

大鼠多发伤致凝血功能障碍模型的建立

包卿 刘政 楚鹰 沈文明 郑旭文 梁华平 岳茂兴

【摘要】目的 建立符合临床条件的多发伤致凝血功能障碍大鼠模型。**方法** 雄性SD大鼠60只,按随机数字表法分为正常组及模型4、6、12、24、48 h组,每组10只。造成大鼠重型颅脑损伤、双股骨折、开腹及腹主动脉放血20%制成多发伤模型;各时间点采集腹主动脉血,用血栓弹力图(TEG)检测凝血反应时间(R值)、血块生成时间(K值)、血块生成率(Angle)、最大宽度值(MA)。**结果** 伤后4 h R值(1.83 ± 0.41)较正常组降低(2.20 ± 0.60 , $P > 0.05$),12 h开始升高(2.58 ± 0.48 , $P > 0.05$),24 h时即明显升高(3.10 ± 0.20 , $P < 0.05$),48 h达高峰(3.40 ± 0.58 , 均 $P < 0.05$)。伤后各时间点K值和Angle无明显变化。伤后4 h MA(mm : 76.73 ± 2.33)即开始较正常组增加(70.40 ± 4.00 , $P > 0.05$),24 h显著增加(84.03 ± 1.93 , $P < 0.01$),48 h达高峰(84.58 ± 2.10 , $P < 0.01$)。**结论** 大鼠多发伤早期即有凝血功能障碍,与临床相符,说明大鼠模型建立成功。

【关键词】 动物模型; 多发伤; 凝血功能障碍; 血栓弹力图

创伤性凝血功能障碍(TIC)发生率及病死率极高^[1],有必要进行研究,但目前尚缺乏与临床相符的动物模型。本实验旨在建立大鼠多发伤模型,并用血栓弹力图(TEG)进行检测,以期研究TIC的发生机制及治疗提供基础。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器: ZH-ZYQ型自由落体脑损伤模型打击器、TEG 5000型血栓弹力图检测仪(美国Haemoscope公司)。

1.2 动物及分组: 雄性SD大鼠60只,体质量(180 ± 20)g,由第三军医大学外科研究所实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(军)2012-0013。按随机数字表法将大鼠分为正常组及模型4、6、12、24、48 h组,每组10只。

1.3 多发伤模型制作: 用10%水合氯醛4 mL/kg腹腔注射麻醉大鼠,然后固定于立体定向仪上,头部备皮消毒后剪开头皮、剥离骨膜,麻花钻于矢状缝右侧2 mm、冠状缝后4 mm处钻一直径为5 mm的圆形窗,保持硬脑膜完整。使用自由落体脑损伤模型打击器,用40 g砝码于25 cm处落下造成重度损伤,打击力1 000 g/cm,完成后缝合头皮;同时于双下肢股外侧切开皮肤及皮下组织,沿股外侧肌间隔钝性分离暴露股骨干,于股骨中段用组织剪横行剪断,止血后缝合皮肤。随后仰卧位固定大鼠,消毒后沿腹中线自耻骨上至胸骨下剪开皮肤与腹膜,充分暴露腹腔,自左向右轻推移肠管,显露出腹后壁,清除腹膜后脂肪组织,穿刺点为左右髂动脉分叉处向心端1~3 mm处,抽取动脉血量约为大鼠总血容量的20%,压迫止血后将肠管归位,缝合腹膜及皮肤,消毒后放回

鼠笼内正常喂水喂食饲养。正常组不予任何处理。

1.4 标本采集及检测: 于腹主动脉采集血液标本,使用1 mL注射器预先吸取0.1 mL枸橼酸钠,抽血0.9 mL后,迅速将血样注入采血管中,轻轻颠倒5~10次混匀血样。将1 mL血样送第三军医大学附属大坪医院输血科进行TEG检测。

TEG参数包括:R值:凝血反应时间,反映凝血因子活性;K值:血块生成时间,反映纤维蛋白交联情况;Angle:血块生成率,反映整体血块形成的速率,与纤维蛋白原浓度和血小板功能状态相关;MA:最大宽度值,反映血块的最大强度,主要反映血小板的功能,也能反映纤维蛋白原水平。

1.5 统计学分析: 采用SPSS 16.0统计软件,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析,两两比较采用Dunnett-*t*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

TEG检测结果(表1)显示,伤后4 h R值即较正常组降低,12 h开始升高,48 h达到高峰;24 h、48 h时R值较正常组明显升高(均 $P < 0.05$)。伤后各时间点K值和Angle变化不大,与正常组比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。伤后4 h MA即较正常组开始延长,48 h达到高峰;24 h、48 h时MA明显高于正常组(均 $P < 0.01$)。

表1 多发伤致凝血功能障碍模型大鼠各时间点TEG参数的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	R值 (min)	K值 (min)	Angle (°)	MA (mm)
正常组	10	2.20 ± 0.60	0.80 ± 0.00	79.73 ± 1.21	70.40 ± 4.00
模型组 4 h	10	1.83 ± 0.41	0.80 ± 0.00	81.75 ± 3.29	76.73 ± 2.33
6 h	10	1.90 ± 0.36	0.80 ± 0.00	80.57 ± 1.90	72.63 ± 3.06
12 h	10	2.58 ± 0.48	0.80 ± 0.00	80.98 ± 1.43	80.08 ± 2.55
24 h	10	3.10 ± 0.20^a	0.80 ± 0.00	80.40 ± 1.89	84.03 ± 1.93^b
48 h	10	3.40 ± 0.58^a	0.80 ± 0.00	80.50 ± 1.24	84.58 ± 2.10^b

注:TEG为血栓弹力图,R值为凝血反应时间,K值为血块生成时间,Angle为血块生成率,MA为最大宽度值;与正常组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.02.013

基金项目:江苏省医药卫生重大课题项目(Z201013);第三军医大学国家重点实验室开放课题(SKLF201312);国家发明专利(ZL2010 1 0248451.9)

作者单位:213002 江苏常州,江苏大学附属武进医院(包卿、楚鹰、沈文明、郑旭文、岳茂兴);400042 重庆,第三军医大学创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室(刘政、梁华平)

通讯作者:岳茂兴, Email: yuemx888@163.com

3 讨论

TIC 及凝血病是世界性的治疗难题, 失血是创伤患者入院后早期死亡的首要原因, 第一个 24 h 失血者占 50%。25%~35% 的创伤患者存在凝血功能障碍, 合并 TIC 者病死率升高 4 倍^[2]。创伤患者在急性创伤性凝血功能障碍 (ATC) 的基础上, 于低温、酸中毒、血液稀释、炎症反应等因素的共同作用下, 出现凝血功能障碍, 称为 TIC^[3]。如果凝血功能障碍得不到及时纠正, 其病死率极高, 可达到 80%^[4]。因此, 早期治疗纠正 TIC 成为目前研究的重点^[5]。

目前用于研究 TIC 的主要动物模型为创伤休克模型, 一般为单一创伤。而临床上大量危重伤员均为多发伤^[6], 因此需要一个与临床相符的多发伤动物模型。本实验通过造成大鼠重型颅脑损伤、双股骨骨折、开腹及腹主动脉放血 20%, 制成大鼠多发伤模型。TEG 检测证实 R 值 4 h 时缩短, 12 h 开始升高, 48 h 达到高峰, 说明伤后早期为高凝状态, 而

后期出现纤溶状态, 与临床相一致。为研究凝血功能障碍的发生机制及治疗提供了良好的模型基础。

参考文献

- [1] MacLeod JB, Winkler AM, McCoy CC, et al. Early trauma induced coagulopathy (ETIC): prevalence across the injury spectrum [J]. *Injury*, 2014, 45 (5): 910-915.
- [2] Katrantha ED, Gonzalez LS 3rd. Trauma-induced coagulopathy [J]. *Crit Care Nurse*, 2014, 34 (4): 54-63.
- [3] Cardenas JC, Wade CE, Holcomb JB. Mechanisms of trauma-induced coagulopathy [J]. *Curr Opin Hematol*, 2014, 21 (5): 404-409.
- [4] Gonzalez E, Moore EE, Moore HB, et al. Trauma-Induced Coagulopathy: An Institution's 35 Year Perspective on Practice and Research [J]. *Scand J Surg*, 2014, 103 (2): 89-103.
- [5] 岳茂兴, 夏锡仪, 李瑛, 等. 丰诺安联用大剂量维生素 B6 新疗法救治严重创伤后凝血病大出血患者的临床研究 [J]. *中华危重病急救医学*, 2013, 25 (5): 310.
- [6] 齐洛生, 杨宏富, 孙荣青, 等. 严重外伤患者的凝血功能变化 [J]. *中国危重病急救医学*, 2010, 22 (6): 379-380.

(收稿日期: 2014-10-15) (本文编辑: 李银平)

· 科研新闻速递 ·

严重脓毒症和脓毒性休克患者乳酸 / 白蛋白比值与器官衰竭和病死率相关

近期中国学者设计了一项在重症加强治疗病房 (ICU) 的前瞻性队列研究, 旨在探讨乳酸 / 白蛋白比值是否可作为严重脓毒症和脓毒性休克患者多器官功能障碍综合征 (MODS) 和病死率的预测因子。该研究纳入了 54 例严重脓毒症或脓毒性休克患者, 收集其临床数据以确定乳酸 / 白蛋白比值与 MODS 进展和病死率之间的关系。结果显示: 第 1 日和第 2 日的乳酸 / 白蛋白比值在 MODS 患者中更高 [第 1 日: MODS 组 (30 例) 比非 MODS 组 (24 例), 2.295 (1.818, 3.065) 比 1.550 (1.428, 1.685), $P < 0.001$; 第 2 日: MODS 组 (26 例) 比非 MODS 组 (23 例), 1.810 (1.377, 2.448) 比 1.172 (1.129, 1.382), $P = 0.002$]。在 ICU 期间乳酸 / 白蛋白比值可独立预测 MODS 的进展 [比值比 (OR) = 5.5, 95% 可信区间 (95%CI) = 1.1 ~ 26.1, $P = 0.033$]。乳酸 / 白蛋白比值预测 MODS 和病死率的受试者工作特性曲线下面积 (AUC) 分别为 0.845 8 和 0.844 9。同时研究显示, 急性生理学及慢性健康状况评分系统 II (APACHE II) 评分越高, 第 1 日和第 2 日的乳酸 / 白蛋白比值越高 ($r_1 = 0.531 5$, $r_2 = 0.540 8$, 均 $P < 0.001$)。氧合指数 (PaO₂/FiO₂) 越低, 第 1 日和第 2 日的乳酸 / 白蛋白比值越高 ($r_1 = -0.514 3$, $r_2 = -0.542 0$, 均 $P < 0.001$)。该研究证实, 乳酸 / 白蛋白比值增加与严重脓毒症和脓毒性休克患者 MODS 进展及病死率相关。

喻文, 罗红敏, 编译自《J Crit Care》, 2014-11-11

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25537574>

严重脓毒症和脓毒性休克患者心肌功能障碍与炎症细胞因子无相关性

体外研究表明, 循环中炎症细胞因子可引起心肌功能障碍。然而, 并没有体内的临床研究证实是否血清炎症细胞因子浓度与心肌功能障碍相关。因此, 近期有学者进行了一项临床研究, 对 105 例严重脓毒症或脓毒性休克患者进行超声心动图, 测定血清炎症细胞因子白细胞介素 (IL-6、IL-8、IL-1 β 、IL-18、IL-10)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、单核细胞趋化因子-1 α (MCP-1 α), 以及心脏生物标志物超敏肌钙蛋白 T (hs-cTnT)、N 末端脑钠肽前体 (NT-proBNP) 水平; 并分析细胞因子和生物标志物与左室收缩和舒张功能障碍、脓毒症严重程度及病死率的相关性。结果显示: 左室射血分数 (LVEF) < 0.50 或 < 0.55 的收缩功能障碍者分别有 13 例 (12%)、24 例 (23%), 组织多普勒二尖瓣环处 e' 峰速度 < 8 cm/s 或二尖瓣 E 峰速度与二尖瓣环处 e' 峰速度比值 (E/e') 负比的舒张功能障碍者分别有 53 例 (50%)、26 例 (25%)。44 例患者 (42%) 在院内死亡。除 IL-1 外, 所有细胞因子与序贯器官衰竭评分 (SOFA)、急性生理学及慢性健康状况评分系统 II (APACHE II) 评分均具有相关性, 所有细胞因子均可预测患者病死率。IL-10、IL-18 可独立预测病死率 [比值比 (OR) = 3.1, $P = 0.006$; OR = 28.3, $P < 0.000 1$]。而细胞因子与 LVEF、舒张期末容积指数 (EDVI)、每搏量指数 (SVI) 或组织多普勒 s' 波、e' 波速度均无显著相关性。同样, 无论是在高或低 LVEF、EDVI、SVI、s' 波和 e' 波速度的患者中, 细胞因子水平差异均无统计学意义。与此相反, NT-proBNP 与 LVEF 及 e' 波速度降低密切相关, hs-cTnT 主要与 e' 波速度减少相关。该研究证实: 在严重脓毒症或脓毒性休克患者中, 炎症细胞因子与心脏收缩或舒张功能障碍并无明显相关性。

喻文, 罗红敏, 编译自《Chest》, 2015-01-15 (电子版)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25591166>