

·实验研究·

酵母多糖制备大鼠全身炎症反应综合征疾病动物模型*

吴智婷, 齐诗仪, 龚 萌, 黄 莹, 吴靖雅, 林锦文, 林 栋
福建中医药大学, 福建 福州 350122

摘 要 目的: 通过研究使用酵母多糖来建立稳定的SIRS大鼠模型, 为下一步探究全身炎症反应综合征(SIRS)发病机制及后续干预做准备。**方法:** Wistar大鼠均采用腹腔注射酵母多糖—石蜡混悬液制备SIRS动物模型, 将模型组大鼠按照不同剂量分为400 mg/kg、500 mg/kg、600 mg/kg、700 mg/kg 4组, 通过对比观察, 评估各组大鼠注射后的生存率(96 h), 给药后24 h大鼠的一般情况、体温、白细胞(WBC)计数、外周血检测指标、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6)水平以及肝肺脏器的病理苏木精-伊红(HE)染色。**结果:** 腹腔注射酵母多糖—石蜡混悬液剂量为600 mg/kg和700 mg/kg的大鼠符合SIRS动物模型标准, 600 mg/kg组大鼠48 h时生存率为40%, 具有较长的生存周期; 而700 mg/kg组大鼠短期内的死亡率在24 h后即可达到50%。**结论:** 腹腔注射酵母多糖—石蜡混悬液是能成功制备较为稳定的SIRS模型大鼠的方法, 600 mg/kg剂量组的大鼠可存活的时间较长, 故可用于SIRS发病机制研究, 亦为SIRS的后续干预实验做好准备。

关键词 酵母多糖; 全身炎症反应综合征; 模型, 动物; 大鼠

doi 10.3969/j.issn.1004-5775.2024.09.008

学科分类代码 310.51

中图分类号 R-332

文献标识码 B

Animal Model of Systemic Inflammatory Response Syndrome in Rats Prepared with Yeast Polysaccharide/Wu Zhiting, Qi Shiyi, Gong Meng, et al./Fujian University of Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian, 350122, China

Abstract Objective: To prepare for the next step of exploring the pathogenesis of SIRS and subsequent intervention, the experiment was conducted to establish a stable rat model of systemic inflammatory response syndrome (SIRS) by investigating the use of yeast polysaccharide. **Methods:** Wistar rats were all injected intraperitoneally with yeast polysaccharide-paraffin suspension to prepare the SIRS animal model, and the model group rats were divided into 4 groups of 400 mg/kg, 500 mg/kg, 600 mg/kg and 700 mg/kg according to different doses. The general condition, temperature, WBC, of rats 24h after administration and test index: TNF- α , IL-6 and pathological HE staining of liver and lung organs were evaluated. **Results:** Rats injected intraperitoneally with yeast polysaccharide-paraffin suspension at the doses of 600 mg/kg and 700 mg/kg met the criteria of SIRS animal model, and the survival rate of rats in the 600 mg/kg group was 40% at 48 h, which had a long survival cycle, while the mortality rate of rats in the 700 mg/kg group could reach 50% after 24 h in the short term. **Conclusion:** Intraperitoneal injection of yeast polysaccharide-paraffin suspension is a successful method to prepare more stable SIRS model rats, and the rats in the 600 mg/kg dose group can survive for a longer period of time. So it can be used to study the pathogenesis of SIRS and also prepare for the subsequent intervention experiments of SIRS.

Keywords Yeast polysaccharide; Systemic inflammatory response syndrome; Model, Animals; Rats

全身炎症反应综合征(SIRS)是身体对有害应激源(如感染、手术、急性炎症、缺血或再灌注等)所产生的夸大防御反应, 其涉及急性期反应物的释放。但是, 如果发生了紊乱的“细胞因子风暴”, 就会导致大规模的炎症级联反应, 从而造成可逆或不可逆转的终末器官功能损伤, 甚至是死亡^[1]。由于其生理病理的复杂性, 且发病机制尚未明确, 故需建立一个理想的SIRS动物模型来模拟人类的SIRS, 借此可以开展进一步的科学研究。

本实验的大鼠SIRS模型是通过腹腔注射酵母多糖—石

蜡混悬液来复制的, 观察大鼠的一般情况、相关炎症细胞因子及肝肺器官的变化, 该模型的成功建立可为防治SIRS提供参考资料, 现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

Wistar雌性大鼠80只, 6~8周龄, 体重180~200 g (福建中医药大学动物实验中心提供), 恒温(22±1)℃室内饲养, 正常光照时间08:00—20:00, 无饮食饮水限制。动物实验操作时间为08:00—20:00, 实验前18 h禁食不禁水。将Wistar大鼠随机分为A、B两大组, A组观察生存率, 共50只; B组观察各项检测指标, 共30只。A、

*基金项目: 福建省自然科学基金项目(2020J01742)。

通信作者: 林栋, E-mail: bluelike1@sina.com。

B两组组内均分为对照组和实验组，根据造模试剂浓度又将实验组分为400 mg/kg组、500 mg/kg组、600 mg/kg组、700 mg/kg组。

1.2 主要试剂和设备

酵母多糖（zymosan A）由美国Sigma公司（z4250-5G）提供；医用液体石蜡购自南昌华鑫医药化工有限公司；TNF-α、IL-6 ELISA定量检测试剂盒由博士德生物工程有限公司提供。

1.3 动物实验

1.3.1 酵母多糖—石蜡混悬液制备 将酵母多糖粉剂与液体石蜡在高频中振荡15 min使粉剂与石蜡混匀，制备成酵母多糖浓度为50 mg/mL的混悬液，然后将其置于100℃的水浴中、消毒灭菌80 min，冷却后在4℃冰箱储存，实验前将其放置在40℃恒温水浴锅，摇匀后使用。

1.3.2 造模 实验前18 h大鼠禁食不禁水，称重，测直肠温度。造模时各组均采用腹腔注射的给药方式，实验组根据大鼠体重对其进行不同剂量的酵母多糖—石蜡混悬液，空白组腹腔注射2 mL的灭菌液体石蜡，注射完成后均轻揉大鼠腹部。

1.3.3 SIRS动物模型造模成功判断标准 按照胡森提供的一般诊断依据：（1）直肠温度较正常或伤前升高或降低1℃；（2）呼吸频率超过对照值2倍或PaCO₂较对照值降低25%；（3）白细胞（WBC）总数超过对照值的2倍或减少50%；（4）心率较对照值增加50%；（5）重要器官的病理学改变；（6）相关细胞因子改变^[2-3]。根据测试条件和数据的稳定性，选择了指标（1）（3）（5）和（6）来监测SIRS模型是否成功建立。

1.4 检测指标和方法

A组分别于6 h、24 h、48 h、72 h、96 h，观察大鼠的生存和死亡情况。B组观察大鼠一般情况，测量大鼠造模前，以及造模后6 h、24 h的直肠温度，造模后24 h的WBC计数、TNF-α、IL-6含量，然后收集每组大鼠的肝脏

和肺部组织，用肉眼大致观察组织病变后，在4%多聚甲醛固定液中固定24 h。随后将组织脱水、包埋，最后进行切片和苏木精-伊红（HE）染色，并在光学显微镜下观察组织。

1.5 WBC计数

采用全自动动物血液分析仪读数并记录B组各组大鼠腹主动脉血标本中的WBC总数。

1.6 细胞因子的检测

取B组各组24 h腹主动脉血标本，按ELISA定量检测试剂盒说明书步骤检测标本中TNF-α、IL-6水平。

1.7 统计学方法

数据采用SPSS 22.0软件进行统计分析。计量资料以均数±标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，组间比较采用t检验。计数资料以例数和百分比（%）表示，组间比较采用 χ^2 检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

实验组大鼠在腹腔注射酵母多糖—石蜡混悬液后，出现竖毛、呼吸急促、反应迟钝、食欲减退、嗜睡等现象，随着注射剂量的增加，各组大鼠的体征改变越明显，并随着时间的推移出现恶化，严重的会呈现口鼻出血、昏睡甚至死亡；对照组大鼠外观及体征并未出现明显变化。

2.2 A组各组大鼠生存率情况

A组对照组和腹腔注射酵母多糖400 mg/kg组大鼠均未死亡情况；腹腔注射酵母多糖500 mg/kg组死亡数不明显，96 h后生存率高达80%；腹腔注射酵母多糖600 mg/kg组24 h内死亡数量不多，24~48 h死亡数量陡增，后趋于平缓，96 h生存率为30%；腹腔注射酵母多糖700 mg/kg组6 h时即有大鼠死亡，24 h死亡数最为明显、48 h后死亡速度趋缓，96 h时生存率仅剩10%。各组大鼠于72~96 h时，死亡数量基本不再产生变化。见表1。

表1 A组各组大鼠生存率情况

组别	总数(只)	6 h死亡(只)	24 h死亡(只)	48 h死亡(只)	72 h死亡(只)	96 h死亡(只)	存活(只)	生存率(%)
(a)对照组	10	0	0	0	0	0	10	100
(b)酵母多糖400 mg/kg组	10	0	0	0	0	0	10	100
(c)酵母多糖500 mg/kg组	10	0	1	1	0	0	8	80
(d)酵母多糖600 mg/kg组	10	0	2	4	1	0	3	30
(e)酵母多糖700 mg/kg组	10	1	5	2	1	0	1	10

2.3 WBC及体温改变

B组中，与对照a组相比，实验组（b、c、d、e组）6 h、24 h体温均有不同程度的升高或降低≥1℃、白细胞数均降低，差异有统计学意义（P<0.05、P<0.01）；且多随着酵母多糖混悬液剂量的增加，其降低程度更甚。见表2和表3。

2.4 细胞因子含量比较

与对照组（a）比较，各实验组（b、c、d、e）TNF-α、IL-6水平均有所升高，各实验组TNF-α与对照组，差异有统计学意义（P<0.01、P<0.05）。c、d、e3组IL-6水平与对照组相比，差异有统计学意义（P<0.05、

P<0.01）。见表4。

2.5 重要脏器病理学形态改变

2.5.1 肺脏 正常对照组大鼠无明显病理学改变情况，其肺组织结构完整、清晰，肺泡壁无增厚、充血现象，肺泡腔内无明显炎性细胞浸润、水肿等改变。腹腔注射不同浓度酵母多糖的实验组大鼠的肺组织结构均存在不同程度的破坏，肺泡壁有增厚的情况，肺泡腔内可见弥漫性炎性细胞浸润，比如大量的中性粒细胞、红细胞以及单核巨噬细胞等，有部分肺泡腔还存在塌陷、变狭窄等病理改变情况。见图1。

表2 B组各组大鼠体温统计

组别	造模前		造模后6 h		造模后24 h	
	存活(只)	体温($\bar{x}\pm s$,℃)	存活(只)	体温($\bar{x}\pm s$,℃)	存活(只)	体温($\bar{x}\pm s$,℃)
(a)对照组	6	36.36±0.31	6	36.66±0.48	6	36.41±0.42
(b)酵母多糖400 mg/kg组	6	36.68±0.32	6	37.38±0.91	6	37.40±0.28 [▲]
(c)酵母多糖500 mg/kg组	6	36.41±0.37	6	34.60±0.61	6	36.03±0.71
(d)酵母多糖600 mg/kg组	6	36.55±0.31	6	33.88±0.51 [▲]	4	34.35±1.03 [▲]
(e)酵母多糖700 mg/kg组	6	36.50±0.35	5	34.18±0.62	3	33.73±0.47 [▲]

6 h时, d组体温较a组有显著下降, 差异有统计学意义, ▲表示 $P<0.01$ 。24 h时, b、d、e组体温较a组, 差异有统计学意义, ▲表示 $P<0.01$ 。

表3 B组各组大鼠造模后24 hWBC计数统计($\bar{x}\pm s$)

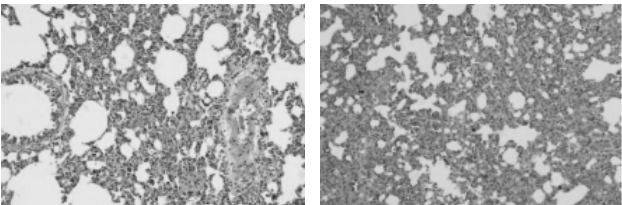
组别	造模后24 h	
	存活(只)	WBC($10^9/L$)
(a)对照组	6	6.43±1.70
(b)酵母多糖400 mg/kg组	6	2.77±0.87 [▲]
(c)酵母多糖500 mg/kg组	6	0.95±0.26 [▲]
(d)酵母多糖600 mg/kg组	4	0.56±0.41 [▲]
(e)酵母多糖700 mg/kg组	3	0.63±0.40 [▲]

b、c、d、e组白细胞较a组均有显著降低, 各实验组与对照组, 差异有统计学意义, ▲表示 $P<0.01$ 。

表4 B组各组大鼠TNF- α 、IL-6水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	造模后24 h		
	存活(只)	TNF- α (pg/mL)	IL-6(pg/mL)
(a)对照组	6	9.89±4.66	37.04±22.69
(b)酵母多糖400 mg/kg组	6	15.26±5.40 [*]	193.31±61.56 [*]
(c)酵母多糖500 mg/kg组	6	19.93±2.70 [▲]	240.83±58.49 [▲]
(d)酵母多糖600 mg/kg组	4	27.10±2.43 [▲]	591.55±229.50 [▲]
(e)酵母多糖700 mg/kg组	3	36.96±4.43 [▲]	399.00±168.27 [▲]

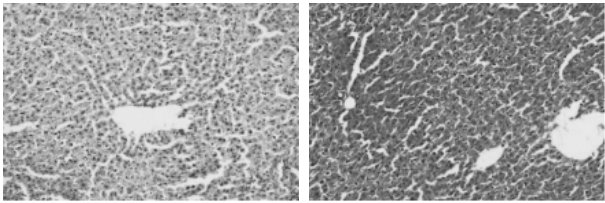
b组TNF- α 含量与a组相比, *表示 $P<0.05$, c、d、e各组TNF- α 含量与a组相比, 差异有统计学意义, ▲表示 $P<0.01$ 。a组与b组的IL-6含量, 差异有统计学意义, *表示 $P<0.05$; a组与c、d、e组的IL-6含量有显著差异, ▲表示 $P<0.01$ 。



正常对照组 (×20) 酵母多糖组 (×20)

图1 正常对照组与酵母多糖实验组大鼠肺组织病理形态学改变

2.5.2 肝脏 正常对照组大鼠肝细胞形态完整、大小一致, 细胞核大而圆且在正中, 相邻肝小叶界限清楚。腹腔注射不同剂量酵母多糖的实验组大鼠的肝小叶中央静脉及周围肝窦均出现不同程度显著的扩张和淤血, 肝细胞可见显著的肿胀变化, 胞浆内部结构呈网状且较稀疏或可见积水变性, 但未有显著的灶性坏死改变。见图2。



正常对照组 (×20) 酵母多糖组 (×20)

图2 正常对照组与酵母多糖实验组大鼠肝组织病理形态学改变

3 讨论

SIRS是指由于创伤、感染或某些药物等原因, 使机体免疫系统发生异常活化, 在体内迅速释放出大量的细胞因子, 形成“细胞因子风暴”, 进而引发脓毒血症和多器官功能障碍综合征 (MODS), 患者大多处于死亡的边缘^[4]。因此, 寻找一个可以建立稳定的SIRS动物模型方法, 用于研究SIRS的发病机制, 以便能更早控制SIRS的发展, 阻止MODS的发生, 以期达到减少SIRS所造成的死亡数量。

目前国际上有多种制备SIRS动物模型的方法, 较常见的有内毒素注射法, 大肠杆菌腹腔注射法, 以及盲肠结扎穿孔术等。这些实验模型均引入了外源性感染因素, 难以排除因感染而引发的外因干预, 不利于研究SIRS发病的生理病理过程。而酵母多糖是一种酿酒酵母细胞壁的提取物^[5], 可在体内外激活补体和巨噬细胞。人体内上皮组织面积最大的是腹膜, 当将酵母多糖注入动物体内后, 巨噬细胞被激活, 将石蜡油作为载体, 是因为它能够有效地诱导大量的炎症介质, 从而引起强烈的炎症反应, 而这种反应可以通过炎症介质来加强, 从而导致严重的腹腔炎症^[6]。该模型可以再现病理生理学和组织病理学特征, 足够稳定, 可以进行数天的研究, 并且没有外源性原发性细菌感染^[7], 是非感染因素所引起的SIRS, 最终可发展到MODS。

在本研究中, 各组大鼠注射酵母多糖—石蜡混悬液后均出现不同程度的反射性竖毛、精神不振、嗜睡、活动度减少、食欲不振等行为特点^[8], 且其严重程度随注射药物剂量的增加而增加。部分注射剂量较多的大鼠甚至出现死亡, 其死亡数量亦随着酵母多糖—石蜡混悬液剂量的增加而提高。以500 mg/kg剂量的酵母多糖—石蜡混悬液给药后, 大鼠出现了行为学改变, 但SIRS效应并不显著; 若

将酵母多糖-石蜡混悬剂的注射剂量提高到 600 mg/kg、700 mg/kg, 则会引起大鼠的 SIRS 现象, 并使其死亡率急剧上升, 尤其是在高剂量 (700 mg/kg) 下, 大鼠在短时间内 (注射后 24 h) 就出现了死亡高峰, 存活周期短, 并且在多次的重复试验中, 此结果均类似。

在 SIRS 中, 涉及的细胞因子与趋化因子众多, 如 TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-12、IFN- γ 、MCP-1 等^[9], 这些因子都是由病原体诱发而引起的。它们在进入循环系统时, 会受到免疫系统的调节和控制, 形成一种相互交错的作用, 引起大规模的炎症级联反应, 最终导致细胞因子风暴的发生^[10]。从 SIRS 到 MODS 的发生发展过程中, 起重要作用的炎症因子分别是 TNF- α 和 IL-6。TNF- α 是炎症反应最早和主要的内源性介质^[11]。而 IL-6 属于一种多效细胞因子, 由单核细胞和巨噬细胞产生, 它能够刺激 T、B 淋巴细胞以及其他参与细胞增殖和分化的细胞, 并提高它们的功能, 其参与血管炎症和免疫反应^[12]。在 Jansen 等^[13-14]实验中发现, 在给大鼠腹腔注射酵母多糖-石蜡混悬液后的 24 h 内, 血浆 TNF- α 和 IL-6 的浓度短暂升高, 这和本次实验结果相吻合。在众多实验研究中^[15-16], 均表明 IL-6 在 SIRS 患者中表达上调, 与其他细胞因子相比, IL-6 作为诊断性生物标志物具有更高的敏感性和特异性。IL-6 水平也与死亡率相关, IL-6 水平升高与 SIRS 患者的死亡风险较高相关^[17]。因此检测血清中 TNF- α 、IL-6 的含量可作为一种预测 SIRS 的指标。本实验的各组大鼠在给药后, TNF- α 、IL-6 的水平均出现了不同程度的增高, 且随着剂量的增加而增高。

本实验选择通过观察腹腔注射药物后大鼠的行为改变、给药前后直肠温度对比以及 WBC 数量、TNF- α 、IL-6 水平和肺、肝的病理学改变, 以此来检测大鼠是否造模成功。本实验结果表明, 不同剂量的酵母多糖可对大鼠造成不同程度的行为改变以及血生化指标的变化, 对大鼠的肺、肝脏器也能产生一定的损害, 并说明了大鼠 SIRS 的模型可用酵母多糖来诱导完成。本研究发现, 700 mg/kg 组的大鼠仅存活 1 只, 死亡率过高, 不适宜用于造模; 而 600 mg/kg 组的大鼠各指标符合 SIRS 动物模型的诊断标准, 具有一定数量的生存率, 并且存活周期相对较长, 利于进行干预实验。表明大鼠以 600 mg/kg 的体重剂量注射酵母多糖-石蜡混悬液较为合适。

本实验中探讨的建立大鼠 SIRS 模型的方法, 具有剂量依赖性和操作的可重复性, 是一种稳定的 SIRS 造模方法, 有利于对 SIRS 的早期发病机制和防治实行干预研究, 是一种较为理想的动物模型。

参 考 文 献

[1] MARGARF A, LUDWIGN, ZARBOCK A, et al. Systemic Inflammatory Response Syndrome after surgery: mechanisms and protection[J]. *Anesth Analg*, 2020, 131(6): 1693-1707.
[2] 陆麒羽, 周裕洋, 王俊波, 等. 酵母多糖致全身炎症反应综合征大鼠模型的制备[J]. *浙江大学学报 (医学版)*, 2011,

40(6): 641-646.

[3] 胡森, 盛志勇, 周宝桐. MODS 动物模型研究进展[J]. *中国危重病急救医学*, 1999(8): 57-60.
[4] BALK R A. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): where did it come from and is it still relevant today? [J]. *Virulence*, 2014, 5(1): 20-26.
[5] STEINBERG S, FLYNN W, KELLEY K, et al. Development of a bacteria-independent model of the multiple organ failure syndrome[J]. *Arch Surg*, 1989, 124(12): 1390-1395.
[6] CHADZINSKA M, STAROWICZ K, SCISLOWSKA-CZARNECKA A, et al. Morphine-induced changes in the activity of proopiomelanocortin and prodynorphin systems in zymosan-induced peritonitis in mice[J]. *Immunol Lett*, 2005, 101(2): 185-192.
[7] STEINBERG S, FLYNN W, KELLEY K, et al. Development of a bacteria-independent model of the multiple organ failure syndrome[J]. *Arch Surg*, 1989, 124(12): 1390-1395.
[8] DOI K, LEELAHAVANICHKUL A, YUEN P S, et al. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury[J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(10): 2868-2878.
[9] FAJGENBAUM D C, JUNE C H. Cytokine storm[J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(23): 2255-2273.
[10] GUPTA K K, KHAN M A, SINGH S K. Constitutive inflammatory cytokine storm: a major threat to human health[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2020, 40(1): 19-23.
[11] GEORGESCU A M, BANESCU C, AZAMFIREI R, et al. Evaluation of TNF- α genetic polymorphisms as predictors for sepsis susceptibility and progression [J]. *BMC Infect Dis*, 2020, 20(1): 221.
[12] LIU S, ZHANG J, PANG Q, et al. The protective role of curcumin in zymosan-induced multiple organ dysfunction syndrome in mice[J]. *Shock*, 2016, 45(2): 209-219.
[13] JANSEN M J, HENDRIKS T, VOGELS M T, et al. Inflammatory cytokines in an experimental model for the multiple organ dysfunction syndrome [J]. *Crit Care Med*, 1996, 24(7): 1196-1202.
[14] ZHANG Y, WANG L, MENG L, et al. Sirtuin 6 overexpression relieves sepsis-induced acute kidney injury by promoting autophagy [J]. *Cell Cycle*, 2019, 18(4): 425-436.
[15] SCHULTE W, BERNHAGEN J, BUCALA R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets—an updated view [J]. *Mediators Inflamm*, 2013, 2013: 165974.
[16] XU Z, SHI L, WANG Y, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome[J]. *Lancet Respir Med*, 2020, 8(4): 420-422.
[17] HACK C E, GROOT E R, FELT-BERSMA R J, et al. Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis[J]. *Blood*, 1989, 74(5): 1704-1710.

[收稿日期: 2023-12-24]