

· 基础研究 ·

新型无血预充大鼠体外循环模型的建立

朱 贤,吉冰洋,刘晋萍,孙燕华,吴树彬,龙 村,唐 跃

[摘要]:目的 建立简便易行的新型无血预充大鼠体外循环模型,为进行中长期研究体外循环对机体各器官的影响提供物质基础。**方法** 选用 7 只成年 SD 大鼠,七氟烷诱导麻醉,经口气管插管接呼吸机维持麻醉。左侧股动脉 22G 套管针穿刺监测血压,鼠尾动脉置入 20G 套管针为动脉端灌注,经颈静脉置入自制多孔静脉引流管为静脉引流,转流 90 min 后停机,监测术前、术中和术后各时间点血流动力学和血气数值。**结果** 各时间点血流动力学和血气数值满意,7 只大鼠停机后生命体征稳定。**结论** 成功建立新型无血预充大鼠体外循环模型,麻醉深度和转流流量和温度均可精确控制,为进一步实施干预性、以及慢性长期实验提供可靠的模型基础。

[关键词]: 大鼠;体外循环;模型

[中图分类号]:R654.1 **[文献标识码]:** A **[文章编号]:**1672-1403(2012)03-0171-04

Establishment of a novel rat model bloodless priming during normothermia cardiopulmonary bypass

Zhu Xian, Ji Bing-yang, Liu Jin-ping, Sun Yan-hua, Wu Shu-bin, Long Cun, Tang Yue,
*Department of Cardiopulmonary bypass, Cardiovascular Institute and Fuwai Hospital, CAMS and PUMC,
 Peking Union Medical College, Beijing 100037*
Corresponding author: Ji Bing-yang, Email: dr. ji. cpb@gmail.com

[Abstract]: Objective To establish simple and convenient cardiopulmonary bypass (CPB) model bloodless priming in rats. **Methods** Seven adult rats received sevoflurane inhalation anesthesia and maintained anesthesia state by tracheal intubation. During the preoperative preparation, 22G catheter was cannulated in left femoral artery for monitoring arterial blood pressure, 20G catheter was cannulated in tail artery for the arterial inflow, homemade multi-orificed catheter was cannulated in right jugular vein for venous drainage. All CPB process lasted for 90 minutes. Blood gas analysis and hemodynamic parameters were measured in each time point before CPB, during CPB and after CPB. **Results** Blood gas analysis and hemodynamic parameters of each time points accorded with normal standard. Vital signs of all rats were stable. **Conclusion** The establishment of CPB bloodless priming in rats is successful. The model could provide reliable basic for further research by controlling the depth of anesthesia and temperature precisely.

[Key words]: Rats; Cardiopulmonary bypass; Models

体外循环(cardiopulmonary bypass, CPB)是心脏外科中保证手术得以实施的重要技术;然而 CPB 是把双刃剑,在保证手术顺利进行的同时 CPB 亦可以触发炎症反应、缺血再灌注、血液稀释、凝血系统障碍等病理反应,对患者术后顺利恢复造成了极大影响^[1]。如何能全面而深入的揭示由此发生的病理生理机制,建立简便易行的动物 CPB 模型是非常必要的。近年来,各种针对 CPB 研究的动物模型层出不穷^[2-4],而大鼠因其价格低廉,与人类相似的心血管系统解剖以及丰富的蛋白、基因水平的检测

手段等优点更加受到广大学者的青睐^[5]。我们在对近 10 年来国内外大鼠 CPB 模型建立的相关经验进行总结后,建立了具有原创性元素的大鼠 CPB 模型,不仅能满足急性实验的需求,同时进行了 CPB 后大鼠的长期存活尝试,取得满意效果。

1 材料和方法

1.1 实验动物 本实验经中国医学科学院阜外心血管病医院动物伦理委员会批准。成年雄性 SD 大鼠 7 只,体重 350~450 g(由中国医学科学院阜外心血管病医院动物中心提供)。

1.2 实验设备和药品 Stockert 双头滚压泵(德国 Stockert 公司),变温毯(ATC1000, Sarasota USA),特制动物膜肺(西京医疗用品有限公司),小动物呼吸

作者单位: 100037 北京,中国医学科学院北京协和医学院阜外心血管病医院体外循环科(朱 贤、吉冰洋、刘晋萍、孙燕华、吴树彬、龙 村),心外科(唐 跃)

通讯作者: 吉冰洋 Email: dr. ji. cpb@gmail.com

机 (Harvard Apparatus), Jostra HCU20 - 600 变温水箱 (Maquet Critical Care AB, Solna, Sweden), 变温器 (西京医疗用品有限公司), 多导生理监护仪, 血气分析仪 (美国 NOVA Biomedical 公司), 16G, 20G, 22G 套管穿刺针 (美国 Becton Dickinson 公司), 外科显微镜 (Oberkochen German), 呼吸麻醉机 (Surgivet USA)、静脉引流管 (改制于 22G 静脉输液针硅胶管), 6% 羟乙基淀粉 (万汶, 130/0.4, 北京费森尤斯卡比医药有限公司), 1 ml, 5 ml, 20 ml 注射器 (上海碧迪医疗有限公司), 手术缝线 (杭州华威医疗用品有限公司), 肝素钠 (常州千红生化制药有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 麻醉和术前准备 实验开始前, 七氟烷吸入诱导麻醉, 四肢固定于操作台, 温度探头置于肛门内监测体温, 经气管内插管, 接呼吸机行机械通气, 吸入 100% 纯氧混合 3% 七氟烷维持麻醉, 呼吸频率初始设定为 60 次/min, 潮气量 8 ~ 10 ml/kg (可根据血气值进行调节)。

1.3.2 动静脉插管过程 在外科显微镜下进行三根血管的穿刺置管: 尾动脉, 左侧股动脉、右侧颈静脉。左侧股动脉 22G 套管针穿刺置管, 全身 400 IU/kg 肝素化后, 行持续血流动力学监测; 20G 套管穿刺针穿刺置入尾动脉, 接 CPB 动脉灌注端; 精细外科剪刀剪开颈静脉, 在 5F 动脉鞘管导丝引导下, 经缺口送入静脉引流管, 尖端至右房水平 (前期预实验中明确颈静脉至右心房距离并做上标记)。所有置管血管远心端丝线结扎, 近心端丝线固定置管, 防止滑脱。

1.3.3 CPB 管道 整体管道由回流室 (5 ml 注射器)、硅胶管道 (内径 4 mm)、特制动物膜肺、变温器、滚压泵、变温水箱组成, 见图 1。管道预充液组成: 11 ml 万汶, 1 ml 肝素 (125 IU/ml), 维持回流室 2 ~ 3 ml 初始液面高度。

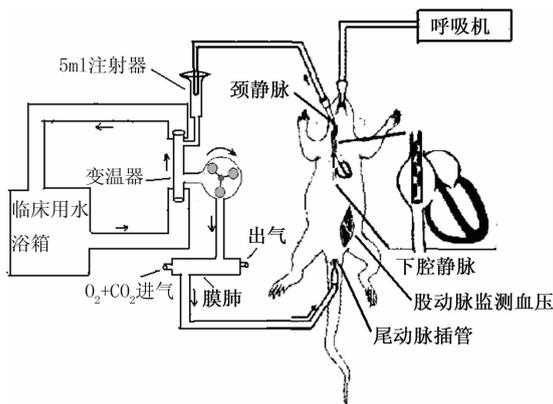


图 1 整体体外循环管路示意图

1.3.4 转流过程 管道预充排气完毕后, 回流室放置静脉引流端, 动脉端接尾动脉插管开始转流, 根据静脉引流量调整滚压泵转速, 膜肺中以氧气和二氧化碳混合气体进行氧合, 氧气流量维持 1 ~ 2 L/min, 根据血气值调整二氧化碳流量, 维持转中 PCO_2 在 35 ~ 45 mm Hg, 转流 90 min 后停机, 保留股动脉血压监测, 停机 30 min 后监测血气。转流过程中不加入任何血管活性药物, 考虑到转流过程可能会有体液的流失, 可根据血压和液面情况加入适量万汶, 大鼠体温通过变温水箱维持在 36°C 以上。

1.4 实验数据采集 实验过程中分别于转前, 转中 15 min、30 min、60 min、90 min 和转后 30 min 抽取血气, 并采用多导生理监护仪对各时间点血压、心率进行记录。

1.5 统计方法 应用 SPSS 13.0 软件包处理数据, 数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 对术中 15 min, 30 min, 60 min, 90 min 四个时间点进行单因素方差分析, 每两组数据之间应用 LSD 检验; $P < 0.05$ 表明有统计学差异。

2 结果

本实验 7 只大鼠转中血流动力学稳定, 各时间点血气和电解质数值基本正常。MAP 在 CPB 15 min 和 CPB 60 min 之间有统计学差异 ($P < 0.05$), 其余数据均无统计学差异 ($P > 0.05$)。二氧化碳分压 (PCO_2) 标准差数值较大, 转机过程中乳酸 (Lac) 较术前偏高。大鼠停机后均成活, 生命体征稳定。转流过程中动脉灌注流量可达到 100 ~ 120 ml/(kg · min)。转流过程中部分血气分析及血流动力学指标见表 1。

3 讨论

总结现有的文献经验, 相比较于大动物 CPB 模型, 大鼠具有以下优势: ① 价格低廉, 操作相对简单, 便于大样本试验的开展; ② 有丰富的蛋白基因水平的研究手段, 在神经功能检测方面也有标准的认知功能评估方法, 便于进行相关研究。然而大鼠体积小, 血管纤细, 全身血容量较少, 用传统的开胸建立 CPB 的方法风险较大, 且不利于大鼠术后存活^[5]。

对大鼠 CPB 模型的研究起于上个世纪 60 年代, Popovic P 首先提出了一种简化的模型建立的方法^[6]。半个世纪以来, 经过研究者的不懈努力, 大鼠模型的建立技术突飞猛进, 各种改良模型层出不穷。2001 年杜克大学报道利用自制的静脉引流管,

表 1 体外循环过程各时间点部分血气分析比较 (n = 7, $\bar{x} \pm s$)

项目	CPB 前	CPB 15 min	CPB 30 min	CPB 60 min	CPB 90 min	CPB 后 30 min
体重(g)	398.57 ± 33.09					
MAP(mmHg)	122.34 ± 12.31	97.73 ± 17.07	87.98 ± 14.31	78.78 ± 20.19*	81.88 ± 11.12	89.08 ± 10.08
葡萄糖(mmol/L)	11.96 ± 1.00	12.48 ± 1.39	14.73 ± 4.41	16.40 ± 4.65	16.63 ± 7.11	18.27 ± 6.10
氧饱和度(%)	99.9 ± 0	98.37 ± 2.17	99.07 ± 0.60	98.96 ± 1.21	98.45 ± 1.30	99.12 ± 0.82
心率(bmp)	398.45 ± 28.60	346.67 ± 31.77	353.52 ± 40.08	369.15 ± 37.27	384.17 ± 56.17	411.03 ± 28.78
pH	7.46 ± 0.1	7.54 ± 0.16	7.47 ± 0.11	7.49 ± 0.69	7.49 ± 0.57	7.42 ± 0.93
PaO ₂ (mm Hg)	491.04 ± 37.73	298.62 ± 123.91	270.37 ± 72.60	234.17 ± 52.53	259.65 ± 36.94	299.28 ± 62.85
PaCO ₂ (mm Hg)	45.16 ± 1.95	37.27 ± 20.50	42.05 ± 12.13	38.03 ± 8.21	34.28 ± 4.61	43.62 ± 12.41
T(°C)	35.63 ± 0.47	36.47 ± 0.42	36.82 ± 0.41	36.82 ± 0.41	36.96 ± 0.39	36.36 ± 0.24
Hct(L/L)	40.29 ± 0.95	19.71 ± 2.14	20.43 ± 2.70	20.43 ± 2.37	18.40 ± 1.67	20.80 ± 1.48
Lac(mmol/L)	0.73 ± 0.47	1.79 ± 0.80	2.44 ± 1.46	2.57 ± 1.60	2.70 ± 1.1	2.32 ± 1.71
Hb(g/L)	134.3 ± 4.0	66.3 ± 6.7	68.3 ± 8.8	68.6 ± 8.6	61.2 ± 5.0	69.4 ± 5.7

注:MAP:平均动脉压;PaO₂:动脉氧分压;PaCO₂:动脉二氧化碳分压;Hb:血红蛋白;与 CPB 15 min 比较 * P < 0.05。

成功建立一套接近全流量的大鼠 CPB 模型,实用有效,用于神经系统功能的研究,然而由于条件的限制,整体管道预充量较大,无法实现无血预充^[7]。后随着膜肺,变温器以及连接管道的微型化,国内外均有一些无血预充大鼠模型报道,de Lange 等在超声引导下,将球囊通过右颈总动脉引入升主动脉,充气阻断主动脉后,注射停搏液使心脏停跳,为小鼠模型的建立提供了新的思路^[8]。在最近的文献中,Waterbury T 等成功建立了无血预充的深低温停循环(deep hypothermic circulatory arrest, DHCA)模型,流量为 100 ~ 120 ml/(kg · min)^[3]。

目前认为一个理想的大鼠 CPB 模型应当满足:

① 大鼠术后可以长期存活;② 操作简单实用,尽可能减少实验参与人员;③ 尽可能接近临床实践^[9];④ 若进一步完成 DHCA 模型的建立,需要有精确温度监测和调控装置。本实验在总结了国内外一些已有的大鼠模型后,根据自身的实验条件及经验对相关设备和实验流程进行了一定程度的改良。

3.1 转流过程采用滚压泵 由于大鼠血容量较少,转流过程中的流量较低,多数试验采用蠕动泵,以求更精确的控制流量,维持回流室液面的平衡。而临床上通常采用滚压泵,本实验中利用滚压泵进行转流,更贴近于临床。

3.2 实验中采用七氟烷气体麻醉 国外的模型建立有报道采用异氟烷混合氧气进行麻醉^[3,8],而国内大多数采用戊巴比妥腹腔麻醉的方法^[10-11]。我们在前期预实验过程中,对气体麻醉和腹腔麻醉两种方式进行比较后发现,腹腔麻醉的麻醉效果较好、操作方便,但可能会抑制大鼠的自主呼吸,并对转中血

压造成影响;另一方面大鼠的麻醉深度无法控制,导致停机后大鼠自我意识长时间无法恢复,影响术后恢复。本试验中采用纯氧混合七氟烷气体麻醉的方式,可以根据七氟烷的浓度来调节大鼠的麻醉深度。我们的经验表明,采用适宜的气体麻醉方式,大鼠通常在停机后,撤出气管插管 5 ~ 10 min 内恢复意识、呼吸,且血压易于维持正常水平。

3.3 实验中采用的变温装置 临床常用的变温水箱,可以对术中的体温进行随意调节,并且可以保证升降温的时间。大多数文献中报道的对 CPB 过程中温度的控制方式各不相同,但大部分均存在温度控制不精确、变化效率不高等缺点。我们在试验中首次应用临床变温水箱,并在 CPB 管路中加装变温器(预充 < 3 ml),取得了较好的效果。一方面增加的预充液量并不会对实验产生较大的影响,另一方面可以模拟临床精确的控制大鼠体温,使实验模型更加贴近临床,并为后期进一步建立 DHCA 模型提供了便利的条件。

3.4 采用鼠尾动脉插管 目前文献报道的动脉插管方式主要有两种:股动脉插管和鼠尾动脉插管。我们在前期预实验中对两种插管方式均进行了尝试,发现两种插管方式各有优劣。股动脉位置表浅,易于分离,且不易出血,但是由于术后结扎股动脉,可能会影响大鼠术后下肢血供,造成大鼠下肢活动障碍。而尾动脉由于包裹在鞘膜中,不易分离,且大鼠尾巴血供极为丰富,易出血,由于 CPB 过程中全身肝素化,鼠尾动脉插管处转流过程中可能会出现渗血情况,但是尾动脉插管由于未伤及大动脉,有利于大鼠的术后存活。所以,可以根据干预试验的内容

来选择合适的插管方式,以达到更高的成功率。

3.5 采用自制的静脉引流管 目前各类文献中所用的静脉引流装置大致有两种,美国杜克大学采用自制的 4.5 F 多孔套管^[7-8],国内多采用 16G 的麻醉套管针^[4,11],然而大鼠静脉壁较薄,套管针管壁较硬,存在穿破静脉壁的风险,从而导致实验的失败。我们在多次实验的基础上认为,合适的静脉引流管应满足以下两点:① 为保证足够的转中流量,管壁内径应达到 2 mm 左右,并加以侧孔 4~6 个,便于引流;② 管壁足够柔软,操作轻柔,尽可能避免对血管壁的损伤以及对心脏传导系统的刺激。本实验中使用的静脉引流管改制于静脉采血针的硅胶管,取得了较好的实验效果,并且可以根据大鼠颈静脉的粗细情况选择不同粗细的管径,提高了实验的成功率。

3.6 不输血 本模型为无血预充,所有的管道连接以及实验器材均尽可能微型化,从术中血气指标来看,既避免了大鼠的过度血液稀释,同时也满足了大鼠的氧合需求。

在前期预实验中,我们建立模型的过程遇到了一些困难,导致实验的失败,究其原因主要有以下几点:① 插管失败:插管操作应轻柔,尽可能一次性成功,首次动脉插管失败时可以阻断动脉近心端后继续尝试插管,静脉插管时避免穿漏胸腔,从而导致实验的失败。② 管道进气:实验开始前充分排气,检查膜肺以及泵管是否存在漏气漏水问题,大鼠血管内一旦进气可出现血压迅速下降,无法控制;③ 内环境紊乱:根据血气值调节合适的 PO_2 和 PCO_2 ,尤其是 PCO_2 ,保证充分的气体交换,避免引起 pH 值和酸碱代谢产物的波动。

试验过程中,我们尝试对其中 3 只大鼠进行了成活试验,术中于回流室加入 1 ml 抗生素,停机后于尾动脉缓慢注入鱼精蛋白,与肝素 1:1 中和,结扎穿刺动脉,缝合伤口,送入动物房饲养观察。2 只大鼠 1 周后仍正常存活,1 只大鼠术后第二天死亡,死亡原因不明。

实验中存在的问题:① 在氧合气体的选择过程中,先后试用了纯氧和不同浓度比的空氧混合气体,但是均出现了转中 PCO_2 降低,大鼠出现呼吸性碱中毒的情况。后期实验中,我们采用了二氧化碳和纯氧的混合气体对静脉血进行氧合,可以根据转中大鼠的血气值调节 PCO_2 和 PO_2 在合适的范围。但是,我们使用的二氧化碳压力钢瓶无法恒定维持 CO_2 的流量,从而造成转中 PCO_2 数值出现波动,标准差增大。② 本模型建立采用血管的穿刺插管,在静脉引流方面可能难以实现全流量引流,且与临床 CPB 插

管方式有较大区别,有文献报道采用开胸的方式进行 CPB 的建立,最大程度上模拟了临床的过程^[12],但是由于对大鼠的损伤较大,不利于大鼠的长期存活。

综上所述,本实验遵循微型化的原则,尽可能贴近临床实践,成功建立一个新型的无血预充大鼠体外循环模型,在麻醉深度,温度等方面实现精确控制,一方面用于研究 CPB 过程中病理生理过程的改变,另一方面可以利用该模型进一步建立 DHCA 模型,对深低温条件下各器官的损伤与保护展开研究。

参考文献:

- [1] Franke A, Lante W, Fackeldey V, *et al.* Pro-inflammatory cytokines after different kinds of cardio-thoracic surgical procedures: is what we see what we know [J]? *Eur J Cardiothorac Surg*, 2005, 28(4): 569-575.
- [2] Kim WG, Choi SH, Kim JH. Temperature control using a heat exchanger of a cardioplegic system in cardiopulmonary bypass model for rats [J]. *Artif Organs*, 2008, 32(12): 993-998.
- [3] Waterbury T, Clark T J, Niles S, *et al.* Rat model of cardiopulmonary bypass for deep hypothermic circulatory arrest [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2011, 141(6): 1549-1551.
- [4] 沈中华,董国华,黄海荣,等. 微创大鼠体外循环模型的建立 [J]. *医学研究生学报*, 2008, 21(8): 809-812.
- [5] Ballaux PK, Gourlay T, Ratnatunga CP, *et al.* A literature review of cardiopulmonary bypass models for rats [J]. *Perfusion*, 1999, 14(6): 411-417.
- [6] POPOVIC V, POPOVIC P. Permanent cannulation of aorta and vena cava in rats and ground squirrels [J]. *J Appl Physiol*, 1960, 15; 727-728
- [7] Mackensen GB, Sato Y, Nellgard B, *et al.* Cardiopulmonary bypass induces neurologic and neurocognitive dysfunction in the rat [J]. *Anesthesiology*, 2001, 95(6): 1485-1491.
- [8] De Lange F, Yoshitani K, Podgoreanu MV, *et al.* A novel survival model of cardioplegic arrest and cardiopulmonary bypass in rats: a methodology paper [J]. *J Cardiothorac Surg*, 2008, 3: 51.
- [9] Jungwirth B, de Lange F. Animal models of cardiopulmonary bypass: development, applications, and impact [J]. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth*, 2010, 14(2): 136-140.
- [10] 王寿勇,李廷玉. 大鼠体外循环模型的建立及改进 [J]. *中国实验动物学报*, 2009, 17(1): 21-24.
- [11] 黑飞龙,高国栋,周荣华,等. 大鼠体外循环模型的建立 [J]. *中国体外循环杂志*, 2006; 4(4): 224-227.
- [12] Günzinger R, Wildhirt SM, Schad H, *et al.* A rat model of cardiopulmonary bypass with cardioplegic arrest and hemodynamic assessment by conductance catheter technique [J]. *Basic Res Cardiol*, 2007; 102(6): 508-517.

(收稿日期: 2012-05-10)

(修订日期: 2012-07-02)