

急性肺损伤新生猪不同机械通气治疗 对肺泡 II 型上皮细胞的影响

姜凤朝, 朱伟, 郑淑香

广东省第二人民医院儿科, 广东 广州 510317

摘要: 目的 研究急性肺损伤(ALI)新生猪机械通气治疗对肺泡 II 型上皮细胞(AEC II)病理结构的影响。**方法**

选择 24 只出生 3 d 左右的新生健康猪,麻醉后均实施相同参数、相同模式的机械通气模式(控制性压力通气),并支气管灌洗 9 g/L NaCl 进行造模。造模后随机分为 4 组:对照组,HFOV 组、CMV 组和 PLV 组,每组 6 只。对照组 ALI 新生猪不实施机械通气,其余 3 组 ALI 新生猪分别实施高频振荡通气(HFOV)、常频机械通气(CMV)、部分液体通气(PLV) 24 h 以观察不同通气模式对 ALI 新生猪 AEC II 病理结构的影响。所有 ALI 新生猪机械通气 24 h 后在过度麻醉下注入 60 g/L KCl 使其自然死亡,取完整肺脏,制备电镜样本,免疫荧光法观察 AEC II 结构。比较各组相应时间段的血气分析指标:氧合指数(OI)值及 $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ (P/F)值。**结果** HFOV 组、CMV 组和 PLV 组机械通气治疗后 P/F 值、OI 值与对照组比较差异无统计学意义(P 均 >0.05)。免疫荧光图像显示,对照组的 AEC II 呈椭球状,出现局部空泡化,且基质排布较疏松;CMV 组 AEC II 形状排布不规整,体积呈变小趋势;HFOV 组 AEC II 结构比较规整,没有出现较大空泡化;PLV 组 AEC II 排布十分规整,无较大空泡化。HFOV 组、CMV 组和 PLV 组的 AEC II 面积、数量和荧光密度与对照组比较差异均有统计学意义(P 均 <0.05)。PLV 组 AEC II 数据明显多于 CMV 组和 HFOV 组,且荧光密度也明显高于 CMV 组(P 均 <0.05)。**结论** 不同通气方式对 AEC II 影响不同,CMV 对 AEC II 损伤最重,PLV 对 AEC II 损伤最轻,证明通过适当调整通气方法,可以有效减轻对 AEC II 细胞造成的损伤。

关键词: 急性肺损伤; 机械通气; 肺泡 II 型上皮细胞; 病理结构

中图分类号: R 563.8 文献标识码: B 文章编号: 1674-8182(2017)03-0387-04

Impact of different mechanical ventilation therapy on alveolar type II epithelial cells in neonatal pigs with acute lung injury

JIANG Feng-chao, ZHU Wei, ZHENG Shu-xiang

Department of Pediatrics. Guangdong No. 2 People's Hospital, Guangzhou, Guangdong 510317, China

Abstract: Objective To study the influences of different mechanical ventilation mode on the pathological structure of alveolar epithelial cell type II (AEC II) in neonatal pigs with acute lung injury (ALI). **Methods** Twenty-four healthy neonatal pigs born about 3 days were selected. In all neonatal pigs, mechanical ventilation of same parameter value and same mode (controlled pressure ventilation) after anesthesia and lavaging 9 g/L NaCl via bronchi were performed to establish ALI models. After modeling, the ALI neonatal pigs were randomly divided into four groups ($n=6$ each): control group, HFOV group, CMV group and PLV group. In control group, mechanical ventilation was not performed. In HFOV group, CMV group and PLV group, high frequency oscillatory ventilation (HFOV), constant frequency mechanical ventilation (CMV) and partial liquid ventilation (PLV) for 24 hours were respectively performed to observe the influence of different mechanical ventilation mode on pathological structure of AEC II. Under excessive anesthesia, injection of 60 g/L KCl was given after mechanical ventilation for 24 hours to cause natural death in all ALI neonatal pigs, then whole lung was taken, and electron microscope sample was prepared to observe the changes of AEC II structure with immunofluorescence method. The gas analysis indexes such as oxygenation index (OI) value and arterial oxygen partial pressure/ fraction of inspire O_2 ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, P/F) value were compared in corresponding time points among four groups. **Results** The P/F values and OI values after mechanical ventilation therapy in HFOV group, CMV group and PLV group were all similar with control group (all $P > 0.05$). After mechanical ventilation treatment, immunofluorescence image displayed that in control group, AEC II appeared ellipsoid shape, local cavitation and the matrix of loose arrangement; in CMV group, AEC II appeared irregular shape and ar-

rangement and a minifying trend of volume; in HFOV group, AEC II appeared relatively regular structure without larger vacuolization; in PLV group, AEC II appeared very neat arrangement without larger vacuolization. There were significant differences in AEC II area, AEC II number and AEC II fluorescent density for the comparison of control group with HFOV group, CMV group and PLV group (all $P < 0.05$). The AEC II count in PLV group was significantly higher than that in CMV group and HFOV group, and the fluorescence density was significantly higher than that in CMV group (all $P < 0.05$). **Conclusion** Different ventilation methods have different influences on AEC II. The injury of CMV to AEC II is the most serious, while the injury of PLV to AEC II is the lightest, therefore proper adjustment of ventilation method can effectively reduce the damage to AEC II cells.

Key words: Acute lung injury; Mechanical ventilation; Alveolar type II epithelial cells; Pathologic structure

在机械通气过程中,其发挥治疗作用的同时,也会引起机械通气相关性肺损伤(VILI)。VILI指在使用呼吸机过程中,肺部原发病变与机械通气相关因素的相互作用而引发机体的肺组织发生系列损伤,是一种急性肺损伤(ALI),也是机械通气较为严重的一种并发症^[1-3]。近年来,由于对VILI的一些激发机制与对应的防治策略进行不断深入的研究,肺机械保护通气措施疗法引起极大的重视^[2-3]。据报道,VILI的发病率为接近35%,病死率高达31%^[4-5]。肺泡II型上皮细胞(AEC II)是VILI发生时的主要靶细胞,同时也是唯一修复VILI损伤的对应干细胞^[4-6]。本研究应用随机选择方案,对24只新生猪ALI造模后随机分组,分别实施常频机械通气(CMV)、高频振荡通气(HFOV)、部分液体通气(PLV)机械通气24 h,使用光学显微镜,荧光显微镜,透射电镜定性、定量观察AEC II病理结构的变化,探讨3种机械通气方法对AECH的影响。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选择40只出生3 d左右的新生健康猪,体质量1.00~2.00 kg,雌雄不限。

1.2 实验器械 Fluorescein Maclura Pomifera (M·pomifera) Lectin 2 g/L (VectorLabs, USA), MAQUET Servo-i 呼吸机(德国西门子), SLE5000 呼吸机(英国SLE LIMIT-ED), ELT-13V-85V34 超低温冰箱(美国HARRIS公司)。

1.3 ALI 动物模型制备 60 g/L 水合氯醛 0.001 L/kg 喂饲 1 h 后, 洁净新生猪皮肤, 安置在开放式保暖台进行保暖预准备, 实验过程保证实验对象正常体温(38 ℃)。肌肉注射地西洋注射液 0.0005 g/kg, 随后开放腋静脉, 静脉注射乌拉坦 0.6 g/kg 麻醉后, 行切气管, 安置 4 mm 导管气管, 接通呼吸机 MAQUET Servo-i, 控制压力通气, 对呼吸机设置相同参数: 呼吸频率(RR)范围为 30~35 次/min, 吸气的峰压(PIP)值为 2.4 kPa, 吸入氧的体积分数(FiO₂)值为 0.21, 呼气末正压通气(PEEP)的值为 0.6 kPa, 吸气时间与

呼气时间(I:E)之比为 1:2, 微调 RR, 令动脉血二氧化碳的分压(PaCO₂)维持的范围为 4.63~5.96 kPa。依据 Lachmann 等方法, 在 38 ℃ 下用 9 g/L 盐水(0.035 L/kg)支气管灌洗, 等动脉血氧分压(PaO₂) < 13.2 kPa 后, 再稳定 1 h, 便可确认 ALI 动物模型制备成功。

1.4 实验动物分组 ALI 造模完成后, 将 24 只新生健康猪完全随机分为 4 组。(1)对照组($n=6$): 对 ALI 新生猪不实施机械通气, 在过度麻醉下, 注入过量 60 g/L 氯化钾使其自然死亡。(2)CMV 组($n=6$): 对 ALI 新生猪均连接 MAQUET Servo-i 呼吸机, 控制压力通气, 对呼吸机设置相同参数: FiO₂ = 1.0, RR 30 次/min, I:E = 1:2, PEEP = 0.4 kPa, PIP = 2.0 kPa, PaCO₂ 维持的范围为 4.63~5.96 kPa, 连续机械通气 1 d。(3)HFOV 组($n=6$): 对 ALI 新生猪采用 SLE5000 呼吸机, 呼吸机设置相同参数: FiO₂ = 1.0, f = 6 Hz, 振荡幅度 2.0~2.5 kPa, 呼吸道平均压(MAP)设置较 CMV 组大 0.2 kPa, 微调振荡幅度使 PaCO₂ 在 4.63~5.96 kPa 的范围, 连续机械通气 1 d。(4)PLV 组($n=6$): 经气管导管于 6 min 内注入全氟化碳(PFC) 0.018 L/kg (38 ℃)。同时注意 PFC 0.008 L/h 进行补充。连接 MAQUET Servo-i 呼吸机, 控制压力通气, 对呼吸机设置相同参数: FiO₂ = 1.0, RR 30 次/min, I:E = 1:2, PEEP = 0.4 kPa, PIP = 2.0 kPa, PaCO₂ 维持的范围为 4.63~5.96 kPa, 连续 PLV 1 d。最后, 实验期间不间断静脉注入多巴胺 0.002 g·kg⁻¹·h⁻¹ 和 1/4 左右的葡萄糖氯化钠注射液 0.12 L·kg⁻¹·d⁻¹, 另外间歇实施静脉注射地西洋、乌拉坦保障麻醉状态。每隔 2 h 检测分析 1 次血气, 并依据血气情况对呼吸机参数更新, 保证血气分析稳定。

1.5 观察指标

1.5.1 实验新生猪血气分析 ALI 新生猪造模制备前及制备完成后, 经插管股动脉取动脉血, 进行血气分析, 计算 ALI 新生猪造模前氧合指数(OI)值、机械通气治疗后 OI 值及 PaO₂/FiO₂(P/F)值: OI = MAP × FiO₂ × 60/PaO₂; P/F = PaO₂/FiO₂。

1.5.2 ALI 新生猪电镜样本制备 对照组的 ALI 新生猪不实施机械通气,在过度麻醉下,注入过量 60 g/L 氯化钾使其自然死亡。HFOV 组、CMV 组和 PLV 组经对应的机械通气治疗 1 d 后,在过度麻醉下,注入过量 60 g/L 氯化钾使其自然死亡。最后,快速剖开胸腔,提取完整肺脏。借助冷冻切片左肺,用蒸馏水稀释成 50% 浓度的包埋剂灌注,取 5 mm × 15 mm × 15 mm 的下肺,用锡纸保存,保存在 -70 °C 待查。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行分析,计数资料以 $n(\%)$ 表示,组间比较应用 χ^2 检验,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行两组 t 检验分析。多个样本比较采用单因素方差分析。多重比较采用 LSD 检验(方差齐)或 Dunnett- t 检验(方差不齐)。检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 ALI 新生猪模型制备过程中的灌洗次数及完成后的 P/F 值、OI 值比较 HFOV 组、CMV 组和 PLV 组的灌洗次数及模型制备完成后的 P/F 值、OI 值与对照组比较无明显差异(P 均 > 0.05)。见表 1。

2.2 4 组免疫荧光分析结果 对照组的免疫荧光图像显示 AEC II 呈椭球状,出现局部空泡化,且基质排布较疏松,CMV 组 AEC II 形状排布不规整,体积呈变小趋势;HFOV 组 AEC II 结构比较规整,没有出现较大空泡化;PLV 组 AEC II 排布十分规整,无较大空泡

化。见图 1。HFOV 组、CMV 组和 PLV 组的 AEC II 面积、数量和荧光密度分析与对照组比较差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。PLV 组 AEC II 面积低于 HFOV 组、CMV 组,数量和荧光密度均高于 HFOV 组、CMV 组(P 均 < 0.05);HFOV 组 AEC II 面积低于 CMV 组,数量和荧光密度均高于 CMV 组(P 均 < 0.05)。见表 2。说明 3 种机械通气方法均可导致 AEC II 细胞受损,CMV 通气对 AEC II 细胞损伤最重,而 PLV 通气最轻。

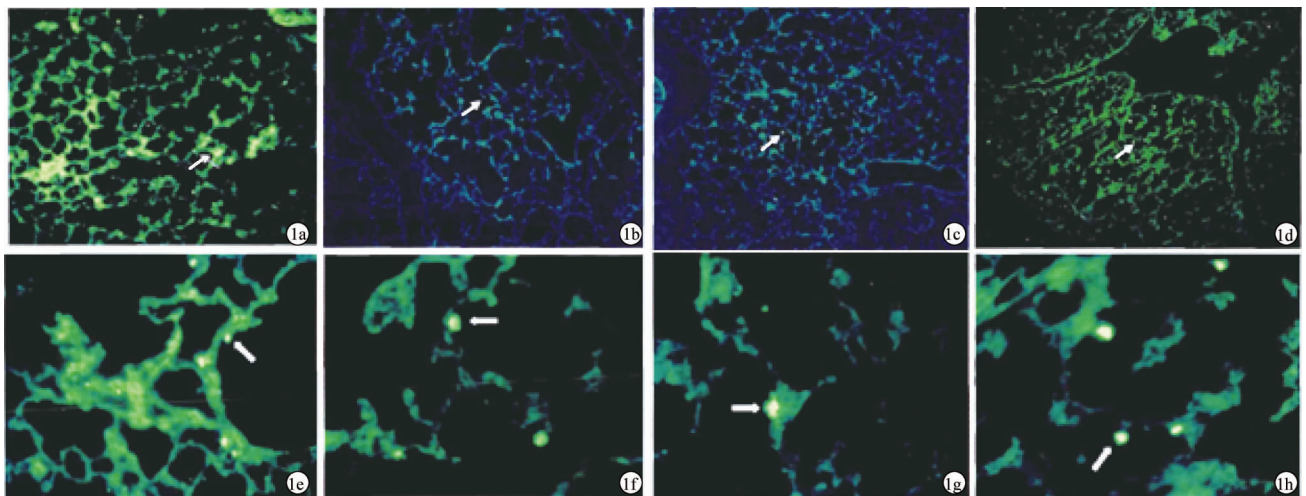
表 1 ALI 新生猪模型制备过程中的灌洗次数及机械通气治疗的 P/F 值、OI 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	ALI 数	灌洗次数(次)	P/F 值(kPa)	OI 值
对照组	6	17.65 ± 1.57	9.68 ± 0.66	17.88 ± 1.24
HFOV 组	6	18.63 ± 3.24	9.95 ± 0.59	18.01 ± 1.14
CMV 组	6	19.23 ± 4.19	6.02 ± 0.74	18.27 ± 1.37
PLV 组	6	17.82 ± 3.53	6.12 ± 0.57	17.87 ± 1.28
F 值		1.3721	1.2082	1.1571
P 值		0.2584	0.3049	0.3279

表 2 4 组免疫荧光分析结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	ALI 数	面积(像数)	低倍(个/视角)	荧光密度
对照组	6	220.04 ± 95.21	85 ± 7	1.638 ± 0.248
HFOV 组	6	328.57 ± 125.19 ^a	53 ± 6 ^a	1.646 ± 0.018 ^a
CMV 组	6	341.38 ± 47.39 ^{ab}	31 ± 6 ^{ab}	1.603 ± 0.139 ^{ab}
PLV 组	6	294.79 ± 68.58 ^{abc}	82 ± 8 ^{bc}	1.653 ± 0.019 ^{ac}
F 值		17.8329	4.0261	7.1742
P 值		0.0000	0.0124	0.0000

注:荧光密度 = 荧光强度/细胞面积;与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 HFOV 组比较,^b $P < 0.05$;与 CMV 组比较,^c $P < 0.05$ 。



注:1a~1d:分别为对照组、CMV 组、HFOV 组和 PLV 组免疫荧光低倍图像($\times 60$);1e~1h:分别为对照组、CMV 组、HFOV 组和 PLV 组免疫荧光高倍图像($\times 400$);其中箭头为 AEC II。

图 1 4 组 ALI 新生猪 AEC II 免疫荧光图像

3 讨论

由于生物功能肺泡的上皮细胞会出现不断的自我新陈代谢更新,主要究于其肺泡组织的干细胞作

用;通过 AEC II 不断更新代谢、分化来替换掉未分化细胞达到更新^[5-7]。ACE II 对 VILI 的变化过程发挥极其关键作用^[7-8]。怎样降低 AEC II 的诱变损伤,增强 VILI 自我修复功能,已经是研究 VILI 重中之

重^[9]。而 AEC II 的结构质量、形体数量可及时显示出肺损伤后自我修复功能的强弱。

M. pomifera 凝集素标记的蛋白能够容易识别 AEC II 表面固有的一种膜蛋白。而 AEC II 上特有的膜蛋白浓度能够反映 *M. pomifera* 凝集素荧光密度,随着 AEC II 的荧光密度的即时变化,能够显示 AEC II 细胞修复状态^[9]。AEC II 细胞发生损伤后相应的表面膜蛋白出现一定程度丢失或生成量降低,AEC II 就会出现局部水肿,对应体积增大,导致膜蛋白密度也相应较少,最终在显微镜下可看到细胞面积增大以及荧光密度降低^[10]。通过荧光素来标记 AEC II 形态及位置便能够准确鉴别 AEC II,再结合 AEC II 面积与荧光密度也可分析 AEC II 损伤程度^[11]。本实验通过对各组 ALI 新生猪的体质量及灌洗前 OI 值对比发现无明显差异,可比性好。

由于 HFOV 呈小 PIP、大 PEEP 等常见特点,作为肺自我保护性机械通气方法的模式,能降低气压伤。此外,HFOV 可以令肺泡容积扩张分散匀称,肺泡保证开放状态,有效降低肺泡在间歇开放与关闭下导致的应力对 AEC II 造成的额外损伤^[11-12]。有临床研究及动物实验显示 HFOV 能降低中性粒细胞集中和活化,降低机械通气引发的致炎细胞因子,从而最大程度降低炎症因子对 AEC II 造成的额外损伤^[13]。本研究发现 HFOV 组的荧光密度高于 CMV 组,且差异明显,说明 HFOV 组的 AEC II 细胞整体受损程度比 CMV 低,疗效较好。HFOV 组 AEC II 面积少于 CMV 组,AEC II 计数多于 CMV 组,可能与 HFOV 可以降低 AEC II 细胞的受损、凋亡有关。

目前,PLV 的肺自我保护机理尚未完全明了。但实施 PLV 后,发现肺部的中性粒细胞聚集现象明显降低,吞噬细胞也受到牵制,进而抑制炎症反应进一步发展恶化,达到保护肺泡作用^[13-14]。同时 PLV 可以改善肺泡通气状况,从而降低代谢性酸中毒与低氧血症,肺泡组织受损显著降低,代谢性物质发生炎症渗出量降低,炎症反应抑制^[14-16]。本研究实验发现,PLV 组 AEC II 数量明显多于 CMV 组和 HFOV 组,且荧光密度也明显高于 CMV 组,说明实施 PLV 可以有效降低 AEC II 细胞凋亡、损伤,比 HFOV、CMV 对 AEC II 造成的损伤轻。这说明实施 PLV 通气对 AEC II 细胞结构等功能影响最小。

综上所述,CMV 组、HFOV 组和 PLV 组的低倍镜 AEC II 视野计数与高倍镜 AEC II 面积(像素)和荧光密度的比较存在较大差异,表明这 3 种机械通气方法导致 AEC II 受损的程度差异较大,其中,CMV 对 AEC II 细胞损伤最重,而 PLV 最轻,证明通过适当调整通

气方法,可以有效减轻对 AEC II 细胞造成的损伤。

参考文献

- [1] 宋晓春,章淬,黄福华,等. 主动脉夹层(DeBakey I 型)手术深低温循环期间应用肺动脉灌注减轻肺损伤[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2015,35(3):390-392.
- [2] Najafi Atabak, Mojtahedzadeh Mojtaba, Ahmadi Keyvan, et al. The immunological benefit of higher dose N-acetyl cysteine following mechanical ventilation in critically ill patients[J]. DARU, 2014, 22(1):57.
- [3] 连祥基,喻文强,余革,等. 低剂量全氟化碳不同时点干预急性肺损伤实验兔对肺组织病理学的影响[J]. 广东医学,2015,36(17):2669-2672.
- [4] 田庆玲,张双,冯雪,等. 机械通气治疗儿童危重症甲型 H1N1 流感肺炎临床观察[J]. 中国妇幼保健,2012,27(7):1008-1010.
- [5] Nieman GF, Gatto LA, Habashi NM. Impact of mechanical ventilation on the pathophysiology of progressive acute lung injury[J]. J Appl Physiol, 2015, 119(11):1245-1261.
- [6] 戴长宗,王德明. 肺表面活性物质和机械通气相关性肺损伤的研究进展[J]. 实用医学杂志,2012,28(17):2972-2974.
- [7] 李韶辉,郑曦,余革,等. 不同剂量全氟化碳吸入预处理对急性肺损伤实验兔肺组织病理的影响[J]. 广东医学,2014,35(9):1332-1335.
- [8] 黄勇,郑青. 支气管肺发育不良患儿血浆及支气管肺泡灌洗液中 TGF- β 1 和 KL-6 水平变化的意义[J]. 广东医学,2014,35(12):1867-1871.
- [9] Lai TS, Wang ZH, Cai SX. Mesenchymal stem cell attenuates neutrophil-predominant inflammation and acute lung injury in an in vivo rat model of ventilator-induced lung injury[J]. Chin Med J, 2015, 128(3):361-367.
- [10] 黎檀实,尹明,冯丽洁. 急性肺损伤中肺泡 II 型细胞凋亡机制的研究现状[J]. 中华危重病急救医学,2002,14(3):185-187.
- [11] Qin X, Fu W, Zhao Y, et al. Ultrastructural study of alveolar epithelial type II cells by high-frequency oscillatory ventilation[J]. Biomed Res Int, 2013, 2013(4):240659.
- [12] 梁剑,覃晓菲,孟琼,等. 不同机械通气方式对急性肺损伤新生猪肺泡 II 型上皮细胞病理结构的影响[J]. 广东医学,2016,37(2):1-3.
- [13] 喻文强,连祥基,徐昊,等. 汽化吸入全氟化碳两种干预模式对急性肺损伤兔呼吸和氧合功能的影响[J]. 广东医学,2015,36(7):1003-1006.
- [14] Liu G, Zhang J, Chen H, et al. Effects and mechanisms of alveolar type II epithelial cell apoptosis in severe pancreatitis-induced acute lung injury[J]. Exp Ther Med, 2014, 7(3):565-572.
- [15] 贾宝银. 降低小鼠组织因子能减轻呼吸机诱导的凝血功能障碍但无抗呼吸机诱导的肺损伤的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2012, 28(3):452.
- [16] 冯丹,徐家丽,姚尚龙. 洛沙坦通过抑制 NF- κ B 减轻大鼠机械通气所致肺损伤[J]. 华中科技大学学报(医学版),2014,43(4):395-398.