

## 论 著

## 新生儿肺炎链球菌肺炎对小鼠肺组织结构和功能的影响

孔潇<sup>1</sup>, 彭欣<sup>1</sup>, 李媛媛<sup>1,2</sup>, 吴毅<sup>1</sup>, 王艺颖<sup>1</sup>, 简鼎<sup>1</sup>, 张光莉<sup>2</sup>, 罗征秀<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所/儿童发育疾病研究教育部重点实验室/国家儿童健康与疾病临床医学研究中心/儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地/儿科学重庆市重点实验室, 重庆 400014; <sup>2</sup>重庆医科大学附属儿童医院呼吸科, 重庆 400014

**[摘要]** 目的 研究新生儿肺炎链球菌肺炎(*S.pp*)对小鼠肺组织结构及功能的影响。方法 50只新生儿(出生后第7天)BALB/c小鼠随机分为*S.pp*组和对照组, 每组25只。其中*S.pp*组鼻腔内滴注 $2 \times 10^7$  cfu肺炎链球菌( $5 \mu\text{l}$ )建立*S.pp*模型, 对照组滴注等量PBS。感染后3周(幼年期)、5周(成年期)收集各组支气管肺泡灌洗液(BALF)及肺组织标本, HE染色检测小鼠肺组织炎症情况及肺泡结构; Masson染色检测肺泡周围胶原纤维沉积情况; ELISA检测BALF中IL-25、IL-33、胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)水平; EMKA动物肺功能检测系统检测成年期小鼠肺阻力。结果 与对照组比较, *S.pp*组小鼠发育至幼年期、成年期时辐射状肺泡计数(RAC)均明显减少[分别为 $(8.00 \pm 1.10)$ 个 vs.  $(3.53 \pm 0.35)$ 个,  $P=0.018$ ;  $(13.73 \pm 2.49)$ 个 vs.  $(4.02 \pm 0.21)$ 个,  $P=0.018$ ]; 平均肺泡截距(MLI)明显增加(分别为 $88.99 \pm 5.55$  vs.  $127.10 \pm 9.54$ ,  $P=0.006$ ;  $74.45 \pm 4.84$  vs.  $131.30 \pm 17.86$ ,  $P=0.020$ ); 肺泡间隔厚度明显增厚[分别为 $(2.38 \pm 0.18) \mu\text{m}$  vs.  $(3.28 \pm 0.13) \mu\text{m}$ ,  $P=0.002$ ;  $(3.41 \pm 0.60) \mu\text{m}$  vs.  $(5.78 \pm 0.75) \mu\text{m}$ ,  $P=0.023$ ]。 *S.pp*组小鼠发育至幼年期平均肺泡直径(MAD)明显增加 $[(167.00 \pm 8.85) \mu\text{m}$  vs.  $(193.40 \pm 5.14) \mu\text{m}$ ,  $P=0.042$ ], 但成年期两组MAD差异无统计学意义。 *S.pp*组小鼠发育至幼年期、成年期肺泡周围炎性细胞浸润较对照组明显增多(分别为 $1.68 \pm 0.24$  vs.  $0.72 \pm 0.12$ ,  $P=0.002$ ;  $1.88 \pm 0.30$  vs.  $0.67 \pm 0.23$ ,  $P=0.006$ )。与对照组比较, 肺炎组小鼠发育至成年期时BALF中IL-25、IL-33及TSLP水平均明显升高[分别为 $(36.16 \pm 2.80) \text{pg/ml}$  vs.  $(45.16 \pm 1.74) \text{pg/ml}$ ,  $P=0.024$ ;  $(52.06 \pm 1.70) \text{pg/ml}$  vs.  $(61.42 \pm 1.50) \text{pg/ml}$ ,  $P=0.004$ ;  $(13.32 \pm 0.74) \text{pg/ml}$  vs.  $(16.71 \pm 0.54) \text{pg/ml}$ ,  $P=0.007$ ]; 肺泡周围胶原纤维沉积明显增多 $(0.01 \pm 0.01$  vs.  $0.44 \pm 0.01$ ,  $P<0.001$ ); 当雾化吸入乙酰甲胆碱浓度达到 $12.5 \sim 50.0 \text{mg/ml}$ 时气道阻力较对照组明显升高( $P<0.001$ )。结论 *S.pp*可诱导BALB/c小鼠平均肺泡计数减少, 平均肺泡截距增大, 肺泡间隔增厚, 气道阻力增加, 导致肺组织结构及功能异常。

**[关键词]** 新生儿; 肺炎链球菌肺炎; 肺组织结构

**[中图分类号]** R563.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0577-7402(2021)06-0574-06

**[DOI]** 10.11855/j.issn.0577-7402.2021.06.07

Effects of neonatal *Streptococcus pneumoniae* pneumonia on lung structure and function of miceKong Xiao<sup>1</sup>, Peng Xin<sup>1</sup>, Li Yuan-Yuan<sup>1,2</sup>, Wu Yi<sup>1</sup>, Wang Yi-Ying<sup>1</sup>, Jian Ding<sup>1</sup>, Zhang Guang-Li<sup>2</sup>, Luo Zheng-Xiu<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Pediatrics, Children's Hospital Affiliated to Chongqing Medical University/Key Laboratory of Child Development Disease, Ministry of Education/National Center for Clinical Medical Research on Child Health and Diseases/National International Scientific and Technological Cooperation Base for Major Diseases of Child Development/Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing 400014, China

<sup>2</sup>Department of Respiratory Medicine, Children's Hospital Affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China

\*Corresponding author, E-mail: luozhengxiu816@163.com

This work was supported by the Chongqing Natural Science Foundation (cstc2020jcyj-msxmX0677), the Key Projects of Chongqing Science and Technology Commission (cstc2017jcyjBX0049), and the Project of Science and Technology Committee of Yuzhong District, Chongqing (20200156)

**[Abstract]** **Objective** To study the effect of *Streptococcus pneumoniae* pneumonia (*S.pp*) on the lung structure and function of mice. **Methods** Fifty neonatal BALB/c mice (1-week-old) were randomly divided into *S.pp* group and control group (25 each). Mice in *S.pp* group were infected intranasally with  $2 \times 10^7$  cfu of *S. pneumoniae* (D39) in  $5 \mu\text{l}$  to establish the *S.pp* model, same

**[基金项目]** 重庆市自然科学基金(cstc2020jcyj-msxmX0677); 重庆市科委重点项目(cstc2017jcyjBX0049); 重庆市渝中区科委项目(20200156)

**[作者简介]** 孔潇, 医学硕士, 主要从事新生儿肺炎链球菌肺炎对小鼠肺发育影响方面的研究

**[通信作者]** 罗征秀, E-mail: luozhengxiu816@163.com

dosage of PBS were used synchronously to treat the mice in control group. Three and five weeks after treatment, lung tissues and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of the two groups were collected, HE staining was performed to detect the pathological changes of lung tissue and alveolar structure; the collagen fiber deposition around alveoli was identified by Masson staining; the levels of IL-25, IL-33 and thymic stromal lymphopoietin (TSLP) in BALF were examined by ELISA. Five weeks after the infection, lung resistance was evaluated by EMKA pulmonary system. **Results** HE staining showed that, compared with control group, the radial alveolar count (RAC) decreased significantly in infancy and adult *S.pp* group ( $8.00 \pm 1.10$  vs.  $3.53 \pm 0.35$ ,  $P=0.018$ ;  $13.73 \pm 2.49$  vs.  $4.02 \pm 0.21$ ,  $P=0.018$ ), the mean linear intercept (MLI) increased obviously ( $88.99 \pm 5.55$  vs.  $127.10 \pm 9.54$ ,  $P=0.006$ ;  $74.45 \pm 4.84$  vs.  $131.30 \pm 17.86$ ,  $P=0.020$ ), and the alveolar septum thickness increased markedly [ $(2.38 \pm 0.18) \mu\text{m}$  vs.  $(3.28 \pm 0.13) \mu\text{m}$ ,  $P=0.002$ ;  $(3.41 \pm 0.60) \mu\text{m}$  vs.  $(5.78 \pm 0.75) \mu\text{m}$ ,  $P=0.023$ ]. Compared with control group, the mean alveolar diameter (MAD) increased significantly in infancy *S.pp* group [ $(167.00 \pm 8.85) \mu\text{m}$  vs.  $(193.40 \pm 5.14) \mu\text{m}$ ,  $P=0.042$ ], but no significant difference existed between control group and adult *S.pp* group. The infiltration of inflammatory cells around alveoli increased obviously in infancy and adult *S.pp* group compared with that in control group ( $1.68 \pm 0.24$  vs.  $0.72 \pm 0.12$ ,  $P=0.002$ ;  $1.88 \pm 0.30$  vs.  $0.67 \pm 0.23$ ,  $P=0.006$ ). Compared with control group, the concentrations of IL-25, IL-33 and TSLP in BALF of adult *S.pp* group increased significantly [ $(36.16 \pm 2.80) \text{pg/ml}$  vs.  $(45.16 \pm 1.74) \text{pg/ml}$ ,  $P=0.024$ ;  $(52.06 \pm 1.70) \text{pg/ml}$  vs.  $(61.42 \pm 1.50) \text{pg/ml}$ ,  $P=0.004$ ;  $(13.32 \pm 0.74) \text{pg/ml}$  vs.  $(16.71 \pm 0.54) \text{pg/ml}$ ,  $P=0.007$ ]; Collagen fiber deposition around alveoli increased markedly [ $(0.01 \pm 0.01) \text{mm}^2$  vs.  $(0.44 \pm 0.01) \text{mm}^2$ ,  $P<0.001$ ], and the airway resistance increased significantly when the concentration of inhaled aerosolized methacholine reached to 12.5–50.0 mg/ml in adult *S.pp* group mice ( $P<0.001$ ). **Conclusion** *Streptococcus pneumoniae* pneumonia may induce the decrease of mean alveolar count, the increase of MLI, the alveolar septum thickness and airway resistance in BALB/c mice, thus lead to abnormal lung tissue structure and function.

**[Key words]** neonatal; *Streptococcus pneumoniae* pneumonia; lung structure

肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, Sp)是儿童社区获得性呼吸道感染最常见的细菌病原体,感染后可急剧增加肺部细菌数量,促使大量白细胞流入肺部,引起弥漫性肺泡上皮细胞损伤<sup>[1]</sup>。流行病学研究发现,新生儿携带和(或)感染肺炎链球菌后,5年内发生哮喘的风险明显增高<sup>[2-3]</sup>。但LaCanna等<sup>[4]</sup>研究发现,成年期小鼠患肺炎链球菌肺炎(*Streptococcus pneumoniae pneumonia*, *S.pp*),肺组织在感染后2周恢复正常,对实验性哮喘的发生无明显影响。*S.pp*后肺组织是否完全恢复不仅依赖于病原微生物是否被彻底清除,也依赖于受损肺组织是否完全再生修复。本课题组前期研究发现,新生儿*S.pp*可导致成年期气道上皮完整性缺失,主要表现为上皮E钙黏蛋白(E-cadherin)、紧密连接蛋白(ZO-1)表达降低<sup>[5]</sup>,因此推测肺泡上皮可能已经发生了损伤。新生儿肺炎链球菌感染促进哮喘发生是否与感染后肺组织结构及功能异常有关目前尚未见报道。因此,本研究探讨了新生儿*S.pp*对肺组织结构、上皮源性细胞因子表达水平及气道反应性的影响,以及新生儿*S.pp*与哮喘发生的关系,以期改善儿童*S.pp*的远期预后提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 8只清洁级BALB/c孕鼠(约28~32 g)购自重庆医科大学实验动物中心[SYXK(渝)2018-0003],饲养于独立通气的消毒饲养盒中。饲养条件:恒温25℃,湿度50%~65%,光

照12 h/d,饲料及饮水充足且均经过消毒处理。自购买后开始观察并准确记录孕鼠的生产时间。所有实验操作均于超净工作台内进行。实验过程符合单位和个人有关实验动物管理和使用的规定。

**1.2 菌株** 肺炎链球菌标准株(D39)由重庆医科大学医学检验、临床检验诊断学教育部重点实验室惠赠。取1 ml标准株接种至THY培养基中,在5%CO<sub>2</sub>、37℃恒温孵箱中培养,待生长至对数期(6~8 h),与50%甘油按7:3混匀后,以1 ml/支分装储存于-80℃冰箱备用。

**1.3 新生儿非致死性*S.pp*模型的建立** 方法参考本课题组前期研究并适当改进<sup>[6]</sup>。将出生后第7天的50只BALB/c小鼠随机分为*S.pp*组与对照组,每组25只,分别给予鼻腔滴注5 μl共计 $2 \times 10^7$  cfu肺炎链球菌或等量PBS。建立模型后监测各组小鼠生命体征,以及是否出现安静少动、体重不增、脱毛等感染表现,感染第2天从*S.pp*组小鼠中通过简单随机抽样法抽取3只小鼠,取全肺进行细菌载量检测,有且仅有肺炎链球菌生长提示建模成功<sup>[6]</sup>,所有实验操作均在超净工作台内进行。

**1.4 标本收集** 两组于建模后3周(幼年期)、5周(成年期)各取8只小鼠麻醉处死,摘取眼球放尽血液,仰卧位固定头部及四肢,暴露胸腔,眼科钳夹闭左肺门,进行支气管肺泡灌洗,收集支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF),气管插管后用PBS洗5次,取BALF 1.2 ml,2500 r/min离心5 min,取上清液保存于-80℃用于后续实验。打开

胸腔,暴露心脏和肺部,剪开左心室,将25号针头插入右心室以PBS冲洗直至肺部颜色变为粉红色或白色。取出右肺,储存于-80℃冰箱,将完整的左肺浸入4%多聚甲醛中,4℃下固定48 h,乙醇脱水后包埋在石蜡中,用于后续肺组织病理检测。

**1.5 细胞因子检测** 采用ELISA法检测成年期小鼠BALF上清液IL-25、IL-33及胸腺基质淋巴细胞生成素(thymic stromal lymphopoietin, TSLP)水平,实验步骤按说明书进行。IL-25、IL-33及TLSP试剂盒购自上海生工生物技术公司。

**1.6 HE染色观察肺组织炎症情况及肺泡结构** 选取S.*pp*组及对照组小鼠各8个左肺组织进行石蜡包埋,肺组织连续切为4 μm的石蜡切片,将石蜡切片脱蜡至水,每只小鼠随机选取3张组织切片进行HE染色。光学显微镜下,每张切片随机选取上、中、下、左、右5个视野(×200),观察肺泡周围炎性细胞浸润情况及肺泡结构。炎症严重程度按以下评分标准进行半定量分析<sup>[7]</sup>:0分,正常;1分,少数炎性细胞;2分,炎性细胞成环,厚度为1个细胞层;3分,炎性细胞成环,厚度为2~4个细胞层;4分,炎性细胞环>4个细胞层。采用软件Image-Pro® 6.0测量辐射状肺泡计数(radial alveolar count, RAC:指从细支气管到其最近胸膜所连接直线穿过的肺泡数)、平均肺泡直径(mean alveolar diameter, MAD:在每个视野下随机取6个肺泡,测量每个肺泡直径,最后取平均值)、平均肺泡截距(mean linear intercept, MLI:参考Dunnill<sup>[8]</sup>的方法,以视野正中为中心划“+”交叉线,计数经此交叉线的肺泡隔数NS,测出“+”字线总长度L,以公式 $MLI=L/NS$ 计算平均肺泡截距,用于估计单个肺泡大小的平均直径)以及平均肺泡间隔厚度(在每个视野下随机选取6个肺泡,测量每个肺泡四周4个点的肺泡间隔厚度,取平均值)。

**1.7 Masson染色检测肺泡周围胶原纤维沉积水平** 分别从两组中各选取3个肺组织进行Masson染色,检测肺泡周围胶原纤维沉积水平。在200倍镜下随机选取5个视野,采用图像分析软件Image-Pro® 6.0测定蓝染色区域(为胶原纤维沉积),取5个视野平均值<sup>[9]</sup>。

**1.8 小鼠肺功能检测** 采用EMKA动物肺功能检测系统检测成年期(6周)小鼠肺阻力,在小鼠意识清醒、自主呼吸正常的状态下,使用梯度乙酰甲胆碱(0、3.125、6.25、12.5、25及50 mg/ml)雾化给药,其中0 mg/ml为生理盐水雾化吸入以测量气道反应性基线,通过生物记录仪检测小鼠呼吸气流及压力变化。每雾化3 min后休息2 min,连续记录5 min,取平均值,得到小鼠通气肺阻力值(lung resistance,

LR)。

**1.9 统计学处理** 采用GraphPad Prim 7.0软件进行统计分析。计量资料符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本t检验;肺阻力指标分析采用双因素方差分析,进一步两两比较采用Bonferroni检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 新生期S.*pp*对小鼠肺泡结构的影响** HE染色结果显示,S.*pp*组小鼠发育至幼年期(3周),RAC较对照组明显减少 $[(8.00 \pm 1.10) \text{个} \text{ vs. } (3.53 \pm 0.35) \text{个}, P=0.018]$ ,MLI、MAD及肺泡间隔厚度较对照组明显增加[分别为 $88.99 \pm 5.55 \text{ vs. } 127.10 \pm 9.54, P=0.042$ ;  $(167 \pm 8.85) \mu\text{m} \text{ vs. } (193.40 \pm 5.14) \mu\text{m}, P=0.042$ ;  $(2.38 \pm 0.18) \mu\text{m} \text{ vs. } (3.28 \pm 0.13) \mu\text{m}, P=0.002$ ]。S.*pp*组小鼠发育至成年期(5周),RAC较对照组明显减少 $[(13.73 \pm 2.49) \text{个} \text{ vs. } (4.02 \pm 0.21) \text{个}, P=0.018]$ ,MLI和肺泡间隔厚度较对照组明显增加[分别为 $74.45 \pm 4.84 \text{ vs. } 131.30 \pm 17.86, P=0.020$ ;  $(3.41 \pm 0.60) \mu\text{m} \text{ vs. } (5.78 \pm 0.75) \mu\text{m}, P=0.023$ ] ,两组间MAD差异无统计学意义 $[(155.50 \pm 6.39) \mu\text{m} \text{ vs. } (173.70 \pm 14.62) \mu\text{m}, P=0.317]$ (图1)。

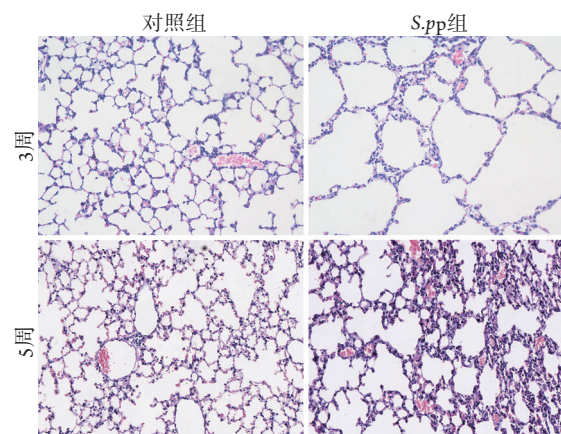


图1 新生期肺炎链球菌肺炎后3周及5周小鼠肺泡结构(HE × 200, n=6)

**Fig.1** Alveolar structure of mice 3 and 5 weeks post neonatal *Streptococcus pneumoniae pneumonia* (HE × 200, n=6)

**2.2 新生期S.*pp*对小鼠肺泡周围胶原纤维沉积的影响** Masson染色结果显示,新生期S.*pp*组小鼠发育至幼年期肺泡周围胶原纤维沉积(即蓝染区域面积)与对照组比较差异无统计学意义 $[(0.04 \pm 0.01) \text{mm}^2 \text{ vs. } (0.07 \pm 0.01) \text{mm}^2, P=0.077]$ ,但是发育至成年期肺泡周围胶原纤维沉积较对照组小鼠明显增多 $[(0.01 \pm 0.01) \text{mm}^2 \text{ vs. } (0.44 \pm 0.01) \text{mm}^2, P < 0.0001]$ ,差异有统计学意义(图2)。

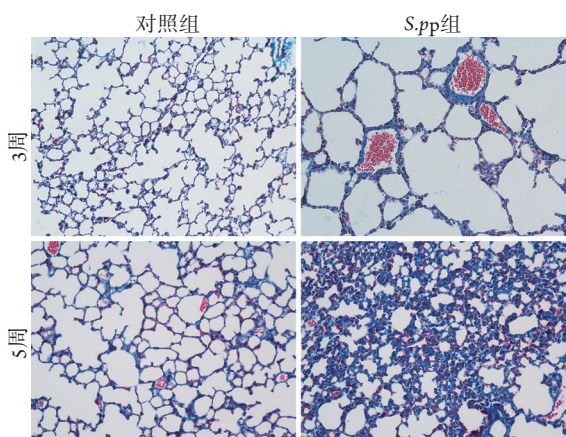


图2 新生儿肺炎链球菌肺炎后3周及5周小鼠肺泡周围胶原纤维沉积情况比较(Masson × 200, n=3)

Fig.2 The collagen fiber deposition around alveoli of mice 3, 5 weeks post neonatal *Streptococcus pneumoniae* pneumonia (Masson × 200, n=3)

2.3 新生儿S.pp对小鼠肺泡周围炎性细胞浸润的影响 HE染色结果显示, 新生儿S.pp组小鼠幼年期及成年期肺泡周围炎性细胞评分较对照组明显增高, 差异有统计学意义[分别为(0.72 ± 0.12)分 vs. (1.68 ± 0.24)分, P=0.002; (0.67 ± 0.23)分 vs. (1.88 ± 0.30)分, P=0.006, 图3]。

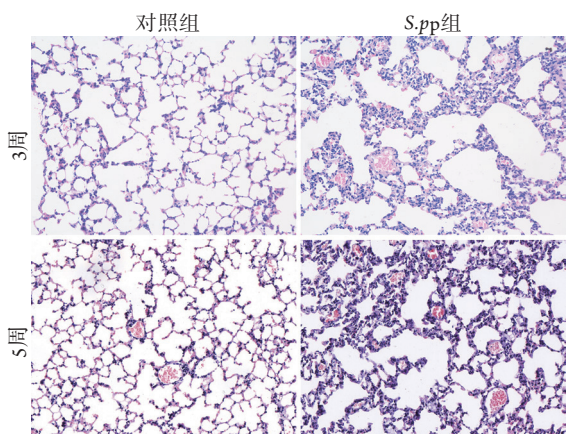


图3 新生儿肺炎链球菌肺炎后3周及5周小鼠肺泡周围炎性细胞浸润情况比较(HE × 200, n=5)

Fig.3 Infiltration of inflammatory cells around alveoli of mice 3, 5 weeks post neonatal *Streptococcus pneumoniae* pneumonia (HE × 200, n=5)

2.4 新生儿S.pp对成年期小鼠BALF中IL-25、IL-33、TSLP表达水平的影响 ELISA检测结果显示, S.pp组小鼠发育至成年期, BALF中IL-25、IL-33、TSLP水平较对照组明显升高[分别为(36.16 ± 2.80) pg/ml vs. (45.16 ± 1.74) pg/ml, P=0.024; (52.06 ± 1.70) pg/ml vs. (61.42 ± 1.50) pg/ml, P=0.004; (13.32 ± 0.74) pg/ml vs. (16.71 ± 0.54) pg/ml, P=0.007], 差异有统计学意义。

2.5 新生儿S.pp对成年期小鼠气道阻力的影响 采用无创肺功能仪分析新生儿S.pp对成年期小鼠气道阻力的影响, 结果显示, 乙酰甲胆碱浓度 ≤ 6.25 mg/ml时两组肺阻力差异无统计学意义, 当乙酰甲胆碱浓度达12.5 mg/ml时, 新生儿S.pp组小鼠气道阻力较对照组明显升高, 差异有统计学意义 (P<0.001, 图4)。

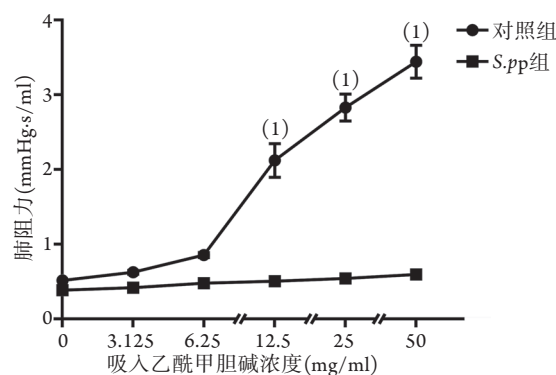


图4 新生儿肺炎链球菌肺炎对成年期小鼠气道阻力的影响(n=5)

Fig.4 Effect of neonatal *Streptococcus pneumoniae* pneumonia on the airway resistance of adulthood mice (n=5) 与对照组比较, (1)P<0.001。

### 3 讨论

流行病学研究发现, 新生儿肺炎链球菌感染后发生持续性喘息或哮喘的风险增加<sup>[10]</sup>, 而临床研究发现, 哮喘患者更易发生S.pp, 可能与上皮损伤导致肺炎链球菌清除率降低有关<sup>[11]</sup>。本课题组前期研究发现, 新生儿肺炎链球菌感染可促进实验性哮喘的发生<sup>[12]</sup>。肺泡是肺部气体交换的主要部位, 具有结构支撑、气体交换、分泌等多种功能。肺部细菌数量急剧增加导致中性粒细胞大量流入肺泡, 中性粒细胞通过分泌中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)和髓过氧化物酶(MPO)杀伤细菌的同时, 也对肺泡上皮细胞造成损伤<sup>[13-14]</sup>。新生儿S.pp促进哮喘发生是否与肺炎后受损肺组织未完全修复导致肺组织结构及功能异常有关尚未见报道。本课题组前期研究发现, 新生儿肺炎链球菌感染可导致成年期肺组织上皮连接蛋白E-cadherin、ZO-1等表达降低<sup>[5]</sup>, 本研究在前期研究的基础上进一步探讨了新生儿S.pp对肺泡上皮完整性和结构的影响。

RAC是评估肺泡化程度的重要指标<sup>[15]</sup>。临床研究发现, 肺泡化主要发生于出生至2岁期间, 但在随后8年内仍持续增加; 小鼠肺泡化在出生后5~30 d完成<sup>[16-17]</sup>。本研究发现, 新生儿S.pp感染小鼠发育至幼年期及成年期时RAC均较对照组明显减少, 提示新生儿S.pp可致小鼠肺泡化降低。MAD及

MLI可反映气体在肺泡中自由活动的空间大小<sup>[18]</sup>。有研究发现持续慢性炎症可导致MLI增加<sup>[19]</sup>，本研究结果显示，新生儿S.pp致幼年期MAD及MLI较对照组明显增大，提示早期感染可致肺泡壁断裂融合，从而使空腔增大、肺泡密度降低，导致肺泡结构异常。肺泡间隔厚度影响气体交换速率，本研究发现新生儿感染S.pp小鼠发育至幼年期及成年期时肺泡间隔明显增厚，提示新生儿肺炎链球菌感染可影响气体交换速率。此外，有研究发现，Ⅱ型肺泡上皮增生及间质纤维化均可导致肺泡间隔增厚<sup>[20]</sup>。本课题组前期研究发现，新生儿患S.pp可致气道周围胶原纤维沉积增多<sup>[5]</sup>，本研究进一步对肺泡周围胶原纤维沉积进行定量分析，发现新生儿S.pp可致成年期肺泡周围胶原纤维沉积明显增多，提示新生儿S.pp可致肺泡间质胶原纤维沉积、肺泡间隔厚度增加，从而使气道阻力增高。

Th1/Th2免疫失衡是支气管哮喘的主要发病机制。本课题组前期研究发现，新生儿S.pp可诱导Th1/Th2免疫失衡<sup>[21-22]</sup>。有研究发现，IL-25、IL-33、TLSP可增强Ⅱ型免疫反应<sup>[23]</sup>，促进炎症反应、黏液产生及肺重塑<sup>[24]</sup>；肺泡上皮受损后分泌的细胞因子IL-25、IL-33、TSLP是促进成纤维细胞增殖分泌胶原纤维的重要介质<sup>[25-27]</sup>；Wang等<sup>[28]</sup>对IL-25、IL-33、TLSP与炎症细胞进行共定位研究证实，IL-25、IL-33、TLSP在促进气道炎症浸润中起关键作用。其中，IL-25可直接通过介导肺泡上皮细胞及成纤维细胞活化而导致胶原纤维沉积增多<sup>[27]</sup>；IL-33为IL-1细胞因子家族成员，可通过基质金属蛋白酶-9(MMP-9)和基质金属蛋白酶组织抑制因子-1(TIMP-1)促进细胞外基质蛋白沉积及肺纤维化发展<sup>[29]</sup>；TSLP为IL-7类细胞因子，可通过肺泡巨噬细胞促进胶原纤维沉积<sup>[26]</sup>，且临床研究显示TSLP抑制剂可减轻过敏性哮喘的气道高反应性，证实了TSLP在肺功能中的关键作用<sup>[30-31]</sup>。本研究发现，新生儿S.pp小鼠发育至成年期时BALF中IL-25、IL-33、TLSP均明显升高，提示新生儿S.pp可促进上皮源性细胞因子IL-25、IL-33、TLSP的产生及肺泡周围胶原纤维的沉积，且可能通过增强Th2型免疫应答促进哮喘的发生。

综上所述，新生儿S.pp可致肺组织不完全修复，诱导肺组织结构及功能异常，促进气道高反应性形成，可能是哮喘发病的潜在危险因素。

#### 【参考文献】

- [1] Zhao W, Pan F, Wang B, et al. Epidemiology characteristics of *Streptococcus pneumoniae* from children with pneumonia in Shanghai: a retrospective study[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2019, 9: 258.
- [2] Weiser JN, Ferreira DM, Paton JC. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion[J]. Nat Rev Microbiol, 2018, 16(6): 355-367.
- [3] Eisenlohr CP, Chartrand EM, Barzaga MR, et al. Impact of pneumococcal vaccine response on asthma exacerbation frequency in young children[J]. Immun Inflamm Dis, 2020, 8(4): 493-496.
- [4] LaCanna R, Liccardo D, Zhang P, et al. Yap/Taz regulate alveolar regeneration and resolution of lung inflammation[J]. J Clin Invest, 2019, 129(5): 2107-2122.
- [5] Wu Y, Kong X, Li QY, et al. Effects of neonatal *Streptococcus pneumoniae* pneumonia on airway epithelial injury of mice[J]. Med J Chin PLA, 2019, 44(11): 919-924. [吴毅, 孔潇, 李沁原, 等. 新生儿小鼠肺炎链球菌肺炎对气道上皮损伤的影响[J]. 解放军医学杂志, 2019, 44(11): 919-924.]
- [6] Yang T, Luo ZX, Fu Z, et al. Establishment of neonatal mouse model of non-lethal *Streptococcus pneumoniae* infection[J]. Chin J Biolog, 2012, 25(7): 905-908. [杨婷, 罗征秀, 符州, 等. 新生儿小鼠非致死性肺炎链球菌感染模型的建立[J]. 中国生物制品学杂志, 2012, 25(7): 905-908.]
- [7] Myou S, Leff AR, Myo S, et al. Blockade of inflammation and airway hyperresponsiveness in immune-sensitized mice by dominant-negative phosphoinositide 3-kinase-TAT[J]. J Exp Med, 2003, 198(10): 1573-1582.
- [8] Dunnill MS. Quantitative methods in the study of pulmonary pathology[J]. Thorax, 1962, 17(4): 320-328.
- [9] Formigli L, Perna AM, Meacci E, et al. Paracrine effects of transplanted myoblasts and relaxin on post-infarction heart remodelling[J]. J Cell Mol Med, 2007, 11(5): 1087-1100.
- [10] Kama Y, Kato M, Yamada Y, et al. The suppressive role of *Streptococcus pneumoniae* colonization in acute exacerbations of childhood bronchial asthma[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2020, 181(3): 191-199.
- [11] Pekuz S, Soysal A, Akkoc G, et al. Prevalence of nasopharyngeal carriage, serotype distribution, and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* among children with chronic diseases[J]. Jpn J Infect Dis, 2019, 72(1): 7-13.
- [12] Tian Y, Tian Q, Wu Y, et al. Vitamin A supplement after neonatal *Streptococcus pneumoniae* pneumonia inhibits the progression of experimental asthma by altering CD4<sup>+</sup>T cell subsets[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 4214.
- [13] Feng J, Dai W, Zhang C, et al. Shen-ling-bai-zhu-san ameliorates inflammation and lung injury by increasing the gut microbiota in the murine model of *Streptococcus pneumoniae*-induced pneumonia[J]. BMC Complement Med Ther, 2020, 20(1): 159.
- [14] Domon H, Oda M, Maekawa T, et al. *Streptococcus pneumoniae* disrupts pulmonary immune defence via elastase release following pneumolysin-dependent neutrophil lysis[J]. Sci Rep, 2016, 6: 38013.
- [15] Rodríguez-Castillo JA, Pérez DB, Ntokou A, et al. Understanding alveolarization to induce lung regeneration[J]. Respir Res, 2018, 19(1): 148.
- [16] Hussain M, Xu C, Ahmad M, et al. Notch signaling: linking embryonic lung development and asthmatic airway remodeling[J]. Mol Pharmacol, 2017, 92(6): 676-693.
- [17] Schittny JC. Development of the lung[J]. Cell Tissue Res, 2017, 367(3): 427-444.
- [18] Hsia CC, Hyde DM, Ochs M, et al. An official research policy

- statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative assessment of lung structure[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 181(4): 394-418.
- [19] Yu N, Sun YT, Su XM, *et al.* Treatment with eucalyptol mitigates cigarette smoke-induced lung injury through suppressing ICAM-1 gene expression[J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(4): BSR20171636.
- [20] Wawryk-Gawda E, Chłapek K, Zarobkiewicz MK, *et al.* CB2R agonist prevents nicotine induced lung fibrosis[J]. *Exp Lung Res*, 2018, 44(7): 344-351.
- [21] Ding F, Fu Z, Liu B. Lipopolysaccharide exposure alleviates asthma in mice by regulating Th1/Th2 and Treg/Th17 balance[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 3220-3229.
- [22] Tian QQ, Liu R, Chen YX, *et al.* The impact of neonatal pneumococcal pneumonia on adult lung immune status and airway hyperresponsiveness in mice[J]. *Immunol J*, 2015, 31(12): 1051-1055. [田琴琴, 刘茹, 陈云秀, 等. 新生儿肺炎链球菌肺炎对成年期肺组织免疫状态及气道高反应的影响[J]. *免疫学杂志*, 2015, 31(12): 1051-1055.]
- [23] Vannella KM, Ramalingam TR, Borthwick LA, *et al.* Combinatorial targeting of TSLP, IL-25, and IL-33 in type 2 cytokine-driven inflammation and fibrosis[J]. *Sci Transl Med*, 2016, 8(337): 337ra65.
- [24] Yi L, Cheng D, Zhang K, *et al.* Intelectin contributes to allergen-induced IL-25, IL-33, and TSLP expression and type 2 response in asthma and atopic dermatitis[J]. *Mucosal Immunol*, 2017, 10(6): 1491-1503.
- [25] Heukels P, Moor CC, von der Thüsen JH, *et al.* Inflammation and immunity in IPF pathogenesis and treatment[J]. *Respir Med*, 2019, 147: 79-91.
- [26] Li G, Jin F, Du J, *et al.* Macrophage-secreted TSLP and MMP9 promote bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019, 366: 10-16.
- [27] Xu X, Luo S, Li B, *et al.* IL-25 contributes to lung fibrosis by directly acting on alveolar epithelial cells and fibroblasts[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2019, 244(9): 770-780.
- [28] Wang W, Li Y, Lv Z, *et al.* Bronchial allergen challenge of patients with atopic asthma triggers an alarmin (IL-33, TSLP, and IL-25) response in the airways epithelium and submucosa[J]. *J Immunol*, 2018, 201(8): 2221-2231.
- [29] Wu L, Luo Z, Zheng J, *et al.* IL-33 can promote the process of pulmonary fibrosis by inducing the imbalance between MMP-9 and TIMP-1[J]. *Inflammation*, 2018, 41(3): 878-885.
- [30] An G, Wang W, Zhang X, *et al.* Combined blockade of IL-25, IL-33 and TSLP mediates amplified inhibition of airway inflammation and remodelling in a murine model of asthma[J]. *Respirology*, 2020, 25(6): 603-612.
- [31] Matera MG, Rogliani P, Calzetta L, *et al.* TSLP inhibitors for asthma: current status and future prospects[J]. *Drugs*, 2020, 80(5): 449-458.

(收稿日期: 2021-02-07; 修回日期: 2021-04-12)

(责任编辑: 张小利)