

技术方法

DOI: 10.11699/cyxh20130623

右主支气管内插管合并胸骨旁开窗术构建单肺通气致兔急性肺损伤动物模型

刘睿¹, 李艳华¹, 郭欣¹, 杨泳², 王殿华³

(1. 昆明医科大学附属昆华医院麻醉科, 昆明 650032; 2. 昆明医科大学医学机能实验中心, 昆明 650031;

3. 昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 昆明 650031)

【摘要】目的:运用右主支气管内插管合并胸骨旁开窗术构建单肺通气(one-lung ventilation, OLV)致兔急性肺损伤(acute lung injury, ALI)动物模型。**方法:**24 只健康日本大耳白兔随机分为以下 4 组($n=6$):假手术组(S 组);双肺通气(two-lung ventilation, TLV)组(T 组);TLV 加胸骨旁开窗术(parasternal fenestration, PF)组(TPF 组)和 OLV 组(O 组)。用支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中中性粒细胞(polymorphonuclear leukocyte, PMN)计数,肺组织髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)含量,肺湿/干(wet/dry, W/D)比值和肺组织形态学评分评价肺损伤严重程度。**结果:**与 S 组相比,O 组、T 组与 TPF 组动物 BALF 中 PMN 计数,肺组织 MPO 活性,肺 W/D 比值和肺组织形态学评分均明显增高($P<0.05$);TPF 组和 T 组动物间上述各项指标差异无统计学意义,但均低于 O 组($P<0.05$)。**结论:**右主支气管内插管合并双侧 PF 是一种用于构建 OLV 致兔 ALI 的可靠方法。

【关键词】单肺通气;急性肺损伤;动物模型**【中国图书分类法分类号】**R332**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-03-15

Establishment of one-lung ventilation induced acute lung injury rabbit model by combining right mainstem bronchial intubation with parasternal fenestration

LIU Rui¹, LI Yanhua¹, GUO Xin¹, YANG Yong², WANG Dianhua³

(1. Department of Anesthesiology, Affiliated Kunhua Hospital, Kunming Medical University; 2. Experimental Center of Medical Function, Kunming Medical University; 3. School of Pharmacy and Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University)

【Abstract】Objective: To build one-lung ventilation (OLV) induced acute lung injury (ALI) rabbit model by combining right mainstem bronchial intubation with parasternal fenestration. **Methods:** Totally 24 healthy Japanese white rabbits were randomized into 4 groups ($n=6$): sham operated group (S group), two-lung ventilation (TLV) group (T group), TLV with parasternal fenestration group (TPF group) and one-lung ventilation group (O group). Lung injury was judged by polymorphonuclear leukocyte (PMN) count in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), myeloperoxidase (MPO) content in pulmonary tissues, lung wet/dry (W/D) ratio and pulmonary histological score. **Results:** Compared with those in S group, all indicators mentioned above were increased significantly in O group, T group and TF group ($P<0.05$). No difference was observed between T group and TF group, but all indicators in the two groups were lower than those in O group ($P<0.05$). **Conclusions:** Combining right mainstem bronchial intubation with parasternal fenestration is a simple and reliable method to build rabbit model of OLV induced ALI.

【Key words】one-lung ventilation; acute lung injury; animal model

单肺通气(one-lung ventilation, OLV)是目前胸外科手术中广泛运用的术中通气维持技术,其在防止病侧肺的分泌物或血液流入对侧肺,避免交叉感染,为术者创造良好手术操作条件的同时可引起急

性肺损伤(acute lung injury, ALI)^[1-2]。因此,寻找抗 OLV 致 ALI 的药物及阐明其中机制是临床亟待解决和研究的重点之一。而建立科学合理的 OLV 致 ALI 动物模型是解决上述问题的基础。本研究旨在采用右主支气管内插管合并胸骨旁开窗术构建 OLV 致 ALI 动物模型,并对其进行评价。

作者介绍:刘睿,Email:812988467@qq.com,在读博士研究生,

研究方向:心胸外科麻醉。

通信作者:王殿华,Email:wangdianhuakm@126.com。

1 材料和方法

1.1 材料

多功能麻醉机(Aestiva/5 7900, Datex Ohmeda, 美国); 麻醉监护仪(S/5 Compact, 通用电器医疗集团芬兰公司); 多参数心电监护仪(M8003A, 飞利浦公司, 德国); 酶标仪(Model NO 550, BIO RAD, 日本); 显微照相系统(DM4000B, LEICA, 德国); 24 只健康日本大耳白兔, 体质量 2.2~2.5 kg, 雌雄不拘, 购自昆明医科大学实验动物中心。髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)检测试剂盒购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实验设计 实验动物随机分为 4 组($n=6$), 假手术组(S 组); 对实验兔施行假手术(颈正中切口暴露分离气管、左侧颈总动脉和右侧颈外静脉); 双肺通气(two-lung ventilation, TLV)组(T 组); 对实验动物施行 3 h 的 TLV[呼吸参数设置: 吸入氧浓度(fraction of inspiration O_2 , FiO_2)=1.0; 潮气量(tidal volume, VT)=20 ml/kg; 呼吸频率(respiration rate, RR)=30 次/min, 吸/呼比(inspiratory/expiratory, I/E)=1/2]; TLV 加胸骨旁开窗术(parasternal fenestration, PF)组(TPF 组): 于双侧 2、3 肋间和 5、6 肋间, 胸骨旁开 1~1.5 cm 处各开一大约 0.5 cm² 的小窗后再施行如上 3 h 的 TLV; OLV 组(O 组): 双侧胸骨旁开窗后调整气管导管至右主支气管施行 2 h 的 OLV, 再将气管导管退至气管施行 1 h 的 TLV。OLV 及 TLV 过程中呼吸参数设置不变。

1.2.2 术中监测及麻醉 左颈总动脉置入 22 G 动脉穿刺导管, 持续监测动脉血压, 维持平均动脉压波动在基础值 $\pm 20\%$ 范围。右颈外静脉置入 24 G 静脉穿刺导管, 恒速输注林格氏液[10 ml/(kg·h)]。于第 2、3 气管环处剪开气管, 置入带套囊内径为 2.0 mm 的气管导管, 持续监测呼末 CO_2 , 维持呼末 CO_2 在 35~45 mmHg 范围。各组实验动物假手术期间以戊巴比妥钠[30 mg/(kg·iv)]维持麻醉。机械通气各组动物给予芬太尼[2 μ g/(kg·iv)]和维库溴铵[0.1 mg/(kg·iv)], 待呼吸停止后接麻醉机行机械通气。机械通气期间恒速静脉注入瑞芬太尼[1 μ g/(kg·min)], 每 30 min 静脉追加维库溴铵 0.1 mg/kg。

1.2.3 支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中中性粒细胞(polymorphonuclear leukocyte, PMN)计数 于右上肺叶支气管内注入冷生理盐水 10 ml, 反复冲洗 3 次(回收率>40%)。回收液于 4 $^{\circ}C$ 、500 r/min 离心 10 min, 沉渣用全自动血细胞分析仪进行 PMN 计数。

1.2.4 肺组织 MPO 活性的测定 运用 ELISA 试剂盒检测右肺中间两叶 MPO 活性, 具体方法按试剂盒说明书进行。

1.2.5 肺 W/D 比值测定 靠右肺下叶内 1/2 外侧缘处切取重约 2~3 g 肺组织, 记录湿重(wet, W)之后将标本置于干燥箱内(80 $^{\circ}C$, 72 h), 充分干燥至恒重后再次称重(dry, D), 计算 W/D 比值。

1.2.6 肺组织学评分 靠右肺下叶外 1/2 内侧处切取肺组织, 行 HE 染色。切片由一不知情的病理学专业技术人员参照 Webb 和 Tierney^[3]的方法在光学显微镜下对肺组织进行形态学评分。具体为间质水肿、肺泡水肿、中性粒细胞浸润和肺泡内充血, 分别依其严重程度评 0~4 分(0 分, 无病变或非常

轻微; 1 分, 轻度病变; 2 分, 中度病变; 3 分, 重度病变; 4 分, 极重度病变), 计算 4 项指标的总分为肺损伤评分。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。所有数据为计量资料, 以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间的比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD- t 法, 以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织 MPO 含量和支气管肺泡灌洗液中 PMN 计数

与 S 组相比, T 组、TPF 组和 O 组动物肺组织 MPO 含量和 BALF 中 PMN 计数明显增高($P < 0.05$); T 组和 TPF 组间上述指标相比差异无统计学意义, 但均明显低于 O 组($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 各组肺组织 MPO 含量和 BALF 中 PMN 计数

Tab.1 MPO content and PMN count in BALF of pulmonary tissues in different groups

组别	例数(n)	MPO (U/mg)	PMN 计数($\times 10^7$ 个/L)
S 组	6	1.05 $\pm$ 0.09	0.79 $\pm$ 0.07
T 组	6	1.51 $\pm$ 0.11	1.26 $\pm$ 0.10
TPF 组	6	1.46 $\pm$ 0.10	1.27 $\pm$ 0.11
O 组	6	2.14 $\pm$ 0.12	2.17 $\pm$ 0.34
F 值		105.138	55.166
P 值		0.000	0.000

注: MPO (S 组 vs. T 组, $P=0.000$; S 组 vs. TPF 组, $P=0.000$; S 组 vs. O 组, $P=0.000$; T 组 vs. TPF 组, $P=0.371$; T 组 vs. O 组, $P=0.000$; TPF 组 vs. O 组, $P=0.000$); PMN 计数 (S 组 vs. T 组, $P=0.000$; S 组 vs. TPF 组, $P=0.000$; S 组 vs. O 组, $P=0.000$; T 组 vs. TPF 组, $P=0.94$; T 组 vs. O 组, $P=0.000$; TPF 组 vs. O 组, $P=0.000$)

2.2 肺湿/干(W/D)比值和肺组织形态学评分

与 S 组相比, O 组、T 组和 TPF 组动物肺 W/D 比值和肺组织形态学评分均明显增高($P < 0.05$); T 组和 TPF 组间上述指标差异无统计学意义, 但均明显低于 O 组($P < 0.05$) (表 2)。

表 2 各组肺 W/D 比值和肺组织形态学评分

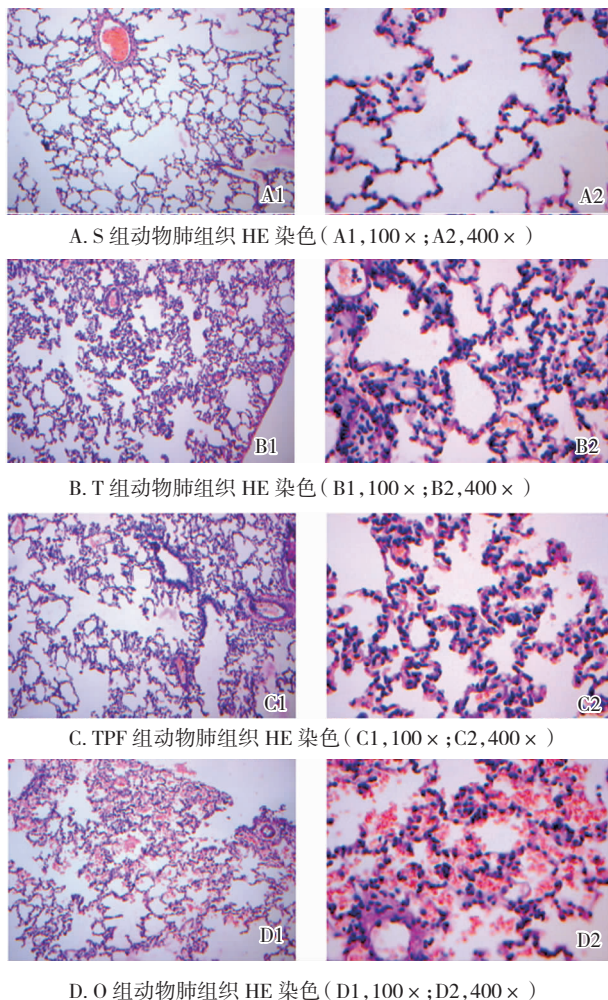
Tab.2 W/D ratio and morphological score of pulmonary tissues in different groups

组别	例数(n)	肺 W/D 比值	形态学评分
S 组	6	3.62 $\pm$ 0.17	0.83 $\pm$ 0.52
T 组	6	3.93 $\pm$ 0.08	5.57 $\pm$ 0.61
TPF 组	6	4.00 $\pm$ 0.14	5.83 $\pm$ 0.52
O 组	6	4.99 $\pm$ 0.08	9.83 $\pm$ 0.68
F 值		143.971	46.935
P 值		0.000	0.000

注: 肺 W/D 比值 (S 组 vs. T 组, $P=0.000$; S 组 vs. TPF 组, $P=0.000$; S 组 vs. O 组, $P=0.000$; T 组 vs. TPF 组, $P=0.332$; T 组 vs. O 组, $P=0.000$; TPF 组 vs. O 组, $P=0.000$); 形态学评分 (S 组 vs. T 组, $P=0.000$; S 组 vs. TPF 组, $P=0.000$; S 组 vs. O 组, $P=0.000$; T 组 vs. TPF 组, $P=0.243$; T 组 vs. O 组, $P=0.000$; TPF 组 vs. O 组, $P=0.000$)

2.3 各组兔肺组织 HE 染色光镜观察图

具体内容详见图 1。



D. O 组动物肺组织 HE 染色 (D1, 100 × ; D2, 400 ×)

S 组:除部分区域见毛细血管扩张充血等轻微炎症反应外,无明显病理改变;T 组和 TPF 组:可见散在充血、出血灶,肺泡腔少量红细胞和炎细胞浸润,肺泡壁明显增厚;O 组:肺组织大面积充血、出血,肺泡腔内有较多红细胞和炎细胞浸润,肺泡壁崩解、充血、增厚和渗出

图 1 各组兔肺组织 HE 染色光镜观察图

Fig.1 Light microscope figure of rabbit pulmonary tissues in different groups with HE staining

3 讨论

自 1984 年 Zeldin 等^[4]报道了 10 例一侧全肺切除术后出现肺部并发症以来,现已证实 OLV 可导致 ALI^[1-2]。而 ALI 的病理学基础是肺泡上皮细胞-毛细血管内皮细胞受损,通透性增加和肺炎症反应。肺组织形态学的改变可直观的反映出组织损伤的严重程度。肺 W/D 比值是用于反映肺水肿程度的常用指标。PMN 做为急性炎症细胞,其在肺内的大量聚集可导致肺毛细血管通透性增加、微血栓的形成和

肺泡上皮广泛受损,是引起 ALI 的重要效应细胞。由于 MPO 是 PMN 内嗜天青颗粒释放的氧化物酶类,每个 PMN 内所含 MPO 的量是恒定的,约占 PMN 干重的 5%,因此 MPO 含量的多寡可反映 PMN 活性的大小。

本研究发现,双肺机械通气后实验动物 BALF 中 PMN 计数、肺组织 MPO 含量、肺 W/D 比值和肺组织形态学评分均明显增高,同时光镜下可见肺组织充血、出血,肺泡腔内红细胞和炎细胞浸润,肺泡壁增厚等病理学改变。OLV 动物上述所测指标进一步增高,肺损伤程度加重。这些研究结果提示:①机械通气可引起以内皮细胞和上皮细胞通透性增加和肺炎症反应为特征的肺损伤;②OLV 可进一步加重此种损伤。这些发现与他人研究结果相符^[5-6]。

此外,就 OLV 动物模型来说,最重要的莫过于确保 OLV 的可靠性,其次便是能真正模拟临床 OLV 过程。但要真正模拟临床 OLV 过程,一般均选用大型动物来进行^[7-8]。可是,因其费用昂贵,所需设备复杂,围手术期管理困难而无法广泛开展。故目前多采用体型较小的动物来模拟类似于临床的 OLV,其模型主要有以下几种:①离体肺模型^[9];②左主支气管阻断法^[10];③气管导管过深插入法^[11];④自制双腔管插管法^[11]。

其中,离体肺模型虽可确保 OLV 的可靠性,但实验技术要求较高,设备较为复杂,且与真实的临床 OLV 过程相比有很大差距。对于左主支气管阻断法模型,同样也能保证 OLV 的可靠性,但有研究认为左主支气管阻断后,左肺形成一个密闭腔,因其内气体吸收耗时较长,肺组织并没有象临床上一样与大气相通而迅速萎陷,而肺萎陷的快慢与其随后的肺损伤有关联^[10]。但此种缺陷完全可以通过待左肺完全萎陷后再施行左主支气管阻断来解决,其真正难点在于对非胸外科专业的研究者来说,在操作暴露左主支气管的技术上有一定的难度,且手术操作损伤重,实验耗时长,不利于广泛开展。而采用单纯的过深气管内插管法,由于无法准确判断气管导管的位置,所以无法保证实验动物,尤其是使体型较小动物真正处于 OLV 状态,这最终将会影响到实验结果的可靠性。有作者比较了自制双腔气管导管(该研究所用自制双腔气管导管插管法类似于临床实际工作中插入左双腔气管导管而实施右侧 OLV)、左主支气管阻断法和气管导管过深插入法这 3 种不同的 OLV 动物模型,结果发现自制双腔气管内导

管插管实施 OLV 较后两者相比其总成功率更高,分别为 100%、60%和 80%^[11]。但对实验兔施行该自制双腔管插管我们认为有如下缺陷:首先,由于右主支气管与气管几乎在一条直线上,在进行气管内插管时若插入过深,则气管导管进入的几乎都是右主支气管。其次,临床实际工作中在进行左双腔气管内导管插管时经常会出现导管误入右主支气管内的情况。Mangar 等^[12]的研究发现,运用未做塑型正常单腔气管导管行左主支气管内插管时,所有的气管导管均插入了 20 例患者的右主支气管,而将单腔气管导管尖端塑型并在导管插入同时做逆时针 90°旋转后,其成功率也未达到 100%。第三,即使将左双腔管插入了左主支气管也无法 100%保证其位置的准确性,而常需在纤维支气管镜的直视下进行判定。第四,该研究中所用自制双腔导管由两根外径为 2 mm 的塑料管道紧密连在一起,左侧管腔塑形略外翘^[11]。由于作者没有描述此外翘幅度大小,所以我们且做如下猜测:①外翘幅度过小,此条件下若要将气管导管在盲探下置入左主支气管的一次成功率保持在 80%^[11]左右似乎并不现实;②外翘幅度过大,超过 1.2 mm(此时其总外径超过了该研究中所测实验动物气管内径 5.2 mm^[11]的均数值),若所用塑料导管过硬则极易损伤气管和支气管。相反,若韧性不够,则又增大了左侧导管置入右主支气管的可能性。因此,就自制兔双腔气管导管而言,其外翘幅度及韧性究竟多少合适还需要更进一步的研究。第五,正如人体间存在个体差异,所以临床实践中对患者施行双腔气管导管气管内插管时,并非采用固定型号的气管导管。同样,实验兔必然也存在个体差异。而该研究对所有实验兔均采用同一管径自制双腔气管导管插管^[11],值得商榷。最后,盲探插入左双腔气管导管而实施右肺 OLV 在临床实际工作中若要达到 100%的成功率是并不现实的。由此可见,若一种方法不能保证 OLV 100%的可靠性,这势必会影响其实验结果的科学性。据此,若要确保实验动物处于真正的 OLV 状态,必需通过直视的手段来进行准确判断。而采用双侧 PF 后,即可以在直视下判断整个实验过程中 OLV 的可靠性。虽然此方法与临床 OLV 时通气侧胸腔并未与大气相通有一定的区别,但双侧胸骨旁开窗 TLV 实验动物 BALF 中 PMN 计数、肺组织 MPO 含量、肺 W/D 比值及肺组织形态学评分与未开窗实施 TLV 的实验动物相比并无显

著性差异。这一结果提示,双侧 PF 并不引起实验动物肺组织损伤。

综上所述,右主支气管内插管合并双侧 PF 是一种用于构建 OLV 致兔 ALI 可靠且简便的方法,具有一定的推广价值。

参 考 文 献

- [1] Della Rocca G, Coccia C. Acute lung injury in thoracic surgery[J]. *Curr Opin Anaesthesiol*, 2013, 26(1): 40–46.
- [2] You Z, Feng D, Xu H, et al. Nuclear factor- κ B mediates one-lung ventilation-induced acute lung injury in rabbits[J]. *J Invest Surg*, 2012, 25(2): 78–85.
- [3] Webb H H, Tierney D F. Experimental pulmonary edema due to intermittent positive pressure ventilation with high inflation pressures. Protection by positive end-expiratory pressure[J]. *Am Rev Respir Dis*, 1974, 110(5): 556–565.
- [4] Zeldin R A, Normadin D, Landtwin B S, et al. Postpneumectomy pulmonary edema[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1984, 87(3): 359–365.
- [5] Kuipers M T, van der Poll T, Schultz M J, et al. Bench-to-bedside review: Damage-associated molecular patterns in the onset of ventilator-induced lung injury[J]. *Crit Care*, 2011, 15(6): 235.
- [6] Kozian A, Schilling T, Röcken C, et al. Increased alveolar damage after mechanical ventilation in a porcine model of thoracic surgery[J]. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2010, 24(4): 617–623.
- [7] Riquelme M, Monnet E, Kudnig S T, et al. Cardiopulmonary changes induced during one-lung ventilation in anesthetized dogs with a closed thoracic cavity[J]. *Am J Vet Res*, 2005, 66(6): 973–977.
- [8] Michelet P, Roch A, Brousse D, et al. Effects of PEEP on oxygenation and respiratory mechanics during one-lung ventilation[J]. *Br J Anaesth*, 2005, 95(2): 267–273.
- [9] Funakoshi T, Ishibe Y, Okazaki N, et al. Effect of re-expansion after short-period lung collapse on pulmonary capillary permeability and pro-inflammatory cytokine gene expression in isolated rabbit lungs[J]. *Br J Anaesth*, 2004, 92(4): 558–563.
- [10] Santos R S, Gan J, Ohara C J, et al. Microwave ablation of lung tissue; impact of single-lung ventilation on ablation size[J]. *Ann Thorac Surg*, 2010, 90(4): 1116–1119.
- [11] 游志坚, 姚尚龙, 李进. 三种兔单肺通气模型的比较[J]. *中国实验动物学报*, 2007, 15(4): 245–248.
- [12] You Z J, Yao S L, Li J. Comparison of three types of one-lung ventilation models in rabbits[J]. *Acta Laboratorium Animals Scientia Sinica*, 2007, 15(4): 245–248.
- [12] Mangar D, Kirchhoff G T, Derasari M, et al. Left bronchial intubation by a single-lumen tube in adults: effects of bevel and curvature[J]. *South Med J*, 1994, 87(11): 1129–1131.

(责任编辑: 关蕴良)