

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2025.19.004
文章编号: 1005-8982 (2025) 19-0021-10

实验研究·论著

不同模型复制方式致肺结节小鼠模型的比较研究*

李晗¹, 王逸飞¹, 宋玲¹, 高云航¹, 陈腾飞¹, 霍旺², 陈韡亚¹, 贾玲¹, 张广平¹

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 解放军总医院第六医学中心中医医学部, 北京 100853)

摘要: **目的** 比较多壁碳纳米管(MWCNT)、MWCNT+脂多糖(LPS)气管滴注、MWCNT+LPS雾化3种方法复制的肺结节小鼠模型,为后续研究提供依据。**方法** 将40只雄性C57BL/6小鼠随机分为空白组、MWCNT组、MWCNT+LPS气管滴注组与MWCNT+LPS雾化组,每组10只。空白组小鼠气管滴注同体积生理盐水,其余各组均气管滴注60 μL 8 mg/kg MWCNT悬液,在此基础上,MWCNT+LPS气管滴注组联合进行气管滴注LPS溶液(5 mg/kg, 7 d/次),MWCNT+LPS雾化组联合进行雾化吸入LPS溶液(5 mg/mL, 30 min/次, 7 d/次),共28 d,第29天取材。检测小鼠肺功能[潮气量(TV)、每分钟通气量(MV)、特殊气道阻力(sRaw)、功能残气量(FRC)],观察小鼠肺部影像学及组织病理学,免疫组织化学法检测巨噬细胞标志物F4/80和淋巴细胞标志物CD3⁺T蛋白表达,检测支气管肺泡灌洗液(BALF)中炎症细胞分类计数,LDH和BCA法检测肺损伤,血细胞分类法检测白细胞比例,酶联免疫吸附试验检测肺泡灌洗液(BALF)中干扰素-γ(IFN-γ)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)与白细胞介素-2(IL-2)水平。**结果** 各组小鼠的TV、MV及FRC水平比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);各组小鼠sRaw水平比较,差异有统计学意义($P<0.05$),MWCNT+LPS气管滴注组小鼠sRaw水平增加。肺部影像学显示,MWCNT组小鼠右肺可见一类圆形实性结节,MWCNT+LPS气管滴注组小鼠左肺可见片状磨玻璃样改变,MWCNT+LPS雾化组右肺可见一单发小斑片状改变。肺部组织病理学显示,空白组小鼠肺部光滑质嫩;MWCNT组小鼠肺部有黑色沉积影,表面有白色小结节;MWCNT+LPS气管滴注组肉眼可见大量黑色碳纳米颗粒沉积物,伴有大量白色结节形成;MWCNT+LPS雾化组小鼠肺部质嫩,中央部有大量黑色沉积物,可见团状小结节。HE染色显示,空白组小鼠肺泡管和肺泡规整,MWCNT组小鼠肺脏可见多灶性轻微肉芽肿,MWCNT+LPS气管滴注组小鼠肺脏可见中度多灶性肉芽肿,MWCNT+LPS雾化组小鼠肺脏可见多灶性轻微肉芽肿。免疫组织化学染色结果显示,与空白组相比,MWCNT组小鼠F4/80和CD3⁺T均在肺组织中少量浸润;MWCNT+LPS气管滴注组的F4/80呈灶状浸润,胞质染色强阳性,CD3⁺T细胞呈局灶性分布;MWCNT+LPS雾化组的F4/80与CD3⁺呈弥散性浸润,在组织间质中广泛分布。与空白组相比,MWCNT组、MWCNT+LPS气管滴注组、MWCNT+LPS雾化组小鼠BALF中性粒细胞数均增加($P<0.05$),MWCNT+LPS气管滴注组出现大量巨噬细胞。各组小鼠BALF的LDH值比较,差异有统计学意义($P<0.05$);与空白组相比,MWCNT组LDH值差异无统计学意义($P>0.05$),MWCNT+LPS气管滴注组LDH值升高($P<0.05$)。各组小鼠BALF的BCA比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。与空白组相比,MWCNT+LPS气管滴注组的单核细胞和嗜酸性粒细胞计数升高($P<0.05$);MWCNT+LPS雾化组小鼠嗜酸性粒细胞计数升高($P<0.05$),中性粒细胞、淋巴细胞及单核细胞比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。与空白组相比,MWCNT组TNF-α水平升高($P<0.05$),INF-γ、IL-2水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$);MWCNT+LPS气管滴注组的INF-γ、TNF-α、IL-2水平均升高($P<0.05$);MWCNT+LPS雾化组的INF-γ、TNF-α、IL-2水平也均升高($P<0.05$)。**结论** MWCNT、MWCNT+LPS滴注和MWCNT+LPS雾化3种方法均可成功复制肺结节模型,其中MWCNT+LPS雾化方法复制的肺结节模型能够有效模拟人类肺结节病理生理学的多个关键特征,是肺结节机制研究和药物开发的有价值实验模型。

收稿日期: 2025-05-14

* 基金项目: 国家自然科学基金青年基金(No: 82204740); 中央级公益性科研院所基本业务费专项资金资助(No: ZXKT22045); 中国中医科学院中央级公益性课题(No: ZXKT25006); 中国中医科学院优秀青年科技人才培养专项(No: ZZ16-YQ-027); 解放军总医院第六医学中心创新培育基金资助项目(No: CXPY202406)

[通信作者] 张广平, E-mail: gpzhang@icmm.ac.cn; Tel: 13810751447

关键词：肺结节；多壁碳纳米管；脂多糖；肉芽肿；雾化

中图分类号：R563

文献标识码：A

A comparative study on different modeling methods for inducing pulmonary sarcoidosis in mice*

Li Han¹, Wang Yi-fei¹, Song Ling¹, Gao Yun-hang¹, Chen Teng-fei¹, Huo Wang², Chen Wei-ya¹,
Jia Ling¹, Zhang Guang-ping¹

(1. Institute of Chinese Materia Medical, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Department of Traditional Chinese Medicine, The Sixth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

Abstract: Objective By comparing three construction methods of mouse lung sarcoidosis models, which concludes MWCNTs, MWCNTs + lipopolysaccharide (LPS) intratracheal instillation, and MWCNTs + LPS aerosolization to provide a basis for subsequent research. **Methods** Forty male C57BL/6 mice were randomly divided into a control group, an MWCNT group, an MWCNT + LPS tracheal instillation group, and an MWCNT + LPS nebulization group, with 10 mice in each group. Mice in the control group received tracheal instillation of the same volume of physiological saline, while mice in the other groups received tracheal instillation of 60 μ L of an 8 mg/kg MWCNT suspension. In addition, the MWCNT + LPS tracheal instillation group received concurrent tracheal instillation of LPS solution (5 mg/kg, 7 days per dose). and the MWCNT + LPS nebulization group received nebulization of LPS solution (5 mg/mL, 30 minutes per session, 7 days per week). The treatment lasted for 28 days, and tissue samples were collected on day 29. Mouse lung function was assessed [tidal volume (TV), minute ventilation (MV), specific airway resistance (sRaw), functional residual capacity (FRC)], and lung imaging and histopathology were observed. Immunohistochemistry was used to detect the expression of macrophage marker F4/80 and lymphocyte marker CD3⁺T protein. Inflammatory cell counts in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were determined, and lung injury was assessed using LDH and BCA assays. White blood cell proportions were analyzed by blood cell classification, and levels of interferon- γ (IFN- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interleukin-2 (IL-2) in BALF were measured by ELISA. **Results** Comparisons of TV, MV, and FRC levels among the groups showed no statistically significant differences ($P > 0.05$); however, comparisons of sRaw levels among the groups revealed statistically significant differences ($P < 0.05$), with increased sRaw levels observed in the MWCNT + LPS tracheal instillation group. Pulmonary imaging revealed that the right lung of the MWCNT group showed a single round solid nodule, the left lung of the MWCNT + LPS tracheal instillation group showed patchy ground-glass opacities, and the right lung of the MWCNT + LPS nebulization group showed a single small patchy lesion. Pulmonary histopathology showed that the lungs of the control group were smooth and tender; MWCNT group mice had black deposits in the lungs with white sarcoidosis on the surface; MWCNT + LPS tracheal instillation group mice had a large amount of black carbon nanotube deposits visible to the naked eye, accompanied by the formation of numerous white sarcoidosis; MWCNT + LPS nebulization group mice had tender lungs with a large amount of black deposits in the central region and visible nodular lesions. HE staining showed that the alveolar tubes and alveoli of the control group mice were well-organized; the lungs of the MWCNT group mice exhibited multifocal mild granulomas; the lungs of the MWCNT + LPS tracheal instillation group mice exhibited moderate multifocal granulomas; and the lungs of the MWCNT + LPS nebulization group mice exhibited multifocal mild granulomas. Immunohistochemical staining results showed that compared with the control group, F4/80 and CD3⁺T cells were slightly infiltrated in the lung tissue of the MWCNT group; in the MWCNT + LPS tracheal instillation group, F4/80 showed focal infiltration with strong cytoplasmic staining, and CD3⁺T cells were distributed in focal areas; In the MWCNT + LPS aerosol group, F4/80 and CD3⁺ cells showed diffuse infiltration and were widely distributed in the interstitial tissue. BALF cell classification showed that, compared with the blank group, the number of neutrophils in the BALF of mice in the MWCNT group, MWCNT + LPS tracheal instillation group, and MWCNT + LPS nebulization group significantly increased ($P < 0.05$), and a large number of macrophages appeared

in the MWCNT + LPS tracheal instillation group. Lung injury results showed that there were statistically significant differences in LDH levels in BALF among the groups ($P < 0.05$). Compared with the control group, there was no statistically significant difference in LDH levels in the MWCNT group ($P > 0.05$), while LDH levels were elevated in the MWCNT + LPS tracheal instillation group ($P < 0.05$). There were no statistically significant differences in BCA levels in BALF among the groups ($P > 0.05$). Peripheral blood leukocyte differential counts showed that, compared with the control group, the MWCNT + LPS tracheal instillation group had elevated monocyte and eosinophil counts ($P < 0.05$); Eosinophil counts were elevated in the MWCNT + LPS nebulization group ($P < 0.05$), while there were no statistically significant differences in neutrophil, lymphocyte, and monocyte counts ($P > 0.05$). ELISA results showed that, compared with the control group, TNF- α levels were elevated in the MWCNT group ($P < 0.05$), while there were no statistically significant differences in INF- γ and IL-2 levels ($P > 0.05$); In the MWCNT + LPS tracheal instillation group, levels of INF- γ , TNF- α , and IL-2 were all elevated ($P < 0.05$); in the MWCNT + LPS aerosol group, levels of INF- γ , TNF- α , and IL-2 were also all elevated ($P < 0.05$). **Conclusions** All three methods, MWCNT, MWCNT + LPS tracheal instillation and MWCNT + LPS aerosolization, could successfully construct lung sarcoidosis models. Among which the mouse lung sarcoidosis model constructed by the MWCNT + LPS nebulization method was able to effectively mimic a number of key features of the pathophysiology of human sarcoidosis, which provided a valuable experimental model for the study of the mechanism of lung sarcoidosis and drug development.

Keywords: pulmonary sarcoidosis; multi-walled carbon nanotubes; lipopolysaccharide; granuloma; atomization

结节病是一种多系统、多器官受累的非干酪样坏死性上皮细胞肉芽肿性疾病,受累器官以肺为主^[1]。根据国际早期肺癌行动计划的研究数据显示,≥40岁且无临床症状的受试者中,肺结节的检出率为30.2%^[2-3]。影像学显示,肺结节多表现为直径≤3 cm的局灶性肺部病变,呈密度增高的阴影。该疾病的典型病理特征主要包括慢性肺部炎症、T淋巴细胞、巨噬细胞和非干酪化肉芽肿的积聚^[4]。而现阶段未能在动物中有效地模拟肺结节是对该疾病研究的关键障碍。这影响了肺结节特异性生物标志物的探究,也阻碍了相关药效学与机制研究。相关研究发现肺结节是肺部对多种难溶性环境颗粒的“异常反应”。碳纳米管是碳的同素异形体,多为石墨烯片卷成的同心圆柱体。其通常分为3种类型:单壁碳纳米管、多壁碳纳米管(multi-walled carbon nanotube, MWCNT)(外径<15 nm)和碳纳米纤维(外径>15 nm),MWCNT是柴油、甲烷、丙烷和天然气火焰燃烧的副产物^[5]。同时有研究表明消防员和接触燃木壁炉的工作人员在接触燃烧副产物后会出现结节病,在对其肺组织的解剖过程中发现了碳纳米颗粒的存在^[6]。本课题组长期从事动物呼吸系统疾病模型研究,前期研究发现仅单独使用MWCNT复制肺结节模型,模型复制时间过长,同时肉芽肿附近缺乏T淋巴细胞积聚

等人类肺结节的病理特征,且早期反应炎症的数据有限,而气管滴注与雾化脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)均可造成小鼠肺部炎症^[7]。因此,本研究同时比较了MWCNT、MWCNT+LPS气管滴注和MWCNT+LPS雾化这3种方法复制肺结节动物模型的能力,期望筛选出与人类肺结节病理特征最接近的模型复制方法,为后续深入研究肺结节的发病机制及干预策略提供模型依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

MWCNT(上海源叶生物科技有限公司, S33198), LPS[西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司, L2880], 三溴乙醇(Tribromoethanol, 别名:阿佛丁)[西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司, T48402], 甲醛[福晨(天津)化学试剂有限公司, 20190920], 放射免疫沉淀法(radioimmunoprecipitation assay, RIPA)裂解液(北京康为世纪生物科技有限公司, CW2334S), 吉姆萨染色液(工作液)(北京索莱宝科技有限公司, G1010), 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)细胞毒性检测试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司, C0016), 二喹啉甲酸法(bicinchoninic acid assay, BCA)蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司, P0012), 白细

胞介素-2 (Interleukin-2, IL-2)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、小鼠干扰素 γ (Interferon- γ , IFN- γ)酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, SEKM-0004、SEKM-0034、SEKM-0031)。

小动物口鼻吸入暴露系统 (上海梅理实验科技有限公司), Fine Pointe 型无创气道动力学研究系统 (美国 DSI 公司), Centrifuge 5810R 台式离心机 (德国 Eppendorf 公司), BSA3202S-CW 型电子天平 (德国 Sartorius 公司), 显微镜及图像分析系统 (BX51, 日本 Olympus 公司), ADVIA[®] 2120i 血液分析仪 (德国西门子医疗系统有限公司), VIP6 全封闭脱水机 (日本樱花医疗集团), KD-BM 生物组织包埋机、KD-P 摊片机 (浙江省金华市科迪仪器设备有限公司), RM2016 病理切片机 (德国徕卡公司), T 18 mini digital ULTRA-TURRAX[®] 分散机 (德国 IKA 公司), Vortex-genie 2 可调速涡旋混合器 (美国 Scientific Industries 公司)。

1.2 实验动物

40 只 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠, 6~8 周龄, 体重 18~20 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK (京) 2021-0006, 饲养于中国中医科学院中药研究所 SPF 级动物房, 实验动物使用许可证号: SYXK (京) 2023-0077。饲养条件为 12 h 明暗交替, 温度 (23 \pm 1) $^{\circ}$ C, 湿度 (50 \pm 15)%, 自由饮水及进食。本研究通过中国中医科学院中药研究所实验动物伦理委员会的审查 (No: 2024B027)。

1.3 实验方法

C57BL/6 小鼠适应性喂养 5 d 后, 随机分为空白组、MWCNT 组、MWCNT+LPS 气管滴注组、MWCNT+LPS 雾化组, 每组 10 只。空白组小鼠气管滴注同体积生理盐水, 其余各组均气管滴注 60 μ L 8 mg/kg MWCNT 悬液^[8], 在此基础上, MWCNT+LPS 气管滴注组气管滴注 LPS 溶液 (5 mg/kg, 7 d/次)^[9], MWCNT+LPS 雾化组雾化吸入 LPS 溶液 (5 mg/mL, 30 min/次, 7 d/次)^[7], 共 28 d, 第 29 天取材^[10]。

1.3.1 MWCNT 配制 取 10 mL 生理盐水加入 10 mL 离心管中, 移液枪常温下取 0.05 μ L 吐温-80 (Tween-80) 原溶液加入管中, 混匀后静置。用电子

天平称量 MWCNT 26.7 mg, 加入配好的 Tween 溶液中, 混合后, 使用超声波清洗器进行超声处理, 频率为 40~100 kHz, 处理 30 min 后, 观察是否有团聚的纳米颗粒, 有则继续打散, 无则放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。气管滴注时, 小鼠经 1.5% 阿佛丁 (0.15 mL/10 g) 麻醉后, 通过 22G 号留置针注入 60 μ L MWCNT 溶液进气管, 随后垂直悬挂 5 min 使溶液分布均匀。LPS 雾化采用小动物口鼻吸入暴露系统, 压缩空气流速 0.04 L/min, 雾化持续时间 30 min/次, 通过气溶胶监测仪确保颗粒质量中值直径约为 4 μ m, 根据公式: 吸入剂量 (mg/kg) = [气溶胶浓度 mg/(L \cdot air)] \times 每分钟通气量 (L/min) \times 雾化时间 (min) \times 可吸入的气溶胶颗粒比例/体重 (kg), 计算得出小鼠 LPS 雾化吸入剂量为 0.6 mg/kg。

1.3.2 小鼠肺功能检查 模型复制第 28 天时, 将空白组、MWCNT 组、MWCNT+LPS 气管滴注组及 MWCNT+LPS 雾化组小鼠依次提前安置于无创气道动力学研究系统中。待小鼠呼吸平稳后, 分别检测其潮气量 (tidal volume, TV)、每分钟通气量 (minute volume, MV)、特殊气道阻力 (specific airway resistance, sRaw) 及功能残气量 (functional residual capacity, FRC)。

1.3.3 小鼠肺部影像学检查 完成肺功能检查后, 每组取 8 只小鼠进行肺部影像学检查。Micro CT 扫描参数设置为管电流 88 μ A、管电压 90 kV, 成像视野 36 nm \times 36 nm, 进行胸部 CT 断层平扫, 扫描时间约 2 min, 采用 Simple Viewer 软件完成图像重建。

1.3.4 样本采集 模型复制第 29 天时, 每组取 8 只小鼠, 腹腔麻醉后, 腹主动脉采血暴露胸腔。结扎右肺叶, 剥离气管并作切口, 插入气管插管后抽取灌洗液 (回收率 $>$ 70%), 1 000 r/min 离心 10 min 取沉淀, 磷酸盐缓冲液重悬涂片, 取上清液做后续检测。腹主动脉抽取的血液采用乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetra-acetic acid, EDTA) 抗凝后备用。右肺用 4% 多聚甲醛溶液固定, 室温保存, 用于病理检测及石蜡切片制备。

1.3.5 肺组织病理形态学检查 取小鼠右肺组织转移至 4% 多聚甲醛溶液中, 固定 24 h 后, 进行常规脱水、石蜡包埋、切片厚度 4 μ m, 随后进行苏木精-伊红 (hematoxylin and eosin, HE) 染色, 光学显微镜下观察其病理形态。

1.3.6 免疫组织化学法检测巨噬细胞标志物 F4/80 和淋巴细胞标志物 CD3⁺T 蛋白表达 石蜡切片经免疫组织化学检测试剂盒标准流程处理, 滴加 F4/80 抗体(1:400)和 CD3 抗体(1:200)分别于 4 °C 孵育过夜, 以免免疫前血清作为阴性对照; PBS 洗涤后滴加生物素化二抗孵育, 1:200 辣根过氧化物酶标记链霉亲和素(HRP-Streptavidin)反应, 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色, 苏木精复染细胞核定位。封片后于显微镜下观察肺组织中 F4/80 和 CD3⁺的蛋白表达。

1.3.7 支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中炎症细胞分类计数 采用瑞氏-吉姆萨染色法检测 BALF 中的细胞数量, 随后进行中粒细胞计数, 步骤如下: ①涂片: 取 20 μL 灌洗液, 均匀推片, 晾干后甲醇固定 10 min。②染色: 瑞氏-吉姆萨染液染色 5 min 后冲净染液。③镜检, 低倍镜(×10)初检评估涂片质量, 选择细胞分布均匀区域; 油镜(×100)随机计数 200 个有核细胞。中性粒细胞绝对计数=中性粒细胞百分比×白细胞总数。

1.3.8 LDH 和 BCA 法检测肺损伤 取 60 μL LDH 检测试剂与 120 μL BALF 上清液于 EP 管中充分混匀, 避光条件下 37 °C 孵育 30 min, 反应终止后转移至 96 孔板, 采用酶标仪检测 490 nm 波长处各孔吸光度值, 根据公式^[11]: LDH 释放率(%)=[(实验组-空白组)/(100%裂解组-空白组)]×100%, 计算 LDH 释放率(%). 将牛血清白蛋白(BSA)标准品(0~2 000 μg/mL)和 BALF 样品各 20 μL 加入 96 孔

板, 每孔加入 200 μL 新鲜配制的 BCA 工作液, 振荡混匀 30 s, 37 °C 避光孵育 30 min 后, 采用酶标仪检测 562 nm 波长处吸光度值, 通过标准曲线计算总蛋白浓度。

1.3.9 血细胞分类法检测白细胞分类计数 取小鼠外周血, 采用 ADVIA[®] 2120i 血液分析仪分析中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞和嗜酸性粒细胞的百分比与白细胞绝对值(×10⁹/L)。

1.3.10 ELISA 检测 BALF 中 IFN-γ、TNF-α、IL-2 水平 采用 ELISA 试剂盒检测 BALF 中 IFN-γ、TNF-α 与 IL-2 水平, 检测步骤严格按照试剂盒说明书操作。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 25.0 统计软件。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 比较采用方差分析, 两两比较用 LSD-*t* 检或 Dunnett's T3 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠肺功能检测结果

各组小鼠的 TV、MV 及 FRC 水平比较, 经方差分析, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。各组小鼠的 sRaw 水平比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); MWCNT+LPS 气管滴注组小鼠 sRaw 水平高于空白组($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 不同模型复制方式小鼠的肺功能的影响 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	TV/(mL/kg)	MV/(mL/min)	sRaw/(mL/min)	FRC/(mL/min)
空白组	0.36 ± 0.1	86.72 ± 13.8	2.19 ± 0.5	0.39 ± 0.1
MWCNT 组	0.37 ± 0.0	73.77 ± 7.4	2.56 ± 0.3	0.34 ± 0.1
MWCNT+LPS 气管滴注组	0.33 ± 0.0	81.15 ± 14.3	4.03 ± 0.5 [†]	0.29 ± 0.1
MWCNT+LPS 雾化组	0.34 ± 0.0	77.95 ± 14.5	3.29 ± 1.0	0.31 ± 0.0
F 值	0.443	0.542	4.725	0.920
P 值	0.735	0.667	0.035	0.474

注: †与空白组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 各组小鼠肺部影像学变化

肺部 CT 显示, 空白组小鼠肺部纹理清晰, 透过度均匀, 没有过高或过低的致密阴影, 没有异常纹路和片状阴影; MWCNT 组小鼠右肺可见一类圆形实性结节(红色箭头), 边界较清晰; MWCNT+LPS 气管滴注组小鼠左肺可见片状磨玻璃样改变(蓝色箭

头); MWCNT+LPS 雾化组右肺可见一单发小斑片状改变(红色箭头), 边界模糊。见图 1。

2.3 小鼠肺部组织病理学变化

小鼠肺部观察结果显示, 空白组小鼠肺部光滑质嫩, 无杂质; MWCNT 组小鼠肺部有黑色沉积影, 表面有白色小结节; MWCNT+LPS 气管滴注组小鼠

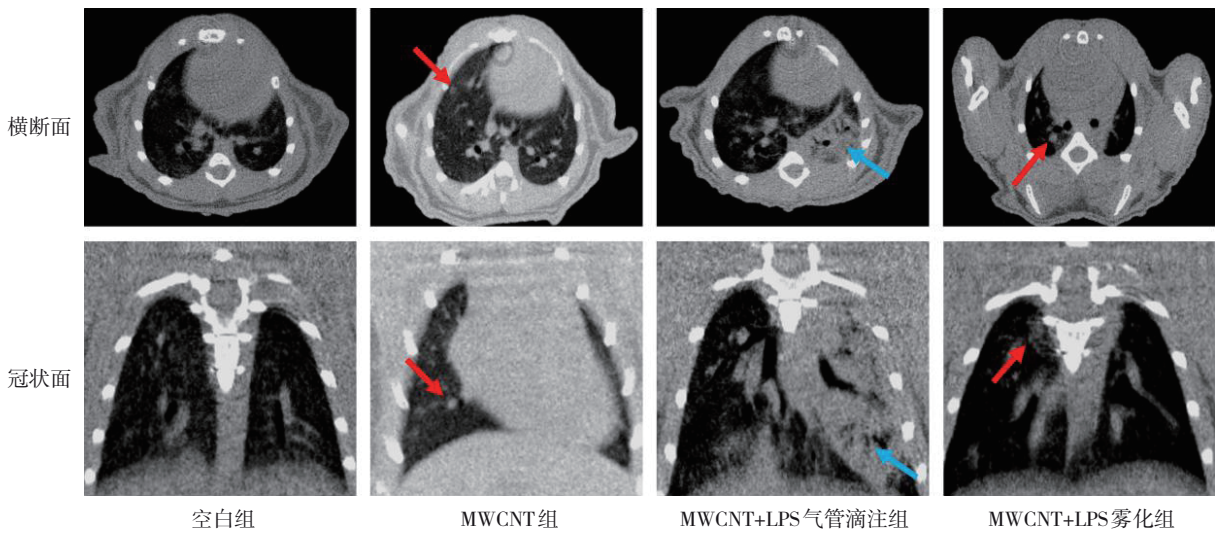
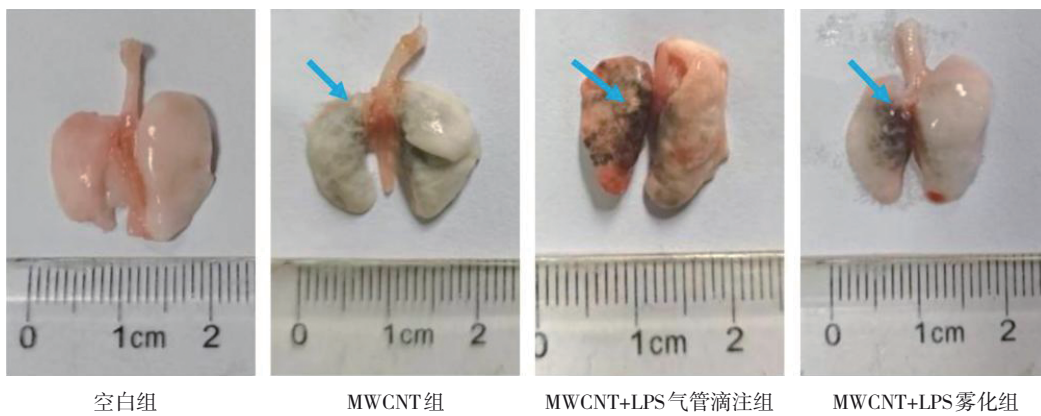


图 1 各组小鼠肺部CT影像图

肺部表面坑洼不平,肉眼可见大量黑色碳纳米粒沉积物,伴有大量白色结节形成;MWCNT+LPS雾化组

小鼠肺部质嫩,中央部有大量黑色沉积物,可见团状小结节。见图2。

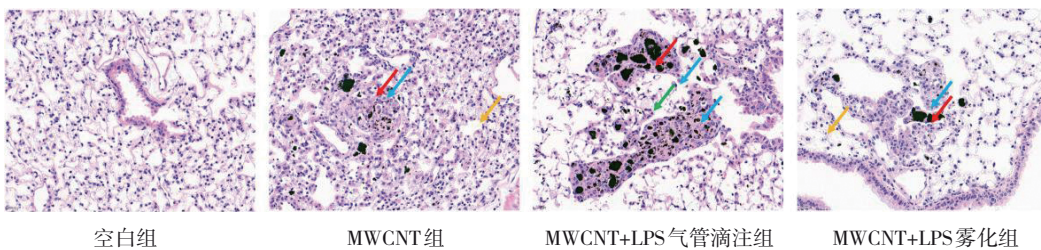


蓝色箭头示小结节。

图 2 各组小鼠肺组织观察

HE染色显示,空白组小鼠肺脏终末细支气管被覆单层柱状纤毛上皮清晰可见,呼吸性细支气管、肺泡管和肺泡规整、肺泡腔内未见明显炎症渗出;MWCNT组小鼠肺脏可见多灶性轻微肉芽肿、轻度色素沉着及弥漫性肺泡细胞成分增多;MWCNT+

LPS气管滴注组小鼠肺脏可见中度多灶性肉芽肿、多灶性色素沉着及炎症细胞浸润;MWCNT+LPS雾化组小鼠肺脏可见多灶性轻微肉芽肿、色素沉着及弥漫性肺泡细胞成分增多。见图3。



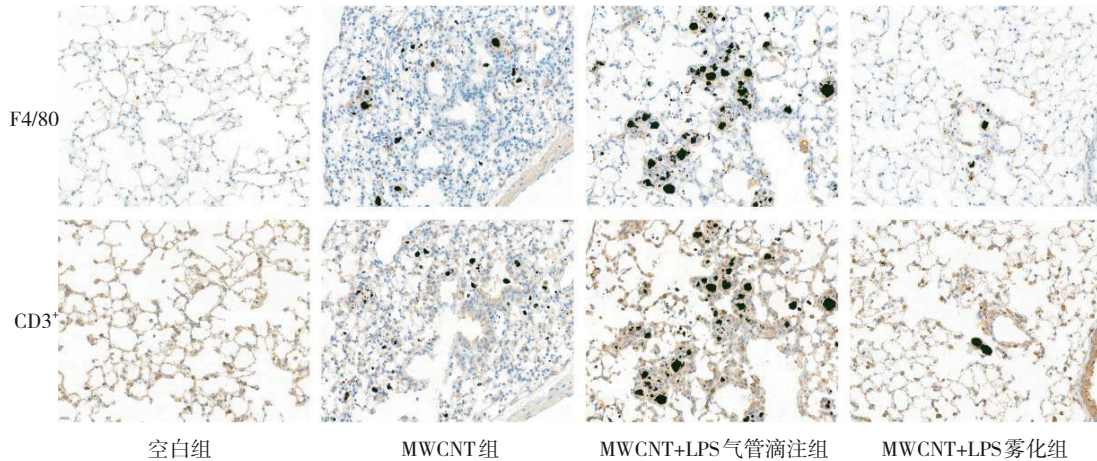
蓝色箭头示多灶性轻微肉芽肿,红色箭头示轻度色素沉着,黄色箭头示弥漫性肺泡细胞成分增多,绿色箭头示炎症细胞浸润。

图 3 各组小鼠的肺组织病理学图像 (HE染色×200)

2.4 各组小鼠肺组织 F4/80 和 CD3⁺T 蛋白表达

与空白组相比, MWCNT 组小鼠 F4/80 和 CD3⁺T 均在肺组织中少量浸润; MWCNT+LPS 气管滴注组的 F4/80 呈灶状浸润, 胞质染色强阳性, CD3⁺T 细胞

呈局灶性分布, 并在 MWCNT 附近呈显著聚集; MWCNT+LPS 雾化组的 F4/80 与 CD3⁺呈弥散性浸润, 在组织间质中广泛分布。见图 4。



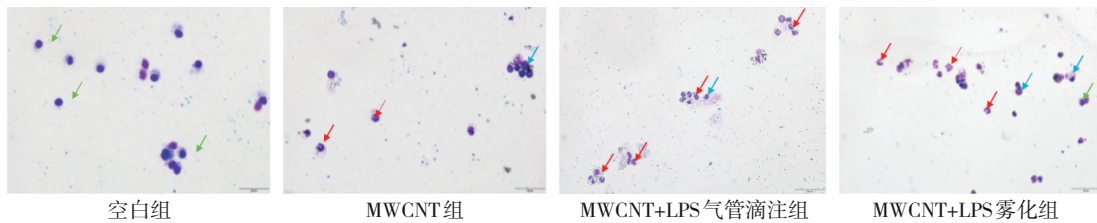
抗 F4/80 标记成熟巨噬细胞表面; 抗 CD3⁺标记成熟 T 淋巴细胞表面。

图 4 各组小鼠肺组织 F4/80 和 CD3⁺T 蛋白表达 (免疫组织化学染色 × 200)

2.5 各组小鼠 BALF 细胞分类及中性粒细胞计数

空白组、MWCNT 组、MWCNT+LPS 气管滴注组和 MWCNT+LPS 雾化组小鼠 BALF 中性粒细胞计数分别为 (9.3 ± 4.0)%、(35.0 ± 5.0)%、(72.7 ± 6.4)%、(56.0 ± 6.0)%，经方差分析，差异有统计学意义 ($F=75.718, P=0.000$)。空白组小鼠 BALF 以淋巴

细胞为主; 相较于空白组, MWCNT 组中性粒细胞增加; MWCNT+LPS 气管滴注组出现较多的中性粒细胞、巨噬细胞, 其中中性粒细胞显著增多; MWCNT+LPS 雾化组小鼠中性粒细胞相较于空白组增加, 但少于 MWCNT+LPS 气管滴注组。见图 5。



绿色箭头示淋巴细胞, 红色箭头示中性粒细胞, 蓝色箭头示巨噬细胞。

图 5 各组小鼠 BALF 细胞分类涂片

2.6 各组小鼠肺损伤结果

各组小鼠 BALF 的 LDH 值比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与空白组相比, MWCNT 组 LDH 值差异无统计学意义 ($P > 0.05$), MWCNT+LPS 气管滴注组 LDH 值升高 ($P < 0.05$)。各组小鼠 BALF 的 BCA 比较, 经方差分析, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

2.7 各组小鼠外周血白细胞分类计数

各组小鼠外周血单核细胞和嗜酸性粒细胞计数比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$);

表 2 各组小鼠 BALF 的 LDH 相对释放率和总蛋白浓度比较 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	LDH 释放率/%	BCA/(mg/mL)
空白组	1.00 ± 0.1	0.44 ± 0.1
MWCNT 组	1.54 ± 0.9	0.49 ± 0.0
MWCNT+LPS 气管滴注组	3.75 ± 1.3 [†]	0.56 ± 0.1
MWCNT+LPS 雾化组	2.53 ± 1.8	0.52 ± 0.2
F 值	5.825	2.064
P 值	0.005	0.137

注: †与空白组比较, $P < 0.05$ 。

WBC、中性粒细胞、淋巴细胞计数比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。与空白组相比,MWCNT+LPS 气管滴注组的单核细胞和嗜酸性粒细胞计数升高($P <$

0.05);MWCNT+LPS 雾化组小鼠嗜酸性粒细胞计数升高($P < 0.05$),中性粒细胞、淋巴细胞及单核细胞比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 各组小鼠外周血白细胞分类与计数比较 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	WBC/($\times 10^9/L$)	中性粒细胞/%	淋巴细胞/%	单核细胞/%	嗜酸性粒细胞/%
空白组	1.98 \pm 1.2	26.85 \pm 25.1	70.20 \pm 23.8	1.10 \pm 1.2	1.85 \pm 1.1
MWCNT 组	2.36 \pm 0.6	21.32 \pm 12.5	69.10 \pm 13.4	7.60 \pm 5.3	1.98 \pm 0.7
MWCNT+LPS 气管滴注组	1.79 \pm 1.4	49.43 \pm 19.0	43.73 \pm 20.7	6.48 \pm 3.2 [†]	0.35 \pm 0.6 [†]
MWCNT+LPS 雾化组	0.96 \pm 0.4	33.33 \pm 12.0	62.07 \pm 11.7	4.30 \pm 2.1	0.30 \pm 0.5 [†]
F 值	2.139	2.757	2.744	4.419	9.422
P 值	0.127	0.069	0.070	0.015	0.001

注:†与空白组比较, $P < 0.05$ 。

2.8 各组小鼠的 INF- γ 、TNF- α 与 IL-2 水平比较

各组小鼠的 INF- γ 、TNF- α 与 IL-2 水平比较,经方差分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与空白组相比,MWCNT 组 TNF- α 水平升高($P < 0.05$),INF- γ 、IL-2 水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);MWCNT+LPS 气管滴注组的 INF- γ 、TNF- α 、IL-2 水平均升高($P < 0.05$);MWCNT+LPS 雾化组的 INF- γ 、TNF- α 、IL-2 水平也均升高($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 各组小鼠 BALF 的 INF- γ 、TNF- α 与 IL-2 水平比较 ($n=8, \text{pg/mL}, \bar{x} \pm s$)

组别	INF- γ	TNF- α	IL-2
空白组	43.21 \pm 4.8	58.19 \pm 3.2	35.26 \pm 2.7
MWCNT 组	57.39 \pm 3.2	122.58 \pm 3.5 [†]	48.63 \pm 3.3
MWCNT+LPS 气管滴注组	172.98 \pm 16.9 [†]	426.33 \pm 27.2 [†]	102.87 \pm 11.3 [†]
MWCNT+LPS 雾化组	135.55 \pm 19.0 [†]	330.70 \pm 12.7 [†]	98.59 \pm 7.3 [†]
F 值	68.583	387.556	71.107
P 值	0.000	0.000	0.000

注:†与空白组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

结节病是一种非干酪样坏死性上皮细胞肉芽肿炎症性疾病,病因不明,以侵犯肺实质为主,具体表现为双侧肺门淋巴结肿大、肺浸润,部分可进展为肺纤维化。临床经过较隐匿,部分患者可自发缓解,但约 5% 的患者会因呼吸衰竭、心脏受累等严重并发症死亡^[12]。肺结节病的典型病理特征是形成非干酪性肉芽肿,其结构主要由巨噬细胞与 T 细胞聚集构成,周围伴随适度的炎症反应^[13]。

动物模型在医药研究中具有不可替代的作用,通过模拟人类的生理、病理和药物反应来帮助研究人员理解疾病机制与评估药物。但由于动物(马除外)不会患有结节病,因此现阶段尚无公认的肺结节动物模型^[14]。过去一段时间,研究人员利用感染性或非感染性因素制备肺结节动物模型。例如由痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes*)引起的肺结节模型,特征为肉芽肿结构不完整、短暂且伴有明显的淋巴性肺炎,因此,此模型更类似于超敏性肺炎^[15]。Tsc2 基因敲除小鼠模型显示与人类结节病相似的系统性肉芽肿形成特征,包括上皮样巨噬细胞、M2 巨噬细胞极化及 mTORc1 通路激活。然而,Tsc2 基因的变异并未被确定为人类结节病的风险因素,且 mTORc1 的异常调控是否足以引发人类疾病尚不明确^[16]。而单纯使用碳纳米管诱导的肺结节表现出与人类疾病不同的特征,包括巨噬细胞和周围淋巴细胞缺乏^[17]。碳纳米管具有广泛的应用场景:医疗器械、药物输送、成像、空气-水过滤、陶瓷、太阳能收集和织物^[18]。前期研究发现 MWCNT 是唯一可诱导肺部肉芽肿形成和淋巴细胞聚集的类型^[19]。因此,本研究选择长度 5 ~ 15 μm 的 MWCNT。

本研究比较了 MWCNT、MWCNT+LPS 气管滴注、MWCNT+LPS 雾化这 3 种不同模型复制方法诱导小鼠形成肺部炎症性肉芽肿的能力。结果显示,在肺功能方面,MWCNT 组与 MWCNT+LPS 雾化组的肺功能未见明显改变;MWCNT+LPS 气管滴注组表现出显著的肺功能异常,表现为 sRaw 显著增加,提示滴注 LPS 可引发急性气道炎症,导致呼吸功能紊乱,

而雾化可使 LPS 均匀分布从而减轻了局部刺激强度^[20]。此结果与临床大多数肺结节患者的肺功能检测表现正常, 而其中 10% ~ 30% 的患者随着疾病累及肺部并发展为慢性疾病或合并其他并发症时出现肺功能下降的现象相一致^[21]。同时在临床 CT 诊断过程中, 肺门周围分布的小结节、纤维化改变及双侧肺门周围阴影为肺结节的典型表现, 不典型表现为肿块样、肺泡样阴影或蜂窝状囊肿等^[22]。本研究影像学结果显示, MWCNT 组出现一类圆形结节, 边界清晰, 与人类肺结节影像学表现相近; 加入 LPS 后均出现磨玻璃密度增高影, 这主要是因为 LPS 导致的肺泡间隔水肿和部分肺泡充填所造成。组织病理学结果进一步表明, MWCNT 单独处理具有诱发轻微肉芽肿的条件, 但很难反映人类结节病中所观察到的局部炎症环境; 而加入 LPS 后, 肉芽肿处多伴随炎性细胞浸润现象, 此结果更符合人类结节的病理改变。免疫组织化学结果进一步表明, 3 种模型复制方法诱导肺结节过程中均出现 F4/80 与 CD3⁺T 阳性表达。同时, ELISA 结果表明, MWCNT+LPS 气管滴注组与 MWCNT+LPS 雾化组 BALF 的 INF- γ 、TNF- α 、IL-2 水平均较空白组升高。以上结果表明, 无论模型复制方式如何, 结节的形成都涉及共同的机制——起始于抗原暴露和免疫系统的激活, T 细胞识别抗原后, 分化为 Th1 细胞, 并释放细胞因子, 随后细胞因子进一步激活巨噬细胞, 增强其吞噬和杀菌能力, 并与 T 细胞和其他免疫细胞等聚集在构成结节的核心理构^[1]。

BALF 作为最接近肺部疾病活动部位的样本, 是检查环境与肺部免疫机制的理想生物标本^[23-24]。BALF 主要含有巨噬细胞和 T 细胞, 其是启动肺结节反应必要因素。本研究肺损伤的检测结果显示, 与空白组相比, MWCNT+LPS 气管滴注组 BALF 的 LDH 活性显著升高, 这一现象可能与纳米颗粒和 LPS 协同作用诱导的细胞膜损伤导致 LDH 释放增加有关^[25]。本研究结果显示, 与空白组相比, MWCNT+LPS 气管滴注组和 MWCNT+LPS 雾化组的 BALF 中巨噬细胞和 T 细胞的数量显著增加。

白细胞是免疫系统的重要组成部分, 负责防御感染、清除异物和调节炎症反应。根据形态、功能和表面标志物, 白细胞可分为多种类型, 每种类型在免疫应答中发挥独特作用^[26]。MWCNT 组 WBC 略

有升高, 但差异无统计学意义, 这一结果与既往研究^[27]一致, 即碳纳米材料在低剂量下可能仅导致非特异性的免疫刺激。MWCNT+LPS 气管滴注组中性粒细胞、淋巴细胞有升高趋势, 表明急性炎症反应被激活, 符合 LPS 诱导的经典中性粒细胞浸润模式, 适应性免疫的早期参与或应激性淋巴细胞动员^[28]; 单核细胞和嗜酸性粒细胞计数升高提示慢性炎症的潜在趋势, 与纳米颗粒联合 LPS 的协同效应相关^[29]。

综上所述, 本研究采用 MWCNT、MWCNT+LPS 气管滴注和 MWCNT+LPS 雾化 3 种方法均成功复制肺结节模型, 但各方法在模型效果上各有特点。MWCNT 组在诱导过程中, 炎症反应的数据有限。而 MWCNT+LPS 滴注组虽然炎症反应强烈, 但因给药方式导致局部 LPS 浓度过高, 直接损伤呼吸道上皮和内皮细胞。而结合小鼠肺功能变化、影像学结果、组织病理学改变、肺结节相关标志物表达、白细胞分类和关键炎症因子含量分析, 采用 MWCNT+LPS 雾化方法复制的小鼠肺结节模型能够有效模拟人类结节病理生理学的多个关键特征, 同时也为结节病机制研究和药物开发提供了有价值的实验模型。

参 考 文 献 :

- [1] XU D F, TAO X H, FAN Y B, et al. Sarcoidosis: molecular mechanisms and therapeutic strategies[J]. *Mol Biomed*, 2025, 6(1): 6.
- [2] 中华医学会呼吸病学分会肺癌学组, 中国肺癌防治联盟专家组. 肺结节诊治中国专家共识(2018年版)[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2018, 41(10): 763-771.
- [3] 王宁, 张婷婷, 陈丹, 等. 单孔胸腔镜下肺亚段/肺段切除术在老年肺结节患者中的临床应用[J]. *中国现代医学杂志*, 2024, 34(9): 78-83.
- [4] LASSANDRO G, PICCHI S G, CORVINO A, et al. Noninfectious granulomatous lung disease: radiological findings and differential diagnosis[J]. *J Pers Med*, 2024, 14(2): 134.
- [5] ÇİLĞİN E. Investigation of the effects of single and double-walled carbon nanotube utilization on diesel engine combustion, emissions, and performance[J]. *Case Stud Therm Eng*, 2024, 57: 104282.
- [6] IZBICKI G, CHAVKO R, BANAUCH G I, et al. World Trade Center "sarcoid-like" granulomatous pulmonary disease in New York city fire department rescue workers[J]. *Chest*, 2007, 131(5): 1414-1423.
- [7] 宋玲, 高云航, 李晗, 等. 雾化吸入脂多糖导致的大鼠急性肺炎模型不同标本中炎症因子比较研究[J]. *中国实验动物学报*,

- 2025, 33(1): 89-98.
- [8] SOLORIO-RODRIGUEZ S A, WILLIAMS A, POULSEN S S, et al. Single-walled vs. multi-walled carbon nanotubes: influence of physico-chemical properties on toxicogenomics responses in mouse lungs[J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2023, 13(6): 1059.
- [9] de SOUZA XAVIER COSTA N, RIBEIRO JÚNIOR G, DOS SANTOS ALEMANY A A, et al. Early and late pulmonary effects of nebulized LPS in mice: an acute lung injury model[J]. *PLoS One*, 2017, 12(9): e0185474.
- [10] ALEXANDER D J, COLLINS C J, COOMBS D W, et al. Association of Inhalation Toxicologists (AIT) working party recommendation for standard delivered dose calculation and expression in non-clinical aerosol inhalation toxicology studies with pharmaceuticals[J]. *Inhal Toxicol*, 2008, 20(13): 1179-1189.
- [11] KORZENIEWSKI C, CALLEWAERT D M. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity[J]. *J Immunol Methods*, 1983, 64(3): 313-320.
- [12] SHARMA R, KOURANOS V, COOPER L T, et al. Management of cardiac sarcoidosis[J]. *Eur Heart J*, 2024, 45(30): 2697-2726.
- [13] ROSEN Y. Pathology of granulomatous pulmonary diseases[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2022, 146(2): 233-251.
- [14] LOCKE L W, SCHLESINGER L S, CROUSER E D. Current sarcoidosis models and the importance of focusing on the granuloma[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1719.
- [15] MALKOVA A, ZINCHENKO Y, STARSHINOVA A, et al. Sarcoidosis and autoimmune inflammatory syndrome induced by adjuvants: is there a connection?[M]//WATAD A, BRAGAZZI N L, SHOENFELD Y. *Autoimmune Disorders: Adjuvants and Other Risk Factors in Pathogenesis*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2024: 247-264.
- [16] MAN A, di SCIPIO M, GREWAL S, et al. The genetics of tuberous sclerosis complex and related mTORopathies: current understanding and future directions[J]. *Genes (Basel)*, 2024, 15(3): 332.
- [17] HUIZAR I, MALUR A, MIDGETTE Y A, et al. Novel murine model of chronic granulomatous lung inflammation elicited by carbon nanotubes[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 45(4): 858-866.
- [18] JAIN N, GUPTA E, KANU N J. Plethora of carbon nanotubes applications in various fields - a state-of-the-art-review[J]. *Smart Sci*, 2022, 10(1): 1-24.
- [19] KNUDSEN K B, BERTHING T, JACKSON P, et al. Physicochemical predictors of multi-walled carbon nanotube-induced pulmonary histopathology and toxicity one year after pulmonary deposition of 11 different multi-walled carbon nanotubes in mice[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2019, 124(2): 211-227.
- [20] TAYLOR-CLARK T E, UNDEM B J. Neural control of the lower airways: role in cough and airway inflammatory disease[J]. *Handb Clin Neurol*, 2022, 188: 373-391.
- [21] YAO Q, JI Q L, ZHOU Y. Pulmonary function in pulmonary sarcoidosis[J]. *J Clin Med*, 2023, 12(21): 6701.
- [22] CRIADO E, SÁNCHEZ M, RAMÍREZ J, et al. Pulmonary sarcoidosis: typical and atypical manifestations at high-resolution CT with pathologic correlation[J]. *Radiographics*, 2010, 30(6): 1567-1586.
- [23] BHARGAVA M, CROUSER E D. Application of laboratory models for sarcoidosis research[J]. *J Autoimmun*, 2024, 149: 103184.
- [24] 许圣慧, 邸沂遥, 高耐芬, 等. tNGS对肺炎患者痰液/肺泡灌洗液标本病原体检测的影响及指导抗生素治疗的价值[J]. *中国现代医学杂志*, 2025, 35(11): 7-12.
- [25] ABULIKEMU A, ZHAO X Y, QI Y, et al. Lysosomal impairment-mediated autophagy dysfunction responsible for the vascular endothelial apoptosis caused by silica nanoparticle via ROS/PARP1/AIF signaling pathway[J]. *Environ Pollut*, 2022, 304: 119202.
- [26] DOROSZ A, GROSICKI M, DYBAS J, et al. Eosinophils and neutrophils-molecular differences revealed by spontaneous Raman, CARS and fluorescence microscopy[J]. *Cells*, 2020, 9(9): 2041.
- [27] van ZANDWIJK N, FRANK A L. Potential toxicities of carbon nanotubes: time for a reminder[J]. *Expert Rev Respir Med*, 2020, 14(4): 339-340.
- [28] MALAINOU C, ABDIN S M, LACHMANN N, et al. Alveolar macrophages in tissue homeostasis, inflammation, and infection: evolving concepts of therapeutic targeting[J]. *J Clin Invest*, 2023, 133(19): e170501.
- [29] DUKE K S, BONNER J C. Mechanisms of carbon nanotube-induced pulmonary fibrosis: a physicochemical characteristic perspective[J]. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2018, 10(3): e1498.

(张蕾 编辑)

本文引用格式: 李晗, 王逸飞, 宋玲, 等. 不同模型复制方式致肺结节小鼠模型比较研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2025, 35(19): 21-30.

Cite this article as: LI H, WANG Y F, SONG L, et al. A comparative study on different modeling methods for inducing pulmonary sarcoidosis in mice[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2025, 35(19): 21-30.