

less posterior chamber intraocular lens implantation in eyes with deficient posterior capsules[J]. J Cataract Refract Surg,2008,34(9):1433-1438.

15 Sinha R, Bansal M, Sharma N, et al. Transscleral Suture-Fixated Versus Intrasceral Haptic-Fixated Intraocular Lens: A Comparative Study[J]. Eye Contact Lens,2016,43(6):389-393.

16 Jacob S. Intrasceral IOL Fixation[J]. Asia Pac J Ophthalmol(Phila),2017,6(4):381-387.

17 Ohta T, Toshida H, Murakami A. Simplified and safe method of sutureless intrasceral posterior chamber intraocular lens fixation: Y-fixation technique[J]. J Cataract Refract Surg,2014,40(1):2-7.

18 Karadag R, Bayramlar H, Sari U. Sutureless intrasceral posterior chamber intraocular lens fixation[J]. J Cataract Refract Surg,2014,40(5):853-854.

19 邹玉平,余惠英,张 楚,等. 玻璃体腔内套结法固定脱位人工晶状体的效果[J]. 中华眼视光学与视觉科学杂志,2012,14(12):734-737.

20 姚 毅,吴 星,宋殊琪,等. 人工晶状体脱入玻璃体腔的手术处理方法[J]. 中华眼外伤职业眼病杂志,2014,36(1):12-15.

[收稿日期 2020-01-09][本文编辑 余 军 吕文娟]

**本文引用格式**  
韦乐强,范 俊,吴冬莲,等. 巩膜瓣下人工晶体深层巩膜固定术的临床疗效分析[J]. 中国临床新医学,2020,13(7):683-687.

课题研究 · 论著

重组人粒细胞集落刺激因子对急性肺损伤  
幼鼠炎症因子表达的影响

莫锦丽, 黄国日, 潘 革, 杨 兰, 黄忠向

基金项目: 广西卫健委计划课题(编号:Z2014457); 南宁市科技攻关计划课题(编号:20153336)

作者单位: 530031 南宁,广西医科大学第三附属医院儿科(莫锦丽,潘 革),检验科(杨 兰),病理科(黄忠向); 530007 南宁,广西医科大学第二附属医院儿科(黄国日)

作者简介: 莫锦丽(1979-),女,医学硕士,主治医师,研究方向:儿童呼吸疾病的诊治。E-mail:279237894@qq.com

通讯作者: 黄国日(1974-),男,大学本科,医学学士,副主任医师,研究方向:儿童危重症的诊治。E-mail:380112810@qq.com

**【摘要】 目的** 探讨重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF)对急性肺损伤幼鼠炎症因子表达的影响。  
**方法** 选取120只SD幼鼠,随机分为实验组和对照组,每组60只。采用经尾静脉注射精制大肠杆菌内毒素脂多糖5 mg/kg建立急性肺损伤模型。实验组采用皮下注射rhG-CSF 30 μg/(kg·d)进行干预,对照组则注射同等剂量的生理盐水,比较两组肺组织及支气管肺泡灌洗液在干预后第5、10、14天转化生长因子β1(TGF-β1)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)和白介素1β(IL-1β)的表达水平。**结果** 在实验干预后第5、10、14天,实验组支气管肺泡灌洗液及肺组织的TGF-β1、TNF-α和IL-1β水平均低于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** rhG-CSF能够有效地减轻急性肺损伤幼鼠的机体炎性反应。  
**【关键词】** 急性肺损伤; 幼鼠; 重组人粒细胞集落刺激因子  
**【中图分类号】** R 332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1674-3806(2020)07-0687-04  
doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2020.07.10

**Effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on the expression of inflammatory factors in young rats with acute lung injury** MO Jin-li, HUANG Guo-ri, PAN Ge, et al. Department of Pediatrics, the Third Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530031, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) on the expressions of inflammatory factors in young rats with acute lung injury. **Methods** One hundred and twenty young Sprague-Dawley (SD) rats were selected and randomly divided into experimental group and control group, with 60 cases in each group. A model of acute lung injury was established by injection of refined lipopolysaccharide of escherichia coli endotoxin 5 mg/kg via tail vein. The experimental group was treated with subcutaneous in-

jection of rhG-CSF 30  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ , and the control group was injected with the same volume of normal saline. The levels of transforming growth factor- $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in lung tissues and bronchoalveolar lavage fluid were compared between the two groups on the 5th, 10th, and 14th days after the intervention. **Results** On the 5th, 10th and 14th days after the experimental intervention, the levels of TGF- $\beta 1$ , TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in bronchoalveolar lavage fluid and lung tissues in the experimental group were significantly lower than those in the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** rhG-CSF can effectively reduce the body's inflammatory response of young rats with acute lung injury.

[**Key words**] Acute lung injury; Young rats; Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF)

急肺损伤为临床常见急危重症,主要病理表现为弥漫性肺泡毛细血管损伤所致的肺水肿,若诊治不及时会进展为急性呼吸窘迫综合征<sup>[1,2]</sup>。急性肺损伤的病死率可达40.0%,是临床危重医学的研究重点<sup>[3]</sup>。急性肺损伤发病机制与机体过度炎症反应所引发的肺血管内皮细胞、肺泡上皮细胞被破坏密切相关,肺部严重的急性炎症反应和中性粒细胞肺炎是其主要组织学特征<sup>[4,5]</sup>。近年有研究<sup>[6]</sup>发现,干细胞能修复急性肺损伤的肺泡上皮细胞和内皮细胞,重建受损的肺组织结构和功能。重组人粒细胞集落刺激因子(recombinant human granulocyte colony-stimulating factor, rhG-CSF)是目前临床常见的干细胞动员剂<sup>[7]</sup>,但关于rhG-CSF对急性肺损伤的治疗效果及具体机制尚未完全明确。本研究旨在通过动物实验探讨rhG-CSF在急性肺损伤治疗中的临床作用,现报告如下。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 选取无特定病原体(specific pathogen free, SPF)健康 Sprague-Dawley (SD) 幼鼠 120 只,均为 3~4 周龄,体重 174~230 (201.32  $\pm$  20.56) g,由广州四和生物科技有限公司提供。采用随机数字表法将实验动物随机分为对照组和实验组,每组 60 只。对照组雄性 20 只,雌性 40 只,平均体重 (201.18  $\pm$  21.21) g;实验组雄性 27 只,雌性 33 只,平均体重 (202.76  $\pm$  22.05) g。两组性别、体重比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),具有可比性。实验开展前,幼鼠均饲养 1 周(饲养温度设置为 21  $^{\circ}\text{C}$ ),自由进食和饮水。饲养观察 1 周无异常后进行实验,实验期间无幼鼠死亡。本实验获得广西医科大学动物实验中心伦理委员会批准。

**1.2 实验主要仪器及试剂** 苏州安泰洁净工作台 (SW-CJ-IFD)、低速离心机 (中佳, SC3614)、大鼠肺泡灌洗液、台式高速冷冻离心机 (湖南湘仪实验仪器开发有限公司, TGL-16)、核酸蛋白测定仪 (德国 Eppendorf, 22331 Hamburg)、ABI7500 荧光 PCR 仪 (美

国爱普拜斯, ABI PRISM<sup>®</sup> 7500 Sequence Detection System)、880 型酶标仪 (德国拜发仪器公司)。试剂:精制大肠杆菌内毒素脂多糖购自美国 Sigma 公司;rhG-CSF (中国医学科学院昆明医学生物研究所, 150  $\mu\text{g}/\text{支}$ )。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 急性肺损伤幼鼠模型建立<sup>[8]</sup>** 经尾静脉注射精制大肠杆菌内毒素脂多糖 5 mg/kg,以建立内毒素性肺损伤幼鼠模型。当幼鼠出现呼吸窘迫、倦怠、蜷缩、对外界刺激敏感、有泡沫状分泌物(带血性)由鼻腔溢出和不喜欢活动等症状,提示造模成功。

**1.3.2 实验干预** 实验组给予皮下注射 rhG-CSF 30  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ,以动员骨髓干细胞;对照组注射同等剂量生理盐水。两组均连续注射 5 d。

**1.3.3 标本采集** 在干预后第 5、10、14 天,两组每次分别经腹腔注射 3% 戊巴比妥钠 (1 mg/kg) 麻醉幼鼠 20 只,并采用断颈法处死。取部分左肺组织,于生理盐水中迅速漂洗干净后立即放入液氮中冷冻,后转入 -70  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中低温保存,备用后续检测。右肺以 10 ml 生理盐水灌洗 3 次,收集灌洗液,800 r/min 离心 5 min,收集上清液置于 -70  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存备用。

**1.4 指标检测** (1)采用酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 法检测支气管肺泡灌洗液转化生长因子  $\beta 1$  (transforming growth factor- $\beta 1$ , TGF- $\beta 1$ )、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 和白介素 1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 水平,实验操作严格按试剂盒说明书操作。(2)采用逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 法检测肺组织匀浆 TGF- $\beta 1$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的 mRNA 表达水平。以  $\beta$ -actin 作为内参。采用 RNA 提取试剂盒 (Engreen, 北京英格恩生物科技有限公司) 提取样品 RNA,经逆转录试剂盒 (BIODEE, 北京拜尔迪生物技术有限公司) 逆转录为 cDNA 进行 RT-PCR,以  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法计算待测因子 mRNA 的相对表达量,引物序列见表 1。

| 表 1 引物序列 |                                |
|----------|--------------------------------|
| TGF-β1   | 上游:5'-TGGGCAGTCAGTCAACTT-3'    |
|          | 下游:5'-GAATCATCAGGATAGAGG-3'    |
| IL-1β    | 上游:5'-GAGGATATTGTCCACCTCCT-3'  |
|          | 下游:5'-ATAGCCTGTTCACTGCTGT-3'   |
| TNF-α    | 上游:5'-TGTGCTCCCTTGCCTTGT-3'    |
|          | 下游:5'-AGTAATGGCTGGATTGATGTC-3' |

1.5 统计学方法 应用 SPSS19.0 统计学软件对数

| 表 2 两组支气管肺泡灌洗液炎症因子在不同时间的表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ ) |                   |                 |                  |                   |                 |                  |                   |                 |                  |
|----------------------------------------------------|-------------------|-----------------|------------------|-------------------|-----------------|------------------|-------------------|-----------------|------------------|
| 组 别                                                | 第 5 天( $n=20$ )   |                 |                  | 第 10 天( $n=20$ )  |                 |                  | 第 14 天( $n=20$ )  |                 |                  |
|                                                    | TGF-β1<br>(pg/ml) | TNF-α<br>(ng/L) | IL-1β<br>(pg/ml) | TGF-β1<br>(pg/ml) | TNF-α<br>(ng/L) | IL-1β<br>(pg/ml) | TGF-β1<br>(pg/ml) | TNF-α<br>(ng/L) | IL-1β<br>(pg/ml) |
| 实验组                                                | 0.57 ± 0.04       | 0.66 ± 0.05     | 0.65 ± 0.03      | 0.42 ± 0.03       | 0.42 ± 0.02     | 0.47 ± 0.04      | 0.34 ± 0.03       | 0.25 ± 0.02     | 0.32 ± 0.02      |
| 对照组                                                | 0.95 ± 0.04       | 0.99 ± 0.04     | 1.07 ± 0.06      | 0.97 ± 0.05       | 1.03 ± 0.06     | 1.10 ± 0.05      | 1.02 ± 0.07       | 0.98 ± 0.07     | 1.00 ± 0.03      |
| $t$                                                | 30.042            | 23.048          | 28.000           | 42.183            | 43.134          | 44.001           | 39.931            | 44.844          | 84.344           |
| $P$                                                | 0.000             | 0.000           | 0.000            | 0.000             | 0.000           | 0.000            | 0.000             | 0.000           | 0.000            |

2.2 两组肺组织炎症因子 mRNA 在不同时间的表达水平比较 干预后第 5、10、14 天实验组肺组织

| 表 3 两组肺组织炎症因子 mRNA 在不同时间的表达水平比较 [ $(\bar{x} \pm s)$ , $2^{-\Delta\Delta CT}$ ] |                 |             |             |                  |             |             |                  |             |             |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-------------|-------------|------------------|-------------|-------------|------------------|-------------|-------------|
| 组 别                                                                            | 第 5 天( $n=20$ ) |             |             | 第 10 天( $n=20$ ) |             |             | 第 14 天( $n=20$ ) |             |             |
|                                                                                | TGF-β1          | TNF-α       | IL-1β       | TGF-β1           | TNF-α       | IL-1β       | TGF-β1           | TNF-α       | IL-1β       |
| 实验组                                                                            | 0.18 ± 0.01     | 0.14 ± 0.01 | 0.23 ± 0.02 | 0.24 ± 0.02      | 0.23 ± 0.02 | 0.31 ± 0.03 | 0.30 ± 0.03      | 0.38 ± 0.03 | 0.51 ± 0.05 |
| 对照组                                                                            | 0.28 ± 0.02     | 0.21 ± 0.02 | 0.62 ± 0.02 | 0.37 ± 0.03      | 0.43 ± 0.04 | 0.50 ± 0.05 | 0.57 ± 0.05      | 0.60 ± 0.06 | 0.72 ± 0.07 |
| $t$                                                                            | 20.000          | 14.000      | 61.664      | 16.125           | 20.000      | 14.572      | 20.708           | 14.667      | 10.917      |
| $P$                                                                            | 0.000           | 0.000       | 0.000       | 0.000            | 0.000       | 0.000       | 0.000            | 0.000       | 0.000       |

3 讨论

3.1 急性肺损伤是儿科中危害较大的疾病之一<sup>[9,10]</sup>。近期研究<sup>[11]</sup>发现干细胞能再生修复急性肺损伤患者肺泡上皮细胞和内皮细胞,重建损伤的肺组织结构并改善患者的肺功能。干细胞动员成为急性肺损伤治疗的新方法,并可能是未来治疗急性肺损伤的主要方式<sup>[12]</sup>。目前关于干细胞治疗急性肺损伤的效果及其机制的研究较少,本研究探究了干细胞动员剂治疗急性肺损伤幼鼠的疗效及其潜在机制,为临床急性肺损伤的治疗提供参考。

3.2 骨髓干细胞动员是利用细胞因子使骨髓中的干细胞进入外周血,通过血液循环到达损伤组织从而达到细胞移植的目的<sup>[13]</sup>。相关研究<sup>[14]</sup>显示,干细胞动员剂具有同时动员骨髓造血干细胞、间质干细胞及内皮干细胞的能力,因而骨髓动员后骨髓的多种干细胞均可参与组织器官的修复。而现阶段所使用的干细胞动员剂主要有粒细胞集落刺激因子、

据进行分析,计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用成组  $t$  检验;计数资料组间比较采用  $\chi^2$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组支气管肺泡灌洗液炎症因子在不同时间的表达水平比较 在实验干预后第 5、10、14 天,实验组支气管肺泡灌洗液 TGF-β1、TNF-α 和 IL-1β 水平低于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 2。

TGF-β1、TNF-α 和 IL-1β 水平低于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 3。

粒细胞集落刺激因子、血管内皮生长因子和干细胞因子等,其中以粒细胞集落刺激因子的应用最为广泛。肺部严重的急性炎症反应以及中性粒细胞肺炎是急性肺损伤患者最为常见的组织学特征,急性肺损伤患者肺泡表面活性物质和炎症因子常存在异常表达现象<sup>[15,16]</sup>。本研究选用 rhG-CSF 对急性肺损伤模型幼鼠进行干预,结果发现干预后第 5、10、14 天实验组支气管肺泡灌洗液的 TGF-β1、TNF-α 和 IL-1β 水平均显著低于对照组,且肺组织的 TGF-β1、TNF-α 和 IL-1β mRNA 水平也均显著低于对照组,提示重组粒细胞刺激因子对急性肺损伤模型幼鼠的肺损伤有一定保护作用,这与其可有效降低炎症因子有关<sup>[17]</sup>。也有研究<sup>[18]</sup>提示,干细胞在损伤局部参与组织修复,并可直接分化成肺泡上皮细胞,肺损伤的修复程度与骨髓干细胞动员剂具有剂量依赖性关系。郭素萍等<sup>[19]</sup>的研究也显示,移植至肺损伤小鼠的干细胞可分化成上皮样细胞,并有效地降低

TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1 和白介素 6(interleukin 6, IL-6) 水平。TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1 和白介素水平与机体炎性反应程度呈正相关,而机体过度炎性反应会导致肺血管内皮细胞和肺泡上皮细胞被破坏,从而促进急性肺损伤发生和进展。rhG-CSF 是近年发现的骨髓干细胞动员剂,属于酪氨酸激酶受体 c-Kit 的配体。应用 rhG-CSF 可使外周血中的骨髓干细胞数量增高数十倍,外周血中干细胞数量增多是其向损伤灶归巢及分化的基础,动员出的干细胞可在肺内定植并向肺上皮细胞分化,减轻机体炎症反应,修复肺损伤<sup>[20]</sup>。

综上所述, rhG-CSF 对急性肺损伤治疗具有积极作用,能够有效地减轻机体的炎症反应,为急性肺损伤治疗提供参考。

## 参考文献

- 1 杨剑榆,黄晓雷,李保珍,等. 白藜芦醇通过抑制 NF- $\kappa$ B 活性减轻大鼠肠缺血再灌注继发性肺损伤的实验研究[J]. 中国临床新医学,2017,10(12):1142-1145.
- 2 蒋云飞,孙 昊,张劲松,等. TLR3/NF- $\kappa$ B 信号通路在百草枯致急性肺损伤的研究[J]. 中华急诊医学杂志,2018,27(6):631-637.
- 3 王 敏. Pro-BNP 与儿童急性肺损伤和急性呼吸窘迫综合征的相关性研究[J]. 中国临床新医学,2018,11(7):643-645.
- 4 李小茜,杨爱东. 急性肺损伤发病机制及中医辨证治疗的思考[J]. 中国中西医结合急救杂志,2018,25(1):9-14.
- 5 Wang J, Shen YC, Chen ZN, et al. Microarray profiling of lung long non-coding RNAs and mRNAs in lipopolysaccharide-induced acute lung injury mouse model [J]. Biosci Rep, 2019, 39(4): BSR20181634.
- 6 郑 洁,杨 素,石杨茹,等. rhG-CSF 联合抗菌药物对急性白血病化疗后中性粒细胞缺乏合并感染患者血清炎症因子的影响[J]. 中华医院感染学杂志,2017,27(23):5344-5347.
- 7 Brú A, Bosch R, Céspedes MV, et al. Antitumoral effect of maintained neutrophilia induced by rhG-CSF in a murine model of pancreatic cancer[J]. Sci Rep, 2019,9(1):2879.
- 8 石 磊,何 英,白 冰,等. 微小 RNA-21 抑制剂对高氧性急

性肺损伤大鼠 II 型肺泡上皮细胞凋亡的影响[J]. 中华危重病急救医学,2017,29(3):244-248.

- 9 孙 谋,孙同文,余言午,等. 脂肪干细胞对脂多糖诱导急性肺损伤大鼠 炎症因子表达的影响[J]. 中华危重病急救医学,2016,28(10):911-915.
- 10 Zhao H, Zhao M, Wang Y, et al. Glycyrrhizic Acid Prevents Sepsis-Induced Acute Lung Injury and Mortality in Rats[J]. J Histochem Cytochem, 2016, 64(2):125-137.
- 11 叶永顺,廖 画,李文丰,等. 骨髓间充质干细胞不同时相干预对 SD 大鼠急性肺损伤的修复作用[J]. 广东医学,2017,38(5):657-661.
- 12 王海斌,石利涛. 骨髓间充质干细胞对老年大鼠髋部骨折后急性肺损伤的保护作用及机制[J]. 中国老年学杂志,2019,39(11):2756-2760.
- 13 沈 鹏. 骨髓间充质干细胞移植对大鼠急性肺损伤的保护作用及其机制研究[J]. 中国现代医学杂志,2016,26(17):13-18.
- 14 刘籽序,张学军. G-CSF 动员干细胞对淋巴细胞的影响[J]. 中国免疫学杂志,2016,32(12):1885-1888.
- 15 周晓霞,张建情,刘春晓,等. 白花前胡有效成分 Pd-Ia 对急性肺损伤的作用及机制研究[J]. 中国药理学通报,2016,32(8):1165-1170.
- 16 张科东,周 凤,付红艳,等. 缺氧诱导因子 1 $\alpha$  对肺组织急性炎症的调控作用研究[J]. 国际呼吸杂志,2020,40(3):183-188.
- 17 张永娜,贺宝霞,赵秀莉,等. 某医院重组人粒细胞刺激因子注射液的临床应用分析[J]. 安徽医药,2019,23(10):2094-2097.
- 18 李程程,孟爱民. G-CSF 动员造血干细胞机制研究进展[J]. 生命科学,2016,28(4):480-485.
- 19 郭素萍,高传玉,刘煜昊. 骨髓干细胞动员剂对大鼠急性心肌梗死肌钙蛋白 I 的影响[J]. 实用诊断与治疗杂志,2005,19(2):114-116.
- 20 毕凌云,郭金岗,张瑞霞,等. 干细胞因子和粒细胞集落刺激因子动员自身骨髓干细胞治疗缺血再灌注肾损伤[J]. 中国组织工程研究,2012,16(41):7681-7687.

[收稿日期 2019-05-14][本文编辑 余 军 吕文娟]

## 本文引用格式

莫锦丽,黄国日,潘 革,等. 重组人粒细胞集落刺激因子对急性肺损伤幼鼠炎症因子表达的影响[J]. 中国临床新医学,2020,13(7):687-690.