

· 基础研究 ·

DOI: 10.13498/j.cnki.chin.j.ecc.2020.01.12

大鼠体外心肺复苏模型的建立与评价

于洁,薛平菲,陈书弘,秦春妮,张蓝予,王寿世,黑飞龙

[摘要]:目的 建立大鼠体外膜氧合(ECMO)辅助下的心肺复苏(ECPR)模型。方法 选取8只健康成年雄性SD大鼠,经尾动脉及右颈外静脉插管建立ECMO,窒息法致心脏骤停,随后ECMO辅助下对大鼠进行心肺复苏,转机1h,监测呼吸、血流动力学及血气指标。结果 成功在ECMO辅助下对窒息心脏骤停大鼠进行了心肺复苏,成功率87.5%,其呼吸、血流动力学稳定,血气结果良好,模型建立成功。结论 该模型运行稳定,成本低廉,可用于研究ECPR相关器官保护。

[关键词]: 体外膜氧合;体外心肺复苏;大鼠;动物模型;心肺转流

Establishment and evaluation of an extracorporeal cardiopulmonary resuscitation model of rat

Yu Jie, Xue Pingfei, Chen Shuhong, Qin Chunni, Zhang Lanyu, Wang Shoushi, Hei Feilong

Department of Extracorporeal Circulation, State Key Laboratory of Cardiovascular disease, Fuwai Hospital, National Center for Cardiovascular Diseases, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 10037, China

Corresponding author: Hei Feilong, Email: heifeilong@126.com

[Abstract]: **Objective** To establish an extracorporeal cardiopulmonary resuscitation (ECPR) model of rat. **Methods** Eight healthy male SD rats were involved in our study. The extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) support was performed by tail artery and external jugular vein cannulation. Following hypoxic cardiac arrest, ECMO provided sufficient oxygenation to support the circulation and lasted for one hour. Respiratory rate, haemodynamic and blood gas parameters were monitored during the experiment. **Results** Seven of the eight rats completed the experiment successfully with a survival rate of 87.5%. The respiratory rate, haemodynamic and blood gas parameters were stable and the model performed well as a research tool of ECPR. **Conclusion** The rat model was cost-effective and well-functioning to study the organ protective effects of ECPR.

[Key words]: Extracorporeal membrane oxygenation; Extracorporeal cardiopulmonary resuscitation; Rat; Animal model; Cardiopulmonary bypass

体外心肺复苏(extracorporeal cardiopulmonary resuscitation, ECPR)支持是指在体外膜氧合(extracorporeal membrane oxygenation, ECMO)技术支持下的心肺复苏(cardiopulmonary resuscitation, CPR),即在心脏骤停患者复苏期间开始体外心肺转流(cardiopulmonary bypass, CPB)^[1]。2019年,美国心脏协会(American Heart Association, AHA)更新了成人

CPB与心血管急救指南,提出在有技术熟练的医护人员迅速支持的情况下,可以考虑对某些接受常规CPR失败的患者应用ECPR^[2]。尽管许多研究报道了ECPR的良好效果,但受限于研究质量,目前尚没有充足证据建议对心脏骤停患者常规应用ECPR。但不可否认的是,ECPR作为挽救难治性心脏骤停患者的潜在治疗手段,正在获得越来越广泛的关注^[3-6]。因此,建立稳定可重复且易于操作的ECPR实验动物模型,对于ECPR技术的进一步发展及其在临床的应用,具有重要的意义。

目前,国内外关于ECPR动物模型的研究较少,且主要以猪、羊、犬等大动物为主,其成本高、人力资源消耗大,不适于广泛开展^[7-8]。而大鼠以其获取方便、成本低廉、解剖结构及功能与人类相近等优

基金项目:北京协和医学院研究生创新基金(2017-1002-2-01)

作者单位:100037 北京,中国医学科学院北京协和医学院国家心血管病中心 心血管疾病国家重点实验室 阜外医院体外循环中心(于洁、陈书弘、秦春妮、张蓝予、黑飞龙); 266041 青岛,青岛大学医学部 青岛市中心医院 麻醉科(薛平菲、王寿世)

通讯作者:黑飞龙,Email:heifeilong@126.com

点,被广泛用于心血管领域的基础研究。本研究参考借鉴了国内外同行关于大鼠 ECPR、ECMO 及 CPR 模型的建造方法,并结合实际进行了改良,建立了无血预充 SD 大鼠 ECPR 模型,为进一步研究 ECPR 技术创造了稳定且经济的实验平台。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康成年雄性 SD 大鼠 8 只,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,体重 450~500 g,术前禁食 8 h,禁饮 2 h。

1.2 实验设备 小动物 ECMO 系统,包含:双头滚压泵(德国 Stockert 公司)、小动物实验用膜肺及配套管路(东莞科威医疗器械有限公司);14 G、20 G、22 G、24 G 套管针(美国 Becton Dickinson 公司);自制多孔静脉引流管;小动物呼吸机(上海奥尔科特生物科技有限公司);Powerlab 多导生理记录仪(澳大利亚 AD-Instruments 公司);自制手持式小动物电动心肺复苏机;温度计;加热垫;电凝设备;外科手术器械。

1.3 麻醉及术前准备 SD 大鼠称重后 3%~4% 异氟烷吸入诱导麻醉,仰卧位固定四肢于操作台,颈部正中皮下局部浸润麻醉,迅速游离并切开气管,置入 14 G 套管针,接小动物呼吸机行机械通气,吸入空气,潮气量 8~10 ml/kg,呼吸频率 60 次/min,1.5%~2.5% 异氟烷吸入维持麻醉,电子温度计石蜡油润滑后置入肛门,加热垫通电,用于术中维持体温。

1.4 手术操作 SD 大鼠手术部位备皮、消毒,1%利多卡因局部浸润麻醉,仔细游离尾动脉、右股动脉及右颈外静脉并于外科显微镜下穿刺置管:其中右股动脉置入 24 G 套管针,置管成功后注射 300 IU/ml 肝素 0.5 ml,连接 Powerlab 多导生理记录仪监测心率及血压;尾动脉根据血管直径置入 20 G 或 22 G 套管针,用于 ECMO 动脉端灌注;右颈外静脉置入自制多孔静脉引流管,用于 ECMO 支持过程中的静脉引流。

1.5 ECMO 系统安装及预充 ECMO 系统由储血室(20 ml 注射器)、滚压泵、小动物实验用膜肺及配套管路组成。ECMO 管路采用无血预充,预充液包含 6% 羟乙基淀粉(万汶)13 ml 及 300 IU/ml 肝素 0.5 ml。

1.6 ECPR 的建立 连接 ECMO 管路静脉端及动脉端并用血管钳夹闭,关闭小动物呼吸机,夹闭 SD 大鼠气管插管并计时,血流动力学监测平均动脉压(mean arterial pressure, MAP)低于 25 mm Hg 视为 SD 大鼠发生心脏骤停(cardiac arrest, CA),继续窒息 4 min。开放气道,纯氧机械通气。使用自制的小动物心肺复苏机对大鼠进行胸外按压(按压频率

200 bpm,深度为胸廓前后径的 1/3),经尾动脉插管给予肾上腺素,开放 ECMO 管路动脉端及静脉端,开始转机,初始流量 60~80 ml/(kg·min),氧气流量 1~1.5 L/min,根据血流动力学监测结果调整转机参数,并根据实际需求追加肾上腺素、去甲肾上腺素、多巴胺等血管活性药物,维持 MAP>60 mm Hg。若连续按压 10 min 仍无自主循环恢复(return of spontaneous circulation, ROSC),视为复苏失败。复苏后 1 h,停机、拔管,处死实验动物并取材。

1.7 数据采集及统计处理 持续监测 SD 大鼠呼吸、血压及肛温,分别于 CA 前及复苏后 30 min 抽取动脉血测血气。使用 SPSS 25.0 软件进行数据处理及统计分析,计量资料使用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,复苏前后数据比较采用配对 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示结果存在统计学差异。

2 结果

2.1 大鼠 ECPR 模型建立情况 实验用 8 只 SD 大鼠体重为(474.5±18.95)g,除 1 只因右颈外静脉置管时穿破血管壁大量失血死亡,剩余 7 只均成功通过窒息法致 CA,并于 ECPR 实施后实现 ROSC,ECPR 模型成功率 87.5%。夹闭气管后,SD 大鼠立刻开始剧烈挣扎,血压上升,心率加快,随着窒息时间延长,大鼠挣扎逐渐减弱,心率降低并出现心律失常,最终心脏搏动消失、脉压消失,MAP 低于 25 mm Hg,视为发生 CA,窒息时间(230.8±29.9)s。CA 开始 4 min 后,进行 ECPR,在胸外按压及 ECMO 辅助下,大鼠血压迅速上升,ROSC 时间(321.7±120.6)s,实验过程中 SD 大鼠静脉-动脉(venous-artery, V-A) ECMO 循环管路参见图 1,血压变化参见图 2。



图 1 大鼠 V-A ECMO 管路图

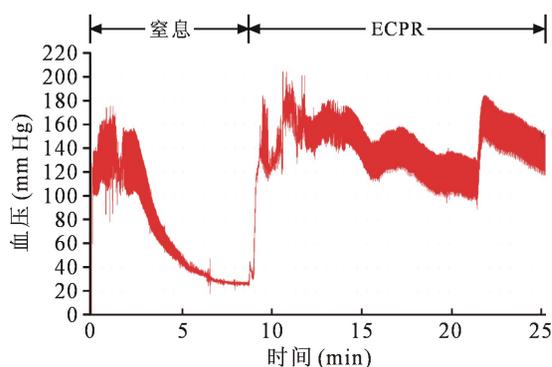


图2 ECPR期间血压变化图

2.2 血流动力学及血气分析 表1为SD大鼠复苏前后体温、血流动力学及血气数据的比较,结果显示:ECPR前后MAP及心率未见显著统计学差异,体温、血气数据变化较为明显,尤其是pH、BE、 HCO_3^- ($P < 0.05$)这可能与CA期间机体严重缺氧导致酸中毒有关;血细胞比容(hematocrit, HCT)、血红蛋白(hemoglobin, Hb)较ECPR前下降显著($P < 0.001$),这可能与无血预充ECMO循环管路造成大鼠血液稀释有关;尽管 PO_2 与 SO_2 复苏前后统计结果差异显著($P < 0.01$),但主要与复苏期间供氧有关,且 SO_2 统计值显示,复苏前后大鼠血氧饱和度均在95%以上,并无实际临床意义;复苏前后 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 离子浓度未见显著差异($P > 0.05$)。

表1 大鼠基本资料、血流动力学及血气分析($n=7, \bar{x} \pm s$)

项目	窒息前	ECPR后30 min	P值
心率(次/)	345±20.15	332.7±20.02	0.058
MAP(mm Hg)	100.29±9.53	95.86±9.65	0.074
体温(°C)	37.17±0.39	36.30±0.39	0.002
pH	7.46±0.04	7.24±0.11	0.001
PO_2 (mm Hg)	76.86±3.98	366±149.02	0.002
PCO_2 (mm Hg)	33.07±6.82	22.9±9.77	0.072
BE(mmol/L)	-1±2.6	-9±3.1	0.006
HCO_3^- (mmol/L)	23.06±2.94	14.86±2.84	0.002
SO_2 (%)	96.71±1.38	100.00±0.00	0.001
Na^+ (mmol/L)	139.43±2.57	138.00±1.73	0.351
K^+ (mmol/L)	4.17±0.41	3.7±0.76	0.156
iCa^{2+} (mmol/L)	1.23±0.84	1.22±0.76	0.645
HCT	0.47±0.56	0.27±0.03	<0.001
Hb(g/L)	159.9±19.1	90.1±9.1	<0.001

3 讨论

研究显示,ECPR可以提高难治性心脏骤停患

者的生存率,并改善其神经系统预后,但目前仅有少数医疗中心具备紧急施行ECPR的能力,且其实施决定常以个案为基础,导致目前ECPR相关临床研究均被认为存在严重的偏倚风险,进而限制了该技术的进一步发展及应用^[9-13]。而仅在中国大陆,每年就有超过50万人发生心脏骤停,其生存率不足百分之一^[14]。因此,建立简单可靠的实验动物模型,探索ECPR的适应证、启动时机、脏器保护等关键问题,对于该技术的发展具有重要的意义。本研究通过参考借鉴国内外同行关于大鼠ECPR、ECMO及CPR模型的建造方法^[15-19],并结合本课题组既往动物实验经验进行改良,建立了无血预充SD大鼠ECPR模型。

目前实验动物心脏骤停模型多采用电流致颤法,用于模拟室颤导致的心脏骤停,但由于大鼠基础心率较快,电流致颤后即使不进行胸外按压,心脏也会出现自动复律,不利于评价抢救效果。窒息法效果确切,主要表现为缺氧导致的心脏停搏,其抢救难度更大。临床上施行ECPR主要针对常规治疗手段,如电除颤、胸外按压等无效或反应不佳的患者,这些患者往往存在更严重的组织缺氧及脏器损害,因此,笔者选择窒息法致心脏骤停的建模方式。值得注意的是,气管夹闭后,尽管SD大鼠处于麻醉状态,但这种极端的刺激会导致其剧烈挣扎,而采用的14G套管针改造的气管插管因缺乏套囊,可因大鼠用力吸气发生漏气,影响窒息效果,因此,本研究采用切开法气管插管,确保结扎确切。

高质量的胸外按压是CPR成功的关键,需要兼顾其位置、深度及频率,还要尽可能避免因按压过度导致的副损伤。大鼠体积小,心跳频率快,单纯徒手按压难以保证按压效果,更无法保证操作均一,因此,笔者采用自制的小动物电动心肺复苏机,其按压频率、深度及力度均可控。实验证实,该心肺复苏机性能良好,按压实施后大鼠收缩压迅速上升到70 mm Hg以上,可在大鼠未ROSC前模拟临床胸外按压效果,部分代替大鼠心脏的射血功能,配合ECMO血流动力学支持及氧合支持,实现ECPR。

实验结果显示,ECPR前后SD大鼠HCT、Hb下降显著($P < 0.001$),主要考虑与ECMO系统预充液造成的血液稀释有关,但受实验动物个体差异及ECMO转流过程中系统调节的影响,不同个体间血液稀释程度并不完全一致,而SD大鼠急性贫血其安全界值目前尚无统一定论,虽然血气测量结果显示ECPR前后 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 电解质浓度未见明显差异,但进一步优化实验条件,消除潜在可能的影响因

素,建立更加稳定均一的模型,是后续工作的重点。

本模型建立过程中预先对 SD 大鼠进行了血管插管,在需要复苏后启动 ECMO,这与临床实践中常见的进行常规 CPR 的同时超声引导下进行动静脉穿刺置管建立 ECMO 支持的实际情况有所不同,这主要是因为大鼠体积小,操作困难,难以在 CPR 同时兼顾血管穿刺置管。本研究通过窒息法致心脏骤停,延长大鼠缺氧时间,进而加剧其脏器损伤的方式来平衡这一缺陷,但如何建立更符合临床实际的 ECPR 模型,值得进一步探讨。

4 结 论

本实验成功建立了窒息法致心脏骤停大鼠的 ECPR 模型,其存活率高,运行稳定、可重复性强,可用于进一步研究 ECMO 技术用于心脏骤停患者抢救的病理生理过程及损伤脏器保护,对于深入探索 ECPR 的适应证、改善 ECPR 患者的临床结局具有积极的意义。

参考文献:

- [1] Sakamoto T, Morimura N, Nagao K, *et al*. Extracorporeal cardiopulmonary resuscitation versus conventional cardiopulmonary resuscitation in adults with out-of-hospital cardiac arrest: a prospective observational study[J]. *Resuscitation*, 2014, 85(6): 762-768.
- [2] Panchal AR, Berg KM, Hirsch KG, *et al*. 2019 american heart association focused update on advanced cardiovascular life support: use of advanced airways, vasopressors, and extracorporeal cardiopulmonary resuscitation during cardiac arrest: an update to the american heart association guidelines for cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care[J]. *Circulation*, 2019, 140(24): e881-e894.
- [3] Kato Y, Kuriyama A, Hata R, *et al*. Extracorporeal membrane oxygenation for hypokalemia and refractory ventricular fibrillation associated with caffeine intoxication[J]. *J Emerg Med*, 2019. [Epub ahead of print].
- [4] Patel JK, Meng H, Qadeer A, *et al*. Impact of extracorporeal membrane oxygenation on mortality in adults with cardiac arrest[J]. *Am J Cardiol*, 2019, 124(12): 1857-1861.
- [5] Bougouin W, Dumas F, Lamhaut L, *et al*. Extracorporeal cardiopulmonary resuscitation in out-of-hospital cardiac arrest: a registry study[J]. *Eur Heart J*, 2019. [Epub ahead of print].
- [6] Mazzeffi MA, Madathil RJ, Gutsche JT. In extracorporeal cardiopulmonary resuscitation, it's great to be young[J]. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2020, 34(2): 363-364.
- [7] Zhang Y, Li CS, Yuan XL, *et al*. ECMO attenuates inflammation response and increases ATPase activity in brain of swine model with cardiac arrest compared with CCPR[J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(7) pii: BSR20182463.
- [8] Hutin A, Lamhaut L, Lidouren F, *et al*. Early coronary reperfusion facilitates return of spontaneous circulation and improves cardiovascular outcomes after ischemic cardiac arrest and extracorporeal resuscitation in pigs[J]. *J Am Heart Assoc*, 2016, 5(12).
- [9] Shao J, Wen W, Yu Z, *et al*. Acute myocardial infarction complicated with cardiac arrest successfully managed by extracorporeal membrane oxygenation combined with intra-aortic balloon counterpulsation: a case report[J]. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*, 2019, 31(10): 1289-1291.
- [10] Deshpande SR, Vaiyani D, Cuadrado AR, *et al*. Prolonged cardiopulmonary resuscitation and low flow state are not contraindications for extracorporeal support[J]. *Int J Artif Organs*, 2020, 43(1): 62-65.
- [11] Pozzi M, Dubien PY, Cesareo E, *et al*. Pre-hospital extracorporeal cardiopulmonary resuscitation [J]. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2020, 34(2): 571-572.
- [12] Shakoor A, Pedroso FE, Jacobs SE, *et al*. Extracorporeal cardiopulmonary resuscitation (ECPR) in infants and children: a single-center retrospective study[J]. *World J Pediatr Congenit Heart Surg*, 2019, 10(5): 582-589.
- [13] Lang CN, Schroth F, Zotzmann V, *et al*. Good long term quality of life after emergency extracorporeal life support for cardiogenic shock and extracorporeal cardiopulmonary resuscitation[J]. *Resuscitation*, 2019, 143: 66-67.
- [14] Chen M, Wang Y, Li X, *et al*. Public knowledge and attitudes towards bystander cardiopulmonary resuscitation in china[J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 3250485.
- [15] Zhang FJ, Song HQ, Li XM. Effect of ulinastatin combined with mild therapeutic hypothermia on intestinal barrier dysfunction following cardiopulmonary resuscitation in rats[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(5): 3861-3868.
- [16] Chen G, Li J, Wang J, *et al*. Inhaling hydrogen ameliorates early postresuscitation EEG characteristics in an asphyxial cardiac arrest rat model[J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 6410159.
- [17] Zhou X, Qu Y, Gan G, *et al*. Cyclosporine a plus ischemic post-conditioning improves neurological function in rats after cardiac resuscitation[J]. *Neurocrit Care*, 2019. [Epub ahead of print].
- [18] Lin QM, Tang XH, Lin SR, *et al*. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation attenuates overexpression of inflammatory mediators in rat brain after cardiopulmonary resuscitation[J]. *Neural Regen Res*, 2020, 15(2): 324-331.
- [19] Qin S, Chen MH, Fang W, *et al*. Cerebral protection of epigallocatechin gallate (EGCG) via preservation of mitochondrial function and ERK inhibition in a rat resuscitation model[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 2759-2768.

(收稿日期: 2019-12-06)

(修订日期: 2019-12-16)