

·论 著·

富氧全氟化碳乳剂对油酸诱导急性呼吸窘迫综合征家兔的保护作用

闻郑峰 吕友 林兆奋

[摘要] 目的 探讨富氧全氟化碳乳剂对油酸诱导急性呼吸窘迫综合征(ARDS)家兔的保护作用。方法 将18只新西兰家兔随机分为油酸+乳剂组、油酸组 and 对照组,每组6只。采用油酸法建立家兔ARDS模型。造模成功后,油酸+乳剂组吸入富氧全氟化碳乳剂15 min,油酸组和对照组雾化吸入等量0.9%氯化钠注射液。观察三组在基线、成模、雾化吸入结束后0 min、5 min、15 min、30 min、60 min、120 min、240 min、360 min时的血氧分压(PaO_2)以及雾化结束后360 min血清和肺灌洗液中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)的浓度,同时,计算Smith肺损伤评分、肺系数、肺通透指数,并在肉眼和显微镜下观察肺组织病理学改变。结果 在雾化吸入富氧全氟化碳乳剂结束后0 min和360 min,油酸+乳剂组的 PaO_2 高于油酸组,差异均有统计学意义(t 分别=2.56、2.30, P 均 <0.05)。在雾化结束后360 min,油酸+乳剂组的Smith肺损伤评分和肺系数低于油酸组,差异均有统计学意义(t 分别=2.56、2.34, P 均 <0.05)。在雾化结束后360 min,油酸+乳剂组的血清和肺泡灌洗液中TNF- α 、IL-1 β 浓度高于油酸组,但差异均无统计学意义(t 分别=0.92、0.52、0.82、0.38, P 均 >0.05)。油酸组和油酸+乳剂组均有肺病理损害,可见不同程度的水肿、出血、坏死、炎症渗出以及肺泡萎缩或消失。结论 富氧全氟化碳乳剂能够提高油酸诱导ARDS家兔的血氧分压和减轻肺组织的损伤程度,但不能抑制炎症因子的释放。

[关键词] 急性呼吸窘迫综合征; 油酸; 全氟化碳; 二棕榈酸卵磷脂

Protection of oxygen-enriched perfluorocarbon emulsion for the rabbit model with acute respiratory distressed syndrome induced by oleic acid WEN Zhengfeng, LYU You, LIN Zhao-fen. Department of Critical Medicine, The Second Hospital of Yinzhou District, Ningbo 315192, China.

[Abstract] **Objective** To explore the protection of oxygen-enriched perfluorocarbon emulsion for the rabbit model with acute respiratory distressed syndrome induced by oleic acid. **Methods** Eighteen New Zealand rabbits were randomly divided into oleic acid + emulsion group, oleic acid group, and basic control group with 6 rabbits in each. The rabbit model of ARDS was induced by oleic acid. After successfully modeling, the rabbits in oleic acid + emulsion group were vaporized oxygen-enriched perfluorocarbon emulsion for 15min, and the rabbits in the basic control group and oleic acid group were given the same amount of vaporized normal saline inhalation. Before modeling for 30min (basic value), after modeling for 30min, and 0min, 5min, 15min, 30min, 60min, 120min, 240min, 360min after inhalation, the PaO_2 was observed in three groups, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) at 360min after inhalation and the Smith lung injury score, the lung coefficient and lung permeability index were calculated. The lung tissue was collected and the lung pathological changes were observed. **Results** Compared with oleic acid group, the PaO_2 of oleic acid + emulsion group was higher at 0 min and 360 min after inhalation of oxygen-enriched perfluorocarbon emulsion ($t=2.56, 2.30, P<0.05$). At 360 min after inhalation, the Smith lung injury score and lung coefficient of oleic acid + emulsion group were lower than those of the oleic acid group ($t=2.56, 2.34, P<0.05$), while the differences in concentrations of TNF- α and

IL-1 β in serum and BALF between two groups were not statistically significant ($t=0.92, 0.52, 0.82, 0.38, P>0.05$). In the oleic acid group and oleic acid + emulsion group, there were pathological damages such as edema, hemorrhage, necrosis, inflammatory exudation and alveolar atrophy or disappearance.

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2021.006.005

基金项目: 国家科技支撑计划(2014BAK05B02)

作者单位: 315192 浙江宁波, 鄞州区第二医院重症医学科(闻郑峰), 肛肠外科(吕友); 海军军医大学附属长征医院急救科(林兆奋)

通讯作者: 吕友, Email: youlv1990@126.com

Conclusion Oxygen-enriched perfluorocarbon emulsion can increase the partial pressure of blood oxygen and reduce the degree of lung injury in ARDS rabbits induced by oleic acid, but it can not inhibit the release of inflammatory factors.

[Key words] acute respiratory distressed syndrome; oleic acid; perfluorocarbon; dipalmitoylphosphatidylcholine

急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distressed syndrome, ARDS) 是严重感染、创伤、休克等肺内外因素作用后出现的以进一步呼吸窘迫和难治性低氧血症为临床特点的综合征^[1]。虽然 ARDS 在机械通气治疗取得重大进展, 但患者住院死亡率仍高达 40%^[2]。全氟化碳具有良好的溶解非极性气体的功能, 可以作为氧气和二氧化碳的运载体^[3], 而二棕榈酸卵磷脂是肺表面活性物质的主要成分, 既可修饰全氟化碳制成全氟化碳乳剂, 又能够提供肺表面活性物质起到改善肺顺应性的作用。本次研究拟通过油酸诱导家兔 ARDS 模型, 观察富氧全氟化碳乳剂治疗该 ARDS 模型的疗效情况。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本次动物实验时间为 2019 年 6 月至 2020 年 5 月, 实验在海军军医大学附属长征医院急救医学实验室完成。选择健康成年新西兰家兔 18 只, 体重约 2 kg 左右, 性别不限, 由海军军医大学实验动物中心提供。实验前晚禁食不禁水。家兔随机分为: 油酸+乳剂组、油酸组和对照组, 每组 6 只家兔。三组一般资料等比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备 新西兰家兔常规称重, 由耳缘静脉注入按戊巴比妥钠 (由 Sigma 公司生产) 30 mg/kg 给药。麻醉起效后, 常规动静脉置管, 用于抽血气分析和给药。外科操作结束后稳定 30 min, 油酸组和油酸+乳剂组采用油酸制备 ARDS 模型, 油

酸 (由 Sigma 公司生产) 按 0.1 ml/kg 从耳缘静脉内在 5 min 内分 3 次匀速注射完毕, 对照组注入相同剂量的 0.9% 氯化钠注射液; 30 min 后反复测动脉血气分析, 将氧合指数 ≤ 300 mmHg 且持续 30 min 以上作为 ARDS 模型制备成功的标准。

1.2.2 实验设计 当造模成功时, 油酸+乳剂组雾化吸入富氧全氟化碳乳剂 (由上海纳米技术及应用国家工程研究中心提供) 15 min (全氟化碳乳剂雾化前通氧气 10 min), 油酸组雾化吸入等量 0.9% 氯化钠注射液。观察和记录基线、成模、雾化吸入完成后 0 min、5 min、15 min、30 min、60 min、120 min、240 min、360 min 时的血氧分压 (partial pressure of oxygen, P_{aO_2}), 比较三组在雾化吸入结束后 360 min 时血清和肺灌洗液中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 的浓度。实验终点处死家兔, 肺组织经过苏木精-伊红染色, 采用 Smith 评分法^[4]评价肺损伤程度。肺系数=肺质量/体质量 $\times 100\%$ 。实验取左上肺作肺泡灌洗, 取血清和肺泡灌洗液上清液检测总蛋白含量, 计算肺通透指数。肺通透指数=肺泡灌洗液总蛋白/血清总蛋白。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计学软件进行数据分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。计量资料比较采用 t 检验; 计数资料比较采用 χ^2 检验。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组家兔的 P_{aO_2} 变化比较见表 1

表 1 三组家兔的 P_{aO_2} 变化比较/mmHg

时间	油酸+乳剂组	油酸组	对照组
基线	124.83 $\pm$ 6.37	115.53 $\pm$ 9.23	111.33 $\pm$ 6.80
成模时	60.21 $\pm$ 2.52 [*]	58.23 $\pm$ 3.23 [*]	113.50 $\pm$ 7.42
雾化吸入结束后 0 min	67.15 $\pm$ 11.76 ^{*#}	53.34 $\pm$ 6.05 [#]	120.50 $\pm$ 9.91
雾化吸入结束后 5 min	62.33 $\pm$ 17.76 [#]	53.33 $\pm$ 10.92 [#]	121.17 $\pm$ 11.03
雾化吸入结束后 15 min	59.84 $\pm$ 15.32 [#]	52.68 $\pm$ 15.73 [#]	127.17 $\pm$ 9.15
雾化吸入结束后 30 min	60.79 $\pm$ 13.13 [#]	52.71 $\pm$ 15.62 [#]	123.67 $\pm$ 7.23
雾化吸入结束后 60 min	73.74 $\pm$ 18.22 [#]	60.78 $\pm$ 17.42 [#]	121.33 $\pm$ 7.17
雾化吸入结束后 120 min	76.34 $\pm$ 17.35 [#]	68.31 $\pm$ 17.23 [#]	114.67 $\pm$ 7.31
雾化吸入结束后 240 min	82.04 $\pm$ 20.31 [#]	71.04 $\pm$ 23.49 [#]	112.17 $\pm$ 6.18
雾化吸入结束后 360 min	92.18 $\pm$ 23.13 ^{*#}	66.21 $\pm$ 15.22 [#]	123.17 $\pm$ 11.89

注: * 与油酸组比较, $P < 0.05$; # 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

由表1可见,在雾化吸入富氧全氟化碳乳剂结束后0 min和360 min,油酸+乳剂组的PaO₂高于油酸组,差异均有统计学意义(t 分别=2.56、2.30, P 均<0.05),但在雾化结束后5 min,两者的PaO₂比较差异无统计学意义(t =1.06, P >0.05)。在造模成功后的各个时间点,油酸+乳剂组和油酸组的PaO₂均低于对照组(t 分别=16.66、16.73、8.50、14.17、6.89、10.71、9.24、10.03、10.28、10.10、5.95、7.87、4.99、6.07、3.48、4.15、2.92、7.22, P 均<0.05)。

2.2 三组家兔的Smith肺损伤评分、肺系数、肺通透指数比较见表2

由表2可见,在雾化吸入结束后360 min,油酸+乳剂组的Smith肺损伤评分和肺系数低于油酸组(t 分别=2.56、2.34, P 均<0.05)。油酸组+乳剂组和油

酸组的Smith肺损伤评分、肺系数和肺通透指数均高于对照组,差异均有统计学意义(t 分别=19.50、26.77、7.97、8.14、4.10、2.70, P 均<0.05)。

表2 三组家兔的Smith肺损伤评分、肺系数、肺通透指数比较

组别	Smith肺损伤评分/分	肺系数/%	肺通透指数/ $\times 10^{-5}$
油酸+乳剂组	9.32 $\pm$ 1.01 ^{##}	1.01 $\pm$ 0.10 ^{##}	3.93 $\pm$ 0.51 ^{##}
油酸组	10.68 $\pm$ 0.82 [#]	1.25 $\pm$ 0.23 [#]	3.48 $\pm$ 0.39 [#]
对照组	0.61 $\pm$ 0.42	0.49 $\pm$ 0.11	2.93 $\pm$ 0.31

注: #:与油酸组比较, P <0.05; #:与对照组比较, P <0.05。

2.3 三组家兔血清和支气管肺泡灌洗液中TNF- α 、IL-1 β 的浓度比较见表3

表3 三组家兔血清和支气管肺泡灌洗液中TNF- α 、IL-1 β 的浓度比较/pg/ml

组别	血清		支气管肺泡灌洗液	
	TNF- α	IL-1 β	TNF- α	IL-1 β
油酸+乳剂组	54.92 $\pm$ 10.13 [*]	26.36 $\pm$ 5.05	113.11 $\pm$ 9.35 [*]	34.62 $\pm$ 4.21 [*]
油酸组	48.47 $\pm$ 13.91 [*]	25.21 $\pm$ 4.79	105.04 $\pm$ 22.18 [*]	33.03 $\pm$ 9.48 [*]
对照组	32.72 $\pm$ 7.38	24.42 $\pm$ 11.38	77.02 $\pm$ 10.04	23.12 $\pm$ 5.21

注: *:与对照组比较, P <0.05。

由表3可见,在雾化吸入结束后360 min,油酸+乳剂组和油酸组血清中的TNF- α 浓度均高于对照组,差异均有统计学意义(t 分别=4.34、2.45, P 均<0.05)。虽然油酸+乳剂组血清和肺泡灌洗液中的TNF- α 、IL-1 β 浓度高于油酸组,但差异均无统计学意义(t 分别=0.92、0.52、0.82、0.38, P 均>0.05)。油酸+乳剂组和油酸组肺泡灌洗液中的TNF- α 、IL-1 β 浓度均高于对照组,差异均有统计学意义(t 分别=6.44、2.82、4.21、2.24, P 均<0.05)。

2.4 三组家兔的肺组织大体标本外观比较 油酸+乳剂组家兔的肺表面可见小片状出血和坏死灶,横切面和气管内可见少量粉红色泡沫状液体流出。油酸组家兔的肺表面可见片状出血和坏死灶,有明显充血水肿,体积较对照组明显增大,横切面和气管内可见大量粉红色泡沫状液体流出;对照组家兔的肺呈淡粉红色,横切面未见明显泡沫样液体流出。

2.5 三组家兔的肺组织光镜结果见图3图4

由图3图4可见,油酸+乳剂组家兔的肺泡内可见中等量的粉红色水肿液和炎症细胞,血管和肺泡内可见少量淤血,并有少部分肺泡萎陷。油酸组家

兔的肺泡内可见大量淡粉色水肿液,肺泡中可见大量炎症细胞,血管及肺泡中可见大量淤血,部分肺泡萎缩或消失。对照组家兔的肺组织表现正常,但部分区域可见少量炎症细胞浸润。

3 讨论

ARDS的主要病理生理基础是肺泡及肺毛细血管的弥漫性损伤导致细胞膜通透性增加、内皮细胞凋亡以及肺表面活性物质的缺乏,进而出现肺水肿、肺不张、通气血流比例失调,最终导致顽固性的低氧血症。相关文献报道,全氟化碳是一类化学性质稳定、无毒、无味、不溶于水的化合物,具有低张力和良好气溶性特征,因此具有抗炎、表面活性物质样作用^[5,6]。同时,选择以二棕榈酸卵磷脂为主要成分的人工肺表面活性物质作为载体,通过补充肺表面活性物质起到降低肺表面张力,防止肺泡塌陷,以提高肺的通气功能。本次实验采用纳米技术以二棕榈酸卵磷脂为载体包裹全氟化碳制备全氟化碳乳剂。

本次实验采用油酸制备ARDS模型,结果可见油酸组+乳剂组和油酸组的Smith肺损伤评分、肺系数和肺通透指数均高于对照组(P 均<0.05),可能

和油酸导致肺泡-毛细血管内皮损伤进而出现肺血管通透性增强以及肺水肿的发生相关。同时可见油酸+乳剂组和油酸组血清中的TNF- α 浓度和肺泡灌洗液中的TNF- α 、IL-1 β 浓度均高于对照组(P 均 <0.05),但总体上升不多,主要和油酸ARDS模型是一种不完全依赖于炎症细胞及其活性产物的模型相关。并且制模成功后PaO₂迅速下降,并在一段时间内较稳定,结合光镜下肺组织的改变,表明已达到ARDS的诊断标准,提示由油酸制备ARDS模型是可靠稳定的。本次实验观察富氧全氟化碳乳剂对油酸诱导ARDS模型的影响,并探究其可能机制。本次实验结果显示,在雾化吸入全氟化碳乳剂结束后0 min,油酸+乳剂组的PaO₂较油酸组迅速改善,这可能与全氟化碳乳剂中氧气的迅速释放密切相关,但疗效在用药结束后5 min消失,其原因很可能与用药剂量较小,携带氧气不多相关。同时在雾化吸入全氟化碳乳剂结束后360 min,油酸+乳剂组的PaO₂较油酸组明显改善,结合相关研究结果,其主要原因与全氟化碳乳剂能够均匀分布于肺泡表面,促进萎陷肺泡复张、改善通气血流比有一定关系^[7]。以上结果证明富氧全氟化碳乳剂能够在短期和长期情况下改善ARDS家兔的氧合状态。

既往实验表明,全氟化碳对于炎症反应具有明显的抑制作用^[8]。其主要机制是全氟化碳可降低炎症因子释放,能够减轻中性粒细胞的浸润,能够抑制趋化因子mRNA表达,并且能够减少黏附分子的表达^[9]。本次实验结果发现,油酸组和油酸+乳剂组的血清和肺泡灌洗液中TNF- α 、IL-1 β 浓度差异不大。这可能与油酸造模机制相关,首先油酸造模主要机制是损伤肺泡-毛细血管内皮,是一种不完全依赖于炎症细胞及其活性产物的急性肺损伤模型^[10],其次油酸型急性肺损伤主要机制是氧化应激反应、促凝血活性增高、内皮素作用等^[11],所以可能油酸导致炎症因子的改变不明显,特别是在血液中。另外,本次实验还发现相关文献中全氟化碳雾化吸入剂量较大,约6 ml·kg⁻¹·h⁻¹,持续2 h,远远高于本次研究的用量,所以本次研究可能导致炎症因子变化不明显。因此,考虑可能建立内毒素诱导的ARDS模型研究全氟化碳抑制炎症反应效果会更加的显著。

综上所述,富氧全氟化碳乳剂可以改善油酸诱导ARDS家兔的氧合情况以及减轻肺部组织损伤,其机制可能与富氧全氟化碳乳剂能够输送氧气、补充肺表面活性物质相关;另一方面,全氟化碳乳剂

由全氟化碳和人工肺表面活性物质合成,但具体由哪种物质起主导作用尚不清楚,可通过建立雾化吸入人工肺表面活性物质组进一步研究。

参考文献

- 1 Ayhan A, Yalçın OT, Tuncer ZS, et al. Synchronous primary malignancies of the female genital tract[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 1992, 45(1): 63-66.
- 2 Ferguson ND, Cook DJ, Guyatt GH, et al. High-frequency oscillation in early acute respiratory distress syndrome [J]. N Engl J Med, 2013, 368(9): 795-805.
- 3 Gao M, Liang C, Song X, et al. Erythrocyte-membrane-enveloped perfluorocarbon as nanoscale artificial red blood cells to relieve tumor hypoxia and enhance cancer radiotherapy[J]. Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.), 2017, 29(35): 1701429.
- 4 Smith KM, Mrozek JD, Simonton SC, et al. Prolonged partial liquid ventilation using conventional and high-frequency ventilatory techniques: gas exchange and lung pathology in an animal model of respiratory distress syndrome[J]. Crit Care Med, 1997, 25(11): 1888-1897.
- 5 Reickert C, Pranikoff T, Overbeck M, et al. The pulmonary and systemic distribution and elimination of perflubron from adult patients treated with partial liquid ventilation[J]. Chest, 2001, 119(2): 515-522.
- 6 杨晨, 陈良安. 全氟化碳治疗急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征研究进展[J]. 中华医学杂志, 2012, 92(14): 1001-1003.
- 7 Bali S, Morgan G, Nyman A, et al. A case for the therapeutic use of perfluorocarbon in pulmonary atelectasis[J]. Thorax, 2017, 72(5): 478-480.
- 8 Khalighi Z, Rahmani A, Cheraghi J, et al. Perfluorocarbon attenuates inflammatory cytokines, oxidative stress and histopathologic changes in paraquat-induced acute lung injury in rats[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2016, 42(1): 9-15.
- 9 Haeberle HA, Nesti F, Dieterich HJ, et al. Perflubron reduces lung inflammation in respiratory syncytial virus infection by inhibiting chemokine expression and nuclear factor-kappa B activation [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2002, 165(10): 1433-1438.
- 10 陆月明. 油酸致急性肺损伤动物模型析评[J]. 中华急诊医学杂志, 2005, 14(1): 81-83.
- 11 Leeman M, Closset J, Vachiéry JL, et al. Sinoaortic deafferentation reduces intrapulmonary shunt in dogs with oleic acid lung injury[J]. J Appl Physiol, 1989, 67(2): 833-838.

(收稿日期 2020-10-19)

(本文编辑 蔡华波)