基础研究 文章编号：0253-3626（2011）08-0921-03

重度脑损伤误吸大鼠继发肺损伤的实验研究

权明桃[1]，江智霞[1]，任光阳[1]，施久军[1]，罗 祎[1]，程华刚[2]
（1. 遵义医学院附属医院 ICU，遵义 563003；2. 遵义医学院附属医院神经科，遵义 563003）

【摘 要】目的：探讨重度脑损伤误吸胃液致肺损伤的机制。方法：SD 雄性大鼠 50 只，随机分为对照组（10 只）和实验组（40 只）。实验组采用改进型 Marmarou 模型方法致大鼠重度脑损伤，再经气管内滴入胃液，制作重度脑损伤误吸模型。分别在造模后 2、6、24 和 48 h 各处死 10 只大鼠收集标本，采用酶联免疫吸附试验（Enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）法检测大鼠血浆中性粒细胞弹性蛋白酶（Neutrophil elastase，NE）含量、支气管肺泡灌洗液（Bronchoalveolar lavage fluid，BALF）中 NE 和白介素-8（Interleukin-8，IL-8）含量；免疫透射比浊法测定 BALF 中白蛋白浓度；光学显微镜观察肺组织病理改变情况。结果：实验组 BALF 和血浆中 NE 含量 2 h 开始升高，与对照组比较差异有统计学意义（$P<0.05$）。BALF 中 NE 升高幅度较血浆明显；BALF 中 IL-8 含量在 2h 开始升高，同时 BALF 中白蛋白浓度也明显升高（$P<0.05$）；BALF 中 NE、IL-8 与白蛋白浓度呈正相关（$P<0.01$）。结论：重度脑损伤误吸可造成肺组织的炎症反应，NE、IL-8 参与肺内炎性反应，造成肺组织损伤。

【关键词】重度脑损伤；急性肺损伤；中性粒细胞弹性蛋白酶
【中国图书分类法分类号】R651.1 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-01-05

The experimental study on secondary lung injury by aspiration in severe brain injury rats

QUAN Ming-tao[1], JIANG Zhi-xia[1], REN Guang-yang[1], SHI Jiu-jun[1], LUO Yi[1], CHENG Hua-gang[2]
(1.Department of ICU, the Affliated Hospital, Zunyi Medical College; 2.Department of Neurology, the Affliated Hospital, Zunyi Medical College)

【Abstract】*Objective*: To investigate gastric aspiration induced lung injury in severe brain injury. *Methods*: 50 male SD rats were randomly divided into control group (n=10) and experimental group(n=40). The severe brain injury in experimental group was made by an improved method of Marmarou model, and then the aspiration models were made by intratracheal instillation of gastric juice. Each ten rats were killed to collect samples at 2 h, 6 h, 24 h and 48 h separately after the models were made. Plasma neutrophil elastase (Neutrophil Elastase, NE) content, the NE content and interleukin -8(IL-8) content in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were detected by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); immune turbidimetric determination was used for the albumin concentration in BALF; and optical microscope for pathological changes in lung tissue. *Results*: BALF and plasma NE levels began to increase at 2 h, which was significant compared with the control group(P<0.05). NE in BALF increased at a significantly higher rate than in plasma; IL-8 level in BALF began to increase at 2h, and meanwhile, BALF albumin concentration was significantly increased (P<0.05); NE, IL-8 in BALF and albumin concentration had positive correlation(P<0.01). *Conclusion*: Aspiration after severe brain injury can cause inflammation in lung tissue, and NE and IL-8 take part in pulmonary inflammatory response, resulting in lung injury.
【Key words】severe brain injury; acute lung injury; neutrophil elastase

急性肺损伤（Acute lung injury，ALI）是颅脑损伤的一种严重肺部并发症，可进展为急性呼吸窘迫综合征（Acute respiratory distress syndrome，ARDS）或急性呼吸衰竭（Acute respiratory failure，ARF），影响患者病情的转归和预后。特别是重度脑损伤（Severe brain injury，SBI）误吸所致的 ALI 是患者伤后病死率居高不下的主要原因之一。以往有关脑损伤误吸盐酸的研究认为，误吸所致的肺损伤主要由早期盐酸直接烧伤和后期中性粒细胞介导的炎性反应所造成。然而，临床误吸物并不仅是盐酸，而是包含食物残渣、胃蛋白酶、细菌等成分的胃内容物[1]。吸入不同胃内容物成分可引起不同程度的肺损伤，其发病机制也有所不同[1]。SBI 后误吸胃内容物所致的肺损伤及其炎症反应如何并不清楚。因此，本研究采用改

作者介绍：权明桃（1973-），女，主管护师，硕士，研究方向：急危重症护理。
通信作者：程华刚，男，教授，Email:1415454489@qq.com。
基金项目：贵州省教育厅自然科学研究项目（编号：黔教科 2008035）；贵州省国际科技合作项目【编号：黔科合外 G 字（2009）700117 号】。

进型 Marmarou 法致大鼠 SBI，再误吸胃液，观察其对肺组织的影响，并探讨其发生机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组

健康雄性 SD 大鼠 50 只，体重 285~316 g，按数字法随机分为对照组（n=10）和实验组（n=40），实验组分别在脑损伤误吸后 2、6、24 和 48 h 各处死 10 只大鼠；对照组不给予任何损伤处理，正常喂养 3 d 处死，收集所需标本。动物经脑损伤后有呼吸抑制、肢体抽搐、昏迷及肢体活动障碍表现的大鼠为本实验入选对象。实验终止前死亡的大鼠不作为本实验的研究对象。

1.2 SBI 误吸模型的建立

应用改进型 Marmarou 法[2]将常态清醒大鼠头部置脑损伤装置的导引管下，用 100 g 撞击锤从 50 cm 高处经引导管下滑致大鼠 SBI。脑损伤造模成功后，予 10%水合氯醛（0.33 mg/kg）腹腔内注射麻醉。将大鼠仰卧固定于操作台上，颈部常规备皮、消毒，矢状切开表层皮肤，分离气管，头向上倾斜 30°角，将胃液（0.4 ml/kg）经气管内滴入。记录大鼠伤后全身状况，缝合颈部皮肤，归笼，予观察、保温。胃液来源：收集鼻饲患者的清晨胃液，静置 30 min。

1.3 标本收集

1.3.1 血浆标本 大鼠麻醉后，经左侧颈总动脉取血 4 ml，4℃ 3 000 r/min 离心 15 min，取上清液，置于-70℃冰箱保存，待测。

1.3.2 肺组织标本 取血完毕，处死大鼠，立即打开胸腔取出肺组织，游离主支气管至环状软骨处，剔除结缔组织及心脏，结扎右主支气管，分离右肺，取部分右肺组织上叶及中叶，行光镜检查。

1.3.3 BALF 标本 对照组用眼科剪于气管下段作一小“T”形切口，实验组经误吸时切开的气管切口，将外径 1.8 mm 的无菌导管经切口处缓缓插入左主支气管，结扎切口下缘 0.5 cm 处，防止灌洗液流出，注射器抽取 5 ml 生理盐水，经导管以较小的压力将盐水缓慢注入肺内，可见大鼠左肺逐渐变得膨隆、苍白，缓慢回抽灌洗液，再将所得液体缓缓注回肺内，如此反复灌洗 5 次，最后将回抽液盛入离心管，4℃ 3 000 r/min 离心 15 min，取上清液-70℃保存，待测中性粒细胞弹性蛋白酶（Neutrophil elastase，NE）、白介素-8（Interleukin-8，IL-8）、白蛋白含量。

1.3.4 脑组织病理标本 用剪刀分离颅骨，暴露脑组织，取损伤周围脑组织 0.2 g 置于 10%的甲醛溶液中保存，待行脑组织 HE 染色。

1.4 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析，计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。对照组及实验组间比较采用单因素方差分析，$P<0.05$ 有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般状况

制作脑损伤模型时，大鼠致伤后立即出现呼吸暂停，5 s~2 min 后自行或人工协助恢复呼吸，继之出现呼吸急促，口鼻见血性泡沫样分泌物，面部、四肢发绀；全身抽搐、偏瘫及昏迷。做误吸模型时，胃液滴入气管后，大鼠出现呛咳，烦躁等症状。

2.2 脑组织形态学变化

肉眼观察大鼠脑组织可见脑水肿及脑出血；HE 染色观察可见脑膜血管扩张充血，神经细胞及血管周间隙增宽，脑膜血管及脑实质血管扩张充血，见噬神经细胞现象等。

2.3 肺组织损伤情况

2.3.1 大体形态观察 实验组大鼠肺组织均可见不同程度的充血、水肿，表面可见点状或灶状出血。

2.3.2 HE 染色光镜观察 实验组大鼠均可见不同程度的肺损伤。主要表现为肺间质血管扩张充血，部分肺泡塌陷，炎细胞浸润明显，肺泡间毛细血管扩张充血伴大量炎细胞浸润及纤维素渗出，细支气管内红细胞及浆液渗出明显等。

2.4 血浆及 BALF 中 NE 含量变化

2 h 组血浆及 BALF 中 NE 含量开始升高，与对照组比较有统计学意义（$P<0.05$），BALF 中 NE 含量升高较血浆明显。见表 1。

2.5 BALF 中 IL-8 含量变化

实验组 BALF 中 IL-8 含量明显升高，与对照组比较有统计学意义（$P<0.05$）。

2.6 BALF 中白蛋白浓度

2~48 h 组与对照组比较明显升高（$P<0.05$），BALF 中白蛋白浓度与 BALF 中 NE、IL-8 含量呈正相关（r=0.854 和 r=0.832，$P<0.01$）。

表 1 大鼠 BALF、血浆 NE 及 BALF 中 IL-8、白蛋白含量（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	BALF中 NE（ng/ml）	血浆 NE（ng/ml）	BALF 中 IL-8	白蛋白（mg/l）
对照组	10	7.58 ± 1.17	10.47 ± 0.95	54.72 ± 21.34	17.67 ± 1.71
2 h 组	10	19.72 ± 2.97◆	18.26 ± 1.94◆	155.61 ± 31.93◆	27.70 ± 4.43◆
6 h 组	10	30.02 ± 2.35◆	18.89 ± 2.60◆	272.63 ± 67.37◆	29.50 ± 3.31◆
24 h 组	10	36.70 ± 1.74◆	24.91 ± 3.02◆	344.58 ± 45.04◆	38.90 ± 6.35◆
48 h 组	10	40.51 ± 2.92◆	26.26 ± 3.49◆	374.42 ± 31.54◆	39.00 ± 4.78◆

注：组间比较采用方差分析，方差齐，◆，与对照组比较 $P<0.05$

3 讨 论

3.1 SBI 误吸胃液模型的建立

颅脑损伤后由于昏迷、呕吐、咽反射减弱或消失易发生口咽部分泌物或胃内容物吸入呼吸道，易致肺部感染、急性肺损伤甚至发展成呼吸窘迫综合征[3]。以往有关脑损伤误吸方面研究多为吸入盐酸，而临床误吸物常为食物残渣、细菌、血液、胃酸、蛋白酶等混合成分。研究认为，胃液误吸引起的肺损伤程度远比单纯盐酸严重[4]。因此，本研究在成功建立大鼠 SBI 的基础上，经气管内滴入胃液，使模型更加符合临床误吸特征。研究发现，脑损伤后大鼠立即出现呼吸暂停，数秒至数分钟后自行或人工协助恢复呼吸，继之出现呼吸急促，口鼻见血性泡沫样分泌物，面部、四肢发绀；全身抽搐、偏瘫及昏迷。胃液滴入气管后，大鼠出现呛咳、烦躁，甚至发绀等症状，说明大鼠 SBI 误吸胃液模型是有效的。

3.2 胃液对肺组织的直接损伤作用

误吸危害程度因吸入气道的胃内容物性质和容量不同而异，误吸物的 pH 值越低，肺损伤则越严重。一般认为胃酸在误吸后肺损伤过程中起着决定性作用，却忽视了胃液中含有的胃蛋白酶等成分，而这些成分也起着较重要的作用[4]。本研究发现，SBI 误吸后 2 hBALF 中白蛋白开始升高。HE 染色显示，自 2 h 开始每组肺组织可见不同程度的损伤，组间无明显区别，主要表现为肺间质血管扩张充血，部分肺泡塌陷，炎细胞浸润明显，肺泡间毛细血管扩张充血伴大量炎细胞浸润及纤维素渗出，细支气管内红细胞及浆液渗出。说明当发生误吸时，酸对气道黏膜的化学性损伤可能是导致肺损伤的始发原因，而同等胃蛋白酶、细菌、胃液小颗粒等，不仅引起气道黏膜损伤，而且还直接破坏肺泡及肺泡表面的肺表面活性物质，肺泡表面活性物质即储存于肺泡型上皮细胞的板层小体中，它的耗竭可能在肺水肿发生上有重要作用。另一方面胃酸和胃蛋白酶激活位于血管内皮层、内皮下层和血管平滑肌中的副交感神经元，释放大量神经肽类物质（如 P 物质、神经肽 A 等），使气管、支气管收缩，引起机体缺氧，加重肺损伤。

3.3 NE 与 SBI 误吸后肺损伤

急性吸入性肺损伤的发病机制除胃液内酸性物质和消化酶对肺组织的直接损伤外，目前认为此种 ALI 与其它致病因素导致的 ALI 殊途同归，亦由肺内过度的炎症反应致继发性肺损伤[5]。NE 是中性粒细胞释放的一种蛋白水解酶，具有降解弹性蛋白、胶原蛋白、蛋白多糖等细胞外基质的主要成分，破坏细胞间的紧密连接，诱导内皮细胞产生趋化性细胞因子等有多种生物学功能，被认为是引起 ALI 的终极效应因子[6]。本研究发现，大鼠误吸后 2 h 血浆 NE、BALF 中 NE 和白蛋白均开始升高，灌洗液中 NE 升高幅度较血浆明显，提示 SBI 误吸可引起 NE 升高，其升高程度与肺水肿程度呈正相关。其发生机制可能与“二次打击”理论有关，作为“一次打击”的颅脑损伤，使机体炎症细胞及免疫细胞处于激活状态，随后并发的误吸便构成“二次打击”，使处于激发状态的炎性细胞释放大量炎症介质，引起肺内过度失控的炎症反应，进而导致 ALI/ARDS 的发生[7]。

3.4 IL-8 与 SBI 误吸后肺损伤

IL-8 是单核细胞产生的中性粒细胞趋化因子，它使粒细胞脱颗粒，产生氧自由基、蛋白酶等介质；增加粒细胞对内皮细胞层的穿透力和血管内皮层的通透性；通过直接或间接的途径趋化粒细胞进入组织间隙和炎症区域。因此，肺内 IL-8 增加在一定程度上反映了肺内炎症反应和炎性损伤的程度。本研究结果显示，IL-8 在 2 h 开始升高，升高水平与灌洗液 NE、白蛋白浓度呈正相关，说明 IL-8 参与了 SBI 误吸后肺内发生炎性反应。董铁立等[8]研究发现，兔误吸胃液后 5 h BALF 中 IL-8 升高，比本研究升高时间晚，这可能与董铁立研究为直接吸入胃液，而本研究采用 SBI 后再吸入胃液的双重致伤因素制作模型，SBI 由于应激反应可引起肺内炎性反应，误吸使炎症反应发生更早更重。

综上所述，在 SBI 造成的呼吸功能损害基础上再发生误吸，使肺受到直接损害，肺毛细血管通透性明显增加，大量蛋白质渗出。与此同时，各种炎性介质活化，导致肺损伤，使呼吸功能障碍，缺氧加重，又可加重脑水肿和脑损害，脑水肿和颅内压增高进一步加重呼吸功能障碍和肺功能损害，形成一个恶性循环是导致肺部严重并发症和早期死亡率高的重要原因之一。因此，加强 SBI 患者监护与护理，防止误吸是降低肺损伤发生的首要措施。对于误吸所致肺损伤，尽早采用雾化吸入炎性抑制剂的局部用药方法，减轻肺内炎性反应来治疗肺损伤有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] 牛永胜，穆心苇，章 淬，等.严重颅脑创伤后不同误吸成分对凝血功能的影响[J].南京医科大学学报，2006，22（2）：132-134.

[2] 韩 威，张 璐，张永亮.重度颅脑损伤引发肺水肿超微结构改变的观察[J].武警医学，2007，18（10）：745-749.

[3] 杨金坤，康健，李胜龙，等.重型颅脑损伤后吸入性肺炎诊治临床研究[J].南京医科大学学报，2008，28（6）：816-818.

[4] 牛永胜，穆心苇，张少华.误吸性肺损伤发病机理[J].临床麻醉学杂志，2004，22（11）：699-700.

[5] 黎檀实，殷迪成，吴旭辉，等.颅脑伤合并吸入性肺损伤患者肺组织细胞凋亡的研究[J].中国危重病急救医学，2004，16（2）：97-99.

[6] Hashimoto S，Okayama Y，Shime N，et al.Neutrophil elastase activity in acute lung injury and respiratory distress syndrome[J].Respirology，2008，13（4）：581-584.

[7] Jin W，Wang H，Ji Y，et al.Enetic ablation of Nrf-2 enhances susceptibility to acute lung injury after traumatic brain injury in mice[J].Exp Biol Med，2009，234（2）：181-190.

[8] 董铁立，牛永胜，王春亭，等.白介素-8 在胃液误吸性肺损伤中变化的观察[J].中华麻醉学杂志，2002，22（6）：367-368.

（责任编辑：冉明会）