

· 基础研究 ·

高压氧对脂多糖内毒素致急性肺损伤大鼠的抗炎作用

彭小刚 王洪敏 刘建英 姚向阳 姚向阳

【摘要】 目的 探讨高压氧(HBO)对脂多糖内毒素致急性肺损伤大鼠的抗炎作用及治疗效果。**方法** 选择 46 只 Sprague-Dawley 大鼠,雌雄各半,分为空白组 10 只、模型组 12 只、HBO 治疗组 24 只。模型组和 HBO 治疗组采用尾静脉注射内毒素(5 mg/kg 体重)制作大鼠急性肺损伤模型;HBO 治疗组大鼠造模后给予 HBO 治疗,压力 0.2 MPa(2.0 ATA),进舱后洗舱 5 min,升压 5 min,稳压吸氧 40 min,减压 10 min 出舱;空白组注射同等剂量生理盐水。各组分别于处理后第 3 小时和第 6 小时进行白细胞计数、动脉血气分析、白细胞介素 8(IL-8)水平检测及计算肺湿重/干重比等,并在光镜下观察肺组织病理变化。**结果** HBO 治疗组与模型组比较,血氧分压提高,肺湿重/干重比、白细胞及中性粒细胞数、IL-8 水平均下降,病理组织切片可见炎性细胞浸润较少。**结论** HBO 治疗急性肺损伤,不仅可以改善组织缺氧,还可产生一定的抗炎作用,从而对急性肺损伤发挥疗效。

【关键词】 急性肺损伤; 脂多糖内毒素; 高压氧; 白细胞介素 8; 抗炎作用

The anti-inflammatory effect of hyperbaric oxygen therapy on acute lung injury induced by lipopolysaccharide endotoxin PENG Xiao-gang*, WANG Hong-min, LIU Jian-ying, YAO Xiang-yang. * Department of Pulmonary, Xiamen 1st Hospital, Xiamen 361000, China

Corresponding author: LIU Jian-ying, Email: lji2317@126.com

【Abstract】 Objective To investigate any anti-inflammatory and curative effect of hyperbaric oxygen (HBO) therapy on mice with acute lung injury (ALI) induced by lipopolysaccharide endotoxin. **Methods** Forty-six Sprague-Dawley rats, half male and half female, were randomly divided into a normal saline group with 10 rats, an LPS group with 12 rats, and an HBO group with 24 rats. LPS was injected via the tail vein at 5 mg/kg weight to establish the ALI model. The HBO group rats were treated with HBO. Then leucocyte counts, arterial blood gas analysis, interleukin-8 (IL-8) in the blood and lung wet/dry weight (W/D) were compared among the 3 groups at the 3rd and 6th hours. Pathological changes were examined under a light microscope. **Results** Compared with the LPS group, blood oxygen and W/D were higher in the HBO group, the white blood cell, neutrophil and IL-8 all were lower, and inflammatory cell infiltration was less in lung slides from the HBO group. **Conclusions** HBO therapy can improve oxygen deficiency and has an anti-inflammatory effect. As a result it might have protective effect against ALI.

【Key words】 Acute lung injury; Lipopolysaccharide endotoxin; Hyperbaric oxygen; Interleukin-8; Anti-inflammatory effects

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)和急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome)是机体在经历严重感染、创伤等后全身炎症反应综合征的肺部表现,其主要病理生理特征是肺实质的急性炎症反应。尽管目前治疗 ALI 的方法很多,但其临床死亡率仍非常高。近年来,应用高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)治疗缺血缺氧性疾病取得了较好的疗效^[1]。细胞因子作为信号分子在启动、放大和维持局部和全身炎症

反应中起关键作用,本实验通过对内毒素致 ALI 大鼠进行 HBO 治疗,观察白细胞与中性粒细胞数、动脉血气指标、白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)水平及肺湿重/干重比等的变化,探讨 HBO 在 ALI 中的抗炎作用及治疗效果。

材料和方法

一、实验动物和分组

选取 SPF 级 Sprague-Dawley 大鼠 46 只,雌、雄各半,体重 200 ~ 260 克,由第四军医大学动物实验中心提供。将大鼠分为 4 组:空白组 10 只、模型组 12 只、HBO 治疗组 24 只。购进后适应性饲养 7 d。

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2011.02.004

作者单位:361000 厦门,厦门市第一医院肺科(彭小刚、王洪敏、姚向阳);遵义医学院第三附属医院呼吸科(刘建英)

通信作者:刘建英,Email:lji2317@126.com

二、主要药物和试剂

脂多糖内毒素 (lipopolysaccharide, 血清型 O55:B5, 编号: L2880) 由美国 Sigma 公司提供; 大鼠 IL-8 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自上海船夫生物科技有限公司。

三、大鼠 ALI 模型制备

根据文献[2]的介绍, 给予模型组、HBO 治疗组大鼠尾静脉注射 5 mg/kg 体重内毒素 (浓度为 1 mg/ml), 建立 ALI 模型, 空白组大鼠注射 5 mg/kg 体重生理盐水。

四、HBO 治疗方法

HBO 组造模后立即送入高压氧舱, 压力 0.2 MPa (2.0 ATA), 每次进舱后纯氧洗舱 5 min, 升压 5 min, 持续稳压吸氧 40 min, 减压 10 min 后出舱, 舱内氧浓度保持在 95% 以上。

五、观察时间点及标本采集

各组分别于造模后第 3 小时和第 6 小时观察并取材, 大鼠颈动脉插管取血后打开胸腔, 取肺组织。

六、血气分析和白细胞计数

各组大鼠均于麻醉后分离颈总动脉, 肝素化后插管, 分别于相应时间点取血送检。采用美国 Nova Biomedical 公司产 Stat Profile pHox 血气分析仪进行动脉血气分析, 同时计数白细胞。

七、血浆 IL-8 测定

各组于相应时间点取血后用 ELISA 试剂盒测定血浆 IL-8 水平, 方法严格按照操作说明进行。

八、肺湿重/干重比的计算

开胸取右肺上叶, 用滤纸吸去肺表面水分和血液, 称肺湿重; 然后置于电恒温箱中在 80℃ 下烘烤 48 h 至重量恒定后称干重, 计算肺湿重/干重比。

九、肺组织形态学观察

各组抽血完毕后处死, 取肺组织, 用 10% 甲醛固定, 石蜡包埋, 切片, HE 染色, 光镜下观察。

十、统计学处理

数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 使用 SPSS 15.0 版统计分析软件进行分析, 多组样本的均数比较采用配对 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

一、一般情况

尾静脉注射内毒素后, 大鼠即出现活动减少、厌食, 约 1 h 后出现呼吸加快、窘迫、嗜睡。HBO 治疗组大鼠经治疗后, 精神明显好转, 活动量增加, 呼吸频率趋于稳定, 无呼吸窘迫。

二、血气分析结果

与空白组比较, 模型组动脉血氧分压 (PO_2) 在各观察时间点均明显下降 ($P < 0.05$), 且随观察时间延长呈下降的趋势; HBO 治疗组各观察时间点血氧分压与空白组比较, 均明显下降 ($P < 0.05$), 但较模型组高, 两组第 6 小时血氧分压比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。模型组及 HBO 治疗组各观察时间点 pH 值较空白组都有不同程度的下降 ($P < 0.05$), 模型组第 6 小时下降最显著, 与 HBO 治疗组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

三、白细胞计数和 IL-8 水平

与空白组比较, 模型组与治疗组各观察时间点白细胞总数、中性粒细胞数均明显增高 ($P < 0.05$); 模型组与 HBO 治疗组白细胞总数比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); HBO 治疗组中性粒细胞数较模型组明显减少 ($P < 0.05$)。模型组与 HBO 治疗组各观察时间点 IL-8 水平均明显高于空白组 ($P < 0.05$); 与模型组比较, HBO 治疗组 IL-8 水平明显降低 ($P < 0.05$)。见表 1。

四、肺湿/干重比值

与空白组比较, 模型组 and HBO 治疗组肺湿重/干重比值均显著增高; 模型组第 6 小时肺湿重/干重比值明显高于 HBO 治疗组 ($P < 0.05$)。见表 1。

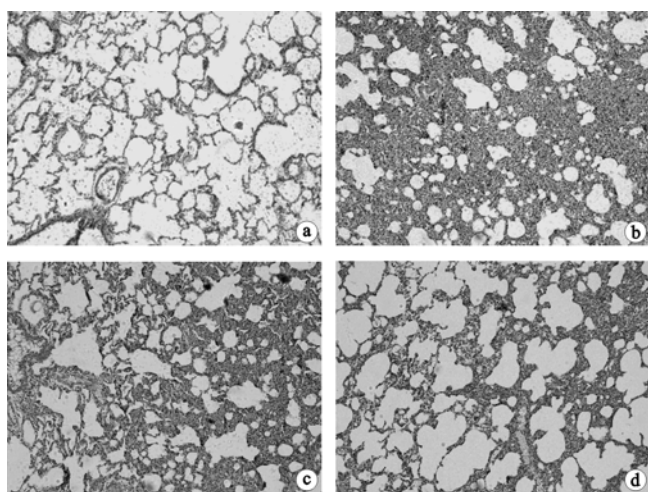
表 1 各组动脉血气分析结果、白细胞计数、IL-8 水平及肺湿/干重比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	血气分析		白细胞计数 ($\times 10^9$)		IL-8 水平 (pg/ml)	肺的湿/ 干重比
		血氧分压 (mmHg)	pH 值	白细胞总数	中性粒细胞		
空白组	10						
第 3 小时		98.5 $\pm$ 1.8	7.31 $\pm$ 0.04	11.2 $\pm$ 3.2	1.75 $\pm$ 0.62	114.6 $\pm$ 23.0	4.211 $\pm$ 0.315
第 6 小时		97.3 $\pm$ 1.6	7.29 $\pm$ 0.05	11.2 $\pm$ 3.2	1.75 $\pm$ 0.62	114.6 $\pm$ 23.0	4.211 $\pm$ 0.315
模型组	12						
第 3 小时		74.9 $\pm$ 6.2 ^a	7.17 $\pm$ 0.07 ^a	12.9 $\pm$ 3.3 ^a	7.06 $\pm$ 2.19 ^a	191.1 $\pm$ 38.0 ^a	—
第 6 小时		62.1 $\pm$ 9.7 ^a	7.05 $\pm$ 0.08 ^a	13.1 $\pm$ 3.6 ^a	7.00 $\pm$ 2.98 ^a	237.4 $\pm$ 47.1 ^a	5.408 $\pm$ 0.630 ^a
HBO 治疗组	24						
第 3 小时		79.8 $\pm$ 5.6 ^a	7.16 $\pm$ 0.09 ^a	13.0 $\pm$ 3.8 ^a	6.00 $\pm$ 2.03 ^{ab}	177.9 $\pm$ 32.2 ^{ab}	4.921 $\pm$ 0.491 ^a
第 6 小时		86.8 $\pm$ 7.4 ^{ab}	7.17 $\pm$ 0.09 ^{ab}	12.8 $\pm$ 3.3 ^a	5.49 $\pm$ 2.45 ^{ab}	158.3 $\pm$ 30.0 ^{ab}	4.821 $\pm$ 0.422 ^{ab}

注: 与空白组相应时间点比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组相应时间点比较, ^b $P < 0.05$

五、各组大鼠肺大体及光镜下观

空白组大鼠肺呈均匀淡粉红色,包膜光滑,弹性好,表面未见病损灶,切面均质,无肺液溢出,肺组织结构完整,肺泡腔清晰;光镜下可见肺泡隔无水肿、炎症等特殊改变。模型组大鼠肺充血、水肿明显,体积增大,弹性差;光镜下可见肺泡隔增宽,大量炎性细胞浸润。HBO 治疗组大鼠造模后第 3 小时肺组织见充血、水肿,体积与模型组比较变化不大;光镜下可见炎性细胞浸润较模型组减少。HBO 治疗组大鼠造模后第 6 小时肺充血、水肿有所减轻;光镜下可见炎性细胞浸润明显减少。见图 1。



注:a 为空白组肺组织;b 为模型组造模后第 6 小时;c 为 HBO 治疗组造模后第 3 小时;d 为 HBO 治疗组造模后第 6 小时

图 1 各组肺组织光镜下观(HE 染色, $\times 40$)

讨 论

在 ALI 复杂的发病机制中,感染是其主要发病因素之一。革兰阴性杆菌感染在感染性疾病中占有重要地位,而内毒素为其主要致病物质。本实验采用 Sprague-Dawley 大鼠予以尾静脉注射内毒素建立 ALI 模型^[3],通过对其病理改变及血气分析等多项指标进行观测,符合 ALI 表现,造模成功。

本研究结果显示,与模型组比较,HBO 治疗组肺湿重/干重比、中性粒细胞计数及 IL-8 水平等指标有明显改变,表明病情有所好转;同时病理切片观察可见,HBO 治疗组炎症细胞浸润较模型组明显减轻,说明 HBO 治疗有效,与文献报道结果相同^[4]。本研究还显示,模型建立成功后给予 HBO 治疗 1 h,然后采血进行血气分析,动脉血氧分压得以提高,表明 HBO 治疗可以改善低氧血症。

有研究报道,HBO 治疗可迅速提高血氧分压及血液内物理溶解氧量,增大氧弥散半径,增加全身组织供氧,使细胞的有氧代谢增强,无氧酵解减弱,细胞内外

水肿减轻^[5]。本研究的 HBO 治疗组造模后第 6 小时肺湿重/干重比低于模型组,表明治疗组大鼠肺组织水肿有所减轻。

炎症因子 IL-8 作为 ALI 的早期重要反应因子之一,可启动和放大 ALI 的炎症反应^[6,7]。目前认为,急性呼吸窘迫综合征或 ALI 是由于致病因子激活炎症细胞,引起炎症介质过度释放、机体炎症反应失控的结果。现有的研究表明,ALI 患者血浆及支气管肺泡灌洗液中 IL-8 含量显著增加,并与病情严重程度相一致^[8]。IL-8 主要由受内毒素或其他细胞因子作用的单核细胞、巨噬细胞和血管内皮细胞等产生,通过诱导中性粒细胞进入组织间隙或跨内皮移行,进入肺间质和肺泡腔^[9]。在这一系列过程中,活化的中性粒细胞促进单核细胞、巨噬细胞和血管内皮细胞等脱颗粒,产生氧自由基、蛋白溶解酶和炎症介质或炎症因子,导致肺毛细血管内皮细胞、肺间质及肺泡上皮细胞损伤,从而引起通透性肺水肿^[10-11]。HBO 治疗能迅速、有效地给机体供氧,增强机体吞噬坏死组织的能力,使毛细血管内皮细胞和肺泡上皮细胞损伤得到修复,II 型肺泡上皮细胞增生,分泌肺泡表面活性物质,从而使萎陷的肺泡膨胀,继而减轻炎性细胞的聚集、活化,减少细胞因子的释放^[12]。由此推测,HBO 治疗有助于降低 IL-8 水平,减少中性粒细胞在肺组织中的聚集,进而减轻肺的病理改变。本研究发现,经过 HBO 治疗后,大鼠 IL-8 水平及中性粒细胞数低于模型组,提示 HBO 治疗可减轻机体炎症反应,并且随着时间的延长,改善效果更明显。

总之,本研究通过观察 HBO 治疗内毒素注射诱导的 ALI 模型大鼠,初步探讨了其抗炎作用以及改善组织缺氧和减轻组织水肿的治疗效果,为 HBO 临床治疗 ALI 提供了实验依据。

参 考 文 献

- [1] 李宁,黄怀. 高压氧临床治疗学. 北京:中国协和医科大学出版社, 2007:45-62.
- [2] 李琦,钱桂生,张青,等. 不同剂量脂多糖对大鼠急性肺损伤效应的观察. 第三军医大学学报, 2004, 26:871-873.
- [3] 张静,瞿介明,潘珏,等. 内毒素耐受大鼠与正常大鼠急性损伤反应比较. 中国呼吸与危重监护杂志, 2003, 2:346-350.
- [4] Perng WC, Wu CP, Chu SJ, et al. Effect of hyperbaric oxygen on endotoxin-induced lung injury in rats. Shock, 2004, 21:370-375.
- [5] 段蕴铀,胡慧军,潘晓雯,等. 不同氧疗方式对兔海水淹溺肺水肿的治疗作用. 中国急救医学, 2004, 24:339-341.
- [6] Bauer TT, Monton C, Torres A, et al. Comparison of systemic cytokine levels in patients with acute respiratory distress syndrome, severe pneumonia, and controls. Thorax, 2000, 55:46-52.
- [7] 张永,程德云,王慧,等. 慢性阻塞性肺疾病大鼠肺内白细胞介素 8 和肿瘤坏死因子- α 与气道炎症的关系研究. 中国呼吸与危重监护杂

- 志, 2003, 6: 355-359.
- [8] Walther FJ, Waring AJ, Sherman MA, et al. Hydrophobic surfactant proteins and their analogues. *Neonatology*, 2007, 91: 303-310.
- [9] Barton BE, Jackson JV. The protective role of IL-6 in the lipopolysaccharide-galactosamine septic shock model. *Infect Immun*, 1993, 61: 1496-1499.
- [10] 彭平, 徐启勇, 叶燕青, 等. 地塞米松磷酸钠微球对大鼠急性肺损伤的保护作用. *武汉大学学报(医学版)*, 2006, 27: 229-231.
- [11] 白春学, 孙波. 急性呼吸窘迫综合征. 上海: 复旦大学出版社, 2005: 103-104.
- [12] 谢劲松, 李侠, 凌斌勋, 等. 高压氧对海水淹溺肺水肿兔肺 c-fos 和 c-jun 基因表达的影响. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2000, 18: 270-272.

(修回日期: 2010-10-20)

(本文编辑: 吴倩)

· 短篇论著 ·

综合疗法治疗腰椎间盘突出症的临床观察

胡阿威 陈新武 喻爱喜 夏春明 何正华 张静 徐明 朱佑旺

腰椎间盘突出症是腰腿痛最常见的原因之一, 是骨科常见病、多发病, 其治疗方法较多, 包括药物、牵引、推拿、物理治疗、外科治疗等。单一治疗常常疗效欠佳, 作者采用综合疗法治疗, 获得满意疗效, 现报道如下。

一、资料与方法

(一) 一般资料

选取 2008 年 5 月至 2009 年 10 月门诊与住院部 LDH 患者 120 例, 均经病史、症状、体格检查、腰椎 X 线片、腰椎间盘 CT 或腰椎 MRI 检查确诊为腰椎间盘突出症, 并除外创伤性、肿瘤性、先天性、感染性等病因所致的腰腿痛。同一患者可有不同节段腰椎间盘突出病变, 因而病例可有重叠。将所有患者分为治疗组 ($n=60$) 和对照组 ($n=60$), 2 组患者年龄、性别、症状、体征等经统计学分析, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 具有可比性, 详见表 1。

(二) 治疗方法

治疗组予包括药物、牵引、推拿、微波和康复训练在内的综合疗法治疗。

1. 牵引治疗: 采用日本 OG GIKEN 公司 OL-2000 型腰椎自动牵引床, 患者仰卧位, 分别固定骨盆和胸廓作对抗牵引, 采取间断牵引 (牵引 6 min、休息 2 min), 牵引重量根据患者病情确定为体重的 40% ~ 60%, 以不产生疼痛为宜, 每次 30 min。年龄较大者牵引重量可适当减轻。每日牵引 1 次, 10 次为 1 个疗程, 连续牵引 2 ~ 3 个疗程。每次撤除牵引后, 患者要平卧硬板床休息 15 ~ 30 min, 腰围保护下地活动。

2. 推拿治疗: 常用的手法包括推、拿、按、摩、牵、抖、揉、滚以及叩击和运动关节类 (包括腰椎旋转法、扳法、拔伸法) 等。放松腰部肌肉, 每次 30 min, 每日 1 次。每日治疗 1 次, 10 次为 1 个疗程。

3. 微波治疗: 采用日本 OG GIKEN 公司 ME-7250 型微波治疗机, 频率 40 ~ 60 MHz, 输出功率 20 ~ 40 W, 时间 20 min, 每

日 1 次, 10 次为 1 个疗程, 疗程间休息 3 d。

4. 药物治疗: 予以脱水、抗炎、活血、改善微循环等治疗; 具体为: 20% 甘露醇 250 ml 加地塞米松 10 mg 静脉滴注, 每日 1 次, 用药 3 d 后减量至地塞米松 5 mg, 继续治疗 3 d。 β -七叶皂苷钠 20 mg 加入 5% 葡萄糖液或生理盐水 250 ml 中静脉滴注, 每日 1 次, 7 ~ 10 d 为 1 个疗程。复方丹参注射液 20 ml 加入 5% 葡萄糖液或生理盐水 250 ml 中静脉滴注, 每日 1 次, 10 d 为 1 个疗程。酌情给予营养神经及抗炎镇痛治疗。

5. 康复训练: 可行仰卧位直腿抬高、俯卧位燕子飞翔等康复训练, 每日 2 ~ 3 次, 每次各 10 ~ 20 组动作, 连续训练 30 d。腰围外固定保护下床, 作坐立行走训练, 每日 1 次, 每次 30 min。

对照组给予腰椎牵引、推拿、甘露醇与地塞米松针治疗, 具体方法同治疗组。

治疗期间, 2 组患者均避免剧烈运动和弯腰活动。

(三) 评定方法

2 组患者均于治疗前和治疗 1 个月后 (治疗后) 采用日本整形外科学会“腰椎疾患治疗成绩评分标准”^[1] 作为腰椎功能评定的标准, 该评定内容包括了临床症状、体征、日常生活动作及膀胱功能四个方面, 最高总评分为 29 分, 评定腰椎功能和治疗效果, 并根据治疗前、后评分计算出改善率。改善率 = [(治疗后评分 - 治疗前评分) / (正常评分 - 治疗前评分)] $\times 100\%$, 改善率 75% ~ 100% 为治愈, 50% ~ 74% 为显效, 25% ~ 49% 为有效, 改善率 < 25% 为无效。治愈显效率以治愈加显效计算。

(四) 统计学处理

采用 SPSS 13.0 版统计学软件, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 t 检验, 计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

二、结果

治疗后, 2 组患者腰椎功能评分情况较治疗前均有显著改善, 其中治疗组改善更为明显, 与对照组治疗后比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 详见表 2; 另外, 治疗组患者的治愈率和治愈显效率也显著高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 详见表 3。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2011.02.005

作者单位: 430061 武汉, 武警湖北省总队医院骨二科 (胡阿威、夏春明、何正华、徐明、朱佑旺), 康复医学科 (陈新武、张静); 武汉大学中南医院骨科 (喻爱喜); 武汉大学 2009 级骨科科学博士生 (胡阿威)