

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.04.003

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20200910.1105.002.html\(2020-09-11\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20200910.1105.002.html(2020-09-11))

盲肠不同部位结扎穿孔致脓毒症模型的建立研究*

王圆圆, 陈 晴, 赵 晗, 王婧蓉, 何长江, 叶小利[△]

(西南大学生命科学学院, 重庆 400715)

[摘要] 目的 通过盲肠不同部位结扎穿孔致脓毒症模型的研究, 探索符合临床病理过程的脓毒症模型。

方法 50 只 KM 雄性 6 周龄小鼠分为 5 组, 空白对照(NC)组、假手术(Sham)组、轻度脓毒症(Min)组、中度脓毒症(Mod)组和重度脓毒症(Sev)组。Sham 组仅进行开腹、关腹程序; Min 组、Mod 组和 Sev 组以盲肠结扎穿孔术处理, 分别结扎盲肠 1/3、1/2、2/3(从盲肠远端起至回盲瓣)后, 建立脓毒症模型。评估并比较 24 h 内小鼠临床症状、生存状况及死亡率。同时, 解剖小鼠肝脏及盲肠组织, 苏木素-伊红(HE)染色观察形态变化。24 h 后进行小鼠眼眶取血, 检测炎症因子水平, 包括肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)。结果 Min 组小鼠死亡率达 20%, Mod 组达 40%, Sev 组达 90%。HE 染色显示肝脏及盲肠细胞肿胀, 组织毛细血管充血, 被炎症细胞浸润, 肝脏大量空泡脂肪样变性, 且病变程度 Sev 组最重, 其次为 Mod 组, Min 组最轻。Mod 组 TNF- α 、IL-6 水平较 NC 组明显升高($P < 0.05$)。结论 Mod 模型是符合临床的 1 种理想动物模型。

[关键词] 脓毒症; 盲肠结扎穿孔术; 小鼠; 死亡率; 细胞因子类

[中图分类号] R-33

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2021)04-0552-05

Study on sepsis model caused by ligation and perforation in different parts of cecum*

WANG Yuanyuan, CHEN Qing, ZHAO Han, WANG Jingrong, HE Changjiang, YE Xiaoli[△]

(School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

[Abstract] **Objective** Through the study of septic models caused by ligation and perforation in different parts of cecum, a clinicopathological sepsis model was explored. **Methods** Fifty 6-week-old km male mice were divided into five groups, the namely blank control (NC) group, the Sham operation (Sham) group, the minor sepsis (Min) group, the moderate sepsis (Mod) group and the severe sepsis (Sev) group. Only laparotomy and abdomen-closing procedures were performed in the Sham group. The Min, Mod and Sev group were treated with cecal ligation and puncture. After ligation of the cecum 1/3, 1/2 and 2/3 (from the distal cecum to the ileocecal valve), the sepsis model was established. The clinical symptoms, survival status and mortality of the mice within 24 h were subsequently graded and compared. After 24 h, orbital blood was taken, and the expression levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) were measured. Liver and cecum tissues were dissected, and hematoxylin-eosin (HE) staining was performed to observe morphological changes. **Results** The mortality rate of mice in the Min group was 20%. The Mod group had a mortality rate of 40%. The mortality rate of the Sev group was 90%. HE staining showed swelling of liver and cecum cells, hyperemia of tissue capillaries, infiltration by inflammatory cells, massive vacuolated steatosis of liver, and the degree of lesion was the highest in the Sev group, followed by the Mod group, and the lowest in the Min group. The levels of TNF- α and IL-6 in the Mod group were significantly different ($P < 0.05$). **Conclusion** The moderate sepsis model is an ideal animal model for clinical compliance.

[Key words] sepsis; cecal ligation and puncture; mice; mortality; cytokines

脓毒症是指由感染引起的全身炎症反应综合征, 是烧伤、创伤、感染、休克等临床急危重患者的严重并

发症之一, 其发生率、病死率均较高。脓毒症可进一步发展为重症脓毒症、脓毒症休克、多器官功能障碍

综合征(MODS)^[1-2]。有调查显示脓毒症已成为重症监护病房仅次于心脏病的主要死亡原因^[3]。研究发现脓毒症的发病机制、病理生理机制是十分复杂的,不仅包括宿主、免疫、炎症及凝血功能异常等多个方面,同时还涉及许多器官及系统,也包括信号通路的参与。尽管已有许多文献研究、临床病理深入观察,但其作为一种失调的免疫过程,一系列炎症反应、凝血功能障碍的发生,阻碍了提升救治水平、降低死亡率的进展。因此,积极寻找针对性措施阻止病情的发展,深入探讨脓毒症发生、发展的病理生理机制是极重要的。

盲肠结扎穿孔术(cecal ligation and puncture, CLP)被认为是进行脓毒症研究的金标准^[4],CLP 模型已有 30 多年的应用历史,是研究脓毒症潜在机制的理想模型^[5],主要优点是能够诱导不同严重程度的脓毒症^[6]。现有证据表明,炎症反应随着脓毒症的严重程度而变化,这在很大程度上取决于盲肠结扎的程度^[1,7]。本实验拟通过对小鼠进行不同程度的 CLP,以诱发不同严重程度的脓毒症,比较其病理变化程度,并对手术操作步骤进行改良,分析诱导脓毒症的标准程序,综合评估更符合临床病理过程的脓毒症模型,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

无特殊病原体(SPF)级 KM 雄性 6 周龄小鼠 50 只,体重 35~42 g,由重庆腾鑫生物技术有限公司提供。小鼠平衡饲养 5 d,饲养于西南大学药学院 SPF 级动物实验中心[SYXK(渝)2014-0002]。饲养条件:温度 23~24 ℃,湿度(50±10)%,12 h 光照/黑暗循环,自由饮水摄食。ELISA 试剂盒[肿瘤坏死因子- α (TNF- α , SU-BN20852)、白细胞介素-6 (IL-6, SU-

BN20188)]购于福建省泉州市睿信生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

实验分 5 组:空白对照(NC)组,假手术(Sham)组,以及根据盲肠的结扎部位分为轻度脓毒症(Min)组、中度脓毒症(Mod)组和重度脓毒症(Sev)组,每组 10 只;NC 组不做任何处理,Sham 组仅行开腹、关腹程序。

1.2.2 手术方法

用 10%水合氯醛麻醉小鼠,使用脱毛膏/电动修剪器剃掉小鼠腹部的毛,并用 75%乙醇及聚维酮碘消毒该区域。在腹白线靠右切开腹腔约 2 cm,找出盲肠后用 5-0 缝线分别结扎盲肠的不同位置(图 1);Min 组盲肠结扎程度为 1/3(图 2A)、Mod 组为 1/2(图 2B)、Sev 组为 2/3 盲肠(图 2C),以 21G 针头贯通穿刺结扎的盲肠 2 次。为确保通畅,用消毒镊子适度挤压让微量肠内容物从穿刺孔溢出;将处理好的盲肠回纳入腹腔,缝合内层用 5-0 缝线,闭合外层用 3-0 缝线,见图 3。在 15 min 内完成每只小鼠的手术流程。待小鼠苏醒后自由饮水,正常饲养,并观察记录小鼠生理状况。

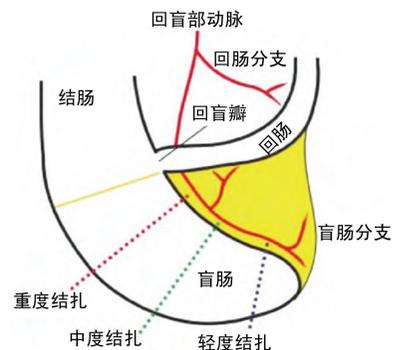


图 1 盲肠结扎部位示意图



A:Min 组;B:Mod 组;C:Sev 组。

图 2 不同组别盲肠结扎部位示意图

1.2.3 观察指标

(1)评估 24 h 内小鼠临床症状、生存状况;(2)各组死亡率比较;(3)解剖小鼠肝脏及盲肠组织,苏木素-

伊红(HE)染色观察形态变化;(4)24 h 后进行小鼠眼眶取血,检测炎症因子水平,包括 TNF- α 、IL-6。

1.3 统计学处理

采用 Origin7.5 软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间采用单因素方差分析, 组内两两比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组临床症状观察

NC 组: 反应敏捷, 精神、食欲、大小便均正常, 毛发均匀光泽。Sham 组: 苏醒后精神较好, 小鼠大多舔舐伤口, 能自由进行取食、饮水等活动。Min 组: 苏醒时间与假手术组相差不大, 醒后身体蜷缩, 基本不活动, 进食减少, 进水频率较高, 对外界反应较迟钝, 呼吸频率加快, 大部分小鼠扎堆取暖, 排便部分呈现黏着状态。12 h 后没有小鼠死亡, 20 h 后小鼠开始死亡, 24 h 后死亡率约 20%。Mod 组: 苏醒延迟, 醒后

精神萎靡, 身体蜷缩, 基本不活动, 进食、进水减少, 大便稀软, 体温明显降低, 小部分小鼠扎堆取暖。12 h 内有部分小鼠死亡, 12 h 后小鼠死亡数目增多, 24 h 后死亡率约 40%。Sev 组: 所有小鼠不再扎堆取暖, 12 h 内死亡率达 90%。剖腹可见恶臭味血性渗液, 肠管水肿粘连, 盲肠坏死变黑。

2.2 各组死亡率比较

24 h 内, 盲肠结扎程度为 1/3 的 Min 组, 其死亡率约为 20%; 盲肠结扎程度为 1/2 的 Mod 组, 死亡率为 40%; 盲肠结扎程度为 2/3 的 Sev 组, 小鼠死亡率为 90%。Min 组的致死高峰期相比于 Mod 组, 会在更晚期出现, Sev 组的死亡高峰集中于前 12 h。



A: 麻醉并脱毛; B: 切开腹腔; C: 找出盲肠; D: 盲肠结扎; E: 穿孔; F: 缝合。

图 3 小鼠结扎穿孔流程示意图

2.3 HE 染色结果分析

光镜下结果显示, NC 组小鼠盲肠组织、肝组织形态正常, 组织纤维结构排列紧密; Sham 组小鼠与 NC 组差异不大。Mod 组小鼠盲肠组织结构有严重损伤, 出血和细胞坏死脱落, 白细胞浸润, 肠部黏膜水肿, 细胞边界模糊; 肝脏组织结构被破坏, 出现急性炎症损伤, 微血栓、淤血及空泡脂肪样变性, 少数细胞有轻微水肿; 病理变化程度 Sev 组最重, Min 组最轻。结果显示, 不同结扎部位皆能诱导小鼠感染脓毒症, 且病变程度随着结扎程度的加深而加重, 但 Mod 组效果

呈现最为典型, 见图 4。

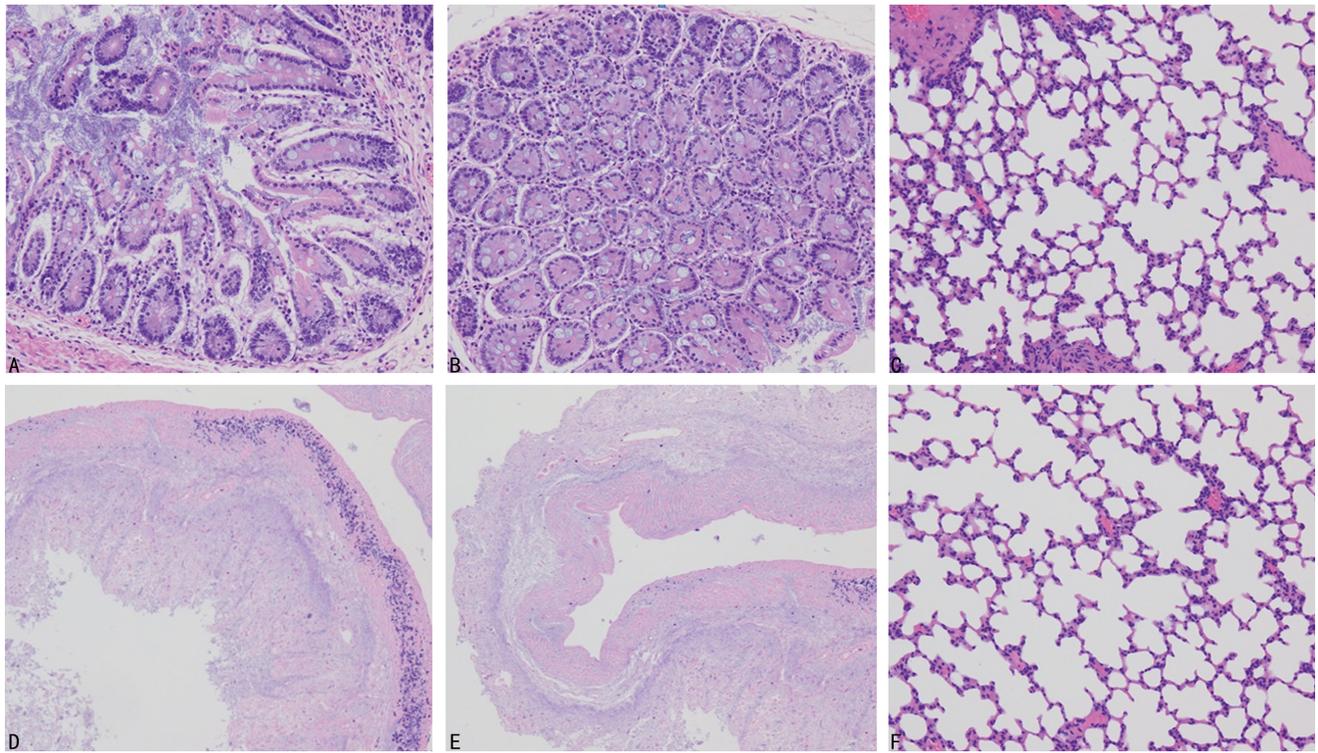
2.4 各组炎症因子水平比较

与 NC 组比较, Sham 组 IL-6、TNF- α 水平无明显变化 ($P > 0.05$), Mod 组 IL-6、TNF- α 水平明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 各组炎症因子水平比较 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	IL-6	TNF- α
NC 组	19.33 \pm 0.73	170.24 \pm 6.91
Sham 组	21.75 \pm 1.71	173.20 \pm 4.33
Mod 组	36.56 \pm 1.72 ^a	298.52 \pm 9.97 ^a

^a: $P < 0.05$, 与 NC 组比较。



A,B:NC 组小鼠盲肠组织;C:NC 组小鼠肝脏组织;D,E:Mod 组小鼠盲肠组织;F:Mod 组小鼠肝脏组织。

图 4 HE 染色结果分析(×200)

3 讨 论

脓毒症及其引起的脓毒症休克和多器官衰竭病情凶险,会引发多系统功能障碍^[8],是 ICU 患者死亡的重要原因^[9]。研究显示许多存活脓毒症患者合并不同程度的免疫抑制,机体表现出持续低水平炎症反应及进展性免疫抑制等免疫失衡状态^[10]。

在脓毒症早期,为发挥对机体的保护作用,心、脑、肺、肝和肾等多个重要器官中自噬开始被诱导,后期随着免疫细胞功能抑制,机体进入持续的免疫抑制期。且研究发现,用自噬抑制剂来阻断自噬,则在脓毒症发病前期 4~6 h,脂多糖诱发炎症加深,使得器官功能受损,呈现为组织器官损伤,也进一步导致小鼠死亡率升高。再者,脓毒症中出现机体自我防御的炎症反应,其中有重要的诱导促凝血作用的是多种细胞炎性因子^[11],其大量释放,通过促凝作用引起微循环障碍,造成脓毒症免疫抑制及功能紊乱,细胞因子分泌失调^[1,7]。炎症诱导凝血反应,而凝血的激活又促进炎症反应,全身炎症反应则加重凝血激活和级联反应。脓毒症病发过程中,其释放的细胞因子转变为抗炎和促炎两大类,促炎细胞因子主要在早期脓毒症病理变化中产生,主要包括 TNF- α 、IL-2、IL-6 等,抗炎介质有 IL-4、IL-10、IL-13。其中 TNF- α 是炎症早期最主要的促炎细胞因子^[12],是内毒素损伤效应的关键介质,介导作用于凝血过程及相关通路变化^[13]。IL-6 是在其他炎性因子作用下产生的炎性介质,是促炎递质的核心成员。有研究表明,IL-6 水平可以作为反映感染严重程度的指标,且直接与脓毒症的预后相

关^[14]。同时,在凝血过程中血小板的激活可以导致某一种配体 CD40 的释放,这种配体可促使 IL-6 合成增加,表明炎症通路的确立是脓毒症患者病理机制的关键。

本研究中,优化后的 CLP 脓毒症模型也存在缺点,即评价模型是否成功建立的指标比较局限^[15]。传统的 CLP 手术步骤,对于针孔大小、结扎穿孔位置及程度等被证实决定最终死亡率的指标进行了标准化^[16],不同结扎穿孔的脓毒症模型虽皆能诱导小鼠感染脓毒症,且病变程度随着结扎程度的加深而加重,但 Min 组小鼠病变程度较低,Sev 组小鼠病变程度较重,且病发速度过快,小鼠死亡率较高,检测急性炎症因子水平和验证模型成功率往往难以实现,故两者都难以对比模拟临床病症的真实情况。而 Mod 组效果明显,且小鼠病发速度可控,呈现状态最为典型,是进行脓毒症致病机制研究和抗炎药物筛选较好的动物模型。本实验虽探究了不同程度盲肠结扎穿孔的死亡率,但模拟临床脓毒症模型的建立还需在此基础上进一步探索,方便推广与应用。

本课题组对 CLP 的标准化手术流程进行改进,有以下 2 点总结:(1)传统 CLP 往往采用 1~2 cm 的中线缝合来完成手术,对于月龄较小、体重较小的小鼠易造成术中死亡或术后局部切口感染,小鼠死亡率由此增高。本项实验通过改变切口位置至中线偏右 3~5 mm,使对盲肠进行操作时手术视野更优,从而缩小了手术切口。通过观察发现,手术切口越小,无关感染率越低,小鼠术后苏醒越快,而缩小后的手术

切口所带来的弊端则是手术过程中盲肠组织难以被发现和进行手术处理,需要操作者仔细观察。同时,在实验操作中,发现因小鼠生理差异,存在少数盲肠末端位于腹腔左侧,压于组织器官之下,给实验操作带来极大难度,需要加大手术切口寻找盲肠位置,极易造成其他黏膜、组织出血或损伤。SOMMER 等^[17]曾对 CLP 小鼠模型的切口愈合状况进行了研究,发现在脓毒症模型组中,小鼠切口愈合能力下降,不仅使 CLP 术后伤口愈合时间延长,而且会影响远处伤口的愈合。因此,在脓毒症动物模型手术过程中,可在实验前通过光照对比,大致确定盲肠末端位置(光下呈明显灰黑色)后,在实验时缩小手术切口,集中于观测到的盲肠末端,可有效缩短实验时间,降低术后切口局部的感染风险。(2)严格控制实验时间,把握手术流程的标准化。掌握从剪开外皮至缝闭外皮的耗时 15 min,除必要的寻找盲肠、结扎穿孔需要耗费 10 min,可通过减少缝闭小鼠外皮伤口的方法来缩短手术时间。已有研究显示可用金属伤口闭合夹进行外皮的闭合处理,故而在正式实验中,本实验对部分小鼠进行金属伤口闭合夹的试用,具体为术前用 75%乙醇及聚维酮碘浸泡 15 min,再进行内皮 5-0 缝线缝闭、闭合外层用 3-0 缝线,结果发现能有效缩短手术时间至 15 min 内,同时减少了外皮缝合中可能出现的出血、感染情况。

综上所述,本研究采用 CLP 建立脓毒症小鼠模型,其中 Mod 模型是一种理想的动物模型。此外,通过炎症因子作用通路,分子对接表达也可以作为判断感染的指标之一,有助于脓毒症的诊断和治疗,为进一步靶向治疗脓毒症提供了新的研究方向。

参考文献

- [1] 刘丽红,王永芳. 头孢哌酮舒巴坦治疗脓毒血症可有效降低患者的炎症因子、Pro-ADM、MIF 水平[J]. 基因组学与应用生物学,2018,37(9):4082-4087.
- [2] BRAUN D. A retrospective review of the sepsis definition after publication of sepsis-3[J]. *Am J Med*,2019,132(3):382-384.
- [3] 陈小卫,谢晓斌. 脓毒血症患者临床特征及其感染的肺炎克雷伯菌耐药机制分析[J]. 中国病原生物学杂志,2019,32(4):473-476.
- [4] DEJAGER L, PINHEIRO I, DEJONCKHEE RE E, et al. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis [J]. *Trends Microbiol*,2011,19(4):198-208.
- [5] 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.
- [6] TANG C W, FENG W M, DU H M, et al. Delayed administration of D-Ala2-D-Leu5-enkephalin, a delta-opioid receptor agonist, improves survival in a rat model of sepsis[J]. *Tohoku J Exp Med*,2011,224(1):69-76.
- [7] BRAUN D. A retrospective review of the sepsis definition after publication of sepsis-3[J]. *Am J Med*,2019,132(3):382-384.
- [8] 李锦灵,黄树武,张钰,等. 大鼠脓毒症模型的凝血功能研究[J]. 中国实验动物学报 2018,26(2):224-229.
- [9] 王宝权,李男,付海燕,等. 重症医学科脓毒症和脓毒性休克患者影响预后相关因素分析[J]. 中国感染与化疗杂志,2019,19(5):499-504.
- [10] 苏和毅,莫泽珣,刘星,等. 内科重症监护病房中继发持续性炎症-免疫抑制-分解代谢综合征的老年脓毒症患者回顾性分析[J]. 中华老年医学杂志,2019,38(8):869-874.
- [11] ZHAO Y, JIA Y, LI C, et al. The risk stratification and prognostic evaluation of soluble programmed death-1 on patients with sepsis in emergency department [J]. *Am J Emerg Med*,2018,36(1):43-48.
- [12] AKGÜN B, OZTURK S, ARTAS G, et al. Effects of intrathecal caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on IL-6 and TNF- α levels and local inflammatory responses in spinal cord injuries [J]. *Turk Neurosurg*,2018,28(4):625-629.
- [13] 廖源,屈萌艰,刘静,等. 超短波对大鼠急性肺损伤炎症反应的影响[J]. 中国组织工程研究,2021,25(2):253-257.
- [14] 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.
- [15] TAI LH, ANANTH A A, SETH R, et al. Sepsis increases perioperative metastases in a murine model [J]. *BMC Cancer*,2018,18(1):277.
- [16] 陈海鸣,韦华璋,朱建光,等. 脓毒症小鼠脾脏 CD4⁺ T 细胞 miR-142-3p 的表达与其意义[J]. 江西医药,2020,55(8):1021-1023.
- [17] SOMMER K, SANDER A L, ALBIG M, et al. Delayed wound repair in sepsis is associated with reduced local pro-inflammatory cytokine expression [J]. *PLoS One*,2013,8(9):e73992.