

神经源性肺水肿大鼠模型的改进与评价

符 晖¹,王桥生^{1*},刘 雁²,周 斌²,彭忠田¹

(1. 南华大学附属第一医院重症医学科,湖南 衡阳 421001;2. 南华大学医学院)

摘 要: **目的** 评价改进后的小脑延髓池穿刺法制作神经源性肺水肿大鼠模型的使用价值。 **方法** 60 只清洁级 SD 大鼠随机均分为 4 组:正常对照组、假手术组、小脑延髓池穿刺直接注射组(直接注射组)、小脑延髓池穿刺延长留置时间组(延长留置时间组)。延长留置时间组造模成功率达 90%。直接注射组采用传统的小脑延髓池穿刺直接注射法造模;延长留置时间组即小脑延髓池穿刺成功后,在脑池内留置 1 mL 注射器针头 20 min 后注射纤维蛋白原(100 mg/mL)和凝血酶(200 U/mL)各 0.075 mL。通过观察各组大鼠肺大体形态学、病理改变及比较生存时间,评价两种制模方法的价值。正常对照组不予任何干预。 **结果** 正常对照组无肺水肿表现。同直接注射组相比,延长留置时间组大鼠肺体积明显增大,肺泡及肺间质渗出明显增多。延长留置时间组大鼠生存时间较直接注射组缩短,分别为 5.008 ± 2.612 h 和 7.482 ± 3.034 h ($t = 2.394, P = 0.024$)。 **结论** 小脑延髓池穿刺延长留置时间法复制的神经源性肺水肿症状典型,是研究神经源性肺水肿较为理想的动物模型。

关键词: 神经源性肺水肿; 小脑延髓池; 纤维蛋白原; 凝血酶

中图分类号:R563

文献标识码:A

Improvement of Neurogenic Pulmonary Edema Model Induced by Cerebellomedullary Cistern Puncture in Rats

FU Hui, WANG Qiaosheng, LIU Yan, et al

(Department of Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the worth of neurogenic pulmonary edema model induced by improved cerebellomedullary cistern puncture. **Methods** 60 SD rats were randomly divided into four groups: control group ($n = 15$); Sham operation group ($n = 15$); direct injection through cerebellomedullary cistern puncture group (abbreviated: direct injection group, $n = 15$); prolonging the indwelling time and injection through cerebellomedullary cistern puncture group (abbreviated: prolonging indwelling time group, $n = 15$). 90% of them is successful in the prolonging indwelling time group. Neurogenic pulmonary edema model was induced by classic cerebellomedullary cistern puncture in the direct injection group, however, that in the prolonging indwelling time group was induced by injecting 0.75 mL Fibrinogen (100 mg/mL) and 0.75 mL thrombin (200 U/mL) respectively after 20 min indwelling needle maintained in cerebellomedullary cistern. The experimental parameters including pulmonary morphology, pathology change and survival time in each group were evaluated. **Results** The pulmonary edema of rats did not be discovered in the control group, however, that in the direct injection group and prolonging indwelling time group were both discovered significantly. Compared with the rats in the direct injection group, the lung volume, exudation of the pulmonary alveoli and pulmonary interstitium increased significantly in the prolonging indwelling time group. Survival time of the rats in the prolonging indwelling time group was shorter than that of the direct injection group, they are (5.008 ± 2.612) h and (7.482 ± 3.034) h, respectively, ($t = 2.394, P = 0.024$). **Conclusion** It is perfect NPE model for research that the modified NPE model has typical NPE symptoms.

Key words: neurogenic pulmonary edema; cerebellomedullary cistern; fibrinogen; thrombin

神经源性肺水肿(Neurogenic Pulmonary Edema, NPE)是指无原发心、肺、肾疾病,而是由各种中枢神经系统疾病所致的引发急性肺水肿,故又称为中枢性肺水肿^[1]。症状表现为呼吸困难、呼吸窘迫、咳粉红色泡沫痰、咯血、呼吸循环衰竭等急性症状。该病发展迅速,死亡率高,但目前NPE的机制还不明确,复制理想的动物模型是研究该疾病的基础,也是制约实验研究的主要环节。目前,NPE造模的方法主要包括小脑延髓池穿刺直接注射法^[2-3]、肾上腺素腹腔注射法^[4]和脊髓损伤法^[5-6]等。其中,小脑延髓池穿刺注射法应用较广,其复制的模型更加符合临床NPE的病理生理特点。但是,小脑延髓池穿刺直接注射法造模引起NPE程度较轻,发展速度慢,症状不明显,不便于实验观察及研究。为复制理想的NPE模型,本文对小脑延髓穿刺法造模进行改进并对其进行了评价。

1 材料与方法

1.1 实验材料

纤维蛋白原(长沙鹏博生物科技有限公司);凝血酶(长沙鹏博生物科技有限公司);水合氯醛(长沙鹏博生物科技有限公司)。

1.2 实验动物及分组

清洁级雄性SD大鼠60只,月龄3~4月,200~250 g,购于湖南斯莱克景达动物有限公司;按照随机数字法分为4组:(1)正常对照组;(2)假手术组;(3)小脑延髓池穿刺直接注射组(直接注射组);(4)小脑延髓池穿刺延长留置时间组(延长留置时间组)。每组各为15只。

1.3 造模方法

实验大鼠术前12 h禁食但不禁水,10%水合氯醛300 mg/kg腹腔注射进行麻醉固定,麻醉后气管切开行气管插管,用1 mL注射器从枕骨粗隆下0.6~0.7 cm进针,进针深度1.0~1.5 cm,穿刺进入小脑延髓池^[7]。直接注射组采用传统的小脑延髓池穿刺直接注射法,穿刺针进入小脑延髓池后即刻在大鼠脑池内注射纤维蛋白原(100 mg/mL)和凝血酶(200 U/mL)各0.075 mL^[3]。延长留置时间组,采用改进的小脑延髓池穿刺延长留置时间法,即穿刺针进入小脑延髓池后在脑池内留置注射器针头20 min后注射纤维蛋白原(100 mg/mL)和凝血酶(200 U/mL)各0.075 mL。假手术组按实验方法进行麻醉固定、气

管切开并行气管插管,但不行小脑延髓池穿刺及注药。正常对照组不予手术及药物干预。

1.4 肉眼观察肺大体标本及病理学检查

造模6 h后随机选取5只大鼠进行解剖,肉眼观察肺脏大体标本颜色、肿胀情况、气管内水肿液及肺组织切面渗液情况。然后分别经肺门平面、肺门平面上1.0 cm及肺门平面以下1.0 cm取肺组织予10%的中性甲醛固定,常规石蜡切片,HE染色,光镜下观察肺门、肺尖及肺底病理改变。

1.5 观察大鼠生存时间

造模成功后,每组10只大鼠,记录各组大鼠生存时间。

1.6 统计学方法

所有数据使用SPSS18.0进行处理。两组间生存时间用均数+标准差表示,组间比较采用两独立样本 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

正常对照组大鼠呼吸平稳,节律齐,唇舌黏膜正常,未闻及湿罗音。而直接注射组造模30 min后均可见明显呼吸困难,出现呼吸困难,频率加快、肌肉无力,随着可见广泛肌颤、全身抽搐,最后因呼吸衰竭死亡;其中延长留置时间组大鼠进展较直接注射组症状更严重,严重时从鼻孔与口腔涌出血性泡沫样液体。两组造模成功率达90%。

2.2 各组大鼠肺大体标本形态学改变

正常对照组及假手术组:双肺正常、浅粉红色,表面光滑,未见淤血,切面未见溢出粉红色液体,分别见图1A、图1B。直接注射组:挤压双肺可见气管有泡沫样液体,大鼠肺体积稍增大,边缘稍钝,表面呈暗红色,气管分叉处可见淡红色水肿液。见图1C。延长留置时间组:气管内可见泡沫样液体,肺体积明显增大、肿胀,边缘钝,肺表面呈暗红色,多发点状或片状出血,肺切面有泡沫样血性液体溢出。见图1D。

2.3 各组肺组织光镜下改变

正常对照组及假手术组,经肺尖、肺门及肺底切片,可见肺间质、肺泡形态结构基本正常,未见明显肺泡、肺间质渗出及出血改变;而直接注射组,经肺尖、肺门及肺底切片均可见肺间质及肺泡腔内可见少量渗出物;延长留置时间组,经肺尖、肺门及肺底

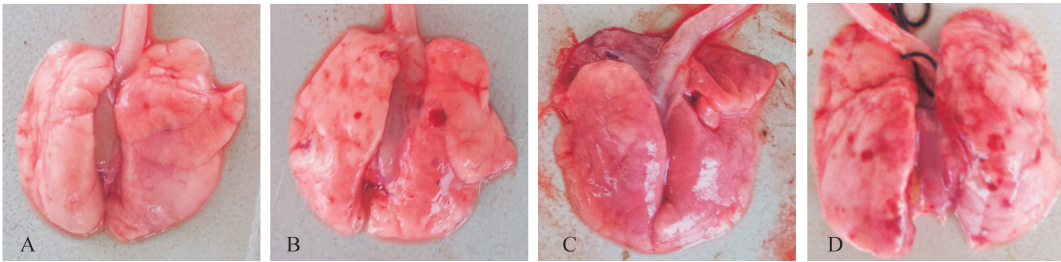


图1 各组肺大体标本形态学改变 A:正常对照组;B:假手术组;C:直接注射组;D:延长留置时间组

切片,可见肺间质渗出增加,肺泡腔内可见大量淡红色絮状渗出物及红细胞。见图2。

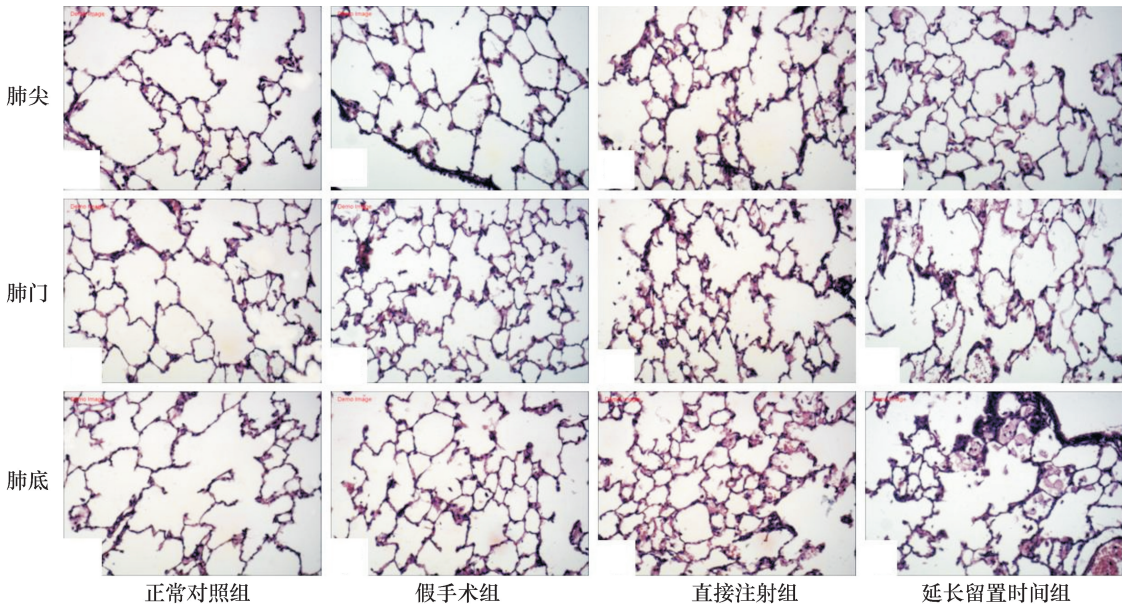


图2 各组肺组织光镜下病理变化(HE染色,200×)

2.4 大鼠生存时间比较

延长留置时间组大鼠生存时间较直接注射组稍有缩短,分别为 5.008 ± 2.612 h 和 7.482 ± 3.034 h ($t = 2.394, P = 0.024$)。相关标准肺水肿模型生存时间约数十分钟至数小时不等,这可能与肺水肿发展迅速导致动物死亡所致^[8-9]。本文中延长留置时间组大鼠较直接注射组大鼠死亡时间缩短,可能与神经中枢损害加重有关。对实验研究 NPE 相关药物干预或机制并不影响。

3 讨 论

NPE 是一个复杂的病理过程,是多种因素综合作用的结果,其发病机制还不明确。目前比较认可的机制是中枢神经系统损伤后,其中延髓是 NPE 发生的关键神经中枢,机体发生过度应激,交感神经过

度兴奋引起儿茶酚胺物质大量释放是导致 NPE 的重要原因。因此,理想的 NPE 模型应该吻合这一病理生理机制^[1,10-11]。虽然,国内外有一些学者提出不同的 NPE 造模方法,主要包括小脑延髓池穿刺注射法、肾上腺素腹腔注射法和脊髓损伤法等。薛敬礼等^[4]报道肾上腺素经腹腔注射可引起大鼠 NPE,诱发肺水肿成功率高,但剂量大小与模型成功与否有很大关系,大部分模型数十分钟内死亡。大鼠急性脊髓损伤可诱发 NPE,但损伤程度不易控制,大鼠很快死亡,死亡原因可能与脊髓损伤有直接关系,不能确定大鼠是否死于 NPE^[12]。上述模型不完全符合 NPE 发病机制,不便于实验观察及研究。蛛网膜下腔出血可并发 NPE^[13],但是蛛网膜下腔出血并 NPE 发病急、进展快、病情重,死亡率高,重复性差,亦不便于实验观察及研究。

小脑延髓池穿刺直射法通过分别注入纤维蛋白原及凝血酶,继发颅内高压,诱发 NPE^[2-3]。该模型符合 NPE 的发病机理。但是,小脑延髓池穿刺直接注射法造模后,亦存在 NPE 形成慢,症状不典型等缺陷。

本文经过小脑延髓池穿刺,通过延长留置穿刺针后再注药,成功复制了 NPE 模型。同小脑延髓池穿刺直接注射法造模法相比,延长留置时间法造模,大鼠肺水肿症状典型,肺组织大体形态及病理改变更显著,肺水肿发展程度更重,重复性好,成功率高。同直接注射组相比,虽然延长留置时间组大鼠生存时间缩短,分别为 7.482 ± 3.034 h 和 5.008 ± 2.612 h,具体机制无相关文献报道,这可能与留置时间组大鼠神经中枢损害加重,肺水肿发展更迅速,发展程度更重有关。但与文献报道的其他复制 NPE 模型方法相比,时间明显延长,可更好地进行实验观察和研究。

但是该造模方法也存在以下不足之处:(1)留置时间过长可导致颅脑损伤程度加重,可能诱发脑疝的形成;(2)延长留置时间的过程中可加重脑干损伤,导致呼吸、循环中枢的抑制,直接导致大鼠死亡。因此,要严格把握进针深度及时间。

小脑延髓池穿刺延长留置时间法复制的神经源性肺水肿症状典型,是研究神经源性肺水肿较为理想的动物模型。

参考文献:

- [1] Davison DL, Terek M, Chawla LS. Neurogenic pulmonary edema[J]. Crit Care, 2012, 16(2): 212.
- [2] Hashiba Y, Ishikawa N, Sumita T, et al. Capsaicin-sensitive nerves exert an inhibitory effect on the development of fibrin-induced pulmonary edema in rats[J]. Am Rev Respir Dis, 1989, 140(3): 652-658.
- [3] Hamdy O, Maekawa H, Shimada Y, et al. Role of central nervous system nitric oxide in the development of neurogenic pulmonary edema in rats[J]. Crit Care Med, 2001, 29(6): 1222-1228.
- [4] 薛敬礼, 史崇敏, 章金涛, 等. 不同方法诱发大鼠肺水肿动物模型的比较研究[J]. 河南医学研究, 2006, 15(2): 109-111.
- [5] Sedy J, Zicha J, Nedvidkova J, et al. The role of sympathetic nervous system in the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord-injured rats[J]. J Appl Physiol (1985), 2012, 112(1): 1-8.
- [6] Sedy J, Zicha J, Kunes J, et al. The role of nitric oxide in the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord-injured rats; the effect of preventive interventions[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2009, 297(4): R1111- R1117.
- [7] 富宏, 陶迎红, 王学美, 等. 经皮穿刺延髓池抽取兔和大鼠脑脊液的方法[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(11): 684-687.
- [8] Hamdy O, Maekawa H, Shimada Y, et al. Role of central nervous system nitric oxide in the development of neurogenic pulmonary edema in rats[J]. Crit Care Med, 2001, 29(6): 1222-1228.
- [9] Bosso FJ, Lang SA, Maron MB. Role of hemodynamics and vagus nerves in development of fibrin-induced pulmonary edema[J]. J Appl Physiol (1985). 1990, 69(6): 2227-2232.
- [10] 吕勇, 刘子美. 神经源性肺水肿的诊断与治疗进展[J]. 安徽医学, 2009, 30(3): 246-248.
- [11] Baumann A, Audibert G, McDonnell J, et al. Neurogenic pulmonary edema[J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2007, 51(4): 447-455.
- [12] 张劲博, 纪瑞华, 邹最, 等. 异氟烷对大鼠急性脊髓损伤后神经源性肺水肿的影响[J]. 中国矫形外科杂志, 2009, 17(8): 617-620.
- [13] Chen S, Zhu Z, Klebe D, et al. Role of P2X purinoceptor 7 in neurogenic pulmonary edema after subarachnoid hemorrhage in rats[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e89042.

(此文编辑: 蒋湘莲)