

· 综述 ·

脓毒症实验动物模型及盲肠结扎穿孔模型的研究进展

陈胜广 吴先正

尽管医学不断向前发展,但脓毒症(sepsis)及其相关的多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)仍然是急危重症患者的主要死亡原因,日益成为临床医师及科研工作者的巨大挑战^[1-2]。尽管已做了大量研究,但人类脓毒症的病理生理机制仍未完全清楚;其发病率和病死率仍居高不下^[3]。为进一步研究脓毒症及其相关并发症的发生、发展和预后,脓毒症动物模型的选择应用是关键之一。随着对脓毒症本质不断深入认识的同时,如何建立、选择更贴近临床实际的脓毒症动物模型,并将研究结果应用于临床实际显得尤为重要。

一、脓毒症动物模型的分类及其特点

1. 给予外源性毒素:如脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS),酵母聚糖。外源性毒素模型按给药剂量又可分为小剂量、大剂量和连续小剂量;LPS动物模型操作简单,并能达到一定的同质性,相对容易复制;但其不能反映人类脓毒症的复杂性,因而并不是模拟人类脓毒症的理想模型。

优点:动物模型简单,可重复;诱导的是急性反应;高度可控并达到标准化。

缺点:LPS调节信号通路依赖Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4),不能反映人类脓毒症复杂的病理、生理反应。显著快速瞬间增高的细胞因子有别于人类脓毒症;存在内毒素抵抗;血流动力学反映不同于人类脓毒症;还存在毒素及其剂量、给药途径的差异。

2. 给予病原体:如细菌、病毒。细菌型模型:不同种类、不同剂量的细菌可以通过气管内、静脉、肌肉、腹腔等途径造模;其病死率主要依赖于细菌的种类、菌落形成单位(colony-forming units, CFU)数目、注射途径、液体复苏程度、抗菌药物的应用等。该模型可控性、重复性较好,但也存在其自身的缺陷:高剂量的细菌在宿主体内往往不会克隆和复制,反而因为补体系统存在而快速裂解。这就可能产生的是内毒素中毒模型而不是多种细菌感染的脓毒症模型。

优点:细菌的存在可以观察到宿主对病原体的反应。缺点:需要在实验前培养并定量细菌;单一细菌模型不能反映人类脓毒症多样性;人类脓毒症一般不

存在大量细菌负荷,而是呈间隙性和持续性并存。高剂量细菌引起的是内毒素中毒而不是脓毒症休克;细菌负荷量、给药途径存在差异。

3. 改变动物内源性保护屏障:腹腔感染模型:该模型模拟临床腹腔脏器穿孔情况,通过含大量细菌的自身粪便污染腹腔引起腹腔感染。内源性粪便污染模型包括:盲肠结扎穿孔(cecal ligation and puncture, CLP)(腹腔内脓肿形成)、盲肠结扎切口(cecal ligation and incision, CLI)、升结肠支架植入腹膜炎(colon ascendens stent peritonitis, CASP)(弥漫性腹膜炎)。这些模型也有其缺陷:脓毒症的过程和生存率的高度可变性导致其表现难以控制。脓毒症病变过程和生存率受多种因素影响,包括:操作者的技术、肠内容物的细菌组成、术者之间的技术差异等。这也导致许多试验结果存在差异甚至相反。

总之,不同的实验目的需要选择不同的实验模型。其中CLP模型是目前该研究领域最常用的动物模型,也是该模型的“金标准”^[4]。CLP涉及3种损伤因素:①剖腹手术本身引起的组织创伤;②盲肠结扎引起的坏死;③微生物菌丛进入腹腔引起的感染。

CLP模型优点:过程简单;有感染存在;多种微生物脓毒症模型;使用宿主所有肠道细菌;类似人类脓毒症过程的血流动力学和代谢阶段、存在高、低两个炎症反应阶段;同人类类似的长期的、较低状态的细胞因子水平升高。缺点:可形成脓肿;实验程序导致脓毒症严重程度存在差异。

二、脓毒症动物模型的选择

实验室和临床研究表明,尽管在有关脓毒症发病机制的认识上已取得较大进展,但仍然缺乏治疗脓毒症的特异性手段,而且多集中于抗炎药物开发,但突破较少^[5]。虽然新药在动物模型上取得较好的治疗效果,但临床应用却差强人意,甚至适得其反^[6]。迄今为止,严重脓毒症或脓毒症休克的病死率仍高达50%^[7]。原因可能与选择研究的脓毒症动物模型与人类脓毒症实际存在较大差异。Deitch^[8]研究指出,许多新药应用失败并带来不良反应可能主要因为在研究过程中使用了不恰当的模型;尤其是应用了那些不能真实重复人类脓毒症的动物模型。他指出不恰当的动物模型因素包括:内毒素中毒而不是感染,使用近交系动物(包括种系),性别单一,单一细菌感染而不是多细菌,辅助治疗缺乏或不足,预处理,涉及临床不相关的变量,使用不恰当的观察终点,不适当的替

代指标。尽管许多脓毒症或脓毒性休克动物模型不适合药物研究,但在一定程度上可以解释脓毒症病理生理机制。因此,不同的研究目的需要选择适当的动物模型。

具体来说,选择同系、同性别的健康动物是基础,严格控制实验条件。在开发新药时需要使用多种动物模型,以使不同的病理生理机制得以反映。由于种属的差异,选择不同物种的脓毒症动脉模型也是值得慎重的问题。而当动物实验结果同临床观察出现矛盾时,研究者不可抛开动物模型本身的局限,而纠结于实验数据。另外,还要考虑到动物模型在感染方式、剂量、细菌的毒力等方面与人类脓毒症的差异。

三、CLP模型的进展

1979年以来,CLP模型已有30余年的发展。人类阑尾炎穿孔或憩室炎穿孔,造成腹腔局部感染,进而发展成脓毒症的混合性细菌感染。CLP即通过盲肠结扎并穿刺,人为的持续污染腹腔来模拟上述疾病过程。CLP模型可以分辨出脓毒症所处的不同病理生理阶段,还可以模拟人类脓毒症的血流动力学和代谢过程。而且在免疫反应方面也与人类病程相似,这也成为该模型临床应用广泛的重要原因。由于实验操作简单,重复性好,与人类疾病发展过程相似^[9],在过去的10余年中,该模型已发展了多个版本。并可将其发展成不同程度的脓毒症。用以研究急性脓毒症、甚至慢性脓毒症的严重程度。

但CLP的最后结局同多种因素有关,盲肠结扎长度和穿刺针型号是病死率较高的最主要因素。也同血清促炎症因子升高相关。Rittirsch等^[10]研究明确了不同的盲肠结扎长度决定不同的病死率;75%、50%和10%的结扎长度分别对应100%、60%和10%的7 d病死率。国内学者也有相似的研究结果^[11]。Heuer等^[12]研究了不同型号穿孔针对CLP模型预后的影响;CLP后22 h,采用18、16和14号针头的病死率分别是30.5%、21%和20%,随着型号增大,病死率急剧升高(21号&100%)。其他影响病死率的因素包括:穿孔的数量、盲肠中粪便容量、粪便中细菌组成、年龄、性别以及种系等,以上均会影响到CLP模型中脓毒症的严

重程度。因此,研究者需根据自身实验选择不同的结扎长度、穿孔针型号等。

参考文献

- 1 Martin GS, Mannino DM, Eaton S, et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000[J]. *N Engl J Med*,2003,348(16):1546-1554.
- 2 Cheng BL, Xie GH, Yao SL, et al. Epidemiology of severe sepsis in critically ill surgical patients in ten university hospitals in China[J]. *Crit Care Med*,2007,35(11):2538-2546.
- 3 Shiramizo S, Marra AR, Durao MS, et al. Decreasing mortality in severe sepsis and septic shock patients by implementing a sepsis bundle in a hospital setting[J]. *Plos One*,2011,6(11):e26790.
- 4 Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis[J]. *J Leukoc Biol*,2007,81(1):137-143.
- 5 Osuchowski MF, Connett J, Welch K, et al. Stratification is the key: Inflammatory biomarkers accurately direct immunomodulatory therapy in experimental sepsis[J]. *Crit Care Med*,2009,37(5):1567-1573.
- 6 Poole D, Bertolini G, Garattini S. Errors in the approval process and post-marketing evaluation of drotrecogin alfa (activated) for the treatment of severe sepsis[J]. *Lancet Infect Dis*,2009,9(1):67-72.
- 7 Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care[J]. *Crit Care Med*,2001,29(7):1303-1310.
- 8 Deitch EA. Animal models of sepsis and shock: A review and lessons learned[J]. *Shock*,1998,9(1):1-11.
- 9 Zanotti-Cavazzoni SL, Goldfarb RD. Animal models of sepsis[J]. *Crit Care Med*,2009,25(4):703-719.
- 10 Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture[J]. *Nat Protoc*,2008,4(1):31-36.
- 11 燕晓雯,李幼勤,黎介寿,等.通过改变盲肠结扎长度制造不同感染程度的大鼠盲肠结扎穿孔模型[J].*中华实验外科杂志*,2007,24(11):1340.
- 12 Heuer JG, Sharma GR, Gerlitz B, et al. Evaluation of protein C and other biomarkers as predictors of mortality in a rat cecal ligation and puncture model of sepsis[J]. *Crit Care Med*,2004,32(7):1570-1578.

(收稿日期:2013-07-26)

(本文编辑:孙荣华)

陈胜广,吴先正.脓毒症实验动物模型及盲肠结扎穿孔模型的研究进展[J/CD].*中华实验和临床感染病杂志:电子版*,2014,8(2):282-283.