DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.11.005
第23卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 11
1264 2001年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)11-1264-03

递增剂量脂多糖致伤对大鼠SIRS-肺损伤的影响

李 琦[1],钱桂生[1],张 青[1],高正今[2],赵 青[3],李海斌[3] ([1]第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037;[2]解放军324医院内二科,重庆 400020;[3]成都军区37分部门诊部,重庆 400042)

提 要:目的 梯级剂量脂多糖(LPS)致伤对大鼠全身炎症反应综合征(SIRS)-肺损伤严重程度的影响。方法 经Wistar大鼠尾静脉注射梯级剂量LPS(2、4、6、8 mg/kg)致伤,观察呼吸频率、死亡率,检测PaO_2、观察外周血WBC计数及分类大白细胞构成比、观察肺W/D值以及病理学检查。结果 ①LPS致伤,可以导致大鼠呼吸困难,PaO_2降低,外周血WBC计数异常(LPS小剂量使其升高,大剂量使其降低),外周血大白细胞构成比升高,肺组织W/D值升高,肺病理改变加重;②LPS≥6 mg/kg致伤,上述变化非常显著。结论 ①LPS致伤,可以诱发大鼠发生SIRS-肺损伤;②LPS 6 mg/kg是导致大鼠SIRS-肺损伤失控,发生ARDS的临界剂量。

关键词:全身炎症反应综合征;急性肺损伤;急性呼吸窘迫综合征;脂多糖
中图法分类号:R563;R63;R977 文献标识码:A

Study of acute lung injury induced by different doses of lipopolysaccharide in rats

LI Qi, QIAN Gui-sheng, ZHANG Qing, GAO Zheng-jin, ZHAO Qing, LI Hai-bin (Institute of Respiratory Disease, Xingqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the effects of increased dose of lipopolysacchairde (LPS) on systemic inflammatory response syndrome (SIRS)-acute lung injury (ALI) in rats. **Methods** Wistar rats were injured with increased dose of LPS (2, 4, 6, 8 mg/kg) to cause the SIRS-ALI. Respirtory rate, mortality, PaO_2, white blood cell (WBC) count in peripherl blood, proportion of large white blood cells, wet / dry weight (W/D) of lung and pathological observation were observed. **Results** ①Respiretory distress, decreased PaO_2, WBC disorder, increased proportion of large white blood cells, increased W/D value and pathological depravation was induced by LPS in rats. ②The changes of the above indexes were significant when LPS≥6 mg/kg was given to rats. **Conclusion** ①The SIRS-ALI may be induced by LPS in rats. ②LPS≥6 mg/kg may cause ARDS in rats which is similar to that of the excessive expression of SIRS.

Key words: systemic inflammatory response syndrome; acute lung injury; acute respitory distress syndrome; lipopolysaccharide

脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)通常用于复制与细菌感染有关的实验动物模型,并可导致急性肺损伤(Acute lung injury, ALI)发生。全身炎症反应综合征(Systemic inflammatory response syndrome, SIRS)是由各种严重损伤、尤其是创伤,感染等引起的过度的全身广泛性炎症反应的临床过程。ALI是SIRS在肺脏的主要表现;急性呼吸窘迫综合征(Adult respiratory distress syndrome, ARDS)是SIRS失控在肺脏的严重表现,是多器官功能障碍综合征(Multiple organ dysfunction syndrome, MODS)或多器官功能衰竭(Multiple organ failure, MOF)在肺脏的具体体现[1,2]。本研究采用递增剂量LPS致伤,通过观察大鼠的呼吸频率、死亡率、PaO_2、外周血WBC计数及分类大白细胞构成比、肺组织湿重/干重比值(Wet weight/dry weight ratio, W/D)以及病理学改变,探讨不同剂量LPS对大鼠SIRS-肺损伤严重程度的影响。

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(39730210)

作者简介:李 琦(1965—),男,福建省永春县人,博士研究生,主治医师,主要从事呼吸衰竭的临床与基础方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68755320

收稿日期:2001-04-06;修回日期:2001-09-20

1 材料与方法

1.1 动物分组与处理

健康Wistar大鼠120只,雌雄不拘,分为5组,每组随机取6只。盐酸氯胺酮(80 mg/kg)腹腔注射麻醉,尾静脉注射致伤剂。根据致伤时所注射LPS($O_{111}B_4$, Sigma)的不同剂量(2、4、6、8 mg/kg)及4个时相点(1、2、4、6h)分组,并设立时相对应的生理盐水对照组(NS-C)。致伤后各时相点采集动脉血和尾末梢血,然后活杀大鼠取肺。观察时相内死亡的大鼠不纳入研究。

1.2 观察指标

观察大鼠呼吸频率、死亡率;测定动脉血氧分压(PaO_2);观察外周血WBC计数及分类大白细胞构成比(代表单核细胞、多形核白细胞);检测左肺W/D值(代表肺水含量);观察肺大体病变及肺组织的常规光镜、透射电镜检查。

1.3 统计学处理

数据用$\bar{x}\pm s$表示,经Excel-97作单因素方差分析和t检验。

2 结果

2.1 死亡率、呼吸频率的变化

NS-C各组大鼠的一般情况良好,呼吸平稳,肌肉张力和对刺激的反应性均无异常,观察全程无一例死亡。

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

LPS 2 mg/kg 致伤后, 呼吸频率轻度增快(60~70 次/min), 无大鼠死亡; LPS≥6 mg/kg 时, 呼吸频率显著增加(≥80 次/min), 大鼠呼吸困难或呼吸窘迫, 可见淡黄色或粉红色泡沫样肺水肿液由鼻孔溢出, 并表现肌张力降低、对外界刺激的反应减弱, 死亡率升高; 当 LPS 8 mg/kg 时, 死亡率高达 60%(36/60)。

2.2　动脉血氧分压(PaO_2)的变化

LPS 致伤以后, 与对应的 NS-C 相比, PaO_2 不同程度下降: 当 LPS 2 mg/kg 时, 呈一过性显著降低($P<0.05$); 当 LPS 4 mg/kg 时, 呈阶段性显著降低($P<0.05$); 当 LPS 6 mg/kg 时, 各时相点均非常显著降低($P<0.01$), 并早期低于 8 kPa; 当 LPS 8 mg/kg 时, 呈严重而持久的低氧血症, 全程低于 8 kPa($P<0.01$), 见表 1。

表 1　LPS 致伤大鼠各时相组 PaO_2 的变化(kPa, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Changes of PaO_2 in rats with ALI induced by LPS at different time(kPa, $\bar{x}\pm s$)

Groups (n=6)	Time after injury (h)			
	1	2	4	6
NS-C	12.09±0.94	12.17±0.99	12.13±0.92	12.18±0.96
LPS 2 mg/kg	12.07±1.89	11.02±0.51*	12.10±1.60	11.73±1.46
LPS 4 mg/kg	11.55±1.86	10.13±1.90*	10.35±1.33*	11.68±1.57
LPS 6 mg/kg	7.93±1.43△	9.18±1.84△	8.77±1.94△	8.50±2.19△
LPS 8mg/kg	7.72±1.39△	7.90±1.14△	7.77±1.11△	7.33±0.53△

*: $P<0.05$ *vs* NS-C at same time; △: $P<0.01$ *vs* NS-C at same time

2.3　外周血白细胞计数的变化

LPS 致伤以后, 大鼠外周血白细胞计数的变化与对应的 NS-C 组相比: 当 LPS 2~4 mg/kg 时, 呈先升高, 后回降; 当 LPS 6 mg/kg 时, 后期显著降低($P<0.05$); 而 LPS 8 mg/kg 时, 则全程显著降低($P<0.05$), 见表 2。

表 2　LPS 致伤大鼠各时相组外周血白细胞计数的变化($\bar{x}\pm s$, $\times10^9$/L)

Tab 2　Changes of WBC-count of periphery blood in rats with ALI induced by LPS at different time ($\bar{x}\pm s$, $\times10^9$/L)

Groups (n=6)	Time after injury (h)			
	1	2	4	6
NS-C	6.52±3.43	6.53±3.46	6.54±3.15	6.53±3.40
LPS 2 mg/kg	6.77±2.22	7.85±0.89	11.57±2.63*	8.52±2.02*
LPS 4 mg/kg	10.50±1.85*	9.18±2.05*	7.63±1.60	5.42±0.94
LPS 6 mg/kg	11.65±2.71*	10.53±2.39*	4.03±0.50△	3.32±0.29△
LPS 8 mg/kg	3.32±0.41*	2.68±0.64*	3.28±0.67*	2.90±0.97*

*: $P<0.05$ *vs* NS-C at same time; △: $P<0.01$ *vs* LPS 6 mg/kg, 2 h and LPS 4 mg/kg, 4 h

2.4　外周血分类大白细胞构成比的变化

外周血分类中的大白细胞主要代表单核细胞、多形核白细胞。LPS 致伤以后, 大鼠外周血分类大白细胞构成比均升高, 与对应的 NS-C 组相比: 当 LPS 2~4 mg/kg 时, 观察的中后期才显著升高($P<0.05$); 当 LPS 6~8 mg/kg 时, 全程均非常显著升高($P<0.01$); 当 LPS 8 mg/kg 时, 外周血分类大白细胞构成比倒置, 见表 3。

表 3　LPS 致伤大鼠外周血白细胞分类的变化($\bar{x}\pm s$, ×100%)

Tab 3　Changes of ratio of large WBC in rats with ALI induced by LPS at different time ($\bar{x}\pm s$, ×100%)

Groups (n=6)	Time after injury (h)			
	1	2	4	6
NS-C	0.23±0.05	0.24±0.06	0.24±0.04	0.24±0.05
LPS 2 mg/kg	0.30±0.09	0.31±0.08	0.42±0.13*	0.42±0.08△
LPS 4 mg/kg	0.26±0.11	0.43±0.09*	0.44±0.09△	0.50±0.11△
LPS 6 mg/kg	0.48±0.08△	0.59±0.07△	0.63±0.06△	0.72±0.08△
LPS 8 mg/kg	0.61±0.11△	0.67±0.10△	0.71±0.10△	0.79±0.07△

*: $P<0.05$ *vs* NS-C at same time; △: $P<0.01$ *vs* NS-C at same time

2.5　肺组织 W/D 值的变化

LPS 致伤大鼠以后, 肺 W/D 值与对应的 NS-C 组相比: 当 LPS 2 mg/kg 时, 在 2 h 以后显著升高($P<0.05$); 当 LPS 4 mg/kg 时, 各时相点均显著升高($P<0.05$); 而当 LPS 6~8 mg/kg 时, 全程显著升高, 且显著高于相同时相的 LPS 2~4 mg/kg 组($P<0.05$), 见表 4。

表 4　LPS 致伤大鼠肺组织肺水含量的变化($\bar{x}\pm s$, g/g)

Tab 4　Changes of lung W/D in rats with ALI induced by LPS at different time($\bar{x}\pm s$, g/g)

Groups (n=6)	Time after injury (h)			
	1	2	4	6
NS-C	4.26±0.09	4.28±0.12	4.26±0.10	4.29±0.13
LPS 2 mg/kg	4.53±0.41	4.69±0.14*	4.69±0.51*	4.27±0.73
LPS 4 mg/kg	4.67±0.26*	4.74±0.38*	5.06±0.43*	5.24±0.81*
LPS 6 mg/kg	4.83±0.35*△	5.54±0.43*△	5.88±0.53*△	6.40±0.71*△*
LPS 8 mg/kg	5.62±0.55*△	5.84±0.50*△	6.12±0.68*△	6.45±0.80*△

*: $P<0.05$ *vs* NS-C at same time and LPS 2 mg/kg, 1 h; △: $P<0.05$ *vs* LPS 2 mg/kg and LPS 4 mg/kg at same time

2.6　肺大体观察及肺组织常规光镜检查

LPS 剂量越大则大鼠肺水肿等大体病变越重; LPS≥6 mg/kg 致伤, 易见出血等严重改变。光镜下, LPS 剂量越大, 则水肿、炎症等主要病变加重; LPS≥6 mg/kg 时, 水肿、炎细胞浸润以及出血均明显突出, 伴局灶性肺不张和肺气肿, 且有微血栓及透明膜形成。

2.7　透射电镜检查

超微病理改变主要表现为肺泡上皮细胞水肿、核周间隙扩大、内质网扩张及退行性变; I 型肺泡上皮细胞轻度肿胀, 呈退行性变; II 型上皮微绒毛脱落减少或变短, 板层体排空, 可见胞体脱落或胞质崩解; 血管内皮细胞肿胀, 吞饮小泡增多, 染色质边集; 肺泡隔间质明显增宽, 电子密度减低。肺泡腔还可见红细胞、多形核白细胞、细胞碎片以及血浆样物质。较大剂量 LPS 致伤, 超微病理改变明显加重。

3　讨论

临床 SIRS 和 MODS 研究发现, 肺损伤通常发生最早, 肺功能障碍表现突出。实验研究也发现, 在 MODS 的演进过程中, 动物的器官功能障碍表现有明显的序贯特征, 首先是肺功能障碍, 然后依次为肠、肾、心、肝等。究其原因, 除开病因对肺组织直接损害因素, 可能是由于肺组织构成中的细胞种类丰富, 肺循环接纳全部体循环血液, 且有全身最大的毛细血管网和最多的内皮细胞结构, 血液中的各种有害因子或介质能够与

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

之充分作用,因此容易造成 ALI。ALI 和 ARDS 是 SIRS 在肺脏的具体表现。因此,本研究以肺损伤作为 SIRS 发生、发展的观察窗口。

LPS 是内毒素(Endotoxin)的主要成分,存在于革兰阴性菌细胞壁的外膜,其毒性作用主要与类脂 A 和核心多糖的 2-酮基-3-脱氧辛酸(KDO)有关,二者具有激活免疫应答的能力。在 ALI 的实验研究中常常使用 LPS 作为致伤剂,但不同血清型的 LPS 毒力不同,实验动物反应差异较大[3]。预实验发现,在相同剂量条件下,大鼠对 LPS (O111B4)的反应比较敏感,肺损伤程度比较均一。因此,本研究采用 LPS(O111B4)作为致伤剂,而采用梯级剂量 LPS 致伤,旨在表现单纯性向失控性 SIRS-肺损伤(ARDS)演进,模拟临床严重感染因素引发脓毒症的过程[4]。

ALI/ARDS 的主要病理特征是弥漫性肺泡、毛细血管膜损伤,通透性增高,肺水肿、微肺不张和炎性细胞浸润,导致机体形成非心源性肺水肿,肺内分流增加,肺顺应性降低,肺通气、换气功能严重下降,并出现呼吸窘迫和顽固的低氧血症。病理学和病理生理学意义上的肺损伤程度是反映 SIRS 发生、发展的理想窗口。因此,本研究选择了呼吸频率等一般情况、PaO_2、外周血 WBC 计数、外周血大白细胞构成比、肺组织 W/D 值以及病理学检查,作为判断大鼠 SIRS-肺损伤程度的指标。

目前,关于如何区分 SIRS 发生、发展的各个不同阶段,尚无可靠指标。Bone[5] 和 Beal 等[6] 认为,MODS 应该包括早期功能不全及其晚期功能衰竭,MOF 只是 MODS 的终末阶段。ALI/ARDS 作为 SIRS 发展成为 MODS/MOF 顺序加重的两个不同的阶段,目前均已纳入呼吸衰竭的范畴。在现行诊断标准中,氧合指数(PaO_2/FiO_2)仍然是区别两者的最重要指标。在小动物的实验研究中,严格界定失控性 SIRS-肺损伤(ARDS),避免误将非失控性 SIRS-肺损伤(ALI)纳入,应当主要根据反映肺功能是否最终失代偿的指标 PaO_2 的变化和直接反映脏器组织损害程度的病理学变化,结合其它指标的异常变化进行综合评估。

本研究以 $PaO_2 \leqslant 8$ kPa 为肺功能失代偿、发生呼吸衰竭作为失控性 SIRS-肺损伤(ARDS)的判断标准,结合其它指标观察,对梯级剂量 LPS 致伤大鼠 SIRS-肺损伤程度进行客观的评价。结果发现:采用 LPS 致伤,大鼠呼吸频率增快,呼吸困难;LPS 剂量越大,呼吸困难越重、死亡率越高;当 LPS 2~4 mg/kg 时,呼吸困难较轻,PaO_2 有显著下降,外周血 WBC 升高,分类大白细胞构成比也升高,肺组织 W/D 值显著升高,并伴有肺组织水肿、炎症细胞浸润等病理改变;当 LPS$\geqslant$6 mg/kg 时,PaO_2 早期低于 8 kPa,外周血 WBC 异常降低,分类大白细胞构成比显著升高,肺组织 W/D 值显著升高,并显著高于较低剂量对应时相组,病理变化也明显加重。

综上所述,LPS 可以导致大鼠 SIRS-肺损伤(ALI)发生;LPS 剂量增加($\geqslant$6 mg/kg),可以导致 SIRS 失控,发生 ARDS。

参考文献:

[1] Moore F A, Moore E E. Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure[J]. Surg Clin North Am, 1995, 75(2): 257-277.
[2] 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.
[3] 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.
[4] Feng L, Tang W W, Chang J C, *et al*. Molecular cloning of rat cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) cDNA and expression in spleen and macrophages[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1993, 192(2): 452-458.
[5] Yan S F, Tritto I, Pinsky D, *et al*. Induction of interleukin 6(IL-6) by hypoxia in vascular cells, central role of the binding site for nuclear factor-IL-6[J]. J Biol Chem, 1995, 270(19): 11 463-11 471.
[6] Yamasawa H, Ishii Y, Kitamura S. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant in a rat model of lipopolysaccharide-induced acute lung injury[J]. Inflammation, 1999, 23(3): 263-274.
[7] 胡 森. MODS 动物模型研究进展[J]. 中国危重病急救医学, 1999, 11(8): 504-507.
[8] Bone R C, Sir Isaac Newton. Sepsis, SIRS and CARS[J]. Crit Care Med, 1996, 24(7): 1 125-1 128.
[9] Dokter W H A, Koopmans S B, Vellenga E. Effects of IL-10 and IL-4 on LPS-induced transcription factors (AP-1, NF-IL6 and NF-kappa B) which are involved in IL-6 regulation. Leukemia, 1996, 10(8): 1 308-1 316.

(编辑 王 红)

消息

《包头医学院学报》征订启事

《包头医学院学报》是国内外公开发行的医学综合性学术期刊,1984 年创刊,季刊,国内统一刊号 CN 15-1182/R,国际标准刊号 ISSN 1006-740X。本刊设有基础医学、预防医学、临床医学、祖国医学、技术方法、短篇报道、综述等栏目。

本刊参加天津市半导体杂志社组办的"全国非邮发报刊联合征订",代号 5579。每期定价 8.00 元,全年 32.00 元。欢迎投稿,欢迎订阅。订阅者可向"全国非邮发报刊联订服务部"订阅,也可直接向本编辑部订阅。

联订服务部地址:天津市大寺泉集北里别墅 17 号 邮编:300220
电话:(022)23973378, 23962479 E-mail: LHZD@public.tpt.tj.cn 网址:www.LHZD.com
编辑部地址:内蒙古包头市昆区钢铁大街 60 号 邮编:014010
电话:(0472)5991178 E-mail: BTYX@china journal.net 网址:http://BTYX.china journal.net.cn

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