



模拟高原环境下高原肺水肿大鼠模型的建立

陶义存¹, 是文辉², 许永华², 靳春丽¹, 卢伟¹, 李琳琳¹, 毛新民¹

(1. 新疆医科大学基础医学院, 乌鲁木齐 830011; 2. 兰州军区乌鲁木齐总医院, 乌鲁木齐 830000)

【摘要】 目的 在人工实验舱模拟高原环境下, 探讨建立高原肺水肿大鼠模型的条件。**方法** Wistar 大鼠, 雌雄各半, 随机分为 5 组: 空白对照组、低氧 24 h 组、低氧 48 h 组、低氧 72 h 组、低氧 7 d 组, 测定大鼠肺组织含水量, 肺组织中 TNF- α 、IL-6 含量及病理改变。**结果** 与正常对照组相比, 低氧 24、48、72 h 组大鼠肺组织含水量依次为 $(81.58 \pm 0.86)\%$ 、 $(82.13 \pm 0.57)\%$ 、 $(82.21 \pm 0.88)\%$, 高于正常对照组 $(78.72 \pm 0.52)\%$, 肺组织中 IL-6 依次为 (329.30 ± 133.58) 、 (323.92 ± 127.42) 、 (506.29 ± 197.19) pg/mL, TNF- α 依次为 (221.08 ± 20.26) 、 (208.05 ± 20.33) 、 (244.63 ± 51.53) pg/mL, 高于正常对照组 IL-6 (187.26 ± 69.49) pg/mL, TNF- α 为 (91.81 ± 22.24) pg/mL。低氧 7d 组肺组织含水量 $(81.47 \pm 0.65)\%$ 、肺组织中 IL-6 (241.33 ± 83.60) pg/mL, TNF- α (109.99 ± 31.98) pg/mL, 均显著低于低氧 72h 组, 病理学结果显示 72h 组肺组织有炎性细胞浸润, 肺泡壁有明显的充血和水肿。**结论** 模拟海拔 5000 m 环境, 建立大鼠肺水肿模型的较好的时间为 72 h。

【关键词】 高原肺水肿; 大鼠; 西北特殊环境人工实验舱; TNF- α ; IL-6

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 01-0076-03

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.01.015

Establishment of a rat model simulating the high altitude pulmonary edema

TAO Yi-cun¹, SHI Wen-hui², XU Yong-hua², JIN Chun-li¹, LU Wei¹, LI Lin-lin¹, MAO Xin-min¹

(1. Basic Medical College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China;

2. Urumqi General Hospital of Lanzhou Military Area Command, Urumqi 830000)

【Abstract】 Objective To establish a rat model simulating high-altitude pulmonary edema by using hypobaric chamber. **Methods** Sixty healthy Wistar rats (male : female = 1 : 1) were randomly divided into five groups: control group, hypoxia 24 h group, hypoxia 48 h group, hypoxia 72 h group, and hypoxia 7 d group. Except for the control group, hypoxia group rats were put in hypobaric chamber for the given time. The lung water content, contents of IL-6 and TNF- α in the lung homogenates were assessed and histological examination was conducted on all animals. **Results** Compared with the control group, the lung water content, content of IL-6 and TNF- α in the lung homogenates were significantly increased in the hypoxia 24 h group, hypoxia 48 h group and hypoxia 72 h group, while lung water content, content of IL-6 and TNF- α in the lung homogenates were lower than that in the hypoxia 72 h group. Interstitial pulmonary edema and inflammatory cell infiltration, alveolar septal widening and interstitial hyperemia were found in the hypoxia 72 h group. **Conclusion** A rat model of high altitude pulmonary edema is successful set up by putting the rats in hypobaric chamber for 72 h.

【Key words】 High altitude pulmonary edema; Rats; hypobaric chamber; TNF- α ; IL-6

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81160416)。

[作者简介] 陶义存(1981-), 男, 在读博士, 讲师, 研究方向: 抗糖尿病及抗高原病药物研发, 电话: 13565921912, 邮箱: taoyicun001@126.com。

[通讯作者] 毛新民, 博士生导师, 电话: 13565843968, 邮箱: maixinmin3277@126.com

高原病是发生于高原低氧环境的一种特发性疾病,急性高原病可分为轻型和重型,重型包括高原肺水肿和高原脑水肿^[1]。到达 4000 m 以上的海拔,发病率高达 30% 以上^[2-3]。西部大开发,带来交通及旅游业的长足发展,必然会带来大量的平原居住环境者进入高原环境,另外我国生活在海拔 3000 m 以上的人群有近 6000 万,所以高原病的研究将越来越受到重视。本实验利用西北特殊环境实验舱^[4],模拟高原低压低氧环境,以 Wistar 大鼠为实验对象,探索高原肺水肿大鼠模型成立的时间,为药物发现和临床药物作用机制研究提供平台。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

西北地区特殊环境实验舱(DYC-3013M,兰州军区乌鲁木齐总医院研制),光学显微镜(Nikon E200,日本),电子天平(AL204,梅特勒-托利多仪器有限公司)。TNF- α 试剂盒(上海依科赛生物制品有限公司,ZJAGBZAB01),IL-6 试剂盒(上海依科赛生物制品有限公司,ZIBIBZAB02),戊巴比妥钠(Amresco,20110612)。

1.2 动物分组

60 只 SPF 级 Wistar 大鼠,雌雄各半,体重(180~220)g,购自新疆医科大学实验动物中心[SCXK(新)2011-0004],实验在新疆医科大学实验动物中心进行[SYXK(新)2011-0004]。

随机分为 5 组:正常对照组,低氧 24 h 组,低氧 48 h 组,低氧 72 h 组及低氧 7 d 组,每组 12 只。空白对照组在 SPF 环境饲养,低氧各组置于模拟海拔 5000 m 高原环境的人工实验舱中饲养。舱内高度以 10 m/s 的速度匀速上升到海拔 5000 m 水平(大气压为 54.1 kPa,氧分压为 11.52 kPa),其间动物自由

进水及进食,每 24 h 开舱半小时添加饲料及饮水。

1.3 动物处理

各组大鼠出低压舱后腹腔注射戊巴比妥钠(2%,0.2 mL/100 g)麻醉,打开腹腔,取肺组织,取左肺上叶称重后锡箔纸包裹测定含水量,左肺下叶 4% 多聚甲醛固定,用于 HE 染色。右肺上中叶称重,加 PBS 液制备 10% 匀浆液,3000 r/min 离心 10 min,分装上清 -80℃ 冰箱冻存测定 TNF- α 、IL-6。

1.4 肺组织病理学观察

左肺下叶多聚甲醛固定一周后,酒精梯度脱水,包埋,切片,HE 染色。光学显微镜观察、不同倍数下拍摄图片。

1.5 肺含水量、肺组织匀浆 TNF- α 、IL-6 的测定

将锡箔纸包裹的肺组织,置烤箱(80℃,72 h)烤至恒重,称干质量,计算含水量^[5]。10% 的肺组织匀浆液按说明书测定 TNF- α 、IL-6 含量。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件进行分析,计量数据均采用均数 $\pm$ 标准差表示,数据先进行正态性检验,符合组间比较采用独立样本 t 检验,不符合进行对数转换。检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 肺含水量及肺组织内 TNF- α 、IL-6 的变化

与正常对照组相比,低氧 24、48、72 h 及 7 d 组肺组织含水量均高于前者($P < 0.05$),前 72 h 肺含水量呈增加趋势,在第 7 天有所回落,且与低氧 72 h 组差异有统计学意义($P < 0.05$)。肺组织匀浆内 TNF- α 、IL-6 含量在低压低氧环境下饲养 24、48、72 h 后高于正常对照组,差异有显著性($P < 0.05$),同样在第 7 天含量较 72 h 时降低($P < 0.05$),且与正常对照组相比差异无显著性。见表 1。

表 1 各组大鼠肺组织含水量、TNF- α 及 IL-6 含量比较($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Tab. 1 Change of the lung water content, TNF- α , and IL-6 in lung tissues in the rats of different groups

组别 Groups	肺含水量 lung water content	IL-6 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
正常对照组 control group	78.72 $\pm$ 0.52	187.26 $\pm$ 69.49	91.81 $\pm$ 22.24
低氧 24h 组 hypoxia 24 h group	81.58 $\pm$ 0.86 **	329.30 $\pm$ 133.58 **	221.08 $\pm$ 20.26 **
低氧 48h 组 hypoxia 48 h group	82.13 $\pm$ 0.57 **	323.92 $\pm$ 127.42 **	208.05 $\pm$ 20.33 **
低氧 72h 组 hypoxia 72 h group	82.21 $\pm$ 0.88 **	506.29 $\pm$ 197.19 **	244.63 $\pm$ 51.35 **
低氧 7d 组 hypoxia 7 d group	81.47 $\pm$ 0.65 * **	241.33 $\pm$ 83.60 ##	109.99 $\pm$ 31.98 ##

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与正常对照组比, ## $P < 0.01$ 与低氧 72 h 组比。

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, Compared with the control group. ## $P < 0.01$, Compared with the hypoxia 7 d group.

2.2 肺组织病理形态学改变

光镜下可见正常对照组大鼠肺组织结构完整,

肺泡腔清晰,无肺水肿表现;低氧 24h 组表现为肺组织肺血管及肺泡壁扩张充血水肿;低氧 48 h 肺组织

部分肺泡壁增厚,间质血管充血,可见代偿性肺气肿;低氧 72 h 组可见炎细胞浸润,多见肺泡壁充血、水肿;低氧 7 d 组部分可见炎性细胞浸润,水肿较低氧 72 h 组减轻。见图 1(彩插 14)。

3 讨论

我国西北边境主要是高原环境,因此预防急性高原病对我国的国防也具有重要意义,急性高原反应是导致部队战斗力下降的重要因素,发病率高达 57.6%,美国的一次营级训练演习中发现,从 2000 m 左右到 3300 m,发病率可达 14.6%^[6]。早期高原病动物相关研究是将动物运送到高原饲养,不仅耗费大量的人力物力,且不易进行质量控制。因此近年来多利用模拟高原环境来进行相关研究。

在高原肺水肿模型动物的选择上,以大鼠居多,还有家兔、狗、猪等,利用大鼠复制高原肺水肿的相关研究中,多数选择了单一性别雄性^[7-8]。本实验采用了雌雄兼用,虽然会给实验结果带来方差增大的影响,但更符合发病人群的实际情况,药物干预方便,更符合新药研发的要求,能更好的应用于新药研发。

相关研究在海拔高度的选择上并不统一,从海拔 4000 m 到 6000 m 不等。考虑到海拔 6000 m 以上的生活人群较少,且从海拔 3000 m 升高至 5000 m,AMS 的发生率从 10% 升至 60%,初次进入高原环境急性高原病的发病多发生在 1~3 d,本实验选择了模拟海拔 5000 m,观察一周内不同时间点模型的成立情况。

已经证实,炎症介质不仅能引起组织损伤,也能增加血管通透性,引起血管渗漏。TNF- α 是全身炎症反应的起始因子,是激活细胞因子级联反应的主要介质,一旦释放很快引起次级因子 IL-1、IL-6、IL-8 的大量产生。TNF- α 与内皮细胞膜上相应的受体结合,可以使内皮细胞间隙增大,增加血管通透性。TNF- α 、IL-6 可刺激巨噬细胞生成大量 NO,NO 舒张血管,增加血管通透性^[9]。所以在判定高原病模型成立的指标选择上,选择了肺含水量、肺病理学改变及肺组织中 TNF- α 、IL-6 含量改变作为判定指

标。由于设备和操作的复杂性,没有测定血氧饱和度及肺动脉压等指标,这些指标及低压低氧饲养 4~6d 的情况以后将做进一步研究。

从实验结果来看,模拟海拔 5000 m 低压低氧环境,动物肺含水量,水肿程度及炎性因子含量都是在 72 h 最显著,与人群的发病时间较一致,可作为高原肺水肿药物干预及发病机制研究的良好模型,而动物在高原环境饲养一周,肺水肿有所消退,这也给药效学实验中给药方案的设计提供了参考依据。

(本文图 1 见彩插 14)

参 考 文 献

- [1] John B. West, English Translation of "Nomenclature, Classification, and Diagnostic Criteria of High Altitude Disease in China" [J]. High Altitude Med Biol, 2010, 11(2): 169-172.
- [2] Wang SH, Chen YC, Kao WF, et al. Epidemiology of acute mountain sickness on Jade Mountain, Taiwan: an annual prospective observational study [J]. High Altitude Med Biol. 2010, 11(1): 43-49.
- [3] Wagner DR, D'Zatko K, Tatsugawa K, et al. Mt. Whitney: Determinants of summit success and acute mountain sickness [J]. Med Sci Sports Exerc. 2008, 40:1820-1827.
- [4] 许永华,张琼,曹金军,等. 创建大型复合低压舱扩大医学实验平台种类 [J]. 中国比较医学杂志. 2012, 22(7):60-63.
- [5] 荣健,王治平,吴钟凯,等. 氧控制性再灌注抗体外循环肺缺血再灌注早期损伤 [J]. 中山大学学报(医学科学版). 2009, 30(6):686-689.
- [6] Norris JN, Viirre E, Aralis H, et al. High altitude headache and acute mountain sickness at moderate elevations in a military population during battalion-level training exercises [J]. Mil Med, 2012, 177(8): 917-923.
- [7] 张兆瑞,张波,何萍萍,等. 高原肺水肿动物模型的初步建立 [J]. 中国医药导报. 2011, 8(27):27-29.
- [8] 陈有,高钰琪,李素芝,等. 高原肺水肿动物模型的初步研究 [J]. 第三军医大学学报. 2006, 28(11):1176-1177.
- [9] Zhou QQ, Tan XL, Wang J, et al. Increased permeability of blood-brain barrier caused by inflammatory mediators is involved in high altitude cerebral edema [J]. Sci Res Essays. 2011, 6(3):607-615.

[收稿日期] 2013-08-29