doi:10.11659/jjssx.05E017094

·基础研究·

SD 大鼠体温过低症胸腔积液模型的建立

奂剑波[1],陈丽娜[2],史成和[3],代 维[4],袁丹凤[4],周继红[4],韩志海[1] (1.第二军医大学海军临床医学院,海军总医院呼吸与危重症医学科,北京 100048;2.安徽医科大学研究生院,安徽 合肥 230032;3.海军总医院海战伤救治研究中心,北京 100048;4.第三军医大学大坪医院野战外科研究所第四研究室,创伤烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

[摘 要] **目的** 建立 SD 大鼠低温性胸水模型,观察大鼠低温胸水产生量与冷水浴时长的关系。**方法** 雄性 SD 大鼠 60 只,体质量为(290.3±7.5)g,随机分为实验组(n=50)和对照组(n=10),根据在冷水中浸泡时间的不同将实验组分为 A1 组、A2 组、A3 组、A4 组、A5 组,每组 10 只大鼠。实验组放入自制圆柱形竖立大鼠固定器内,然后置入(20±0.2)℃冷水中浸泡,浸泡深度为锁骨水平。A1 组、A2 组分别浸泡 12 h、24 h 后取出大鼠进行麻醉,收集血清及胸水上清液检测总蛋白、乳酸脱氢酶浓度;剩余大鼠浸泡 24 h 后给予 37 ℃恒温水浴复温 1 h,A3 组、A4 组、A5 组分别在开始复温后 12 h、24 h、36 h 取出大鼠并收集血清及胸水上清液送检。正常对照组直接麻醉收集血清检测总蛋白、乳酸脱氢酶浓度。采用 Light 标准对大鼠胸水性质进行分析。**结果** 正常对照组大鼠无明显胸水,A2 组冷水浸泡 24 h 胸水量较 A1 组冷水浸泡 12 h 增多;复温后随着时间的延长胸水量逐渐减少,至复温后 36 h 胸水消失。A1 组胸水总蛋白/血清总蛋白约 50%,A2、A3、A4 组均大于 50%;实验各组胸水乳酸脱氢酶/血清乳酸脱氢酶均小于 60%;实验组胸水乳酸脱氢酶大于 2 倍正常组血清乳酸脱氢酶。按照 light 标准,大鼠体温过低症胸水性质为渗出液。**结论** 采用 20 ℃水浴建立大鼠低温性胸水模型稳定可靠;胸水随着冷水浸泡时间的延长而增多,给予复温后胸水先慢后快逐渐被吸收。

[关键词] 体温过低症;胸腔积液;大鼠;疾病模型

[中图分类号] R339.6;R561.3 [文献标识码] A [收稿日期] 2017-05-20

[基金项目] 军队后勤科研计划重点项目(BHJ14C009);军队后勤科研计划重点项目(BHJ16J011)

[通信作者] 韩志海,E-mail:hanzhihai@hotmail.com

[5] 李雪鹏,冯卫华,刘丰春,等.人脑脑回的侧别差异性[J].大理学院学报(医学版),2002,11(2):14-16.

[6] 焦守恕.大脑半球的不对称性[J].北京第二医学院学报,1981,4(1)365.

[7] 陈汉其,李少华,高豫中,等.大脑左右半球不对称的形态观察及临床意义[J].中国临床解剖学杂志,1997,15(4):291-293.

[8] 陈 伟,丁士仪,张绍祥,等.大脑半球髓质不对称性的 MRI 研究[J].第三军医大学学报,2002,24(2):238-239.

[9] 遇 涛.大脑皮层功能绘图的临床应用与进展[J].实用医学杂志,2012,28(13):2117-2119.

[10] Lascano AM,Grouiler F,Genetti M,et al. Surgically relevant localization of central sulcus with high-density somatosensory-evoked potentials compared with functional magnetic resonance imaging[J]. Neurosurgery,2014,74(5):517-526. doi:10.1227/NEU.0000000000000298.

[11] Schucht P,Scidel K,Murek M,et al. Low-threshold monopolar motor mapping for resection of lesions in motor eloquent areas in chidren and adolescents[J]. J Neururg Pediatr,2014,13(5):572-578. doi:10.3171/2014.1.PEDS13369.

[12] Yang JC,Papadimitriou G,Eckbo R,et al. Multi-tensor investigation orbitofrontal cortex tracts affected in subcaudate tractotomy[J]. Brain Imaging Behav,2015,9(2):342-344. doi:10.1007/s11682-014-9314-z.

[13] Winter TJ,Franz EA. Implication of the anterior commissure in the allocation of attention to action[J]. Front Psychol,2014,5(3):256-258. doi:10.3389/fpsyg.2014.00432.

[14] Freitag MT,van Bruggen T,Fritzsche KH,et al. Reduced lateralization in early onset schizophrenia[J]. Neurosci Lett,2013,1(24):23-28. doi:10.1016/j.neulet.2013.01.024.

[15] Choi BS,Kim YH,Jeon SR. Vascular caused by deep brain stimulation using double-dose gadolinium-enhanced brain MRI[J]. Neural Regen Res,2014,9(3):276-279. doi:10.4103/1673-5374.128221.

[16] Han HJ,Jung WH,Jang JH,et al. Reduced volume in the antherior internal capsule but its maintained correlation with the frontal gray matter in subjects at ultra-high risk for psyhosis[J]. Psychiatry Res,2012,204(2):82-90. doi:10.1016/j.pscychresns.2012.09.012.

[17] Jang SH,Chang PH,Kim YK,et al. Anatomical lpcation of the frontopontine fibers in the internal capsule in the human brain a diffusion tensor tractography study[J]. Neuro Report,2014,25(2):117-121. doi:10.1097/WNR.0000000000000076.

[18] Lemary M,Kido DK. Asymmetries of the cerebral hemisphere on computed tomogram[J]. Comput Tomogr,1978,2(5):471-478.

[19] 刘学钧,李建利,陈汉其,等.大脑左右半球不对称的解剖学观察及临床意义[J].中国煤炭工业医学杂志,2003,6(7):634-635. doi:10.3969/j.issn.1007-9564.2003.07.046.

(编辑:刘 艺)

Establishment of pleural effusion model of SD rats with hypothermia

HUAN Jian-bo[1], CHEN Li-na[2], SHI Cheng-he[3], DAI Wei[4], YUAN Dan-feng[4], ZHOU Ji-hong[4], HAN Zhi-hai[5] (1. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Naval General Hospital, Naval Medical College of Second Military Medical University, Beijing 100048, China; 2. Graduate Shool, Anhui Medical University, Hefei Anhui 230032, China; 3. Naval War Treatment Research Center, Naval General Hospital, Beijing 100048, China; 4. Fourth Research Room, State Key Laboratory of Traumatic Burn and Compound Injury, Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To establish a hypothermic pleural effusion model with SD rats, and to observe the relationship between hypothermic pleural effusion production and cold water immersion duration. **Methods** Sixty male Sprague-Dawley rats of (290.3 ± 7.5) g were randomly divided into experimental group (n = 50) and control group (n = 10). The experimental group was divided into group A1, A2, A3, A4 and A5 according to the different immersion time with 10 rats in each group. The experimental group was placed in a self-made cylindrical erected rat holders and then immersed in cold water at (20 ± 0.2) ℃. The soaking depth was the level of clavicle of the rats. Group A1 and A2 were respectively removed and anesthetized after immersing 12 hours and 24 hours, and the serum and pleural effusion were collected to detect total protein and lactate dehydrogenase concentration. The remaining rats of experimental group were rewarmed by incubating at 37 ℃ for 1 hour. Group A3, A4 and A5 were respectively anesthetized at 12 hours, 24 hours and 36 hours after the initiation of rewarming for detecting the serum and pleural effusion. The control group was directly anesthetized to collect serum to detect total protein, lactate dehydrogenase concentration. The pleural effusion quality was analyzed by Light standard. **Results** There was no obvious pleural effusion in normal rats. The amount of pleural effusion in the group A2 was higher than that in the group A1. After the rewarming, the amount of pleural effusion gradually decreased with the prolongation of time, and disappeared 36 hours later. Pleural effusion total protein/serum total protein was about 50% in group A1, while it was more than 50% in the group A2, A3 and A4. Pleural effusion lactate dehydrogenase/serum lactate dehydrogenase were all less than 60% in each experimental group. The pleural effusion lactate dehydrogenase of experimental group was 2 times greater than that of the control group. **Conclusion** The method of establishing hypothermia pleural effusion SD rats model by immersing in 20 ℃ water is stable and reliable. The pleural effusion increased with the prolongation of the cold water immersing. After rewarming, the pleural effusion was gradually absorbed and then dispeared.

Keywords: hypothermia; pleural effusion; rat; disease model

体温过低症在野外探险、极端低温天气、海难事故中发生率高,死亡率高,是灾害救援面临的重要伤病[1-2]。重度的低温伤员死亡率高,常伴随一定程度的胸腔积液,正确及时处理胸水对于伤员预后有重要影响[3-4]。目前低温胸水发生的原因仅仅在于理论推导,尚缺乏科学实证,因此亟需建立相应的动物模型逐步深入地进行研究。本研究通过低温水浴方法制作 SD 大鼠体温过低症胸腔积液模型,观察大鼠低温胸水产生量与水浴时间的关系,并通过 Light 标准对胸水性质进行分析。

1 材料与方法

1.1 实验动物和材料

雄性 SD 大鼠 60 只,体质量为(290.3 ± 7.5) g,由第三军医大学野战外科研究所动物实验中心提供,实验方案经海军总医院动物实验伦理委员会批准。大鼠实验前 12 h 禁食,自由饮水。实验材料包括:自制圆柱形竖立大鼠固定器、恒温水浴箱、离心机、毛巾、鼠笼、电子肛温计等。

1.2 实验方法

大鼠随机分为实验组(n = 50)和对照组(n = 10)。实验组放入自制圆柱形竖立大鼠固定器内,然后置入(20 ± 0.2)℃冷水中浸泡,浸泡深度为锁骨水平,根据浸泡时间的不同分为 A1 组、A2 组、A3 组、A4 组和 A5 组,每组 10 只。A1 组浸泡 12 h 后取出大鼠进行腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,剪开腹腔腹主动脉穿刺采集血液,小心沿胸骨正中线剪开 1 个小切口,观察胸水颜色、澄清度,用注射器抽取双侧胸水,记录胸水量,血液及胸水均采用 3 000 r/min 离心 15 min,取上清液送第三军医大学大坪医院检验科检测总蛋白浓度(双缩脲法)、乳酸脱氢酶浓度(酶速率法)。A2 组 10 只大鼠浸泡 24 h 后按 A1 组方法提取血清及胸水上清液送检。剩余大鼠连同其固定器一起移至 37 ℃恒温水浴箱内,浸泡深度为锁骨水平,温水浴复温 1 h 后将其取出放入鼠笼内,取出固定器然后用干毛巾简单擦拭身上水分,室温保持在 20 ℃,给予充足水和饲料自由饮食,A3 组、A4 组及 A5 组大鼠分别在开始复温后 12 h、24 h、36 h 按 A1 组方法提取血清及胸水上清液送检。对照组大鼠麻醉后,按相同方法采集血清检测总蛋白

浓度和乳酸脱氢酶浓度。

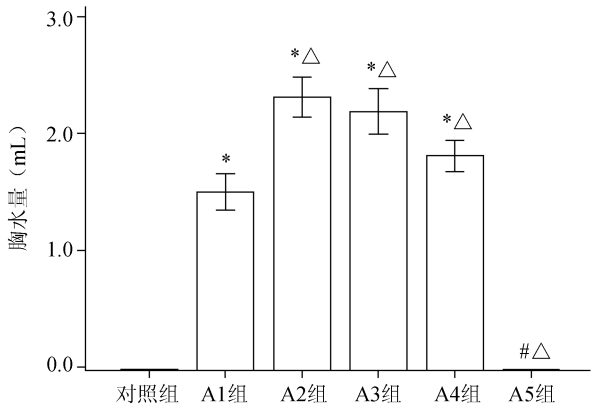
1.3 数据处理与统计

应用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行分析处理，胸水量、胸水与血清总蛋白浓度及其比值，胸水与血清乳酸脱氢酶浓度及其比值均用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，并采用单因素方差分析（ANOVA）进行比较，采用 SNK 检验进行两两相互比较，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠胸水随时间变化

各组胸水量如图 1 所示，正常大鼠无明显胸水，A2 组冷水浴 24 h 胸水量较 A1 组冷水浴 12 h 增多。复温后随着时间的延长胸水量逐渐减少，至复温后 36 h（A5 组）胸水消失。除 A4 组 1 只大鼠胸水呈淡黄色透明外，其余大鼠胸水颜色均为无色透明。



#：总体 ANOVA 分析，$P<0.05$；*：与对照组比较（SNK 检验），$P<0.05$；△：与 A1 组比较（SNK 检验），$P<0.05$

图 1 各组平均胸水量

2.2 各组胸水性质分析（Light 标准）

各组胸水和血清总蛋白浓度、乳酸脱氢酶浓度及其比值如表1，总体差异均有统计学意义（$P>0.05$）。实验组中 A1 组胸水总蛋白与血清总蛋白的比值接近 50%，其余各组均大于 50%，实验各组胸水乳酸脱氢酶与血清乳酸脱氢酶的比值均小于 60%；实验组胸水乳酸脱羟酶小于 2 倍正常血清乳酸脱羟酶。按照 Light 标准，A1 ~ A4 组胸水性质为渗出液。

3 讨论

及时恰当的复温是体温过低症救治的关键，但复温成功后各系统并发症也是导致重度伤员死亡率高的重要原因[5-6]。van der Ploeg 等[3]、Totapally 等[7]和 Su 等[8]对低温伤员的统计中呼吸系统的并发症发生率最高，且大多伴有胸水发生，病死率最高。临床上体温过低症属少发伤病，低温性胸水的处理未能形成系统的理论和原则，需要利用动物实验进行科学研究[9-10]。低温性胸水的产生与机体核心温度的高低密切相关，前期实验中我们将 SD 大鼠置入 20 ℃冷水中并采用温度记录器连续记录腹腔温度，大鼠在 20 ℃冷水浸泡后腹腔温度在 2 h 后逐渐接近水温，并长时间内维持，当给予 37 ℃水浴复温其体温快速恢复至正常。本研究虽未行连续腹腔温度记录，但完全按照相同方法进行低温浸泡实验，故认为大鼠腹腔温度变化曲线与前期实验结果相同。机体核心温度下降常会伴随一系列的病理生理改变，低温可导致心脏功能抑制，外周血管收缩，使外周血容量相对增多，胸膜毛细血管静水压升高导致体液向浆膜腔外漏，另外体温过低伤员也会通过低温性利尿的方式来排出相对过多的体液[11-12]。本研究中我们发现低温性胸水大部分为双侧胸水，并且伴随复温胸水开始减少，减少速度先慢后快，这与心源性胸水产生的表现极为相似，与前推论相符，故低温性胸水大部分为漏出成分[13]。该大鼠模型在低温浸泡 12 h 左右即产生明显胸水，在浸泡 24 h 胸水增多，胸水产生率为 100%，该体温过低症胸腔积液模型稳定重复性良好，可为后续研究所使用。

表 1 各组血清与胸水总蛋白浓度（TP）、乳酸脱氢酶浓度（LDH）及比值（$\bar{x} \pm s$，$n=10$）

组别	血清		胸水		胸水/血清	
	TP（g/L）	LDH（u/L）	TP（g/L）	LDH（u/L）	TPR（%）	LDHR（%）
对照组	49.9 ± 1.4	1 036.9 ± 116.7	–	–	–	–
A1 组	51.4 ± 0.9*	4 040.0 ± 836.1*	25.7 ± 0.8	1 472.4 ± 378.4	49.9 ± 0.9	36.3 ± 4.2
A2 组	53.6 ± 0.9*☆	4 648.8 ± 595.9*	27.6 ± 0.8☆	1 868.3 ± 228.0☆	51.5 ± 1.1☆	40.3 ± 3.0☆
A3 组	52.5 ± 1.0*☆	4 628.9 ± 990.2*	27.3 ± 0.7☆	1 752.3 ± 350.8☆	51.9 ± 0.7☆	38.1 ± 2.5
A4 组	51.9 ± 1.0	4 643.0 ± 646.5*	27.0 ± 0.9#☆	1 715.5 ± 266.4△	52.0 ± 1.2#☆	37.0 ± 3.3#
A5 组	51.0 ± 1.1#	4 414.0 ± 731.9#*	–	–	–	–

#：总体 ANOVA 分析，$P<0.05$；△：总体 ANOVA 分析，$P=0.051$（结合数据内容认为差异有统计学意义）；*：与对照组比较（SNK 检验），$P<0.05$；☆：与 A1 组比较（SNK 检验），$P<0.05$

上世纪70年代，Light等[14]提出区别胸水漏出液和渗出液的Light标准，至今仍为临床广泛使用，即胸水总蛋白(TP)/血清TP大于50%，胸水乳酸脱氢酶(LDH)/血清LDH大于60%，或胸水LDH大于血清LDH正常值上限2/3，如符合任意一项即为渗出液，如全不符合则为漏出液。本研究中除A1组外其余各实验组胸水TP/血清TP均大于50%，且胸水LDH大于2倍正常血清LDH，根据Light标准为渗出液。有研究表明，虽然Light标准鉴别渗出液的敏感性较高，但是也会将20%左右的漏出液误诊为渗出液[15-16]。胸水TP/血清TP在鉴别渗出液和漏出液中价值最高，本研究中各实验组并未明显大于50%，因此不改变我们对低温性胸水主要为漏出液的推断，但胸水仍有部分渗出成分。LDH是广泛存在于机体组织细胞内的一种糖酵解酶，在心肌与骨骼肌中含量最多，当机体组织受到损伤时，LDH就会从细胞内进入到血液或组织液中，从而检测到其值升高，以此来反映炎症反应，但该指标对判断病因特异性较差[16]。本研究中实验组无论在低温浸泡期间还是复温后血清LDH均明显高于正常组血清LDH 2倍以上，因此低温对于大鼠的损伤是相对严重的，这在一些相关研究中也得到了证实[17-19]，但是本研究中胸水血清LDH比值却较低，所以我们认为低温对于全身的损伤要大于对胸膜的损伤。胸膜低炎症反应是临床上采用胸膜腔温水灌流方法来进行重度体温过低症复温的前提条件[20]，对于低温性胸水的处理如何与复温措施密切结合，胸水的血液回输能否有效弥补快速复温后血容量增大对补液的需求是今后研究的重要内容。

综上所述，采用20 ℃水浴使大鼠产生低温性胸水模型稳定可重复性良好，可用于后续研究。胸水随着冷水浴时间的延长而增多，给予复温后胸水先慢后快逐渐被吸收；按照Light标准大鼠体温过低症胸水性质为渗出液，但不能否认体液浆膜腔外漏为低温性胸水形成的主要原因。

[参考文献]

[1] Brown DJ, Brugger H, Boyd J, et al. Accidental hypothermia[J]. N Engl J Med, 2012, 367(20): 1930 - 1938. doi: 10.1056/NEJMra1114208.

[2] Weuster M, Bruck A, Lippross S, et al. Epidemiology of accidental hypothermia in polytrauma patients: an analysis of 15,230 patients of the TraumaRegister DGU[J]. J Trauma Acute Care Surg, 2016, 81(5): 905 - 912. doi: 10.1097/TA.0000000000001220.

[3] van der Ploeg GJ, Goslings JC, Walpoth BH, et al. Accidental hypothermia: rewarming treatments, complications and outcomes from one university medical centre[J]. Resuscitation, 2010, 81(11): 1550 - 1555. doi: 10.1016/j.resuscitation.2010.05.023.

[4] Rischall ML, Rowland-Fisher A. Evidence-based management of accidental hypothermia in the emergency department[J]. Emerg Med Pract, 2016, 18(1): 1 - 19.

[5] Zafren K. Out-of-hospital evaluation and treatment of accidental hypothermia[J]. Emerg Med Clin North Am, 2017, 35(2): 261 - 279. doi: 10.1016/j.emc.2017.01.003.

[6] Jarosz A, Darocha T, Kosinski S, et al. Profound accidental hypothermia: systematic approach to active recognition and treatment[J]. ASAIO J, 2017, 63(3): e26 - e30. doi: 10.1097/MAT.0000000000000422.

[7] Totapally A, Leoncio M, Beltramo F, et al. Epidemiology and outcomes of children with accidental hypothermia: a propensity-matched study[J]. J Trauma Acute Care Surg, 2017, 82(2): 362 - 367. doi: 10.1097/TA.0000000000001280.

[8] Su YJ. Hypothermic lung edema after accidental hypothermia with out of hospital cardiac arrest[J]. Heart Lung Vessel, 2015, 7(4): 328 - 329.

[9] Coccarelli A, Boileau E, Parthimos D, et al. Modelling accidental hypothermia effects on a human body under different pathophysiological conditions[J]. Med Biol Eng Comput, 2017. doi: 10.1007/s11517 - 017 - 1657 - 3.

[10] Darocha T, Stolinski J, Piatek J. Cardiac surgery centers are ideal places to treat patients undergoing life-threatening deep accidental hypothermia using extracorporeal membrane oxygenation venoarterial therapy[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2017, 153(1): 146 - 147. doi: 10.1016/j.jtcvs.2016.08.047.

[11] Polderman KH. Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia[J]. Critical Care Medicine, 2009, 37(Supplement): S186 - S202. doi: 10.1097/CCM.0b013e3181aa5241.

[12] 陈丽娜，奂剑波，史成和，等. 海水浸泡性体温过低症的病理生理学研究进展[J]. 转化医学杂志，2016(6): 381 - 384. doi: 10.3969/j.issn.2095 - 3097.2016.06.016.

[13] 孙建勋，李红伟，张龙彬. 心源性胸水的临床特点及误诊原因分析[J]. 临床医学，1998(8): 47 - 48.

[14] Light RW, Macgregor MI, Luchsinger PC, et al. Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates[J]. Ann Intern Med, 1972, 77(4): 507 - 513.

[15] Saguil A, Wyrick K, Hallgren J. Diagnostic approach to pleural effusion[J]. Am Fam Physician, 2014, 90(2): 99 - 104.

[16] 杨小兵，何 晗，苏湘敏，等. 探讨血清与胸水LDH、CRA、SF检测联合胸水染色体检查在良恶性胸腔积液鉴别诊断中的价值[J]. 中国实验诊断学，2017, 21(1): 97 - 99.

[17] 王军辉，王宏伟，张海欧. 体温过低大鼠复温过程中肝功能指标的变化规律及意义[J]. 山东医药，2013, 53(1): 33 - 34. doi: 10.3969/j.issn.1002 - 266X.2013.01.011.

[18] 丁延楷，李永清，唐亦奇，等. 浸泡性体温过低狗的呼吸、气体代谢及心功能研究[J]. 中国应用生理学杂志，1990, 6(1): 82 - 84.

[19] 毕建立，江朝光，李佳春，等. 海水浸泡性体温过低症的心功能和血乳酸变化[J]. 军医进修学院学报，2003, 24(2): 101 - 102. doi: 10.3969/j.issn.1005 - 1139.2003.02.008.

[20] 张 建，陈伯华，丁江舟. 体温过低的复温技术与装备[J]. 中华航海医学与高气压医学杂志，2009, 16(3): 192 - 193. doi: 10.3760/cma.j.issn.1009 - 6906.2009.03.025.

(编辑：杨 颖)