

# 大鼠心脏移植急性排斥合并肺部细菌感染模型的建立

陈浩 于伟勇 卢晨

**【摘要】** 目的 建立大鼠心脏移植急性排斥合并肺部细菌感染模型。方法 异基因大鼠心脏移植术后给予环孢霉素 A(CSA)  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  皮下注射。术后第 6 天将动物随机分为继续 CSA 治疗(A组)和生理盐水  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  皮下注射(B组)。在术后第 13 天将动物进一步随机给予  $0.2 \text{ ml}, 1 \times 10^9 \text{ cfu/ml}$  铜绿假单胞菌气管内接种(C组)或  $0.2 \text{ ml}$  生理盐水气管内接种(D组)。观察各组生存率,并于术后第 14 天处死动物,切取移植心脏和肺脏组织做病理学检查。结果 实验动物全部存活;A组动物未见明显排斥反应;B组动物移植心脏发生 ISHLT 3R 级(重度)排斥反应;C组动物发生中-重度肺部炎症反应;D组动物肺部病理未见明显异常。结论 通过急性排斥和细菌气管内接种这两种干预因素处理,成功建立了心脏移植术后急性排斥合并肺部细菌感染模型。

**【关键词】** 心脏移植; 移植排斥; 模型,动物; 肺部感染

**A rat model of cardiac rejection combined with lung infection** CHEN Hao, YU Wei-yong, LU Chen. Department of Cardiothoracic Surgery, Huadong Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China

Corresponding author: CHEN Hao, Email: h.chen@fudan.edu.cn

**【Abstract】** **Objective** To establish a rat model of cardiac rejection combined with lung infection. **Methods** Allogeneic animals underwent heart transplantation on day 0 were begun on daily cyclosporine A (CSA) injection ( $10 \text{ mg/kg}$  subcutaneously). On post-operative day (POD) 6, animals were randomized to either have their CSA continued (Group A), or had their CSA discontinued and begun on a normal saline placebo injection ( $10 \text{ mg/kg} \cdot \text{d}$  subcutaneously). On POD 13, Groups A and B were further randomized to Group C, receiving intratracheal inoculation with *Pseudomonas aeruginosa* ( $0.2 \text{ ml}, 1 \times 10^9 \text{ cfu/ml}$ ) and Group D, receiving intratracheal inoculation with normal saline ( $0.2 \text{ ml}$ ). Animals were sacrificed on POD 14. Both the donor heart and lung tissues were assessed for pathologic confirmation of rejection and infection respectively. **Results** All animals survived throughout the study. ISHLT grad 3R (severe) rejections were observed in each donor heart of Group B, compared with an average score of 0 (no rejection) in those of Group A. Moderate to severe pneumonia occurred in all animals of Group C while Group D showed minor changes in their lungs. **Conclusions** By impose acute rejection and/or infectious interventions, we successfully established a rat model of cardiac rejection combined with lung infection.

**【Key words】** Heart transplantation; Graft rejection; Models, animal; Lung infection

免疫排斥和感染都是心脏移植术后常见的严重并发症和致死原因<sup>[1]</sup>。即使在现代免疫抑制方案治疗下,术后 1 年内仍有近 30% 的患者至少发生 1 次排斥反应<sup>[2]</sup>。同时,由于免疫抑制剂的应用,宿主免疫功能低下,容易发生感染。移植术后 1 年内感染平均发生率约为 40%,移植后死亡近 30% 为感染所致,远远超过因排斥而死亡者<sup>[1]</sup>。心脏移植术后感染最常发生部

位是肺脏,最常见的感染类型是肺炎<sup>[3-5]</sup>。

排斥和感染的早期鉴别比较困难,两者早期均表现为相似的非特异性症状,如疲倦、气促、低热、活动能力下降等,有时即使组织学检查也难以辨别。然而,两者的鉴别又至关重要,因为对应的治疗原则截然不同,而且还相互影响<sup>[6]</sup>;加强抗排斥治疗使供心耐受,但同时会造成免疫低下,易诱发感染;降低免疫抑制剂量虽然会减少感染率,但又可诱发排斥;而一旦发生排斥,则更容易引起感染,造成恶性循环。

建立稳定可靠的动物模型,是开展相关疾病研究的基础,对理解疾病的发生发展至关重要。为此,我们以大鼠心脏移植模型为基础,通过气管接种铜绿假单胞菌,模拟临床常见的移植术后患者的肺部感染,建立

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.16.101

基金项目:上海市科学技术委员会浦江人才计划(10PJ1403600)

作者单位:200040 上海,复旦大学附属华东医院心胸外科(陈浩、于伟勇),病理科(卢晨)

通讯作者:陈浩,Email:h.chen@fudan.edu.cn

心脏移植术后急性排斥合并肺部细菌感染的动物模型。

## 材料和方法

1. 实验动物:200~250 g 清洁级雄性近交系大鼠,购自中国科学院上海实验动物中心,其中 Wistar 大鼠为供体, Lewis 大鼠为受体。实验方法经复旦大学附属华东医院动物管理委员会批准,动物管理和福利按相关规范和标准执行。

2. 实验设备:显微外科手术器械(Codman & Shurtleff Inc., Raynham, MA)、3×手术显微镜(Designs for Vision Inc., Ronkonkoma, NY)、8-0 无损伤缝线(Ethicon, Raleigh, NC)。

3. 动物模型:(1)腹腔内心脏移植模型<sup>[7]</sup>:在100 mg/kg 氯胺酮腹腔注射麻醉下,常规备皮消毒,肝素化后切取供体心脏,切开右心房,并经此通路破坏三尖瓣并制造房间隔缺损,将供心升主动脉和右心房分别与受体腹主动脉和下腔静脉连续吻合。手术完成后,供体心脏应恢复自主窦性搏动,没有活动性出血和明显外科损伤。(2)大鼠肺部细菌感染模型<sup>[8]</sup>:在100 mg/kg 氯胺酮腹腔注射麻醉下,常规备皮消毒,动物30度角头高脚低仰卧于手术台,分离暴露气管后在直视下注入0.2 ml  $1 \times 10^9$  cfu/ml 铜绿假单胞菌(ATCC 27853,复旦大学附属中山医院临床微生物实验中心提供)并保持10 min,使气管内菌液在重力作用下流入支气管和肺泡内,诱发肺部感染。(3)术后管理:动物清醒并自动翻身,放入单独消毒鼠笼,置于恒温恒湿动物房饲养,定时记录一般情况,腹部触诊供心搏动情况。

4. 实验分组(图1):心脏移植术当日即开始给予环孢霉素A(cyclosporine A, CSA,  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 皮下注射)治疗。术后第6天将动物随机分为两组,A组继续CSA治疗,B组停用CSA,改用 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 生理盐水皮下注射。在术后第13天将动物进一步随机给予0.2 ml  $1 \times 10^9$  cfu/ml 铜绿假单胞菌气管内接种(C组)或0.2 ml 生理盐水气管内接种(D组)。因此实验动物可分为AC、AD、BC、BD 4组(每组10只)。

5. 病理检查:于术后第14天处死动物,切取移植心脏横断面中段和左肺中段组织,10%福尔马林液固定后常规切片、HE染色,由同一位病理科医师随机双盲读片。按照国际心肺移植学会(international society of heart and lung transplantation, ISHLT)心脏病理分级标准<sup>[9]</sup>对移植心脏组织进行分级评价。

## 结 果

实验期间动物全部存活。免疫抑制组移植心脏色

泽红润、大小正常、心律整齐、搏动有力,病理镜下观察未见明显排斥反应,ISHLT 评级为0分(图2A,2C)。免疫排斥组移植心脏呈苍白色,明显肿胀,搏动微弱,病理镜下观察发生ISHLT 3R级(重度)排斥反应(图2B,2D)。

气管接种后,无肺部感染组数小时内活动开始增多,主动进食饮水,24 h时已经完全恢复接种前活跃状态,病理镜下观察肺部仅见轻微炎症反应(图3A,3C)。肺部感染组动物术后表现出萎靡少动,呼吸急促,进食饮水次数明显减少,病理镜下观察可见中-重度肺炎表现(图3B,3D)。

## 讨 论

作为目前治疗终末期心脏疾病的惟一有效手段,心脏移植近年来在我国取得了巨大进步<sup>[10-11]</sup>。免疫排斥和感染是心脏移植术后常见的严重并发症和致死原因,两者因初期临床表现极为相似而难于进行早期鉴别诊断,导致贻误治疗。为模拟临床常见的移植术后患者的肺部感染,我们在大鼠心脏移植模型基础上,通过气管接种铜绿假单胞菌,建立心脏移植术后急性排斥合并肺部细菌感染的动物模型,这将有助于开展相关疾病研究,如基因在体功能分析、发病机制探讨,以及发现诊断治疗新靶点。

Kobayashi 等<sup>[12]</sup>通过结扎盲肠导致腹腔感染,研究了感染对移植心脏存活的影响。但该模型主要存在两个不足之处:(1)感染部位为腹腔,而临床最常见的心脏移植术后感染部位为肺脏;(2)感染严重程度的可控性差,盲肠结扎后动物死亡率高,而本模型可通过调整气管接种的病原微生物种类、数量以及时间频率等条件,比较方便地达到理想的实验状态。目前尚无其他类似动物模型的报道。

我们经过预实验,探索了抑制排斥诱导肺脏感染的细菌种类、剂量、给药途径以及给药时间点等各种关键性实验条件。本实验结果表明:(1)受体动物皮下注射CSA  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,能可靠地抑制排斥反应,并且在停用CSA后一周内稳定发生ISHLT 3R级排斥反应。(2)动物接种细菌后,能稳定地诱发病理学证实的细菌性肺炎,而且接种细菌后的实验动物在供心排斥的情况下均能存活1 d以上。

本实验的主要不足之处在于未对肺脏感染导致的系统性炎症反应进行验证,如白细胞计数、血培养和炎症因子如肿瘤坏死因子检测等。因本模型同时用于研究免疫排斥(CSA)和肺脏感染(细菌气管接种)两种实验因素对动物基因表达谱的影响,所以实验分组采用了 $2 \times 2$ 析因实验设计,由于排斥亦可导致系统性炎症

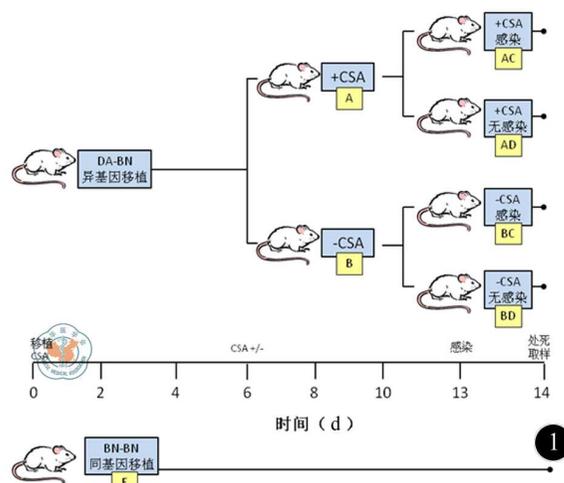


图1 实验分组。AC组：免疫抑制+肺部感染；AD组：免疫抑制+无肺部感染；BC组：免疫排斥+肺部感染；BD组：免疫排斥+无肺部感染

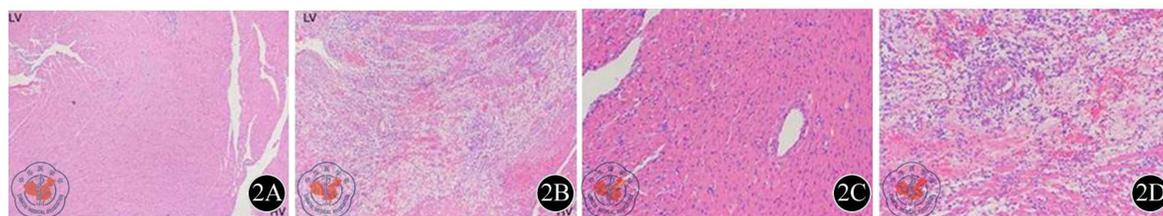


图2 移植心脏病理(HE)。2A, 2B: ×40; 2C, 2D: ×100

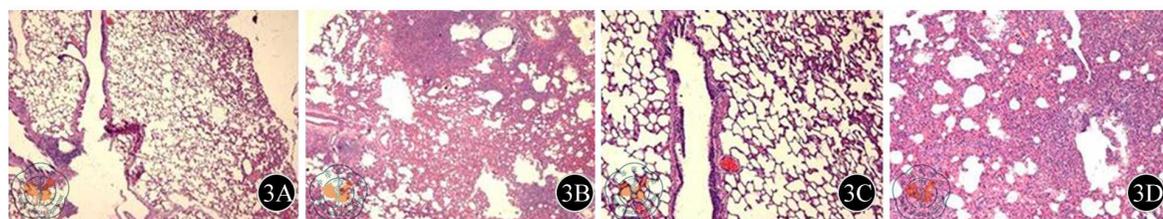


图3 肺脏病理(HE)。3A, 3B: ×40; 3C, 3D: ×100

反应,容易与肺部感染所致者混淆。另一方面,本模型是对心脏移植<sup>[7]</sup>和肺部机会致病菌感染<sup>[8]</sup>这两个成熟动物模型的整合,肺部感染引起的系统性炎症反应表现已经有了全面充分的报道。

综上所述,我们成功建立了心脏移植术后急性排斥合并肺部细菌感染的动物模型,这将有利于开展相关研究,从而提高临床诊疗水平。

### 参 考 文 献

[1] Stehlik J, Edwards LB, Kucheryavaya AY, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-eighth Adult Heart Transplant Report--2011. J Heart Lung Transplant, 2011, 30:1078-1094.

[2] Stehlik J, Edwards LB, Kucheryavaya AY, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-seventh official adult heart transplant report--2010. J Heart Lung Transplant, 2010, 29:1089-1103.

[3] Fishman JA, Rubin RH. Infection in organ-transplant recipients. N Engl J Med, 1998, 338:1741-1751.

[4] Lenner R, Padilla ML, Teirstein AS, et al. Pulmonary complications in cardiac transplant recipients. Chest, 2001, 120:508-513.

[5] Atasever A, Bacakoglu F, Uysal FE, et al. Pulmonary complications in

heart transplant recipients. Transplant Proc, 2006, 38:1530-1534.

[6] Dunn DL. Hazardous crossing: immunosuppression and nosocomial infections in solid organ transplant recipients. Surg Infect (Larchmt), 2001, 2:103-110; discussion 110-102.

[7] Yokoyama H, Ohmi M, Murata S, et al. Proposal of a working left heart model with a heterotopic transplantation technique in rats. J Heart Lung Transplant, 1995, 14:706-712.

[8] 李倬哲, 翟介明, 何礼贤, 等. 粒细胞减少大鼠铜绿假单胞菌肺部感染模型的建立及炎症反应研究. 中华结核和呼吸杂志, 2001, 24:674-678.

[9] Stewart S, Winters GL, Fishbein MC, et al. Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. J Heart Lung Transplant, 2005, 24:1710-1720.

[10] 王春生. 总结经验, 进一步提高我国心肺移植水平. 中华器官移植杂志, 2010, 31:449.

[11] 陈彧, 解基严. 心脏移植治疗严重的心力衰竭[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2007, 1:245-247.

[12] Kobayashi J, Mavroudis C, Crawford SE, et al. A new rat infection-heart transplant model; effect of infection on graft survival studies. J Heart Lung Transplant, 1993, 12:659-664.

(收稿日期:2012-05-08)

(本文编辑: 张岚)