

一种创伤感染致多器官功能障碍综合征动物模型的建立

班雨 沈洪 黎檀实

【摘要】 目的 复制符合临床特征且简便易行的创伤感染双相打击致多器官功能障碍综合征(MODS)动物模型,为进一步探讨其发病机制和治疗方法奠定基础。方法 6月龄 Wistar 雄性大鼠,体重(203.5±11.4)g。随机分为单纯创伤组(T组)和创伤感染序贯致MODS组(M组)。钳夹大鼠肢体造成多发性闭合型骨折和广泛性软组织挫伤,M组12h后致背部30%总体表面积(TBSA)Ⅲ度烫伤,并创面涂布绿脓杆菌。分别于创伤前以及创伤后24、48、96和120h观察动物活动和创面情况,测定体重、体温、心率,并检测各时间点大鼠血浆及肝脏内毒素水平以及心、肝、肾、脑、小肠的功能变化,全身炎症反应发生率、MODS发生率及死亡率,同时对重要脏器进行组织病理学观察。结果 M组大鼠创伤48h后,丙氨酸转氨酶(ALT)、总胆红素(TBil)、血尿素氮(BUN)、血肌酐(Cr)、天冬氨酸转氨酶(AST)、肌酸磷酸激酶(CPK)的最高值均显著高于伤前自身对照值(P 均 <0.05),且与T组比较差异有统计学意义(P 均 <0.05);48h后病理变化明显,大鼠处于若干脏器功能衰竭早期伴若干脏器功能受损期;内毒素水平在伤后96h增至峰值,达到基础值的8.36倍;伤后96h内毒素水平与脏器功能的变化具有明显的相关性($r=0.9272$),MODS发生率为86%,死亡率30%;伤后120h,MODS发生率为100%,死亡率50%。结论 本模型较好地模拟了临床创伤继发感染后发展为MODS的过程,感染过程符合临床经过,内毒素释放稳定,机体反应充分,是用于创伤导致MODS发病机制和治疗方法研究较好的动物模型。

【关键词】 创伤; 多器官功能障碍综合征; 动物模型; 大鼠

An experimental study of a rat model with MODS as a result of trauma induced infection BAN Yu, SHEN Hong, LI Tan-shi. Department of Emergency, General Hospital of The PLA, Beijing 100853, China
Corresponding author: SHEN Hong (Email: shenhong@em120.com)

【Abstract】 Objective To reproduce an animal model of multiple organ dysfunction syndrome(MODS) which was caused by two "hits" (injury and infection), to explore the potential aetiology and strategies of treatment. **Methods** The rats' extremities were crushed, resulting in severe injury with multiple closed fractures and extensive contusion of soft tissues. After 12 hours, a thirty percent total body surface area Ⅲ (TBSA Ⅲ) burns contaminated by *Pseudomonas aeruginosa* was inflicted upon the injury rats in MODS group. Rats' activities and wound appearance were observed, body weight, temperature, heart rate were recorded, and the blood lipopolysaccharide (LPS) level, the functional changes in all major organs, the occurrence rate of inflammatory reactions, the mortality of MODS and morbidity, and the pathological changes of the major organs were monitored at 24, 48, 96, 120 hours. **Results** To compare with pre-injury states and control group there were marked increases in alanine aminotransferase (ALT), total bilirubin (TBil), blood urea nitrogen (BUN), creatinine (Cr), aspartate aminotransferase (AST), creatine phosphokinase (CPK) contents 48 hours after the injuries (all $P<0.05$). When compared with the control group, there was significant difference ($P<0.05$). After 48 hours, there were obvious changes in pathology, the rats were in the early stage of MODS along with signs of damage to several organs. There was a typical relationship between LPS and organ functional changes. The LPS level peaked within 96 hours after the injury, the level was 8.36 folds of basic level. After 96 hours, there was correlation between LPS and the change of organ function ($r=0.9272$). The incidence of MODS was 86%, and the mortality rate reached 30% in 96 hours after injury. At 120 hours after the injury, MODS was found in all the rats and the mortality rate reached 50%. **Conclusion** This model seems to mimick the development of MODS which occurs after serious injuries followed by infection. The process of infection is coincidental with clinical picture, and LPS was released steadily with full body reaction. This animal model provides us an excellent opportunity to explore the pathogenesis and treatment of MODS after trauma.

【Key words】 trauma; multiple organ dysfunction syndrome; animal model; rat

基金项目:国家(863)计划课题(2004AA2Z3A60)

作者单位:100853 北京,解放军总医院急诊科

通讯作者:沈洪,Email:shenhong@em120.com

作者简介:班雨(1970-),男(汉族),河北省人,医学博士,主治医师。

多器官功能障碍综合征(MODS)动物模型是研究MODS发病机制和临床防治的基础。我们在已有研究基础上,试图建立能较全面反映其病理机制和临床特征的标准化动物模型。

1 材料与方 法

1.1 动物分组及模型制备:6 月龄雄性 Wistar 大鼠 100 只,体重(203.5±11.4)g;用掷硬币法随机分为单纯创伤(T)组和创伤感染致 MODS(M)组,两组又分为创伤前及创伤后 24、48、96 和 120 h 5 个亚组,每个亚组 10 只动物。创伤感染序贯致大鼠 MODS 模型建立过程分为首次打击(多发创伤)、二次打击(烧伤+烧伤创面感染)两个阶段。

1.1.1 创伤模型制备:氯胺酮 20 mg/kg 腹腔注射麻醉。参照文献[1-2]方法,用夹钳夹大鼠肢体,造成双侧股骨多发性闭合型骨折和广泛软组织挫伤,伤后 1 h 腹腔注射生理盐水 50 ml/kg 抗休克。

1.1.2 烧伤并创面感染二次打击:致伤后 12 h 再次麻醉动物,将 M 组大鼠背部备皮部位浸入 99 ℃ 水中 12 s,造成 30%总体表面积(TBSA)Ⅲ度烫伤,伤后 30 min 向创面涂布绿脓杆菌 1 ml^[3](预先取烧伤病房培养出的绿脓杆菌菌株,制成实验菌液,含菌量为 1×10¹² cfu/L),伤后 1 h 腹腔注射生理盐水 50 ml/kg 抗休克。T 组麻醉后自然苏醒。

1.2 血清及组织指标检测

1.2.1 标本采集:观察各时间点大鼠活动及创面,测定体重、体温及心率。用颈椎脱臼法处死大鼠,开腹从下腔静脉采血取肝脏置液氮中冻存,用于肝组织内毒素检测;同时留取心、肝、肾、胃、小肠等器官,用体积分数为 10%的中性甲醛固定。

1.2.2 血浆及肝组织内毒素测定:采用基质显色法鲎试剂(LAL)测定血浆内毒素含量。用冰 1 mol/L HClO₄制备肝组织匀浆,离心取上清液,用 6 mol/L KOH 调 pH 值为 7,再离心,上清液加去离子水。用分光光度计在 545 nm 波长处测定血浆或肝组织匀浆的吸光度(A)值,根据 A 值(减去空白本底)对应相应稀释浓度求线性回归方程,用方程计算样本相

应含量,内毒素单位以 EU 表示。

1.2.3 器官功能指标测定:采用全自动生化分析仪检测乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸磷酸激酶(CPK)、丙氨酸转氨酶(ALT)、总胆红素(TBil)、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)。

1.2.4 组织病理学观察:组织标本经甲醛固定,常规石蜡切片,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察。

1.3 统计学分析:计量数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用 SPSS 10.0 统计软件包进行单因素方差分析(One-way ANOVA)、配对 t 检验;计数资料以百分率表示, χ^2 检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠症状、体征、心率、体温、白细胞计数及体重的变化(表 1):两组大鼠创伤后均出现心率、体温和白细胞计数增高及体重减轻的现象。M 组反应明显,在伤后 48 h 后心率和白细胞计数及 96 h 后体温和体重比较差异均有统计学意义(P 均 <0.05)。

2.2 大鼠血浆及肝组织内毒素含量的变化(表 2):创伤后两组血浆和肝组织内毒素浓度均明显增高,48 h 后两组比较差异有统计学意义(P 均 <0.05)。

表 2 两组动物伤前及伤后不同时间点血浆及肝内毒素水平变化($\bar{x}\pm s$)

时间	组别	动物数	血浆内毒素(kEU/L)	肝内毒素(EU/g)
伤前	T 组	10	0.21±0.02	1.10±0.17
	M 组	10	0.19±0.03	1.11±0.28
伤后 24 h	T 组	10	0.21±0.07	1.77±1.07
	M 组	10	1.43±0.17 ^a	1.98±0.58
伤后 48 h	T 组	10	0.24±0.05	1.90±0.95
	M 组	10	2.41±0.58 ^a	3.74±0.95 ^a
伤后 96 h	T 组	9	0.25±0.03	1.97±1.24
	M 组	7	2.09±1.06 ^a	3.01±1.05 ^a
伤后 120 h	T 组	9	0.25±0.05	2.01±0.56
	M 组	5	2.55±1.31 ^a	3.12±0.88 ^a

注:与 T 组同期比较,^a $P<0.05$

表 1 两组动物伤前及伤后不同时间点心率、体温、白细胞计数和体重的变化及发生率及死亡率($\bar{x}\pm s$)

时间	组别	动物数	心率(次/min)	体温(℃)	白细胞计数($\times 10^9/L$)	体重(g)	MODS 发生率(%)	死亡率(%)
伤前	T 组	10	201±30	38.2±0.2	6.7±0.9	202±13	0	0
	M 组	10	197±22	38.3±0.2	6.8±0.5	205±15	0	0
伤后 24 h	T 组	10	217±34	38.9±0.3	15.9±5.7	210±12	0	0
	M 组	10	231±32	39.1±0.3	17.5±3.3	197±18	10	0
伤后 48 h	T 组	10	206±27	38.7±0.2	17.3±3.1	200±13	1	0
	M 组	10	274±33 ^a	39.5±0.6	20.0±3.3 ^a	194±17	50	0
伤后 96 h	T 组	9	236±42	38.6±0.3	20.6±5.8	197±26	11	10
	M 组	7	288±48 ^a	40.1±1.0 ^a	28.9±4.7 ^a	185±19 ^a	86	30
伤后 120 h	T 组	9	229±40	38.7±0.4	19.9±4.8	192±17	22	10
	M 组	5	263±35 ^a	39.5±0.8	22.4±5.2 ^a	180±21 ^a	100	50

注:与 T 组同期比较,^a $P<0.05$

表 3 两组动物伤前及伤后不同时间器官功能的变化($\bar{x} \pm s$)

时间	组别	动物数	LDH(U/L)	CPK(U/L)	ALT(U/L)	TBil(μ mol/L)	BUN(mmol/L)	Cr(μ mol/L)
伤前	T 组	10	379.37 ± 44.28	714.71 ± 106.41	53.16 ± 7.15	1.60 ± 0.12	5.73 ± 1.44	20.35 ± 7.53
	M 组	10	408.14 ± 29.87	813.22 ± 94.20	49.11 ± 7.20	1.73 ± 0.26	6.32 ± 1.32	20.50 ± 8.75
伤后 24 h	T 组	10	404.57 ± 91.56	2050.11 ± 179.98 ^b	80.20 ± 14.53 ^b	1.70 ± 0.16	5.88 ± 1.57	21.85 ± 4.50
	M 组	10	450.50 ± 129.57	4023.58 ± 980.58 ^{ab}	140.21 ± 25.35 ^{ab}	2.35 ± 0.21 ^b	9.52 ± 3.00 ^{ab}	30.20 ± 6.95 ^b
伤后 48 h	T 组	10	406.89 ± 120.33	3890.65 ± 790.41 ^b	91.06 ± 20.09 ^b	1.72 ± 0.13 ^b	6.11 ± 2.13 ^b	32.71 ± 6.34 ^b
	M 组	10	580.04 ± 156.23 ^{ab}	4890.22 ± 940.28 ^b	210.36 ± 50.64 ^{ab}	3.17 ± 0.42 ^{ab}	13.52 ± 2.30 ^{ab}	35.71 ± 8.48 ^b
伤后 96 h	T 组	9	535.09 ± 145.01 ^b	3108.62 ± 506.72 ^b	120.96 ± 19.23 ^b	2.09 ± 0.34 ^b	7.83 ± 3.60 ^b	30.45 ± 5.56 ^b
	M 组	7	649.58 ± 123.30 ^b	5634.88 ± 794.20 ^{ab}	263.01 ± 22.32 ^{ab}	3.99 ± 0.49 ^{ab}	28.33 ± 4.60 ^{ab}	49.56 ± 11.74 ^{ab}
伤后 120 h	T 组	9	518.15 ± 146.28 ^b	2030.55 ± 470.25 ^b	153.31 ± 46.36 ^b	2.06 ± 0.41 ^b	7.51 ± 1.87 ^b	33.25 ± 9.77 ^b
	M 组	5	700.15 ± 145.35 ^{ab}	3701.22 ± 904.55 ^{ab}	319.20 ± 56.77 ^{ab}	4.18 ± 0.80 ^{ab}	39.75 ± 6.87 ^{ab}	65.55 ± 19.32 ^{ab}

注:与 T 组同期比较,^a $P < 0.05$;与本组伤前比较,^b $P < 0.05$

2.3 大鼠器官功能指标的变化(表 3):两组大鼠创伤后 LDH、CPK、ALT、TBil、BUN、Cr 的最高值均显著高于伤前自身对照值(P 均 < 0.05),且与对照组比较差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。

2.4 各时间点动物器官功能障碍分期、MODS 发生率、动物死亡率(表 1,表 4);MODS 的诊断和评分标准参照王今达等^[4]和盛志勇等^[5]提出的 MODS 各器官功能障碍分期诊断标准和评分标准。

表 4 两组动物伤前及伤后不同时间点单一器官功能障碍发生率 % (只/只)

时间	组别	心脏	肝脏	肾脏	脑	GI
伤前	T 组	0(0/10)	0(0/10)	0(0/10)	0(0/10)	0(0/10)
	M 组	0(0/10)	0(0/10)	0(0/10)	0(0/10)	0(0/10)
伤后 24 h	T 组	0(0/10)	0(0/10)	0(0/10)	0(0/10)	0(0/10)
	M 组	20(2/10)	10(1/10)	20(2/10)	0(0/10)	0(0/10)
伤后 48 h	T 组	0(0/10)	10(1/10)	20(2/10)	0(0/10)	0(0/10)
	M 组	40(4/10)	50(5/10)	70(7/10)	10(1/10)	20(2/10)
伤后 96 h	T 组	11(1/9)	22(2/9)	22(2/9)	0(0/9)	0(0/9)
	M 组	71(5/7)	86(6/7)	86(6/7)	29(2/7)	43(3/7)
伤后 120 h	T 组	11(1/9)	22(2/9)	22(2/9)	0(0/9)	11(1/9)
	M 组	80(4/5)	100(5/5)	100(5/5)	60(3/5)	60(3/5)

2.5 主要器官功能障碍发生时器官的病理改变:各衰竭器官呈现以炎症为主的非特异性改变。

2.5.1 大体观察:心脏大体无明显变化;双肺饱满肿胀,多有点、片状出血,有的呈灰红色实变;肝脏饱满、包膜紧张,肝实质呈暗红,部分可见黄白色坏死灶,偶有点状出血点;肾脏体积增大、肿胀,呈片状瘀血性改变;胃黏膜下点状出血,胃黏膜糜烂、多处溃疡形成,部分溃疡深在。小肠肠管扩张,肠腔内有液体潴流,黏膜下点状散在出血。

2.5.2 镜下观察:心肌细胞水肿变性,间质充血、水肿,炎性细胞浸润;肝细胞浊肿,可见嗜酸性变化和脂肪变性,部分可见肝细胞萎缩或点、片状坏死,

周围见炎性细胞浸润。肝窦充血扩张,门管区炎性细胞浸润,库普弗细胞明显增生;肺泡水肿,肺泡腔内见大量红细胞、白细胞及细胞碎片,并见有肺萎缩、肺间质水肿、炎性细胞浸润,毛细血管内皮水肿、内有中性粒细胞聚集、红细胞淤积、形成微血栓。

3 讨论

复制 MODS 模型的目的在于模拟 MODS 的发病因素、病理过程和临床特征,研究 MODS 的发病机制及防治方法。建立理想的 MODS 动物模型,是进一步深入研究 MODS 的需要和前提。近年研究和临床实践发现,创伤后器官功能不全分为原发性 MODS(单相型)和继发型 MODS(双相迟发型)两种类型,其中以继发型 MODS 为多,占临床病例的 70%~80%,特征为创伤休克复苏后经过一个稳定期,又遭受二次打击,诱发以失控的全身炎症或脓毒症为特征的继发器官损伤,其发生发展过程中全身炎症反应综合征(SIRS)过程显著。

临床上创伤、烧伤、严重感染等作为第一次打击可使炎性细胞被激活而处于“激发状态”,患者经及时抢救复苏可度过一段平稳期。当创面、腹腔或肺部发生感染,肠黏膜屏障破坏而发生肠源性脓毒症时即构成第二次打击,此期打击可使处于“激发状态”的炎性细胞释放大量的炎症介质,诱发炎症介质的“级联反应”,导致全身炎症反应失控和 MODS。基于二次打击和双相迟发假说,研究者复制了二次打击模型,包括 Hu 等^[6]的山羊模型和陈德晖等^[7]的大鼠模型等。二次打击模型的优点充分体现了临床 MODS 的发生发展过程和病理生理特征,炎症反应的扩大也能够进行人为控制,模型复制的成功率较高,器官功能损害多数能达到衰竭的诊断标准。

本实验参照文献[1-2]方法作一定改进,建立严重创伤动物模型,并且以烧伤后创面感染模拟二次

打击,实验动物采用同系同性别 Wistar 大鼠,与小动物(如羊、猪)在体实验模型相比,同种系大鼠个体差异小,致伤条件易行,经济简便;采用自制的可控性夹钳为致伤工具,确保各动物的致伤程度一致,以减少系统误差。而文献采用大鼠 6 处骨折加失血性休克的方法复制多发性创伤动物模型,考虑到大鼠本身血容量少,不易控制放血量,且这种模型制备手术过程十分复杂,根据简明创伤分度(AIS)评分四肢多发性长骨闭合型骨折为严重创伤,所以本实验结合文献方法作改进,以夹钳致大鼠双侧骨骨折和软组织挫伤,不进行放血和液体复苏,造成大鼠的严重创伤作为对机体的第一次打击,这样刺激因素较单一,基本排除了像临床上液体复苏、药物治疗等干扰,同时也体现了以动物作为实验对象的优点,更有利于本研究对实验条件的控制。

近年来动物实验和临床研究已经表明,细菌内毒素在休克发展中起着重要作用,研究者对其作用机制提出的二次打击也就是“内毒素增敏”学说,来解释其造成 MODS 的原因。本研究从创伤后 MODS 临床常见诱因出发,以多发创伤后创面感染作为序贯性损伤的二次打击,采用了统一面积、统一深度、统一涂菌量,复制烧伤创面脓毒症的自然临床过程,涂菌后 12 h 血浆内毒素浓度即出现升高,最高时(96 h)达到基础值的 8.36 倍;在经历了创伤后 12 h 机体的应激反应期后,其创面感染逐渐加重,体内免疫系统应答充分,使 Wistar 大鼠能对创伤和感染因素作出充分反应,而其器官功能也从维持自身平衡的代偿阶段发展到失代偿阶段。文献报告直接静脉滴注或腹腔注射内毒素模拟 MODS 所需剂量应 > 5 mg/kg,最高甚至达到 20 mg/kg^[8]。而本实验中内毒素刺激过程连续,符合生理和自然病程,血浆内毒素水平较低,但病理表现明显。

在 MODS 动物模型的复制中,准确判断 SIRS 和 MODS 的发生与否至关重要。由于目前国内外不存在公认的动物 SIRS 和 MODS 诊断标准,我们在诊断大鼠 SIRS 和 MODS 时主要参照文献[4-5]的标准。一个符合临床实际、理想的 MODS 实验模型应具备:①致伤因素与临床 MODS 常见诱因基本一致;②发病应在创伤发生 24 h 后,过程应具有临床 MODS 的双相迟发特征;③有 2 个以上器官或系统的功能衰竭;④能反映 MODS 的失控炎症、高代谢消耗态和器官功能衰竭的临床表现;⑤有足够的发病率和死亡率;⑥可重复性好,能够全面系统的分析

研究 MODS 的全过程^[9]。对照以上标准,本实验建立的模型具有以下特点:①多因素复合致伤,体现了骨折创伤、烧伤、失液、感染、内毒素血症等各种诱发 MODS 的因素;②用创伤和感染双相打击,较好地模拟了临床双相迟发 MODS 的发病过程;③实验过程中,本模型表现出较好的 MODS 临床特征,如失控的炎症反应,机体明显消耗态所反映的高代谢、器官功能衰竭;④器官功能不全发生率高,有一定动物死亡率;⑤重复性好,施以相同打击程度,可诱发出大致相同的功能和病理变化;⑥动物简单,便于进行充分研究,从现有条件出发,检测大鼠各项指标的试剂和仪器最齐全。总之,该研究建立了大鼠创伤感染双相致 MODS 动物模型,对开展创伤致 MODS 时机体相关改变实验研究提供了稳定的平台。

参考文献

- [1] 庞荣清,陈忠明,徐永清,等.一种多器官功能障碍综合征模型的建立[J].中华实验外科杂志,2001,18(6):506-507.
- [2] 吕琦,金大地,金丽娟.多发性创伤后巨噬细胞吞噬凋亡白细胞的功能变化[J].中华创伤杂志,1999,15(1):29-31.
- [3] 郭振荣,高维谊,贺立新,等.几种抗绿脓杆菌药物疗效筛选的实验研究[J].中华整形烧伤外科杂志,1995,11(6):421-424.
- [4] 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.
- [5] 盛志勇,胡森.多器官功能障碍综合征[M].北京:科学出版社,1999:186-187.
- [6] Hu S,Sheng Z,Zhou B,et al. Study on delay two-phase multiple organ dysfunction syndrome[J]. Chin Med J(Engl),1998,11(2):101-108.
- [7] 陈德晖,黎毅敏,陈福雄,等.两次打击大鼠所致多器官功能障碍综合征动物实验模型的建立及病理观察[J].热带医学杂志,2005,5(3):271-275,393.
- [8] Rotstein O D. Modeling the two hit hypothesis for evaluating strategies to prevent organ injury after shock/resuscitation [J]. J Trauma,2003,54(5 Suppl):S203-206.
- [9] 胡森,盛志勇,周宝桐. MODS 动物模型研究进展[J]. 中国危重病急救医学,1999;11(8):504-507.

(收稿日期:2007-12-02)

(本文编辑:李银平)

• 广告目次 •

① 廊坊爱尔:炭肾	(封二)
② 华旭:全自动全功能和持续徐缓式血液净化装置	(插页)
③ 锐普生物:TnI 试剂盒	(插页)
④ 广东天普药业:天普洛安	(插页)
⑤ 珠海丽珠:丽珠血液灌流器	(插页)
⑥ 天津红日药业:血必净注射液	(插页)
⑦ 瑞士雅培:i-STAT 血液分析仪	(封底)