

小鼠高原低压低氧环境下运动导致急性肺损伤模型的构建与评估

张彩云^{1,4}, 王华南², 王怡平⁴, 梁志欣³

¹解放军医学院, 北京 100853; ²联勤保障部队第990医院呼吸内科, 河南驻马店 463000; ³解放军总医院第一医学中心呼吸与危重症医学科, 北京 100853; ⁴解放军总医院第六医学中心呼吸与危重症医学科, 北京 100048

摘要:背景 高原低压低氧环境导致的急性肺损伤(acute lung injury, ALI)发病机制尚未完全明确, 模型的成功建立是探索其发病机制的基础。目的 在单纯的高原低压低氧环境基础上加入运动因素, 建立一种新型的小鼠高原低压低氧环境联合运动导致的急性肺损伤模型。方法 应用高原模拟舱模拟高原低压低氧环境, 应用小动物跑步机模拟小鼠运动状态。将100只C57BL/6J小鼠随机分为空白对照组、12 h、24 h、48 h、72 h五组, 每组各20只。将小鼠置于高原模拟舱内的小动物跑步机上, 模拟舱海拔升至8 000 m, 跑步机速度调整: 低速设定4 m/min, 高速设定6 m/min, 呈高低速循环模式, 加速时间设定10 s。每运动1 h后休息20 min, 12 h组共运动6 h后休息, 其他实验组每日运动6 h, 其余时间休息, 于12 h、24 h、48 h、72 h分别将小鼠取出, 观察模拟高原环境下运动后小鼠的行为状态、生理表现及生存情况。各组小鼠处死后观察肺组织病理改变、含水率, 检测支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)蛋白含量、肺组织氧化应激指标丙二醛(malondialdehyde, MDA)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)水平以及血清炎症因子白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)、IL-6、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)变化情况。结果 空白对照组、12 h组、24 h组、48 h组、72 h组生存率分别为100%、100%、90%、80%、50%。肺组织HE染色可见空白对照组肺组织肺泡间隔正常, 无肺泡间隔增宽、炎细胞浸润、肺泡萎陷、肺泡出血等情况; 12 h组、24 h组肺组织肺泡间隔轻度增宽, 炎细胞轻度浸润, 未见肺泡出血; 48 h组、72 h组出现明显的肺泡间隔增宽, 炎细胞大量浸润, 且有肺泡内出血。24 h组、48 h组、72 h组肺损伤评分(Smith评分)相较于空白对照组均显著升高($P < 0.001$)。24 h组、48 h组、72 h组MDA相较于空白对照组均升高($P < 0.05$), 72 h组最高($P < 0.001$)。24 h组、48 h组、72 h组SOD相较于空白对照组均降低($P < 0.05$), 72 h组最低($P < 0.001$)。24 h组、48 h组、72 h组肺泡灌洗液蛋白浓度均升高($P < 0.001$), 72 h组最高($P < 0.001$)。24 h组、48 h组、72 h组血清炎症因子IL-1相较于空白对照组均显著升高($P < 0.001$)。24 h组、48 h组、72 h组血清炎症因子IL-6相较于空白对照组均显著升高($P < 0.001$)。24 h组、48 h组、72 h组血清炎症因子TNF- α 相较于空白对照组均显著升高($P < 0.001$)。结论 将小鼠置于模拟海拔8 000 m低压低氧环境下配合间断的运动刺激, 48 h后可成功构建稳定的小鼠高原急性肺损伤模型。

关键词:高原; 低氧; 急性肺损伤; 小鼠; 动物疾病模型

中图分类号: R563.8

文献标志码: A

文章编号: 2095-5227(2025)04-0347-07

DOI: 10.12435/j.issn.2095-5227.24121202

引用本文: 张彩云, 王华南, 王怡平, 等. 小鼠高原低压低氧环境下运动导致急性肺损伤模型的构建与评估 [J]. 解放军医学院学报, 2025, 46 (4): 347-353.

Establishment and evaluation of a novel mice model of acute lung injury induced by exercise in a high altitude hypobaric hypoxia environment

ZHANG Caiyun^{1,4}, WANG Hua'nian², WANG Yiping⁴, LIANG Zhixin³

¹Chinese PLA Medical School, Beijing 100853, China; ²Department of Respiratory, The 990th Hospital of Joint Logistics Support Force, Zhumadian 463000, Henan Province, China; ³Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the First Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100853, China; ⁴Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the Sixth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100048, China

Corresponding author: LIANG Zhixin. Email: liangzhixin301@163.com

Abstract: Background The pathogenesis of acute lung injury (ALI) induced by high-altitude hypobaric hypoxia remains incompletely understood, necessitating reliable animal models to investigate its underlying mechanisms. **Objective** To establish a novel murine model of ALI by combining hypobaric hypoxia with exercise stress. **Methods** A hypobaric hypoxia chamber was used to simulate a high-altitude low-oxygen environment, and an animal treadmill was employed to mimic the exercise state of mice.

收稿日期: 2024-12-12

基金项目: 国家重点研发计划课题(2022YFA1104704)

第一作者: 张彩云, 本科, 主治医师。Email: caiyunwtt@126.com

通信作者: 梁志欣, 博士, 主任医师, 教授。Email: liangzhixin301@163.com

A total of 100 C57BL/6J mice were randomly divided into control group, and 12 h, 24 h, 48 h, and 72 h groups, with 20 mice in each group. Mice were placed on the animal treadmill inside the hypobaric hypoxia chamber, where the simulated altitude was set to 8 000 meters. The treadmill speed was adjusted as follows: low speed at 4 m/min and high speed at 6 m/min, alternating in a high-low speed cycle mode, with an acceleration time of 10 seconds. After 1 hour of exercise, mice rested for 20 minutes. The 12 h group underwent a total of 6 hours of exercise followed by rest, while other experimental groups performed 6 hours of daily exercise with the remaining time allocated for rest. At 12 h, 24 h, 48 h, and 72 h post-treatment, mice were removed from the chamber to observe behavioral states, physiological manifestations, and survival outcomes under simulated high-altitude exercise conditions. After euthanasia, lung tissue pathological changes and water content were examined. Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) protein content, pulmonary oxidative stress markers (malondialdehyde, MDA; superoxide dismutase, SOD), and serum inflammatory cytokines (interleukin-1 [IL-1], interleukin-6 [IL-6], tumor necrosis factor- α [TNF- α]) were also analyzed. **Results** The survival rates of the control group, 12 h, 24 h, 48 h, and 72 h groups were 100%, 100%, 90%, 80%, and 50%, respectively. Hematoxylin-eosin (HE) staining of lung tissues revealed normal alveolar septa in the control group, with no evidence of widened alveolar septa, inflammatory cell infiltration, alveolar collapse, or alveolar hemorrhage. Mild alveolar septal thickening and mild inflammatory cell infiltration were observed in the 12 h and 24 h groups, without alveolar hemorrhage. In contrast, the 48 h and 72 h groups exhibited significant alveolar septal thickening, extensive inflammatory cell infiltration, and alveolar hemorrhage. The lung injury scores (Smith scores) in the 24 h, 48 h, and 72 h groups were significantly higher than that in the control group (all $P < 0.001$). MDA levels in the 24 h, 48 h, and 72 h groups were elevated compared to the control group ($P < 0.05$), with the highest level in the 72 h group ($P < 0.001$). SOD content in the 24 h, 48 h, and 72 h groups was significantly lower than that in the control group (all $P < 0.05$), reaching its lowest in the 72 h group ($P < 0.001$). Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) protein concentrations in the 24 h, 48 h, and 72 h groups were increased compared to the blank control group (all $P < 0.001$), with the highest concentration in the 72 h group. Serum inflammatory cytokine IL-1 levels in the 24 h, 48 h, and 72 h groups were significantly higher than those in the control group (all $P < 0.001$). Similarly, sera IL-6 levels in these groups were markedly elevated compared to the control group (all $P < 0.001$). TNF- α levels in the 24 h, 48 h, and 72 h groups were also significantly increased relative to the control group (all $P < 0.001$). **Conclusion** By placing mice in a simulated hypobaric hypoxia environment at an altitude of 8 000 meters combined with intermittent exercise stimulation, a stable high-altitude acute lung injury model in mice can be successfully established within 48 hours.

Keywords: high-altitude; hypoxia; acute lung injury; mice; animal disease models

Cited as: Zhang CY, Wang HN, Wang YP, et al. Establishment and evaluation of a novel mice model of acute lung injury induced by exercise in a high altitude hypobaric hypoxia environment[J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2025, 46(4): 347-353.

急性暴露于海拔2 500 m以上的高原环境时,可能会导致低压低氧诱导的急性肺损伤,其主要临床表现包括呼吸困难、发绀、粉红色泡沫痰、活动耐力下降等^[1]。随着高海拔地区旅游业、登山运动的发展以及高原军事作战训练的需求,急性肺损伤的发病率逐渐上升,因此越来越引起重视。高原低压低氧环境诱导的急性肺损伤主要机制是炎症反应^[2]、氧化应激以及急性缺氧导致的肺毛细血管收缩、肺血管通透性增加,进而导致肺泡内蛋白质和水肿液渗出^[3-5]。目前高原肺水肿的治疗主要依靠吸氧、糖皮质激素等治疗,效果不佳且糖皮质激素的不良反应程度重,目前无公认的其他有效防治措施^[6]。建立重复性好、评价体系健全的高原低压低氧肺损伤模型有助于进一步明确高原环境肺损伤的发病机制,进而帮助研发相关的防治药物。小鼠作为啮齿类动物,是最常用的实验动物,其经济实惠、取材简单方便,但目前小鼠高原低压低氧肺损伤模型的相关研究较少,模型构建的成功率较低^[7]。鉴于运动、劳累等是高原肺损伤的主要诱因^[4,8],本研究将小动物跑步机改良后置于高原模拟舱中,模拟海拔8 000 m环境下运动状态,评估不同的高原环境暴露时间及运

动条件导致肺损伤的情况,从而探索并建立稳定的小鼠高原急性肺损伤模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验动物采用SPF级雄性C57BL/6J小鼠100只(18~22 g, 8周龄),购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物饲养于解放军总医院第一医学中心动物实验中心,环境条件:12 h/12 h光暗循环,温度(25±1)°C、湿度50%±5%,充足供应水与饲料,实验前适应性喂养1周。所有实验方案经解放军总医院第一医学中心动物管理与使用委员会批准(批号:SQ2023656)。

1.2 主要试剂与仪器

高原模拟舱(上海塔望科技有限公司);小动物跑步机(上海塔望科技有限公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒(北京阳光英锐生物科技有限公司);白细胞介素-1(interleukin-6, IL-1)、IL-6、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA试剂盒(江苏酶免生物);丙二醛(malondialdehyde, MDA)及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)含量检测试剂盒(江苏艾迪生生物科技有限公司);电

子秤(上海仪器厂);光学显微镜CKX41(Olympus, 日本);YB-6D型生物组织石蜡包埋机(武汉赛维尔生物科技有限公司);苏木素染色剂(武汉塞维尔生物科技有限公司)。

1.3 预实验明确小鼠海拔高度耐受情况,确认正式实验的海拔条件

正式实验前,我们对小鼠海拔高度及时间的耐受情况进行了摸索,以确定正式实验的海拔条件。取50只雄性C57BL/6J小鼠(18~22g,8周龄),按照随机数字表法分为10组(每组5只),分别为空白对照组、6 000 m 24 h组、6 000 m 48 h组、6 000 m 72 h组、7 000 m 24 h组、7 000 m 48 h组、7 000 m 72 h组、8 000 m 24 h组、8 000 m 48 h组、8 000 m 72 h组;预实验中不对小鼠进行运动刺激,将小鼠直接放置高原模拟舱内后关闭舱门,设置模拟舱参数:20 min内升至目标高度,并按设定时间分别取出各组小鼠,观察各组小鼠生存率和肺组织病理变化。

1.4 正式实验动物分组及模型建立方法

将100只雄性C57BL/6J小鼠按照随机数字表法分为5组,其中空白对照组20只,实验组分为12 h组、24 h组、48 h组、72 h组各20只。将购入的小动物跑步机安置于高原模拟舱内(图1),各实验组小鼠分别放置于跑步机跑道,关闭模拟舱舱门,设置模拟舱参数:20 min升至海拔8 000 m高度(35.5 kPa,大气压差:-65.5 kPa,氧分压:7.7 kPa)。到达目标高度后开启小动物跑步机,跑步机速度调整:最低速设定4 m/min,最高速设定6 m/min,呈高低速循环模式,由低速到高速的加速时间设定10 s,这种运动模式保证小鼠不会因持续快速运动而导致严重缺氧死亡。每运动1 h后休息20 min,其中12 h组运动6 h后休息,24 h组、48 h组、72 h组每24 h运动6 h,其余时间休息,跑步机内放置鼠粮及专用小动物饮水瓶,休息期间可自由进食水,于12 h、24 h、48 h、72 h分别将小鼠取出,进行行为观察和取材。

1.5 正式实验各组小鼠行为观察

观察各组小鼠高原低压低氧环境及运动因素刺激前、刺激后30 min内的活动、反应能力、呼吸、进食状态等。

1.6 正式实验各组小鼠样本解剖与采集

50 mg/kg戊巴比妥腹腔麻醉,眼球取血后颈椎脱臼法处死小鼠,沿小鼠胸部正中剪开皮肤和胸壁,每组中10只小鼠取出肺组织,右上肺用于肺

含水量检测,右下肺行HE染色观察病理改变,其余肺叶用于检测氧化应激指标,另外10只小鼠切开颈部皮肤,钝性分离肌肉层,暴露气管后进行气管插管,缓慢气管内注入冰0.9%氯化钠注射液0.6 mL缓慢回抽,反复冲洗3次,收集灌洗液,上述步骤重复2次,共注入1.2 mL,回收约0.9 mL灌洗液用于蛋白含量检测。空白对照组小鼠不设置低温、低压、低氧条件,直接进行眼球血、肺组织、支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)取材。

1.7 正式实验各组小鼠血清炎症因子测定

眼球取血并常温放置2 h后,3 500 r/min离心10 min,取血清,使用Elisa试剂盒进行炎症因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平测定(酶标仪波长450 nm)。

1.8 正式实验各组小鼠BALF蛋白质浓度测定

将采集的BALF以1 500 r/min离心15 min,收集上清液,使用BCA蛋白浓度测定试剂盒,检测肺泡灌洗液中总蛋白浓度。

1.9 正式实验各组小鼠肺组织含水率测定

取右肺上叶,用滤纸轻轻吸去肺组织表面血污。测量湿重后放入电烤箱中进行烘干,温度设定为65 $^{\circ}$ C,时间设定72 h,烘干肺组织达到恒定重量,称取干重。组织含水率=(湿重-干重)/湿重。

1.10 正式实验各组小鼠肺组织病理学HE染色及肺损伤评分

取右肺下叶在4%多聚甲醛中固定24 h后,不同浓度乙醇梯度脱水,石蜡包埋,切片机切片、固定、烤片,后用HE染色试剂盒染色。染色后在光学显微镜下观察肺部病理变化,采用Smith评分方法对肺水肿、肺泡及间质炎症、肺泡及间质出血、肺不张及肺透明膜形成这4方面进行病理评估,无肺损伤为0分,肺损伤范围<25%为1分,肺损伤范围25%~50%为2分(不包括50%),肺损伤范围50%~75%为3分(不包括75%),肺损伤 \geq 75%为4分。肺损伤评分为上述4个参数分数之和。每张切片观察10个高倍镜视野,取其平均值作为切片的肺损伤评分。

1.11 正式实验各组小鼠肺组织氧化应激指标测定

剩余肺组织进行切割、称重,研磨机中研磨,用MDA试剂盒及SOD试剂盒按照说明书进行MDA和SOD测定。

1.12 统计学方法

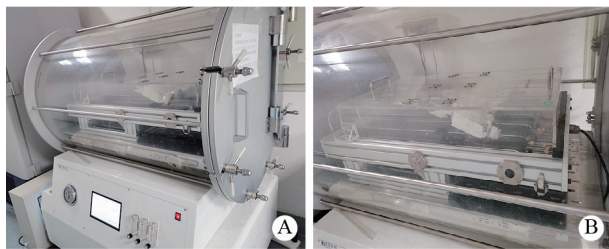
采用SPSS26.0进行统计分析,GraphPadPrism 9.0进行绘图,计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方

差分析, 两两比较采用独立样本 *t* 检验, 计数资料以例数(百分比)表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 预实验中各组小鼠生存率及肺组织病理变化

预实验中, 不给予运动刺激, 将高原模拟舱分别升至 6 000 m、7 000 m、8 000 m, 小鼠分别放置 24 h、48 h、72 h, 仅观察各组小鼠生存率及肺组织病理学表现。结果显示, 各组小鼠生存率均为 100%。6 000 m 海拔环境下, 24 h 组可见肺泡壁炎细胞轻度增多, 但无肺泡间隔增宽、肺泡出血等表现; 48 h 组、72 h 组可见炎细胞增多、肺泡间隔轻度增宽。7 000 m 和 8 000 m 各组均可见轻度的肺泡间隔增宽、炎细胞浸润表现, 肺损伤表现并不典型。见图 2。



A: 高原模拟舱; B: 高原模拟舱内小动物跑步机, 小动物跑步机附带放置专用水瓶及鼠粮。

图 1 构建模型所需主要设备

Fig. 1 The main equipment needed to build the model

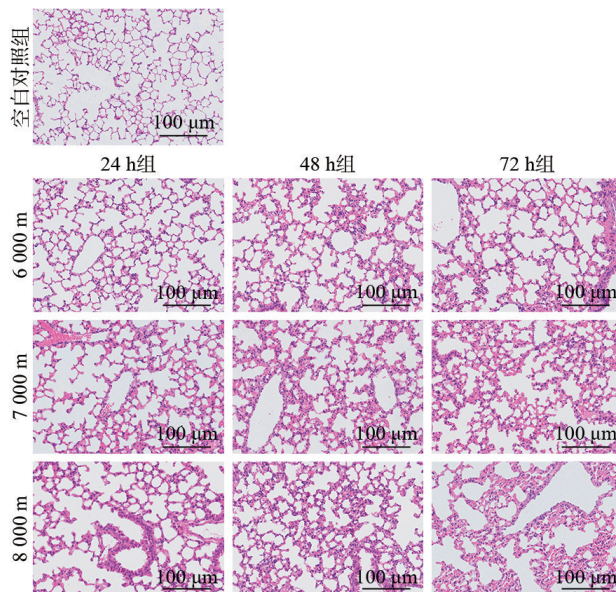


图 2 预实验中 6 000 m、7 000 m 及 8 000 m 单纯的低压低氧环境下小鼠各放置 24 h、48 h、72 h 后肺组织病理学(HE 染色, 200 ×)

Fig. 2 Pathomorphological observation of lung tissue of mice at altitudes of 6 000 m, 7 000 m and 8 000 m for 24 h, 48 h and 72 h in the pilot experiment (HE staining, 200 ×)

2.2 正式实验结果

2.2.1 各组小鼠存活率 空白对照组、12 h 组、24 h 组、48 h 组、72 h 组取出时的存活率分别为 100%(20 只)、100%(20 只)、90%(18 只)、80%(16 只)、50%(10 只)。

2.2.2 小鼠行为观察 各组小鼠致伤前均活动敏捷, 反应灵敏, 运动能力强, 呼吸正常, 主动觅食水。各实验组小鼠于跑步机内运动期间, 呼吸频率显著增快。休息时小鼠呼吸频率快, 活动显著减少, 觅食、水显著减少。12 h 组、24 h 组小鼠在脱离高原环境后口唇有轻度发绀, 10 ~ 20 min 内均基本恢复至正常活跃状态, 并开始觅食、水。48 h 组小鼠脱离高原环境 30 min 后口唇仍有明显发绀, 部分恢复活跃状态(4 只, 25%), 部分仍状态萎靡, 反应迟钝, 活动减少(12 只, 75%)。72 h 组脱离高原环境 30 min 后四肢及口唇仍明显发绀, 且所有小鼠均不能恢复活跃状态, 精神萎靡, 不进行觅食活动, 体质量显著下降, 眼分泌物增多。见图 3。



A: 对照组小鼠无明显发绀, 肺大体呈均匀淡粉色; B: 48 h 组小鼠口唇明显发绀, 且肺大体见多个肺叶有内出血表现。

图 3 对照组和 48 h 模型组小鼠口唇发绀情况及肺外观

Fig. 3 Evaluation of oral mucosal and lip cyanosis and lung morphology in the control and 48-hour model groups

2.2.3 血清炎症因子测定结果 24 h 组、48 h 组、72 h 组的血清 IL-1 水平均高于空白对照组, 差异有统计学意义 [(66.9±4.1) ng/L、(77.6±7.1) ng/L、(84.4±4.1) ng/L vs (54.4±2.4) ng/L, $P < 0.001$]; 12 h 组、24 h 组、48 h 组、72 h 组血清 IL-6 水平均高于空白对照组, 差异有统计学意义 [(85.7±8.9) pg/mL、(93.7±5.1) pg/mL、(108.7±6.4) pg/mL、(120.7±10.8) pg/mL vs (73.4±5.0) pg/mL, $P < 0.01$]; 12 h 组、24 h 组、48 h 组、72 h 组的血清 TNF- α 水平均

高于空白对照组, 差异有统计学意义[(584.0±75) ng/L、(735.0±50.7) ng/L、(761.0±38.7) ng/L、(869.2±104.7) ng/L vs (506.2±61.0) ng/L, $P<0.05$]。以上指标在72 h均达到高峰($P<0.001$)。见图4。

2.2.4 肺组织含水率及肺泡灌洗液蛋白质含量结果 24 h组、48 h组、72 h组的肺组织含水率均高于空白对照组, 差异有统计学意义($0.77±0.01$ 、 $0.78±0.01$ 、 $0.79±0.01$ vs $0.75±0.01$, $P<0.05$); 24 h组、48 h组、72 h组的肺泡灌洗液蛋白含量均高于空白对照组, 差异有统计学意义[(781.6±73.8) μg/mL、(826.1±95.7) μg/mL、(776.1±127.1) μg/mL vs (492.8±77.7) μg/mL, $P<0.001$]。见图5。

2.2.5 肺组织氧化应激指标测定结果 24 h组、48 h组、72 h组的肺组织SOD含量均低于空白对照组, 差异有统计学意义[(93.4±12.8) U/g、(84.1±8.3) U/g、(80.1±13.7) U/g vs (112.4±13.6) U/g, $P<0.05$]; 24 h组、48 h组、72 h组的肺组织MDA含量均高于空白对照组, 差异有统计学意义[(26.6±8.1) nmol/g、(30.6±5.7) nmol/g、(34.5±7.4) nmol/g vs (17.8±4.7) nmol/g, $P<0.05$]。见图6。

2.2.6 肺组织HE染色及肺损伤Smith评分 观察各组小鼠右下肺病理学改变, 空白对照组肺组织肺泡结构正常, 未见肺泡萎缩, 肺泡间隔未见增宽及炎细胞浸润, 肺泡腔内未见出血及炎细胞浸润; 12 h组和24 h组可见肺泡结构尚正常, 肺泡间隔较空白对照组呈轻度增宽, 局部可见炎细胞浸润明显; 48 h组和72 h组可见肺泡明显萎缩, 肺泡间隔明显增宽, 炎细胞浸润, 并伴有肺泡内出血(图7)。24 h组、48 h组、72 h组的Smith肺损伤评分均高于空白对照组, 差异有统计学意义($2.6±0.7$ 、 $5.8±0.79$ 、 $7.2±0.63$ vs $1.4±0.52$, $P<0.001$) (图8)。

3 讨论

急性高原肺损伤是快速到达2 500 m以上的高

海拔地区后2~5 d发生的急性肺损伤, 严重时可能危及生命。建立稳定的急性高原肺损伤动物模型是明确发病机制、研发治疗药物的关键。有些文献也将高原低压低氧肺损伤模型称为高原肺水肿模型, 建模方法均为低压、低氧环境刺激导致肺部毛细血管收缩、肺动脉高压、含有大量蛋白的水肿液渗出至肺泡中以及炎症、氧化应激等, 肺组织病理表现基本一致^[9], 本文将此类模型统称为高原低压低氧肺损伤模型。文献报道急性高原肺损伤模型的建立方法并不统一, 海拔高度选择4 000~8 000 m不等, 高海拔暴露时间从数小时至15 d不等, 肺部病理表现也轻重不一^[9-12]。既往用于高原肺损伤研究的动物主要有猪、犬、大鼠等, 但模型重复性差, 且实验动物价格高, 限制了急性高原肺损伤相关研究^[13-14]。小鼠作为最常用的实验动物, 价格经济实惠, 取材方便, 但由于小鼠缺氧耐受性较高等原因, 模型构建成功率偏低^[15]。本研究尝试在高原低压低氧环境的基础上加入运动因素, 更为真实地模拟高原环境下运动作业的实际状态, 建立一种新型的高原低压低氧环境联合运动导致急性肺损伤的模型。

本研究从肺大体形态、肺组织病理学(HE染色)、肺组织含水量及肺泡灌洗液蛋白含量等方面直接验证急性肺损伤模型的成功构建, 且鉴于炎症、氧化应激等是高原肺损伤的主要发病机制, 我们还对小鼠血清炎症因子、肺组织氧化应激指标进行检测以间接验证肺损伤模型的成功构建。本研究的创新点在于构建高原急性肺损伤模型过程中, 在单纯的低压低氧条件基础上, 加入了运动因素, 以快速诱导急性肺损伤形成。据笔者了解, 目前尚无C57BL/6J小鼠高原环境下运动导致急性肺损伤模型构建的文献报道。

本课题组在正式实验前进行了预实验, 预实验中发现, 将C57BL/6J小鼠放置于6 000 m的海拔

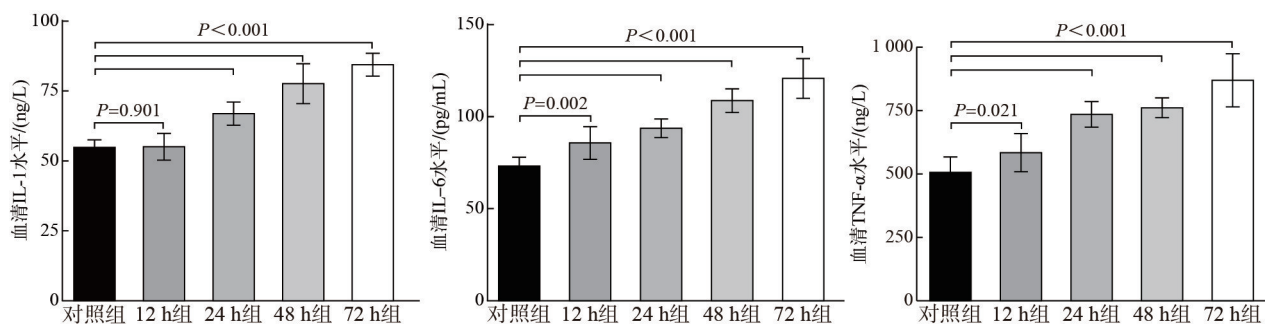


图4 各组小鼠血清炎症因子IL-1、IL-6、TNF-α的水平

Fig. 4 The levels of IL-1, IL-6 and TNF-α in serum of mice in each group

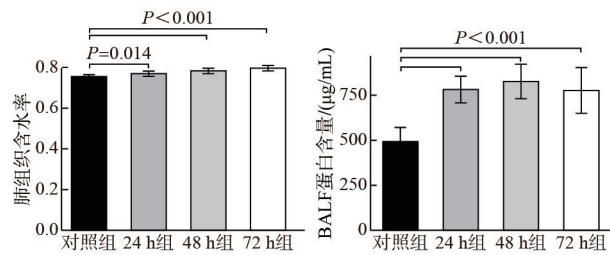


图5 各组小鼠肺组织含水率及BALF蛋白含量测定结果

Fig. 5 The water content of lung tissue and the protein content of BALF in each group

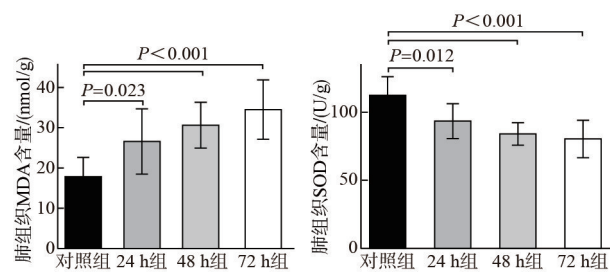


图6 各组小鼠肺组织SOD及MDA含量

Fig. 6 The contents of SOD and MDA in lung tissue of mice in each group

高度时可见小鼠活动轻微减少,有觅食、水活动,放置24~72 h肺部病理提示肺损伤并不明显,提示小鼠可耐受6 000 m海拔高度的低压、低氧环境。调整至海拔高度7 000~8 000 m时小鼠自主活动显著减少,放置24~72 h后小鼠几乎无死亡,说明该范围海拔高度可导致小鼠缺氧,虽影响正常活动,但不会因严重缺氧死亡,该条件下放置24~72 h小鼠肺组织病理学显示肺损伤轻微,这可能是进入低压、缺氧环境后小鼠活动显著减少,减轻了低压、缺氧等因素导致的肺损伤。根据既往的文献报道,运动、劳累是高原肺损伤发病的主要因素,单纯的运动可导致肺泡上皮轻度肿胀,肺泡间隔轻度增宽,不会引起肺泡出血。而低氧环境下运动使肺泡毛细血管通透性增加,加剧肺泡毛细血管屏障损害,运动可协同低氧条件,导致肺损伤加重^[8]。因此,我们选择在8 000 m低压低氧环境的基础上加入运动条件,并进行运动时间、速度等的摸索。

既往曾有研究尝试建立SD大鼠低压低氧环境下运动急性肺损伤模型,大鼠的运动速度选择为20 m/min,每4 h休息20 min,48 h后可出现肺损伤^[8],我们将购入的小动物跑步机安装于高原模拟舱内,拟对小鼠8 000 m高原环境下运动导致急性肺损伤的条件进行摸索。我们在实验中发现小鼠以 ≥ 10 m/min匀速运动1 h时多数小鼠出现力竭现象,且有小鼠突发死亡,对死亡小鼠进行肺组织HE染色未见明显出血、肺泡间隔增宽等情况,推测小鼠可能是因为低氧环境下快速运动而导致脑、心肌等重要脏器急性重度缺氧而快速死亡。经摸索发现,我们将跑步机速度调整为高低速循环模式,其中最低速4 m/min,最高速6 m/min,由低速到高速的加速时间设定为10 s,每运动1 h休息20 min,每天运动6 h为小鼠可耐受的活动强度,这样可保证小鼠不至于因持续快速运动而导致急性缺氧死亡。因此将正式实验条件设定为海拔8 000 m,跑步机高低速循环模式,4~6 m/min,每运动1 h休息20 min,每天运动6 h。

本实验将100只C57BL/6J小鼠随机分为空白对照组、12 h组、24 h组、48 h组和72 h组,空白对照组不进行高原环境及运动干预,其他4组在8 000 m高原环境下进行运动干预,在相应时间点取出小鼠进行取材。结果发现,空白对照组肺组织病理见肺泡间隔正常,肺泡腔无红细胞、炎细胞渗出等表现;12 h组和24 h组肺组织见肺泡间隔轻度增宽,伴有炎细胞渗出,仅局部有明显肺泡间隔增宽等表现;48 h组和72 h组肺组织病理见肺泡明显萎缩,肺泡间隔增宽明显,大量炎细胞浸润,部分肺泡内有出血,出现典型的肺组织损伤表现。另外,我们的结果显示随着高原环境暴露及运动时间的延长,小鼠肺组织的含水量逐渐增加,肺泡灌洗液的蛋白含量也逐渐升高,48 h组、72 h组与空白对照组比较,差异均有统计学意义,提示高原肺损伤模型建立成功。

高原急性肺损伤的发病机制目前未完全明确,现有的研究显示炎症、氧化应激、缺氧导致的肺

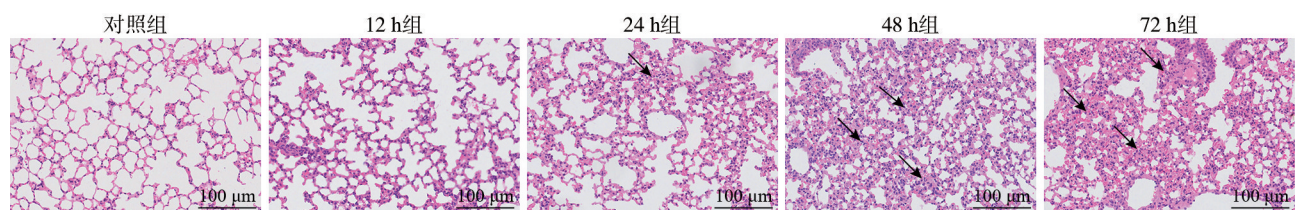


图7 各组小鼠肺组织病理学(HE染色,200×)

Fig. 7 Pathomorphological observation of lung tissue in each group mice (HE staining, 200 ×)

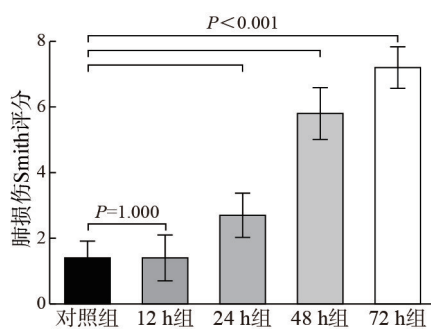


图8 各组小鼠肺组织损伤Smith评分

Fig. 8 Smith score of lung tissue injury in each group mice

血管应力衰竭、铁死亡等均参与高原急性肺损伤的发病^[16-20]。氧化应激指体内氧化与抗氧化反应的失衡，氧化应激反应可以激活多种细胞因子和酶，以抑制进一步的损伤并维持生物体的稳态。SOD作为酶抗氧化系统中的关键角色，可将超阴氧离子(O²⁻)转化为H₂O₂，通过过氧化氢酶进一步发挥作用，将释放的H₂O₂转化为H₂O和O₂，缺氧等损伤时，体内SOD水平可显著下降^[21]。MDA作为脂质过氧化的终产物，可间接反映组织过氧化损伤的程度^[10]。本研究中，肺组织MDA含量随高原环境暴露时间及运动时间的增加而逐渐升高，72 h达高峰，肺组织SOD随着暴露时间增加而下降，差异有统计学意义。这也验证了氧化应激反应参与了缺氧相关的组织损伤。另外，炎症也被认为是高原急性肺损伤发病的主要机制，并且已在许多研究中证实，因此炎症指标的升高，也可间接评估高原急性肺损伤的严重程度^[22]。我们的研究结果显示，IL-1、IL-6、TNF- α 等炎症指标随着高原环境暴露及运动时间的延长均逐渐升高，且IL-6和TNF- α 在致伤因素暴露12 h后即已经出现升高，差异有统计学意义，三项炎症指标72 h达高峰。

我们实验的优势在于在高原低压低氧基础上加入了运动因素进行高原急性肺损伤模型的构建，这更加真实地模拟了高原环境作业状态下急性肺损伤发生的情况，不足之处是对于单纯运动是否可形成肺组织损伤，我们仅参考了既往文献报道，未再进行验证。

综上所述，根据肺组织病理结果、肺组织含水率的评估、肺泡灌洗液蛋白含量以及炎症指标、氧化应激指标的检测结果，48 h组和72 h组可形成典型的高原肺损伤病理表现。但72 h组死亡率达50%，且时间成本有所增加；48 h组肺组织病理表

现典型，时间成本合理，且有较低的死亡率(20%)。我们的实验结果证明C57BL/6J小鼠在海拔8 000 m环境下，每日跑步运动6 h(运动速度4~6 m/min，高低速循环)，可建立稳定的高原环境肺损伤模型，这为高原肺损伤防治药物的研发提供了一定参考。

作者贡献 张彩云：总体构思，进行实验，数据分析处理，文章撰写；王怡平、王华南：协助实验；梁志欣：监督指导，方案设计，资金获取。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突。

数据共享声明 本论文相关数据可依据合理理由从作者处获取，Email: caiyunwwt@126.com。

参考文献

- Gatterer H, Villafuerte FC, Ulrich S, et al. Altitude illnesses [J]. Nat Rev Dis Primers, 2024, 10 (1): 43.
- El Alam S, Pena E, Aguilera D, et al. Inflammation in pulmonary hypertension and edema induced by hypobaric hypoxia exposure [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23 (20): 12656.
- Wang RJ, Ma SH, Yang J, et al. Sodium hydrosulfide protects rats from hypobaric-hypoxia-induced acute lung injury [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25 (19): 10734.
- Misericocchi G. Physiopathology of high-altitude pulmonary edema [J]. High Alt Med Biol, 2025, 26 (1): 1-12.
- Tsai SH, Huang PH, Tsai HY, et al. Roles of the hypoximimic microRNA-424/322 in acute hypoxia and hypoxia-induced pulmonary vascular leakage [J]. FASEB J, 2019, 33 (11): 12565-12575.
- Wang TT, Hou J, Xiao WJ, et al. Chinese medicinal plants for the potential management of high-altitude pulmonary oedema and pulmonary hypertension [J]. Pharm Biol, 2020, 58 (1): 815-827.
- Ko CL, Lin JA, Chen KY, et al. Netrin-1 dampens hypobaric hypoxia-induced lung injury in mice [J]. High Alt Med Biol, 2019, 20 (3): 293-302.
- Zhou QQ, Wang D, Liu YS, et al. Solnatide demonstrates profound therapeutic activity in a rat model of pulmonary edema induced by acute hypobaric hypoxia and exercise [J]. Chest, 2017, 151 (3): 658-667.
- Shi JP, Liu Z, Li MX, et al. Polysaccharide from Potentilla anserina L ameliorate pulmonary edema induced by hypobaric hypoxia in rats [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 139: 111669.
- Yang XY, Li JJ, Ma Y, et al. Curcumin-mediated enhancement of lung barrier function in rats with high-altitude-associated acute lung injury via inhibition of inflammatory response [J]. Respir Res, 2024, 25 (1): 354.
- Lin X, Wang HY, Pu XY. Protective mechanism of fdft1 in steroid hormone synthesis pathway in SD rats with acute hypoxic injury [J]. Genes Genomics, 2020, 42 (11): 1319-1326.
- Guo QW, Li X, Li WB, et al. A pharmacodynamic evaluation of the protective effects of roxadustat against hypoxic injury at high altitude [J]. Drug Des Devel Ther, 2023, 17: 75-85.