

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.01013

等量海水与淡水淹溺对兔肺损伤作用的比较

张新红,段蕴铀*,芮萌,王海龙,王宇

第二军医大学海军临床医学院,海军总医院呼吸内科,北京 100037

[摘要] **目的:**比较等量海水与淡水灌注对兔肺损伤程度的影响。**方法:**健康成年新西兰兔 24 只,随机分为 3 组($n=8$):对照组、海水灌注组(经气管插管灌注配方海水 2 ml/kg,约 5 min 灌注完)、淡水灌注组(同海水灌注组方法灌注淡水 2 ml/kg)。连续 180 min 观察各组灌注前后呼吸频率、体循环参数、动脉血气和血清肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、IL-6 的变化。实验终点处死动物,观察肺泡灌洗液细胞计数和分类、肺组织湿/干质量比、肺微血管通透指数、肺病理组织学等。**结果:**灌注后动物呼吸明显增快($P<0.01$),体循环平均压下降($P<0.01$),导致低氧血症及低碳酸血症,血清 TNF- α 、IL-6 等炎症因子水平增高($P<0.01$),肺组织病理损伤重,且海水组较淡水组变化显著且持久;海水组肺组织湿/干质量较其他两组增大、肺微血管通透指数较其他两组增高($P<0.05$),支气管肺泡灌洗液中细胞数量较对照组增多($P<0.01$),肺损伤程度明显重于淡水灌注组。**结论:**等剂量海水与淡水灌注比较,海水致兔的肺损伤程度重,病情发展快,病变更持久。

[关键词] 海水;淡水;溺水;肺损伤

[中图分类号] R 649.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)09-1013-05

Comparison of lung injuries induced by drowning with equal volume of seawater and freshwater in rabbits

ZHANG Xin-hong, DUAN Yun-you*, RUI Meng, WANG Hai-long, WANG Yu

Department of Respiratory Medicine, General Hospital of Navy, Naval Clinical Medical College of Second Military Medical University, Beijing 100037, China

[ABSTRACT] **Objective:** To compare the lung injuries caused by drowning with equal volume of seawater and freshwater in rabbits. **Methods:** Twenty-four healthy New Zealand rabbits were randomly allocated to three groups ($n=8$): control group (CG), seawater-drowning group (infused with seawater, 2 ml/kg) and freshwater-drowning group (infused with freshwater, 2 ml/kg). All rabbits were observed for 3 hours for breathing frequency, heart rate, mean arterial pressure (MAP), blood gas analysis and levels of TNF- α and IL-6. Pulmonary histopathology, ratio of wet/dry lung weight and permeation index of pulmonary capillary were recorded after the animals were sacrificed at the end of the experiment. **Results:** After infusion of seawater or freshwater, the respiration rates, serum levels of TNF- α and IL-6 were significantly increased ($P<0.01$), and the MAP was decreased ($P<0.01$), leading to hypoxemia and hypocapnia. Lung injuries were noticed in both seawater-drowning group and freshwater-drowning groups, with those in the former more persistent. The wet/dry ratio and permeation index of lung capillary were significantly increased after infusion in the seawater group compared with those in the other two groups ($P<0.05$). The cell number in the bronchoalveolar lavage fluid was significantly larger in the seawater-drowning group compared with that in the control group ($P<0.01$), and the lung injury was more severe than that in the freshwater group. **Conclusion:** Seawater infusion can lead to more serious and persistent lung injury in rabbits compared with equal volume of freshwater.

[KEY WORDS] seawater; freshwater; drowning; lung injuries

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(9):1013-1017]

随着人类海洋方面的经济、军事活动的日益增多,对海水淹溺的医学研究越来越受到重视,同时由于水上作业突发性事件的频发,对于淡水淹溺以及淡水淹溺与海水淹溺之间的关系与区别的研究再度

引起人们的关注。海水和淡水淹溺均是以急性呼吸系统损伤为主的全身性损害,淹溺后肺水肿是溺水后主要的死亡原因。自 20 世纪以来,国外学者通过动物实验研究,观察了淡水淹溺后动物的病理生理

[收稿日期] 2009-01-29 **[接受日期]** 2009-03-12

[基金项目] 全军“十一五”科研计划(06-3305)。Supported by Project of the “11th Five-Year Plan” for Tackling Scientific Program of PLA(06-3305)。

[作者简介] 张新红, 博士生, 主治医师。E-mail: zhangxh1970@sina.com

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 010-66958088, E-mail: duanyunyou@126.com

学、组织学、血液动力学以及呼吸力学等方面的变化^[1-2],国内学者近年来也对海水淹溺性肺损伤进行了大量的研究,并成功建立了海水淹溺致急性肺损伤动物模型^[3],但是关于两者致肺损伤作用的比较研究较少。本实验的目的是比较等量海水和淡水对家兔致肺损伤的作用和程度。

1 材料和方法

1.1 实验仪器及材料 多导生理监测仪(荷兰 Phillips);血气分析仪(OMNI-C型,瑞士 Roche);“Y”型玻璃气管插管;TNF- α 及 IL-6 ELISA 试剂盒(RapidBio Lab, USA)。

配方海水:按照中国国家海洋局第三海洋研究所海洋化学研究室提供的我国东南沿海海水主要成分配制:NaCl 26.518 g/L, MgCl₂ 2.447 g/L, MgSO₄ 3.305 g/L, CaCl₂ 1.141 g/L, KCl 0.725 g/L, NaHCO₃ 0.202 g/L, NaBr 0.083 g/L。淡水:采自北京市玉渊潭东湖湖水(水质基本符合国家地面水水质三级标准, pH 6.5~8.5, 氯化物含量低于 0.01 g/L)。

1.2 实验动物及分组 选用健康新西兰兔(雌雄不限),由北京兴隆实验动物养殖厂提供,12周龄,普通级,许可证号:SCXK(京)2006-0001,24只,体质量(2.29±0.18)kg。将实验动物用随机数字表法分为3组,每组8只:对照组(C组,不做灌注);海水灌注组(S组,经气管插管注入配方海水2 ml/kg,约5 min灌注完毕);淡水灌注组(F组,经气管插管注入淡水2 ml/kg,约5 min灌注完毕)。动物禁食12 h,速眠新-氯胺酮(1:1)0.5 ml/kg肌内注射麻醉,颈部去毛,逐层分离并暴露气管,行气管切开插入“Y”型玻璃气管插管,医用缝合丝线结扎固定,灌注相应液体。经右侧颈动脉置入动脉导管,监测相应指标。

1.3 实验数据采集 各组均持续观察180 min,分别于灌注前、灌注即刻(0时刻)以及灌注后30、60、120和180 min进行动脉血气分析,监测并记录各时间点心率(HR)、平均动脉压(MAP)、呼吸频率;于灌注前及灌注后60、180 min分别抽血测定 TNF- α 、IL-6 浓度。实验终点抽血测定血清总蛋白含量,处死动物;取生理盐水10 ml分2次灌注右下肺,留取支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)进行细胞计数、细胞分类、总蛋白含量测定,计算肺微血管通透指数(BALF总蛋白含量/血清总蛋白含量);取右上肺组织测定湿质量后置于75℃干燥箱烘干72 h测定干质量,计算湿/干质量比;左下肺行 H-E 染色形态学观察、组织学病理评分。

1.4 统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS

16.0 统计软件进行分析;不同实验组在各个时间点各项数据的比较均采用重复测量资料的方差分析,若有差异,则采用 SNK-*q* 法进一步进行两两比较;同一组处理后各时间点与处理前的比较采用 Dunnett-*t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 呼吸、循环指标的变化 动物灌注海水后,立即出现发绀、呼吸急促,随着时间延长虽有所减慢,但仍显著高于淡水灌注组和对照组($P < 0.01$),有时甚至呈现潮式呼吸等呼吸节律改变。气管插管内喷出泡沫样液体,听诊双肺满布湿啰音。而淡水灌注组灌注后呼吸频率亦有所增快,与灌注前和对照组均有显著差异($P < 0.01$),但仅灌注后数分钟内增快明显,随着时间延长,逐渐减慢(图1A),也未见明显发绀,听诊肺内未闻及湿啰音。

各灌注组灌注瞬间心率均有轻度增加,但变化不显著,与对照组比无差异($P > 0.05$,图1B)。而在灌注瞬间 MAP 均有短暂升高,数分钟后即逐渐下降,与灌注前及对照组均有显著差异($P < 0.01$),而以海水灌注组下降更为明显(图1C)。

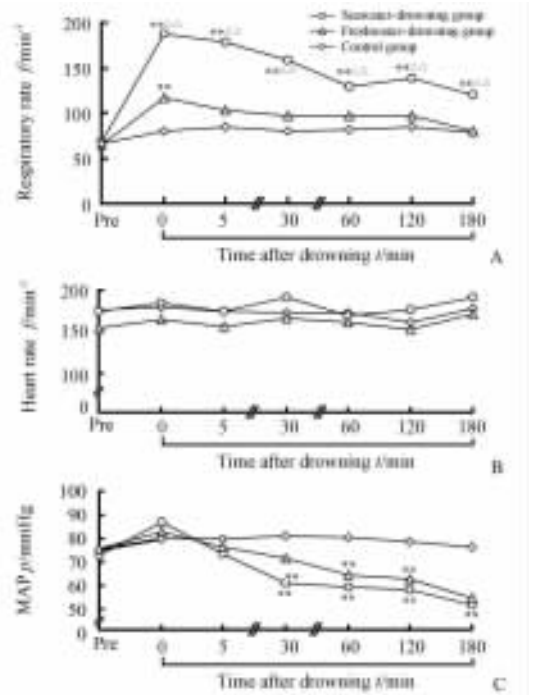


图1 各组动物呼吸、心率、平均动脉压的变化

Fig 1 Changes of respiratory rate, heart rate and mean arterial pressure in each group

A: Respiratory rate; B: Heart rate; C: Mean arterial pressure. 1 mmHg=0.133 kPa. * $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ vs freshwater-drowning group. $n=8$

2.2 血气分析各指标的变化 各组在处理前后血

液 pH 值无明显差异。灌注组气管内灌注液体后出现不同程度的低氧血症和低碳酸血症,与对照组存在显著差异。淡水组 PaO₂ 下降约 26%, 30 min 时降至最低,随之逐渐回升;PaCO₂ 则呈进行性下降,最大降幅 32%左右。而灌注海水组 PaO₂ 在灌注即

刻即达到最低值,降幅约达 65%,随着时间延长缓慢回升,在 180 min 时,氧合指数仍低于 300 mmHg,灌注后各时间点 PaO₂ 与对照组和淡水组比较均有显著差异 ($P < 0.01$); PaCO₂ 亦逐渐下降,较淡水组变化更为显著,见表 1。

表 1 各组动物不同时间点 pH、PaO₂、PaCO₂ 的变化

Tab 1 Changes of pH, PaO₂, and PaCO₂ at different moments in each group

($n=8, \bar{x} \pm s$)

Index	Group	Pre-drowning	Time after drowning <i>t</i> /min				
			0	30	60	120	180
pH	C	7.45±0.03	7.42±0.03	7.40±0.04	7.41±0.03	7.39±0.04	7.43±0.04
	F	7.43±0.03	7.45±0.02	7.47±0.04	7.45±0.03	7.43±0.03	7.40±0.03
	S	7.44±0.04	7.46±0.02	7.48±0.08	7.47±0.03	7.44±0.03	7.37±0.14
PaO ₂ p/mmHg	C	91.23±5.02	89.23±2.23	90.25±3.07	91.15±5.68	92.22±6.09	94.28±2.51
	F	91.88±8.58	76.32±6.38**	67.93±9.17**	78.87±13.92*	86.95±17.41	77.83±9.64**
	S	90.38±7.75	30.59±4.77**△△	41.01±4.93**△△	48.42±5.11**△△	59.19±11.65**△△	63.71±13.53**△△
PaCO ₂ p/mmHg	C	40.15±3.31	38.20±3.12	36.29±3.08	35.33±2.97	36.16±4.33	37.03±3.28
	F	39.73±2.99	35.56±4.28	31.30±4.49*	30.88±4.44*	29.63±3.50**	27.03±5.97**
	S	39.14±3.15	29.35±3.15**△△	27.35±3.99**	25.93±2.53**△△	24.87±4.38**△	28.73±9.05**

C:Control group; F:Freshwater-drowning group; S:Seawater-drowning group. 1 mmHg=0.133 kPa; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs C group; △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$ vs F group

2.3 血清中炎症因子 TNF-α、IL-6 水平测定 如表 2 所示,经方差分析和 SNK-*q* 检验,2 个灌注组灌注后血清 TNF-α、IL-6 均高于对照组,而海水灌注组

增高更显著,与淡水组有统计学差异 ($P < 0.01$)。结果表明气管内灌注液体对实验动物有损伤作用。

表 2 各组动物处理前后血清 TNF-α 和 IL-6 的变化

Tab 2 Changes of serum TNF-α and IL-6 at different moments in each group

[$n=8, \bar{x} \pm s, \rho_B / (\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1})$]

Index	Group	Pre-drowning	Time after drowning <i>t</i> /min	
			60	180
TNF-α	C	238.35±11.09	241.77±14.11	270.39±9.07
	F	268.31±16.38	338.31±19.81*	344.10±16.27*
	S	242.67±13.57	333.55±54.47*	447.76±42.94**△△
IL-6	C	545.74±28.63	566.74±36.17	556.57±31.91
	F	539.33±19.57	611.23±9.80**	701.37±26.54**
	S	553.96±25.39	885.83±37.47**△△	812.79±43.70**△△

C:Control group; F:Freshwater-drowning group; S:Seawater-drowning group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs C group; △△ $P < 0.01$ vs F group

2.4 BALF 中细胞数及细胞分类 实验终点处死动物,行支气管肺泡灌洗,见淡水组灌洗液呈洗肉水样,混浊,处理后细胞计数,镜下细胞形态破坏,仅见大量细胞碎片,离心后见视野内大量均匀深染细胞,但未见细胞核,无法进行细胞分类;而海水组灌洗液色淡、混浊,有较多白色絮状分泌物悬浮,镜下细胞分类可见较多中性粒细胞和淋巴细胞;对照组灌洗液则较清亮,细胞分类以巨噬细胞为主,并可见少量淋巴细胞(表 3)。

2.5 肺组织湿/干质量比及肺泡通透性的比较 如表 4 所示,海水组肺组织湿/干质量比、肺泡通透指

数均高于其他 2 组 ($P < 0.05$)。而淡水组与对照组比较无明显差异。

2.6 肺病理组织学改变

2.6.1 大体标本 对照组兔肺表面呈均匀的淡粉红色,无出血,切面无液体渗出(图 2A,2B)。淡水组兔肺表面可见点状暗红色区和出血区,低垂部位病变较明显,切面呈淡红色,挤压时有少量粉红色液体渗出(图 2C,2D)。海水组兔肺体积明显大于其他 2 组,肺组织饱满,可见片状暗红色区及出血区明显多于淡水组,以低垂部位为著,切面挤压时渗出较多粉红色泡沫样物质,较淡水组颜色淡(图 2E,2F)。

表3 各组实验动物 BALF 中细胞数及细胞分类

Tab 3 Cell population and classification in BALF in each group

(n=8, x̄±s)

Group	Cell population(×10 ⁴ /L)	Classification(%)		
		Macrophage	Neutrophil	Lymphocyte
C	48.25±22.10	92.67±1.53	0	7.33±1.55
S	162.75±52.33**	65.00±1.00**	20.667±9.018**	13.67±8.51**

C: Control group; S: Seawater-drowning group. ** P<0.01 vs C group

表4 各组实验动物肺湿/干质量及肺微血管通透指数

Tab 4 Ratios of wet/dry lung mass and permeation indices of pulmonary capillary in each group

(n=8, x̄±s)

Group	Wet/dry ratio	Permeation index
C	5.19±0.14	0.030±0.017
F	5.31±0.22	0.034±0.013
S	7.68±0.76*△	0.052±0.003*△

C: Control group; F: Freshwater-drowning group; S: Seawater-drowning group. * P<0.05 vs C group; △ P<0.05 vs F group

度<75%;4分:广泛且明显),分析结果如表5所示,灌注组与对照组比较,均有明显的间质水肿、充血和肺泡萎陷、出血等病理变化,以海水组变化显著,尤其在肺泡水肿、炎细胞浸润方面较淡水组明显加重(P<0.01)。

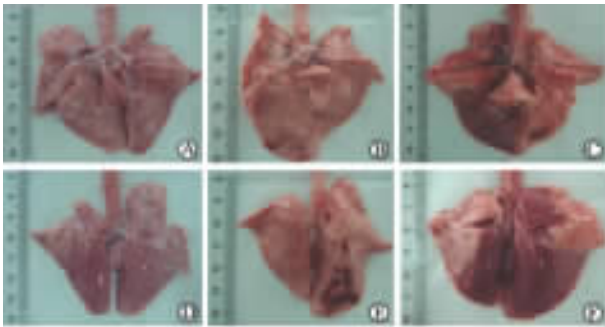


图2 各组动物肺大体标本

Fig 2 Lung appearance of each group

A, D: Control group; B, E: Freshwater-drowning group; C, F: Seawater-drowning group(up: normal ventralis; down: dorsal view)

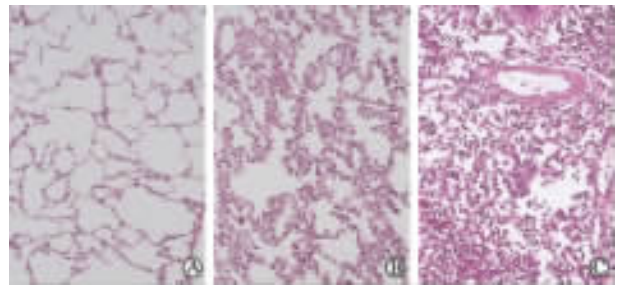


图3 各组动物肺组织病理学观察

Fig 3 Pulmonary histopathology of each group(H-E)

A: Control group; B: Freshwater-drowning group; C: Seawater-drowning group. Original magnification: ×100

3 讨论

2.6.2 H-E染色光镜所见 对照组肺间质无水肿,肺泡壁较薄,肺泡结构完整,无明显炎细胞浸润(图3A)。淡水组支气管上皮有脱落;间质充血、水肿明显,肺泡增厚,扭曲变形;局灶性肺泡萎陷,不张。肺泡腔内偶见少许炎细胞浸润和红细胞渗出,红染的蛋白性渗出物附着于肺泡壁(图3B)。海水组也可见支气管及血管上皮脱落;肺间质充血、水肿;肺泡壁增厚,广泛肺泡闭陷,呈片状不张。部分区域形成局灶性气肿;肺毛细血管充血扩张,肺泡腔内少量淋巴细胞,局灶见蛋白及红细胞渗出(图3C)。

2.6.3 肺组织病理评分 对各组实验动物肺组织病理学变化在间质水肿、间质充血、肺泡水肿、肺泡出血、炎细胞浸润及肺泡萎陷几方面进行评分(0:无;1分:轻度<25%;2分:中度<50%;3分:重

肺是淹溺后最先受损的器官,无论海水还是淡水进入呼吸道,都可以导致肺的损伤,对肺的损伤作用均包括两个方面:一方面是液体对肺的直接损伤作用,另一方面是由此导致的低氧血症、代谢性酸中毒以及机体炎症反应所引起的进一步肺损害^[3-6]。本研究通过向实验动物气管内灌注等量的海水和淡水,观察相关肺损伤指标,发现海水对呼吸生理的影响明显大于淡水,导致呼吸窘迫、发绀、双肺湿啰音,严重低氧血症,达到ALI标准,而等量淡水灌注并不能达到ALI标准;海水组炎症因子TNF-α、IL-6的水平也高于淡水;海水淹溺组肺大体标本充血水肿明显,肺湿/干重比、微血管通透指数、病理积分等损伤指标均明显重于淡水组。

海水由于高渗特性,直接导致肺泡上皮细胞的损伤,并使毛细血管内的水分转移至肺间质和肺泡腔,造成肺泡内水分增多。海水还可以直接造成毛细血管内皮损伤、通透性增高。肺泡上皮及血管内皮损伤的结果导致呼吸膜受损,造成肺通气和弥散功能障碍,出现低氧血症、代谢性酸中毒。肺泡上皮

细胞受损使肺泡表面活性物质合成减少、功能下降, 导致肺顺应性下降, 肺泡萎陷、不张, 肺泡呼吸面积

减少, 加之肺泡内液体积聚影响氧合, 导致通气/血流比例失调, 组织缺氧、代谢紊乱^[6-7]。

表5 各组实验动物肺组织病理评分

Tab 5 Pathological scores of lung tissue in each group

(n=8, $\bar{x} \pm s$)

Group	Interstitial edema	Interstitial congestion	Alveolar edema	Alveolar hemorrhage	Inflammatory infiltration	Alveolar collapse
C	0.15±0.10	0	0.10±0.09	0.05±0.05	0.23±0.05	0.18±0.05
F	1.70±0.35**	1.90±0.12**	0.30±0.16	0.18±0.10**	0.20±0.16	1.35±0.19**
S	1.30±0.60**	2.00±0.16**	0.93±0.48**△	0.20±0.06**	2.50±0.58**△△	1.55±0.57**

C: Control group; F: Freshwater-drowning group; S: Seawater-drowning group. ** $P < 0.01$ vs C group; △△ $P < 0.01$ vs F group

淡水淹溺进入气道的是低渗液体, 进入气道后向渗透压较高的肺泡上皮细胞内渗透, 直接导致上皮细胞肿胀^[5], 甚至崩解破裂。此外, 肺毛细血管内皮细胞亦同样受到渗透压的影响而出现结构和功能的破坏, 造成肺通气和弥散功能障碍, 出现低氧血症、代谢性酸中毒。

尽管淡水与海水对肺毛细血管上皮、肺泡上皮细胞等的直接损伤作用机制不同, 但均引起低氧血症, 并且以海水组变化显著、持久。此外, 由于呼吸频率增快, 出现过度通气, 加之代谢性酸中毒的存在, 结果导致低碳酸血症。两组比较, 仍以海水灌注所致影响更大。

TNF- α 、IL-6 是肺损伤时的主要致炎因子, 通过对血清中两种炎症因子的测定可以看出, 海水和淡水灌注均可以引起机体炎症反应, 导致 TNF- α 、IL-6 等炎症因子水平增加, 加重肺组织的继发性损害^[5,8]。两组比较, 仍以海水组影响较大。

灌洗液细胞计数和分类、肺泡通透指数、肺组织湿/干质量比均显示了肺内炎症反应和肺损伤的程度以及肺泡毛细血管通透性的变化, 结果显示, 海水组与淡水组有显著差别, 海水组炎细胞渗出明显增多, 肺泡通透性增高, 肺组织含水量增加。而淡水组肺泡通透指数、肺组织湿/干重比与对照组均无明显差异。此外, 淡水组灌洗液与海水组有显著差别, 外观表现为血性, 显微镜下见细胞大量崩解、破碎, 染色后证实细胞结构破坏, 无细胞核, 分析其原因可能是由于淡水的低渗特性, 注入肺内后, 由于渗透压低, 受压力梯度影响, 导致细胞内水肿, 继而出现细胞崩解破裂。

从肺大体标本和肺组织病理分析可以看出, 海水组肺充血水肿明显重于淡水组, 体积、重量明显增大, 海水组在各项评分中均较淡水组损伤重, 尤以肺泡水肿、炎细胞浸润为甚。而淡水组则在间质水肿方面略重于海水组, 与灌注液体渗透压有关。海水

为高渗液体, 注入肺内后, 导致肺泡上皮细胞内液体外渗, 细胞体积相对缩小, 而肺泡腔内液体渗出增多, 导致肺泡水肿液积聚; 肺泡通透性增加, 导致炎细胞大量渗出到肺泡腔。而淡水由于低渗性, 导致肺泡上皮细胞内水含量增多, 因此肺泡隔明显增宽、变厚, 镜下显示肺泡隔较为透明、含水量明显增加, 而肺泡腔内水肿不明显; 此外, 肺泡腔内炎细胞浸润不明显, 一方面考虑该剂量淡水对肺泡通透性影响较小, 另一方面与低渗透压导致细胞破坏有关。

综上所述, 相同量海水和淡水气管内注入淹溺比较, 海水对呼吸、循环、肺病理损伤和病理生理方面的影响均明显大于淡水, 海水导致肺损伤的程度更重, 病情进展快。通过该项研究, 更加深了对海水淹溺肺损伤机制的认识。

[参考文献]

- [1] Salomez F, Vincent J L. Drowning: a review of epidemiology, pathophysiology, treatment and prevention[J]. Resuscitation, 2004, 63: 261-268.
- [2] Orłowski J P, Abulleil M M, Phillips J M. The hemodynamic and cardiovascular effects of near-drowning in hypotonic, isotonic, or hypertonic solutions[J]. Ann Emerg Med, 1989, 18: 1044-1049.
- [3] 韩志海, 段蕴铀, 刘于红, 冯华松, 张志诚, 姜涛, 等. 海水淹溺致急性肺损伤兔模型的建立[J]. 海军总医院学报, 2007, 20: 132-135.
- [4] 王莉琴, 徐建国, 李伟彦. 己酮可可碱对淡水淹溺后肺粘附分子表达的影响[J]. 临床麻醉学杂志, 2003, 19: 545-549.
- [5] 古妙宁, 肖金仿, 黄毅然, 傅卫军, 林春水, 周伟, 等. 海水和淡水直接肺损伤作用的比较[J]. 中华麻醉学杂志, 2003, 23: 608-612.
- [6] 董文度, 赵增荣, 张敏华, 王琰, 袁驾南, 刘虹, 等. 兔海水淹溺肺水肿时肺损伤及其机理研究[J]. 中华航海医学杂志, 1998, 5: 16-19.
- [7] 韩志海, 段蕴铀, 刘于红. 海水淹溺致急性肺损伤兔病理学特征实验观察[J]. 国际呼吸杂志, 2008, 28: 1109-1111.
- [8] 傅卫军, 古妙宁, 陈仲清, 肖金仿, 黄毅然, 周伟, 等. 海水型呼吸窘迫综合征犬模型的实验研究[J]. 第一军医大学学报, 2004, 24: 665-669.

[本文编辑] 孙岩