

油酸制作 ARDS 犬模型及 CT 表现

李雯, 陈淮, 曾庆思, 刘奇, 刘琴, 蒙秋华

【摘要】 目的:探索利用油酸制作犬急性呼吸窘迫综合征(ARDS)模型的方法及 CT 评价犬 ARDS 的价值。方法:将 16 条健康比格犬随机分为模型组(A 组,12 条)和对照组(B 组,4 条),A 组在 30 min 内从深静脉缓慢注入 0.18 mL/kg 油酸(用 0.9%生理盐水 30 mL 稀释)造模,当犬动脉血氧分压(PaO_2)/吸入氧分数值(FiO_2) ≤ 200 mmHg 和肺动脉楔压(PCWP) ≤ 18 mmHg 时,即认定犬 ARDS 成模;B 组仅从深静脉注入相同容量的 0.9%生理盐水。两组在造模前及造模后均行 CT 扫描。在 CT 扫描结束后对犬实施安乐死,取出肺组织观察大体标本及镜下情况,并计算肺湿干比重(W/D)。结果:A 组在油酸注射(90 \pm 10) min 后形成 ARDS 模型,其肺湿干比重为 10.42 \pm 0.74,与 B 组(5.33 \pm 0.75)比较差异有统计学意义($P < 0.05$);犬 ARDS 镜下表现为肺水肿、炎性细胞渗出及透明膜形成,而两肺弥漫分布磨玻璃密度影则为犬 ARDS 的典型 CT 表现。结论:利用油酸能较好地制作犬 ARDS 模型,CT 能有效监测犬 ARDS 的形成。

【关键词】 急性呼吸窘迫综合征;狗;油酸;体层摄影术,X 线计算机

【中图分类号】 R563.8; R814.42 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-0313(2014)05-0509-04

Acute respiratory distress syndrome (ARDS) model in dogs induced by oleic acid and its CT features LI Wen, CHEN Huai, ZENG Qing-si, et al. Department of Radiology, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou Institute of Respiratory Disease, Guangzhou 510120, P. R. China

【Abstract】 Objective: To investigate the way of producing acute respiratory distress syndrome (ARDS) model of dogs by oleic acid (OA) and to assess the value of CT in monitoring ARDS model of dogs. **Methods:** 16 healthy Beagle dogs were randomly divided into the model group (group A, n=12) and the control group (group B, n=4). Acute lung injury (group A) was induced by the infusion of 0.18 ml/kg OA (diluted in 30 ml of 0.9% saline) slowly through the central venous catheter in 30min and ARDS was identified while $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200$ mmHg and $\text{PCWP} \leq 18$ mmHg. Group B was only infused with the same volume of 0.9% saline. Thorax CT scans were performed before and after modeling in the two groups and dogs were euthanized after CT scans. The lung tissue was removed for gross specimen and microscopic examination. At the same time, lung wet-dry weight ratio (W/D) was calculated. **Results:** ARDS was formed in (90 \pm 10) min after injection of OA. The lung wet to dry ratio of group A was 10.42 \pm 0.74 and there was statistical difference ($P < 0.05$) between group A and group B. The pathological changes of ARDS included pulmonary edema, inflammatory cell exudation and hyaline membrane formation. The diffuse distribution of ground-glass opacity in two lungs was the typical CT findings of ARDS in dogs. **Conclusion:** ARDS model of dogs can be produced by oleic acid and CT can effectively monitor the formation of ARDS in dogs.

【Key words】 Acute respiratory distress syndrome; Dog; Oleic acid; Tomography, X-ray computed

急性肺损伤(acute lung injury, ALI) /急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)指由于心源性以外的各种肺内、肺外因素造成的急性、进行性缺氧性呼吸衰竭,其临床表现为呼吸窘迫和难以纠正的低氧血症,治愈率较低;临床往往急性发病且情况危急,处理不及时,病死率高。CT 检查受到搬运途中病情危险的限制,临床上主要行床旁照片影像检查。临床对 ARDS 的很多研究是在动物 ARDS 模型上进行的,根据模型研究该病病理生理变化过程以及治疗方案^[1]。多数实验证实犬的 ARDS

标准与人类相同^[1]。本研究采用油酸对比格犬进行 ARDS 模型制作,旨在了解犬 ARDS 的 CT 影像表现。

材料与方法

1. 实验准备

16 条实验动物比格犬均由广州医药工业研究院提供,且通过了广州医学院的医学伦理会批准,雌雄不分,未孕,体重 10~14 kg,其中随机 12 条为实验组(A 组,即模型组),另 4 条为对照组(B 组),采用呼吸机(EVITA 4,德国)控制犬的呼吸,犬的吸氧浓度为 50%,呼吸时比为 1:2,呼吸频率为 25~40 次/分。

2. 麻醉和外科准备

实验犬在实验开始前禁食禁饮 12 h,用 100 mg 氯胺酮、10 mg 咪达唑仑、0.25 mg 阿托品肌肉注射诱导

作者单位:510120 广州,广州医科大学附属第一医院,广州呼吸疾病研究所放射科

作者简介:李雯(1987-),女,江西人,硕士,主要从事胸部影像诊断工作。

通讯作者:曾庆思, E-mail: 13660611505@163.com

基金项目:广东省科技计划项目(2010B060900090)

麻醉后,喉镜引导下向气管内插入内径为 7.5 mm 的气管插管建立呼吸通道^[2],用刺针经皮刺入动物右侧股静脉,插入导丝引入 8F 单腔导管鞘建立静脉通道,该通道用来确保实验过程中动物麻醉、输液和血流动力学测定。实验过程中从中心静脉持续静滴生理盐水 50 ml/h,间断用稀释的肝素溶液冲洗管道系统,保持管道的通畅。持续从中心静脉管静脉注射 5~10 mg/kg/h 丙泊酚和 0.25~0.50 mg/kg/h 维库溴胺(推针泵 SN-50C6,深圳)维持麻醉。向右侧股静脉导管鞘内插入施旺甘氏导管(爱德华兹生命科学,加利福尼亚州),用来测量肺动脉楔压(pulmonary arterial wedge pressure,PCWP)。左侧股动脉以右侧股静脉同样的方法置入 4F PiCCO 管,用来检测动脉血压、中心体温和血管外肺水的情况,并通过该通道采集动脉血的标本用来进行血气分析(使用 i-STAT Abbott,Illinois)。

3. CT 扫描设备及参数

本实验采用西门子 128 层螺旋 CT 进行扫描,扫描采用从肺尖至膈顶模式,扫描参数:128×0.6 mm,转速 0.5 s/r,视野 180 mm×180 mm,管电压 120 kV,管电流一般为 35 mAs,螺距 1.2,像素尺寸 0.32×0.32,采集矩阵 512×512。扫描完成后对扫描原始数据进行图像重建,重建层间距、层厚为 2 mm。

4. 急性肺损伤模型构造及 CT 扫描

A 组(模型组)根据犬的重量按 0.18 ml/kg 的油酸计算注入静脉量,用 0.9%生理盐水 30 ml 稀释油酸,然后通过中心静脉管在 30 min 内注射^[3,4]。B 组用 0.9%生理盐水代替油酸,根据犬的重量按 0.18 ml/kg 的 0.9%生理盐水加上 0.9%生理盐水 30 ml 的量注入,用相同的方法注射入犬的体内。两组动物均采用仰卧位姿势。所有动物在实验前均采集动脉血进行血气分析、肺毛细血管楔压的测量和分别行 CT 胸部扫描,注入油酸后每隔 10 min 采集动脉血进行血气分析,直至 A 组犬动脉血氧分压(P_{aO_2})/吸入氧分数(FiO_2) ≤ 200 mmHg 后,再对两组犬分别采集动脉血进行血气分析和 PAWP 的测量,A 组实验后 CT 扫描时机:当犬 $P_{aO_2}/FiO_2 \leq 200$ mmHg 和 PAWP(肺毛细血管楔压) ≤ 18 mmHg 时,即认定犬达 ARDS 状态^[3]。B 组 CT 扫描时机与 A 组平均时间相同。

实验中观察犬的呼吸情况,当 A 组 $P_{aO_2}/FiO_2 \leq 200$ mmHg 且吸氧后未见改善视为达到 ARDS 模型要求,对犬进行 CT 扫描,用 0.1 mL 维库溴铵静脉注射,阻滞犬的自主呼吸,随即用呼吸机给犬以 35 cmH₂O 的压力,视为吸气末相,此条件扫描得到的 CT 图像为犬吸气末图像;然后用丙泊酚静脉推注安乐死的方式处死犬,取出肺组织,观察肺大体标本变化情况。在左下肺取 5 cm×5 cm×5 cm 大小的肺组织

称其重量记为湿重(W),放入 80℃烤箱中烘干 30 h 后重新称取重量记为干重(D)^[5],记录湿干比重(W/D)值。在右下肺前基底段、后基底段、外基底段、右上肺尖段、右上肺前段、左上肺尖后段共 6 处分别取长、宽、高各为 1 cm 大小的肺组织,用福尔马林固定进行石蜡包埋、切片,苏木精-伊红(HE)染色,光镜下观察肺泡及肺间质改变。B 组按相同的 CT 扫描方式进行扫描、处死及病理观察。

统计学分析采用 SPSS 16.0 软件,数据以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用两独立样本的 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1. 一般情况

A 组(模型组)12 条实验犬中 10 条成模,2 条失败(实验中死亡)。A 组所有犬均在注射油酸 4~10 min 开始出现呼吸频率增快、呼吸费力、鼻翼煽动及嘴唇、颜面、粘膜紫绀;(90±10) min 后动脉血氧合指数 $P_{aO_2}/FiO_2 \leq 200$ mmHg, PAWP ≤ 18 mmHg,此时认定为达到 ARDS 状态。B 组(对照组)所有犬未见呼吸频率增快、呼吸窘迫、口唇发绀等现象,动脉氧合指数 $P_{aO_2}/FiO_2 \geq 300$ mmHg, PAWP ≤ 18 mmHg(表 1)。

表 1 两组实验前后 P_{aO_2}/FiO_2 及 PAWP 值 (mmHg)

组别	P_{aO_2}/FiO_2	PCWP
模型组		
实验前	446.68±27.05	8.60±1.78
实验后	164.08±21.13	9.90±3.60
对照组		
实验前	486.94±29.46	10.00±2.16
实验后	480.75±34.50	10.50±1.29

2. 肺病理表现

肺大体标本:B 组(对照组)肺体积未见增大,脏层胸膜未见紧绷,肺组织表面呈淡粉色,切开未见支气管内有肺水溢出(图 1)。A 组(模型组)肺体积增大,肺重量明显增加,脏层胸膜紧绷,肺表面可见弥漫的充血水肿,尤其是重力依赖区(背侧)两下肺呈朱红色,类似肝组织,两上肺散在点片状出血点,切面疏松,切开有泡沫状淡粉色液体从支气管内流出(图 2)。光镜下观察:对照组肺组织结构完整,小叶、肺泡腔清晰,无透明膜形成,肺泡间隔无水肿、炎症等特殊改变,肺泡间质无炎性浸润,纤维结缔组织无增生,肺泡壁无增厚(图 3);模型组肺泡间隔明显增宽,肺泡间隔以中性粒细胞浸润为主,肺泡腔内有大量红细胞、中性粒细胞、均质染色的透明膜及水肿液,肺泡大小不一,部分扩张,部分变小甚至塌陷,间质水肿明显,组织疏松(图 4)。病理湿干比的计算方法为肺组织的湿重与同块肺组织烘

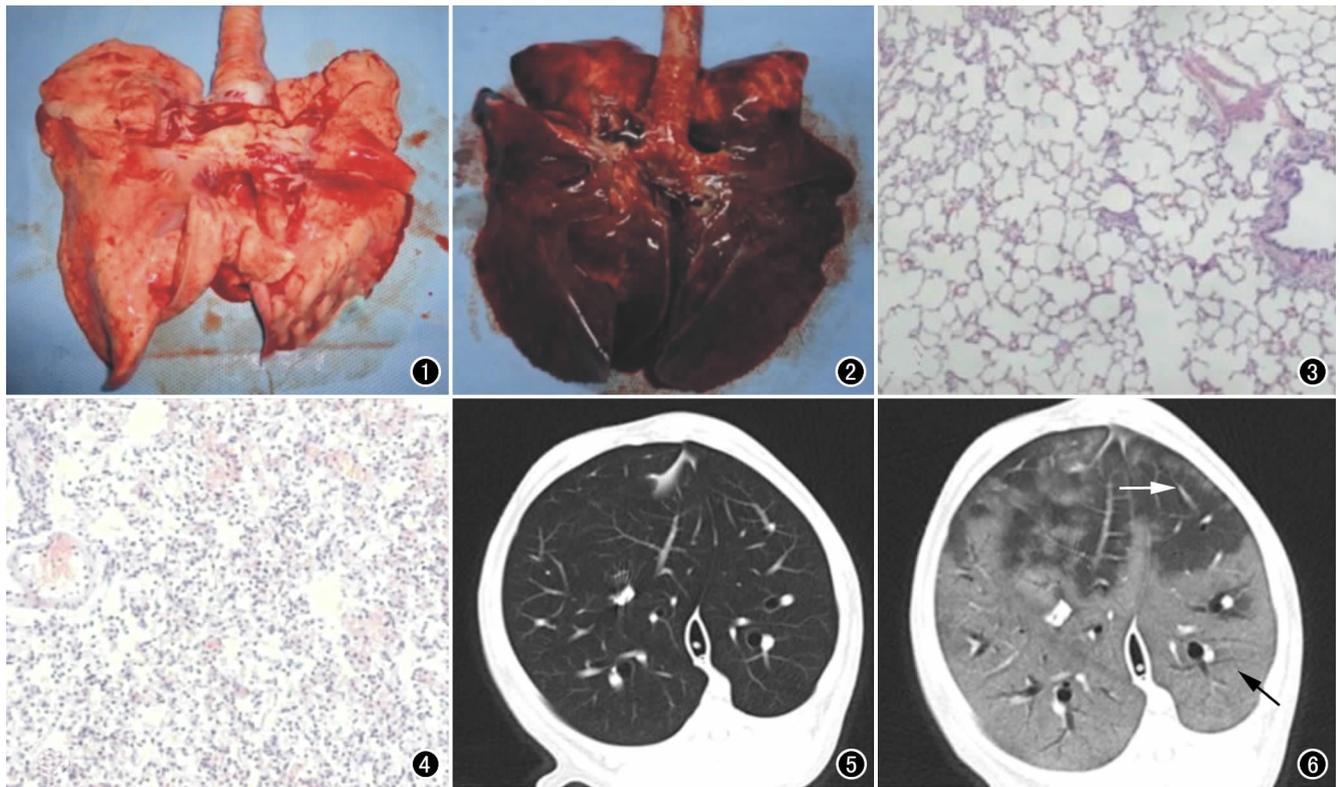


图1 对照组犬肺大体标本。图2 模型组肺大体标本,两下肺呈朱红色,类似肝组织,有泡沫状淡粉色液体从气管内流出。图3 对照组病理图示肺组织结构完整,肺小叶、肺泡腔内清晰,无透明膜形成,肺泡间隔未见增厚,肺泡间质内未见炎性细胞浸润($\times 40$, HE)。图4 模型组病理图示肺泡间隔明显增宽,肺泡间隔中性粒细胞浸润,肺泡腔内有大量红细胞、中性粒细胞、均质染色的透明膜及水肿液,肺泡大小不一致,部分闭塞塌陷($\times 40$, HE)。图5 模型组犬实验前CT扫描图像示两肺野清晰,肺纹理走行自如,两肺实质未见异常密度影。图6 模型组犬ARDS成模后CT扫描图像示近背侧片状实变影,其内可见空气支气管征(黑箭),腹侧肺组织可见斑片状模糊影(白箭)。

烤干后重量的比值。模型组的湿干比重(W/D)值明显高于对照组,两组差异有统计学意义($P < 0.05$, 表2)。

表2 两组犬肺组织湿干比值

组别	例数	W/D
模型组	10	10.42 ± 0.74
对照组	4	5.33 ± 0.75

注: t 值 = 4.798, P 值 = 0.001。

3. 肺 CT 表现

模型组和对照组实验前 CT 均表现为两肺清晰、纹理清楚(图5)。模型组成模后犬肺部 CT 图像:近背侧近重力依赖区肺部可见片状分布均匀实变影,其内见空气支气管征;次近重力依赖区多呈大片状磨玻璃密度影,分布多不均匀,其内夹杂正常肺组织;而非重力依赖区(近犬腹侧)多呈小斑片状不均匀模糊影(图6)。

不同犬成模时的影像表现均有实变影、大片状磨玻璃密度影、小斑片状模糊影三种影像改变,三种影像表现的分布情况如下:①实变影均在模型犬的重量依赖区即背侧肺组织,位置较固定,且都呈均匀分布;②大片状磨玻璃密度影均在次重力依赖区,多不均匀,夹杂正常肺组织,且磨玻璃密度影与正常肺组织边界清

楚,但分布无明显规律;③小斑片状模糊影在犬非重力依赖区均有出现,分布多不均匀,但出现有一定规律,多位于近胸膜下肺组织。

讨论

欧美协会 1994 年制定的 ARDS 诊断标准为:①有发病的高危因素;②急性起病,呼吸频率增快和/或呼吸窘迫;③低氧血症:ALI 时动脉血氧分压(PaO_2)/吸入氧分数值(FiO_2) ≤ 300 mmHg, ARDS 时 $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200$ mmHg;④胸部 X 线检查两肺可见浸润阴影;⑤肺毛细血管楔压(PAWP) ≤ 18 mmHg 或临床上能除外心源性肺水肿。凡符合以上 5 项可以诊断为 ALI 或 ARDS^[3]。ARDS 的损伤因素包括直接和间接损伤,直接损伤是有害因素直接损伤肺泡上皮导致局限性的肺泡炎症应答;而 ARDS 的间接损伤是有害因素通过炎症介质穿过血液影响血管内皮导致肺损伤^[6]。ALI/ARDS 其病理生理基础是大量炎症细胞通过释放大量炎症介质和细胞因子而致病^[7]。大量中性粒细胞、巨噬细胞的聚集和被活化,引起呼吸爆发,产生氧自由基,释放多种炎症介质和代谢产物造成肺

泡-毛细血管膜的损伤,弥漫性肺损伤、蛋白性肺泡水肿液聚集、间质浸润引起的小气道狭窄及支气管阻塞使肺泡萎陷^[6],损害使肺内炎性细胞及成纤维细胞反应性增加,造成肺血管阻塞,增加生理无效腔^[8]。

笔者应用油酸进行 ARDS 犬模型的制作,是由于油酸是 18-碳的不饱和脂肪酸,直接进入肺循环后能引起脂肪栓塞综合征,引起急性肺损伤^[9]。油酸致肺损伤作用机制包括如下几点^[10]:①氧化应激反应,油酸具有亲水特性,较低浓度时即可与生物膜结合,氧化应激参与诱导肺损伤的发病;②促凝血活性增高,油酸损伤后常可发现肺泡内纤维蛋白沉积,促凝血活性明显增高,持续较长时间的纤维蛋白沉积和积聚,可能成为导致纤维化的炎症刺激成分之一;③内皮素作用,油酸使肺炎性细胞明显增多,这是由于内源性内皮素通过内皮素受体依赖性机制促进循环嗜中性粒细胞向肺内浸润,增加微血管血浆外渗。

关于 ARDS 模型试验动物亦有运用兔、猪的报道^[2,11],本实验采用犬是因为犬体型较兔大,便于观察肺部 CT 图像,更接近于人,提高了试验结果的可参考性。猪体型较大,体重较重,不适合较少的实验人员操作,且转运上 CT 机比较麻烦。因此犬适合较少实验人员参与的实验,并能得到满意的接近人类的胸部影像图。

本组实验中行 CT 扫描前运用 0.1 mL 维库溴铵注入犬体内,目的是阻滞犬的自主呼吸。人在扫描前先深吸一口气屏住呼吸,再行扫描。犬并不能像人类一样配合进行 CT 扫描,为了所得胸部 CT 图像清晰、便于观察,阻滞犬的自主呼吸后,再用呼吸机给犬以 35 cmH₂O 的压力视为吸气末相,可得到满意的胸部 CT 影像图。本组实验显示模型组成模后 CT 扫描均显示肺部实变影和磨玻璃密度影,近重力依赖区肺部病变较显著;病理表现主要为肺间隔和肺泡腔大量渗出,同时有透明膜形成,在 ARDS 猪模型上也有类似的 CT 表现^[11]。

本次实验总共运用 16 条比格犬,其中 2 条实验中途死亡,第 1 条在刚注完油酸 5 min 后死亡,第 2 条在注完油酸 60 min 后死亡,笔者所得经验如下:①注射油酸时应该用生理盐水稀释,混合均匀,尽量让油酸变成最小油滴悬浮于生理盐水中,油酸颗粒过大容易造成较大的肺动脉栓塞,导致犬猝死。在注射完油酸后,由于注射器管壁会有油酸残留,应用生理盐水多次冲洗注入犬体内,确保注射的油酸量;②保证呼吸道的通畅,注射完油酸后等待成模的后期要注意犬呼吸的变

化,由于油酸造成的炎性反应,毛细血管内皮完整性破坏导致肺水肿,大量水肿液从肺泡腔内向段以上支气管内溢出,当填满主支气管或气管时,犬呼吸困难,这并不是 ARDS 造成的不可逆性呼吸困难,此时应该及时用吸痰机吸去气管内的肺泡水肿液,并适量增大吸氧浓度至 70%;③在等待造模过程中要密切监控犬的心率,由于炎症反应的打击,往往在造模过程中犬的心率容易降低至 30~40 次/分,此时用 20 mL 生理盐水稀释 10 mL 阿托品静脉注射,如若无效增大剂量;④保证血管管道通畅,在每次采集完动脉血液时应用生理盐水冲洗 PICCO 管,防止管道内血液凝固堵塞导管。

参考文献:

- [1] Liu Q, Li W, Zeng QS, et al. Lung stress and strain during mechanical ventilation in animals with and without pulmonary acute respiratory distress syndrome[J]. J Surg Res, 2013, 181(2): 300-307.
- [2] Protti A, Cressoni M, Santini A, et al. Lung stress and strain during mechanical ventilation: any safethreshold? [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 183(10): 1354-1362.
- [3] Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, et al. The American-European consensus conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and trial co-ordination[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1994, 149(3): 818-824.
- [4] Neumann P, Berglund JE, Andersson LG, et al. Effects of inverse ratio ventilation and positive end-expiratory pressure in oleic acid-induced lung injury[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 161(5): 1537-1545.
- [5] 王艳玲, 肖倩, 吴瑛. 24 h 内不同俯/仰卧位通气时间比对急性肺损伤模型病理的影响[J]. 中国实用护理杂志, 2011, 27(5): 1-4.
- [6] Pelosi P, D'Onofrio D, Chiumello D, et al. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome are different[J]. Eur Respir J Suppl, 2003, 42(22): 48s-56s.
- [7] 谭玉军, 刘秀珍, 张如意, 等. JAK2/STAT1 在油酸型 ARDS 大鼠中的作用及 GCs 对其调控研究[J]. 实用医学杂志, 2012, 28(8): 1259-1261.
- [8] Blanch L, López-Aguila J, Villagrà A, et al. Bedside evaluation of pressure-volume curves in patients with acute respiratory distress syndrome[J]. Curr Opin Crit Care, 2007, 13(3): 332-337.
- [9] Schuster DP. ARDS: clinical lessons from the oleic acid model of acute lung injury[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1994, 149(1): 245-260.
- [10] 陆月明. 油酸致急性肺损伤动物模型析评[J]. 中华急诊医学杂志, 2005, 14(1): 81.
- [11] 戢新平, 王玉芝, 杨丽丽, 等. 体位改变对急性肺损伤兔肺功能与 CT 及病理的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2005, 28(1): 33-36.

(收稿日期: 2013-03-27 修回日期: 2013-09-23)