

小鼠肠缺血再灌注诱发多器官功能障碍的动物模型研究*

郑德义, 王毅, 杜娇, 李平洋, 肖向阳, 程代薇, 李自力

(贵州省人民医院 烧伤整形科, 贵州 贵阳 550002)

[摘要] 目的: 探讨建立稳定的肠缺血再灌注(II/R)损伤诱发多器官功能障碍综合征(MODS)的实验动物模型。方法: C57 BL/6 小鼠 72 只, 根据观察指标随机分组; 分组 1, 肠缺血 30 min 组、40 min 组、50 min 组和 60 min 组后恢复灌注, 观察造模后 7 d 不同肠缺血时间动物生存率; 分组 2, 假手术组(Sham)、缺血 40 min 后再灌注组(II/R), 于再灌注 1 h、6 h 及 12 h 取标本, 检测血清 ALT、AST、Crea 及 LDH 水平, 同时取肺、肝及肾组织做病理学检查。结果: 随着肠缺血时间延长, 动物生存率明显降低, 肠缺血 40 min 小鼠 7 d 内生存率为 60%, 选择缺血 40 min 作为动物模型进行分组 2 实验; 肠缺血 40 min 后再灌注 6 h 时, 血清 ALT、AST、Crea 和 LDH 明显升高 ($P < 0.05$), 肺、肝脏及肾脏组织器官发生病理学改变。结论: 小鼠肠缺血 40 min 再灌注后 6 h, 是研究 II/R 损伤诱发 MODS 较理想的时间点。

[关键词] 肠; 缺血再灌注; 多器官功能障碍; 模型, 动物; 小鼠

[中图分类号] R363; R656.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2015)04-0346-03

Research on Multiple Organ Dysfunction Syndrome Model Induced by Intestinal Ischemia/Reperfusion in Mice

ZHENG Deyi, WANG Yi, DU Jiao, LI Pingyang, XIAO Xiangyang, CHENG Daiwei, LI Zili

(Department of Burn and Plastic Surgery, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an animal model of multiple organ dysfunction syndrome (MODS) induced by intestinal ischemia/reperfusion (II/R) in mice. **Methods:** C57 BL/6 mice were randomly divided into group 1 (intestinal ischemia 30, 40, 50 and 60 min subgroups) and group 2 (sham operation subgroup, II/R subgroup). The survival rates of mice were observed after different intestinal ischemia time in group 1. Biochemical indexes of ALT, AST, Crea and LDH in serum were measured, and pathological changes of the lung, liver and kidney were observed by optical microscope after II/R in group 2. **Results:** With intestinal ischemia time prolonged, mice survival rate was significantly reduced. Compared with intestinal ischemia 30 min group, the mice survival rates in more than 50 min intestinal ischemia group decreased significantly ($P < 0.05$). The mice survival rates in intestinal ischemia 60 min group decreased significantly than in less than 50 min intestinal ischemia group ($P < 0.05$). After intestinal ischemia 40 min and reperfusion 6 h, mice serum ALT, AST, Crea and LDH increased significantly ($P < 0.05$) and pathological changes of lung, liver and kidney could be observed. **Conclusion:** 6 h of reperfusion after mesentery ischemia for 40 ~ 50 min is the ideal choice to research MODS induced by II/R in mice.

[Key words] intestine; ischemia reperfusion; multiple organ failure; models, animal; mice

*[基金项目] 国家自然科学基金(30730091); 贵州省科学技术基金[黔科合 LS 字(2011)15 号]

网络出版时间: 2015-04-20 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20150420.1911.019.html>

肠道缺血再灌注(intestinal ischemia reperfusion, I/R)损伤是严重创(烧)伤后常见的病理生理过程,肠缺血再灌注不仅引起肠损伤,而且导致机体其他器官如肺、肝及肾脏等多器官损害^[1],发生多器官功能障碍综合征(MODS),甚至多器官衰竭死亡。国内文献多以大鼠、兔等较大型啮齿动物为实验对象^[2-3],且肠缺血及再灌注时间不一,本研究以小鼠为实验对象,探索建立稳定的 I/R 诱发 MODS 实验动物模型。

1 材料与方法

1.1 动物分组

10 周龄健康雄性 C57BL/6 小鼠 72 只,体重 22~26 g,根据观察指标随机分组。分组 1:肠缺血 30 min 组、40 min 组、50 min 组和 60 min 组,每组 12 只,手术后 7 d 时观察肠缺血不同时间小鼠的生存率。分组 2:假手术组(Sham,6 只小鼠),肠缺血 40 min 后再灌注组(I/R,18 只小鼠),分别于再灌注 1 h、6 h 和 12 h(各 6 只)时取标本。实验经过医院伦理学委员会批准。

1.2 方法

参照文献^[4]实验,所有小鼠术前禁食 12 h,自由饮水,腹腔注入 1% 戊巴比妥钠(50 mg·kg⁻¹)麻醉,开腹钝性分离肠系膜前动脉,用动脉夹夹闭肠系膜前动脉(SMA)造成小鼠肠缺血,缺血相应时间后松开动脉夹恢复血流再灌注,关闭腹腔;假手术组不夹闭 SMA(仅开腹后关闭腹腔)。术后立即腹壁皮下注入生理盐水 1 mL,自由进饮食。

1.3 检测指标

观察分组 1 中的 48 只小鼠 7 d 内的生存率,分组 2 中的 24 只小鼠分别于相应时间,心脏穿刺抽血,室温静置、离心(4 000 g/min)15 min 分离血清,-80 °C 保存,统一检测血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、肌酐(Crea)、乳酸脱氢酶(LDH)水平;肠缺血再灌注后 6 h 取右上肺叶、肝及肾脏组织做病理学检查。

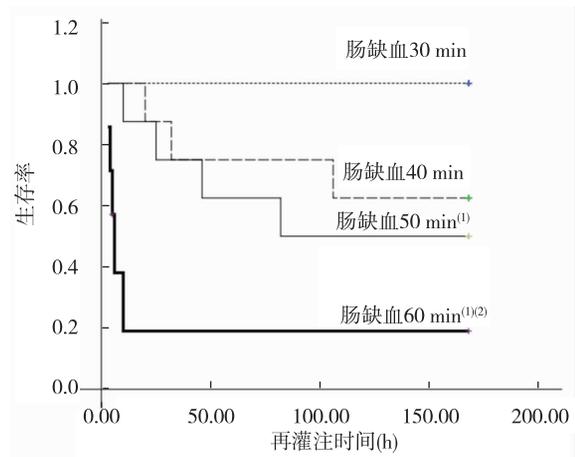
1.4 统计学处理

数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,SPSS 16.0 统计软件处理,组间差异采用单因素方差分析,Kaplan-Meier 生存曲线计算生存率,采用 Mantel-cox 检验比较生存率, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 I/R 小鼠生存率

观察肠缺血再灌注后 7 d 内动物生存状况,随着肠缺血时间延长,小鼠生存率明显降低。在观察期内,肠缺血 30 min 小鼠全部存活,缺血 40 min 动物生存率 60%,缺血 50 min 小鼠生存率仅 50% (在 82 h 半数动物死亡),肠缺血 60 min 小鼠生存率 < 40% (在 6 h 时半数动物死亡)。与肠缺血 30 min 比较,肠缺血 50 min 和 60 min 组小鼠死亡率明显增加($P < 0.05$),见图 1。



⁽¹⁾与肠缺血 30 min 比较, $P < 0.05$;⁽²⁾与肠缺血 ≤ 50 min 比较, $P < 0.05$

图 1 不同肠缺血时间小鼠的生存率

Fig. 1 Mice survival rate in different ischemia time groups

2.2 血清 ALT、AST、Crea 和 LDH

小鼠肠缺血再灌注 1 h 时,仅有 Crea 指标高于假手术组($P < 0.01$),肠缺血后再灌注 6 h,4 项血清学指标均明显高于假手术组($P < 0.01$);而在 12 h 血清指标中仅有 ALT 及 AST 明显高于假手术组($P < 0.01$)。结果提示,小鼠肠缺血再灌注损伤所引起的 MODS 在手术后 6 h 是最为显著,是最佳时间点。见表 1。

2.3 肺、肝和肾组织改变

假手术组小鼠肺、肝脏及肾脏组织形态正常。I/R 后 6 h 肺、肝脏及肾脏发生病理改变,主要肺组织充血,肺间质炎性细胞浸润;肝细胞水样变性、气球样变性,部分有炎性细胞浸润;肾小管上皮细胞水肿(图 2)。

表 1 肠缺血后不同再灌注时间血清生化指标变化($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The serum biochemical index changes in different reperfusion time after ischemia

生化指标	sham	再灌注时间		
		1 h	6 h	12 h
ALT(u/L)	40.25 ± 2.63	56 ± 20.07	179.5 ± 141.59 ⁽¹⁾	128.33 ± 89.67 ⁽¹⁾
AST(u/L)	195.75 ± 57.53	156.67 ± 22.37	483.33 ± 176.31 ⁽¹⁾	365 ± 117.29 ⁽¹⁾
Crea(mmol/L)	5.25 ± 0.96	17.67 ± 12.58 ⁽¹⁾	10.33 ± 1.86 ⁽¹⁾	8.00 ± 2.65
LDH(u/L)	1496.75 ± 382.85	1406.33 ± 1136.55	3119 ± 947.58 ⁽¹⁾	1910.33 ± 369.85

⁽¹⁾与 sham 比较, $P < 0.01$

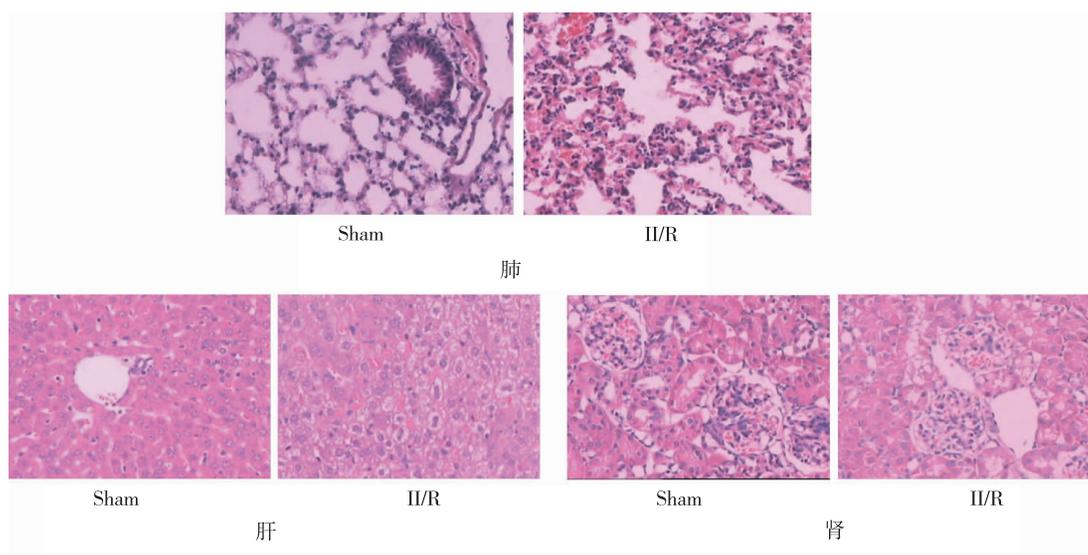


图 2 各组小鼠肺、肝和肾组织学表现(HE, ×100)

Fig. 2 The pathological change of lung, liver and kidney induced by II/R

3 讨论

肠缺血再灌注是严重创伤、烧伤休克后救治过程中可能发生的一个共同的病理生理阶段。肠缺血再灌注损伤后肠黏膜屏障受损及功能下降,促使肠道细菌及内毒素移位,氧自由基损害、中性粒细胞活化和各种炎性细胞因子的过度合成及释放,诱发全身炎性反应,导致肺、肝、肾脏等远隔脏器的损害^[1],是 ARDS 和 MODS 发生的重要原因^[5-6]。研究 II/R 损伤的发病机制,首先建立稳定、可靠的实验动物模型是关键。

本实验表明,随着肠缺血时间增加,动物存活率逐渐降低,肠缺血 60 min 组小鼠,再灌注 6 h 时半数动物死亡,显然不合作为研究模型。肠缺血时间 40 ~ 50 min 小鼠在 1 周观察期内,半数以上存活,是较为理想的肠缺血时间。因此,选择肠缺血 40 min 后再灌注 1 h、6 h 及 12 h 时,观察肝、肾及全身组织器官功能损伤情况及血清 AST、ALT、

LDH 及 Crea 水平。LDH 几乎存在于所有器官组织细胞内,是有机体能量代谢过程中参与糖酵解的重要酶,当组织器官发生病变时,细胞膜通透性增加,释放更多的 LDH 到细胞间隙和体液,LDH 水平是反应细胞膜损伤较灵敏的指标之一,是目前比较公认测定细胞膜损伤的指标^[7]。本研究发现,小鼠肠缺血再灌注 1 h 时血清学指标仅有 Crea 高于假手术组,提示此时再灌注造成的损伤并不明显;12 h 时血清学指标仅有 ALT 和 AST 高于假手术组,提示再灌注 12 h 时组织器官的修复功能可能部分恢复;再灌注 6 h 时血清学 4 项指标明显高于假手术组,而且病理检查提示,肠缺血后再灌注 6 h,肺、肝脏及肾脏发生改变,主要表现为组织细胞水肿、变性,伴随炎症细胞浸润,提示小鼠缺血再灌注 6 h 是观察 MODS 模型的最佳时间点。模型制作过程中,因小鼠体形小,要求手术操作熟练、轻柔、精细,减少腹腔脏器的翻动,术中、术后注意保温,缺血期间断缝合或蚊式钳夹闭暂时关闭腹腔,以防肠组织及腹腔体液外渗。

(下转第 355 页)

- 杂志, 2011(3): 228-229.
- [4] Chen B, Liao WQ, Xu N, et al. Adiponectin protects against cerebral ischemia-reperfusion injury through anti-inflammatory action [J]. *Brain Res*, 2009(4):129-137.
- [5] Crack PJ, Taylor JM, Ali U, et al. Potential contribution of NF-kappaB in neuronal cell death in the glutathione peroxidase-1 knockout mouse in response to ischemia-reperfusion injury [J]. *Stroke*, 2006(6):1533-1538.
- [6] Ridder DA, Schwaninger M. NF-κB signaling in cerebral ischemia [J]. *Neuroscience*, 2009(3):995-1006.
- [7] Clark IA, Alleva LM, Vissel B, et al. The roles of TNF in brain dysfunction and disease [J]. *Pharmacol Ther*, 2010(3):519-548.
- [8] 段国平, 刘晓利, 赵丕文. 葡萄籽原花青素的药理学研究进展 [J]. *环球中医药*, 2014(4):313-316.
- [9] 顾冰. 原花青素在 D-半乳糖致衰老大鼠大脑、心脏组织中的抗氧化作用 [J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2011(22):1-3.
- [10] 吴岚, 刘开祥, 俸军林, 等. 原花青素对脑缺血再灌注损伤大鼠血脑屏障通透性和自由基含量的影响 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2009(7):801-803
- [11] Annapurna A, Ansari MA, Manjunath PM, Partial role of multiple pathways in infarct size limiting effect of quercetin and rutin against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2013(4):491-500
- [12] 李建玲, 何斌, 李琳琳. 原花青素对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *中国生化药物杂志*, 2011(6):463-466.
- [13] 杨东斌, 原花青素对大鼠脑缺血再灌注损伤脑组织中 TL-6 和 ET-1 的影响 [J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2013(9):44-45.
- (2015-01-12 收稿, 2015-03-09 修回)
中文编辑: 刘平; 英文编辑: 刘华

(上接第 348 页)

综上所述,应用阻断小鼠肠系膜上动脉 40~50 mm 再灌注 6 h,既能保证动物生存率,满足实验要求,又能形成肠道及远隔器官损伤及功能障碍,为进一步研究肠缺血再灌注诱发 MODS 发病机制的提供依据。

4 参考文献

- [1] Harward TR, Brooks DL, Flynn TC, et al. Multiple organ dysfunction after mesenteric artery revascularization [J]. *J Vasc Surg*, 1993(18):459-469.
- [2] 朱枝祥, 陈丁丁. 肠系膜动脉缺血再灌注诱发多器官功能障碍综合征模型研究 [J]. *抗感染药学*, 2010(2):93-96.
- [3] 宋富波, 杨牟, 车海杰. 兔急性肠道缺血再灌注损伤模型的建立 [J]. *青岛大学医学院学报*, 2010(2):166-170.
- [4] 郑德义, 王建明, 贾一韬, 等. p38 丝裂原活化蛋白激酶在小鼠肠缺血再灌注肺损伤中的作用 [J]. *第二军医大学学报*, 2010(3):254-257.
- [5] Takayama M, Ishibashi M, Ishii H, et al. Effects of neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046) on lung injury after intestinal ischemia-reperfusion [J]. *J Appl Physiol*, 2001(4):1800-1807
- [6] Yao Y, Yu Y, Wu Y, et al. The role of gut as a cytokine-generating organ in remote organ dysfunction after intestinal ischemia and reperfusion [J]. *Chin med J*, 1998(6):514-518.
- [7] 王敏, 俞诗源, 刘佳昕, 等. X 射线辐射对小鼠肾组织中乳酸脱氢酶、Na⁺-K⁺ATP 酶活性及 caspase-3 蛋白、Bax 蛋白表达的影响 [J]. *甘肃农业大学学报*, 2014(2):41-47.
- (2015-01-23 收稿, 2015-03-11 修回)
中文编辑: 刘平; 英文编辑: 刘华

(上接第 351 页)

- [8] 翁霞, 辛光, 李云霞. 蒽酮比色法测定马铃薯淀粉总糖的条件研究 [J]. *食品研究与开发*, 2013(17):86-88.
- [9] 郭雷, 吕明生, 王淑军等. 苯酚-硫酸法测定櫻桃酒中总糖 [J]. *食品研究与开发*, 2010(6):130-132.
- [10] 陈焕娜, 刘洋, 赵晓霞, 等. 分光光度法测定丹参总酚含量方法的研究 [J]. *亚太传统医药*, 2010(8):19-22.
- [11] 陈农, 丁宁, 彭国平, 等. 两种方法测定丹参滴注射液糖类含量 [J]. *医药导报*, 2013(5):672-674.
- [12] 阮鸣. 冠心宁注射液中大类成分的含量测定 [J]. *南京晓庄学院学报*, 2013(3):71-75.
- [13] 李萌, 刘新国, 吴金虎, 等. 前愈合方中多糖成分的提取工艺优选 [J]. *中国医院药学杂志*, 2011(24):2018-2021.
- [14] 孙淑玲, 刘坤, 杨新涛. 关于食品中总糖测定中几个问题的探讨 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2013(13):2852-2853.
- (2014-09-25 收稿, 2015-02-15 修回)
中文编辑: 刘平; 英文编辑: 赵毅