论著

文章编号:1000-5404(2009)21-2090-04

胸部开放伤后海水和淡水浸泡对肺损伤的作用比较

胡晓红[1,2],段蕴铀[2],李 毅[2],薛志强[3],孟继光[2] ([1]军事医学科学院研究生队,北京 100850;[2]海军总医院呼吸科,北京 100048;[3]解放军总医院胸外科,北京 100853)

摘 要:目的 比较胸部开放伤后胸腔海水与淡水浸泡对肺损伤的作用。**方法** 24只实验犬致胸部开放伤后分成对照组、海水组和淡水组。海水组和淡水组伤后10 min内经伤口分别灌入海水和淡水;观察胸部开放伤后0、2、4、6、8 h的生命体征,测渗透压、血浆炎症因子变化。伤后8 h取肺组织观察病理学和炎症因子变化。**结果** 肺泡通透指数:海水组较淡水组明显升高($P<0.05$),淡水组与对照组比较无统计学差异($P>0.05$);IL-1β、IL-8:海水组较淡水组升高($P<0.05$),淡水组较对照组升高($P<0.05$);血管性血友病因子(von Willnbrang factor, vWf):海水组较淡水组、对照组升高($P<0.05$),淡水组较对照组无差异。相关分析显示:血浆渗透压与肺泡通透性指数、炎症因子IL-1β、IL-8正相关($P<0.05$)。**结论** 海水较淡水对开放伤后肺组织的损伤程度更严重,可能与海水高渗加重肺血管通透性和过度炎症反应有关。

关键词: 急性肺损伤;淡水;海水;胸部开放伤;浸泡

中图法分类号: R563; R655; R835.3 **文献标识码:** A

Differences between acute lung injury induced by immersion in seawater and in freshwater in dogs after open chest trauma

HU Xiao-hong[1,2], DUAN Yun-you[2], LI Yi[2], XUE Zhi-qiang[3], MENG Ji-guang[2] ([1]Postgraduate College, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850; [2]Department of Respiratory Diseases, Naval General Hospital, Beijing 100048; [3]Department of Thoracic Surgery, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

Abstract: Objective To compare the differences between acute lung injury (ALI) induced by seawater-immersion and freshwater-immersion after open chest trauma. **Methods** Twenty-four dogs were randomly divided into 3 groups, ALI model group (control), seawater immersion group (group SW), and freshwater immersion group (group FW). ALI model was established by cutting an incision of 0.5 cm at the 4th intercostal space. Then artificial seawater or pure water (35 ml/kg) was perfused into the incision for the later 2 groups. The pathological changes were evaluated by light microscopy, hemotoxin and eosin (HE) staining in 8 h after perfusion. In 0, 2, 4, 6 and 8 h after trauma, the plasma samples were collected to test the levels of IL-1β, IL-8 and von Willnbrang factor (vWF) with ELISA. The amount of total protein in plasma and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were measured. **Results** Compared with group FW, the pulmonary penetration index, the concentrations of IL-1β, IL-8 and vWF in the plasma and lung tissue in group SW were markedly higher. They were significantly positively correlated with the plasma osmotic pressure ($P>0.05$). **Conclusion** Despite immersing in seawater and in freshwater worsen the ALI after open chest trauma, the ALI induced by seawater-immersion is severer than that caused by freshwater-immersion. It is attributed to higher plasma osmotic pressure and abundance of salts after seawater immersion, which increasing the pulmonary penetration index and aggravating the inflammatory response.

Key words: acute lung injury; freshwater; seawater; open chest trauma; immersion

现代海战中,胸部开放伤的发生率约占20%,伤后落水的可能性极大[1]。海水具有高渗、高钠、低温等特点,胸部开放伤后海水浸泡可引起严重的急性肺损伤(acute lung injury,ALI),并可进一步发展为急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome,ARDS)和多脏器功能衰竭综合征(multiple organ dysfunction syndrome,MODS),从而危及生命,死亡率大大

基金项目:海军后勤科研计划课题(2004-3304)
Supported by the Program of Logistic Scientific Research Plan of Chinese Navy (2004-3304)

作者简介:胡晓红,女,陕西省西安市人,博士研究生,副主任医师,主要从事呼吸和儿科重症监护、新生儿疾病等方面研究。E-mail:navy9lemon@sohu.com

通信作者:段蕴铀,E-mail:forever.lemon@163.com

收稿日期:2009-03-10;修回日期:2009-06-27

高于一般陆战伤[2]。为进一步了解海水作为致伤因素，在胸部开放伤后合并海水浸泡致 ALI 伤情危重的病理作用机制，我们将胸部开放伤的动物模型分别进行胸腔海水、淡水浸泡，比较其伤情特点与病理生理变化的相关因素，探讨胸部开放伤后海水胸腔浸泡的救治要点。

1　材料与方法

1.1　动物模型建立和实验分组

健康成年杂交犬 24 只，购自北京科宇动物养殖中心（合格证号：SCXF-京-2002），体质量 15～20 kg，雌雄不限。术前禁食 12 h，采用氯胺酮（20 mg/kg）和速眠新（0.1 ml/kg）肌肉注射麻醉。分离右侧颈静脉和颈动脉，分别置入动脉及静脉导管，连接至多导生理记录仪监测生命体征并方便取血和注射药物。胸部开放伤海水浸泡致 ALI 犬模型制备参照文献[3]：用锐器于犬右胸第 4、5 肋间制成 0.5 cm 切口，形成开放性气胸，取 8 只做为对照组（仅有开放性气胸）；海水组（$n=8$）外伤后10 min 内通过切口向胸腔内注入人工海水 35 ml/kg；淡水组（$n=8$）外伤后注入纯净水 35 ml/kg。人工海水按照国家海洋局第三海洋研究所提供的中国东南沿海海水主要成分配制，渗透压 1 250～1 350 mmol/L，pH 8.20，比质量 1.05～1.06。实验室温度 25 ℃，人工海水温度 22 ℃。所有动物在开放伤后 10 min 内闭合伤口。动态观察血气，以氧合指数（PaO_2/FiO_2）< 300 mmHg 为 ALI 模型成功的指标。各组伤后 6 h 内均达到 ALI 诊断标准。

1.2　标本留取

分别于外伤后 0、2、4、6、8 h 留取静脉血和动脉血，伤后 8 h 用生理盐水 15 ml 进行肺中叶支气管肺泡灌洗，留取支气管肺泡灌洗液（BALF）和肺组织标本。静脉血和 BALF 用离心机，3 000 r/min离心 10 min，分离血浆和 BALF 上清液，－20 ℃保存。肺组织标本－80 ℃冻存待用。

1.3　检测指标和方法

观察肺组织病理改变，动脉血测血气、静脉血测血浆渗透压和各因子水平。伤后 8 h 测 BALF 和血浆中总蛋白含量，计算肺泡通透指数（pulmonary penetration index，PPI），PPI = BALF 中蛋白含量/血浆蛋白含量。按照 ELISA 试剂盒（尚柏生物制剂公司提供）说明，ELISA 方法测定血浆各时间点炎症因子白细胞介素-1β（interleukin-1β，IL-1β）、白细胞介素-8（interleukin-8，IL-8）水平和内皮损伤生物标志血管性血友病因子（von Willnbrang factor，vWF）水平。

1.4　统计学处理

以 SPSS 13.0 统计软件包处理数据。每个指标的重复测量数据用方差分析法，计量数据间显著性采用 t 检验，用 Pearman correlation 行相关性分析。

2　结果

2.1　组织学变化

对照组肺泡结构完整，毛细血管充血、炎细胞浸润，肺泡内无明显渗液，肺泡间隔无明显增宽。淡水组肺泡结构尚完整，局灶性肺泡萎陷，毛细血管和肺间质充血明显，肺泡腔内少许炎、红细胞渗出，未见水肿液积聚。海水组肺间质和肺泡腔内大量水肿液积聚，肺泡间隔明显增宽，毛细血管扩张淤血，大量白细胞渗出、聚集，部分区域肺泡结构的完整性破坏，肺泡融合，部分区域肺泡塌陷萎缩。见图 1。

2.2　肺泡通透性指数（PPI）比较

如表 1 所示，海水组 PPI 、BALF 中蛋白含量较对照组、淡水组明显升高（$P<0.05$），淡水组较对照组变化无统计学意义（$P>0.05$）。

表 1　各组 BALF 和血浆中总蛋白含量（g/L）及肺泡通透性指数 PPI 比较（$n=8$，$\bar{x}\pm s$）

组别	BALF 中总蛋白（g/L）	血浆总蛋白（g/L）	PPI
对照组	1.95±0.57	71.41±9.42	0.026±0.007
淡水组	2.24±0.48	65.05±5.97	0.034±0.007
海水组	3.97±1.58[a]	71.24±6.45	0.055±0.002[a]

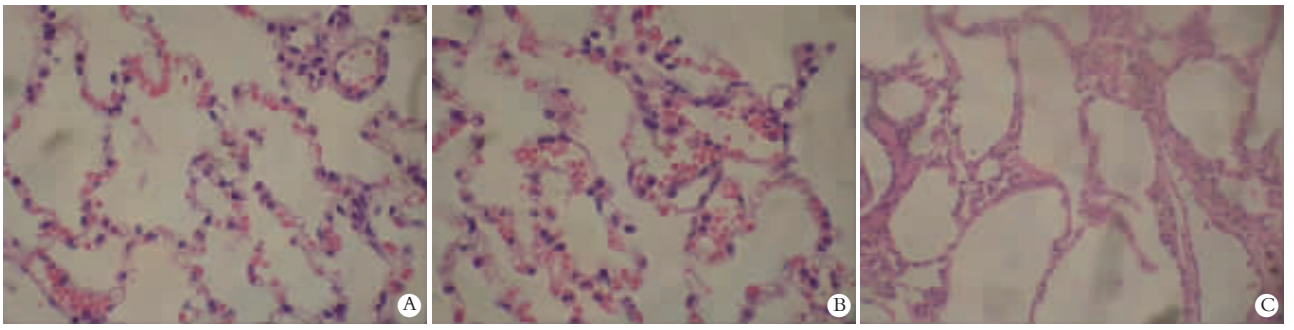
a：$P<0.05$，与对照组、淡水组比较

2.3　血浆炎症因子表达

2.3.1　IL-1β　对照组伤后 6 h 较伤前出现显著差异（$P<0.05$）；淡水、海水组伤后 2 h 较伤前差异显著，较对照组升高提前出现，淡水、海水组 IL-1β 升高较对照组有显著差异（$P<0.05$）；海水组较淡水明显升高，伤后 2 h 差异显著（$P<0.05$，表 2）。

2.3.2　IL-8　对照组伤前、后无显著差异；淡水、海水组伤后 2 h 较伤前出现显著差异；淡水、海水组较对照组有显著差异（$P<0.05$）；海水组较淡水明显升高，伤后 4 h 差异显著（$P<0.05$，表 2）。

2.3.3　vWf　在对照组和淡水组变化不明显，海水组伤后 4 h 较伤前及对照组和淡水组出现显著统计学差异（$P<0.05$）；对照组和淡水组间未见显著差异（$P>0.05$，表 2）。



A：对照组；B：淡水组；C：海水组

图 1　各组肺组织病理学观察（HE×200）

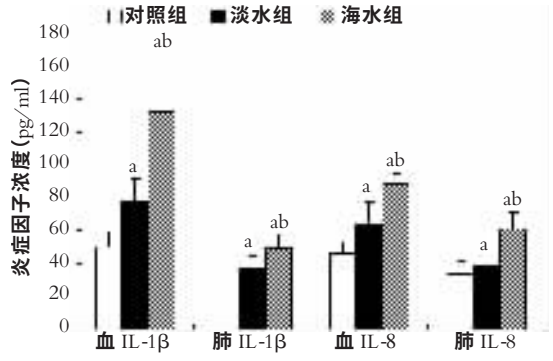
表2 各组血浆中炎症因子变化(pg/ml, $n=8$, $\bar{x}\pm s$)

组别	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h
IL-1β					
对照组	33.99±5.91	38.93±7.83	44.78±10.74	48.25±12.73[a]	50.09±9.65[a]
淡水组	31.90±5.63	66.53±13.88[ab]	107.72±18.51[ab]	61.13±11.38[ab]	77.54±14.39[ab]
海水组	32.66±4.63	123.82±46.39[abc]	144.11±29.72[abc]	106.71±37.18[abc]	131.90±35.39[abc]
IL-8					
对照组	31.31±3.11	40.65±16.75	38.41±15.30	47.74±10.87	46.34±7.18
淡水组	33.27±3.91	56.31±12.00[a]	57.69±8.37[ab]	62.80±21.27[ab]	63.71±14.15[ab]
海水组	32.61±2.30	68.62±18.57[ab]	79.91±8.24[abc]	77.79±11.01[abc]	88.26±6.66[abc]
vWf					
对照组	0.53±0.08	0.61±0.10	0.57±0.16	0.49±0.13	0.59±0.19
淡水组	0.56±0.08	0.58±0.09	0.57±0.08	0.60±0.07	0.64±0.08
海水组	0.55±0.07	0.59±0.10	0.76±0.08[abc]	0.85±0.08[abc]	1.03±0.09[abc]

a: $P<0.05$,同组内与0 h比较;b: $P<0.05$,与对照组比较;c: $P<0.05$,与淡水组比较

2.4 肺组织和血浆中IL-1β和IL-8水平比较

伤后8 h肺组织和血浆中海水组IL-1β较淡水组明显升高($P<0.05$);同时海水组IL-8较淡水组明显升高($P<0.05$);海水组、淡水组较对照组亦明显升高($P<0.05$)。

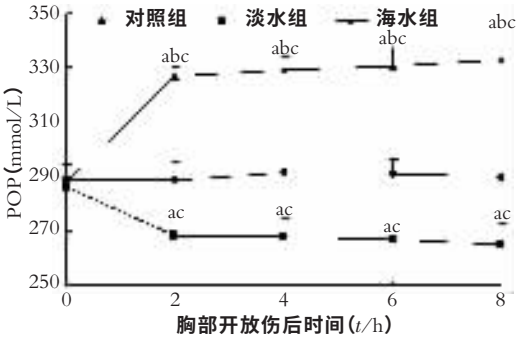


a: $P<0.05$,与对照组比较;b: $P<0.05$,与淡水组比较

图2 伤后8 h肺和血浆中各组IL-1β和IL-8水平比较

2.5 血浆渗透压变化

海水组和淡水组血浆渗透压(plasma osmotic pressure, POP)在2 h内迅速达到新的稳态:海水组POP升高,淡水组降低,均较对照组有显著差异($P<0.05$);海水组与淡水组间差异显著($P<0.05$)。见图3。



a: $P<0.05$,与对照组比较;b: $P<0.05$,与淡水组比较;c: $P<0.05$,同组内与0 h比较

图3 各组血浆渗透压变化分析

2.6 血浆渗透压升高与肺泡通透性和炎症因子水平的相关性

相关性分析结果:血浆渗透压(POP)与IL-1β($r=0.616$, $P=0.01$)、IL-8($r=0.638$, $P=0.001$)、PPI($r=0.743$, $P=0.035$)明显正相关。

3 讨论

海战中胸部开放伤伤员落水后可致ALI的病情加重,但其机制不详。本实验中发现海水和淡水组均在伤后即出现呼吸急促、低氧血症等,海水组呼吸困难进行性加重,淡水组在2~4 h后呼吸困难逐渐缓解,趋于稳定。海水浸泡后肺泡通透指数(PPI)明显升高提示高渗海水导致肺泡通透性升高,引起毛细血管内液体、蛋白质以及肺泡隔内物质大量渗入肺泡内,导致肺泡水肿,弹性下降,肺顺应性降低,表现为呼吸困难,呼吸频数,而淡水浸泡改变不明显,不会导致严重的肺水肿和低氧血症,与我们病理观察结果一致。

各组血浆和肺组织中IL-1β和IL-8进行性升高,海水组较淡水组显著升高。IL-1β是肺泡巨噬细胞激活后分泌的、介导早期ALI的主要细胞因子之一,通过诱导巨噬细胞产生多种趋化因子如IL-8等并刺激趋化因子释放和上调黏附分子表达[4], IL-1β还以自分泌或旁分泌的方式增加炎性细胞因子基因表达,从而扩大肺部炎症反应[5],在ALI发生、发展中发挥重要的炎症引发作用。IL-8是中性粒细胞激活和迁移的重要调节因子和进入损伤组织的重要炎性介质,是目前已知最强的中性粒细胞趋化因子,与血管内皮细胞表面的硫酸肝素糖蛋白结合,对黏附在血管内皮细胞上的中性粒细胞有很强的趋化作用,并使之激活、外形改变,脱颗粒,引起呼吸爆发,释放溶酶体酶和发挥吞噬作用,是ALI病理过程中起重要作用的细胞因子[6-8]。本实验结果证实胸部开放伤后淡水或海水胸腔浸泡均可加重全身炎症反应,但海水较淡水组炎症程度更剧。

血管性血友病因子(vWF)是内皮细胞上的特征因子, vWF水平的增加是血管内皮细胞损伤的标志[9]。本实验证实胸部开放伤后海水胸腔浸泡出现严重的血管内皮细胞损伤,而淡水浸泡对血管内皮细胞损伤不明显。内皮细胞的损伤是ARDS的重要标志,在ALI的病理机制中起重要作用,其损伤程度与预后密切相关。因此,淡水浸泡后肺组织损伤轻,可以逐步代偿,病情发展慢,不易发展为ARDS。

肺组织内大量产生的炎症因子是导致肺泡上皮细胞和内皮细胞损伤的重要原因,也是ALI重要的发生机制,在胸部开放伤合并海水浸泡致ALI中发挥重要作用。海水浸泡加剧了浸泡组织的过度炎症反应,启动全身炎症反应造成组织继发损伤。本实验相关性分析显示血浆渗透压升高与炎症因子大量释放、肺泡通

透性升高的正相关性支持这一结论。

综上所述,胸部开放伤后海水、淡水浸泡致ALI的基本病理生理改变相似,都是炎症反应和细胞损伤,但病理反应和损伤程度海水组明显重于淡水组。淡水浸泡病理变化以炎症反应为主,细胞损伤不明显,肺泡毛细血管膜通透性改变小,因此渗出性水肿较海水浸泡程度明显减轻,预后好。海水的高渗环境加重了肺泡细胞、毛细血管内皮细胞的损伤和炎症反应的程度,使肺泡通透指数明显升高,加重渗出性肺水肿,导致更严重的损伤。提示胸部开放伤海水浸泡致ALI病情危重的重要因素是海水的高渗环境。其救治措施也有别于一般创伤和淡水浸泡,及时补充低张液体降低血浆渗透压尤为关键,液体管理是海战伤ALI救治研究不能忽略的环节。

参考文献:

[1] 沈宏亮,王 强. 海水浸泡创伤病理生理变化和救治措施的研究进展[J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(12): 1365-1367.
[2] 虞积耀,赖西南,李 辉,等. 战伤合并海水浸泡生存时间及死亡率的动物实验研究[J]. 解放军医学杂志, 2005, 30(3): 268-269.
[3] 孟继光,段蕴铀,薛志强,等. 胸部开放伤后海水灌入胸腔致急性肺损伤犬模型的实验研究[J]. 中华航海医学与高气压医学杂志, 2008, 15(2): 74-77.
[4] Haddadel B, McCluskie K, Birrell M A, *et al*. Differential effects of ebselen on neutrophil recruitment, chemokine, and inflammatory mediator expression in a rat model of lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation[J]. J Immunol, 2002, 169(2): 974-982.
[5] Guo R F, Ward P A. Mediators and regulation of neutrophil accumulation in inflammatory responses in lung: insights from the IgG immune complex model[J]. Free Radic Biol Med, 2002, 33(3): 303-310.
[6] Riffo-Vasquez Y, Spina D. Role of cytokines and chemokines in bronchial hyperresponsiveness and airway inflammation [J]. Pharmacol Ther, 2002, 94(3): 185-211.
[7] Mukaida N. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003, 284(4): L566-L577.
[8] Shames B D, Zallen G S, McIntyre R C Jr, *et al*. Chemokines as mediators of diseases related to surgical conditions[J]. Shock, 2000, 14(1): 1-7.
[9] Varol E, Ozaydin M, Sahin M, *et al*. vWF levels as a circulating marker of endothelial dysfunction in patients with hypertrophic cardiomyopathy[J]. Indian Heart J, 2005, 57(6): 655-657.

(编辑 邓强庭)

文章编号:1000-5404(2009)21-2093-01

个案与短篇

重庆三峡库区部分地域猪博尔纳病病毒自然感染状况调查

朱 丹[1],张英英[1],展群岭[1],余建萍[1],曾志磊[1],徐鸣明[1],胡永波[1],陈 晓[1],彭 丹[1],霍 康[1],谢 鹏[1,2] (重庆医科大学:[1]附属第一医院神经内科,[2]神经科学研究中心,重庆 400016)

博尔纳病病毒(Borna disease virus,BDV)是一种非细胞溶解的单股负链嗜神经RNA病毒,可引起人畜共患病博尔纳病。目前研究表明,BDV几乎可感染所有的温血动物[1],但其流行现况尚不完全清楚。本研究采用改进的巢式逆转录酶聚合酶链反应(nRT-PCR)检测重庆三峡库区部分地域健康猪外周血单核细胞(PBMCs)BDV P24基因片段,对阳性产物进行测序分析,了解该地域BDV自然感染状况。

1 材料与方法

1.1 实验动物

360例健康猪(雌雄各半)来自重庆三峡库区(合川、荣昌、涪陵、云阳等养猪大县)。采集猪外周血10 ml加EDTA抗凝待检测。

基金项目:国家高技术研究发展计划(863计划)(2006AA02Z196)
Supported by the National High Technology Research and Development Program of China(863 Program)(2006AA02Z196)
作者简介:朱 丹,女,重庆市人,博士研究生,主要从事中枢神经系统感染等方面的研究。E-mail:zhudan25@gmail.com
通信作者:谢 鹏,E-mail:peng.xie58@gmail.com
收稿日期:2009-03-22;修回日期:2009-04-27

1.2 引物和探针

根据GenBank BDV基因组保守区编码BDV p24第二开放阅读框(ORFⅡ)的核苷酸序列,设计了2对引物和1条探针,其中外引物序列为P1:5′-TGACCCAACCAGTAGACCA-3′,P2:5′-GTCCCATTCATCCGTTGTC-3′,内引物序列为P3:5′-CCCTCCAAGTGGAAACCAT-3′,P4:5′-CAGTATCTTGATGTTCTCGCCA-3′,引物由上海英骏生物有限公司合成;荧光探针序列为:5′-FAM-TCAGCGGTGCGACCACTCCGATAGC-TAMRA-3′,由中山医科大学达晖基因诊断中心合成。

1.3 RNA的提取

将EDTA抗凝的外周血用Ficoll-conray液密度梯度离心法分离PBMCs,随后用Trizol一步法提取RNA。提取的RNA样本用紫外分光光度计测260、280 nm处的吸光度值*D*(260)和*D*(280),并计算二者比值以分析RNA样品的纯度。使用随机数字表法选择8例PBMCs样本提取的RNA样品进行琼脂糖凝胶电泳分析所提取的RNA样品完整性。

1.4 样本的BDV检测

本研究采用改进的nRT-PCR方法,即在常规nRT-PCR的基础上,第2轮PCR过程中加入*Taq*Man荧光探针。在检测中均设置阴性对照(非模板)和阳性对照(PMD19质粒标准品)以

(下转2105页)