

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.05.0626

• 海洋军事医学 •

潜水减压病猪模型的建立及评估

庆 龙[△], 衣洪杰[△], 周 全, 王晔炜, Dinesh Kshemendra Ariyadewa, 徐佳俊, 徐伟刚*

第二军医大学海军医学系潜水医学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 建立潜水减压病(DCS)猪模型,用于应用基础研究。**方法** 选用6头巴马小型猪,采用DWC150型动物实验舱模拟潜水方案处理,以压缩空气加压至600 kPa,停留30 min后,以600~500 kPa 1 min、500~400 kPa 1.5 min、400~300 kPa 2 min、300~200 kPa 2.5 min、200~100 kPa 3 min的方案减压。用动物跑步机评测肢体运动功能,诱发电位仪检测脊髓诱发电位联合确定DCS脊髓损伤;超声评估右心气泡量和心肺功能;观察皮肤症状演变并检测血液指标。通过整体行为学、组织病理学、循环和神经生理学、气泡生成、炎症反应等方面筛选建立评估指标体系。**结果** 模型DCS发病率100%,死亡率0%。运动功能和诱发电位在减压前后发生明显变化;超声检测出减压后静脉系统气泡量显著,肺动脉指标改变;同时出现典型皮肤损伤;白细胞、血小板数量减少,D-二聚体量增高,肺、脊髓发生淤血、出血等病理改变。上述各类指标能够客观反映模型损伤,可以组成衡量模型发病的评估体系。**结论** 巴马猪是制备DCS大动物模型的理想动物。

[关键词] 减压病;动物模型;巴马猪**[中图分类号]** R 845.21 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)05-0626-05

Establishment and evaluation of a swine model of diving decompression sickness

QING Long[△], YI Hong-jie[△], ZHOU Quan, WANG Ye-wei, Dinesh Kshemendra Ariyadewa, XU Jia-jun, XU Wei-gang*

Department of Diving Medicine, Faculty of Naval Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To establish a swine model of diving decompression sickness (DCS) for applied basic research. **Methods** Six Bama miniature pigs underwent a simulated diving in DWC150 animal chamber with the profile of 600 kPa (30 min) exposure, followed by 600-500 kPa (1 min), 500-400 kPa (1.5 min), 400-300 kPa (2 min), 300-200 kPa (2.5 min) and 200-100 kPa (3 min) decompression. The limb motor function was detected by animal treadmill and the evoked potential of spinal cord was tested jointly to evaluate spinal cord injury of DCS. The amount of bubbles and cardio-pulmonary function were assessed by ultrasonography. The evolution of skin symptoms was observed and blood index was collected. A set of evaluating parameters were screened considering the overall behavior, histopathology, circulation and neurophysiology, bubble generation and inflammation response. **Results** The DCS incidence was 100% (6/6) in the present research and there was no animal death. Evoked potential and motor function underwent significant change after decompression. Cardiac ultrasonography detected substantial amount of bubbles in the venous system and the pulmonary artery index was changed. Typical skin lesions appeared. White blood cells and platelets were reduced, and the amount of D-dimer was increased. Congestion and bleeding were noticed in the lung and spinal cord. The changes of the above indicators could objectively reflect the DCS injuries, and could be used to set up an evaluation system for swine model of DCS. **Conclusion** Bama miniature pigs are ideal animals for DCS modelling.

[Key words] decompression sickness; animal models; Bama pigs

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(5): 626-630]

减压病(decompression sickness, DCS)是机体因所在环境气压的降低速度过快和幅度过大导致气压变化前已经溶入体内的生理惰性气体超过了饱和和极限,形成气泡而引起的症状和体征^[1]。DCS

防治是各类水下活动的核心问题。相对于普通临床疾病,DCS的发生条件特殊、病例数极少,因此其机制和防治研究更加依赖于动物模型。已有许多种类的小动物被应用于DCS实验研究,特别是小鼠和大

[收稿日期] 2016-03-25 **[接受日期]** 2016-04-27**[基金项目]** 第二军医大学“深蓝计划”项目(2014JS05)。Supported by Deep Blue Project of Second Military Medical University (2014JS05)。**[作者简介]** 庆 龙,硕士生, E-mail: qinglong312@163.com;衣洪杰,硕士生, E-mail: hongjieyi@163.com[△]共同第一作者(Co-first authors)。

*通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-81871141, E-mail: wg_hsu@163.com

鼠,其价格低廉且针对它们的分子生物学研究手段较为齐全,在需要较多例数观察发病率和死亡率、初步评价效应以及在机制探索时多被采用。但是,小动物的基因和生理构造与人类差别较大,在深入观察新型防治措施效果、机制或者在新技术应用于人体前,需要借助大动物模型。在非灵长类动物中,猪在基因水平、解剖结构和生理特征上与人类较为相近,特别是心血管系统、呼吸系统、皮肤组织和脊髓等与DCS发生密切相关的系统^[2]。因此,早在1974年猪就被用于DCS研究^[3]。然而,普通猪体形庞大,给模型制备和指标观测带来相当大的不便。巴马猪是我国人工培育的唯一小型猪,遗传背景明确,生理指标稳定、重现性好,是理想的DCS大动物模型。本研究旨在制备DCS巴马猪模型,并建立系统、全面的评价指标体系。

1 材料和方法

1.1 实验动物 5个月龄普通级巴马小型猪6头,由上海市甲干生物科技有限公司[SCXK(沪)2015-0005]提供,体质量(22.15±1.68)kg,饲养于第二军医大学实验动物中心,在实验操作前适应5d,每日按2%体质量给予标准猪粮,自由饮水。本研究获得第二军医大学伦理委员会批准。

1.2 实验系统 DWC150型动物实验舱,上海701所杨园医用氧舱厂。电控动物跑步机(YSC600,河南坤钰贸易商行),速度1.0~20 km/h可控。WATOEX-20VET型兽用呼吸麻醉机,深圳迈瑞生物科技有限公司。PM-900VET兽用心电监护仪,深圳迈瑞生物科技有限公司。NDI-094肌电图诱发电位仪,上海海神医疗电子仪器有限公司。MyLab30CV超声检测仪,意大利百胜集团公司,配有PA230E心脏探头。

1.3 高压暴露

1.3.1 加压 以压缩空气加压。速率:100~200 kPa,50 kPa/min;200~360 kPa,80 kPa/min;360~600 kPa,120 kPa/min。所用压强单位均表示绝对压。

1.3.2 稳压 在600 kPa停留30 min,持续低流量通风,防止舱内CO₂蓄积,每5 min检测O₂浓度1次,舱内温度维持在23~25℃。

1.3.3 减压 以600~500 kPa 1 min、500~400 kPa 1.5 min、400~300 kPa 2 min、300~200 kPa 2.5 min、200~100 kPa 3 min的方案减压。

1.4 观测指标

1.4.1 行为学 出舱后2 h、6 h和24 h,置动物于

跑步机上,能够站立者逐步增加速度,直到不能继续或者最高完成1.6 km/h持续5 min为止。暴露前2 d完成动物跑步机适应。

1.4.2 皮肤表现 高压暴露出舱后观察动物的皮肤变化,包括皮损出现时间、皮损面积、颜色变化和主要损伤部位。

1.4.3 气泡量 高压暴露后20、40、60、90、120 min和3 h、4 h、6 h超声检测流经右心室的气泡量1 min,录像并计数。

1.4.4 肺动脉血流指标 在每次探测完气泡后,以超声仪测量肺动脉血流和压力变化。

1.4.5 血液指标 高压暴露前和暴露后6 h取静脉血5 mL,检测血常规、血生化和凝血等指标。

1.4.6 诱发电位 高压暴露前和暴露后6 h,给予速眠新、丙泊酚后以异氟烷维持麻醉,检测脊髓感觉诱发电位。

1.4.7 组织病理检测 在24 h检测运动功能后,氯胺酮过量麻醉致死,解剖观察肺脏和脊髓大体病理学。取组织,10%甲醛溶液固定,制成H-E染色切片,显微镜下观察。

1.4.8 肺湿干质量比 取右肺部分组织,在冰生理盐水中漂洗去除表面残血,用滤纸吸干肺表面,称湿质量;放置60℃烤箱内连续烘烤48 h,称干质量。计算湿干质量比。

1.5 模型评估指标体系

1.5.1 半定量指标及权重 根据动物在高压暴露快速减压后的一系列指标,筛选了以下5大类半定量指标,并根据各指标的发生机制,定义了权重。各指标的权重赋值只限于同类别指标之间的比较,不同类别之间的赋值大小没有可比性。

(1)行为学指标:主要为肢体运动功能评测,根据Tarlov评分^[4]改良后分级。双后肢完全瘫痪为0分,双后肢只能稍微活动为1分,只能在帮助下站立为2分,能够站立但不能自然行走为3分,能行走但是速度达不到1.0 km/h为4分,能行走速度达到1.0~1.6 km/h但不能达到6分标准的为5分,能在1.6 km/h的速度下自然行走至少5 min为6分。

(2)血管内气泡:根据Eftedal-Brubakk评分规则^[5]赋值。无气泡为0分,偶尔的气泡为1分,每4次循环至少1个气泡为2分,每1次循环至少1个气泡为3分,连续的气泡、至少在整个画面中1个气泡/cm²为4分,无法辨认单个气泡为5分。

(3)肺脏显微病理:镜下观察肺组织H-E染色切片,每个组织标本检查10个镜下视野(200×),根

据肺泡和间质炎症、出血、水肿、肺不张和坏死情况赋值,25%视野损伤为1,50%视野损伤为2,75%视野损伤为3,弥漫性损伤为4^[6-7]。

(4)脊髓显微病理:参照 Towfighi 等所描述的方法进行适当改良^[7-8],400×视野下观察脊髓组织 H-E 染色切片。神经元的损伤主要有变性和坏死,变性指组织切片为嗜伊红染色增强或呈细网状改变,赋值1;坏死指组织切片见小圆形空泡密集或小圆形空泡呈相互融合,组织结构模糊或消失,细胞核形态改变,浓缩或破裂,赋值5。脊髓白质出现轻度稀疏,神经纤维排列不整齐,为轻度病变,赋值1;若出现严重稀疏,神经纤维排列不整齐,有凝固性坏死和囊腔形成,则为重度病变,赋值2。

(5)皮肤表现:根据皮损面积赋值,斑、丘疹超过体表面积50%为5分;超过体表面积25%但不足50%为4分;超过体表面积10%但不足25%为3分;斑、丘疹明显但小于体表面积的10%为2分;斑、丘疹轻微为1分;基本无表现为0分。

1.5.2 定量指标 包括:血常规、血生化和凝血指标,感觉诱发电位的潜伏期,肺动跨瓣压及血流速度,肺干湿质量比。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,重复测量资料采用重复测量资料方差分析,自身前后对照两组计量资料采用相关样本 *t* 检验,病理指标选用独立样本 *t* 检验。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 模型成功率 使用 6 头巴马猪制备 DCS 模型,全部发病,模型成功率 100%;无个体死亡。

2.2 模型评估指标的变化 表 1~4 具体列出了采用“600 kPa 暴露 30 min-10 min 减压”方案制备的 DCS 巴马猪模型各指标值。由表 1 可见,减压后 2、

6、24 h,脊髓运动功能受损,Tarlov 评分降低,与高压暴露前比较差异有统计学意义($P < 0.05$);皮损症状在减压后 2 h 和 6 h 较明显,与暴露前比较差异有统计学意义($P < 0.05$),24 h 基本消退。由表 2 可见,高压暴露后 24 h,肺和脊髓出现明显病理改变,肺湿干质量比增大,与正常对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。由表 3 可见,诱发电位潜伏期在减压后 6 h 延长,与暴露前比较差异有统计学意义($P < 0.05$);血液白细胞计数和血小板计数在高压暴露后 6 h 减少,凝血酶原时间延长,纤维蛋白降解产物和 D-二聚体升高,与暴露前比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。由表 4 可见,超声探测右心气泡,在减压后 4 h 内气泡量增多,与暴露前比较差异有统计学意义($P < 0.05$),6 h 偶见气泡;肺动脉瓣口流速和肺动脉跨瓣压在减压后有所降低,随着时间的延长又逐渐恢复。

表 1 巴马猪减压病模型 Tarlov 评分和皮损评分的变化

<i>n</i> =6, $\bar{x} \pm s$				
指标	高压暴露前	减压后 2 h	减压后 6 h	减压后 24 h
Tarlov 评分	6±0	3.67±0.47*	4.17±0.37*	4.66±0.47*
皮损评分	0±0	3.33±0.74*	1.67±0.68*	0.17±0.37

* $P < 0.05$ 与高压暴露前比较

表 2 巴马猪减压病模型高压暴露后 24 h 肺和脊髓显微病理、肺湿干质量比的变化

<i>n</i> =6, $\bar{x} \pm s$				
组别	肺显微病理	脊髓显微病理		肺湿干质量比
		神经元	白质	
正常对照组	0±0	0±0	0±0	4.78±0.21
模型组	3.33±0.74*	2.33±1.88*	1.66±1.49*	5.91±0.28*

* $P < 0.05$ 与正常对照组比较

表 3 巴马猪减压病模型诱发电位和血液指标的变化

<i>n</i> =6, $\bar{x} \pm s$							
检测时间点	刺激胫神经诱发电位		血液主要变化指标				
	头部	第 1 腰椎	WBC	PLT	PT	FDP	D-D
	<i>t</i> /ms	<i>t</i> /ms	($\times 10^9, L^{-1}$)	($\times 10^9, L^{-1}$)	<i>t</i> /s	$\rho_B / (mg \cdot L^{-1})$	$\rho_B / (mg \cdot L^{-1})$
高压暴露前	22.35±1.05	8.87±0.55	13.79±5.36	421.38±43.21	10.97±0.57	1.03±0.09	0.78±0.32
减压后 6 h	26.41±1.57*	10.74±0.62*	9.80±3.62*	283.17±49.14*	12.36±0.53*	1.55±0.10*	1.98±0.79*

WBC: 白细胞; PLT: 血小板; PT: 凝血酶原时间; FDP: 纤维蛋白原降解产物; D-D: D-二聚体. * $P < 0.05$ 与高压暴露前比较

表4 巴马猪减压病模型超声检测气泡量、肺动脉瓣口流速和肺动脉跨瓣压的变化

n=6, $\bar{x} \pm s$

评价指标	高压暴露前		减压后 t/min							P
	20	40	60	90	120	180	240	360		
气泡量(EB评分)	0±0	5±0	5±0	5±0	4.50±0.50	3.33±0.47	1.83±0.69	0.50±0.50	<0.05	
流速 v/(m·s ⁻¹)	1.37±0.05	1.20±0.07	1.18±0.07	1.24±0.10	1.26±0.05	1.25±0.06	1.28±0.05	1.30±0.09	1.31±0.04	<0.05
跨瓣压 p/mmHg	7.48±0.60	5.81±0.57	5.67±0.71	6.20±0.62	6.41±0.44	6.27±0.71	6.53±0.58	6.71±0.51	6.90±0.61	<0.05

EB: Eftedal-Brubakk. 1 mmHg=0.133 kPa

3 讨论

3.1 猪 DCS 模型的优缺点 猪的心脏解剖结构和大小与人基本一致,外周血管构造、分布和血管内径大小也较为相近,这些对于研究气泡在循环系统内的生成、运动及损伤规律和效应有重要意义^[9]。猪肺与人分叶虽不同,但在气管支气管分支及肺泡构造上与人一致,其整个呼吸循环系统功能与人相近;而 DCS 气泡形成与呼吸循环功能密切相关。猪表皮和表皮厚度适宜,真皮层有人类相似的毛囊和胶原蛋白,且毛发稀疏,利于观察症状变化;同时,某些部位皮肤较厚、血管分布较少,没有小汗腺,对温度调节反应较差,使得 DCS 皮肤症状更易发生^[2]。猪脊髓和脑的大小、结构、血供、灰白质比例和功能与人类相当,使得神经系统症状具有良好的可比性。猪的新陈代谢也与人类相似,研究猪 DCS 药物防治措施时,其药理作用、药代动力学和毒性作用也具有很好的代表意义^[2, 9-10]。猪的体脂含量较高,更容易产生理想的 DCS 效应;但相同高压暴露方案导致的 DCS 发病率和严重程度会稍高于人类,在研究新的减压方案时,应考虑这一差异。国内有研究者制备过猪 DCS 模型,但主要针对血管功能、行为学或血液学指标进行观察^[11-13],没有系统探讨评估指标体系,也没有深入分析模型制备的各要素。

3.2 模型 DCS 严重程度的确定 由于 DCS 研究有机机制探讨、继发炎症反应、致病气泡分布以及预防和治疗方法探索等不同目的,所以对于模型发病的严重程度要求不同。总体规律是高压暴露的压力越高、时程越长、减压速率越快,病情越严重^[14]。由于 DCS 模型存在很大的品系和个体差异,只能通过一定数量的重复来制备某一目标严重程度的模型,具体方案根据期望的发病率由文献数据和预实验摸索确定。发病率(通常以行为学评判)和死亡率是重要的终末指标,但要在率上得出统计学差异,每组需

要的样本量会很多。因此,在小动物模型研究中可更多地采用率指标,而包括猪在内的大动物模型可更多地采用生化指标、气泡生成、心血管和神经功能等无创或微创等指标,以尽可能控制模型的死亡率,降低必须采用的动物样本量。

本研究预期制备的巴马猪 DCS 模型需要发病率高、死亡率低,国外相似体质量猪的 DCS 造模方案虽有明显 DCS 症状,但有较高死亡率^[15-16],本研究采用“600 kPa 暴露 30 min-10 min 减压”方案,通过降低减压速度以减少死亡率,结果表明行为学发病率达 100%,且没有动物死亡,所以此方案非常适合体质量 22 kg 左右的巴马猪。推测暴露的压强低些、时间长些,或者压强高些或时间长些但减压速率慢些,也能达到同样效果。具体发病率和死亡率,可根据研究中所施加的防治措施的有效性适当调整。但对于空气暴露,500~600 kPa 压强比较合适,更高会有明显的氮麻醉效应。

猪 DCS 模型制备中主要影响因素和人类 DCS 发生的影响因素类似。首先是体质量,需要严格控制。其次是动物的状态,状态差者症状严重,因此应严格按标准控制饲养条件和搬运等操作。高压暴露过程及出舱后的环境温度也是影响发病程度的重要因素。加压、稳压阶段环境温度高,而减压或减压后阶段温度低,会加剧病情。动物加压舱最好有温控系统,否则减压过程舱内温度容易降低过多。

3.3 模型指标的选择 和人类 DCS 一样,猪 DCS 可按照症状分为 I 型和 II 型。但动物由于缺乏自主表达能力,主要依据客观表现区分。I 型症状较轻,主要表现为皮肤症状和肢体疼痛,后者主要通过步态和肌力综合判断;II 型症状较严重,包括强烈肢体疼痛和心肺、神经系统表现^[17]。由于依据症状的判断具有主观、粗糙的缺点,在评估时需要更具体、客观的指标体系。

气泡是 DCS 的致病因子,通过多普勒或二维超

声技术探测右心系统内气泡量,是评估DCS的最客观指标。血管内气泡会导致内皮损伤,激活凝血、炎症和免疫等反应,导致一系列指标的改变,都可反映疾病严重程度。

肺是DCS气泡靶器官,血管内气泡最终通过右心多数被阻滞在肺毛细血管网系统内,导致一系列损伤。除了出现肺组织水肿等病理改变外,还可能会出现肺动脉高压;气泡流经右心及肺动脉时,还可能造成这些部位的损伤;最终导致右心功能异常。

中枢神经系统特别是脊髓,也是DCS气泡重要的损伤部位。重症模型常会出现脊髓功能受损的行为学表现。Tarlov评分是常用的肢体功能评价指标,反映脊髓丘脑的运动通路功能完整性^[4, 16, 18]。诱发电位作为更加敏感的指标,可检测脊髓通路完整性。

综上所述,本研究成功建立了猪DCS模型,并建立了系统的评价指标体系。通过选择全部或者部分指标可以在今后的预防或处置措施研究中客观评价效果。同时,该模型也为深入研究DCS发生机制奠定了基础。

[参考文献]

[1] Vann R D, Butler F K, Mitchel S J, Moon R E. Decompression illness[J]. *Lancet*, 2011, 377: 153-164.

[2] Swindle M M, Makin A, Herron A J, Clubb F J Jr, Frazier K S. Swine as models in biomedical research and toxicology testing[J]. *Vet Pathol*, 2012, 49: 344-356.

[3] Powell M R, Doebbler G F, Hamilton R W Jr. Serum enzyme level changes in pigs following decompression trauma[J]. *Aerosp Med*, 1974, 45: 519-524.

[4] Malkevich N, McCarron R M, Mahon R T. Decompression from saturation using oxygen: its effect on DCS and RNA in large swine[J]. *Aviat Space Environ Med*, 2010, 81: 15-21.

[5] Eftedal O, Brubakk A O. Agreement between trained and untrained observers in grading intravascular bubble signals in ultrasonic images[J]. *Undersea Hyperb Med*, 1997, 24: 293-299.

[6] Jeng M J, Kou Y R, Sheu C C, Hwang B. Effects of partial liquid ventilation with FC-77 on acute lung injury in newborn piglets[J]. *Pediatr Pulmonol*, 2002, 33: 12-21.

[7] Towfighi J, Mauger D, Vannucci R C, Vannucci S J. Influence of age on the cerebral lesions in an immature

rat model of cerebral hypoxia-ischemia: a light microscopic study[J]. *Brain Res Dev Brain Res*, 1997, 100: 149-160.

- [8] 范丹峰,康志敏,张荣佳,蔡志宇,徐伟刚. 空气潜水减压病大鼠模型的建立[J]. *环境与健康杂志*, 2009, 26: 1018-1020.
- [9] Walters E M, Prather R S. Advancing swine models for human health and diseases[J]. *Mo Med*, 2013, 110: 212-215.
- [10] Douglas W R. Of pigs and men and research: a review of applications and analogies of the pig, *Sus scrofa*, in human medical research[J]. *Space Life Sci*, 1972, 3: 226-234.
- [11] 朱祥祺,李斌,姜峰,李慈,蒋凌波,马征. 模拟潜水引起的小型猪骨髓压变化[J]. *中国病理生理杂志*, 2003, 19: 845-846.
- [12] 冀仲义,袁锦富,雷呈祥,胡开元,王庆蓉. 建立减压病动物模型的研究[J]. *航天医学与医学工程*, 2006, 19: 99-101.
- [13] 程国光,甘世祥,朱祥祺,钮燕. 小型猪作为减压病动物模型的研究[J]. *中国实验动物学杂志*, 1996, 6: 197-200.
- [14] Dromsky D M, Toner C B, Survanshi S, Fahlman A, Parker E, Weathersby P. Natural history of severe decompression sickness after rapid ascent from air saturation in a porcine model[J]. *J Appl Physiol* (1985), 2000, 89: 791-798.
- [15] Mahon R T, Cronin W A, Bodo M, Tirumala S, Regis D P, Auker C R. Cardiovascular parameters in a mixed-sex swine study of severe decompression sickness treated with the emulsified perfluorocarbon Oxycyte[J]. *J Appl Physiol* (1985), 2015, 118: 71-79.
- [16] Mahon R T, Auker C R, Bradley S G, Mendelson A, Hall A A. The emulsified perfluorocarbon Oxycyte improves spinal cord injury in a swine model of decompression sickness[J]. *Spinal Cord*, 2013, 51: 188-192.
- [17] Mahon R T, Dainer H M, Gibellato M G, Soutiere S E. Short oxygen prebreathe periods reduce or prevent severe decompression sickness in a 70-kg swine saturation model[J]. *J Appl Physiol* (1985), 2009, 106: 1459-1463.
- [18] Mahon R T, Watanabe T T, Wilson M C, Auker C R. Intravenous perfluorocarbon after onset of decompression sickness decreases mortality in 20-kg swine[J]. *Aviat Space Environ Med*, 2010, 81: 555-559.