

· 基础研究 ·

大鼠蛛网膜下腔出血致多器官功能障碍综合征模型的建立

贺燕 郭洪志

【摘要】 目的 建立符合临床实际、简便易行的蛛网膜下腔出血(SAH)致多器官功能障碍综合征(MODS)模型。方法 采用大鼠 Willis 环注血法建立 SAH 致 MODS 模型,48 只 Wistar 大鼠随机分为正常对照组、假手术组、SAH 后 6 个亚组(4,12,24,36,48,72 组),记录各时相点大鼠 SAH 后的症状、体征,检测外周血 WBC、肝肾功能、心肌酶学改变。光镜下观察肺、小肠、肝和肾组织病理变化,依据全身炎症反应综合征(SIRS)和 MODS 的诊断标准判断 SIRS 和 MODS 的发生率。结果 (1)假手术组与正常对照组相比,其呼吸、心率、体温及外周血 WBC、ALT、AST、BUN、Cr、CK 的差异无显著意义($P > 0.05$);SAH 组的上述各项指标均高于正常对照组、假手术组($P < 0.01$),并且在 24~36h 变化最明显。(2)大鼠 SAH 后各时相点各脏组织均有不同程度的炎性损害,SAH 组在 24~36h 时相点的脏器病理变化最显著,在 48h 稍有减轻,72h 时相点仍可见炎性损害。(3)SAH 组 SIRS 的发生率为 100%;MODS 发生率为 69.4%,死亡率为 38.9%。结论 大鼠 Willis 环注血法可成功建立 SAH 致 MODS 的实验动物模型。

【关键词】 蛛网膜下腔出血;多脏器功能障碍综合征;动物模型

Establishment of a rat model of subarachnoid hemorrhage induced by multiple organ dysfunction syndrome

HE Yan, GUO Hongzhi

Department of Neurology, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, China

【Abstract】 Objective To establish a easily made model that would imitate clinical features of multiple organ dysfunction syndrome (MODS) resulting from subarachnoid hemorrhage (SAH). Methods Rat model of SAH was formed by injecting arterial blood into the Willis' circle. Forty-eight Wistar rats were randomly divided into three groups: normal control group ($n = 6$), sham-operative group ($n = 6$) and SAH group ($n = 36$) including 4, 12, 24, 36, 48 and 72h subgroups. Changes of symptoms and signs including temperature, heart rate and respiration of each group were recorded. The WBC count and biochemical indices were assayed. Pathological changes in lung, liver, intestines and kidney were recorded through optical microscopy. Incidences of systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and MODS were diagnosed according to the diagnostic criteria. Results (1) There were no significant differences in temperature, heart rate, respiration, WBC count, and the levels of ALT, AST, BUN, Cr and CK between normal control group and sham-operative group ($P > 0.05$). The rats of SAH group had obviously higher temperature, heart rate, respiration, WBC count and levels of ALT, AST, BUN, Cr and CK than the normal control group and sham-operative group ($P < 0.01$), and the changes were most obvious at 24~36 hour point. (2) Inflammatory injuries in varying degrees were observed in organs at each time point after SAH. The pathological changes in the organs were peaked at 24~36 h, slightly alleviated at 48 h, and still could be observed at 72 h. (3) Incidences of SIRS, MODS and mortality were 100%, 69.4% and 38.9% respectively after SAH in SAH group. Conclusion An experimental animal model of MODS can be established successfully through SAH by injecting arterial blood into the Willis' circle in rats.

【Key words】 subarachnoid hemorrhage; multiple organ dysfunction syndrome; animal model

收稿日期:2005-11-22

作者单位:250012 济南市,山东大学研究生 现在山东中医药大学第二附属医院神经内科(贺燕);250012 济南市,山东大学齐鲁医院神经内科(郭洪志)

作者简介:贺燕,女,1972年2月生,山东济南人,医学硕士,主治医师

通讯作者:郭洪志, Tel: 0531-82168817, 0531-82169082, E-mail: guohongzhi8051

@yahoo.com.cn
万方数据

急性脑血管病 (acute cerebrovascular diseases, ACVD) 并发多器官功能障碍综合征 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS) 是脑源性多器官功能障碍综合征 (cerebrogenic multiple organ dysfunction syndrome, CMODS) 中最常见的类型, MODS 在 ACVD 后的发生率为 11%~21%^[1], 临床表现为器官系统

损伤出现的时间迅速,损伤程度严重,救治困难,临床死亡率高达41%~87%^[2]。但是至今国内外学者对ACVD并发MODS仍未给予足够的重视,目前MODS主要作为ACVD的一种临床现象或并发症加以报道,对其发病机制的基础研究寥寥无几,相关动物模型的建立几乎是空白。本实验为利于研究ACVD并发MODS的发生机制、病理生理过程及有效防治方法,模拟蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)致MODS的发病过程,建立大鼠SAH致MODS模型。

1 材料与方法

1.1 动物分组 成年健康雄性Wistar大鼠(清洁级)48只,体重250~300g,由山东大学实验动物中心提供。应用随机数字表将大鼠分为8组:正常对照组($n=6$)、假手术组($n=6$)、蛛网膜下腔出血组(SAH组, $n=36$)分为4, 12, 24, 36, 48, 72h时相点6个亚组。

1.2 模型制作 采用大鼠Willis环注血法建立SAH致MODS模型,具体步骤为:(1)术前准备:在室温22℃及恒定湿度的条件下,大鼠术前禁食12h,禁水4h。轻柔抓取动物,以1%戊巴比妥溶液40mg/kg的剂量腹腔注射麻醉动物。(2)SAH术:将动物俯卧位固定在立体定向仪上,切开顶部中线皮肤,钝性分离肌肉及骨膜。在前囟前5mm、中线旁3mm处颅骨钻孔。此孔位于前颅窝底与额极交界处,在手术显微镜下仔细将脑膜挑破,当清亮脑脊液流出时,将PE-10塑料管尖端指向双耳连线中点,紧贴前颅窝底蛛网膜下腔送入,深度约1cm,使该管顶端恰好位于Willis环前部。连接微量注射器回吸证实有清亮脑脊液流出后,自插管内注入非肝素化的股动脉自体血100 μ l。(3)假手术操作步骤同SAH术,但最后经插管注入100 μ l生理盐水。

1.3 检查项目与方法 (1)观察术后各时相点动物的一般情况,包括意识、精神状态、进食情况、肢体活动等。(2)观察术后各时相点动物的体温、呼吸、心率改变(麻醉后)。(3)采血:假手术组术后12h、SAH

组术后各时相点将动物麻醉后,常规消毒皮肤,股静脉抽血5ml,立即送化验室检测血常规、肝功(ALT、AST)、肾功(BUN、Cr)、心肌酶(CK)。(4)取脏器:迅速开胸暴露心脏,从左心室至升主动脉插管,先以100ml生理盐水快速灌注,之后稍缓慢灌注至流出液清亮,换4%多聚甲醛200ml快速灌注,之后稍缓慢灌注继续固定,灌注约30min至动物四肢变硬。注毕立即取脑置于4%多聚甲醛溶液内固定;同时迅速取肺脏、肝脏、肾脏、小肠,观察大体标本的形态变化,置于10%中性福尔马林溶液固定。各脏器用冰冻切片机连续冠状切片,HE染色,光镜下观察病理改变。

1.4 SIRS、MODS的诊断标准 按照盛志勇等^[3]的实验动物SIRS、MODS诊断标准为依据。

1.5 统计学处理 实验数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用SPSS10.0统计软件包进行处理,数据间差异显著性检验采用 t 检验、方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有显著意义。

2 结果

2.1 实验动物的一般情况 假手术组表现为12h内精神轻度萎靡,呼吸加快,12h后好转、进食及活动无异常、针刺肢体的痛觉反应灵敏。SAH组术后11只(30.6%)出现昏迷、紫绀、过度换气,19只(52.8%)出现癫痫发作,术后醒转的大鼠精神萎靡、食欲下降、呼吸急促,针刺肢体的痛觉反应迟钝。14只(38.9%)未到时相点死亡。

2.2 动物的呼吸、心率、体温及外周血WBC变化 见表1。假手术组与正常对照组相比,其呼吸、心率、体温及外周血WBC的差异无显著意义($P > 0.05$);SAH组的上述各项指标均高于正常对照组、假手术组($P < 0.01$)。

2.3 动物的肝功、肾功、心肌酶学的变化 见表2、3。假手术组与正常对照组比较,其肝功、肾功、心肌酶无显著性差异($P > 0.05$);SAH组的上述各项指标均高于正常对照组、假手术组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表1 各组模型呼吸、心率、体温、外周血WBC的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	呼吸(次/min)	心率(次/min)	体温(℃)	WBC($\times 10^9/L$)
正常组	61.50 $\pm$ 1.37	183.17 $\pm$ 51.76	36.52 $\pm$ 0.49	6.89 $\pm$ 0.36
假手术组	62.83 $\pm$ 2.22	192.33 $\pm$ 47.21	36.91 $\pm$ 0.52	7.11 $\pm$ 0.41
SAH组	126.33 $\pm$ 7.81**	329.67 $\pm$ 48.83**	39.52 $\pm$ 1.56**	22.95 $\pm$ 3.16**

注:与假手术组比较,* $P < 0.001$;与正常组比较,** $P < 0.001$

表2 各组模型肝功、肾功、心肌酶学的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mmol/L)	CR (μ mol/L)	CK (U/L)
正常组	71.67 $\pm$ 12.86	164.17 $\pm$ 27.30	6.15 $\pm$ 0.73	29.70 $\pm$ 1.15	744.50 $\pm$ 83.54
假手术组	78.83 $\pm$ 10.63	166.83 $\pm$ 21.99	7.09 $\pm$ 0.83	31.15 $\pm$ 2.44	768.53 $\pm$ 79.16
SAH组	216.67 $\pm$ 49.66 [*]	340.17 $\pm$ 47.04 ^{*#}	20.03 $\pm$ 3.89 ^{*#}	74.63 $\pm$ 6.32 ^{*#}	2741.46 $\pm$ 271.78 ^{*#}

注:与假手术组比较,^{*} $P < 0.001$;与正常组比较,[#] $P < 0.001$

表3 各组模型各时相点的肝功、肾功、心肌酶学的变化规律($\bar{x} \pm s$)

组别	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mmol/L)	CR (μ mol/L)	CK (U/L)
正常组	71.67 $\pm$ 12.86	164.17 $\pm$ 27.30	6.15 $\pm$ 0.73	29.70 $\pm$ 1.15	744.50 $\pm$ 83.54
假手术组(12h)	78.83 $\pm$ 10.63	166.83 $\pm$ 21.99	7.09 $\pm$ 0.83	31.15 $\pm$ 2.44	768.53 $\pm$ 79.16
SAH组					
4h	88.16 $\pm$ 22.15	185.23 $\pm$ 35.45	8.72 $\pm$ 1.14	34.47 $\pm$ 3.65 ^{△*}	1020.00 $\pm$ 139.33 ^{*#}
12h	197.67 $\pm$ 13.56 ^{△*}	226.50 $\pm$ 35.39 ^{△*}	17.94 $\pm$ 1.74 ^{△*}	52.20 $\pm$ 5.73 ^{△*}	2267.17 $\pm$ 261.79 ^{△*}
24h	238.33 $\pm$ 35.65 ^{△*}	371.01 $\pm$ 32.79 ^{△*}	28.80 $\pm$ 3.91 ^{△*}	79.25 $\pm$ 6.15 ^{△*}	2983.67 $\pm$ 270.03 ^{△*}
36h	221.61 $\pm$ 33.49 ^{△*}	301.52 $\pm$ 31.28 ^{△*}	23.14 $\pm$ 2.89 ^{△*}	65.73 $\pm$ 5.94 ^{△*}	2203.35 $\pm$ 296.68 ^{△*}
48h	162.84 $\pm$ 22.36 ^{△*}	255.34 $\pm$ 33.20 ^{△*}	12.17 $\pm$ 2.05 ^{△*}	57.07 $\pm$ 5.48 ^{△*}	1383.83 $\pm$ 214.57 ^{△*}
72h	107.17 $\pm$ 12.45 [☆]	187.50 $\pm$ 35.32	9.05 $\pm$ 1.28 [☆]	41.03 $\pm$ 4.19 ^{△*}	1071.16 $\pm$ 129.67 ^{△*}

注:与假手术组比较,^{*} $P < 0.01$,[#] $P < 0.05$;与正常组比较,[△] $P < 0.01$,[☆] $P < 0.05$

2.4 动物的主要脏器病理改变 正常对照组和假手术组各器官组织结构基本正常,假手术组中肺组织偶见肺泡隔增宽,毛细血管充血,少量中性粒细胞浸润,肝组织见少量肝细胞浊肿。SAH组周围脏器各时相点的病理改变以非特异性炎症反应为主:(1)肺脏:4h即见毛细血管扩张充血、血管腔内可见中性粒细胞增多,肺泡腔内及血管周围可见渗出;12h即见肺泡腔明显扩张,细支气管腔及气管腔内可见纤维蛋白渗出;24h和36h上述炎性改变更加明显,见到轻度慢性淋巴细胞性支气管肺炎的改变;48h则上述炎性改变有所减轻;而在72h仍见炎症细胞浸润及肺泡腔扩张。(2)小肠:12h黏膜、黏膜下层、肌层及外膜层结构正常;24h出现黏膜和黏膜下层水肿、增厚;36h和48h可见肌层及黏膜层之间水肿、增厚、充血,可见炎细胞浸润;而在72h仍有黏膜和黏膜下层充血、水肿。(3)肝脏:8h个别动物开始出现少数肝细胞浊肿,24h肝组织中肝细胞点状坏死,肝窦扩张,中央静脉周围肝细胞明显肿胀,气球样变;36h可见间质内出现慢性炎细胞浸润,并见部分肝细胞嗜酸性变;而在48h减轻,肝细胞嗜酸性改变减轻。(4)肾脏:12h开始出现肾间质充血,少数近曲肾小管上皮细胞浊肿,胞浆变空;24h和36h出现了肾小球萎缩,肾小管扩张大小不等,近曲肾小管上皮细胞浊肿;以后的各时相点除48h可见个别处肾近曲小管坏死外,其它未见特殊变化。

率为100%;符合MODS标准的实验动物25只,发生率为69.4%;未到时相点而死亡的14只,6个亚组的平均死亡率为38.9%。

3 讨论

MODS动物模型的复制是研究MODS发病机制和临床防治的基础,同时也是MODS研究的一个难点。首先,一个理想的MODS动物模型MODS的发病率和死亡率必须在50%以上,才能符合MODS早期诊断和防治研究的要求;其次,MODS动物模型的复制过程应包括:诱发因素(即致伤因素)+SIRS+多器官功能障碍^[3]。目前MODS模型的成功复制经验几乎都来自国内外创伤外科领域^[4-7],而ACVD致MODS的动物模型复制屈指可数,近3年来,郭洪志等^[8,9]成功建立了前脑缺血、脑出血致MODS的动物模型,为进一步研究ACVD致MODS的发病机制提供了广阔的前景。本研究借鉴上述模型的经验,力求建立一种成功的SAH致MODS模型。

考虑到动物模型应与临床相似、并尽量减少手术创伤干扰,又必须达到较高的发病率和死亡率。本研究采用Willis环注血法制备SAH模型,一是手术简单,组织损伤轻;二是避免所采用的方法对各脏器造成的影响,而干扰SAH对各器官系统功能的作用;三是SAH的严重程度能达到较高的MODS发生率和死亡率。

2.5 SAH后合并SIRS、MODS发生率 SIRS的发生

万方数据

(下转第62页)

10d。例4患者反复发作胆源性胰腺炎,全面评估后,在全麻下行 ERCP 十二指肠乳头切开取石术,效果良好。(2)加强营养及支持治疗:禁食,必要时予胃肠减压,静脉营养,减少脂肪摄入,纠正水、电解质及酸碱失衡;同时加强免疫支持疗法,如予以丙种球蛋白,胸腺肽等。(3)积极治疗并发症:在高龄重症感染者,休克、DIC 发生率高,甚至出现多脏器功能

衰竭,危及患者生命,故需严密观察生命体征及相关化验检查的变化,发现问题,尽快处理,可明显降低死亡率。(4)中医中药治疗:高龄本病患者因不能耐受手术根治,故常使疾病反复发作。给予中医辨证论治,运用消炎利胆、通腑排石等法则,根据病情,或以汤药、或用成药,均有助于缓解症状,并可延缓或防止急性胆囊炎的再次发作。

(上接第43页)

本研究结果显示,假手术组的呼吸、心率、体温及外周血 WBC、肝功、肾功、心肌酶学等指标与正常对照组比较,差别无显著意义,而与手术组比较,差异有显著意义,提示手术本身未对各脏器造成影响。研究结果还显示 SAH 组大鼠术后 30.6% 出现昏迷、紫绀、过度换气,52.8% 出现癫痫发作,术后醒转的大鼠精神萎靡、食欲下降、呼吸急促,针刺肢体的痛反应迟钝。周围器官组织的病理结果证实:SAH 组存在以炎症为主的非特异性改变,术后 12h 肺、小肠、肝、肾均见非特异性炎症反应,在 24~36h 达高峰,在 48h 稍有减轻,72h 时相点仍可见炎症损害。同样研究结果显示:SAH 组的肝功、肾功、心肌酶指标均高于正常对照组($P < 0.01$)。其中 12, 24, 36h 时 ALT、BUN、Cr、CK 的平均值均超过正常对照组 2 倍或 3 倍,达到器官功能障碍 I 期或 II 期。按照盛志勇等^[3]提出的动物 SIRS 和 MODS 的诊断标准,SAH 组 SIRS 的发生率为 100%,MODS 的发生率为 69.4%,仅未到时相点的动物死亡率就达 38.9%,符合 MODS 动物模型的设计要求。

本模型的特点是:符合临床常见诱发因素;SAH 的严重程度易于达到 MODS 的诊断标准,各器官功能的各项指标变化能动态反映 MODS 的发病过程;采用一次打击能客观反映 SAH 与 MODS 的密切关系,有利于对 SAH 致 MODS 发病机制的研究;手术操作简单,整个操作过程仅需约 30min;手术创伤小,避免了手术创伤对各脏器所造成的影响,重复性

好,实用性强。SAH 后 MODS 临床常见,但发病机制不清。大鼠 Willis 环注血法成功建立 SAH 致 MODS 动物模型,为今后深入研究 ACVD 致 MODS 的发生机制奠定了基础。

参考文献

- 1 王拥军,卢德宏,崔丽英,等.现代神经病学进展(2).北京:科学技术文献出版社,2001.182-198.
- 2 赵性泉,龙洁.急性脑血管病与多脏器衰竭.中风与神经疾病杂志,2000,17:227-229.
- 3 盛志勇,胡森.多器官功能障碍综合征.北京:科学出版社,2000.29-55.
- 4 Goris RJA,Boekholtz WKF, Van Bebber IT, et al. Multiple organ failure and sepsis without bacteria. Arch Surg,1986,121:897-901.
- 5 Steinberg S, Flyun W, Kelley K, et al. Development of a bacteria independent model of the multiple organ failure syndrome. Arch Surg,1989,124:1390-1396.
- 6 胡森,盛志勇,周宝桐.MODS 动物模型研究进展.中国危重病急救医学,1999,11:504-507.
- 7 胡森,盛志勇,周宝桐,等.双相迟发型多器官功能障碍综合征(MODS)动物模型的研究.中华创伤杂志,1996,12:3-4.
- 8 郭洪志,屈传强.大鼠急性前脑缺血致多器官功能障碍综合征模型的建立.脑与神经疾病杂志,2004,12:11-13.
- 9 郭洪志,王蕾,孙海荣,等.大鼠前脑出血致多器官功能障碍综合征模型的建立.脑与神经疾病杂志,2004,12:338-341.