

3种急性肺损伤兔模型的比较

吕晶¹, 孙震¹, 李泳², 陈卫民¹

(1. 中国医科大学附属盛京医院麻醉科, 辽宁 沈阳 110004; 2. 沈阳市皇姑区中心医院麻醉科)

[摘要] 目的:比较3种常用的急性肺损伤(ALI)动物模型造模效果。方法:24只健康成年日本大白兔随机分为3组,每组8只,气管插管后,行机械通气。盐酸造模组(HCL组):经气管导管给予0.1 mol/L的盐酸3 ml/kg;脂多糖造模组(LPS组):通过中心静脉30 min内缓慢滴注LPS 1 mg/kg;肠系膜上动脉缺血再灌注复合腹腔内放置粪便组(SMA组):钳闭肠系膜上动脉30 min,期间腹腔内放置肠内容物(1 ml/kg)与血(1 ml/kg)的混合物。连续描记平均动脉压(MAP)和心率(HR)的变化;检测基础(T_0)及造模后1,2,4,6,8 h(T_1, T_2, T_4, T_6 和 T_8)的动脉血气和血清内IL-1 β 的浓度;实验结束测定血清内肺表面活性物质相关蛋白A(SP-A)的浓度。结果: PaO_2 在 T_1, T_2 时点,HCL组较LPS组和SMA组明显降低($P < 0.01$);在 T_4 时点3组无统计学差异;在 T_6, T_8 时点HCL组和SMA组较LPS组明显降低($P < 0.01$)。MAP和HR在HCL组和LPS组内各时点无统计学差异;SMA组内与 T_0 时点相比较, $T_4 \sim T_8$ 时点的MAP较低($P < 0.01$)、HR较快($P < 0.01$)。IL-1 β 浓度在HCL组各时点无统计学差异,而LPS组和SMA组则随着时间的发展,IL-1 β 的浓度逐渐变化;血清内SP-A的浓度,SMA组明显高于另外两组($P < 0.01$)。结论:与盐酸支气管滴注造模和脂多糖中心静脉滴注造模相比,肠系膜上动脉缺血再灌注复合腹腔内放置粪便法,既可持续保持 PaO_2 水平较低,也可保证血清内炎性因子浓度较高,更可能会发展为急性呼吸窘迫综合征(ARDS)。

[关键词] 动物模型;兔;急性肺损伤;盐酸;脂多糖;缺血再灌注;腹膜炎

[中图分类号] R332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-4646(2007)05-0558-03

Comparison of 3 rabbit models of acute lung injury

LÜ Jing¹, SUN Zhen¹, LI Yong², CHEN Wei-min¹

(1. Department of Anesthesiology, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China; 2. Department of Anesthesiology, Central Hospital of Huanggu District, Shenyang)

[Abstract] **Objective:** To compare 3 widely used rabbit models of acute lung injury (ALI). **Methods:** A total of 24 Japanese white rabbits were randomly assigned ($n=8$ in each group) to receive bronchoalveolar instillation of hydrochloric acid (HCl, 3 mg/kg) in HCl group, central vein infusion of lipopolysaccharide (LPS, 1 mg/kg) in LPS group, and intraperitoneal placement of a compound of feces (1 ml/kg) and blood (1 ml/kg) during superior mesenteric artery occlusion for 30 minutes in SMA group. The rabbits were anesthetized and mechanically ventilated. The mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) were continuously monitored during the experiment. Blood samples were obtained for blood gas analysis, and the concentrations of interleukin-1 β (IL-1 β) were measured at the baseline (T_0) and 1, 2, 4, 6, and 8 hours (T_1, T_2, T_4, T_6, T_8) after ALI. The level of surfactant protein A (SP-A) in serum was detected at the end of the experiment. **Results:** PaO_2 was significantly lower in HCl group than in other 2 groups at T_1 and T_2 ($P < 0.01$); no between-group differences in PaO_2 were found at T_4 ; PaO_2 was significantly lower in HCl and SMA groups than in LPS group at T_6 and T_8 ($P < 0.01$). No significant differences in MAP and HR were found between HCl and LPS groups at all time points. In SMA group, the MAP decreased significantly and the HR increased significantly from T_4 to T_8 ($P < 0.01$), compared with those at T_0 . The concentration of IL-1 β did not change in HCl group, but it significantly changed in other 2 groups. The level of SP-A in the serum was significantly higher in SMA group than in other 2 groups. **Conclusion:** Compared with bronchoalveolar instillation of hydrochloric acid and central vein infusion of LPS, the ALI model established by intraperitoneal placement of a compound of feces and blood during superior mesenteric artery occlusion is more valuable in the study of ALI.

[Key words] animal model, rabbit; acute lung injury; hydrochloric acid; lipopolysaccharide; ischemia/reperfusion; peritonitis

许多动物实验发现,用同一种方法治疗急性肺损伤(acute lung injury, ALI)的效果并不一致^[1,2],甚至出现相反的结论,可能的原因就是不同造模方法制造的ALI动物模型的生理指标变化存在较大的差异。本研究对现阶段常用的3种ALI动物模型:稀盐酸支气管灌注、脂多糖(lipopolysaccharide,

LPS)右心房滴注和肠系膜上动脉缺血再灌注复合腹腔内放置粪便法进行比较,评估不同的造模方式其结果有何不同,哪一种方法更可能发展为急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与设备

[作者简介] 吕晶(1969-),女,讲师,学士。

E-mail: lujing_cmu@yahoo.com

IL-1 β 酶联免疫试剂盒(Biosource 公司);一抗鼠抗兔肺表面活性物质相关蛋白 A(surfactant protein A,SP-A)单抗(武汉博士德公司);二抗生物素标记山羊抗兔 SP-A 单体(北京中山公司);TECAN-SUNRISE 酶标仪(奥地利);LPS(Sigma 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物分组:24 只健康日本雄性大白兔,体质量 2.4~3.2 kg。随机分为 3 组,每组 8 只:盐酸支气管灌注组(HCL 组)、脂多糖心房滴注组(LPS 组)和肠系膜上动脉缺血再灌注复合腹膜内放置粪便组(SMA 组)。

1.2.2 动物模型制备:腹腔注射氯胺酮 100 mg/kg 麻醉,开放耳缘静脉,气管切开,静脉注射泮库溴铵 0.4 mg/kg,插入气管导管连接西门子 900C 型呼吸机,调整机械参数潮气量 10 ml/kg,吸入氧分数(FiO₂)为 1.0,吸呼比为 1:2,调节呼吸次数使 PaCO₂ 保持在 35~45 mmHg 之间。右股动脉置管,连接日本产光电多导生理监测仪,连续描记平均动脉压(MAP)和心率(HR)的变化。行颈部中心静脉穿刺,在生理监测仪的帮助下送管入右心房。待上述操作结束后 10 min,记录血气和各项监测值为基础值(T₀)。实验过程中保持机械参数设置不变,每小时静脉输注泮库溴铵 0.2 mg/kg、氯胺酮 20 mg/kg 及乳酸钠林格液 10 ml/kg。

HCL 组造模参照文献 [3] 介绍的方法略加改进,经气管导管给予 0.1 mol/L 的盐酸 1.5 ml/kg,保持右侧卧位 15 min 后转为左侧体位,再给予相同浓度相同剂量的盐酸,通气 15 min,转为仰卧位。

LPS 组造模参照文献[4]介绍的方法,通过中心静脉 30 min 内缓慢滴注 LPS 1 mg/kg。

SMA 组造模参照文献[5]介绍的方法,用动脉夹钳闭肠系膜上动脉 30 min 后重新开放动脉。期间切开盲肠,取肠内容物 1 ml/kg 与自体血 1 ml/kg 混合,将混合物置于腹腔左下象限后,缝合盲肠和腹壁。

1.2.3 监测指标:记录各组造模后 1,2,4,6,8 h(T₁, T₂,T₄,T₆ 和 T₈)的动脉血气及 MAP、HR 变化,并抽取静脉血用 ELISA 法检测 T₀~T₈ 时点血清内白介素 1 β (interleukin-1 β ,IL-1 β)的浓度。实验结束后按文献[6]介绍的方法测量血清内 SP-A 的浓度。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 12.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用方差分析 LSD-*t* 检验,组内比较采用配对 *t* 检验。

2 结果

2.1 3 组兔的体质量无统计学差异。其他各项生理指标和监测结果见表 1。

表 1 各项生理指标的变化(n = 8, $\bar{x} \pm s$)
Tab.1 Dynamic changes of physiological parameters(n = 8, $\bar{x} \pm s$)

指标	分组	T ₀	T ₁	T ₂	T ₄	T ₆	T ₈
PaO ₂ (kPa)	HCL	68.2 ± 4.5	36.8 ± 3.7 ⁶⁾	36.9 ± 2.9 ⁶⁾	36.0 ± 3.3 ⁶⁾	36.1 ± 2.8 ⁶⁾	36.3 ± 3.5 ⁶⁾
	LPS	69.3 ± 4.8	52.2 ± 4.2 ^{2),6)}	45.0 ± 4.6 ^{2),6),7)}	36.1 ± 3.1 ^{6),7)}	44.8 ± 5.2 ^{2),6),7)}	46.9 ± 5.3 ^{2),6)}
	SMA	69.0 ± 4.1	50.6 ± 5.2 ^{2),6)}	44.4 ± 5.6 ^{2),6),7)}	35.2 ± 4.3 ^{6),7)}	35.8 ± 3.6 ^{4),6)}	34.7 ± 3.0 ^{4),6)}
PaCO ₂ (kPa)	HCL	5.2 ± 0.3	5.4 ± 0.4	5.4 ± 0.42	5.5 ± 0.4	5.4 ± 0.5	5.4 ± 0.4
	LPS	5.3 ± 0.5	5.5 ± 0.4	5.5 ± 0.5	5.6 ± 0.4	5.4 ± 0.5	5.4 ± 0.4
	SMA	5.2 ± 0.4	5.6 ± 0.4	5.53 ± 0.33	5.5 ± 0.5	5.4 ± 0.4	5.4 ± 0.4
MAP (kPa)	HCL	10.3 ± 0.7	10.2 ± 0.5	10.2 ± 0.3	10.1 ± 0.5	10.3 ± 0.3	10.3 ± 0.4
	LPS	9.9 ± 0.7	10.2 ± 0.7	9.9 ± 0.7	10.0 ± 0.6	10.1 ± 0.7	10.1 ± 0.6
	SMA	10.1 ± 0.6	10.4 ± 0.5	9.9 ± 0.59	9.3 ± 0.4 ^{1),3),5),7)}	9.1 ± 0.7 ^{1),3),5)}	9.1 ± 0.6 ^{1),3),5)}
HR (次/min)	HCL	238 ± 26	241 ± 31	248 ± 29	245 ± 32	246 ± 36	247 ± 32
	LPS	240 ± 33	253 ± 31	247 ± 29	251 ± 37	253 ± 38	246 ± 34
	SMA	243 ± 31	244 ± 37	254 ± 28	279 ± 19 ^{2),3),6),7)}	285 ± 28 ^{2),4),6)}	284 ± 26 ^{2),4),6)}
IL-1 β (pg/ml)	HCL	432 ± 133	441 ± 136	452 ± 147	449 ± 163	456 ± 167	450 ± 154
	LPS	419 ± 120	458 ± 160	596 ± 114 ^{2),6),8)}	785 ± 87 ^{2),6),8)}	658 ± 124 ^{2),6),8)}	612 ± 80
	SMA	420 ± 113	452 ± 96	563 ± 108 ^{2),6),8)}	605 ± 98 ^{2),4),6)}	682 ± 105 ^{2),6),7)}	760 ± 74 ^{2),6),8)}

注:与 HCL 组比较, 1)P < 0.05, 2)P < 0.01; 与 LPS 组比较, 3)P < 0.05, 4)P < 0.01; 与 T₀ 比较, 5)P < 0.05, 6)P < 0.01; 与组内前一个时点比较, 7)P < 0.05, 8)P < 0.01

PaO₂ 在 T₁、T₂ 时点 HCL 组较 LPS 组和 SMA 组明显降低 (P < 0.01); PaO₂ 在 T₆、T₈ 时点 HCL 组和

SMA 组较 LPS 组明显降低 (P < 0.01)。与 T₀ 时点相比, 各组 T₁~T₈ 时点的 PaO₂ 明显降低 (P < 0.01);

LPS 组 T_4 时点的 PaO_2 明显低于 T_1 、 T_2 、 T_6 和 T_8 时点 ($P < 0.05$); SMA 组 $T_2 \sim T_8$ 时点的 PaO_2 明显低于 T_1 时点 ($P < 0.05$)。

SMA 组内与 T_0 时点相比较, $T_4 \sim T_8$ 时点的 MAP 较低 ($P < 0.05$)、HR 较快 ($P < 0.01$)。

LPS 组和 SMA 组随着时间的发展, IL-1 β 的浓度逐渐变化, 分别在 T_4 和 T_8 时点达到高峰。

2.2 血清内 SP-A 浓度 HCL 组为 (305 ± 48) ng/ml, LPS 组为 (289 ± 56) ng/ml, SMA 组为 (396 ± 37) ng/ml。与 HCL 组和 LPS 组相比, SMA 组血清内 SP-A 的浓度明显增高 ($P < 0.01$)。

3 讨论

一般认为引起 ALI 的危险因素分为直接肺损伤和间接肺损伤两类。本研究中支气管内滴注盐酸属于直接肺损伤, 右心房滴注 LPS 和肠系膜上动脉缺血再灌注复合腹膜内放置粪便属于间接肺损伤。

本研究中盐酸滴注 1 h 后 (T_1 时点) PaO_2 明显降低, 氧合指数 (PaO_2/FiO_2) 低于 300, 达到了 ALI 的诊断标准。盐酸支气管内滴注形成 ALI 的速度较快, 同时也保持 PaO_2 较长时间内无明显改善 (本实验观察时间为 8 h)。LPS 组达到 ALI 的诊断标准的时间略长 (T_4 时点), 并且在给予 LPS 6 h 后, 氧合指数逐渐提高, 这可能同实验所给予的 LPS 的剂量有关。SMA 组采用双重干预的策略。肠系膜上动脉缺血再灌注所致的远隔脏器肺损伤, 白细胞介导的炎性反应可能是其主要的原因为。腹腔内放置自体血混合的粪便, 导致腹腔内多重细菌感染, 也是 ARDS 发生、发展的重要机制之一。将粪便与自体血相混合可减少细菌毒素的吸收速率, 防止围实验期动物的死亡。本研究中尽管 SMA 组达到 ALI 诊断标准所需的时间较长 (T_4 时点), 但从 T_4 时点至实验结束, 氧合指数无明显提高。

ALI 是 ARDS 的早期阶段, ALI 是否发展为 ARDS 同体内炎性反应和抗炎性反应的失衡有关。IL-1 β 的浓度同 ALI 的预后密切相关。HCL 组血清内 IL-1 浓度较 T_0 时点无明显改变, 而 LPS 组和 SMA 组则随着时间的发展 IL-1 β 的浓度逐渐增加, 分别在 T_4 和 T_6 时点达到高峰。LPS 是诱导机体巨噬细胞产生 IL-1 β 关键因素, 与炎性反应的一般过程不同, 一次性给予致病剂量的 LPS 可能是 LPS 组内 IL-1 β 浓度峰值较 SMA 组提前的一个原因。本实验

未发现致伤后 HCL 组内 IL-1 β 浓度较基础值有明显提高, 可能同本实验观察时间较短有关。SP-A 是肺表面活性物质中含量最为丰富的一种蛋白质, 在肺脏的防御过程中起到重要的作用。正常情况下, 血清内 SP-A 的浓度很低, 当肺泡毛细血管屏障受损、通透性增强时, 血清内 SP-A 的浓度可作为肺泡毛细血管膜屏障损伤程度的一个指标, 同肺损伤后是否会发展为 ARDS 密切相关^[7,8]。与 HCL 组和 LPS 组相比, SMA 组血清内的 SP-A 的浓度较高, 说明该方法所致的 ALI 更可能会发展为 ARDS。

微循环障碍所致的组织器官灌注不足是 ARDS 患者死亡的基本原因。感染所引起的 ALI 或 ARDS 往往伴随着血压下降和 HR 加快。

综上所述, 肠系膜上动脉缺血再灌注复合腹膜内放置粪便法制造 ALI 动物模型, 即可持续保持 PaO_2 在较低水平, 也可保证血清内炎性因子浓度较高, 更可能会发展为 ARDS。

参考文献:

- [1] ANGELOVA M, NAKAZAWA K, YOKOYAMA K, et al. Effects of partial liquid ventilation on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in rats[J]. Resuscitation, 2004, 62(1): 89-96.
- [2] HIRAYAMA Y, HIRASAWA H, ODA S, et al. Partial liquid ventilation with FC-77 suppresses the release of lipid mediators in rat acute lung injury model[J]. Crit Care Med, 2004, 32(10): 2085-2089.
- [3] NISHINA K, MIKAWA K, TAKAO Y, et al. Intravenous lidocaine attenuates acute lung injury induced by hydrochloric acid aspiration in rabbits[J]. Anesthesiology, 1998, 88(5): 1300-1309.
- [4] ROTTA AT, GUNNARSSON B, HERNAN LJ, et al. Partial liquid ventilation with perflubron attenuates in vivo oxidative damage to proteins and lipids[J]. Crit Care Med, 2000, 28(1): 202-208.
- [5] STEINBERG J, HALTER J, SCHILLER H, et al. The development of acute respiratory distress syndrome after gut ischemia/reperfusion injury followed by fecal peritonitis in pigs: a clinically relevant model [J]. Shock, 2005, 23(2): 129-137.
- [6] GREENE KE, WRIGHT JR, STEINBERG KP, et al. Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1999, 160(6): 1843-1850.
- [7] ROBERTSON B, CURSTEDT T, HERTING E, et al. Alveolar-to-vascular leakage of surfactant protein A in ventilated immature newborn rabbits[J]. Biol Neonate, 1995, 68(3): 185-190.
- [8] GREENE KE, YE S, MASON RJ, et al. Serum surfactant protein-A levels predict development of ARDS in at-risk patients [J]. Chest, 1999, 116(1 Suppl): 90S-91S.

[收稿日期] 2006-09-26