

一种比格犬失血性休克模型的建立^{*}

陈健钊 陈洁君 李日许 郭秋平

(广州医药研究总院有限公司, 广州 510240)

摘要:目的 将失血性休克模型程度统一到血气指标上,建立一种稳定的重度失血性休克大动物模型,以满足药效评价的需要。**方法** 普通级比格犬15只,从颈动脉导管放血至动脉收缩压为50 mmHg左右并维持血压,模型成功标准为动脉血乳酸9~11 mmol/L、碱剩余<-12 mmol/L,静脉血氧饱和度<60%。模型成功后,观察实验动物一般生理指标、血气、血常规等指标变化。**结果** 存活动物12只,模型成功率80%,具有较高的成功率和重现性,各指标变化符合失血性休克特征。**结论** 该模型客观准确地模拟了失血性休克患者的临床特点,适用于血液制品及血液代用品的药效评价。

关键词:失血性休克;比格犬;动物模型

中图分类号: R-332 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)02-0055-04

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.02.010

失血引起的失血性休克是导致手术和创伤患者死亡的主要原因之一^[1]。失血性休克是一种由于失血引起的组织血流灌注过低,导致机体微循环功能不良,组织缺血缺氧,并最终引起细胞损伤的病理过程。目前常用的失血性休克模型有三种:定量出血^[2]、定压出血^[3-4]和非控制性出血模型^[5]。为了更为客观地对抗失血性休克药物进行有效性评价,需要建立一种更加标准化、易于重复和区分药效的失血性休克模型。在失血性休克研究中,犬是目前应用最广的一种动物,其较大的体型使得手术操作和取样更加方便^[6]。因此,本实验选用背景数据丰富的比格犬作为实验动物,以血气指标作为衡量休克严重程度的标准,结合固定血压出血,建立重度失血性休克大动物模型,为评价血液制品及血液代用品的效能提供了可能。

1 材料与方法

1.1 实验动物

普通级雄性比格犬15只,10~12月龄,体质量10~12 kg,购自广州医药研究总院有限公司实验动

物研究开发中心,许可证号SCXK(粤)2013-0007,实验动物合格证号为No.44006900000267。动物购入后适应性观察期不少于7 d,单笼饲养,定量喂食,自由饮水。选取检疫合格动物进行造模。造模前禁食不禁水12 h。

1.2 实验材料

HSIV大动物吸入式麻醉机(上海曼普生物科技有限公司);MP150十六道生理记录仪(美国BIOPAC Systems公司);i-STAT 1 Analyzer手持式血液分析仪(美国ABBOTT公司);Sysmex 2000iv全自动血液分析仪(日本Sysmex公司);恒温动物手术台(兴化市同昌不锈钢制品厂);微量注射泵(深圳圣诺医疗设备有限公司);数字体温计(大连欧姆龙有限公司);含抗凝剂塑料血袋(四川南格尔生物科技有限公司);异氟烷(宝龄富锦生技股份有限公司);肝素钠注射液(江苏万邦生化医药股份有限公司);0.9%氯化钠注射液(四川科伦药业股份有限公司);丙泊酚注射液(西安力邦制药有限公司)等。

1.3 实验方法

根据动物体质量采用丙泊酚7 mg/kg静脉注射

收稿日期:2018-09-23

^{*} 基金项目:广州市科信局生物产业重大专项(No.201300000053)。

作者简介:陈健钊(1990—),男,工程师,研究方向:药理毒理.E-mail:chenjianzhao@live.cn

通信作者:郭秋平(1978—),女,高级工程师,研究方向:新药安全性评价.E-mail:vipvivenguoguo@126.com

进行诱导麻醉,气管插管后,使用 1.0%~3.0%异氟烷维持麻醉。实验动物采用仰卧位保定于恒温手术台,于四肢放置电极记录休克前后心电图的变化。钝性分离颈部肌肉,暴露颈动脉及静脉并留置肝素钠填充的导管,颈动脉导管用于采集动脉血样及手术过程中的血压测定,颈静脉导管用于放血。上述操作完成后,用 100 单位/kg/h 的肝素钠溶液静脉推注进行抗凝处理,待血压稳定时,采集各项指标作为休克前基线数据。

从颈动脉导管快速放血至动脉收缩压 50 mmHg 左右,放出的血液回收到含抗凝剂的塑料血袋中,通过继续放血或回输血液来维持血压。放血开始 30 min 后,开始采集动脉血样进行血气分析(后期根据动物情况确定检测时间),当动脉血乳酸和动脉血碱剩余达到标准时,采集静脉血样检测静脉血氧饱和度。模型成功标准为动脉血乳酸 9~11 mmol/L,动脉血碱剩余<-12 mmol/L,静脉血氧饱和度<60%。模型建立后,采集各项指标作为休克后数据。

检测指标包括:收缩压(SBP)、舒张压(DBP)、平均压(MAP)、心率、体温、毛细血管再充盈时间(CRT)、脉搏血氧饱和度(SpO₂)、动脉血乳酸(Lac)、动脉血碱剩余(BE)、静脉血氧饱和度(SvO₂)、动脉血 pH、动脉血二氧化碳分压(PCO₂)、动脉血氧分压(PO₂)、血红蛋白含量(HGB)、红细胞压积(HCT)。

1.4 统计方法

应用 SPSS 22.0 统计软件进行分析,计量资料以平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,休克前后数据比较采用配对 *t* 检验,*P*<0.05 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 造模基础数据

本实验使用动物 15 只,其中造模成功动物 12 只,造模过程中死亡动物 3 只,模型成功率为 80%。模型成功动物体质量为(12.30±1.11) kg,放血量(667±101)mL,按公斤体质量折算为(54.5±8.4)mL/kg,相当于动物自身血量(按动物体质量的 8%计算)的(68.1±10.5)%,休克造模时间为(116±70)min。

2.2 休克前后动物一般生理指标的变化

休克前,实验犬心电图正常(图 1)。休克后实验犬心电图检查出现心电图电压减弱、P 波高抬、ST 段下移(图 2),提示模型动物心肌受累。如表 1 所示,与休克前相比,休克后实验犬的 SBP、DBP、MAP 均显著下降(*P*<0.001),CRT 显著延长(*P*<0.001),同时体温(*P*<0.05)和 SpO₂(*P*<0.01)也出现明显的降低。此外,休克前后动物的心率略微升高,但并未发生显著的改变。

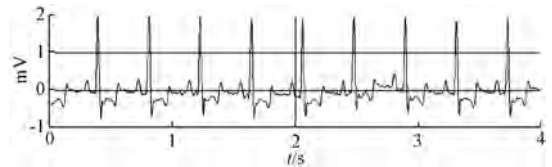


图 1 休克前实验犬心电图

Fig.1 Example of ECG before shock

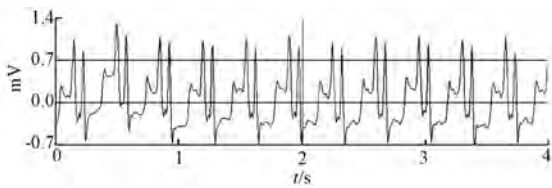


图 2 休克后实验犬心电图

Fig.2 Example of ECG after shock

表 1 失血性休克模型动物休克前后一般生理指标的变化(*n*=12, $\bar{x}\pm s$)

Table 1 The change of general physiological indexes before and after shock(*n*=12, $\bar{x}\pm s$)

组别	SBP/mmHg	DBP/mmHg	MAP/mmHg	心率/BPM	体温/℃	CRT/s	SpO ₂ /%
休克前	93±9	58±10	70±9	117±12	36.7±0.7	0.9±0.1	97±2
休克后	51±13 ***	22±7 ***	31±9 ***	130±33	35.8±1.1 *	2.8±1.0 ***	92±2 **

注:与休克前相比,**P*<0.05,***P*<0.01,****P*<0.001
Note:**P*<0.05,***P*<0.01,****P*<0.001,versus before shock

2.3 休克前后动物血气指标的变化

休克后,实验动物的动脉血 Lac 显著高于休克前(*P*<0.001,见表 2),动脉血 BE、pH、静脉血 SvO₂与休克前相比显著降低(*P*<0.001)。而休克前后动脉血 PCO₂ 和 PO₂ 并未产生明显变化。

2.4 休克前后动物血常规指标的变化

失血性休克模型动物在休克前与休克后对比,血常规指标 HGB 和 HCT 均发生了显著升高,其中 HGB *P*<0.01,HCT *P*<0.001。

表 2 失血性休克模型动物休克前后血气指标的变化 (n=12, $\bar{x}\pm s$)

Table 2 The change of blood-gas parameters before and after shock (n=12, $\bar{x}\pm s$)

组别	Lac/(mmol/L)	BE/(mmol/L)	SvO ₂ /%	pH	PCO ₂ /mmHg	PO ₂ /mmHg
休克前	1.91±0.68	-4±3	69±11	7.344±0.047	40.4±3.0	156±25
休克后	10.05±0.63***	-19±2***	29±15***	7.071±0.096***	41.7±13.4	161±24

注:与休克前相比,*** P<0.001

Note:versus before shock,*** P<0.001

表 3 失血性休克模型动物休克前后血常规指标的变化 (n=12, $\bar{x}\pm s$)

Table 3 The change of blood routine indexes before and after shock (n=12, $\bar{x}\pm s$)

组别	HGB/(g/L)	HCT/%
休克前	118±5	35.9±1.5
休克后	134±12**	42.4±3.2***

注:与休克前相比,** P<0.01,*** P<0.001

Note:versus before shock,** P<0.01,*** P<0.001

3 讨论

为了实现抗休克药物药效的准确评估,本实验室参考了多种文献报道的传统休克模型的建立方法(如固定血压失血、BE 指标等),结合失血性休克的一些临床特点(Lac 升高、SvO₂ 降低),建立了一种新型的重度比格犬失血性休克模型。该模型采用多个指标来统一休克的严重程度,更好地模拟临床失血性休克患者酸碱失衡、组织缺氧、低血压的特点,使模型具有高度的标准化。同时该模型也克服了以往传统休克模型由于判断标准单一所带来的模型严重程度差异大的弊端。

在本实验中,经过前期快速失血,将 SBP 迅速降低至 50 mmHg 左右,此时降低失血速度,保持 SBP 稳定,尽可能地减小血压波动。若血压继续过快降低,则回输一定量自体血液以维持血压,待血压稳定后继续放血。随着失血量的增加,实验犬出现严重的酸中毒,Lac 继续升高、BE 负值增大、血液 pH 降低。而由于呼吸机维持供氧,动脉血中 PCO₂ 和 PO₂ 并未发生较大的改变。

模型成功建立时,SvO₂ 降低至 29%,提示机体严重缺氧,氧供需严重不平衡。其他的一般生理指标变化如体温降低、CRT 升高、SpO₂ 降低,均与临床上失血性休克的表现相一致。国内外研究活动性出血常用的指标为 HGB 和 HCT^[7-8],由于本实验造模过程采用的方法为活动性出血,因此也以 HGB 和 HCT 作为失血性休克模型严重程度的参考指标。由实验数据可知,休克后 HGB 和 HCT 反而发生了

显著升高,这可能与文献报道的犬失血后脾脏内血红细胞释放到血循环有关^[9]。

本模型成功率 80%、失血百分比(68.1±10.5)%,是成模率较高的重度失血性休克模型。由于采用多个指标作为造模成功的标准,使本模型更加客观、准确地模拟了临床中患者进入失血性休克的状态,为我们下一步评价血液制品及血液代用品提供了一个可靠的平台。

参考文献

[1] Nunez T C, Cotton b A. Transfusion therapy in hemorrhagic shock [J]. Current opinion in critical care, 2009, 15(6): 536-541.

[2] Deitch E A. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned [J]. Shock, 1998, 9(1): 1-11.

[3] Bedirli A, Sozuer E M, Muhtaroglu S, et al. The role of oxygen free radicals and nitric oxide in organ injury following hemorrhagic shock and reinfusion [J]. International journal of surgical investigation, 2000, 2(4): 275-284.

[4] 李学勇,渠凯,付少才,等. 异体犬血浆治疗失血性休克 Beagle 犬的实验研究 [J]. 实验动物科学, 2012, 29(5): 45-50.

[5] Varicoda E Y, Poli de Figueiredo L F, Cruz R J jr, et al. Blood loss after fluid resuscitation with isotonic or hypertonic saline for the initial treatment of uncontrolled hemorrhage induced by spleen rupture [J]. The Journal of trauma, 2003, 55(1): 112-117.

[6] Fulop A, Turoczy Z, Garbaisz D, et al. Experimental models of hemorrhagic shock: a review [J]. European surgical research Europaische chirurgische Forschung Recherches chirurgicales europeennes, 2013, 50(2): 57-70.

[7] Bursa F, Pleva L, Maca J, et al. Tissue ischemia microdialysis assessments following severe traumatic haemorrhagic shock: lactate/pyruvate ratio as a new resuscitation end point? [J]. BMC anesthesiology, 2014, 14(1):1-8.

[8] 孙海梅,代冬梅,杨蓉蓉,等. 犬失血性休克模型建立的研究 [J]. 生物技术世界, 2016, (1): 257-258.

[9] Kemming G, Messick J B, Mueller W, et al. Can we continue research in splenectomized dogs? Mycoplasma haemocanis: old problem—new insight [J]. European surgical research Europaische chirurgische Forschung Recherches chirurgicales europeennes, 2004, 36(4): 198-205. (下转至第 62 页)

The Embryo-fetal Developmental Toxicity Test of Intravenous Cyclophosphamide on New Zealand Pregnant Rabbits

GONG Yingfei, ZENG Xianhuan, ZHAO Weijun, ZUO Juntao, ZHU Zhongkai,

WANG Zhanbo, LIU Wei, WANG Yun, YANG Yong

(Center for New Drug Safety Evaluation and Research, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

Abstract: Objective To observe the embryo-fetal developmental toxicity of intravenous cyclophosphamide on pregnant rabbits, and provide basis for using cyclophosphamide as a positive control in embryo-fetal developmental toxicity test. **Method** Pregnant New Zealand rabbits were randomly divided into control group (0.9% Sodium chloride injection, GD11, i.v), and cyclophosphamide group (cyclophosphamide 30 mg/kg, GD11, i.v). At termination (GD28), the uterine content was removed by caesarean section. Live fetuses were examined for external, visceral and skeletal malformations and variations. **Result** There were no noticeable changes in the reproductive function and embryogenesis of rabbits by cyclophosphamide. But cyclophosphamide could cause the teratogenic in external, visceral and skeletal malformations. The rate of cleft palate was 32.95%, the rate of visceral variation was 10.23%, and the rate of skeletal malformation was 23.37%. **Conclusion** Inject cyclophosphamide (30 mg/kg) into the New Zealand rabbits can cause fetal malformation. Type and ratio of fetal malformations are proportional. Cyclophosphamide can be used as a positive control for embryo-fetal developmental toxicity test in rabbits.

Key words: Cyclophosphamide; reproductive toxicity; pregnant rabbits; positive control

(上接第 57 页)

A Model of Hemorrhagic Shock in Beagle Dogs

CHEN Jianzhao, CHEN Jiejun, LI Rixu, GUO Qiuping

(Guangzhou General Pharmaceutical Research Institute, Guangzhou 510240, China)

Abstract: Objective To establish a model of hemorrhagic shock in Beagle dogs for the experimental study of drug evaluation and research. **Method** Fifteen Beagle dogs of common grade were bled until the arterial pressure (SBP) reached 50 mmHg, which was then maintained as best as possible. The criteria of the model were 9~11 mmol/L of Lac and 12 mmol/L of BE in arterial blood, less than 60% PO₂ in venous blood. When the model was established, the changes of general physiological indexes, blood-gas parameters and blood routine indexes were observed. **Result** Twelve animals survived, the success rate of the model was 80%. The changes of indexes were in accordance with the characteristics of hemorrhagic shock. **Conclusion** The model was able to simulate the clinical characteristics of hemorrhagic shock objectively and accurately, and is suitable for the efficacy evaluation of blood products and blood substitutes.

Key words: Hemorrhagic shock; Beagle dog; animal model