

· 论著 ·

D-氨基半乳糖致敏小鼠内毒素性休克模型的建立



高宏富 肖光夏 任建东 夏培元

【摘要】 目的 建立适用于拮抗内毒素/脂多糖(LPS)药物研究的昆明小鼠内毒素性休克模型。方法 将不同剂量的D-氨基半乳糖(D-Gal)及LPS先后注射于小鼠腹腔,根据注射药物不同分为1组:等渗盐水(NS)+LPS 80 mg/kg;2组:NS+LPS 90 mg/kg;3组:D-Gal 500 mg/kg+NS;4组:D-Gal 500 mg/kg+LPS 25 μg/kg;5组:D-Gal 500 mg/kg+LPS 50 μg/kg;6组:D-Gal 500 mg/kg+LPS 250 μg/kg;7组:D-Gal 600 mg/kg+NS;8组:D-Gal 600 mg/kg+LPS 10 μg/kg;9组:D-Gal 600 mg/kg+LPS 25 μg/kg;10组:D-Gal 600 mg/kg+LPS 50 μg/kg。观察注射后小鼠死亡情况,计算其死亡率。选择死亡率100%的剂量组合刺激小鼠,分为对照组:注射D-Gal 600 mg/kg+NS;LPS组:注射D-Gal 600 mg/kg+LPS 50 μg/kg。于注射后30、75、120 min取小鼠静脉血,检测其血清肿瘤坏死因子α(TNF-α)水平。另取小鼠10只,同前分组,于注射后5 h处死,取其肺、肝、小肠行病理学观察。结果 2、6、10组小鼠死亡率达100%($P < 0.01$)。对照组小鼠血清TNF-α含量保持在较低水平;LPS组伤后各时相点TNF-α含量均显著高于对照组($P < 0.01$),在注射后75 min时达高峰(6365 ± 2087) ng/L。LPS组小鼠肺、肝、小肠出现明显炎症反应;对照组仅肝脏有轻微病理改变。结论 D-Gal致敏小鼠对LPS的反应符合内毒素性休克的特征,该小鼠模型适用于拮抗LPS的药理学研究。

【关键词】 内毒素类; 休克; 模型,动物; D-氨基半乳糖

Reproduction of the murine endotoxin shock model in D-galactosamine-sensitized KunMing mice GAO Hong-fu, XIAO Guang-xia, REN Jian-dong, XIA Pei-yuan. Institute of Burn Research, Southwest Hospital, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, P. R. China

Corresponding author: XIA Pei-yuan, Email: pyxia@yahoo.com.cn, Tel: 023-68754463

【Abstract】 Objective To reproduce a Kunming murine endotoxin shock model suitable for the anti-endotoxin pharmaceutical research. Methods Kunming mice were challenged with an intraperitoneal (i. p.) injection of different doses of D-galactosamine (D-Gal) and endotoxin (LPS) and divided into 10 groups: i. e., group 1 [with injection of isotonic saline solution (NS) and LPS]; group 2 (with injection of NS and 90mg/kg LPS), group 3 (with injection of NS and 500mg/kg D-Gal), group 4 (with injection of 500mg/kg D-Gal and 25 μg/kg LPS), group 5 (with injection of 500mg/kg D-Gal and 50 μg/kg LPS), group 6 (with injection of 500mg/kg D-Gal and 250 μg/kg LPS), group 7 (with injection of NS and 600mg/kg D-Gal), group 8 (with injection of 600mg/kg D-Gal and 10 μg/kg LPS), group 9 (with injection of 600mg/kg D-Gal and 25 μg/kg LPS), group 10 (with injection of 600mg/kg D-Gal and 50 μg/kg LPS). The death of the mice were observed and the mortality rate was recorded at 48 post-injection hour (PIH). The dose of D-Gal and LPS which caused 100% lethality was chosen for the subsequent experiment to serve as control group (with injection of NS and 600mg/kg D-Gal), LPS group (with injection of 600mg/kg D-Gal and 50 μg/kg LPS for later experiment). The venous blood of the mice were collected for the detection of serum content of TNF-α with ELISA method at 30, 75 and 120 post-injection minutes (PIM). The tissues of lung, liver, intestine were also harvested at 5 PIH for the pathological examination. Results The lethality of mice was 100% in the groups 2, 6 and 10 ($P < 0.01$). The serum content of TNF-α was maintained in a low level in control group, but it increased remarkably in LPS group, and it reached peak at 75 PIM (6365 ± 2087 ng/L, $P < 0.01$). Obvious inflammatory reaction was observed in the lung, liver and intestine in LPS group, while only mild inflammatory reaction was observed in liver in control group. Conclusion The Kunming mice showed signs of endotoxin shock after D-galactosamine presensitizing and endotoxin challenge, and it is suitable for anti-endotoxin pharmaceutical research.

基金项目:全军医药卫生科研基金(01L065);重庆市科技攻关项目(CSTC,2007AC5013)

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室(高宏富、肖光夏),药剂科(任建东、夏培元)

通讯作者:夏培元,Email:pyxia@yahoo.com.cn,电话:023-68754463

【Key words】 Endotoxins; Shock; Models, animal; D-Galactosamine

细菌内毒素/脂多糖(LPS)是所有革兰阴性(G⁻)细菌细胞壁外膜上的主要结构成分,是G⁻细菌主要的致病因子^[1]。为研究LPS在生物体内的复杂生物学效应和相应的拮抗药物及措施,需应用各种内毒素性休克的动物模型。昆明小鼠是国内最常用的实验动物之一,以往的研究中制作昆明小鼠内毒素性休克模型常采用直接注射法^[2,3]。由于昆明小鼠对LPS耐受性较强,如此大剂量的LPS制作的休克模型,其LPS拮抗剂用量也需增加,由此带来一些不确定的不良反应,且研究成本提高,故不适用于LPS拮抗药物的药理学研究。我们试用D-氨基半乳糖(D-galactosamine, D-Gal)致敏的方法来提高昆明小鼠对LPS的敏感性,以期建立一种更适用于相关药理研究的昆明小鼠内毒素性休克模型。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、仪器及动物来源

清洁级昆明小鼠(第三军医大学实验动物中心)146只,体质量18~22g,雌雄不拘。D-Gal、LPS(*E. coli* O₁₁₁B₄,美国Sigma公司),酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(深圳晶美生物工程有限公司)。550型酶标仪(美国Bio-Rad公司)。

1.2 内毒素性休克模型的建立

将D-Gal用等渗盐水(NS)配制成50、60mg/ml溶液;LPS用NS配制成8、9mg/ml及1.0、2.5、5.0、25.0μg/ml溶液。将D-Gal和LPS按0.2ml/20g剂量注射于小鼠腹腔。先注射D-Gal,1h后注射LPS。根据小鼠所注射药物的不同分为:1组:NS+LPS 80mg/kg;2组:NS+LPS 90mg/kg;3组:D-Gal 500mg/kg+NS;4组:D-Gal 500mg/kg+LPS 25μg/kg;5组:D-Gal 500mg/kg+LPS 50μg/kg;6组:D-Gal 500mg/kg+LPS 250μg/kg;7组:D-Gal 600mg/kg+NS;8组:D-Gal 600mg/kg+LPS 10μg/kg;9组:D-Gal 600mg/kg+LPS 25μg/kg;10组:D-Gal 600mg/kg+LPS 50μg/kg。每组10只小鼠。各组小鼠注射后自由进食、饮水,于注射后4、8、12、16、24、48h观察记录小鼠死亡情况,并计算其死亡率。

1.3 检测指标

1.3.1 血清肿瘤坏死因子α(TNF-α)含量的检测

将36只小鼠随机分成对照组:注射D-Gal 600mg/kg+NS;LPS组:注射D-Gal 600mg/kg+LPS 50μg/kg,每组18只。于注射后30、75、120min从小鼠

眶后静脉取血,每个时相点6只。采用ELISA法检测其血清TNF-α含量,操作按试剂盒说明书进行。

1.3.2 病理学观察 取小鼠10只,分为对照组、LPS组,每组5只。2组所注药物和方法同TNF-α含量的检测。于注射后5h以颈椎脱臼法处死小鼠,分别取肺脏、肝脏和小肠,于体积分数20%甲醛溶液中固定,石蜡包埋,切片,光学显微镜下观察。

1.4 统计学处理

部分数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 12.0统计软件行单因素方差分析及 χ^2 检验。

2 结果

2.1 小鼠死亡率

各组小鼠注射后活动和进食减少,精神差。1~10组小鼠的死亡数分别为8、10、0、0、7、10、0、0、4、10只,其中2、6、10组小鼠死亡率为100%。见表1。

表1 各组小鼠死亡率比较(%)

组别	注射后时间(h)					
	4	8	12	16	24	48
NS + LPS 80 mg/kg 组	0	0	0	20	30	80
NS + LPS 90 mg/kg 组	0	0	10	30	70	100
D-Gal 500 mg/kg + NS 组	0	0	0	0	0	0
D-Gal 500 mg/kg + LPS 25 μg/kg 组	0	0	0	0	0	0
D-Gal 500 mg/kg + LPS 50 μg/kg 组	0	0	10	20	40	70
D-Gal 500 mg/kg + LPS 250 μg/kg 组	0	30*	60*	80*	90	100
D-Gal 600 mg/kg + NS 组	0	0	0	0	0	0
D-Gal 600 mg/kg + LPS 10 μg/kg 组	0	0	0	0	0	0
D-Gal 600 mg/kg + LPS 25 μg/kg 组	0	0	0	10	20	40
D-Gal 600 mg/kg + LPS 50 μg/kg 组	0	20*	60*	90*	100*	100

注:每组鼠数10只;NS为等渗盐水,LPS为内毒素/脂多糖,D-Gal为D-氨基半乳糖;与同一时相点NS+LPS 90mg/kg组比较,a: P < 0.01

2.2 血清TNF-α含量的变化

对照组小鼠血清TNF-α含量保持在较低水平;LPS组则显著升高(P < 0.01),在75min时达高峰。见表2。

表2 两组小鼠血清肿瘤坏死因子α含量(ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数 (只)	注射后时间(min)		
		30	75	120
对照组	18	50 ± 11	56 ± 10	46 ± 13
内毒素/脂多糖组	18	2846 ± 935*	6365 ± 2087*	3521 ± 1282*

注:与对照组比较, a: P < 0.01

2.3 小鼠肺、肝、小肠病理学变化

对照组小鼠肺脏、小肠无明显病理改变,肝细胞

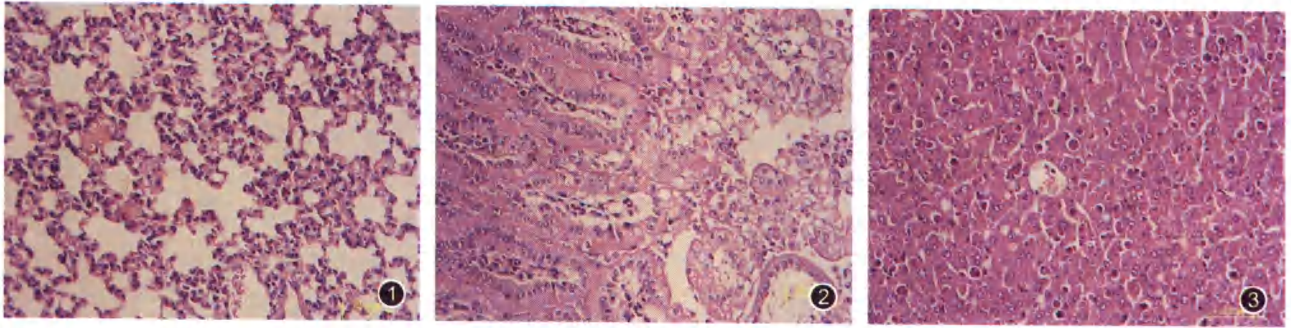


图 1 内毒素/脂多糖(LPS)组小鼠肺脏肺泡间隔充血、水肿,间隔增宽,炎性细胞浸润 HE ×400 图 2 LPS 组小鼠小肠黏膜及黏膜下层水肿,绒毛固有层血管充血 HE ×400 图 3 LPS 组小鼠肝脏肝窦和中央静脉充血,库普弗细胞增多 HE ×400

轻度浊肿,无炎性细胞浸润。LPS 组小鼠肺脏可见肺泡间隔充血、水肿,间隔增宽,炎性细胞浸润,肺小血管内粒细胞扣押,部分肺泡内透明膜形成(图 1);小肠黏膜及黏膜下层水肿,绒毛固有层血管充血,部分肠绒毛坏死脱落于肠腔中(图 2);肝脏肝窦和中央静脉充血,库普弗细胞增多,肝小叶中央区灶性、片状坏死,胆汁淤积(图 3)。

3 讨论

LPS 是严重烧伤、创伤及感染患者发生脓毒症的重要致病因子,针对 LPS 的研究一直是医学领域的热点。大鼠、小鼠、家兔、猪、羊以及灵长类等各种不同的内毒素性休克动物模型在研究中均被应用。由于小鼠的遗传背景和人类相近,免疫系统与人类相似,故在 LPS 研究中应用较为广泛,特别是药理研究中应用较多^[4]。但是不同种属的动物对 LPS 敏感性不同,各种系的小鼠对 LPS 耐受性普遍较强,大剂量 LPS 制作的休克模型往往不适用于拮抗 LPS 的药理学研究。1979 年美国学者 Galanos 等^[5]观察到, D-Gal 可使实验动物对 LPS 的敏感性升高上千倍,并建立了 C₅₇BL/6、NMRI 小鼠 D-Gal 致敏的内毒素性休克模型,此后类似模型在国外拮抗 LPS 药物的研究中被广泛应用^[6-8]。

昆明小鼠由于遗传性质稳定,价格便宜,易于获得,是国内药理实验应用最多的动物。但昆明小鼠对 LPS 的耐受性较强,以往复制昆明小鼠内毒素性休克模型常采用直接注射 LPS 的方法,其剂量每公斤体质量达数十毫克。D-Gal 致敏的昆明小鼠模型鲜有报道。我们在研究中观察到, D-Gal 致敏小鼠内毒素性休克模型的建立,关键在于 D-Gal 和 LPS 的剂量。将不同剂量的 D-Gal 和 LPS 组合作用于昆明小鼠,观察到 D-Gal 500 mg/kg + LPS 250 μg/kg 以及 D-Gal 600 mg/kg + LPS 50 μg/kg 2 种剂量均可使

昆明小鼠 48 h 内死亡率达 100%,即体质量 18~22 g 的昆明小鼠 D-Gal 和 LPS 的用量为 D-Gal 10 mg/只 + LPS 5 μg/只,或者 D-Gal 12 mg/只 + LPS 1 μg/只。在药理实验中可选择 LPS 剂量较低的后一种组合。在 2 种剂量组合下小鼠死亡高峰都集中于注射后 8~16 h,48 h 内全部死亡。与单独注射 LPS 比较,提前 1 h 注射致敏剂 D-Gal,小鼠对 LPS 敏感性提高数千倍,与其他种系小鼠致敏效果类似。

LPS 在体内通过 LPS 结合蛋白、CD14 等介导,与单核巨噬细胞、内皮细胞等靶细胞上的跨膜受体 Toll 样受体 4 相结合,在淋巴细胞抗原 96 辅助下将信号转入细胞内,通过胞内复杂的信号途径,导致 TNF-α、白细胞介素 1(IL-1)、IL-6 等致炎细胞因子的产生,从而损坏细胞和器官功能^[9]。本研究检测了在 D-Gal 500 mg/kg + LPS 50 μg/kg 剂量下小鼠血清 TNF-α 含量及重要脏器的病理学变化,结果显示,致敏小鼠在 LPS 刺激后血清 TNF-α 水平显著升高,75 min 达高峰。刺激后小鼠肺脏、肝脏、小肠出现充血、水肿、坏死等明显病理学改变,这些病理改变与 LPS 直接作用后的改变相似,表明使用 D-Gal 致敏后,虽然 LPS 用量极小,但能达到相近的生物学效应。

D-Gal 提高小鼠 LPS 敏感性的机制主要是因为 D-Gal 可阻断尿嘧啶核苷酸的代谢,诱发肝脏毒性。D-Gal 的这种毒性效应具有肝脏特异性和可逆性,对其他脏器不造成损伤。Galanos 等^[5]检测了家兔、大鼠、小鼠注射 D-Gal 后血浆中山梨醇脱氢酶的变化。结果显示,注射后 6 h 内无明显改变,24 h 后显著升高。表明 D-Gal 注射后早期引起的代谢改变是导致 LPS 敏感性提高的原因,而与后期引起的肝细胞损害无关。本研究中对照组在注射 D-Gal 后 2 h 内,小鼠血清 TNF-α 维持在较低水平,5 h 后行肝脏病理学检查仅见肝细胞轻度浊肿,肺脏及小肠均无明显

变化。这些结果进一步证实小鼠休克死亡是由 LPS 导致,而与 D-Gal 无直接关系。

本研究所建立的 D-Gal 致敏昆明小鼠内毒素性休克模型,与国外其他小鼠致敏模型特征相似,可以获得与人体类似的 LPS 敏感水平,适用于相关拮抗药物的研究,同时可避免使用大剂量药物引发的不良反应。研究所用 LPS 拮抗剂的合成、提纯等工艺复杂,成本高,减少 LPS 及拮抗剂用量后可大大节约研究成本。

参考文献

[1] Stephen TM, Christopher MS, Tran AX, et al. Diversity of endotoxin and its impact on pathogenesis. *J Endotox Rese*, 2006, 12 (4): 205 - 223.

[2] 郑江,周红,鲁永玲,等. 杀菌性/通透性增加蛋白模拟肽中和内毒素作用的研究. *中华烧伤杂志*, 2002, 18(2): 95 - 99.

[3] 郭毅斌,郑江,吕根法,等. 阳离子多肽 MP-1 拮抗内毒素/脂多糖活性的实验研究. *中华烧伤杂志*, 2005, 21(3): 189 - 192.

[4] 杨策,蒋建新. 内毒素研究的相关动物模型//蒋建新. 细菌内

毒素基础与临床. 北京:人民军医出版社, 2004:183 - 189.

[5] Galanos C, Freudenberg MA, Reutter W. Galactosamine-induced sensitization of the lethal effects of endotoxin. *Proc Natl Acad Sci*, 1979, 76(11): 5939 - 5943.

[6] David SA, Silverstein R, Amura CR, et al. Lipopolyamines; novel antiendotoxin compounds that reduce mortality in experimental sepsis caused by gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43(4): 912 - 919.

[7] Nagaoka I, Satoko H, Francois N, et al. Augmentation of the Lipopolysaccharide-neutralizing activities of human cathelicidin CAP18/LL-37-derived antimicrobial peptides by replacement with hydrophobic and cationic amino acid residues. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002, 9(5): 972 - 982.

[8] Santamaria C, Silda L, Larios S, et al. Bactericidal and antiendotoxic properties of short cationic peptides derived from a snake venom lys49 phospholipase A2. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(4): 1340 - 1345.

[9] Susu MZ, Shanta MZ, Datta A, et al. Differential induction of the toll-like receptor 4-MyD88-dependent and -independent signaling pathways by endotoxins. *Infect Immun*, 2005, 73(5): 2940 - 2950.

(收稿日期:2007-03-15)

(本文编辑:张红)

· 技术与方法 ·

自制弹力“不”字状包扎止血带

赵耀华 牛希华 景福琴 孙聪北 杨国艳 狄海萍

头皮取皮术在烧伤治疗中已普遍应用,但取皮结束时需对头部进行加压包扎,医师按传统方法操作常感不便,而且将全身麻醉患者的颈部频繁转动会带来一定的风险。笔者自制了一种弹力“不”字带,配合尼龙扣粘贴,可起到加压止血的作用,且应用方便。

“不”字带制作及使用方法:将市售弹力布裁成 26 cm × 9 cm(1 块,两端各接 14 cm × 9 cm 的布质材料)、13 cm × 9 cm(3 块,游离端各接 14 cm × 9 cm 布质材料 1 块),拼缝成“不”字状,并在布质材料相应位置缝上尼龙粘贴扣(图 1,

2)。术中按常规操作取头皮,用油纱覆盖供皮区,外裹无菌厚纱布,将“不”字带拉伸,按 a - a'、b - b'、c - c'、o - o'交叉系于患者额部。见图 1~4。

讨论 此弹力包扎带取材方便、缝制简单、经济实惠、外形美观。但弹力布和尼龙粘贴扣不能承受高压蒸汽灭菌,熏蒸又会残留刺激性物质,有条件者可在使用前采用环氧乙烷灭菌。

笔者单位将其应用于 106 例烧伤植皮手术患者,取得了满意的效果。

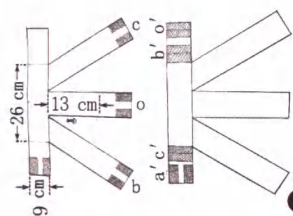


图 1 弹力“不”字状包扎止血带示意图 图 2 弹力“不”字状包扎止血带外观 图 3 弹力“不”字状包扎止血带使用方法 图 4 患者头部取皮后用弹力“不”字状包扎止血带止血(后上观)

作者单位:450004 郑州市第一人民医院烧伤科

(收稿日期:2007-07-24)

(本文编辑:赵敏)