

· 基础研究 ·

DOI: 10.13498/j.cnki.chin.j.ecc.2020.03.14

无血预充大鼠体外循环心脏不停跳模型的改进

韩悦,刁玉刚,宋丹丹,孙莹杰,费婉琪,郑晶晶

[摘要]:目的 寻找建立体外循环(ECC)模型的简便安全以及利于术后行为学检测的穿刺方法。方法 无菌级雄性成年 SD 大鼠 350~400 g 20 只。2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,右下肢隐动脉穿刺监测血压,右下肢大隐静脉穿刺用于给药及补液,左下肢隐动脉穿刺灌注,经右颈内静脉穿刺引流,术中连续监测心率、心电图、血氧饱和度、血压和肛温。转流流量维持在 100~120 ml/(kg·min),转流中根据血气分析结果调整离子和酸碱紊乱,ECC 转流 60 min。结果 18 只大鼠成活,存活大鼠术后一天均可进行水迷宫训练。结论 此种方法的改良对大鼠创伤小,操作简单,成功率较高,均可用于术后行为学检测,是研究 ECC 后全身炎症反应导致的术后认知功能障碍、各脏器保护策略的良好的实验模型。

[关键词]: 体外循环;大鼠;无血预充;心脏不停跳;动物模型

Modified extracorporeal circulation model of blood-free prefilled rats

Han Yue, Diao Yugang, Song Dandan, Sun Yingjie, Fei Wanqi, Zheng Jingjing

General Hospital of the Northern Theater of the Chinese People's Liberation Army, Shenyang 110016, China

Corresponding author: Diao Yugang, Email: diao72@163.com

[Abstract]: **Objective** To find a simple and safe method for establishing CPB model and a puncture method convenient for postoperative behavioral testing. **Methods** Twenty sterile adult male SD rats weighing 350–400 g were anesthetized by intraperitoneal injection with 2% pentasorbital sodium. The right lower extremity saphenous artery was punctured for blood pressure measurement, the right lower extremity saphenous vein was punctured for drug delivery and fluid replacement, the left lower extremity saphenous artery was punctured for perfusion, and the right internal jugular vein was punctured for drainage. Heart rate, electrocardiogram, blood oxygen saturation, blood pressure and rectal temperature were monitored during the operation. The flow rate was maintained at 100–120 ml/(kg·min). During the perfusion, the ion concentration and acid–base disorder were adjusted according to the results of blood gas analysis. The extracorporeal circulation was maintained for 1 hour. **Results** Eighteen rats survived successfully. The survived rats were able to be trained in water maze one day after surgery. **Conclusion** This method is easy to operate with less trauma and higher success rate. It can be used for postoperative behavioral testing. It is a good experimental model for studying postoperative cognitive dysfunction caused by systemic inflammatory response after CPB and organ protection strategy.

[Key words]: Extracorporeal circulation; Rat; Blood-free prefill; Heart beating; Animal model

体外循环(extracorporeal circulation, ECC)技术目前已经成为心胸外科手术的重要辅助措施,但体外循环时间过长的肝脏手术其术后死亡率及并发症的发生率仍较高,一直是相关研究的重点。因此建立模拟临床 ECC 过程的动物实验模型显得尤为重要。本研究拟对大鼠 ECC 模型建立的相关穿刺技术进行改良,探索大鼠 ECC 模型安全简便有效的建立方法。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81801078)

作者单位:110016 沈阳,中国人民解放军北部战区总医院麻醉科[韩悦(研究生)、费婉琪(研究生)]

通讯作者:刁玉刚,Email: diao72@163.com

1 研究对象及方法

1.1 实验动物 选取体重在 350~400 g 的成年雄性 SD 大鼠 20 只,大鼠由中国人民解放军北部战区总医院动物实验中心提供,所有实验方法均由中国人民解放军北部战区总医院实验动物伦理委员会审查和确认(批准号 2019014)。

1.2 材料与试剂 小动物呼吸机(玉研科学仪器有限公司, HX-101E),多参数心电监护仪(康泰医学系统有限公司, CMS7000),血气分析仪(德国西门子), Morris 水迷宫(上海欣软信息科技有限公司), 16 G、18 G、22 G 和 24 G 套管穿刺针(碧迪医疗器械有限公司),以及整个大鼠 ECC 系统,由恒流蠕动泵(重

庆科耐普蠕动泵有限公司)、大鼠专用模式氧合器(四川华西生物研究所)、配套硅胶泵管及管道(上海复旦生物材料有限公司)组成;戊巴比妥钠(美国 Sigma 公司)、吸入用七氟烷(上海恒瑞医药)、盐酸利多卡因注射液(遂成药业股份有限公司)等药物。

1.3 实验方法

1.3.1 麻醉与术前准备 大鼠在温度 23~25℃,湿度 45%~55%,光暗周期 12 h/12 h 环境中饲养^[1]。术前禁食 6 h、不禁水。腹腔注射 2%戊巴比妥钠 50 mg/kg,待大鼠翻正反射消失后固定于手术台上,连接心电图和血氧监测,大鼠气管插管,连接呼吸机,调整呼吸参数:潮气量 8~10 ml/kg,呼吸频率 60 次/min,吸入纯氧流量 1~2.5 L/min^[2]。根据动脉血气调整参数使动脉二氧化碳分压(PaCO₂)维持在 35~45 mm Hg,术中根据麻醉深度进行 2%戊巴比妥钠 0.3~0.5 ml 间断腹腔注射。

1.3.2 穿刺置管 右侧颈部、双下肢大腿内侧术区备皮,消毒,铺单。切皮后用 2%利多卡因 0.5 ml 局部浸润麻醉,依次钝性分离左侧大隐静脉,隐动脉,右侧隐动脉及右侧颈内静脉,血管上下两端分别穿 1-0 丝线打活结备用,置管完成后可直接打结进行置管固定。左侧大隐静脉以 24 G 套管针穿刺置管,排气,给予肝素(400 IU/kg)进行全身肝素化,10 min 后测活化凝血时间(activated clotting time, ACT),确保转流期间的 ACT>480 s,此静脉用于静脉给药及补液。左侧隐动脉置入 24 G 套管,连接换能器检测血压及采血。将 24 G 套管针置入右侧隐动脉作为 ECC 动脉血回输端。右颈内静脉置入带有侧孔的 18 G 套管针,置管深度到门齿,插入上腔静脉和下腔静脉与右心房交界处,作为静脉引流端^[3]。

1.3.3 ECC 预充液为 6%羟乙基淀粉注射液 2 ml,乳酸钠林格注射液 2 ml,20%甘露醇 1 ml,5%碳酸氢钠+咪塞米+肝素(1 000 IU/kg)共 1 ml 成比例配置备用。储血槽为 5 ml 注射器并低于大鼠心脏平面 30 cm,连接并固定转流机各管道,连接氧气端,流量调至 1~2.5 ml/min,0.9%生理盐水排空管道并探查管道连接紧密性,用预充液冲洗管道并排空膜肺及管道内气泡,防止气泡进入大鼠体内^[4]。5 ml 储血槽内加入罗库溴铵 1.2 ml/kg,舒芬太尼 3 μg/kg,去甲肾上腺素 2 滴(2 ml 注射器针头)。膜肺动脉出血口连接右侧隐动脉,储血槽接收颈内静脉流出的血流,转流开始逐渐加大引流量至 100~120 ml/(kg·min),关闭呼吸机,ECC 期间根据血气结果调整各离子水平以及酸碱失衡,大鼠的各指标与

人的正常值范围相同,保持体温 32~35℃,监测转流期间的尿量,维持平均动脉压(mean arterial pressure, MAP)60~90 mm Hg。转流 60 min 逐渐减少灌注流量至 1 ml/h,恢复机械通气。根据停机前血红蛋白及血细胞比容(hematocrit, HCT)决定是否回输管道内的血。停机前按 1:1 给予鱼精蛋白拮抗肝素。根据大鼠血压及中心静脉压调整血管活性药及补液,待其生命体征平稳后停药,拔出穿刺针套管,结扎,局麻下缝合。

1.3.4 术后 待大鼠自主呼吸恢复并有体动后,脱机观察其呼吸情况,撤掉心电监护,保留血氧饱和度监测继续观察,待大鼠自主脱管,自由进水,自由活动后放入饲养箱中,供食水,注意通风,保暖。

1.4 统计学分析 数据分析采用 SPSS 19.0 软件,定量数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,不同时间点的比较采用单因素方差分析检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠存活情况 18 只大鼠顺利完成 ECC,另两只因穿刺颈内静脉置管失败导致引流不畅以及突破心脏而死亡。完成 ECC 的大鼠待循环稳定后拔出动静脉插管并在局麻下缝合切口皮肤,等大鼠自主吐出气管导管,喂食糖水待其状态良好后放回鼠笼,术后 24 h 观察大鼠活动情况及精神状态与术前无异样,见图 1。



图 1 大鼠穿刺部位以及术后下肢恢复情况

2.2 生命体征与血气分析结果 大鼠 ECC 期间 MAP 与肛温明显降低,但在 ECC 结束后会逐渐恢复,由于预充液的血液稀释 HCT 在 ECC 期间也有所降低,但在可接受的范围内,其余参数基本维持在正常水平。见表 1。

2.3 大鼠术后 1 d 水迷宫实验结果 18 只大鼠术后 1 d 均进行隐藏平台实验,所有大鼠术前和术后的平均游泳速度无统计学差异($P > 0.05$),说明改

表 1 大鼠 ECC 模型循环及血气变化(n=18, $\bar{x}\pm s$)

项目	ECC 前	ECC 15 min	ECC 45 min	停 ECC	ECC 后 30 min
MAP(mm Hg)	110.3±5.7	65.8±6.3	64.2±6.7	92.4±7.4	97.6±6.8
肛温(℃)	37.1±0.4	34.5±0.7	35.1±0.6	35.5±0.7	36.8±0.3
HCT	0.43±0.06	0.30±0.03	0.30±0.02	0.3±0.03	0.34±0.02
PaO ₂ (mm Hg)	378±36.6	252±21.3	246±25.4	236±22.5	382±37.2
PaCO ₂ (mm Hg)	38.3±2.1	36.7±1.2	37.4±0.9	38.0±1.4	40.1±1.8

良后的穿刺技术对大鼠术后下肢运动功能的恢复无明显影响,结果见图 2。

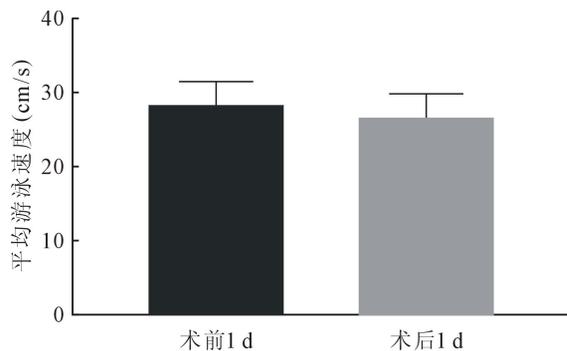


图 2 大鼠术前后平均游泳速度的比较

3 讨论

ECC 是心脏手术成功的前提和保证,大鼠 ECC 模型的建立模仿临床设置,能够应用于 ECC 术后所致并发症相关机制的具体研究。本论文总结国内外大鼠 ECC 模型的建立并结合自身实验及条件进行了改良。

3.1 麻醉与插管 麻醉与插管是 ECC 模型成功建立的前提,此模型待大鼠七氟烷吸入麻醉后采用 2% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 提起右下肢完全暴露腹部进行腹腔注射麻醉,注意回吸无血后注射麻药,避免麻药入血死亡,待翻正反射消失后,四肢及门齿固定在手术台上,营造黑暗的环境,打开手术灯探照在声门位置,插管钳挑起会厌后,可见声门随呼吸运动而张合,插管切勿暴力,抓好时机,待声门张开后轻柔的置入气管导管,并固定好导管位置连接呼吸机进行机械通气。多次插管会导致喉头水肿充血,上呼吸道分泌物增多,大鼠因无法通气血氧饱和度急剧下降而死亡,因此遇到插管困难时可换其他实验人员尝试插管或者使用管芯将导管置入,保证大鼠及时通气确保生命体征的平稳。

3.2 动静脉穿刺置管 本实验采用了大隐静脉及

隐动脉穿刺置管。右下肢隐动脉分离穿刺置管作为动脉回输端,左下肢隐动脉分离穿刺置管连续监测动脉血压以及大隐静脉穿刺作为静脉输液给药。本方法选择右下肢隐动脉而不是尾动脉作为动脉血回输端,隐动脉位置表浅,易于分离,且不易出血,并且术中可以妥善固定,不会因回输血压力大而使管路脱出,术后结扎隐动脉及隐静脉不会影响大鼠下肢血供,对下肢活动无影响。为检验采用这种穿刺方法建立的大鼠 ECC 模型对术后行为学检测是否有影响,分别在术前和术后 1 d 进行水迷宫训练,18 只大鼠全部完成训练,因此这种改良穿刺方法建立的大鼠 ECC 模型,在大鼠 ECC 后检测动物行为学改变是可行的。

3.3 右颈内静脉穿刺置管注意事项 采用 16 G 麻醉套管针进行穿刺,针管前端剪 4-5 个侧孔,为了达到更好的引流。右颈内静脉血管壁较薄,穿刺过程中极易穿破血管壁,进而血气胸形成,因此穿刺过程中,动作要轻柔,遇到阻力后适当调整角度方向重新进管,置管深度到右心房并且血流速度能够满足全流量转流即是合适的深度^[5-6],切勿继续进管,穿破心房导致心包压塞大鼠血压迅速下降至死亡。熟悉大鼠颈内静脉至右心房血管的走形及解剖结构,操作要小心谨慎,尽量避免上述情况的发生。

3.4 ECC 期间的调节 本模型为无血预充非开胸心脏不停跳 ECC 模型,为了防止大鼠血液过度稀释,尽量减少管路中的预充液,通过转流前大鼠血气分析结果,在预充液中加入相应的药物进行预调节,本实验采用的管路需要预充液 12 ml 左右,血流量调节在 100~120 ml/(kg·min)^[7-8]。转流期间严密监测大鼠血压心率的波动以及尿量体温的数值,必要时给予升压药或强心药处理。术中血气分析显示 HCT 经预充液稀释后在 0.28 以上,血红蛋白在 86 g/L 以上,能够满足器官组织灌注及携氧能力。转流期间注意储血槽的血液平面不能低于 1 ml,防止进入气体导致空气栓塞,观察尿量及颜色的改变,计算出入量,必要时补液或者给利尿药,确保肾脏灌

注。根据血气值调节酸碱平衡,离子紊乱,及时纠正保持内环境平衡。转流 1 h 后停机要慢,注意复温,根据血红蛋白的浓度决定管路中的血是否输回大鼠体内,回输血液转流机减到最小转速,防止速度过快引起心衰^[9-10]。

综上所述,大鼠 ECC 模型建立有很多种,本实验选择大鼠下肢隐静脉、隐动脉进行穿刺,操作熟练后血管神经解剖明确,操作时间明显缩短,术中可以妥善固定,术后下肢恢复速度很快,创伤小,选择穿刺的血管结扎后都有侧支血管进行血液供应,不会造成缺血坏死的并发症,为今后研究 ECC 后严重并发症的病理机制提供良好的实验平台。

参考文献:

- [1] Huang D, Chen M, Wang Z, *et al*. Electroacupuncture pretreatment attenuates inflammatory lung injury after cardiopulmonary bypass by suppressing NLRP3 inflammasome activation in rats[J]. *Inflammation*, 2019, 42(3): 895-903.
- [2] Engels M, Bilgic E, Pinto A, *et al*. A cardiopulmonary bypass with deep hypothermic circulatory arrest rat model for the investigation of the systemic inflammation response and induced organ damage[J]. *J Inflamm (Lond)*, 2014, 11: 26.
- [3] Zhang W, Zhang Y, Liu D, *et al*. A novel rat model of cardiopulmonary bypass for deep hypothermic circulatory arrest without blood priming[J]. *Chin Med J(Engl)*, 2014, 127(7): 1317-1320.
- [4] Li LK, Cheng W, Liu DH, *et al*. A novel, recovery, and reproducible minimally invasive cardiopulmonary bypass model with lung injury in rats[J]. *Chin Med J(Engl)*, 2013, 126(24): 4715-4719.
- [5] 朱斌. 大鼠体外循环模型研究中的若干问题[J]. *中国医学科学院学报*, 2012, 34(6): 629-632.
- [6] Zhu X, Ji B, Liu J, *et al*. Establishment of a novel rat model without blood priming during normothermic cardiopulmonary bypass[J]. *Perfusion*, 2014, 29(1): 63-69.
- [7] Samarska IV, Henning RH, Buikema H, *et al*. Troubleshooting the rat model of cardiopulmonary bypass: effects of avoiding blood transfusion on long-term survival, inflammation and organ damage[J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2013, 67(2): 82-90.
- [8] 李健,郭震,路丽明,等. 无血预充大鼠体外循环模型的建立[J]. *中国体外循环杂志*, 2018, 16(3): 184-188.
- [9] 段铭杰,孙莹杰,郑翔,等. 改良穿刺法建立大鼠无血预充非停跳体外循环后认知功能障碍模型[J]. *中国体外循环杂志*, 2017, 15(3): 179-184.
- [10] 曾庆东,李勇男,周玉姣,等. 新型无血预充大鼠深低温停循环模型的建立[J]. *中国体外循环杂志*, 2016, 14(2): 120-124.

(收稿日期:2020-01-06)

(修订日期:2020-04-14)

(上接第 170 页)

- [1] Cho HJ, Ma JS, Cho YK, *et al*. Timing in resolution of left heart dilation according to the degree of mitral regurgitation in children with ventricular septal defect after surgical closure[J]. *J Pediatr (Rio J)*, 2014, 90(1): 71-77.
- [2] Carpentier A, Adams DH, Filsoufi F, *et al*. Carpentier's reconstructive valve surgery[M]. Maryland: Saunders, 2010: 60-68.
- [3] Vricella LA, Ravekes WA, Arbustini E, *et al*. Simplified mitral valve repair in pediatric patients with connective tissue disorders[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2017, 153(2): 399-403.
- [4] Buratto E, Ye XT, Konstantinov IE. Mitral repair in children with connective tissue disorders: on the edge, over the edge, or edge-to-edge[J]? *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2017, 153(2): 404-405.
- [5] 殷强,韩跃虎,李红玲,等. 二尖瓣成形术治疗小儿先天性二尖瓣病变疗效分析[J]. *中国体外循环杂志*, 2019, 17(3): 180-182.
- [6] Lawrie GM, Earle EA, Earle N. Intermediate-term results of a nonresectional dynamic repair technique in 662 patients with mitral valve prolapse and mitral regurgitation[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2011, 141(2): 368-376.
- [7] Rahimtoola SH. The year in valvular heart disease[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 63(19): 1948-1958.

(收稿日期:2019-12-02)

(修订日期:2020-01-02)