

急性肺损伤大鼠肺灌洗液及血清 中LDH, ALP, TC, TG及PL变化研究

北京医科大学第三医院 (100083) 刘 宏* 赵金垣 王世俊 李国权

提 要 对静脉注射油酸引起急性肺损伤的(ALI)大鼠,在注射后不同时间收集支气管肺泡灌洗液(BALF)和血清进行分析,发现其BALF中乳酸脱氢酶(LDH)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆固醇(TC)和磷脂(PL)均有不同程度增加,注射后0.5小时LDH即增高达对照组的6.7倍($P < 0.001$)。血清中LDH, ALP, TC及PL均有异常改变,其中注射后0.5小时血清LDH即高达对照组的2倍($P < 0.01$)。实验组BALF及血清中甘油三酯(TG)均比对照组有所降低。实验提示, BALF和血清中LDH升高伴脂类异常,有可能是早期诊断急性肺损伤较特异的组合指标。

关键词 呼吸窘迫综合征 乳酸脱氢酶 碱性磷酸酶 总胆固醇 甘油三酯 磷脂

成人呼吸窘迫综合征(ARDS)是临床上常见的危重病症之一。尽管近二三十年来人们对之进行了广泛深入的研究,其死亡率仍高达60%以上。进一步研究ARDS的发病机制,探索其早期诊断指标及寻找有效的治疗药物,是解决这一棘手问题的三条重要途径。本实验观察了油酸型呼吸窘迫综合征(RDS)动物模型在静脉注射油酸后0.5, 2, 6, 24和72h BALF及血清中乳酸脱氢酶(LDH)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)及磷脂(PL)的变化,并分析其变化发展规律,以期研究ARDS的发病机制和探索ARDS的早期诊断指标提供依据。

1 材料与方 法

选取体重250~320g Wistar 大鼠,随机分为实验组和对照组。实验组动物从尾静脉缓慢(30秒)注入0.25ml/kg油酸(分析纯,北京89942部队试剂厂),制备实验性RDS动物模型。对照组从尾静脉注入等量生理盐水(NS)。动物在注射后0.5, 2, 6, 24和72h分五批用腹主动脉放血法处死,届时采血在AVL 945血气分析仪上测定动脉血氧分压(P_{aO_2})和血氧饱和度(O_{2sat}),同时留取血样分离血清备用。

动物处死后,立即开胸取肺脏做大体观察,称全肺重并计算肺系数(肺重/体重×

100%),然后从气管内插入直径2mm细塑料管,用4℃生理盐水进行灌洗。每次灌入5ml并反复抽洗3次,总灌入液量为30毫升/只,回收率为 $91.4 \pm 0.5\%$ 。灌洗后,每组每批取4只肺,置80℃烤箱内烘干至恒重,称重并计算肺湿重/干重比值(Rw/d);另取5只肺脏,右肺做肺匀浆测肺组织中血小板激活因子(另文报道),左肺用10%福尔马林在25cmH₂O压力下灌注30分钟,使肺膜展平并做内固定,之后投入10%福尔马林中浸泡固定一周。然后按常规病理学方法逐级酒精脱水、透明、包埋、切片、HE染色,置光镜下观察。

将灌洗液2000转/分离心10分钟,取上清液0.5ml,另取血清0.5ml,分别在日立7150自动生化分析仪(日本日立公司)上测定LDH, ALP, TC, TG, PL。

LDH试剂盒为法国 Aus Bio 公司产品; ALP和TC试剂盒为北京中生公司产品; TG试剂盒为德国Boehringer Mannheim公司产品; PL试剂盒为日本第一化学药品株式会社产品。

2 结 果

2.1 一般观察

实验组动物在注油酸后1~2分钟即出现明显的呼吸困难,呼吸幅度加大,呼吸频率从

* 现在山西省大同医专

82 ± 11次/分增加到125 ± 23次/分($\bar{X} \pm SD$)。注射后1~2小时, 27.7% (13/47) 的动物鼻腔中有血性分泌物流出。在最初的几小时内, 动物呈瘫软无力状, 活动少, 行走时呈爬行步态, 很少进食进水。24小时后, 动物一般状态好转, 至72小时, 活动基本恢复正常。处死动物时发现, 78.7% (37/47) 的动物有血性胸腔积液; 10.6% (5/47) 的动物膀胱中有血性尿液充盈, 其中2例尿道口有血迹。

对照组动物无上述异常表现。

表1 油酸型肺损伤大鼠血氧分压、肺系数、肺湿/干重比值变化 ($\bar{X} \pm SE$)

组别	时间	n	氧分压 (kPa)	氧饱和度 (%)	肺系数 (%)	湿/干重比
对照组	0.5h	9	12.11 ± 0.31	96.5 ± 0.8	0.56 ± 0.05	4.78 ± 0.18
	2h	9	12.72 ± 0.39	96.1 ± 0.9	0.62 ± 0.04	4.53 ± 0.21
	6h	9	12.71 ± 0.17	96.2 ± 0.6	0.64 ± 0.02	4.77 ± 0.23
	24h	9	12.61 ± 0.56	97.3 ± 0.5	0.60 ± 0.03	4.51 ± 0.10
	72h	9	12.51 ± 0.23	96.2 ± 1.1	0.60 ± 0.03	4.87 ± 0.29
油酸组	0.5h	9	10.96 ± 0.68	96.3 ± 0.8	1.27 ± 0.05***	8.64 ± 0.11***
	2h	9	5.63 ± 0.56***	74.1 ± 5.7**	1.40 ± 0.08***	8.33 ± 0.25***
	6h	9	7.95 ± 0.56***	88.7 ± 2.4**	1.20 ± 0.05***	7.49 ± 0.36***
	24h	9	8.00 ± 0.44***	90.4 ± 2.4*	1.16 ± 0.04***	6.79 ± 0.18***
	72h	11	7.99 ± 0.69***	86.8 ± 3.2*	1.08 ± 0.05***	5.54 ± 0.19*

与对照组比较 *P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001 kPa = 7.5mmHg

2.3 BALF和血清中LDH, ALP, TC, TG及PL

对照组动物BALF无色透明。实验组动物0.5~6h各组BALF呈血水样或洗肉水样; 24h组呈深浅不一的黄色或棕色, 少数呈淡红色, 稍浊; 72h组多为无色, 少数为淡红色、混浊, 镜检时发现较多的上皮细胞。

BALF中LDH, ALP, TC, TG及PL变化见表2。从表2中可见, 实验组BALF中LDH, ALP, TC和PL均高于对照组, LDH 0.5h即高达对照组的6.7倍, 72h进一步高达15.7倍; ALP为对照组的1.4~2.5倍; TC以0.5h组增高最明显, 是对照组的5.7倍; PL含量为对照组的2~2.5倍; TG均降低, 以72h组最明显, 是对照组的67%。

血清中LDH, ALP, TC, TG及PL变化见表3。从表3中可见, 注油酸后0.5~6h,

2.2 PaO₂, O₂ sat, 肺系数和肺R w/d变化

PaO₂, O₂ sat, 肺系数和肺R w/d变化见表1。从表1可见, 注油酸后0.5h, PaO₂稍有降低, O₂ sat仍正常; 2~72h, PaO₂明显降低 (P<0.001), O₂ sat亦降低 (P<0.05~0.01)。PaO₂和O₂ sat降低均以2h组最为严重。

注油酸后0.5~72h, 肺系数和肺R w/d均明显增加 (P<0.001), 其中肺系数以2h组最为严重, 肺R w/d增加以0.5h组最为严重, 此后随时间增加而逐渐减轻。

血清LDH增高, 为对照组的1.7~2.1倍; 24~72h, 血清LDH降低, 仅为对照组的80%和50%。血清ALP在注油酸后也呈下降趋势, 其中2, 72h两组均低至对照组的50%。血清TC则在注油酸后2~72h增高, 为对照组的1.2~1.4倍。实验组血清TG呈下降趋势, 72h组低至对照组的60%。实验组血清PL在2~24h均增高, 为对照组的1.2~1.6倍。

2.4 病理观察

肉眼观察, 实验组动物双肺明显肿胀饱满, 体积增大, 重量增加。0.5h组, 肺组织表面有90%~95%为鲜红色充血实变区, 其间夹杂有片、灶状的粉红色肺组织; 2, 6h组, 肺表面呈鲜红或深红色“肝样变”, 有由肺小叶间隔形成的细网状或花斑状纹理; 24h组, 肺表面呈暗红色, 前述纹理增多, 密布于全肺; 72h组, 肺表面大部分呈灰紫色, 其间有片、

表2 油酸型肺损伤大鼠BALF中LDH,ALP,TC,TG,PL含量及LDH浓度变化(X±SE)

组别	时间(h)	n	LDH		ALP	TC	TG	PL
			(U)	(U/L)	(U)	(μmol)	(μmol)	(mg)
对照组	0.5	9	2.78±1.03	112±43	1.36±0.25	0.38±0.13	195.9±33.9	1.53±0.25
	2	8	3.93±0.79	143±30	1.69±0.19	0.49±0.16	198.4±21.6	1.95±0.33
	6	9	4.79±0.98	172±35	1.56±0.22	1.01±0.34	250.5±26.0	1.75±0.18
	24	9	3.34±1.67	123±60	1.39±0.34	0.67±0.25	219.2±23.0	1.53±0.29
	72	9	2.55±0.73	96±27	1.15±0.18	0.38±0.10	206.1±31.9	1.45±0.24
油酸组	0.5	9	18.55±3.93***	676±147**	1.96±0.17	2.18±0.26***	178.3±13.8	3.14±0.29***
	2	9	24.62±4.48***	859±153***	2.78±0.29**	2.01±0.23***	183.9±22.7	3.82±0.41**
	6	9	18.57±2.40***	657±86***	2.26±0.16*	1.82±0.24	230.9±30.5	3.83±0.24***
	24	9	20.80±1.74***	757±61***	3.18±0.31**	0.75±0.13	209.1±29.8	3.27±0.64*
	72	11	39.95±3.55***	1457±128***	2.89±0.19***	0.88±0.19*	138.0±20.0	3.68±0.21***

与对照组比较 *P<0.05 **P<0.01 ***P≤0.001, BALF总量=30×0.914ml

表3 油酸型肺损伤大鼠血清中LDH,ALP,TC,TG及PL浓度变化(X±SE)

组别	时间(h)	n	LDH (U/L)	ALP (U/L)	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	PL (mg/L)
对照组	0.5	9	815±166	217±25	1.40±0.11	7.53±0.92	1124±81
	2	8	1087±127	325±30	1.30±0.07	7.53±0.39	939±140
	6	9	902±144	179±23	1.44±0.10	8.29±0.87	1140±86
	24	9	896±199	229±44	1.14±0.07	7.95±0.72	912±49
	72	9	889±117	230±32	1.59±0.07	8.41±1.18	1252±44
油酸组	0.5	8	1592±118**	210±20	1.18±0.06	6.21±0.38	813±147
	2	9	1897±191**	159±28***	1.54±0.10	7.74±0.81	1164±83
	6	9	1896±353*	190±20	1.68±0.16	7.82±1.12	1284±106
	24	8	730±93	208±29	1.57±0.10**	6.66±1.38	1449±237*
	72	11	426±83**	114±17**	2.05±0.12**	5.37±0.69*	1191±120

与对照组比较 *P<0.05 **P<0.01 ***P≤0.001

灶状的粉红或灰白色肺组织相间,呈花斑状,肺组织肿胀程度明显减轻。

光镜下,可见肺间质和肺泡水肿、出血,以中性粒细胞为主的炎细胞浸润,小灶性肺不张,灶性坏死,微血栓形成,肺周边部多有梗塞灶,肺泡中有较多脱落的肺上皮细胞。可见多处毛细血管扩张充盈,部分病例有透明膜形成。

3 讨论

用油酸复制 RDS 动物模型是国内外广泛采用的方法。本实验中动物注油酸后出现明显的呼吸困难,严重低氧血症,肺组织充血、出血、水肿、炎细胞浸润、灶性坏死和梗塞灶形成,表明 RDS 动物模型复制是成功可靠的。

LDH广泛存在于体内各种组织中,尤以肝、心肌、肾、骨骼肌、胰腺和肺最多。在心肌梗塞、肝炎、肝硬化、肾脏疾病、恶性肿瘤以及某些贫血病人,血清LDH都会增高。目前此项测定是诊断心肌梗塞的一项有用指标⁽¹⁾。但近年来发现在肺损伤时 LDH 及其同工酶会有改变。Ward等⁽²⁾发现血清LDH及LDH₁在补体激活性肺损伤时明显增高。娜琪等⁽³⁾发现窒息新生儿缺氧损伤时血清 LDH₁₋₅下降,LDH₂及LDH₃/LDH₁比值增高。本实验发现,油酸型肺损伤BALF中LDH明显增高,注药后0.5h即高达对照组的6.7倍,72h进一步高达15.7倍;血清LDH在注药后0.5h即增高至对照组的2倍,并持续增高6h以上,血清和

BALF中LDH增高早于PaO₂的明显降低和除呼吸困难之外的其他症状,可见LDH增高也是早期诊断肺损伤的敏感指标之一。

实验组BALF中LDH增高的机制,早期可能是肺毛细血管内皮细胞损伤后血液中LDH漏入肺泡和肺损伤后组织中LDH渗出到肺泡共同引起的。其根据是:(1)此时BALF呈血性;(2)本实验还对部分实验组动物的胸水进行了分析,发现其中LDH浓度远高于血清LDH浓度(0.5h:8410±1492,n=3;2h:8276±1675,n=3;6h:6211±764,n=4;72h:2888±306,n=5),提示有肺组织中的LDH渗出。晚期则可能主要因肺组织中LDH渗出所致,因为此时BALF为黄色、棕色,甚至无色,说明肺泡出血已趋停止,且此时BALF中LDH浓度已超过血清LDH浓度(见表2和表3);另外,其时(特别是72h)BALF浊度增加,细胞计数时发现多量的上皮细胞,提示了肺组织的损伤。

注油酸早期血清LDH增高,可能是因肺毛细血管内皮细胞损伤后,肺组织中LDH通过破损之处进入血液所致。晚期血管缺损修复,肺组织中LDH不再进入血流,而肺组织因LDH大量渗出到肺泡和胸腔,便从血中摄取LDH加以补充,故此时血中LDH减少。

ALP几乎存在于机体的各个组织,但以骨骼、肾和肝中含量较多,临床上常用作骨组织、肾和肝有关疾病的辅助检查^[4]。本实验发现,油酸型肺损伤BALF中ALP从0.5~72h都有增高(1.4~2.5倍),提示BALF中ALP测定对肺损伤的诊断也有一定意义。

对于肺损伤时BALF中中性脂肪的变化,有少数国外学者进行了研究。Liau等^[5]对N-亚硝基-N-甲基尿烷(NNNMU)犬肺损伤模型的BALF中肺表面活性物质(PS)进行了分析,发现2~20天各时点TC无明显变化,各时点TG均降低。本实验发现,油酸型肺损伤早期(0.5h)BALF中TC即增高,并持续增高至72h;血清TC从2h开始增高,持续至72h;BALF和血清中TG均呈减低趋势,至72h时,

都降低至对照组的60%左右。可见油酸型肺损伤时,作为PS的成份,TC和TG也有改变且有一定变化规律。

对于肺损伤时BALF中PL的变化,研究结果不一^[5~8]。本实验发现,油酸型肺损伤时BALF中PL从0.5~72h均有增高,为对照组的2~2.5倍;2~24h血清PL也增高1.2~1.6倍。

油酸型肺损伤时血清中TC、TG和PL变化的机制及其与BALF中这些指标的关系,有待于进一步研究。

鉴于目前尚无单一特异且敏感的指标可早期诊断ARDS,而临床上又常用组合指标的方式诊断某些疾病,故设计了本组实验。若血清LDH与血清天冬氨酸转氨酶(AST,即GOT)同时增高,可提示心肌梗塞;血清AST正常,而LDH和胆红素同时增高,可提示肺梗塞^[1]。那么,血清LDH增高伴脂类(包括PL,TC,TG)异常是否可提示ARDS,值得进一步探讨和验证。

(本研究工作得到北医三院检验科张淑萍、孙尊、张雅君、张秋红等同志的热情帮助,特此致谢。)

4 参考文献

- 1 北京中生物生物工程高技术公司. 临床诊断试剂盒方法学. 1992;6:53
- 2 Ward PA, et al. Systemic complement activation, lung injury and products of lipid peroxidation. *J Clin Invest* 1985;76:517
- 3 郑琪,等. 乳酸脱氢酶同工酶活性测定对窒息新生儿缺氧损伤的评价. *中国实用儿科杂志*. 1994;9(2):100
- 4 北京中生物生物工程高技术公司. 临床诊断试剂盒方法学. 1992;6:27
- 5 Liau DF, et al. Functional abnormalities of lung surfactant in experimental acute alveolar injury in the dog. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:395
- 6 Hall SB, et al. Altered function of pulmonary surfactant in fatty acid lung injury. *J Appl Physiol* 1990;69(3):1143
- 7 Hallman M, et al. Evidence of lung surfactant abnormality in respiratory failure. *J Clin Invest*, 1982; 70: 673
- 8 Pison U, et al. Surfactant abnormalities in patients with respiratory failure after multiple trauma. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140:1033

Abstracts of Original Articles

Molecular Monitoring of Point Mutations of Ki-ras Oncogene in White Blood Cells of Benzene Workers

Xia Zhaolin, et al

Activation of ki-ras oncogene in WBC by point mutation at codon 12 was detected by Polymerase Chain Reaction (PCR) using specific oligonucleotide probe. Only one case among 41 workers exposed to benzene was found to have point mutation from GGT to TGT (Gly to Cys). This worker has exposed to benzene for 6 years and her WBC counts in peripheral blood were lower than $4.5 \times 10^9/L$ in all three successive examinations. It is suggested that this worker has a possibility of suffering from leukemia. It is also supposed that point mutation of Ki-ras oncogene in WBC may be used as a biomarker of leukemia induced by benzene and may be employed as a early surveillance indicator among occupational benzene exposed population.

Key words: benzene exposure, Ki-ras oncogene, oligonucleotide, PCR

Alterations of the Levels of LDH, ALP, TC, TG and PL in Bronchoalveolar Lavage Fluid and Serum in Acute Lung Injured Rats

Liu Hong, et al

Acute lung injury (ALI) of rats was induced by injection of oleic acid. After injection, the levels of lactate dehydrogenase (LDH), alkaline phosphatase (ALP), total cholesterol (TC), triglyceride (TG) and phospholipid (PL) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and serum were periodically quantified. The results showed that the levels of LDH, ALP,

TC and PL in BALF were increased, the level of LDH in BALF even increased to 6.7-folds of the control at 0.5 hour after injection ($P < 0.001$). Serum LDH level increased to 2-folds of control at 0.5 hour after injection ($P < 0.01$). TG in BALF and serum of rats with ALI were decreased compared with the control. It was suggested that the increase of LDH with the abnormalities of lipids (TC, TG and PL) in BALF and serum may be served as a early specific combined parameter for the diagnosis of ALI.

Key words: LDH, ALP, TC, PL, TG

Effects of Experimental High Temperature on Acute Phase Response Protein

Wu Yang, et al

12 male volunteers did a mimic work of moderate-intensity at $T_{db} 39^\circ C \pm 1^\circ C$, Rh 20% for 3 hours in an artificial climate chamber. Pulse rate, oral temperature, perspiration amount were measured and the subjective feeling were inquired before work, at the given time during the work and after the work. Before and after work, venous blood was taken to determine acute phase response protein (APRPs). During work, pulse rate increased from the first exercise and oral temperature went up after the second exercise but never exceed $38^\circ C$. α -AT, α -AG, Hp, Cp, and Fn significantly increased at 3 hours after heat exercise, except that Tr decreased slightly. The results suggested that some indices of APRPs might be of diagnostic significance for heat injury or heat-stroke, but their specificity should be further investigated in the future.

Key words: high temperature, acute phase response proteins