

## · 研究报告 ·

## 呼吸机相关性肺炎动物模型的建立

武庆平 姚尚龙 袁世英

【关键词】肺炎,呼吸机相关性; 大鼠; 动物模型; 铜绿假单胞菌

呼吸机相关性肺炎(VAP)动物模型的建立对研究 VAP 的发病机制、诊断和治疗有重要意义。但关于小动物 VAP 模型的建立国内外未见报道。本研究中采用经口气管插管机械通气 24 h 后接种铜绿假单胞菌(PA)复制大鼠 VAP 模型,报告如下。

## 1 材料与方法

1.1 接种 PA 的制备:PA 菌株 ATCC 27853 由华中科技大学协和医院检验科提供,划线接种于血平板后,CO<sub>2</sub> 孵箱 37 °C 培养 24 h,每 24 h 转种 1 次以保证 PA 活性。使用前 1~2 h,采用麦氏管(McFarland)目测和分光光度仪比色法,用无菌盐水配成 A、B、C 3 种浓度的细菌悬液。

1.2 动物与分组:健康清洁级成年雄性 SD 大鼠 44 只(购自华中科技大学同济医学院动物中心),体重 280~320 g,5~8 月龄。随机分为 4 组,每组 11 只,其中 8 只用于实验:①对照组,接种生理盐水;②A 组,接种 1.5×10<sup>8</sup> cfu/ml PA 菌;③B 组,接种 3×10<sup>8</sup> cfu/ml PA 菌;④C 组,接种 6×10<sup>8</sup> cfu/ml PA 菌。每组又分 9 h 和 24 h 两个亚组,每亚组 4 只大鼠。各组中余 3 只大鼠用于观察 3 d 死亡率。

## 1.3 动物模型建立

1.3.1 经口气管插管:用 16 和 18 号静脉套管针制备气管导管。大鼠麻醉前禁食 12 h。用质量分数为 20%的乌拉坦腹

腔注射麻醉,用消毒小纱布将舌向左外侧上方轻轻拉出,头部尽量向上抬起,同时上下颌分开。在额戴式喉镜反射光照射下对准声门旋转插入自制气管导管,插入深度为套管针尾部与牙齿平齐。观察棉絮在气管导管口的起伏并用听诊器听双肺呼吸音以确定导管在气管内,将气管导管外层与大鼠上唇缝合固定,连接动物呼吸机控制呼吸。呼吸机参数设定为:潮气量(V<sub>T</sub>)12 ml/kg,呼吸频率 70 次/min,吸入氧浓度(FiO<sub>2</sub>)1.0。为防止体位引起的肺不张,每隔 30 min 行 2~3 次大 V<sub>T</sub> 通气。股静脉插管,以 3~5 ml/h 输入质量分数为 5%的葡萄糖盐水。

1.3.2 大鼠肺部感染模型制备:每只大鼠机械通气 24 h(无需使用肌松剂)后,竖起固定板>45°,以微量注射器快速注入 0.2 ml PA 菌液和 0.5 ml 气体,并保持体位 5 min。

1.4 观察指标:大鼠机械通气和颈动脉插管后,用 Medlab 生物信号采集处理系统(南京美易科技有限公司)监测呼吸参数、血压、心率和体温,并于机械通气 9 h 时记录。分别于接种细菌后 9 和 24 h 剖胸处死大鼠,取左中、下肺组织,经体积分数为 10%的甲醛固定和苏木素-伊红(HE)染色制成病理切片。右侧肺组织用 4 °C 生理盐水 10 ml 行支气管肺泡灌洗 5 次,每次灌洗量>5 ml,回收量>90%,收集支气管肺泡灌洗液(BALF)

和心腔血作细菌培养。

1.5 肺组织病理学改变分度:轻度:低倍镜下见小支气管和细支气管周围及肺泡内有渗出和中性粒细胞、淋巴细胞浸润,间质毛细血管充血;中度:低倍镜下见多个细支气管及肺炎性细胞浸润、充血、出血病理改变;重度:低倍镜下见到片状炎性细胞浸润和间质出血,常有坏死灶形成。

1.6 统计学分析:数据输入 SAS 8.1 医学统计分析软件,行方差分析(Fisher 检验)和  $\chi^2$  检验。用 Bartlett 检验进行方差齐性检验,用方差分析的 Dunnett 和 SNK 两种方法进行对照组与实验组及实验组间的均数比较, Fisher 检验数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, P<0.05 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 机械通气过程中各组动物呼吸参数、血压、心率、体温和麻醉药用量差异均无显著性(表 1)。

2.2 肺部感染临床及病理学表现:在接种 PA 菌的 3 组中,除 A 组有 2 只未出现肺炎临床表现外,其余均见不同程度肺炎症状,B 组有 2 只、C 组有 5 只口、鼻周出现血迹。C 组有 3 只在 24 h 内死亡。对照组无一只出现肺炎临床表现。接种 PA 菌的 3 组中,22 只大鼠肉眼观察中、下肺叶可见不同程度的融合性出血性病灶。大鼠肺组织光镜下观察呈小叶性肺炎特征。接种 PA 菌的 3 组肺组织

表 1 各组动物机械通气 9 h 时 P<sub>ET</sub>CO<sub>2</sub>、P<sub>mean</sub>、PaCO<sub>2</sub>、生命体征及乌拉坦用量的比较( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	P <sub>ET</sub> CO <sub>2</sub> (mm Hg)	P <sub>mean</sub> (cm H <sub>2</sub> O)	PaCO <sub>2</sub> (mm Hg)				收缩压 (mm Hg)	舒张压 (mm Hg)	心率 (次/min)	乌拉坦用量(ml)		体温 (°C)
			0	30 min	12 h	24 h				诱导量	维持量	
对照组	30.98±2.03	20.92±0.51	31.50±2.25	28.13±1.88	27.00±2.85	26.70±1.58	105.6±5.2	72.3±4.9	364.1±9.1	1.51±0.14	0.47±0.12	37.98±0.22
A 组	31.35±0.86	22.24±0.61	29.25±2.25	28.43±1.80	26.70±3.00	26.55±1.65	103.8±4.7	71.7±4.6	366.3±7.2	1.45±0.18	0.45±0.18	38.03±0.21
B 组	29.85±0.75	22.55±0.82	30.75±3.00	29.18±2.25	26.85±2.48	26.25±1.58	104.0±4.1	71.7±4.7	362.2±11.6	1.40±0.23	0.46±0.13	38.07±0.19
C 组	31.95±0.90	21.63±0.41	30.00±1.50	28.05±2.78	27.08±1.80	26.70±1.73	103.3±5.2	72.1±4.5	361.1±5.2	1.49±0.19	0.50±0.15	38.02±0.21
F 值	1.49	0.80	2.36	0.70	0.06	0.20	0.49	0.72	0.22	4.00	0.17	0.91
P 值	0.345	0.553	0.084	0.557	0.981	0.898	0.688	0.596	0.877	0.107	0.910	0.513

注:P<sub>ET</sub>CO<sub>2</sub>:呼气末二氧化碳分压;P<sub>mean</sub>:平均气道压;PaCO<sub>2</sub>:动脉血二氧化碳分压;1 mm Hg=0.133 kPa;1 cm H<sub>2</sub>O=0.098 kPa

基金项目:教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20020487063)

作者单位:430022 武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院麻醉教研室

作者简介:武庆平(1968-),男(汉族),山西省平遥县人,医学博士,主治医师,主要从事呼吸机相关性肺损伤和肺炎方面的研究,已发表论文 5 篇。

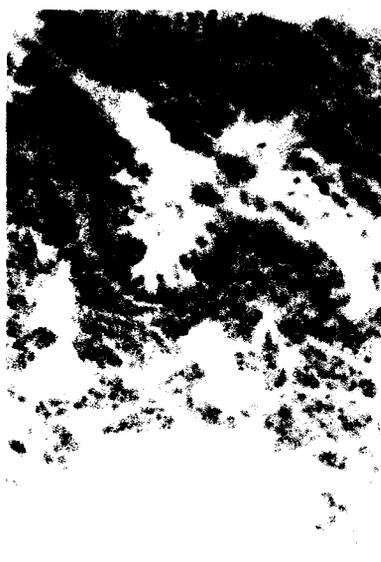


图 1 VAP 大鼠轻度肺组织病理变化(HE, ×150)

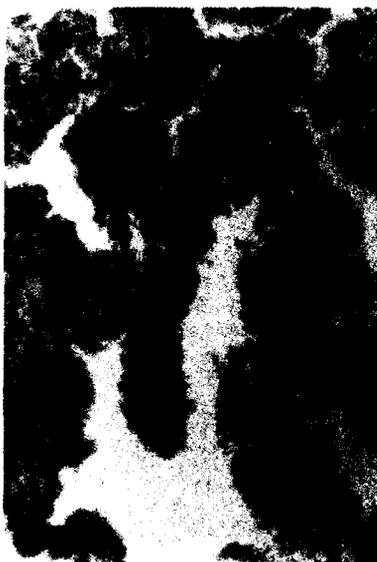


图 2 VAP 大鼠中度肺组织病理变化(HE, ×150)

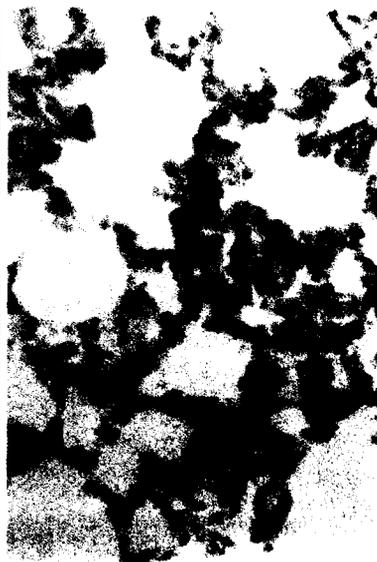


图 3 VAP 大鼠重度肺组织病理变化(HE, ×150)

表 2 各组大鼠 VAP 感染率、死亡率和血、BALF 细菌培养率

只/只(%)

组别	VAP 肺部感染				死亡	血培养率		BALF 培养率	
	无感染	轻度	中度	重度		9 h	24 h	9 h	24 h
对照组	8/8(100.0)	0/8(0)	0/8(0)	0/8(0)	0/3(0)	0/4(0)	0/4(0)	0/4(0)	0/4(0)
A 组	2/8(25.0)*	3/8(37.5)*	3/8(37.5)*	0/8(0)	0/3(0)	0/4(0)	0/4(0)	1/4(25)	3/4(75)*
B 组	0/8(0)*	2/8(25.0)*	4/8(50.0)*	2/8(25.0)* <sup>△</sup>	0/3(0)	0/4(0)	1/4(25)	4/4(100)* <sup>△</sup>	4/4(100)*
C 组	0/8(0)*	0/8(0)	3/8(37.5)*	5/8(62.5)* <sup>△</sup>	3/3(100.0)* <sup>△</sup>	2/4(50)* <sup>△#</sup>	4/4(100)* <sup>△#</sup>	4/4(100)* <sup>△#</sup>	4/4(100)*

注:与对照组比较;\*P<0.05;与 0.5 M 组比较;<sup>△</sup>P<0.05;与 1.0 M 组比较;<sup>#</sup>P<0.05

轻、中、重度病理改变发生率差异有显著性(图 1~3,表 2)。

**2.3 外周血和 BALF 细菌学培养:**3 个 PA 组间细菌血培养阳性率差异有显著性,C 组明显高于其他两组;B 和 C 两组的 BALF 细菌培养阳性率明显高于 A 组和对照组(表 2)。

**3 讨论**

临床研究认为,大多数 VAP 主要来源于内源性的耐药 PA<sup>[1,2]</sup>;VAP 患者的致病菌多以革兰阴性(G<sup>-</sup>)杆菌为主(>60%),其中 PA 占首位(24.4%)<sup>[3]</sup>。因此,选择 PA 作为致病菌建立的 VAP 动物模型具有一定代表性。我们应用肺组织病理学观察和病原学检查并结合临床表现来确诊 VAP,确保了 VAP 动物模型的可信度<sup>[4]</sup>。本研究结果显示,3 组大鼠均成功地诱导出 VAP。

国内外 PA 接种肺炎模型大多采用 6×10<sup>8</sup> cfu/ml 细菌浓度<sup>[5,6]</sup>。我们发现,用此细菌浓度接种 VAP 模型时,大鼠肺组织表现为重度病理变化达 62.5%,死亡率 100.0%,而 1.5×10<sup>8</sup> cfu/ml 细菌浓度复制 VAP 有 25.0% 大鼠未发生

肺部感染,表明这两种浓度不利于 VAP 模型建立。用 3×10<sup>8</sup> cfu/ml PA 接种的 8 只大鼠全部产生了肺炎临床表现;光镜下观察呈不同程度肺炎特征,中度肺组织病理变化占 50%。B 组的 BALF 细菌培养持续阳性率为 100%,无大鼠死亡。因此我们认为采用 3×10<sup>8</sup> cfu/ml 浓度 PA 气管内接种复制大鼠 VAP 模型较为理想。

此外,我们采用额戴式喉镜把光线反射入咽喉部,保证了插管者明视下进行气管插管,插管时尽量抬高头部使声门易于暴露,插管成功率 100%,成功克服了大鼠明视下经口气管插管的难题。根据大鼠股静脉位于皮下浅层的特点,我们采用切皮后用 24 号静脉套管针明视下股静脉穿刺输液,成功率 100%,保证了大鼠 VAP 模型液体维持和营养补充。本法建立大鼠 VAP 模型,不需要贵重仪器设备,感染部位准确,病变典型,稳定性和重复性好。

**参考文献:**

1 Fagon J Y, Chastre J, Wolff M, et al. Invasive and noninvasive strategies for

management of suspected ventilator-associated pneumonia: a randomized trial [J]. Ann Intern Med, 2000, 132: 621 - 630.  
 2 Ruiz M, Torres A, Ewig S, et al. Noninvasive versus invasive microbial investigation in ventilator-associated pneumonia: evaluation of outcome [J]. Am J Respir Crit Med, 2000, 162: 119 - 125.  
 3 Chastre J, Fagon J Y. Ventilator-associated pneumonia [J]. Am J Respir Crit Med, 2002, 165: 867 - 903.  
 4 Young P J, Redly S A. Ventilator-associated pneumonia diagnosis, pathogenesis and prevention [J]. Anaesthesia, 1999, 54: 1183 - 1197.  
 5 李倬哲, 瞿介明, 何礼贤, 等. 粒细胞减少大鼠铜绿假单胞菌肺部感染模型的建立及炎症反应研究 [J]. 中华结核与呼吸杂志, 2001, 24: 674 - 678.  
 6 黄怡, 刘忠令. 铜绿假单胞菌肺部感染时局部和血清 IL-8 动力学变化 [J]. 第二军医大学学报, 2000, 21: 450 - 452.

(收稿日期:2005-05-10  
 修回日期:2005-07-24)  
 (本文编辑:郭方,李银平)