

· 论 著 ·

# 猪胰蛋白酶致大鼠 COPD 氧化应激与动脉血气间的相关性研究

吴 升, 沈亚伟, 郝 建, 常月进, 刘 娟

**[摘要]** **目的** 探讨猪胰蛋白酶(PPE)致大鼠慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)氧化应激与动脉血气变化的关系。**方法** Wistar 大鼠 30 只随机分为对照组(A 组)、模型组(B 组)和棉籽油组(C 组), 每组 10 只。B、C 组大鼠气管内一次性注入 PPE 构建肺气肿模型, C 组大鼠腹腔内注射棉籽油(1 ml/kg)。饲养 30 d 后处死解剖, 测量大鼠肺体积, 肺泡形态学, 肺组织超氧化物歧化酶(SOD)活力、丙二醛(MDA)含量和测定动脉血气分析, 并用统计学方法探讨氧化应激与动脉血气间的相互关系。**结果** B、C 组大鼠肺体积、肺泡形态学、氧化应激水平均明显大于 A 组( $P < 0.05$ ); B、C 组肺组织 SOD 活力和 MDA 含量较 A 组显著升高( $P$  均  $< 0.05$ )。A 组动脉血氧分压( $\text{PaO}_2$ )、动脉血氧饱和度( $\text{SaO}_2$ )、动脉血二氧化碳分压( $\text{PaCO}_2$ )基本正常; B、C 组  $\text{PaO}_2$ 、 $\text{SaO}_2$  明显降低, 而  $\text{PaCO}_2$  明显升高。肺组织 SOD 与  $\text{PaO}_2$  呈正相关, 肺组织 MDA 与  $\text{PaO}_2$  呈负相关; 肺组织 SOD、MDA 均与  $\text{PaCO}_2$  不相关。**结论** 用猪胰蛋白酶制作大鼠 COPD 模型成功, 大鼠 COPD 氧化应激与动脉血气之间有着密切的相关性, 值得在动物 COPD 实验造模中推广使用。

**[关键词]** 猪蛋白酶; 大鼠; 慢性阻塞性肺疾病; 氧化应激; 动脉血气分析

**[中图分类号]** R563.9 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-271X(2012)03-0219-04

## The research of relationship between oxidatit stress and the changes of arterial blood gas in the rat with COPD induced by pig trypsin

WU Sheng, SHEN Ya-wei, HAO Jian, CHANG Yue-jing, LIU Juan. Hangzhou Sanatorium of Nanjing Military Command, Military Clinical College of Hangzhou, Anhui University of Medicine, Hangzhou, Zhejiang 310007, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the research of relationship between oxidatit stress and the changes of arterial blood gas in the rat with COPD induced by pig trypsin (PPE). **Methods** Thirty Wistar rats were randomly divided into control group (group A), model group (group B) and cottonseed oil group (group C), each group of each 10 rats. Established model in rats which rat's trachea injected for PPE, raising 30 days put to death, and the measurement of rat's lung volume, the alveolar morphology, content of SOD and MDA of lung tissue and determination of arterial blood gas analysis, and statistical methods to explore of relation oxidatit stress with arterial blood gas. **Results** The lung volume, the alveolar morphology, oxidative stress levels in group B and C were significantly greater than A group ( $P < 0.05$ ); Content of SOD and MDA in B and C group of lung tissue were increased significantly than group A ( $P < 0.05$ ).  $\text{PaO}_2$ ,  $\text{SaO}_2$ ,  $\text{PaCO}_2$  in Group A was basic normal;  $\text{PaO}_2$  and  $\text{SaO}_2$  in B, C group were significantly reduced, and  $\text{PaCO}_2$  was increased significantly. SOD of lung tissue was positively associated with  $\text{PaO}_2$ , MDA of lung tissue were negatively correlated  $\text{PaO}_2$ ; MDA and SOD of lung tissue were not related with  $\text{PaCO}_2$ . **Conclusion** With pig trypsin make rat's model of COPD, the rats with COPD has close correlation between oxidation stress and arterial blood gas, the animal experiment mode of COPD is worthy of use of promotion.

**[Key words]** porcine pancreatic elastase; rat; COPD; oxidative stress; arterial blood gas analysis

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是呼吸道常见疾病之一,其诱因包

括大气污染、气候变化、吸烟或有害气体、有害颗粒影响以及感染,这些诱因可使气道气流受限,绝大部分不可逆并逐渐加重<sup>[1-3]</sup>。目前,临床上对 COPD 尚不能治愈,其发病机制仍不完全清楚,可能与蛋白酶/抗蛋白酶失衡、氧化/抗氧化失衡、炎症/抗炎症失衡、吸烟、感染等机制有关。本研究用猪胰蛋白酶

**作者简介:** 吴 升(1965-),男,江西上饶人,硕士,主任医师,从事心肺康复,老年病研究

**作者单位:** 310007 浙江杭州,安徽医科大学解放军杭州临床学院(南京军区杭州疗养院)

**通讯作者:** 郝 建, Email: jianhao105@163.com

(porcine pancreatic elastase, PPE) 制作大鼠 COPD 动物模型, 探讨慢性阻塞性肺气肿的发病机制, 并探讨大鼠 COPD 氧化应激与动脉血气之间相互关系, 现将动物实验报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料 健康雄性 SPF 级 Wistar 大鼠, 体重 220 ~ 250 g, 由浙江省第一医院实验动物中心提供, 动物批文号: SCXK (浙) 2007-0029。棉籽油 (Sigma. USA, 批号 C7767)、超氧化物歧化酶 (SOD) 检测试剂盒与脂质过氧化物 (MDA) 检测试剂盒 (南京建成生物技术有限公司)、图像分析软件 (Leica Qwin V3)、图像采集系统 (Leica Application Suite)、PPE (105 U/mg, Roch. USA, 批号 11027905001)。

1.2 实验方法 Wistar 大鼠 30 只随机分为 3 组, 每组 10 只, 设生理盐水对照组 (A 组)、实验动物肺气肿模型组 (B 组) 和棉籽油治疗组 (C 组), 称大鼠体重后并及时记录各组参数, 用 10% 水合氯醛 (4 ml/kg) 大鼠腹腔麻醉。将大鼠仰卧固定, 颈部皮肤备皮、消毒、纵向切开、逐层分离暴露气管, 细针头刺入气管内一次性注入相应试剂: A 组给予生理盐水 (0.4 ml/kg); B、C 组给予浓度为 5000 U/ml 的 PPE (2000 U/kg), 缝合皮肤并消毒。C 组大鼠腹腔内再注射棉籽油 (1 ml/kg), 每日 1 次, 连续 30 d。3 组大鼠喂以大鼠饲料 (以每只 30 g/d 供应), 水随意供应, 每天观察大鼠的活动和进食情况, 30 d 后处死。

1.3 肺组织氧化水平检测 取适量肺组织根据试剂盒说明测样品中 SOD 活力和 MDA 浓度。

1.4 动脉血气分析 30 d 后用 10% 水合氯醛 (4 ml/kg) 麻醉各组大鼠。固定大鼠于操作台上, 用手术刀切開大鼠腹腔, 分离暴露出腹主动脉。选用 2.5 ml 注射器抽取肝素钠适量湿润注射器, 经腹主动脉抽取大鼠动脉血 1 ml, 术毕将抽取的动脉血放置 4℃ 低温条件下保存, 然后测定动脉血气分析, 并将各参数值及时记录与整理。

1.5 肺泡形态计量学观察 取每只大鼠左肺上、下段, 右肺尖、膈叶各四块肺组织, 常规脱水, 石蜡包埋, 3 μm 连续切片, 每张切片在 100 倍光镜下随机

采集 5 个视野, 肉眼观察并利用 Leica Qwin V3 图像分析软件分析。

1.5.1 平均肺泡面积 (MAA) 计数每个视野内的肺泡数 (Na), 利用图像分析软件测出每个视野的面积 (TA), HE 染色阳性区域 (肺实质) 的面积 (PA), 以  $MAA = (TA - PA) / Na$  得到每个视野的平均肺泡面积。

1.5.2 平均内衬间隔 (MLI) 其数值反应平均肺泡直径。在计算机图像分析系统上, 参考 Dunnill 方法<sup>[2]</sup>以视野正中为中心划“+”字交叉线, 计数经此交叉线的肺泡间隔数 (NS)。测出“+”字线总长度 (L), 以  $MLI = L / NS$  得到平均内衬间隔。

1.6 肺体积 (V) 测定 第 30 天处死各组大鼠后打开胸腔, 游离并完整取出气管和肺组织, 在 20 cm 水柱的压力下将 10% 的中性福尔马林液充分灌注肺脏 30 min, 结扎气管后浸入 10% 的中性福尔马林液中, 测量排液量, 获得 V。

1.7 统计学处理 计量数据以均数 + 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件进行多组比较单因素方差分析, 组间比较用 SNK 法, 氧化物、抗氧化物与动脉血气间的相关性采用相关回归分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织病理学改变

2.1.1 肉眼观察 B、C 组肺体积较 A 组明显增大, 部分可见明显的肺大泡, 颜色灰白, 肺弹性减弱。  
2.1.2 光镜表现 B、C 组较 A 组普遍存在肺泡腔不规则扩大, 肺泡间隔变薄甚至断裂, 部分肺泡相互融合形成肺大泡, 肺泡数量减少, 肺泡总面积减小 (图 1)。

2.2 肺泡体积和肺泡形态学分析 与 A 组比较, B、C 组的肺体积明显增大 (P 均 < 0.05), 说明经 PPE 滴注后大鼠肺体积明显异常; B 组与 C 组相比, 肺体积无差异 (P > 0.05), 说明棉籽油溶剂对肺气肿治疗无作用。肺泡形态学比较显示, B、C 组 MLI、MAA 与 A 组比较差异有统计学意义 (P < 0.05, 表 1)。

表 1 各组大鼠肺体积和肺泡形态计量学比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	V (cm <sup>3</sup> )	MLI (μm)	MAA (um <sup>2</sup> )
A 组	10	4.2 ± 0.47	201.86 ± 9.77	40108.63 ± 1362.02
B 组	10	7.26 ± 0.97 *	229.74 ± 16.94 *	52407.60 ± 3417.08 *
C 组	10	7.43 ± 1.31 *	232.90 ± 13.92 *	53045.40 ± 2668.44 *

注: 与 A 组比较, \* P < 0.05

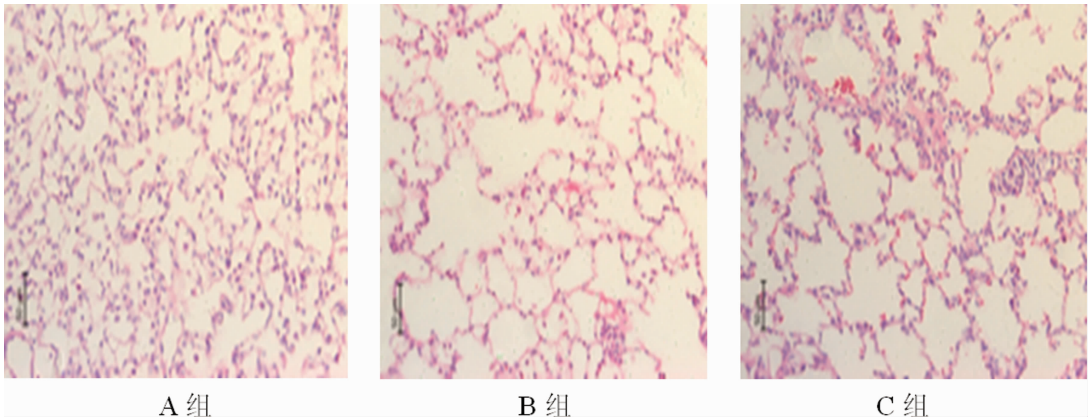


图 1 各组大鼠肺组织比较(HE ×100)

**2.3 动脉血气分析** B、C 组动脉血二氧化碳分压(PaCO<sub>2</sub>)值均显著高于 A 组( $P < 0.05$ ),动脉血氧分压(PaO<sub>2</sub>)、动脉血饱和度(SaO<sub>2</sub>)值均显著低于 A 组( $P < 0.05$ ,表 2)。

表 2 各组大鼠动脉血气分析变化( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	PaCO <sub>2</sub> (kPa)	PaO <sub>2</sub> (kPa)	SaO <sub>2</sub>
A 组	10	6.181.16	10.310.59	96.62.06
B 组	10	9.141.06*	6.481.45*	86.16.26*
C 组	10	9.030.86*	7.161.22*	87.73.71*

注:与 A 组比较,\*  $P < 0.05$

**2.4 氧化应激水平** B、C 组 SOD 活力和 MDA 含量较 A 组都有不同程度的提高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ,表 3),说明 PPE 的刺激作用引起肺组织氧化应激明显。

表 3 各组大鼠肺组织氧化应激水平( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	SOD (Nu/ml)	MDA (nmol/ml)
A 组	10	30.01 ± 15.29	0.0344 ± 0.014
B 组	10	48.33 ± 24.79*	0.0931 ± 0.017*
C 组	10	58.05 ± 13.07*	0.0938 ± 0.017*

注:与 A 组比较,\*  $P < 0.05$

**2.5 肺组氧化水平与动脉血气的相关性分析** 肺组组织 SOD 活性与 PaO<sub>2</sub> 呈显著正相关,与 PaCO<sub>2</sub> 不相关;肺组织 MDA 含量与 PaO<sub>2</sub> 呈显著负相关,肺组织 MDA 活性与 PaCO<sub>2</sub> 不相关(表 4)。

表 4 肺组织 SOD、MDA 与 PaO<sub>2</sub>、PaCO<sub>2</sub> 相关分析

	PaO <sub>2</sub> (KPa)	P 值	PaCO <sub>2</sub> (KPa)	P 值
SOD	r = 0.712	0.000	r = -0.315	0.176
MDA	r = -0.595	0.006	r = 0.299	0.200

3 讨论

用浓度 5000 U/ml 的 PPE (2000 U/kg)滴注大鼠气管内制作大鼠 COPD 动物实验模型,大鼠肺组织标本呈灰白且体积明显增大,与对照组大鼠用生理盐水气管内滴注相比较,大鼠肺组织呈粉红色且体积也没有明显增大。病理检查显示,B、C 组大鼠较 A 组普遍存在肺组织结构紊乱、破坏非常显著,肺泡腔不规则扩大,部分肺泡相互融合形成肺大泡,肺泡数量减少,肺泡总面积减小,肺泡的间隔变薄、断裂和肺的弹性减弱,说明用 PPE 制作大鼠 COPD 实验动物模型典型造模成功,与国内外有关作者<sup>[4-7]</sup>报道一致。

实验动物造模后,出现呼吸道分泌物增加,呼吸困难,有明显缺氧等大鼠肺气肿病症,B、C 组 PaO<sub>2</sub>、SaO<sub>2</sub> 值均显著低于 A 组( $P$  均  $< 0.05$ ),而 B、C 组 PaCO<sub>2</sub> 值均显著高于 A 组( $P$  均  $< 0.05$ ),A 组 PaO<sub>2</sub>、SaO<sub>2</sub>、PaCO<sub>2</sub> 基本正常,说明 PPE 造模对肺组织损伤甚至肺组织严重破坏密切相关,而 C 组的棉籽油溶剂对肺气肿无保护作用。处死实验动物后,B、C 组 SOD、MDA 含量较 A 组都有不同程度的提高,而且均有统计学意义( $P < 0.05$ ),说明 PPE 的刺激作用引起肺组织氧化应激相当显著,与文献报道相似<sup>[8-10]</sup>。本研究还对氧化水平与动脉血气进行相关分析,肺组织 SOD 与 PaO<sub>2</sub> 呈正相关,肺组织 MDA 与 PaO<sub>2</sub> 呈负相关;肺组织 SOD、MDA 均与 PaCO<sub>2</sub> 不相关。大鼠 COPD 时氧化应激明显,证明氧化应激是诱导阻塞性肺气肿的重要环节之一<sup>[11-12]</sup>,氧化应激水平与缺 O<sub>2</sub> 密切相关,缺 O<sub>2</sub> 越严重氧化应激水平越明显,与 CO<sub>2</sub> 潴留则不相关。但此时处于动物实验急性应激状态,氧化应激呈慢性迁延状态时与 CO<sub>2</sub> 潴留是否相关还需深入研究与探讨。

常见症状、体征,亦要了解不典型心包炎的临床表现。②对心脏的各种杂音应有正确的认识、做好鉴别诊断,查体要仔细。对本病有诊断价值的体征,认症要准确,如颈静脉怒张、心脏搏动不明显、心包叩击音、奇脉、心包摩擦音等。③不能忽视对心包积液的检查,其对病因诊断很有价值<sup>[2]</sup>。④详细询问病史,凡病史中有急性心包炎或有过肺部结核感染史,特别是胸膜炎病史,或有过严重的胸部外伤病史者,切要警惕慢性缩窄性心包炎之可能,缩窄性心包炎能否得到有效的治疗,很大程度上取决于及时、准确的诊断<sup>[3]</sup>。一旦诊断明确,主张尽早行心包切除术,病程越长,手术效果越差<sup>[4]</sup>。⑤对可疑病例应及时 UCG 检查,国内有报道<sup>[5]</sup> UCG 诊断缩窄性心包炎的符合率 51%~73%,且费用低廉、重复性好,结合 CT、MRI 可明显提高诊断阳性率<sup>[6]</sup>。

### 【参考文献】

- [1] Ha JW, Ommen SR, Tajik AJ, et al. Differentiation of constrictive

pericarditis from restrictive cardiomyopathy using mitral annular velocity by tissue Doppler echocardiography [J]. AM J Cardiol, 2004, 94(3):316-319.

- [2] Levy PY, Fournier PE, Charrel R, et al. Molecular analysis of pericardial fluid: a 7-year experience [J]. Eur Heart J, 2006, 27(16): 1942-1946.
- [3] Marshall A, Ring N, Lewis T. Constrictive pericarditis: lessons from the past five year experience in the South West cardiothoracic center [J]. Clin Med, 2006, 6(6): 592-597.
- [4] Yetkin U, Kestelli M, Ergunes K, et al. Recent surgical experience in chronic constrictive pericarditis [J]. Tex Heart Inst J, 2003, 30(1): 27-30.
- [5] 韦育林, 李楚强, 谷小鸣. 缩窄性心包炎的临床和超声心动图表现 [J]. 广东医学, 2002, 23(10): 1065-1066.
- [6] 冯新恒, 李昭屏, 李卫虹, 等. 缩窄性心包炎的临床及超声心动图特征 [J]. 北京大学学报: 医学版, 2007, 39(6): 642-644.

(收稿日期: 2012-03-20)

(本文编辑: 张仲书)

(上接第 221 页)

### 【参考文献】

- [1] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2007 年修订版) [J]. 中华内科杂志, 2007, 46(3): 254-261.
- [2] Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary [J]. Am J Respir Cir Care Med, 2007, 176(6): 532-555.
- [3] GOLD Executive Committee. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease (Updated 2009). www. Goldcopd. com.
- [4] 沈亚伟, 王波, 郝建. 全反式维甲酸对肺气肿大鼠氧化应激的影响 [J]. 临床肺科杂志, 2011, 16(4): 506-508.
- [5] Celli BR. Update on the Management of COPD [J]. Chest, 2008, 133(6): 1451-1462.
- [6] 晁晖, 唐广林, 万毅新. 黄芩苷通过调节  $\gamma$  干扰防治大鼠慢性阻塞性肺疾病 [J]. 国际呼吸杂志, 2012, 32(1): 18-21.
- [7] 曾小康, 徐建林, 汪伟民. 木瓜蛋白酶和胰蛋白酶所致大鼠肺模

型的差异及对比 [J]. 国际呼吸杂志, 2011, 31(7): 1318-1322.

- [8] Parent F, Maitre S, Meyer G, et al. Diagnostic value of D-dimer in patients with suspected pulmonary disease: results from a multicentre outcome study [J]. Thromb Res, 2007, 120(2): 195-200.
- [9] 文红, 高怡, 安嘉颖, 等. 中重度慢性阻塞性肺疾病患者无氧阈和高强度肺康复运动方案的比较 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2008, 31(8): 571-576.
- [10] Holverda S, Bogaard HJ, Groepenhoff H, et al. Cardiopulmonary exercise test characteristics in patients with chronic obstructive pulmonary disease and associated pulmonary hypertension [J]. Respiration, 2008, 76(2): 160-167.
- [11] 向永红, 苏晓丽, 胡成平, 等. 慢性间断性低氧大鼠氧化应激相关途径及抗氧化剂干预效果分析 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2010, 33(12): 912-916.
- [12] 楼标雷, 修清玉. 慢性阻塞性肺疾病中的氧化应激 [J]. 东南国防医药, 2007, 9(3): 237-240.

(收稿日期: 2011-10-11; 修回日期: 2012-03-05)

(本文编辑: 张仲书; 英文编辑: 王建东)