段爽,朱瑛,赵茹茹,等. 复合感染脓毒症大鼠模型的构建和评价［J］. 中国实验动物学报, 2022, 30(8): 1034-1041.
Duan S, Zhu Y, Zhao RR, et al. Construction and evaluation of rat models of multiple-infection sepsis［J］. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(8): 1034-1041.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.08.003

复合感染脓毒症大鼠模型的构建和评价

段爽[1],朱瑛[1],赵茹茹[1],侯媛璐[1],李明泓[1,3],林青[2,3],李奇峰[1,3*]

(1. 云南中医药大学基础医学院,昆明 650500;2. 云南中医药大学药理教研室,昆明 650500;
3. 云南省高校中医治法与中药药效关系研究科技创新团队,昆明 650500)

【摘要】 目的 着力于解决盲肠穿刺结扎(CLP)模型因水肿肠道封堵结扎穿刺部位随机影响模型动物感染进程的问题,探索通过复合感染支架整合盲肠结扎穿刺法和植入带菌物法,建立感染可持续的脓毒症动物模型。**方法** 将 54 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组(Sham 组,n = 18)、盲肠穿刺结扎组(CLP 组,n = 18)、复合感染脓毒症模型组(MIM 组,n = 18),其中每组 10 只用于考察各组动物一般生存状态、盲肠结扎部位封堵情况和生存率;每组另 8 只用于考察各组脓毒症损伤指标。采用 HE 染色观察大鼠心脏、肝、肺、肾组织病理形态改变;取腹主动脉血检测脂多糖(LPS)、白介素-6(IL-6)、心肌钙蛋白-Ⅰ(cTn-I)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBil)、乳酸(Lac)和肌酐(Cr)含量;取肝组织检测丙二醛(MDA)和腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)含量。**结果** 造模 96 h 后,Sham 组大鼠无死亡,CLP 组大鼠生存率 70%,MIM 组生存率 0%;MIM 组心脏、肝、肺、肾组织损伤程度较 CLP 模型组更为严重;MIM 组分别与 Sham 组和 CLP 组比,LPS、IL-6、cTn-I、ALT、AST、TBil、Cr、Lac、MDA 含量最高,ATP 含量最低,均具有显著性差异(P < 0.05);MIM 组 LPS、IL-6、TBil、MDA 等指标的变异系数较 CLP 组明显更小。**结论** MIM 组可使肠内容物不断渗漏引发持续感染,反应感染和炎症的关键指标(LPS、IL-6、MDA 等)变异性远低于 CLP 组,病程进展更为一致,其模型的结构效度更好;MIM 组较 CLP 组,术后感染表现更为剧烈、器官损伤程度更深、而死亡率更高且组内死亡时间更为均一,其模型的表面效度更好,因而更符合严重感染导致机体过度反应而产生脓毒症 MODS 的临床实际。

【关键词】 脓毒症;多器官功能障碍综合征;复合感染模型;盲肠结扎穿刺
【中图分类号】Q95-33 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1005-4847 (2022) 08-1034-08

Construction and evaluation of rat models of multiple-infection sepsis

DUAN Shuang[1], ZHU Ying[1], ZHAO Ruru[1], HOU Yuanlu[1], LI Minghong[1,3], LIN Qing[2,3], LI Qifeng[1,3*]

(1. Department of Basic Medicine, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China. 2. Department of Pharmacology, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500. 3. Yunnan Provincial University Traditional Chinese Medicine Treatment and Traditional Chinese Medicine Efficacy Relationship Research Scientific and Technological Innovation Team, Kunming 650500)
Corresponding author: LI Qifeng. E-mail: 375487824@qq.com

【Abstract】 Objective We focused on solving a problem in the infection course of cecum ligation and puncture (CLP) septic model animals, i.e., the random occlusion of ligation and puncture sites due to bowel edema. To establish a septic animal model with a sustainable infection, we combined cecal ligation puncture and bacterial carrier implantation

[**基金项目**]国家自然科学基金(81960815),云南省科学技术厅联合专项(202001A2070001-032),云南中医药大学南药可持续利用研究重点实验室(202105AG070012XS2245)。
Funded by the National Natural Science Foundation of China (81960815), Joint Special Project of Yunnan Provincial Department of Science and Technology(202001A2070001-032), Key Laboratory of Sustainable Utilization of Southern Medicine of Yunnan University of Chinese Medicine (202105AG070012XS2245).
[**作者简介**]段爽(1996—),女,在读硕士研究生,研究方向:中西医结合防治疾病作用机制研究。Email:944765534@qq.com
[**通信作者**]李奇峰(1977—),男,硕士,副教授,研究方向:中西医临床基础。Email:375487824@qq.com

with a compound infection stent. **Methods** Fifty-four male SD rats were randomly divided into three groups: Sham (n = 18), CLP (n = 18), and multiple infect model (MIM, n = 18) groups. In each group, 10 rats were investigated for their survival status, intra-abdominal infection, and survival rate. Another 8 rats were selected for studying related indicators of sepsis multiple organ dysfunction syndrome (MODS) injury. The detected indicators included LPS, IL-6, cTn-I, ALT, AST, TBil, Lac, and Cr abdominal aortic blood contents; MDA and ATP liver tissue contents, and HE staining of pathological changes in heart, liver, lung, and kidney tissue. **Results** 96 h after molding operation, there were no deaths in the Sham group, and survival rates in the CLP and MIM groups were 70% and 0%, respectively. The degrees of injury in the heart, liver, lungs, and kidneys in the MIM group were greater than those in the CLP model group. Compared with the Sham and CLP groups, the MIM group had the highest contents of LPS, IL-6, cTn-I, ALT, AST, TBil, Cr, Lac, and MDA and the lowest of ATP, all of which were significantly different ($P < 0.05$). The coefficients of variation for LPS, IL-6, TBil, and MDA in the MIM group were significantly decreased in relation to those of the CLP group. **Conclusions** The MIM group's intestinal contents leaked continuously to cause persistent infection, which result ed in much lower variability in key infection and inflammation indicators (LPS, IL-6, MDA, etc.) and a more consistent course of disease than in the CLP group. Thus, the structural validity of the MIM model was better. Compared with the CLP group, the MIM group had more severe postoperative infections, deeper organ damage, higher mortality, more consistent within-group death times, and thus had greater face validity. Therefore, the MIM model best fits with the clinical profile of septic-MODS, which is caused by an over-reaction to severe infection.

【**Keywords**】 sepsis; multiple-organ dysfunction syndrome; multiple-infection model; cecum ligation puncture

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

脓毒症是由于严重感染引起机体过度反应而出现危机生命的多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)[1-2]。这一定义凸显了感染是脓毒症的明确诱因,而 MODS 是脓毒症的重要病理特征,也是脓毒症不良结局的决定性因素。由于缺乏有效治疗药物,仅我国严重脓毒症患者病死率高达 50%,每年的医疗费约为 46 亿美元[3-5],由此造成沉重经济和社会负担。缺乏稳定、贴近临床的动物模型,使脓毒症病理生理学和相关药物研究受到较大限制[6-7]。历经数十年的脓毒症药物研发,均以失败告终。因此,建立稳定能够高度模拟人类脓毒症病理生理过程的脓毒症动物模型对脓毒症研究至关重要。目前盲肠结扎穿刺(cecum ligation and puncture, CLP)动物模型是脓毒症研究的经典模型,因具有血流动力学、代谢过程、炎症反应阶段等与人类脓毒症类似的临床表现。然而,良好的脓毒症动物模型除需模拟人类脓毒症的临床表现,还需能够模拟人类脓毒症的病程发展。但实践中发现,经典 CLP 模型脓毒症大鼠由感染造成肠道水肿并封堵盲肠穿刺结扎部位,此过程会受到诸多因素的影响并随机发生,导致部分模型动物的感染过程延缓或终止,进而造成相同造模条件下的模型动物差异性大的结果[8-11]。此外,考察药物对脓毒症的影响,如不能排除 CLP 模型肠道随机封堵穿刺结扎部位的问题,就很难确认药物的实际效用。据此,本研究以 CLP 模型为基础,着力解决 CLP 模型因水肿肠道封堵结扎穿刺部位随机影响模型动物感染进程的问题,探索通过复合感染支架整合盲肠结扎穿刺法和植入带菌物法,建立感染可持续的脓毒症动物模型,即复合感染脓毒症模型(multiple infect model, MIM)。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物

54 只 8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠,体重(230 ± 20) g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SCXK(湘)2019-0004】,于采光通风良好,温度 20 ~ 26℃,相对湿度 42% ~ 62%的室内适应性饲养 6 d 后进行实验,饲养于云南中医药大学实验动物部【SYXK(滇)K2017-0005】。随机分为假手术组(Sham 组)、盲肠穿刺结扎组(CLP 组)、复合感染模型组(MIM 组)每组各 18 只,以上各组再随机分为生存率组每组 10 只和实验组每组 8 只。研究流程均符合云南中医药大学实验动物伦理委员会要求(R-062021135)。

1.1.2　主要试剂与仪器

10%鼠粪混悬液(10 g 大鼠新鲜粪便 + 0.02 g 连二亚硫酸钠+90 mL 生理盐水,600 r/min 离心 10 min,取上清,-20℃冰箱冷冻保存备用)。

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)试剂盒(泉州睿信,20210720);白介素-6(interleukin6, IL-6)试剂盒(泉州睿信,20210809);乳酸(lactic acid, Lac)试剂盒(南京建成,20210707);丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)试剂盒(南京建成,20210524);天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)试剂盒(南京建成,20210518);心肌肌钙蛋白 I(cardiac troponinI, cTn-I)试剂盒(Elabscience,20210806);肌酐(creatinine, Cr)试剂盒(南京建成,20210708);总胆红素(total bilirubin, TBil)试剂盒(南京建成,20210730);丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(南京建成,20210702);腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)试剂盒(碧云天,012521210621);抗凝剂(康卫仕,20201012)。

冰冻切片机*/MEV(莱比信,中国);包埋仪 1100 mm × 500 mm × 380 mm/YD-6L(益迪医疗,中国);玻片扫描影像系统 TeksqraySQS-1000(eksqray,中国);多功能酶标仪 InfiniteM200PR0(TECAN,瑞士)。

1.1.3 主要器材和设备

复合感染支架(自制参见图 1),通过复合感染支架整合盲肠结扎穿刺法和植入带菌物法。盲肠穿刺部位固定于支架通孔一侧,辅助以通孔处呈均匀分布的突起,二者协同可阻碍水肿肠道封堵盲肠结扎穿刺部位;其次通过向固定在支架上的棉球滴加粪便提取液,干扰远端水肿肠道对盲肠结扎部位的封堵。最终达到建立稳定而可持续感染的脓毒症动物模型的目的。

1.2 方法

1.2.1 模型制作

术前 14 h 禁食不禁水。麻醉满意后腹部中下部铺放洞巾,75%乙醇消毒,从尿道口上 1 cm 处沿腹中线切开约 2.5 cm 纵行切口,用钝性无菌解剖镊探查腹腔,暴露盲肠,避开血管分离肠系膜,距盲肠末端 1 cm 处用 3/0 型号手术缝合线结扎,将结扎部固定于复合感染模型支架中心部位,然后轻提起结扎盲肠,用 21 G 针在结扎部位从上向下螺旋状穿刺三针六孔,每针旋转 30°,两针之间上下间隔约 3 mm。穿刺盲肠挤出少量粪便,用消毒签擦去挤出的粪便。在复合感染支架预先固定的两个 0.03 g 棉花上各滴加 10%鼠粪混悬液 0.3 mL。轻提腹腔切口,将复合感染支架放入腹腔并尽量至于腹腔底部。最后逐层缝合切口。将术后大鼠置于笼中直至麻醉苏醒,正常饲养。所有动物手术在 20 min 内完成,保持一致性。CLP 组:不安放复合感染支架和滴加鼠粪混悬液,其余同 MIM 组。Sham 组:仅暴露盲肠,其余同 MIM 组。操作过程如图 2 所示。

图 1 复合感染支架图

Figure 1 Multiple infect model stent diagram

1.2.2 生存率实验

每隔 2 h 观察,连续观察 96 h 各组大鼠是否出现嗜睡、少动、竖毛、蜷缩、食欲减退;眼睛和口鼻是否有分泌物;上述症状是否随时间发展症状加剧;死前是否出现颤抖、全身僵化、呼吸不畅;动物开腹

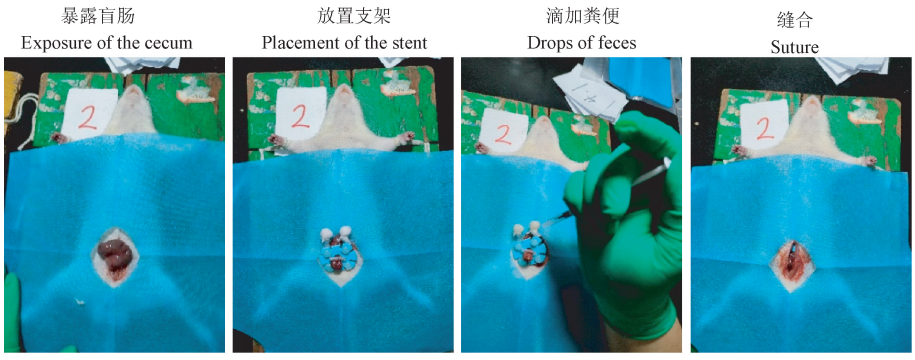


图 2 建立复合感染模型步骤

Figure 2 Steps to establish a multiple infection model

后检查盲肠结扎穿刺部位封堵情况，观察是否有混浊渗出液，肠道肿胀粘连程度，脏器是否有瘀血。记录各组大鼠死亡时间。

1.2.3　炎症和 MODS 损伤指标检测

生存率实验中 MIM 组大鼠在术后 17.5 h 首先出现死亡，因此大鼠统一在 17.5 h 麻醉腹主动脉取血，用枸橼酸钠抗凝，经 2500 r/mim 离心 10 min 后血浆样本按照说明书检测 LPS、IL-6、MDA、Lac、ALT、AST、cTn-I、Cr、TBil、ATP 的含量。取肝组织测定 MDA 和 ATP 含量。

1.2.4　HE 染色形态学检查

取新鲜的脏器组织置于 4%多聚甲醛中固定，依次进行 HE 染色步骤后通过玻片扫描保存分析结果。

1.3　统计学分析

收集并整理数据，以平均值 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。使用 SPSS 26.0 进行数据统计分析，使用 Graph Pad Prism 8.0.1 进行图像制作。组间比较采用方差分析，生存研究采用 log-rank 检验。统计标准为：$P < 0.05$ 有统计学意义，$P < 0.01$ 具有显著性差异，$P < 0.001$ 极具显著性差异。

2　结果

2.1　一般情况

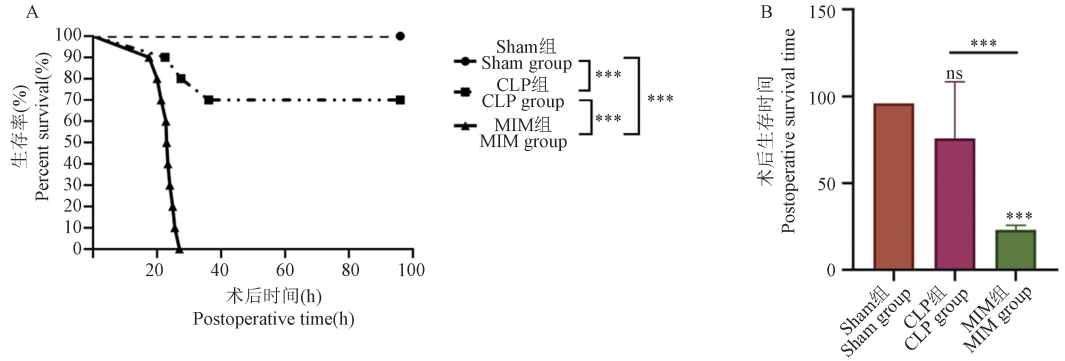
Sham 组：所有大鼠术后 4 h 左右全部麻醉苏醒，醒后能自由活动、正常进食饮水、没有嗜睡及蜷缩状态，受刺激后有规避动作、行动速度稍慢、眼角和鼻尖没有分泌物，无明显不良症状。术后 12 h 左右已经有 9 只大鼠运动速度恢复正常。96 h 解剖未发现腹腔渗出液、肠管扩张和脏器肉眼观察无明显损伤。

CLP 组：所有大鼠术后 4 h 左右全部麻醉苏醒，12 h 左右所有大鼠开始出现嗜睡、进食减少、精神状态不佳、行动缓慢、蜷缩抱团、鼻尖有少量分泌物、尿量减少。22 h 后 3 只大鼠开始出现寒战、呼吸困难、死亡。36 h 后存活大鼠症状逐步改善。死亡大鼠解剖可见：盲肠结扎部位未能完全封堵，穿刺针孔明显，盲肠结扎部位呈暗红色，腹腔有浑浊腹水，肠道粘连，空肠充气。心脏、肝、肺等脏器瘀血明显。而存活大鼠 96 h 解剖可见盲肠结扎部位被水肿肠道严密封堵，盲肠结扎部位与周围肠道较难分离，盲肠末端变灰绿色。腹腔有较少或无清澈腹水，肠道肿胀粘连程度较死亡鼠大幅减轻，心脏、肝、肺和肾未见瘀血。

MIM 组：所有大鼠术后 4 h 左右全部麻醉苏醒，8 h 后所有大鼠开始出现嗜睡、无进食、精神状态不佳、行动缓慢、蜷缩抱团、竖毛、鼻尖有分泌物、尿量减少；大约 12 h 后症状逐步显著，眼角出现红色分泌物，腹胀明显。16 h 后陆续有大鼠出现明显寒战和呼吸困难、有濒死感。27 h 后全部死亡。打开腹腔可见盲肠结扎部位盲肠结扎部位未被完全包裹，穿刺针孔明显，盲肠结扎部位呈暗红色，腹腔有浑浊或血性腹水，肠道粘连，空肠充气。心脏、肝、肺、肾等多个脏器瘀血明显。

2.2　生存率实验结果

观察改良 CLP 模型造模 96 h 期间大鼠生存状况并记录死亡时间（见图 3）。术后 96 h，Sham 组大鼠生存率 100%，CLP 组大鼠生存率 70%，术后 22.5 h，CLP 组首只大鼠出现死亡，其中 3 只死



注：与假手术组及 MIM 组相比，$^{***}P < 0.001$。

图 3　造模后各组生存曲线及死亡时间柱状图（$n = 10$）

Note. Compared with the Sham group and the MIM group, $^{***}P < 0.001$.

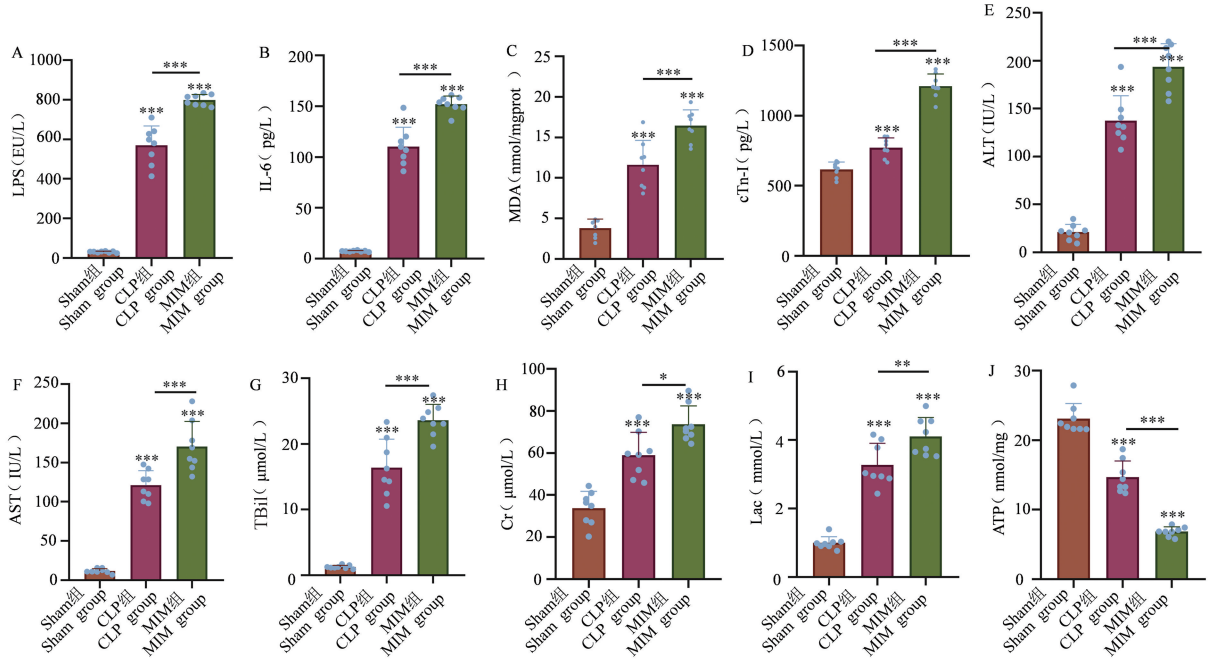
Figure 3　Survival curve and death time histogram of each group after molding ($n = 10$)

亡时间集中在(29 ± 7)h 期间,其余存活。MIM 组生存率 0%,术后 17.5 h MIM 组首只大鼠出现死亡,死亡时间集中在(22 ± 5)h 期间。从死亡时间柱状图可知,与 Sham 组相比,CLP 组无统计学意义($P > 0.05$),而 MIM 组统计意义极显著($P < 0.001$)。大鼠生存时间与放置复合感染支架密切相关。

2.3 血清中炎症指标和器官损伤指标变化

通过前期生存率实验结果,对造模 17.5 h 后大鼠进行 LPS、IL-6、MDA、cTn-I、ALT、AST、TBil、Cr、Lac 和 ATP 指标检测。组间比较差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。结果知:LPS、IL-6、MDA、cTn-I、ALT、AST、TBil、Cr 和 Lac 的含量 Sham 组较低,CLP 组和 MIM 组显著升高,MIM 组最高。ATP 含量 Sham 组最高,而 CLP 组和 MIM 组显著降低,MIM 组最低(见图 4)。

从各组变异系数对比表可看出,MIM 组内反映感染与炎症的模型关键指标(LPS、IL-6、MDA)变异性远低于 CLP 组,且大部分指标变异性均较 CLP 组更小(见表 1)。



注:A:各组 LPS 含量的比较;B:各组 IL-6 含量的比较;C:各组 MDA 含量的比较;D:各组 cTn-I 含量的比较;E:各组 ALT 含量的比较;F:各组 AST 含量的比较;G:各组 TBil 含量的比较;H:各组 Cr 含量的比较;I:各组 Lac 含量的比较;J:各组 ATP 含量的比较;与假手术组和 MIM 组相比,$^{*}P < 0.05$,$^{**}P < 0.01$,$^{***}P < 0.001$。

图 4 造模 17.5 h 后各组指标的变化水平($n = 8$)

Note. A. Comparison of LPS content between groups. B. Comparison of IL-6 content between groups. C. Comparison of MDA content between groups. D. Comparison of cTn-I content between groups. E. Comparison of ALT content between groups. F. Comparison of AST content between groups. G. Comparison of TBil content between groups. H. Comparison of Cr content between groups. I. Comparison of Lac content between groups. J. Comparison of ATP content between groups. Compared with the Sham group and the MIM group. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.

Figure 4 Level of change of indicators in each group after 17.5 h of molding($n = 8$)

表 1 造模 17.5 h 后各组变异系数对比表($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison table of coefficients of variation of each group after 17.5 h of mold making($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	LPS (EU/L)	IL-6 (pg/L)	MDA (nmol/mgprot)	cTn-I (pg/L)	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	TBil (μmol/L)	Cr (μmol/L)	Lac (mmol/L)	ATP (nmol/L)
Sham 组 Sham group	0.111	0.074	0.277	0.080	0.361	0.229	0.187	0.222	0.182	0.088
CLP 组 CLP group	0.159	0.162	0.241	0.084	0.177	0.143	0.292	0.184	0.178	0.156
MIM 组 MIM group	0.032	0.048	0.111	0.066	0.115	0.176	0.095	0.111	0.127	0.091

2.4　大鼠 HE 染色观察脏器组织病理学结果

心脏：Sham 组无炎性细胞浸润，心肌细胞排列整齐，心肌纤维结构完整无断裂，心肌横纹清晰，血管结构完整，无扩张及充血；CLP 组有炎性细胞浸润，心肌细胞排列紊乱，心肌横纹模糊，细胞质空泡化增加，部分区域出现间质水肿，毛细血管扩张；MIM 组可见大量炎性细胞浸润，心肌纤维变性、坏死、心肌横纹几乎消失，可见细胞核固缩或溶解，毛细血管明显扩张充血，周围有红细胞渗出，部分区域呈凝固型坏死改变。

肝：Sham 组汇管区未见炎症性细胞浸润，肝小叶和肝细胞形态正常；CLP 组有炎性细胞浸润，肝窦扩张，肝细胞水肿，细胞核肿胀，气球样变性明显；MIM 组有大量炎性细胞浸润，细胞边界不清，细胞广泛水肿，部分细胞出现凋亡小体，细胞核碎裂、溶解，中央汇管区可见肝细胞出血性坏死。肝窦扩张，肝索结构紊乱，肝小叶结构不清，可见大量红细胞渗出。

肺：Sham 组未见明显炎性细胞浸润，肺组织平整无皱褶，结构正常，肺泡结构清晰，肺泡壁薄；CLP 组出现炎性细胞浸润，部分肺泡壁结构破坏，肺泡周围血管腔扩张，肺泡扩张融合，肺泡数目变少且变大，纤维间隔增厚；MIM 组出现大量炎性细胞浸润，肺泡壁明显增厚，肺间隔明显增厚，肺泡塌陷，部分肺泡腔及呼吸性支气管内出血，毛细血管变少且畸形，大量红细胞渗出。

肾：Sham 组未见明显炎性细胞浸润，肾小球结构正常，肾小管管腔完整齐；CLP 组可见肾皮质及间质有大量炎性细胞浸润，并可见肾小球萎缩、肾小管上皮细胞水肿、空泡变性；MIM 组出可见大量炎性细胞浸润，肾小球及基底膜萎缩、球囊间隙明显增宽，肾小球毛细血管扩张及充血，大量红细胞外渗出，上皮细胞水肿，空泡变性。肾小管壁增厚、血管腔接近闭塞。远曲小管及收集管内可见红细胞（见图 5）。

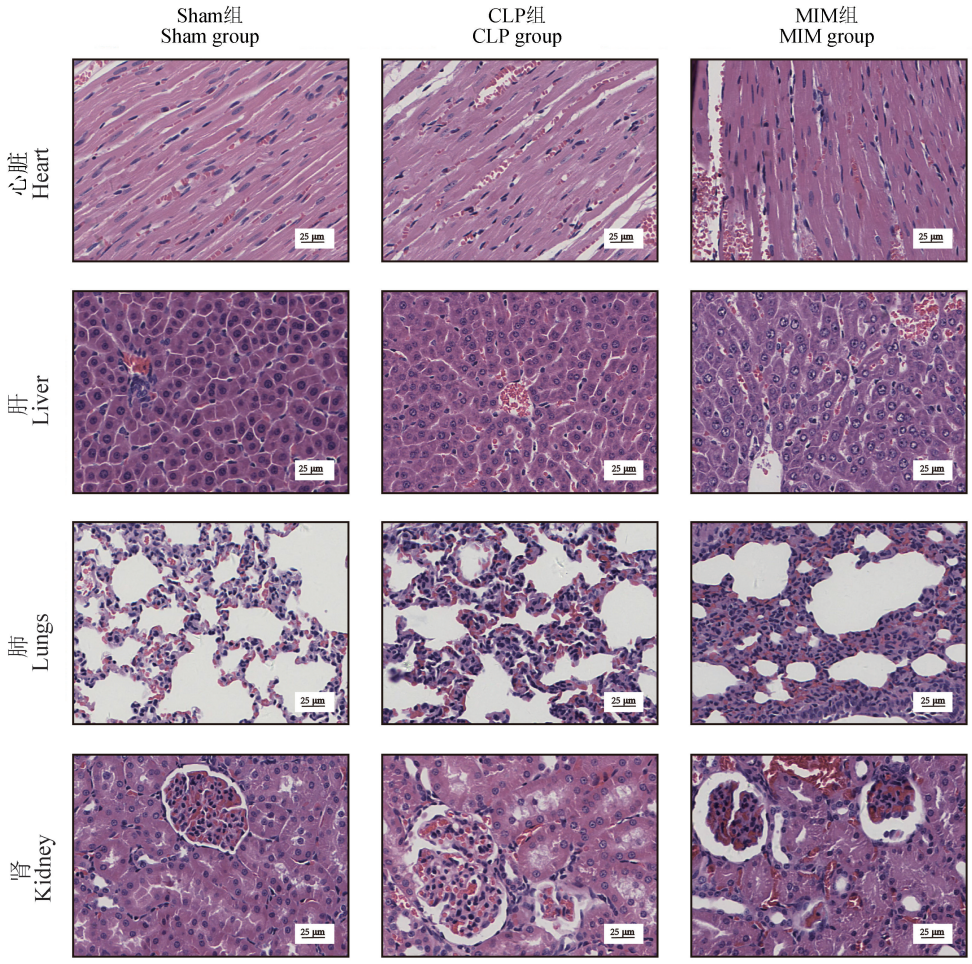


图 5　造模 17.5 h 后脏器组织 HE 染色结果（n = 8）

Figure 5　HE staining results of posterior organ tissues 17.5 h after molding（n = 8）

3 讨论

脓毒症是宿主对感染功能失调反应引起的危急生命的多器官功能障碍综合征[1],是当代重症医学研究的焦点和难点。建立稳定且可较好模拟脓毒症临床复杂病理生理过程的动物模型,无疑是脓毒症病理生理机制研究和治疗药物筛选的基础。

注射内毒素和植入活菌培养物脓毒症模型可控制感染剂量,稳定性和重复性好。但二者仅是对实验动物的急性一次性打击,无法模拟临床患者存在的感染灶持续性地释放病菌和内毒素过程。此外基于注射内毒素模型开发的药物在临床上并未显示出有益效果,这提示模型与临床有较大差距。CLP 模型通过盲肠结扎穿刺,破坏肠道屏障,引起肠内菌群持续性释放,模型动物病情不断发展,具有更好的临床相关性[12-13]。但实际操作中如果盲肠结扎部位稍长、穿刺针孔过大、过多,容易导致动物死于急性损伤,与感染导致机体过度反应的本质不符;而如果结扎部位稍短、穿刺较少,又容易出现水肿肠道随机封堵盲肠结扎穿刺部位,表现为:(1)有的动物不能有效封堵盲肠结扎穿刺部位,病情不断发展至死亡;(2)有的动物部分封堵减少一定肠道菌群释放,生存周期大幅延长;(3)有的动物全面有效封堵,病情不再发展长久存活。由此造成模型动物组间变异性大,进而干扰脓毒症机制研究和药物效果评价。针对 CLP 模型的弊端,有学者做出积极有益的探索[14],如通过静脉采血针套管呈“十”字型固定于盲肠结扎穿刺部位,以阻碍水肿肠道对盲肠结扎穿刺部位的封堵,并能造成较 CLP 模型更为严重的炎症反应和多器官功能障碍。但笔者重复该模型发现,该模型仍不能完全避免结扎盲肠被封堵问题,且模型动物死亡时间不均一,模型动物有相当的存活率。

本实验着力解决 CLP 模型水肿肠道封堵盲肠结扎部位影响感染进程这一核心问题通过在复合感染支架头部棉球滴加鼠粪混悬液,干扰肠道对盲肠结扎部位的封堵;通过植入复合感染支架可物理隔绝水肿的肠道对盲肠结扎穿刺部位封堵;最后通过螺旋均匀的穿刺方法能够在发生封堵的情况下,肠道也很难对盲肠结扎部位完全封堵。实现 MIM 模型能够始终存在持续感染源的目的。本模型亦可手术切除结扎盲肠,将包裹特定细菌的膜性小囊穿刺后固定于复合感染支架中心孔上,在棉球上滴加同种细菌,进而开展特定细菌导致脓毒症发展的机制研究,如革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌致脓毒症差异研究。这是传统 CLP 模型不易实现的。

判断动物模型有效性可从结构效度和表面效度两方面评价,结构效度是理论基础。临床上脓毒症患者一般体内存在感染病灶,感染灶持续性地释放病菌和内毒素,从而引起炎症反应、氧化应激、内皮损伤、循环状态改变、能量代谢低下和器官功能障碍等病理生理改变[15-17],伴有剧烈炎症反应和严重器官损伤症状[18-20]。本模型实验动物为 SPF 级大鼠,其同批大鼠本身无明显感染与炎症,因此 MIM 模型鼠的 LPS、IL-6、MDA 等指标的组内变异系数较小可直接反映该模型的感染与炎症进程更为一致。此外 LPS、IL-6、MDA 指标反映 MIM 模型较 CLP 模型感染、炎症反应更为强烈;cTn-I、AST、ALT、TBil、Cr、Lac 和 ATP 等指标说明 MIM 模型较 CLP 模型更能造成心脏、肝、肾多器官功能障碍[21-23],并伴随能量代谢低下。HE 染色结果也表明造成严重的器官损伤。因此 MIM 模型的结构效度更好。表面效度是动物模型表现症状与人类自然发展的相似性。临床脓毒症最常见症状有疲劳、呼吸短促和精神状态改变等[24]。大鼠有嗜睡、无进食、精神状态不佳、行动缓慢、蜷缩抱团、竖毛等表现可作为类似临床脓毒症的表现。MIM 模型大鼠集中出现类似宏观病理表现。因此 MIM 模型的表面效度更好。

综上,本研究显示放置滴加粪便的复合感染支架,能够实现脓毒症模型核心要求的持续感染,还可人为决定注射感染源种类,实现复合感染,更贴近脓毒症因感染引发的发病机制。该模型的动物死亡时间较 CLP 模型更为集中,多器官高度损伤,且感染与炎症进程更为统一,因此有利于开展脓毒症病理生理和药效评价等相关研究。但此模型需开较大切口放置复合感染支架,易致实验数据偏倚且主观控制盲肠结扎长度在实际操作中有误差,加之没有做血流动力学相关指标,可能与临床实际有一定出入。此次改良模型方法可为今后脓毒症模型提供借鉴意义,并在此基础上继续改良创新。

参 考 文 献(References)

[1] 中华医学会重症医学分会. 中国严重脓毒症/脓毒性休克治疗指南(2014)[J]. 全科医学临床与教育, 2015, 13(4): 365-367.
Chinese Medical Association Severe Medicine Branch. Guidelines for the treatment of severe *Sepsis*/septic shock in China (2014) [J]. Clin Educ Gen Pract, 2015, 13(4): 365-367.

[2] Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS international *Sepsis* definitions conference[J]. Crit Care Med, 2003, 31(4): 1250-1256.

[3] Dyson A, Singer M. Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? [J]. Crit Care Med, 2009, 37: S30-S37.

[4] Xie JF, Wang HL, Kang Y, et al. The epidemiology of *Sepsis* in Chinese *ICUs*: A national cross-sectional survey [J]. Crit Care Med, 2020, 48(3): e209-e218.

[5] Liu YC, Yao Y, Yu MM, et al. Frequency and mortality of sepsis and septic shock in China: A systematic review and meta-analysis [J]. BMC Infect Dis, 2022, 22(1): 564.

[6] Huang M, Cai S, Su J. The pathogenesis of *Sepsis* and potential therapeutic targets [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(21): 5376.

[7] 姚咏明, 张艳敏. 脓毒症发病机制最新认识 [J]. 医学研究生学报, 2017, 30(7): 678-683.
Yao YM, Zhang YM. Updated insights into the pathogenesis of sepsis [J]. J Med Postgrad, 2017, 30(7): 678-683.

[8] 李青青, 张宇轩, 徐桂萍. 两种麻醉方法建立大鼠盲肠结扎穿孔术脓毒症模型的比较 [J]. 新疆医学, 2022, 52(2): 121-123, 134.
Li QQ, Zhang YX, Xu GP. Two anesthesia methods in the establishing sepsis model of Cecal ligation-peferation in rats [J]. Xinjiang Med J, 2022, 52(2): 121-123, 134.

[9] 尤金枝, 王捷虹, 高麦仓, 等. 尿激酶、低分子肝素对脓毒症弥散性血管内凝血大鼠模型的影响研究 [J]. 陕西医学杂志, 2020, 49(9): 1071-1073, 1077.
You JZ, Wang JH, Gao MC, et al. Study of urokinase and low molecular weight heparin on sepsis DIC rats model [J]. Shaanxi Med J, 2020, 49(9): 1071-1073, 1077.

[10] 肖皓亮, 黎满香. 大鼠盲肠结扎穿刺脓毒症模型死亡率影响因素研究 [J]. 湖南畜牧兽医, 2016, 1: 43-45.
Xiao HL, Li MX. Study on the influencing factors of mortality of cecal ligation puncture sepsis model in rats [J]. Hunan J Anim Sci Vet Med, 2016, 1: 43-45.

[11] 李欣, 李景辉. 脓毒症动物模型制备的影响因素及研究进展 [J]. 中华危重症医学杂志(电子版), 2015, 8(1): 53-57.
Li X, Li JH. Influencing factors and research progress of animal model of sepsis [J]. Chin J Crit Care Med Electron Ed, 2015, 8(1): 53-57.

[12] 黄鑫, 张敏州. 盲肠结扎穿孔术——脓毒症模型研究的金标准 [J]. 医学综述, 2015, 21(3): 392-395.
Huang X, Zhang MZ. Gold standard for the model research of cecal ligation and puncture-*Sepsis* [J]. Med Recapitul, 2015, 21(3): 392-395.

[13] 彭凤辉, 邓晓彬, 吕立文. 脓毒症动物模型的研究进展 [J]. 广西医科大学学报, 2020, 37(8): 1577-1581.
Peng FH, Deng XB, Lü LW. Research progress in animal models of sepsis [J]. J Guangxi Med Univ, 2020, 37(8): 1577-1581.

[14] 黎李俊, 杨国辉. 一种改良盲肠结扎穿刺致大鼠脓毒症模型的方法 [J]. 中国医学科学院学报, 2020, 42(4): 468-476.
Li LJ, Yang GH. Establishment of an improved rat model of *Sepsis* induced by cecal ligation and puncture [J]. Acta Acad Med Sin, 2020, 42(4): 468-476.

[15] Harrison C. *Sepsis*: calming the cytokine storm [J]. Nat Rev Drug Discov, 2010, 9(5): 360-361.

[16] van der Poll T, Meijers JCM. Systemic inflammatory response syndrome and compensatory anti-inflammatory response syndrome in sepsis [J]. J Innate Immun, 2010, 2(5): 379-380.

[17] Zhou FH, Wang L. Thoughts on the treatment of sepsis [J]. J Pract Shock, 2020, 4(3): 131-135.

[18] 汪浪, 张智琪, 沈雪, 等. 老年脓毒症患者临床特征及预后影响因素 [J]. 中国感染控制杂志, 2022, 21(4): 377-383.
Wang L, Zhang ZQ, Shen X, et al. Clinical characteristics and prognostic factors of elderly patients with sepsis [J]. Chin J Infect Control, 2022, 21(4): 377-383.

[19] 孙航, 赵菊馨, 杨方, 等. TNF-α、IL-10 及 CRP 在脓毒症患者中的表达及其临床意义 [J]. 中国实用医刊, 2021, 48(19): 31-34.
Sun H, Zhao JX, Yang F, et al. Expression and clinical significance of TNF-α, IL-10 and CRP in patients with sepsis [J]. Chin J Pract Med, 2021, 48(19): 31-34.

[20] 邢小康, 李曼, 郭丰. 脓毒症相关肝损伤分析 [J]. 中国继续医学教育, 2018, 10(27): 87-88.
Xing XK, Li M, Guo F. Analysis of *Sepsis*-associated liver injury [J]. Chin Cont Med Edu, 2018, 10(27): 87-88.

[21] 董权平, 张逸询, 钟振威. 血清 D-二聚体、cTnI 及血压变化在急性心肌梗死和主动脉夹层诊断中的应用价值 [J]. 吉林医学, 2022, 43(1): 103-104.
Dong QP, Zhang YX, Zhong ZW. Application value of serum D-dimer, cTnI and blood pressure changes in diagnosis of acute myocardial infarction and aortic dissection [J]. Jilin Med J, 2022, 43(1): 103-104.

[22] 刘岷念, 肖艳玲, 胡芳. 慢性肾脏病患者血清胆红素、血脂水平变化及其对颈动脉粥样硬化作用的研究 [J]. 临床内科杂志, 2022, 39(3): 192-195.
Liu MN, Xiao YL, Hu F. Changes of serum bilirubin and blood lipid levels in patients with chronic kidney disease and their effects on carotid atherosclerosis [J]. J Clin Intern Med, 2022, 39(3): 192-195.

[23] 杨姗, 李红, 庄惠君, 等. 血清肌酐和肾小球滤过率与代谢综合征患病率相关性的横断面研究 [J]. 重庆医学, 2022, 51(10): 1670-1674.
Yang S, Li H, Zhuang HJ, et al. A cross-sectional study of serum creatinine and glomerular filtration rate with prevalence rate of metabolic syndrome [J]. Chongqing Med, 2022, 51(10): 1670-1674.

[24] 范丽丽. 早期识别和评估脓毒性休克的研究进展 [J]. 临床研究, 2021, 29(9): 196-198.
Fan LL. Advances in the early identification and assessment of septic shock [J]. Clin Res, 2021, 29(9): 196-198.

[收稿日期] 2022-05-10