020)

[摘 要] **目的**: 探讨新生大鼠急性肺损伤模型的建立及其病理特征。**方法**: 采用腹腔注射内毒素(LPS, 5 mg/kg) 的方法制备新生 SD 大鼠急性肺损伤动物模型,在光镜下观察肺的病理变化,观察支气管肺泡灌洗液(BALF)中细胞分类情况,用 ELISA、RT-PCR 法检测血清和肺组织中白介素 -6(IL-6)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的表达。**结果**: LPS 注射 3 h 后,光镜下可见明显的肺出血和中性粒细胞浸润;肺湿/干重比(W/D)增加,BALF 中多形核白细胞(PMN)数量明显增加,血清中 TNF-α 和 IL-6 表达水平和肺组织中 TNF-α mRNA 水平均显著增高。**结论**: 新生 SD 大鼠腹腔注射 LPS 后,能够引起显著的急性肺部炎症反应。

[关键词] 模型,动物内毒素类; 炎症; 肺损伤; 肿瘤坏死因子
[中图分类号] R363.21; R364.5 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2013)03-0253-04

Building and Evaluation of Acute Lung Injury Model with Neonatal Rats Induced by Lipopolysaccharides

HE Wushi, YAN Xudong, ZHOU Keying
(*Department of Pediatrics, Shenzhen People's Hospital, The Second Medical College of JI NAN University, Shenzhen 518020, Guangdong, China*)

[**Abstract**] **Objective**: To explore the establishment and pathological characteristics of acute lung injury model with neonatal rats. **Methods**: Acute lung injury models of neonatal rats were established via intraperitoneal injection of 5 mg/kg lipopolysaccharides (LPS). The pathological changes were observed with tissue sections with microscopy. The tumor necrosis factor-α (TNF-α) mRNA expression in lung were measured by RT-PCR. The levels of TNF-α and IL-6 were detected with ELISA. **Results**: Lung hemorrhage accompanied by polymorphonuclear neutrophil infiltration was observed in 3 hours after LPS administration. Wet/dry ratio, and polymorphonuclear leukocytes (PMN) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) increased obviously. Serum TNF-α level and IL-6 level significantly increased. TNF-α mRNA expression in lung also increased. **Conclusion**: LPS administration to neonatal rats results in acute lung injury accompanied by obvious inflammatory responses.

[**Key words**] model, animal; endotoxins; Inflammation; lung injury; tumor necrosis factor; interleukin-6

急性肺损伤(acute lung injury,ALI) 是指机体在遭受创伤、休克、感染、败血症、缺氧等病理刺激后发生的急性炎症反应,是新生儿临床常见的危重症[1-2]。目前 ALI 的发病机理尚未完全明确,本试验采用腹腔注射内毒素(lipopolysaccharide,LPS)的方法制备新生 SD 大鼠 ALI 动物模型,并观察肺组织的病理变化和炎症反应情况,以探讨新生大鼠 ALI 的病理特征和机制。

1 材料和方法

1.1 材料

*[基金项目]深圳市 2011 年科技计划项目(201102147)

日龄 7 d、体质量 12 ~ 18 g 的健康新生 SD 大鼠 50 只(由南方医科大学实验动物中心提供),LPS 购自美国 Sigma 公司,TNF-α 和 IL-6 ELISA 试剂盒购自上海 ExCell Biology 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备 50 只新生 SD 大鼠随机分为生理盐水对照组(n = 10)和 ALI 组(n = 40),后者进一步分为 1、3、6 及 12 h 亚组,每组 10 只。ALI 组予以 5 mg/kg LPS 腹腔注射;生理盐水对照组予以 5mL/kg 生理盐水腹腔注射。

1.2.2 组织学检查 新生 SD 大鼠于各时间点用 5% 戊巴比妥钠(0.02 ml/kg)麻醉,打开胸腹腔,肉眼观察肺组织大体病理改变,取右下肺置于 4% 的多聚甲醛中固定,常规脱水,冰冻切片,HE 染色,光镜下观察。

1.2.3 肺组织湿重/干重(W/D)比值测定 取右上肺叶称湿重(W)后置 60 ℃恒温箱,24 h 后再称干重(D),计算 W/D 比值。

1.2.4 支气管肺泡灌洗液(BALF)细胞分类 各时间点新生大鼠腹腔麻醉后,暴露气管,将套管针插入气管,用生理盐水反复灌洗 3 次,新生鼠每次 0.3 mL,收集(BALF)约 0.5 mL。4 ℃,800 r/min 离心 10 min,取沉淀涂片,瑞氏染色,计数 200 个细胞进行分类。

1.2.5 促炎细胞因子水平测定 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测外周血血清中 TNF-α、IL-6 表达量,按试剂盒说明书操作。用 RT-PCR 检测肺组织中 TNF-α 的表达,TRIZOL (Promega, USA)法提取肺组织总 RNA,Takara 反转录试剂盒反转录获得 cDNA 并进行 PCR 扩增。大鼠 TNF-α 引物参照 Genebank,由上海生工生物工程技术公司合成,TNF-α 引物上游序列为 5′-CCA CGC TCT TCT GTC TAC TG-3′,TNF-α 下游序列为 5′-CTC ACT GTT CGG GCA TCG-3′,退火温度 58 ℃,30 个循环。GAPDH 引物上游序列为 5′-TGA TGC TGG TGC TGA GTA TGT C -3′,GAPDH 下游序列为 5′-T GT GAG CTT CCC GTT CAG CTC T-3′,退火温度 60 ℃,30 个循环。反应结束后取 PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶中电泳,经凝胶成像分析系统分析电泳条带。以 TNF-α 与 GAPDH 条带吸光度的比值代表 TNF-α 表达的相对量。

1.3 统计学处理

计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 12.0 统计软件进行 t 检验,$P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 肺组织炎性细胞浸润

对照组新生 SD 大鼠肺组织小叶结构清晰,肺泡腔干净,肺泡间质无炎性细胞浸润,肺泡壁无增厚,肺泡 I 型和 II 型细胞结构清晰。LPS 注射后可见肺组织充血明显,肺泡间质和肺泡腔内可见大量红细胞和中性粒细胞浸润,见图 1。

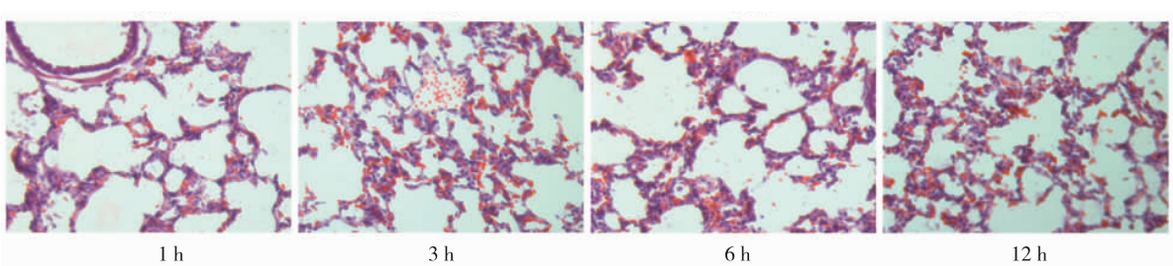


图 1 LPS 注射后各时间点新生 SD 大鼠肺组织 (HE, ×200)

Fig. 1 Lung tissue sections of neonatal rats after LPS injection (HE staining ×200)

2.2 肺组织湿重/干重(W/D)比值

新生 SD 大鼠注射 LPS 后 1 h,肺组织湿重/干重(W/D)比值显著增加($P < 0.05$),并随着 LPS 作用时间的延长而有所增加($P < 0.01$),见表 1。

2.3 BALF 中白细胞

对照组中 BALF 中多形核白细胞(PMN)数量约 2% ~3%,注射 LPS 后 3 h 和 6 h 的新生 SD 大鼠 BALF 中 PMN 百分率显著增加($P < 0.01$),12 h 略有降低,见表 1。

2.4 血清中促炎细胞因子水平

注射 LPS 后 1 h,新生 SD 大鼠血清中 TNF-α 含量显著高于对照组($P < 0.05$),在 3 h 达到高峰,随后略有降低,但仍保持较高水平,至 12 h 仍显著高于对照组($P < 0.01$)。血清中 IL-6 的表达

变化与 TNF-α 类似，见表 1。

表 1　各组大鼠肺 W/D 比值、BALF 中 PMN、血清中 TNF-α 和 IL-6 水平（$n=4, \bar{x} \pm s$）

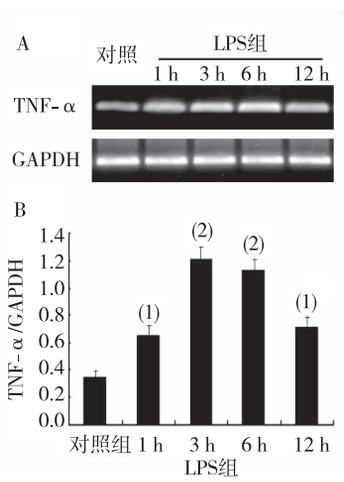
Tab. 1　The lung W/D ratio, PMN in BALF, TNF-α level and IL-6 level in serum in rats of different groups（$n=4, \bar{x} \pm s$）

组别	肺 W/D 比值	PMN 中 BALF（%）	血清中 TNF-α（ng/L）	血清中 IL-6（ng/L）
对照组	5.16 ± 0.38	2.62 ± 1.33	23.46 ± 3.08	8.58 ± 2.15
LPS1 h 组	5.87 ± 0.42(1)	4.49 ± 2.35	87.34 ± 7.59(1)	32.27 ± 1.72(1)
LPS3 h 组	6.21 ± 0.31(2)	11.73 ± 1.79(2)	245.03 ± 14.34(2)	97.47 ± 7.24(2)
LPS6 h 组	6.08 ± 0.44(2)	11.89 ± 2.84(2)	189.28 ± 12.26(2)	85.93 ± 6.04(2)
LPS12 h 组	6.18 ± 0.57(2)	9.26 ± 3.07(2)	57.30 ± 4.25(1)	36.04 ± 3.29(1)

(1) 与对照组比较，$P<0.05$，(2) $P<0.01$

2.5　肺组织 TNF-α mRNA 表达

对照组中，新生 SD 大鼠 TNF-α 表达较弱，注射 LPS 以后，表达量显著增加，3 h 达到最高峰（$P<0.01$），随后逐渐下调，但在 12 h TNF-α 表达仍显著高于对照组（$P<0.05$），见图 2。



B 图为 A 图的定量分析，TNF-α 相对表达量用 TNF-α 和 GAPDH 条带灰度值的比值来衡量，(1) $P<0.05$，(2) $P<0.01$

图 2　肺组织 TNF-α mRNA 表达

Fig. 2　TNF-α mRNA levels in lung tissue

3　讨论

新生大鼠肺组织损伤模型和病理变化文献报道较少，缺乏系统性研究。本研究参考 Choi 等人[3]制备 ALI 成年动物模型的方法，建立新生大鼠 ALI 模型，观察腹腔注射 LPS 对出生 7 d 后新生 SD 大鼠肺组织损伤的影响。

LPS 是革兰阴性菌细胞壁主要成分，是引起感染性疾病的主要因素，也是制备成年动物急性肺损伤模型中最常用的诱导剂。本实验通过新生大鼠腹腔注射 5 mg/kg LPS 建立 ALI 模型，大鼠肺组织病理改变符合 ALI 的病理改变。本实验结果显示，与生理盐水对照组比较，LPS 注射组新生大鼠肺部充血明显，肺泡间质有炎性浸润，肺泡壁增宽，肺泡腔内可见出血细胞和粒细胞渗出。本研究发现注射 LPS 后，新生 SD 大鼠肺湿/干重比值增高，BALF 中 PMN 数量增加，血清中 IL-6 的水平显著上升，且与 LPS 作用时长具有相关性，与肺组织出血时间和程度具有一致性，表明 LPS 注射以后引起了 ALI 和炎症反应。

研究表明，静脉或腹腔注射，以及气管内吸入 LPS，都可引起成年大鼠血清、BALF 内 TNF-α 水平升高[4-5]，抑制 TNF-α 的生成可减轻肺组织水肿和血管内皮细胞损伤[6-7]。本研究发现，与生理盐水对照组相比，新生大鼠腹腔注射 LPS 后，肺组织中 TNF-α mRNA 水平显著升高，血清中 TNF-α 含量也显著增加。这与 LPS 诱导成年大鼠 ALI 模型变化一致，表明 TNF-α 参与了 LPS 所致的新生大鼠肺部炎性损伤，可能在新生大鼠 ALI/ 肺出血病理过程中起着重要的调节作用。

本研究结果表明，LPS 腹腔注射能够引起新生大鼠 ALI 和炎症反应，可作为新生儿肺出血研究的动物模型。

4　参考文献

[1] Kubo K. Acute lung injury (ALI)/acute respiratory distress syndrome (ARDS) [J]. Nihon Rinsho, 2012(70): 526 - 529.

[2] Luh SP, Chiang CH. Acute lung injury/acute respiratory distress syndrome (ALI/ARDS): the mechanism, present strategies and future perspectives of therapies [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2007(8): 60 - 69.

[3] Choi JS, Lee HS, Seo KH, et al. The effect of post-treatment N-acetylcysteine in LPS-induced acute lung injury of rats [J]. Tuberc Respir Dis (Seoul), 2012(73): 22 -

31.
[4] Cao Q, Mak KM, Lieber CS. Dilinoleoylphosphatidylcholine decreases LPS-induced TNF-alpha generation in Kupffer cells of ethanol-fed rats: respective roles of MAPKs and NF-kappaB [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002(294): 849 - 853.
[5] Andrzejczak D, Gorska D, Czarnecka E. Influence of amlodipine and atenolol on lipopolysaccharide (LPS)-induced serum concentrations of TNF-alpha, IL-1, IL-6 in spontaneously hypertensive rats (SHR) [J]. Pharmacol Rep, 2006(58): 711 - 719.
[6] Jansson AH, Eriksson C, Wang X. Lung inflammatory responses and hyperinflation induced by an intratracheal exposure to lipopolysaccharide in rats [J]. Lung, 2004 (182): 163 - 171.
[7] Murakami K, Okajima K, Uchiba M, et al. Gabexate mesilate, a synthetic protease inhibitor, attenuates endotoxin-induced pulmonary vascular injury by inhibiting tumor necrosis factor production by monocytes [J]. Crit Care Med, 1996(24): 1047 - 1053.

(2013-03-18 收稿,2013-05-09 修回)
编辑:周 凌

(上接第 252 页)

表 2 各组大鼠 60 s 内穿越平台次数($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Comparison of platform-crossing frequency by rats in 60 seconds in each group

组 别	n	穿越平台次数(次)
空白组	15	6.33 ± 0.82
模型组	15	2.17 ± 0.41
安理申组	16	4.33 ± 1.03$^{(1)(2)}$
地黄饮子组	16	4.17 ± 0.98$^{(1)(2)}$

治疗组与空白组比较,$^{(1)}P < 0.01$,$^{(2)}P < 0.01$

表 3 各组大鼠逃避潜伏期($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Comparison of escape latency of rats in each group

组 别	n	潜伏期(s)
空白组	15	11.01 ± 2.27$^{(1)}$
模型组	15	52.65 ± 6.96
安理申组	16	23.03 ± 6.19$^{(1)(2)}$
地黄饮子组	16	22.47 ± 4.36$^{(1)(2)}$

$^{(1)}P < 0.01$;安理申组、地黄饮子组与空白组比较,$^{(2)}P < 0.01$

3 讨论

VD 临床多表现为记忆及认知等功能障碍,其发病率高、致残率高,给家庭和社会带来沉重的精神压力和经济负担。本实验灌胃治疗 4 周后,经 Morris 水迷宫检测结果显示,地黄饮子组 VD 大鼠路径明显延长、60 s 内穿越平台次数显著增加、60 s 内首次穿越原平台时间显著缩短,与模型组相比差异有统计学意义,提示地黄饮子可改善血管性痴呆大鼠学习记忆能力,其结果虽与安理申组相当,且两组比较差异无统计学意义,但可以提示经典古方地黄饮子在治疗血管性痴呆学习记忆障碍方面具有明显的改善作用,可提高学习记忆能力的同时,还可改善大鼠的一般情况,提高生存质量,并为临床治疗血管性痴呆开发中药新药提供实验基础。

地黄饮子出自金元四大家之首刘完素《黄帝素问宣明论方》,由熟地黄、石斛、石菖蒲、山萸肉、肉苁蓉、茯苓、远志、五味子、巴戟天、麦冬、附子、肉桂、薄荷、姜、枣组成,用于治疗下元虚衰,痰浊随之上泛,堵塞窍道所致的喑痱证。VD 的病机是以本虚标实为特征,以肾精不足,髓海失养而成痴呆为本虚。因此地黄饮子符合 VD 本虚标实的病机特点,遵循"虚者补之,实者泻之,攻补兼施"的治疗原则,其意义在于使肾气充盛、精髓得化、髓海得充,同时化痰开窍,交通心肾以醒神。本研究结果表明,地黄饮子可改善 VD 大鼠的认知功能,提高 VD 大鼠学习记忆能力。

4 参考文献

[1] 王艳玲,赵建军. 中医药治疗血管性痴呆研究进展[J]. 世界中西医结合杂志,2008(2):118 - 119.
[2] 张俊华,王晓辉. 血管性痴呆中医药临床研究现状分析[J]. 中医脑病杂志,2008(2):104.
[3] 窦金金,谢宁,吴颂,等. 血管性痴呆大鼠模型的改良[J]. 中国临床保健杂志,2012(2):167 - 168.
[4] 赵宪林,方秀斌,李东培. 大鼠血管性痴呆模型制作[J]. 中国医科大学报,2002(3):166 - 167.

(2013-03-25 收稿,2013-04-25 修回)
编辑:文箐颖