

吴志豪,杨露银,任维,等. 小鼠支气管肺泡灌洗术研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(10): 1368-1373.

Wu ZH, Yang LY, Ren W, et al. Research progress of bronchoalveolar lavage in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(10): 1368-1373.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.10.015

小鼠支气管肺泡灌洗术研究进展

吴志豪¹, 杨露银², 任维², 周雅楠², 王红², 雷云², 于红^{1*}, 杨思进^{2*}

(1. 西南医科大学基础医学院, 四川 泸州 646000; 2. 西南医科大学附属中医医院, 四川 泸州 646000)

【摘要】 支气管肺泡灌洗术是研究呼吸系统疾病的一项重要技术, 已经在疾病研究中得到广泛运用。目前, 临床患者的支气管肺泡灌洗操作流程已经逐步规范化, 而小鼠作为研究肺部疾病重要的模型动物之一, 尚缺乏针对小鼠的支气管肺泡灌洗液标准采集和检测流程, 不规范的流程会导致该技术在研究中的推广和应用受阻, 同时也会影响实验结果的准确性和可靠性。本文对国内外研究中小鼠支气管肺泡灌洗方法进行了系统总结, 以期今后运用并建立规范的灌洗流程提供参考和指导。

【关键词】 支气管肺泡灌洗术; 肺部疾病; 小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 10-1368-06

Research progress of bronchoalveolar lavage in mice

WU Zhihao¹, YANG Luyin², REN Wei², ZHOU Yanan², WANG Hong²,
LEI Yun², YU Hong^{1*}, YANG Sijin^{2*}

(1. School of Basic Medical Science, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China.

2. the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000)

Corresponding author: YANG Sijin. E-mail: ysjimn@sina.com; YU Hong. E-mail: hongyu@swmu.edu.cn

【Abstract】 Bronchoalveolar lavage is an important technique to study respiratory diseases and has been widely used in disease research. Currently, the procedure of bronchoalveolar lavage in patients has been gradually standardized. However, in mice, as an important model animal for studying lung diseases, standard collection and testing procedures for bronchoalveolar lavage fluid are needed. An unstandardized procedure can hinder the promotion and application of this technique in research and affects the accuracy and reliability of experimental result. This review presents a systematic summary of domestic and international studies of bronchoalveolar lavage method for mice to provide a reference and guidance for researchers applying and establishing a standardized lavage procedure.

【Keywords】 bronchoalveolar lavage; lung disease; mice

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

支气管肺泡灌洗术 (bronchoalveolar lavage, BAL) 在呼吸系统疾病中发挥着重要作用。医务人员可以借助这项技术了解患者肺部的炎症水平、细胞类型等信息, 以便更准确地对呼吸系统疾病进行诊断和治疗^[1]。同时, 这项技术也可以用于评估药

物的疗效^[2]、探索疾病的发病机制等^[3], 为呼吸系统疾病的治疗提供更好地指导。目前, 已有多项指南提出了临床患者支气管肺泡灌洗标准操作方法^[4-5], 还包括支气管肺泡灌洗液的规范化检测流程等, 这为临床操作提供了有益指导。

【基金项目】 四川省中医药管理局项目 (2021XYCZ006), 西南医科大学校级科研项目 (2023XGZX008)。

Funded by Project of Sichuan Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine (2021XYCZ006), School-Level Scientific Research Project of Southwest Medical University (2023XGZX008).

【作者简介】 吴志豪 (1994—), 男, 硕士, 研究方向: 免疫学。Email: wzhkycg@163.com

【通信作者】 杨思进 (1962—), 男, 博士, 主任中医师, 研究方向: 中西医结合防治心脑血管肺疾病的基础与临床。Email: ysjimn@sina.com; 于红, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 肿瘤的免疫治疗、抗病原真菌药物的免疫机制。Email: hongyu@swmu.edu.cn。

* 共同通信作者

小鼠作为肺部疾病研究常用的模型动物,被广泛运用于肺部感染^[6]、肺纤维化^[7]、哮喘^[8]等疾病的研究中。由于缺乏统一的小鼠支气管肺泡灌洗标准流程,研究者在实验小鼠支气管肺泡灌洗液的取样和检测方法上存在较大差别,不同的取样和处理方法可能会对后续的检测结果产生影响,这不仅限制了支气管肺泡灌洗术在领域内的推广和应用,还可能导致实验结果间缺乏可比性及可重复性。因此,建立一套规范并易于推广的支气管肺泡灌洗流程就显得尤为重要。本文系统地总结了国内外研究中小鼠支气管肺泡灌洗的操作方法,以期能为研究者运用并建立规范的小鼠支气管肺泡灌洗流程提供参考和指导。

1 麻醉

为了获得一份高质量的小鼠支气管肺泡灌洗液,研究者通常需要对实验小鼠进行适当的麻醉。常用的全身性麻醉药物从给药途径上大致分为两类:注射类麻醉药和吸入性麻醉药。注射类麻醉药物主要包括戊巴比妥钠、三溴乙醇、氯胺酮及甲苯噻嗪等,而吸入性麻醉药主要包括异氟烷、七氟烷等^[9]。小鼠常用的麻醉剂及其剂量、特点等相关信息汇总见表 1。

由于支气管肺泡灌洗会对小鼠造成较大的损伤,并且为了确保插管被正确放置在气管内,多数研究者选择将实验小鼠安乐死后再进行解剖和灌洗。戊巴比妥钠是最常见的安乐死制剂。在使用戊巴比妥钠对小鼠进行安乐死时,联合使用局部麻醉药和抗惊厥药以帮助动物缓解疼痛是有必要的。同时,为了确保小鼠气管及肺部的完整并顺利完成后续的灌洗操作,一般不采用颈椎脱臼法和断头法处理小鼠。

对非临终小鼠进行支气管肺泡灌洗存在以下困难和挑战:(1)尽管灌洗方法在不断改进,但灌洗液总会残留一部分在肺内,导致小鼠出现急性肺损伤等并发症^[11];(2)研究者需要谨慎选择麻醉药物,应尽可能选择对小鼠呼吸、循环系统影响较小的药物,此外,对实验小鼠进行多次支气管肺泡灌洗时,研究者还应当注意麻醉剂可能会影响肺泡灌洗液中细胞总数或总蛋白水平^[11];(3)在手术操作和术后恢复过程中,研究者都需要注意对小鼠进行保温及生命体征监测,以确保其存活。

2 灌洗方式

小鼠支气管肺泡灌洗常用的操作方式包括在体灌洗和离体灌洗。离体灌洗是将动物支气管及

表 1 小鼠常用麻醉剂汇总

Table 1 Common anesthetics for mice

麻醉途径 Types of anesthesia	名称 Name	常用剂量 Usual dose	特点 Characteristic	参考文献 Reference
注射麻醉 Injectable anesthesia	氯胺酮、甲苯噻嗪 Ketamine, xylazine	氯胺酮 80 ~ 100 mg/kg、 甲苯噻嗪 5 ~ 10 mg/kg Ketamine 80 ~ 100 mg/kg, Xylazine 5 ~ 10 mg/kg	常用的注射麻醉组合,可实现有效镇痛等作用。对小鼠肺泡灌洗液中总细胞或总蛋白水平影响较小。 Ketamine/xylazine is a commonly used injectable anesthetic drug combination that can achieve an effective analgesia effect. It has little effect on total cell or total protein levels in the bronchoalveolar lavage fluid of mice.	[9-10]
注射麻醉 Injectable anesthesia	戊巴比妥钠 Pentobarbital sodium	30 ~ 50 mg/kg	麻醉起效快且维持时间较长。但可能引起动物的血压下降及呼吸抑制。 Although sodium pentobarbital has the advantages such as rapid onset and a long duration of anesthesia maintenance, it may cause a drop in blood pressure and respiratory depression in animals.	[9]
注射麻醉 Injectable anesthesia	三溴乙醇 Tribromoethanol	240 mg/kg	麻醉时间短、起效快。对动物的呼吸和心脏功能均有抑制作用且容易引起注射部位的炎症。 Tribromoethanol has a short anesthesia time and rapid onset of action, but it has inhibitory effects on respiration and cardiac function and is prone to cause inflammation at the injection site.	[9]
吸入麻醉 Inhalant anesthesia	异氟烷 Isoflurane	诱导麻醉使用 2% ~ 3% 浓度,维持使用 1.5% ~ 2% 浓度 Induce anesthesia: 2% ~ 3%, Maintain anesthesia: 1.5% ~ 2%	可以快速诱导和恢复,并且能精确控制和调整麻醉水平。可能诱导小鼠肺泡灌洗液中总细胞计数升高。 Isoflurane can induce anesthesia quickly and the recovery is rapid, and can also precisely control and adjust the level of anesthesia. It may cause elevated total cell counts in alveolar lavage fluid in mice.	[9-10]

肺部完整解剖分离后在体外进行灌洗,其优点是灌洗回收率相对较高,但可能会对灌洗液中的细胞活性产生影响。此外,离体灌洗的解剖过程耗时较长,要求研究者具有丰富的解剖经验,在过程中还需要注意避免手术器械刺伤肺叶等情况。

在体灌洗是多数研究者选用的灌洗方式,根据操作方式不同又可进一步分为气管切开灌洗和气管插管灌洗。气管切开灌洗是目前的主流灌洗方式^[12-13],主要包括麻醉小鼠、暴露小鼠气管并半剪开、导管插入气管后尼龙绳固定、灌洗等步骤。Luckow 等^[14]提出,气管切开灌洗操作步骤复杂、耗时较长,操作者在实验前需要经过大量培训;而经口气管插管只需要使用导管从口咽插入气管即可开始灌洗,相对气管切开更为简便、花费时间较短,并且经口气管插管获得的灌洗液中细胞数量更多。值得注意的是,经口气管插管虽然较气管切开相对简便,但经口气管插管仍需要暴露小鼠肺部及气管,以确保插管正确进入并保持在合适的位置,并且小鼠气管插管存在一定难度,反复插管失败可能会导致小鼠咽喉部出现伤口,血液混入灌洗液中造成污染。在体灌洗的两种方法都有各自的优缺点,研究者可以结合自身操作经验并进行预实验以确定操作方式。最后,不论选择哪种方法,研究者都应仔细操作,避免破坏小鼠气管及肺部的完整性,导致灌洗液漏出或污染。

3 灌洗装置

目前,商业化的小鼠支气管肺泡灌洗装置尚未普及,研究者在进行实验时往往需要自行组装实验所需的操作设备,这些设备虽然更贴合实验者的个人习惯,但存在一定的缺陷。研究者组装所用的部分装置或工具,可能在其他国家或地区难以购买到,这会导致部分经过改良的灌洗装置难以在其他国家或地区推广和应用。因此,实验者在组装和改进灌洗装置时,应考虑到设备在其他国家或地区是否可获得并且易于组装。

灌洗设备主要依据实验者采用气管切开还是气管插管灌洗而组装,下面将分别论述不同灌洗方式所采用的基本装置组成。

气管切开灌洗:气管切开灌洗所用装置主要包括注液部分(注射器)、插管部分(针头和套管)、固定部分(尼龙绳)。注液部分由注射器构成,小鼠肺泡灌洗通常选择 1 mL 注射器。插管部分由针头和

套管组成,套管较柔软,单独使用不能很好地进入小鼠气管;注射器针头尖锐,单独使用可能会损伤气管,并且也不能很好地堵塞气管。因此需要在注射器针头上套入一段硅胶软管,这样既可以避免针头戳伤气管,也能起到防止灌洗液漏出的作用。这种方法的弊端是套入的硅胶软管需要研究者自行裁剪,而且软管口径与针头口径存在差别,可能导致针头与软管之间难以固定。张效云等^[15]将静脉滞留针用于气管灌洗,成功回收 89% 以上的肺泡灌洗液。此外,Sun 等^[13]成功使用 22G 静脉穿刺针用于支气管肺泡灌洗。静脉留置针在临床中广泛使用,商业化产品丰富,可选用 22G 或 24G 型号的留置针进行支气管肺泡灌洗。静脉留置针与穿刺针都是使用具有一定硬度的针芯引导软管进入气管,可酌情选用。

气管插管灌洗:气管插管灌洗所用装置主要包括注液部分(注射器)、插管部分(插管针)。注液部分同样选用 1 mL 注射器,而插管针则可使用小鼠直头灌胃针或直型橄榄尖插管^[14]。气管插管法虽然没有使用尼龙绳固定,但插管的钝端可堵住小鼠声门部,防止灌洗液倒流。

气管切开法适用于对临终小鼠进行支气管肺泡灌洗,而气管插管灌洗虽然也需要暴露气管部分,但完整地保留了小鼠气管,因此更适合于非临终小鼠的支气管肺泡灌洗。

4 灌洗液

一份高质量的灌洗液可以提高后续结果的准确性及可靠性,而灌洗液的种类、保存方法和处理方式等条件则是影响灌洗液质量的重要因素。

灌洗液通常为中性、等渗的液体,常用的灌洗液包括生理盐水、磷酸盐缓冲液(PBS)以及平衡盐溶液,其中生理盐水和磷酸盐缓冲液因为其生理特性更受国内外研究者喜爱^[16-17]。对于灌洗液的温度设置,研究者们通常将灌洗液预冷后使用^[18],但并没有解释其原因。一般而言,以细胞收集、培养为目的的研究,可以将灌洗液保持在 37℃ 左右,这样做可能减少灌洗过程中对组织和细胞的刺激,如小鼠肺泡巨噬细胞的分离和培养,研究者多选择将灌洗液加热后使用^[19-20]。另外值得参考的是,37℃ 预热的生理盐水在临床支气管肺泡灌洗中更为常用^[5];如果研究目的是对灌洗液中的细胞进行计数、分类以及检测上清中炎症因子,那么将灌洗液

预冷并将其低温保存则是更好的选择。因此,灌洗液的选择及温度控制需要依据实验目的进行选取和设定。相比于不含添加剂的生理盐水或者 PBS,复合型灌洗液通常具有提高酶和细胞活力等优势。常用的添加剂包括胎牛血清(FBS)^[21]、乙二胺四乙酸(EDTA)^[19]等,胎牛血清可以提高灌洗液中细胞的活性,而 EDTA 可以螯合钙、镁等金属离子,加速细胞的脱离,便于灌洗时尽可能多地采集到肺内的细胞。研究表明,复合 PBS 灌洗液(37℃,2 mmol/L EDTA 和 0.5% FBS)在灌洗中能收获更多数量的细胞^[19]。此外,如果灌洗液中含有较多红细胞,可以加入红细胞裂解液以降低红细胞对后续结果的影响。总的来说,根据实验目的来选择合适的添加剂将有助于获得更高质量的灌洗液,提高检测结果的准确性。

对于灌洗液的保存装置,大多数研究者选择将灌洗液收集后置于塑料离心管中,并没有特别强调离心管的种类。一般而言,用于生化检测和细胞因子分析的液体可以保存在普通离心管中,而用于病原学分析则应使用无菌容器收集^[22],尤其在细胞分析时最好选用硅化玻璃容器或者无细胞粘附的塑料容器^[10],尽可能地减少细胞损失。

在获得肺泡灌洗液后,研究者需要及时对灌洗液进行处理,可以将灌洗液试管置于冰上或冷藏,

将灌洗液离心后分为细胞成分及上清液分别保存,以供后续检测。细胞成分可以通过总细胞或白细胞计数进行分析。不同方式获得的灌洗液中,其细胞总数可能存在差异,但不同细胞群的比例是相对固定的。传统的细胞计数法主要通过将细胞重悬后制成细胞涂片,利用瑞氏染液进行染色,再由研究者在显微镜下进行计数并进一步判断出中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、巨噬细胞等细胞类型。这种方法目前正受到许多研究者的质疑,因为细胞的计数和分类可能因为人为错误而影响结果的准确性。相比而言,基于流式细胞术的细胞计数和分类法正成为一种更快速、更准确的检测方法。

上清液常用于生化及细胞因子检测,检测方法主要包括 ELISA、活性氧检测等。此外,基于流式的多因子检测法因为其高效、快速、所需样本量少等优点,正受到越来越多的研究者的关注。检测细胞因子时需要注意,多次的洗涤会稀释细胞因子的浓度,因此检测第一次灌洗所得灌洗液会更加合适。

若不能及时对灌洗液进行检测,则应将灌洗液进行保存,通常来说,细胞在灌洗液(4℃)中的保存时间应尽可能短,而上清液则可保存在-80℃条件中直至检测。

表 2 汇总了国内外部分研究中灌洗液的种类、处理方法等参数信息,可以看到,不同的研究之间

表 2 支气管肺泡灌洗参数汇总

Table 2 Summary of bronchoalveolar lavage parameters

小鼠 Mouse	灌洗液 Lavage fluid	灌洗部位 Lavage sites	灌洗次数 Frequency	离心参数 Centrifugation parameters	参考文献 References
C57BL/6	PBS(预冷,0.4 mL) PBS (pre-cooled, 0.4 mL)	左肺 Left lung	3	4℃,350 g,5 min	[17]
Balb/c	生理盐水(常温,0.8 mL) Saline (normal temperature, 0.8 mL)	左肺 Left lung	3	4℃,1200 r/min,10 min	[23]
Balb/c	生理盐水(预冷,1.0 mL) Saline (pre-cooled, 1.0 mL)	右肺 Right lung	3	4℃,1500 g,10 min	[24]
C57BL/6	PBS(0.4 mmol/L EDTA,预冷,0.5 mL) PBS (0.4 mmol/L EDTA, pre-cooled, 0.5 mL)	双肺 Whole lung	5	4℃,200 g,5 min	[25]
Balb/c	PBS(预冷,0.5 mL) PBS (pre-cooled, 0.5 mL)	左肺 Left lung	3	4℃,1000 g,15 min	[26]
Balb/c	生理盐水(预冷,0.8 mL) Saline (pre-cooled, 0.8 mL)	左肺 Left lung	5	3000 r/min,10 min	[27]
C57BL/6N	PBS(预冷,0.5 mL) PBS (pre-cooled, 0.5 mL)	双肺 Whole lung	3	4℃,200 g,10 min	[28]
Balb/c	PBS(预冷,1.5 mL) PBS (pre-cooled, 1.5 mL)	双肺 Whole lung	3	4℃,1200 r/min,5 min	[29]
Balb/c	PBS(常温,0.4 mL) PBS (normal temperature, 0.4 mL)	左肺 Left lung	3	4℃,2500 r/min,5 min	[30]
Balb/c	PBS(预冷,0.5 mL) PBS (pre-cooled, 0.5 mL)	双肺 Whole lung	6	4℃,2500 r/min,5 min	[31]

灌洗液的处理条件存在较大差异,未来还需要更多的研究探讨不同的灌洗液处理条件对后续结果的影响,并且研究者也需要在文献中更加详细地描述灌洗液的参数,便于其他研究者参考和借鉴。

5 灌洗部位

由于小鼠支气管口径较小,难以使用支气管镜进行操作,通常采取全肺灌洗或灌洗单侧肺部以获得灌洗液。研究者若期望获得更多的灌洗标本,则需要采用全肺灌洗的方法进行操作,但这种方法的弊端是在一定程度上降低了动物组织标本的利用率,可能会导致实验动物数量增加,违反了实验动物减量化、再利用和再循环的原则^[32]。同时还应该注意到,灌洗的过程对肺组织有一定的损伤,一些细胞或者分泌物可能被冲刷掉,虽然有部分研究者选择将灌洗后的肺叶用于组织学检查^[28],但夹闭小鼠单侧肺叶再进行灌洗,将未灌洗的肺叶用于组织学检查可能是更好的选择^[26-27],研究者应结合疾病模型特点等,选择病变显著侧肺叶进行灌洗。

6 灌洗量及速度

过量的灌洗液会导致小鼠肺内压力升高,可能会出现灌洗液从肺组织包膜渗入胸腔等情况,严重影响灌洗液回收。常用的单次小鼠支气管肺泡灌洗液量通常为 0.2 ~ 1.0 mL。研究表明,灌洗液产生的拉伸力和剪切力可能会对细胞造成一定的影响^[33],相比于 1 mL 灌洗液,0.5 mL 及 0.75 mL 的灌洗液收集到的细胞活性更高。

而对于灌洗液的推注速度,目前尚缺乏研究探讨这一参数对结果的影响。大部分研究者采用的是手工推注灌洗液而非使用可调节流量速度的微量注射泵,因此难以对该参数进行量化和比较。较为公认的是,研究者在灌洗时应略缓慢地将灌洗液注入肺部,并仔细观察肺部膨胀程度,避免液体渗漏^[10]。

7 回收率

灌洗液的回抽依赖于肺部的弹性。相比于急性肺损伤而言,一些疾病如肺气肿等会严重影响小鼠的肺部弹性,最终影响灌洗液的回收率。虽然灌洗液的回收率似乎可以作为评估实验操作成功与否的重要指标,但由于不同的实验者间灌洗的操作方法并不统一,而且动物疾病模型也不同,所以很

难对回收率进行比较。因此,是否可以将灌洗液的回收率作为小鼠支气管肺泡灌洗术成功标准之一,还需要更进一步的讨论。

8 总结与结论

近年来,随着新型冠状病毒感染的流行,急性肺损伤、肺纤维化等疾病受到了越来越多研究者的关注。支气管肺泡灌洗作为呼吸疾病研究中的重要检测手段之一,目前仍存在许多亟待解决的问题,如灌洗液采集和检测流程的不统一,这些都可能限制该技术的传播和推广,同时也可能导致部分实验结果难以被复现,影响实验的可靠性。因此,推进小鼠支气管肺泡灌洗术标准化流程的建立便显得十分必要。

参考文献(References)

- [1] Garvin MR, Alvarez C, Miller JI, et al. A mechanistic model and therapeutic interventions for COVID-19 involving a RAS-mediated bradykinin storm [J]. *Elife*, 2020, 9: e59177.
- [2] Hirano A, Kanehiro A, Ono K, et al. Pirfenidone modulates airway responsiveness, inflammation, and remodeling after repeated challenge [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006, 35(3): 366-377.
- [3] Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding [J]. *Lancet*, 2020, 395(10224): 565-574.
- [4] Meyer KC, Raghu G, Baughman RP, et al. An official American Thoracic Society clinical practice guideline; the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, 185(9): 1004-1014.
- [5] 王娟, 孙军, 高长龙, 等. 纤维支气管镜肺泡灌洗术治疗儿童难治性支原体肺炎疗效分析 [J]. *临床儿科杂志*, 2017, 35(1): 16-18.
Wang J, Sun J, Gao CL, et al. The effect of fiberoptic bronchoscopy and bronchoalveolar lavage in the treatment of refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children [J]. *J Clin Pediatr*, 2017, 35(1): 16-18.
- [6] Lee JS, Lee YN, Lee YT, et al. Ginseng protects against respiratory syncytial virus by modulating multiple immune cells and inhibiting viral replication [J]. *Nutrients*, 2015, 7(2): 1021-1036.
- [7] Deng J, He Y, Sun G, et al. Tanreqing injection protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis via inhibiting STING-mediated endoplasmic reticulum stress signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 305: 116071.
- [8] Ting NC, Huang WC, Chen LC, et al. *Descurainia sophia* ameliorates eosinophil infiltration and airway hyperresponsiveness by reducing Th2 cytokine production in asthmatic mice [J]. *Am J Chin Med*, 2019, 47(7): 1507-1522.
- [9] 卢晓, 于灵芝, 周聪颖, 等. 常用实验动物全身性麻醉药物

- 的使用 [J]. 实验动物与比较医学, 2022, 42(1): 18-25.
- Lu X, Yu LZ, Zhou CY, et al. General anesthetics commonly used for laboratory animals [J]. Lab Anim Comp Med, 2022, 42(1): 18-25.
- [10] Tighe RM, Birukova A, Yaeger MJ, et al. Euthanasia- and lavage-mediated effects on bronchoalveolar measures of lung injury and inflammation [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2018, 59(2): 257-266.
- [11] Poitout-Belissent F, Grant SN, Tepper JS. Aspiration and inspiration: using bronchoalveolar lavage for toxicity assessment [J]. Toxicol Pathol, 2021, 49(2): 386-396.
- [12] Daubeuf F, Frossard N. Performing bronchoalveolar lavage in the mouse [J]. Curr Protoc Mouse Biol, 2012, 2(2): 167-175.
- [13] Sun F, Xiao G, Qu Z. Murine bronchoalveolar lavage [J]. Bio Protoc, 2017, 7(10): e2287.
- [14] Luckow B, Lehmann MH. A simplified method for bronchoalveolar lavage in mice by orotracheal intubation avoiding tracheotomy [J]. Biotechniques, 2021, 71(4): 534-537.
- [15] 张效云, 攀晓峰, 王文栋. 制备小鼠支气管肺泡灌洗液方法的改进 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2017, 33(1): 109-110.
- Zhang XY, Nian XF, Wang WD. Improvement of the method for preparing mouse bronchoalveolar lavage fluid [J]. Chin J Clin Exp Pathol, 2017, 33(1): 109-110.
- [16] 高琴琴, 丁子桐, 李友林, 等. 不同剂量卵蛋白诱发 BALB/c 小鼠支气管哮喘模型比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(4): 52-57.
- Gao QQ, Ding ZT, Li YL, et al. Comparison of asthma models induced by different doses of ovalbumin in BALB/c mice [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(4): 52-57.
- [17] Wang Y, Wang X, Li Y, et al. Xuanfei Baidu Decoction reduces acute lung injury by regulating infiltration of neutrophils and macrophages via PD-1/IL17A pathway [J]. Pharmacol Res, 2022, 176: 106083.
- [18] Shin JH, Han SG, Kim JK, et al. 5-Day repeated inhalation and 28-day post-exposure study of graphene [J]. Nanotoxicology, 2015, 9(8): 1023-1031.
- [19] Busch CJ, Favret J, Geirsdóttir L, et al. Isolation and long-term cultivation of mouse alveolar macrophages [J]. Bio Protoc, 2019, 9(14): e3302.
- [20] 雷文知, 桑军军, 潘炜华, 等. 新生隐球菌感染小鼠肺泡巨噬细胞相关细胞因子与疾病病程相关性研究 [J]. 中国真菌学杂志, 2014, 9(2): 65-69.
- Lei WZ, Sang JJ, Pan WH, et al. Correlation study on macrophage-derived cytokines and disease course in *Cryptococcus neoformans* infection mouse model [J]. Chin J Mycol, 2014, 9(2): 65-69.
- [21] Conde E, Bertrand R, Balbino B, et al. Dual vaccination against IL-4 and IL-13 protects against chronic allergic asthma in mice [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 2574.
- [22] 周道银, 吴茅, 许绍强, 等. 支气管肺泡灌洗液细胞形态学检验中国专家共识(2020) [J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(6): 4-8.
- Zhou DY, Wu M, Xu SQ, et al. Consensus of Chinese experts on morphological examination of bronchoalveolar lavage fluid cells (2020) [J]. J Mod Lab Med, 2020, 35(6): 4-8.
- [23] Peng XP, Li XH, Li Y, et al. The protective effect of oleanolic acid on NMDA-induced MLE-12 cells apoptosis and lung injury in mice by activating SIRT1 and reducing NF- κ B acetylation [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 70: 520-529.
- [24] Fang Y, Gao F, Liu Z. Angiotensin-converting enzyme 2 attenuates inflammatory response and oxidative stress in hyperoxic lung injury by regulating NF- κ B and Nrf2 pathways [J]. QJM, 2019, 112(12): 914-924.
- [25] Mo Y, Jiang M, Zhang Y, et al. Comparative mouse lung injury by nickel nanoparticles with differential surface modification [J]. J Nanobiotechnology, 2019, 17(1): 2.
- [26] Wu X, Kong Q, Zhan L, et al. TIPE2 ameliorates lipopolysaccharide-induced apoptosis and inflammation in acute lung injury [J]. Inflamm Res, 2019, 68(11): 981-992.
- [27] Wang Z, Yao N, Fu X, et al. Butylphthalide ameliorates airway inflammation and mucus hypersecretion via NF- κ B in a murine asthma model [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 76: 105873.
- [28] Shin IS, Shin NR, Park JW, et al. Melatonin attenuates neutrophil inflammation and mucus secretion in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary diseases via the suppression of Erk-Sp1 signaling [J]. J Pineal Res, 2015, 58(1): 50-60.
- [29] 周滕静, 陈兰英, 胡宏辉, 等. 白头翁皂苷 B4 对脂多糖诱导的急性肺损伤的保护作用研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(6): 664-670.
- Zhou MJ, Chen LY, Hu HH, et al. Protective effect of *Pulsatilla* saponin B4 on lipopolysaccharide-induced acute lung injury [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2019, 30(6): 664-670.
- [30] 开沙尔江·麦麦提吐逊, 陈春雨, 娜迪热木·肖克拉提, 等. 阿里红调控 MAPK/NF- κ B 信号通路对过敏性哮喘小鼠的影响及作用机制 [J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(14): 1554-1559.
- Kaishaerjiang MMTS, Chen CL, Nadiremu XKLT, et al. Effect of *Fomes officinalis* on regulating MAPK/NF- κ B signaling pathway on allergic asthma in mice and its mechanism [J]. Chin J Hosp Pharm, 2023, 43(14): 1554-1559.
- [31] 陈思思, 于光远. 齐留通干预 ALOX5 对 RSV 感染后小鼠气道炎症与 AHR 的影响 [J]. 免疫学杂志, 2023, 39(4): 305-311.
- Chen SS, Yu GY. Zileuton alleviates the airway inflammation and AHR in RSV-infected mouse by interfering ALOX5 [J]. Immunol J, 2023, 39(4): 305-311.
- [32] Diaz L, Zambrano E, Flores ME, et al. Ethical considerations in animal research: the principle of 3R's [J]. Rev Invest Clin, 2020, 73(4): 199-209.
- [33] Sasaki E, Momose H, Furuhashi K, et al. Impact of injection buffer volume to perform bronchoalveolar lavage fluid collection for isolating alveolar macrophages to investigate fine particle-induced IL-1 α secretion [J]. J Immunotoxicol, 2021, 18(1): 163-172.