

• 综述 •

脓毒症动物模型制备方法的研究进展

朱雪琦(综述) 刘清泉 姚咏明(审校)

【关键词】 脓毒症; 动物模型; 研究进展

脓毒症是临床急危重患者的主要死亡原因之一,在过去的几十年中,世界各国投入了大量精力和财力对其展开研究。动物模型作为脓毒症发病机制和防治研究的基础,在脓毒症研究领域具有举足轻重的作用,这里有必要对其制备方法的研究进展进行回顾,综述如下。

1 脓毒症动物模型的种类

1.1 细菌或内毒素攻击模型:内毒素即脂多糖(LPS),是革兰阴性(G^-)菌细胞壁的主要成分,脓症患者血中 LPS 浓度与病情和预后密切相关。给动物静脉注射(静注)LPS 可诱导多种炎性介质的合成释放,并引起急性感染症状,死亡率较高。根据攻击剂量和方法不同,此类模型大致可分为小剂量(亚致死量)、大剂量(致死量)和小剂量连续攻击 3 种。随着病情的进展,脓症患者血细菌培养阳性率逐渐升高,提示菌血症在脓毒症进程中也扮演着很重要的角色。因此,细菌攻击成为复制模型的另一类方法。静注大剂量细菌,动物会出现显著的心血管功能障碍,短时间内可死亡。

1.2 肺炎和腹膜炎模型:肺脏和腹腔是脓症患者常见的感染灶。向动物气管或鼻腔内注入链球菌、克雷伯菌或铜绿假单胞菌,肺脏可出现弥散性损伤,肉眼可见肺肿胀,表面散在多个出血点,组织形态学观察显示有中粒细胞聚集^[1]。腹腔感染模型主要包括盲肠结扎穿孔术(CLP)、腹腔接种细菌以及腹腔注射菌液 3 种。CLP 模型通过将盲肠近端结

扎、远端穿孔的方法,使动物自身肠内容物外溢,引起腹膜炎;腹腔接种细菌模型采用向动物腹腔植入粪便的方法引发腹膜炎;植入异种粪便或在植入物中加入硫酸钡、胆汁盐或自体血红蛋白制成的明胶丸,可增加植入物的毒性,避免产生耐受^[2]。植入多种属动物混合粪便组成的接种物,可引发混合性腹腔感染。此外,腹腔注射菌液可使细菌迅速播散到远端器官,引起多器官损伤^[3]。除上述两大类方法外,还可采用将感染异物植入动物软组织的方法形成局部脓肿,引起全身感染症状^[4]。

2 模型动物种属和性别的选择

选择哪个种属的动物用于研究是应考虑的重要问题。小型哺乳动物,如大鼠、小鼠或豚鼠,遗传相似性高,无特异性病原菌,价格较低,多用于有关生存率的研究。大型哺乳动物,如猪、羊、狗和灵长类,可提供充足的标本,便于连接各种监测设备和进行器官功能支持,因此可检测多种指标,适于观察发病过程和症状表现。灵长类动物,如狒狒、黑猩猩的免疫系统与人类高度相似,对于评价细胞因子反应有重要价值,但其价格昂贵、不易标准化。羊对内毒素十分敏感,只需相当于大鼠、兔和狗的几十至几千分之一剂量即可出现脓毒症症状,加之其性情温顺,肺部淋巴系统丰富,特别适用于建立相对慢性、清醒状态的模型,尤其适用于肺损伤的研究。与其他非灵长类动物相比,猪肾脏、心血管和消化系统的生理特点和解剖结构与人类最相似,多用于多器官功能障碍综合征(MODS)的研究。此外,具有明确基因特征的同系繁殖动物,如内毒素耐受型和内毒素敏感型小鼠,已作为很有用途的工具用于研究脓毒症和感染的病理生理变化。近年来,特定基因敲除和转基因品系的动物应运而生,成为从分子水平揭示脓毒症发病机制和进行防治研究的重要工具^[5,6]。

研究表明^[7]:脓毒症雌性小鼠 10 d 的生存率为 60%,而雄性为 25%;雄性小鼠脾细胞免疫反应降低,而雌性没有

这种变化。失血性休克的雄性小鼠脾细胞和巨噬细胞的白细胞介素-1(IL-1)产生量降低,而雌性没有这种变化。还有研究证实,阉割手术可阻止创伤和失血性休克后雄性小鼠的免疫抑制^[8]。这些结果提示,雌性小鼠较雄性小鼠更能耐受脓毒症和失血性休克,且雄性小鼠有易于因脓毒症或休克引发免疫抑制的倾向,可能与睾丸激素有关^[9]。

3 宿主对内毒素和细菌反应性的差异

不同种属宿主对内毒素敏感性不同,对同种细菌的反应各异。啮齿类动物、猫和狗对内毒素较耐受;人类、兔、羊以及灵长类动物则对内毒素敏感性较高,灭活的菌体或氨基半乳糖即可减少 LPS 的用量^[10,11]。能导致人类典型伤寒发热的伤寒沙门菌在啮齿类动物身上并不能引起全身症状。而沙门菌属的另一个血清型鼠伤寒沙门菌可引发小鼠的全身感染症状,但其对人类毒力很低,一般不引起全身症状。

同种属动物对不同种类的细菌反应不同,感染不同细菌后对治疗的反应也有差异。给猪分别注射相同剂量的 G^- 菌和革兰阳性(G^+)菌,其血流动力学和肺脏改变各异。葡萄球菌仅引起微小的变化,大肠杆菌和铜绿假单胞菌则可导致休克和急性呼吸衰竭。对于腹腔注射金黄色葡萄球菌或大肠杆菌的小鼠,抗生素可诱发前者循环中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的早期释放,而对于后者的 TNF- α 释放在时间和变化幅度上均无明显影响^[12]。采用抗 TNF- α 抗体分别对接受致死剂量的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌大鼠进行治疗,结果显示对前者的保护作用明显优于后者^[13]。

同种细菌攻击方式不同,引起细胞因子的反应亦不同。给小鼠静注致死剂量大肠杆菌 O111:B4 活菌, TNF- α 的升高幅度显著高于腹腔注射。同种细菌也可能因为毒力基因表达的不同而具有广泛的疾病谱。

以上提示,使用某一剂量和种类的细菌或内毒素,建立某一种属的动物模

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(G1999054203,2005CB522602);首都医学发展科研基金重点项目(2003-2023)

作者单位:100700 北京中医药大学东直门医院急诊科(朱雪琦,刘清泉);100037 北京,解放军总医院第一附属医院(原解放军第三〇四医院)全军烧伤研究所(姚咏明)

通讯作者:刘清泉,教授,硕士研究生导师
(Email:liuqingquan_2003@yahoo.com.cn)

作者简介:朱雪琦(1979-),女(汉族),北京人,医学硕士,医师。

型,用于观察药物疗效,结果并不完全一致,对其可靠性的解释更要谨慎^[10]。

4 对脓毒症动物模型的评价

复制脓毒症模型的目的是模拟脓毒症的发病因素、病理过程和临床特征以及研究脓毒症的发病机制和防治方法等。因此,一个与临床相关性较强的脓毒症模型应该满足以下几点:①感染因素最好以感染灶、创面感染或内源性感染的形式出现,以模拟人类感染引起一系列病理生理反应的自然过程;②发病过程中血细菌培养及内毒素检测为阳性;③MODS发生距原发打击有一定的时间;④有明显的脓毒症表现,呈现高动力循环状态和持续高代谢反应;⑤有足够的死亡率和 MODS 发病率。

目前,复制菌血症模型通常采用的是大肠埃希氏杆菌血清敏感型无毒力菌株,其在宿主体内不能繁殖,接受静注的动物在中性粒细胞缺乏情况下都可将其迅速有效地清除,因此,必须注射相当大剂量才有可能打击或麻痹宿主的防御反应。细菌通过开放的静脉进入机体,致使宿主无机会隔离感染灶,从而产生致命的脓毒症状态。然而大多数患者的发病并不是由大量细菌负荷并在某时激发所致,通常是存在明确或高度可疑(隐匿)的感染灶,并持续不断地向机体播散细菌。此外,流行病学调查资料显示,近年来 G^+ 菌感染在脓毒症患者中所占比例明显增高,已经渐渐超过 G^- 菌,其常与 G^- 菌脓毒症同时发生,并与内毒素协同作用,使脓毒症的病理生理过程进一步恶化^[14]。但在基础研究中,大多数菌血症模型采用的仍是 G^- 菌。

采用小剂量内毒素攻击,动物受到的打击是短暂、一过性的,某些对内毒素敏感性不强的种属(尤其啮齿类动物)极易耐受。而大剂量内毒素攻击,动物在没有充分液体复苏和其他支持治疗情况下呈现的是低动力循环状态,血中促炎因子爆发式释放,持续时间短,内毒素及促炎因子升高幅度远远高于临床患者^[15]。动物在短时间内死于内毒素休克,没有充分的时间发展成为持续的促炎/抗炎反应并表现出脓毒症的临床特征,所引起的器官功能障碍也与炎症反应关联性不强。因此,更确切地说,此类模型属于内毒素中毒模型。细胞因子拮抗剂和类固醇可能会有较好的疗效,但推理至临床要谨慎。若给予动物充分的支持治疗,

可将低动力循环转变为高动力循环,但操作繁琐,需要较高的实验条件,用于样本较大的有关防治研究存在一定困难。持续小剂量门静脉输入内毒素,可模拟人类脓毒症时内毒素从感染灶持续小剂量释放入血或创伤后肠屏障受损所致肠源性内毒素血症的特点,动物在内毒素小剂量持续作用下表现出高动力循环、持续高代谢和全身炎症反应,但动物创伤大,需要长时间麻醉,对实验条件要求高,且啮齿类动物同样易耐受,因此也有一定局限性。

在动物腹腔接种细菌,可形成一个相对局限的感染灶,延缓了机体对细菌的吸收,引发慢性腹腔感染,动物起病隐匿,呈现高动力循环状态,终末死亡率较高。缺陷是细菌培养和细菌定量使过程相对较繁琐。目前,仅有小动物肺炎模型实验的报道,缺乏心血管方面的信息;而且与腹膜炎模型相比,动物发展成脓毒症的比例不高。局部脓肿灶模型动物存活时间长,血流动力学和代谢改变与临床相似,但是模型制作和动物护理复杂,感染发展不易控制,引起的全身反应较轻,实验结果不稳定,目前已不常用。

CLP 模型操作简便,通过外科处理使动物腹腔存在失活组织的同时,少量持续溢入混有多种细菌的肠内容物,引起腹腔感染,这与临床上阑尾炎穿孔形成的憩室炎极为相似。这个模型最初是用大鼠建立的,目前已经在多种属动物身上复制成功,动物表现出与临床相似的早期高动力循环、高代谢和晚期低动力循环状态^[9,16],血中内毒素检出率及细菌培养(包括 G^+ 菌和 G^- 菌)阳性率高,内毒素和促炎因子升高幅度相对平缓,持续时间长。有研究对比了 CLP 模型和内毒素中毒模型的病理生理反应,结果二者细胞因子反应的数量级差别极为显著^[17];另有资料表明,抗 TNF 治疗可显著降低后者的死亡率,而对前者无效^[18]。这些特点均显示出 CLP 模型在临床相关性方面的优势。此模型的缺陷是穿孔后是否包裹关系到动物的预后,并受施术者手法和动物个体差异的影响,不易人为控制。小动物实验可通过增大样本量来解决,但在大动物仍然是个难点,有人采用切除部分网膜的方法防止包裹^[19],可供参考。

在过去的几十年中,液体复苏、抗感染治疗、血管活性药物应用及器官支持

治疗在不断完善,但脓症患者仍未能得到有效的救治,许多在临床前动物实验中显示出很好疗效的药物,在临床试验性治疗中并未取得预期的结果,抗内毒素抗体、抗 TNF 抗体、IL-1 受体拮抗剂、类固醇等在临床试验中相继失败,有的甚至显示出有害作用,因此,临床上脓毒症患者的病死率仍居高不下^[20]。动物实验与临床试验为何会出现如此强烈的差异,原因是多方面的,就动物模型而言,通过上述分析,认为目前主要存在以下几个问题:①一部分动物模型缺乏局部感染灶;②由于种属差异性的存在,动物模型只能模拟临床脓毒症的一部分特征;③由于实验条件、时间等多种因素的限制,复制模型时无法完全模拟临床上器官支持和其他辅助治疗过程;④未对动物实验结果进行谨慎合理的解释即直接推理到临床。这些缺陷虽然在其他疾病的动物模型中也普遍存在,但对于脓毒症这个复杂的综合征,各种因素的影响就显得尤为突出。由此可见,没有选择临床相关性较强的动物模型以及对实验结果不谨慎的解释,是造成防治研究尴尬局面的重要原因。

5 结语

尽管存在着诸多局限,但在过去的几十年中,动物模型仍然为脓毒症发病机制和防治研究提供了大量有意义的基础数据,其在脓毒症研究领域的作用是其他任何手段不可替代的。其中,局部感染模型,尤其是 CLP 模型,与临床脓毒症相关性较强,应用正日趋广泛。在今后的研究中,如何合理选择动物种属,改进动物模型,加强对动物的辅助治疗和器官支持,以增强其临床相关性,并对实验结果进行合理的解释是人们应高度关注的问题。更值得强调的是,某种治疗药物临床试验的设计和实施,应该在多种动物的模型应用上得到肯定疗效并进行严谨的分析后才宜进行。

参考文献:

- Schultz M J, van der Poll T. Animal and human models for sepsis [J]. *Ann Med*, 2002, 34: 573-581.
- Mathiak G, Szewczyk D, Abduah F, et al. An improved clinically relevant sepsis model in the conscious rat [J]. *Crit Care Med*, 2000, 28: 1947-1952.
- Sewnath M E, Olszyna D P, Birjmohun R, et al. IL-10-deficient mice demonstrate multiple organ failure and increased mor-

- tality during *Escherichia coli* peritonitis despite an accelerated bacterial clearance [J]. *J Immunol*, 2001, 166: 6323 - 6331.
- 4 胡森. MODS 动物模型 (M) // 盛志勇, 胡森. 多器官功能障碍综合征. 北京: 科学出版社, 1999: 185 - 199.
 - 5 Corral J, Yelamos J, Hernandez - Espinosa D, et al. Role of lipopolysaccharide and cecal ligation and puncture on blood coagulation and inflammation in sensitive and resistant mice models [J]. *Am J Pathol*, 2005, 166: 1089 - 1098.
 - 6 Remick D G, Bolgos G, Copeland S, et al. Role of interleukin - 6 in mortality from and physiologic response to sepsis [J]. *Infect Immun*, 2005, 73: 2751 - 2757.
 - 7 Zell Weger R, Wichmann M W, Ayala A, et al. Females in proestrus state maintain splenic immune functions and tolerate sepsis better than males [J]. *Crit Care Med*, 1997, 25: 106 - 110.
 - 8 Wichmann M, Zellweger R, De Maso C M, et al. Chaudry IH: mechanism of immune suppression in males following trauma - hemorrhage; critical role of testosterone [J]. *Arch Surg*, 1996, 131: 1186 - 1192.
 - 9 Deitch E A. Animal models of sepsis and shock; a review and lessons learned [J]. *Shock*, 1998, 9: 1 - 11.
 - 10 Parker S J, Watkins P E. Experimental models of gram - negative sepsis [J]. *Br J Surg*, 2001, 88: 22 - 30.
 - 11 Pittet J F, Pastor C M, Morel D R. Spontaneous high systemic oxygen delivery increases survival rate in a awake sheep during sustained endotoxemia [J]. *Crit Care Med*, 2000, 28: 496 - 503.
 - 12 Silverstein R, Wood J G, Xue Q, et al. Differential host inflammatory responses to viable versus antibiotic - killed bacteria in experimental microbial sepsis [J]. *Infect Immun*, 2000, 68: 2301 - 2308.
 - 13 Karzai W, Cui X, Mehlhom B, et al. Protection with antibody to tumor necrosis factor differs with similarly lethal *Escherichia coli* versus *Staphylococcus aureus* pneumonia in rats [J]. *Anesthesiology*, 2003, 99: 81 - 89.
 - 14 姚咏明, 盛志勇. 内毒素与革兰阳性菌致病因子的协同效应与意义 [J]. *中国危重病急救医学*, 2005, 17: 193 - 196.
 - 15 Lekkou A, Karakantza M, Mouzaki A, et al. Cytokine production and monocyte HLA - DR expression as predictors of outcome for patients with community - acquired severe infections [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2004, 11: 161 - 167.
 - 16 宋林萍, 张星火, 李莉, 等. 脓毒症患者血流动力学数值与动脉压力波形关系的探讨 [J]. *中国危重病急救医学*, 2002, 14: 457 - 460.
 - 17 Remick D G, Newcomb D E, Bolgos G, et al. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis, lipopolysaccharide vs cecal ligation and puncture [J]. *Shock*, 2000, 13: 110 - 116.
 - 18 Remick D G, Manohar P, Bolgos G, et al. Block of tumor necrosis factor reduces lipopolysaccharide lethality, but not the lethality of cecal ligation and puncture [J]. *Shock*, 1995, 4: 89 - 95.
 - 19 王恒进, 王笑云, 应旭, 等. 猪多器官功能障碍综合征合并急性肾功能衰竭模型的制作 [J]. *南京医科大学学报*, 2003, 23: 196 - 199.
 - 20 陶晓根, 承韶辉, 王锦权, 等. 糖皮质激素抵抗与脓毒症血症 [J]. *中国危重病急救医学*, 2001, 13: 307 - 309.

(收稿日期: 2005 - 12 - 05)

(本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

β_2 -肾上腺素受体激动剂对人内皮细胞体外缺氧/复氧损伤的保护作用

循环休克所致的缺氧/复氧过程能导致活性氧自由基释放、内皮损伤及多器官衰竭。既往的研究表明 β_2 -肾上腺素受体激动剂对内皮细胞具有保护作用。最近, 法国的研究人员通过前瞻性体外实验证实, β_2 -肾上腺素受体激动剂福莫特罗能预防内皮细胞的缺氧/复氧损伤。实验于细胞灌流装置中进行, 在倒置相差显微镜观察下, 用 Krebs 培养液对人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 进行持续灌注, 平衡 1 h 后造成 2 h 缺氧和 1 h 复氧过程, 复氧结束后检测细胞死亡情况及氧自由基生成情况。结果显示: 缺氧/复氧过程能导致内皮细胞死亡增多 [缺氧/复氧组为 (29 ± 4)%, 对照组为 (1 ± 5)%, $P < 0.05$] 及内皮细胞氧自由基生成 [缺氧/复氧组为 (126 ± 4)%, 对照组为 (108 ± 4)%, $P < 0.05$]。福莫特罗能剂量依赖性减少细胞死亡及内皮氧自由基的生成, 而 β_2 -肾上腺素受体拮抗剂 ICI118,551 及一氧化氮合酶抑制剂 N^G -硝基-L-左旋精氨酸 (L-NNA) 能拮抗福莫特罗的细胞保护作用及氧自由基生成抑制作用。因此研究人员认为: 福莫特罗能减少体外缺氧/复氧模型中内皮细胞的死亡及氧自由基生成, 该作用为 β_2 -肾上腺素能特异性, 可能部分由一氧化氮合酶介导。

周国勇, 周洁平, 编译自《*Crit Care Med*》, 2006, 34: 165 - 172; 胡森, 审校

缺血/再灌注降低肠黏膜免疫功能

最近日本科研人员报道了肠缺血/再灌注 (I/R) 对肠相关淋巴组织 (GALT) 免疫功能影响的实验结果。实验人员将 90 只小鼠随机分为 3 组: I/R 组 (缺血 60 min)、假手术组 (行开腹术) 及对照组 (不行手术)。于术后 1、2、4、7 和 10 d 处死动物, 收集小肠集合淋巴结、肠上皮隐窝部及黏膜固有层的淋巴细胞以及呼吸道和小肠黏膜的灌洗液并进行观察。结果显示, 肠 I/R 后集合淋巴结、上皮隐窝部及黏膜固有层的淋巴细胞数量明显减少, 这一现象在 GALT 的效应器官上皮隐窝部和黏膜固有层中尤其显著; 但黏膜固有层淋巴细胞的数量能迅速恢复, 集合淋巴结作为 GALT 的生发器官, 淋巴细胞减少轻微但持久。与假手术组对照组相比, 肠 I/R 能减少集合淋巴结 B 细胞的数量; 减少上皮内间隙 α -T 细胞受体 (TCR)⁺、 $\gamma\delta$ -TCR⁺、CD8⁺ 以及 B 细胞的数量; 减少黏膜固有层 $\gamma\delta$ -TCR⁺、CD8⁺ 和 B 细胞的数量。与假手术组相比, I/R 组呼吸道 IgA 水平差异无显著性; I/R 组 1 d 时肠道 IgA 较高, 但 2 d 时差异无显著性。研究人员认为, 肠 I/R 能显著减少 GALT 细胞数量并伴随淋巴细胞表型的改变, 但不影响黏膜 IgA 水平。这些改变可能与重大手术创伤后感染并发症所致的病死率增加有关。

周国勇, 周洁平, 编译自《*Crit Care Med*》, 2006, 34: 182 - 187; 胡森, 审校