DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.10.006
第26卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 10
856 2004年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)10-0856-03

油酸-内毒素序贯致伤引起大鼠急性肺损伤的特点

李 琦,钱桂生,张 青,王长征 (第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037)

提 要:目的 通过复制油酸-内毒素(OA-LPS)介导的大鼠急性肺损伤(ALI)模型并观察大鼠血浆IL-13含量等变化,探讨序贯致伤所引起的急性肺损伤特点。方法 采用OA-LPS序贯致伤Wistar大鼠,观察伤后大鼠PaO_2、肺含水量、血浆IL-13含量及病理学的变化。结果 OA-LPS组大鼠呼吸窘迫,PaO_2早期低于8 kPa,死亡率升高,肺含水量显著增加,肺水肿、炎细胞浸润等病变严重,伴透明膜形成,血浆IL-13含量显著升高;尤其在间隔4 h两次致伤以后,上述各指标变化最大。结论 OA-LPS序贯致伤大鼠,可以介导严重的ALI/ARDS,即在第一次致伤后,给予第二次低剂量致伤,可以引发ARDS,与机体抗炎细胞因子水平异常升高可能有关;并且,在两次致伤之间还存在一个"相对敏感期"。

关键词:急性呼吸窘迫综合征;急性肺损伤;油酸;脂多糖;白细胞介素-13
中图法分类号:R392.11;R563.02;R996 文献标识码:A

Characteristics of the acute lung injury induced by oleic acid and lipopolysaccharide in rats

LI Qi, QIAN Gui-sheng, ZHANG Qing, WANG Chang-zheng (Institute of Respiratory Diseases, Xingqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the characteristics of the acute lung injury induced by oleic acid (OA) and lipopolysaccharide (LPS) in rats. Methods Wistar rats were injured with OA (0.2 mL/kg) and LPS (2 mg/kg) to establish the acute lung injury (ALI) model. The indexes of respiratory rate, PaO_2, wet weight/dry weight (W/D) of lung lobes, plasma IL-13, and pathological changes were observed. Results Acute respiratory distress syndrome (ARDS) was found in rats treated with OA-LPS. The level of PaO_2 was lower than 8 kPa at the early stage. Increased death rate, significantly increased water content in the lungs, more serious pulmonary edema and infiltration of inflammatory cells accompanied by formation of hyaline membrane, and significantly increased plasma IL-13 content were also found. There were significant changes of the above indices, especially in OA-LPS/4 h group. Conclusion OA-LPS might cause serious ALI/ARDS. Injury due to second time low-dose OA-LPS after the first time injury may induce ARDS, which may be associated with the abnormally increased level of anti-inflammatory cytokines. There is a relative sensitivity between the two injuries.

Key words: acute respiratory distress syndrome; acute lung injury; oleic acid; lipopolysaccharide; interleukin-13

多发性骨折和严重的革兰阴性菌感染,常常引发临床急性肺损伤(acute lung injury, ALI)或急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)。目前认为,ALI/ARDS的发病机制与过度的全身炎症反应有关[1],与抗炎机制紊乱同样关系密切[2]。本研究采用OA-LPS序贯致伤大鼠,复制ALI模型并观察大鼠PaO_2、肺含水量、血浆白细胞介素-13(interleukin-13, IL-13)含量及病理学等变化,探讨序贯致伤所引起的急性肺损伤特点。

1 材料与方法

1.1 动物分组与处理

Wistar大鼠84只(本校实验动物中心提供),雌雄不拘,体质量(200±50) g。腹腔注射盐酸氯胺酮(80 mg/kg)麻醉。根据OA-LPS组两次致伤的时间间隔随机分段等分7组(每组12只)。首先由尾静脉注射OA 0.2 ml/kg(化学纯,苏州正兴化工研究所提供),分别间隔1、4、12、24 h后,再由另一侧尾静脉注射LPS 2 mg/kg(浓度为1 g/L,O_{111}:B_4,购自Sigma),此后2 h点采集标本。油酸对照组(OA-C, $n=6$)则将第二次处置替换为生理盐水(NS)注射。同时设立内毒素对照组(LPS-C, $n=6$)和生理盐水对照组

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(39730210);全军医学科研"十五"计划重点课题(01Z074)
Supported by the Key Program of the National Natural Science Foundation of China (39730210) and the Key Research Project of the "Tenth Five-year Plan" of PLA (01Z074)
作者简介:李 琦(1965-),男,福建省永春县人,博士,副主任医师,副教授。主要从事急性肺损伤发病机制及治疗的研究,发表论文16篇。电话:(023)68774603
通信作者:钱桂生,电话:(023)68755603
收稿日期:2004-02-24;修回日期:2004-04-02

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(NS-C, n=6), 分别注射 LPS 2 mg/kg 和 NS 2 ml/kg, 此后 2 h 点采集标本。实验观察期间死亡的大鼠不纳入本研究。

1.2　观察指标

观察大鼠的呼吸等一般情况; 测定动脉氧分压(PaO_2)和左肺叶组织湿质量/干质量值; 肺大体观察, 肺组织常规光镜观察并作病理形态学积分, 透射电镜检查; ELISA 检测血浆 IL-13 含量。

1.3　肺组织含水量测定

游离大鼠左肺, 称量湿质量(wet weight, W), 经一 0.06 kPa ×70 ℃脱水 24 h 后, 再称量干质量(dry weight, D), 以湿质量/干质量比值表示肺组织含水量。

1.4　病理形态学积分方法[3]

取右肺上叶组织, 经固定、包埋、切片、HE 染色后, 光镜下观察。根据肺间质水肿、肺泡水肿、炎细胞浸润、肺泡出血、透明膜形成、肺不张改变, 按程度"无、轻、中、重"分别计"0、1、2、3分", 然后累计总分。

1.5　血浆 IL-13 的测定

采用固相三明治夹心、酶联免疫吸附试验(ELISA-Kit, Diaclone Research, FRENCE)检测血浆 IL-13 含量, 具体操作参照试剂盒说明进行。

1.6　统计学处理

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 运用 SPSS10.0 行方差分析和均数间多重比较。

2　结果

2.1　呼吸频率、死亡率的变化

NS-C 组大鼠的一般情况良好, 呼吸平稳, 无 1 例死亡。单独注射 LPS 或 OA 后, 大鼠呼吸频率增加, 到 2 h 时逐渐趋于稳定, 无大鼠死亡。OA-LPS 导致大鼠早期发生并持续存在呼吸困难或呼吸窘迫, 常见泡沫样液体由鼻孔溢出, 死亡率升高; 尤其是 OA 致伤后 4 h, 再由 LPS 致伤, 死亡率高达 78.6%(44/56)。

2.2　动脉氧分压(PaO_2)的变化

OA+LPS 致伤大鼠以后, PaO_2 显著降低, 较 OA 或 LPS 致伤更明显; 与 OA-C 相比, OA-LPS 致伤导致大鼠 PaO_2 早期低于 8 kPa, 间隔 4 h 的两次致伤使 PaO_2 降低幅度最大, 见表 1。

表 1　OA-LPS 致伤大鼠 PaO_2 的变化(kPa, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Changes of PaO_2 in rats with ALI/ARDS induced by OA-LPS (kPa, $\bar{x}\pm s$)

Group	n	PaO_2
NS-C	6	12.17±0.99
LPS-C	6	11.02±0.51
OA-C/1 h	6	9.85±0.58 *
OA-C/4 h	6	8.62±0.84 *
OA-C/12 h	6	10.32±0.83 *
OA-C/24 h	6	10.98±1.65
OA-LPS/1 h	12	7.49±0.84 △
OA-LPS/4 h	12	6.06±0.63 △
OA-LPS/12 h	12	8.90±0.78 △
OA-LPS/24 h	12	9.92±2.72 *

*: $P<0.01$, *vs* NS-C and LPS-C; △: $P<0.01$, *vs* OA-C at the same time point

2.3　肺组织湿质量/干质量比值的变化

LPS-C 组显著高于 NS-C 组($P<0.05$); OA-C 组非常显著高于 NS-C 组和 LPS-C 组($P<0.01$); OA-LPS 组升高更突出, 均高于相同时相的 OA-C 组; OA-LPS/4 h 组达到高峰, 显著高于 OA-C 各组($P<0.05$)。即 OA-LPS 导致大鼠肺组织湿质量/干质量比值升高非常显著, 作用大于单独 OA 或 LPS 致伤, 且间隔 4 h 两次致伤使值升高最大, 见表 2。

表 2　OA-LPS 致伤大鼠肺组织 W/D 值的变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Changes of lung W/D in rats with ALI/ARDS induced by OA-LPS ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	W/D
NS-C	6	4.28±0.12
LPS-C	6	4.69±0.14
OA-C/1 h	6	6.34±0.62 *
OA-C/4 h	6	6.30±0.86 *
OA-C/12 h	6	6.21±0.90 *
OA-C/24 h	6	6.06±0.48
OA-LPS/1 h	12	6.93±0.88 *
OA-LPS/4 h	12	7.04±0.49 △
OA-LPS/12 h	12	6.90±0.99 *
OA-LPS/24 h	12	6.18±0.74 *

*: $P<0.01$, *vs* NS-C and LPS-C; △: $P<0.01$, *vs* OA-C

2.4　肺大体观察、肺组织常规光镜检查

NS-C 组大鼠肺呈均匀淡粉红色, 包膜光滑, 弹性好, 表面未见病损灶, 切面均质, 无液体溢出; 光镜下肺组织结构完整, 肺泡腔清晰, 肺泡隔无水肿、炎症等特殊改变, 偶见肺间质白细胞少量增加。LPS-C 组大鼠肺轻度充血、水肿、体积增大, 切面轻度肿胀、含水增加; 光镜下仅见肺泡隔增宽、少量炎细胞浸润、基本组织结构尚未破坏。OA-C 组大鼠肺表面呈暗红色, 可见肺包膜下普遍充血水肿, 弹性降低, 与 LPS-C 组比较, 肺体积增大更显著; 光镜下可见浸润较重, 肺间质水肿、增宽较明显。OA-LPS 组肺体积增大最显著, 水肿、浸润、出血更加严重; 光镜下可见微血栓及透明膜形成, 其中以 OA-LPS/4 h 组病变最重, 病理形态学积分最高, 见表 3。

表 3　OA-LPS 两次致伤大鼠肺组织病理形态学积分的变化(分, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Pathological changes of lungs in rats with ALI/ARDS induced by OA-LPS (score, $\bar{x}\pm s$)

Group	n	Pathology score
NS-C	6	1.83±1.17
LPS-C	6	4.33±2.07
OA-C/1 h	6	9.17±1.47 *
OA-C/4 h	6	8.17±1.17 *
OA-C/12 h	6	6.83±2.14 *
OA-C/24 h	6	5.17±2.79 *
OA-LPS/1 h	12	11.58±1.38 *
OA-LPS/4 h	12	13.5±2.51 *△
OA-LPS/12 h	12	9.75±2.56 *
OA-LPS/24 h	12	6.92±3.00 *

*: $P<0.01$, *vs* NS-C and LPS-C; △: $P<0.01$, *vs* OA-C at the same time point

2.5　透射电镜检查

NS-C 组未发现明显病变。LPS-C 组肺毛细血管内中性粒细胞或单核细胞聚集; 内皮细胞肿胀, 吞饮小泡增加; 细胞间紧密连接变形或缺损; 肺泡隔间质增宽; 肺泡上皮细胞水肿, 内质网扩张; Ⅱ型上皮微绒毛脱落减少, 板层体排空, 胞体脱落或胞

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

质崩解;I型肺泡上皮细胞轻度肿胀;肺泡腔内可见肺巨噬细胞伪足增多,伴脱颗粒现象,肺泡腔还可见 RBC、多形核白细胞(PMN)、坏死细胞碎片和血浆样物质。OA-C 组与 LPS-C 组相似,主要改变是I型肺泡上皮细胞不同程度发生肿胀,肺泡隔厚部明显水肿增宽,II型上皮微绒毛脱落减少或变短,内质网扩张,线粒体肿胀、空泡化,以及胞浆内板层体排空。OA-LPS 组病变较重,其特点是肺毛细血管内皮细胞肿胀更加显著,肺泡腔内坏死细胞碎片较多见,吞噬细胞胞浆内串珠样空泡,II型上皮细胞有增生现象。

2.6 血浆 IL-13 含量的变化

OA-C 组和 OA-LPS 组的血浆 IL-13 含量均非常显著高于 NS-C 组($P<0.01$),含量高峰亦均出现在 4 h 组;OA-C 组与 OA-LPS 组的变化趋势相似,但相同时相的 OA-LPS 组上升更高;OA-C 组和 OA-LPS 组的高峰值均非常显著高于 LPS-C 组($P<0.01$),OA-LPS 组的高峰值达到(58.28±5.06) ng/L (OA-LPS/4 h),非常显著高于 OA-C 组的高峰值[OA-C/4 h,(52.55±4.93) ng/L]。OA-C 组和 OA-LPS 组高峰以后仍然保持在高水平。显然,OA-LPS 两次致伤,导致大鼠血浆 IL-13 含量非常显著升高,较 OA 致伤更明显;与 OA-C 相比,以 OA-LPS 两次致伤间隔 4 h 的方式致伤,导致大鼠血浆 IL-13 含量峰值上升最高,见表 4。

表 4 OA-LPS 两次致伤大鼠血浆 IL-13 含量的变化(ng/L, $\bar{x}\pm s$)

Tab 4 Changes of plasma IL-13 in rats with ALI/ARDS induced by OA-LPS (ng/L, $\bar{x}\pm s$)

Group	n	Plasma IL-13
NS-C	6	12.13±5.02
LPS-C	6	27.35±5.90
OA-C/1 h	6	34.42±4.69 *
OA-C/4 h	6	52.55±4.90 *
OA-C/12 h	6	44.47±5.13 *
OA-C/24 h	6	25.99±4.98 *
OA-LPS/1 h	12	39.64±4.93 *
OA-LPS/4 h	12	58.28±5.06 △
OA-LPS/12 h	12	50.92±5.61 *
OA-LPS/24 h	12	38.13±6.23 *

*: $P<0.01$, *vs* NS-C and LPS-C; △: $P<0.01$, *vs* OA-C

3 讨论

在机体严重创伤后发生 ALI 的基础上,如果合并重症感染,则容易引发 ARDS,这是重症监护病房死亡率居高不下的主要原因。序贯两次致伤的研究方法有助于从更加贴近临床的角度揭示 ARDS 的发病机制,也为类似序贯性损伤引发 ARDS 寻求一个可能的防治环节[4]。因此,本研究采用 OA 和 LPS 两次致伤,旨在模拟临床严重创伤基础上并发严重细菌感染,表现 ALI 向 ARDS 演进的过程。在本研究中,静脉注射 OA 相当于多发性骨折或严重挤压伤所引起的脂质释放入血,而静脉注射 LPS 相当于严重的革兰阴性细菌感染释放内毒素入血,序贯两次致伤的结果就是大鼠首先发生 ALI,然后发展成为 ARDS。

研究表明,发生 ALI 时,肺组织中有大量炎症细胞浸润,伴随细胞因子大量释放。目前认为,以细胞因子大量释放为特征的全身炎症反应征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)是 ALI 或 ARDS 的发病基础[1,5,6]。晚近研究还表明,内源性抗炎介质的释放异常也与 ARDS 发生有关[7]。IL-13 是一种抗炎细胞因子[8~10]。同时观察大鼠血浆 IL-13 含量等变化,有助于揭示 ALI/ARDS 的特点。

本研究主要针对大鼠肺损伤程度,以 $PaO_2\leqslant 8$ kPa 作为肺功能失代偿、呼吸衰竭,发生 ARDS 的判断标准,结合其它指标评价模型。结果显示:OA-LPS 致伤,大鼠发生呼吸窘迫突出,$PaO_2\leqslant 8$ kPa,肺水含量显著增加,肺大体病变及组织学炎症细胞浸润等改变也明显加重,血浆 IL-13 含量显著升高,尤其各指标的变化均以间隔 4h 的两次致伤所产生的效应最大。

本研究结果提示,OA-LPS 序贯性两次致伤,可以介导大鼠发生严重的 ALI/ARDS,即在第 1 次致伤后的非失控基础上,给予第 2 次较小剂量致伤,可以引发 ARDS 形成。同时,ALI/ARDS 的形成与 IL-13 异常升高可能有关;而且,在两次致伤之间还存在一个"相对敏感期"。该结果与临床 ICU 观察相似,即严重创伤后 24~48 h 出现第 2 次患者死亡高峰,此时死亡原因可能就是合并感染所引发的 ARDS。

参考文献:

[1] 钱桂生. 全身炎症反应综合征、急性肺损伤与急性呼吸窘迫综合征[J]. 解放军医学杂志, 1999, 24(5): 313-316.

[2] Bone R C. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS)[J]. Ann Intern Med, 1996, 125(8): 680-687.

[3] Sun D, Zhao M, Ma D, *et al*. Protective effect of interleukin-1 receptor antagonist on oleic acid-induced lung injury[J]. Chin Med J(Engl), 1996, 109(7): 522-526.

[4] Saadia R, Schein M. Multiple organ failure. How valid is the "two hit" model[J]? J Accid Emerg Med, 1999, 16(3): 163-167.

[5] 张 青, 毛宝龄, 钱桂生, 等. 油酸和内毒素两次打击大鼠急性肺损伤动物模型研究[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(6): 603-604.

[6] 徐剑铖, 毛宝龄. 急性肺损伤炎性细胞因子表达调控及治疗研究[J]. 第三军医大学学报, 1997, 19(1): 47.

[7] Bone R C. Sir Isaac Newton, Sepsis, SIRS, and CARS[J]. Crit Care Med, 1996, 24(7): 1125-1128.

[8] Minty A, Chalon P, Derocq J M, *et al*. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses[J]. Nature, 1993, 362(6417): 248-250.

[9] Kim C, Schinkel C, Fuchs D, *et al*. Interleukin-13 effectively down-regulates the monocyte inflammatory potential during traumatic stress[J]. Arch Surg, 1995, 130(12): 1330-1336.

[10] Muchamuel T, Menon S, Pisacane P, *et al*. IL-13 protects mice from lipopolysaccharide-induced lethal endotoxemia: correlation with down modulation of TNF-alpha, IFN-gamma, and IL-12 production[J]. J Immunol, 1997, 158(6): 2898-2903.

(编辑 王 红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net