

· 药理 ·

## 不同途径吸入脂多糖致大鼠急性肺炎模型的优选

张亚平<sup>1</sup>, 张广平<sup>2</sup>, 苏萍<sup>2</sup>, 杨依靠<sup>2</sup>, 马梦<sup>2</sup>, 马丽娜<sup>2</sup>, 侯红平<sup>2</sup>,  
张钟秀<sup>2</sup>, 李晗<sup>2</sup>, 高云航<sup>2</sup>, 宋玲<sup>2</sup>, 宫平<sup>2</sup>, 叶祖光<sup>2\*</sup>

(1. 江西中医药大学药学院, 南昌 330004; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的: 平行比较气管滴入、口咽吸入、经鼻滴入与雾化吸入脂多糖(LPS)诱导的大鼠急性肺炎模型的病理变化, 筛选最佳诱导大鼠急性肺炎的造模方法, 并对其进行多指标验证。方法: 气管滴入LPS组、口咽吸入LPS组、经鼻滴入LPS组、雾化吸入LPS组大鼠造模24 h后, 通过病理学观察各组肺组织炎症程度; 雾化吸入LPS-1组, LPS-2组, LPS-3组依次造模24, 16, 8 h后, 采用无创气道动力学研究系统检测大鼠的肺功能, 全自动血液分析仪对支气管肺泡灌洗液(BALF)中白细胞进行分类和计数; 通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测BALF及肺组织中的白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的含量; 病理学观察各组大鼠肺组织的炎症程度。结果: 与气管滴入、口咽吸入、经鼻滴入相比, 雾化吸入LPS组大鼠肺部损伤程度一致, 病理变化表现稳定, 组内差异小。雾化吸入LPS多指标检测显示, 与阴性组比较, 造模后大鼠的呼吸频率(F), 潮气量(TV), 特殊气道阻力(sRaw)发生显著变化( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ); 大鼠雾化LPS后8 h时白细胞计数(WBC)增加; 16 h时WBC明显增加( $P < 0.05$ ), 嗜中性粒细胞比例也开始增加( $P < 0.01$ ); 24 h时WBC数目显著升高( $P < 0.01$ ), 淋巴细胞所占比例开始显著升高( $P < 0.05$ ); 雾化吸入LPS后8 h开始, BALF和组织中炎症因子TNF- $\alpha$ 及IL-6的含量均显著升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结论: 雾化吸入LPS所致的大鼠肺部损伤程度一致, 病理变化表现稳定, 接近于临床急性肺炎的发展情况, 有利于筛选治疗急性肺炎的药物。

**[关键词]** 脂多糖; 急性肺炎模型; 雾化吸入; 无创气道动力学研究系统; 暴露塔; 炎症因子; 白细胞计数

**[中图分类号]** R289; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)07-0082-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20180791

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180110.1640.015.html>

**[网络出版时间]** 2018-01-12 9:19

### Selection of Acute Pneumonia Rat Models Induced by Lipopolysaccharide with Different Inhalation Pathways

ZHANG Ya-ping<sup>1</sup>, ZHANG Guang-ping<sup>2</sup>, SU Ping<sup>2</sup>, YANG Yi-fei<sup>2</sup>, MA Meng<sup>2</sup>, MA Li-na<sup>2</sup>,  
HOU Hong-ping<sup>2</sup>, ZHANG Zhong-xiu<sup>2</sup>, LI Han<sup>2</sup>, GAO Yun-hang<sup>2</sup>, SONG Ling<sup>2</sup>, GONG Ping<sup>2</sup>, YE Zu-guang<sup>2\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** By comparing the pathological changes of rat pneumonia model induced by lipopolysaccharide (LPS), which was given through tracheal instillation, oropharyngeal inhalation, nasal instillation and aerosol inhalation method, we screened out the best method to induce acute pneumonia in rats and verified it with multi-index. **Method:** At 24 h after modeling, inflammation degree of lung tissue of rats in each group was observed. While aerosol inhalation group (LPS-1, LPS-2 and LPS-3) have been modeled 24, 16, 8 h, respectively; lung function of rats in these three groups tested by non-invasive airway mechanics system, the

**[收稿日期]** 20171121(003)

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2017ZX09201002-007, 2017ZX09201002-006, 2015ZX09501004-003-002)

**[第一作者]** 张亚平, 在读硕士, 从事中药药理学研究, E-mail: 1634677415@qq.com

**[通信作者]** \* 叶祖光, 研究员, 从事中药药理与毒理学研究, Tel: 010-84252805, E-mail: yezuguang@sina.com

white blood cells in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was classified and counted by automatic hematology analyzer, the contents of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in BALF and lung tissue were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Furthermore, we observed the inflammation degree of lung tissue of rats in each group. **Result:** Compared with intratracheal instillation, oropharyngeal inhalation and nasal instillation, the degree of lung injury in rats from aerosol inhalation LPS group was consistent, the pathological changes were stable, and the differences in the group were small. At 8 h after modeling, the lung function of rats started to change, the contents of white blood cell count (WBC) began to increase in BALF, the contents of IL-6 and TNF- $\alpha$  in BALF and lung tissue began to increase. At 16 h, WBC increased significantly ( $P < 0.05$ ), and the proportion of neutrophils began to increase obviously ( $P < 0.01$ ). At 24 h, WBC increased significantly ( $P < 0.01$ ), and the proportion of lymphocytes began to increase obviously ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The animal model established by aerosol inhalation of LPS, which not only has a wide range of inflammation, but also distributes uniformly, furthermore, this model is close to the development of clinical acute pneumonia. In a conclusion, the pneumonia model established by aerosol inhalation of LPS is beneficial for the screening of drugs on pneumonia.

[**Key words**] lipopolysaccharide; acute pneumoniae model; aerosol inhalation; non-invasive airway mechanics system; inhalation tower; inflammatory factor; white blood cell count

急性肺炎是一种常见的呼吸系统病,其发病机制复杂,起病急、病程短,严重者可诱发心血管系统疾病,甚至危及生命<sup>[1]</sup>。临床常用于治疗急性肺炎的药物有抗生素类、肾上腺素皮质激素类等,尽管种类繁多,却不能显著降低急性肺炎患者的死亡率<sup>[2]</sup>。提高急性肺炎的治疗水平,研发新的有效治疗药物已成为科研人员亟待解决的问题。

脂多糖(LPS)在机体内可以诱发炎症细胞浸润、炎症因子释放及肺泡上皮细胞死亡<sup>[3]</sup>,已被公认是诱导急性肺炎的主要药物。然而,在建立急性肺炎模型过程中,LPS造模给药途径繁杂,除了经典气管滴入<sup>[4]</sup>、口咽吸入<sup>[5]</sup>、鼻部吸入<sup>[6]</sup>、腹腔注射<sup>[2]</sup>等给药途径,还有新建立的雾化吸入给药途径。由于造模给药方法过多,且少有文献对不同途径建立的动物肺炎模型进行比较,实验人员无法选择更好的造模方法。这严重影响了治疗急性肺炎的药物研发。

本研究可分为两部分,首先使用雾化吸入LPS法、经鼻滴入LPS法、口咽滴入LPS法、气管滴入LPS法诱导大鼠产生急性肺炎,通过病理学观察各组大鼠肺组织的变化,筛选出最佳造模方法。其次对已筛选的最佳给药途径,即雾化LPS给药途径进行多指标检测,观察动物的呼吸状态及肺组织病理学、检测支气管肺泡灌洗液(BALF)中白细胞数量和分类、以及肺组织和BALF中炎症因子的表达。以上实验研究可为大鼠肺炎模型的建立提供一定参考,也可为今后研究呼吸系统炎症性疾病的发病机制

及开发抗炎新药提供有效手段。

## 1 材料

Fine Pointe 型无创气道动力学研究系统和 Fine Pointe 型暴露塔(美国 DSI 公司),SpectraMax i3x 型酶标仪(美国 Molecular Devices 公司),3-18KS 型高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司),BSA3202S-CW 型电子天平(德国 Sartorius 公司),JXFSTPRP-24 型全自动样品快速研磨仪(上海净信科技),ADVIA 2120 型全自动血液分析仪(德国 Simens 公司),BX51 型显微镜及图像分析系统(日本 Olympus 公司);Finesse 325 型切片机,Excelsior ES 型全自动脱水机,Histocentre3 型石蜡包埋机和 Varistain Gemini ES 型全自动染色机(美国 Thermo 公司)。脂多糖(LPS)干粉(美国 Sigma 公司,批号 057M4013V),白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20170612,20170612)。

雄性 Wistar 大鼠,SPF 级,体质量( $170 \pm 10$ ) g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2016-0011。本实验所进行的所有相关操作均在中国中医科学院中药研究所动物伦理委员会的批准下进行,批准号 20172001。

## 2 方法

### 2.1 不同途径吸入 LPS 的急性肺炎大鼠模型比较

**2.1.1 动物分组及造模方法** 雄性 Wistar 大鼠 48 只,依据体质量分层随机均分为 8 组,分别为气管滴入 LPS 组、气管滴入空白组、口咽吸入 LPS 组、口咽

吸入空白组、经鼻滴入 LPS 组、经鼻滴入空白组、雾化吸入 LPS 组、雾化吸入空白组。各组采用不同的给药途径给予 LPS ( $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 或者生理盐水溶液,雾化吸入 LPS 组吸取 LPS 溶液 15 min。具体造模方法为①气管滴入 LPS 组:大鼠用 10% 水合氯醛溶液按  $3.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  麻醉(以下大鼠麻醉方法均与之相同),用 12 号大鼠灌胃针插至大鼠会厌软骨部位,灌入 LPS 溶液,造模 24 h 后处理动物;气管滴入空白组给予生理盐水,操作方法与之相同。②口咽吸入 LPS 组:大鼠麻醉后,头向下倾斜,将舌头用镊子牵出,吸取 LPS 溶液,经咽后壁滴入口腔,迅速捏住鼻孔,维持 30 s,待液体全部吸入经鼻即可,造模 24 h 后处理动物;口咽吸入空白组给予生理盐水,操作方法与之相同。③经鼻滴入 LPS 组:大鼠麻醉后,用移液器吸取 LPS 溶液滴入大鼠 2 个鼻腔中,并迅速捏住大鼠鼻孔,维持 30 s,待液体全部吸入鼻腔即可,造模 24 h 后处理动物;经鼻滴入空白组给予生理盐水,操作方法与之相同。④雾化吸入 LPS 组:将大鼠置于动物暴露塔中,静置 10 min,待动物呼吸平静后进行雾化吸入  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  LPS 15 min(雾化速率设定  $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,平衡质量浓度  $11.78 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,下同),连续造模 3 d,最后 1 次雾化 LPS 24 h 后处理动物;雾化吸入空白组给予生理盐水,操作方法与之相同。

**2.1.2 动物处理** 所有动物于造模后 24 h 时麻醉,然后腹主动脉采血,暴露胸腔,取 8 组大鼠右肺,用 10% 甲醛固定。

**2.1.3 肺组织的病理学观察** 肺组织经脱水,石蜡包埋,制成  $4 \mu\text{m}$  的切片,苏木精-伊红(HE)染色,光镜下观察肺组织的病理学变化。

**2.2 雾化吸入 LPS 急性肺炎大鼠模型的多指标检测**

**2.2.1 动物分组及造模方法** Wistar 大鼠 24 只,依据体重质量分层均分为 4 组,分别为阴性组, LPS-1 组, LPS-2 组和 LPS-3 组。阴性组雾化吸入生理盐水,每天 1 次,每次 15 min,连续给药 3 d; LPS 组雾化吸入  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  LPS,每天 1 次,每次 15 min,连续造模 3 d。

**2.2.2 肺功能的测定** 最后 1 次给药后,阴性组, LPS-1 组, LPS-2 组和 LPS-3 组依次将动物提前放于无创气道动力学研究系统中,待动物呼吸稳定后,各组依次于 24, 24, 16, 8 h 时用无创检测系统对各组大鼠呼吸功能进行测量,数据采集 5 min,采集呼吸参数,包括呼吸频率(F),潮气量(TV),每分钟通气

量(MV),特殊气道阻力(sRaw),功能残气量(Frc),50%呼气流量(EF50),吸气流量峰值(PIF)和呼吸流量峰值(PEF),吸气时间(Ti),呼气时间(Te)。

**2.2.3 支气管肺泡灌洗液(BALF)中白细胞分类及计数** 阴性组, LPS-1 组, LPS-2 组和 LPS-3 组依次于 24, 24, 16, 8 h 对动物进行麻醉,腹主动脉采血,暴露胸腔,右肺叶结扎,用磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4,下同)盥洗左肺,盥洗 2 次,每次 1 mL,每次均静止平衡 30 s,合并盥洗液,取盥洗液 1 mL,离心( $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 10 min),取上清液  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  冻存,加入 Hanks 液 500  $\mu\text{L}$  使沉淀的白细胞重悬,用全自动血液分析仪进行细胞分类和计数。

**2.2.4 肺部盥洗液炎症因子的测定** 取所有动物 BALF 的上清液,用 ELISA 试剂盒检测 BALF 中 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的含量,检测方法与试剂盒说明书一致。

**2.2.5 肺组织炎症因子的测定** 取所有动物的右肺组织中叶,加入 PBS 后进行组织匀浆(60 Hz, 4 min),组织匀浆液离心( $2500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 20 min),取上清液分装冻存( $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ );用 ELISA 试剂盒检测肺组织上清液中 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的含量,检测方法与试剂盒说明书一致。

**2.2.6 肺组织的病理学观察** 所有动物均进行肺组织的病理学观察,操作同 2.1.3 项。

**2.3 统计分析** 应用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,符合正态分布且方差齐性的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析,方差齐用最小显著性差异法(LSD)检测,方差不齐用 Tamhane's T2 法检测。病理定性用等级程度表示,采用非参数检验进行组间比较。 $P < 0.05$  表示有显著性差异。

### 3 结果

**3.1 不同途径吸入 LPS 的急性肺炎大鼠模型肺组织病理观察** 病理学的变化是区分急性肺炎模型的直观指标之一,其评分标准见表 1。通过病理学观察发现,气管滴入 LPS 组肺泡壁轻度增厚,细支气管内见脱落的上皮细胞胞浆,病理表现见表 2 和见图 1;口咽吸入 LPS 组肺部的肺泡壁中度增厚,肺泡腔变小甚至消失,间质见少量嗜中性粒细胞浸润,细支气管内见脱落的上皮细胞、分泌的黏液及大量嗜中性粒细胞,病理表现见表 2 和图 1;经鼻滴入 LPS 组肺泡壁轻微至中度增厚,肺间质见少量嗜中性粒细胞浸润,病理表现见表 2 和图 1,与经鼻滴入阴性组比较,经鼻滴入 LPS 组有一定的炎症程度,但无统计学意义;雾化吸入 LPS 组肺泡壁中度增厚,肺泡腔减小甚至消失,间质少量嗜中性粒细胞浸润,

肺泡腔内偶见少量泡沫细胞,细支气管内见脱落的细支气管上皮细胞及分泌的黏液和少量红细胞,病理表现见表 2 和图 1;各空白组的肺组织未见显著异常。结果表明经鼻滴入 LPS 组大鼠肺组织炎症较轻,且肺部病理变化组内差异较大,无统计学意义;气管滴入 LPS 组和口咽吸入 LPS 组的大鼠肺组织炎症较重;而雾化吸入 LPS 组大鼠肺组织炎症表现为中度,且组内各实验动物肺部炎症损伤程度一致,病理变化表现稳定,组内差异小。故选择雾化吸入 LPS 组作进一步验证。

表 1 肺组织损伤的病理学评分标准

Table 1 Pathology classification standard of lung injury

病理变化等级	病理变化特殊描述
-	肺泡壁未见显著异常,未有炎症浸润
+	个别肺泡壁局灶性增厚,偶见少量炎症细胞散在,浸润
++	小面积肺泡壁局灶性增厚,偶见少量炎症细胞散在,浸润
+++	肺泡壁大面积增厚,大面积炎症细胞浸润,部分肺泡腔结构消失
++++	肺泡壁弥散性增厚,炎症细胞浸润,肺泡腔结构基本消失,偶见坏死脱落的肺泡壁上皮细胞

注:“-”计 0 分;“+”计 1 分;“++”计 2 分;“+++”计 3 分;“++++”计 4 分。

表 2 雾化吸入 LPS 的大鼠病理变化等级的分布

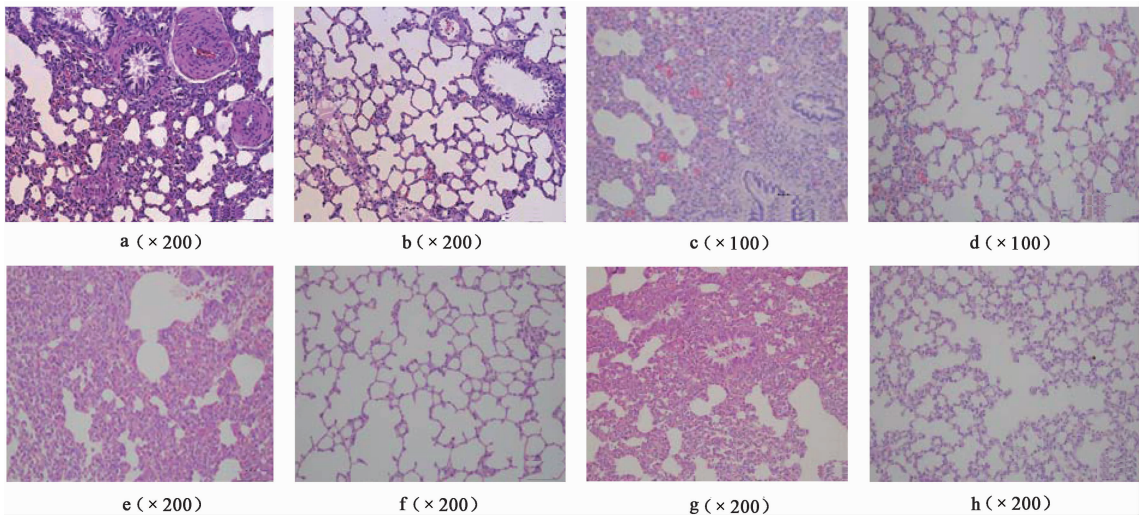
Table 2 Distribution of pulmonary pathological changes of rats in each group

组别	n					P <sup>1)</sup>
	0 分	1 分	2 分	3 分	4 分	
气管滴入 LPS	0	0	1	1	4	<0.01
气管滴入空白	6	0	0	0	0	-
口咽吸入 LPS	0	0	1	3	2	<0.01
口咽吸入空白	6	0	0	0	0	-
经鼻滴入 LPS	0	1	2	3	0	>0.05
经鼻滴入空白	6	0	0	0	0	-
雾化吸入 LPS	0	0	0	6	0	<0.01
雾化吸入空白	5	1	0	0	0	-

注:<sup>1)</sup>与对应给药方式的空白相比较。

### 3.2 雾化吸入 LPS 急性肺炎大鼠模型的多指标检测

**3.2.1 不同时间肺组织的病理变化情况** 通过病理观察发现,雾化吸入 LPS 后 8 h 时已有大鼠肺组织肺泡壁轻度增厚,轻度水肿,间质极少量嗜中性粒细胞浸润,细支气管内见分泌的黏液,评分为 4 只 2 分和 2 只 1 分;16 h 时肺泡壁轻度至中度增厚,肺泡腔减小甚至消失,间质少量嗜中性粒细胞浸润,细



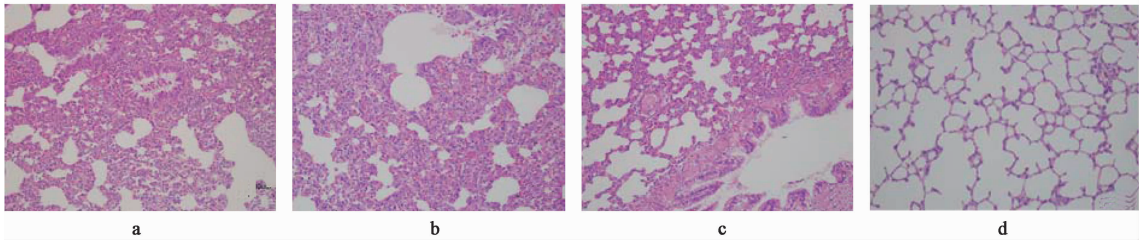
a. 气管滴入 LPS 组; b. 气管滴入空白组; c. 口咽吸入 LPS 组; d. 口咽吸入空白组; e. 经鼻滴入 LPS 组; f. 经鼻滴入空白组; g. 雾化吸入 LPS 组; h. 雾化吸入空白组

图 1 雾化吸入 LPS 的大鼠的肺组织病理染色(HE)

Fig.1 Pulmonary pathological changes of rats in different groups(HE)

支气管内见脱落的细支气管上皮细胞及分泌的黏液,评分均为 3 分;24 h 时所有大鼠肺组织均表现中度损伤,肺泡壁中度增厚,肺泡腔减小甚至消失,间质少量嗜中性粒细胞浸润,肺泡腔内偶见少量泡沫

细胞,细支气管内见脱落的细支气管上皮细胞及分泌的黏液和少量红细胞,评分均为 3 分。见图 2。结果表明随着时间的推移,LPS 雾化吸入所建立的急性肺炎模型逐渐加重,且所建立的模型损伤程度



a. LPS-1 组; b. LPS-2 组; c. LPS-3 组; d. 阴性组

图 2 雾化吸入 LPS 各组大鼠的肺组织病理染色 (HE, ×200)

Fig. 2 Pulmonary pathological changes of rats in different aerosol inhalation LPS groups (HE, ×200)

一致、病理变化表现稳定、组内差异小,与临床急性肺炎发病情况及症状接近。

**3.2.2 白细胞分类及计数** 大鼠雾化 LPS 后 8 h 时白细胞计数 (WBC) 增加; 16 h 时 WBC 明显增

加 ( $P < 0.05$ ), 中性粒细胞比例也开始增加 ( $P < 0.01$ ); 24 h 时 WBC 数目显著升高 ( $P < 0.01$ ), 淋巴细胞所占比例开始明显升高 ( $P < 0.05$ ), 但中性粒细胞比例减少。见表 3。

表 3 雾化吸入 LPS 后各组大鼠 BALF 中的白细胞分类与计数 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Classification and counting of white blood cell in BALF of rats from different aerosol inhalation LPS groups ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	WBC ( $\times 10^9$ )/个/L	Neut 比例/%	Lymph 比例/%	Mono 比例/%	Eos 比例/%	Baso 比例/%
阴性	0.14 ± 0.04	30.47 ± 3.67	27.5 ± 22.95	16.54 ± 12.49	8.34 ± 7.15	5.36 ± 2.75
LPS-1	0.90 ± 0.29 <sup>2)</sup>	11.00 ± 11.98	69.65 ± 30.14 <sup>1)</sup>	15.25 ± 16.82	0.40 ± 2.56	2.52 ± 0.86
LPS-2	0.52 ± 0.24 <sup>1)</sup>	59.50 ± 5.91 <sup>2)</sup>	10.58 ± 3.31	24.28 ± 12.53	3.02 ± 2.56	1.18 ± 0.86
LPS-3	0.42 ± 0.04	26.44 ± 11.56	46.40 ± 22.23	17.98 ± 5.85	5.86 ± 6.86	2.26 ± 1.30

注: Neut. 嗜中性粒细胞; Lymph. 淋巴细胞; Mono. 单核细胞; Eos. 嗜酸性粒细胞; Baso. 嗜碱性粒细胞。与阴性组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  (表 4, 5 同)。

**3.2.3 炎症因子的含量** LPS 是 TNF- $\alpha$  及 IL-6 的直接诱导剂, 同时 TNF- $\alpha$  及 IL-6 的含量变化也是评价炎症的指标之一<sup>[7]</sup>。通过 ELISA 检测显示,

雾化吸入 LPS 后 8 h 开始, BALF 和组织中炎症因子 TNF- $\alpha$  及 IL-6 的含量均显著升高。结果见表 4。

表 4 雾化吸入 LPS 后各组大鼠的 BALF 及肺组织中炎症因子的质量浓度 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 4 Contents of IL-6 and TNF- $\alpha$  in BALF and lung tissue of rats in different aerosol inhalation LPS groups ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	BALF		肺组织	
	IL-6	TNF- $\alpha$	IL-6	TNF- $\alpha$
阴性	39.02 ± 17.63	100.80 ± 23.17	25.32 ± 5.87	42.49 ± 13.11
LPS-1	148.49 ± 25.32 <sup>2)</sup>	221.96 ± 28.55 <sup>2)</sup>	61.15 ± 8.97 <sup>2)</sup>	89.46 ± 12.34 <sup>2)</sup>
LPS-2	79.23 ± 11.90 <sup>2)</sup>	181.83 ± 17.18 <sup>2)</sup>	63.85 ± 8.17 <sup>2)</sup>	100.28 ± 13.01 <sup>2)</sup>
LPS-3	51.85 ± 11.07 <sup>1)</sup>	166.10 ± 18.22 <sup>1)</sup>	44.30 ± 7.61 <sup>2)</sup>	112.08 ± 29.22 <sup>2)</sup>

**3.2.4 肺功能** 通过肺功能检测进一步验证了雾化吸入 LPS 可致大鼠产生急性肺炎模型, 见表 5。结果发现大鼠雾化吸入 LPS 后 8 h 时, F 和 sRaw 增加 ( $P < 0.05$ ); TV, PIF, Ti 和 Te 降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。16 h 时 F 和 sRaw 显著增加 ( $P < 0.01$ ); TV, MV, Frc, PIF, PEF 和 Ti, Te 均显著降低 ( $P < 0.01$ )。24 h 时 F 和 sRaw 显著增加 ( $P < 0.01$ ); TV, MV 和 Ti 均明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。

#### 4 讨论

急性肺炎一直是临床常见疾患之一, 为了研发治疗急性肺炎的有效药物, 研究人员一直致力于建立稳定的急性肺炎动物模型<sup>[8-9]</sup>。用 LPS 对大、小鼠进行腹腔注射或者静脉注射诱导动物炎症反应是过去常用的炎症造模方法, 尽管此类给药方法简单易行, 但是所建立的炎症有全身炎症反应, 动物容易休克甚至死亡, 造成的肺部炎症所需时间长且模型

表 5 雾化吸入 LPS 后各组大鼠的肺功能检测 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 5 Lung function of rats in different aerosol inhalation LPS groups ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	F/次/min	TV/mL · kg <sup>-1</sup>	MV/mL · min <sup>-1</sup>	sRaw/kPa · s	Frc/mL · min <sup>-1</sup>
阴性	99.66 ± 19.45	1.70 ± 0.27	172.18 ± 64.70	0.19 ± 0.05	1.04 ± 0.80
LPS-1	138.61 ± 42.40 <sup>2)</sup>	1.37 ± 0.14 <sup>2)</sup>	149.02 ± 62.38 <sup>2)</sup>	0.26 ± 0.08 <sup>2)</sup>	1.00 ± 0.73
LPS-2	123.32 ± 11.27 <sup>2)</sup>	1.39 ± 0.20 <sup>2)</sup>	162.24 ± 33.12 <sup>2)</sup>	0.30 ± 0.08 <sup>2)</sup>	0.69 ± 1.12 <sup>2)</sup>
LPS-3	109.83 ± 26.07 <sup>1)</sup>	1.33 ± 0.19 <sup>2)</sup>	186.30 ± 46.41	0.24 ± 0.03 <sup>1)</sup>	1.12 ± 0.93
组别	EF50/mL · s <sup>-1</sup>	PIF/mL · s <sup>-1</sup>	PEF/mL · s <sup>-1</sup>	Ti/ms	Te/ms
阴性	5.93 ± 5.26	10.02 ± 3.19	7.59 ± 5.01	0.23 ± 0.02	0.39 ± 0.08
LPS-1	5.40 ± 3.49	10.30 ± 0.90	7.11 ± 2.92	0.19 ± 0.01 <sup>1)</sup>	0.34 ± 0.28
LPS-2	5.99 ± 1.65	9.16 ± 1.34 <sup>2)</sup>	6.62 ± 1.70 <sup>2)</sup>	0.17 ± 0.01 <sup>2)</sup>	0.20 ± 0.02 <sup>2)</sup>
LPS-3	5.76 ± 2.50	9.44 ± 1.02 <sup>1)</sup>	8.56 ± 2.14	0.19 ± 0.02 <sup>1)</sup>	0.28 ± 0.18 <sup>1)</sup>

不稳定。近年国内外开始使用局部给药法建立 LPS 急性肺炎模型,如经气管滴入法、经口咽吸入法等,但是这类方法产生的肺部炎症多局限于注射点附近,而且造模过程中对动物有创伤。

由于不同给药途径的选择会影响大鼠肺炎造模效果,进而影响到开发治疗肺炎药物的研究。因此,本研究建立气管滴入、口咽吸入、经鼻滴入、雾化吸入 4 种给药方式诱导大鼠急性肺炎,通过病理学观察筛选出最佳给药途径。研究结果表明气管滴入与口咽吸入给药途径能够造成肺部严重损伤,气管滴入肺组织大部分可达到 4 分级别损伤,个别肺部区域为 2 分或 3 分级别损伤,口咽吸入次之;但两者在给药过程中会出现药物在肺部聚集的现象,肺部损伤程度不一致、病理变化表现不稳定且药物定量方面较差,不利于治疗肺炎药物的筛选。经鼻滴入给药途径不仅需要消耗大量药物,且造模程度较轻,与空白组比较无统计学差异;雾化吸入给药途径肺组织均可达到 3 分级别损伤,肺部严重程度为中度,肺部损伤程度一致,病理变化表现稳定,组内差异小。综上所述,本研究最终选取雾化吸入给药途径为 LPS 所致大鼠肺炎的给药途径。

本研究中病理学观察结果表明,雾化吸入 LPS 造模后,随着时间的推移,大鼠肺部炎症逐步加重,说明雾化吸入 LPS 造模方法的稳定可控。BALF 中的白细胞分类结果表明,早期(0 ~ 16 h)嗜中性粒细胞比例升高,中期(16 ~ 24 h)嗜中性粒细胞比例逐渐降低,淋巴细胞比例逐渐增加。据研究报道表明,在肺组织中可引起中性粒细胞与淋巴细胞增加的主要促炎症因子为 TNF- $\alpha$  和 IL-6<sup>[10]</sup>。本研究结果发现,与阴性组比较,模型组大鼠 BLAF 及肺组织中炎症因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 含量显著升高。动物雾化吸

入 LPS 后,与阴性组比较,8 ~ 24 h 大鼠的气道阻力外,呼吸频率显著升高,潮气量、每分钟通气量显著降低。肺功能检测数据分析表明,大鼠的呼吸功能可能与急性肺炎的炎症程度密切相关。本研究采用暴露塔对动物进行平行雾化吸入 LPS,可建立稳定的急性大鼠肺炎模型。病理变化及肺功能检测显示该模型与临床上患者急性肺炎发病过程相接近,可为研究呼吸系统炎性疾病的发病机制以及开发抗炎新药提供有效手段。

雾化吸入给药方法在临床已广泛使用,但在基础研究中却存在许多技术盲点。①雾化有效剂量的计算。动物雾化有效剂量不仅与吸入时药物浓度、吸入时间有关,还与吸入动物本身呼吸参数相关。在预试验中,作者假设动物的呼吸参数一定,对雾化吸入 LPS 的质量浓度(2.5, 5, 10 g · L<sup>-1</sup>)及吸入时间(每天吸入时间 15 min)分别进行了优化。结果发现当 LPS 质量浓度为 10 g · L<sup>-1</sup>时,由于 LPS 质量浓度过大,会影响雾化器的雾化性能,雾化器会出现间歇不震动的现象。虽然病理学研究表明不同质量浓度的 LPS 所致大鼠肺部损伤范围一致,但 LPS 质量浓度为 5, 10 g · L<sup>-1</sup>时,诱导产生的肺组织病理变化等级均为 3 分级别,即肺部中度损伤,比 LPS 质量浓度为 2.5 g · L<sup>-1</sup>时炎症程度(2 分级别)更重,更适于实验研究。综上所述,筛选出 LPS 最佳雾化质量浓度为 5 g · L<sup>-1</sup>,每天雾化时间 15 min。②大鼠雾化吸入量与人吸入量的等效剂量转换。大鼠与人雾化吸入量的关系为  $X_h = X_a (M_a/M_h)^{(1-b)}$  ( $X_h$  为人的有效吸入量,  $X_a$  为鼠的有效吸入量,  $M_a$  为鼠的体质量,  $M_h$  为人的体质量,  $b = 0.67$ )<sup>[11]</sup>,这可为后续的相关研究提供参考。

除此之外,经本实验对无创气道动力学研究

系统和暴露塔在动物雾化吸入肺部给药的性能考察,可为雾化吸入药理研究提供有效的研究工具。雾化吸入疗法作为呼吸系统相关疾病的重要治疗手段,具有较大的开发前景。中药雾化吸入给药历史悠久,早在唐代就有用中药蒸气形成的气雾治疗中风口噤的记载。中药雾化吸入疗法在临床应用多年,已被众多的临床医生和广大的患者所接受,具有较大的市场需求<sup>[12]</sup>。应用无创气道动力学研究系统和暴露塔可以将中药制剂振动形成雾滴完成肺部药物递送,保持中药大分子的完整性、有效性,为中药制剂的雾化吸入创造有利条件。

[参考文献]

[1] Corrales-Medina V F, Musher D M, Shachkina S, et al. Acute pneumonia and the cardiovascular system [J]. *Lancet*, 2013, 381(9865):496-505.

[2] 唐洁, 吕云瑶, 龙之浩, 等. 筋骨草水煎液对急性肺炎的保护作用研究[J]. *川北医学院学报*, 2017, 32(3):329-331.

[3] MENG L, LI L, LU S, et al. The protective effect of dexmedetomidine on LPS-induced acute lung injury through the HMGB1-mediated TLR4/NF- $\kappa$ B and PI3K/Akt/mTOR pathways[J]. *Mol Immunol*, 2017, 94:7-17.

[4] 焦光宇, 聂志伟, 刘春利, 等. 小剂量脂多糖气管内滴注制备急性肺损伤动物模型的探究[J]. *中国实验动物学报*, 2007, 15(4):292-295.

[5] 杨东, 仇玮祎, 张畅, 等. 地塞米松治疗 LPS 诱导急性肺炎模型小鼠病理学评价方法的建立[J]. *实验动物*

科学, 2013, 30(4):13-16, 69.

[6] 杜顺霞, 黄慧学, 蒙雪芳, 等. 甜牛大力和苦牛大力总黄酮对小鼠急性肺损伤的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(8):160-165.

[7] 宣国平, 张琳, 钟明媚. 脂多糖致大鼠急性肺损伤模型取材时间选择[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2015, 29(2):136-138.

[8] Uchida T, Shirasawa M, Ware L B, et al. Receptor for advanced glycation end-products is a marker of type I cell injury in acute lung injury [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 173(9):1008-1015.

[9] Izushi Y, Teshigawara K, LIU K, et al. Soluble form of the receptor for advanced glycation end-products attenuates inflammatory pathogenesis in a rat model of lipopolysaccharide-induced lung injury [J]. *J Pharmacol Sci*, 2016, 130(4):226-234.

[10] Erdenechimeq C, Guiqide A, Dejidmaa B, et al. Total phenolic, flavonoid, alkaloid and iridoid content and preventive effect of *Lider-7-tang* on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2017, 50(12):e5916.

[11] Phillips J E. Inhaled efficacious dose translation from rodent to human: a retrospective analysis of clinical standards for respiratory diseases [J]. *Pharmacol Therapeut*, 2017, 178:141-147.

[12] 韩飞, 晏丽, 朱大治, 等. 雾化吸入法在临床中应用的研究进展[J]. *中国医院药学杂志*, 2016, 36(24):2218-2222.

[责任编辑 刘德文]