

· 论著 ·

克雷伯杆菌肺炎老龄大鼠多器官损伤模型的建立

李建生 王守富 秦金利 张慧俭 李素云 余海滨 王峰 刘四化 李亚

【摘要】 目的 建立细菌性老龄大鼠多器官损伤模型。方法 将大鼠随机分为老龄对照组、老龄模型组和青年对照组、青年模型组。采用气管插管法注入肺炎克雷伯杆菌引起肺部炎症,根据脏器有关生化指标变化、病理学改变及动物死亡率等情况评价该模型。结果 青年模型组和老龄模型组制模 24 h 后大鼠死亡率分别为 33.3%(5/15)和 60.0%(15/25)。与同龄对照组比较,青年模型组和老龄模型组外周血白细胞计数和中性粒细胞比例明显增高(P 均 <0.01);肺、心、肝功能障碍发生率为 60%~100%;肺动脉血氧分压(PaO_2)明显下降,动脉血二氧化碳分压(PaCO_2)显著上升($P<0.05$ 或 $P<0.01$);血清肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、乳酸脱氢酶(LDH)和丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)明显增高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);脏器组织学发生了明显的病理学改变。与青年模型组比较,老龄模型组肺 PaO_2 明显下降、 PaCO_2 显著上升;血清 CK、CK-MB、LDH 和 ALT、AST 明显增高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);肺、心、小肠病理损伤评分显著增高(P 均 <0.05),肝、肾亦有增高趋势。结论 成功地制备了细菌性老龄大鼠多器官损伤模型,符合老年“肺启动”机制多器官功能障碍综合征(MODS)特征,该模型制备简便,成功率高。脏器损伤重、死亡率高为老龄大鼠多器官损伤的特点。

【关键词】 肺炎; 老龄大鼠; 多器官损伤; 动物模型

A model of multiple organ injury induced by *Klebsiella pneumoniae pneumonia* in aged rats LI Jian-sheng*, WANG Shou-fu, QIN Jin-li, ZHANG Hui-jian, LI Su-yun, YU Hai-bin, WANG Feng, LIU Si-hua, LI Ya. * Geriatrics Department of Henan College of TCM, Zhengzhou 450008, Henan, China

【Abstract】 Objective To reproduce a model of bacterial multiple organ injury (MOI) in aged rats. Methods Male Sprague-Dawley (SD) rats were used. The young rats were divided into young control group (YCG, $n=10$) and young model group (YMG, $n=15$), and the elderly, aged control group (ACG, $n=10$) and aged model group (AMG, $n=25$). The model of rats with *Klebsiella pneumoniae pneumonia* was produced by tracheal instillation of the bacteria, and injury to various organs was observed and evaluated with changes in biochemical parameters, pathological pictures and mortality. Results Between YMG and AMG, the mortality rates were 33.33% (5/15) and 60.00% (15/25), respectively, at 24 hours after instillation of the bacteria. Compared with YCG and ACG, the neutrophil percentage and white blood cell (WBC) counts in peripheral blood increased significantly in YMG and AMG groups (all $P<0.01$), the rates of dysfunction of the lungs, the heart and the liver, were 60%-100%. The respiratory dysfunction was evidenced by an increase in the arterial partial pressure of carbon dioxide (PaCO_2 , $P<0.01$), and a decrease in the arterial partial pressure of oxygen (PaO_2 , $P<0.05$ or $P<0.01$). Myocardial dysfunction was shown by a the sharp increase in creatine kinase (CK), creatine kinase isoenzyme MB (CK-MB) and lactate dehydrogenase (LDH), and that of the liver by changes in alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST, $P<0.05$ or $P<0.01$). The pathological changes under light and electronic microscopy were obvious, and the main feature was infiltration of the inflammatory cells. Compared with YMG, PaO_2 in AMG dropped significantly, PaCO_2 increased, CK, CK-MB, LDH, ALT and AST also increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). The scores of pathological injury in the lungs, the heart and the small intestine in the AMG were obviously higher than that in YMG group (all $P<0.05$), and the same was trend in the liver and the kidney. Conclusion The model of bacterial MOI in aged rats is reproduced successfully, and it mimics the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome (MODS) which initiates from infection in the lungs. The model is simple and convenient to replicate with a high success rate. The MOI in the aged rats is characterized by the severity of the organ injury and a high mortality rate.

【Key words】 pneumonia; aged rat; multiple organ injury; animal model

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.04.010

基金项目:河南省高校新世纪优秀人才计划(2006HANCET-05)

作者单位:450008 郑州,河南中医学院老年医学研究所(李建生、秦金利、张慧俭、李素云、余海滨、刘四化、李亚);河南省中医药研究院(王守富);河南省中医院(王峰)

Email:li_js8@163.com

老年多器官功能障碍综合征(MODSE)是在老年人器官老化和患有多种慢性疾病基础上诱发的多器官功能障碍综合征(MODS),多器官损伤仍是 MODS 的核心病理过程,感染是 MODS 诱发和加重的重要因素。本研究中通过气管插管注入克雷伯

杆菌引起肺部炎症,由肺而引起多器官损伤,以建立老龄大鼠多器官损伤模型。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及材料:清洁级 SD 老龄雄性大鼠 35 只,鼠龄 21 个月,体重(550±70)g;SD 青年雄性大鼠 25 只,鼠龄 6 个月,体重(200±20)g;均由河南省实验动物中心提供(合格证号: XK20050001)。肺炎克雷伯杆菌由中国生物制品检验鉴定所提供(种系号:k46114),使用前用无菌生理盐水稀释至 1.2×10^{13} cfu/L。

1.2 动物分组与模型制备:按随机数字表法分组。35 只老龄大鼠分为老龄对照组 10 只、老龄模型组 25 只;25 只青年大鼠分为青年对照组 10 只、青年模型组 15 只。参照文献[1]气管插管法制作肺炎模型,由肺炎导致多器官损伤。肺炎克雷伯杆菌菌液用量 0.3 ml,感染的动物将菌液在肺内保持 10 min,最终造成感染性多器官损伤大鼠模型,模型成功标准参照文献[2]中动物 MODS 时器官功能障碍分期诊断及评分标准判定。取大鼠肺泡灌洗液做细菌培养,采用双纸片试验法鉴定为克雷伯杆菌。

1.3 指标测定及方法

1.3.1 血:尾静脉取血,用血液分析仪测定白细胞(WBC)计数和中性粒细胞比例。

1.3.2 生化指标:取腹主动脉血,采用酶动力学法检测乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB);采用速率法检测丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST);尿素氮(BUN)和肌酐(Cr);采用电极法测定动脉血氧分压(PaO₂)、动脉血二氧化碳分压(PaCO₂)。

1.3.3 组织含水量:取肺、心、小肠、肝、肾等器官组织,用生理盐水冲洗除去积血,滤纸沾干表面水分,分别称湿重,置烤箱中干燥 24 h 称干重,按公式计算组织含水量。

$$\text{含水量} = (\text{湿重} - \text{干重}) / \text{湿重} \times 100\%$$

1.3.4 组织病理学观察:取肺、心、肝、肾、小肠组织,用多聚甲醛水溶液固定,经脱水、透明、浸蜡、包埋,切成 4~6 μm 厚的切片,常规脱蜡、脱水,苏木素-伊红(HE)染色,脱水、透明、封片。光学显微镜下观察各脏器组织病理学改变并进行组织损伤评分。肺脏组织损伤评分按文献[3]标准,分别记为 0~3 分;心肌组织损伤评分按文献[4]标准,分别记为 0~3 分;肝脏损伤程度分级按文献[5]标准,用 +~+++ 表示,分别记为 0.1~0.3 分;肾脏损伤程度分级按文献[6-7]标准,分别记为 0~4 分;小肠组织损

伤程度分级按文献[8]方法,分别记为 0~4 分。每组随机选取 2 只大鼠的肺、心、肝、肾、小肠样本,用戊二醛前固定、锇酸后固定,梯度乙醇脱水,环氧树脂包埋,制备超薄切片,轴-铅双染,透射电镜下观察。

1.4 统计学方法:应用 SPSS 13.0 软件;计数资料用率表示,采用 χ^2 检验;计量资料先进行正态分布检验,符合正态分布者采用单因素方差分析,不符合正态分布者进行数据转化后比较,结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠死亡率:制模后 24 h 内各组均无大鼠死亡;24~48 h 青年对照组和老龄对照组大鼠无死亡。老龄模型组大鼠死亡率[60.0%(15/25)]较青年模型组[33.3%(5/15)]有所升高,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 各组大鼠脏器功能障碍分布情况(表 1):老龄模型组发生肺、心、肝功能障碍的动物数多于青年模型组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组出现脏器功能障碍的大鼠数 只

组别	动物数	肺脏	心脏	肝脏	肾脏	合计
青年对照组	10	0	0	0	0	0
青年模型组	10	7	6	6	0	19
老龄对照组	10	0	0	0	0	0
老龄模型组	10	10	7	8	0	25

2.3 各组大鼠外周血 WBC 计数和中性粒细胞比例的变化(表 2):青年模型组和老龄模型组 WBC 计数和中性粒细胞比例在 24 h、48 h 分别较同龄对照组明显升高(P 均 < 0.01);但两模型组间比较差异无统计学意义。

表 2 各组大鼠 WBC 计数及中性粒细胞比例比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	WBC 计数($\times 10^9/L$)		中性粒细胞比例	
		24 h	48 h	24 h	48 h
青年对照组	10	5.06±1.40	4.99±1.09	0.24±0.08	0.25±0.06
青年模型组	10	16.48±2.92 ^b	18.25±3.45 ^b	0.60±0.04 ^b	0.62±0.06 ^b
老龄对照组	10	6.38±1.23	6.30±1.26	0.24±0.06	0.24±0.05
老龄模型组	10	13.52±2.86 ^b	16.13±3.35 ^b	0.56±0.07 ^b	0.56±0.06 ^b

注:与同龄对照组比较,^b $P < 0.01$

2.4 各组大鼠脏器生化指标变化

2.4.1 血清 CK、CK-MB、LDH、BUN、Cr、ALT、AST 水平(表 3):青年对照组和老龄对照组 CK、CK-MB、LDH、ALT、AST 水平比较差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。青年模型组和老龄模型组血

清 CK、CK-MB、LDH、ALT、AST 含量均较同龄对照组明显升高,且老龄模型组均显著高于青年模型组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。4 组间血 BUN、Cr 比较则差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。

2.4.2 血 PaO₂、PaCO₂(表 3):青年模型组和老龄模型组较同龄对照组 PaO₂ 均明显降低,PaCO₂ 均明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);老龄模型组 PaO₂ 则较青年模型组下降显著,PaCO₂ 较青年模型组增高(P 均 < 0.05)。

表 3 各组大鼠血气分析指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	PaO ₂ (mm Hg)	PaCO ₂ (mm Hg)
青年对照组	10	90.63 ± 7.57	39.75 ± 3.59
青年模型组	10	66.43 ± 9.46 ^b	50.74 ± 5.44 ^a
老龄对照组	10	83.67 ± 5.45	42.16 ± 4.16
老龄模型组	10	51.46 ± 7.08 ^{bc}	61.20 ± 9.21 ^{bc}

注:与同龄对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与青年模型组比较,^c $P < 0.05$;1 mm Hg = 0.133 kPa

2.5 各组大鼠脏器损伤病理变化

2.5.1 组织含水量(表 5):青年模型组肺脏组织含水量较青年对照组明显增高($P < 0.05$),心、肝、肾、小肠有增高趋势,但差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。老龄模型组肺、心、肝、肾、小肠组织含水量均较老龄对照组显著增高,且高于青年模型组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.5.2 脏器损伤程度评分(表 5):青年模型组和老龄模型组肺、心、肝、肾、小肠组织损伤程度评分均显著高于同龄对照组(P 均 < 0.01),且老龄模型组肺、心、小肠组织损伤程度评分均明显高于青年模型组(P 均 < 0.05)。

表 3 各组大鼠血清 CK、CK-MB、LDH、BUN、Cr、ALT、AST 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	CK(U/L)	CK-MB(U/L)	LDH(U/L)	BUN(mmol/L)	Cr(μmol/L)	ALT(U/L)	AST(U/L)
青年对照组	10	92.37 ± 38.78	173.70 ± 42.73	69.34 ± 12.57	5.91 ± 0.60	62.55 ± 11.56	29.50 ± 9.38	133.83 ± 49.17
青年模型组	10	1191.90 ± 90.34 ^b	1168.40 ± 112.91 ^b	1064.90 ± 140.30 ^b	6.66 ± 1.62	61.66 ± 9.31	104.71 ± 14.43 ^b	176.75 ± 38.82 ^a
老龄对照组	10	150.38 ± 23.47	180.83 ± 37.28	53.38 ± 9.69	6.88 ± 0.68	63.00 ± 7.45	32.75 ± 12.62	162.44 ± 45.40
老龄模型组	10	1956.50 ± 361.55 ^{bc}	2185.50 ± 315.91 ^{bd}	1716.78 ± 368.99 ^{bc}	8.39 ± 1.27	79.66 ± 18.62	199.80 ± 17.22 ^{bc}	422.50 ± 142.12 ^{bd}

注:与同龄对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与青年模型组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$

表 5 各组大鼠各脏器组织含水量和脏器损伤程度评分比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	组织含水量(%)					脏器损伤程度评分(分)				
		肺	心	肝	肾	小肠	肺	心	肝	肾	小肠
青年对照组	10	77.7 ± 1.5	79.1 ± 1.0	68.9 ± 0.7	75.3 ± 1.0	77.4 ± 1.5	0	0	0	0	0
青年模型组	10	80.4 ± 1.6 ^a	80.2 ± 1.5	70.2 ± 1.9	76.9 ± 2.4	79.6 ± 3.6	7.1 ± 1.5 ^b	4.4 ± 1.5 ^b	0.4 ± 0.2 ^b	1.9 ± 0.7 ^b	1.5 ± 0.5 ^b
老龄对照组	10	76.0 ± 1.3	76.2 ± 2.1	69.4 ± 1.4	74.9 ± 2.7	74.4 ± 1.9	1.0 ± 0.5	0.7 ± 0.5	0.1 ± 0.0	0.5 ± 0.5	0.5 ± 0.3
老龄模型组	10	85.6 ± 1.9 ^{bc}	86.4 ± 1.3 ^{bc}	86.9 ± 2.3 ^{bd}	86.7 ± 2.6 ^{bc}	85.1 ± 2.5 ^{bc}	9.0 ± 0.0 ^{bc}	7.2 ± 1.6 ^{bc}	0.6 ± 0.1 ^b	3.0 ± 0.7 ^b	2.5 ± 0.5 ^{bc}

注:与同龄对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与青年模型组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$

3 讨论

目前有关多器官损伤与 MODS 动物模型主要有:①烫伤后金黄色葡萄球菌感染致严重脓毒症大鼠模型^[9],该模型适合烧(创)伤所致 MODS 研究。②两次打击大鼠所致 MODS 动物模型^[10],该模型适合创伤所致 MODS 研究。③肺炎克雷伯杆菌致大鼠重症肺炎模型^[11],制模后均出现血气分析和血流动力学等改变,符合重症肺炎标准,但是否引起多器官损伤,未见报道。④肌肉感染灶和腹膜后感染灶所致 MODS 家兔模型,缺点是模型制作和动物护理复杂。⑤山羊双相迟发 MODS 模型,动物表现为高代谢、高排低阻和全身炎症等脓毒症样反应。⑥酵母多糖、去甲斑蝥素和肿瘤坏死因子(TNF)致 MODS 模型,这 3 种物质所致 MODS 模型的可取之处在于致病因素简单明确,便于复制,特别适用于发病机制研究;不足之处在于病因学和病理生理过程与临床 MODS 有一定差距,器官功能一般达不到衰竭标准^[2]。⑦油酸/内毒素序贯致伤致老年鼠 MODS 模型^[12],该模型为内毒素致伤,而内毒素只是细菌致病的一种成分,且上述多数研究模型建立在青年动物身上,忽视了增龄因素对模型的影响。显然,以青年动物为研究对象的结果来推测 MODSE 发病机制和评价药物疗效,显然是不适宜的。

临床 MODSE 发病诱因中以感染最为多见,其中肺部感染最多。在内毒素和低灌注诱发的老年大鼠 MODS 过程中,肺脏的衰竭发生最早、频率最高;酵母多糖所致 MODS 大鼠也以肺脏出现最早,衰竭最重。因此,王士雯教授^[13-15]提出了 MODSE 肺启动机制学说,认为老年人因衰老引起的各脏器功能

减退是形成 MODS 的基础,而多数老年人并存多种慢性疾病又使得器官的代偿能力降低,功能衰退加重,当老年人感染致病菌时,肺部的炎症细胞被激活,引起炎症因子的“瀑布”样释放,启动全身炎症反应,导致多器官功能障碍或衰竭。

本研究表明,老龄模型组制模 24 h 后大鼠死亡率高达 60%;外周血 WBC 计数和中性粒细胞比例均明显增高;肺、心、肝功能障碍发生率为 60%~100%,脏器组织学和超微结构也发生了明显病理学改变,这些结果符合多器官功能障碍诊断标准,可见模型建立是成功的。由于诱发 MODS 的致病菌主要是革兰阴性菌或混合菌,在医院获得性肺炎致病菌中也是常见肺炎克雷伯杆菌作为致病菌由肺炎自然状态下导致多器官损伤,与临床发病过程一致,该模型制备简便,成功率高。

参考文献

- [1] 张均田. 现代药理实验方法学. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1999:1420-1421.
- [2] 胡森,盛志勇. 多器官功能障碍综合征. 北京:科学出版社,1999:186-204.
- [3] Schmidt J, Lewandrowski K, Warshaw AL, et al. Morphometric characteristics and homogeneity of a new model of acute pancreatitis in the rat. *Int J Pancreatol*, 1992, 12(1): 41-51.
- [4] 张明辉,阮英菲,王清峙,等. 大鼠心肌缺血再灌注损伤与心肌肽素的保护作用. *中国临床康复*, 2005, 9(23): 86-88.
- [5] 彭芳,刘晓波,方春生,等. 紫红獐牙菜对实验性肝损伤的保护作用. *中药新药与临床药理*, 2002, 13(6): 376-378.
- [6] Furuichi K, Wada T, Iwata Y, et al. Administration of FR167653, a new anti-inflammatory compound, prevents renal ischaemia/reperfusion injury in mice. *Nephrol Dial Transplant*, 2002, 17(3): 399-407.
- [7] 李鹏,丁小强,曹长春,等. 肾脏缺血预适应及白细胞间黏附分子 1 的作用. *中华肾脏病杂志*, 2004, 20(3): 199-201.
- [8] 严彩霞,张丙宏,付春花,等. 肠三叶因子对新生鼠坏死性小肠结肠炎模型 iNOS 及 TNF- α 、NO 的影响及意义. *中华围产医学杂志*, 2005, 8(4): 251-254.
- [9] 李红云,姚咏明,施志国,等. 烫伤后金黄色葡萄球菌感染致严重脓毒症大鼠模型的建立. *中国危重病急救医学*, 2001, 13(5): 275-279.
- [10] 陈德晖,黎毅敏,陈福雄,等. 两次打击大鼠所致的多器官功能障碍综合征动物实验模型的建立及病理观察. *热带医学杂志*, 2005, 5(3): 271-275.
- [11] 陈业民,黄文杰,李胜利,等. 肺炎克雷伯菌致大鼠重症肺炎模型的建立. *第一军医大学学报*, 2005, 25(12): 1498-1520.
- [12] 徐智,吴国明,钱桂生,等. 油酸-内毒素序贯致伤致老年大鼠 MODS 模型的建立. *第三军医大学学报*, 2004, 26(10): 852-855.
- [13] 王士雯,韩亚玲,钱小顺,等. 1 605 例老年多器官功能衰竭的临床分析. *中华老年多器官疾病杂志*, 2002, 1(1): 7-10.
- [14] 王士雯. 老年多器官功能不全启动机制若干问题初探. *中华老年心脑血管病杂志*, 2000, 2(3): 149-151.
- [15] 王士雯,钱小顺. 老年多器官功能衰竭肺启动的研究进展. *中华老年医学杂志*, 2005, 24(4): 313-316.

(收稿日期:2008-11-30 修回日期:2009-01-10)

(本文编辑:李银平)

• 科研新闻速递 •

抑制素降低细菌感染患者炎症因子水平的随机双盲临床研究

为测定抑制素是否能减少严重脓毒症的发生率和急性细菌感染患者炎症因子的水平,研究者对第三疾病控制中心的内科病房和重症监护病房收入的 82 例可疑或确诊细菌感染患者进行了随机双盲临床试验。41 例患者依次口服 HMG 辅酶 A 还原酶抑制剂 40 mg 和 20 mg,另 41 例患者口服安慰剂作为对照。通过分析 72 h 内患者血中炎症因子水平变化,得出两组患者炎症因子水平与入院时病情的严重程度呈正相关。82 例患者中有 4 例(每组 2 例)最终发展为严重脓毒症,其他临床检测指标无明显差异,也无死亡患者。HMG 辅酶 A 还原酶抑制剂 20 例患者的肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)水平显著下降,而口服安慰剂的对照组(20 例)患者无明显变化。研究者认为,抑制素可以降低急性细菌感染患者血中的炎症因子水平。

曲冰杰,编译自《Intensive Care Med》,2009-02-11(电子版);胡森,审校

血乳酸检测对患者入院诊断的价值

有研究报道,入住重症监护病房(ICU)后高乳酸血症患者血乳酸(Lac)水平的下降与存活率呈正相关。研究者把患者分成以下几组进行比较:脓毒性休克组与出血性疾病组,脓毒性休克组与普通患者组,低氧运输的血流动力学稳定组与不稳定组。通过检测患者入 ICU 时的血 Lac 水平,评价其对重症患者是否具有同样的作用。研究者在两个研究中心共观察 394 例患者,显示入 ICU 后(T0)血 Lac 水平的降低与入 ICU 0~12 h(T0~12)和 12~24 h(T12~24)时病死率呈正相关。进一步分析表明,只有在脓毒性休克组血 Lac 水平的降低与病死率呈正相关(T0~12 h;相对危险度(HR)=0.34, P=0.004;T12~24;HR=0.24, P=0.003),而在出血性疾病组和普通患者组,以及低氧运输的血流动力学稳定组和不稳定组(T0~12 h;HR=0.78, P=0.52;T12~24 h;HR=1.30, P=0.61)中,血 Lac 水平的下降与存活率无相关性。研究者认为,不论血流动力学状况如何,脓毒性休克的发生与患者入 ICU 24 h 内血 Lac 水平下降直接相关,而出血及其他与低氧运输相关联的患者则与其无关。可以猜测患者入院后由于不可逆损伤所致的改变与血 Lac 水平下降无任何关联。

曲冰杰,编译自《J Trauma》,2009,66(2):377-851;胡森,审校