

微量失血对左肝外叶切除 + 定容失血性休克大鼠生存率的影响

俞晓军[#] 钱 琤[#] 张育理[#] 胡志前[△]

(上海第二军医大学附属长征医院普外科 上海 200003)

摘要 目的:观察在大鼠左肝外叶切除 + 定容失血性休克模型制作过程中微量失血对最终大鼠生存率的影响。方法:45只SD大鼠按不同的放血比例分为三组,以Wigger改良法建立左肝外叶切除 + 定容失血性休克模型,严格标准化放血前的各项手术操作和观测指标,比较三组大鼠最终生存率的差异。结果:在分别按2.4ml/100g(A组)、2.5ml/100g(B组)、2.6ml/100g(C组)比例定容失血的大鼠模型中,各组大鼠生存率分别为:A组66.67%,B组42.86%,C组7.69%,A、B两组与C组大鼠的生存率相比较存在明显差异($P < 0.05$)。结论:即使是0.1ml/100g的微量失血对于该模型大鼠的生存率也是有显著影响的,这一点在大鼠的定容失血性休克模型实验中是不应被忽视的。

关键词 大鼠休克模型;失血性休克;微量失血

中图分类号:Q95-3 R641 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)19-3615-03

Effect of Small Amount of Blood Loss on Survival Rate of Rats with Left Hepatic Lobectomy and Fixed Volume Hemorrhagic Shock

YU Xiao-jun[#], QIAN Cheng[#], ZHANG Yu-xing[#], HU Zhi-qian[△]

(Department of General Surgery, Changzheng Hospital affiliated to Second Military Medical University, Shanghai, 200003)

ABSTRACT Objective: To observe the effect of trace blood loss to the survival of rats suffered left lobular hepatectomy and fixed volume hemorrhagic shock. **Methods:** Forty-five Sprague-Dawley rats were separated into 3 groups according to the different proportion of bleeding. Left lobular hepatectomy and fixed volume hemorrhagic shock rats model was made referring to Wigger's with strict standard of all the surgical procedure and observations. The final survival rates of rats were analyzed among the three groups. **Results:** Among the three groups of left lobular hepatectomy and fixed volume hemorrhage rats, which classified by the different proportions of bleeding as 2.4ml/100g (group A), 2.5ml/100g (group B) and 2.6ml/100g (group C), survival rate of rats in each group were A of 66.667%, B of 42.86% and C of 7.69%, and there was significant difference of the survival rate between the group A/B and the group C. **Conclusion:** Even 0.1ml/100g trace blood loss also may lead to a conspicuous impact to the survival of the rats. This should not be ignored in some fixed volume hemorrhagic shock model of rats.

Key words: Rats shock model; Hemorrhagic shock; Trace blood loss

Chinese Library Classification: Q95-3, R641 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)19-3615-03

为了探讨创伤与休克的发生机制、病理改变及抢救方法,人们在进行失血性休克的研究中多选用大鼠作为动物模型,迄今为止人们已建立和使用了多种大鼠的休克模型,包括定压模型、定容模型、定碱缺模型及非控制性失血模型等^[1-3,12]。其中,定容模型是以放血量达到动物体重或其总血量的百分比为指标,一般需放到总血量的40%-50%^[4-6]。然而,在对模型制作过程的描述中,对于术中失血量的准确描述很少,即使被提及也大多以不超过全血量的5%为限^[7,13],那么,是不是在5%以内的失血都可以认为是对模型的制作没有影响的、可以被忽略的呢?本实验就是要研究微量失血对于大鼠左肝外叶切除 + 定容失血性休克模型生存率的影响。

1 材料和方法

[#] 共同第一作者

作者简介:俞晓军(1980-)男,博士研究生,主要研究方向:肝胆外科、休克;张育理,男,博士研究生;钱琤,男,博士研究生

[△]通讯作者:胡志前 E-mail: fish0220@163.com

(收稿日期:2011-04-09 接受日期:2011-04-30)

1.1 实验动物

健康7~8周龄SPF级SD(Sprague-Dawley)大鼠共45只,体重280~310g,雄性,SPF(specific pathogen free condition)级条件下饲养,购自第二军医大学试验动物中心(上海西普尔-必凯动物有限公司提供)(生产许可证SCXK沪2007-0003;实验许可证SYXK沪2007-0003),分笼饲养于屏障系统的洁净层流架内,室温控制在(25±1)℃,湿度控制在(55±1)%。

1.2 动物分组

45只雄性SD大鼠随机分为3组,每组15只,分别按照2.4ml/100g(A组)、2.5ml/100g(B组)、2.6ml/100g(C组)比例定容失血。所有大鼠购入后均于SPF级动物房内按自然昼夜节律(12-12)饲养1周以上以适应环境,体重达标后作为备手术组,术前12h予以禁食,自由饮水。

1.3 模型制作

本实验中模型制作是在Wiggers^[8]改良法基础上在放血前行大鼠左肝外叶切除术,于右侧颈总动脉置管监测血压及心率,右侧股动脉置管施行放血,失血方式采用15min内匀速一次性放血,失血速率(ml/min)=失血总量(失血比例×大鼠体

重)/15。具体手术操作步骤如下 3%戊巴比妥钠溶液按 30mg/kg 给予腹腔内麻醉,麻醉起效后大鼠重新称重、固定,下垫恒温垫(动物恒温系统 ALC-HTP 上海奥尔科特生物科技有限公司)以保持整个操作过程中动物体温保持恒定在 37±0.5℃,直肠内置入体温探头监测体温变化。用 22G 密闭式静脉留置针(BD)行右侧颈总动脉插管并固定(管内用 25U/ml 肝素钠溶液预凝),将颈动脉插管经三通管连接 MPA2000 多导生理记录仪(上海奥尔科特生物科技有限公司)并开始记录大鼠血压,用 22G 密闭式静脉留置针(BD)行右侧股动脉插管并固定(管内用 25U/ml 肝素钠溶液预凝),随后取上腹部正中切口,长度约 3.5cm,术中注意勿损伤腹白线两侧穿支血管(如可见明显血管需先结扎再切断),于左肝外叶肝蒂部切实结扎并离断、移除左肝外叶,关腹。至此手术操作部分已全部结束,动物稳定 10min 后开始按既定速率采用动物用微量注射系统 ALC-IP900(上海奥尔科特生物科技有限公司 精确至 0.001ml)匀速放血。放血结束后不予以任何复苏措施,所有大鼠自放血结束起观察 24 小时。整个术中全部可见渗血均用消毒棉签吸附并称重,失血量的计算采用公式:失血量=(吸附后棉棒重量-吸附前棉棒重量)/0.9(大鼠血液的密度)。

为了保证术中操作的一致性,我们特别注意了以下几点:
A 麻醉:一般给药后 2min 起效(大鼠呈蹒跚步态),如超过 2min 未见明显效果考虑为麻醉失败(如药物注入肠腔内或腹膜后等等),该大鼠将予以剔除。
B 全身肝素化的问题:既往很多休克模型的实验中均提到

了采取全身肝素化^[14-16],这样可以避免放血过程中堵管的问题,但我们发现肝素化后对于手术操作的影响非常大,单是一个切开皮肤都会渗血难止,故本动物模型制作时未采取全身肝素化,仅于测压管道内预先用 25U/ml 肝素钠溶液预凝。经反复实验最后采用内径稍大的 22G BD 管直接行股动脉置管,同时在放血速率上做了调整后,堵管的问题没有出现。

C 术中失血:因本实验的目的旨在研究微量失血对大鼠生存率的影响,故所有术中失血超过 0.1ml 的均已剔除。全部大鼠尸检(死亡组大鼠死亡即刻尸检,存活组大鼠观察 24h 后予以处死并尸检)均未发现腹腔积血、肝脏创面出血等异常情况。

1.4 统计分析

所有数据均使用 SPSS17.0 医学统计软件进行统计学计算,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析,计数资料采用 χ^2 检验。P<0.05 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 模型制作成功率

在全部 45 只实验大鼠中,顺利完成模型制作的有 39 只,其余 6 只因麻醉意外(2 只)和术中失血超过 0.1ml(4 只)而剔除出组。总模型制作成功率为 86.67%。

2.2 放血前各组大鼠相关数据比较

我们比较了三组大鼠放血前体重、手术操作时间、术前 MAP(平均动脉压)、放血结束时 MAP 四项指标,结果见表 1。

表 1 三组大鼠术前相关指标的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The comparison of preoperative related indicators among three groups

Group	Mean weight(g)	Mean operative time(min)	Preoperative MAP(mmHg)	MAP at the end of hemorrhage(mmHg)
Group A	292.53± 9.59	19.58± 1.51	127.41± 5.39	30.80± 1.46
Group B	289.71± 7.09	18.92± 1.73	129.18± 4.43	31.09± 1.55
Group C	291.33± 7.83	18.85± 1.46	127.21± 5.33	29.87± 1.92
P value	0.679*	0.451*	0.540*	0.154*

Note: Data were presented as group means ± SE. *P >0.05 indicated no differences between the three groups. Meanwhile, the MAP at the end of hemorrhage in each group reached the standard level of authority^[9, 10].

2.3 三组大鼠存活时间和 24h 存活率的比较

2.3.1 根据各组大鼠的存活时间绘制生存曲线 见图 1(图中 X 轴代表从放血结束开始计时直到动物死亡的时间)。

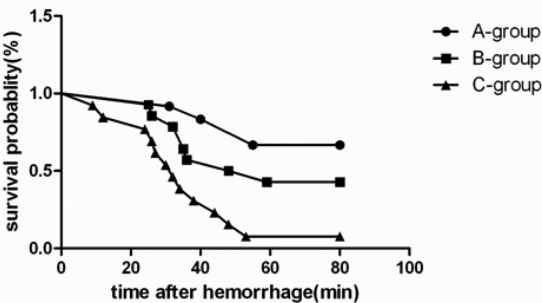


图 1 三组大鼠的生存曲线图

Figure 1 The survival curve of three groups

从图中可以看出:三组大鼠在放血结束时所有动物均存活,即所有动物均经受住了失血的过程并达到了休克的程度。随着失血比例的增加,各组大鼠的存活率逐渐降低,休克维持期 1h 后各组的存活率保持稳定,说明经受住休克维持期 1h 的大鼠均顺利存活下来。

2.3.2 三组大鼠的 24h 存活率比较

见表 2。

3 讨论

在定容失血性休克大鼠模型的制作过程中,严格测量并记录失血总量及失血比例对于模型的稳定性和可复制性至关重要,也关系到一篇研究的严谨性和可信性。在放血前的切皮、分离、动脉插管等手术操作中,即使再熟练、再精确的术者也很难达到“0”失血,这种“微量”失血又恰恰常常被我们所忽视,也

许这种失血对于大型实验动物如犬、猪等影响确实是微乎其微 ,但对于大鼠而言却决不应该被随意忽略 ,在特定的条件下 , 这种看似 " 微量 " 的出血对于实验结果往往会产生重大的影响。

表 2 三组大鼠的 24h 存活率的比较
Table 2 The comparison of survival rates after 24 hours among the three groups

Group	Survival group	Dead group	Total	Survival rate
Group A	8	4	12	66.67%
Group B	6	8	14	42.86%
Group C	1	12	13	7.69%

X² test among the three groups:

Group A vs GroupB :X²=1.474 P=0.225*

Group B vs GroupC :X²=4.340 P=0.037[△]

Group A vs GroupC :X²=9.420 P=0.002[△]

Note: *P>0.05 indicated no differences between group A and group B. △P<0.05 indicated statistics differences in group A,B compared with group C.

查阅既往的文献 ,在大鼠休克模型的制作中对于放血前手术操作过程中失血量的准确描述很少 ,即使被提及也大多以不超过全血量的 5% 为限^[7,13] ,那么我们可以估算一下 :大鼠的全血量按 6.5ml/100g 计算^[11] ,一只 300g 的大鼠全血量大约在 19.5ml ,则 5% 的全血量为 0.975ml ,也就是说 ,在很多时候 ,术中操作失血在 0.975ml 以内的误差均被我们忽视了 ,这部分失血并未计入总失血量之内。然而 ,在本实验中 ,B 组与 C 组间失血量仅仅相差 0.1ml/100g ,以一只 300g 的大鼠为例 ,总失血量仅仅差了 0.3ml ,而最终的生存率却差异显著。当然 ,并不是说这种微量失血在任何程度的大鼠休克模型中都会直接影响到最终的结果 ,例如本实验中 A 组与 B 组间就无统计学差异 ,但当休克达到一定的程度时 ,这种失血的影响就应该引起实验者的重视。总之 ,在动物实验中 ,不可轻易忽视看似微小的干扰因素 ,精确的测量和记录是获得成功的基础和保障。

参 考 文 献(References)

[1] Schlichting E, Lyberg T. Monitoring of tissue oxygenation in shock: an experimental study in pigs[J]. Crit Care Med, 1995, 23: 1703-1710

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

[3] Tsukamoto T, Pape HC. Animal models for trauma research: what are the options?[J]. Shock, 2009, 31(1): 3-10

[4] Villela NR, Cabrales P, Tsai AG, Intaglietta M. Microcirculatory effects of changing blood hemoglobin oxygen affinity during hemorrhagic shock resuscitation in an experimental model [J]. Shock, 2009, 31(6): 645-652

[5] Johnson RA, Durante W, Craig T, et al. Vascular arginase contributes to arteriolar endothelial dysfunction in a rat model of hemorrhagic shock[J]. J Trauma, 2010, 69(2): 384-391

[6] Bowman PD, Sondeen JL, Zhao B, et al. A temporal study of gene expression in rat lung following fixed-volume hemorrhage [J]. Physiol

Genomics, 2005, 23(3): 275-286

[7] Sato H, Tanaka T, Kasai K, et al. Role of p38 mitogen activated protein kinase on renal dysfunction after hemorrhagic shock in rats[J]. Shock, 2005, 24(5): 488-494

[8] Wiggers CJ. The present status of the shock problem [J]. Physiol Rev, 1942, 22: 74-123

[9] Gustavo P, Samir P, luiz F, et al. Impact of shock and fluid resuscitation On the morphology and apoptosis of bone marrow: an experimental study[J].J Trauma, 2004, 56: 1001-1008

[10] Osband AJ. Sifri ZC, LaiWang, et al. Small volume albumin administration protects against hemorrhagic shock-induced bone marrow dysfunction[J]. J Trauma, 2004, 56: 279 -283

[11] Reynolds PS, Barbee RW, Skaflen MD, Ward KR. Low-volume resuscitation cocktail extends survival after severe hemorrhagic shock [J]. Shock, 2007, 28(1): 45-52

[12] Stern SA, Dronen SC, Wang X. Multiple resuscitation regimens in a near-fatal porcine aortic injury hemorrhage model [J]. Acad Emerg Med 1995, 2(2): 89-97

[13] Reynolds PS, Barbee RW, Skaflen MD, et al. Low-volume resuscitation cocktail extends survival after severe hemorrhagic shock [J]. Shock 2007, 28(1): 45-52

[14] Osband AJ. Deitch EA, Hauser CJ, et al. Albumin protects against gut-induced lung injury in vitro and in vivo [J]. Ann Surg, 2004, 240 (2): 331-339

[15] Fernandes D, de Sordi R, Pacheco LK, et al. Late, but not early inhibition of soluble guanylate cyclase decreases mortality in a rat sepsis model[J]. J Pharmacol Exp Ther 2009, 328(3): 991-999

[16] Gaddipati JP, Sundar SV, Calemine J, et al. Differential regulation of cytokines and transcription factors in liver by curcumin following hemorrhage/resuscitation[J]. Shock, 2003, 19(2): 150-156