

静脉注射内毒素致大鼠急性肺损伤模型的病理生理学指标评价

樊毫军 刘书盈 张健鹏 刘又宁

【摘要】 目的 观察静脉注射内毒素所致大鼠急性肺损伤(ALI)模型的病理生理学指标,全面评价该模型。**方法** 将 33 只 Wistar 大鼠随机分为实验组和对照组,对照组于静脉注射生理盐水后 2 h 处死动物,实验组静脉注射革兰阴性菌脂多糖后分别于 2、4 和 6 h 后处死,比较各组死亡率、呼吸频率、肺脏病理、血气指标、肺顺应性、右肺湿重/体重比值、血清和支气管肺泡灌洗液(BALF)中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平。**结果** 实验组 6 h 动脉血氧分压(PaO_2)跌至 69.18 mm Hg (1 mm Hg=0.133 kPa);肉眼肺脏可见明显淤血、出血点和水肿;光镜下肺泡正常结构消失,间质水肿增宽,大量炎性细胞浸润,毛细血管明显扩张、充血,白细胞附壁;肺顺应性跌至正常值的 47%,右肺湿重/体重比值相当于正常值的 137%;血清、BALF 中 TNF- α 水平急剧升高。**结论** 以肺部特征性病理改变和 PaO_2 下降大于 30% (与基线值相比)作为判定大鼠 ALI 模型是否成功的主要指标;以肺顺应性、湿重/体重比值作为辅助指标,可能更适合于大鼠 ALI 模型。

【关键词】 内毒素; 肺损伤,急性; 模型

Assessment on pathophysiological indexes of acute lung injury induced by lipopolysaccharide in rats FAN Hao-jun*, LIU Shu-ying, ZHANG Jian-peng, LIU You-ning. * Department of Respiratory Disease, General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China
Corresponding author: ZHANG Jian-peng (Email: zjp99@vip.sina.com)

【Abstract】 Objective To observe and evaluate the pathophysiological indexes of acute lung injury (ALI) induced by lipopolysaccharide (LPS) in rats. **Methods** Thirty-three Wistar rats were randomly divided into normal control group and experiment group. Respiratory rate, mortality, arterial blood gases, compliance and wet weight of right lung/body weight ratio, tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were determined 2, 4 and 6 hours after injection of LPS or normal saline in both groups. **Results** In the experiment group, the following changes were found. Arterial partial pressure of oxygen (PaO_2) was reduced to 69.18 mm Hg (1 mm Hg=0.133 kPa), marked blood stasis, and edema in lung tissues could be grossly seen and pathological examination showed that there was a large number of inflammation cell infiltration and edema in interstitial spaces with disappearance of normal construction of alveolae. There was also dilatation of capillaries with congestion and adherent leukocytes. Furthermore, compliance was decreased to 47% of the normal value, and wet weight of right lung/body weight ratio increased to 137% of the normal value. Blood TNF- α level increased markedly in serum and BALF. **Conclusion** Specific pathological changes and decreased PaO_2 over 30% of the baseline value are the main signs of successful reproduction of ALI model in rats. Compliance and weight of right lung/body weight value can also reflect the status of ALI as helpful indexes.

【Key words】 lipopolysaccharide; acute lung injury; model

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是指严重感染、创伤、休克等打击后,出现以肺泡毛细血管损伤导致肺水肿和肺不张为病理特征的一种肺部炎症与通透性增加综合征,临床表现为呼吸窘迫和顽固性低氧血症。静脉注射(静注)脂多糖(LPS)所导致

的大鼠 ALI 模型是一种小动物 ALI 模型。评价有别于犬、猪等大动物 ALI 模型。评价模型制备是否成功,国内外的研究主要以肺部病理改变为判定标准^[1,2]。而该模型的血气分析结果、肺顺应性等病理生理学指标如何,目前报道较少。本研究就此进行了研究,旨在更全面地评价大鼠 ALI 模型。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂:电子秤:Mettler AE160(瑞士),AVL993 型全自动血气分析仪;LPS 血清型(O111:B4,批号 1111114,美国 Sigma 公司)。

1.2 动物与分组:雄性健康 Wistar 大鼠 33 只,由解放军总医院实验动物中心提供,体重 200~250 g。

基金项目:国家“十五”重大攻关课题(2003BA712A07-01)

作者单位:100039 北京,武警总医院呼吸科(樊毫军,张健鹏);250000 济南,济南军区总医院呼吸科(刘书盈);100853 北京,解放军总医院呼吸科(刘又宁)

通讯作者:张健鹏 (Email: zjp99@vip.sina.com)

作者简介:樊毫军(1974-)男(汉族),河南新乡人,博士研究生,主治医师,主要从事机械通气基础与临床研究 (Email: fanhaojun999@126.com)。

动物按随机数字表法分为两组:①对照组(NC 组)6 只,肌肉注射(肌注)质量分数为 20%的乌拉坦(5 ml/kg),麻醉起效后,经阴茎背静脉缓慢注射生理盐水 7 ml/kg,2 h 后处死动物,收集标本。②实验组(LPS 组)27 只,肌注 20%乌拉坦(5 ml/kg),麻醉起效后,经阴茎背静脉缓慢注射 LPS 7 mg/kg,分别于 2、4 和 6 h 后处死动物,每个时间点各 9 只。

1.3 实验操作:相应时间点取 1 ml 动脉血行血气分析,另取 2 ml 静脉血以 $2\,000\times g$ 离心 10 min,上清于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待测。气管切开插入气管插管,经三通与 U 形测压计连接,测定肺顺应性。结扎右侧支气管,用 2 ml 生理盐水灌洗左侧肺,回收支气管肺泡灌洗液(BALF),回收率大于 50%, $2\,000\times g$ 离心 10 min,上清于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待测。剪下右肺称重,计算肺湿重/体重比值,之后留作常规病理检验。

1.4 病理切片:取大鼠肺、肝、肾、心,于体积分数为 10%的甲醛浸泡固定 24 h,石蜡包埋、切片,常规苏木精-伊红(HE)染色,观察各脏器组织病理学改变。

1.5 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平测定:血液和 BALF 上清 TNF- α 水平测定采用双抗体夹心卵白素-生物素-过氧化物酶-酶联免疫吸附法(ABC-ELISA),药盒购自北京尚柏生物医学技术有限公司,具体操作步骤按照说明书进行。

1.6 统计学处理:结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用 F 检验,采用 SPSS 10.0 进行统计分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 死亡率、呼吸频率变化:NC 组大鼠一般情况良好,呼吸平稳,对外界刺激反应无异常,无死亡。LPS 组大鼠静注 LPS 7 mg/kg 后,呼吸频率显著增加(≥ 90 次/min),呼吸困难、喘鸣音,四肢、口唇发绀,个别大鼠口、鼻内涌出粉红色泡沫水肿液。LPS 2、4 和 6 h 组分别死亡 1 只、1 只和 2 只。

2.2 各脏器大体与常规病理比较:NC 组大鼠肺脏光镜下肺泡结构正常,无异常发现(彩色插页图 1)。LPS 4 h 组,特别是 LPS 6 h 组,肉眼可见肺脏表面淤血,出血点和水肿明显(彩色插页图 2)。光镜下 LPS 组病理改变以肺间质病变为主,肺组织毛细血管明显扩张、充血,白细胞附壁,肺泡隔增宽,大量白细胞渗出、聚集,部分肺泡腔中可见渗出液、出血、萎陷不张(彩色插页图 3 和图 4)。各组镜下均未见心、肾等其他脏器明显异常,LPS 6 h 组肝脏汇管区可见少许中性粒细胞浸润,未见明确灶样坏死。

2.3 血气分析结果(表 1):与 NC 组相比,LPS 组大鼠动脉血氧分压(PaO_2)由 2~6 h 持续下降,6 h 组呈现严重的持续缺氧状态, PaO_2 跌至 $(69.18\pm 3.23)\text{ mm Hg}$ ($1\text{ mm Hg}=0.133\text{ kPa}$)。LPS 组 2 h 和 4 h 动脉血二氧化碳分压(PaCO_2)较 NC 组明显升高,同时 pH 显著下降。

表 1 各组动脉血气结果比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of arterial blood gases analyses among four groups($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	$\text{PaO}_2(\text{mm Hg})$	$\text{PaCO}_2(\text{mm Hg})$	pH
NC 组	6	100.43 ± 3.89	51.03 ± 4.61	7.28 ± 0.05
LPS 2 h 组	8	$85.74\pm 11.65^*\Delta$	$62.61\pm 5.49^*\Delta$	$7.24\pm 0.04^*$
LPS 4 h 组	8	$76.29\pm 6.75^*\Delta$	$58.76\pm 11.02^*$	$7.25\pm 0.07^*$
LPS 6 h 组	7	$69.18\pm 3.23^*$	50.99 ± 6.26	7.27 ± 0.04

注:与 NC 组比较: * $P<0.05$;与 LPS 6 h 组比较: $\Delta P<0.05$

2.4 各组肺顺应性与右肺湿重/体重比值比较(表 2):LPS 各组肺顺应性均低于 NC 组,6 h 组跌至 $(0.066\pm 0.007)\text{ ml/cm H}_2\text{O}$,仅相当于 NC 组的 47%。LPS 各组肺湿重随时间的延长而增加,LPS 6 h 组右肺湿重/体重达到 $0.003\,7\pm 0.000\,3$,为 NC 组的 137%。

表 2 各组肺顺应性和右肺湿重/体重比值比较($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of compliance and wet weight of right lung/body weight ratio among four groups($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	肺顺应性($\text{ml/cm H}_2\text{O}$)	右肺湿重/体重
NC 组	6	0.140 ± 0.049	$0.002\,7\pm 0.000\,1$
LPS 2 h 组	8	$0.083\pm 0.016^*\Delta$	$0.003\,2\pm 0.000\,4^*\Delta$
LPS 4 h 组	8	$0.075\pm 0.008^*\Delta$	$0.003\,5\pm 0.000\,4^*$
LPS 6 h 组	7	$0.066\pm 0.007^*$	$0.003\,7\pm 0.000\,3^*$

注:与 NC 组比较: * $P<0.05$;与 LPS 6 h 组比较: $\Delta P<0.05$

2.5 血清和 BALF 中 TNF- α 比较(表 3):LPS 各组血清和 BALF 中 TNF- α 水平均明显高于 NC 组,LPS 6 h 组血清 TNF- α (9.367 ± 0.579) ng/L, BALF 中 TNF- α 为 (10.750 ± 1.095) ng/L,分别为 NC 组的 1.47 倍和 1.33 倍。

表 3 各组血清和 BALF 中 TNF- α 水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison of TNF- α levels in serum and BALF among four groups($\bar{x}\pm s$) ng/L

组别	动物数(只)	血清 TNF- α	BALF TNF- α
NC 组	6	6.372 ± 0.751	8.077 ± 0.088
LPS 2 h 组	8	$6.837\pm 0.576\Delta$	$8.307\pm 0.270^*\Delta$
LPS 4 h 组	8	$7.973\pm 0.227^*\Delta$	$9.237\pm 0.626^*\Delta$
LPS 6 h 组	7	$9.367\pm 0.579^*$	$10.750\pm 1.095^*$

注:与 NC 组比较: * $P<0.05$;与 LPS 6 h 组比较: $\Delta P<0.05$

3 讨论

革兰阴性(G^-)菌所致败血症是引起 ALI、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、多器官功能障碍综合征

(MODS)并最终导致患者感染死亡的重要原因之一, G⁻菌细胞壁主要成分是 LPS, 研究 LPS 致 ALI 动物模型对临床 ALI/ARDS 防治有重要意义^[3]。

本实验结果表明:大鼠静注 LPS 7 mg/kg 后 6 h 死亡率达到 22.2%, 肉眼肺脏可见明显淤血、出血点和水肿;光镜下肺泡正常结构消失, 间质水肿增宽、大量炎性细胞浸润、毛细血管明显扩张、充血、白细胞附壁;右肺湿重/体重比值相当于正常值的 137%, 肺顺应性跌至正常值的 47%, 说明存在严重的肺水肿;血清和 BALF 中 TNF- α 水平急剧升高。以上各项指标表明大鼠在 LPS 的攻击下发生了 ALI。此时 PaO₂ 与基础值相比下降了约 31 mm Hg, 而氧合指数 (PaO₂/FiO₂) 为 329 mm Hg, 仍高于临床上 ALI 的诊断标准^[4]。李琦等^[5]报道:尾静脉注射 LPS 的剂量上升为 8 mg/kg 时, 大鼠呈严重而持久的低氧血症状态, 死亡率高达 60% 以上, PaO₂ 平均为 58 mm Hg。国外 Domenici-Lombardo 等^[6]评价气管注入 LPS 5 mg/kg 致 ALI 模型, 大鼠在致伤后 24 h 肺脏达到 ALI 病理标准, 此时 PaO₂ 平均为 71 mm Hg。说明大鼠在肺脏病理呈现 ALI 时 PaO₂ 会随之明显下降, 但不一定能达到针对大动物的

PaO₂/FiO₂ < 300 mm Hg 标准, 否则大部分动物死亡, 不利于开展小动物 ALI 实验的研究。

通过对大鼠 LPS 所致 ALI 模型的病理生理学指标评价, 我们认为以肺部特征性病理改变和 PaO₂ 下降大于 30% (与基线值相比) 作为判定大鼠 ALI 模型是否成功的主要指标, 以肺顺应性、湿重/体重比值为辅助指标, 可能更适合于大鼠 ALI 模型。

参考文献:

- 1 Rojas M, Woods C R, Mora A L, et al. Endotoxin-induced lung injury in mice: structural, functional, and biochemical responses [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 288: L333-341.
- 2 张青, 李琦, 毛宝龄, 等. 内毒素致伤大鼠肺组织促炎与抗炎细胞因子 mRNA 表达的时相性研究 [J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 585-588.
- 3 张秋金, 李银平, 黎檀实. 肺泡上皮细胞功能特性与内毒素性急性肺损伤 [J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17: 382-384.
- 4 刘又宁. 急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征的诊断标准 (草案) [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2000, 23: 203.
- 5 李琦, 钱桂生, 张青等. 递增剂量脂多糖致伤对大鼠 SIRS-肺损伤的影响 [J]. 第三军医大学学报, 2001, 23: 1264-1267.
- 6 Domenici-Lombardo L, Adembri C, Consalvo M, et al. Evolution of endotoxin induced acute lung injury in the rat [J]. Int J Exp Pathol, 1995, 76: 381-390.

(收稿日期: 2005-11-11 修回日期: 2005-12-24)

(本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

肠缺血/再灌注后的微血管分流与缺血时间有关, 并可增加死亡率

德国学者最近的实验证明, 肠系膜上动脉闭塞 (SMAO) 和再灌注之后发生微血管分流能加重脓毒性休克。他们取 30 只自主呼吸大鼠制作 SMAO 模型, 于 0 min (对照)、30 min (SMAO-30)、60 min (SMAO-60) 后用生理盐水再灌注 4 h, 将大鼠一段回肠肠样外置, 用活体显微镜观察肠系膜静脉内白细胞与血管内皮的相互作用, 连续监测肠系膜上动脉血流, 并间断进行肠道动脉血气分析; 另取 30 只大鼠作为配对研究, 连续监测肠系膜上动脉血流, 但不外置回肠肠样, 同样分别于 SMAO 0 min (对照*), 30 min (SMAO-30*), 60 min (SMAO-60*) 之后恢复血流。结果显示: 缺血/再灌注后很快出现白细胞附壁, SMAO-60 组小静脉中心血流速度明显减小直至为 0, 而 SMAO-30 组与对照组恢复再灌注后肠系膜上动脉和回肠静脉灌流持续不断。SMAO-60 组的微循环改变伴有渐进的代谢性酸中毒, 需要更多静脉液体维持动脉血压, 存活率明显减小 (30%)。SMAO-60* 组肠系膜上动脉血流增加与再灌注后的腹腔动脉血流有关, 并且在 SMAO-30* 组与对照* 组中肠系膜上动脉血流持续未减, SMAO-60* 组存活率为 80%。由此得出结论: 在 SMAO 60 min 后再灌注时出现的微血管分流, 能显著加重肠系膜缺血的病理变化, 增加动物的死亡率。

车晋伟, 编译自《Microcirculation》, 2006, 13: 411-422; 胡森, 审校

刺激迷走神经能抑制内毒素血症大鼠凝血与纤溶系统活化

脓毒症和内毒素血症的发病与过度炎症反应和凝血功能紊乱相关, 后者皆可引起器官功能衰竭乃至死亡。最近荷兰学者研究了电刺激迷走神经 (VNS) 对内毒素血症时凝血和纤溶指标的影响。实验使用注射了非致死剂量脂多糖 (LPS) 的大鼠, 随机进行 VNS 或假手术 (对照), 在注射 LPS 前及注射后 2.4 和 6 h 检测凝血与纤溶指标及细胞因子的释放。结果显示: LPS 能激活凝血纤溶系统, 引起血浆凝血酶-抗凝血酶复合物浓度增加, 抗凝血酶浓度减少; 早期血纤维蛋白溶酶原激活剂活性升高, 组织型纤维蛋白溶酶原激活剂增多; 后期纤溶酶原激活剂抑制剂 I 型增多。VNS 能显著抑制 LPS 引起的凝血亢进和纤溶作用, 还可减少 LPS 诱导的促炎细胞因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-6 (IL-6) 在血浆中的浓度, 同时不影响抗炎细胞因子 IL-10 的释放。上述实验结果表明: 胆碱能抗炎通路不仅对抗炎有作用, 同时还可影响凝血-抗凝的平衡。

车晋伟, 编译自《J Thromb Haemost》, 2006-06-29 (电子版); 胡森, 审校

纤维支气管镜肺减容术在绵羊肺气肿模型中的应用

(正文见482页)



图1 自行研制的单向活瓣支架
Figure 1 One-way flap device made in China



图2 放置支架8周后CT示右下叶肺不张
Figure 2 Collapse of right diaphragmatic lobe of lung 8 weeks after treatment with stent shown by CT image

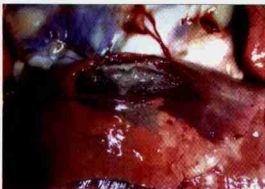


图3 BLVR 术后8周支架远端肺不张区体积缩小及瘢痕组织
Figure 3 General specimen of lung tissue showed the reduced area of collapse in the distant region from the stent 8 weeks after BLVR



图4 BLVR术后8周显示放置支架治疗区域可见瘢痕组织而在非治疗区域可见肺气肿 (HE, x100)
Figure 4 Scar tissue in stent-treated site and emphysema in non-stent-treatment site 8 weeks after BLVR (HE, x100)

静脉注射内毒素致大鼠急性肺损伤模型的病理生理学指标评价

(正文见485页)

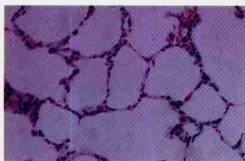


图1 NS组肺组织病理学变化 (HE, x100)
Figure 1 Pathological changes of lung tissue in NS group (HE, x100)



图2 LPS 6 h组肺组织大体观察
Figure 2 General specimen of lung tissue 6 hours after LPS injection

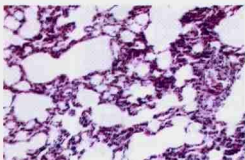


图3 LPS 2 h组肺组织病理学变化 (HE, x100)
Figure 3 Pathological changes of lung tissue 2 hours after LPS injection (HE, x100)

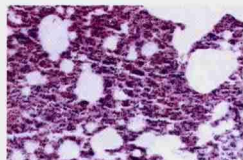


图4 LPS 6 h组肺组织病理学变化 (HE, x100)
Figure 4 Pathological changes of lung tissue 6 hours after LPS injection (HE, x100)