

蕨麻小型猪与巴马小型猪高原多脏器 功能障碍综合征模型的比较研究

牛廷献, 郭晓宇, 申 健, 王红义, 陆 璐, 肖 攀, 冯小明

(兰州军区兰州总医院, 兰州 730050)

【摘要】 目的 比较不同海拔地区两种小型猪高原多脏器功能障碍综合征(H-MODS)模型存在的差异, 探讨建立H-MODS模型的理想动物。方法 利用高原土生蕨麻小型猪与平原巴马小型猪, 以内毒素(LPS)建立H-MODS模型。检测不同时点血液生理生化指标的变化, 并观察肺脏组织病理学变化。结果 巴马小型猪模型的死亡率明显高于蕨麻小型猪; 生理生化各指标的变化基本相同, 但蕨麻小型猪的变化较平缓。在24 h与48 h肺脏均出现严重病理改变, 但巴马小型猪较蕨麻小型猪更严重。结论 不同海拔地区的两种小型猪均可成功建立H-MODS模型, 同时蕨麻小型猪由于自身高原生物特性对H-MODS模型的复制更加准确安全, 避免高原环境的外在因素的影响。

【关键词】 高原多脏器功能障碍综合征模型; 蕨麻小型猪; 巴马小型猪; 比较

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 04-0033-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.004.007

Comparison of the Bama minipig and Juema minipig models of high altitude multi-organ dysfunction syndrome

NIU Ting-xian, GUO Xiao-yu, SHEN Jian, WANG Hong-yi,

LU Lu, XIAO Pan, FENG Xiao-ming

(Department of Animal Experiment, Lanzhou General Hospital of
PLA Lanzhou Military Command, Lanzhou 730050, China)

【Abstract】 Objective To compare the Bama minipig and Juema minipig models of high altitude multi-organ dysfunction syndrome. **Methods** Six plateau-origin Juema minipigs and plain-origin Bama minipigs in each group received intravenous infusion of 0.35 mg/kg lipopolysaccharide (LPS), respectively. Blood samples were taken at 0 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h and 72 h after LPS infusion. Routine blood test was performed, blood CK, AST, ALT, TBIL, CRE were assayed, and histopathological examination of the lung tissues was performed at 24 h, 48 h after LPS infusion. **Results** The mortality of Bama minipigs was 33.3%, higher than that of 16.7% of Juema minipigs. The trend of physiological and biochemical changes was similar, but was milder in the Juema minipigs than in Bama minipigs. The lung injuries of the Bama minipigs at 24 h and 48 h were more severe than those in the Juema minipigs. **Conclusions** Both Bama and Juema minipig models of high altitude multi-organ dysfunction syndrome can be successfully established. Juema minipig models can be more closely and safely established, due to its own plateau biological properties, and avoid the influence by extrinsic

[基金项目] 甘肃省技术与开发专项计划(1205TCYA010)。

[作者简介] 牛廷献(1966-),男,主任技师,主要研究方向:人类疾病动物模型的建立及相关研究。E-mail: niutx10000@163.com。

[通讯作者] 冯小明(1980-),男,主管技师,主要研究方向:实验动物质量控制及开发研究。Email: fxm8006@163.com。

injurious effects of plateau environment.

【Key words】 High altitude multi-organ dysfunction syndrome; Juema minipig; Bama minipig; Animal model

我国高原地区急性重型高原病并发多脏器功能障碍综合征 (multiorgan dysfunction syndrome, MODS) 的发病率较高^[1,2]。高原地区发生 MODS (H-MODS) 后虽然在本质上与平原 MODS 没有差别,但从平原进驻高原后随着海拔高度的上升,以缺氧的环境因素逐渐成为主要影响因素。从而不同程度地改变了 MODS 的发病过程、临床特征和预后,使其治疗方案也随之发生了显著变化^[3]。而 H-MODS 在治疗中的不确定因素比平原地区更多、变数更大,使得难以全面细致观察 H-MODS 患者病情变化的全过程。H-MODS 动物模型是研究其发病机制和临床防治的基础,但目前研究所使用的实验动物均为低海拔或中度海拔生长培育的^[4-7],不具有高原生物学特性。在建立高原疾病模型时,不同海拔地区的动物对所建模型的质量是否存在差异未见报道。而在研究中低海拔地区生长的实验动物自身会出现不同程度的高原反应,受高原环境的外在因素的影响很大,这就难免使得实验结果出现一些误差。对此,本研究采用高原藏麻小型猪和巴马小型猪建立 H-MODS 模型,以研究二者对模型质量存在的差异,寻求建立 H-MODS 模型理想的实验动物。

1 材料和方法

1.1 动物与试剂

藏麻小型猪与巴马小型猪各 6 只,雌雄各半,体重 15 kg 左右,分为藏麻小型猪 (JM) 组和巴马小型猪 (BM) 组。藏麻小型猪为兰州军区总医院动物实验科培育,巴马小型猪购自第四军医大学动物实验中心 (生产许可证: SCXK (军) 2012-006)。氯胺酮 (国药准字: H35020148, 福建古田药业有限公司), 地西洋注射液 (国药准字: H12020957, 天津金耀氨基酸有限公司), LPS (血清型为: O127: B8, 批号为 64H4010, 美国 Sigma 公司)。生化分析仪: Beckman 公司, Coulter LX20。

1.2 模型建立

制模方法参照文献^[4,8], 本实验在海拔 3500 m 的甘南桑科草原进行, 将猪运输到目的地之后, 休整 3 d 待动物的状态稳定之后再行实验。JM 和 BM 均采用氯胺酮 (6 mg / kg) 联合安定 (0.5 mg / kg) 进行肌肉注射麻醉, 同时肌肉注射阿托品 (0.05

mg / kg)。两组猪麻醉后经耳静脉泵入脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) (0.35 mg / kg, 30 min 内泵完)。

1.3 血常规和血清生化指标的测定

血常规及各项生化指标的检测均由本院检验科完成。分别于 0、3、6、12、24、48 和 72 h 经颈静脉采血, 测定血液血常规: 红细胞计数 (RBC)、白细胞计数 (WBC)、血红蛋白 (HGB)、红细胞积压 (HCT)、红细胞平均体积 (MCV)、红细胞平均血红蛋白含量 (MCH)、血小板 (PLT) 等和血清生化指标: 肌酸激酶 (CK)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、丙氨酸转氨酶 (ALT)、总胆红素 (TBIL) 和肌酐 (CRE)。

1.4 MODS 的诊断标准

参照胡森等^[8,9]提出的动物发生 MODS 时各个器官功能障碍分期诊断标准和评分标准。在注射 LPS 后出现 2 个或 2 个以上器官或系统功能障碍判定为 MODS。

1.5 统计学方法

数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 利用 SPSS 17.0 统计分析软件对数据进行处理, 两组之间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 体征表现

JM 组猪麻醉后由耳静脉泵入 LPS, 30 min 内输完, 1 h 后 JM 猪开始转醒但是倒卧不起, 呼吸及心率增快, 并出现腹胀、发热、尿频; 苏醒后四肢无力倒卧, 无食欲, 精神萎靡, 呼吸急促; 8 ~ 10 h 后 JM 组猪站立行走, 开始采食, 精神状态良好, 基本恢复正常; 其中 1 头 JM 组猪在 4 h 因呼吸窘迫、心律、继之心衰死亡。BM 组猪的体征表现与 JM 组相比出同样症状但更严重; BM 组猪麻醉并在 30 min 内输完 LPS, 1 h 后还处于昏迷状态, 2 h 后开始转醒但倒卧不起, 呼吸及心率增快, 并出现腹胀、发热、尿频, 无食欲, 精神萎靡; 5 h 与 14 h 分别有 1 只猪出现死亡; 12 ~ 16 h 后 JM 组猪站立行走, 开始采食, 精神状态良好, 基本恢复正常。JM 组与 BM 组猪死亡率分别为 16.7% 和 33.3%。

2.2 生化水平比较

藏麻小型猪与巴马小型猪生化水平比较结果见图 1。其 CK、AST 变化趋势两者是相同的, 0 h ~ 6 h 急剧上升, 12 h ~ 24 h 达到最大, 之后又开始下降至

72 h 基本恢复正常,两者的表达水平也是非常的相近(见图 1-1,1-2)。JM 组 ALT 在 48h 后略呈下降趋势,BM 组变化趋与水平(见图 1-3);BM 组 TBIL 水平在 0h 高于 JM 组并一直上升,24 h 达到最大,24~48 h 急剧下降;JM 组水平低于 BM 组,0 h~12 h 其变化基本趋于水平,12 h~48 h 与 BM 组相同具有先升高后降低的趋势,但是变化幅度很小(见图 1-4)。BM 组 CRE 水平高于 JM 组,且在 0 h~3 h 略有降低,在 3 h~12 h 开始上升,之后缓慢降低;JM 组水平变化平缓并趋于水平(见图 1-5)。

2.3 血常规水平比较

蕨麻小型猪与巴马小型猪血常规水平比较结果见图 2。两者 WBC、RBC、PLT 变化趋势是相同的,WBC 在 0 h~3h 急剧下降,6 h~24h 急剧上升,24 h~72h 又开始下降(见图 2-1);RBC 在 0 h~3 h 基本没有变化,在 3 h~6h 上升,6 h~24 h 下降,24 h

~72 h 又开始上升(见图 2-2);PLT 水平变化趋势是先下降后升高(见图 2-3)。尽管两者 WBC、RBC、PLT 变化趋势是相同,但是 JM 组变化幅度较 BM 组相对平缓,此外 WBC 与 RBC 水平 JM 组在 0 h 要高于 BM 组,但是 0 h PLT 水平 BM 组高于 JM 组。其余血常规指标两者之间没有明显的区别。

2.4 肺组织病理变化比较

巴马小型猪与蕨麻小型猪 24 h(A、B)、48 h(C、D)及正常对照(E、F)肺组织病理切片如图 3 所示。A 肺泡腔无渗出,均匀一致,支气管腔完整,肺泡上皮细胞排列整齐,毛细血管扩张充血,有少量红细胞渗出;B 肺泡结构基本完整,毛细血管无扩张,无水肿,无红细胞拥堵现象,肺泡间隔增宽,部分肺泡上皮细胞排列杂乱。C 肺泡腔内弥散性淤血,有大量红细胞渗出及少量中性粒细胞浸润,巨噬细胞增多,肺泡间隔增宽,毛细血管扩张充血;D 肺泡腔内

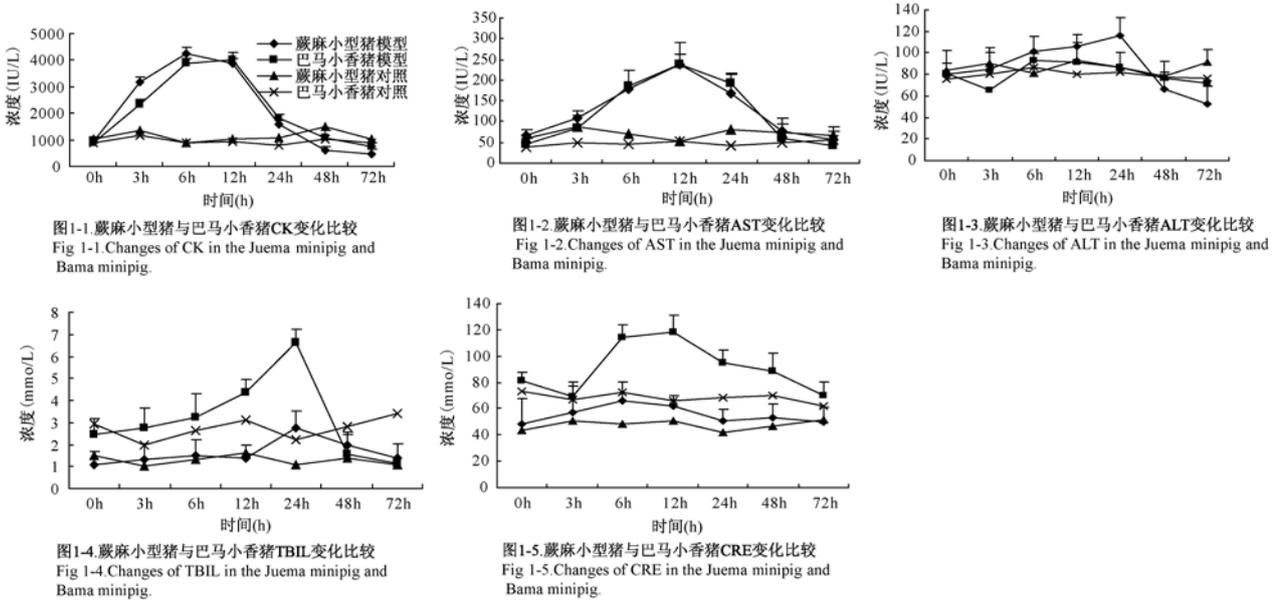


图 1 蕨麻小型猪与巴马小型猪生化指标变化比较

Fig. 1 Changes of biochemistry in the Juema minipig and Bama minipig.

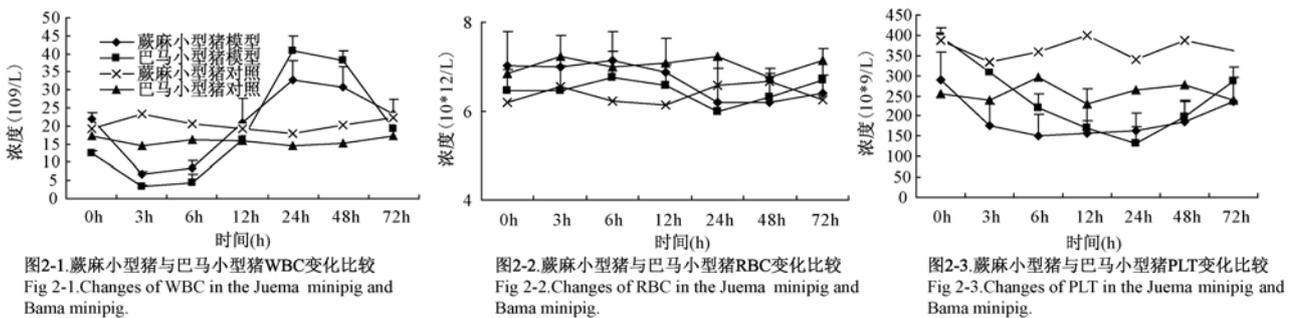


图 2 蕨麻小型猪与巴马小型猪生化指标变化比较

Fig. 2 Changes of blood WBC, RBC and PLT in the Juema minipig and Bama minipig.

有轻微出血,肺泡壁模糊,有少量红细胞渗出,肺泡间隔略有增厚。E 和 F 肺组织结构未见异常改变(图 3 封二)。

3 讨论

高原藏麻小型猪生长于我国青藏高原甘南藏族自治州合作地区。由于生存在恶劣高寒气候和低劣的饲养条件下,使其具有适应高原环境的独特的生物学特性。并且长期以来在封闭环境中自繁自养免受外来血缘的杂交影响,从而它形成了一个稳定的原始的地方小型猪种。它生长缓慢、体形矮小、繁殖能力强,是典型的高原小型猪种之一^[10]。在高原地区,伴随着海拔的增高,低氧、低压环境等影响因素也在加强,促使 MODS 发生发展也急骤加快,因而选择合适的动物建立模型,可以更准确的了解高海拔地区 MODS 的演变规律,病理变化特点,对高海拔地区 MODS 早期诊断、早期治疗提供重要的参考依据。本研究采用高原土生藏麻小型猪和巴马小型猪建立 H-MODS 模型进行对比分析,研究高原医学与实验动物的高原特性之间关系。

在 MODS 的研究中,采用大小鼠、兔及大型动物如绵羊和犬等均可用于建立 MODS 模型^[11-13],大、小鼠对内毒素敏感性较差,解剖结构与人差别较大,不是理想的模型动物;兔虽然对内毒素敏感性好,但死亡率很高;而小型猪在疾病发病机理、生理学、解剖学等方面与人相似度很高,从而成为研究人类疾病理想的实验动物^[14-18],利用小型猪建立 MODS 模型能够更加真实地模拟病理变化和临床特征。

本研究选择具有高原特性的藏麻小型猪与巴马小型猪在相同条件下建立高原 MODS 动物模型,两者均可以在小剂量 LPS 作用下就能形成全身性炎症反应(SIRS),继而诱发 MODS^[19]。两者建模后 CK、AST 变化趋势两者是相同的,先急剧增高然后再下降至 72h 基本恢复正常,两者 ALT、TBIL 及 CRE 变化基本相同,并且两者的表达水平也是非常的相近,但是 TBIL 和 CRE 的变化趋势藏麻猪较小型猪平缓一点。WBC 在 0~3 h 急剧下降,6 h~24h 急剧上升,24 h~72 h 又开始下降,与绵羊高原 MODS 模型的变化规律完全吻合^[20],虽然两者 WBC、RBC、PLT 变化趋势相同,但是 JM 组变化幅度较 BM 组相对平缓。

研究发现,内毒素继发的全身炎症在高海拔地

区反应明显比低海拔地区严重,同时高原地区 MODS 所引起的死亡率^[21]、肺部损伤病理改变也比亚高原地区明显严重^[5]。本研究采用平原动物与高原地区动物分别建立高原 MODS 模型都引起严重的肺部损伤,在 48 h 肺部病理变化最为严重,肺脏均出现不同程度的充血水肿,肺泡腔内淤血,红细胞渗出,肺泡间隔略有增厚等明显的病理特征,但是藏麻小型猪的病理变化较巴马小型猪略微小,而且两组死亡率藏麻小型猪明显低于巴马小型猪。这可能与高原 MODS 中性粒细胞在低氧环境暴露下功能改变密切相关,研究发现在急性缺氧环境下中性粒细胞趋化能力加剧,体现在常氧对照组中性粒细胞伪足长度小于急慢性缺氧组^[22]。同时,在高海拔地区,由于低氧应激因素的存在,MODS 模型表现出病理损伤较中度海拔地区严重,然而在主要的损伤器官中,肺损伤尤其明显,可能是在 LPS 诱导的 MODS 发生发展中,伴随着早期炎症介质大量释放而引起肺泡毛细血管膜过渡炎症反应。有研究报道,在相同内毒素剂量诱导下,高海拔地区建立动物模型时所引起机体的病理损伤比中度海拔地区严重,这就反应了外在的低氧环境可能会推动病情的发展^[5]。

因此,在建立高原疾病模型实验动物的选择中,由于不同的实验动物具有不同的生物学特性,对于高原低氧环境的适应能力不同,所以在建立疾病模型时,非高原性实验动物受高原低氧环境的影响更大。这也就提示在高原疾病的研究中选用高原特性实验动物将更准确的模拟疾病发生发展特点的同时可避免外在的打击因素而引起的死亡。

参考文献:

- [1] 周其全,刘福玉,郑必海,等. 3184 例重型急性高原病患者并发多器官功能障碍综合征的结果分析 [J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(1): 362-401.
- [2] 周其全,刘福玉,郑必海,等. 白细胞与白细胞介素增高在急性高原病并发多器官功能障碍中的作用及临床意义 [J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(10): 5882-5921.
- [3] 张世范,刘毅,高炜,等. 高海拔地区多脏器功能障碍评分系统诊断的标准 [J]. 中华急诊医学杂志. 2006, 15(4): 366-369.
- [4] 牛廷献,万东君,陆璐,等. 高原地区多脏器功能障碍综合征绵羊模型的建立 [J]. 实验动物与比较医学, 2012, 32(4): 285-289.
- [5] 万东君,牛廷献,王春雨,等. 高海拔地区内毒素致绵羊多脏器功能障碍综合征的病理学改变 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(8): 40-43.

- [6] 王红义, 冯小明, 史智勇, 等. 亚高原与高原地区绵羊多脏器功能障碍综合征血清生化指标的比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(7): 56-59.
- [7] 牛廷献, 万东君, 罗晓红, 等. 血必净对高原绵羊多脏器功能障碍综合征的治疗研究 [J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2013, 12(8): 625-628.
- [8] 胡森, 盛志勇, 周宝桐, 等. 双相迟发多器官功能不全综合征(MODS)动物模型的研究 [J]. 中华创伤杂志, 1996, 12(2): 102-106.
- [9] 胡森, 盛志勇, 周宝桐. MODS 动物模型研究进展 [J]. 中国危重病急救医学, 1999, 11(8): 504-507.
- [10] 景致忠, 张永兴, 王自强, 等. 甘肃藏麻猪实验动物化应用前景 [J]. 实验动物科学与管理, 1997, 14(4): 64-65.
- [11] 段绍斌, 李学雄, 姚华, 等. 多器官功能障碍综合征时血管内皮细胞损伤的研究 [J]. 新疆医科大学学报, 2010, 33(3): 271-274.
- [12] 卢媛媛, 尹文, 虎晓岷. 家兔失血性休克并内毒素诱发多脏器功能障碍综合征模型制备 [J]. 江苏医药, 2005, 31(6): 448-450.
- [13] 任添华, 牛驰, 任爱民, 等. 动物模型组织氧代谢的变化特征 [J]. 首都医科大学学报, 2008, 29(3): 308-310.
- [14] Wei HJ, Qing YB, Pan WR, et al. Comparison of the efficiency of Banna miniature inbred pig somatic cell nuclear transfer among different donor cells [J]. Plos ONE, 2013, 8(2): 57728.
- [15] Kim YK, Lee GS, Jung EM, et al. Generation of fibroblasts overexpressing liver-specific PEPCK in a miniature pig model of human type 2 diabetes mellitus [J]. Mol Med Report, 2012, 6(1): 45-50.
- [16] Christoffersen B, Golozubova V, Pacini G, et al. The young Gottingen minipig as a model of childhood and adolescent obesity: influence of diet and gender [J]. Obesity, 2013, 21(1): 149-158.
- [17] 冯书堂. 我国小型猪资源实验化培育及开发利用 [J]. 实验动物科学, 2007, 24(6): 111-118.
- [18] 袁进, 顾为望. 小型猪作为人类疾病动物模型在生物医学研究中的应用 [J]. 动物医学进展, 2011, 32(2): 108-111.
- [19] 胡森, 盛志勇, 周宝桐. MODS 动物模型研究进展 [J]. 中国危重病急救医学, 1999, 11(8): 504-507.
- [20] 牛廷献, 万东君, 陆璐, 等. 高原地区多脏器功能障碍综合征绵羊模型的建立 [J]. 实验动物与比较医学, 2012, 32(4): 285-289.
- [21] 王红义, 冯小明, 史智勇, 等. 亚高原与高原地区绵羊多脏器功能障碍综合征血清生化指标的比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(7): 56-59.
- [22] 周其全, 张世范. 中性粒细胞过渡激活在急性高原病伴多脏器功能障碍中的作用及其机制 [J]. 临床军医杂志, 2009, 37(2): 308-311.

[修回日期]2015-02-09

(上接第 17 页)

- [9] Van Der Linden P, Wathieu M, Gilbert E, et al. Cardiovascular effects of moderate normovolaemic haemodilution during enflurane-nitrous oxide anaesthesia in man [J]. Acta Anaesthesiol Scand, 1994, 38: 490-498.
- [10] Ickx BE, Rigolet M, Van der Linden PJ. Cardiovascular and metabolic response to acute normovolemic anemia [J]. Anesthesiology, 2000, 93: 1001-1016.
- [11] Jones, SB, Whitten, CW, Monk, TG. Influence of crystalloid and colloid replacement solutions on hemodynamic variables during acute normovolemic hemodilution [J]. J Clin Anesth, 2004, 16(1): 11-7.
- [12] 牛新环, 田玉科, 张咸伟, 等. 急性等容性血液稀释与自体血回输对病人水电解质和血浆蛋白的影响 [J]. 临床麻醉学杂志, 2004, 20(2): 109-110.
- [13] Stehling LC. A Report by the American Society of Anesthesiologists Task Force on Blood Component Therapy. Practice Guidelines for Blood Component Therapy [J]. Anesthesiology, 1996, 84: 732-747.
- [14] Miller RD. Coagulation and packed red cell transfusion [J]. Anesth Analg, 1995, 80: 215-216.
- [15] Hobisch-Hagen P, Wirleitner B, Mair J, et al. Consequences of acute normovolaemic haemodilution on haemostasis during major orthopaedic surgery [J]. Br J Anaesth, 1999, 82(4): 505-509.
- [16] Bourke DL, Smith TC. Estimating allowable hemodilution [J]. Anesthesiology, 1974, 41: 609-612.
- [17] 效小莉, 钱桂兰, 刘岚. 围产期急性等容稀释性自体输血安全性研究 [J]. 中国输血杂志, 2013, (1): 63-64.

[修回日期]2015-02-15