

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.033

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.033>

脑死亡动物模型的研究进展

王建桥¹, 吕浩同² 综述 李战永³ 审校

(1. 河北省廊坊市人民医院神经内科, 河北 廊坊 065000; 2. 华北理工大学临床医学院2013级, 河北 唐山 063000;
3. 廊坊师范学院生命科学学院, 河北 廊坊 065000)

[摘要] 脑死亡动物模型可用于研究器官移植供体的功能, 大鼠、猪、狗、家兔、小鼠等是脑死亡动物模型常选用的模式动物。当前具有代表性的脑死亡建模方法, 是通过急剧或缓慢颅内加压法建模, 制备突发性脑死亡模型和渐进性脑死亡模型。模式动物脑死亡的判定目前尚无统一标准, 现有脑死亡动物模型仍存在不足, 不能全面模拟临床脑死亡, 建模成功的判断与临床上脑死亡的诊断仍有差别。

[关键词] 脑死亡; 模式动物; 突发性脑死亡模型; 渐进性脑死亡模型

Research progress of animal model of brain death

WANG Jianqiao¹, LÜ Haotong², LI Zhanyong³

(1. Department of Neurology, People's Hospital of Langfang City, Langfang Hebei 065000;
2. College of Clinical Medicine, North China University of Science and Technology, Tangshan Hebei 063000;
3. College of Life Science, Langfang Teachers University, Langfang Hebei 065000, China)

Abstract Brain death models can be used to study the function of transplant donor. Rats, pigs, dogs, rabbits, mice, etc. are often selected for model animals used in brain death studies. Currently, the typical method to establish a brain death model is to increase intracranial pressure suddenly or gradually by inflation of an epidural balloon catheter. The commonly applied models are sudden onset brain death model and gradual onset brain death model. There are still no uniform criteria for the determination of brain death in the model animal. Additionally, some deficiencies of brain death animal models at present are existed yet, and it cannot fully simulate the clinical brain death. The judgment of a successful brain death model is still different from the diagnosis of clinical brain death.

Keywords brain death; model animal; the sudden onset brain death model; the gradual onset brain death model

尽管当前各国对于脑死亡判定的神经标准仍存在争议^[1-3], 但“脑死亡是指大脑、小脑、脑干在内的全脑功能不可逆转的丧失”已成为学界共识^[4-5]。确立脑死亡标准, 有利于科学地确定死

亡时间, 为器官移植提供更多的供体。然而, 脑死亡状态可以影响供体器官正常功能、增加移植物的不良预后。脑死亡供体的器官缺血、缺氧可导致多种炎症介质过多释放, 从而损害移植器官

收稿日期 (Date of reception): 2017-07-04

通信作者 (Corresponding author): 李战永, Email: lee1537@126.com

的功能, 加速移植后的排斥反应^[6-8]。近年来, 有关脑死亡的实验研究越来越多地关注脑死亡对供体器官的影响及其机制、移植前改善脑死亡供体器官的质量、移植存在的问题及其前期干预等内容。前述各种实验研究的开展均需要脑死亡动物模型的合理应用。本文就脑死亡动物模型的制作及应用予以综述。

1 模式动物的选择

利用模式动物建立疾病模型是当今生物医学研究的重要手段, 对疾病的基础研究、临床应用和转化研究均具有重要意义, 科学合理的选用模式动物已成为影响生物医学基础研究发展的一个关键因素。为了解脑死亡模式动物的种类, 本文检索了截止2017年6月在PubMed和万方数据库中的期刊文献。PubMed的检索词为: 题名(Title)“脑死亡(Brain Death)”+题名/摘要(Title/Abstract)“模型(Model)”, 检索出文献144篇, 其中利用模式动物进行脑死亡相关研究的文献111篇。通过查阅文章内容, 统计发现所用实验动物有大鼠、猪、狗、家兔、小鼠、羊、狒狒, 其中大鼠做为模式动物的使用率最高, 其次是猪(图1)。万方数据库的检索词为: 题名“脑死亡”+摘要“模型”, 命中57条, 其中有用文献56篇, 所用实验动物有猪、大鼠、家兔、猫、狗、小鼠, 使用率依次降低(图2)。

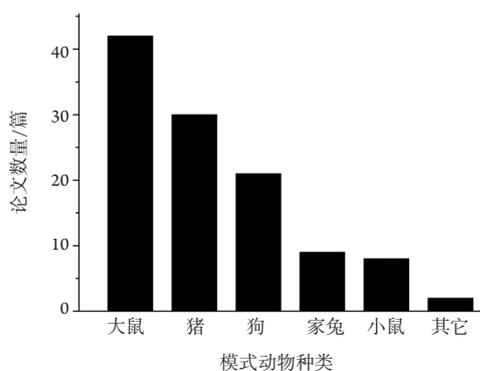


图1 PubMed检索脑死亡模式动物结果

Figure 1 Search results of Brain death model animal in PubMed

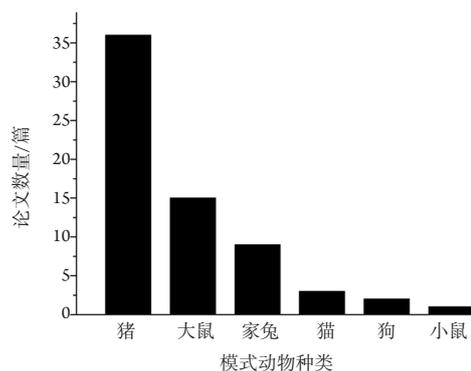


图2 万方数据库检索脑死亡模式动物结果

Figure 2 Search results of brain death model animal in Wanfang data

尽管上述检索可能存在遗漏, 但透过检索结果, 也能基本了解国际(国内外)和国内在进行脑死亡的基础研究时, 模式动物的使用现状。两个数据库检索结果不一致, 在一定程度上反映出国内外在研究脑死亡时, 选用的模式动物存在某些差异。大型动物(如猪、狗等)的使用往往更易受到动物福利、宗教信仰等伦理问题的制约^[9], 这可能是猪作为脑死亡模式动物, 其使用率在国内外有所差别的原因之一。此外, 动物来源也会影响模式动物的使用。

2 脑死亡动物模型的制作及应用

目前应用最多的脑死亡建模方法, 是颅内加压法, 采用颅内水囊或气囊占位, 即颅内置留可扩张性气囊, 囊内充气或充水, 使颅内压急剧或缓慢上升。通过升高颅内压使全脑组织受损从而进行脑死亡过程的诱导, 同时监测各项生理指标用以判断脑死亡。按颅内压升高的速度, 可把实验性脑死亡模型分为突发性脑死亡模型(sudden onset brain death model)和渐进性脑死亡模型(gradual onset brain death model)^[10-11]。

2.1 突发性脑死亡(爆发式球囊颅内加压法)

亦称为爆发性脑死亡(explosive brain death, EBD)。建模过程中, 造成脑的急性显著损伤, 在30~60 s内使实验动物的颅内压大于或等于其平

均动脉压,致全脑完全缺血、引起全脑功能永久性消失;同时用人工手段维持实验动物的心跳和被动呼吸,从而模拟人类原发性脑死亡的临床状况。早期实验室研究脑死亡多采用EBD方式建立动物模型。突发性脑死亡建模的不足之处,在于急剧颅内压升高会导致动物的血流动力学不稳定和充血性呼吸衰竭,颅内压突然升高可引起不可逆转的心肌损伤,部分实验动物死于心跳骤停或需要药物治疗,另有部分实验动物建模后因无法维持血流动力学平稳而不能应用。为了防止血压过度波动,经常使用升压药来维持突发脑死亡动物的血压平稳,而升压药对许多器官都会有损伤性毒副作用^[10]。

通过EBD方式建模进行研究^[12],发现多巴胺和去甲肾上腺素损伤家兔脑死亡后的肾灌注,并可能降低肾移植在恢复前的活力,选择肾上腺素可作为处理脑死亡供体的首选儿茶酚胺。观察EBD对猪心肌功能和高能磷酸盐储备的影响,发现脑死亡期间发生的早期心脏损伤并非缺血所致^[13]。研究人员^[14]采用EBD方法建立狗脑死亡模型,观察脑死亡动物全身及局部血流的分布情况和内脏器官的早期代谢变化。Breithaupt-Faloppa等^[15]采用EBD方式建模,研究了肺部炎症与性别的相关性。

2.2 渐进性脑死亡(缓慢式球囊颅内加压法)

与突发性脑死亡模型相比,渐进性脑死亡(gradual brain death, GBD)在建模过程中,通过颅内气囊的扩张缓慢升高颅内压,对血流动力学影响较小,而且在脑死亡后若干小时内能使血压维持平稳水平^[16]。Kolkert等^[10]在总结前人的各种脑死亡模型制作的基础上,提出了一种新的渐进性脑死亡模型制作方法:在各种监测设施齐备时,对大鼠复合麻醉,颅骨钻孔后硬膜外留置气囊,向气囊内缓慢持续注入生理盐水,注水速度为16 $\mu\text{L}/\text{min}$,从而使气囊内压缓慢持续上升,直至大鼠血压出现降低后又恢复升压高峰时的基础水平,停止注水和麻醉,气囊保持膨胀状态直至实验完成。这种建模模拟颅内出血导致脑死亡的过程,建模过程中不用升压药物维持血压,也无需改变颅内气囊容积,很少有血流动力学不稳现象出现,避免了升压药对外周器官的损伤副作用,符合器官供体脑死亡模型的要求。

渐进式脑死亡模型是一个较难复制的模型,术中操作失误或其他干扰因素往往使动物出现“心跳停止死亡”而非“脑死亡”。针对GBD建

模过程中出现的不足,不同的实验室又提出了相关改良措施。陆海盛等^[17]在Pratschke等^[16]建模方式的基础上,对术中麻醉、插管、颅内加压、脑死亡判断等环节进行探讨改良,降低了手术操作难度,提高了手术成功率。石雍等^[18]在建模过程中采用气管插管进行机械通气,微量输液泵持续缓慢地向球囊导管注射生理盐水进行颅内加压,更好地模拟了临床脑死亡过程,脑死亡后平均动脉压和心率也比较稳定。利用成熟的基因敲除或转基因小鼠以及丰富的小鼠特异性试剂,能从分子层面探究脑死亡对供体器官的影响^[19-20]。由于在缓慢加压过程中缺乏颅内压监测,以注水速度为指标进行加压较盲目,以致建立起的脑死亡模型个体差异大、稳定性差,不能准确地评价脑死亡后机体生理生化的变化。万晨光等^[21]以经典的硬膜外颅内加压法为基础,在长白猪颅内置入Codman有创颅内压监测探头,在实时监测颅内压变化情况下,根据颅内压与平均动脉压的关系进行间断颅内加压,为研究脑死亡建模过程中、脑死亡后的脑组织病理改变及器官移植免疫等变化提供了更加稳定的动物模型。另有研究基于传统建模方法改良颅骨钻孔工具,术中使用便携超声机行心脏彩超监测心率变化^[22];缓慢增加颅内压过程中改变对大鼠的护理和治疗策略,建立可重复的脑死亡动物模型,可模拟临床原发性颅内出血导致脑的脑膜炎和随后的脑死亡^[11],比传统的渐进脑死亡模型更具优势。

GBD模型的循环稳定时间优于EBD模型。通过缓慢增加颅内压建立标准化脑死亡模型,可用于界定脑缺血时缺血脑组织氧供和灌注压的阈值水平,模拟人类脑死亡的临床进展过程^[23,24],研究提高移植器官质量和数量的新策略^[11]。Pratschke等^[16]描述了一种渐进性、可控性大鼠脑死亡模型,并证实外周器官缺血是尸体肾移植后,肾功能延迟恢复的发生率高于活体供体的部分原因。GBD对移植后同种异体心脏的功能有损伤,由此导致炎症因子的上调并引起宿主免疫机制,加速未修饰宿主的急性排斥反应过程^[25]。

2.3 其他建模方法

小鼠颅内插入Fogarty导管并在10 min内充气以实现脑干压迫,致脑桥不可逆性缺血损伤可诱导脑死亡^[26]。在猪枕部颅内空间插入导管并增加颅内压,直到脑干脑疝形成,可引起脑死亡^[27]。Hvas等^[28]将注射针头通过左侧颅骨的钻孔插入,并立体定位放置在内囊侧脑室水平,通过在内囊

中灌注血液,建立了一种标准化的、由出血性发作引起的猪脑死亡动物模型。

3 模式动物脑死亡的判定

比较各种动物模型的研究结果^[27],发现并非所有的动物脑死亡后的血压和心率都表现出相同的反应。因脑死亡模式动物的多样性,目前尚缺乏统一的实验脑死亡判断标准。谷振勇等^[29]用猫做动物模型,诊断脑死亡的主要指征为:深度昏迷、对强烈的疼痛刺激无反应;大脑电沉默(脑电活动消失),自主呼吸停止,脑循环停止,脑反射消失,排除麻醉及镇静药物的影响等。张水军等^[30]认为:以大鼠出现深昏迷、自主呼吸停止、无角膜反射和静息脑电,并持续6 h以上无变化为脑死亡。实验性巴马小型猪脑死亡判定标准^[31]为:1)深昏迷;2)脑干反射消失;3)自主呼吸停止;4)脑电静息;5)阿托品试验阴性;6)抽搐反应消失;7)呼吸暂停试验阳性;8)首次判定脑死亡后观察6~12 h无变化。符合1),2),3),4)+5),6),7)其中之一+8)后可判定为脑死亡。该标准接近临床判定标准,符合脑死亡动物实验的实际情况,并对不同方法建立的脑死亡模型具有适应性,是文献报道脑死亡动物实验中较完备的脑死亡判定标准。

4 现有脑死亡动物模型制作的不足

4.1 麻醉剂的种类较多,有的麻醉过程略复杂,麻醉剂影响脑电图

使用不同的模式动物,要采用不同的麻醉剂。而且根据实验目的,选择的麻醉方法及给药途径都不相同。一般来说,小型动物往往使用单一麻醉剂,而大型动物如猪、狗等往往采用复合麻醉的方法,给药途径有吸入麻醉、静脉注射麻醉、腹腔注射麻醉等。麻醉剂会影响脑细胞的活动,从而影响脑电图,因而有时会影响对脑死亡的判断。

4.2 现有脑死亡模型不能全面模拟临床脑死亡

目前绝大多数脑死亡模型均人为升高颅内压所致,可以模拟严重损伤、出血、炎症、肿瘤、脑水肿、脑压迫、脑疝所致的原发性脑死亡,因此研究内容也是针对临床上明确原因所致脑死亡;但不能很好的模拟所有临床脑死亡原因。模拟临床上继发性脑死亡动物模型报道很少。

4.3 目前仍缺乏判定实验动物脑死亡的统一标准

如何判定实验动物是否脑死亡、脑死亡模型是否建立成功,国内外缺乏统一标准。实验动物的脑死亡诊断更多的是依靠实验人员结合临床,观察实验动物的临床表现(如实验动物进入深昏迷状态、瞳孔散大等)而得出结论,但这种判定存在很大的主观性,且受实验人员的临床经验所局限,往往并不能准确的判定脑死亡状态,从而导致后续实验的真实性出现偏差。

参考文献

- Pandey A, Sahota P, Nattanmai P, et al. Variability in diagnosing brain death at an academic medical center[J]. *Neurosci J*, 2017, 2017: 6017958.
- Altınörs N, Haberal M. Brain Death and Transplant in Islamic Countries[J]. *Exp Clin Transplant*, 2016, 14(Suppl 3): 48-52.
- Lewis A, Greer D. Current controversies in brain death determination[J]. *Nat Rev Neurol*, 2017, 13(8): 505-509.
- 国家卫生和计划生育委员会脑损伤质控评价中心. 脑死亡判定标准与技术规范(成人质控版)[J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2015, 15(12): 935-939. Brain Injury Evaluation Quality Control Centre of National Health and Family Planning Commission. Criteria and practical guidance for determination of brain death in adults (BQCC version)[J]. *Chinese Journal of Contemporary Neurology and Neurosurgery*, 2015, 15(12): 935-939.
- Nikas NT, Bordlee DC, Moreira M. Determination of Death and the Dead Donor Rule: A Survey of the Current Law on Brain Death[J]. *J Med Philos*, 2016, 41(3): 237-256.
- Fung A, Zhao H, Yang B, et al. Ischaemic and inflammatory injury in renal graft from brain death donation: an update review[J]. *J Anesth*, 2016, 30(2): 307-316.
- Saat TC, Susa D, Kok NF, et al. Inflammatory genes in rat livers from cardiac- and brain death donors[J]. *J Surg Res*, 2015, 198(1): 217-227.
- Li Y, Xiong Y, Zhang H, et al. Ginkgo biloba extract EGB761 attenuates brain death-induced renal injury by inhibiting pro-inflammatory cytokines and the SAPK and JAK-STAT signalings[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 45192.
- Ishii M, Matsumoto Y, Sekimizu K. Usefulness of silkworm as a model animal for understanding the molecular mechanisms of fungal pathogenicity[J]. *Drug Discov Ther*, 2015, 9(4): 234-237.
- Kolkert JL, 't Hart NA, van Dijk A, et al. The gradual onset brain death model: a relevant model to study organ donation and its consequences on the outcome after transplantation[J]. *Lab Anim*,

- 2007, 41(3): 363-371.
11. Zhang S, Cao S, Wang T, et al. Modified brain death model for rats[J]. *Exp Clin Transplant*, 2014, 12(5): 469-473.
 12. Ueno T, Zhi-Li C, Itoh T. Unique circulatory responses to exogenous catecholamines after brain death[J]. *Transplantation*, 2000, 70(3): 436-440.
 13. Ferrera R, Bopassa J, Rodriguez C, et al. High energy compound stability during experimental brain death[J]. *Transplant Proc*, 2006, 38(7): 2285-2286.
 14. De Luca FA, Cruz RJ Jr, Garrido Adel P, et al. Initial hepatosplanchnic blood flow distribution and oxygen metabolism in experimental model of hypotensive brain death[J]. *Ann Transplant*, 2009, 14(1): 38-46.
 15. Breithaupt-Faloppa AC, Ferreira SG, Kudo GK, et al. Sex-related differences in lung inflammation after brain death[J]. *J Surg Res*, 2016, 200(2): 714-721.
 16. 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(3): 427-430.
 17. 陆海盛, 马毅, 朱晓峰. 改良大鼠渐进性脑死亡模型的制作[J]. *中华实验外科杂志*, 2010, 27(9): 1341-1343.
LU Haisheng, MA Yi, ZHU Xiaofeng. Establishment of modified gradual onset brain death model in rats[J]. *Chinese Journal of Experimental Surgery*, 2010, 27(9): 1341-1343.
 18. 石雍, 李崇辉, 肖年军, 等. 稳定小鼠缓慢颅内加压法脑死亡模型的建立[J]. *中国医学科学院学报*, 2015, 37(2): 195-200.
SHI Yong, LI Chonghui, XIAO Nianjun, et al. Establishment of a stable mouse model of brain death by the method of the gradually increasing intracranial pressure[J]. *Acta Academiae Medicinae Sinicae*, 2015, 37(2): 195-200.
 19. Atkinson C, Varela JC, Tomlinson S. Complement dependent inflammation and injury in a murine model of brain dead donor hearts[J]. *Circ Res*, 2009, 105(11): 1094-1101.
 20. Kamal RP, Katz JM, York IA. Molecular determinants of influenza virus pathogenesis in mice[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2014, 385(3): 243-274.
 21. 万晨光, 冯学泉, 李牧, 等. 改良猪脑死亡模型的建立[J]. *天津医药*, 2014, 42(4): 318-320.
WAN Chenguang, FENG Xuequan, LI Mu, et al. Establishment of Modified Brain Death Model in Pig[J]. *Tianjin Medical Journal*, 2014, 42(4): 318-320.
 22. 潘宜鹏, 刘煜, 李明, 等. 改良颅内加压法兔脑死亡模型建立及其状态的维持[J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26(1): 25-28.
PAN Yipeng, LIU Yu, LI Ming, et al. Establishment of brain death model for rabbits in a modified way by increasing intracranial pressure and maintaining the state of brain death[J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2016, 26(1): 25-28.
 23. Purins K, Sedigh A, Molnar C, et al. Standardized experimental brain death model for studies of intracranial dynamics, organ preservation, and organ transplantation in the pig[J]. *Crit Care Med*, 2011, 39(3): 512-517.
 24. Purins K, Enblad P, Wiklund L, et al. Brain tissue oxygenation and cerebral perfusion pressure thresholds of ischemia in a standardized pig brain death model[J]. *Neurocrit Care*, 2012, 16(3): 462-469.
 25. Wilhelm MJ, Pratschke J, Beato F, et al. Activation of the heart by donor brain death accelerates acute rejection after transplantation[J]. *Circulation*, 2000, 102(19): 2426-2433.
 26. Floerchinger B, Yuan X, Jurisch A, et al. Inflammatory immune responses in a reproducible mouse brain death model[J]. *Transpl Immunol*, 2012, 27(1): 25-29.
 27. Sereinigg M, Stiegler P, Puntschart A, et al. Establishing a brain-death donor model in pigs[J]. *Transplant Proc*, 2012, 44(7): 2185-2189.
 28. 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(8): 995-1005.
 29. 谷振勇, 李如波. 应用颅内高压复制脑死亡动物模型[J]. *河北医科大学学报*, 1999, 20(6): 341-343.
GU Zhenyong, LI Rubo, JIANG Jingtao, et al. Establishment of animal model of brain death by intracranial hypertension[J]. *Journal of Hebei Medical University*, 1999, 20(6): 341-343.
 30. 张水军, 史冀华, 唐哲, 等. 甘氨酸对脑死亡大鼠供肝损伤的防护作用[J]. *中华器官移植杂志*, 2004, 25(5): 264-266.
ZHANG Shuijun, SHI Jihua, TANG Zhe, et al. The protection effects of glycine pretreatment on brain-dead donor liver[J]. *Chinese Journal of Organ Transplantation*, 2004, 25(5): 264-266.
 31. 史冀华, 张水军. 实验性巴马小型猪脑死亡判定标准的初步探索[J]. *基础医学与临床*, 2006, 26(7): 786-787.
SHI Jihua, ZHANG Shuijun. Preliminary exploring on experimental brain death indexes of Ba-Ma mini pigs[J]. *Basic Medical Sciences and Clinics*, 2006, 26(7): 786-787.

本文引用: 王建桥, 吕浩同, 李战永. 脑死亡动物模型的研究进展[J]. *临床与病理杂志*, 2017, 37(9): 1960-1964. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.033

Cite this article as: WANG Jianqiao, LV Haotong, LI Zhanyong. Research progress of animal model of brain death[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2017, 37(9): 1960-1964. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.033