

# 内毒素致多脏器功能障碍综合征绵羊模型的建立

王春雨<sup>1</sup>, 凡春玲<sup>2</sup>, 罗晓红<sup>1</sup>, 万东君<sup>2</sup>, 李晶<sup>2</sup>, 陆璐<sup>3</sup>, 王红义<sup>3</sup>, 牛廷献<sup>3</sup>

(兰州军区兰州总医院 1. 内分泌科 2. 干部病房 3. 动物实验科, 兰州 730050)

**【摘要】** 目的 建立简单有效的内毒素(lipopolysaccharide, LPS)致多脏器功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)绵羊模型,观察其血气、血常规和血清生化等的变化特点。方法 绵羊全麻后 $3\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $6\ \mu\text{g}/\text{kg}$  LPS分别于30 min和60 min内静脉泵入实验I组和实验II组。以不同时点测定血气、血常规和血清生化变化。结果 LPS静注后,实验I组和II组绵羊的死亡率分别为33.3%和50%;两实验组3 h内氧合指数明显降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ );不同时点天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、总胆红素(TBIL)和肌酐(CRE)明显升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ );白细胞(WBC)数目在2 h明显降低,之后明显升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。结论 两种剂量的LPS均能成功地建立绵羊MODS模型;血气、血常规和血清生化等均有明显的变化。

**【关键词】** 多脏器功能障碍综合征(MODS); 内毒素(LPS); 模型, 动物

**【中图分类号】** R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)08-0049-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.08.012

## Establishment of a Sheep Model of Multiple Organ Dysfunction Syndrome Induced by Lipopolysaccharide

WANG Chun-yu<sup>1</sup>, FAN Chun-ling<sup>2</sup>, LUO Xiao-hong<sup>1</sup>, WAN Dong-jun<sup>2</sup>,  
LI Jing<sup>2</sup>, LU Lu<sup>3</sup>, WANG Hong-yi<sup>3</sup>, NIU Ting-xian<sup>3</sup>

(1. Department of Endocrinology; 2. VIP Ward; 3. Department of Animal Experiment,  
Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, China)

**【Abstract】 Objective** To establish a simple and effective animal model of multiple organ dysfunction syndrome (MODS) induced by lipopolysaccharide (LPS) in sheep and observe the changes of blood gas, blood routine test and blood biochemistry. **Methods** Twelve sheep (6 males and 6 females) were randomized into group 1 and group 2, six sheep in each group. After anesthesia,  $3\ \mu\text{g}/\text{kg}$  LPS was infused intravenously within 30 minutes in the group 1 and  $6\ \mu\text{g}/\text{kg}$  LPS within 60 minutes in the group 2. The blood gas, blood routine test and blood biochemistry were measured at different time points. **Results** Two sheep in the group 1 (33.3%) and three sheep in the group 2 (50.0%) died after the intravenous injection of LPS. The oxygenation index was significantly decreased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), aspartic transaminase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total bilirubin (TBIL) and creatinine (CRE) were significantly increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ) at different time points. The number of leukocytes was significantly decreased within 2 hours after intravenous injection of LPS, then markedly increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusions** A sheep model of MODS has been successfully established by two doses of LPS. Significant changes of the indexes of blood gas, blood routine test and biochemistry can be seen in those model sheep.

[基金项目] 甘肃省自然科学基金(No. 1010RJA052)。

[作者简介] 王春雨(1976-),女,主治医师。

[通讯作者] 罗晓红(1963-),女,主任医师,主要研究方向:高海拔地区多脏器功能障碍的综合防治研究。

【Key words】 Multiple organ dysfunction syndrome (MODS); Lipopolysaccharide (LPS); Sheep; Model animal

多脏器功能障碍综合征(MODS)多继发于严重感染、创伤、内毒素血症等,治疗难度大,死亡率高,国内外迄今没有突破性进展。由于其原发病因各异、发病过程不同,发病机制复杂,加之治疗因素的干扰,使得难以全面细致观察 MODS 患者病情变化的全过程。MODS 动物模型是研究其发病机制和临床防治的基础,因此,建立简单有效且符合临床实际的 MODS 动物模型一直是国内外研究的难点和热点。本研究利用 LPS 诱发绵羊脓毒血症,进而介导 MODS,以探讨建立一种简单有效且能模拟 MODS 病理和临床特征变化的动物模型。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物与分组

12 只 1 年期健康杜泊绵羊,雌雄各半,随机分为实验 I 组和 II 组,每组各 6 只,平均体重(18.4 ± 3.5) kg。全价饲料饲养。

### 1.2 模型建立

实验组动物均用速眠新 II 号(1.5 mL/kg)(军事医学科学院军事兽医研究所,吉兽药试字(2004)005013)肌内注射麻醉。之后,实验 I 组和 II 组分别以 3 μg/kg 和 6 μg/kg LPS<sup>[1]</sup>(血清型为:O127:B8,批号为 64H4010,美国 Sigma 公司)于 30 min 和 60 min 内均匀持续经前肢桡静脉泵入。

### 1.3 检测指标与方法

血气、血常规和血清生化等指标的检测均由本院检验科测定。

1.3.1 血气分析: LPS 静注前后,分别于 0、1、2、3 和 6 h 经股动脉采血,立即测定氧分压(PaO<sub>2</sub>)。

1.3.2 血常规和血清生化指标的测定: LPS 静注前后,分别于 0、3、6、12、24、48 和 72 h 经颈静脉采血,分别测定血常规、生化指标(天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、总胆红素(TBIL)和肌酐(CRE))。

### 1.4 MODS 的诊断标准

参照胡森等<sup>[2]</sup>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

数据均以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,利用 SPSS10.0 统计分析软件对数据进行处理,组间比较采用 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 体征表现及死亡率

两实验组绵羊静脉泵入 LPS 2 h 后,呼吸加快且困难,心率快而不齐。7 h 后腹胀,尿频,不能站立,运动障碍。24 h 后实验 I 组 2 只和 II 组 3 只绵羊因呼吸窘迫、心律失常、血压下降,继而心衰而死亡,死亡率分别为 33.3% 和 50%。

### 2.2 气血分析

静注 LPS 后,1~6 h 实验 I 组和 II 组绵羊股动脉氧分压(PaO<sub>2</sub>)(mmHg)与 0 h 相比均明显下降( $P < 0.01$ ),氧合指数[PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>(吸入氧浓度)]均 ≤ 26.70 kPa (1 kPa = 7.5 mmHg)(表 1)。结果表明,氧合指数已达到急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)的诊断标准<sup>[3]</sup>。

### 2.3 血清生化指标的变化

静注 LPS 前后结果表明(表 2): ① AST: 两实验组均在 6 h 时开始上升,12 h~72 h 的水平明显或显著高于 0 h ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。实验 I 组在 24 h 时达到峰值,而实验 II 组从 6 h 开始以极高的水平不断上升,直至 72 h。② ALT: 两实验组均在 24 h 的水平达到峰值,之后逐渐下降,但明显高于 0 h 的水平( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。③ TBIL: 实验 I 组的水平在 12 h 和 24 h 时明显高于 0 h ( $P < 0.05$ ),在 24 h 时达到峰值,之后不断下降。而实验 II 组 12 h~72 h 的水平明显或显著高于 0 h ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),且保持不断上升。

表 1 两实验组气血分析

Tab. 1 Blood gas analysis in the two groups

	实验 I 组 Group I					实验 II 组 Group II				
	0 h	1 h	2 h	3 h	6 h	0 h	1 h	2 h	3 h	6 h
PaO <sub>2</sub>	67.7 ± 6.3	35.2 ± 5.6*	31.8 ± 3.6*	30.3 ± 4.7*	41.5 ± 5.3*	65.1 ± 5.4	31.5 ± 3.8*	29.8 ± 4.2*	36.2 ± 2.6*	42.3 ± 4.9*
PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub>	42.9 ± 4.3	22.3 ± 2.5	20.2 ± 2.1	19.2 ± 3.2	26.3 ± 3.5	41.3 ± 3.1	20.0 ± 2.6	18.9 ± 2.3	23.0 ± 2.3	26.8 ± 3.7

注: \* 与 0 h 相比  $P < 0.01$ 。

Note: \* Compared with the values measured at 0 h,  $P < 0.01$ .

表 2 两实验组血清生化指标的变化

Tab. 2 The changes of serum biochemical indexes in sheep of the two groups

	组别 Groups	0 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
AST (IU·L <sup>-1</sup> )	Group I	94.3 ± 15.4	121.7 ± 23.8	184.6 ± 21.3*	254.1 ± 22.4**	199.7 ± 27.3*	152.4 ± 26.8*
	Group II	95.2 ± 13.1	137.4 ± 21.6	204.8 ± 23.5**	316.2 ± 28.2**	407.6 ± 25.1**	561.2 ± 32.7**
ALT (IU·L <sup>-1</sup> )	Group I	15.3 ± 2.1	18.6 ± 3.5	23.8 ± 2.7	50.9 ± 3.2**	43.4 ± 3.5**	37.3 ± 4.1*
	Group II	16.7 ± 1.3	18.3 ± 2.5	45.6 ± 3.6*	98.3 ± 3.2**	57.2 ± 3.8**	48.1 ± 3.2*
TBIL (μmol·L <sup>-1</sup> )	Group I	3.2 ± 0.5	4.5 ± 0.7	5.9 ± 1.8*	7.6 ± 1.2*	4.3 ± 1.3	3.4 ± 1.8
	Group II	3.3 ± 1.2	6.5 ± 1.6	7.8 ± 2.1*	9.8 ± 1.7**	12.1 ± 2.5**	40.2 ± 2.7**
CRE (μmol·L <sup>-1</sup> )	Group I	52.7 ± 2.8	62.1 ± 3.9	82.5 ± 3.5	114.7 ± 3.7*	79.1 ± 2.8	65.2 ± 3.6
	Group II	51.8 ± 2.1	76.4 ± 3.6	94.1 ± 2.5*	134.8 ± 3.2**	90.6 ± 3.5*	84.2 ± 3.8

注: \* 与 0 h 相比  $P < 0.05$ , \*\* 与 0 h 相比  $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the data measured at 0 h, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

④ CRE: 两实验组均在 24 h 的水平达到峰值。但实验 I 组只在 24 h 时的水平明显高于 0 h ( $P < 0.05$ ), 而实验 II 组 12 h、24 h 和 48 h 的水平明显或显著高于 0 h ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。以上结果表明, 静注 LPS 24 h 后成功建立了 MODS 模型。

### 2.4 血常规的变化

血常规结果表明(图 1) 静注 LPS 后, 实验 I 组 2 h ~ 4 h WBC 的数目与 0 h 相比明显下降 ( $P < 0.01$ ), 12 h 时开始上升, 至 48 h ~ 72 h 又明显高于 0 h ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。实验 II 组 2 h ~ 12 h WBC 的数目明显下降 ( $P < 0.01$ ), 24 h 时开始上升, 72 h 又明显高于 0 h ( $P < 0.05$ )。

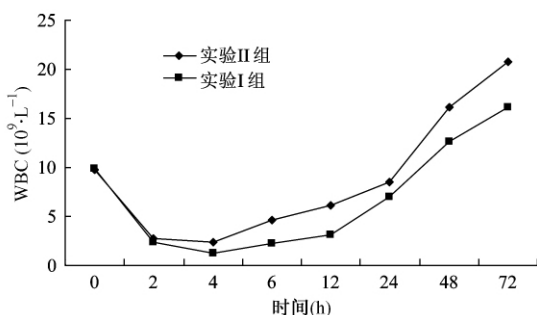


图 1 两实验组 WBC 的变化趋势

Fig. 1 The changes of WBC counting in the two groups

### 3 讨论

脓毒血症是一个相当复杂的病理生理过程, 有其特殊的血流动力学特征, 还存在失控的炎症反应、持续高代谢以及最终出现多器官功能障碍综合征 (MODS) 等特点<sup>[4, 5]</sup>。一般认为, 感染后器官功能障碍分为 2 类<sup>[6]</sup>: 一类为原发性器官损伤 (临床称单相速发型), 占 10% ~ 20%, 患者受到严重创伤感染和休克时可以很快发生器官功能障碍; 另一类是继发性器官损伤 (双相迟发型), 占 70% ~ 80%, 创

伤、休克等作为第 1 次打击, 其后感染或非感染性损害构成第 2 次打击诱发了全身炎症反应 (SIRS) 或脓毒血症 (sepsis), 此即二次打击模型。很多学者认为二次打击模型 (既双相迟发型) 能够更好的模拟人体内疾病的发生和发展过程, 但此类模型制作复杂, 复制困难。内毒素介导的 MODS 模型具有致伤因素单一、造模方法简便快捷、结果便于分析等优点。大小鼠、兔、绵羊和犬等动物均可用于建立 MODS 模型<sup>[7-10]</sup>, 大鼠、小鼠虽然价格低, 但对内毒素敏感性较差, 解剖结构与人差别较大; 兔对内毒素敏感性强, 死亡率过高; 小香猪模型接近人的发病过程, 但成本过高; 绵羊与其他动物比较, 对 LPS 敏感性较高, 在小剂量 LPS 作用下就能诱发 SIRS, 继而进展至 MODS<sup>[11]</sup>; 另一方面, 绵羊为大型动物, 便于实验观察血流动力学、氧代谢和肺机械力学的改变, 而且其病理生理变化与人相近<sup>[12]</sup>。因此, 本研究选择静脉泵入小剂量 LPS 建立绵羊 MODS 模型。

本研究结果表明, 静注 LPS 后, 1 ~ 6 h 实验 I 组和 II 组 PaO<sub>2</sub> 均明显下降 ( $P < 0.01$ ), 氧合指数已达到急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 的诊断标准; AST、ALT、TBIL 和 CRE 两实验组均在不同时点明显或显著升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 但 AST 升高的时间较早 (6 h)。这表明在 MODS 的形成过程中, LPS 对肝脏的损伤早于心脏和肾脏。血常规结果表明, 静注 LPS 后, 两实验组 WBC 数目在 2 h 时均显下降 ( $P < 0.01$ ), 之后又明显升高 ( $P < 0.01$ )。此结果与有关文献报道一致<sup>[13, 14]</sup>。这提示 LPS 静注后, 首先对 WBC 具有急剧杀伤的作用, 之后形成 SIRS, 使得 WBC 数目急剧升高。上述结果表明, 本研究利用两种剂量的 LPS 均成功建立了 MODS 模型。但两实验组的结果表明 6 μg/kg 的 LPS 对机体的损伤程度和死亡率

大于 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。因此,作者认为,若对 MODS 的发病机制研究,利用 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  的 LPS 较理想。这样,既节约时间,又节省试剂。若对 MODS 的干预研究,利用 6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  的 LPS 较理想,这样可以更好地验证药物的防治效果。

#### 参考文献:

- [1] 郭凤梅,邱海波,周韶霞,等.急性呼吸窘迫综合征绵羊模型的建立[J].中国危重病急救医学,2001,13(2):95-98.
- [2] 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,1996,12:102-106.
- [3] Beruand GR, Artigas A, Brigham K L, et al. The American-European Consensus Conference on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1994, 149: 818-824.
- [4] Pellegrini JD, Decoigen D, Pugana JC, et al. Relationships between lymphocyte apoptosis and anergy following trauma [J]. Surg Res, 2000, 88(2): 200-206.
- [5] Bruins MJ. Aspects of organ protein, amino acid and glucose metabolism in a porcine model of hypermetabolic sepsis [J]. Clin Sci, 2003, 104(2): 127-141.
- [6] 孙宇,陆江阳,王晓虹,等.小鼠迟发型多器官功能障碍综合征模型复制及病理学观察[J].中国危重病急救医学,2003,15(1):15-18.
- [7] 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.
- [8] 卢媛媛,尹文,虎晓岷.家兔失血性休克并内毒素诱发多器官功能障碍综合征模型制备[J].江苏医药,2005,31(6):448-450.
- [9] 任添华,牛驰,任爱民,等.MODS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.
- [10] Nolan B, Collette H, Baker S, et al. Inhibition of neutrophil apoptosis after severe trauma is NF kappa beta dependent [J]. Trauma, 2000, 48(4): 599-605.
- [11] 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.
- [12] Mustered RA, Fisher J, Hayman S, et al. Cardiopulmonary response to pseudomonas septicemia in swine: an improved model of the adult respiratory distress syndrome [J]. Lab Animal Sci, 1989, 39(1): 37-43.
- [13] 任添华,姜悦,任爱民,等.单相迟发型多脏器功能障碍综合征动物模型的研究[J].首都医科大学学报,2005,26(4):479-481.
- [14] 平易,刘骏峰,谢琼红,等.内毒素介导的多脏器功能障碍综合征动物模型的研究[J].中国临床医学,2009,16(2):287-290.

(修回日期)2011-03-16

#### (上接第 48 页)

- [5] Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus [J]. Diabet Med, 2005, 22(4): 359-370.
- [6] Scherneck S, Vogel H, Nestler M, et al. Role of zinc finger transcription factor zfp69 in body fat storage and diabetes susceptibility of mice [J]. Results Probl Cell Differ. 2010, 52: 57-68.
- [7] Moleroa JC, Leea S, Leizermanb I, et al, Effects of rosiglitazone on intramyocellular lipid accumulation in Psammomys obesus [J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1802(2): 235-239.
- [8] Adeli K, Lewis GF. Intestinal lipoprotein overproduction in insulin-resistant states [J]. Curr Opin Lipidol, 2008, 19(3): 221-228.
- [9] 石巧娟,刘月环,楼琦,等.非酒精性脂肪肝大鼠 PPAR $\alpha$  基因表达及脂代谢和胰岛素水平的变化 [J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(8): 26-30.
- [10] 钟民涛,黄敏,卢静,等.长爪沙鼠迟发型高脂血症模型的初步建立 [J]. 中国实验动物学报, 2006, 14(3): 217-221.
- [11] 王芃芃,黄磊,伍晓雄,等.高脂饮食对小鼠脂质代谢和 leptin 基因表达水平的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2008, 16(1): 40-44.
- [12] Koteish A, Mae Diehl A. Animal models of steatohepatitis. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2002, 16(5): 679-690.
- [13] 范建高,曾民德,李继强,等.肝内脂肪和脂质过氧化与肝纤维化关系的实验研究 [J]. 中华内科杂志, 1997, 36(12): 808-811.
- [14] 丁霞,蒙一纯,债长恩,等.酒精性肝纤维化动物模型的建立 [J]. 中国中医基础医学杂志, 1999, 5(7): 47-48.
- [15] Chitturi S, Farrell GC. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. Semin Liver Dis, 2001, 21(1): 27-41.
- [16] Wanless IR, Shiota K. The pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis and other fatty liver diseases: a four-step model including the role of lipid release and hepatic venular obstruction in the progression to cirrhosis [J]. Semin Liver Dis, 2004, 24(1): 99-106.
- [17] Caldwell SH, Crespo DM. The spectrum expanded: cryptogenic cirrhosis and the natural history of non-alcoholic fatty liver disease [J]. J Hepatol, 2004, 40(4): 578-584.

(修回日期)2011-03-15