

· 论 著 ·

内毒素诱导大鼠感染性休克模型复制的探索

李钦¹, 刘晓青², 代蓉³, 林青³

1. 云南省中医中药研究院, 云南 昆明 650223; 2. 西安交通大学前沿科学技术研究院, 陕西 西安 710054;
3. 云南中医学院, 云南 昆明 650500

摘要: **目的** 探索感染性休克大鼠模型的制作方法。**方法** 将 48 只 SD 大鼠分为对照组和 3 个不同剂量的脂多糖(LPS)组(每组 12 只)。腹腔注射戊巴比妥钠麻醉后,对照组给予腹腔注射生理盐水,LPS 组腹腔注射 LPS(1、3、5 mg/kg)造模。观察各组大鼠的平均动脉压(MAP)、死亡率、存活时间、直肠温度及肺、肠、心、肝、肾等重要脏器的组织病理学变化。以 MAP < 90 mm Hg 或较基础 MAP 至少降低 40 mm Hg 时为感染性休克模型制备成功。**结果** 与对照组相比, LPS 组大鼠随 LPS 剂量的增加,死亡率递增($P < 0.05$);存活时间有所缩短,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。4 组间大鼠直肠温度差异无统计学意义($P > 0.05$),其中对照组大鼠直肠温度波动幅度均未超过 1 °C, LPS 组大鼠分别在腹腔注射 LPS (1、3、5 mg/kg) 150、120、30 min 起直肠温度降低超过 1 °C。病理学评分表明,在肺组织 LPS 5 mg/kg 组高于空白对照组($P < 0.05$);在肠组织 LPS 3 个剂量组均高于空白对照组(P 均 < 0.05);在心、肝、肾组织 4 组间差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。本实验中,LPS 对造模大鼠具有毒性作用,但由于造模大鼠 MAP 基本保持正常,表明感染性休克大鼠模型制作失败。**结论** LPS 剂量不足、致伤因素单一、动物选择不合理、麻醉剂选取不当等是 LPS 诱导大鼠感染性休克模型复制失败的可能原因。

关键词: 脂多糖; 大鼠; 感染性休克; 模型

中图分类号 R-332 R 631^{*}.4 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2016)07-0865-04

Exploration of method making LPS-induced rat septic shock model

LI Qin^{*}, LIU Xiao-qing, DAI Rong, LIN Qing

^{*} Yunnan Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Kunming, Yunnan 650223, China

Corresponding author: LIN Qing, E-mail: 1609627617@qq.com

Abstract: Objective To explore the method making lipopolysaccharide(LPS)-induced rat septic shock model. **Methods**

Forty-eight SD rats were divided into control group and three LPS groups of different doses ($n = 12$ each). After anesthesia with intraperitoneal injection of pentobarbital sodium, intraperitoneal injection of normal saline was given in control group, and intraperitoneal injection of different doses of LPS (1-, 3-, 5 mg/kg) was given in LPS groups for molding. The mean arterial blood pressure (MAP), mortality, survival time; rectal temperature and the histopathological changes of vital organs including lung, intestine, heart, liver and kidney in each groups were observed. It was the standard to successfully establish septic shock model that the MAP was less than 90 mm Hg or was reduced by at least 40 mm Hg. **Results** Compared with control group, the mortality in LPS groups increased with the increase of LPS doses ($P < 0.05$). The survival time decreased somewhat in LPS groups, but there were no significant differences among control group and LPS groups ($P > 0.05$). There were no statistical differences in rectal temperatures among four groups (all $P > 0.05$) in which the fluctuation range of rectal temperatures in control group was not more than 1 °C, and the fluctuation ranges more than 1 °C after intraperitoneal injection of different doses of LPS (1-, 3-, 5 mg/kg) in LPS groups were from 150-, 120- and 30-minute, respectively. Pathology score showed that the score of lung tissues in LPS 5 mg/kg group was higher than that in control group ($P < 0.05$); the scores of intestinal tissues in all LPS group were higher than that in control group ($P < 0.05$); there were no significant differences in scores of heart, liver and kidney tissues among four groups (all $P > 0.05$). In this study, it demonstrated failure to establish septic shock rat model that the MAP of rats basically maintained normal range though LPS had some toxicity to model rate. **Conclusion** The causes of failure to establish LPS-induced rat septic shock model were as follows: insufficient LPS dosage, single cause of injury, unreasonable animal selection, improper selection of anesthetics.

Key words: Lipopolysaccharide; Rat; Septic shock; Model

感染性休克是一个相当复杂的疾病过程,目前在实验室常采用脂多糖(LPS)直接注射、细菌攻击、局部脓毒病灶、盲肠结扎并穿孔或肠系膜动脉夹闭等复制动物模型^[1-4],这些方法虽然从某方面模拟了感染性休克的致伤因素和发展过程,但都难以复制出完全符合临床实际的标准化的动物模型。我们在实验中采用 LPS 直接注射法复制大鼠感染性休克模型后,相关指标均未达到造模成功标准,现将具体实验方法及失败经验总结如下。

1 材料与方法

1.1 材料 清洁级雄性 SD 大鼠,雄性;体重 250 ~ 300 g,成都达硕生物科技有限公司,合格证号:SCXK(川)2008~24。LPS O111:B4 购自 Sigma 公司(批号 029K4022)。

1.2 分组与给药 将 48 只雄性大鼠随机分为 A、B、C、D 4 组,每组 12 只。A 组(空白对照组):在给予 LPS 的相同时间点,经相同途径给予等量生理盐水。B 组(LPS 1 mg/kg 剂量组):腹腔注射 LPS O111:B4 1 mg/kg。C 组(LPS 3 mg/kg 剂量组):腹腔注射 LPS O111:B4 3 mg/kg。D 组(LPS 5 mg/kg 剂量组):腹腔注射 LPS O111:B4 5 mg/kg。

1.3 造模方法 实验前大鼠禁食过夜,自由饮水。实验时,复测体重,腹腔注射 3% 戊巴比妥钠 1.6 ml/kg(48 mg/kg)麻醉后,将 PE50 管和三通管用 3% 肝素钠充盈,行右侧颈总动脉插管,连接八导生理记录仪监测平均动脉压(MAP);用温度传感器测定大鼠直肠温度,描记大鼠正常 MAP 及直肠温度后,腹腔注射 LPS O111:B4。记录给予 LPS 后前 3 h 的 MAP、直肠温度,结扎血管,缝合切口,大鼠在 25 °C 下继续观察 24 h 后将其处死,留取肺、肠、心、肝、肾,10% 福尔马林固定。若在此过程中大鼠有死亡,则在其死亡后 10 min 内留取以上重要脏器,10% 福尔马林固定。

1.4 观察指标 (1)大鼠在腹腔注射 LPS 后的死亡率。(2)腹腔注射 LPS 后各组大鼠的存活时间。(3)在腹腔注射 LPS 前后,用八导生理记录仪监测各组大鼠 MAP 的变化情况。依据参考文献[5],大鼠 MAP < 90 mm Hg 或较基础 MAP 至少降低 40 mm Hg(排除大出血等其他原因导致的血压降低)时认为感染性休克模型制备成功。(4)组织病理学观察:做 HE 染色,光镜下根据重要脏器组织病变程度不同分

为 0~3 分,进行盲法评分(表 1),其中炎性细胞为放大 400 倍每视野的细胞数。

表 1 重要脏器组织病理学评分标准

病理特征	0 分	1 分	2 分	3 分
充血	无	少量	较多	大量
水肿	无	<1%	1%~5%	>5%
炎性细胞浸润	<5	5~15	15~25	>25
坏死	无	点状	碎片状	片状

1.5 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件进行数据统计。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,正态分布者用多因素重复测量方差分析进行处理,方差齐者采用 LSD-*t* 检验进行多重比较,方差不齐者采用 Dunnett's T3 检验进行多重比较;非正态分布者采用非参数检验;计数资料用率表示,采用 χ^2 检验。检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 死亡率 追加麻醉剂后 4 只大鼠 10 min 内死亡,进入实验 A、B、C、D 组各为 11、11、12、10 只大鼠。腹腔注射后大鼠随 LPS 剂量增高死亡率升高,与 A 组比差异有统计学意义(P 均 < 0.05);但不同剂量 LPS 组间大鼠死亡率差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。见表 2。

2.2 存活时间 B、C、D 组大鼠存活时间均较 A 组为短(P 均 < 0.05),但 4 组间差异无统计学意义(P > 0.05)。见表 2。

2.3 MAP 在实验过程中,4 组大鼠 MAP 均在正常范围内波动,组间差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。见表 3。

2.4 直肠温度 实验过程中,A 组大鼠直肠温度波动幅度均未超过 1 °C;B、C、D 组在腹腔注射 LPS 后直肠温度呈逐渐降低的趋势,其中 B 组在 150 min 起肛温降低超过 1 °C,C 组在 120 min 起直肠温度降低超过 1 °C,D 组在 30 min 起直肠温度降低超过 1 °C,而 4 组间大鼠直肠温度差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。见表 4。

2.5 大鼠重要脏器组织病理学改变 肺组织病理学评分在 4 组间差异有统计学意义(P < 0.05),其中 D 组高于 A 组(P < 0.05);在肠组织 4 组间差异有统计学意义(P < 0.05),其中 B、C、D 组均高于 A 组(P 均 < 0.05);在心、肝、肾组织 4 组间差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。见表 5 和图 1~5。

表 2 各组大鼠死亡情况和存活时间比较

分组	动物数(只)	死亡[只(%)]	存活时间(h, $\bar{x} \pm s$)
A 组	11	0	23.4 ± 5.3
B 组	11	3(27.27)*	18.2 ± 4.3*
C 组	12	4(33.33)*	20.5 ± 13.6*
D 组	10	4(40.00)*	17.0 ± 14.6*

注:与 A 组比较, *P < 0.05。

表 3 各组大鼠 MAP 的比较 (mm Hg, $\bar{x} \pm s$)

时间(min)	A 组(n=11)	B 组(n=11)	C 组(n=12)	D 组(n=10)
0	124.2 ± 12.5	126.3 ± 15.7	131.0 ± 8.2	128.1 ± 4.4
10	123.9 ± 10.2	142.8 ± 7.3	122.3 ± 7.1	126.9 ± 11.7
30	123.3 ± 7.1	142.6 ± 10.1	115.7 ± 22.6	119.6 ± 8.1
60	126.4 ± 10.0	129.9 ± 17.1	119.8 ± 11.9	110.5 ± 10.1
90	130.5 ± 0.6	123.1 ± 19.8	113.5 ± 14.6	96.2 ± 5.7
120	122.8 ± 5.9	117.5 ± 12.8	122.3 ± 9.2	108.8 ± 11.2
150	117.5 ± 2.1	119.0 ± 6.4	106.7 ± 6.3	114.1 ± 14.6
180	137.8 ± 16.1	123.1 ± 13.5	112.7 ± 8.1	120.3 ± 10.9

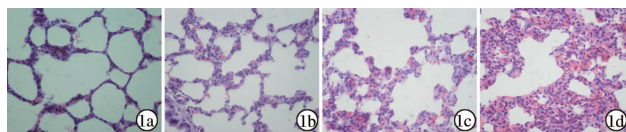
表 4 各组大鼠直肠温度的比较 (°C, $\bar{x} \pm s$)

时间(min)	A 组(n=11)	B 组(n=11)	C 组(n=12)	D 组(n=10)
0	38.4 ± 1.4	38.1 ± 1.8	38.3 ± 1.6	38.6 ± 0.5
10	37.9 ± 2.3	37.8 ± 1.0	37.9 ± 1.3	37.7 ± 2.2
30	37.6 ± 1.6	37.6 ± 1.6	37.8 ± 1.8	37.3 ± 2.1
60	37.5 ± 1.5	37.8 ± 1.7	37.7 ± 1.7	37.1 ± 1.8
90	36.9 ± 2.0	37.5 ± 2.9	37.4 ± 1.8	36.8 ± 2.5
120	36.6 ± 1.6	37.3 ± 2.6	36.9 ± 1.3	36.7 ± 1.6
150	36.5 ± 2.1	36.8 ± 3.2	36.7 ± 1.5	36.4 ± 2.3
180	36.7 ± 2.3	36.8 ± 2.4	36.1 ± 3.1	36.3 ± 2.4

表 5 大鼠重要脏器组织病理学评分 (分, $\bar{x} \pm s$)

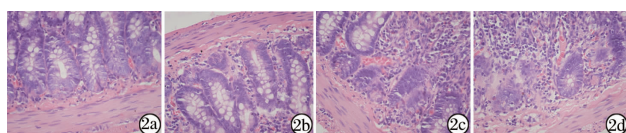
组别	只数	肺	肠	心	肝	肾
A 组	11	0.9 ± 0.4	1.0 ± 0.6	0.9 ± 0.4	0.6 ± 0.5	1.1 ± 0.4
B 组	11	1.2 ± 0.9	2.1 ± 0.6*	1.2 ± 1.0	1.7 ± 0.5	1.2 ± 1.0
C 组	12	1.5 ± 0.8	2.2 ± 0.8*	1.3 ± 0.5	1.1 ± 0.3	1.2 ± 0.8
D 组	10	1.7 ± 0.7*	2.0 ± 0.9*	1.5 ± 0.7	1.4 ± 0.7	1.3 ± 0.9
P 值		< 0.05	< 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05

注:与 A 组比 *P < 0.05。



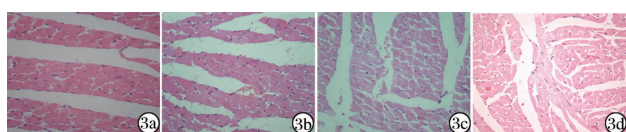
注:1a:A 组;1b:B 组;1c:C 组;1d:D 组。

图 1 大鼠肺组织病理学变化图(HE, ×400)



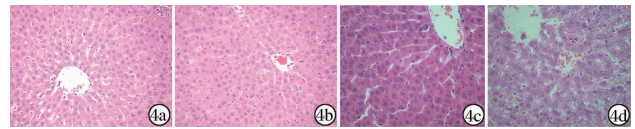
注:2a:A 组;2b:B 组;2c:C 组;2d:D 组。

图 2 大鼠肠组织病理学变化图(HE, ×400)



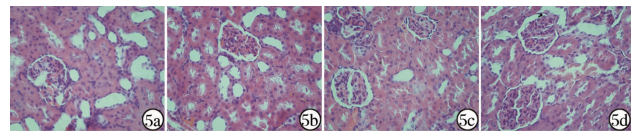
注:3a:A 组;3b:B 组;3c:C 组;3d:D 组。

图 3 大鼠心组织病理学变化图(HE, ×400)



注:4a:A 组;4b:B 组;4c:C 组;4d:D 组。

图 4 大鼠肝组织病理学变化图(HE, ×400)



注:5a:A 组;5b:B 组;5c:C 组;5d:D 组。

图 5 大鼠肾组织病理学变化图(HE, ×400)

3 讨论

LPS 是革兰阴性细菌外膜上的一种双歧性糖脂,可引起实验动物休克,导致低血压、代谢性酸中毒、血液浓缩,甚至在几分钟内死亡^[6-7]。因其造模具有致伤因素单一、造模方法简便快捷、结果便于分析等优点,在实验研究中常常使用其作为致伤剂,复制动物感染性休克模型^[8-10],然而目前 LPS 诱导的大鼠感染性休克模型尚缺乏公认的剂量和适合的给药途径。我们在参考前人实验结果的基础上^[8,10-11],将 LPS 的剂量定为 1、3、5 mg/kg。在感染性休克动物模型的复制中,常见的给药途径为腹腔注射和静脉推注,静脉注射时,药物直接进入血液循环迅速呈现作用,无吸收过程;腹腔注射时,药物可通过腹腔大量的毛细血管迅速吸收,因此,我们在实验中采取腹腔注射 LPS 的方式。

实验中,我们发现大鼠对 LPS 的耐受性颇高,三种剂量腹腔注射后持续监测血压 3 h,休克的重要评价指标—MAP 基本保持正常,模型复制失败。24 h 内 LPS 3 组大鼠的死亡率随剂量增高有所增加,存活时间缩短,组间无统计学差异。除空白对照组外,3 个 LPS 剂量组大鼠分别在腹腔注射 LPS 150、120、30 min 起直肠温度降低超过 1 °C,但 3 组间差异无统计学意义。肺组织病理学评分仅有 LPS 5 mg/kg 组与空白对照组相比差异有统计学意义;肠组织病理学评分 3 个剂量组与空白对照组相比差异均有统计学意义;心、肝、肾组织病理学评分 4 组间差异无统计学意义,这提示 LPS 首先攻击的脏器可能是肠和肺。

虽然此次模型复制以失败告终,但仍可提供一定的实践经验。总结失败的原因为:(1) LPS 剂量不足;在实验过程中,虽然各组大鼠 MAP 基本保持正常,但与空白对照组相比,3 个 LPS 剂量组大鼠的死亡率呈逐渐增加的趋势、存活时间缩短;LPS 1、3、5 mg/kg 组分子 150、120、30 min 时直肠温度开始降

低超过 1 ℃;LPS 5 mg/kg 组肺组织病理学评分较空白对照组显著增加,由此可看出,随着剂量的增加,各观察指标呈现损伤加重的趋势,因此我们认为模型复制失败的原因之一可能与 LPS 剂量不足有关。(2)致伤因素单一:感染性休克的发病机制是细菌、病毒或霉菌等微生物及其毒素侵入血循环激活宿主免疫系统产生多种细胞因子和炎症介质,使得血管舒缩功能异常导致组织灌注不足而发病。一次性腹腔注射 LPS 并没有较好的模仿临床患者 LPS 少量持续或断续入血的状态。(3)动物选择不合理:本实验观察到大鼠对 LPS 毒素的耐受性颇高,整个实验过程中各组大鼠血压基本保持正常,LPS 5 mg/kg 组部分大鼠在腹腔注射 LPS 后 90 min 内血压呈一过性下降,之后又逐渐恢复至接近正常水平。(4)麻醉剂的问题:本实验采用腹腔注射 3% 戊巴比妥钠麻醉后,部分大鼠迅速出现死亡,剩余大鼠仅可持续 1 h 左右的有效麻醉,后期补加麻醉剂的过程中,受大鼠苏醒后紧张因素的影响可造成血压一过性升高,同时,有 4 只大鼠在追加麻醉剂后 10 min 内死亡,考虑为麻醉剂注射过快所致。

针对以上问题,笔者对 LPS 诱发感染性休克大鼠模型的复制总结几点经验如下:(1)加大 LPS 用量:可在 LPS 5 mg/kg 的基础上加大 LPS 的用量。(2)尽量采用复合模型:因动物种属和个体差异,对 LPS 的敏感性非常不一致,LPS 所致的休克模型较难获得成功。盲肠结扎穿孔是目前常用的感染性休克模型^[12-13],优点是能完全模拟临床疾病的发生、发展过程,并能给实验动物充分的反应时间,但其制备需较长时间(16~24 h)。若在盲肠结扎穿孔模型的基础上加上小剂量 LPS,既可缩短造模的时间,又可较好的模拟感染性休克多重病因致病的过程。(3)可采用兔或羊复制感染性休克模型^[14-15]:文献报道,兔复制 LPS 性休克模型较易成功。兔经静脉输注 LPS 后,血压下降明显,压力波形亦呈一定规律性的变化,有些在给予 LPS 的初期还可出现心律失常。羊对 LPS 亦较敏感,仅用 0.6 μg/kg 的 LPS 就能造成羊肺血管损伤和 PaO₂ 降低,同时表现出全身炎症反应。(4)注意麻醉剂对实验结果的影响^[16-17]:乌拉坦和戊巴比妥钠是 LPS 诱导大鼠感染性休克模型建立中常用的麻醉剂,但据文献报道:乌拉坦对迷走神经传出有抑制作用,戊巴比妥钠除对呼吸中枢有轻度抑制外,对血压无明显影响^[16],同时,乌拉坦对 LPS 休克大鼠具有保护作用,能促进 LPS 休克大鼠血压升高、改善骨骼肌微循环、降低大鼠死亡率^[17],故麻醉剂的种类不同,对实验结果是否有影响,也应是值得注意

的问题。

参考文献

- [1] Sari AN, Korkmaz B, Serin MS, et al. Effects of 5, 14-HEDGE, a 20-HETE mimetic, on lipopolysaccharide-induced changes in MyD88/TAK1/IKKβ/IKB-α/NF-κB pathway and circulating miR-150, miR-223, and miR-297 levels in a rat model of septic shock[J]. *Inflamm Res*, 2014, 63(9):741-756.
- [2] Tsao CM, Li KY, Chen SJ, et al. Levosimendan attenuates multiple organ injury and improves survival in peritonitis-induced septic shock: studies in a rat model[J]. *Crit Care*, 2014, 18(6):652.
- [3] Sahin S, Oter S, Burukoğlu D, et al. The effects of carnosine in an experimental rat model of septic shock[J]. *Med Sci Monit Basic Res*, 2013, 19:54-61.
- [4] Coletta C, Módos K, Oláh G, et al. Endothelial dysfunction is a potential contributor to multiple organ failure and mortality in aged mice subjected to septic shock: preclinical studies in a murine model of cecal ligation and puncture[J]. *Crit Care*, 2014, 18(5):511.
- [5] Nikolic J, Stojanovic I, Pavlovic R, et al. The role of L-arginine in toxic liver Failure: interrelation of arginase, polyamine catabolic enzymes and nitric oxide synthase[J]. *Amino Acids*, 2007, 32(1):127.
- [6] Masip J, Mesquida J, Luengo C, et al. Near-infrared spectroscopy StO₂ monitoring to assess the therapeutic effect of drotrecogin alfa (activated) on microcirculation in patients with severe sepsis or septic shock[J]. *Ann Intensive Care*, 2013, 3(1):30.
- [7] Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock[J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(21):2063.
- [8] 傅小云, 李康, 陈森, 等. 不同容量液体复苏对内毒素休克大鼠小肠基础电节律的影响[J]. *上海医学*, 2014, 37(10):853.
- [9] Liu W, Shan LP, Dong XS, et al. Effect of early fluid resuscitation on the lung in a rat model of lipopolysaccharide-induced septic shock[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2013, 17(2):161-169.
- [10] 鄢春亭, 陈奕名, 张恩淑, 等. 人参二醇皂甙对内毒素休克大鼠肾组织的保护作用[J]. *中国老年学杂志*, 2014, 34(5):1328.
- [11] 许建平, 肖苏红, 邓常青, 等. 内毒素大鼠休克早期血浆组织因子与组织因子途径抑制物的观察[J]. *中国病理生理杂志*, 1998, 14(2):133-135.
- [12] Santiago MB, Vieira AA, Giusti-Paiva A. Impaired chemoreflex sensitivity during septic shock induced by cecal ligation and perforation[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2013, 91(12):1107-1111.
- [13] 夏满莉, 王敏, 柴荣奎, 等. 大鼠 CLP 与 LPS 两种败血症心室动力学及血管张力变化的比较研究[J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2010, 39(6):572-576.
- [14] 马宏博, 朱陵群, 刘清泉, 等. 有关内毒素性休克动物模型复制的探讨[J]. *中国中医急症*, 2003, 12(3):260-261.
- [15] 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.
- [16] 詹群珊, 周启明, 肖献忠. 钨对大鼠内毒素休克时肝损伤的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 1992, 8(2):136-139.
- [17] 阮建阳, 刘喜玲. 乌拉坦对大鼠内毒素休克动物模型的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2000, 10(1):37-38.