

## 急性臭氧暴露对小鼠肺功能及肺部炎症的影响

曾梓淇<sup>1</sup>, 张宇博<sup>1</sup>, 刘绍慧<sup>1</sup>, 王雪秀<sup>1</sup>, 陈 浩<sup>2,4</sup>, 邹云峰<sup>3,4</sup>

(1. 广西医科大学公共卫生学院, 南宁 530021; 2. 广西医科大学公共卫生学院环境卫生学教研室, 南宁 530021; 3. 广西医科大学公共卫生学院卫生毒理学教研室, 南宁 530021; 4. 广西高校高发疾病预防与控制研究重点实验室, 南宁 530021)

**摘要** 目的: 探讨不同浓度臭氧急性暴露对小鼠肺功能及肺部炎症的影响。方法: 将63只雄性C57BL/6小鼠随机分为9组, 每天暴露于过滤空气或臭氧( $1.6 \text{ mg/m}^3$ 、 $2.4 \text{ mg/m}^3$ )3 h, 暴露1 d、3 d、5 d后, 使用全身体积描记法检测小鼠肺功能, 取支气管肺泡灌洗液(BALF)进行炎症细胞计数, 苏木精—伊红(HE)染色评估肺组织炎症浸润程度, 免疫组织化学染色检测肺组织降钙素基因相关肽(CGRP)表达水平, 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)和酶联免疫吸附实验(ELISA)分别检测小鼠肺组织肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-13(IL-13)、CXC趋化因子配体-15(CXCL15)mRNA表达及其在BALF中的蛋白浓度。结果: 臭氧暴露使小鼠的肺功能指标发生改变, 表现为呼吸频率(F)下降, 每分钟通气量(Mv)降低, 增强呼吸间歇(Penh)升高( $P < 0.05$ )。从时间效应看, 与同浓度暴露1 d的 $2.4 \text{ mg/m}^3$ 暴露组相比, 连续暴露5 d后Penh及最大呼气流速(PEF)显著下降( $P < 0.05$ )。HE染色结果显示, 急性臭氧暴露可导致小鼠肺部炎性细胞浸润和气道狭窄。免疫组织化学染色结果显示,  $1.6 \text{ mg/m}^3$ 臭氧连续暴露3 d后肺组织中CGRP蛋白的平均光密度值及其阳性细胞占比升高( $P < 0.05$ ); BALF炎症细胞计数提示, 臭氧暴露组小鼠的炎症细胞总数升高(均 $P < 0.05$ )。RT-qPCR和ELISA分析表明,  $2.4 \text{ mg/m}^3$ 连续3 d臭氧暴露可显著提升促炎因子(TNF- $\alpha$ 、IL-6、CXCL15)水平, 降低抗炎因子IL-13水平(均 $P < 0.05$ )。结论: 急性臭氧暴露可引发肺功能下降和呼吸道炎症水平升高, 且呈现一定的剂量和时间效应关系。

**关键词** 臭氧; 肺功能; 肺部炎症; 肺部结构

中图分类号: R114 文献标志码: A 文章编号: 1005-930X(2025)04-0552-09

DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2025.04.009

### Effects of acute ozone exposure on pulmonary function and inflammation in mice

ZENG Ziqi<sup>1</sup>, ZHANG Yubo<sup>1</sup>, LIU Shaohui<sup>1</sup>, WANG Xuexiu<sup>1</sup>, CHEN Hao<sup>2,4</sup>, ZOU Yunfeng<sup>3,4</sup>. (1. School of Public Health, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Department of Environmental Health, School of Public Health, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 3. Department of Toxicology, School of Public Health, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 4. Guangxi Colleges and Universities Key Laboratory of Prevention and Control of Highly Prevalent Diseases, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

**Abstract** Objective: To investigate the effects of acute ozone exposure at different concentrations on pulmonary function and inflammation in mice. Methods: Sixty-three male C57BL/6 mice were randomly divided into 9 groups and exposed daily to filtered air or ozone ( $1.6 \text{ mg/m}^3$ ,  $2.4 \text{ mg/m}^3$ ) for 3 hours. After 1, 3, and 5 days of exposure, pulmonary function of the mice was assessed by whole-body plethysmography. Inflammatory cells were counted in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). The degree of pulmonary inflammatory infiltration was evaluated via hematoxylin-eosin (HE) staining. The expression level of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in lung tissue was analyzed by immunohistochemistry. The mRNA expression levels of inflammatory cytokines tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), interleukin-13 (IL-13), and CXC chemokine ligand-15 (CXCL15) in mouse lung tissues and their protein concentrations in BALF, were detected by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), respectively. Results: Ozone exposure induced changes in the pulmonary function indices of mice, characterized by a

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 82203985); 广西壮族自治区教育厅资助项目(No.2024KY0106)

[通信作者] 邹云峰, E-mail: zouyunfeng@gxmu.edu.cn; 陈浩, E-mail: haochenx@sr.gxmu.edu.cn

[收稿日期] 2025-04-07

decrease in respiratory frequency (F) and minute ventilation (Mv), and an increase in enhanced pause (Penh) ( $P < 0.05$ ). From the perspective of time-response, compared with the 2.4 mg/m<sup>3</sup> exposure group exposed to the same concentration for 1 day, Penh and peak expiratory flow (PEF) were significantly decreased after 5 consecutive days of exposure ( $P < 0.05$ ). HE staining showed acute ozone exposure could lead to pulmonary inflammatory cell infiltration and airway stenosis in mice. Immunohistochemistry revealed that compared with the filtered air control group, the mean optical density value of CGRP protein and the proportion of CGRP-positive cells in lung tissues were increased after 3 consecutive days of 1.6 mg/m<sup>3</sup> ozone exposure. The BALF inflammatory cell counts indicated that the total number of inflammatory cells in mice of the ozone groups was increased (all  $P < 0.05$ ). RT-qPCR and ELISA analyses showed that continuous exposure to 2.4 mg/m<sup>3</sup> ozone for 3 days could significantly increase the levels of pro-inflammatory factors TNF- $\alpha$ , IL-6, CXCL15 and decrease the level of anti-inflammatory factor IL-13 (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Acute ozone exposure can reduce pulmonary function and increase respiratory inflammation, with dose- and time-response relationships.

**Keywords** ozone; pulmonary function; pulmonary inflammation; pulmonary structure

地表臭氧是光化学烟雾的主要成分<sup>[1]</sup>,其形成依赖于人类活动排放的氮氧化物(nitrogen oxides, NO<sub>x</sub>)和挥发性有机化合物(volatile organic compounds, VOCs)在光照下的光化学反应<sup>[2]</sup>。臭氧分子中的氧原子具有强亲电性<sup>[3]</sup>,可通过氧化作用攻击呼吸道上皮细胞膜中的不饱和脂肪酸(如C=C双键)引发脂质过氧化反应<sup>[4]</sup>,生成大量活性氧及脂质过氧化物,最终导致肺部炎症和功能损伤<sup>[5]</sup>。

前期研究表明,大气污染物的联合暴露会导致炎症因子释放和免疫功能受损<sup>[6]</sup>;而臭氧作为大气污染物的成分之一,在疾病的发生、发展中亦发挥了重要作用。流行病学证据表明,短期急性臭氧暴露与呼吸系统疾病密切相关,臭氧浓度升高可加剧儿童急性哮喘症状。研究发现,在臭氧浓度每增加1个四分位间距时,儿童哮喘住院风险显著增加<sup>[7]</sup>。此外,一项针对健康非吸烟女性的研究发现,室外臭氧暴露可显著降低第1秒用力呼气量(FEV1)及用力肺活量(FVC)等肺功能指标<sup>[8]</sup>。这些研究为理解臭氧对呼吸系统的危害提供了重要依据,但仍存在一些不足。现有动物模型在进行臭氧毒性机制验证时,较少考虑敏感的暴露剂量和时间,导致阴性结果或实验间结果的可比性较低。本研究通过将C57BL/6小鼠暴露于不同浓度(0 mg/m<sup>3</sup>、1.6 mg/m<sup>3</sup>、2.4 mg/m<sup>3</sup>)及不同时间(1 d、3 d、5 d)的臭氧环境中,探讨臭氧暴露对小鼠肺功能和肺部炎症的影响,以寻找暴露的敏感剂量和时间点。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物分组与臭氧暴露 63只6周龄SPF

级雄性C57BL/6野生型小鼠(体质量20~25 g)购自并饲养于广西医科大学实验动物中心,本实验已取得广西医科大学实验动物伦理委员会批准(审批号:202404017)。小鼠适应性饲养1周后,采用3×3析因设计法进行随机分组,臭氧浓度(0 mg/m<sup>3</sup>、1.6 mg/m<sup>3</sup>、2.4 mg/m<sup>3</sup>)与暴露时间(1 d、3 d、5 d)交叉组合,共9组。具体分组如下:暴露1 d+0 mg/m<sup>3</sup>组、暴露1 d+1.6 mg/m<sup>3</sup>组、暴露1 d+2.4 mg/m<sup>3</sup>组、暴露3 d+0 mg/m<sup>3</sup>组、暴露3 d+1.6 mg/m<sup>3</sup>组、暴露3 d+2.4 mg/m<sup>3</sup>组、暴露5 d+0 mg/m<sup>3</sup>组、暴露5 d+1.6 mg/m<sup>3</sup>组、暴露5 d+2.4 mg/m<sup>3</sup>组。各组小鼠每日于暴露舱内接受对应浓度臭氧暴露3 h(0 mg/m<sup>3</sup>组通入过滤空气)。臭氧暴露1 d、3 d、5 d后,立即对小鼠进行肺功能检测并采集支气管肺泡灌洗液(BALF)及肺组织用于后续分析。实验技术路线图见图1。使用臭氧暴露舱(上海塔望智能科技有限公司)进行动物呼吸道染毒。

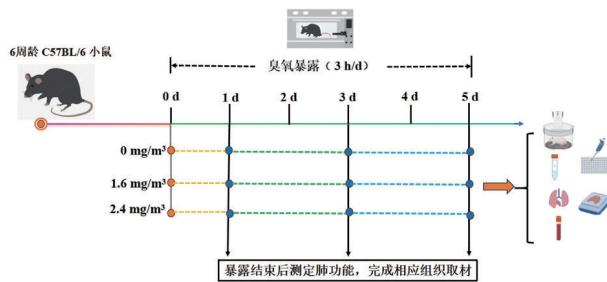


图1 实验技术路线图

**1.2 仪器与试剂** WBP全身体积描记系统(上海塔望智能科技有限公司);细胞涂片机(美国Thermo Fisher公司);台式高速冷冻离心机(湖南湘

仪实验室仪器开发有限公司);多功能酶标仪(美国 BioTek 公司);实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)仪(美国 Thermo Fisher 公司);低温研磨仪(武汉塞维尔生物科技有限公司);酶联免疫吸附实验(ELISA)检测试剂盒(上海原鑫生物科技有限公司);兔降钙素基因相关肽(CGRP)抗体(北京博奥森生物技术有限公司);RT all-in-one Mix 逆转录试剂盒(北京启衡星生物科技有限公司)。

**1.3 肺功能检测** 采用 WBP 全身体积描记系统检测呼吸功能,每只小鼠持续监测 45 min,截取连续 10 min 数据段进行呼吸参数分析。检测吸气时间(TI)、呼气时间(TE)、最大吸气流速(PIF)、最大呼气流速(PEF)、呼吸频率(F)、每分钟通气量(Mv)、增强呼吸间歇(Penh)等指标。

#### 1.4 ELISA 法检测小鼠 BALF 中炎症因子水平

钝性分离气管周围结缔组织后预置缝合线,于气管上做一纵行切口,插入钝头套管针,随后打结固定缝合线。使用 1 mL 无菌注射器抽取 0.7 mL PBS 经套管针缓慢灌注,轻揉胸廓 10 s 后回抽灌洗液,重复 3 次,回收液置于 EP 管中。按 ELISA 试剂盒说明书步骤,检测 BALF 上清液中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-13(IL-13)、CXC 趋化因子配体-15(CXCL15)水平。

**1.5 细胞涂片及炎症细胞分类计数** (1)BALF 炎症细胞计数:将收集的 BALF 吹打混匀后,取出 10  $\mu$ L 置于计数板上,显微镜下计数 4 个象限内的总细胞数(N),依据细胞计数公式: $n=N/4 \times 10^4 \times 10$ ,计算 1 mL BALF 中的炎症细胞总数。(2)细胞涂片制作:计算涂片 50 000 个细胞所需的 BALF 体积,取对应体积的 BALF 加入新的 EP 管,将定量后的 BALF 在 4  $^{\circ}$ C 条件下以 1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,向管底细胞沉淀中加入 140  $\mu$ L 含 5% BSA 的 PBS 溶液重悬细胞,将混匀的细胞悬液转移到一次性细胞漏斗中,固定漏斗与载玻片,涂片机 1 000 r/min 离心 5 min,使细胞悬液均匀涂布到载玻片上,随后自然风干。(3)涂片染色:将载玻片置于甲醛溶液中固定 20 s 后,依次浸于迪夫染色液 I 染色 5 s、迪夫染色液 II 染色 15 s,立即取出水洗、风干。使用 EVOS 显微镜对染色后的涂片进行拍照、保存。40 倍镜下选择视野区域,根据细胞形态学特征,对该视野区域的巨噬细胞、淋巴细胞、中性粒细胞进行分类,并计算 100 个细胞中各类炎症细胞占比。

#### 1.6 苏木精—伊红(HE)染色和免疫组织化学染色

左肺组织离体后立即浸入 4% 多聚甲醛溶液中室温固定 24 h,经梯度乙醇脱水、二甲苯透明处理后,石蜡包埋并制备 4  $\mu$ m 厚切片;干燥后二甲苯梯度脱蜡、乙醇水化,行 HE 染色,在光学显微镜下观察肺组织病理变化。水化进行抗原修复后使用 BSA 封闭,经兔抗 CGRP 及 HRP 二抗孵育后行 DAB 显色,随后苏木精复染、封片,显微镜下观察 CGRP 在肺组织中的表达和定位。

#### 1.7 RT-qPCR 法检测肺组织中炎症因子表达

取小鼠肺组织,研磨后使用 Trizol 试剂提取总 RNA,将 RNA 逆转录为 cDNA,使用 Power Up SYBR Green Master Mix 预混液按照 10  $\mu$ L 总反应体系进行 PCR 扩增。qPCR 反应条件:95  $^{\circ}$ C 预变性 3 min,共 40 个循环,每个循环依次为:95  $^{\circ}$ C 循环反应 30 s,60  $^{\circ}$ C 下退火、延伸 60 s,完成新链的合成。以 18s 为内参基因,采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算目的基因相对表达量。PCR 引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

基因名称	上/下游	引物序列(5'~3')
18s	上游	GGGAGCCTGAGAACGGC
	下游	GGGTCGGAGTGGTAATT
IL-6	上游	CAAAGCCAGAGTCCTTCAGAG
	下游	AGCATTGGAAATTGGGGTAG
TNF- $\alpha$	上游	TCTTCTCATCCTGCTTGTGG
	下游	ATGAGAGGGAGGCCATTG
IL-13	上游	GGCAGCAGCTTGAGCACATT
	下游	GGCATAGGCAGCAAACCATG
CXCL15	上游	GGTGATATTGAGACCATTACTG
	下游	GCCAACAGTAGCCTCACCCAT

**1.8 统计学方法** 所有数据使用 GraphPad Prism 10.3 软件进行统计分析。连续变量以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。两组以上差异显著性评估采用单因素方差分析,进一步两组比较采用 Dunnett Tukey 检验。使用 Image J 对 CGRP 蛋白阳性细胞占比及平均光密度进行半定量分析。以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 小鼠体征** 暴露期间,所有小鼠正常摄食、饮水,各组小鼠在暴露前、后体质量变化差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(图 2)。实验期间,过滤空气对照

组小鼠皮毛整洁有光泽,可自主活动;而臭氧暴露组小鼠活动范围缩减,被毛粗糙无光泽,精神萎靡。

**2.2 臭氧暴露对小鼠肺功能的影响** C57BL/6小鼠经臭氧暴露后出现呼吸功能损伤,具体表现为:(1)呼吸节律异常:臭氧暴露导致F降低、TI及TE延长;(2)气道阻力升高:Penh作为气道阻力指标,随着臭氧浓度增加而上升;(3)通气功能抑制:在臭氧

暴露组中,PIF、Mv降低,而PEF在暴露1 d时升高,在连续暴露5 d后流速降低( $P<0.05$ )。与暴露1 d相比,1.6 mg/m<sup>3</sup>臭氧持续暴露3 d和5 d后,Penh显著降低( $P<0.05$ ),而2.4 mg/m<sup>3</sup>臭氧连续暴露5 d后TI较暴露1 d延长( $P<0.05$ ),提示呼吸模式可能发生代偿性改变,见表2。

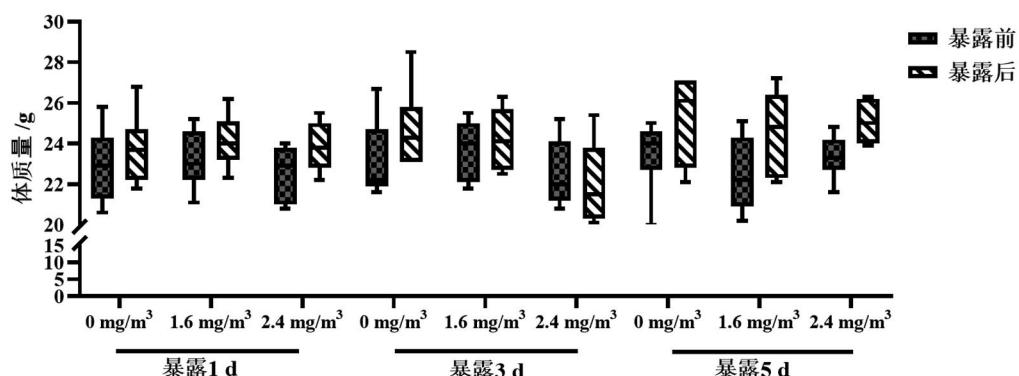


图2 各组小鼠体质量在暴露前及暴露后的变化情况(n=7)

表2 臭氧暴露前、后小鼠肺功能变化

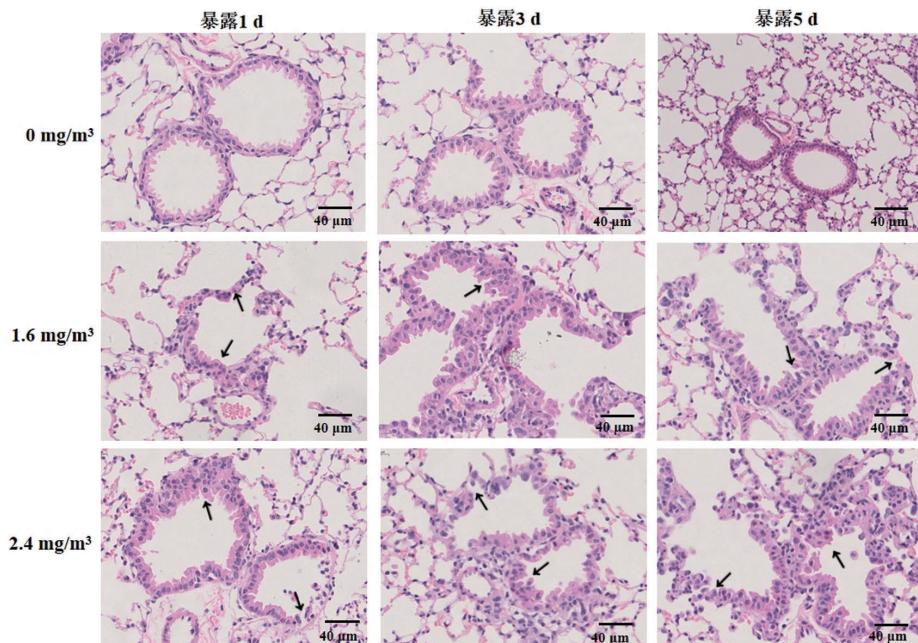
肺功能指标	暴露时间/d	臭氧暴露浓度/(mg/m <sup>3</sup> )			$\bar{x} \pm s, n=7$
		0	1.6	2.4	
TL/s	1	0.05±0.01	0.09±0.02*	0.09±0.01*	
	3	0.06±0.02	0.11±0.01*	0.08±0.02 <sup>#</sup>	
	5	0.06±0.01	0.107±0.03	0.14±0.04* <sup>#△▲</sup>	
TE/s	1	0.13±0.02	0.30±0.05*	0.33±0.11*	
	3	0.14±0.02	0.26±0.05*	0.26±0.10*	
	5	0.15±0.06	0.25±0.05*	0.25±0.08*	
PIF/(mL/s)	1	2.94±0.31	2.54±1.13	1.90±0.32*	
	3	2.96±0.89	1.46±0.60*	1.92±1.02*	
	5	3.27±0.51	1.70±0.79*	1.35±0.86*	
PEF/(mL/s)	1	2.11±0.15	3.55±1.42	3.58±0.58*	
	3	2.08±0.39	1.81±0.65	2.66±1.39	
	5	2.30±0.41	1.60±0.44* <sup>△</sup>	1.51±0.39* <sup>△</sup>	
F/(N/min)	1	363.42±56.71	188.96±31.15*	163.85±42.50*	
	3	343.29±75.92	176.24±20.83*	215.44±87.44*	
	5	372.25±101.72	200.68±56.86*	174.08±54.40*	
Mv/mL	1	32.32±6.34	20.93±9.48	14.30±5.01*	
	3	34.51±10.63	14.73±3.60*	21.34±13.29	
	5	37.40±10.08	17.56±7.75*	14.07±7.37*	
Penh	1	1.86±0.63	10.46±2.49*	14.26±5.21*	
	3	1.64±0.71	6.40±2.68* <sup>△</sup>	7.50±4.53*	
	5	1.96±0.92	4.75±1.86* <sup>△</sup>	6.84±2.39* <sup>△</sup>	

Penh=(Te-Tr)/Tr(PEF/PIF),式中Tr为松弛时间,指呼气时压力下降到36%的时间。相同暴露时间下,与0 mg/m<sup>3</sup>相比,\* $P<0.05$ ;相同暴露时间下,与1.6 mg/m<sup>3</sup>相比,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;相同暴露浓度下,与暴露1 d相比,<sup>△</sup> $P<0.05$ ;相同暴露浓度下,与暴露3 d相比,<sup>▲</sup> $P<0.05$ 。

**2.3 臭氧暴露后小鼠肺部病理学改变** HE染色结果显示,0 mg/m<sup>3</sup>组小鼠的肺组织结构清晰,未发现明显炎性改变,而1.6 mg/m<sup>3</sup>、2.4 mg/m<sup>3</sup>臭氧暴露小鼠支气管周围出现炎性细胞的浸润、支气管壁增厚、气道狭窄等病理改变,且肺部炎症随着臭氧暴露浓度升高而增加(图3)。从暴露时间角度来看,3 d和5 d臭氧暴露所致肺组织损伤未见显著差异。

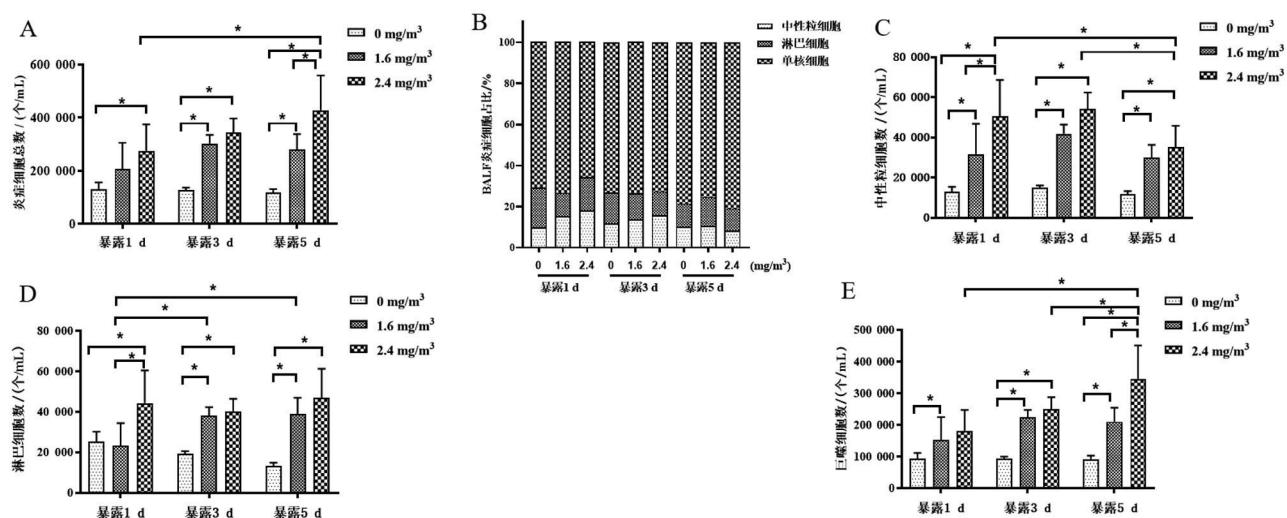
**2.4 臭氧暴露对小鼠BALF中炎症细胞总数及各类炎症细胞占比的影响** 与0 mg/m<sup>3</sup>组相比,1.6

mg/m<sup>3</sup>、2.4 mg/m<sup>3</sup>组BALF中炎症细胞总数增加( $P < 0.05$ )(图4A)。各类炎症细胞占比在暴露前、后差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(图4B)。进一步计算各类炎症细胞在BALF中的浓度,结果显示,中性粒细胞数、淋巴细胞数、巨噬细胞数随着臭氧暴露浓度的增加而增加,在2.4 mg/m<sup>3</sup>浓度下,暴露5 d较暴露1 d中性粒细胞数减少,巨噬细胞数增加( $P < 0.05$ );1.6 mg/m<sup>3</sup>浓度下,连续暴露3 d较暴露1 d淋巴细胞数增加( $P < 0.05$ )(图4C、图4D、图4E)。



臭氧暴露后小鼠肺部形态学改变( $\times 20$ );黑色箭头指示肺部炎性细胞浸润、支气管壁增厚等肺部炎性改变。

图3 臭氧暴露诱导小鼠肺部病理学改变( $n=3$ )



A: BALF中炎症细胞总数;B: BALF细胞涂片各类炎症细胞占比;C: 1 mL BALF中中性粒细胞数;D: 1 mL BALF中淋巴细胞数;E: 1 mL BALF中巨噬细胞数;组间比较,\* $P < 0.05$ 。

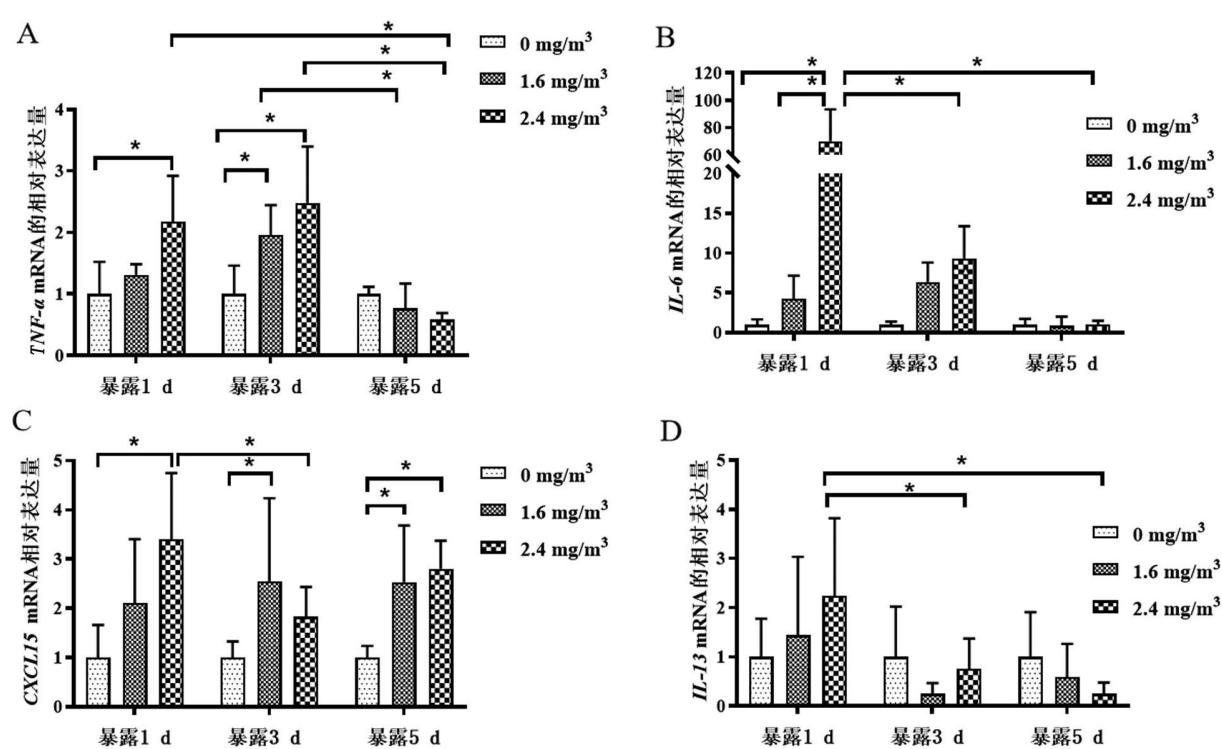
图4 臭氧暴露后小鼠BALF中炎症细胞总数和各类炎症细胞数量及占比改变( $n=6$ )

**2.5 臭氧暴露对小鼠肺组织中炎性因子 mRNA 表达水平的影响** 与  $0 \text{ mg/m}^3$  组相比, 3 种炎症因子在  $2.4 \text{ mg/m}^3$  臭氧浓度下暴露 1 d 时的表达量升高, 而在连续暴露 3 d 或 5 d 后呈现不同程度的下降趋势。从暴露的浓度效应看, 与  $0 \text{ mg/m}^3$  组相比, 在暴露 1 d 时,  $2.4 \text{ mg/m}^3$  组促炎因子  $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-6}$ 、 $\text{CXCL15}$  表达上调 ( $P < 0.05$ ); 连续暴露 3 d 时,  $1.6 \text{ mg/m}^3$  组促炎因子  $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{CXCL15}$  表达上调 ( $P < 0.05$ )。从时间效应角度看, 与暴露 1 d 相比, 连续 3 d 暴露于  $2.4 \text{ mg/m}^3$  臭氧下  $\text{IL-13}$ 、 $\text{CXCL15}$  表达下调 ( $P < 0.05$ ); 与暴露 3 d 相比, 连续 5 d 暴露于  $1.6 \text{ mg/m}^3$  臭氧下促炎因子  $\text{TNF-}\alpha$  表达下调 ( $P < 0.05$ ); 与暴露 1 d 相比, 连续 5 d 暴露于  $2.4 \text{ mg/m}^3$  臭氧下促炎因子  $\text{IL-6}$  及抗炎因子  $\text{IL-13}$  表达下调 ( $P < 0.05$ ), 见图 5。

**2.6 臭氧暴露对小鼠肺部炎性因子及 CGRP 蛋白水平的影响** ELISA 结果显示,  $1.6 \text{ mg/m}^3$  臭氧连续暴露 3 d 是炎症因子蛋白表达水平升高的关键时间一剂量节点。从浓度效应角度看, 臭氧连续暴露 3 d 时,  $1.6 \text{ mg/m}^3$  组 4 种炎症因子的蛋白水平较  $0 \text{ mg/m}^3$

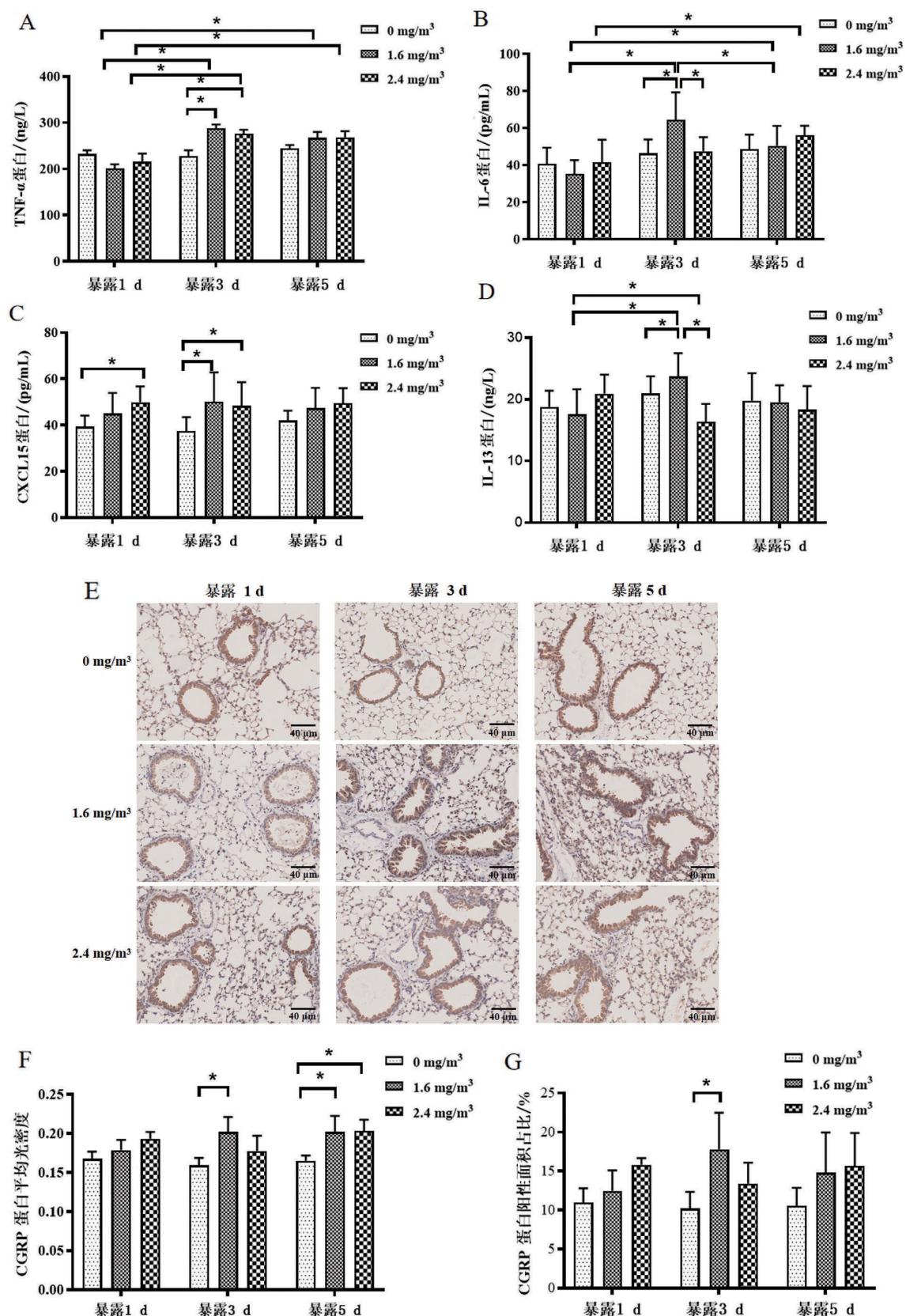
组升高 ( $P < 0.05$ ), 而  $2.4 \text{ mg/m}^3$  组  $\text{IL-6}$  和  $\text{IL-13}$  蛋白水平与  $0 \text{ mg/m}^3$  组比较无显著差异 ( $P > 0.05$ ); 臭氧暴露 1 d 和 5 d 时,  $1.6 \text{ mg/m}^3$  和  $2.4 \text{ mg/m}^3$  组  $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-6}$  和  $\text{IL-13}$  的蛋白水平较  $0 \text{ mg/m}^3$  组均无显著变化 ( $P > 0.05$ );  $\text{CXCL15}$  蛋白水平仅在  $2.4 \text{ mg/m}^3$  臭氧暴露 1 d 时显著升高 ( $P < 0.05$ )。在时间效应方面, 暴露于  $1.6 \text{ mg/m}^3$  臭氧下连续 3 d,  $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-6}$ 、 $\text{IL-13}$  的蛋白水平较暴露 1 d 升高 ( $P < 0.05$ ); 连续暴露 5 d 时  $\text{IL-6}$  蛋白水平较暴露 1 d 升高 ( $P < 0.05$ )。暴露于  $2.4 \text{ mg/m}^3$  臭氧下连续 3 d、5 d,  $\text{TNF-}\alpha$  蛋白水平较暴露 1 d 升高 ( $P < 0.05$ ), 而  $\text{IL-6}$  的蛋白水平仅在连续暴露 5 d 时上升 ( $P < 0.05$ ), 见图 6A~图 6D。

免疫组织化学染色结果显示, 肺组织 CGRP 主要在支气管上皮细胞表达 (图 6E)。 $1.6 \text{ mg/m}^3$  臭氧暴露 3 d 后 CGRP 蛋白的平均光密度值及其阳性细胞占比升高 (均  $P < 0.05$ ), 见图 6F、图 6G。提示  $1.6 \text{ mg/m}^3$  臭氧暴露 3 d 可能是臭氧诱导神经源性炎症的敏感响应期。



A:各组小鼠肺组织中  $\text{TNF-}\alpha$  mRNA 相对表达量比较;B:各组小鼠肺组织中  $\text{IL-6}$  mRNA 相对表达量比较;C:各组小鼠肺组织中  $\text{CXCL15}$  mRNA 相对表达量比较;D:各组小鼠肺组织中  $\text{IL-13}$  mRNA 相对表达量比较;组间比较, $*P < 0.05$ 。

图 5 臭氧暴露对小鼠肺部炎性因子 mRNA 表达水平的影响 ( $n=6$ )



A: 各组小鼠 BALF 中 TNF- $\alpha$  蛋白水平比较; B: 各组小鼠 BALF 中 IL-6 蛋白水平比较; C: 各组小鼠 BALF 中 CXCL15 蛋白水平比较; D: 各组小鼠 BALF 中 IL-13 蛋白水平比较; E: 免疫组织化学染色定位各组小鼠肺组织中 CGRP 表达( $\times 20$ ); F: 肺组织中 CGRP 蛋白平均光密度值; G: 肺组织中 CGRP 蛋白阳性细胞占比; 组间比较, \* $P < 0.05$ 。

图 6 臭氧暴露对小鼠肺部炎性因子及 CGRP 蛋白水平的影响( $n=6$ )

### 3 讨 论

臭氧是我国城市夏季常见的大气污染物,其对人群健康的危害备受关注<sup>[9]</sup>。本研究通过构建不同浓度一时间的动物臭氧暴露模型,探讨臭氧暴露对肺功能和肺部炎症的影响,以寻找臭氧暴露引发健康危害的敏感剂量和时间点。本研究结果显示,1.6 mg/m<sup>3</sup>臭氧连续暴露3 d为小鼠急性臭氧暴露产生效应的敏感暴露方案。

本研究选取1.6 mg/m<sup>3</sup>和2.4 mg/m<sup>3</sup>的臭氧浓度进行小鼠暴露实验。这两个浓度的选择理由如下:(1)由于小鼠和人经呼吸道暴露于臭氧的等效转化比为4:1,因此1.6 mg/m<sup>3</sup>和2.4 mg/m<sup>3</sup>的浓度可近似等效于标准条件下(25 °C, 101 kPa)人类暴露于0.4~0.6 mg/m<sup>3</sup>的臭氧环境中<sup>[10]</sup>;(2)0.4~0.6 mg/m<sup>3</sup>可以代表美国洛杉矶、中国上海等地高污染期间的环境臭氧浓度;(3)既往研究表明,啮齿类动物于1.6~2.4 mg/m<sup>3</sup>暴露环境下,可导致肺部炎症指标显著增加。

本实验结果发现,臭氧暴露可显著影响小鼠的肺功能指标。气道高反应性指标Penh值升高,表明气道阻力增加。此前文献指出,臭氧通过刺激呼吸道内的C纤维<sup>[11]</sup>,引发神经反射性支气管收缩。同时,神经肽P物质的释放增加细胞通透性和炎症细胞趋化作用,导致气道黏膜水肿和炎性细胞浸润<sup>[12]</sup>,使气道对刺激物更加敏感。这一过程与流行病学研究中患有肺功能疾病的患者更易感臭氧的现象相似<sup>[13]</sup>。此外1.6 mg/m<sup>3</sup>臭氧暴露3 d后Penh值较暴露1 d有所降低,提示机体可能存在气道反应性的适应过程。这一发现与Lee等<sup>[14]</sup>动物模型中高浓度臭氧暴露诱导持续性支气管收缩伴气道反应性降低的结论基本一致。与0 mg/m<sup>3</sup>组相比,臭氧暴露后PEF呈现“先升后降”的变化趋势,而Mv在时间梯度上没有显著差异。表明暴露初期气道高反应性增高,机体需要通过提高气道内压力来克服气道阻力,用力程度增加使呼气流速加快;随着暴露时间的增加,机体通过延长TI和降低F实现功能代偿,最终维持Mv的相对稳定。由于肺功能测定在臭氧暴露结束后进行,因此未能完全捕捉到暴露前期频率加快的动态过程。而前期文献指出低浓度暴露初期出现代偿性呼吸频率加快,这种“先应激后代偿”的呼吸模式重塑机制与人群研究中观察到的长期暴露后肺功能参数变化趋势高度一致。

在炎症因子水平上,RT-qPCR及ELISA结果均

提示臭氧暴露引发的炎症反应具有明显的时间依赖性特征,表明在臭氧连续暴露1~5 d过程中可能存在双相调控机制。在暴露1 d时,促炎因子TNF- $\alpha$ 、IL-6、CXCL15的mRNA表达上调,表明急性炎症被快速激活。而连续暴露3 d时,促炎因子表达量达到峰值后启动负反馈调节机制,包括JAK-STAT通路抑制和Nrf2抗氧化通路激活<sup>[15-16]</sup>。这种“爆发—抑制”模式可能提示机体存在炎症过程的自限性调节。另外,本研究结果提示蛋白水平的变化滞后于mRNA水平,可能由于蛋白合成需要经过翻译、修饰、加工等多个步骤,并受到负反馈调节等多种因素的调节,该现象进一步验证了炎症反应的层级调控特性。同时CGRP作为一种关键神经源性炎症介质,其表达呈现出独特的浓度—时间响应模式。在2.4 mg/m<sup>3</sup>高浓度臭氧暴露下,CGRP表达出现延迟升高的现象,可能与过度氧化应激导致感觉神经元TRPA1/TRPV1通道功能被抑制有关。Ike等<sup>[17]</sup>指出刺激早期炎症反应,其高表达有利于抑制过度炎症反应。这种保护—耗竭的动态变化模式提示CGRP在臭氧诱导肺损伤中早期募集炎症反应后通过负反馈调节抑制促炎反应发生的双重角色,说明CGRP在神经源性炎症反应的启动和终止等阶段发挥调控作用。

总的来说,本研究确定了3 d连续暴露为急性向亚急性转变的关键时间点。此时肺功能指标(PEF、Penh)、促炎因子表达及CGRP水平在臭氧暴露下出现拐点,提示机体在此阶段启动了多维度代偿机制。这种多系统协同的代偿模式可能代表肺损伤进程中的可逆性窗口期,为公共卫生干预提供了时间参考。然而,本研究依然存在一些不足:恒定的暴露浓度不能模拟真实环境下臭氧昼夜浓度的变化情况,物种间的代谢差异也限制了研究结果在人类中的直接应用。陈婉玲等<sup>[18]</sup>提出,通过MOA/AOP框架开展健康风险评估,提示未来应考虑结合人群队列研究综合分析,从而为臭氧健康风险研究提供更全面的证据支撑。本研究动物模型并未纳入老龄动物及特定疾病小鼠模型,结果外推具有一定局限性。此外,本研究未进一步探讨NF-κB、MAPK等经典信号通路在代偿机制中的角色。现已有文献指出,在饮食中摄入ω-3多不饱和脂肪酸可对健康成年人的心血管产生保护作用<sup>[19-21]</sup>。未来的研究应进一步探讨臭氧诱导炎症反应的分子机制,并寻找有效的干预靶点以减轻臭氧对肺部健康的危害。

## 参考文献：

- [1] NIEDER R, BENBI D K. Reactive nitrogen compounds and their influence on human health: an overview[J]. *Reviews on environmental health*, 2021, 37(2): 229-246.
- [2] HUI K L, YUAN Y, XI B D, et al. A review of the factors affecting the emission of the ozone chemical precursors VOCs and NO<sub>x</sub> from the soil[J]. *Environment international*, 2023, 172: 107799.
- [3] PERRYMAN A, SPEEN A M, KIM H H, et al. Oxysterols modify NLRP2 in epithelial cells, identifying a mediator of ozone-induced inflammation[J]. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 2021, 65(5): 500-512.
- [4] LI J, SONG H R, LUO T, et al. Exposure to O<sub>3</sub> and NO<sub>2</sub> on the interfacial chemistry of the pulmonary surfactant and the mechanism of lung oxidative damage[J]. *Chemosphere*, 2024, 362: 142669.
- [5] JIANG X H, LI M, LI W X, et al. Effects of co-exposure to heat and ozone on lipid metabolism in the liver and adipose tissue of C57BL/6J male mice[J]. *Journal of hazardous materials*, 2025, 489: 137577.
- [6] 霍 霞, 谢 博, 曾志俊, 等. 环境污染物暴露对儿童免疫系统发育的影响 [J]. 广西医科大学学报, 2024, 41(11): 1530-1537.
- [7] ZHANG J Y, AI B Z, GUO Y M, et al. Long-term exposure to ambient ozone and adult-onset asthma: a prospective cohort study[J]. *Environmental research*, 2024, 252: 118962.
- [8] YODA Y, OTANI N, SAKURAI S, et al. Acute effects of summer air pollution on pulmonary function and airway inflammation in healthy young women[J]. *Journal of epidemiology*, 2014, 24(4): 312-320.
- [9] WANG H W, GAO Y, SHENG L F, et al. The impact of meteorology and emissions on surface ozone in Shandong Province, China, during summer 2014-2019[J]. *International journal of environmental research and public health*, 2022, 19(11): 6758.
- [10] WARHEIT D B. Interspecies comparisons of lung responses to inhaled particles and gases[J]. *Critical reviews in toxicology*, 1989, 20(1): 1-29.
- [11] PRUEITT R L, GOODMAN J E. Evaluation of neural reflex activation as a mode of action for the acute respiratory effects of ozone[J]. *Inhalation toxicology*, 2016, 28(11): 484-499.
- [12] MURPHY S R, OSLUND K L, HYDE D M, et al. Ozone-induced airway epithelial cell death, the neurokinin-1 receptor pathway, and the postnatal developing lung[J]. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*, 2014, 307(6): L471-L481.
- [13] FENG S R, YANG L, DOU S Q, et al. Associations between long-term ozone exposure and small airways function in Chinese young adults: a longitudinal cohort study [J]. *Respiratory research*, 2024, 25(1): 105.
- [14] LEE J M, MESHANNI J A, VAYAS K N, et al. Inhaled ozone induces distinct alterations in pulmonary function in models of acute and episodic exposure in female mice [J]. *Toxicological sciences*, 2025, 204(1): 70-78.
- [15] ZHU H H, ZHANG H L, LU K, et al. Chlorinated organophosphate flame retardants impair the lung function via the IL-6/JAK/STAT signaling pathway[J]. *Environmental science & technology*, 2022, 56(24): 17858-17869.
- [16] SUN N, HUANG Y, ZHANG X Y, et al. Involvements of Nrf2 and oxidative stress in the ozone-elicted exacerbation in an allergic rhinitis model[J]. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2023, 255: 114822.
- [17] IKE E, KAWANO T, TAKAHASHI K, et al. Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist suppresses allergic asthma responses via downregulation of group 2 innate lymphoid cells in mice[J]. *International immunopharmacology*, 2023, 122: 110608.
- [18] 陈婉玲, 李钟意, 韦丽娟, 等. 从毒理学与流行病学的融合看因果推断和暴露风险评估研究[J]. 广西医科大学学报, 2024, 41(7): 976-981.
- [19] CHEN H, ZHANG S Q, SHEN W, et al. The influence of dietary intake of omega-3 polyunsaturated fatty acids on the association between short-term exposure to ambient nitrogen dioxide and respiratory and cardiovascular outcomes among healthy adults[J]. *Environmental health*, 2021, 20(1): 123.
- [20] CHEN H, TONG H Y, SHEN W, et al. Fish oil blunts lung function decrements induced by acute exposure to ozone in young healthy adults: a randomized trial[J]. *Environment international*, 2022, 167: 107407.
- [21] CHEN H, ZHANG S Q, SHEN W, et al. Omega-3 fatty acids attenuate cardiovascular effects of short-term exposure to ambient air pollution[J]. *Particle and fibre toxicology*, 2022, 19(1): 12.

本文引用格式:

曾梓淇, 张宇博, 刘绍慧, 等. 急性臭氧暴露对小鼠肺功能及肺部炎症的影响 [J]. 广西医科大学学报, 2025, 42(4): 552-560. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2025.04.009  
ZENG Z Q, ZHANG Y B, LIU S H, et al. Effects of acute ozone exposure on pulmonary function and inflammation in mice [J]. *Journal of Guangxi medical university*, 2025, 42(4): 552-560. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2025.04.009