

建立大鼠深低温肺缺血再灌注在体模型的实验研究

吴智勇 王志芹 毛志福 祁海杰 代飞峰 张 浩 柳亚奎 王志维 夏 军

摘 要 **目的** 建立一种新的模拟深低温停循环条件下肺缺血再灌注大鼠模型。**方法** Wistar 大鼠 30 只,分为实验组、对照组和正常组。麻醉后气管切开插管接小动物呼吸机,股动脉置管测动脉压力,监测心电图、肛温、血氧饱和度和血气分析,用体外降温至肛温 24℃。实验组阻断左下肺门 30min 后开放,并逐渐将体温恢复正常;对照组单纯降温复温。复温后处死动物,取肺组织标本计算 W/D 值及病检。**结果** 实验大鼠无死亡。实验组 W/D 值较正常组和对照组明显增高 ($P < 0.05$) 病检显示实验组明显肺泡间质水肿,大量炎性细胞、红细胞渗出;而对照组病变明显减轻。**结论** 本实验方法制作的大鼠模型可以用于模拟人深低温停循环肺缺血再灌注的研究。

关键词 大鼠 肺 深低温停循环 缺血再灌注

Experimental Study of Establishment of in vivo Rat Deep Hypothermia Lung Ischemia – reperfusion Model. Wu Zhiyong, Wang Zhiqin, Mao Zhifu, Qi Haijie, Dai Feifeng, Zhang Hao, Liu Yakui, Wang Zhiwei, Xia Jun. Department of Cardiovascular Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract Objective To establish the new rat model of deep hypothermic circulatory arrest (DHCA) with lung ischemia – reperfusion. **Methods** Thirty Wistar rats were divided into experimental group, control group and normal group. Anesthetized rats received tracheostomy ventilation. Femoral artery catheter was placed to measure artery pressure, ECG was monitored. Oxygen saturation and blood gas analysis was done, and rectal temperature with external cooling to 24℃ was recorded. Left lower pulmonary artery occlusion in experimental group (the control group did not block) will gradually return to normal body temperature. After the body temperature restored, rats were put to death and lung tissue samples were taken to calculate W/D and pathological examination. **Results** No rat failed. Compared to normal group and control group, W/D value in the experimental group increased significantly ($P < 0.05$). Its pathologic examination showed marked alveolar interstitial edema, majority inflammatory cells' and red blood cell leakage. **Conclusion** The method can be used to simulate people to deep hypothermic circulatory arrest in lung ischemia – reperfusion.

Key words Rat; Lung; Deep hypothermic circulatory arrest; Ischemia – reperfusion

深低温停循环 (deep hypothermic circulatory arrest, DHCA) 在心血管外科领域中已得到了广泛的应用,但其研究对象主要集中在猪、狗等大动物,实验成本高,且由于多使用体外循环技术干扰因素多,这些都成为制约大批量实验的障碍。为了寻找一种适应现代医学研究需要的模型,我们探索建立一种简单有效的深低温停循环肺缺血大鼠模型,现报道如下。

材料与方法

1. 实验动物及分组:SPF 级 Wistar 大鼠 (湖北省动物实验中心提供),雌雄不限,体重 220 ~ 250g,随机分为实验组、对照组、正常组,每组 10 只。

2. 大鼠深低温停循环模型制作:实验组 Wistar 大鼠以 0.3% 戊巴比妥钠 40mg/kg 腹腔注射麻醉。固定后气管切开后插管接小动物呼吸机,呼吸频率 80 ~ 90 次/分,吸呼比 1: (2

~ 3)。每 1h 做大鼠动脉血气分析保持血气稳态。备皮、消毒,用剪刀剪开皮肤,打开腹股沟管,找到股动脉,动脉置管,取动脉血做血气分析后,用肝素填充连接管后接压力换能器,多功能监护仪 (PHILIPS MP40) 监测血压。同时动态监测心电图和肛温变化。在大鼠尾巴的根部缠绕血氧饱和度探头,检测外周血氧饱和度。用冰块体表物理降温,每隔 1min 记录体温、心率、血压以及血氧饱和度,调整降温速度。当肛温降至 24℃ 时停止降温。经左胸第 4 肋间进胸,剪断第 4 肋骨,分别向上下牵引暴露。按 1.5mg/kg 肝素化后用无创伤血管阻断夹自左肺门处夹闭左下肺动静脉和左下肺支气管及支气管动脉,使左下肺在深低温下停止灌注。潮气量减少 1/3。30min 后开放阻断夹,肺复张后关胸。用红外线灯给大鼠复温,每分钟体温恢复不超过 0.5℃,2h 内将体温恢复到正常。对照组单纯肛温降至 24℃,30min 后升温。

3. 观测指标:统计大鼠的生存情况。复温后处死实验大鼠取肺组织 HE 染色评价肺组织形态学变化。再取部分实验标本,电子天平称湿重 (W),然后置入 55℃ 电热恒温鼓风干燥箱 48h 后称干重 (D),并计算 W/D 比,代表肺含水量。

4. 统计学方法:计数资料用 χ^2 检验,采用 SPSS 11.5 软件

作者单位:430060 武汉大学人民医院心血管外科 (吴智勇、毛志福、代飞峰、张浩、柳亚奎、王志维、夏军);武汉市武昌医院 (王志芹);武汉市儿童医院 (祁海杰)

进行统计学处理, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

实验组、对照组大鼠在降温 and 升温过程中生命体征差异不明显。实验大鼠无死亡。W/D 值正常组 3.07 ± 0.41 ; 对照组 3.18 ± 0.39 ; 实验组 3.98 ± 0.45 , 实验组与正常组和对照组比较 $P < 0.05$ 。光镜下可见正常组肺泡间隔正常, 无水肿和炎性细胞浸润, 肺泡腔内无渗出物 (图 1)。实验组肺泡间质水肿, 炎性细胞浸润, 肺泡结构破坏, 部分肺泡萎陷, 部分肺泡出现代偿性肺气肿, 肺泡腔内出现大量红细胞、炎性细胞、浆性渗出液 (图 2)。对照组 (图 3) 肺泡间隔稍水肿, 肺泡腔内炎性细胞浸润及出血均明显减轻, 部分肺泡恢复正常。降温、复温过程中血压、心率变化如图 4 ~ 图 7 所示。

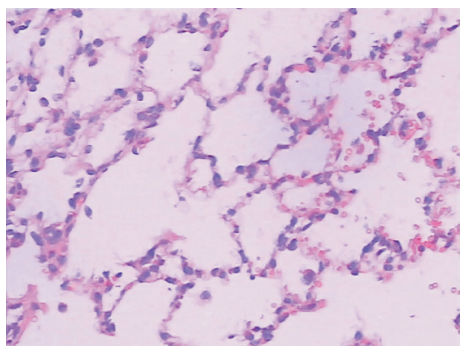


图 1 正常大鼠肺泡间隔正常, 无水肿和炎症细胞浸润, 肺泡腔内无渗出物 (HE, $\times 200$)

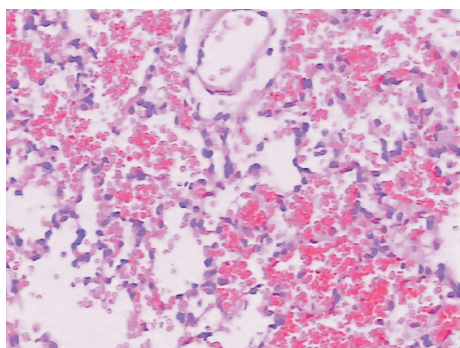


图 2 实验组, 肺泡间质水肿, 炎性细胞浸润, 肺泡结构破坏, 部分肺泡萎陷, 肺泡腔内出现大量红细胞、炎性细胞、浆性渗出液 (HE, $\times 200$)

讨 论

在深低温停循环下肺脏经过低温缺血过程及缺血再灌注损伤, 其功能损害大大增加, 有关 DHCA 术后中呼吸系统并发症的报道亦渐增多, 约 2% 的患者有 ARDS 症状, 发生 ARDS 后的患者有 $>50\%$ 的病死率, 表明深低温停循环术后肺损伤仍是亟待解决的关

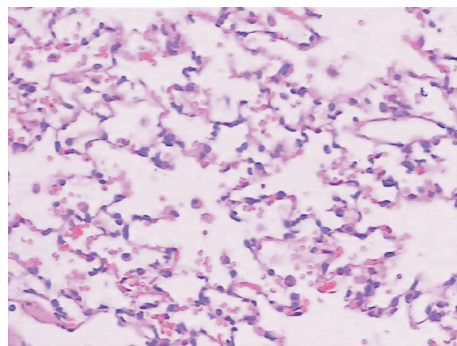


图 3 对照组, 肺泡间隔稍水肿, 肺泡腔内少许炎性细胞浸润及出血, 肺组织病理损伤程度明显轻于实验组 (HE, $\times 200$)

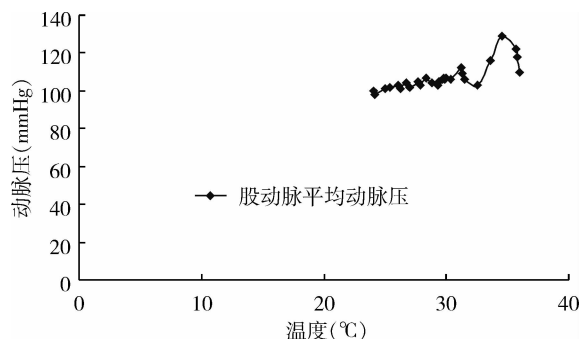


图 4 大鼠降温至深低温过程中肛温变化与血压变化

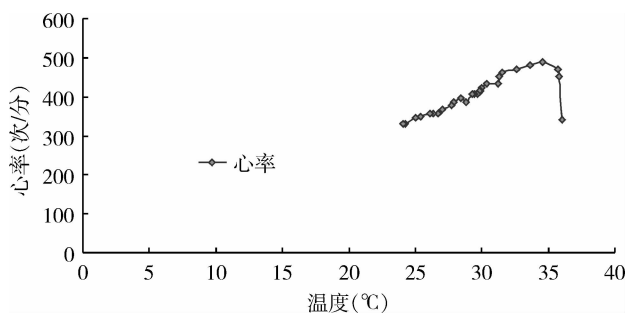


图 5 大鼠降温至深低温过程中肛温变化与心率变化

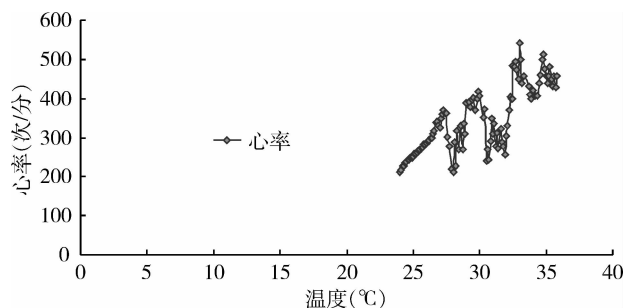


图 6 大鼠复温过程中肛温变化与心率变化

键问题之一^[1]。因此, 研究深低温体外循环术后肺损伤的发病机制及有效的防治措施, 降低近远期肺部

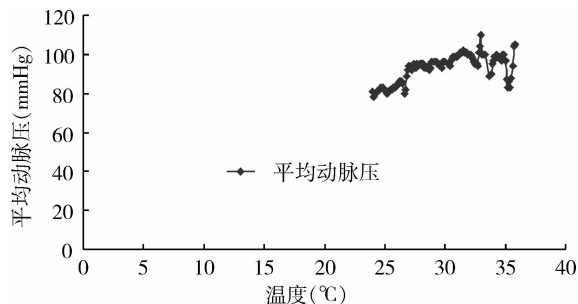


图 7 大鼠复温过程中肛温变化与血压变化

并发症发生率,改善患者生存质量,具有非常重要的意义。为此,许多学者用不同动物建立了各种动物模型,研究深低温停循环对机体的影响^[2]。目前深低温停循环肺保护动物模型主要是建立在猪、狗等大型动物体外循环的基础上。这些模型和人类体外循环时操作非常近似,可以逼真模拟围术期肺的改变,但也存在一些缺点:(1)成本过高:购买和饲养这些大型实验动物花费很高,而且在模拟深低温停循环时都需要体外循环辅助,不但要投入大量经费购买体外循环设备还要组织人员进行围术期管理,这都使实验成本增高,不适合于现代科学研究所要求的大批量的实验操作。(2)体外循环:随着现代科学研究的发展,目前有关肺保护方面的研究多集中在内源性保护机制的研究,这就要求实验条件尽量减少外源性干扰因素,而体外循环无疑增加了这些外源性干扰因素使得实验结果可能导致偏差。我们所建立的实验模型则具有以下优点:①大鼠的购买和饲养成本比较低,实验过程操作相对简单,一个人便可完成整个实验操作;②不需要体外循环辅助,节省了大量的人力和财力,适合于现代科研所要求的大批量、重复性研究;③鼠的基因 99% 能在人基因组中找到同源序列,通过对大鼠的深低温肺保护机制的研究,能很大程度地反映人类在深低温肺缺血后肺细胞的变化情况^[3];④现代医学在大鼠呼吸系统方面的研究已经非常深入,实验所需的试剂和设备非常齐全,这些都能促进深低温肺保护的研究。大鼠耐低温特性是此模型的建立基础。我们的前期研究发现,在肛温 11 ~ 12℃ 大部分大鼠才会由于体温过低死亡,而肛温降至深低温 22 ~ 24℃ 左右时,大鼠的心脏仍有搏动,但此时大鼠的心率是正常的 50% ~ 60%、血压只有正常的 40% ~ 50%,心排出量显著下降,泵血量只有正常的 2/10 ~ 3/10 左右与人体深低温低流量灌注的流量相似(图 8、图 9)。大鼠肺血供的来源和人类相似主要是支气管动脉和肺动脉。在本模型中夹闭左下肺动、静脉和左下肺支气管,这样就完全阻断了左下肺血供,

因此,此模型可以模拟人在深低温停循环下肺缺血缺氧的实验条件。

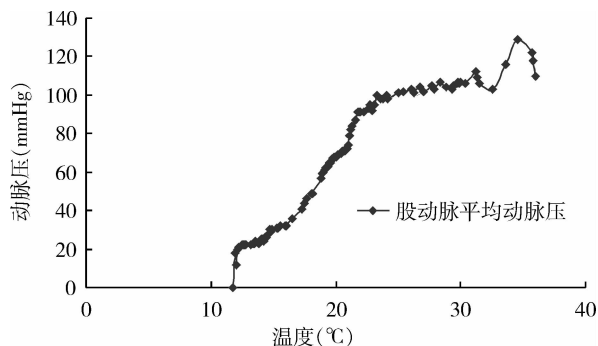


图 8 大鼠降温过程中肛温变化与血压变化

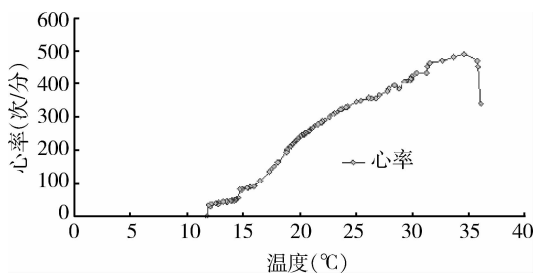


图 9 大鼠降温过程中肛温变化与心率变化

实验过程中我们发现,大鼠的麻醉深度不宜过浅,而且要在实验过程中追加麻药,否则在降温过程中可能会出现实验大鼠的抽搐,影响实验结果。在本实验前,我们作了大量的预实验,发现实验大鼠复温后呼吸系统分泌物很多,易造成窒息死亡,预实验过程中的 1 例大鼠死亡与呼吸道堵塞有直接关系。最后才摸索出气管切开可以有效吸出这些分泌物从而解决了大鼠在实验过程中窒息的难题。另外,在复温过程中易出现心房纤颤可以给予药物干预,但复温至正常后血压心率基本都可以回归正常。基于以上原因,此动物模型适用于深低温停循环下急性肺损伤的研究。

参考文献

- 1 Nishibe T, Kondo Y, Muto A, *et al.* Protective effect of sivelestat sodium (Eraspol) on postoperative lung dysfunction in patients with type A acute aortic dissection: a pilot study [J]. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 2008, 49 (5): 627 - 631
- 2 Zheng JH, Gao BT, Jiang ZM, *et al.* Evaluation of early macrophage activation and NF- κ B activity in pulmonary injury caused by deep hypothermia circulatory arrest: an experimental study [J]. *Pediatr Cardiol*, 2010, 31 (2): 215 - 221
- 3 Bradley A. Mining the mouse genome [J]. *Nature*, 2002, 420 (6915): 512 - 514

(收稿日期:2011-08-30)

(修回日期:2011-09-14)