

• 基础论著 •

盲肠结扎穿孔建立小鼠弥漫性血管内凝血动物模型的研究

宋景春 林兆奋 王湏 杨洋 陈自力

【摘要】 目的 应用盲肠结扎穿孔术(CLP)建立小鼠弥漫性血管内凝血(DIC)动物模型。方法 将昆明小鼠随机分为假手术组(sham)、中度CLP组(mCLP)和重度CLP组(hCLP),检测术后即刻、2、6、12、24、48、72 h共7个时间点的外周血血小板计数(PLT)、谷丙转氨酶(ALT)、肌酐(Cr)、凝血酶原时间(PT)、部分凝血活酶时间(APTT)、纤维蛋白原(FIB)、D-二聚体,计算72 h各组存活率,并进行组织病理切片观察。结果 术后72 h小鼠sham组存活率均为100%,mCLP组存活率为60%,hCLP组存活率为10%($P<0.05$)。与sham组相比,mCLP和hCLP组小鼠CLP术后6 h PLT、FIB明显下降,APTT+PT延长,D-二聚体、ALT升高,术后12 h Cr升高(P 均 <0.05),组织病理显示肺和肠系膜出现不同程度的微血栓形成。结论 CLP小鼠模型能够体现类似临床的DIC的发展过程,重度CLP小鼠模型可作为脓毒症性DIC研究的动物模型。

【关键词】 弥漫性血管内凝血; 模型,动物; 小鼠

Disseminated intravascular coagulation model in mice with cecal ligation and puncture Song Jingchun*, Lin Zhaofen, Wang Zhen, Yang Yang, Chen Zili. *Intensive Care Unit, the 94th Hospital of PLA, Nanchang 330002, China
Corresponding author: Song Jingchun, Email: songjingchun@126.com

【Abstract】 Objective To construct disseminated intravascular coagulation(DIC) model in mice with cecal ligation and puncture. **Methods** KM mice were randomized into sham-operated group, middle grade group for cecal ligation and puncture(mCLP group) and high grade group for CLP(hCLP group). Blood were detected in immediately, 2 hours, 6 hours, 12 hours, 24 hours, 48 hours and 72 hours after CLP for platelet count, prothrombin time(PT), activated partial thromboplastin time(APTT), fibrinogen(FIB), D-dimer, alanine aminotransferase(ALT) and creatinine(Cr). Survival analysis at 72 h after CLP for each group was calculated, and pathological changes for mesenterium and lung were also observed at every time point after CLP. **Results** The survival rates of sham group, mCLP group and hCLP group were 100%, 60% and 10%, respectively. Compared with the sham group, the platelet count and FIB of the mCLP group and hCLP group decreased markedly, PT and APTT prolonged, D-dimer and ALT increased at 6 hours after CLP. Tissue edema and inflammatory cell infiltration were typical pathological changes in the tissues of mesenterium and lung in CLP mice. **Conclusion** CLP model in mice show similar pathophysiological with DIC and is fit to be a reliable model to study DIC.

【Key words】 Disseminated intravascular coagulation; Models, animal; Mice

弥散性血管内凝血(disseminated intravascular coagulation, DIC)是以不同原因所致的凝血因子和血小板被激活、继发性纤溶亢进,并引起广泛微血

栓形成和出血为病理特征的获得性临床综合征,是临床一种常见病、多发病,是引起多器官功能衰竭的重要原因^[1]。近年来,国内外曾试用多种外源性物质来制造DIC动物模型,如采用凝血酶、内毒素、高分子右旋糖酐、兔脑粉浸出液等,并得到广泛应用^[2-4]。但这些模型使用外源性物质,与临床病理过程符合度不高。鼠类盲肠结扎穿孔模型(CLP)模仿临床上阑尾炎穿孔或憩室炎穿孔的特点,并一直

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2014.18.024

基金项目:南京军区医学科技创新重点课题项目(2013ZD22);江西省卫生厅科技计划(20133233)

作者单位:330002 南昌,解放军第94医院重症医学科(宋景春、王湏、杨洋、陈自力);第二军医大学长征医院急救科(林兆奋)

通讯作者:宋景春,Email:songjingchun@126.com

被认作是脓毒症研究动物模型的“金标准”^[5]。鉴于脓毒症是 DIC 形成的首要病因, CLP 法也更为符合临床病理过程^[6]。因此, 本研究拟探讨用 CLP 法建立小鼠 DIC 模型, 并用于对 DIC 病理生理过程的研究。

材料与方法

一、实验动物及分组

SPF 级昆明 (KM) 雄性小鼠 135 只, 8 周龄, 质量 18~24 g、由第二军医大学实验动物中心提供 [实验动物生产许可证号: SCXK (沪) 2013-2003 号; 使用许可证号: SYXK (沪) 2013-2003 号]。动物适应性饲养 1 周后, 将 KM 小鼠分别随机分成假手术组 (简称 sham 组)、CLP 中度损伤组 (mCLP 组)、CLP 重度损伤组 (hCLP 组)。分组情况具体如下: (1) 用于生存率分析的共 30 只: sham 组 10 只, mCLP 组 10 只, hCLP 组 10 只; (2) 用于出凝血系列检测和病理分析的共 105 只: sham 组 35 只, mCLP 组 35 只, hCLP 组 35 只, 按术后即刻、2、6、12、24、48、72 h 7 个时间点取血标本。

二、主要试剂和仪器

Coulter-JT 全自动检测仪 (美国库尔特仪器公司生产), 全自动凝血分析仪 (法国 STA-Compact 公司), 7020 型全自动生化分析仪 (日本日立公司), DENLEY DRAGON 酶标仪 (芬兰 Thermo 公司), TGL-168 离心机 (上海安亭科学仪器厂), LEICA RM2135 轮转式切片机 (德国 LEICA 公司)。

三、建立小鼠 CLP 模型

术前 8 h 禁食。CLP 组常规消毒腹部, 皮肤正中切开, 打开腹腔寻找盲肠, 小心分离其远端与大肠的系膜, 避免碰伤肠系膜血管。盲肠内如有粪便, 则轻轻将其挤向与其相连的结肠。mCLP 组用无菌 4 号丝线紧紧结扎盲肠远端 1/2 处, hCLP 组结扎盲肠远端 3/4 处, 并用无菌 7 号针头在已结扎盲肠远端中央处贯通穿刺, 然后把盲肠推回腹腔, 关闭腹腔, 逐层缝合。sham 组分离盲肠末端后, 不进行结扎穿孔, 直接关闭腹腔, 逐层缝合^[5]。所有动物均在术后立即背部皮下注射生理盐水 (50 ml/kg), 行液体复苏治疗。整个实验过程在室温 22~25 °C 环境进行, 术后小鼠自由饮食饮水。

四、动物模型 DIC 判断标准

参照 1999 年第六届全国血栓与止血会议制定的诊断 DIC 标准以及 Kessler 等^[7]建立的鼠类 DIC

模型诊断标准, 确立本实验 DIC 判断标准。即与对照组比较: 凝血酶原时间 (PT)、活化部分凝血酶原时间 (APTT) 明显延长; 纤维蛋白原定量 (FIB)、血小板计数 (PLT) 明显降低; D-二聚体明显升高; 并以器官组织切片显示微血管中出现纤维蛋白微血栓作为判断 DIC 的关键指标。

五、DIC 检测指标

(1) 凝血指标: 全自动凝血分析仪用血凝法检测 PT、APTT、FIB。(2) 纤溶指标: D-二聚体均用 ELISA 法检测。每孔各加入标准品或待测样品 100 μ l, 将反应板充分混匀后置 37 °C 120 min, 用洗涤液将反应板充分洗涤 4~6 次, 每孔中加入第一抗体工作液 100 μ l, 将反应板充分混匀后置 37 °C 60 min。再次洗板, 每孔加酶标抗体工作液 100 μ l。将反应板置 37 °C 30 min。再次洗板, 每孔加入底物工作液 100 μ l, 置 37 °C 暗处反应 15 min。然后每孔加入 100 μ l 终止液混匀, 30 min 内用酶标仪在 450 nm 处测吸光值。(3) 肺、肠系膜组织切片 HE 染色后在光学显微镜下观察有无微血栓形成。

六、器官损伤指标

(1) 血液: Coulter-JT 全自动检测仪检测血小板 (PLT); (2) 肝脏: 全自动生化分析仪化学发光法检测血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT); (3) 肾脏: 全自动生化分析仪化学发光法检测血清肌酐 (Cr); (4) 肺、肠系膜组织切片 HE 染色观察病理损伤改变。小鼠肺、肠系膜组织用 10% 甲醛固定 24 h 后, 经洗涤、脱水、石蜡包埋、轮转式切片机切成 4 μ m 切片, 分别进行 HE 染色。

七、统计学分析

采用 SPSS 18.0 统计分析软件对数据进行统计分析, 数据均采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。应用生存分析中的 Kaplan-Meier 法比较各组小鼠存活率的差异, 多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 组间两两比较采用最小显著性差异法 (LSD 法)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、生存率分析

术后 72 h, sham 组小鼠无死亡, 存活率均为 100%; mCLP 组小鼠存活 6 只, 死亡 4 只, 存活率为 60%; hCLP 组小鼠存活 1 只, 死亡 9 只, 存活率为 10%。采用生存分析中的 Kaplan-Meier 法分析显示, CLP 术后, mCLP 组小鼠 72 h 生存能力高于

hCLP 组 ($P < 0.05$)。见图 1。

二、术后不同时间点小鼠 PLT、PT、APTT、FIB 和生化值的改变

凝血指标方面,与 sham 组相比,mCLP 和 hCLP 组小鼠 PLT 和 FIB 在 CLP 术后 6 h 开始持续下降,24 h 后下降趋势减慢,直至 72 h 最低 ($P < 0.05$);hCLP 组较 mCLP 组的 PLT 和 FIB 下降更加明显(图 2A, 2D)。与 sham 组相比,mCLP 和 hCLP 组小鼠 PT 在 CLP 术后 6 h 开始明显延长,48 h 延长出现高峰,随后缓慢回缩 ($P < 0.05$) (图 2B); mCLP 和 hCLP 组小鼠 APTT 在 CLP 术后 6 h 开始明显延长,24 h 延长出现高峰,随后缓慢回缩 ($P < 0.05$) (图 2C)。与 mCLP 组相比,hCLP 组的 PT+APTT 延长更明显 ($P < 0.05$)。

与 sham 组相比,mCLP 和 hCLP 组小鼠的 D-二聚体在 CLP 术后 6 h 开始明显升高,24 h 达高峰,随后出现缓慢下降 ($P < 0.05$); 术后 12 h 开始,hCLP 组较 mCLP 组的 Cr 上升更加明显(图 2E)。

肝肾功能指标方面,与 sham 组相比,mCLP 和 hCLP 组小鼠的 ALT 在 CLP 术后 6 h 开始持续升高,24 h 后上升趋势减慢,48 h 达高峰,随后出现缓慢下降 ($P < 0.05$); 术后 12 h 开始,hCLP 组较 mCLP 组的 ALT 上升更加明显(图 2F)。

与 sham 组相比,mCLP 和 hCLP 组小鼠的 Cr 在 CLP 术后 12 h 开始明显升高,24 h 达高峰,随后出现缓慢下降 ($P < 0.05$); 术后 12 h 开始,hCLP 组较 mCLP 组的 Cr 上升更加明显(图 2G)。

三、肠、肺组织的病理改变

sham 组肠和肺组织则无明显炎症细胞浸润,未见微血栓征象。mCLP 和 hCLP 组小鼠组织切片 HE 染色发现,CLP 术后 2 h 肠和肺组织开始出现炎症细胞浸润,并逐渐加重,至 12~48 h 达到高峰,其后逐渐减轻。肺组织严重时可见肺间隔增宽,广泛肺泡壁血管充血,大量炎症细胞浸润。肠系膜结缔组织切片严重时主要表现大量炎症细胞浸润。肠系膜和肺组织 CLP 术后 6 h 可见微血管微血栓(图 3A, 3B),12~48 h 数目最多(图 3C),hCLP 组较 mCLP 组明显。

讨 论

DIC 是一组发生在多种疾病基础上,由致病因素激活凝血系统,导致微血管内广泛微血栓形成,凝血因子被大量消耗及纤溶异常激活,所引起的全

身性血栓-出血综合征。DIC 的临床诊断可依据血栓与止血国际协会的 DIC 五步评分法和 1999 年第六届全国血栓与止血会议制定的诊断 DIC 标准,但动物模型研究尚缺乏统一标准。据 Line 等^[2]统计结果,至今 DIC 已有研究应用大鼠、小鼠、豚鼠、兔、狗、猪、羊和灵长类动物等,DIC 诱导剂也有脂多糖、细菌、高分子右旋糖酐、组织因子、蛇毒、肿瘤、血小板激活因子等数十种。国内研究应用高分子右旋糖酐和脂多糖比例较高。高分子右旋糖酐诱导 DIC 模型的原理是引起血管舒缩功能紊乱,血流变慢,为 DIC 的发生创造条件。脂多糖诱导 DIC 模型启动机体内源性凝血途径,诱导凝血酶的产生,从而引起广泛的促凝血和促血栓形成作用。脂多糖静脉注射后引起的即刻心血管抑制效应会很大程度上影响模型的存活率^[8]。从上述两种模型机理可知,高分子右旋糖酐和脂多糖诱发 DIC 的病理生理过程与临床尚有很大不同。而据日本脓毒症研究小组统计,临床脓毒症诱发 DIC 的发病率高达 50%以上^[9]。CLP 模型目前是用以研究脓毒症最广泛的一种模型,模仿临床上阑尾炎穿孔或憩室炎穿孔导致脓毒症休克的病理生理过程,故尝试应用 CLP 模型研究 DIC 是更符合临床实际的研究手段^[10-11]。

PT 和 APTT 分别反映外源性、内源性凝血功能是否正常,其中 PT、APTT 时间缩短提示血液处于高凝状态或存在血栓栓塞性疾病,两者时间延长则反映机体有出血倾向。FIB 是机体止血生理中重要的凝血因子,FIB 增高提示血液处于高凝、高粘状态,易形成血栓,FIB 减少时机体可出现出血征象。D-二聚体是纤维蛋白单体经活化因子 XIII 交联后,再经纤溶酶水解所产生的一种特异性纤溶过程标记物,主要反映纤维蛋白溶解功能。与 sham 组相比,mCLP 和 hCLP 组小鼠 CLP 术后 6 h PLT、FIB 明显下降,APTT、PT 延长,D-二聚体升高,提示 CLP 术后小鼠出现 FIB 过度消耗,纤溶系统功能亢进,出血倾向明显,证实 DIC 病理生理过程出现。CLP 术后 6 h mCLP 和 hCLP 组小鼠出现 ALT 升高,术后 12 h 出现 Cr 升高,提示 CLP 术后 6 h 出现多器官功能损害。微血栓是指在小于 150 μm 的微血管中,由血小板、纤维素和(或)红细胞组成,HE 染色呈粉红色,单纯的红细胞堆积认为是血管中残留的血液,HE 染色呈点样深红色。组织病理显示 mCLP 和 hCLP 组小鼠 CLP 术后 2 h 肠和肺组织开始出现炎症细胞浸润,并逐渐加重,至 24~48 h 达

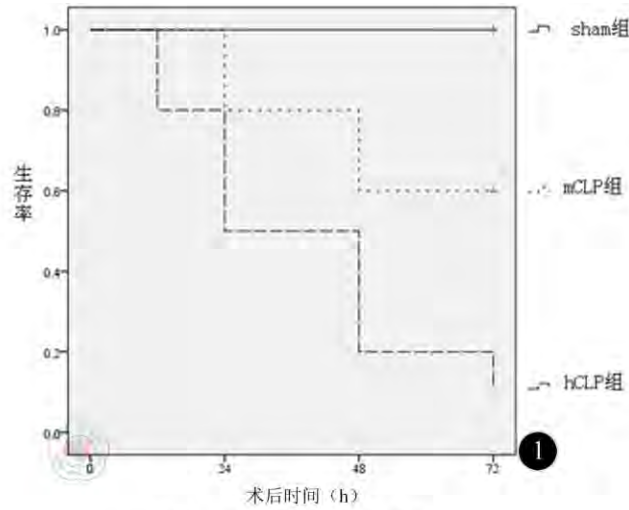


图1 小鼠术后72 h存活率

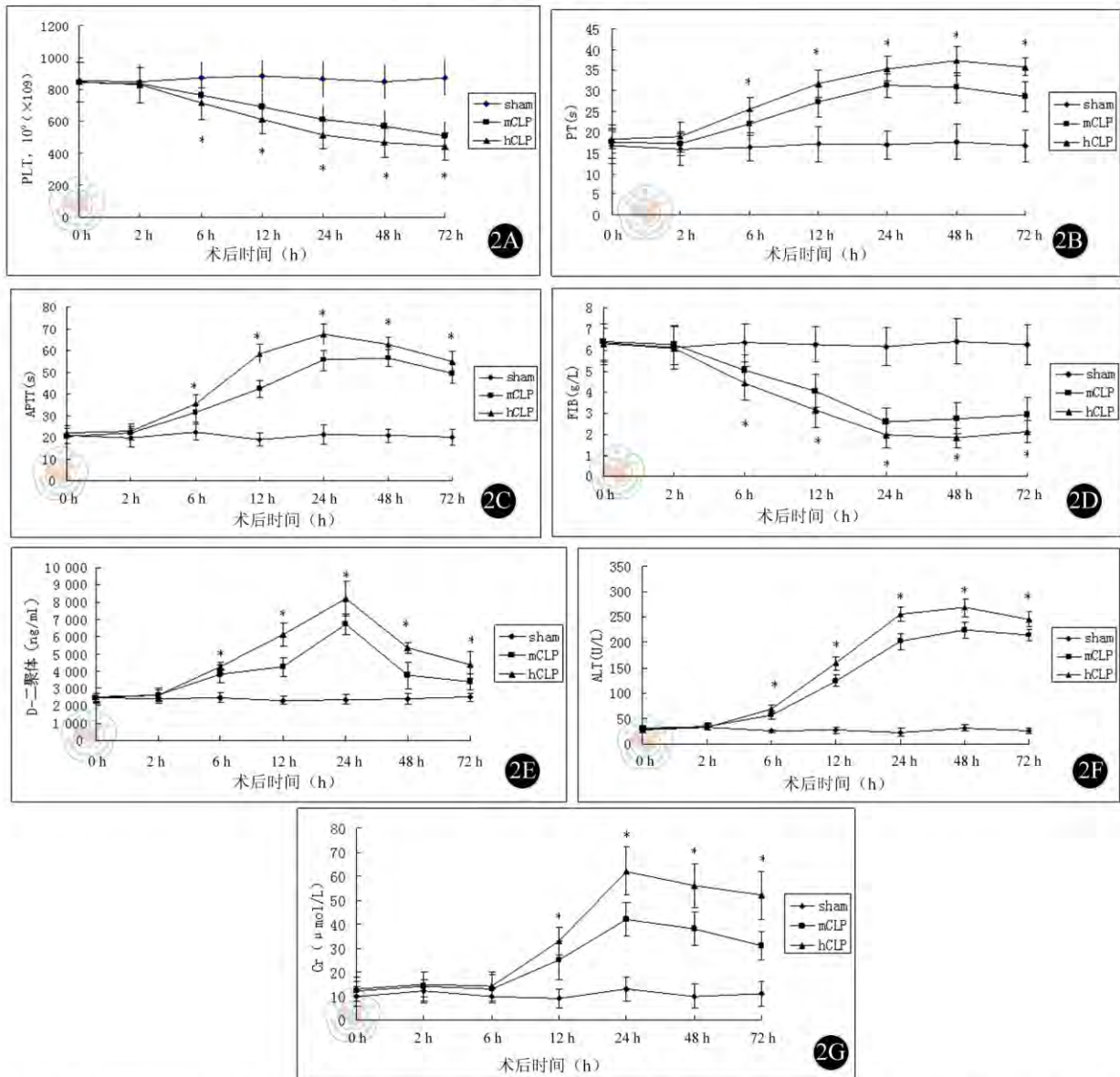


图2 术后不同时间点小鼠PLT、PT、APTT、FIB和生化值的改变。2A: PLT; 2B: PT; 2C: APTT; 2D: FIB; 2E: D-二聚体; 2F: ALT; 2G: Cr。与sham组比较, * $P < 0.05$

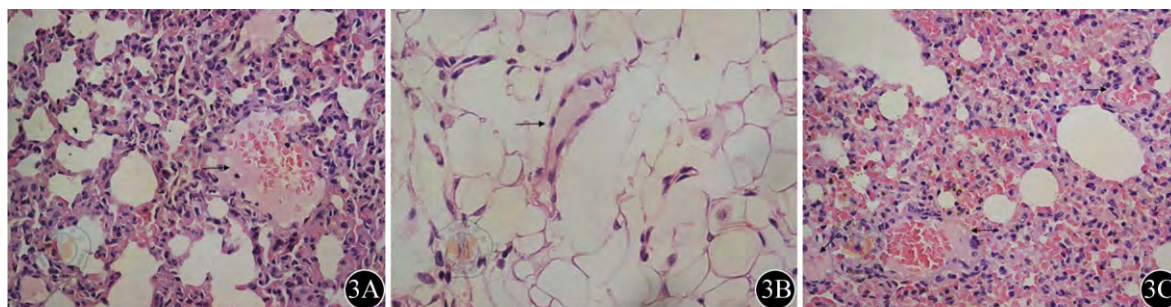


图3 小鼠CLP术后肺与肠系膜组织的病理改变(HE ×400)。3A: CLP术后6 h肺组织混合血栓。3B: CLP术后6 h肠系膜组织纤维素血栓。3C: CLP术后12 h肺组织多发血栓

到高峰,其后逐渐减轻。术后6 h mCLP和hCLP组小鼠肺和肠系膜微血管即开始出现不同程度的微血栓形成,12~48 h更加明显,证实CLP诱发DIC成功。

CLP模型的预后与动物品系、年龄和性别、盲肠长度和结扎范围、穿刺针尺寸和数目等诸多因素相关。因此,本研究依据2008年Rittirsch等的报道,采用中度与重度CLP模型分组对小鼠的变化进行研究。本研究结果显示,术后72 h KM小鼠sham组存活率均为100%,mCLP组存活率为60%,hCLP存活率为10% ($P < 0.05$)。hCLP组较mCLP组PLT、FIB下降幅度更大,APTT+PT延长时间更长,D二聚体升高更为明显,肝肾损害也更加严重,这是选择模型时需要考虑的因素。

综上所述,CLP小鼠模型能够体现类似临床的DIC的发展过程,重度CLP模型是DIC研究的更好选择。

参 考 文 献

- [1] Toh CH, Alhamdi Y. Current consideration and management of disseminated intravascular coagulation[J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2013, 2013: 286-291.
- [2] Line Olrik Berthelsen, Annemarie T. Kristensen, Mikael Tranholm. Animal models of DIC and their relevance to human DIC: A systematic review[J]. Thrombosis Research, 2011(128): 103-116.
- [3] Tagami T, Matsui H, Horiguchi H, et al. Antithrombin and mortality in severe pneumonia patients with sepsis-associated disseminated

intravascular coagulation: an observational nationwide study[J]. J Thromb Haemost, 2014.

- [4] Seki Y, Wada H, Kawasugi K, et al. A prospective analysis of disseminated intravascular coagulation in patients with infections[J]. Intern Med, 2013, 52(17): 1893-1898.
- [5] Daniel Rittirsch, Markus S Huber-Lang, Michael A Flierl, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture[J]. Nature Protocols, 2009, 4(1): 31-36.
- [6] Iba T, Yamada A, Hashiguchi N, et al. New therapeutic options for patients with sepsis and disseminated intravascular coagulation[J]. Pol Arch Med Wewn, 2014, 124(6): 321-328.
- [7] Kessler CM, Tang Z, Jacobs HM, et al. The suprapharmacological dosing of antithrombin concentrate for Staphylococcus aureus-induced Disseminated intravascular coagulation in guinea pigs: substantial reduction in mortality and morbidity[J]. Blood, 1997, 89(12): 4393-4401.
- [8] Siempos II, Lam HC, Ding Y, et al. Cecal Ligation and Puncture-induced Sepsis as a Model To Study Autophagy in Mice[J]. J Vis Exp, 2014, 9 (84): e51066.
- [9] Ogura H, Gando S, Saitoh D, et al. Epidemiology of severe sepsis in Japanese intensive care units: a prospective multicenter study[J]. J Infect Chemother, 2014, 20(3): 157-162.
- [10] Zafrani L, Gerotziafas G, Byrnes C, et al. Calpastatin controls polymicrobial sepsis by limiting procoagulant microparticle release[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2012, 185(7): 744-755.
- [11] Park JH, Hwang IC, Ha N, et al. Effects of the anti-sepsis drug, (S)-1-(α -naphthylmethyl)-6, 7-dihydroxy-1, 2, 3, 4-tetrahydroisoquinoline (CKD-712), on mortality, inflammation, and organ injuries in rodent sepsis models[J]. Arch Pharm Res, 2011, 34(3): 485-494.

(收稿日期: 2014-07-07)

(本文编辑: 戚红丹)