

水下火器爆炸致兔急性闭合性肝损伤的实验研究

黄奕江^{1,2}, 齐晓林², 马宏昊³, 郝建⁴, 张超¹, 王军民⁴

摘要 目的 探讨水下火器爆炸致兔急性闭合性肝损伤的病理生理机制。方法 选取 30 只兔, 随机分为空白对照组(10 只)和实验组(20 只), 实施水下爆炸损伤腹部, 制作急性闭合性肝损伤模型, 分别于爆炸损伤 12、24 h 后采样(每时间点各 10 只), 测定肝湿/干重比(W/D)、动脉血氧分压(PaO₂)、谷丙转氨酶(ALT)和炎性因子。选取肝组织, 显微镜观察光镜下肝组织病理形态。结果 光镜下, 实验组 12 h 起可见肝组织片状出血, 肝血管破裂出血明显, 肝组织内见片状坏死, 肝索破坏, 炎细胞浸润, 偶见肝细胞嗜酸性变。与空白对照组比较, 实验组 W/D 明显升高($P < 0.05$), PaO₂ 明显降低($P < 0.05$)。与空白对照组比较, 实验组 ALT 指数明显升高($P < 0.05$), 炎性因子较空白对照组明显升高($P < 0.05$)。结论 水下爆炸冲击波可导致实验兔急性闭合性肝损伤, 引起相应病理生理学改变。

关键词 急性闭合性肝损伤; 爆炸伤; 兔

中图分类号 R 563.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)02-0221-04

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.02.015

肝脏是人体最大的实质性器官, 质地脆, 是腹腔脏器中较容易损伤的脏器。急性闭合性肝损伤在闭合性腹部外伤中约为 20%, 仅次于脾破裂和肾损伤, 居第 3 位^[1]。临床上, 闭合性肝损伤远比开放性肝损伤多, 且合并伤多、病情凶险, 尽早明确诊断并予以干预治疗意义重大^[2]。该研究旨在通过建立水下火器爆炸致兔急性闭合性肝损伤动物模型, 检测分析肝组织湿干比重(W/D)、动脉血氧分压(PaO₂)、谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)及炎性因子, 探讨水下火器爆炸致兔急性闭合性肝

损伤的机制, 为普通外伤及战伤致急性闭合性肝损伤提供有效防治措施。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验动物 30 只健康新西兰兔, 雌雄不限, 体重(1.84 ± 0.29) kg, 由安徽长临河医药科技有限公司提供。

1.1.2 试剂与仪器 血气分析采用美艾利尔 Epoc 血气分析系统; 兔白介素-8(interleukin-8, IL-8) ELISA 试剂盒(批号: 201602)、兔金属基质蛋白酶(matrix metalloproteinases-9, MMP-9) ELISA 试剂盒(批号: 201602)、兔核因子-κB(nuclear factor-κB, NF-κB) ELISA 试剂盒(批号: 201602)、兔肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α) ELISA 试剂盒(批号: 201602)(上海江莱生物科技有限公司); IL-6 ELISA 试剂盒(批号: 20160125UJ)、兔中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE) ELISA 试剂盒(批号: 20160127FR)(上海朗顿生物科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 将 30 只新西兰兔采用抽签法随机分为空白对照组($n = 10$)和实验组($n = 20$), 实验组仍采用抽签法根据采样时间随机分为 12 h 组和 24 h 组, 各 10 只。

1.2.2 模型建立 使用中国科技大学近代力学系研制的爆炸装置, 并按照爆炸力学相关公式及肝脏组织病理观察结果设定合理爆炸剂量、距离。爆炸前备皮, 消毒颈部, 于气管的左侧旁取反“L”形切口, 暴露出颈总动脉, 置 24G 套管针并固定, 暴露出右侧颈外静脉, 24G 套管针穿刺颈外静脉, 固定后使用肝素封管, 将套管针的尾端固定于兔的颈后(不易脱落, 便于抽血, 不易被动物咬断)。将兔固定于实验装置平台上, 暴露腹部, 其余部位由自行设计的保护装置进行防护, 建立完成爆炸致兔急性闭合性肝损伤模型(图 1)。

1.2.3 标本采集 氯胺酮 40 mg/kg 经肌肉注射麻醉实验兔, 实施水下爆炸后取出实验兔, 采集颈外动

2016-11-28 接收

基金项目: 南京军区科技创新课题面上项目(编号: 15MS150)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院普通外科, 合肥 230022

² 中国人民解放军第一二三医院肝胆外科, 蚌埠 233015

³ 中国科学技术大学近代力学系, 合肥 230022

⁴ 中国人民解放军杭州疗养院全军创伤康复中心, 杭州 310007

作者简介: 黄奕江, 男, 硕士研究生;

张超, 男, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者,
E-mail: smallcloud2@hotmail.com

脉血,并行血气分析,处死实验兔。解剖腹腔,取出肝脏,观察病理组织大体变化情况,详细记录描述。切取肝右叶于10%福尔马林固定液固定,固定时间不少于48 h。

1.3 观察指标

1.3.1 肝组织病理组织学观察 取肝右叶组织用10%福尔马林固定液固定,选取3.0 mm × 1.5 mm × 0.5 mm 大小的组织,经梯度酒精、二甲苯脱水透明,浸蜡、包埋、4 μm 切片、烤蜡、脱蜡、脱水、染色、梯度酒精、二甲苯脱水透明、中性树胶封片、光学显微镜观察。

1.3.2 肝 W/D 取肝左内叶,吸干表面杂质,天平称取肝湿重后,置于80 °C烘箱烘72 h至烘干,称取干重,计算 W/D。

1.3.3 动脉血气分析 实施爆炸后采动脉血2 ml,即刻行血气分析。

1.3.4 ALT 检测 注射器抽取5 ml 动脉血,室温静置2 h,3 000 r/min 离心10 min,吸取血清到EP管中,4 °C 保存备用,然后采用速率法进行ALT检测。

1.3.5 血清炎症因子检测 采用ELISA法对兔血清进行炎症因子检测,包括MMP-9、TNF-α、NF-κB、NE、IL-8、IL-6。

1.4 统计学处理 采用SPSS 19.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间及组内数据比较均采用定量资料的 *t* 检验;多组间比较采用方差分析(原数据方差不齐,在方差分析前通过对数转换使其具有方差齐性),组间两两比较采用SNK-*q* 检验。



图1 兔置管后及爆炸前

A: 实验前准备; B: 爆炸致兔急性闭合性肝损伤模型

2 结果

2.1 肝组织病理组织学观察 肉眼可见部分肝组织片状出血,部分肝组织肝血管破裂出血明显,部分肝组织内见片状坏死,部分肝组织肝索破坏,炎细胞浸润,偶见肝细胞嗜酸性变,12 h 组肝组织炎症较24 h 组严重(图2)。

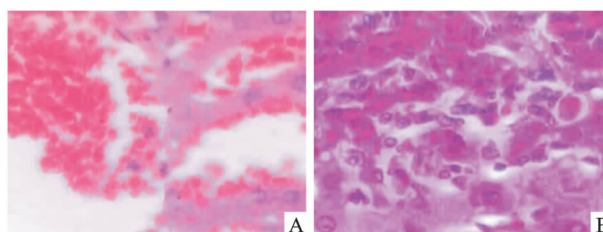


图2 各组兔组织病理学变化 HE × 100
A: 12 h 组; B: 24 h 组

2.2 肝 W/D 实验各组 W/D 值较空白对照组明显增加,12 h 组较空白对照组增加最为明显,差异有统计学意义($P < 0.05$);且 W/D 值24 h 组较12 h 组明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

2.3 PaO₂ 实验各组 PaO₂ 较空白对照组明显降低,12 h 组 PaO₂ 降低最明显,差异有统计学意义($P < 0.05$);且24 h 组较12 h 组 PaO₂ 有所改善,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

2.4 ALT 实验各组 ALT 较空白对照组明显升高,12 h 组 ALT 值升高最明显,差异有统计学意义($P < 0.05$);24 h 组较12 h 组 ALT 有所改善,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

2.5 肝组织炎症因子 实验各组炎症因子值较空白对照组增高,且均是12 h 组增高最为明显,差异均有统计学意义($P < 0.05$);各炎症因子24 h 组值较12 h 组均有所降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

3 讨论

水下爆炸与空气中爆炸有很大区别,由于水的

表1 各组兔肝组织 W/D、PaO₂、ALT 变化($n = 10 \bar{x} \pm s$)

| 指标 | 空白对照组 | 12 h 组 | 24 h 组 | F 值 | P 值 |
|------------------------|---------------|-----------------|----------------|--------|-------|
| W/D | 3.29 ± 0.07 | 3.44 ± 0.15* | 3.22 ± 0.07# | 14.044 | 0.001 |
| PaO ₂ (kPa) | 11.33 ± 0.78 | 8.55 ± 2.25* | 10.56 ± 0.64# | 3.604 | 0.042 |
| ALT(U/L) | 47.40 ± 11.59 | 109.80 ± 20.49* | 60.40 ± 22.43# | 6.256 | 0.014 |

与空白对照组比较:* $P < 0.05$; 与12 h 组比较:# $P < 0.05$

表2 各组兔肝组织炎症因子比较($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

| 指标 | 空白对照组 | 12 h 组 | 24 h 组 | F 值 | P 值 |
|---------------------------|-----------------------|------------------------------------|--------------------------------------|--------|--------|
| MMP-9 ($\mu\text{g/L}$) | 21.75 \pm 2.32 | 32.27 \pm 11.97 | 23.20 \pm 5.45 [#] | 9.056 | 0.004 |
| TNF- α (ng/L) | 250.75 \pm 44.20 | 1 135.80 \pm 89.95 [*] | 548.85 \pm 123.74 ^{* #} | 99.207 | <0.001 |
| NF- κ B (ng/L) | 1 682.80 \pm 617.62 | 3 573.60 \pm 363.07 [*] | 2 819.10 \pm 271.59 ^{* #} | 17.026 | <0.001 |
| NE (ng/ml) | 67.13 \pm 22.89 | 180.93 \pm 43.22 | 116.87 \pm 14.47 ^{* #} | 17.223 | <0.001 |
| IL-8 (ng/L) | 76.32 \pm 21.13 | 75.07 \pm 8.31 | 44.27 \pm 9.37 ^{* #} | 9.816 | 0.003 |
| IL-6 (ng/L) | 95.20 \pm 54.44 | 315.60 \pm 134.00 [*] | 177.60 \pm 25.42 [#] | 10.757 | 0.002 |

与空白对照组比较:^{*} $P < 0.05$; 与 12 h 组比较:[#] $P < 0.05$

传导作用大于空气,爆炸产生的冲击波对机体的伤害远大于空气爆炸伤,而碎片、烧伤等空气中爆炸时常见的致病因素在水下爆炸中则处于次要地位。本实验主要观察水下爆炸冲击波对实验兔肝脏的损伤过程,采用特制的装具保护好实验兔的其它脏器,仅暴露其肝脏部位,并通过前期的预实验,设定好爆炸剂量和距离,确保实验兔肝脏受损并能成活。

当实验兔肝脏受到爆炸冲击波的损伤时,机体发生了一系列的创伤性炎症反应,多种细胞因子和蛋白酶参与了炎症反应、细胞增生和组织修复过程。NE,又称白细胞弹性蛋白酶,可分解细胞外基质,通过血管屏障进入炎症部位,还能通过细胞的吞噬作用杀死和溶解致病微生物参与机体防御^[3],是创伤性炎症反应较为敏感的指标之一。MMP-9 是以酶原的形式从胞内分泌到胞外的^[4]。在体外,MMP-9 通过有机汞制剂反应才有活性,在体内则须经一系列蛋白酶级联而激活。MMP-3 可能是 MMP-9 最有效的激活剂^[5]。MMP-9 可通过释放血管内皮生长因子以参与血管生成^[6-7],是炎症修复的重要因子。TNF- α 可直接导致肝血窦微循环障碍、促进中性粒细胞释放炎症介质、活化磷脂酶 A2 以及激活凋亡通路等途径引发肝脏的炎症损伤^[8]。NF- κ B 是多种组织细胞中具有转录功能的一类蛋白质,其通过参与炎症反应和控制细胞凋亡基因在肝损伤中起关键作用^[9]。除了本实验所检测的炎症因子外,C 反应蛋白也是反映急性创伤感染的一个敏感指标,创伤发生后几小时内即可急剧升高,7~10 h 后开始下降。另外,环氧合酶-2 是由损伤性因子(包括化学因子、物理因子和生物因子)诱导产生的一种酶,是前列腺素合成初始步骤中的关键限速酶,能催化前列腺素合成并参与炎症反应。环氧合酶-2 抑制剂能降低促炎症和趋化因子的表达和减轻急性肺损伤的程度^[10],还能够降低烧伤大鼠模型的炎症因子水平并提高其存活率^[11]。

本研究中,爆炸后 24 h,实验兔 W/D、ALT、

PaO₂ 等指标与爆炸后 12 h 相比已有明显改善,提示致伤因素清除后,机体的各项功能已趋于好转,同时也提示水下火器爆炸致急性闭合性肝损伤应尽早进行医疗干预,使用药物控制肝细胞损伤,减轻肝脏水肿,抑制创伤性炎症反应。

本实验制作了爆炸冲击波致肝脏损伤的动物模型,通过示波器准确控制炸药的当量,并对其他脏器进行了物理遮盖保护,减少了干扰因素,结果可重复性高。但由于爆炸冲击波损伤多是复合伤,往往造成多脏器的同时损伤,尤其对肺等空腔脏器损伤更重,因此本模型尚不能完全准确反映爆炸冲击波对机体损伤程度。另外,由于本实验动物数量较少,仅设置伤后 12 h 和 24 h 2 个观察点,尚不能完全准确反映水下爆炸冲击波对肝脏的损伤早期各时间段的规律变化,有待进一步研究。

参考文献

- [1] 陈孝平,汪建平. 外科学[M]. 8 版. 北京:人民卫生出版社, 2013:388.
- [2] 徐明良,张剑雄,郝明周,等. 外伤性肝损伤 92 例诊断与治疗[J]. 福建医药杂志, 2015, 37(2):68-9.
- [3] Tamakuma S, Ogawa M, Aikawa N, et al. Relationship between neutrophil elastase and acute lung injury in humans[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2004, 17(5):271-9.
- [4] Newby A C. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates[J]. Cardiovasc Res, 2006, 69(3):614-24.
- [5] Huang P H, Chen Y H, Wang C H, et al. Matrix metalloproteinase-9 is essential for ischemia-induced neovascularization by modulating bone marrow-derived endothelial progenitor cells[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009, 29(8):1179-84.
- [6] 王兆京,张丹丹,陈志伟,等. MMP-9 与 VEGF 在成人肝血管瘤中的表达及其意义[J]. 东南大学学报(医学版), 2014, 33(1):66-70.
- [7] 吴婧婧,顾康生. 小肠腺癌患者中 MMP-9、Ki-67、EGFR 和 VEGF 的表达与临床特征及预后的相关性研究[J]. 安徽医科大学学报, 2013, 48(6):647-51.

(下转第 231 页)

LGA rates were 30.61% and 17.11%, respectively. When using P_3 and P_{97} as the cutoff point, Chinese 15 cities standard and the INTERGROWTH-21st Project (2014) SGA incidence distribution standards distribution of 1.24% and 1.67%, LGA rates were 16.57% and 5.76%. The INTERGROWTH-21st Project (2014) standard screening SGA and LGA, sensitivity, negative likelihood ratio were lower, and specificity, positive predictive value, negative predictive value, positive likelihood were high. **Conclusion** The INTERGROWTH-21st Project (2014) standard might be used to screen SGA and LGA.

Key words newborn; birth weight; SGA; LGA

(上接第 223 页)

- [8] Whiting J F, Green R M, Rosenbluth A B, et al. Tumor necrosis factor- α decreases hepatocyte bile salt uptake and mediates endotoxin-induced cholestasis[J]. *Hepatology*, 1995, 22(4 Pt 1): 1273-8.
- [9] Chen F, Castranova V, Shi X. New insights into the role of nuclear factor- κ B in cell growth regulation[J]. *Am J Pathol* 2001, 159(2):387-97.
- [10] Sio S W, Ang S F, Lu J, et al. Substance P upregulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E metabolite by activating ERK1/2 and NF- κ B in a mouse model of bum-induced remote acute lung injury[J]. *J Immunol*, 2010, 185(10):6265-76.
- [11] Strong V E, Mackrell P J, Concannon E M, et al. Blocking prostaglandin E2 after trauma attenuates pro-inflammatory cytokines and improves survival[J]. *Shock*, 2000, 14(3):374-9.

Experimental study on acute closed hepatic injury induced by underwater firearm explosion in rabbits

Huang Yijiang^{1,2}, Qi Xiaolin², Ma Honghao³, et al

¹Dept of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Hepatobiliary Surgery, The 123rd Hospital of Chinese People's Liberation Army, Bengbu 233015;

³Dept of Modern Mechanics, University of Science and Technology of China, Hefei 230022)

Abstract Objective To explore the pathophysiology mechanism of acute closed hepatic injury of rabbits by firearm explosion underwater. **Methods** 30 rabbits were randomly divided into two groups as follow: control group (10 rabbits) and experimental group (20 rabbits). Rabbits in experimental group were made to rabbit models of acute closed hepatic injury by firearm explosion underwater. Animals samples were harvested after the explosion at 12 hours and 24 hours, respectively (10 at each time point). Liver wet/dry weight ratio (W/D), arterial partial pressure of oxygen (PaO_2), transaminase, inflammatory factors and liver pathology were detected. **Results** Liver tissue haemorrhage, rupture of liver blood vessels, liver tissue necrosis, inflammatory cell infiltration were observed after explosion at 12 h and more seriously than those for 24 h in experimental group. Compared with the control group, W/D increased significantly ($P < 0.05$), PaO_2 decreased significantly ($P < 0.05$), transaminase index and inflammatory cytokines increased significantly ($P < 0.05$) in the experimental group. **Conclusion** The shock wave of explosion underwater can cause acute closed hepatic injury with relevant pathophysiology changes of experimental rabbits.

Key words acute closed hepatic injury; blast injury; rabbit