DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.01.022

兔自身对照性胆原性脓毒症模型的建立*

董家鸿 段恒春 韩本立 彭志明 李 昆 王敖川 黄志强 (第三军医大学附属西南医院肝胆外科中心) 重庆,630038

提 要 为了研究胆原性脓毒症及其发病机理,在大耳白兔右侧叶肝管开口近侧结扎总肝管并向其近端肝管内注入含 2×10^8 大肠杆菌的菌液,从而诱发脓毒症;在右侧肝脏叶为急性胆道感染所诱发的全身脓毒性反应的靶器官,而其余肝叶则为胆道感染直接攻击的靶器官。形成自身对照性动物模型并能显示类似人类胆原性脓毒症的血流动力学、代谢和病理改变。

关键词 脓毒症,胆原性;动物模型;兔

中图法分类号 R363

胆原性脓毒症是由严重胆道梗阻和感染所诱发的脓毒症。与一般腹腔脓毒症殊不相同,临床所见胆原性脓毒症常起病急骤、病程凶险重笃,病程早期即可继发多器官衰竭[1~4]。临床资料提示,肝脏功能率先受损对于胆原性脓毒症病程恶性发展并最终导致多器官衰竭具有十分重要的病理意义[1,4]。但在实验研究中,由于缺乏脓毒性攻击(septic insult)强度相当的腹腔脓毒症模型作实验对照,难以充分阐明胆原性脓毒症时肝脏损害的病理特点及有关发病机理。

本研究目的是建立一种类似临床发病情况且具有自身对照特点的兔胆原性脓毒症模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物

采用四川省中药研究所动物室提供的日本杂交大耳白兔,雌雄各半,3~4月龄,体重 2.0~3.0 kg。单笼喂养1周后开始实验。

1.2 菌液制备

致病菌株选用埃希氏大肠杆菌(ATCC:25922)。将菌种接种于血平板上,置37℃孵育24 h,用无菌生理盐水洗脱,离心(3500× g ,10 min),弃上清液,用生理盐水稀释成浓度为 1×10^9 CFU/ml 的菌液。置4℃保存备用。

1.3 模型复制法

动物术前禁食12 h,戊巴比妥钠(30 mg/kg,IV)麻醉,无菌条件下作上腹正中切口,缝扎胆囊管,在右侧叶肝管开口头侧游离并结扎肝总管,于结扎点稍近端穿刺胆管注入 0.2 ml 大肠杆菌菌液,并在穿刺点近端再次结扎肝总管(图1);腹腔内注入 40 ml 无菌生理盐水后关腹。术后单笼饲养,自由饮水,禁食。在本模型中,位于梗阻水平近端的左右中叶和左侧叶为感染肝叶,而肝管开口位于梗阻水平远端的右侧叶为非感染肝叶。

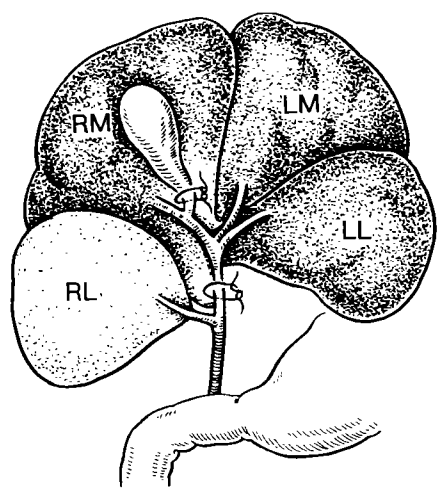


图1 动物模型示意图

Fig 1 Schematic representation of the experimental model

RL: right lateral lobe; RM: right middle lobe; LM: left middle lobe; LL: left lateral lobe

1.4 实验方案和观察指标

本研究分两个系列进行:(1)比较不同药量胆道感染后动物死亡率;(2)动物模型的临床病理表现。

第一系列实验设4组,即胆道梗阻组(biliary obstruction, BO)和3个不同细菌负荷量的胆道感染组(biliary infection, BI)。胆道感染按上述方法复制,3组动物注入胆道的菌量分别为 7×10^7(BI-1)、2×10^8(BI-2)和 6×10^8(BI-3);注入菌液体积均为 0.2 ml。BO 组除不向胆道内注菌外,其余处理条件与胆道感染者相同。每组15只动物。手术后12、24和48 h统计各组动物累积死亡率,并据以确定复制胆原性脓毒症(biliary sepsis, BS)的适当菌量。

* 全军青年科学基金资助项目

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

第二系列实验设 7 组，BO 及 BS 组各设术后 12、24 和 48 h 3 个时相点组；各 BS 时相点组动物处理条件同前述 BI－2 组；另设正常对照组(normal control，NC)。每组 8 只兔，在预定时相点分别检测下列各项指标：(1)直肠温度；(2)外周血白细胞数；(3)动脉压和胆道压，测压装置采用 CYX105 型压力传感器和 PTM－7 压力测试仪(国营永红机器厂产品)；(4)动脉血清谷丙转氨酶(ALT)、线粒体谷草转氨酶(m-AST)活性、总胆红素(TB)含量及全血酮体比值(ketone body ratio，KBR)，m-GOT 与 ALT 一样均反映肝细胞群损害，采用大久保法测定[5]；KBR 反映功能性肝细胞群数量，采用 Li 等的方法测定全血乙酰乙酸和 β-羟丁酸浓度[6]，计算两者的比值即为 KBR；(5)血、胆汁和脏器组织细菌定量；(6)肝脏病理组织学变化，自左中叶和右侧叶各取小块肝组织，常规制成石蜡切片，HE 染色，光镜下观察肝内病变。

实验数据以 $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ 表示。用多因素方差分析比较组间差异显著性。

2　结果

2.1　动物死亡率

图 2 显示各组动物术后不同时相点的累积死亡率。BO 组在 48 h 内无死亡。胆道感染动物的死亡率则随细菌负荷量的增大而呈明显的量效关系。BI－3 组 12 h 死亡率高达 40.0%；而 BI－1 组 48 h 存活率仍高达 80.0%，其肝脏病变和全身脓毒性反应均较轻；BI－2 组 12 h 死亡率低，48 h 死亡率为 60.0%，显示胆原性脓毒性的典型临床病理表现；故以此组的菌量作为本模型脓毒性攻击的标准负荷量。

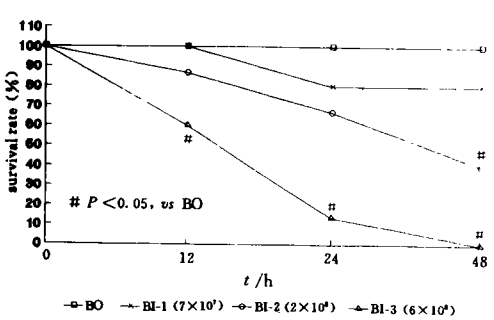


图2　胆道梗阻和胆道不同负荷量大肠杆菌攻击后动物的存活率

Fig 2　Survival rates following biliary obstruction and biliary septic challenge with different amounts of live E. Coli

2.2　临床表现

BS 动物均于术后 12 h 内出现寒战、发热、呼吸频数、精神萎靡、蜷缩、闭眼、拒食和活动减少等脓毒性反应的表现，并逐渐加重。BS 组术后 24 h 平均动脉压显著降低，至 48 h 降至 9.3 kPa。BS 组术后 12 h 外周血白细胞数显著降低，以后维持于低水平。BO 组动物无上述表现(表 1)。

表 1　胆道梗阻和胆道感染后动物体温、呼吸率、血压、胆道压和白细胞数($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$，$n=8$)

Tab 1　Temperature, respiratory rate, blood pressure, biliary pressure and leukocytes following biliary obstruction or biliary sepsis ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, $n=8$)

	NC	12 h	24 h	48 h
Temperature (℃)				
BO	39.0±0.1	38.4±0.3	38.8±0.2	39.0±0.1
BS		40.5±0.3△#	41.3±0.2△#	41.3±0.2△#
Respiratory rate (次/min)				
BO	48±2.1	52±2.0	55±2.5	55±2.0
BS		84±4.3△#	93±6.9△#	106±5.9△#
Blood pressure (kPa)				
BO	14.4±0.5	14.1±0.4	14.1±0.5	13.3±0.3
BS		13.8±0.4	12.6±0.6△#	9.3±0.6△#
Biliary pressure (kPa)				
BO	0.70±0.12	1.80±0.12△	2.13±0.12△	2.32±0.11△
BS		2.25±0.16△	3.71±0.25△#	3.30±0.27△#
Leukocytes (1×10^9 个/L)				
BO	8.84±0.45	9.30±1.11	8.29±0.95	8.94±1.22
BS		4.89±0.43△#	3.67±0.35△#	4.09±0.36△#

△：$P<0.05$ *vs* NC；#：$P<0.05$ *vs* BO

2.3　胆道压力

NC 组肝总管压力为 0.70±0.12 kPa。BO 组和 BS 组术后梗阻近端肝总管压力均持续显著升高，但 BS 组较 BO 组升高更为显著(表 1)。

2.4　肝功能

BO 组术后血清 ALT 和 mAST 活性持续轻度升高；术后早期 KBR 降低，至 48 h 有所回升。BS 组血清 ALT 和 mAST 活性进行性显著升高，而 KBR 进行性显著降低。两组血清 TB 含量均维持在正常范围内(表 2)。

表 2　胆道梗阻和胆道感染后动物肝功能参数($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$，$n=8$)

Tab 2　Hepatic parameters in the rabbits following biliary obstruction or biliary sepsis ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, $n=8$)

	NC	12 h	24 h	48 h
ALT(u/L)				
BO	25±3.4	146±14.0△	195±14.2△	213±15.4△
BI		206±15.2△#	273±18.8△#	363±24.2△#
mGOT(u/L)				
BO	19±2.7	61±6.0△	72±6.4△	96±8.1△
BI		126±11.6△#	243±30.2△#	299±35.1△#
TB(μmol/L)				
BO	6.8±1.0	10.3±3.2	10.3±2.9	7.8±2.6
BI		10.9±2.1	6.8±7.2	10.4±2.2
KBR				
BO	0.933±0.044	0.745±0.050△	0.553±0.043△	0.753±0.046△
BI		0.610±0.054△#	0.480±0.034△	0.305±0.039△#

△：$P<0.05$ *vs* NC；#：$P<0.05$ *vs* BO

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.5 细菌分布

BO组胆汁、血液和诸内脏组织细菌培养均为阴性。而BS组术后12 h始胆汁、血、感染肝叶、非感染肝叶、肺、脾、肾和心肌组织均培养出大肠杆菌。

2.6 肝胆系统病理改变

2.6.1 大体形态 伤后各时相点，BS动物梗阻近端胆管显著扩张，其内充满灰黄色脓性胆汁。感染肝叶在伤后12 h显著充血肿大，24 h出现多发性粟粒状化脓灶，48 h可见融合脓肿。非感染肝叶在伤后24 h和48 h也显轻度充血肿大。伤后各时相点，BO组动物梗阻近端胆管明显扩张，胆汁清亮，梗阻肝叶轻度肿大，非梗阻肝叶无明显变化。

2.6.2 光镜观察 伤后各时相点，BS动物感染肝叶内均见门管区小叶间胆管显著扩张，胆管上皮脱落，部分管壁破坏，其腔内充满变性的中性粒细胞、坏死组织碎片和细菌等；门管区内大量以中性粒细胞和巨噬细胞为主的炎细胞浸润，随病程延续门管区炎细胞增多并破坏界板而侵入肝小叶内。伤后12 h，感染肝叶内肝细胞排列略显紊乱，肝窦充血，肝细胞显浊肿；伤后24 h肝小叶结构及肝细胞索排列紊乱，肝窦变窄，肝细胞呈灶性或片状坏死。伤后48 h，可见多发性灶性或大片肝细胞坏死，坏死区周围见明显充血、出血和炎细胞浸润。伤后12 h，BS动物非感染肝叶内肝窦充血扩张，见少量炎性细胞浸润；伤后24 h，肝小叶内炎性细胞散在分布，肝细胞显浊肿，部分肝细胞胞浆疏松、脂肪变性；伤后48 h，肝小叶结构及肝细胞索排列紊乱，肝窦变窄，见灶性肝细胞坏死。

伤后12～24 h，BO组梗阻肝叶内门管区小叶间胆管明显扩张，肝细胞轻度浊肿；伤后48 h，门管区内以单核细胞为主的炎细胞浸润；小胆管增生，见较多双核肝细胞。BO组非梗阻肝叶无明显改变。

3 讨论

胆原性脓毒症既不同于一般的腹腔脓毒症，也不同于一般急性胆道感染。根据胆原性脓毒症的临床病理特征[1~2]，其动物模型的标准应包括：急性胆道感染、持续菌血症、早期发生并迅速演进的全身脓毒性反应及多器官功能障碍。与以前报道的各种化脓性胆管炎动物模型不同[5~7]，本模型是第一个充分显示胆原性脓毒症典型表现的小动物模型。肖路加等为研究胆道感染与胆石形成的关系，秦明放等为研究内毒素血症在重症胆管炎发病中的意义，已分别复制了兔化脓性胆管炎模型；方法是造成肝总管或胆总管部分狭窄，向梗阻近端胆管内注入1×10^5大肠杆菌[5,6]。从各自所报道的实验结果看，这两种模型的病程进展速度、全身脓毒性反应及死亡率均与胆原性脓毒症差异甚大。模型的病情轻及早期死亡率低可能与其细菌负荷量小有关[5,6]。我们在本模型中于右侧叶肝管开口近端结扎胆管，造成部分肝胆管的梗阻和化脓性感染，符合临床上急性梗阻性化脓性肝胆管炎的发病情况[1]。同时，完全结扎兔胆管则避免了因胆管部分狭窄难以控制而造成的模型低重复性。事实上，胆管完全梗阻可能更符合人类胆原性脓毒症的发病条件。通过比较不同细菌负荷量的胆道感染时，动物全身脓毒性反应及死亡率，发现在细菌负荷量为2×10^8大肠杆菌时动物出现类似人类胆原性脓毒症的临床病理表现。

胆原性脓毒症是一种首先攻击肝脏的特殊类型的腹腔脓毒症，需要设计和确立与胆原性脓毒症模型的脓毒性攻击强度相当、可作为对照的腹腔脓毒症模型来对照研究以阐明胆原性脓毒症时肝脏损害的病理特点及有关病理机理。单纯腹腔内接种等量大肠杆菌不易复制出脓毒症；我们曾将两倍于诱发胆原性脓毒症的大肠杆菌负荷量接种于兔腹腔内，动物不出现显著脓毒性反应。盲肠结扎穿孔模型类似临床上腹腔脓毒症[8]，但其脓毒性强度难以控制，且几乎无法做到与胆原性脓毒症者相均衡。

我们利用兔胆管和肝脏多枝多叶的解剖特点，将其分隔成两个不同的病理单元。从肝损害病理过程看，梗阻平面近端的感染肝叶受到胆道高压和胆系感染的直接攻击作用；而梗阻平面远端的非感染肝叶和诸肝外器官一样是急性胆道感染所诱发的宿主全身脓毒性反应的靶器官，这与腹腔脓毒症时病理情形相似。因而借助于此模型，比较感染肝叶和非感染肝叶之间病理改变的异同即可鉴别胆原性脓毒症和腹腔脓毒症对肝脏的不同病理效应。这一自身对照模型成功地解决了胆原性脓毒症研究中极为重要的实验对照难题。本实验的病理组织学资料显示，在病程早期感染肝叶率先出现显著炎性反应和肝实质损害；随病程演进在感染肝叶病变逐渐加重的同时，非感染肝叶相继出现炎性反应及肝实质结构损害。这表明胆原性脓毒症较其它类型腹腔脓毒症更早地诱致肝脏损害。

参考文献

1 黄志强. 急性梗阻化脓性胆管炎. 见：吴阶平，裘法祖 主编. 黄家驷外科学. 上册. 第5版. 北京：人民卫生出版社，1992：1399～1402

2 王曙光，王敖川，韩本立. 急性重症胆管炎后多器官衰竭. 中国急救医学，1990；10(3)：2

3 大久保，照行. GOT、GPT. 临床病理，1983；特刊55号：115

4 Li PK，Lee JT，MacGillivray MH *et al*. Direct，fixed-time kinetic assays for β-hydroxybutyrate and acetoacetate with a centrifugal analyzer or a computer-backed spectropho-tometer. Clin Chem，1980；25：1713

5 肖路加，彭其芳，饶林强等. 化脓性胆管炎和胆红素结石的动

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

物模型.中华外科杂志,1985;23(7):399
6 秦明放,鲁焕章,白月华等.化脓性胆管炎兔模型与内毒素血症的研究.中华实验外科杂志,1993;10(2):51
7 Huang T, Base TA, Williams RD *et al*. The significance of biliary pressure in cholangitis. Arch Surg,1969;98(15):629
8 Pink MP, Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock. J Surg Res,1990;49(2):186

(收稿:1995-10-24;修回:1996-01-23)
(编辑 刘 鹏)

Clinical and pathophysiological characteristics of a newly established rabbit model for biliary sepsis

Dong Jiahong, Duan Hengchun, Han Benli, Peng Zhiming, Li Kun, Wang Aochuan, Huang Zhiqiang (Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract A newly established rabbit model for the study of biliary sepsis was described. Sepsis in the rabbit was induced with the ligation of the right hepatic duct just before its junction with the left hepatic duct to form the common bile duct and injection of a suspension containing 2×10^8/ living germs of E. coli into the proximal bile duct. The liver lobes of the septic rabbit was compartmentized into 2 distinct pathological units, that is, the right lobe wasthe target organ of the systemic septic response evoked with acute cholangitis while the other lobes were the target directly attacked by acute cholangitis. This self-controlled experimental model is able to exhibit hemodynamic, metabolic and pathological changes similar to those of human biliary sepsis and to serve as an ideal model to study the pathogenesis of biliary sepsis especially for the comparison of the different pathological patterns in the liver due to biliary and peritoneal sepsis respectively.

Key words sepsis/biliary; animal model; rabbit

电离子烧灼冠周龈瓣的疗效观察

Observation on the results of pericoronal gingival flap by ionized cauterization

张 虹* 于一心 (第三军医大学附属西南医院口腔科) 重庆,630038

下颌第三磨牙常萌出受阻,在牙冠远中面有龈瓣及软组织复盖,形成龈袋盲囊,极易引起发炎,临床上常采用龈瓣切除术,消除龈袋.我科自1990年以来采用电离子技术,对26例可萌出的下颌阻生智齿,进行冠周龈瓣烧灼,取得了满意的疗效,现将其报告如下:

1 临床资料

1.1 病例选择

下颌阻生智齿,其远中和颊侧有龈瓣覆盖;牙位轻度舌侧移位,具有良好对殆关系,牙冠殆面无龈瓣复盖,而牙冠的远中有龈袋者.治疗26例病人,男15例,女11例.年龄均在18～26岁,所有病例均有冠周炎反复发作的病史。

1.2 材料及方法

1.2.1 材料 选用GX－Ⅰ型多功能电离子治疗机(广西应用物理研究所生产),功率100 VA,输出指示5～16 V。

1.2.2 操作方法 患者仰坐于牙科治疗椅上,2%奴夫卡因常规行患侧下齿槽神经、舌神经、颊神经阻滞麻醉后,用气枪吹干或棉球擦干需烧灼的龈瓣,并隔湿。接通治疗机电源开关,输出功率调到10～15 V,将长短火开关拨向长火档,选用直径为0.3～0.5 mm不锈钢丝作治疗针头,安插在笔式治疗机头上,前端弯成90°角。治疗针头轻轻与龈瓣接触,先烧灼复盖在牙冠上的龈瓣,然后分别烧去颊舌侧龈瓣,并沿牙冠周围向下烧至牙颈部,间断式地向后扩展,充分暴露牙冠,尤其是远中部的龈盲囊要烧灼彻底,最后用治疗触头轻轻平扫创面,使创面表面形成薄炭化层,术后创面任其自然开放不作特殊处理,嘱患者保持口腔清洁。术中应注意:①在烧灼时,治疗触头应尽量避免碰及牙齿,以免引起牙髓刺激症。②要保护好口颊及舌部组织,免受烧灼。

2 疗效观察

治疗26例病人,24例病员随访。术后第1天,24例均感咀嚼食物时有轻微疼痛,查创面均无出血、水肿及分泌物。术后第3天,16例仍感咀嚼时轻微疼痛,7例无疼痛感;1例因喝大量啤酒,局部疼痛和水肿较明显,给予局部处理。24例病人烧灼部均形成假膜复盖。术后7～10 d,24例均无疼痛,局部假膜已脱落,

(下转 58 页)

* 进修生,成都军区峨眉疗养院 峨嵋山市,614200

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net