

脓毒症相关脏器损伤动物模型研究进展

杨家豪¹, 丁纯蕾¹, 钱风华², 孙旗¹, 姜旭升², 陈雯², 沈梦雯¹

(1. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院急诊医学科, 上海 200437; 2. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院老年医学科, 上海 200437)

[摘要] 脓毒症是机体因感染和免疫失调引起的多脏器功能衰竭综合征, 影响心脏、肺脏、肾脏、肝脏、大脑等多个重要器官, 致死率极高。建立各器官功能衰竭综合征相应的动物模型是明确其发病机制、研究潜在有效药物及评估治疗方案有效性与安全性不可或缺的一环。本文首先对脓毒症相关脏器损伤的经典造模方式进行总结, 指出脓毒症的经典造模方式包括破坏肠道屏障组织完整性和植入病原体或毒性药物。前者主要包括盲肠结扎穿刺法、升结肠植入支架法和盲肠结扎切口法, 后者根据模拟临床感染途径的不同分为腹腔注射、静脉注射和气道内给药, 其中以盲肠结扎穿刺法和脂多糖腹腔注射最为常见。其次, 本文归纳总结了脓毒症致心肌损伤、急性肺损伤、急性肾损伤、急性肝损伤、脓毒症相关脑病的动物模型常见的造模方法和模型评估方法, 指出几乎所有器官损伤都用到了经典造模方式, 对不同器官损伤模型根据发病机制的不同进行了相应的补充。比如, 除经典造模方式外, 气管内滴注脂多糖进行脓毒症致急性肺损伤的造模方式更能模拟肺屏障功能损伤; 盲肠结扎穿刺法后气管内给予假单胞菌进行二次打击的脓毒症致急性肾损伤造模方式能表现出更严重的急性肾损伤; 半乳糖胺腹腔注射是较为成熟的脓毒症致急性肝损伤的造模方式; 颅内注射脂多糖是脓毒症致脑功能障碍可行的造模方式。另外, 除造模方式不同外, 根据实验目的的不同, 给药时间和给药剂量和实验时间节点也均存在差异。本综述通过对脓毒症致心肌病、急性肺损伤、急性肾损伤、急性肝损伤、脑功能障碍的动物模型研究进展进行介绍, 以期对动物模型的选择和实验设计的优化提供一定参考。

[关键词] 脓毒症; 动物模型; 多器官功能损伤; 研究进展

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)06-0636-09



Research Progress on Animal Models of Sepsis-Related Organ Injury

YANG Jiahao¹, DING Chunlei¹, QIAN Fenghua², SUN Qi¹, JIANG Xusheng², CHEN Wen², SHEN Mengwen¹

(1. Department of Emergency Medicine, Yueyang Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China; 2. Department of Geriatrics Medicine, Yueyang Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China)

Correspondence to: SHEN Mengwen (ORCID: 0000-0002-1186-5654), E-mail: hupo_58@163.com

[ABSTRACT] Sepsis is a multi-organ dysfunction syndrome caused by infection and immune dysfunction, with a high mortality rate. It affects multiple important organs such as the heart, lungs, kidneys, liver, and brain. Establishing corresponding animal models of organ dysfunction syndrome is an essential step in clarifying its pathogenesis, researching potential effective drugs, and evaluating the effectiveness and safety of treatment plans. This article first summarizes classic modeling methods for sepsis related organ injury, including the destruction of intestinal barrier tissue integrity and the implantation of pathogens or toxic drugs. The former mainly includes cecal ligation and puncture, ascending colon stent implantation,

[基金项目] 国家自然科学基金“基于机械敏感离子通道蛋白 PIEZO1 的四逆升降散调控细胞紧密连接改善脓毒症急性肺损伤的机制研究”(82304933); 上海市卫生健康委员会卫生行业临床研究专项“四逆升降散改善脓毒症急性呼吸窘迫综合征患者预后的临床观察研究”(202140202); 上海中医药大学预算内科研项目“加味四逆升降散调控 Ang-Tie 轴改善脓毒症急性肺损伤毛细血管渗漏的研究”(2021LK096)

[第一作者] 杨家豪(1999—), 男, 硕士研究生在读, 研究方向: 中西医结合急危重症诊疗。E-mail: 864102934@qq.com

[通信作者] 沈梦雯(1986—), 女, 博士, 副主任医师, 研究方向: 中西医结合急危重症诊疗。E-mail: hupo_58@163.com。ORCID: 0000-0002-1186-5654

and cecal ligation incision. The latter is divided into intraperitoneal injection, intravenous injection, and intratracheal administration based on the clinical infection route being simulated. Cecal ligation and puncture and lipopolysaccharide intraperitoneal injection are the most commonly used methods. Secondly, this article summarizes the common modeling methods and evaluation methods for animal models of sepsis-induced cardiomyopathy, acute lung injury, acute kidney injury, acute liver injury, and brain dysfunction. It points out that almost all organ injuries use classic modeling methods, and different organ injury models have additional modifications according to their different pathogenesis. For example, in addition to the classic modeling methods, lipopolysaccharide instillation in the trachea is more effective in modeling acute lung injury as it better simulates lung barrier dysfunction. Cecal ligation and puncture followed by *Pseudomonas* instillation in the trachea in a secondary challenge model better represents sepsis-induced acute kidney injury. Intraperitoneal injection of galactosamine is a mature modeling method of sepsis-induced acute liver injury. Intracerebral injection of lipopolysaccharide is a feasible model of sepsis-associated encephalopathy. In addition to the different modeling methods, there are differences in the administration time, dosage and experimental time points according to the different experimental purposes. This article reviews the research progress of animal experimental models for sepsis-induced cardiomyopathy, acute lung injury, acute kidney injury, acute liver injury, and brain dysfunction, aiming to provide a reference for the selection of animal experimental models and optimization of experimental design.

[Key words] Sepsis; Animal models; Multiple organ dysfunction; Research progress

脓毒症 (sepsis) 是重症监护病房 (intensive care unit, ICU) 常见的危重症之一。2016年, 脓毒症3.0被定义为机体对感染反应失调引起的多器官功能障碍综合征^[1-3], 相较于1991年的脓毒症1.0与2001年的脓毒症2.0定义, 新定义更加关注感染序贯的脏器功能损害。截至2017年, 全球有4 890万例脓毒症病例, 其中死亡病例约占全球死亡总数的19.7%^[4]。一项统计调查表明, 在中国的ICU中, 脓毒症患者约占20%, 其90 d死亡率高达35.5%^[5]。随着医疗技术的发展, 脓毒症的死亡率有较大降低, 但该疾病对患者心脏、肺脏、肾脏、肝脏、大脑等多个器官功能仍会造成极大损伤, 如何改善脓毒症患者的预后依然是全球面临的重要医学难题^[6]。为了解决这一难题, 建立稳定、可重复的动物模型是推动脓毒症相关脏器损伤研究的关键之一。

1 经典造模方式

1.1 破坏肠道屏障组织完整性

细菌性腹膜炎模型是临床上用于模拟脓毒症的常用模型, 该模型通过破坏肠道完整性, 以使微生物群成分进入腹腔, 来实现模拟脓毒症的过程^[7]。目前破坏组织完整性的造模方式可分为盲肠结扎与穿刺 (cecal ligation and puncture, CLP) 型、升结肠支架腹膜炎脓毒症 (colon ascendens stent peritonitis, CASP) 型、

盲肠结扎与切口 (cecal ligation and incision, CLI) 型^[8-9]。

1.2 植入病原体/毒性药物

植入病原体即向动物给予临床常见致病菌如大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌和链球菌等^[10-11], 从而模拟临床屏障组织感染诱发的脓毒症。根据不同的研究目的, 可采用不同的给药途径, 如腹腔注射、静脉注射与气管内给药 (表1)。这种方法无需手术, 具有可重复性和低侵入性的特点, 适合触发特定病原体免疫反应的研究^[12]。

植入毒性药物诱导脓毒症通常需要使用病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns), 其中以脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 最为常见, 其他还有酵母聚糖、肽聚糖等^[13-14]。此类造模方式可以快速且有效地诱导脓毒症, 常用于研究免疫应答及炎症反应。但由于毒性药物的单一性, 此类方法难以模拟临床上多菌性脓毒症的病理生理情况。

除此之外, 向腹腔注射粪便溶液或盲肠匀浆可以诱导一种侵入性低且易于获得的多微生物脓毒症模型, 然而肠道内容物大量给药的造模方式会引起强烈的免疫反应, 需要进行模型鉴定和筛选。这个过程中实验动物可能在造模早期死亡, 也可能会完全康复, 这就对取得预期实验效果造成了阻碍^[15]。

腹腔内植入载有病原体的纤维蛋白凝块是一种新

型诱导脓毒症的方式。该方法首先将一定剂量的细菌封闭在纤维蛋白凝块中, 然后通过中线剖腹手术将纤维蛋白凝块植入腹腔。纤维蛋白会延迟机体对被封闭细菌的吸收速度, 并促进脓肿的形成和发展, 进而使脓肿演变成局部的脓毒症病灶, 引起腹膜炎, 最终导

致血流感染。与传统造模方式相比, 这种造模方式的优势在于病原体在体内缓慢持续释放, 可以更好地模拟病原体从感染到扩散的过程, 造成更为持久的感染模型^[8]。

经典造模方式的优缺点具体见表2。

表1 常见造模药物给药途径及优缺点

Table 1 Common routes of drug administration for modeling and their advantages and limitations

给药途径	优点	局限
Routes of administration	Advantages	Limitations
腹腔注射	操作简便, 适用于快速诱导脓毒症模型	可引起腹膜炎等多种并发症, 无法造成目标脏器损伤; 无法完全模拟临床脓毒症多菌性感染
Intraperitoneal injection		
静脉注射	接近临床细菌及毒素入血情况, 适用于研究循环中的炎症反应	易损伤血管; 对药物剂量及浓度要求高
Intravenous injection		
气管内给药	可模拟肺部感染引起的脓毒症, 适合建立急性肺损伤模型	操作复杂、易对气管造成损伤; 对药物剂量及浓度要求高
Intratracheal administration		

表2 建立脓毒症动物模型的常见方法及其优缺点

Table 2 Common methods for establishing animal models of sepsis and their advantages and limitations

方法	具体技术	优点	局限
Methods	Specific techniques	Advantages	Limitations
破坏肠道屏障组织完整性 Disrupting the integrity of intestinal barrier tissue	CLP ^[7]	脓毒症造模“金标准”最接近人类脓毒症发病过程; 可重复性高; 可模拟多菌性感染	手术难度大、死亡率及疾病严重程度难以控制
	CASP ^[8]	接近人类脓毒症发病过程; 可重复性高; 可控制脓毒症严重程度	手术难度大、操作复杂
	CLI ^[9]	与CLP模式相同, 可持续释放病原体, 模拟临床腹腔感染致脓毒症	代谢组学、血流动力学以及免疫反应的研究尚未成熟
植入病原体/毒性药物 Introducing pathogens/toxic drugs	脂多糖、酵母聚糖、肽聚糖 ^[13-14]	易操作、低侵入性; 可激活宿主免疫系统用于研究脓毒症相关免疫反应	无法模拟脓毒症的多菌性感染
	大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌 ^[10-11]	易操作、低侵入性; 适用研究宿主对特定病原体的反应机制	无法模拟脓毒症的多菌性感染, 有细菌使用的实验室等级要求
	载有病原体的纤维蛋白凝块 ^[8]	可重复性高; 使病原体缓慢释放, 造成持久感染而不影响最终死亡率	纤维蛋白凝块制作难度大
	粪便溶液、盲肠匀浆 ^[15]	易操作、低侵入性; 可模拟多菌性感染	免疫反应过于强烈, 易导致早期死亡或早期完全康复, 浓度难以控制

2 脓毒症致不同脏器损伤相关动物造模

在脓毒症造模动物的选择上, 鼠类 (murine), 如大鼠、小鼠、豚鼠等, 由于其易于基因改造、繁殖能力强、世代更新快且容易饲养的特性, 是研究各类脓毒症相关脏器损伤最常选用的实验对象。

2.1 脓毒症致心肌病

脓毒症心肌损伤 (sepsis-induced myocardial injury, SIMI) 是脓毒症患者最严重且最常见的并发症之一, 表现为心室射血分数降低和心室扩张, 对患者

的预后构成极大的威胁^[16]。

2.1.1 腹腔注射LPS法与CLP法

胡立亚等^[17] 在一项比较腹腔注射10、12、15 mg/kg等不同剂量LPS后对C57BL/6小鼠 (8~12周龄、雄性) 模型进行脓毒症心肌损伤的研究中发现, 7 d死亡率分别为33.3%、53.3%、86.7%。LPS各剂量组小鼠均出现心肌组织损伤, 且LPS的剂量越大损伤越严重。在达格列净与冷诱导RNA结合蛋白通过减轻心脏炎症、细胞凋亡和氧化应激改善SIMI的两项不同的研究中, 均采用LPS腹腔注射法进行造模。前者LPS以

5 mg/kg 的剂量腹腔注射入 SD 大鼠（8 周龄、雄性），所有大鼠在 LPS 注射后均予 2 mL/kg 生理盐水进行液体复苏，药物干预时间为造模前 7 d，样本采集时间为造模后 24 h^[18]；后者实验对象为 C57BL/6J 小鼠（10 周龄、雄性），LPS 剂量为 10 mg/kg，药物干预时间为造模前 7 d，样本采集时间为造模后 12 h^[19]。两项实验均发现达格列净能够减轻脓毒症致 SIMI。在芦竹碱改善 SIMI 的研究中，于造模前 7 d 每日使用芦竹碱干预，向 C57BL/6 小鼠（8~12 周龄、雄性）腹腔内按 20 mg/kg 注射 LPS 造模后，每隔 12 h 记录小鼠存活情况。结果显示，实验组 24 h 及 72 h 存活率均优于对照组，说明芦竹碱具有减轻脓毒症致 SIMI 的作用^[20]。

另外两项通过抑制铁死亡来改善 SIMI 的研究均采用 CLP 法对 SD 大鼠（6~8 周龄、雄性）进行造模。术后立即予 40 mL/kg 乳酸钠林格氏液进行液体复苏，其给药时间为 CLP 前 30 min。之后按照每 12 h 一次的间隔给予药物干预，采集时间为造模后 24 h。结果发现白藜芦醇可通过激活 Sirt1/Nrf2 通路减轻铁死亡，而益气复脉合剂可通过激活 xCT/GPX4 通路减轻铁死亡，从而减轻大鼠的 SIMI 严重程度^[21-22]。

2.1.2 SIMI 模型的评估

造模之后，通过超声心动图评估心功能；血样本的生化检测评估炎症因子；酶联免疫吸附试验检测心肌损伤标志物水平；病理组织切片观察心肌结构形态等相关实验方式进行 SIMI 模型评估^[23]。

2.2 脓毒症致急性肺损伤

急性肺损伤（acute lung injury, ALI）是脓毒症中最为常见且最早发生的并发症，该病进展迅速且有极高的死亡率^[24]。免疫反应失调及内皮功能障碍是脓毒症 ALI 的标志^[25]。CLP 与 LPS 注射仍然是脓毒症急性肺损伤（sepsis-induced acute lung injury, SALI）动物模型的主要建立方式^[26]。

2.2.1 经典造模方式均能造成 SALI 免疫反应失调

Zhou 等^[27]在近期一项实验比较了单次盲肠结扎穿刺法、两次重复穿刺法、LPS（10 mg/kg 或 20 mg/kg）尾静脉注射法、LPS（10 mg/kg 或 20 mg/kg）气管内滴注法诱发的 SALI 动物模型情况。分别在 SD 大鼠（体重 180~220 g、雄性）造模后 4、24、48 h 这三个时间点进行比较。结果发现，就死亡率而言，除 10 mg/kg LPS 气管内滴注法外，其余造模方式的大鼠在 7 d 内的死亡率均超过 50%；就炎症因子释放而言，各模型组在造模后 24 h 和 48 h 时，大鼠血清白细胞介素-6 和 C

反应蛋白水平均明显升高。

Ji 等^[28]在另一项研究血清淀粉样蛋白 A 与脓毒症小鼠（4 月龄、雄性、C57BL/6 型）死亡率和肺损伤的研究中分别使用了 LPS（7.5 mg/kg）腹腔内注射、CLP、盲肠匀浆注射三种造模方式，使用这三种方法造模的小鼠在 7 d 内的死亡率分别为 10%、45%、29%。此外，Sorgun 等^[29]在研究中探讨了利用甜菜碱的抗炎和抗氧化特性对 SALI 的保护作用，给 Wistar 大鼠（体重 200~250 g、雄性）按 1 g/kg 的剂量腹腔注射 75 mg/mL 浓度的大鼠（不包括在本研究中）粪便溶液，造模后 24 h 取样，发现与对照组相比，实验组白细胞介素-6 和 C 反应蛋白水平均降低。并且经甜菜碱治疗后，实验组肺 CT 实质密度以及肺组织病理评分均较对照组有所改善。

2.2.2 气道内给药可以更好地模拟肺屏障功能损伤

在前述的六种 SALI 动物模型比较实验中，气管内滴注 LPS 的大鼠肺组织病理学上有明显改变且伴有炎症渗出。在第 4 个小时，大鼠肺泡灌洗液中的白细胞介素-6、C 反应蛋白、总蛋白浓度出现了明显升高，但 CLP 与 LPS 尾静脉注射组均未见肺损伤表现，肺泡灌洗液结果均无明显变化^[27]。

Guo 等^[30]在另一项关于药物调节表面活性蛋白表达与分泌以减轻 SALI 的研究中，以向 FVB/NJ 小鼠（8~12 周龄、不区分性别）气管内注射荧光标记铜绿假单胞菌溶液（ 5×10^4 CFU/只）的方式进行造模。在造模后的 0、12、24、36、48 h 分别采用荧光信号检测活体成像系统检测小鼠体内的细菌负荷。结果显示，在 24 h 时出现细菌负荷高峰。其药物干预时间为造模后 30 min，实验时间为造模后 24 h，此造模方式的 48 h 死亡率为 60%。

2.2.3 SALI 模型的评估

造模后通过测定肺组织中过氧化酶活性来评估炎症细胞在肺组织的浸润程度；肺湿重与干重比来评估组织水肿程度^[15]；支气管肺泡灌洗液中蛋白水平与伊文思蓝外渗试验来检测血管通透性^[26]；酶联免疫吸附试验来检测血清和支气管肺泡灌洗液中白细胞介素-6、肿瘤坏死因子- α 等因子的浓度；原位末端标记法来评估内皮细胞凋亡程度等相关试验进行 SALI 模型评估^[31]。

2.3 脓毒症致急性肾损伤

脓毒症致急性肾损伤（sepsis-associated acute

kidney injury, SA-AKI) 是常见的器官功能障碍之一。约 60% 的脓毒症患者会并发急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI), 而 AKI 的发展会显著增加患者死亡风险^[32]。

2.3.1 最常见的 SA-AKI 造模方式

Lv 等^[33] 在一项探究 SA-AKI 潜在诊断生物标志物的研究中, 研究人员将 LPS 以 10 mg/kg 注射于 Wistar 大鼠 (8~9 周龄、体重 180~220 g、雄性) 腹膜内, 并设 LPS 注射后 8、12、24、48、72 h 为观察时间点。结果发现, LPS 注射 8 h 后血清肌酐与尿素氮开始明显升高且于 12 h 到达高峰后开始下降。Kim 等^[34] 在一项探讨 β -羟基丁酸是否通过减少肾小管细胞凋亡和炎症反应来改善 SA-AKI 的研究中, 将 LPS 以 15 mg/kg 的剂量, 腹腔注射于 C57BL/6 小鼠 (8 周龄、雄性) 体内进行造模, 药物干预时间为造模前 24 h, 而样本采集时间为造模后 24 h。实验结果表明, β -羟基丁酸能够减轻 SA-AKI 的严重程度。

CLP 造模方式与前文类似, 例如, Luo 等^[35] 在通过调控乳腺癌易感蛋白 1 的稳定性使核因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 信号通路失活进而减轻 SA-AKI 的研究中, 给药时间为 C57BL/6J 小鼠 (8 周龄、雄性) CLP 前 1 d, 术后立即予 50 mL/kg 生理盐水液体复苏, 样本采集观察时间为术后 12、24、48 h。

2.3.2 降低早期死亡率的改良造模方式

尽管早期可以看到血清肌酐和尿素氮的升高, 但是病理学观察显示肾实质不一定有损伤, 小鼠可能痊愈或未进展至肾损伤却已死于其他脏器功能衰竭。因此, 为了降低早期死亡率, 提升肾损伤的发生率, 有研究人员进行了一定的探索, 并改良了造模方式。

Munley 等^[36] 在近期的一项关于脓毒症造模方法的研究中发现, 在 SD 大鼠 (9~11 周龄、不区分性别) CLP 术后第一天通过气管内给予假单胞菌进行二次打击的造模方式比单独 CLP 表现出更严重的 AKI 和更高的血肌酐水平。在研究水通道蛋白等多种蛋白是否能作为 SA-AKI 的潜在指标中, 通过向 Wistar 大鼠 (8~9 周龄、雄性) 腹腔内注射盲肠匀浆的方式进行造模。但与传统盲肠匀浆造模方式不同, 该实验在造模后 12 h 每天 2 次, 连续 5 d 给予抗感染处理 (亚胺培南 1.5 mg/只), 并于造模后 24 h 开始液体复苏, 以此延长大鼠存活时间^[33]。

2.3.3 SA-AKI 模型的评估

造模后, 经尾静脉收集血样本或代谢笼采集尿液

标本, 以测定肌酐与尿素氮水平来评估肾功能; 同时, 收集肾脏样本进行病理染色, 以评估肾组织的损伤程度 (肾小管坏死、上皮细胞脱落、管型沉积、血管充血等)。以上相关实验用于评估 SA-AKI 模型^[37-38]。

2.4 脓毒症致急性肝损伤

肝脏作为防御感染的前线脏器, 在脓毒症的发展过程中发挥着重要作用; 同时, 肝脏也是脓毒症相关脏器损伤的主要目标之一。大约 50% 的脓毒症患者会出现急性肝损伤 (sepsis-induced acute liver injury, SI-AKI)^[39]。

2.4.1 CLP 与 LPS/半乳糖胺腹腔注射是较为成熟的 SI-AKI 造模方式

Wan 等^[40] 在研究 T 细胞产生的白细胞介素-17a 在 SI-AKI 中的保护作用时, 虽采用 CLP 造模, 但与传统 CLP 造模方式不同的是, 此实验中运用 18 号针头穿刺 5 次以达到造模目的, 给药时间为手术前 3 d, 其 7 d 内死亡率为 70%。

Zhang 等^[41] 在莲心碱通过核因子 κ B 和丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路减轻 SI-AKI 的研究中则采用 LPS (10 mg/kg) 向 C57BL/6 小鼠 (7~8 周龄、雄性) 腹膜内注射的方式造模, 其药物干预时间为 LPS 注射前 5 d 每日给药, 样本采集时间为 LPS 注射后 6 h。此外, Arunachalam 等^[42] 基于肝脏代谢药物的特殊功能, 半乳糖胺被特异性地用于急性肝损伤的造模中。例如, 在 P2Y2 嘌呤核苷酸受体基因缺失可保护小鼠免受细菌内毒素和脓毒症相关肝损伤的研究中, 采用 LPS (100 μ g/kg) 联合半乳糖胺 (700 mg/kg) 向 C57BL/6J 小鼠 (10~12 周龄、雄性) 腹腔内注射的造模方式, 分别于造模后 1 h 和 5 h 后进行样本采集。

2.4.2 SI-AKI 模型的评估

造模后, 收集血样本以测定血清丙氨酸转氨酶 (alanine transaminase, ALT)、天冬氨酸转氨酶 (aspartate transaminase, AST) 以评估肝功能, 通过酶联免疫吸附试验来检测肝脏匀浆中白细胞介素-1 β 、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素-6 的表达来评估肝脏中的细胞因子水平, 以肝脏病理组织切片等实验进行 SI-AKI 的评估^[43]。

2.5 脓毒症相关脑病

脓毒症相关脑病 (sepsis-associated encephalopathy, SAE) 主要由脓毒症进展过程中释放的各类因子所致, 其发病率高且发病时间早。急性期

表现为谵妄、脑缺血或脑出血等，远期表现为认知障碍^[44]。

2.5.1 建立脓毒症相关脑病动物模型首要选择

Giridharan 等^[45] 在一项关于脓毒症致认知功能下降及其与肠道和大脑之间相互作用的研究中，采用 CLP 对 Wistar 大鼠（50 日龄、雄性）进行造模，大鼠在术后 12 h 给予液体复苏以及抗感染治疗。在术后 24 h 或 10 d 进行后续实验，发现神经胶质细胞和肠道微生态可能为治疗脓毒症幸存者认知功能障碍提供新靶点。Kala 等^[46] 在一项关于脓毒症引起大鼠海马体振荡状态的研究中，使用 LPS（10 mg/kg）向 Long-Evans 大鼠（体重 400~500 g、雄性）腹腔内注射进行造模，其观测时间为 LPS 注射后 3 h，实验结果描述了脓症患者和 SAE 动物模型中的严重睡眠碎片化的机制。

2.5.2 LPS 直接损伤模型的探索

Lee 等^[47] 在一项探究抗炎与 LPS 致大鼠学习与记忆障碍作用之间关系的研究中，将 50 μg LPS 溶于 10 μL 的脑脊液中，再向 SD 大鼠（6 周龄、雄性）双侧颅内进行注射。此法可引起慢性炎症并导致脑功能障碍，给药时间为 LPS 注射后 24 h。该实验发现人参

皂苷 Rg3 可能通过其在大脑中具有的抗炎活性改善认知和记忆功能，从而有效预防或减缓阿尔茨海默病等神经系统疾病的发展。

2.5.3 SAE 模型的评估

造模后，通过伊文思蓝染色评估血-脑屏障通透性；通过水迷宫试验来评估动物学习及记忆能力；采用酶联免疫吸附法测定脑组织样本中细胞因子水平等方法来评估 SAE^[48-49]。

3 总结与展望

综上所述，LPS 注射与 CLP 法仍是脓毒症脏器损伤最常用的造模方式。LPS 注射法更容易操作、侵入性低、诱导脓毒症速度更快，适用于研究早期的炎症及免疫反应对脏器损伤的影响；而 CLP 法能更好地模拟多菌性脓毒症，但其操作复杂，且均一性较难把握。各类造模的优缺点比较，具体见表 3。为了更好地模拟不同脏器在脓毒症发展过程中的损伤机制，规避经典造模方式的缺点，我们根据研究目标的不同，得出一些新的探索和初步结论，大致可以归纳为：针对脏器的直接给药，例如气道内、颅脑内直

表 3 脓毒症致不同脏器损伤相关动物造模及其优缺点

Table 3 Experimental animal modeling of sepsis-induced organ injury and the advantages and limitations of these methods

脏器损伤 Organ damage	方式 Method	时间 Time	优势 Advantages	局限 Limitations	检测指标 Testing indexes
脓毒症致心肌病 Sepsis-induced myocardial injury, SIMI	LPS 腹腔注射 ^[18-19,21-22]	造模后	易操作、低侵入性、可快速	不能完全模拟脓毒症致	超声心动图、心肌损
	器官损伤情况观察剂量： 5~10 mg/kg	12、24 h	诱导脓毒症；可通过调 节剂量控制疾病严重程 度	心肌病的临床情况	伤标志物、心脏病 理切片 ^[20]
	生存情况观察剂量：20 mg/kg				
脓毒症致急性肺 损伤 Sepsis-induced acute lung injury, SALI	CLP ^[20]	造模后 12、24 h	更接近临床脓毒症致心肌 病的病理变化	操作复杂、创伤大、无法 同时间点里在保证相 对均一性的情况下大 量造模	
	LPS 腹腔注射：5~10 mg/kg ^[27]	造模后 4、	易操作、侵入性低、可快速	难以模拟多菌性脓毒症	过氧化酶活性、肺干
	LPS 静脉注射：10~20 mg/kg ^[27]	12、24 h	诱导脓毒症；可通过调 节剂量及注射方式控制 疾病严重程度	致急性肺损伤	湿重比、BALF 液 及血清中炎症因 子及蛋白水平 ^[15,26,31]
	LPS 气管内滴注：10~20 mg/kg ^[27]				
	气管内注射生物发光铜绿假单胞 菌溶液（5×10 ⁴ CFU/只） ^[30]	造模后 24 h	可直观检测感染部位、感 染严重程度	操作复杂、生物安全等 级高、仪器要求高	
	粪便溶液腹腔注射：浓度 75 mg/ mL；剂量 1 g/kg ^[29]	造模后 24 h	易操作，更接近临床多菌性 脓毒症致急性肺损伤的 病理变化	粪便溶液的制备难度 高、均一性差	
	CLP ^[27-28]	造模后 12、24 h	更接近临床脓毒症致急性 肺损伤的病理变化；模 型使用成熟，易于参考	操作复杂、创伤大、无法 同时间点里在保证相 对均一性的情况下大 量造模	

(续表)

脓毒症致急性肾损伤	LPS腹腔注射:10~15 mg/kg ^[33-34]	造模后12 h	易操作、侵入性低、易重复、可快速诱导脓毒症,利于肾损伤的观察	无法模拟多菌性或特定菌种脓毒症急性肾损伤的病理情况	血尿肌酐、尿素氮、肾脏病理切片 ^[39]
Sepsis-induced acute kidney injury, SA-AKI	盲肠匀浆腹腔注射+亚胺培南(1.5 mg/只, bid)抗感染 ^[33]	造模后24 h	接近临床脓毒症致急性肾损伤的病理情况、延长了实验动物的存活时间	盲肠匀浆制备难度高、均一性差	
	CLP+气管内滴注假单胞菌的二次打击(10 ⁷ /只) ^[36]	造模后24 h	可快速诱导更为严重的脓毒症致急性肾损伤、相关肾损伤指标水平更高	操作复杂、死亡率高	
脓毒症致急性肝损伤	LPS腹腔注射:10 mg/kg ^[41]	造模后6 h	易操作、侵入性低	难以模拟临床上多菌性脓毒症致急性肝损伤的病理情况	血清ALT、AST、肝脏匀浆中细胞因子水平、肝组织病理切片 ^[43]
Sepsis-induced acute liver injury, SI-AKI	LPS(100 μg/kg)+半乳糖胺(700 mg/kg)腹腔注射 ^[42]	造模后1、6 h	LPS联合半乳糖胺可较好的模拟临床脓毒症致急性肝损伤、减少LPS的用量	对药物浓度、剂量准确度要求较高	
	CLP ^[40]	造模后24 h	更接近临床脓毒症致急性肝损伤的病理变化	操作复杂、创伤大、无法同时时间点里在保证相对均一性的情况下大量造模	
脓毒症相关脑病	LPS腹腔注射:5~10 mg/kg ^[46]	造模后3 h	可快速诱导脓毒症相关脑病、对全身炎症反应以及免疫应答进行研究	难以模拟临床上多菌性脓毒症致脑病的病理情况	伊文思蓝染色评估血-脑脊液屏障通透性、水迷宫试验评估动物学习及记忆能力、测定脑组织样本中细胞因子水平、脑组织病理切片 ^[48-49]
Sepsis-associated encephalopathy, SAE	LPS双侧颅内注射:50 μg溶于10 μL脑脊液 ^[47]	造模后24 h	可引起慢性炎症并导致脑功能障碍	操作复杂、使用少难以参考	
	CLP ^[45]	造模后24 h	更接近临床脓毒症相关脑病的病理变化	操作复杂、创伤大、无法同时时间点里在保证相对均一性的情况下大量造模	

接给予LPS或者细菌造成损伤;采用荧光标记的细菌给药,观察感染部位及感染高峰期;通过小剂量LPS两次或多次打击,或LPS注射联合CLP的复合造模方式来降低造模失败率;感染后联合抗生素疗法,降低造模早期死亡,但因为抗生素使用造成的免疫干扰,仅适用于特定的研究内容。总之,为了更精准地满足脓毒症脏器损伤的研究需求,仍需不断探索、反复评价,以期脓毒症研究和临床诊疗提供更精准的基础依据。

[作者贡献 Author Contribution]

杨家豪负责文章构思设计与撰写;
丁纯蕾参与论文框架构思;
钱风华和陈雯参与文稿修改;
孙旗和姜旭升负责文献收集及整理;
沈梦雯指导论文写作及核定,并获得基金资助。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

[1] DE BACKER D, DEUTSCHMAN C S, HELLMAN J, et al. Surviving sepsis campaign research priorities 2023[J]. Crit Care Med, 2024, 52(2): 268-296. DOI: 10.1097/CCM.0000000000006135.

[2] SEYMOUR C W, LIU V X, IWASHYNA T J, et al. Assessment of clinical criteria for sepsis: for the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3) [J]. JAMA, 2016, 315(8):762-774. DOI: 10.1001/jama.2016.0288.

[3] MARGALIN B, ARFIJANTO M V, HADI U. Effector function and neutrophil cell death in the severity of sepsis with diabetes mellitus[J]. Narra J, 2024, 4(1): e532. DOI: 10.52225/narra.v4i1.532.

[4] RUDD K E, JOHNSON S C, AGESA K M, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the global burden of disease study[J]. Lancet, 2020, 395(10219):200-211. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)32989-7.

[5] XIE J F, WANG H L, 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. DOI: 10.1097/CCM.0000000000004155.

[6] CARABALLO C, JAIME F. Organ dysfunction in sepsis: an

- ominous trajectory from infection to death[J]. *Yale J Biol Med*, 2019, 92(4):629-640.
- [7] WANG J B, LIAO L M, CHEN Y, et al. A modified surgical sepsis model satisfying sepsis-3 and having high consistency of mortality[J]. *Shock*, 2023, 59(4): 673-683. DOI: 10.1097/SHK.0000000000002096.
 - [8] DRECHSLER S, OSUCHOWSKI M. Cecal ligation and puncture [M]//Walker J M. *Methods Mol Biol. New York: Humana*, 2021: 1-8. DOI: 10.1007/978-1-0716-1488-4_1.
 - [9] UTIGER J M, GLAS M, LEVIS A, et al. Description of a rat model of polymicrobial abdominal sepsis mimicking human colon perforation[J]. *BMC Res Notes*, 2021, 14(1): 14. DOI: 10.1186/s13104-020-05438-y.
 - [10] SHARMA A, KONTODIMAS K, BOSMANN M. The MAVS immune recognition pathway in viral infection and sepsis[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2021, 35(16): 1376-1392. DOI: 10.1089/ars.2021.0167.
 - [11] CHEUNG G Y C, BAE J S, OTTO M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*[J]. *Virulence*, 2021, 12(1): 547-569. DOI: 10.1080/21505594.2021.1878688.
 - [12] DICKSON K, LEHMANN C. Inflammatory response to different toxins in experimental sepsis models[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18):4341. DOI: 10.3390/ijms20184341.
 - [13] LIN H, JI F, LIN K Q, et al. LPS-aggravated Ferroptosis via Disrupting Circadian Rhythm by Bmal1/AKT/p53 in Sepsis-Induced Myocardial Injury[J]. *Inflammation*, 2023, 46(4): 1133-1143. DOI: 10.1007/s10753-023-01804-7.
 - [14] JAKOBSSON G, PAPAREDDY P, ANDERSSON H, et al. Therapeutic S100A8/A9 blockade inhibits myocardial and systemic inflammation and mitigates sepsis-induced myocardial dysfunction[J]. *Crit Care*, 2023, 27(1): 374. DOI: 10.1186/s13054-023-04652-x.
 - [15] BAER B, PUTZ N D, RIEDMANN K, et al. Liraglutide pretreatment attenuates sepsis-induced acute lung injury[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2023, 325(3): L368-L384. DOI: 10.1152/ajplung.00041.2023.
 - [16] LIU Y F, HU N D, AI B, et al. MiR-31-5p alleviates septic cardiomyopathy by targeting BAP1 to inhibit SLC7A11 deubiquitination and ferroptosis[J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2024, 24(1):286. DOI: 10.1186/s12872-024-03954-4.
 - [17] 胡立亚, 李培军, 常超, 等. 脓毒症心肌损伤小鼠模型的建立和评价[J]. *中华危重病急救医学*, 201830(4): 342-345. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.04.011.
HU L Y, LI P J, CHANG C, et al. Establishment and evaluation of mouse models of septic myocardial injury[J]. *Chin Crit Care Med*, 2018, 30(4):342-345. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.04.011.
 - [18] HAN X Y, LIU X, ZHAO X, et al. Dapagliflozin ameliorates sepsis-induced heart injury by inhibiting cardiomyocyte apoptosis and electrical remodeling through the PI3K/Akt pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 955:175930. DOI: 10.1016/j.ejphar.2023.175930.
 - [19] LIU A J, ZHANG Y L, XUN S C, et al. Targeting of cold-inducible RNA-binding protein alleviates sepsis via alleviating inflammation, apoptosis and oxidative stress in heart[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 122: 110499. DOI: 10.1016/j.intimp.2023.110499.
 - [20] DAO L, LIU H D, XIU R Z, et al. Gramine improves sepsis-induced myocardial dysfunction by binding to NF- κ B p105 and inhibiting its ubiquitination[J]. *Phytomedicine*, 2024, 125: 155325. DOI: 10.1016/j.phymed.2023.155325.
 - [21] ZENG Y C, CAO G D, LIN L, et al. Resveratrol attenuates sepsis-induced cardiomyopathy in rats through anti-ferroptosis via the Sirt1/Nrf2 pathway[J]. *J Invest Surg*, 2023, 36(1):2157521. DOI: 10.1080/08941939.2022.2157521.
 - [22] GUO L Y, LI P, WANG Y M, et al. Yiqifumai injection ameliorated sepsis-induced cardiomyopathy by inhibition of ferroptosis via xct/gpx4 axis[J]. *Shock*, 2024, 61(4): 638-645. DOI: 10.1097/SHK.0000000000002257.
 - [23] WAN T T, LI Y, LI J X, et al. ACE2 activation alleviates sepsis-induced cardiomyopathy by promoting MasR-Sirt1-mediated mitochondrial biogenesis[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2024, 752:109855. DOI: 10.1016/j.abb.2023.109855.
 - [24] LEE W J, CHEN Y L, CHU Y W, et al. Comparison of glutathione peroxidase-3 protein expression and enzyme bioactivity in normal subjects and patients with sepsis[J]. *Clin Chim Acta*, 2019, 489: 177-182. DOI: 10.1016/j.cca. 2017. 10.031.
 - [25] ZHANG H, LIU J L, ZHOU Y L, et al. Neutrophil extracellular traps mediate m6A modification and regulates sepsis-associated acute lung injury by activating ferroptosis in alveolar epithelial cells[J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(8):3337-3357. DOI: 10.7150/ijbs.69141.
 - [26] JIANG T, LIU E R, LI Z Y, et al. SIRT1-Rab7 axis attenuates NLRP3 and STING activation through late endosomal-dependent mitophagy during sepsis-induced acute lung injury[J]. *Int J Surg*, 2024, 110(5): 2649-2668. DOI: 10.1097/JS9.0000000000001215.
 - [27] ZHOU G, XIE D, FAN R, et al. Comparison of pulmonary and extrapulmonary models of sepsis-associated acute lung injury[J]. *Physiol Res*, 2023, 72(6): 741-752. DOI: 10.33549/physiolres.935123.
 - [28] JI A L, TRUMBAUER A C, NOFFSINGER V P, et al. Deficiency of acute-phase serum amyloid A exacerbates sepsis-induced mortality and lung injury in mice[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(24): 17501. DOI: 10.3390/ijms242417501.
 - [29] SORGUN O, ÇAKIR A, BORA E S, et al. Anti-inflammatory and antioxidant properties of betaine protect against sepsis-induced acute lung injury: CT and histological evidence[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2023, 56: e12906. DOI: 10.1590/1414-431X2023e12906.
 - [30] GUO J P, CHEN X H, WANG C, et al. Liraglutide alleviates acute lung injury and mortality in pneumonia-induced sepsis through regulating surfactant protein expression and secretion[J]. *Shock*, 2024, 61(4): 601-610. DOI: 10.1097/SHK.0000000000002285.
 - [31] YU Y J, LI Z X, LIU C, et al. Danlou tablet alleviates sepsis-induced acute lung and kidney injury by inhibiting the PARP1/

- HMGB1 pathway[J]. *Heliyon*, 2024, 10(9): e30172. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e30172.
- [32] ZARBOCK A, KOYNER J L, GOMEZ H, et al. Sepsis-associated acute kidney injury-treatment standard[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2023, 39(1):26-35. DOI: 10.1093/ndt/gfad142.
- [33] LV W Y, XUE L G, LIANG L, et al. Endotoxin induced acute kidney injury modulates expression of AQP1, P53 and P21 in rat kidney, heart, lung and small intestine[J]. *PLoS One*, 2023, 18(7): e0288507. DOI: 10.1371/journal.pone.0288507.
- [34] KIM M J, KIM Y S, KIM S R, et al. β -hydroxybutyrate ameliorates sepsis-induced acute kidney injury[J]. *Mol Biol Rep*, 2023, 50(11):8915-8923. DOI: 10.1007/s11033-023-08713-w.
- [35] LUO S, GONG J Z, ZHAO S Q, et al. Deubiquitinase BAP1 regulates stability of BRCA1 protein and inactivates the NF- κ B signaling to protect mice from sepsis-induced acute kidney injury[J]. *Chem Biol Interact*, 2023, 382: 110621. DOI: 10.1016/j.cbi.2023.110621.
- [36] MUNLEY J A, KELLY L S, GILLIES G S, et al. Narrowing the gap: preclinical trauma with postinjury sepsis model with increased clinical relevance[J]. *Shock*, 2023, 60(2): 272-279. DOI: 10.1097/SHK.0000000000002161.
- [37] FU Y, XIANG Y, WEI Q Q, et al. Rodent models of AKI and AKI-CKD transition: an update in 2024[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2024, 326(4): F563-F583. DOI: 10.1152/ajprenal.00402.2023.
- [38] LUO C J, LUO F, CHE L, et al. Mesenchymal stem cells protect against sepsis-associated acute kidney injury by inducing Gal-9/Tim-3 to remodel immune homeostasis[J]. *Ren Fail*, 2023, 45(1):2187229. DOI: 10.1080/0886022X.2023.2187229.
- [39] CAI J Z, TANG D, HAO X, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosome alleviates sepsis-associated acute liver injury by suppressing MALAT1 through microRNA-26a-5p: an innovative immunopharmacological intervention and therapeutic approach for sepsis[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1157793. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1157793.
- [40] WAN J, ZHANG Q, HAO Y L, et al. Infiltrated IL-17A-producing gamma delta T cells play a protective role in sepsis-induced liver injury and are regulated by CCR6 and gut commensal microbes[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023, 13: 1149506. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1149506.
- [41] ZHANG X, YUAN S L, FAN H, et al. Liensinine alleviates sepsis-induced acute liver injury by inhibiting the NF- κ B and MAPK pathways in an Nrf2-dependent manner[J]. *Chem Biol Interact*, 2024, 396:111030. DOI: 10.1016/j.cbi.2024.111030.
- [42] ARUNACHALAM A R, SAMUEL S S, MANI A, et al. P2Y2 purinergic receptor gene deletion protects mice from bacterial endotoxin and sepsis-associated liver injury and mortality[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2023, 325(5): G471-G491. DOI: 10.1152/ajpgi.00090.2023.
- [43] FU J N, LIU S C, CHEN Y, et al. Forsythiaside A alleviates lipopolysaccharide-induced acute liver injury through inhibiting endoplasmic reticulum stress and NLRP3 inflammasome activation[J]. *Biol Pharm Bull*, 2023, 46(7):979-986. DOI: 10.1248/bpb.b23-00137.
- [44] PAN S W, LV Z, WANG R, et al. Sepsis-induced brain dysfunction: pathogenesis, diagnosis, and treatment[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 1328729. DOI: 10.1155/2022/1328729.
- [45] GIRIDHARAN V V, GENEROSO J S, LENCE L, et al. A crosstalk between gut and brain in sepsis-induced cognitive decline[J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1):114. DOI: 10.1186/s12974-022-02472-4.
- [46] KALA, LEEMBURG S, JEZEK K. Sepsis-induced changes in spectral segregation and kinetics of hippocampal oscillatory states in rats[J]. *eNeuro*, 2023, 10(6): ENEURO.0002-23.2023. DOI: 10.1523/ENEURO.0002-23.2023.
- [47] LEE B, SUR B, PARK J, et al. Ginsenoside Rg3 alleviates lipopolysaccharide-induced learning and memory impairments by anti-inflammatory activity in rats[J]. *Biomol Ther*, 2013, 21(5):381-390. DOI: 10.4062/biomolther.2013.053.
- [48] QIU F, LIU Y M, LIU Y, et al. CD137L inhibition ameliorates hippocampal neuroinflammation and behavioral deficits in a mouse model of sepsis-associated encephalopathy[J]. *Neuromolecular Med*, 2023, 25(4): 616-631. DOI: 10.1007/s12017-023-08764-z.
- [49] QIN M B, GAO Y X, GUO S G, et al. Establishment and evaluation of animal models of sepsis-associated encephalopathy[J]. *World J Emerg Med*, 2023, 14(5): 349-353. DOI: 10.5847/wjem.j.1920-8642.2023.088.
- (收稿日期:2024-06-21 修回日期:2024-10-09)
(本文编辑:翟玉凤,富群华,丁宇菁,张萍)

[引用本文]

杨家豪, 丁纯蕾, 钱风华, 等. 脓毒症相关脏器损伤动物模型研究进展[J]. *实验动物与比较医学*, 2024, 44(6): 636-644. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.087.

YANG J H, DING C L, QIAN F H, et al. Research progress on animal models of sepsis-related organ injury[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2024, 44(6): 636-644. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.087.