

· 论著 ·

窒息法致心搏骤停家兔心肺复苏后多器官功能障碍模型的建立方法与评价指标

张东 李南 陈颖 王育珊

【摘要】 目的 探讨心搏骤停(CA)复苏后多器官功能障碍综合征(PR-MODS)家兔模型的建立方法和相关评价指标,为 CA 复苏后综合治疗研究提供具有实用价值的动物模型及评价方法。**方法** 将 35 只家兔按随机数字表法分成假手术组(5 只)、窒息 7 min 组(15 只)和窒息 8 min 组(15 只)。以夹闭气管法复制 CA 模型,心肺复苏(CPR)后观察两个窒息组家兔自主循环恢复(ROSC)率、不同时间点死亡率和全身炎症反应综合征(SIRS)发生率;同时检测两个窒息组家兔复苏前和 ROSC 后 12、24、48 h 血中肌酸激酶同工酶(CK-MB)、丙氨酸转氨酶(ALT)、肌酐(Cr)、血糖(Glu)及动脉血氧分压(PaO₂)水平;在 ROSC 后 48 h 处死存活家兔,光镜下观察心、脑、肺、肾、肝、小肠等器官的病理学变化;并根据主要器官功能及形态学变化判定是否发生 CA 后 PR-MODS。**结果** ①窒息 7 min 组和 8 min 组家兔 ROSC 率分别为 100.0%和 86.7%($P>0.05$)。窒息 8 min 组家兔 6 h 死亡率明显高于窒息 7 min 组(46.7%比 6.7%, $P<0.05$),而 12~48 h 死亡率仅有升高趋势(均 $P>0.05$)。②ROSC 后存活家兔可出现球结膜水肿、呼吸窘迫、血压下降、腹胀和肠鸣音减弱或消失,以及少尿等不同程度器官功能受损的表现。③假手术组家兔未发生 SIRS 和主要器官功能受损相关指标的变化。两个窒息组家兔在 ROSC 后 12~24 h 均发生 SIRS 反应;存活家兔在 ROSC 后 12 h CK-MB(U/L)即较窒息前明显升高(窒息 7 min 组:786.88 ± 211.84 比 468.20 ± 149.45,窒息 8 min 组:894.88 ± 248.80 比 462.11 ± 115.15,均 $P<0.05$),24 h ALT(U/L)、Cr(μmol/L)、Glu(mmol/L)即明显升高(窒息 7 min 组 ALT:174.25 ± 36.28 比 50.27 ± 9.37, Cr:144.25 ± 41.64 比 67.71 ± 16.47, Glu:11.21 ± 1.14 比 5.59 ± 1.10;窒息 8 min 组 ALT:205.50 ± 10.61 比 51.13 ± 10.37, Cr:230.50 ± 88.39 比 65.93 ± 13.81, Glu:11.55 ± 0.35 比 6.41 ± 1.23,均 $P<0.05$),48 h PaO₂(kPa)即明显下降(窒息 7 min 组:5.03 ± 0.73 比 9.07 ± 1.03, $P<0.05$)。④ROSC 后存活 48 h 的家兔(仅窒息 7 min 组存活 4 只)主要器官发生明显的病理改变,多表现为炎性细胞浸润、部分细胞变性水肿及坏死、组织出血等病理特征。**结论** CA 家兔在 ROSC 后如若出现 SIRS 和 2 个或 2 个以上器官功能障碍的体征、生化指标和非特异性病理改变,可作为评价 PR-MODS 动物模型的参考指标。

【关键词】 心搏骤停; 心肺复苏; 多器官功能障碍综合征; 动物模型

Reproducing and evaluating a rabbit model of multiple organ dysfunction syndrome after cardiopulmonary resuscitation resulted from asphyxia ZHANG Dong, LI Nan, CHEN Ying, WANG Yu-shan. Department of Intensive Care Unit, the First Hospital, Jilin University, Changchun 130021, Jilin, China
Corresponding author: WANG Yu-shan, Email: wang-yushan@tom.com

【Abstract】 Objective To evaluate the reproduction of a model of post resuscitation multiple organ dysfunction syndrome (PR-MODS) after cardiac arrest (CA) in rabbit, in order to provide new methods for post-CA treatment. **Methods** Thirty-five rabbits were randomly divided into three groups, the sham group ($n=5$), the 7-minute asphyxia group ($n=15$), and the 8-minute asphyxia group ($n=15$). The asphyxia CA model was reproduced with tracheal occlusion. After cardiopulmonary resuscitation (CPR), the ratio of recovery of spontaneous circulation (ROSC), the mortality at different time points and the incidence of systemic inflammatory response syndrome (SIRS) were observed in two asphyxia groups. Creatine kinase isoenzyme (CK-MB), alanine aminotransferase (ALT), creatinine (Cr), glucose (Glu) and arterial partial pressure of oxygen (PaO₂) levels in blood were measured in the two asphyxia groups before CPR and 12, 24 and 48 hours after ROSC. The survived rabbits were euthanized at 48 hours after ROSC, and heart, brain, lung, kidney, liver, and intestine were harvested for pathological examination using light microscope. PR-MODS after CA was defined based on the function of main organs and their pathological changes. **Results** ① The incidence of ROSC was 100.0% in 7-minute asphyxia group and 86.7% in 8-minute asphyxia group respectively ($P>0.05$). The 6-hour mortality in 8-minute asphyxia group was significantly higher than that in 7-minute asphyxia group (46.7% vs. 6.7%, $P<0.05$), and the mortality of 8-minute asphyxia group at 12–48 hours was slightly higher compared with that of 7-minute asphyxia group (all $P>0.05$). ② There was a variety of organ dysfunctions in survived rabbits after ROSC, including chemosis, respiratory distress, hypotension, abdominal distension, weakened or disappearance of bowel peristalsis and oliguria. ③ There was no SIRS or associated changes in major organ function in the sham group. SIRS was observed at 12–24 hours after ROSC in the two asphyxia groups. CK-MB (U/L) was increased significantly at 12 hours after ROSC compared with that before asphyxia (7-minute asphyxia group: 786.88 ± 211.84 vs. 468.20 ± 149.45, 8-minute asphyxia group: 894.88 ± 248.80 vs. 462.11 ± 115.15, both $P<0.05$), ALT

(U/L), Cr ($\mu\text{mol/L}$) and Glu (mmol/L) were elevated obviously at 24 hours after ROSC (7-minute asphyxia group ALT: 174.25 ± 36.28 vs. 50.27 ± 9.37 , Cr: 144.25 ± 41.64 vs. 67.71 ± 16.47 , Glu: 11.21 ± 1.14 vs. 5.59 ± 1.10 ; 8-minute asphyxia group ALT: 205.50 ± 10.61 vs. 51.13 ± 10.37 , Cr: 230.50 ± 88.39 vs. 65.93 ± 13.81 , Glu: 11.55 ± 0.35 vs. 6.41 ± 1.23 , all $P < 0.05$), and PaO_2 (kPa) was lowered significantly at 48 hours after ROSC (7-minute asphyxia group: 5.03 ± 0.73 vs. 9.07 ± 1.03 , $P < 0.05$). ④ There were pathological changes in major organ in the survived rabbits at 48 hours after ROSC (only 4 rabbits survived in 7-minute asphyxia group), including infiltration of inflammatory cells, partial cellular degeneration, edema, necrosis and tissue bleeding in major organs.

Conclusion If the SIRS and dysfunction of two or more organ were defined in animals after ROSC, the signs, biochemical markers and nonspecific pathological changes could be accepted to evaluate the PR-MODS.

[Key words] Cardiac arrest; Cardiopulmonary resuscitation; Multiple organ dysfunction syndrome; Animal model

心搏骤停(CA)复苏后多器官功能障碍综合征(PR-MODS)是导致CA患者最终复苏失败和整体预后不良的重要原因^[1-3]。如何减少心肺脑复苏(CPCR)过程中缺血/再灌注(I/R)损伤对心肌代谢和多器官功能的影响,进而阻止PR-MODS的发生发展,采用相关综合性防治措施提高心肺复苏(CPR)整体救治成功率越来越成为临床研究关注的焦点。因此,2010年美国CPR指南已将CA后综合治疗列入心血管急救成人生存链第5个新环节^[4]。目前由于受医学伦理学的限制,探索有效的CPR后综合治疗的干预措施,仍主要依赖动物实验研究来实现,但尚缺乏合适的CA后PR-MODS动物模型及其评价指标。因此,本课题组在窒息法致家兔CA模型的基础上,继续对CPR后家兔多器官功能改变和预后进行研究,初步摸索出CA后PR-MODS家兔模型建立的可行性方法,同时也对模型成功建立的相关指标进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物及模型复制:35只清洁级成年家兔〔购自吉林大学白求恩医学部实验动物中心,动物合格证号:SCXK(吉)2007-0004〕,体质量2.0~2.5 kg。用随机数字表法分成假手术组(5只)、窒息7 min组(15只)和窒息8 min组(15只)。参考文献[5]中致家兔窒息后CA和CPR的方法,不同窒息时间组分别在夹闭气管7 min和8 min后开始复苏;假手术组麻醉后不夹闭气管。对自主循环恢复(ROSC)的动物行连续颈动脉血压和心电图监测,对复苏后循环不稳定的家兔酌情给予多巴胺、肾上腺素、多巴酚丁胺等药物,至少维持平均动脉压(MAP)在60 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)以上,同时给予呼吸机辅助

通气。在ROSC后8~12 h,家兔血压和呼吸相对平稳至少1 h时可逐步进行脱机、拔管,将颈动脉置管撤除,局部结扎,逐层缝合颈部各层组织,连续观察24~48 h以上。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.2 标准:CA标准、ROSC判断标准、自主呼吸判断标准以及动物全身炎症反应综合征(SIRS)和MODS的诊断标准参考文献[5]方法。

1.3 观察和检测指标:①观察家兔外观、行为变化,计算窒息组家兔的ROSC率和6、12、24、48 h的死亡率。②检测窒息组家兔ROSC后6、12、24 h呼吸、心率、肛温和白细胞计数,观察SIRS的发生情况,同时观察假手术组有无SIRS发生。③窒息组家兔取复苏前和ROSC后12、24、48 h动脉血3 ml,检测肌酸激酶同工酶(CK-MB)、丙氨酸转氨酶(ALT)、肌酐(Cr)、血糖(Glu)、动脉血氧分压(PaO_2),同时检测假手术组麻醉前及苏醒后24 h各器官功能指标。④在ROSC后48 h将存活家兔处死,留取心、肺、脑等器官标本,甲醛固定,石蜡制片,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察各器官的病理学变化。

1.4 统计学处理:应用PEMS 3.1医学统计软件,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验;计数资料用率 $/$ 只表示,采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 模型动物外观、行为变化:①假手术组家兔麻醉后1 h可基本恢复角膜和咳嗽反射等各种生理性反射,自主呼吸平稳,但四肢不能完全站立,对疼痛刺激有较弱的躲避反应;2 h仍不能正常跳跃行走;3~4 h可较长时间站立,有自主搜索和饮水,其后逐渐恢复正常。②窒息组家兔在ROSC后2~4 h有角膜和咳嗽反射,自主呼吸弱需依赖呼吸机,球结膜水肿并流泪,对疼痛刺激无反应;4~8 h给予强刺激家兔可睁眼、四肢活动轻微,有自主呼吸且较规律,有轻微嚼管和吞咽动作;8~12 h血压平稳,自主呼吸

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2013.02.005

基金项目:国家自然科学基金(30870351);吉林省科技发展计划项目(200705201)

作者单位:130021 长春,吉林大学第一医院 ICU

通信作者:王育珊,Email:wang-yushan@tom.com

较好,可逐渐脱机、拔管,给予高流量鼻导管吸氧,对疼痛刺激有强烈的躲避反应,并开始饮水、进食、站立;12~24 h 开始出现精神萎靡,进食少,体温升高,呼吸频率和心率加快,呼吸音粗或有少许湿啰音;24~48 h 停止给氧,存活 48 h 的家兔不进食,对疼痛刺激反应弱,呼吸窘迫伴口唇、四肢末端发绀,心率减慢,腹部膨隆伴有肠鸣音较弱或消失,尿少。

2.2 不同窒息时间组 ROSC 率、死亡率比较(表 1):窒息 7 min 组 ROSC 率略高于窒息 8 min 组,但差异无统计学意义($P>0.05$)。窒息 8 min 组 6 h 死亡率明显高于窒息 7 min 组($P<0.05$),而 12~48 h 死亡率仅较窒息 7 min 组有升高趋势(均 $P>0.05$)。

2.3 各组家兔 SIRS 发生和主要器官功能指标比较(表 2):假手术组麻醉前和苏醒后 24 h 均未发生 SIRS 和器官功能指标变化(均 $P>0.05$)。两个窒息

表 1 不同窒息时间组家兔 ROSC 率及死亡率比较

组别	动物数	ROSC 率(%)	ROSC 后不同时间点死亡率[% (只)]			
			6 h	12 h	24 h	48 h
窒息 7 min 组	15	100.0	6.7(1)	26.7(4)	46.7(7)	73.3(11)
窒息 8 min 组	15	86.7	46.7(7) ^a	60.0(9)	86.7(13)	100.0(15)

注:ROSC:自主循环恢复;与窒息 7 min 组比较,^a $P<0.05$

组家兔在 ROSC 后 12~24 h 均出现 SIRS;与窒息前比较,两组 CK-MB 在 ROSC 后 12 h 即出现明显升高,ALT、Cr、Glu 在 ROSC 后 24 h 均出现明显升高,PaO₂ 在 ROSC 后 48 h 出现明显下降(均 $P<0.05$)。

2.4 ROSC 后 48 h 家兔主要器官组织病理学改变(图 1a~f):ROSC 后 48 h 将窒息 7 min 组仍存活的 4 只家兔处死,镜下观察显示,各主要器官发生炎性细胞浸润、部分细胞变性水肿及坏死、组织出血等病理特征。

表 2 窒息法致心搏骤停家兔心肺复苏不同时间点主要器官功能指标的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	动物数	CK-MB(U/L)	ALT(U/L)	Cr(μ mol/L)	Glu(mmol/L)	PaO ₂ (kPa)
假手术组	麻醉前	5	410.37 $\pm$ 85.31	53.80 $\pm$ 8.90	70.80 $\pm$ 16.54	5.72 $\pm$ 1.32	9.57 $\pm$ 1.28
	苏醒后 24 h	5	377.46 $\pm$ 115.67	58.80 $\pm$ 12.79	75.72 $\pm$ 9.30	6.30 $\pm$ 0.98	10.32 $\pm$ 1.93
窒息 7 min 组	窒息前	15	468.20 $\pm$ 149.45	50.27 $\pm$ 9.37	67.71 $\pm$ 16.47	5.59 $\pm$ 1.10	9.07 $\pm$ 1.03
	ROSC 12 h	11	786.88 $\pm$ 211.84 ^a	62.64 $\pm$ 12.24	62.64 $\pm$ 12.24	7.17 $\pm$ 1.06	24.30 $\pm$ 2.63 ^a
	ROSC 24 h	8	2294.48 $\pm$ 1134.40 ^a	174.25 $\pm$ 36.28 ^a	144.25 $\pm$ 41.64 ^a	11.21 $\pm$ 1.14 ^a	10.67 $\pm$ 1.55 ^a
	ROSC 48 h	4	1227.14 $\pm$ 427.27 ^a	261.75 $\pm$ 27.90 ^a	176.75 $\pm$ 37.53 ^a	10.43 $\pm$ 0.75 ^a	5.03 $\pm$ 0.73 ^a
窒息 8 min 组	窒息前	15	462.11 $\pm$ 115.15	51.13 $\pm$ 10.37	65.93 $\pm$ 13.81	6.41 $\pm$ 1.23	8.96 $\pm$ 1.00
	ROSC 12 h	6	894.88 $\pm$ 248.80 ^a	63.67 $\pm$ 11.88	98.83 $\pm$ 16.70 ^a	7.45 $\pm$ 1.71	22.78 $\pm$ 3.80 ^a
	ROSC 24 h	2	3066.13 $\pm$ 1135.38 ^a	205.50 $\pm$ 10.61 ^a	230.50 $\pm$ 88.39 ^a	11.55 $\pm$ 0.35 ^a	7.40 $\pm$ 0.47

注:ROSC:自主循环恢复,CK-MB:激酸肌酶同工酶,ALT:丙氨酸转氨酶,Cr:肌酐,Glu:血糖,PaO₂:动脉血氧分压;与本组窒息前比较,^a $P<0.05$

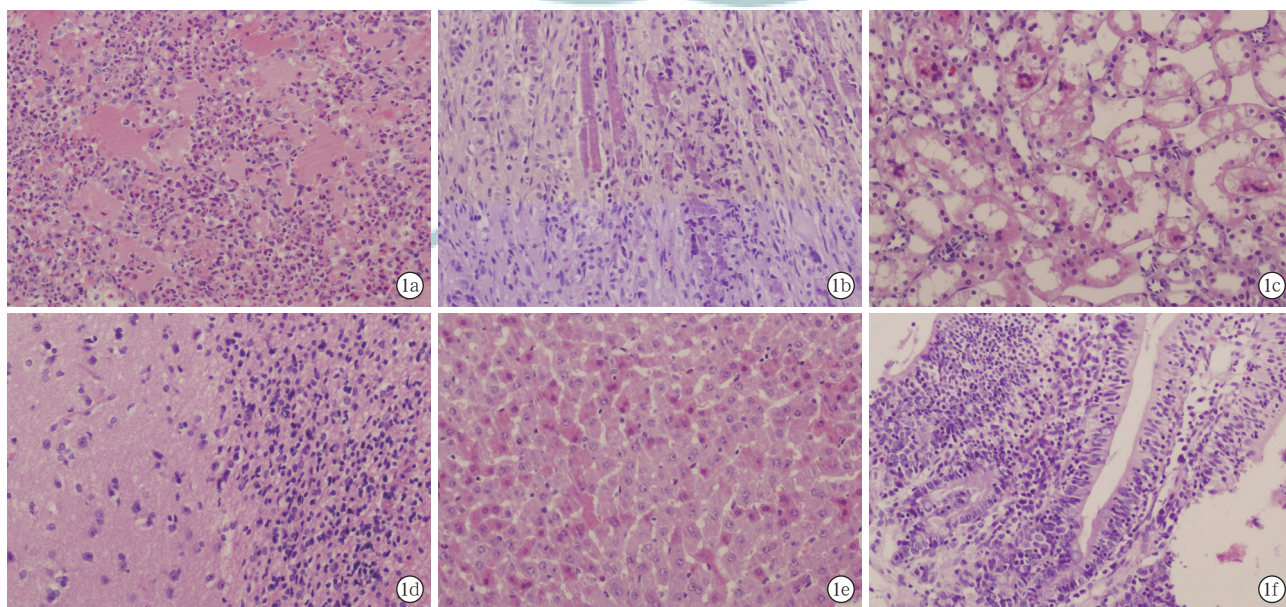


图 1 光镜下观察窒息法致心搏骤停家兔成功复苏后 48 h 主要器官的病理学改变 肺组织(a)肺泡腔内出血,伴腔内大量蛋白渗出,肺间隔充血、水肿,大量中性粒细胞浸润;心肌组织(b)间质水肿,部分细胞坏死,炎性细胞浸润;肾脏组织(c)肾小球内出血,炎性细胞浸润,肾小球扩张充血,肾小管上皮轻度水肿;脑组织(d)有较多炎性细胞浸润,脑膜充血明显;肝脏组织(e)细胞轻度水肿,嗜酸性变,部分肝细胞坏死失去正常细胞结构;肠组织(f)见绒毛间质大量炎性细胞浸润,部分肠绒毛上皮细胞坏死 HE 中倍放大

3 讨论

CA 经 ROSC 后机体出现心、肺、脑等重要器官功能紊乱或障碍常被称为复苏后综合征(PRS), CPR 是导致 MODS 的一个重要原因, 因此 PRS 又称为 PR-MODS^[1], 但目前其发生机制尚不十分明确。

采用窒息法建立 CA 模型多被用于模拟临床缺氧导致的 CA。近年来选择家兔用于 CA 的实验研究有增多的趋势^[6-8], 主要优势有: 家兔比较容易成批饲养; 动物实验需要的设备相对简单, 而且实验的可操作性较强; 相对小动物动静脉置管更容易且有利于采血、给药和进行血流动力学监测; 整体模型的建立和相关实验研究成本相对低, 更接近临床实际和有利于后续研究。本研究中以窒息法致家兔 CA 模型的建立为基础, 进一步来探讨是否可以成功建立 PR-MODS 动物模型。结果显示: CA 家兔 ROSC 后 12~24 h 普遍出现 SIRS 反应及不同程度的器官功能改变, 48 h PaO₂ 出现明显下降; 光镜下病理学观察显示, 主要器官组织发生明显改变, 以炎性细胞浸润、部分细胞变性水肿及坏死、组织出血等为主要表现, 这些改变与相关研究报道^[9-11]相近。提示窒息法致家兔 CA 复苏后会发生 SIRS, 以及主要器官功能、体征、生化指标和组织病理学改变, 这些指标均可作为 PR-MODS 动物模型成功建立与否的评价指标。

在 CA 后 PR-MODS 制模诊断标准中需要注意的方面有: 首先, 实验动物应具备 PR-MODS 的诱发因素, 心脏发生停搏并实施 CPR。其次, 可证实 CPR 后动物发生了 SIRS, SIRS 可导致大量炎症介质异常分泌、内皮细胞功能障碍、凝血功能紊乱和微血栓形成, 也是 MODS 的始动原因^[11-12], 因而 PR-MODS 动物模型需要具备 SIRS 的基本特征。最后, 若确认 PR-MODS 则至少要出现 2 个或 2 个以上器官功能、体征和生化指标的改变, 病理变化要以组织细胞水肿和炎性细胞浸润为主, 并且这种功能性和形态学改变应具有可逆性。因此, 综合本研究结果, 评价 PR-MODS 动物模型鉴定的标准应考虑具备以下条

件: ①有诱发因素(CA)且复苏成功; ②ROSC 后有 SIRS 发生; ③在 24~48 h 可出现多器官功能障碍(2 个或 2 个以上)的体征、生化或病理学改变。

本研究证实采用窒息法致 CA 建立 PR-MODS 模型虽然有一定的可行性和优势, 但也存在一些问题, 特别是窒息法建立的动物模型可能会较好地模拟临床上以窒息、溺水等因素引起的 CA, 与临床上目前以冠心病为突发因素所致的 CA 及其引发的 MODS 发病机制尚有一定差异。另外, 由于能客观反映复苏后脑功能的血清学标志物并不明确, 因此, 本模型也未对复苏后存活家兔脑功能指标进行检测。今后对于选择何种方法和相关评价指标更适合建立 CA 后 PR-MODS 模型仍有待进一步深入探讨。

参考文献

- [1] 杜捷夫, 沈洪. 心肺复苏后多器官功能障碍综合征. 中国危重病急救医学, 2002, 14: 383-385.
- [2] 朱英, 黄淮, 颜景华, 等. 心肺复苏后多器官功能障碍综合征危险因素和预后分析. 中国医师杂志, 2006, 8: 1048-1050.
- [3] Neumar RW, Nolan JP, Adrie C, et al. Post-cardiac arrest syndrome: epidemiology, pathophysiology, treatment, and prognostication. Circulation, 2008, 118: 2452-2483.
- [4] Field JM, Hazinski MF, Sayre MR, et al. Part 1: executive summary: 2010 American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. Circulation, 2010, 122: S640-656.
- [5] 张东, 王育珊, 李南, 等. 不同窒息时间对心搏骤停家兔心肺复苏后多器官功能障碍发生的影响. 中国危重病急救医学, 2011, 23: 341-344.
- [6] 李正斌, 王学廷, 孙宗立, 等. 两种方法致兔心脏骤停后复苏对实验结果的影响. 中国急救医学, 2002, 22: 131-132.
- [7] 何明丰, 张英俭, 黎练达, 等. 气管夹闭窒息法家兔心脏骤停模型的研究. 中华实验外科杂志, 2004, 21: 375-376.
- [8] Chen MH, Xie L, Liu TW, et al. Epinephrine, but not vasopressin, improves survival rates in an adult rabbit model of asphyxia cardiac arrest. Am J Emerg Med, 2007, 25: 509-514.
- [9] 江慧琳, 朱永城, 陈晓辉, 等. 促红细胞生成素对心肺复苏后心肌功能的影响. 中国危重病急救医学, 2011, 23: 608-612.
- [10] 宿志宇, 李春盛. 低温复苏对猪心搏骤停后肺酶学和形态学的影响. 中国危重病急救医学, 2010, 22: 85-88.
- [11] 李海峰, 于亚欣, 姜晓明, 等. 血必净注射液对复苏后大鼠细胞因子和 p38 丝裂素活化蛋白激酶通路的影响. 中国中西医结合急救杂志, 2010, 17: 148-151.
- [12] Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, et al. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. J Leukoc Biol, 2008, 83: 536-545.

收稿日期: 2012-08-22 (本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

一种防止心肺复苏过程中床垫压缩的新方法

实施心肺复苏术时, 床垫的压缩会导致心肺复苏回馈装置高估心肺复苏过程中胸腔的按压深度。为此研究人员进行了相关研究, 发现实施心肺复苏术前应用一种乙烯塑料罩盖住床垫, 并用真空泵压缩后能很好地解决上述问题。研究人员让 27 名受试者在不同床垫上[传统床垫(CONV 组)、加底板的床垫(BB 组)、加乙烯塑料罩并进行真空泵压缩的床垫(VAC 组), 每组 9 名]进行心肺复苏模拟测试。研究人员分别对床垫的压缩深度和胸腔的压缩深度进行测量。结果发现, 与 CONV 组和 BB 组相比, VAC 组床垫的压缩深度(mm)明显下降(7.0 ± 0.7 比 14.9 ± 1.4 , 14.0 ± 1.3 , $P < 0.001$); CONV 组和 VAC 组总的压缩深度(mm)分别为 65.4 ± 3.8 和 58.3 ± 3.0 ($P < 0.001$)。因此, 研究人员认为, 应用乙烯塑料罩盖住床垫, 并用真空泵压缩后能够明显增加床垫的硬度, 使胸外按压更加有效。

罗红敏, 编译自《Resuscitation》, 2013-01-11(电子版); 胡森, 审校