

脂多糖和石墨粉诱导小鼠急性肺损伤病理形态学比较

崔雯雯¹, 张彦芬², 秘尧², 金鑫¹, 刘克剑², 王宏涛^{1,3}

(1. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150042; 2. 河北以岭医药研究院, 国家中医药管理局重点研究室 (心脑血管络病), 石家庄 050035; 3. 河北省络病重点实验室, 石家庄 050035)

【摘要】目的 通过比较脂多糖(LPS)和石墨粉颗粒分别诱导小鼠急性肺损伤的病理形态学差异,探讨不同来源细颗粒物成分导致急性肺损伤的可能机制。**方法** 将140只SPF级18~20g雄性KM小鼠随机分为7组,除正常对照组外其他组经气管内分别滴注LPS溶液及石墨粉混悬液制备急性肺损伤小鼠。记录各组动物死亡率,光和透射电镜下观察各组小鼠不同时间点肺组织病理变化。Western Blot检测肺组织中NE的蛋白表达,实时定量PCR法检测肺组织中MCP-1的mRNA表达。**结果** 与正常对照组相比,G(石墨粉)组和L(LPS)组均有不同程度病理学改变,G组小鼠肺部有大量巨噬细胞渗出,L组小鼠肺部渗出物以中性粒细胞为主;肺组织中NE蛋白表达均高于正常对照组($P < 0.05$),且L组与G组之间差异有显著性($P < 0.05$);肺组织中MCP-1 mRNA表达均高于正常对照组($P < 0.01$),且L组与G组之间也有显著差异($P < 0.01$)。**结论** 不同来源颗粒物引起肺部的病理损伤不同,可能引起炎症反应的机制也存在差异,即成分复杂的细颗粒物导致急性肺损伤的机制可能存在混合性。

【关键词】 急性肺损伤;脂多糖;石墨粉;作用机制;病理学

【中图分类号】 Q95-33;R965 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014)05-0022-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.05.005

Pathological comparison of lipopolysaccharide- and graphite particle-induced acute lung injury

CUI Wen-wen¹, ZHANG Yan-fen², BEI Yao², JIN Xin¹, LIU Ke-jian², WANG Hong-tao^{1,3}

(1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150042, China;

2. Yiling Medical Research Institute of Hebei Province, Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine (Cardio-Cerebral Vascular Network Disease),

Shijiazhuang 050035; 3. Key Laboratory of Network Disease of Hebei Province, Shijiazhuang 050035)

【Abstract】Objective To compare the differences of lung pathological changes of acute lung injury in mice induced by lipopolysaccharide (LPS) and graphite particles, and to explore the possible mechanisms of acute lung injury induced by fine particles of different origins. **Methods** 140 male specific-pathogen-free Kunming mice weighing 18–20 g were randomly divided into 7 experimental groups, in addition to the normal control group. The experimental groups were treated by intratracheal instillation of LPS solution or graphite powder suspension in different doses, respectively, to induce acute lung injury in the mice. The mortality of the mice was observed, and pathological changes of the lung tissues were examined by light and transmission electron microscopy. Western blot was used to detect the protein expression of neutrophil elastase (NE) in lung tissues, and real-time quantitative PCR was used to detect mRNA expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the lung tissue. **Results** Compared with the normal control group, some pathological changes were observed in the lung tissues of the groups L (LPS) and G (graphite). There were numerous macrophages in the lung tissues in the group G mice, and exudate, mainly neutrophils, in the lung tissues of the group L. The NE protein expression in the lung tissue was significantly higher than that of the normal control group ($P < 0.05$), and there was also a sig-

[基金项目] 国家科技部“十二五重大新药创制”项目;抗流感中药莲花清瘟胶囊生产技术改造研究(编号:2011ZX09201-201-27)。

[作者简介] 崔雯雯(1991-),女,硕士生。E-mail: reaishenghuo0506@163.com

[通讯作者] 王宏涛(1972-),男,博士,高级工程师。E-mail: wanghongtao@yiling.cn

nificant difference between the groups L and G ($P < 0.05$). The MCP-1 mRNA expression in lung tissues was higher in the control group ($P < 0.01$), and there was also a significant difference between the groups L and G ($P < 0.01$). **Conclusions** Diverse types of particulate matters induce different pathological changes in the lungs, therefore the mechanism may also be different in the inflammatory responses. It means that the lung injuries caused by fine particles of mixed composition may have complex mechanisms.

【Key words】 Acute lung injury; Lipopolysaccharides, LPS; Graphite powder; Mechanism; Pathology; Mice

随着工业的发展与生活水平的提高,可吸入颗粒物已经严重危害人的身体健康,使呼吸道疾病和心脑血管疾病的发病率和死亡率大大提高。PM_{2.5} 或称细颗粒物,指环境空气中空气动力学当量直径小于等于 2.5 μm 的颗粒物。它包含土壤扬尘、植物花粉、细菌等自然源颗粒物等^[1-2],又包含燃煤燃油等人为源排放颗粒物,因而存在微生物源成分对直接诱发肺部损伤的风险,也存在细颗粒物向呼吸道沉积导致损伤的可能^[3]。作为革兰阴性菌细胞壁主要成分的内毒素脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)可导致机体肺部损伤^[4-6],石墨粉(graphite powder)作为颗粒直径 2.6 μm 的颗粒可在肺部沉积,两种不同成分,导致的肺部病理损伤,有何异同,目前尚未见报道。因此,本实验采用气管灌注 LPS 和石墨粉后不同时间点取材的方法,观察不同来源颗粒物成分对动物肺部病理损伤差异,为更深入研究细颗粒物的肺损伤机制提供参考。

1 材料与方 法

1.1 仪器设备

3K15 型低温高速离心机(德国 Sigma);Leica RM2015 切片机(德国 Leica 公司);Olympus IX71 荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司);ABI 7300 Real-Time PCR System(美国 ABI 公司);UVP 凝胶扫描系统(美国 UVP 公司);DYZ-22A 型双恒定时电泳仪(北京市六一仪器厂);DYY-III 桥式电泳槽(北京市六一仪器厂)。

1.2 药物和试剂

LPS (Sigma 公司,102M4017V,德国);2.6 μm 石墨粉(青岛晨阳石墨有限公司);Western 印迹检测抗体:中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)兔抗小鼠多克隆抗体(Abcam 公司,英国);RNA 提取试剂 Trizol Reagent (Invitrogen 公司,美国);反转录试剂盒(Promega 公司,美国);琼脂糖(Promega 公司,美国);荧光定量 PCR 试剂盒(BBI 公司,加拿大)。

1.3 动物饲养与分组实验

SPF 级雄性 KM 小鼠 140 只,6 周龄,体重 18 ~ 20 g,由中国食品药品检定研究所提供【SCXK(京)2009-0017】。实验在河北省络病重点实验室进行【SYXK(冀)2009-0033】。实验前适应性喂养 4 d 后,随机分成 3 组:正常对照组(N 组, $n = 20$)、LPS 组(L 组, $n = 60$)、石墨粉组(G 组, $n = 60$);其中 LPS 组和石墨粉组又根据造模时间各分为三个亚组:LPS(L-6 h)、LPS(L-24 h)、LPS(L-72 h),石墨粉(G-6 h)、石墨粉(G-24 h)、石墨粉(G-72h),每组各 20 只。

1.4 造模方法

用 10% 水合氯醛 3.5 mL/kg 腹腔麻醉后,将小鼠固定在手术板上,颈部消毒,纵向切开颈部皮肤,剥离皮下组织,暴露气管,用 1mL 注射器吸取 LPS 溶液(5 mg/kg)、石墨粉混悬液(40 mg/kg),以生理盐水作为溶剂 2 mL/kg,从气管两气管环间快速刺入注射,滴入后立即直立小鼠,轻度晃动数次后缝合伤口,小鼠自然清醒。

1.5 取材及指标检测

1.5.1 肺组织病理学检测

每组随机取三只小鼠,于各时间点将小鼠采用眼球取血的方式处死,开胸取肺。取左肺上叶组织块,放入 4% 甲醛溶液固定 48 h,石蜡包埋,切片(片厚 5 μm),于切片中任意抽取其中一张片子,HE 染色,光镜下观察肺组织形态学改变;去左肺下叶组织块(2 mm × 2 mm × 2 mm),放入 2.5% 戊二醛溶液中固定 48 h,二甲砷酸缓冲液冲洗两遍,四氧化钼固定再经缓冲液冲洗,逐级丙酮脱水,环氧树脂浸透包埋,超薄切片,醋酸铀-枸橼酸铅染色,透射电镜观察肺组织超微结构的变化。

1.5.2 Western blot 法检测肺组织中 NE 的蛋白表达

称取小鼠肺组织加入组织裂解液,匀浆后 4℃ 离心分离上清,进行蛋白定量。取各组蛋白样品进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,半干转膜后封闭,与一抗结合后洗膜,二抗结合,洗膜后采用增强型 ECL 化学发光法显色,扫描灰度值,以目的蛋白与内参

GAPDH 比值表示。

1.5.3 实时定量 PCR 法检测 MCP-2 的 mRNA 表达水平

用 Trizol 试剂提取心脏组织总 RNA, 进行 cDNA 的合成。实时荧光定量 PCR 检测肺组织中 MCP-1 的 mRNA 表达水平, 引物序列如下: MCP-1, 158bp, 上游 5'-ACTTCTATGCCTCCTGCTCAT-3', 下游 5'-ACTGGCTGCTTGTGATTCTC-3'; GAPDH, 120 bp, 上游 5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3', 下游 5'-GCTTACCACCTTCTTGATGTC-3'。以 GAPDH 为内参照基因, 得到目的基因表达的相对定量值 (RQ 值)。

1.6 统计方法

采用 SPSS 17.0 软件包进行统计学处理, 实验数据为连续性变量用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用单因素方差分析进行检验, 方差齐性, 使用 LSD 法进行检验后多重比较, 检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 建模后小鼠一般情况及存活率

N 组小鼠一般情况良好, 活动正常, 呼吸平稳, 食量正常, 对外界刺激反应正常; L-6 h 组小鼠多数一般情况良好, 少数几只出现蜷卧少动、反应迟钝的症状, 存活 19 只; L-24 h 组小鼠多数行动较迟缓, 嗜睡, 反应迟钝, 存活 15 只; L-72 h 组小鼠体型瘦弱, 进食量明显减少, 呼吸微弱, 对外界刺激反应迟钝, 存活 9 只; G-6h 组小鼠一般情况与 N 组差异不大, 无死亡现象; G-24h 组小鼠活动稍微减少, 呼吸较平稳, 少数几只出现蜷卧少动、反应迟钝症状, 存活 18 只; G-72 h 组小鼠多数活动量明显减少, 嗜睡, 对外界刺激反应较迟钝, 存活 14 只。L 组和 G 组不同时间点小鼠存活率 (见图 1, 彩插 4)。

2.2 光镜下观察肺组织病理形态学变化

正常对照组, 肺泡壁完整, 无增厚, 无炎细胞浸润, 无充血; L-6 h 组肺泡腔内可见以中性粒细胞为主的渗出物, 部分肺泡壁轻微破坏; L-24 h 组肺泡腔内可见大量中性粒细胞为主的渗出物, 肺泡壁毛细血管扩张充血, 部分肺泡壁轻微破坏; L-72 h 组部分正常肺组织结构消失, 呈实变状, 肺泡腔内可见大量中性粒细胞为主的渗出物, 肺泡壁毛细血管扩张充血, 部分肺泡壁轻微破坏, 部分肺泡腔代偿性扩张; G-6 h 组支气管及肺泡壁可见黑色颗粒物聚集; G-24 h 组支气管及肺泡壁可见黑色颗粒物聚集, 巨

噬细胞增多, 无明显渗出物; G-72 h 组支气管及肺泡壁可见黑色颗粒物聚集, 巨噬细胞增多, 肉芽肿形成, 部分肺泡壁增厚, 无明显渗出物 (图 2, 彩插 5)。

2.3 电镜下观察肺组织超微结构变化

正常对照组肺组织结构基本正常, 肺泡 II 型上皮细胞微绒毛排列整齐, 胞质内有大量板层体和线粒体, 板层小体结构清晰, 基膜完整; L-6 h 组 II 型上皮细胞出现损伤, 板层小体空泡化, 微丝模糊、断裂, 基质变淡; L-24 h 组纤毛轻微断裂、融合, 胞质细小空泡变, 嗜铁性板层体排空; L-72 h 组 II 型上皮细胞颗粒排出, 损伤加重; G-6 h 组 II 型上皮细胞轻微损伤, 部分板层小体脱落; G-24 h 组 II 型上皮细胞损伤, 内部有黑色物质出现, 胞质细小空泡变; G-72 h 组 II 型上皮细胞损伤, 内部有大量黑色物质出现, 细胞肿胀空泡变。见图 3。

2.4 急性肺损伤小鼠肺组织中 NE 的蛋白表达、MCP-1 的 mRNA 表达 见表 1。

表 1 肺组织中 NE 蛋白表达和 MCP-1 m-RNA 表达

Tab.1 NE protein and MCP-1 m-RNA expression in the mouse lung tissues ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

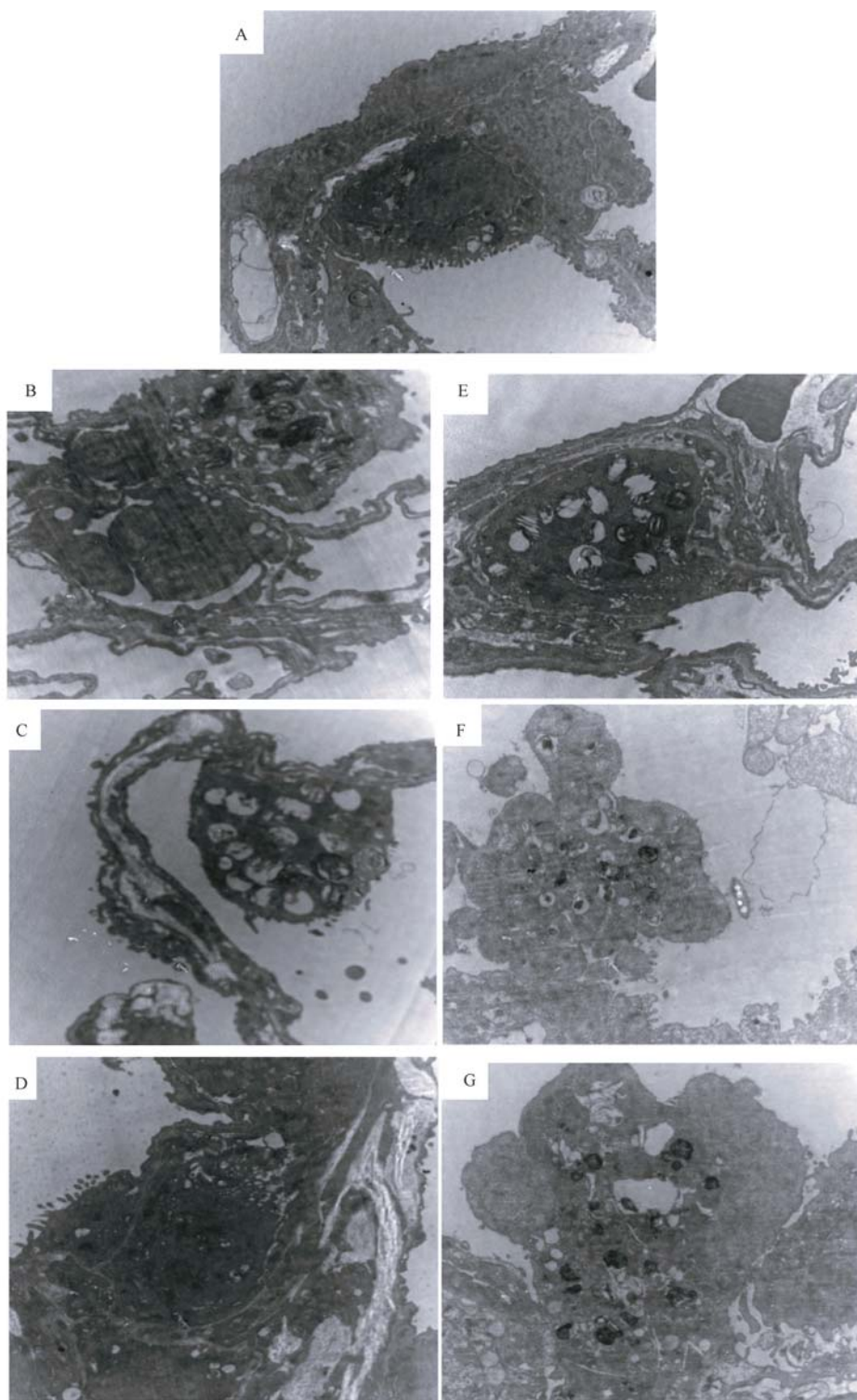
小鼠组别 Mouse groups	NE	MCP-1 mRNA
N 组	0.67 ± 0.01	1.06 ± 0.14
L 组	0.97 ± 0.07 **	2.98 ± 0.66 **
G 组	0.82 ± 0.14 * #	5.26 ± 0.39 * * #

注: * 与正常组比较差异有显著性, $P < 0.05$; ** 与正常组比较差异有显著性, $P < 0.01$; # 与 LPS 组比较差异有显著性, $P < 0.05$; ## 与 LPS 组比较差异有显著性, $P < 0.01$ 。

Note. * Compared with the normal group, $P < 0.05$; ** Compared with the normal group, $P < 0.01$; # Compared with the LPS group, $P < 0.05$; ## Compared with the LPS group, $P < 0.01$.

3 讨论

细颗粒物的来源广泛、成因复杂, 自然来源包括森林火灾、风扬尘土、细菌、真菌孢子等, 人为来源包括: 燃烧产物 (化石燃料、秸秆、垃圾等)、道路扬尘、工业粉尘等^[1-2]。细颗粒物的粒径为小于等于 2.5 μm , 因而直接进入肺部深处, 引起炎症反应; 又因具有粒径小、比表面积大的特点, 它能够携带易引起呼吸道疾病的细菌、病毒、重金属等进入肺部, 从而激活炎性细胞释放大量的炎症因子, 引起肺部损伤。大量的流行病学和毒理学研究表明^[7-10], $\text{PM}_{2.5}$ 能够直接进入人体肺部并沉积于肺泡腔内, 诱发呼吸道上皮细胞及肺部免疫细胞产生细胞毒性和免疫反应, 从而引发肺部急性损伤并严重威胁人类健康。本实验采用 LPS 和石墨粉分别模拟生物源细颗粒



注:A. 肺组织结构基本正常;B. II型上皮细胞出现损伤,微丝模糊、断裂;C. 纤毛轻微断裂、融合,嗜铁性板层体排空;D. II型上皮细胞颗粒排出;E. II型上皮细胞轻微损伤,部分板层小体脱落;F. II型上皮细胞损伤,胞质细小空泡变;G. II型上皮细胞损伤,细胞肿胀空泡变。

图 3 小鼠肺组织超微结构损伤变化

Note. A. Normal lung tissue structure; B. Type II epithelial cell damage occurs, microfilaments blurred and broken; C. Cilia slight fracture and fusion, osmiophilic lamellar bodies emptying; D. Type II epithelial cell particles discharged; E. Type II epithelial cells minor injuries, some of lamellar bodies fall off; F. Type II epithelial cell injury, small cytoplasmic vacuolization; G. Type II epithelial cell injury, cell swelling and vacuolization.

Fig. 3 Ultrastructural changes in the lung tissues of the mice A: N, B: L-6h, C: L-24h, D: L-72 h, E: G-6h, F: G-24h, G: G-72h.

物成分和直接沉积入肺的颗粒物成分,观察不同颗粒物成分导致急性肺损伤的病理变化。

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是一种由多种致病因素引起的由炎症细胞释放炎症因子介导的肺内过度性、失控性炎症反应,各种致病因子激活炎症细胞释放炎症介质引起“瀑布式炎症级联反应”,它的发生发展与促炎细胞因子的合成、过度释放及内源性抗炎细胞因子的释放不足密切相关^[11-13],其恶化阶段即为急性呼吸窘迫综合征,其死亡率高达 30%~50%^[14]。其病变组织病理学表现为:肺泡上皮细胞损伤,细胞间隙增宽,肺泡壁断裂,肺泡腔内炎症细胞浸润和渗出^[15-16]等。

Sochor 等^[17]认为,中性粒细胞在肺内的聚集和激活是 LPS 所致 ALI 最常见的病理学改变和导致肺损伤的机制。中性粒细胞在肺内大量聚集,释放氧自由基、弹性蛋白酶等炎症介质,炎症介质又可以诱导免疫细胞释放炎症因子,而炎症因子能够促使中性粒细胞的大量渗出及粘附,从而引起级联性炎症反应,最终引起急性肺部损伤^[18-19]。中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)是由中性粒细胞产生的细胞毒性分子,NE 因能够降解细胞外基质、血浆蛋白,诱导上皮细胞释放炎症因子等作用,被认为是引起 ALI 的重要机制之一^[19]。单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)是一种具有强烈趋化作用的趋化因子,它的主要功能是趋化和激活单核巨噬细胞,MCP-1 在肺组织中的大量表达能够导致巨噬细胞的大量聚集和浸润^[20-21]。

本研究中,LPS 诱导的 ALI 可见肺组织中以中性粒细胞为主的渗出物,随着造模时间的增长,中性粒细胞的数量明显增多、浸润现象加重,石墨粉诱导的 ALI 可见肺组织中巨噬细胞随时间增长增多最终形成异物性肉芽肿,根据动物死亡率及病理形态学变化情况,检测了 L 组、G 组和正常对照组小鼠肺组织中 NE 蛋白表达和 MCP-1 基因表达,两组均显著高于正常对照组,说明 LPS 和石墨粉均可以引起肺内 NE 和 MCP-1 的含量增加;L 组 NE 在肺内表达高于 G 组,而 G 组 MCP-1 在肺内高于 L 组,说明 LPS 进入肺内后主要刺激中性粒细胞,石墨粉则主要引起巨噬细胞的增多。本实验结果显示,LPS 诱导的急性肺损伤是以中性粒细胞为炎症发生的起点,肺内中性粒细胞的聚集、渗出,由中性粒细胞释放弹性蛋白酶诱导炎症因子的大量出现,炎症因子又反向刺激中性粒细胞大量渗出,最终导致炎症弥漫于肺

内,引起急性肺损伤。且随着 LPS 作用时间的延长,实验小鼠的状态越来越差,死亡率升高说明,肺部炎症的长期发展最终会导致机体功能的衰弱甚至死亡。石墨粉诱导的 ALI 主要引起巨噬细胞增多,颗粒物通过呼吸道进入肺内,肺内趋化因子会趋化单核巨噬细胞吞噬、清除进入体内的颗粒物,而来不及被吞噬的颗粒物与肺巨噬细胞接触时间过长导致炎症因子的产生,同时未被吞噬的颗粒物会发生迁移并反复诱导趋化因子趋化炎性细胞聚集、浸润,最终导致肺内严重炎症损伤甚至肉芽肿。虽然两种来源的颗粒物引起肺损伤的过程都是以炎症细胞释放炎症因子为主要途径,但是 LPS 是直接刺激中性粒细胞,释放炎症因子引发炎症反应,石墨粉颗粒是通过大量沉积于肺部,引起趋化因子诱导巨噬细胞聚集、吞噬而最终导致的炎症损伤,在损伤机制上是存在着差异的。

综上所述,LPS 和石墨粉导致的肺损伤的病理形态和机制存在着明显差异,即自然环境中细颗粒物 PM_{2.5}引起肺损伤的机制也可能同时存在两种机制-肺内巨噬细胞和中性粒细胞增多,直接释放炎症因子或诱导炎症介质释放炎症因子最终造成肺损伤,但这还需要进一步研究探讨。

(本文图 1 见彩插 4,图 2 见彩插 5。)

参 考 文 献

- [1] 杨天智. 长沙市大气颗粒物 PM_{2.5} 化学组分特征及来源解析 [D]. 长沙:中南大学, 2010.
- [2] 毕晓萍. PM_{2.5} 对环境与健康的影响探讨 [J]. 绿色科技, 2012 (5):205-205.
- [3] 杨洪斌, 邹旭东, 汪宏宇, 等. 大气环境中 PM_{2.5} 的研究进展与展望 [J]. 气象与环境学报, 2012, 28(3):77-82.
- [4] 李超然, 王智刚. 内毒素所致急性肺损伤发病机制的研究进展 [J]. 中国医药科学, 2011, 1(10):47-49.
- [5] 王宏, 刘刚, 符炜, 等. Nr2 在丙泊酚抑制内毒素性急性肺损伤中的作用 [J]. 中国药理学通报, 2013, 29(9):1286-1290.
- [6] 姜远旭, 徐世元, 张雪萍, 等. 右美托咪定联合乌司他丁减轻脂多糖诱导的大鼠急性肺损伤 [J]. 中国病理生理杂志, 2014, 30(1):96-101.
- [7] André E, Stoeger T, Takenaka S, et al. Inhalation of ultrafine carbon particles triggers biphasic pro-inflammatory response in the mouse lung [J]. Eur Respir J. 2006, 28(2):275-285.
- [8] Niwa Y, Hiura Y, Sawamura H, et al. Inhalation exposure to carbon black induces inflammatory response in rats [J]. Circ J, 2008, 72(1):144-149.
- [9] 夏萍萍, 郭新彪, 邓芙蓉, 等. 气管滴注大气细颗粒物对大鼠的急性毒性 [J]. 环境与健康杂志, 2008, 25(1):4-6.

(下转第 31 页)