

·实验研究 Experimental research·

犬肺栓塞缺血-再灌注损伤模型的实验研究

李建军, 翟仁友, 张东坡, 黄强, 于平, 戴定可, 包娜

【摘要】 目的 建立一种良好的适合进行影像学实验研究的肺栓塞缺血-再灌注损伤动物模型。**方法** 健康杂种犬 20 只。采用 Seldinger 技术穿刺右颈内静脉,置鞘,经鞘置入 Swan-Ganz 导管,用其球囊栓塞犬的右下肺下叶动脉 4 h,然后再撤除球囊,使血流再灌注 4 h,制成肺栓塞缺血-再灌注损伤模型。在缺血前、缺血 4 h 和再灌注 4 h 3 个时间点进行肺部 CT 扫描。最后处死犬,把双下叶肺组织送检病理和电镜检查。**结果** 成功制作 20 只犬的闭胸式活体肺栓塞缺血-再灌注损伤模型,CT、病理和电镜扫描显示均符合肺栓塞缺血-再灌注损伤的变化,即渗透性肺水肿。**结论** 犬的闭胸式活体肺栓塞缺血-再灌注损伤模型可真实模拟肺栓塞缺血-再灌注损伤的病理生理过程,是一种良好的适合进行影像学实验研究的动物模型。

【关键词】 肺栓塞;缺血-再灌注损伤;动物模型;犬

中图分类号:R735.7 文献标识码:B 文章编号:1008-794X(2009)-01-0040-04

Experimental study of pulmonary thromboembolism ischemia-reperfusion injury in canine model LI Jian-jun, ZHAI Ren-you, ZHANG Dong-po, HUANG Qiang, YU Ping, DAI Ding-ke, BAO Na. Department of Oncology and Hepatobiliary Interventional Center, Beijing Youan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100069, China

【Abstract】 Objective To establish a canine model of pulmonary thromboembolism ischemia-reperfusion injury (PTE IRI) that may be used for imaging study. **Methods** Ten male and 10 female healthy mongrel canines with (18.6 ± 0.8) kg/body weight, were used. A Swan-Ganz catheter was introduced into the right internal jugular vein via a preset percutaneous sheath using the Seldinger technique, and then was with further insertion the pulmonary artery. Balloon occlusion of the right inferior lobe pulmonary artery for 4 hours was followed by removing the catheter and ending with 4 hours of reperfusion. CT was performed before ischemia, 4 h after ischemia and 4 h after reperfusion. At last, dogs were killed and the bilateral inferior lung tissues were prepared for the examination by light and electronic microscopy. **Results** All canine models were successfully developed pulmonary thromboembolism ischemia-reperfusion injury. The examination of CT, light and electron microscopy consistently indicated the presence of permeability pulmonary edema after reperfusion. **Conclusions** A closed-chest canine model in vivo of pulmonary thromboembolism ischemia-reperfusion injury can be established with virtual pathophysiological process in human and be as well as for imaging experimental study. (J Intervent Radiol, 2009, 18: 40-43)

【Key words】 pulmonary thromboembolism; ischemia-reperfusion injury; animal model; canine

肺栓塞治疗后可出现缺血-再灌注损伤^[1-3]。目前开展肺栓塞缺血-再灌注的研究和防治已越来越受到人们的重视,而建立良好的动物模型又是研究缺血-再灌注损伤发病机制和评价药物防治的基

础,尤其是进行影像学研究,其要求更高。本研究旨在建立一种适合进行影像学研究的犬肺栓塞缺血-再灌注模型,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 健康杂种犬 20 只,雌性 10 只,雄性 10 只,体重 17 ~ 20 kg,平均 (18.6 ± 0.8) kg。

1.1.2 实验设备 ADVANTX LCA Plus DSA (美国

基金项目:首都医学发展科研基金(2003-1017)

作者单位:100069 北京 首都医科大学附属北京佑安医院肿瘤肝胆介入中心(李建军);首都医科大学附属北京朝阳医院放射科(翟仁友、张东坡、黄强、于平、戴定可、包娜)

通信作者:翟仁友

GE 公司);Mark v 血管造影高压注射器 (美国 MEDRAD 公司)。

1.1.3 实验器械 18 G Seldinger 穿刺针、5 F 猪尾导管、0.035 英寸黑泥鳅导丝、5 F 和 8 F 导管鞘均为日本 TERUMO 产品;7 F Swan-Ganz 热稀释漂浮导管为美国 Arrow 公司产品。

1.1.4 实验药品及试剂 戊巴比妥钠 (德国进口, 中国北京化学制剂公司分装);1% W/V 丙泊酚 (AstreZeneca S.P.A, 意大利);安其格纳芬对比剂 (广州先灵药业有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物准备 实验前禁食 12 h, 禁水 6 h, 禁水前供给犬适量的 5% 葡萄糖氯化钠溶液, 以补充能量。先将犬制动后用套管针穿刺犬的后肢外侧小隐静脉, 连接三通管, 经三通管缓慢注射 1% 丙泊酚 (W/V) 6 ~ 10 ml 实行诱导麻醉, 密切观察实验犬的肌张力和角膜反射, 确定实验犬进入麻醉状态后, 再注射硫酸阿托品 1 mg, 用肝素盐水封管、固定套管针。然后将犬抬到实验台上, 取仰卧位, 用细带把双前肢、双后肢分别固定在实验台两侧。之后借助喉镜放置 7 F 气管插管, 然后腹腔注射 3% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 维持麻醉。

1.2.2 实验步骤

1.2.2.1 本实验分为缺血前、缺血 4 h 和再灌注 4 h 3 个时间点。

1.2.2.2 将犬放置在 CT 扫描床上, 行肺部 CT 扫描。

1.2.2.3 右侧颈部、右侧腹股沟备皮、消毒。采用 Seldinger 技术穿刺右股静脉, 置入黑泥鳅导丝, 然后交换入 5 F 导管鞘, 建立此通道可用于①取血;②经鞘管放置猪尾导管, 进行肺动脉造影等;同法穿刺右颈内静脉, 置入 8 F 导管鞘。

1.2.2.4 经右股静脉导管鞘送入猪尾导管至主肺动脉, 以 8 ml/s 的速度, 注入 16 ~ 20 ml 安其格纳芬, 进行主肺动脉造影, 观察肺动脉情况。

1.2.2.5 然后经右颈内静脉导管鞘送入 Swan-Ganz 导管, 透视下待球囊漂浮到主肺动脉后, 把导管顶端送至右肺的下叶肺动脉, 注入 1 ml 稀释对比剂 (安其格纳芬: 生理盐水 = 2:8) 充盈球囊, 栓塞右下叶肺动脉, 再次行主肺动脉造影, 证实右下叶动脉堵塞完全 (图 1)。

1.2.2.6 将球囊放置在右下叶肺动脉 4 h 时刻, 固定 Swan-Ganz 导管, 再次行肺部 CT 扫描。

1.2.2.7 CT 扫描完毕, 迅速抽空球囊, 撤出 Swan-Ganz 导管, 使血流完全开通, 形成再灌注。

1.2.2.8 血流再灌注 4 h, 制成缺血-再灌注损伤模型, 再次行主肺动脉造影, 观察肺动脉造影表现, 撤出猪尾导管, 再次行肺部 CT 扫描。

1.2.2.9 实验完毕后, 经股静脉鞘管快速注射氯化钾处死犬, 将肺组织送病理和电镜检查, 观察实验结果。

1.2.3 肺 CT 扫描参数 Scan Type: Helical Full 0.8 s, Thick Speed: 5.0, 39.37, 0.984:1, Interval: 5, 120 kV, 250 mA, Recon Type: Lung。

2 实验结果

2.1 一般情况

本实验共成功制作犬的闭胸式活体肺栓塞缺血-再灌注损伤模型 20 只, 实验过程顺利, 方法简便、可行。CT、病理和电镜扫描显示均符合缺血-再灌注损伤的变化。

2.2 CT 扫描表现

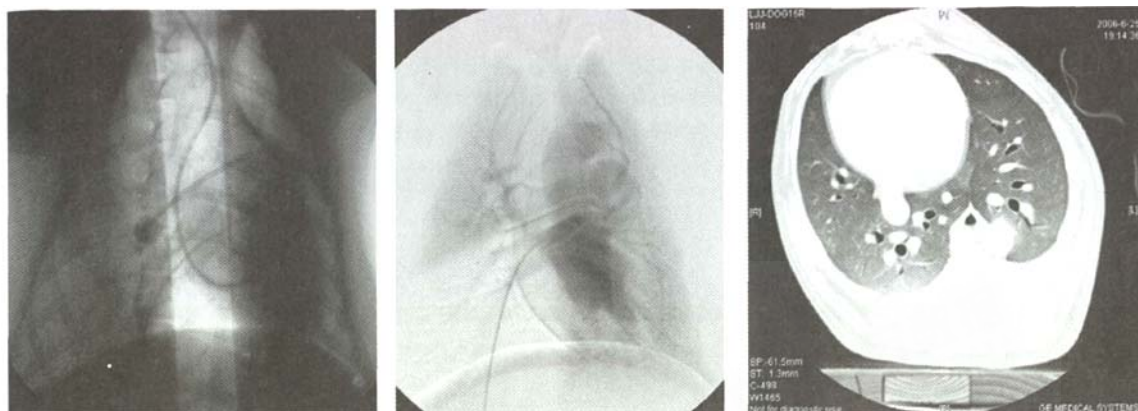
再灌注 4 h CT 主要表现为右侧下叶的肺水肿 (图 1), 具体表现为:①右下叶肺纹理增多;②可见磨玻璃样改变, 肺野透亮度减低, 密度增高;③严重者局部肺野出现肺实变, 肺密度增加, 肺纹理消失;④部分犬的非缺血侧也可见肺纹理增多及磨玻璃样改变。

2.3 病理

2.3.1 大体标本 缺血-再灌注侧肺组织表面和切面呈暗红色, 可见大片出血灶。非缺血侧肺表面红润, 但是有 5 只也出现大片的出血灶, 2 只出现小片出血灶, 3 只可见点状出血灶;如果将点状出血灶包括在内, 共有 10 只 (10/20, 50%) 犬的非缺血侧肺出现不同程度的损伤。

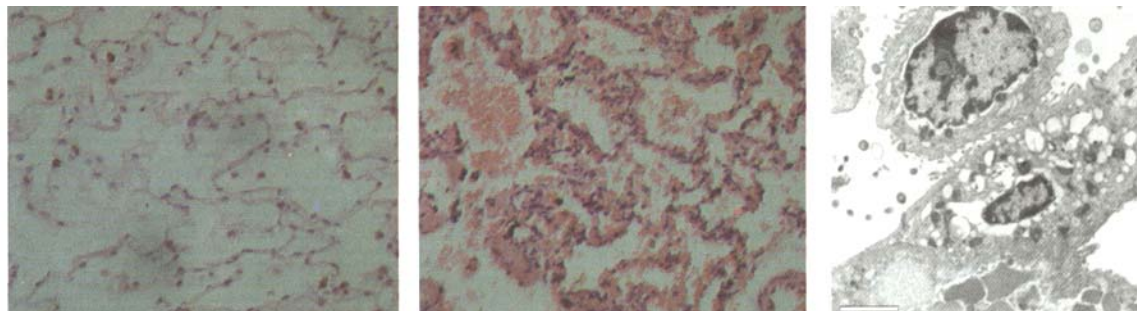
2.3.2 光镜切片观察 缺血-再灌注侧肺泡结构破坏严重, 肺泡间隔增宽, 肺泡间质及肺泡腔内有水肿液, 并可见较多淋巴细胞、中性粒细胞、巨噬细胞浸润及大量红细胞渗出。非缺血侧肺组织结构正常, 肺泡结构完整。

2.3.3 电镜观察 缺血-再灌注侧肺 I、II 型肺泡上皮细胞及肺血管内皮细胞肿胀, 线粒体空泡化、嵴溶解明显, 核染色质凝聚、边集, II 型肺泡上皮细胞板层体空化、板层减少, 部分上皮细胞和内皮细胞坏死、脱落, 细胞结构模糊, 细胞连接间隙增宽, 多数肺泡腔内及肺泡壁毛细血管可见较多红细胞及中性粒细胞渗出。非缺血侧肺 I、II 型肺泡上皮细胞、肺血管内皮细胞结构正常, 肺泡壁结构完整 (图 2)。



a Swan-Ganz 导管送至右下叶肺动脉,充盈球囊,栓塞右下叶肺动脉 **b** 缺血即刻肺动脉造影实质期显示:右下叶肺动脉分布区可见灌注缺损,余肺灌注均匀 **c** 再灌注 4 h 的 CT 显示右下叶肺纹理增粗及磨玻璃样改变

图 1 缺血-再灌注过程



a 缺血-再灌注侧肺病理显示:肺间质及较多区域肺泡腔内有多量水肿液(HE × 40) **b** 缺血-再灌注侧肺病理显示:肺泡间质弥漫性出血,可见较多灶性肺泡出血及肺泡膨胀不全,肺血管内中性粒细胞聚集(HE × 40) **c** 缺血-再灌注侧肺电镜显示:I型肺泡I:皮细胞线粒体空泡化、嵴溶解明显,核染色质凝聚、边集。II型肺泡上皮细胞板层体空化、板层减少,核染色质凝聚,核周间隙增宽,粗面内质网扩张、脱颗粒(× 12 000)

图 2 肺缺血-再灌注病理变化

3 讨论

建立理想的肺栓塞缺血-再灌注动物模型是进行缺血-再灌注损伤影像学研究的基础。目前,国内外模型主要分离体模型和活体模型两大类^[1,2]。离体模型的主要缺点是去除了神经体液因素对缺血-再灌注的影响,不能真实模拟病理生理过程;而活体模型可以更完全体现缺血-再灌注阶段的病理生理变化。常见的活体模型为开胸式夹闭和(或)结扎肺动脉,这种方法操作难度高,创伤大,一定程度上增加了动物模型的死亡率。此外,开胸手术的一些操作,如切断肋骨、剪开心包、分离肺动脉及复张肺等过程,均会造成胸部结构的破坏和损伤,势必干扰再灌注损伤影像结果的分析。

本实验应用 Swan-Ganz 导管成功建立了犬的闭胸式肺栓塞缺血-再灌注损伤模型。通过 Seldinger

技术穿刺右颈内静脉,将 Swan-Ganz 导管球囊漂入目标肺动脉。当球囊嵌顿于目标肺动脉时,先抽空球囊内气体,然后注入稀释的碘对比剂,非常便于透视下观察球囊位置,并可随时了解堵塞情况。当抽空球囊时,就达到血流再灌注的目的。此外,通过右下肢股静脉插管送入猪尾导管至肺动脉内,既可进行肺动脉造影,又可在整个实验过程中动态监测肺动脉压,还可以取血等。

肺有两组血液循环,一组是普通意义上的肺循环,参与气体交换的功能性肺血管;另一组是支气管动静脉循环,是体循环中胸主动脉的分支,其功能是向呼吸性细支气管以上的呼吸道组织供给氧和营养物质。正常情况下,支气管动脉的血流量仅占心排量的 1%~2%,支气管动静脉循环和肺循环有吻合支,并且支气管动静脉循环的压力比肺循环高。Fadel 等^[3]提出慢性肺动脉阻塞不一定引起严重

缺血,长时间肺动脉阻塞反而减轻肺缺血-再灌注损伤的程度。Kowalski 等^[4]和 Pearse 等^[5]研究发现,急性肺动脉结扎后再灌注水肿的程度与支气管动脉循环血流呈负相关,形成机制是:①支气管动脉可减轻缺血性肺损伤。②再灌注期间,代偿扩张的支气管血管对液体的直接吸收,有利于肺水肿液的清除。探讨结扎肺动脉对支气管动脉循环影响的实验,分别在鼠、犬、羊、猪等实验动物体进行^[4,6,8]。Haworth 等^[8]的研究表明缺血 2 周就形成了支气管循环代偿扩张,4 周后扩张的支气管动脉管径比伴行的肺动脉还粗。为了去除支气管循环对肺栓塞缺血-再灌注损伤的代偿作用,本实验选择栓塞肺动脉 4 h 和再通 4 h,在这个时间窗内,支气管动脉循环不能形成代偿,确保了肺缺血和再灌注损伤的效果。

本实验成功制作了犬的闭胸式活体肺栓塞缺血-再灌注损伤模型,CT 扫描显示再灌注侧肺出现肺纹理增多和磨玻璃样改变,符合肺水肿的表现。病理和电镜扫描也均符合缺血-再灌注损伤的变化。另外本实验研究发现在大体病理标本中有 10 只犬的非缺血侧肺叶出现程度不一的损伤,表现为大片状、小片状、点状出血水肿灶,CT 也显示肺纹理增多及磨玻璃样等不同程度改变。Hamvas 等^[9]的研究也发现同样的现象,认为一侧肺缺血-再灌注损伤可导致对侧肺出现相似的但较弱的损伤,非缺血肺的损伤可能由中性粒细胞依赖的循环介质即体液因素介导。

犬的闭胸式活体肺栓塞缺血-再灌注损伤模型可真实模拟肺栓塞缺血-再灌注损伤的病理生理过程,是一种良好的适合进行影像学实验研究的动物模型;此模型可以稍加修改后应用于其他组织器官

的缺血-再灌注损伤的研究。

[参考文献]

- [1] Guth S, Prüfer D, Kramm T, et al. Length of pressure-controlled reperfusion is critical for reducing ischaemia-reperfusion injury in an isolated rabbit lung model[J]. J Cardiothorac Surg, 2007, 2:54.
- [2] Nowak K, Weih S, Post S, et al. Bradykinin in ischemia-reperfusion injury of the rat lung [J]. J Physiol Pharmacol, 2007, Suppl 5(Pt 2): 513 - 522.
- [3] Fadel E, Mazmanian GM, Chapelier A, et al. Lung reperfusion injury after chronic or acute unilateral pulmonary artery occlusion[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1998, 157(4 Pt 1): 1294 - 1300.
- [4] Kowalski TF, Guidotti M, Deffebach M, et al. Bronchial circulation in pulmonary artery occlusion and reperfusion [J]. J Appl Physiol, 1990, 68: 125 - 129.
- [5] Pearse DB, Wagner EM. Role of the bronchial circulation in ischemia-reperfusion lung injury[J]. J Appl Physiol, 1994, 76: 259 - 265.
- [6] Kelly SM, Taylor AE, Michel RP. Bronchial collateral vessel micropuncture pressure in postobstructive pulmonary vasculopathy[J]. J Appl Physiol, 1992, 73: 1914 - 1924.
- [7] Charan NB, Carvalho P. Angiogenesis in bronchial circulatory system after unilateral pulmonary artery obstruction [J]. J Appl Physiol, 1997, 82: 284 - 291.
- [8] Haworth SG, M De Leval, Macartney FJ. How the left lung is perfused after ligating the left pulmonary artery in the pig at birth: clinical implications for the hypoperfused lung [J]. Cardiovasc Res, 1981, 15: 214 - 226.
- [9] Hamvas A, Palazzo R, Kaiser L, et al. Inflammation and oxygen free radical formation during pulmonary ischemia-reperfusion injury[J]. J Appl Physiol, 1992, 72:621-628.

(收稿日期:2008-04-07)