

## 内毒素诱发弥散性血管内凝血伴多器官功能损害大鼠模型的建立

乔佑杰 祝君梅 张宇 袁红岩

**【摘要】 目的** 建立一种感染性弥散性血管内凝血(DIC)伴多器官功能障碍综合征(MODS)大鼠模型。**方法** 健康清洁级 Wistar 大鼠 24 只,随机分为正常对照组、低剂量脂多糖(LPS)组、中剂量 LPS 组和高剂量 LPS 组,每组 6 只。正常对照组经股静脉插管两次注射不同剂量生理盐水(1.4 ml/kg 和 2.8 ml/kg);低剂量 LPS 组经股静脉插管两次注射 LPS 1.4 ml/kg(56  $\mu$ g/kg)和 2.8 ml/kg(112  $\mu$ g/kg);中剂量 LPS 组两次注射 LPS 1.4 ml/kg(98  $\mu$ g/kg)和 2.8 ml/kg(196  $\mu$ g/kg);高剂量 LPS 组两次注射 LPS 1.4 ml/kg(196  $\mu$ g/kg)和 2.8 ml/kg(392  $\mu$ g/kg);两次注射间隔 12 h。分别经股静脉插管取各组大鼠静脉血标本,检测注射前后的血小板(PLT)、DIC 凝血象、D-二聚体、纤维蛋白原(Fbg)、抗凝血酶Ⅲ(AT-Ⅲ)、血糖(Glu)、天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)和乳酸脱氢酶(LDH)变化;第二次注射后 4 h,活杀大鼠取肺、肝、肾脏进行组织病理学观察。**结果** 高剂量 LPS 组大鼠两次 LPS 攻击后 4 h 内全部死亡;低剂量和中剂量组动物无死亡。中剂量 LPS 组两次 LPS 攻击后大鼠的 PLT、D-二聚体、Fbg、Glu、AST、ALT、ALP、LDH、活化部分凝血活酶时间、凝血酶原时间和抗凝血酶Ⅲ水平与正常对照组比较差异均有显著性( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );肺、肾、肝脏组织病理学观察均有明显的损伤改变。**结论** 应用 98  $\mu$ g/kg 和 196  $\mu$ g/kg LPS 静脉给予对大鼠间隔 12 h 进行两次攻击可制备 DIC 伴多器官功能损害大鼠模型。

**【关键词】** 弥散性血管内凝血; 多器官功能损害; 内毒素; 动物模型; 大鼠

**Reproduction of a rat model of disseminated intravascular coagulation accompanied by multiple organ injuries** QIAO You-jie, ZHU Jun-mei, ZHANG Yu, YUAN Hong-yan. Tianhe Hospital, Tianjin 300050, China

**【Abstract】 Objective** To reproduce a rat model of disseminated intravascular coagulation (DIC) accompanied by multiple organ dysfunction syndrome (MODS) induced by endotoxin. **Methods** Twenty-four healthy Wistar rats were randomly divided into four groups: control group, low dosage lipopolysaccharide (LPS) group, middle dosage LPS group, and high dosage LPS group (each  $n=6$ ). Rats of each group were given different dosages of normal saline (1.4 ml/kg, 2.8 ml/kg), low dosages LPS [1.4 mg/kg (56  $\mu$ g/kg), 2.8 ml/kg (112  $\mu$ g/kg)], middle dosages LPS [1.4 mg/kg (98  $\mu$ g/kg), 2.8 ml/kg (196  $\mu$ g/kg)] and high dosages LPS [1.4 ml/kg (196  $\mu$ g/kg), 2.8 ml/kg (392  $\mu$ g/kg)] respectively twice 12 hours apart through femoral vein intubation injection. Blood platelet (PLT) count, coagulation function, D-dimer, fibrinogen (Fbg), antithrombin Ⅲ (AT-Ⅲ) blood glucose (Glu), biochemistry indexes including aminotransferase (AST), alanine transaminase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) and lactate dehydrogenase (LDH) were determined before and after LPS challenge, and histopathologic changes of lung, liver and kidney were observed 4 hours after the second injection. **Results** The rats in high dosage LPS group died 4 hours later, and the rats in low and middle dosage LPS groups survived after double LPS challenge. The results of blood PLT, D-dimer, Fbg, Glu, AST, ALT, ALP, LDH, coagulation function of activated partial thromboplastin time, prothrombin time and level of anti-thrombin Ⅲ in middle dosage LPS group were significantly different compared with those of control group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Obvious changes in histopathology were found in major organs such as lung, kidney and liver. **Conclusion** Double intravenous LPS challenge (98  $\mu$ g/kg and 196  $\mu$ g/kg) in rats can reproduce a rat model with DIC accompanied by multiple organ injuries.

**【Key words】** disseminated intravascular coagulation; multiple organ injuries; endotoxin; animal model; rat

多器官功能障碍综合征(MODS)是指机体在受到严重创伤、休克、感染、大面积烧伤、外科大手术、

重症胰腺炎等急性损害 24 h 后,同时或序贯出现 2 个或 2 个以上的系统或器官功能障碍或衰竭,即急性损伤患者多个器官功能改变不能维持内环境稳定的临床综合征,临床上以感染性病因为最为多见<sup>[1-3]</sup>。目前研究感染性 MODS 的实验方法很多。本实验应用不同剂量脂多糖(LPS)对大鼠进行两次攻击,制

作者单位:300050 天津市天和医院

作者简介:乔佑杰(1962-),男(汉族),天津市人,硕士,硕士生导师,主任医师。

表 1 3 组大鼠 PLT 和凝血指标检测结果比较( $\bar{x} \pm s$ )Table 1 Comparison of PLT and blood coagulation indexes among three groups( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数(只)	PLT( $\times 10^9/L$ )	Fbg(g/L)	APTT(s)	D-二聚体( $\mu g/L$ )	PT(s)	AT-III(%)
正常对照组	6	517 $\pm$ 33	2.54 $\pm$ 0.73	20.7 $\pm$ 1.2	240 $\pm$ 80	16.70 $\pm$ 1.20	115.0 $\pm$ 9.0
低剂量 LPS 组	6	448 $\pm$ 69	1.67 $\pm$ 0.62	24.1 $\pm$ 3.8	320 $\pm$ 40	20.20 $\pm$ 3.70	89.0 $\pm$ 6.2
中剂量 LPS 组	6	116 $\pm$ 39** $\Delta\Delta$	0.18 $\pm$ 0.10** $\Delta\Delta$	92.6 $\pm$ 10.3** $\Delta\Delta$	720 $\pm$ 89** $\Delta\Delta$	64.90 $\pm$ 7.23** $\Delta\Delta$	54.0 $\pm$ 10.0** $\Delta\Delta$

注: APTT 为活化部分凝血活酶时间, PT 为凝血酶原时间; 与正常对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与低剂量 LPS 组比较:  $\Delta\Delta P < 0.01$

表 2 3 组大鼠血生化指标检测结果比较( $\bar{x} \pm s$ )Table 2 Comparison of blood biochemistry indexes among three groups( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数(只)	Glu(mmol/L)	ALT(U/L)	AST(U/L)	ALP(U/L)	LDH(U/L)
正常对照组	6	6.01 $\pm$ 1.02	38 $\pm$ 7	138 $\pm$ 24	228 $\pm$ 30	185 $\pm$ 34
低剂量 LPS 组	6	4.70 $\pm$ 1.21	69 $\pm$ 36	177 $\pm$ 37	229 $\pm$ 36	228 $\pm$ 47
中剂量 LPS 组	6	12.84 $\pm$ 2.90** $\Delta\Delta$	210 $\pm$ 24** $\Delta\Delta$	413 $\pm$ 68** $\Delta\Delta$	394 $\pm$ 62** $\Delta\Delta$	705 $\pm$ 136** $\Delta\Delta$

注: 与正常对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与低剂量 LPS 组比较:  $\Delta\Delta P < 0.01$

备感染性弥散性血管内凝血(DIC)伴多器官功能损害大鼠模型, 从凝血功能、生化指标及组织病理学改变方面评价该模型的效果。

## 1 材料与方 法

**1.1 实验材料:** 大肠杆菌 O111:B4 LPS 由上海生物制品研究所提供, 使用时用生理盐水配制成 40、70 和 140 mg/L 3 个剂量组。CHB-28 双目显微镜(日本), MS 9 全自动血细胞分析仪及其配套试剂(法国), STAGO STA 全自动凝血仪及其配套试剂(法国), BECKMAN CX5 全自动生化分析仪及其原配套试剂及定标液(法国); 无菌手术器械及股静脉插管导管(国产)。

**1.2 动物分组及模型制备:** 参照文献<sup>[4]</sup>方法, 在以往我们所制备家兔 MODS 模型方法的基础上进行改良, 制备大鼠 DIC 伴多器官功能损害模型。

**1.2.1 动物选择:** 清洁级 Wistar 大鼠 24 只, 雌雄不拘, 体重(240 $\pm$ 15)g, 实验前在天津市医药科学研究所动物室适应性饲养 2 周, 自由饮食、饮水。

**1.2.2 股静脉导管制备和插入<sup>[5]</sup>:** 选用 PE-50 聚乙烯导管, 加热拉制成内径 0.5 mm、外径 1 mm、长约 20 cm 的导管。插入端剪成 45°平滑的斜面, 用体积分数为 2% 的戊二醛浸泡 30 min 消毒。插管前向导管内充 40 kU/L 的肝素生理盐水, 非插入端用无菌不锈钢针塞住, 管壁外涂无菌液体石蜡。用质量分数为 0.35% 的戊巴比妥钠溶液 35 ml/kg 经腹腔注射麻醉动物, 仰卧固定于实验台上, 剪去右腹股沟部鼠毛, 手术部位皮肤消毒, 沿股动、静脉走向切开右大腿内侧皮肤, 分离出一段长约 1.5 cm 的股静脉, 剪开股静脉并将导管插入约 2 cm, 结扎固定, 检查导管回血情况, 回血良好后, 塞上无菌不锈钢针备用, 并缝合皮肤。根据组别不同, 分别从股静脉插管处注射 LPS 或生理盐水。

**1.2.3 动物分组及 LPS 染毒方法:** 按随机数字表法将大鼠分为 4 组, 每组 6 只。①正常对照组: 从股静脉插管处注射生理盐水 1.4 ml/kg, 12 h 后再给予生理盐水 2.8 ml/kg; ②低剂量 LPS 组: 从股静脉插管处注射 LPS 1.4 ml/kg (56  $\mu$ g/kg), 12 h 后再给予 LPS 2.8 ml/kg (112  $\mu$ g/kg); ③中剂量 LPS 组: 从股静脉插管处注射 LPS 1.4 ml/kg (98  $\mu$ g/kg), 12 h 后再给予 LPS 2.8 ml/kg (196  $\mu$ g/kg); ④高剂量 LPS 组: 从股静脉插管处注射 LPS 1.4 ml/kg (98  $\mu$ g/kg), 12 h 以后, 再次给予 LPS 2.8 ml/kg (392  $\mu$ g/kg)。

**1.3 检测指标及方法:** 第 2 次注射 LPS 或生理盐水 4 h 后, 分别从各组动物腹主动脉取血检测血小板(PLT)、DIC 凝血象、D-二聚体、纤维蛋白原(Fbg)、抗凝血酶 III(AT-III) 血糖(Glu)、天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)和乳酸脱氢酶(LDH)。

**1.4 组织病理学观察:** 术毕放血处死动物, 并摘取其肺脏、肾脏和肝脏, 用体积分数为 10% 的甲醛溶液固定 48 h 以上, 苏木素-伊红(HE)染色, 常规切片, 观察各器官组织病理学改变。

**1.5 统计学方法:** 检测数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 用  $t$  检验;  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 死亡率比较:** 低、中剂量 LPS 组大鼠无死亡, 高剂量组大鼠在两次注射 LPS 后 4 h 内全部死亡。

**2.2 各组大鼠 PLT 和凝血指标检测结果(表 1):** 与正常对照组比较, 低剂量 LPS 组各项凝血指标均有所异常, 但差异均无显著性; 中剂量 LPS 组各项凝血指标进一步恶化, 与正常对照组和低剂量 LPS 组比较差异均有显著性( $P < 0.01$ )。

**2.3 各组大鼠血生化指标检测结果比较(表 2):** 与

正常对照组比较,低剂量 LPS 组大鼠 Glu 有所下降,ALT、AST、ALP 和 LDH 均有不同程度升高,但差异均无显著性;中剂量 LPS 组 Glu、ALT、AST、ALP 和 LDH 均明显升高,与正常对照组和低剂量 LPS 组比较差异均有显著性( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。

**2.4 组织病理学观察结果:**正常对照组肺组织肺泡壁结构基本正常,肺泡大小、充气及肺泡间隔基本正常(彩色插页图 1);肾组织可见肾小球、肾小管结构基本正常(彩色插页图 2);肝组织中央静脉及肝细胞结构尚清晰,肝细胞索排列尚整齐,肝细胞结构无明显病变(彩色插页图 3)。中剂量 LPS 组肺组织出现肺泡萎缩、肺泡壁增厚、泡沫细胞灶,有肺出血及大量炎性细胞浸润(彩色插页图 4);肾小球、肾小管结构紊乱,上皮细胞浊肿,出现炎性细胞浸润,血管系膜及内皮细胞严重变性,近端曲管管腔消失,曲管上皮严重变性坏死(彩色插页图 5);肝脏小叶结构不清,肝细胞索排列紊乱,有肝细胞解离现象,部分肝细胞肿胀,汇管区炎性细胞浸润,局部灶性肝细胞坏死(彩色插页图 6)。

### 3 讨论

从目前的临床资料来看,感染性 MODS 更多的是由革兰阴性菌感染,造成内毒素血症或内毒素休克,由此引发机体一系列病理变化,如凝血功能障碍,机体代谢紊乱,微循环障碍,高分解代谢等,DIC 是感染性 MODS 病理变化中的一个重要组成部分。在感染性 MODS 发生发展过程中,LPS 不仅是能使效应细胞(如单核细胞、中性粒细胞、血小板等)激活的“信号”,而且还是效应细胞分泌内源性炎症介质因而介导机体发生一系列病理变化的关键所在,循环中的内毒素可以明显启动凝血系统,加重内毒素造成的微循环障碍及组织细胞缺血、缺氧程度,进而

引起和加速细胞变性、坏死,最终导致器官功能出现损害,发生 MODS<sup>[6]</sup>。

本实验结果显示,中剂量 LPS 组大鼠经股静脉两次给予 LPS(98  $\mu\text{g}/\text{kg}$  和 196  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )攻击后,其血液生化指标出现明显异常,尤以凝血功能异常变化为主符合 DIC 实验室诊断系统评价标准<sup>[7]</sup>;肺脏、肾脏、肝脏等主要器官组织病理学改变明显,符合 MODS 诊断标准<sup>[2,4]</sup>中多器官功能损害的标准,说明感染性 DIC 伴多器官功能损害大鼠模型是成功可靠的。各项检测指标显示,本方法制备的大鼠感染性 DIC 伴多器官功能损害模型的病理生理改变,与 DIC 伴多器官功能损害患者的临床过程基本一致,且该模型制模过程简单、易操作,动物来源方便经济,适合于急性实验使用。

### 参考文献:

- 1 Fry D E, Pearlstein L, Fulton R L, et al. Multiple system organ failure, the role of uncontrolled infection[J]. Arch Surg, 1980, 115(2):136-140.
- 2 王今达, 王宝恩. 多脏器功能失常综合征(MODS)病情分期诊断及严重程度评分标准[J]. 中国危重病急救医学, 1995, 7(6): 346-347.
- 3 张淑文, 王超, 阴赅宏, 等. 多器官功能障碍综合征诊断标准与病情严重程度评分系统的多中心临床研究[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16(6):328-332.
- 4 王今达, 崔乃杰, 宗育杉, 等. 内毒素性多系统脏器衰竭发病机理的新概念及防治措施的新理论研究[J]. 中国危重病急救医学, 1989, 1(1):17-24.
- 5 徐淑云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社, 1996:855.
- 6 Logan T F, Virji M A, Gooding W E, et al. The pathogenesis of disseminated intravascular coagulation in sepsis [J]. JAMA, 1994, 271(6):427-428.
- 7 颜存粮, 彭黎明. 弥漫性血管内凝血实验诊断的系统评价[J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26(11):686-690.

(收稿日期:2006-10-10)

(本文编辑:李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

### 《中国危重病急救医学》杂志投稿须知

为缩短稿件修改时间,提高效率,加快文摘刊发速度,请作者在投稿时注意以下问题:①来稿须实事求是、数据可靠,具有科学性、逻辑性和时效性,文字精练,引用资料应给出文献依据。②论著类文章在正文前应有内容、格式完全相同的中英文摘要〔按目的(Objective)、方法(Method)、结果(Result)、结论(Conclusion)4个部分分别说明〕以及关键词(3~8个),全部作者的中、英文姓名及单位,中、英文摘要均一式2份。③文稿作者顺序排名(不排并列作者),作者单位及邮政编码在作者姓名后注明。英文的作者顺序及单位写法与中文完全相同。④在文稿首页下脚注明第一作者姓名(出生年),性别(民族),籍贯,硕士以上学位,职称,主要研究方向、研究成果及业绩,发表论文数,国外进修情况及学术地位等。⑤如文稿属科研基金资助项目或重点攻关、研究课题,请在文稿首页的脚注中一并注明,出示课题号,并务必同时寄上述证明复印件(A4复印纸)。⑥投稿请提供软盘(WPS、Word打字,如用方正、华光系统打字,请另存为“纯文本”文件,文件名控制在8个字符以内),并交文字稿2份。

(本刊编辑部)

## 内毒素诱发弥散性血管内凝血伴多器官功能 损害大鼠模型的建立

(正文见41页)

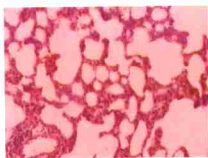


图1 正常对照肺组织病理变化(HE, ×100)  
Figure 1 Pathological changes of lung tissues in control group (HE, ×100)

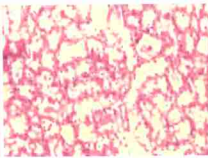


图2 正常对照肾组织病理变化(HE, ×100)  
Figure 2 Pathological changes of renal tissues in control group (HE, ×100)

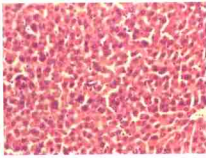


图3 正常对照肝组织病理变化(HE, ×100)  
Figure 3 Pathological changes of liver tissues in control group (HE, ×100)

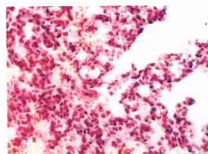


图4 中剂量LPS组大鼠肺组织病理变化  
(HE, ×200)  
Figure 4 Pathological changes of lung tissues in middle dosage group (HE, ×200)

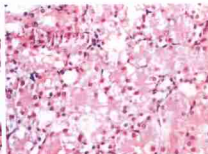


图5 中剂量LPS组大鼠肾组织病理变化  
(HE, ×200)  
Figure 5 Pathological changes of renal tissues in middle dosage group (HE, ×200)

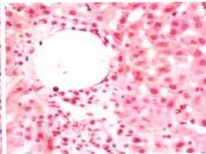


图6 中剂量LPS组大鼠肝组织病理变化  
(HE, ×200)  
Figure 6 Pathological changes of liver tissues in middle dosage group (HE, ×200)

## 肝功能衰竭肝性脑病大鼠5-羟色胺和去甲肾上腺素的变化

(正文见50页)

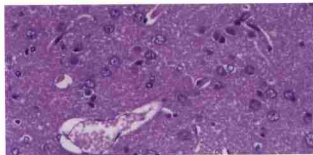


图1 ALF组大鼠脑组织病理学改变 (HE, ×200)  
Figure 1 Pathological changes of cerebral tissues in rats of ALF group (HE, ×200)

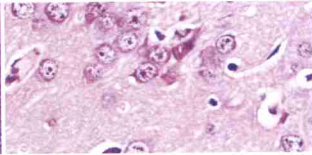


图2 CLF组大鼠脑组织病理学改变 (HE, ×400)  
Figure 2 Pathological changes of cerebral tissues in rats of CLF group (HE, ×400)

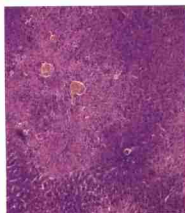


图3 ALF组大鼠肝组织病理学改变  
(HE, ×200)  
Figure 3 Pathological changes of liver tissues in rats of ALF group (HE, ×200)

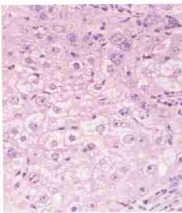


图4 CLF组大鼠肝组织病理学改变  
(HE, ×400)  
Figure 4 Pathological changes of liver tissues in rats of CLF group (HE, ×400)



图5 CLF组大鼠典型肝脏大体改变  
Figure 5 General changes of liver in rats of CLF group