

脓毒症实验动物模型 CLP 与 CASP 进展

缪鹏 郁正亚

脓毒症是一种由感染引起的临床综合征,通常导致全身一系列炎症反应,后期病死率较高,在世界范围内加重了卫生资源的负担。脓毒症有4个分期:全身炎症反应综合征(SIRS)、脓毒症、严重脓毒症以及脓毒症休克。脓毒症后期主要表现为全身器官衰竭(尤其在严重脓毒症期),最终导致难以逆转的循环衰竭(脓毒症休克)。肺、胃肠道、泌尿生殖道以及血液循环感染是绝大多数脓毒症患者的初始感染灶^[1]。脓毒症炎症状态存在两种截然不同的免疫反应现象:SIRS特点是产生过多促炎介质因子,使机体早期处于高炎症反应状态,而随后发生的代偿性抗炎反应综合征(CARS)则使机体逐渐转入低炎症反应状态。当SIRS发展到CARS过程的某一阶段时,机体内促炎介质因子和抗炎介质因子可达成某种平衡,称为混合型炎症反应综合征(MARS)^[2]。SIRS与CARS失衡或扩大化,均会导致宿主发生过度炎症反应,或因免疫功能抑制而受到间接伤害^[3]。

为更好的研究脓毒症发病机制与治疗措施,现已设计出多种与脓毒症发病类似的动物模型。其相似点是尽可能模仿临床患者体内所出现的病理变化^[3]。其优点在于可控性强,实验中变量因素少,可以选择性在不同条件下更好地观察免疫、循环、代谢等变化^[4]。

脓症患者最常见的感染源来自腹腔且易造成腹腔内感染,因此腹腔感染模型是目前最常采用的脓毒症动物模型^[5]。鼠类盲肠结扎穿孔(CLP)与腹腔持续置管引流(CASP)是临床研究脓毒症常用的两种模型,均模仿腹腔脓毒症感染的临床过程,引起多菌群感染,最终导致SIRS^[6]。

一、脓毒症动物模型的特点

Hubbard等^[4]指出理想的脓毒症动物模型应具备以下标准:脓毒症动物存在毒血症、细菌血培养呈阳性;动物模型表现出特征性代谢及生理学紊乱,脓毒症感染超过一定时间使动物机体内产生相应反应;同时该动物模型成本小,重复性好,见表1。

国内学者提出脓毒症动物模型应包括有脓毒症典型的高排低阻血流动力学表现和高代谢状态;伴发多个器官功能障碍;有较高的自然病死率;出现器官功能障碍及动物死亡距脓毒症模型制备应有一定的时间间隔^[5]。

近年来随着科学技术的发展,不同种属的动物被应用到研究中。小型哺乳动

物如大鼠、小鼠或豚鼠多用于有关生存率的研究;大型哺乳动物,如猪、羊、狗和灵长类则适于观察发病过程和症状表现。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,已广泛用于研究脓毒症和感染的病理、生理变化,而特定基因敲除和转基因品系的动物则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^[7]。动物模型的年龄、性别、品系与生长环境也是在选择模型时值得考虑的因素。Turnbull 等^[8]通过对同一品系不同年龄小鼠 CLP 模型比较发现,年老小鼠较年轻小鼠对 CLP 模型更为敏感,其生存率明显降低,且血浆细胞因子水平显著提升。在创伤出血等打击后,雌性小鼠的免疫反应较雄性小鼠低。比较 C57BL6 小鼠与 BALB/c 小鼠,感染更易于诱导前者出现 Th1 反应^[9]。Kiank 等^[10,11]报道脓毒症动物模型处于不同温度及压力下会影响体内免疫水平及脓毒症发展过程,其预后也不一样。近期研究表明,一些动物模型可以模拟出人类脓毒症免疫炎症和凋亡的特征表现。虽然还未对这些动物模型与临床的相关性进行评价,但可靠地模拟出人类脓毒症免疫系统的变化过程,将是今后建立动物模型的标准之一^[12]。总之,对于不同的研究内容,选择合适的脓毒症模型至关重要。

表1 脓毒症动物模型评定标准

脓毒症动物模型	评定标准
早期脓毒症	高血容量状态(循环阻力降低,心输出量升高,血压维持正常);高代谢状态(糖异生增加,高胰岛素血症)
晚期脓毒症	低血容量状态(循环阻力降低,心输出量降低,导致低血压);低代谢状态(低血糖,低胰岛素血症)

注:共同存在于人类脓毒症与脓毒症动物模型但未经临床证实的特点为特殊细胞群的凋亡(树突状细胞、内皮细胞及上皮细胞)

二、CLP 模型

CLP 模型是用于研究脓毒症及脓毒症休克最广泛的一种模型。其原理是腹腔内感染形成腹膜炎,多重病原体感染导致 SIRS、脓毒症、脓毒症休克甚至死亡。CLP 模型的标准步骤主要参考 Rittirsch 等^[13]的报道,其方法是在盲肠近端处结扎,并用无菌针在已结扎盲肠远端贯通穿刺盲肠壁造成穿孔,粪便流入腹腔引起混合性细菌感染及坏死组织处炎症反应,动物模型很快出现典型脓毒症及脓毒症休克的表现。CLP 模型模仿临床上阑尾炎穿孔或憩室炎穿孔的特点,并一直被认作是脓毒症研究动物模型的“金标准”。

CLP 模型不仅易于标准化,还可以引入多种不同变量,因此在实验室被广泛应用。CLP 模型有直接的感染病灶,也可以通过外科手术复原。CLP 模型被广泛应用的另一重要原因就是其多用途性,包括研究细胞功能紊乱、细胞因子分泌模式、性别/激素的影响、组织动力学和凋亡程序等^[4]。值得注意的是,CLP 模型可以模仿人类脓毒症中不同阶段血液动力学及代谢的变化,选择性观察不同细胞群的凋亡过程及宿主免疫反应,为建立临床模型提供参考^[3]。

在 CLP 脓毒症模型的研究过程中,有数据表明大鼠体内白细胞介素 6(IL-6)的表达与 CLP 导致的脓毒症和大鼠生存率有很大关联,这点与临床观察到的现

象相近。CLP 模型建立 6 h 后 IL-6 浓度即可发生变化,且与小鼠病死率相关^[4]。此外,巨噬细胞炎症蛋白-2(MIP2)、趋化因子 KC、C 蛋白及 C-反应蛋白可以作为 CLP 模型早期和晚期死亡的特异性指标^[3]。

三、CASP 模型

与 CLP 模型相似,CASP 模型也是一种用于脓毒症研究的实验室动物模型。CASP 模型的步骤多参考 Zantl 等^[14,15]的报道,其方法是通过将一固定管径的支架植入鼠的升结肠壁,使肠腔与腹腔相通,持续感染形成腹膜炎导致脓毒症、多器官衰竭,最终死亡。这种病理变化与临床上肠痿的病理变化过程相仿,腹腔内有肠内容物漏出但基本观察不到明显的缺血坏死灶。因此,CASP 模型非常适用于基于此种病理过程的脓毒症研究^[16]。

CASP 模型同样是一种鼠类腹腔内细菌感染的模型,重现了急性多重细菌感染的脓毒症性腹膜炎的发生、发展过程。菌血症最早可以在置管 12 h 后检出,LPS 浓度在 2 h 内升高。通过血浆中细胞因子水平的变化发现 SIRS 及 CARS 均在 CASP 模型形成感染性腹膜炎后迅速发展,置管 3 h 后即可检出血浆促炎因子包括肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素 1(IL-1)、白细胞介素 12(IL-12)、白细胞介素 18(IL-18)及血浆抗炎因子白细胞介素 10(IL-10)伴随性升高。CASP 模型中实验鼠肺提取物中存在大量 TNF,但少有 IL-10 表达,肝脏提取物则相反,IL-10 高表达而 TNF 低水平表达。Emmanuilidis 等^[17]证实 CASP 鼠类模型中肝脏库弗细胞是产生 IL-10 的主要来源,同时提出肝脏库弗细胞在调控感染免疫反应中起重要作用。在 CASP 模型中肺和肝脏的炎症基因表达主要是依靠 TLRs 的信号配体 MyD88。而缺乏 MyD88 基因片段的 CASP 模型的脾脏中几乎观察不到炎症的变化。去除 MyD88 基因的 CASP 模型中细菌防御机制未减弱,从而预防 SIRS 的产生,提高存活率。IL-12 p40 缺乏的大鼠较 CASP 模型病死率更高。这些研究成果均表明脓毒症时免疫机制的变化与 CASP 模型预后联系紧密。全身细胞因子的变化与 CASP 模型中不同管径的支架管有关,但变化幅度均比 CLP 模型中要高。与临床腹膜炎患者相比,CASP 模型血浆 TNF、IL-6、IL-10 水平均显著升高。以上证据表明 SIRS 和 CARS 可能在不同部位同时发生^[3]。

Lustig 等^[16]发现 CASP 模型直到死亡前 1 h 体内病理生理变化与血液动力学变化均相对稳定,预示 CASP 模型可以为研究脓毒症及其后期变化提供一个相对稳定的载体。

四、CLP 与 CASP 模型比较

CLP 与 CASP 模型模仿的是两种不同类型的疾病状态,提示 CASP 模型侧重于弥漫性腹膜炎的病理变化,而 CLP 模型则更偏向于局限性腹腔脓肿形成的病理变化^[6]。CLP 与 CASP 两种模型各有利弊,二者在影响因素、细胞炎症因子变化、细菌培养、预后因素及存活率等方面各有不同(表 2)。

1. 影响因素:CLP 模型的影响因素有很多,包括动物年龄、性别、种系等。据报道,即使在相同实验室条件、同种实验设备操作下制备 CLP 模型,对比不同组

数时病死率及死亡时间仍有很大差异。CLP 模型中被结扎盲肠的长度是影响动物预后的一个重大决定因素,随着盲肠结扎长度的增加,促炎因子也随之增加,其他影响因素包括穿刺数目、穿刺针尺寸等。此外,CLP 模型中肠壁是否完全结扎在一定程度上与动物模型的病死率有很大关联。在 CLP 模型上很难对流入腹腔的肠内容物估量,如果出现腹腔感染灶被网膜及周围包裹局限化则无法达到脓毒症动物模型标准,这也是决定疾病严重程度的一个重要因素^[3]。

表2 CLP 与 CASP 模型特点

	优点	缺点
CLP 模型	模仿临床阑尾炎穿孔或憩室炎穿孔的特点,脓毒症研究动物模型的“金标准”;在研究细胞功能紊乱、细胞因子分泌模式、性别/激素的影响、组织动力学和凋亡程序等应用较广泛;可控性高,标准化水平高。	多菌群感染 存在实验室内差异 存在年龄、性别、种族差异 自愈性
CASP 模型	持续感染形成腹膜炎导致脓毒症,模仿临床上肠痿的病理变化过程; 炎症细胞因子相对 CLP 模型检出早,峰值高; 变异小,重复性好; 至死亡 1 h 前模型体内生理变化与血液动力学;变化均相对稳定。	多菌群感染 操作差异 特征性血液动力变化少 差异未被广泛认识,使用较局限

相比而言,CASP 模型可以弥补 CLP 模型持续性腹腔内感染不足的缺点。CASP 模型是一种较新且影响因素没有被广泛认识的模型,因此使用相对局限,其特征性血液动力变化不是很显著,影响预后的因素与留置引流管的管径有很大关联。CASP 模型虽然不涉及 CLP 模型中的盲肠结扎问题,但操作难度更大,尤其是升结肠置管后要一直保持引流通畅,否则同样会形成局限性脓肿,影响实验结果。相对 CLP 模型而言,变异小、重复性好是 CASP 模型成功至关重要的因素之一,CASP 模型更适用于脓毒症疾病的研究^[3]。

2. 细胞因子及炎症介质的变化:无论是脓毒症模型的设计实验还是药物测试均应考虑到不同脓毒症动物模型所模仿疾病上的差异,临床中弥漫性腹膜炎和局限性腹腔脓肿有着明显不同的预后。因此,不同原因的脓毒症模型不仅在感染发生的病理基础上相异,细胞因子的变化也是千差万别。促炎因子 TNF 在 CLP 模型中起保护性作用,而缺失 TNF 受体 p55 的 CASP 模型与野生型大鼠生存率相近;CASP 模型中,IFN- γ 受体和 IL12 p40 缺失的大鼠更容易发生脓毒症,但在 CLP 模型中这两种大鼠与对照组相比均无明显异常,表明 IFN- γ 及 IL-12 在抵抗全身感染中起到重要作用,而 TNF 可能在腹腔脓肿的局限化过程中起到重要作用。在抗炎因子的研究中发现,脓毒症早期中和内源性 IL-10 可增加 CLP 与 CASP 动物模型的病死率,提示无论何种形式腹膜炎,早期机体抗炎反应都是非常必要的。同时,这些研究还提示 CASP 模型与 CLP 模型在研究脓毒症的过程中可以互相弥补,而两者的诱发因素(腹膜炎感染与脓肿形成)及导致脓毒症休克和器官衰竭的特异性病理变化将是今后研究脓毒症的热点^[3,6]。

3. 细菌培养:为研究 CASP 与 CLP 动物模型体内感染扩散程度,Zantl 等^[14]

观察到 CASP 术后 3 ~ 12 h 腹腔内菌落数较假手术组有明显提升,12 h 后在血液和器官内均有鼠类肠道菌群的侵袭。Maier 等^[6]在术后取不同组别、不同器官与不同时间段的组织进行细菌培养,发现 CASP 模型术后 6 h 腹腔灌洗液、肝脏、肺中即可检测出大量细菌,术后 12 h 及 18 h 这些器官中检测出的细菌数目也远大于 CLP 模型,提示 CASP 模型中全身系统性感染逐渐加重,而 CLP 模型中全身系统的感染程度小于 CASP 模型。

4. 预后因素及存活率:动物模型中脓毒症严重程度可以通过病死率判断,而对不同动物模型施加不同影响因素可以明显改变预后。CLP 模型中改变穿刺针尺寸与穿刺数目可以使大鼠存活短至几小时,多至 28 d。CLP 模型盲肠结扎长度占全长 75% 时,4 d 内病死率可达 100%;占全长 50% 时,7 d 内病死率可达 60%,而占全长 10% 时,病死率只有 10%^[13]。CASP 模型中引流管的尺寸从 14 号到 22 号不等,预后也不同,采用 14 号引流管的动物病死率可高达 100%,16 号病死率约为 70%,18 号病死率为 50%,22 号病死率仅为 38%。所有模型病死率高发期是术后 1 ~ 2 d,致死原因往往是多器官衰竭包括肺、肝脏以及肾脏^[14]。CASP 模型预后受炎症扩散造成的组织损伤程度及病原体清除程度的影响^[5]。

五、人类脓毒症与动物脓毒症模型的区别

动物模型的研究往往在于阐明某些疾病机制或不同诱因所产生的结果,过去几十年对于脓毒症的研究往往使用毒血症模型,但这不足以涵盖人类脓毒症的复杂性。随着近年来科学技术发展,更多模仿临床的脓毒症动物模型相继出现,而关于动物模型是否能代表临床状况的话题也一直处于争议中^[18]。

人类脓毒症与动物脓毒症模型间尚存在明显差异。如鼠类模型的年龄一般不超过 3 个月,多饲养于无特殊病原菌的环境下且常常近亲繁殖,年龄、体重相差不大,不伴有其他疾病的并发症,而临床上脓毒症常见于 50 岁以上的人群,常伴有其他系统疾病;动物模型常常可以有一个比较恒定的发病过程及时间,而临床患者因种族、年龄、体重、身体状况等差异,很难判断疾病的始发征兆。此外,在分子水平上人类和动物模型也有不同。如 C 反应蛋白(CRP)是一种经典的急性时相反应蛋白,其在人类可以激活补体系统,而在大鼠体内并不参与补体系统的激活^[15]。

因此,尽管动物脓毒症模型与人类脓毒症存在不同致病原、种族差异、机体内环境差异、年龄差异、同时存在的并发症以及不同剂量药物产生的特异性作用等诸多差异,但动物模型仍然可以揭示一些疾病的发生发展规律,并指导医者改进治疗方法^[19-21]。

六、小结

建立标准化的脓毒症动物模型是研究脓毒症发病机制与治疗方法不可或缺的一部分。盲肠结扎穿孔(CLP)模型与腹腔持续置管引流(CASP)模型是两种临床研究脓毒症常用的鼠类模型,均模仿腹腔脓毒症感染的临床过程,其中 CLP 模型模仿临床上阑尾炎和憩室炎穿孔,偏向于局限性腹腔脓肿形成的病理变化,并

一直作为脓毒症研究动物模型的“金标准”;CASP模型侧重于弥漫性腹膜炎的病理变化,脓毒症造成的全身系统性感染较重。因此,CASP模型对于研究弥漫性腹膜炎的治疗方法要优于CLP模型,而对于研究腹腔内感染例如腹腔脓肿等治疗方法,CLP模型更具有优势。针对不同脓毒症发病原因,选择何种模型作为相关研究的标准也是今后值得深入研究的课题。

参 考 文 献

- 1 Hodgin KE, Moss M. The epidemiology of sepsis. *Curr Pharm Des*,2008,19(14):1833-1839.
- 2 Osuchowski MF, Welch K, Siddiqui J, et al. Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. *J Immunol*,2006,177(3):1967-1974.
- 3 Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov*,2005,4(10):854-865.
- 4 Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG. Cecal ligation and puncture. *Shock*,2005,24(Suppl 1):52-57.
- 5 汤耀卿,李磊. 脓毒症动物模型制作方略及应用. *中华实验外科杂志*,2006,23(12):1433-1434.
- 6 Maier S, Traeger T, Entleutner M. Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. *Shock*,2004,21(6):505-511.
- 7 朱雪琦,刘清泉,姚咏明. 脓毒症动物模型制备方法的研究进展. *中国危重急救医学*,2006,18(2):114-116.
- 8 Turnbull IR, Wlzonek JJ, Osborne D, et al. Effects of age on mortality and antibiotic efficacy in cecal ligation and puncture. *Shock*,2003,19(4):310-313.
- 9 Mees ST, Dohm C, Broetzmann K, et al. Age- and gender-related differences of the immune function in a murine model of hemorrhagic shock: IL-10 restores immunodepression in aged females without reduction of mortality. *Langenbecks Arch Surg*,2007,392(5):629-638.
- 10 Kiank C, Entleutner M, Füll B, et al. Stress-induced immune conditioning affects the course of experimental peritonitis. *Shock*,2007,27(3):305-311.
- 11 Kiank C, Koerner P, Kessler W, et al. Seasonal variations in inflammatory responses to sepsis and stress in mice. *Crit Care Med*,2007,35(10):2352-2358.
- 12 高晓刚,陈德昌. 动物模型在脓毒症研究中的意义. *中国急救医学*,2006,26(10):685-686.
- 13 Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc*,2009,4(1):31-36.
- 14 Zantl N, Uebe A, Neumann B, et al. Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis. *Infect Immun*,1998,5(66):2300-2309.
- 15 Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J Leukoc Biol*,2007,81(1):137-143.
- 16 Lustig MK, Bac VH, Pavlovic D, et al. Colon ascendens stent peritonitis—a model of sepsis adopted to the rat: physiological, microcirculatory and laboratory changes. *Shock*,2007,28(1):59-64.
- 17 Emmanuilidis K, Weighardt H, Maier S, et al. Critical role of Kupffer cell-derived IL-10 for host defense in septic peritonitis. *J Immunol*,2001,167(7):3919-3927.
- 18 Dyson A, Singer M. Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? *Crit Care Med*,2009,37(Suppl 1):S30-S37.
- 19 Poli-de-Figueiredo LF, Garrido AG, Nakagawa N, et al. Experimental models of sepsis and their clinical relevance. *Shock*,2008,30(Suppl 1):53-59.
- 20 Marshall JC, Deitch E, Moldawer LL, et al. Preclinical models of shock and sepsis: what can they tell us? *Shock*,2005,24(Suppl 1):1-6.
- 21 Esmon CT. Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? *Crit Care Med*,2004,32(Suppl 5):S219-S222.

(收稿日期:2010-03-22)

(本文编辑:孙荣华)

缪鹏,郁正亚. 脓毒症实验动物模型 CLP 与 CASP 进展[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志:电子版*,2010,4(4):464-469.