

猕猴脊髓损伤研究长时程麻醉方案的建立及评价

马小翠¹, 唐 涛^{1,2}, 刘少君^{2*}

(1. 中国医科大学肿瘤医院, 辽宁省肿瘤医院, 沈阳 110042; 2. 军事科学院军事医学研究院基础医学研究所神经生物学教研室, 北京 100850)

【摘要】 目的 为成功构建猕猴脊髓损伤模型及其它猕猴长时程手术操作提供一种简单易行的麻醉方案。**方法** 选取雄性成年猕猴 10 只, 采用丙泊酚静脉诱导、异氟醚吸入维持的复合麻醉方式进行麻醉, 记录麻醉诱导时间、麻醉维持时间以及麻醉苏醒时间。持续监测血氧饱和度 (SpO₂)、呼吸频率 (RR)、心率 (HR), 并通过对其分析评价麻醉方案的可行性及有效性。**结果** 10 只猕猴均按实验计划完成实验, 麻醉诱导时间短、起效快, 麻醉期间生命体征平稳, 镇静、镇痛及肌松满意, 术后苏醒迅速、完全, 未发生麻醉并发症。**结论** 丙泊酚与异氟醚复合麻醉方式是一种安全有效的猕猴长时程麻醉方案。

【关键词】 猕猴; 麻醉; 丙泊酚; 异氟醚

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 07-0087-05

doi: 10. 3969/j. issn. 1671-7856. 2018. 07. 015

Establishment and evaluation of a long-term anesthesia protocol for studies of spinal cord injury in macaques

MA Xiaocui¹, TANG Tao^{1,2}, LIU Shaojun^{2*}

(1. Cancer Hospital of China Medical University; Liaoning Cancer Hospital & Institute, Shenyang 110042, China.
2. Department of Neurobiology, Beijing Institute of Basic Medical Sciences, Beijing 100850)

【Abstract】 Objective To provide a simple, convenient, and safe anesthesia method for long-term operations in macaques. **Methods** Ten male *Macaca mulatta* macaques were anesthetized by a combination of intravenous anesthesia with propofol and isoflurane inhalation. The induction time, duration of anesthesia, and recovery time were recorded. After continuous monitoring of blood oxygen saturation, respiratory rate, and heart rate, the feasibility and effectiveness of the anesthetic scheme was evaluated by data analysis. **Results** All 10 monkeys survived the experimental anesthesia protocol. The anesthesia induction time was short and the onset was rapid. During anesthesia, vital signs were stable, and the sedation, analgesia, and muscle relaxation were satisfactory. **Conclusions** Combined anesthesia induced by propofol and isoflurane is a safe and effective method for long-term anesthesia of macaques.

【Key words】 *Macaca mulatta*; anesthesia; propofol; isoflurane

猕猴 (*Macaca mulatta*) 作为常用的非人灵长类模式动物, 因其在生理、代谢以及解剖结构等许多生物学特性上与人存在高度相似性, 被越来越多的

应用于医学研究^[1]。由于猕猴是一种具有攻击性的大型实验动物, 在进行实验操作过程中, 常常需要使其进入镇静或麻醉状态, 来保证实验的顺利进

【作者简介】马小翠 (1978—), 女, 主治医师, 硕士, 研究方向: 缺血再灌注损伤、临床麻醉。E-mail: 18900917539@163.com

【通信作者】刘少君 (1954—), 男, 研究员, 博士, 研究方向: 脊髓损伤修复。E-mail: shaojun_liu@126.com

行和实验人员以及实验动物的安全。随着猕猴被更多地应用于复杂医学实验,传统的麻醉方案,如速新眠、氯胺酮以及复合型成品麻醉剂舒泰等已很难满足长时程实验操作的需求^[2-6]。为配合猕猴脊髓损伤模型建立及损伤修复实验,本研究基于临床常用的麻醉方案,结合实验动物特点,设计了一套简单易行且安全有效的猕猴麻醉方案,并对这一方案进行观察和评价。

1 材料和方法

1.1 实验动物

成年普通级雄性猕猴 10 只,体重 4.5 ~ 5.5 kg,年龄 4 ~ 6 岁,购自河北省正定县龙威猕猴饲养场[SCXK(冀)2010-1-007]。实验动物饲养于军事医学科学院实验动物中心[SYXK(军)2012-0065],单只分笼饲养,笼舍配有层流净化设施,12 h 昼夜交替,室温 22℃ ~ 23℃,相对湿度 40% ~ 45%,可自由获取食物及饮用水。饲养及实验严格遵守军事医学科学院非人灵长类动物实验规范(IACUC-2015-016)。实验过程中按实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

异氟烷(50 g,山东科源制药有限公司,批号 151201);丙泊酚注射液(20 mL,广东嘉博制药有限公司,批号 X140811-2);硫酸阿托品注射液(2 mL,天津药业集团有限公司,批号 15110504)。口咽通气道[ISO SIZE 5.5,英特赛克医疗器械(常州)有限公司];麻醉面罩(ISO SIZE 3,VBM Medizintechnik GmbH);小动物麻醉机(Surgivet 100 Smith Medical PM, Inc.);心电监护仪(PM-900A+,湖南省瑞博科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物术前用药及麻醉诱导

实验动物于手术前 10 h 禁食水,麻醉前 30 min 给予硫酸阿托品注射液 0.5 mL(0.25 mg)肌肉注射。麻醉诱导时,用移动背板将猕猴固定于笼门处,头皮针连接 5 mL 注射器于肘窝行静脉穿刺,缓慢推送丙泊酚注射液(6 mg/kg)诱导麻醉,遵循先快后慢的原则,药物推入约 60% ~ 70% 时,猕猴会出现躁动,继续缓慢给药,待全部药物推入后拔除头皮针,局部棉球按压,防止出血。猕猴进入麻醉状态,检查生命体征是否平稳,有无呼吸抑制现象。如无异常,给予臀大肌肌肉注射 0.5 g 头孢曲松钠

注射液。放置于转运箱内转运至手术室。

到达手术室后将猕猴俯卧位置于手术床上,头置于头圈内偏向左侧(麻醉机放置于左侧),口腔内放置口咽通气道,面罩通气。四头带固定面罩,异氟醚吸入维持麻醉(初始体积浓度 2.0%,氧流量 2 L/min)。检查右侧耳朵有无压迫,面罩有无移位、漏气,腹下放置棉垫,减轻膝关节压力,固定四肢,连接监护仪(血氧探头置于左耳外耳廓,心电图电极分别放置于双肩及右下肢,体温探头置于口中,血压袖带绑于右上臂),监护心率、血压、脉搏、血氧饱和度等生命体征。

1.3.2 麻醉维持

手术室操作过程中保持异氟烷吸入麻醉,根据刺激强度调整异氟醚体积浓度(1.0% ~ 2.5%)。

1.3.3 脊髓损伤模型建立

行后正中直切口(T₁₁ ~ L₂),逐层切开皮肤、皮下组织,沿棘突两侧剥离最长肌,暴露椎板,咬除 T₁₂ ~ L₁ 棘突,切除 T₁₂ 下部椎板、L₁ 上部椎板及 T₁₂ ~ L₁ 间韧带。显微镜下纵行切开 L₁ ~ L₂ 硬脊膜并悬吊,双极电凝脊髓后正中静脉,小圆刀锐性横断脊髓,形成脊髓完全横断损伤,双极电凝脊髓前正中静脉及前外侧静脉,显微剪刀离断,脊髓断端自然收缩,形成一 3 mm 间隙。彻底止血,生理盐水冲洗硬膜囊,无活动性出血,严密缝合硬脑膜防止脑脊液漏。逐层缝合肌肉及皮下结缔组织,皮肤吻合器闭合皮肤切口,敷料包扎固定。

1.3.4 麻醉唤醒

停用异氟醚,保留氧气,流量 5 L/min,必要时吸痰管吸出口腔分泌物。猕猴清醒后,检查肌力、肌张力及病理反射,确认生命体征稳定后,放置于转运箱转运至动物中心。

1.3.5 观察指标

记录麻醉诱导时间、麻醉维持时间以及麻醉苏醒时间。持续监测血氧饱和度(SpO₂)、呼吸频率(RR)、心率(HR),并记录麻醉前(T₀)、麻醉后 10 min(T₁)、手术开始时(T₂)、脊髓损伤造模时(T₃)、皮肤缝合时(T₄)以及麻醉苏醒睁眼后(T₅)生命体征数据进行分析。

1.4 统计学方法

应用 R 软件对实验数据进行统计学分析,计量资料以平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示;单因素重复测量资料先进行正态检验、方差齐性检验及球形检验,符合上述条件,行单因素重复测量方差分析

(one-way repeated measures ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有显著性; 并对 $P < 0.05$ 的计量资料行 Tukey's 组间多重比较进行分析。

2 结果

2.1 麻醉诱导

麻醉诱导时间短、起效快(3.11 ± 0.53) min, 无明显呼吸及循环抑制。

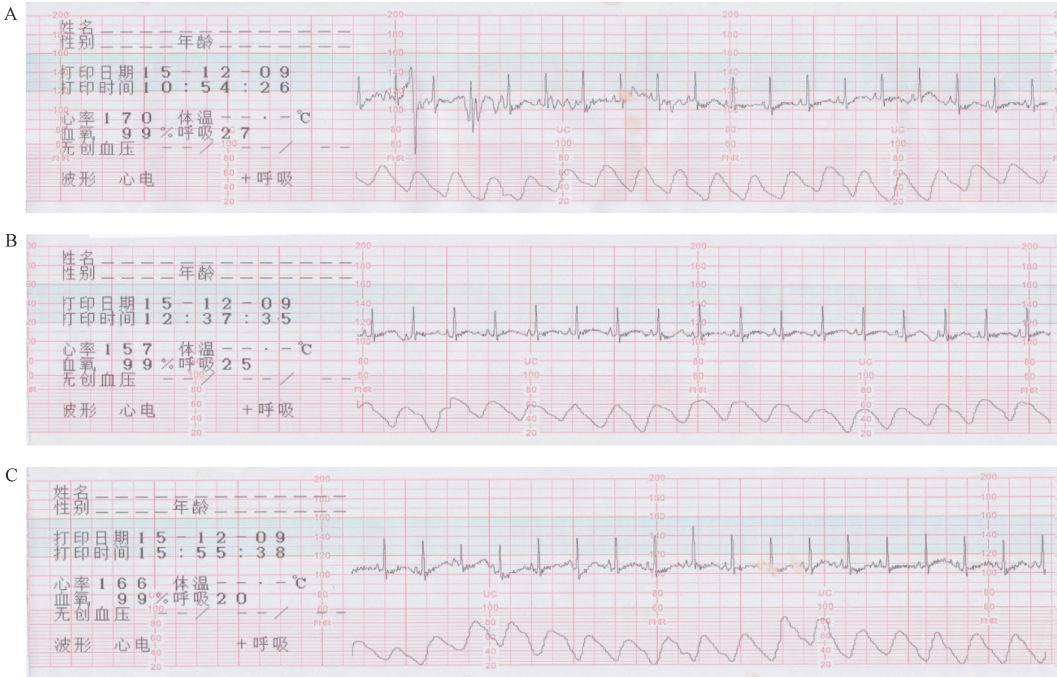
2.2 麻醉维持

实验过程中, 实验动物镇静充分, 镇痛效果好, 无体动, 肌肉松弛良好, 能够满足后正中入路脊髓暴露要求, 基本生命体征平稳(表 1、图 1), 血氧饱和度和呼吸频率各时间点间比较差异无显著性($P > 0.05$); 心率随麻醉时间改变而有所改变($P < 0.05$), 但各时间点心率两两之间比较差异无显著性($P > 0.05$)。麻醉维持时间(5.62 ± 0.33) h。

表 1 血氧饱和度(SpO₂)、呼吸频率(RR)、心率(HR)变化($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
Table 1 Changes in blood oxygen saturation (SpO₂), respiratory rate (RR) and heart rate (HR)

	血氧饱和度 (%) Blood oxygen saturation	呼吸频率(每分钟次数) Respiratory rate (times per minute)	心率(每分钟次数) Heart rate (times per minute)
T0	98.8 ± 0.42	24.2 ± 2.09	174.5 ± 8.35
T1	98.7 ± 0.48	24.6 ± 1.65	173.2 ± 7.31
T2	98.7 ± 0.48	24.8 ± 0.92	168.7 ± 8.71
T3	98.9 ± 0.32	24.9 ± 0.88	165.1 ± 9.18
T4	98.5 ± 0.71	24.3 ± 1.83	164.4 ± 9.25
T5	98.8 ± 0.42	23.8 ± 1.55	173.2 ± 9.61
单因素重复测量方差分析的 P 值 P-value of one-way repeated measures ANOVA	0.99	0.62	0.039

注: T0: 麻醉前; T1: 麻醉后 10 min; T2: 手术开始时; T3: 脊髓损伤造模时; T4: 皮肤缝合时; T5: 麻醉苏醒睁眼后。
Note. T0: Preanesthesia; T1: 10 min after anesthesia; T2: At the beginning of surgery; T3: At the time of spinal cord transection; T4: At the time of skin suture; T5: Waking and eyes opening after anesthesia.



注: A: 猕猴麻醉诱导后基本生命体征; B: 猕猴脊髓全横断损伤造模脊髓横断时生命体征; C: 猕猴术后缝合皮肤时生命体征。

图 1 猕猴术程生命体征

Note. A: Vital signs of the macaques after anesthesia induction. B: Vital signs of the macaques during spinal cord transection. C: Vital signs of the macaques during skin suturing.

Figure 1 Vital signs of the macaques during the operation

2.3 麻醉苏醒

麻醉苏醒时间(9.22 ± 2.31) min, 全部实验动物均于苏醒后安全返回动物中心, 无一例发生麻醉意, 麻醉效果达到实验设计要求。

3 讨论

实验动物麻醉的效果直接影响到实验动物的安全和实验操作的顺利与否^[7]。猕猴是一种非常机警、灵活的非人灵长类实验动物。对猕猴进行造模及实验验证手术条件要求高、投入大, 一旦出现术中麻醉减浅、动物体动, 极易造成实验失败。

目前猕猴实验麻醉常用以氯胺酮、巴比妥类、右美托咪定以及市售复合麻醉药舒泰为主^[2, 5-6]。氯胺酮、巴比妥类只针对短小手术操作, 麻醉方式多为肌肉注射, 诱导时间过长, 维持时间短, 为维持足够的麻醉时间, 术中需要不定时地追加药物, 无法维持平稳的麻醉深度, 且随着麻醉时间的延长, 容易造成药物蓄积, 术后苏醒时间长, 易造成实验动物死亡。右美托咪定等虽然可以利用微量泵进行持续静脉注射以进行长时间麻醉, 但麻醉深度不足以完成损伤较强的操作。有研究使用丙泊酚静脉持续泵注进行猕猴麻醉得到了很好的效果^[8-9], 丙泊酚起效快、作用时间短、安全范围大、可操作性强, 但因为猕猴四肢皮肤薄, 皮下结缔组织松弛, 且覆盖毛发, 即使术前进行备皮仍会留存一层绒毛, 血管留置通路不易于固定及长期维持。

近年来, 吸入麻醉逐渐在动物实验中得以应用。异氟醚有很强的麻醉效能, 其血/气分配系数低, 麻醉深度易于调节。在猕猴脊髓损伤模型手术中, 脊髓暴露过程及入路关闭过程刺激强度大, 需要足够的镇痛强度及麻醉深度。脊髓损伤过程刺激强度小, 但手术操作在显微镜下进行, 操作精细, 要求实验动物无体动, 异氟醚良好的肌松作用可以保证手术操作的顺利进行, 这是其它静脉麻醉药无法比拟的。在保留自主呼吸时, 吸入麻醉药可以产生负反馈效应, 自动维持麻醉深度在较安全的水平。通常脊髓损伤模型手术需要 6 h 左右, 异氟醚化学性质稳定, 在机体内生物转化极少, 几乎全部以原型从肺排出, 长时间应用无蓄积, 可以为手术提供充足的时间。且吸入麻醉操作简便, 可重复性强, 避免了反复追加药物造成的麻醉深度波动以及药物蓄积。操作结束后苏醒快, 没有躁动, 有利于对模型进行早期评价。麻醉剂吸入途径包括气管

插管、气管切开和面罩吸入等。考虑到面罩吸入麻醉方式较插管麻醉方式易于操作, 避免气管插管对猕猴的强刺激和对气道的损伤, 本研究采取了面罩麻醉方式, 且得到了良好的效果。由于选用的是面罩吸入方式, 会有手术室污染的弊端, 但可以通过选用适合猕猴面部曲线的面罩, 达到封闭麻醉呼吸管路的目的(笔者根据猕猴面部大小及形状选取了 #2 或 #3 麻醉面罩), 麻醉废气通过活性炭麻醉废气回收装置进行回收可达到减轻麻醉气体对手术室空气的污染。

丙泊酚与异氟醚复合麻醉方式适用范围宽, 丙泊酚静脉麻醉可以较容易地满足动物笼舍诱导麻醉、短时间麻醉方式下检查(如 X 线、MRI 等)以及转移不同操作场地(手术室、笼舍及检查场所)的要求。

异氟醚吸入麻醉可以达到较长时间手术镇静、镇痛及肌松的要求, 可根据不同操作刺激强度调整麻醉深度, 保证实验动物生命体征平稳。本实验中, 猕猴的血氧饱和度和呼吸频率在整个实验过程中一直保持稳定, 心率在手术操作期间较操作前和苏醒后有所下降, 正是由于研究者根据操作刺激强度调整麻醉深度所致, 是麻醉达到预定效果的表现。停止异氟醚吸入后 10 min 内实验动物即苏醒, 利于实验早期的效果评价以及术后护理。丙泊酚与异氟醚联合使用根据实验要求随时进行转换, 这样既避免了丙泊酚静脉留置泵入的不稳定性, 又可以避免异氟醚麻醉需要气源等设备不易移动的缺点。

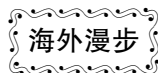
综上所述, 以丙泊酚进行麻醉诱导, 异氟醚吸入维持麻醉, 可有效保证实验动物生命体征平稳, 易于根据刺激强度快速调节麻醉深度, 镇痛、镇静及肌松效果好, 术后苏醒快、不良反应少, 是猕猴长时程手术操作所需的简单易行、安全高效的麻醉方案。

参考文献:

- [1] 江鹏亮, 汤球, 余琛琳, 等. 非人灵长类动物模型在医学研究中的应用概况 [J]. 实验动物科学, 2010, 27(6): 59-64.
- [2] 刘雪萍, 谢莉萍, 韦祝梅. 四种麻醉药物对食蟹猴麻醉效果分析和选择应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(2): 45-47.
- [3] 马兰芝, 赵源, 尚玉璞, 等. 氯胺酮联用速眠新 II 对食蟹猴麻醉效果观察 [J]. 实验动物科学, 2009, 26(3): 60-62.
- [4] 马诺山, 姚咏明, 于勇. 速眠新与盐酸氯胺酮对猕猴麻醉效

- 果的初步观察 [J]. 中国实验动物学报, 2003, 11(3): 191-192.
- [5] 段俊堂, 徐春忠, 吴昆, 等. 不同剂量的舒泰对猕猴麻醉效果的观察 [J]. 畜牧与兽医, 2012, 44(S2): 147-151.
- [6] 和占龙, 鲁帅尧, 陈丽雄, 等. 速眠新在实验猕猴麻醉中的应用 [J]. 实验动物与比较医学, 2005, 25(4): 236-237.
- [7] 汪芳俊, 胡建华, 杨宇焦, 等. 两种麻醉方法对大鼠蛛网膜下腔阻滞模型建立的影响 [J]. 西安交通大学学报(医学版), 2017, 38(3): 462-465.
- [8] 田肇隆, 马艳辉, 李丽, 等. 恒河猴大脑中动脉 M1 段栓塞建模中麻醉方案的选择 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(6): 53-55, 62.
- [9] 田肇隆, 王小华, 许亚超, 等. 恒河猴脊髓半断模型行脑和脊髓 fMRI 检查麻醉方案的实验研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(3): 39-41.

[收稿日期]2017-12-20



聚焦基础研究, 关注科研前沿 ——第 65 届日本实验动物学年会研究内容简介

2018 年 5 月 15 日—19 日, 中国实验动物学会代表团一行 16 人参加了第 65 届日本实验动物学年会。本次会议汇集了来自日本、中国、韩国、印度尼西亚等实验动物领域相关的科研、技术和管理专家。本次会议共发表报告和论文 240 余篇, 涉及实验动物使用管理、实验动物育种、动物疾病模型构建、比较医学分析等实验动物的各个领域。

现将会议中的重点研究领域作简单的介绍和分析:

(1) 实验动物育种生殖技术

实验动物育种生殖技术是实验动物繁殖和基因修饰动物研制的关键技术。本次大会中关于实验动物育种生殖技术的报告共计 36 篇。其中实验动物学会的功劳奖颁给了 Naomi Nakagata 教授, 主要汇报内容是优化了精子冷冻技术, 并对精子冷冻的国际标准提出了修改。在其他报告中包括了冷冻精子和胚胎技术 (10 篇)、精子活性研究 (7 篇)、基因修饰动物的改进 (18 篇)、Wistar 大鼠繁殖技术 (1 篇)。比较集中的研究是免疫缺陷小鼠的基因修饰。同时针对免疫缺陷小鼠 NOG 产量低的问题, 采用超排和精子冷冻技术来高效生产 NOG 小鼠。

(2) 动物模型的研制和比较医学分析

关于动物模型的构建和比较医学研究共涉及论文 45 篇。表现为以下几个特点: ①实验动物种类多样性, 尤其使用了非人灵长类构建的动物模型。包括了各类小鼠模型、猕猴鼻炎模型、猕猴慢性神经病理性疼痛模型、非人灵长类心肌炎模型等。②疾病多样性。包括心力衰竭、听力损伤、肥胖行为学、认知、传染病、骨科疾病、精神分裂、老年痴呆、癌症等领域。其中对于小鼠行为和认知方面的研究也是这次会议的重点, 包括了小鼠社交能力、行为能力、空间记忆能力相关基因的研究。③疾病治疗方法多样性。除了采用了芬太尼、谷氨酸、吡哆醇等西药外, 还使用日本的传统药方来治疗过敏、化疗后恢复治疗和神经退行性疾病。

(3) 干细胞研究进展

干细胞相关的分析涉及 11 篇, 主要内容包括新型胚胎干细胞建立、iPS 细胞胚胎样诱导、干细胞治疗疾病动物模型、干细胞衰老、干细胞调节基因的研究等方面。其中有两篇是关于人和动物胚胎嵌合体的研究, 为了解决 iPS 在体外培养及诱导不能很好地体现体内环境的问题, 研究人员将人干细胞移植到小鼠胚胎中, 在小鼠体内研究人体干细胞的功能和作用。

第 65 届日本实验动物学年会内容广泛, 涉及到大小鼠、猕猴、狨猴、食蟹猴、小型猪等多种物种, 研究内容涉及了实验动物管理、环境评估、动物福利、胚胎精子冷冻、动物模型构建和分析、病毒感染、干细胞研究等各个方面。日本研究人员在实验动物的许多研究领域都有深入的研究, 值得我们学习和借鉴。

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心 白琳)