

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2015.01.005

兔组织笼无菌感染模型的制备^{*}

刘树玲 丁 丽 邢 昆

(济宁医学院药学院, 山东 日照 276826)

摘 要 目的 制备兔组织笼无菌感染模型, 为药物药动学—药效学结合模型(pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling, PK-PD)研究提供在体动物实验载体。**方法** 选取健康家兔 28 只, 耳缘静脉注射盐酸赛拉唑注射液 0.15ml/kg 麻醉, 每只分别背部备皮、切开皮肤, 然后在皮下植入长约 5cm 的无菌中空胸腔引流管 1 个, 继而在无菌操作下手术缝合。术后应用青霉素肌肉注射 3d 以预防感染。**结果** 5 只家兔先后因不同原因死亡, 23 只家兔均获得清亮的无菌组织液, 成功建立兔组织模型, 成功率为 82.14%。**结论** 通过严格控制无菌操作, 选择合适的麻醉剂, 手术刀口选择在兔背部, 术后及时预防感染, 可以成功制备兔组织笼无菌感染模型, 并获得清亮的无菌组织液。

关键词 兔组织笼模型; PK-PD; 无菌操作; 组织液

中图分类号: R965.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9760(2015)02-023-03

The preparation of aseptic rabbit tissue cage infection model

LIU Shuling, DING Li, XING Kun

(School of Pharmaceutical Sciences, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

Abstract: Objective To prepare a rabbit tissue cage model so as to provide drug animal carrier in vivo for drug PK-PD modeling study. **Methods** 28 healthy rabbits were selected and injected with the anesthesia xylazine iv respectively. The back hair was cut in each rabbit, and then the skin was cut open. A 5cm of sterile hollow chest tube drainage was implanted subcutaneously. In the end the wound was sewed up with aseptic technique. After operation penicillin im was injected for 3 days to prevent infection. **Results** Among the 28 rabbits, 5 rabbits were dead due to different causes. Clear and sterile tissue fluid were gotten from other 23 rabbits. A rabbit tissue model was established successfully, and the success rate was 82.14%. **Conclusion** By stricted controlling aseptic operation, selecting the appropriate anesthesia and surgical incision in the back of the rabbit, timely postoperative anti-infection, a rabbit tissue cage model can be successfully established, so does clear tissue fluid.

Keywords: A rabbit tissue cage model; PK-PD modeling; Aseptic technique; Tissue fluid

药动学—药效学结合模型(pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling, PK-PD)是研究药物在体内变化过程与其药效消长关系的一种工具, 其借助数学方法定量表达浓度、时间和效应之间的关系, 对药物的研发和合理使用具有指导意义^[1]。兔组织笼感染模型是近年来刚发展起来的一项用于抗菌药物 PK-PD 研究的新技术^[2]。兔组织笼感染模型建立成功后, 可以通过注射器经管上的小孔反复、较大量地抽取组织液。运用该模型可以通过 1 只动物而完成整个研究过程, 与传统感染模型相

比^[3-4], 不仅避免了分批处死动物所带来的误差, 而且还可以用于分析组织液内的药物浓度与组织液内病原菌之间的关系, 非常适合用于抗菌药物疗效的观察。因此, 该模型是一个较好的研究抗菌药物的 PK-PD 动物模型。为探究该模型制备的可行性, 我们进行了兔组织笼模型的实验研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物

普通家兔, 由济宁医学院实验动物中心提供, 普通饮食。

1.2 药品与器械

1.2.1 药品 戊巴比妥钠(美国 Sigma 公司); 尼

^{*} [基金项目] 2010 年山东省自然科学基金项目(编号: ZR2010BL031); 2013 年济宁医学院基金项目(编号: JY2013KJ011)

可刹米注射液(吉林省华牧动物保健品有限公司);盐酸赛拉嗪注射液(吉林省华牧动物保健品有限公司);盐酸利多卡因(山东圣鲁制药有限公司);注射用青霉素钠(山东鲁抗医药股份有限公司);碘伏(山东利尔康消毒科技有限公司);地克朱利溶液(江西博莱大药厂)。

1.2.2 仪器 立式压力蒸汽灭菌器(上海三申医疗器械有限公司);SW-CJ-2FD型双人单面净化工作台(苏州净化设备有限公司)。

1.3 模型制备

1.3.1 预实验 实验开始前先将实验中所有用到的手术器械预先高压消毒(121.3°C , 25min)并干燥后备用(下同),随机选取健康家兔1只,称重、背部备皮后固定于兔台上,耳缘静脉注射戊巴比妥钠麻醉后进行手术,术后3h后仍未见苏醒,证明采用戊巴比妥钠麻醉剂效果不理想。

又随机选取健康家兔1只,手术操作同上,耳缘静脉注射盐酸赛拉嗪注射液 0.05ml/kg 麻醉(即参照说明书给予肌肉注射剂量的 $1/3$),家兔间歇性抽搐20min左右,达到麻醉效果,但麻醉时间较长。

另随机选取健康家兔1只,手术操作同上,采用肌肉注射盐酸赛拉嗪注射液 0.15ml/kg 麻醉,5min后突然间歇性抽搐持续20min,家兔麻醉后手术,术后肌肉注射尼克刹米注射液,15min后家兔苏醒。因此,肌肉注射麻醉剂盐酸赛拉嗪注射液后效果比戊巴比妥钠好,但需要较长的诱导时间。由以上预实验可知麻醉剂盐酸赛拉嗪注射液给药方式与剂量不易控制,其麻醉效果不理想,需考虑选择其他麻醉剂。

1.3.2 兔组织笼无菌感染模型的制备 选取健康家兔28只,称重、背部备皮后固定于兔手术台上,耳缘静脉注射盐酸赛拉嗪注射液 0.15ml/kg 麻醉,家兔立即出现四肢肌肉松软,瞳孔扩大,角膜反射消失,昏迷逐渐加深,呼吸减慢变浅,备皮处碘伏消毒后铺无菌洞巾,背部分次两边皮下注射利多卡因,每次 1ml 局部麻醉,用手术刀切开皮肤,钝性分离皮下组织,在皮下植入 5cm 左右的无菌中空胸腔引流管^[5],然后用手术线缝合伤口,碘伏消毒伤口。耳缘静脉注射尼克刹米注射液,2min后家兔苏醒,手术完成后,给家兔带防咬项圈以防止家兔回头破坏手术伤口缝合部位。

术后连续肌肉注射3d青霉素预防家兔感染,并及时观察家兔伤口愈合情况和日常活动状况。2

周后家兔手术伤口愈合,4周后中空管内充满组织液,用无菌注射器抽取无菌胸腔引流管内组织液 0.1ml ,用接种环接种于预先制备好的固体培养基平皿内, 37°C 培养24h后经检验无菌,证明实验家兔组织笼模型建立成功。

2 结果

手术器械预先通过高压消毒以严格控制无菌操作,选择耳缘静脉注射盐酸赛拉嗪注射液 0.15ml/kg 麻醉家兔,手术刀口选择在家兔背部,术后3d连续肌肉注射青霉素预防感染,5只先后因不同原因死亡,23只家兔均获得清亮的无菌组织液,成功建立兔组织模型,成功率为 82.14% 。

3 讨论

3.1 家兔死亡原因分析

实验过程中家兔死亡,其一为麻醉剂致死,通过实验分析发现,肌肉注射所用麻醉诱导时间较长,不适合制备大量兔组织笼模型实验的应用。尝试缩短盐酸赛拉嗪的麻醉时间,选择耳缘静脉注射(剂量为肌肉注射的 $1/3$),但因个体差异影响,剂量不易控制,因此,选用在宠物医院中成熟应用的盐酸赛拉嗪注射液,结果其麻醉效果比戊巴比妥钠和盐酸赛拉嗪好。手术结束后1h,麻醉剂药效会随时间延长而逐渐失效,家兔由于手术伤口产生痛觉,往往会用牙齿咬开术后缝合的伤口(故给家兔带防咬项圈以防止其回头破坏手术伤口缝合部位),尽管已预防用药青霉素,但因伤口再次开裂致其感染死亡。1只家兔在手术后第2天死亡,解剖发现体内无异常,怀疑是个体差异所致。术后发现家兔死亡前1d精神萎靡,身体瘫软,拒绝进食,粪便不成形且伴下体粪便污染,怀疑家兔感染球虫病。用地克朱利溶液预防,用药后家兔未再发生死亡情况。

3.2 兔组织笼无菌感染模型制备的注意事项

首先建立无菌概念,在临床医疗护理操作中,采用防止微生物进入人体组织或其他无菌范围的操作技术称之为无菌操作^[6]。实验中所用手术器械都要经过高温高压消毒灭菌方可使用,以降低动物感染几率。

其次,宜选择合适的麻醉剂,并按照家兔体重和用药方式量取麻醉剂量。戊巴比妥钠对中枢神经系统有广泛抑制作用,随用药剂量的增加而产生镇静、催眠和抗惊厥效应,大剂量时则产生麻醉作

用,作用机制主要与阻断脑干网状结构上行激活系统有关,其麻醉程度较深,不适合兔组织笼模型制备的使用。盐酸赛拉嗪是一种肾上腺素受体激动剂,与中枢神经系统突触前膜的受体结合并激动受体,从而抑制突触前膜去甲肾上腺素的释放,具有强效镇静、镇痛及中枢性肌松作用,因静脉注射起效时间快,适合大规模模型制备使用。尼可刹米对延髓呼吸中枢具有选择性直接兴奋作用,也可作用于颈动脉窦和动脉体化学感受器,反射性兴奋呼吸中枢,提高对缺氧的敏感性,使呼吸加深加快,对大脑皮层,血管运动中枢和脊髓亦有相应的兴奋作用。与盐酸赛拉嗪配合使用,以缩短动物麻醉时间,加快苏醒。

另外,手术刀口应选择在家兔前背部以防止家兔撕咬伤口,缝合伤口时宜先将皮下筋膜缝合,再缝合皮肤,以缩短伤口愈合时间。将 5cm 无菌胸腔引流管植入皮下的过程最为关键。在无菌胸腔引流管植入过程中,家兔皮下组织必须要充分分离,以减少切口张力,还需要注意无菌操作,防止切口及无菌胸腔引流管内组织液的感染^[7]。

通过严格控制无菌操作,选择合适的麻醉剂,手术刀口选择在兔背部,术后及时预防感染,可以

成功建立兔组织模型,并获得清亮的无菌组织液。为进一步的 PK-PD 研究提供实验动物载体。

参考文献:

- [1] 丁莉. 现代药理学研究的新课题—PK-PD 结合模型[J]. 湖北中医杂志, 2006, 28(7): 51-52.
- [2] 崔俊昌, 刘又宁, 王睿等. 左氧氟沙星对兔组织笼金黄色葡萄球菌感染的疗效研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2007, 12(3): 291-294.
- [3] Stein GE. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of newer fluoroquinolones[J]. Clin Infect Dis, 1996, 23(Suppl 1): S19-S24.
- [4] Aminimanizani A, Beringer P, Jelliffe R. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of the newer fluoroquinolone antibacterials[J]. Clin Pharmacokinet, 2001, 40: 169-187.
- [5] 盛美艳, 张芸, 刘明涛, 等. 环丙沙星在兔血液与组织液中的药动学[J]. 中国医药工业杂志, 2010, 41(7): 525-527.
- [6] 李小寒, 尚少梅. 基础护理学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006, 127.
- [7] 崔俊昌, 刘又宁, 王睿杭, 等. 左氧氟沙星对兔组织笼金黄色葡萄球菌感染的疗效研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2007, 12(3): 291-294.

(收稿日期 2014-12-26)

(上接第 7 页)

- [48] Daniels D J, Lenard N R, Etienne C L, et al. Opioid-induced tolerance and dependence in mice is modulated by the distance between pharmacophores in a bivalent ligand series[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(52): 19208-19213.
- [49] Rozenfeld R, Gupta A, Gagnidze K, et al. AT1R-CB1R heteromerization reveals a new mechanism for the pathogenic properties of angiotensin II[J]. EMBO J, 2011, 30(12): 2350-2363.
- [50] Moreno E, Moreno-Delgado D, Navarro G, et al. Cocaine disrupts histamine H3 receptor modulation of dopamine D1 receptor signaling via σ 1 receptor: a key target for cocaine toxicity[J]. J Neurosci, 2014, 34(10): 3545-3558.
- [51] Hasbi A, O'Dowd B F, George S R. Dopamine D1-D2 receptor heteromer signaling pathway in the brain: emerging physiological relevance[J]. Mol Brain, 2011, 4: 26.
- [52] Conn P J, Christopoulos A, Lindsley C W. Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders[J]. Nat Rev Drug Discov, 2009, 8(1): 41-54.
- [53] Orrú M, Quiroz C, Guitart X, et al. Pharmacological evidence for different populations of postsynaptic adenosine A2A receptors in the rat striatum[J]. Neuropharmacology, 2011, 61

(516): 967-974.

- [54] Quiroz C, Luján R, Uchigashima M, et al. Key modulatory role of presynaptic adenosine A2A receptors in cortical neurotransmission to the striatal direct pathway[J]. Scientific World Journal, 2009, 9: 1321-1344.
- [55] Armentero M T, Pinna A, Ferré S, et al. Past, present and future of A(2A) adenosine receptor antagonists in the therapy of Parkinson's disease[J]. Pharmacol Ther, 2011, 132(3): 280-299.
- [56] Justinová Z, Ferré S, Redhi G H, et al. Reinforcing and neurochemical effects of cannabinoid, CB1 receptor agonists, but not cocaine, are altered by an adenosine A2A receptor antagonist[J]. Addict Biol, 2011, 16(3): 405-415.
- [57] Chen X, Bai B, Chen J, et al. Identification of serine 348 on the apelin receptor as a novel regulatory phosphorylation site in apelin-13-induced G protein-independent biased signaling[J]. J Biol Chem, 2014, 289(45): 31173-31187.
- [58] Bai B, Jiang Y, Chen J, et al. Dynamics of apelin receptor/G protein coupling in living cells[J]. Exp Cell Res, 2014, 328(2): 401-409.

(收稿日期 2015-03-10)