

静脉注射大肠杆菌制备高动力型感染性休克犬模型

崔 嵩, 韩叶叶, 刘思伯

(大连医科大学附属大连市中心医院, 重症医学科, 辽宁 大连 116033)

【摘要】 目的 通过静脉注射大肠杆菌方法制备高动力型感染性休克犬模型。方法 杂种犬22只, 随机分为对照组($n=11$)和实验组($n=11$)。麻醉犬后, 经右股静脉置入双腔中心静脉导管, 对照组使用微量泵向犬股静脉内泵入生理盐水, 实验组以同样方法泵入大肠杆菌, 经右股动脉置入PICCO导管, 在0~48 h各时点应用PICCO监测全身血流动力学情况。结果 实验组的心率(HR)、心排量(CO)、每搏量(SV)在12 h均显著升高($P < 0.05$), 收缩压(SBP)、外周血管阻力(SVR)在12 h显著降低($P < 0.05$), 而其他血流动力学指标如中心静脉压(CVP)、肺动脉楔压(PAWP)、氧输送(DO_2)、氧消耗(VO_2)、氧摄取率(O_2ER)差异均无显著性($P > 0.05$)。实验组从12 h起即可观察到明显的尿量减少; 动脉收缩期峰值血流速度(PSV)和阻力指数(RI)与对照组相比差异均有显著性($P < 0.05$)。结论 运用微量泵向犬股静脉泵入活大肠杆菌可以成功制备高动力型感染性休克犬模型, 可为研究感染性休克提供实验基础。

【关键词】 感染性休克; 动物实验; 犬; 大肠杆菌; 血流动力学

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 09-0048-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.09.009

Establishment of a dog model of hyperdynamic septic shock by intravenous injection of *Escherichia coli*

CUI Song, HAN Ye-ye, LIU Si-bo

(Department of Intensive Care Medicine, Dalian Municipal Central Hospital Affiliated of Dalian Medical University, Dalian 116033, China)

【Abstract】 Objective To establish a dog model of hyperdynamic septic shock by intravenous injection of *Escherichia coli*. **Methods** Twenty-two hybrid dogs were randomly divided into control group ($n=11$) and experimental group ($n=11$). A double-cavity central venous catheter was inserted into the right femoral vein of the dogs after anesthesia. Physiological saline was continuously pumped into the femoral vein of the dogs in the control group by the micro-pump, while the dogs of the septic shock group were pumped with *E. coli* in the same way. The catheter of PICCO (pulse indicator continuous cardiac output) was inserted into the right femoral artery and the systemic hemodynamics of the dogs was monitored at all of the time points from 0 to 48 h. **Results** Compared with the control group, the heart rate (HR), cardiac output (CO) and stroke volume (SV) of the experimental group were significantly increased at 12 h ($P < 0.05$), and the systolic blood pressure (SBP) and systemic vascular resistance (SVR) were significantly decreased at 12 h ($P < 0.05$). However, other hemodynamic parameters such as the central venous pressure (CVP), the pulmonary artery wedge pressure (PAWP), the oxygen delivery rate (DO_2), the oxygen consumption rate (VO_2), and the oxygen extraction rate (O_2ER) were not significantly different ($P > 0.05$). Moreover, significant decrease in urine output was observed in the septic

【基金项目】 大连市卫计委2013年课题项目(课题名称:《亚低温治疗感染性休克所致ARDS的实验研究》)。

【作者简介】 崔嵩(1978-),男,副主任医师。E-mail: cuisong2008@qq.com

shock group since 12 hours, and the peak systolic velocity (PSV) and the resistance index (RI) of the systolic artery were significantly different from those in the control group ($P < 0.05$). **Conclusions** The dog model of hyperdynamic septic shock can be successfully established by intravenous injection of *Escherichia coli* into the femoral vein by a micro-pump. This model provides an experimental basis for further study of septic shock.

[Key words] Septic shock; Animal experiments; Canine; *Escherichia coli*; Hemodynamics

脓毒症是 ICU 中危重症患者的主要死亡原因之一,其血流动力学的复杂性使其治疗比其他类型的休克困难,因此,对其血流动力学的病理生理学的研究也更显重要。本实验想要通过静脉注射活化大肠杆菌的方法制备出脓毒症休克犬的动物模型,希望为研究脓症患者血流动力学改变提供理想的实验动物模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物

杂种雄性犬 22 只,1~2 周岁成年犬,购自大连医科大学实验动物中心[SCXK(辽)2008-0002],随机分为 2 组,每组 11 只,体重 18~20 kg,两组实验犬体重差异无显著性。实验前应用统一犬粮喂养 1 周[SYXK(辽)2008-0002],术前禁食 12 h,禁水 4 h。动物实验经由实验动物使用与管理委员会(IACUC)批准(AEE15003)。

1.2 细菌制备

大肠杆菌菌株 ATCC25922 由大连医科大学微生物研究室提供,首次稀释菌株分于 50 支 2.0 mL 冻存管(Corning Incorporated 公司,430659 型号)内,每管内含菌液 0.2 mL 和 20% 甘油 0.8 mL,同一时间密封标记后置于 -80℃ 深低温冰箱。每次取出 1 支冻存管,以保证每次实验注射用大肠埃希菌基因型和致病力相同。

培养基由 3 g 营养肉汤粉和 1.8 g 琼脂粉(天津市致远化学试剂有限公司)加蒸馏水至 100 mL 制成,高压蒸汽锅灭菌维持 30 min。灭菌后,待培养基冷却后制成固体培养基。取 1 支含菌液冻存管,置于 37℃ 水箱(上海医用恒温设备厂,WS2-261-79 型号)内 10 min 进行细菌复苏。复苏后,用已灭菌接种棒蘸取适量菌液均匀涂布于各培养基表面。培养皿倒置于 37℃ 恒温空气浴振荡器内培养 12 h 后取出各培养皿,分别用生理盐水洗脱表面菌落,收集于同一试剂瓶内。从试剂瓶内取少量菌液,采用稀释平板计数法计数,计算出原菌液中菌落形成

单位(CFU/mL),稀释至 1×10^9 CFU/mL 置于 4℃ 冰箱内备用。

1.3 模型制备

1.3.1 麻醉及机械通气

戊巴比妥钠(购自美国 Sigma 公司)3 g 溶解于 97 mL 生理盐水配置成 3% 浓度溶液。首剂麻醉使用 1.5 mL/kg 肌肉注射,之后以 1~3 mL/h 经微量注射泵(Fresenius Kabi 公司,Injectmat 型号)持续静脉泵入。待麻醉后将犬固定于动物解剖台上。经口气管插管,连接呼吸机(Drager Medical GmbH 公司,Evita XL 型号)辅助通气,初始呼吸参数设定:SIMV(容量控制),潮气量(tidal volume, VT) = 8~10 mL/kg,吸入氧浓度(fraction of inspiration O_2 , FiO_2) = 30%~50%,呼气末正压(positive end expiratory pressure, PEEP) = 0 mmHg,吸气时间 1.2 s,呼吸频率(f) = 15~20 次/min。

1.3.2 动静脉置管,连接监护设备

颈部和腹股沟区备皮后常规消毒、铺无菌单,超声引导下分别行动、静脉穿刺置管。颈内静脉留置 12 Fr 三腔导管(Arrow International Inc 公司,REF CS-12123-F 型号)一枚,细腔连接压力传感器后与心电监护仪(GE Medical Systems Information Technologies Inc 公司,TRAM-RAC 4A 型号)连接用于监测中心静脉压(central venous pressure, CVP)。股静脉留置 7 Fr 双腔导管(Arrow International Inc 公司,REF CV-17702-E 型号)一枚,一腔用于连接 PICCO 注射液温度探头容纳管,另一腔作为输液和麻醉剂泵入通路。股动脉留置 PICCO 热稀释导管,通过压力传导系统与 PICCO 机器(Pulsion Medical Systems 公司,PC 8100 型号)连接,持续监测并记录收缩压(systolic blood pressure, SBP)、平均动脉压(mean arterial pressure, MAP)、心率(heart rate, HR)、心输出量(cardiac output, CO)、心指数(cardiac index, CI)、每搏量(stroke volume, SV)、每搏量指数(stroke volume index, SVI)、外周血管阻力(systemic vascular resistance, SVR)、外周血管阻力指数(systemic vascular resistance index, SVRI)、每搏量变化(stroke volume variation, SVV)、氧输送(oxygen delivery, DO_2)、氧消

耗(oxygen consumption, VO_2)。脉氧夹固定于犬舌,连接心电监护仪,持续进行氧饱和度监测。

1.3.3 大肠杆菌注射

将犬固定于解剖台后,待心率及血压稳定(血压波动范围不超过 ± 10 mmHg) 30 min 作为基线 0 h。之后,对照组经股静脉以 $0.5 \text{ mL}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ 持续泵入生理盐水至 48 h 后处死。实验组以同样速度泵入活大肠杆菌(*E. coli*, 1×10^9 CFU/mL),当出现感染性休克时(MAP ≤ 60 mmHg 或者 SBP < 90 mmHg)改为持续泵入生理盐水。每 1 h 记录尿量。每 6 h 校正 PICCO,每次校正前关闭双腔管另一输液腔,通过注射液温度探头容纳管注射 15 mL 且温度小于 8°C 的生理盐水,3 s 内注射完毕。

1.4 全身血流动力学监测

通过心电监护仪及 PICCO 仪监测并记录 48 h 内 SBP、MAP、HR、CO、SV、SVI、SVR、SVRI、SVV、CVP、 DO_2 、 VO_2 等血流动力学参数。

1.5 肾脏血流动力学监测

每隔 6 h 使用彩色多普勒超声仪(color Doppler flow imaging, CDFI; 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司)分别测量右侧肾动脉(main renal artery, MRA)的动脉收缩期峰值血流速度(peak systolic ve-

locity, PSV) 和阻力指数(resistance index, RI),每次测量取连续 3 个波形均值。

1.6 统计学方法

全部数据采用 SPSS 17.0 软件包进行分析处理。实验数据用平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。计量资料两组比较用独立 *t* 检验(independent samples *t*-test),方差不齐则采用非参数检验法;相关性采用线性回归分析。 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 血流动力学改变

对照组和实验组犬的所有血流动力学指标在基线 0 h 差异均无显著性($P > 0.05$)。实验组 SBP 在 0 h 为(169.01 ± 12.50) mmHg,12 h 时 SBP 出现明显降低,HR、CO 明显升高并伴 SVR 的降低,呈现“高排低阻”血流动力学表现,和对照组相比差异有显著性($P < 0.05$),在 36 h 时 CO 达到最大,并随着时间延长,CO 和 SVR 都逐渐降低,逐渐呈现出“低排低阻”(表 1)。其他血流动力学指标如 CVP、肺动脉楔压(pulmonary artery wedge pressure, PAWP)、 DO_2 、 VO_2 、氧摄取率(oxygen extraction rate, O_2ER)与对照组相比差异均无显著性($P > 0.05$)。

表 1 对照组和实验组血流动力学参数的对比分析

Tab. 1 Comparison of hemodynamic parameters between the control group and the septic shock group

观察指标 Indicators	对照组 Control group	实验组 Septic shock group	P 值 P-value
HR (beat/min)			
0 h	180.00 \pm 30.23	175.40 \pm 3.62	> 0.05
12 h	172.32 \pm 3.84	190.32 \pm 20.26	< 0.05
24 h	178.49 \pm 5.56	201.49 \pm 35.95	< 0.05
36 h	173.81 \pm 10.26	218.30 \pm 19.41	< 0.05
48 h	171.36 \pm 11.94	225.49 \pm 21.53	< 0.01
SBP (mmHg)			
0 h	171.23 \pm 20.49	169.01 \pm 12.50	> 0.05
12 h	160.32 \pm 8.06	134.78 \pm 10.12	< 0.05
24 h	154.82 \pm 5.76	114.28 \pm 6.32	< 0.01
36 h	159.91 \pm 15.76	100.28 \pm 9.32	< 0.01
48 h	154.60 \pm 18.43	96.36 \pm 5.50	< 0.01
CO (L/min)			
0 h	2.78 \pm 0.65	2.88 \pm 0.42	> 0.05
12 h	2.62 \pm 0.58	3.39 \pm 0.76	< 0.05
24 h	2.89 \pm 0.46	3.76 \pm 0.81	< 0.01
36 h	2.88 \pm 0.32	3.91 \pm 0.61	< 0.01
48 h	2.93 \pm 0.64	2.57 \pm 0.53	< 0.05
SVR ($\text{dyn}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^{-5}$)			
0 h	4319 \pm 1052	4210 \pm 418	> 0.05
12 h	4100 \pm 1090	3601 \pm 721	< 0.05
24 h	3829 \pm 672	3292 \pm 560	< 0.05
36 h	3925 \pm 762	3013 \pm 490	< 0.01
48 h	3801 \pm 451	2638 \pm 387	< 0.01

2.2 心输出量与肾血流动力学关系

实验组 12 h 即可出现 PSV 的增加,36 h 达最大,而 RI 在 12 h 即可见明显减少,与对照组相比,差异有显著性($P < 0.05$)。PSV 与 CO 呈正相关(回归方程为 $Y = 0.642 + 0.005X$, $R^2 = 0.785$, $P < 0.01$) (图 1), PSV 随 CO 增加而增加。RI 与 CO 呈负相关(回归方程为 $Y = 4.013 - 1.836X$, $R^2 = 0.812$, $P < 0.01$) (图 2), RI 随 CO 增加而减少。

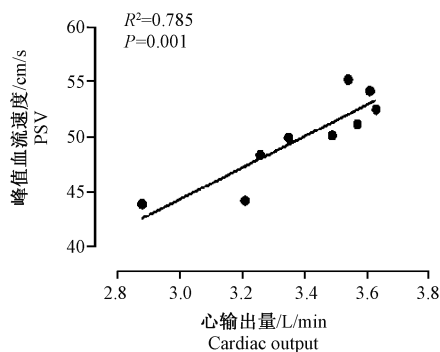


图 1 PSV 与 CO 的相关性

Fig. 1 Correlation between PSV and CO

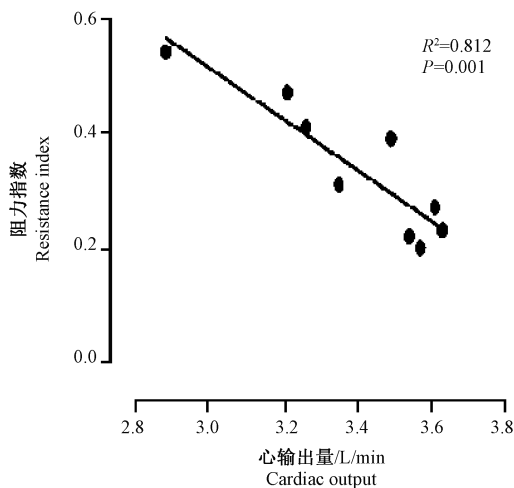


图 2 RI 与 CO 的相关性

Fig. 2 Correlation between RI and CO

3 讨论

脓毒症是重症监护病房的主要死亡原因之一^[1,2]。一项来自高收入国家的流行病学资料显示,从 2008 年到 2012 年脓毒症患病人数从 346/10 万上升到 436/10 万^[3],全球脓毒症患病人数估计约 3150 万,严重脓毒症约 1940 万,脓毒症死亡



图 3 高动力型感染性休克犬模型

Fig. 3 The dog model of hyperdynamic septic shock

人数约 530 万^[4],一项来自法国的 ICU 的流行病学资料显示脓毒症休克的病死率高达 45%,因此,脓毒症的高发病率及病死率使其成为研究的热门^[5]。2016 年第三次国际共识 (Sepsis 3.0) 定义脓毒症为“严重感染引起的宿主反应失调(失控的炎症反应)导致的致命性器官功能障碍”^[2]。Giantomasso^[6,7]认为血流动力学的改变参与多器官功能障碍的发展,是患者死亡的主要原因。临床上,脓毒症休克可根据血流动力学特点分为高排-低阻(暖休克)和低排-低阻(冷休克)两种类型。

目前存在多种脓毒症休克动物模型制备方法,较公认感染性休克模型制备方法有内毒素 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导、活菌注射、盲肠结扎穿孔等,选择物种包括兔子、鼠、猪等,各种模型都包含了循环系统、组织代谢、激素反应等方面指标的改变^[8,9]。本实验通过股静脉注射活菌的方法制备感染性休克模型,模拟临床上感染早起最常见的“高动力”休克模型,实验组 CO 在 12~36 h 各时间点分别出现不同程度的上升,而 SBP 和 SVR 在 12~48 h 各时间点分别出现不同程度的下降,显示高动力循环感染性休克模型制备成功。我们同时还发现 PSV 与 CO 呈正相关,RI 与 CO 呈负相关,这与最新研究高动力型感染性休克时肾血流量增加、肾血管阻力下降一致^[10]。

运用微量泵向犬静脉内泵入活大肠杆菌制备高动力型感染性休克犬模型,结果符合临床上感染性休克早期高动力型血流动力学表现,可以很好地模拟临床情况,为更加准确地研究感染性休克病理生理变化提供了理想的实验动物模型。

参考文献:

- [1] Gullo A, Foti A, Murabito P, et al. Spectrum of sepsis, mediators, source control and management of bundles [J]. *Front Biosci*, 2010, 2: 906-911.
- [2] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3) [J]. *JAMA*, 2016, 315(8): 801-810.
- [3] Stoller J, Halpin L, Weis M, et al. Epidemiology of severe sepsis: 2008-2012 [J]. *J Crit Care*, 2016, 31(1): 58-62.
- [4] Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, et al. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis. Current estimates and limitations [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2016, 193(3): 259-272.
- [5] Lygidakis NJ, Jain S, Sacchi M, et al. Reappraisal of a method of reconstruction after pancreatoduodenectomy [J]. *Hepatogastroenterology*, 2005, 52(64): 1077-1082.
- [6] Garrido AG, Poli de Figueiredo LF, Rocha e Silva M. Experimental models of sepsis and septic shock: an overview [J]. *Acta Cir Bras*, 2004, 19(2): 82-88.
- [7] Di Giandomasso D, May CN, Bellomo R. Vital organ blood flow during hyperdynamic sepsis [J]. *Chest*, 2003, 124(3): 1053-1059.
- [8] Hollenberg SM, Dumasius A, Easington C, et al. Characterization of a hyperdynamic murine model of resuscitated sepsis using echocardiography [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 164(5): 891-895.
- [9] Karzai W, Cui X, Mehlhorn B, et al. Protection with antibody to tumor necrosis factor differs with similarly lethal *Escherichia coli* versus *Staphylococcus aureus* pneumonia in rats [J]. *Anesthesiology*, 2003, 99(1): 81-89.
- [10] Wan L, Bagshaw SM, Langenberg C, et al. Pathophysiology of septic acute kidney injury: What do we really know? [J]. *Crit Care Med*, 2008, 36(4 Suppl): S198-S203.

[收稿日期]2017-01-20

· 会议 ·

——*Animal Models and Experimental Medicine*

启动工作会议隆重召开

盛夏七月,骄阳似火。在各界人士的鼎力支持和协助下,《中国实验动物学报》编辑部荣获中国科技期刊国际影响力提升计划 D 类项目资助后,创办期刊 *Animal Models and Experimental Medicine* (AMEM)。7 月 11 日,由 AMEM 主编、中国实验动物学会理事长秦川教授策划,由编辑部李继平主任执行的 AMEM 启动工作会议在北京京瑞温泉国际酒店第四会议室隆重召开。来自全国各地的近二十位实验动物相关领域专家学者齐聚一堂,以极大的热情和极具开拓性的视野,为 AMEM 的成长保驾护航。

作为中国唯一一本体现实验动物相关领域多学科交叉的英文期刊,AMEM 由中国实验动物学会和中国医学科学院医学实验动物研究所主办,以国际著名学术出版商 Wiley 为出版平台,初步计划为季刊,预计 2018 年 1 月出版第一期,年底申请进入 PubMed 数据库,2020 年申请进入 SCI。

AMEM 具备实验动物相关法律法规约束,关注实验动物福利伦理等敏感问题,旨在促进中国实验动物科学与世界各国同行之间的信息交流,为实验动物学科原创性和应用性成果搭建展示平台,为国际科学界了解中国乃至亚洲实验动物科学发展状况、动物福利状况提供学术窗口,从而增强中国科学家的话语权。

在此次启动会上,诸位嘉宾各抒己见、畅所欲言,展开热烈的讨论和思维的交流碰撞,从多个角度和不同专业背景出谋划策,为 AMEM 的创办和发展提供了诸多宝贵的意见和建议。与会专家一致认为,重视和加强基础研究是“十三五”期间科学技术发展的战略重点,近年来国家在前瞻部署中把基础研究摆在重要位置。在“一带一路”发展战略和国际化趋势的影响下,动物实验科学这一重要基础学科的研究工作逐渐向中国转移,中国的动物福利状况日渐受到国际关注,实验动物科学领域在中国的发展越来越迅猛,优秀的稿件如雨后春笋般大量涌现。国家政策对实验动物基础研究的大力支持和中国实验动物科学界对本土原创性成果展示平台的迫切需求,为 AMEM 的创办提供了得天独厚的契机,AMEM 正是在这样的背景下应运而生。把握机遇的同时,也意味着迎接更多挑战。

《中国比较医学杂志》编辑部