

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2024.02.016

坏死性筋膜炎动物模型构建研究进展

邢宝杰¹ 综述 贾代良^{1,2} 审校

(¹ 济宁医学院临床医学院, 济宁 272013; ² 济宁医学院附属医院急诊外科, 济宁 272029)

摘要 坏死性筋膜炎是一种累及皮下组织、筋膜和肌肉的软组织感染,以广泛、迅速的皮下软组织感染为特征,可在短时间内波及全身,严重者可引发感染性休克及多器官功能衰竭。近年来坏死性筋膜炎发病趋势逐年递增,患者死亡率、截肢率也比较高。坏死性筋膜炎临床诊疗的发展与相关基础研究密不可分。为了增加我们对坏死性筋膜炎发病机制的理解,需要一个可靠的坏死性筋膜炎动物模型,至少部分地反映人类坏死性筋膜炎的感染过程。本文将简要综述坏死性筋膜炎动物模型的构建方法,为坏死性筋膜炎诊治的研究提供参考。

关键词 坏死性筋膜炎; 动物模型; 研究进展; 建模方法

中图分类号: R632.9 **文献标识码**: B **文章编号**: 1000-9760(2024)04-155-03

Research progress in animal model construction of necrotizing fasciitis

XING Baojie¹, JIA Dailiang^{1,2}

(¹ School of Clinical Medicine, Jining Medical University, Jining 272013, China;

² Department of Emergency Surgery, Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining 272029 China)

Abstract: Necrotizing fasciitis is a soft tissue infection that affects subcutaneous tissue, fascia, and muscles. It is characterized by widespread and rapid subcutaneous soft tissue infection, which can spread throughout the body in a short period of time. In severe cases, it can cause septic shock and multiple organ failure. In recent years, the incidence trend of necrotizing fasciitis has been increasing year by year, and the mortality rate and amputation rate of patients are also relatively high. The development of clinical diagnosis and treatment of necrotizing fasciitis is closely related to basic research. In order to increase our understanding of the pathogenesis of necrotizing fasciitis, a reliable animal model of necrotizing fasciitis is needed, which at least partially reflects the infection process of human necrotizing fasciitis. This article will briefly review the construction methods of animal models for necrotizing fasciitis, providing reference for research on the diagnosis and treatment of necrotizing fasciitis.

Keywords: Necrotizing fasciitis; Animal model; Research progress; Modeling methods

坏死性筋膜炎是一种累及皮下组织、筋膜和肌肉的软组织感染,以广泛、迅速的皮下软组织感染为特征,可在短时间内波及全身,严重者可引发感染性休克及多器官功能衰竭^[1]。尽管及时使用抗生素、静脉注射免疫球蛋白、重症监护治疗以及积极的手术清创,死亡率仍居高不下^[2-3]。给家庭和社会带来了沉重的医疗负担。因此,建立可靠的动物模型对研究坏死性筋膜炎的发病机制和优化治疗方案至关重要。目前,国内还没有开展类似坏死性筋膜炎的动物模型,国外相关研究也比较少见。整理分析各种坏死性筋膜炎动物模型的优缺点,对后续坏死性筋膜炎的研究具有重要意义。现结合国内外相关文献对坏死性筋膜炎动物模型的研究现状和进展做一综述。

1 常用于建模的动物类型

常用于坏死性筋膜炎动物模型动物有大鼠、小鼠、新西兰大白兔及其他动物。作为一个理想的坏死性筋膜炎动物模型应具备以下几个特点: 1) 相似性。不同种属的动物基因和人的基因具有的差异性不同,和人类基因越相似动物模型越接近于人体发病条件。2) 经济性。尽可能降低造模实验的成本。3) 可重复性。造模实验需要便于重复研究。4) 方便性。指建模方法简单及动物饲养和管理方便。

1.1 大鼠

大鼠作为标准“实验动物”,其先天遗传性状、后天繁育条件、营养需求、微生物携带状况及环境因素等多方面都受到全面控制,既可以保证实验结果的准确性、可靠性和可重复性,又能保护实验人员的健康;大鼠动物遗传性状稳定

[通信作者] 贾代良, E-mail: 237849399@qq.com

且显著,质量和规格繁多,可选择性多^[4];大鼠经济实用,应用较为广泛^[5]。

1.2 小鼠

小鼠作为医学实验中最常用动物,除了具有与大鼠类似的优点外,小鼠相比于大鼠来说基因更容易控制。通过控制基因可复制出类似于人类各阶段、不同疾病条件下的动物模型。随着转基因技术的不断发展,通过转基因技术可获得与人类发病机制相似的小鼠^[1,6],使得转基因小鼠被广泛应用于坏死性筋膜炎疾病的研究。使用小鼠作为模型其不足就在于动物体型小,造模动物取血、其他体液和组织比较困难,难以观察动物的感染进展及对治疗的反应。同时小鼠模型影像学检查的难度也较大。

1.3 新西兰大白兔

应用兔子作为模型动物的优势就在于其寿命长且繁殖能力强,易于饲养管理。兔子体型相对较大,其较大的体积更便于对感染病灶进行测量和观察,且易于采集标本和进行相关的生化检验、病理学及影像学检查。缺点是兔类动物体型相对鼠类大,饲养成本高。

1.4 其他

非人类灵长类动物基因方面与人类更加相似,发病机制也更加接近^[7],可以更好地复制人类坏死性筋膜炎的发病机制。但是,非人类灵长动物价格昂贵,保护方面和动物来源受限,且饲养和管理的难度比较大,还可能会造成疾病的传播^[8],以上不利条件均导致了非人类灵长动物不能广泛作为实验动物而应用。

2 造模菌株的选择

根据致病菌的不同,坏死性筋膜炎可分为 4 型:Ⅰ型为多细菌混合感染,由多种需氧菌和厌氧菌共同所致,常见有革兰氏阳性球菌(链球菌和葡萄球菌)、革兰氏阴性菌(大肠杆菌、不动杆菌、假单胞菌和克雷伯菌)及厌氧菌(拟杆菌和梭菌)等;Ⅱ型为单一细菌感染,主要由 A 族链球菌(GAS)或耐甲氧西林金黄色葡萄球菌引起;Ⅲ型和Ⅳ型为特殊致病菌感染^[9]。现有的造模模型常用的致病菌菌株有多细菌混合菌株(链球菌和葡萄球菌)和单一细菌菌株(链球菌)两类。Seal 等^[10]设计了一个链球菌与葡萄球菌的混合菌株,分别从单一菌株致病坏死性筋膜炎的临床病例中分离出链球菌和金葡菌,后通过体外培养混合注入实验动物体内构建模型。相对单一致病菌株,混合菌株造模成功率更高。其原理是通过葡萄球菌产生的葡萄球菌 α-赖氨酸协同链球菌促使感染的发生。

3 感染部位的选择

现有的坏死性筋膜炎动物模型在研究中感染部位的选择是多样的,常见的部位有动物后肢、侧腹部、背部、颈部、臀部等^[11-14]。选用模型动物足部进行感染的也有少量报

道。侧腹部皮下感染应用最为广泛,其具有操作方便,处理简单,易于观察感染情况等优点。

4 坏死性筋膜炎的造模方法

4.1 单纯皮下注射法

单纯皮下注射法是目前坏死性筋膜炎最常用的造模方法,其具体方法主要是通过将致病菌注入动物的皮下,通过皮下感染获得动物模型。此方法构建坏死性筋膜炎动物模型的可重复性较好,在临床试验中应用广泛。实验动物麻醉后,将注射区域动物皮毛刮除,后进行常规消毒,用注射器将致病菌注入皮下,可进行多点注射,多点注射后造模成功率高。该方法适用于大部分品系鼠类,同样也适用于兔类。这种建模方法具有操作方便、用时短、成功率高等优势。

4.2 人为制造擦伤+皮下注射法

皮肤软组织损伤是坏死性筋膜炎感染易感的因素之一^[15-16]。为了探索创伤导致坏死性筋膜炎发病机制的假设,Seki 等^[17]使用小鼠作为模型,在该模型中,小鼠在远离主要接种部位的肢体区域被人为擦伤。通过与未受伤的对照组对比,证实了受伤的小鼠死亡率明显更高,受伤肢体的细菌负荷更大,并且菌血症发作更早。此方法适用于兔子等中、大型动物。该方法模拟了皮肤软组织的创伤,更好地还原了临床上外伤合并坏死性筋膜炎的患者,为临床研究创伤与坏死性筋膜炎的关系提供了实验基础。

4.3 转基因动物+皮下注射法

转基因动物是指采用增加或敲除基因的方式来构建易感坏死性筋膜炎动物的一种方法。通过转基因技术,使动物获得或丢失某种蛋白的表达来增加动物的易感性^[18]。Nookala 等^[19]应用 HLA-II 转基因小鼠,通过去掉小鼠保护性 HLA-II 类等位基因促进 GARP 和 FoxP3 表达 Terg 的诱导来增强小鼠的易感性;Matsui 等^[11]应用 CD46 转基因小鼠构建模型,通过构建 CD46 转基因小鼠获得与人类 CD46 表达水平相似的小鼠来高度还原人类感染的过程^[20]。这些转基因小鼠不仅为坏死性筋膜炎的研究提供了一个有效工具,还为研究坏死性筋膜炎的致病机制和有关药物的研发提供了帮助。

5 小结与展望

坏死性筋膜炎动物模型种类繁多,但没有任何一个动物模型能代表人类坏死性筋膜炎所有的特征。迄今为止,尽管国内外从不同角度对坏死性筋膜炎进行了大量研究,许多关于坏死性筋膜炎和其他侵入性感染中 GAS 发病机制的基本问题仍未得到解答。因此,在将来的研究中,应创新和改良坏死性筋膜炎的动物模型,增强动物模型的临床可操作性,减少动物模型与人类生理和解剖的差异,开发一种能够真实模拟人类生理解剖结构,产生与人类致病机理

高度一致的坏死性筋膜炎的理想模型。

坏死性筋膜炎动物模型的构建在指导临床治疗等方面有着重要意义,但从总体来看,现阶段尚无普适性的坏死性筋膜炎模型,目前模型的构建仍处于探索阶段,对于实际的操作仍面临许多挑战,例如:坏死性筋膜炎菌株的提取比较困难,从患者身上提取的细菌菌株培养常常为阴性;实验动物的感染率较低。因此,坏死性筋膜炎动物模型的构建仍还有很长的一段路要走。综合相关文献分析,建议未来发展应从以下几个方面进行:1)整合现有的相关模型及相关研究,从动物选择、菌株选择、感染程度等几个层面综合分析模型的构建。2)根据坏死性筋膜炎致病因素的不同,构建相应的特异性模型。这样使模型更有实用性。3)结合目前医院大数据分析及相关流行病学研究,构建适用于临床的动物模型。

随着技术的不断革新,相信在不久的将来这些问题都会被克服。如果这些问题解决,将对疾病的认识、相应的药物研究、疾病的预防等产生巨大影响。我们预测坏死性筋膜炎模型的研究未来重点将会向对疾病机制的研究;对新型药物的评估;探索新的治疗方法;验证基因策略等方面进行优化。相信通过对坏死性筋膜炎的研究将给广大患者带来福音。

利益冲突:所有作者均申明不存在利益冲突。

参考文献:

- [1] Abdullah M, McWilliams B, Khan SU. Reliability of the laboratory risk indicator in necrotizing fasciitis (LRINEC) score [J]. *Surgeon*, 2019, 17 (5): 309-318. DOI: 10. 1016/j. surge. 2018. 08. 001.
- [2] Stevens D, Bryant A. Necrotizing soft-tissue infections [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378 (10): 971. DOI: 10. 1056/NEJMc1800049.
- [3] 孙法同, 贾代良. 坏死性筋膜炎研究进展 [J]. *济宁医学院学报*, 2020, 43 (5): 366-371. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-9760. 2020. 05. 014.
- [4] Karam N, Lavoie JF, St-Jacques B, et al. Bone-specific overexpression of PITX1 induces senile osteoporosis in mice through deficient self-renewal of mesenchymal progenitors and wnt pathway inhibition [J]. *Sci Rep*, 2019, 9 (1): 3544. DOI: 10. 1038/s41598-019-40274-6.
- [5] Campos J, Brill A. By word of mouse: using animal models in venous thrombosis research [J]. *Platelets*, 2020, 31 (4): 447-454. DOI: 10. 1080/09537104. 2019. 1678117.
- [6] Rinotas V, Niti A, Dacquin R, et al. Novel genetic models of osteoporosis by overexpression of human RANKL in transgenic mice [J]. *J Bone Miner Res*, 2014, 29 (5): 1158-1169. DOI: 10. 1002/jbmr. 2112.
- [7] 曾林, 赵太云. 实验动物学发展概况与展望 [J]. *解放军医学杂志*, 2010, 35 (8): 916-919.
- [8] 韩建保, 张高红, 郑永唐. 大动物生物安全三级实验室的生物安全隐患与对策 [J]. *环境与健康杂志*, 2010, 27 (10): 918-919. DOI: 10. 16241/j. cnki. 1001-5914. 2010. 10. 003.
- [9] 朱倩, 朱桂松, 许颢. 坏死性筋膜炎的中西医治疗进展 [J]. *内蒙古中医药*, 2022, 41 (3): 138-141. DOI: 10. 16040/j. cnki. cn15-1101. 2022. 03. 066.
- [10] Seal DV, Kingston D. Streptococcal necrotizing fasciitis: development of an animal model to study its pathogenesis [J]. *Br J Exp Pathol*, 1988, 69 (6): 813-831.
- [11] Matsui H, Sekiya Y, Nakamura M, et al. CD46 transgenic mouse model of necrotizing fasciitis caused by *Streptococcus pyogenes* infection [J]. *Infect Immun*, 2009, 77 (11): 4806-4814. DOI: 10. 1128/IAI. 00577-09.
- [12] Dalton TL, Hobb RI, Scott JR. Analysis of the role of CovR and CovS in the dissemination of *streptococcus pyogenes* in invasive skin disease [J]. *Microb Pathog*, 2006, 40 (5): 221-227. DOI: 10. 1016/j. micpath. 2006. 01. 005.
- [13] Eter EG, Khazzaka A, Mneimneh W, et al. Does diclofenac increase the risk of cervical necrotizing fasciitis in a rat model? [J]. *Int J Exp Pathol*, 2009, 90 (1): 58-65. DOI: 10. 1111/j. 1365-2613. 2008. 00594. x.
- [14] Ravins M, Ambalavanan P, Biswas D, et al. Murine soft tissue infection model to study group A streptococcus (GAS) pathogenesis in necrotizing fasciitis [J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2427: 185-200. DOI: 10. 1007/978-1-0716-1971-1_16.
- [15] Selbie FR, Simon RD. Virulence to mice of staphylococcus pyogenes: its measurement and its relation to certain in vitro properties [J]. *Br J Exp Pathol*, 1952, 33 (4): 315-326.
- [16] 任尊, 程鹏飞, 韩培. 坏死性筋膜炎诊治的研究进展 [J]. *国际骨科学杂志*, 2020, 41 (5): 294-297. DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-7083. 2020. 05. 009.
- [17] Seki M, Saito M, Iida K, et al. Onset of streptococcal toxic shock syndrome is accelerated by bruising in a mouse model [J]. *Microb Pathog*, 2008, 44 (4): 339-343. DOI: 10. 1016/j. micpath. 2007. 10. 009.
- [18] Sun H, Ringdahl U, Homeister JW, et al. Plasminogen is a critical host pathogenicity factor for group A streptococcal infection [J]. *Science*, 2004, 305 (5688): 1283-1286. DOI: 10. 1126/science. 1101245.
- [19] Nookala S, Mukundan S, Fife A, et al. Heterogeneity in FoxP3- and GARP/LAP-expressing T regulatory cells in an HLA class II transgenic murine model of necrotizing soft tissue infections by group A streptococcus [J]. *Infect Immun*, 2018, 86 (12): DOI: 10. 1128/IAI. 00432-18.
- [20] Kemper C, Leung M, Stephensen CB, et al. Membrane cofactor protein (MCP; CD46) expression in transgenic mice [J]. *Clin Exp Immunol*, 2001, 124 (2): 180-189. DOI: 10. 1046/j. 1365-2249. 2001. 01458. x.

(收稿日期 2023-05-02)

(本文编辑:石俊强)