

重症急性胰腺炎大鼠早期肺组织损伤的实验研究

张义胜 王明海 陶坤 赵国海

【摘要】 目的 观察重症急性胰腺炎(SAP)早期对肺组织损伤的影响。**方法** 将健康成年雄性 SD 大鼠 40 只随机分成假手术组及 SAP 后 30、60、120 和 360 min 组,每组 8 只大鼠。采用经胰胆管逆行注入质量分数为 5% 的牛磺胆酸钠溶液的方法来制备 SAP 模型。于各时间点活杀大鼠,分别观察大鼠动脉血气分析、肺组织病理改变及检测肺组织湿/干重(W/D)比值。**结果** SAP 大鼠 360 min 时肺组织内即有大量中性粒细胞浸润和显著的病理学改变,且肺组织含水量明显增多、剩余碱(BE)值显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但对大鼠动脉血氧分压(P_{aO_2})和动脉血二氧化碳分压(P_{aCO_2})的变化影响不明显(P 均 > 0.05)。**结论** SAP 早期即可造成大鼠肺组织显著的炎症反应,且肺组织存在一定程度的损伤。

【关键词】 胰腺炎,急性,重症; 肺损伤; 炎症

Experimental study on early pulmonary injury induced by severe acute pancreatitis in rats ZHANG Yi-sheng, WANG Ming-hai, TAO Kun, ZHAO Guo-hai. Department of Surgical Emergency, Yijishan Hospital, Wannan Medical College, Wuhu 241001, Anhui, China

Corresponding author: ZHAO Guo-hai (Email: wangmh0410@sina.com.cn)

【Abstract】 Objective To investigate the injury to pulmonary tissue induced by severe acute pancreatitis (SAP) during its early period. **Methods** Forty adult male Sprague-Dawley (SD) rats weighing 300-400 g were randomly divided into 4 groups with 8 animals in each group: sham operation group and 30, 60, 120 and 360 minutes after SAP groups. The model of SAP was reproduced by retrograde injection of 5% sodium taurocholate into the pancreatic duct of rats. Rats were sacrificed at different time points, and blood gas analysis, pulmonary pathological changes and wet dry weight ratio (W/D) of the lung were conducted. **Results** A large amount of polymorphonuclear neutrophils were observed in pulmonary tissue within 360 minutes after reproduction of SAP with obvious changes, and water content of pulmonary tissue was increased significantly, while base excess (BE) decreased significantly in rats with SAP ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). But no obvious change was observed in arterial partial pressure of oxygen (P_{aO_2}) and partial pressure of carbon dioxide (P_{aCO_2} , both $P > 0.05$). **Conclusion** SAP causes significant inflammation in rat lung with injury to pulmonary tissue in its early period.

【Key words】 severe acute pancreatitis; lung injury; inflammation

重症急性胰腺炎(SAP)是临床常见急腹症,发病急、病情变化快、机制复杂、治疗困难,病死率目前达 20%~30%^[1]。由于 SAP 病程中常伴有严重的脏器功能损伤,其中急性肺损伤(ALI)和急性呼吸窘迫综合征(ARDS)极为常见。随着临床治疗技术的发展,近年来国际上 ARDS 病死率已由原来的 75%降到 25%~40%,但在我国北京和上海的流行病学调查报告中,ARDS 病死率仍高达 50.0%~68.7%^[2]。这说明我国重症医学对 ALI/ARDS 的认识和治疗状况尚不容乐观^[3],这可能也是导致急性胰腺炎(AP)患者救治困难和病死率居高不下的重

要原因之一,所以探讨 SAP 早期肺部损伤情况具有重要的临床意义。本实验以 SD 大鼠为研究对象,报告如下。

1 材料和方法

1.1 动物与试剂:健康成年雄性 SD 大鼠 40 只,体重 300~400 g,由南京青龙山动物中心提供。按照随机数字表法将大鼠分成假手术组(8 只)和模型组(32 只),再将模型组分为 SAP 后 30、60、120 和 360 min 4 个时间点组,每组 8 只。牛磺胆酸钠由美国 Sigma 公司提供,i-STAT 全自动血气分析仪芯片由美国 i-STAT 公司提供。

1.2 动物模型制备^[4-5]:大鼠术前禁食 12 h、自由饮水,用质量分数为 25% 的乌拉坦(5 ml/kg)腹腔注射麻醉。麻醉显效后,常规消毒铺巾,在无菌操作下行颈部正中切开,分离出气管,予气管切开并插管,保留自主呼吸。再分离左侧颈总动脉,插入聚乙烯细塑料管,经压力换能器接多功能监护仪,用以采动脉

基金项目:安徽省教育厅自然科学基金资助项目(2004kj346)

作者单位:241001 安徽芜湖,皖南医学院附属弋矶山医院急诊外科

通讯作者:赵国海,教授,硕士生导师,主任医师 (Email: wangmh0410@sina.com.cn)

作者简介:张义胜(1968-),男(汉族),安徽省人,医学硕士,副主任医师。

血标本并检测血流动力学变化。另取腹正中切口逐层切开入腹,于十二指肠内侧找到片状分布的胰腺,在靠近肝门处用无损伤金属夹夹闭胰胆管,在胰胆管距十二指肠壁 2 mm 处用 4.5 号针尖逆行进针,进入胰胆管后,用无损伤的金属夹夹闭十二指肠侧胰胆管,再用恒流泵以 0.25 ml/min 的速度向胰胆管内匀速泵入质量分数为 5% 的牛磺胆酸钠溶液 (1 ml/kg),泵注完毕,停留 5 min 后拔针,松开两端金属夹,见胰腺被膜下出血、水肿即制模成功,再连续缝合关闭腹腔。假手术组不注入牛磺胆酸钠,进腹后仅翻动胰腺数次后立即放血处死并取标本。胰管注射完毕后模型组立即予微量注射泵尾静脉持续注入生理盐水 12 ml · kg⁻¹ · h⁻¹。

1.3 血气分析测定:在各时间点于密闭条件下颈总动脉取血 0.3 ml,用美国产 i-STAT 全自动血气分析仪检测各组大鼠动脉血气分析。

1.4 肺组织含水量测定:从各组大鼠左下肺切取 200 mg 肺组织,置于烘箱内 80 °C 干烤 24 h 后,用托盘天平称重并计算肺组织湿/干重(W/D)比值,以 W/D 比值表示肺组织含水量,比值越大说明肺水肿越明显。

1.5 肺组织病理学观察和积分:活杀各组大鼠,根据腹水、腹腔内胰腺周围组织坏死、皂化斑确定 SAP 诊断。在肉眼观察各组大鼠肺组织水肿、出血情况后,迅速取出肺脏,剔除周围结缔组织及擦除表面血渍,分别取左肺上叶,用体积分数为 10% 的甲醛固定 48 h 后,常规石蜡包埋、切片,苏木素-伊红(HE)染色,于光镜下观察组织病理学改变。并按肺水肿、出血、炎性细胞浸润、小气道损伤程度进行评分,每项 5 个等级分别为 0、1、2、3 和 4 级^[6]。

1.6 统计学处理:检测数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS10.0 统计软件进行单因素方差分析和 LSD 法检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血气分析的动态变化(表 1):与假手术组比较,模型组各时间点动脉血氧分压(PaO₂)有下降趋势,动脉血二氧化碳分压(PaCO₂)逐渐升高,但变化不明显,差异均无统计学意义(P 均 > 0.05);剩余碱(BE)在 60 min 时明显下降($P < 0.05$),120 min 和 360 min 时下降非常显著(P 均 < 0.01)。

2.2 肺组织 W/D 比值的动态变化(表 2):与假手术组比较,模型组肺组织 W/D 比值随时间延长逐渐增加,至 360 min 时肺组织水肿明显,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 1 不同时间点大鼠 PaCO₂、PaO₂ 和 BE 值变化比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Comparison of PaCO₂, PaO₂ and BE levels at different time stages($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	PaO ₂ (mm Hg)	PaCO ₂ (mm Hg)	BE(mmol/L)
假手术组	107.8±14.1	37.1±10.0	3.9±1.8
模型组 30 min	106.4±14.0	37.8±3.3	2.0±1.2
60 min	102.3±19.2	38.5±8.0	1.6±1.3*
120 min	98.6±18.2	41.1±13.5	-2.6±2.2**
360 min	96.0±13.1	47.3±8.2	-8.1±3.0**
F 值	0.789	1.637	46.578
P 值	0.540	0.187	0.000

注:与假手术组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 1 mm Hg = 0.133 kPa

表 2 不同时间点大鼠肺组织 W/D 比值及病理学评分比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Comparison of pulmonary W/D ratio and pathological score at different time stages($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	W/D 比值	病理学评分(分)
假手术组	4.024±0.863	0.125±0.231
模型组 30 min	4.238±0.991	0.188±0.259
60 min	4.415±0.879	0.625±0.443
120 min	4.878±0.859	0.813±0.594*
360 min	5.965±1.240**	2.375±1.026**
F 值	4.990	19.377
P 值	0.030	0.000

注:与假手术组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 光镜下观察肺组织形态学变化及病理学评分(表 2):假手术组大鼠肺外观色泽粉红,镜下观察肺组织未见异常。模型组 30 min 时肺组织基本正常;60 min 时肺组织大致正常,部分肺间质略增厚,无中性粒细胞浸润;120 min 时肺大体标本稍水肿,镜下观察到肺泡间隔稍增厚,肺间质稍充血和少量炎性细胞浸润,此时的病理学评分已明显高于假手术组($P < 0.05$);360 min 时肺大体标本色泽暗红,可见包膜下点、片状出血,镜下水肿、炎性细胞浸润以及出血等病变均加重,肺泡间隔明显增厚,肺间质充血和出血并伴大量中性粒细胞浸润,以小静脉和小支气管周围多见,小支气管内偶见少量渗出物,病理学评分显著高于假手术组($P < 0.01$)。

3 讨论

在 SAP 胰外器官损害中,以肺损伤最为突出,但 SAP 时 ALI 的发生机制仍不是非常清楚,是否在 SAP 早期时便存在肺组织损伤,目前亦没有明确的依据。我们使用 5% 牛磺胆酸钠溶液逆行注射大鼠胰胆管,制备大鼠 SAP 模型,根据腹水、腹腔内胰腺周围组织坏死、皂化斑来确定 SAP 大鼠模型的建立。通过检测各组大鼠动脉血气分析、肺组织含水量的变化以及对肺组织镜下形态学的观察和相应的病

理学评分, 来了解 SAP 后早期不同时间点的肺部损伤情况。

在实验中我们发现: SAP 后大鼠 PaO_2 逐渐下降, 虽然在 360 min 内差异无统计学意义, 但缺氧的趋势是显而易见的; 另外, SAP 大鼠 PaCO_2 逐渐升高, 表明 SAP 大鼠有 CO_2 潴留的表现, 以 360 min 时最为明显; 而 SAP 后大鼠 BE 值显著下降, 说明有代谢性酸中毒表现, 以 360 min 时最为明显。这与 SAP 时胰腺本身微循环障碍、缺血、缺氧致使局部的无氧代谢增强有关, 亦与 SAP 后 PaO_2 逐渐下降导致全身的无氧代谢增强有关。这些都表明 SAP 后 360 min (即 SAP 早期) 大鼠就已存在肺脏的功能变化, 尽管这种功能变化还未达到急性呼吸衰竭的严重低氧血症标准。

通过对肺组织进行肉眼和镜下观察以及病理学评分, 我们发现, 直至 SAP 后 120 min, 肉眼观察大鼠肺组织大体标本也无明显改变; 而光镜下大部分肺泡间隔已出现轻度增厚, 部分肺间质也出现了充血和少量炎性细胞浸润, 且病理学评分明显高于假手术组。360 min 时光镜下显示两侧肺水肿明显, 包膜下点、片状出血, 肺泡间隔明显增厚, 肺间质充血、出血伴大量中性粒细胞浸润。反映肺水肿程度的肺组织 W/D 比值亦显著增高, 说明此时肺组织含水量明显增加。这些病理变化正是肺功能改变的基础, 也符合临床上 ALI 的病理学改变。

呼吸膜的厚度是影响肺内气体交换的一个重要因素。肺泡间隔增厚, 意味着呼吸膜厚度增加, 而气体扩散速率与呼吸膜厚度成反比关系, 膜越厚, 单位时间内交换的气体体积就越少。当这种病理变化不能得到改善甚至进一步加重时, 便会出现低氧血症型呼吸衰竭和高碳酸血症型呼吸衰竭。

目前, 临床上对 ALI 诊断标准仍沿用 1994 年

欧美联席会议 (AECC) 制定的 ALI 诊断标准^[3], 其中 ALI 诊断最重要的两个指标是 X 线胸片改变和 PaO_2 的变化, 因为它们分别反映了肺脏的病理和功能变化。而本实验结果证实, SAP 大鼠早期肺脏已存在一定程度的功能变化和病理学改变, 虽然未出现严重的低氧血症和高碳酸血症, 但已有的显著肺部炎症反应是个不争的事实, 即已存在一定程度的肺部损伤。由于 ALI 是一个由轻到重、由弱到强的连续病理生理过程, 而机体的应激反应和脏器本身的代偿功能使 SAP 早期的功能变化仅表现在一定范围, 但只要致病因素未消除, 肺部损伤便会进一步发展、加重, 以致出现明显的功能变化。当机体已出现明显的 ALI 甚至到出现 ARDS 才去认识和治疗, 便会大大增加治疗的难度, 以致降低治愈率和增加病死率。因此, 认识到 SAP 早期时已有一定程度的肺部损伤, 对 SAP 进行早期干预和治疗具有积极意义。所以该模型完全可以用来进行 SAP 早期有关 ALI 肺部炎症反应方面的实验研究。这为临床对 SAP 早期进行肺部炎症干预提供基础实验依据。

参考文献:

- 1 Bhatia M, Neoptolemos J P, Slavin J. Inflammatory mediators as therapeutic targets in acute pancreatitis [J]. Curr Opin Investig Drugs, 2001, 2(4): 496-501.
- 2 邱海波. 规范和提高我国急性呼吸窘迫综合征的诊断和治疗 [J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18(12): 705.
- 3 中华医学会重症医学分会. 急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征诊断和治疗指南 (2006) [J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18(12): 706-710.
- 4 尚占民, 王宝恩, 张淑文, 等. 大鼠急性重症胰腺炎模型的建立 [J]. 世界华人消化杂志, 2000, 8(8): 921.
- 5 王勇, 刘志苏, 江平, 等. 两种逆行胆胰管穿刺方法复制胰腺炎模型比较 [J]. 医学新知杂志, 2002, 12(2): 82-83.
- 6 朱列伟, 孙波, 郑珊, 等. 实验性急性肺损伤的形态计量 [J]. 复旦学报, 2003, 30(2): 110-113.

(收稿日期: 2007-07-28 修回日期: 2007-09-30)

(本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

血浆可溶性糖化物质受体水平影响脓毒症患者的预后

有学者认为血浆可溶性糖化物质受体 (sRAGE) 水平可能与外科重症加强治疗病房 (ICU) 脓毒症患者的预后有关。为证明这一假设, 德国学者通过一项临床研究, 观察了外科 ICU 患者 sRAGE 的变化, 这些患者中约 60% 被临床诊断为严重脓毒症或脓毒性休克, 其中 29 例为发生严重脓毒症或脓毒性休克后 24 h 内的重症监护患者; 8 例健康志愿者作为对照。与健康受试者比较, 脓症患者血浆 sRAGE 浓度显著升高 [(1 026 ± 177) ng/L 比 (1 764 ± 138) ng/L, $P < 0.05$]; 28 d 内死亡者较存活者血浆 sRAGE 浓度更高 [(1 326 ± 112) ng/L 比 (2 302 ± 189) ng/L, $P < 0.01$]。统计学分析显示, 脓症患者血浆 sRAGE 浓度达 1 596 ng/L 时, 脓毒症诊断的特异性为 75.0%, 敏感性为 84.6%。因此研究者认为, 脓毒症患者的血浆 sRAGE 水平升高与其严重程度和预后相关。但 sRAGE 能否作为一个新的脓毒症标志物还需要进一步临床验证。

耿世佳, 编译自《J Surg Res》, 2007-08-22 (电子版); 胡森, 审校