

· 基础研究 ·

老龄大鼠非细菌性多器官功能不全综合征模型的建立

朱庆磊 杨契 钱小顺 尹彤 薛桥 徐斌 王士雯

【摘要】 目的 以酵母多糖腹腔注射建立老龄大鼠多器官功能不全综合征(MODSE)模型,并进一步与成年多器官功能不全综合征(MODS)模型作比较。方法 成年和老龄SD大鼠,腹腔注射不同剂量酵母多糖,以血气、血生化 and 心、肝、脑、肺、肾等各主要脏器的光镜检查等为指标,观察上述各主要脏器的功能和形态学的变化。结果 与成年和老龄正常对照组相比,成年和老龄不同酵母多糖组血气和血生化指标均出现不同程度的改变,肺、心、肝、脑、肾等主要脏器出现明显病理改变。在相同酵母多糖浓度下,老龄组呼吸功能、心脏功能和肾脏功能降低较相应成年组重;在复制模型程度相似的情况下,与成年大鼠相比,老龄大鼠有死亡时间延迟的趋势。结论 酵母多糖腹腔注射可复制 MODSE 模型,以 0.5 g/kg 腹腔注射最为理想,该模型可用于 MODSE 机制和实验治疗学的探讨。

【关键词】 老年多器官功能不全综合征;动物模型;大鼠;酵母多糖

A model of non-bacterial multiple organ dysfunction syndrome in the elderly rats

ZHU Qinglei, YANG Jie, QIAN Xiaoshun, et al

Institute of Geriatric Cardiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

【Abstract】 Objective To establish a model of multiple organ dysfunction syndrome in the elderly (MODSE) rats by intraperitoneal injection of different doses of zymosan, and to compare the multiple organ dysfunction syndrome (MODS) in the adult and in the elderly. Methods Intraperitoneal injection of different doses of zymosan was given to the adult and senile rats and the changes of the function and morphology of vital organs including the heart, liver, brain, lungs, and kidneys were observed by the analysis of blood gas, blood biochemistry as well as the histopathologic examination. Results Compared with the normal adult and elderly rat controls, the blood gas and blood biochemistry changed to different extents in the zymosan groups of different doses. The pathological changes were also observed in the vital organs including the lungs, heart, liver, brain, kidneys, etc. After injection of the same concentrations of zymosan, the reductions of respiratory, cardiac and renal functions in the senile groups were much more severe than those in the corresponding adult group. In the duplicate model of similar degree, the senile rats showed the tendency to die later than the adult rats. Conclusion Zymosan can be used in elderly animal model to incite MODS with the best dosage of 0.5 g/kg and thus the model can be used to study the mechanisms and the experimental therapeutics of MODSE.

【Key words】 multiple organ dysfunction syndrome in the elderly; animal model; rat; zymosan

老年人器官功能随着年龄的增长而衰退,在此基础上慢性疾患又进一步消耗各器官的功能储备,使机体各器官处于功能不全的临界状态;在某些诱因刺激下,短时间内可出现 2 个或者 2 个以上器官序贯性或同时出现功能不全,即老年多器官功能不全综合征(multiple organ dysfunction syndrome in the elderly, MODSE)。这一概念首先由解放军总医院老年心血管病研究所王士雯教授提出^[1],随后发现 MODSE 是导致老年人死亡的重要原因之一,该研究

已越来越引起人们的关注。而 MODSE 动物模型的复制是研究 MODSE 发病机制和临床防治的基础,在 MODSE 的研究中发挥着重要的作用,但至今国内外尚无理想的、公认的用于研究 MODSE 的动物模型。本试验拟通过酵母多糖腹腔注射复制 MODSE 模型并进行评价,以期建立较为理想的 MODSE 动物模型,为今后 MODSE 发病机制和临床防治的研究提供前期基础。

1 材料和方法

1.1 动物 健康成年 SD 大鼠,雄性,4 月龄,200 ~ 260 g;健康老龄 SD 大鼠,雄性,24 月龄,650 ~ 1000 g,均由解放军总医院实验动物中心提供。

1.2 分组 健康成年和老龄 SD 雄性大鼠各 42 只,

收稿日期:2003-12-09

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(NO.G2000057004)

作者单位:100853 北京市,中国人民解放军总医院老年心血管病研究所

作者简介:朱庆磊,男,1972 年 4 月生,山东省泗水县人,医学博士,副

研究员。Tel:010-66936762

按体重大小各随机分成4组:生理盐水对照组(6只)、酵母多糖0.25 g/kg组(12只)、0.5 g/kg组(12只)、1.0 g/kg组(12只)。

1.3 模型制备 (1)梯级浓度酵母多糖溶液的配制:准确称取定量酵母多糖(Sigma公司)溶于不同体积无菌生理盐水中,使其终浓度分别为1.25%, 2.5%和5.0%。高频振荡15 min,然后在100℃水浴80 min灭菌。用时以40℃水浴复温,高频振荡15 min后给药。(2)模型复制:大鼠于模型制备前禁食12 h(不禁水),在无菌操作下腹腔注射上述梯级浓度的酵母多糖溶液。对照组注射等体积的无菌生理盐水。注射后轻揉腹壁片刻,继续观察24~72 h。

1.4 观察项目和方法 (1)于模型制备后观察一般情况和各组动物的死亡率。(2)于造模后24 h各组选取6只未死动物,在戊巴比妥钠麻醉下采集颈动脉血进行血气分析,采集外周血进行血清生化检测。(3)采集血后处死动物,取心、肝、脑、肺、肾和肠等脏器进行大体标本和光镜检查。

1.5 数据处理 计量资料结果以均数±标准差表示,统计分析采用单因素方差分析,实验组与对照组之间用Dunnet检验,各实验组间均数比较采用Duncan检验。

2 结果

2.1 一般情况 与给药前相比,给生理盐水和酵母多糖后,生理盐水对照组大鼠无明显改变。酵母多糖组所有大鼠均出现不同程度的食欲下降、呼吸短促、竖毛、出汗、毛无光泽、稀便、心动过速等,且严重程度随酵母多糖剂量的增加而加重。部分鼠表现为易激惹、躁动,部分则表现为肢体蜷缩、活动减少;另外部分鼠口鼻出现出血和结膜出血,严重者站立不稳、昏睡,甚至死亡。

2.2 动脉血气分析的变化 与成年生理盐水正常对照组相比,成年酵母多糖各组PaO₂、pH和SO₂均有不同程度的降低,PaCO₂则有不同程度的增加,且它们的降低或增加幅度随酵母多糖浓度的增加而加大。与老龄生理盐水正常对照组相比,老龄酵母多糖各组PaO₂、pH和SO₂也均有不同程度的降低,PaCO₂则有不同程度的增加,且它们的降低或增加幅度也随酵母多糖浓度的增加而加大。与相应成年组相比,老龄酵母多糖0.25 g/kg组PaO₂和SO₂低于成年酵母多糖0.25 g/kg组,老龄0.5 g/kg组PaO₂低于相应成年组,老龄酵母多糖0.25 g/kg和0.5 g/kg组PaCO₂分别高于相应成年组。提示不论成年大鼠还是老龄大鼠,酵母多糖各组呼吸功能均有不同程度的改变;在相同酵母多糖浓度下,老龄组呼吸功能降低较相应成年组明显(表1)。提示不论成年大鼠还是老龄大鼠,酵母多糖各组呼吸功能均有不同程度的改变。

2.3 各组生化指标的变化 与成年生理盐水正常对照组相比,成年酵母多糖各组GPT、GOT、UN、CR、ALP、LDH和TNI均有不同程度的增加,且它们的增加幅度随酵母多糖浓度的增加而加大。与老龄生理盐水正常对照组相比,老龄酵母多糖各组GPT、GOT、UN、CR、ALP、LDH和TNI也均有不同程度的增加,其增加幅度也随酵母多糖浓度的增加而加大。与相应成年组相比,老龄酵母多糖0.25 g/kg组UN和CR高于相应成年酵母多糖0.25 g/kg组,老年0.5 g/kg组GOT、UN、CR和TNI分别高于相应成年0.5 g/kg组(表2)。提示不论成年大鼠还是老龄大鼠,酵母多糖各组肝、心和肾脏功能均有不同程度的改变;且在相同酵母多糖浓度下,老龄组肾脏和心功能降低较相应成年组更明显。

表1 各组动脉血气分析的变化(n=5~6; $\bar{x} \pm s$)

组别 (g/kg)	PaO ₂ (mmHg)	PaCO ₂ (mmHg)	pH	SO ₂ (%)
成年组				
NS	98.0 ± 13.6	32.4 ± 4.8	7.42 ± 0.036	94.2 ± 1.96
0.25	83.6 ± 2.9*	39.4 ± 1.9*	7.35 ± 0.032**	89.5 ± 1.32**
0.5	66.0 ± 6.9**	47.4 ± 2.5**	7.31 ± 0.098*	83.8 ± 2.42**
1.0	54.5 ± 4.2**	58.1 ± 3.3**	7.27 ± 0.042**	81.4 ± 3.40**
老龄组				
NS	91.6 ± 9.4	35.6 ± 3.6	7.40 ± 0.009	91.7 ± 1.81
0.25	75.5 ± 3.7 ^{△△} **	45.9 ± 3.8 ^{△△} **	7.32 ± 0.022 ^{△△}	85.2 ± 2.68 ^{△△} **
0.5	55.2 ± 12.3 ^{△△} **	57.0 ± 2.8 ^{△△} **	7.27 ± 0.10 ^{△△}	82.2 ± 2.90 ^{△△}

注:与成年NS相比,*P<0.05,**P<0.01;与老年NS相比,△△P<0.01;与对应成年组相比,*P<0.05,**P<0.01

表2 各组生化指标的改变($n=5\sim 6; \bar{x} \pm s$)

组别	GPT (g/kg)	GOT (U/L)	UN (mmol/L)	CR ($\mu\text{mol/L}$)	ALP (U/L)	LDH (U/L)	TNI ($\mu\text{g/L}$)
成年组							
NS	13.2±4.6	11.8±9.5	6.1±1.1	34.2±6.6	122.3±21.6	175.7±91.3	0.42±0.13
0.25	32.1±10.6**	86.6±11.5**	8.3±2.1	42.4±3.2*	196.7±60.9*	488.9±109.6**	0.70±0.07**
0.5	53.1±19.3**	132.2±51.5**	14.1±5.2*	60.4±20.5*	272.1±109.3**	1213.6±314.1**	0.86±0.06**
1.0	81.8±29.3**	283.3±125.4**	26.9±10.2**	110.3±45.5**	337.8±81.4**	2441.4±480.7**	1.13±0.25**
老龄组							
NS	8.6±4.4	12.3±6.9	6.1±0.8	46.4±7.9*	89.0±26.5	174.9±78.7	0.49±0.11
0.25	28.4±10.1 [△]	116.4±39.0 ^{△△}	18.4±7.9 ^{△*}	95.7±41.2 ^{△*}	139.8±35.0 ^{△△}	545.4±109.3 ^{△△}	0.74±0.06 ^{△△}
0.5	43.5±27.0 ^{△△}	247.4±59.5 ^{△△*}	27.5±3.4 ^{△△**}	135.1±29.7 ^{△△**}	204.2±27.9 ^{△△}	1771.2±665.5 ^{△△}	1.07±0.18 ^{△△*}

注:与成年NS相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与老年NS相比,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与对应成年组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

2.4 主要脏器病理改变 (1)大体形态改变:酵母多糖诱发 MODS 各组大鼠 24 h 可见如下改变:①肺脏:不同程度肿胀,严重者可见充血,出血点及淤血斑。②腹腔:腹腔内见较多渗出液,部分出现血性腹水;浆膜组织极度肿胀,充血。③小肠:肠管扩张、胀气,部分呈暗紫色,肠腔内可见暗红或暗紫色潴留液;黏膜可见散在出血及糜烂坏死灶。④肝脏:呈暗红或暗紫色,部分出现点状出血,表面多见纤维素样渗出物。⑤心脏:颜色稍显暗红,形态无明显异常。⑥肾脏、脑、胰腺:大体形态均无明显改变。(2)光镜所见:①肺脏:轻度者可见轻度肺水肿,偶见透明膜;肺间质水肿、出血、炎细胞浸润;肺泡上皮细胞肿胀;毛细血管内皮水肿,管腔内大量红细胞淤积,形成微血栓。重度者可见明显肺泡水肿与肺萎陷;部分肺泡上皮细胞脱落、坏死;毛细血管内大量白细胞浸润,微血栓形成(图 1-A)。②肝脏:轻度者可见肝血管及肝窦扩张充血,肝细胞胞浆浊肿、嗜酸性变及脂肪变性。重度者多见肝细胞片状坏死,肝窦内大量炎细胞浸润(图 1-B)。③肾脏:轻度者可见肾小球体积变小,肾小球毛细血管充血,血管内皮肿胀,基底膜增厚,肾小管上皮细胞肿胀;肾间质水肿,炎细胞浸润。重度者可见肾小球聚集,密度增高;肾小球上皮细胞广泛坏死脱落(图 1-C)。④心脏:可见间质充血、水肿(图 1-D)。⑤脑:局部可见小胶质细胞增多。⑥肠:局部肠黏膜脱落,肠壁各层间质内大量炎细胞浸润(图 1-E)。

上述大体和光镜下病理改变与酵母多糖给药剂量密切相关,一般而言,成年组酵母多糖 0.25 g/kg 组多见轻度改变,1.0 g/kg 组以重度变化为主;而老龄

0.5 g/kg 组则多见重度改变,老龄 0.5 g/kg 组与成年 1.0 g/kg 组病理改变相似。

2.5 死亡率和死亡时间 成年大鼠酵母多糖 0.5 g/kg 组出现动物死亡,而老龄大鼠酵母多糖 0.25 g/kg 组即出现动物死亡,两者死亡率随酵母多糖浓度的增加而增加。在死亡率相近的情况下,老龄大鼠模型所需酵母多糖的量比成年大鼠模型低,但死亡时间有延长的趋势(表 3)。

表3 各组大鼠死亡率和死亡时间的变化

组别 (g/kg)	死亡率 (只)	死亡时间 (h)
成年组		
NS	0	0
0.25	0	0
0.5	3	25.3±8.3
1.0	6	18.3±7.3
老龄组		
NS	0	0
0.25	2	31.0±18.4
0.5	6	24.5±7.2
1.0	11	16.3±7.6

2.6 心、肺湿重与体重比值的变化 与成年生理盐水正常对照组相比,成年酵母多糖 1.0 g/kg 组肺湿重与体重比值增加;与老龄生理盐水正常对照组相比,老龄酵母多糖 0.25 g/kg 组和 0.5 g/kg 组均有不同程度的增加,其增加幅度也随酵母多糖浓度的增加而加大(表 4)。表明酵母多糖可引起肺部明显的炎症改变。

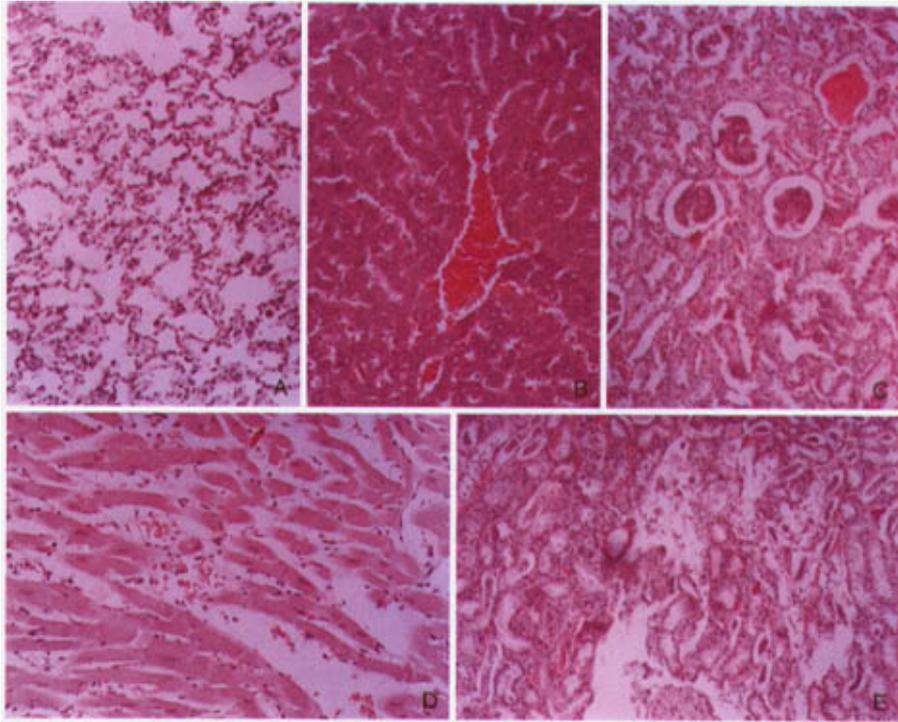


图1 酵母多糖 0.5 mg/kg 老龄组主要脏器病理结果

A. 肺: 间质、肺泡水肿, 炎细胞浸润; B. 肝: 淤血, 出血, 炎细胞浸润; C. 肾: 肾小球间质充血, 上皮细胞脱落、坏死; D. 心: 间质充血水肿; E. 肠: 黏膜坏死、脱落

表4 各组大鼠肺湿重与体重比值以及心湿重/体重比值的变化 (n=5~6; $\bar{x} \pm s$)

组别 (g/kg)	肺湿重/体重 (%)	心湿重/体重 (%)
成年组		
NS	0.75 ± 0.047	0.43 ± 0.04
0.25	0.73 ± 0.028	0.44 ± 0.032
0.5	0.85 ± 0.094	0.45 ± 0.066
1.0	0.86 ± 0.068*	0.43 ± 0.051
老龄组		
NS	0.68 ± 0.033	0.38 ± 0.042
0.25	0.75 ± 0.045 [△]	0.40 ± 0.051
0.5	0.77 ± 0.054 [△]	0.38 ± 0.065

注: 与成年 NS 相比, * P < 0.05; 与老年 NS 相比, [△] P < 0.05

3 讨论

MODS 是目前研究的热点之一, 目前认为其发病机制是机体免疫反应失衡的结果^[2], 酵母多糖是

酵母属啤酒细胞壁的提取物, 可激活补体和巨噬细胞, 造成严重的炎症^[3], 可用于 MODS 模型的复制^[4,5]。本研究选用成年和老龄大鼠, 分别给予不同剂量的酵母多糖, 结果表明不论是成年还是老龄大鼠, 不同剂量的酵母多糖均可造成大鼠不同程度的血气、血生化以及心、肝、脑、肺、肾等重要脏器的病理学改变。血生化中 GPT、GOT 和 LDH 可反映心脏和肝脏的功能, UN 和 CR 反映肾脏的功能; TNI 作为一种反映心肌损伤的特异性指标, 在心肌损伤的特异性诊断中具有重要的意义^[6]。上述指标的变化提示不同剂量的酵母多糖可造成肺、心、肝、肾等重要脏器功能的损害和形态的改变, 再次证实酵母多糖可复制 MODS, 其引起的 MODS 与目前 MODS 是由机体全身免疫反应失衡造成的认识观点相一致, 模型动物发病的进程也与临床疾病的进程一致。在研究中, 我们发现成年大鼠以 1.0 g/kg 体重腹腔注射剂量最为合适, 与以往文献报道一致^[7]。而老龄大鼠

以 0.5 g/kg 剂量腹腔注射产生的复制效果与成年大鼠 1.0 g/kg 相似,提示老龄大鼠以 0.5 g/kg 体重腹腔注射剂量最为合适。

与 MODS 不同,MODSE 具有自己的特点:如多伴有基础疾病,患者免疫功能较差;起病隐匿,多器官受累,病程迁延,死亡率高。本研究发现,与相应成年组相比,在相同酵母多糖浓度下,老龄组呼吸功能、心脏功能和肾脏功能降低较相应成年组重;在复制模型程度相似的情况下,与成年模型相比,老龄模型死亡率虽未降低,但死亡时间有延迟的趋势(由于该研究采用动物数量较少,未能得出统计学差异)。余颂涛^[8]在老龄大鼠多器官功能衰竭模型中也发现类似的现象,推测其原因可能与老龄动物免疫反应低下和反应延迟有关。本研究还发现,与生理盐水正常对照组相比,成年和老龄酵母多糖组肺湿重与体重比值增加,提示酵母多糖可引起肺部明显的炎症改变,这与病理结果相一致。同时,该研究还提示,与心、脑、肝和肾等脏器相比,肺部炎症改变和病理改变出现较早,且损伤程度严重。Jackson 等^[9]研究表明,肺脏在酵母多糖致 MODS 的过程中发挥着重要的作用。本研究发现除复制模型所需酵母多糖剂量较低以及在复制模型程度相似的情况下,死亡时间有延迟的趋势外,MODSE 与 MODS 反应相似,提示肺脏在酵母多糖致 MODSE 的过程中也起着重要的作用,这与临床病例研究结果以及王士雯教授提出的肺启动假说相一致^[10,11]。

综上所述,本文首次报道了老龄大鼠 MODS 模型的建立,该模型具有制备方法简便,重复性好,具有明显的剂量依赖性,并且可根据不同的研究需要,

控制 MODSE 的程度和死亡率,是一种研究 MODSE 发病机制和防治较理想的动物模型。

参考文献

- 1 王士雯,谭端军.老年多器官功能不全的研究现状与展望.内科急危重症杂志,1999,5: 146-147.
- 2 Keh D. Immunocompetence in the critically ill: understanding the problem. *Minerva Anesthesiol*,2000,66:358-361.
- 3 Paya M, Terencio MC, Ferrandiz ML, et al. Involvement of secretory phospholipase A₂ activity in the zymosan rat air pouch model of inflammation. *Br J Pharmacol*,1996,117: 1773-1779.
- 4 Shayevitz JR, Miller C, Johnson KJ, et al. Multiple organ dysfunction syndrome: end organ and systemic inflammatory response in a mouse model of nonseptic origin. *Shock*,1995,4: 389-396.
- 5 Jansen MJ, Hendriks T, Verhofstad AA, et al. Gradual development of organ damage in the murine zymosan-induced multiple organ dysfunction syndrome. *Shock*,1997,8: 261-267.
- 6 周白丽. 心肌肌钙蛋白—心肌损伤的标志物. *中国综合临床*,2003,19:298-299.
- 7 陈海龙,关凤林,吴咸中,等.非细菌性多器官功能不全综合征的动物模型. *中国急救医学*,1997,17: 1-4.
- 8 余颂涛. MOFE 实验研究与诊断指标初步探讨. *实用老年医学*,1994,8:7-9.
- 9 Jackson RJ, Johnson DD, Maxson RT, et al. A comparison of neonatal and adult multiorgan failure in a rat model. *J Pediatr Surg*,2000,35: 428-431.
- 10 王士雯,韩雅玲,钱小顺,等. 1605 例老年多器官功能衰竭的临床分析. *中华老年多器官疾病杂志*,2002,1:7-10.
- 11 王士雯. 老年多器官功能不全综合征的肺启动机制. *中华老年多器官疾病杂志*,2002,1:4-6.

· 消 息 ·

《临床外科杂志》征订启事

《临床外科杂志》是由中华医学会湖北分会主办,全国公开发行的临床外科专业性学术期刊,为国家科学技术部中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),被中国学术期刊(光盘版)、万方数据数字化期刊群和中文科技期刊数据库全文收录。并荣获首届《CAJ-CD 规范》执行优秀期刊奖。ISSN 1005-6483, CN 42-1334/R。

本刊以“面向临床,指导临床,服务临床”为宗旨,报道外科领域中最最新的科研成果和临床诊治经验,密切结合临床实践,对外科临床和科研工作有很强的指导作用。辟有述评、专题笔谈、论著、术式介绍、技术革新、讲座、综述、会议(座谈)纪要、临床病例讨论、教学查房、学术争鸣、国内外学术动态、基层医院经验、病例报告、问题解答、新期刊文献、书评等栏目。

本刊自 2004 年起改为月刊。欢迎广大读者及时到当地邮局订阅(邮发代号为 38-184),每册定价 6.5 元。也可随时汇款至本刊编辑部邮购。

地址:湖北省武汉市武昌丁字桥路 100 号,邮政编码:430064;电话:027-87893476;传真:027-87893470;E-mail:hbxyh@public.wh.hb.cn;lwen62@vip.sina.com