

## • 论 著 •

## 高温气体吸入致豚鼠急性肺损伤动物模型制备的实验研究

徐晓峰<sup>1</sup>, 许秀娟<sup>1</sup>, 郝建<sup>1</sup>, 吴升<sup>1</sup>, 李树雯<sup>1</sup>, 钱钧<sup>1</sup>, 常月进<sup>1</sup>, 刘娟<sup>1</sup>, 王丽君<sup>1</sup>, 姚远<sup>2</sup>

**[摘要]** 目的 制备高温气体吸入致豚鼠急性肺损伤 (ALI) 动物模型。方法 选择 20 只雄性豚鼠随机分为 2 组, 每组 10 只, 其中健康豚鼠为对照组, 急性肺损伤豚鼠为实验组。实验组吸入 150℃ 高温气体制作豚鼠 ALI 动物模型, 然后处死 2 组豚鼠并取豚鼠右肺的大体标本, 称重计算豚鼠肺湿/干重比 (W/D), 选取 2 组豚鼠左上肺组织进行 HE 染色, 利用光学显微镜观察肺组织病理变化情况, 及时记录其病理变化的结果; 对豚鼠动脉血液进行血气分析并比较。结果 实验组豚鼠肺组织病理结构呈现明显的急性炎症性改变; 实验组豚鼠肺 W/D 比值显著高于对照组 [ (5.72±0.31) vs (4.88±0.11),  $P<0.05$  ]; 实验组豚鼠 pH、PaO<sub>2</sub> 显著低于对照组 [ (7.02±0.12) vs (7.38±0.04), (98.80±62.60) mmHg vs (177.30±24.70) mmHg,  $P<0.05$  ], 而 PaCO<sub>2</sub> 显著高于对照组 [ (74.70±23.23) mmHg vs (31.10±8.77) mmHg,  $P<0.05$  ]。结论 成功制作豚鼠 ALI 实验动物模型。该模型达到 ALI 要求, 仿真性能高、重复性好、稳定性高, 为今后研究高温气体吸入致 ALI 的临床及基础研究提供了可靠的动物模型。

**[关键词]** 实验动物模型; 急性肺损伤; 豚鼠

**[中图分类号]** R563.8 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-271X(2017)05-0449-04

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1672-271X.2017.05.001

## An experimental study of acute lung injury in guinea pigs induced by high temperature gas

XU Xiao-feng<sup>1</sup>, XU Xiu-juan<sup>1</sup>, HAO Jian<sup>1</sup>, WU Sheng<sup>1</sup>, LI Shu-wen<sup>1</sup>, QIAN Jun<sup>1</sup>, CHANG Yue-jin<sup>1</sup>, LIU Juan<sup>1</sup>, WANG Li-jun<sup>1</sup>, YAO Yuan<sup>2</sup>

(1. Cardiopulmonary Rehabilitation Medicine Centre, Hangzhou Sanatorium of Nanjing Military Region, Hangzhou 310007, Zhejiang, China; 2. Department of Emergency, the 117th Hospital of PLA, Hangzhou 310034, Zhejiang, China)

**[Abstract]** **Objective** To prepare the experimental animal models of acute lung injury (ALI) induced by high temperature gas inhalation in guinea pigs. **Methods** Twenty male guinea pigs were randomly divided into 2 groups, each group of 10 guinea pigs. The healthy guinea pigs were set as the control group, and the ALI guinea pigs were set as the experimental group. High temperature gas (150℃) was given to the guinea pigs of the experimental group for inhaling 5 minutes to induce the animal model of ALI. Then the two groups of guinea pigs were executed and lung specimens were taken from guinea pigs. Wet/dry weight ratio (W/D) of the right lungs was calculated. Up-left lungs of the two groups were stained with HE, and the pathological changes of lung tissues were observe by optical microscope in the two groups; The blood gas of the guinea pigs arterial blood was also analyzed and compared. **Results** The pathological structure of lung tissue of the experimental group showed obvious acute inflammatory changes. The lung W/D ratio of guinea pigs in the experimental group was significantly higher than that in the control group [ (5.72±0.31) vs (4.88±0.11),  $P<0.05$  ]. The pH and PaO<sub>2</sub> of guinea pigs in the experimental group were significantly lower than those in the control group [ (7.02±0.12) vs (7.38±0.04), (98.80±62.60) mmHg vs (177.30±24.70) mmHg,  $P<0.05$  ], while PaCO<sub>2</sub> was significantly higher than that in the control group [ (74.70±23.23) mmHg vs (31.10±8.77) mmHg,  $P<0.05$  ]. **Conclusion** The high temperature gas supplied to guinea pigs designed in this study can successfully establish ALI experimental animal model which meets the requirement of ALI and has high simulation performance, good repeatability, high stability. It provides a reliable animal model for the clinical and basic research of ALI induced by high temperature gas inhalation.

**基金项目:** 全军医药卫生科研基金 (10Z034)

**[Key words]** Experimental animal model; Acute lung injury; Guinea pig

**作者单位:** 1. 310007 杭州, 南京军区杭州疗养院心肺康复医学中心; 2. 310034 杭州, 解放军第 117 医院急诊科

**通信作者:** 郝建, E-mail: jianhaol05@163.com

**引用格式:** 徐晓峰, 许秀娟, 郝建, 等. 高温气体吸入致豚鼠急性肺损伤动物模型制备的实验研究 [J]. 东南国防医药, 2017, 19(5): 449-452.

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是各种肺内外致病因素导致的急性弥漫性炎症性肺损伤, 如进一步恶化, 则表现为急性呼吸窘迫综合征, 引起急性呼吸衰竭。以往研究 ALI 发生和发展的大部分信息是从尸检肺及肺组织活检中得到, 为进一步

了解肺损伤阶段性的实况及全景,ALI 动物模型的研究发挥了重要作用<sup>[1-2]</sup>。目前有机械通气、脂多糖注射、细菌感染、高氧、油酸、盐酸吸入等 ALI 的造模方法,然而大部分动物模型都有其局限性。现代战争常使用火焰喷射器或者各种燃烧物质作为武器,导致人体 ALI 非常常见。本研究制备高温气体吸入致豚鼠 ALI 动物模型模拟野战状态火器伤,以期为今后研究高温气体吸入致 ALI 的病理、病理生理、机制、治疗等提供可靠的动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物与主要材料 健康雄性豚鼠 20 只,体重(203±19)g,购于安徽医科大学附属省立医院动物实验中心,实验动物许可证号:SCXK(皖)2006-002]。动物实验前,在 20~29℃ 的室内(保持新鲜空气)适应性喂养 1~2 d,自由饮食饮水。高温气体实验平台由中国科技大学火灾科学国家重点实验室设计制作。动脉血气分析仪(GEM Premier 3000,凯隆国际实业有限公司生产)。

1.2 实验模型装置设计 与中国科技大学火灾科学国家重点实验室联合研制高温气体动物实验模型装置,见图 1、图 2、图 3。实验模型装置由三大部组成:第一部分为舱室结构装置,第二部分为进气口和出气口装置,第三部分为实验模型底部点火启动或关闭灭火的控制开关。该调控实验模型装置输入电压:220~380 V,输出电流:0~20 A,输出功率:0~5 kW,调节可变的温度数值在 0~200℃ 范围。

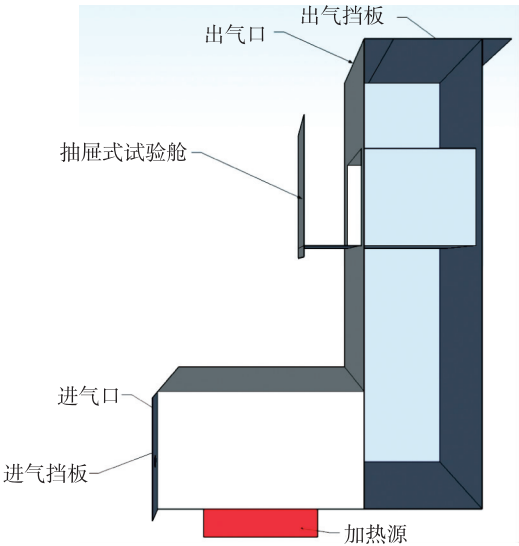


图 1 高温气体实验装置三维图

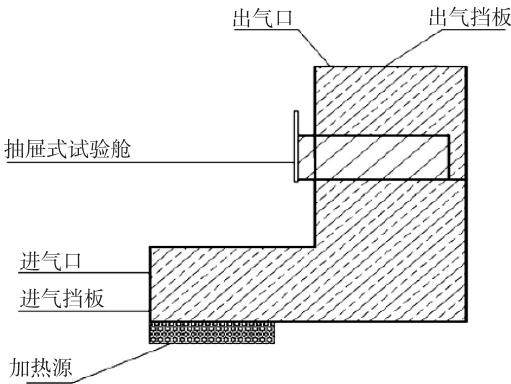


图 2 高温气体实验装置平面图

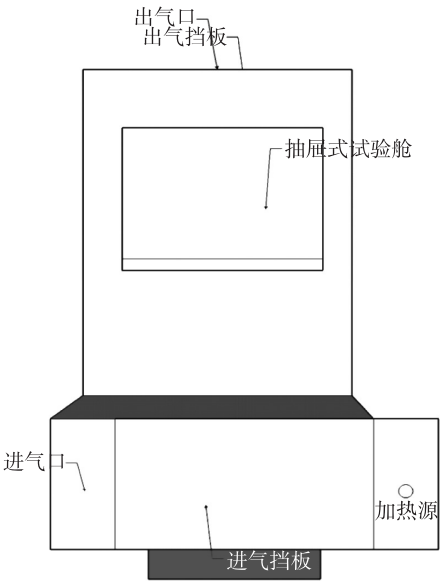


图 3 高温气体实验装置正面平面图

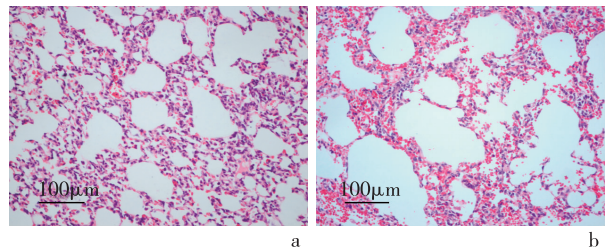
1.3 ALI 动物模型制作 将健康雄性豚鼠 20 只随机分为 2 组,其中 10 只健康豚鼠为对照组、10 只急性肺损伤豚鼠为实验组。将 2 组称重并记录,用 400 mg/kg 的 10%水合氯醛注射液注入实验豚鼠的腹腔中进行麻醉,麻醉完毕后,放置在实验装置内平台中,启动点火,调节实验模型装置内可变温度至 150℃ 高温气体供给豚鼠吸入,整个 ALI 的实验时间控制在 3 min,豚鼠 ALI 的实验结束时,迅速调节实验装置内气体高温至常温状态。

1.4 实验样品测定 造模成功后观察豚鼠 4 h,用 10%水合氯醛对 2 组豚鼠进行麻醉,打开胸腔,经腹主动脉抽取 4 mL 血液进行动脉血气分析。提取 2 组豚鼠的右肺组织,在标准滤纸上吸干表面液体后,称取湿重,放入鼓风恒温干燥箱 100℃ 干燥 48 h,待完全干燥后,称取干重,计算 W/D 比值。另取豚鼠左上肺组织,10%甲醛溶液固定、石蜡包埋、切片,HE 染色行病理组织学检查。

**1.5 统计学分析** 采用 SPSS11.5 统计软件进行数据分析,计量数据采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间作配对资料 *t* 检验分析,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

2 结果

**2.1 病理学检查结果** 对照组显示正常健康豚鼠的肺解剖组织,实验组可见肺泡壁断裂破坏显著、肺泡腔融合变大,肺间质增宽、结构损伤、破坏,肺毛细血管显明充血、水肿和大量的炎性细胞浸润。见图 4。



a: 对照组; b: 实验组

图 4 豚鼠肺组织光学显微镜下病理学变化

**2.2 W/D 和动脉血气分析结果** 实验组豚鼠肺 W/D 比值显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ),提示 ALI 豚鼠肺组织积聚大量的水分,其肺的体积重量明显增加。2 组豚鼠动脉血气分析比较,实验组豚鼠 pH、PaO<sub>2</sub> 显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ),而 PaCO<sub>2</sub> 显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ),提示高温对肺组织破坏比较严重,瞬间引起小气道的灼伤、肺泡广泛断裂、肺间质明显水肿,引起急性的严重气体交换功能障碍,导致豚鼠出现氧分压下降明显并伴有高碳酸血症。见表 1。

表 1 豚鼠肺湿/干重比和动脉血气分析比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	湿/干重比	pH	PaO <sub>2</sub> (mmHg)	PaCO <sub>2</sub> (mmHg)
对照组	10	4.88±0.11	7.38±0.04	177.30±24.70	31.10±8.77
实验组	10	5.72±0.31*	7.02±0.12*	98.80±62.60*	74.70±23.23*

与对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; 1 mmHg = 0.133 kPa

3 讨论

在现代战争中常使用火焰喷射器或者各种原因火灾燃烧物质,导致瞬间释放大量高温热能量,使周围环境空气温度迅速上升,当人体吸入高温热能的空气可造成气道损伤,导致 ALI。本实验着重模拟火焰喷射器或火灾引起的高温气体给予豚鼠吸入,使用实验设计的装置制作成 ALI 动物模型

进行实验研究。根据消防性能化设计指导原则<sup>[3]</sup>,人体对烟气层等火灾环境的辐射热的耐受极限为 2.5 kW/m<sup>2</sup>,即相当于上部烟气层的温度约为 180~200℃。当热辐射强度 < 2.5 kW/m<sup>2</sup>,人的耐受时间 > 5 min;当热辐射强度 > 2.5 kW/m<sup>2</sup>,人的耐受时间 < 30 s。另外,根据高温环境下人员极限忍耐时间和温度之间的关系(Crane 公式)表示为: $t_c(T) = 3.28 \times 10^8 / T^{3.61}$ ,其中  $T$  为环境的温度,单位为摄氏度; $t_c(T)$  的单位为 min,据此理论<sup>[3]</sup>,对本实验设计装置进行研究改良,设置高温气体调控温度在 150℃左右,时间设定 3 min,制作豚鼠 ALI 动物模型。经过本设计的设备装置实验研究显示,可达到 ALI 实验动物模型的要求,仿真性能高、重复性好、稳定性高。

评价一个动物模型是否合格主要取决于它是否能较好地模拟该疾病的发生、发展过程,包括组织病理学和生理学变化。ALI 的主要病理学特征表现为上皮细胞损伤、中性粒细胞等炎性细胞浸润和渗透性肺水肿的形成<sup>[4-5]</sup>。实验设备装置能否成功制作出 ALI 实验动物模型,取决于肺解剖病理学结构破坏程度<sup>[6-7]</sup>、肺水肿<sup>[8-9]</sup>和是否有呼吸衰竭情况<sup>[10-11]</sup>。本研究的实验装置模拟野战状态火器伤,直接对细胞组织产生损害及破坏作用,造成肺泡断裂破坏、肺毛细血管明显充血水肿,肺间质组织可见炎性细胞浸泡等,从图 4 病理学结果显示,实验组豚鼠肺解剖结构与对照组比较遭受明显破坏,病理学检查可见肺泡壁明显的断裂、破坏,肺泡融合变大,肺间质增宽、破坏、结构紊乱,肺毛细血管显明充血、水肿和大量炎性细胞浸润。由此证明,上述高温气体实验装置,启动开关点火,引发的高温气体致豚鼠吸入后,造成豚鼠发生 ALI,使得肺解剖结构遭受明显的严重而广泛破坏,与之前的文献报道一致<sup>[6,10,12-13]</sup>。从本研究实验组豚鼠肺 W/D 比值明显比对照组增加 ( $P < 0.05$ ),提示豚鼠伴有 ALI 后,肺组织间质渗出液显著积聚,引起肺体积增大、重量增加,证明实验组有明显的肺水肿,肺水肿引起肺体积重量显著增加,造成肺组织的顺应性明显下降,与刘娟等<sup>[14]</sup>的报道一致。ALI 早期引起过度换气,代偿中氧分压并不降低,且因肺组织广泛破坏而出现 PaCO<sub>2</sub> 升高。本研究 PaCO<sub>2</sub> 的检测是在造模 4 h 后抽取豚鼠动脉血进行血气分析,与对照组比较,实验组动脉血气分析 pH 值、动脉血 PaO<sub>2</sub> 均显著下降(均  $P < 0.05$ ),且 PaCO<sub>2</sub> 明显升高 ( $P < 0.05$ ),揭示本实验的火器高温瞬间对肺组织破坏比较严重,瞬间引起小气道灼伤、肺泡广泛断裂、肺间质



明显水肿,引起急性的严重气体交换功能障碍,导致豚鼠呈单纯性高碳酸血症合并重度呼吸性酸中毒,与之前的文献报道一致<sup>[14-17]</sup>。

综上所述,应用本项目研制的高温气体给豚鼠吸入,成功制作出实验动物 ALI 模型的结论有:①观察豚鼠的肺 W/D 比值明显增加,提示肺水肿。②测量豚鼠的动脉血气显示:pH 值下降伴 PaCO<sub>2</sub> 明显升高,提示单纯性高碳酸血症导致呼吸性酸中毒。③肺组织解剖结构损伤、破坏,病理学检查观察肺组织体积显著变大、肺泡断裂、融合气腔扩大、肺毛细胞血管显明充血水肿、大量的炎性细胞浸润以及肺间质增宽、结构损伤、破坏等变化情况。本研究的难点在模拟火焰喷射器或火灾引起的 ALI 动物模型的建立。在模拟火器伤的过程中,对于温度和爆破时间的要求都很高,因为一旦温度过高,时间过长,会造成受试豚鼠其他部位的烧伤;而若温度和时间不够,则不能完成模拟 ALI 的生理病理过程。本研究的高温气体实验装置,设计了计算机集成模块自动调控整个结构装置内的空间辐射增热源和可变输出功率,调控实验模型装置内的空气流动、温度的变化,可以调控高温气体温度、时间和高温气体流动,模拟火焰喷射器或火灾引起的高温气体给予豚鼠吸入,能很好地制作出 ALI 实验动物模型的效果,仿真性能高、重复性好、稳定性高,对战争及突发公共卫生事件中高温气体吸入体内致 ALI 的临床及基础研究提供了很好的保证。

#### 【参考文献】

- [1] 陈 娇,钱晓明,聂时南. 急性肺损伤动物模型的研究现状[J]. 医学研究生学报, 2013, 26(8): 851-854.
- [2] Fanelli V, Ranieri VM. Mechanisms and clinical consequences of acute lung injury[J]. Ann Am Thorac Soc, 2015, 12(Suppl 1): S3-S8.
- [3] 王 婷,梁华平,柴鉴深,等. 三种大鼠急性肺损伤模型的比较[J]. 成都医学院学报, 2016, 11(1): 5-9.
- [4] 霍 然,胡 源,李元洲. 建筑火灾安全工程导论[M]. 合肥:中国科学技术大学出版社, 1999: 78-79.
- [5] Mireles-Cabodevila E, Chatburn RL, Thurman TL, *et al.* Application of mid-frequency ventilation in an animal model of lung injury: a pilot study[J]. Respir Care, 2014, 59(11): 1619-1627.
- [6] Fang Y, Xu P, Gu C, *et al.* Ulinastatin improves pulmonary function in severe burn-induced acute lung injury by attenuating inflammatory response [J]. J Trauma, 2011, 71(5): 1297-1304.
- [7] 陈魁君,王建民. 细胞因子生物标志物在爆炸致急性肺损伤检测中的应用[J]. 中华诊断学电子杂志, 2016, 4(1): 19-22.
- [8] 潘 蔚,刘军生,刘润生,等. 急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征致肺水肿的病理生理研究进展[J]. 解放军预防医学杂志, 2016, 34(4): 576-579.
- [9] 孙红双,吕菁君,魏 捷. 急性肺损伤发病机制及治疗的未来研究趋势[J]. 医学研究杂志, 2016, 45(1): 181-183.
- [10] Zhang Y, Zhang B, Xu DQ, *et al.* Tanshinone II A attenuates seawater aspiration-induced lung injury by inhibiting macrophage migration inhibitory factor [J]. Biol Pharm Bull, 2011, 34(7): 1052-1057.
- [11] 李鲁欢,张友琴,郝 建,等. 丹参酮 IIA 磺酸钠治疗爆炸豚鼠急性肺损伤实验研究[J]. 临床肺科杂志, 2015, 20(11): 1991-1994.
- [12] 常月进,吴 升,郝 建,等. 不同剂量乌司他丁对高温气体致豚鼠急性肺损伤的影响[J]. 临床肺科杂志, 2011, 17(5): 781-783.
- [13] Han S, Mallampalli RK. The acute respiratory distress syndrome: from mechanism to translation[J]. J Immunol, 2015, 194(3): 855-860.
- [14] 刘 娟,吴 升,郝 建,等. 丹参酮 IIA 磺酸钠治疗火器伤致豚鼠急性肺损伤与细胞因子调节作用的研究[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2013, 7(6): 150-153.
- [15] 黄海嵘,张 雷,李德闽,等. 大鼠体外循环后肺损伤的实验研究[J]. 东南国防医药, 2014, 16(2): 113-116.
- [16] 黄文彬,申 捷,张 琳,等. 乌司他丁对鼠急性肺损伤的保护作用及相关因子的表达[J]. 中华急诊医学杂志, 2010, 19(1): 37-42.
- [17] Menezes LG, Uzuelli JA, Tefé-Silva C, *et al.* Acute lung injury induced by the intravenous administration of cigarette smoke extract[J]. J Bras Pneumol, 2013, 39(1): 39-47.

(收稿日期:2017-03-22; 修回日期:2017-07-05)

(本文编辑:叶华珍; 英文编辑:王建东)