



改良颅内加压法兔脑死亡模型建立及其状态的维持

潘宜鹏¹, 刘煜¹, 李明², 任秀昀³

(1. 武警总医院移植科, 北京 100039; 2. 武警总医院医务部, 北京 100039; 3. 武警总医院超声科, 北京 100039)

【摘要】目的 探寻改良颅内加压法制作兔脑死亡模型及维持脑死亡状态的方法。**方法** 新西兰大白兔 15 只, 随机分成 2 组: 假手术组 (B 组, $n=6$), 仅颅内插管, 行麻醉维持; 脑死亡组 (A 组, $n=9$), 通过改良的颅内加压法制作脑死亡模型。记录平均动脉压 (MAP) 和心率 (HR) 的变化。通过呼吸机和血管活性药物将生命体征维持在某一可控水平。**结果** A 组 9 只兔中 8 只建模成功, 在颅内加压过程中随着颅内压力的增高, MAP 和 HR 呈波浪状逐渐升高。麻醉状态下和脑死亡时 MAP 峰值分别为 (80.63 ± 8.45) mmHg、 (111.63 ± 7.71) mmHg, 二者相比有统计学意义 ($P < 0.05$)。麻醉状态下、脑死亡时和脑死亡后 2 h 的 HR 分别为 (153.25 ± 14.35) 次/min、 (262.38 ± 16.60) 次/min 和 (218.50 ± 10.27) 次/min, 三者之间两两相比具有统计学差异 ($P < 0.05$)。**结论** 与传统术式相比, 改良后的方法可以稳定、可靠地建立兔脑死亡模型; 通过及时有效的呼吸、循环支持, 脑死亡状态可以长时间维持。

【关键词】 脑死亡; 模型制作; 兔; 生命体征

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 01-0025-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2016.001.005

Establishment of brain death model for rabbits in a modified way by increasing intracranial pressure and maintaining the state of brain death

PAN Yi-peng¹, LIU Yu¹, LI Ming², REN Xiu-yun³

(1. Department of Transplantation, the General Hospital of the Chinese People's Armed Police, Beijing 100039, China;
2. Medical department, the General Hospital of the Chinese People's Armed Police, Beijing 100039, China;
3. Department of Ultrasound, the General Hospital of the Chinese People's Armed Police, Beijing 100039, China)

【Abstract】Objective To explore the modified increasing intracranial pressure method to set up the brain death model for rabbits and sustain the state of brain death. **Methods** 15 healthy New Zealand rabbits were divided into brain death group (Group A, $n=9$) and sham operation group (Group B, $n=6$) randomly. The 9 brain death rabbits were set up by increasing intracranial pressure in a modified way. The sham operation rabbits were only sustained with anesthesia. Recorded the mean artery pressure (MAP) and heart rate (HR). **Results** In group A, the 8 brain death rabbits were successfully set up. Only 1 died of heart failure. Compared to Group B, the MAP and HR of Group A rise up greatly during increasing intracranial pressure and presented an increasing trend. The peak MAP and HR were (111.63 ± 7.71) mmHg and (262.38 ± 16.60) beats/min which were much higher than the MAP (80.63 ± 8.45) mmHg and HR (153.25 ± 14.35) beats/min before increasing intracranial pressure ($P < 0.05$). After brain death, MAP decreased sharply to 45mmHg. 2 hours after brain death, HR (218.50 ± 10.27) beats/min presented an decreasing trend too, which showed a

[基金项目] 武警总部课题 (WZ2014002)。

[作者简介] 潘宜鹏 (1988-), 男, 硕士, 研究方向: 肝脏移植方向。

[通讯作者] 任秀昀 (1970-), 女, 博士, 研究方向: 超声造影, E-mail: rrcloud@sina.com。

significantly statistic difference to peak HR(262.38 ± 16.60) and HR(153.25 ± 14.35) beats/min before brain death($P < 0.05$). **Conclusions** Compared to traditional method, the brain death model could be established stably and securely in the modified way and maintained for long time with the respiration and circulation supports.

【Key words】 Brain death; Model establishing; Rabbits; Vital signs

随着我国器官捐献工作的法制化,脑死亡器官捐献(donor after brain death, DBD)和脑-心双死亡标准器官捐献(donation after brain death plus cardiac death, DBCD)为我国现阶段的主要器官捐献类型^[1]。而 DBD 和 DBCD 患者都不可避免地经历低血压、低氧血症及长时间热缺血损伤^[2],严重影响器官质量^[3]。因此建立一个稳定的动物脑死亡模型及脑死亡状态长时间维持对于研究脑死亡供者器官的变化至关重要。我研究所将传统的制作过程进行改良,使其具有很好的可操作性,并可较长时间的维持脑死亡状态,为脑死亡器官捐献的临床研究奠定了模型基础,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPS 级新西兰雄性兔 15 只,体重 $2.2 \sim 2.8$ kg, 12 周龄。由中国人民解放军总医院动物实验中心提供【SCXK(京)2011-0006】。实验在中国人民武装警察部队总医院动物实验中心进行【SYXK(军)2012-0062】。

1.2 实验仪器与试剂

BL-420 生物技能实验系统(成都泰盟科技有限公司)、HX-100E 动物呼吸机(成都泰盟科技有限公司)、JR. 1/2 智能恒温控制仪(成都泰盟科技有限公司)、便携超声仪器(意大利百胜公司,型号: MyLab 30 Gold)、Foley 气囊导管(美国巴德国际有限公司)等。多巴胺注射液(2 mL: 20 mg, 批号: 33140506, 上海禾丰制药有限公司)。

1.3 改良兔脑死亡模型的建立方法

术前准备:术前兔禁食 12 h,自由饮水。称重后进行诱导麻醉(枸橼酸芬太尼注射液和咪达唑仑注射液混合制剂肌注)。耳缘静脉滴注咪达唑仑注射液和盐酸赛拉嗪注射液进行麻醉维持。备皮,沿颈部做一纵切口,游离气管行气管插管后固定,备接呼吸机,缝合皮肤。于右侧腹股沟区做一斜行切口游离出股动脉及股静脉。行股动脉插管,连接压力传感器;留置股静脉插管,肝素封管以备术中采血,缝合皮肤。额、顶和枕极颅骨骨膜下埋置脑电图银针电极。四肢连接心电图导联。便携超声仪监测

心脏超声,描记心率。自动温度监测仪监测兔肛温,通过加热设备维持在 37.5°C 。

颅内球囊导管植入方法:于颅顶正中做矢状切口,分离皮下组织和骨膜至颅骨面,于双眼角后缘连线中点后方 0.5 cm 旁开 0.5 cm 处,用木雕刻刀刻出直径约 0.5 cm 大小孔道(兔颅骨厚度约 2 mm,操作时勿伤及硬脑膜及脑组织),保持硬脑膜完整,置入 6 号 Foley 球囊导管。骨蜡封闭,缝合切口。保留 6 号 Foley 球囊导尿管。脑死亡组经导管渐进式注入生理盐水,每次 0.5 mL,缓慢匀速,间隔约 5 分钟,总入量约 2 mL 时每次注入 0.2 mL,兔出现躁动,瞳孔逐步缩小,球结膜水肿,自主呼吸停止后停止加压。自主呼吸停止时,气管插管接动物呼吸机,设置呼吸频率 35 次/min,潮气量 25 mL/kg,吸呼比 5:4,氧浓度 50%^[4]。保留导管内生理盐水至实验结束。脑死亡的确认参照卫生部脑死亡判定标准起草小组制定的《脑死亡判定标准》及国外文献,拟定本实验脑死亡模型建立标准:①麻醉停止后仍处于深昏迷状态;②瞳孔散大,对光反射消失,角膜反射消失;③自主呼吸停止,自主呼吸诱发实验阴性;④脑电图静息成直线;⑤阿托品实验阴性^[4-5]。

脑死亡状态维持方法:我们认为加压过程中兔自主呼吸停止则脑死亡诱导成功,此后开始进行脑死亡状态维持,观察指标变化,多巴胺 4 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{min})$ 静脉滴入维持血压,并随血压变化调整输液速度,本实验维持脑死亡状态 8 h 后撤除呼吸机,处死兔。手术全程输注液体 300 mL。假手术组仅行硬膜外插管,不加压。余操作和脑死亡组相同。

1.4 监测指标

监测所有实验动物平均动脉压、心率等变化。

1.5 数据统计方法

将计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组计量资料之间的比较采用 t 检验,用 SPSS21.0 统计软件统计分析。

2 结果

2.1 兔脑死亡模型建立

脑死亡组有 8 只成功建立脑死亡模型,并且均维持超过 8 h;其中 1 只实验过程中出现心衰,经抢

救无效死亡;另外 8 只均采用缓慢间断颅内加压法建立脑死亡模型,球囊内缓慢间断注入生理盐水(2.4 ± 0.2) mL 时,兔即出现脑死亡表现。兔体温维持在(37 ± 0.3) $^{\circ}\text{C}$ 。尿量(0.52 ± 0.16) mL/min。每只兔的总建模时间为(100 ± 10) min,其中诱导脑死亡时间(30 ± 5) min。8 只兔均维持脑死亡状态 480 min 以上。假手术组麻醉状态下维持 8 h 后,撤除麻药后半小时内 6 只兔均自然苏醒,然后空气栓塞处死。实验结束后焚烧兔。

2.2 脑死亡前后兔 MAP 及 HR 变化

B 组兔在诱导脑死亡过程中 MAP 和 HR 随颅内间断加压呈现波浪状升降变化,总体趋势不断升高。加压前 MAP 和 HR 分别为(80.63 ± 8.45) mmHg 和(153.25 ± 14.35) 次/min,球囊内缓慢间断注入生理盐水(2.4 ± 0.2) mL 时,MAP 和 HR 开始急剧升高,达到峰值(111.63 ± 7.71) mmHg 和(262.38 ± 16.60) 次/min,峰值维持约(1.5 ± 0.2) min 后开始急剧下降,呼吸深慢,瞳孔先缩小后散大,直到自主呼吸停止,脑电图静息,连接动物呼吸机,同时应用血管活性药物,诱导脑死亡后 2 h 为(50.13 ± 2.59) mmHg。MAP 峰值与加压前比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);脑死亡后 2 h 与加压前比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。B 组峰值及脑死亡后 2 h 的 MAP 与 A 组对应时间点 MAP 的比较差异也具有统计学意义($P < 0.05$)。实验全程 MAP 均维持在 40 mmHg 以上。诱导脑死亡过程中 HR 呈现升高趋势。加压前 HR 为($153.25 \pm$

14.35) 次/min,加压至脑死亡过程中峰值 HR 为(262.38 ± 16.60) 次/min,差异具有统计学意义($P < 0.05$);脑死亡 2 h 后 HR 为(218.50 ± 10.27) 次/min,与峰值 HR(262.38 ± 16.60) 次/min 和加压前 HR 比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。B 组诱导脑死亡后的 HR 与 A 组对应时间点 HR 的比较差异也具有统计学意义($P < 0.05$)。A 组行颅内插管前后 MAP 及 HR 的比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。A 组与 B 组 MAP 各时间点对比见表 1;A 组与 B 组 HR 各时间点对比见表 2。

2.3 撤除抢救

动物脱离呼吸机和停止多巴胺滴注后血压直线下降,约 5 min 后血压压差为零。

3 讨论

现阶段,脑死亡的定义为枕骨大孔以上水平包括大脑、小脑和脑干等在内的全脑功能完全地不可逆性损害^[6]。脑死亡状态超越昏迷状态,即无自主呼吸,需要呼吸机维持,全身肌肉松弛,各种反射消失,低体温及尿崩,但是心跳仍存在。概念重点强调全脑功能不可逆性损伤。生理学研究表明,机体的生命中枢即血压和呼吸调节中枢位于脑干,血压调节中枢通过改变心肌收缩力和心率来调节血压变化,脑死亡研究过程中脑干会不可避免的遭受打击,机体血压、心率和呼吸会发生剧烈改变,所以监测血压和心率变化可直接反应脑死亡的发生过程。

表 1 两组兔实验期间不同时间点 MAP 变化(mmHg)
Tab.1 Variation of MAP in different test time of two group of rabbit

组别 Group	例数 Case	加压前 Pre- compression	峰值时刻 The peak	脑死亡 2 h Brain Death 2 h	脑死亡 4 h Brain Death 4 h	脑死亡 6 h Brain Death 6 h	脑死亡 8 h Brain Death 8 h
A	8	80.63 $\pm$ 8.45	111.63 $\pm$ 7.71 ^{ab}	50.13 $\pm$ 2.59 ^a	45.75 $\pm$ 2.43	44.63 $\pm$ 2.39	42.38 $\pm$ 3.81
B	6	80.67 $\pm$ 6.06	79.00 $\pm$ 6.03	82.83 $\pm$ 7.57	86.00 $\pm$ 5.44	80.00 $\pm$ 7.92	82.17 $\pm$ 6.68

注:与同组加压前比较,差异有统计学意义,^a $P < 0.05$;与假手术组比较,差异有统计学意义,^b $P < 0.05$ 。
Note:Compared to Pre-compression in group A, ^a $P < 0.05$; Compared to group B, ^b $P < 0.05$.

表 2 两组兔实验期间不同时间点 HR 变化(次/min)
Tab.2 Variation of HR in different test time of two group of rabbit

组别 Group	例数 Case	加压前 Pre- compression	峰值时刻 The peak	脑死亡 2 h Brain Death 2 h	脑死亡 4 h Brain Death 4 h	脑死亡 6 h Brain Death 6 h	脑死亡 8 h Brain Death 8 h
A	8	153.25 $\pm$ 14.35	262.38 $\pm$ 16.60 ^{ab}	248.50 $\pm$ 16.07 ^{ab}	218.50 $\pm$ 10.27	210.25 $\pm$ 5.18	207.18 $\pm$ 3.09
B	6	149.83 $\pm$ 21.28	155.17 $\pm$ 18.16	149.33 $\pm$ 20.83	149.67 $\pm$ 12.14	155.00 $\pm$ 10.92	155.00 $\pm$ 10.92

注:与同组加压前比较,差异具有统计学意义,^a $P < 0.05$;与假手术组比较,差异具有统计学意义,^b $P < 0.05$ 。
Note:Compared to Pre-compression in group A, ^a $P < 0.05$; Compared to group B, ^b $P < 0.05$.

随着国内脑死亡器官捐献的发展,有关脑死亡动物模型实验研究应运而生。脑死亡模型的制作方法包括颈内动脉结扎法、呼吸暂停法^[7-8]、膜外加压法、颅内制造血肿法^[9]、断头法等^[10-11]。研究表明,大量原发性脑死亡病例的实践报告中显示 90 % 以上存在脑疝^[6],提示颅内高压可能是脑死亡重要发病机制。国外已有关于鼠、猪和犬脑死亡模型建立的报道^[12-13]。因此参照相关文献,本实验采用改良的颅内加压法制作兔脑死亡模型,增加了模型制作过程中的可行性和成功率,并长时间维持脑死亡状态。传统方法相关文献已有阐述,文中不再设立传统术式组,与传统方法比较,我们将模型制作过程及某些指标的监测进行改进:首先我们选用木刻雕刀将颅骨刻出直径 0.5 cm 大小孔径,相关文献报道使用颅钻^[4],实践表明颅钻钻孔不稳定,兔尸体解剖发现其颅骨较薄,颅骨钻容易破坏脑组织;其次由于心电图描记心率时会受到较多干扰,所以其值波动较大很难反映出心率的真实变化,我们应用中便携超声机行兔心脏彩超,最为准确的反应心率变化。

研究显示,脑死亡诱导过程中 MAP 随间断颅内加压呈波浪状升降,总体上升,当脑死亡诱导成功后骤然下降,具有特征性改变。与相关文献报道相符^[14]。通过呼吸机和多巴胺将 MAP 维持在 45 mmHg;加压过程中 HR 在加压过程中升高明显,迅速达到峰值。脑死亡诱导后心率有下降趋势但仍高于加压前,且维持到实验结束。我们推测出现此结果可能有两种原因:第一,机体控制心率的神经中枢在延髓,静息状态下心率被迷走神经抑制,当机体脑死亡后这种抑制关系解除,心率加快;第二,脑死亡诱导成功后兔血压急骤下降,需要大量多巴胺维持,而大剂量多巴胺可作用于 β 受体,因此心率加快^[15]。但有待进一步研究。

本实验目的在于探索一个具有可行性且成功率高的脑死亡模型制作以及脑死亡状态维持的方法,为今后脑死亡供体器官质量的评估研究提供稳定的模型基础。对于脑死亡状态下器官功能、器官血流动力学及病理学方面的改变亟待进一步研究。

参考文献:

- [1] 刘永峰. 心脏死亡供着器官移植现状与展望[J]. 中华普通外科杂志, 2013, 28(3): 169 - 172.
- [2] 丁义涛. 心脏死亡供者肝移植的现状与展望[J]. 中华器官移植杂志, 2013, 34(1): 1 - 4.
- [3] Levesque E, Hoti E, Khalfallah M, *et al.* Impact of reversible cardiac arrest in the brain-dead organ donor on outcome of adult liver transplantation [J]. *Liver Transpl*, 2011, 17: 1159 - 1166.
- [4] 钟子彪, 王彦峰, 李玲, 等. 缓慢间断颅内加压法兔脑死亡模型的建立及其病理生理变化[J]. 中华肝胆外科杂志, 2013, 19(8): 622 - 624.
- [5] 郑树森. 肝移植围手术期处理[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 55.
- [6] 李德祥. 脑死亡法医病理学研究. 法医学杂志[J], 1985, 1(1): 36.
- [7] Pratschke J, Wilhelm MJ, Kusaka M, *et al.* A model of gradual onset brain death for transplant-associated studies in rats[J]. *Transplantation*, 2000, 69(21): 427 - 430.
- [8] Floerchinger B, Yuan X, Jurisch A, *et al.* Inflammatory immune responses in a reproducible mouse brain death model[J]. *Transpl Immunol*, 2012, 27(11): 25 - 29.
- [9] Bruinsma GJ, Nederhoff MG, Geertman HJ, *et al.* Acute increase of myocardial workload, hemodynamic instability, and myocardial histological changes induced by brain death in the cat [J]. *Surg Res*, 1997, 68(21): 7 - 15.
- [10] Sereinigg M, Stiegler P, Puntschart A, *et al.* Establishing a brain-death donor model in pigs[J]. *Transplant Proc*, 2012, 44(7): 2185 - 2189.
- [11] Hvas CL, Nielsen TK, Barklin A, *et al.* Brain death induced by cerebral haemorrhage-a new porcine model evaluated by CT angiography[J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2012, 56(2): 995 - 1005.
- [12] Kusaka M, Pratschke J, Wilhelm MJ, *et al.* Activation of inflammatory mediators in rat renal isografts by donor brain death [J]. *Transplantation*, 2000, 3: 405.
- [13] Steen PA, Milde JH, Michenfelder JD. No barbiturate protection in dog model of complete cerebral ischemia[J]. *Ann Neurol*, 1979, 4: 343.
- [14] Van Der Hoeven HA, Ter Hoist GJ, Molema G, *et al.* Effects of brain death and hemodynamic status on function and immunologic activation of the potential donor liver in the rat [J]. *Ann Surg*, 2000, 232: 804 - 813.
- [15] 王莉. 多巴胺药物剂量对家兔心血管影响 [J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 1999, 1(2): 123 - 125.

[修回日期] 2015-10-21