

• 标准与指南 •

脓毒症临床前研究最低质量标准 (MQTiPSS): 基于感染类型和器官功能障碍终点的质量标准(全译)

王丽雪¹ 任超¹ 姚人骐¹ 肖献忠² 姚咏明¹

¹解放军总医院第四医学中心创伤研究中心,北京 100048;²中南大学基础医学院病理生理学系,脓毒症转化医学湖南省重点实验室,长沙 410078

通信作者:姚咏明,Email:c_ff@sina.com;肖献忠,Email:xiaoxianzhong@csu.edu.cn

脓毒症临床前研究最低质量标准(MQTiPSS):基于感染类型和器官功能障碍终点的质量标准最初发表于 *Shock*, 2019, 51(1): 23–32. DOI: 10.1097/SHK.0000000000001242.

2019 版权归休克学会所有。本文在休克学会的许可下翻译并转载,休克学会不对翻译的准确性负责。

【摘要】 虽然脓毒症的临床定义和推荐治疗指南在定期更新,但对脓毒症的临床前模型尚无系统综述。为了弥补这一缺陷,韦格斯-伯纳德会议的与会人员对 260 篇关于脓毒症模型的高被引科研论文(2003 至 2012 年)进行了文献综述,并提出了一套指南。本报告的第二部分为针对脓毒症临床前模型的感染类型和器官损伤类型提出的建议。在感染类型方面,本综述纳入的研究中 44% 采用盲肠结扎穿孔术(CLP)模型,40% 采用内毒素注射模型。推荐 8(按指南第一部分顺序编号):内毒素注射不是复制脓毒症模型的合适方法;从临床分离物中提取的活菌或真菌菌株更为合适。推荐 9:尽可能使用人体脓毒症中常见的微生物复制脓毒症模型。脓毒症 3.0 定义指出,脓毒症是由宿主对感染反应失调所致危及生命的器官功能障碍,但本综述对器官功能障碍的描述很有限。推荐 10:在临床前模型中应该使用器官功能障碍的定义。推荐 11:并非某一器官/系统的所有功能活动异常才能诊断为器官功能障碍。推荐 12:应采用客观的可重复评分系统来评估器官功能障碍。推荐 13:并非所有实验都必须检测器官功能障碍的全部指标,但是研究者应尽可能多地收集相关信息。这些推荐意见被认为是脓毒症动物模型的“最佳实践”指南。

【关键词】 急性肾损伤; 急性肺损伤; 动物模型; 内毒素

基金项目: 国家自然科学基金(81730057, 81801935, 81842025, 81671895)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.10.002

Minimum quality threshold in preclinical sepsis studies (MQTiPSS): quality threshold for types of infections and organ dysfunction endpoints

Wang Lixue¹, Ren Chao¹, Yao Renqi¹, Xiao Xianzhong², Yao Yongming¹

¹Trauma Research Center, Fourth Medical Center of the Chinese PLA General Hospital, Beijing 100048, China; ²Sepsis Translational Medicine Key Laboratory of Hunan Province, Department of Pathophysiology, School of Basic Medicine Science, Central South University, Changsha 410078, Hunan, China

Corresponding author: Yao Yongming, Email: c_ff@sina.com; Xiao Xianzhong, Email: xiaoxianzhong@csu.edu.cn

Originally published as: minimum quality threshold in preclinical sepsis studies (MQTiPSS): quality threshold for types of infections and organ dysfunction endpoints. *Shock*, 2019, 51(1): 23–32. DOI: 10.1097/SHK.0000000000001242.

Copyright © 2019 by the Shock Society. Translated and republished with the permission of the Shock Society. The Shock Society is not responsible for the accuracy of the translation.

【Abstract】 Although the clinical definitions of sepsis and recommended treatments are regularly updated, a systematic review has not been done for preclinical models. To address this deficit, a Wiggers-Bernard Conference on preclinical sepsis modeling reviewed the 260 most highly cited papers between 2003 and 2012 using sepsis models to create a series of recommendations. This Part II report provides recommendations for the types of infections and documentation of organ injury in preclinical sepsis models. Concerning the types of infections, the review showed that the cecal ligation and puncture model was used for 44% of the studies while 40% injected endotoxin. Recommendation #8 (numbered sequentially from Part I): endotoxin injection should not be considered as a model of sepsis; live bacteria or fungal strains derived from clinical isolates are more appropriate. Recommendation #9: microorganisms should replicate those typically found in human sepsis. Sepsis-3 states that sepsis is life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection, but the review of the papers showed limited attempts to document organ dysfunction. Recommendation #10: organ dysfunction definitions should be used in preclinical models. Recommendation #11: not all activities in an organ/system need to be abnormal to verify organ dysfunction. Recommendation #12: organ dysfunction should be measured in an objective manner using reproducible scoring systems. Recommendation #13: not all experiments must measure all parameters of organ dysfunction, but investigators should attempt to fully capture as

much information as possible. These recommendations are proposed as "best practices" for animal models of sepsis.

【Key words】 Acute kidney injury; Acute lung injury; Animal model; Endotoxin

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81730057, 81801935, 81842025, 81671895)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.10.002

1 概述

脓毒症临床前模型在诱发脓毒症的病原体类型、感染部位以及如何量化器官损伤等方面存在较大差异。这种差异导致不同研究结果之间的比较较为困难。2017 年的一篇综述强调了使用不同病原体和感染源诱导脓毒症临床前模型的必要性^[1]。虽然本文没有提出一个通用的、标准化的感染模型,但提倡对两个特定内容制定标准:其一涉及感染类型,包括病原体和感染部位;其二包括器官损伤的检测,在临床前模型中应用新的脓毒症 3.0 来定义脓毒症^[2]。2018 年的一篇文献指出单一模型不足以囊括脓毒症的异质性,这为建立标准化脓毒症模型提供了科学前提^[3]。

为了解决上述问题,2017 年 5 月在维也纳召开了一次关于脓毒症临床前建模的韦格斯-伯纳德会议。该会议的目的是明确脓毒症临床前模型的局限性,并为提高脓毒症模型的转化价值而提出一套指南,该指南被定义为“脓毒症临床前研究的最低质量标准(minimum quality threshold in pre-clinical sepsis studies, MQTiPSS)”^[4-7]。会议之前,与会者对 2003 至 2012 年发表的文献进行了一次综述。6 个专题工作组(WGs)确定了 260 篇关于脓毒症模型的高被引科研论文,并将其作为会议讨论的基础。为了能有充分的时间对文献进行引用参考,与会者选择了 2003 至 2012 年的时间周期。该会议认为高被引的研究论文可提供动物模型的基本信息,实际上,这些文章被认为是最重要的“群体智慧”。260 篇论文他引量共计超过 29 000 次,表明这种方法的有效性。通过对脓毒症临床前模型文献分析,提示在脓毒症研究中感染模型和器官功能障碍评估方案仍存在许多不足。

韦格斯-伯纳德会议共发表了 3 篇联合文章^[5-7],并将其作为 MQTiPSS 指南,即建立脓毒症模型的基本条件以提高临床转化相关性。指南的第二部分对脓毒症临床前模型的感染部位和类型以及器官损伤终结点提出了具体建议。该会议的主要目的是为今后科学研究建立质量标准,从而使模型的研究结果更适用于临床,不同实验室之间、物种之间的研究具有更大的可比性。

2 方法

韦格斯-伯纳德会议是以休克、脓毒症和器官衰竭为主题,由奥地利维也纳 AUVA 研究中心(LBI 创伤)的路德维希·玻尔兹曼实验和临床创伤学研究所为各国学者搭建的一个学术交流平台(<http://trauma.lbg.ac.at/en>)。该会议是以两位杰出的科学家命名的,一位是来自“新世界”的 Carl Wiggers 博士,另一位是来自“旧世界”的 Claude Bernard 博士,他们终身致力于危重症医学和实验科学研究。LBI 创伤主要负责会议主题的选择,而奥地利休克和组织工程研究促进会主要为会议提供赞助。

为了弥补脓毒症临床前研究在管理指南和标准化方面

的缺陷,LBI 创伤于 2017 年 5 月在维也纳组织了一次韦格斯-伯纳德会议,其主题为“脓毒症临床前建模:交换意见并形成建议”。此次会议的主要目标是确定和发布既能被临床前脓毒症研究所囊括又符合 MQTiPSS 定义的基本要素^[8]。根据专家们在基础、临床和转化研究方面的经验,邀请了来自 13 个国家的 31 名专家(包括 5 名脓毒症 3.0 定义工作组的成员^[2])参加了该倡议。

该倡议由 3 个阶段组成:首先,在为期 3 个月的筹备阶段,与会者系统综述了 2003 至 2012 年 260 篇高被引脓毒症临床前研究论文,并确定了有待讨论的关键建模主题。其次,与会者在为期 2 d 的韦格斯-伯纳德会议上进行了关于脓毒症临床前模型的讨论,最终就提议的要点起草了一份指南,并在会后进一步完善与细化。

在筹备阶段,使用 ISI Web of Knowledge 数据库进行文献检索(检索词为“脓毒症模型”),共筛选出包含 374 项动物研究的 260 篇高被引研究论文(被引频次范围 50~743 次,他引共计超过 29 000 次)。从 2003 年开始,时间跨度主观界定为连续 10 年,因为 2003 年是脓毒症 2.0 定义提出的一年^[2]。本文包含与主题相关的研究结果见表 1~2。第一项分析显示,在 2003 至 2012 年的科研论文中,79% 的研究使用小鼠为研究对象;因此进行了第二次较小规模的调研,检索了 2013 至 2017 年只使用小鼠脓毒症模型(在 PubMed 中检索词为“脓毒症 AND 小鼠”)的所有研究(共 190 篇;不计被引频次);并与 2003 至 2012 年间主要文献综述的结局指标进行比较。总之,筹备阶段旨在确定脓毒症动物模型中最重要的概念,并将其在维也纳韦格斯-伯纳德会议上讨论。所有与会专家被分为 6 个专题工作组:研究设计、人道建模、感染类型、器官衰竭/功能障碍、液体复苏和抗菌药物治疗。这两项分析结果在会议期间均被采纳。

在会议阶段,每个专题工作组分别起草了一份指南,作为工作组讨论和完善或不予进一步审议的基础(第 1 天)。修订后,所有与会者对提议的要点进行表决,以达成共识(第 2 天)。韦格斯-伯纳德会议的与会专家共对 29 个要点达成了共识,其中包括 20 项“推荐”强度和 9 项“考虑”强度(工作组 3 和工作组 4 的要点列于表 3~4)。按照脓毒症 3.0 定义工作组采用的形式^[2],即任何提议要点都需要至少 2/3(超过 65%)的与会者赞同才能批准。所有共识要点均需达成一致,或不超过 2 票弃权(即推荐 8)。“推荐”强度实际上表示 31 位与会者在内容和实施的需求上几乎一致同意;而“考虑”强度是指在最终“推荐”前还需要进一步讨论的问题。

在会议后阶段,工作重点是确定 MQTiPSS 共识的“推荐”及“考虑”要点。这项任务主要是通过改良的德尔菲法在工作组成员间进行电话会议和基于电子通讯讨论来完成的。最后,著作委员会(在会议上成立)与所有与会者共同制定

表 1 脓毒症模型的感染类型终点 (2003 至 2012 年)

脓毒症最初 感染类型	实验 (项)	特异性 病原体	实验 (项)
CLP	134	大肠杆菌	33
LPS/E i.v.	125	铜绿假单胞菌	19
LPS/ 细菌 i.p.	49	肺炎链球菌	13
2-hit	22	金黄色葡萄球菌	6
肺炎	20	炭疽芽孢杆菌	5
P/FP	6	肺炎克雷伯菌	4
CASP	5	单核细胞增生李斯特菌	3
细菌 s.c.	2	鼠伤寒沙门杆菌	3
尿源性脓毒症	1	B 组链球菌	3
细菌 p.o.	1	A 组链球菌	2
黏膜源性细菌	1	肠炎沙门菌	2
尿道源性细菌	1	鲍曼不动杆菌	2
胆管源性细菌	1	白色念珠菌	2
鼻内细菌	1	乳糖奈瑟球菌	2
疟疾 i.p.	1	脑膜炎奈瑟球菌	2
经导管真菌血症	1	疟原虫	2
细菌 (未定义) inj.	3	奇异变形杆菌	1
		猪沙门菌	1
		伯克菌	1
		肠道沙门菌	1
		烟曲菌	1
		枯草芽孢杆菌	1
		鼠柠檬酸杆菌	1
		多微生物 (未定义)	2

注:整理的数据来源于经 ISI Web of Knowledge 数据库检索(检索词为“脓毒症模型”)并综述的 260 篇高被引科研论文(包括 374 项动物实验);CLP 为盲肠结扎穿孔术;LPS/E i.v. 为静脉注射脂多糖(LPS);i.p. 为腹腔内;2-hit 为二次打击,至少两种不同的攻击出现在一种脓毒症模型中;P/FP 为颗粒和(或)粪便/纤维蛋白腹膜炎;CASP 为升结肠支架置入腹膜炎;s.c. 为皮下;p.o. 为口服;inj. 为注射

表 2 脓毒症模型中器官衰竭 / 功能障碍终点 (2003 至 2012 年)

器官损伤 / 实验 功能障碍研究 (项)	特殊器官 / 系统研究 (项)	实验 (项)	临床评分 系统 (项)	实验 (项)	形态学 研究 (项)
是	204	肺	77	应用	10
单器官	116	肝脏	62	未应用	364
多器官	88	淋巴细胞	57		
不是	170	肾脏	48		
		脾脏	29		
		肠	23		
		心脏	22		
		凝血系统	20		
		中枢神经系统 / 脑	12		
		肌肉组织	6		
		线粒体	5		
		血管 / 内皮	4		
		胰腺	3		
		代谢	3		
		皮肤	3		
		肾上腺	1		
		胸腺	1		
		甲状腺	1		
		膈膜	1		

注:整理的数据来源于经 ISI Web of Knowledge 数据库检索(检索词为“脓毒症模型”)并综述的 260 篇高被引科研论文(包括 374 项动物实验)

表 3 脓毒症临床前研究最低质量标准 (MQTiPSS) 中感染类型终点工作组的“推荐”及“考虑”共识要点

工作组	要点	推荐 / 考虑强度
感染类型 (工作组 3)	⑧ 我们认为脂多糖 (LPS) 攻击不是复制人类脓毒症的合适模型	R
	⑨ 推荐优先使用人体脓毒症中常见的微生物复制动物模型	
	e. 考虑建立腹腔以外部位 (如肺、泌尿道、脑) 发生的脓毒症模型	C

注:R 代表推荐强度,C 代表考虑强度

表 4 脓毒症临床前研究最低质量标准 (MQTiPSS) 中器官衰竭 / 功能障碍终点工作组的“推荐”及“考虑”共识要点

工作组	要点	推荐 / 考虑强度
器官衰竭 / 功能障碍 (工作组 4)	⑩ 器官 / 系统功能障碍是指基于客观证据,该器官 / 系统出现了危及生命的异常改变	R
	⑪ 某个器官 / 系统发生功能障碍时,并不指其所有功能活动都出现异常	
	⑫ 为确定器官 / 系统功能障碍严重程度的客观证据,需要开发、验证并使用评分系统,或使用现有的评分系统	
	⑬ 并非所有实验都必须检测器官功能障碍的全部指标,但动物模型应得到充分利用	
	f. 避免低血糖	C

注:R 代表推荐强度,C 代表考虑强度

MQTiPSS 的执行摘要^[4]和 3 篇论文^[5-7]。每篇文章都基于两个相关的工作组;该指南第二部分详细讨论了感染类型和器官衰竭 / 功能障碍终点的指导要点。

3 感染类型

脓毒症 3.0 将人类脓毒症定义为机体对感染反应失调所致危及生命的器官功能障碍^[2]。脓毒性休克被定义为脓毒症的一个特殊类型,其循环、细胞和代谢异常比单纯脓毒症具有更高的死亡风险^[2]。因此,感染的存在是脓毒症发生发展的决定性因素之一。脓毒症通常为细菌感染,最常见于肺部、腹膜或泌尿生殖系统^[9]。因此,当复制人类脓毒症的动物模型时,细菌感染最为合适且优于细菌成分如细胞壁成分等。该会议仔细综述了脓毒症临床前模型的高被引论文,以确定所采用的感染类型(表 1)。分析结果显示,大多数研究采用盲肠结扎穿孔术 (CLP) 模型 (44%)、脂多糖 (LPS) 诱导模型 (40%) 和单一感染模型如肺炎 (16%)。随后,通过对 2013 至 2017 年的 190 项小鼠脓毒症研究进行了小规模综述,发现 64% 的研究采用了 CLP 模型,而 LPS 攻击是第二类常见模型,占 23% (均为单一和二次打击的组合)。在本文中,CLP 模型的广泛应用显而易见,但不提倡大量应用 LPS 制作脓毒症模型。此外,使用器官特异性脓毒症模型(肺、泌尿生殖系统、血流)研究相对较少,因此工作组提出了一项具体建议。CLP 所致脓毒症模型简单且可行,尤其是与复苏、抗菌药物和感染负荷控制相结合的模型效果更佳^[10-11]。肠道菌群所致模型可能处于或不处于非生物状态^[12]。该模型复制了人类脓毒症的某些但非全部特征(如一些研究中不包含急性肺损伤^[13])。

特定的感染模型可能会提供更多的信息,因为它们考虑了病原体的剂量、感染途径的选择以及细菌菌株的种类。并非所有的动物都对指定的细菌菌株具有相同的敏感性,所以某些细菌种类和菌株仅适用于特定哺乳动物模型^[14]。

需仔细考虑细菌菌株的选择。虽然从新生儿、小儿和成人脓毒症患者中分离的细菌不尽相同,但是在临床分离物中常发现许多相同的种类。它们包括革兰阴性菌,如大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、脆弱类杆菌,以及革兰阳性菌,如肺炎链球菌、化脓性链球菌和金黄色葡萄球菌。采用这些细菌感染复制脓毒症动物模型是一个合理的选择。人们应该意识到,某一物种有许多菌株可供研究者使用;然而,与临床分离的菌株相比,这些菌株在其毒力^[15]、形成生物膜的能力以及抗菌药物耐药性等方面可能存在明显差异^[16-17]。因此,只要这些细菌具有稳定的特征和较高的种群纯度,对脓毒症患者的细菌分离株进行研究就是一个不错的选择。当然,感染途径也很重要,这取决于具体的研究方向,但同时也应遵循简单的概念,例如,使用肺炎患者肺部细菌来感染动物。

感染类型的具体推荐:本次会议讨论了脓毒症临床前模型的几项具体推荐。下列来自感染类型工作组的推荐和考虑因素以前一篇文章,即第一部分开始连续编号,并从推荐 8 开始。

推荐 8: 推荐 LPS 攻击不是复制人类脓毒症的合适模型

LPS 是现代医学史上研究最多的细菌成分之一^[17],它来源于革兰阴性菌细胞壁,具有许多细菌种类依赖的变异性。该毒素价格低廉,甚至可放心由初级研究人员使用。多种哺乳动物对 LPS 反应强且迅速,并在病理生理反应(大剂量攻击后心动过速、发热、循环衰竭)以及生化改变(白细胞增多、细胞因子释放)等方面都具有明确特征。此外,LPS 诱导的反应具有高度可重复性,为干预措施评估提供了一个明确而稳定的观察方法^[18]。然而,脓毒症是一个具有高致死率的临床综合征,其病理生理学特征复杂,演变过程需要几天而不是几小时。多个共识会议的召开旨在为人类脓毒症制定一个合理、具有诊断功能的“伞式”定义。值得注意的是,1992 年会议明确指出脓毒症可由多种致病菌引起,包括细菌、寄生虫、真菌或病毒,提示 LPS 作为疾病发生主要诱因的误导性假设^[19]。

除此之外,LPS 攻击的广泛应用归因于它模拟了脓毒症的一些急性临床特征,包括全身炎症反应综合征(SIRS,如发热、白细胞增多、细胞因子释放)。通过对脓毒症动物模型的高被引文献的分析显示,40% 的研究使用了 LPS(表 1)。然而目前的证据清楚地表明,鉴于脓毒症表型与由 LPS 诱导的表型之间存在显著差异,故不应将 LPS 攻击作为可接受的脓毒症模型。例如,LPS 诱发强且迅速的炎症反应特征与 CLP 模型中细胞因子缓慢及长期释放的特点明显不同^[20]。研究表明,抗肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 治疗对 LPS 攻击模型有效,而对 CLP 小鼠模型无明显作用^[21]。此外,通过比较低剂量注射 LPS 的健康志愿者^[22-23]与严重脓毒症患者^[24-25]

中 TNF- α 释放规律,发现后者 TNF- α 峰值水平从未超过前者。“持续性危重病”这种新表型的出现^[26-27],进一步否定了基于(急性)LPS 方案的转化有效性。研究仅能提示,脓毒症早期反应的某些特点可通过 LPS 攻击来复制。

然而,仍有研究应用 LPS 构建脓毒症模型。由于时间、经费和对临床脓毒症了解有限,研究人员可能继续使用 LPS 复制模型,理由是至少有一些革兰阴性菌感染所致脓毒症患者血中 LPS 水平升高^[28],且 LPS 暴露是该疾病的重要原因。生物体对 LPS 的敏感性存在明显差异^[29],人类对 LPS 非常敏感。可将接受 LPS 刺激的数据作为参考,因为这类研究与脓毒症前 24 h 反应相似。然而,需要指出的是,LPS 诱发脓毒症得到的任何结论向临床脓毒症患者转化可能存在不可避免的局限性。

推荐 9: 推荐优先使用人体脓毒症中常见微生物复制动物模型

1866 年,Coze 和 Feltz^[30]第一次证明脓毒症患者血液中细菌可以感染家兔并使其死亡,这为将临床分离物用于临床前研究提供了一个实例。目前,许多研究人员使用实验室菌株而非临床分离菌株进行研究。采用这些实验室菌株进行的研究并没有考虑基因毒力^[15]和日趋恶化的抗菌药物耐药性^[31],这些因素很大程度上影响了脓毒症的严重程度和结局^[17, 32]。长期传代的实验室菌株(如大肠杆菌 K12 和铜绿假单胞菌 PAO1)可能失去重要的病理生理特性,进而不能反映“真实情况”的发病机制^[33]。由于特定的生长条件,细菌基因组在体外连续传代过程中不断进化,可能变得无毒^[33]。实验室菌株逐渐丧失生物膜形成能力,降低了它们的致病力和抗菌药物耐药性^[34]。此外,毒力菌株和普通实验室菌株主要表现出代谢组学的差异^[35],结合宿主蛋白能力不同,并能产生外毒素和毒力因子。例如,与临床分离菌制备的 LPS 相比,实验室革兰阴性菌 LPS 可能被修饰进而产生低活力相关的去乙酰化作用^[36]。值得注意的是,对细菌进行浮游和生物膜培养也可能导致内毒素活性改变^[37]。另一个不可忽视的重要因素是,在脓毒症患者中观察到病毒再激活^[38],已有研究报道无症状病毒感染和微生物产物之间存在协同效应^[39-40]。

然而,不同病原体所致脓毒症临床前模型不应完全忽视。在一些案例中,与患者相比,不同的病原体可在动物中产生相似的疾病表型。例如,由柠檬酸杆菌属感染引起的动物肾脏疾病与人类大肠杆菌产生的志贺毒素引起的肾脏疾病是完全相同的。同样,C57BL/6 小鼠体内伯氏疟原虫 ANKA 也能部分复制恶性疟原虫引起的人脑疟疾。

考虑(e): 考虑建立腹腔以外部位(如肺、泌尿道、脑)发生的脓毒症模型

脓毒症可由机体不同部位的感染引起。在过去的 20 年中,人类感染的部位基本保持不变,最常见的是肺,其次是腹腔、尿路和软组织^[41-42]。约 60% 的脓毒症临床前模型来自腹腔感染,这与临床数据形成鲜明对比(表 1)。因此,CLP 和结肠支架腹膜炎或单纯微生物处理包括腹腔内或者

静脉直接注射细菌诱导多微生物模型是常用的方法^[42-43]。尽管这些模型提供了重要的信息,但腹膜炎模型并不能复制患者最常见部位(肺)的感染,在之前文章中已解决了这一问题^[10, 44]。

基于流行病学的临床数据,我们认为多种临床前模型适用于脓毒症的研究。具体的模型应尽量反映临床实际,以明确机体特定部位的相关途径和病理生理改变。深入了解稳态失调机制将有助于探讨更适合的治疗干预措施^[1]。由肺炎链球菌、肺炎克雷伯菌或铜绿假单胞菌等致病菌导致肺部感染引起的脓毒症模型与临床的相关性最为密切^[44],可用于鉴别不同的特征。同样,尿路感染^[45]或软组织感染^[46](如 A 组链球菌)模型也可提供有价值的信息。使用不同感染部位诱导的模型将有助于认识脓毒症感染的自然进程。

4 器官衰竭及功能障碍

2016 年提出的脓毒症 3.0 将脓毒症定义为机体对感染反应失调而导致危及生命的器官功能障碍^[2]。这一定义为临床前研究包括器官功能障碍评估提供了必要条件。在脓毒症研究中监测器官功能障碍可为深入了解脓毒症的发病机制提供依据。如果脓毒症中某一特定通路的功能失调与器官功能障碍之间存在既定的因果关系,那么该通路在脓毒症中的意义将更为重要。与会者仔细分析了这些高被引论文是否记录了器官功能障碍,以及是否使用了器官损伤评分系统。然而,许多有关脓毒症的高被引文献没有检测器官功能障碍。如表 2 所示,在高被引的 260 篇文献中,只有 204 篇(即不到 60%)测量了某一方面的器官功能障碍。在这 204 篇文献中,只有 10 篇使用评分系统量化器官损伤程度,如快速序贯器官衰竭评分(qSOFA)^[47]。具体来讲,77 篇脓毒症模型文献中观察了肺损伤,但不到一半的文献(23/77)仅部分检测了肺功能,如支气管肺泡灌洗液的内容物。美国胸科学会已发布过动物急性肺损伤评估指南^[48],所以衡量急性肺损伤的标准和方法有据可依。在表 2 中 48 篇文献对肾脏进行了研究,却没有检测肌酐水平;而肌酐是肾危险性损伤、肾功能丧失和终末期肾病评分系统中的一个重要指标^[49]。使用与患者类似的临床评分系统将是一个合理的开端,但需要进行修改,以便准确地反映实验动物的器官功能障碍。未检测器官功能障碍意味着失去了研究脓毒症模型中器官是否受损的机会。此外,了解器官功能障碍是一项重要的科学方法,有助于提高实验的严谨性^[50]。

器官衰竭/功能障碍的具体建议:由器官衰竭/功能障碍终点工作小组提出的建议是在感染类型建议后依次编号,并从推荐 10 开始。

推荐 10:器官/系统功能障碍是指基于客观证据,该器官/系统出现了危及生命的异常改变

器官功能障碍是指对潜在有害危险信号或病原体的不良反应。重要的是,脓毒症引起的器官功能障碍与为减轻机体损伤的适应性反应有着本质的区别。有必要为机体器官系统的功能障碍制定客观的、易测量的标准,并将这些标准作为结果变量。

脓毒症的临床和实验研究主要集中在两个结局指标:存活率和(或)生物标志物^[51-54]。在实验动物中,生物标志物通常是衡量免疫功能的指标,如细胞因子水平^[55]、白细胞介素-6(IL-6)水平^[56-57]或白细胞计数(WBC)。人类生物标志物通常由一般检查如生命体征或标准实验室检测(如 WBC)组成。例如,SIRS 的诊断标准包括体温、心率、呼吸频率和 WBC^[19, 58-59]。脓毒症 3.0 定义临床标准将重点转向器官功能障碍,使其成为定义脓毒症的两个基本特征之一^[2]。然而,用以评估器官功能障碍的方法尚不成熟,特异性不高。例如,脓毒症 3.0 定义工作小组使用具有全球“器官功能障碍”代表性的序贯器官衰竭评分(SOFA)评估^[60],其为具有预后评估价值的临床综合指标^[61]。然而,工作小组发现 SOFA 评估要点仅与指定的器官系统有关,并没有明确某一器官的功能障碍。随后,工作小组还建议衍生一个更新工具^[2]。人类研究由于缺乏明确鉴别脓毒症的“金标准”而进一步受阻;因而使用具有结局(预测病死率)或结构(识别具有“外观类似”脓毒症特征的患者,如难治性肺损伤)等有效性的指标来识别脓毒症患者^[62-63]。因为感染和脓毒症都是已知存在的,动物研究减少了使用结果来识别脓毒症的必要性。因此,临床前模型可以用来确定器官功能障碍的潜在可转化标准。动物实验除了评估干预措施对脓毒症存活率和远期预后的影响外,还了解器官功能障碍提供了契机,而器官功能障碍是目前临床诊断脓毒症所必需的。

推荐 11:某个器官/系统发生功能障碍时,并不指其所有功能活动都出现异常

自 1973 年 Tilney 等^[63]首次提出综合征的概念以来,临床研究一直在解决急性疾病进展为多器官功能障碍综合征(MODS)和器官功能障碍的模式,但是许多动物实验只观察了存活率。然而,量化常规标志物(血小板、肌酐、胆红素等)以评估器官功能障碍是可行的,类似于 SOFA 评分^[64-67],即使在啮齿类动物研究中亦如此。如果使用传统的生化指标来描述器官功能障碍,它们常被作为单一终点评估,而不像临床 SOFA 评分(SOFA 中的 S)。动物实验缺乏与 SOFA 评分类似的有效和标准化标志物。

器官损伤的传统指标(血小板、肌酐、胆红素等)对量化评估细胞和组织损伤有一定帮助,进而深入了解器官特异性功能障碍程度。研究人员利用组织学、免疫组化和其他方式来检测组织损伤,对器官功能完整性进行深入分析。这些技术可评估功能障碍的严重程度,并进一步探讨其损伤模式,如坏死——不是各种形式的程序性细胞死亡^[68-70]。此外,这些技术可提供损伤的空间分布情况。“逆向转化”的选择,即比较动物模型中组织损伤的模式及严重程度,使常规临床标志物在揭示治疗干预措施的有效性时更有用^[65-66, 69]。有趣的是,与存活 CLP 小鼠相比,致死性 CLP 小鼠的器官功能障碍参数变化更大,但从未超过 CLP 合并顺铂或四氯化碳诱导的非致死性肝毒性和肾毒性存活小鼠的参数变化^[71]。换句话说,非致死性因素诱导的器官损伤模型比致死性脓毒症小鼠模型所致器官损伤更为显著。鉴于心血管系统在器官

衰竭中的重要地位,有望使用无线生物监测技术对临床和血流动力学参数进行纵向评估^[72-73]。在小鼠 CLP 模型中,可用遥测技术来定义和验证模拟人类脓毒症急性恶化研究的标准^[73]。此外,在小动物模型中,即使是肝、肾等内脏器官,应用活体显微镜技术也可评价超出大体血流动力学评估范围的微循环障碍^[67]。从患者层面推断,单个器官功能下降与宿主反应失调相一致,尽管实验资料表明大部分组织和器官只是轻微改变,可能也需要重症医学科(ICU)特殊的干预措施,如机械通气和心肺支持,以逆转严重 MODS^[74]。

该建议指出,并非某一器官的所有功能都紊乱或异常才称为器官障碍。该项推荐要点的纳入是因为临床前模型为深入研究多个参数的研究奠定了基础。如果要求所有功能均出现异常,那么器官功能障碍的标准会太高。

推荐 12: 为确定器官 / 系统功能障碍严重程度的客观证据,需要开发、验证并使用评分系统,或使用现有的评分系统

当患者的疾病和病理改变涉及单个或多个器官时,如脓毒症、急性肺损伤或严重创伤,可用已开发及验证过的诊断评分系统来反映器官病理状态。评分系统如 SOFA、qSOFA、简明急性生理学评分和急性生理学及慢性健康状况评分 II^[1-2,9],已发展为器官功能评估的标准。这些评分系统在很大程度上为临床医生对器官功能的评估提供了统一的标准。基于该统一标准,能针对患者的病情状况作出诊断,也有助于作出临床决策。为便于这类疾病的研究,已成立器官功能障碍数据库。与之相似,为了便于研究成果的共享,应该开发脓毒症动物实验模型的评分系统。这些评分系统与临床患者所用的系统类似,包括生化指标、生理指标、血生化、凝血系统状态、形态学(包括大体和微观)和行为学改变。同时也包括基本信息,如年龄、性别、营养状况等^[2,60,75-80]。这些评分系统对严重损伤程度分级尤为实用^[78-79]。目前,临床前研究的评分系统尚未统一应用。因此,仅能通过提供有限的详细数据来详细阐述建立脓毒症模型的“临床”状态^[8,81]。在“脓毒症临床前建模”的第 9 次韦格斯-伯纳德会议上,我们综述了 260 篇脓毒症实验文献,其中包括 374 项对器官功能障碍进行评估的实验研究(表 2)。116 项实验中仅对 1 个器官损伤 / 功能障碍的终点进行了检测,88 项检测了多器官功能障碍终点,而 170 项根本没有报告任何终点。此外,在 374 项实验中,只有 10 项使用了与临床评分系统类似的形式,而其余 364 项没有使用。另外,374 项实验中有 118 项对器官损伤进行了形态学观察,而其他 256 项没有进行。虽然目前大部分研究没有采用器官损伤评分,但器官损伤参数的检测指南已有发布,如美国胸科学会关于实验性急性肺损伤的指南^[48]。这些指南旨在鼓励研究人员采用标准化方法检测肺损伤实验模型中功能障碍指标。测量一组普适的器官损伤指标有利于动物模型之间进行更好的比较分析。如果这些指南存在或能够通过科学共识建立,且不仅是针对单个器官^[76,80],而是在一个系统水平,如啮齿类脓毒症严重程度评分^[82],研究人员应在报道脓毒症动物模型时纳入这类评分系统。

推荐 13: 并非所有实验都必须检测器官功能障碍的全部指标,但动物模型应该得到充分利用

开展脓毒症研究和开发新的治疗措施很大程度上依赖于体内实验。然而,脓毒症模型会对动物造成明显不适、疼痛和痛苦。因此,研究人员应该在预算允许范围内尽可能多地收集信息,从而最大限度地利用这些动物,同时努力减少所需动物的数量。

许多简单的行为学和生理性检查是非侵入性的,且不需精密设备。例如,我们可以较容易获得动物笼中活动情况、体重和直肠温度,并且早前的研究显示这些指标与下丘脑中促炎细胞因子水平相关^[83]。动脉血压、心率、呼吸速率和血氧饱和度等生命体征也可通过非侵入性手段测定^[84]。这些生命体征可用于预测脓毒性休克、交感神经张力增加、代谢性酸中毒和肺分流。此外,研究人员可以应用脓毒症严重程度评分为以后其他变量的相关性分析提供依据^[82]。

建议最大限度地收集样本。例如,如果处死一只动物,应该收集、冷冻并保存血浆或血清,以便后续研究。实验者应对因人道终点或研究结束时安乐死的动物进行尸检,包括外观检查、放血、探查、大体解剖、称重和保存主要器官,如将心、肺、脾、肠道、肝和肾等保存于固定液中以便后续研究。鉴于某些组织器官需要特定的收集和固定技术,动物尸检应在每次实验之前充分计划^[85-86]。较为理想的是,通过不同领域研究人员之间的合作以改进动物数据和样本的使用。例如,探讨脓毒症相关性肾损伤的实验人员可以与脓毒症相关性肺损伤研究人员分享脓毒症严重程度评分、血氧饱和度和肺组织资料,与脓毒症相关性肠道功能障碍研究者分享体重、血清和肠道组织数据。

值得一提的是,并非所有研究人员都有时间、设备或专业知识来充分界定每个器官的功能障碍。例如,虽然可以在小鼠体内无创测量脉搏血氧饱和度和呼吸频率,但这些检测不能提供类似动脉血气、全身容积图和肺组织学检查等高级别的详细信息。然而,如果某一研究人员主要研究肾脏方面,那么期待其对肺部进行详细研究是不合理的。对研究人员来说,无创测量血氧和呼吸频率更为合理。

考虑(f): 避免低血糖

脓毒症状态下代谢紊乱常造成高血糖,这与脓毒症患者^[87]和脓毒症实验性模型^[88]结局的恶化有关。急性高血糖是指血糖在 8.0~15.0 mmol/L (144~270 mg/dL) 范围内波动^[89-90]。有资料证实,高血糖作为脓毒症发病率和病死率的一个危险标志,可影响脓毒症的严重程度^[91]。高血糖亦是脓症患者采用胰岛素治疗的原因。然而,强化胰岛素治疗与低血糖(血糖<3.9 mmol/L 或<70 mg/dL)发生率的增加密切相关^[92]。两项大型观察性队列研究显示,强化胰岛素治疗使脓毒症成为严重低血糖的重要危险因素^[93-94]。即使是单纯的严重低血糖也会影响脓毒症的严重程度^[95],并显著增加死亡风险。除了高血糖和低血糖,血糖变异性增加也与脓症患者病死率显著上升有关^[95-97]。血糖变异性增加对患者预后影响极大,它使危重病患者病死率增加近 10 倍^[95]。

现有数据表明,血糖水平显著影响脓毒症的结局,故应在临床前模型中加以考虑,尤其是血糖的变异性。如果高血糖和低血糖的影响不在探讨范围内,则可建议将血糖水平保持在正常范围(4.4~6.1 mmol/L 或 79.2~110.0 mg/dL),日变化量既不低于 3.9 mmol/L (70 mg/dL),也不超过 7.8 mmol/L (140 mg/dL)。

然而,脓毒症小鼠的血糖反应与患者不同。CLP 小鼠通常会出现长期和严重的低血糖,而患者常出现高血糖,但啮齿类动物不发生高血糖^[98]。啮齿类动物的低血糖与胰岛素敏感性增高有关,导致在正常胰岛素水平即可出现低血糖^[99]。但即使在低血糖的啮齿类动物中,胰岛素也能减轻炎症反应和多器官功能障碍^[100]。有鉴于此,研究人员应考虑预防脓毒症临床前模型中血糖水平的急剧变化。我们意识到脓毒症患者通常会监测其他参数,如血压、尿量,这些问题在后续的讨论中将进一步解决。

5 结 论

本部分详细介绍了韦格斯-伯纳德会议两个工作组就脓毒症临床前建模提出的“推荐”及“考虑”要点。其目的是通过对脓毒症临床前模型中的高被引学术文分析来确定临床前模型的研究现状。资料分析显示,模型类型以及如何监测动物模型以评估器官损伤存在明显差异。与会者意识到 2016 年脓毒症 3.0 定义强调脓毒症是由于感染引发的器官功能障碍^[2]。工作组针对感染类型和器官功能障碍的监测提出了具体建议。我们希望这些“推荐”及“考虑”有助于推动脓毒症临床前模型的标准化,并最终促进临床前研究的转化。毋庸置疑,基于临床观察和实验研究新观点而产生的新挑战将不断涌现。基础科学家和临床医生的密切合作对深入理解(重新理解)任何现有的和新提出的准则至关重要。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] van der Poll T, van de Veerdonk FL, Scicluna BP, et al. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets [J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17 (7): 407–420. DOI: 10.1038/nri.2017.36.
- [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. DOI: 10.1001/jama.2016.0287.
- [3] Remick DG, Ayala A, Chaudry IH, et al. Premise for standardized sepsis models [J]. *Shock*, 2019, 51 (1): 4–9. DOI: 10.1097/SHK.0000000000001164.
- [4] Osuchowski MF, Ayala A, Bahrami S, et al. Minimum quality threshold in pre-clinical sepsis studies (MQTiPSS): an international expert consensus initiative for improvement of animal modeling in sepsis [J]. *Shock*, 2018, 50 (4): 377–380. DOI: 10.1097/SHK.0000000000001212.
- [5] Zingarelli B, Coopersmith CM, Drechsler S, et al. Part I: minimum quality threshold in preclinical sepsis studies (MQTiPSS) for study design and humane modeling endpoints [J]. *Shock*, 2019, 51 (1): 10–22. DOI: 10.1097/SHK.0000000000001243.
- [6] Libert C, Ayala A, Bauer M, et al. Part II: minimum quality threshold in preclinical sepsis studies (MQTiPSS) for types of infections and organ dysfunction endpoints [J]. *Shock*, 2019, 51 (1): 23–32. DOI: 10.1097/SHK.0000000000001242.
- [7] Hellman J, Bahrami S, Boros M, et al. Part III: minimum quality threshold in preclinical sepsis studies (MQTiPSS) for fluid resuscitation and antimicrobial therapy endpoints [J]. *Shock*, 2019, 51 (1): 33–43. DOI: 10.1097/SHK.0000000000001209.
- [8] Osuchowski MF, Thiemermann C, Remick DG. Sepsis-3 on the block: what does it mean for preclinical sepsis modeling? [J]. *Shock*, 2017, 47 (5): 658–660. DOI: 10.1097/SHK.0000000000000775.
- [9] Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock [J]. *N Engl J Med*, 2013, 369 (21): 2063. DOI: 10.1056/NEJMc1312359.
- [10] DeJager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, et al. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? [J]. *Trends Microbiol*, 2011, 19 (4): 198–208. DOI: 10.1016/j.tim.2011.01.001.
- [11] Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, et al. Cecal ligation and puncture [J]. *Shock*, 2005, 24 Suppl 1: 52–57. DOI: 10.1097/01.shk.0000191414.94461.7e.
- [12] Lankelma JM, van Vught LA, Belzer C, et al. Critically ill patients demonstrate large interpersonal variation in intestinal microbiota dysregulation: a pilot study [J]. *Intensive Care Med*, 2017, 43 (1): 59–68. DOI: 10.1007/s00134-016-4613-z.
- [13] Iskander KN, Craciun FL, Stepien DM, et al. Cecal ligation and puncture-induced murine sepsis does not cause lung injury [J]. *Crit Care Med*, 2013, 41 (1): 159–170. DOI: 10.1097/CCM.0b013e3182676322.
- [14] Warren HS, Fitting C, Hoff E, et al. Resilience to bacterial infection: difference between species could be due to proteins in serum [J]. *J Infect Dis*, 2010, 201 (2): 223–232. DOI: 10.1086/649557.
- [15] Mora-Rillo M, Fernández-Romero N, Navarro-San Francisco C, et al. Impact of virulence genes on sepsis severity and survival in *Escherichia coli* bacteremia [J]. *Virulence*, 2015, 6 (1): 93–100. DOI: 10.4161/21505594.2014.991234.
- [16] Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, et al. Survival strategies of infectious biofilms [J]. *Trends Microbiol*, 2005, 13 (1): 34–40. DOI: 10.1016/j.tim.2004.11.010.
- [17] Seboxa T, Amogne W, Abebe W, et al. High mortality from blood stream infection in Addis Ababa, Ethiopia, is due to antimicrobial resistance [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (12): e0144944. DOI: 10.1371/journal.pone.0144944.
- [18] Chen TY, Warren HS, Greene E, et al. Protective effects of anti-O polysaccharide and anti-lipid A monoclonal antibodies on pulmonary hemodynamics [J]. *J Appl Physiol* (1985), 1993, 74 (1): 423–427. DOI: 10.1152/jappl.1993.74.1.423.
- [19] Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine [J]. *Chest*, 1992, 101 (6): 1644–1655. DOI: 10.1378/chest.101.6.1644.
- [20] Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, et al. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture [J]. *Shock*, 2000, 13 (2): 110–116. DOI: 10.1097/00024382-2000013020-00004.
- [21] Remick D, Manohar P, Bolgos G, et al. Blockade of tumor necrosis factor reduces lipopolysaccharide lethality, but not the lethality of cecal ligation and puncture [J]. *Shock*, 1995, 4 (2): 89–95. DOI: 10.1097/00024382-199508000-00002.
- [22] van der Poll T, Coyle SM, Kumar A, et al. Down-regulation of surface receptors for TNF and IL-1 on circulating monocytes and granulocytes during human endotoxemia: effect of neutralization of endotoxin-induced TNF activity by infusion of a recombinant dimeric TNF receptor [J]. *J Immunol*, 1997, 158 (3): 1490–1497.
- [23] van der Poll T, Coyle SM, Levi M, et al. Effect of a recombinant dimeric tumor necrosis factor receptor on inflammatory responses to intravenous endotoxin in normal humans [J]. *Blood*, 1997, 89 (10): 3727–3734.
- [24] Mera S, Tatulescu D, Cismaru C, et al. Multiplex cytokine profiling in patients with sepsis [J]. *APMIS*, 2011, 119 (2): 155–163. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2010.02705.x.
- [25] Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Cytokine signaling: regulation of the immune response in normal and critically ill states [J]. *Crit Care Med*, 2000, 28 (4 Suppl): N3–12. DOI: 10.1097/00003246-200004001-00002.
- [26] Gentile LF, Cuenca AG, Efron PA, et al. Persistent inflammation and immunosuppression: a common syndrome and new horizon for surgical intensive care [J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2012, 72 (6): 1491–1501. DOI: 10.1097/TA.0b013e318256e000.

- [27] Sauaia A, Moore EE, Johnson JL, et al. Temporal trends of postinjury multiple-organ failure: still resource intensive, morbid, and lethal [J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2014, 76 (3): 582–592, discussion 592–593. DOI: 10.1097/TA.0000000000000147.
- [28] Levin J, Poore TE, Zaubler NP, et al. Detection of endotoxin in the blood of patients with sepsis due to gram-negative bacteria [J]. *N Engl J Med*, 1970, 283 (24): 1313–1316. DOI: 10.1056/NEJM197012102832404.
- [29] McCuskey RS, McCuskey PA, Urbaschek R, et al. Species differences in Kupffer cells and endotoxin sensitivity [J]. *Infect Immun*, 1984, 45 (1): 278–280.
- [30] Coze L, Feltz VT. Recherches expérimentales sur la présence des infusoires et l'état du sang dans les maladies infectieuses [J]. *Gazette Medicale de Strasbourg*, 1866, 6: 115–125.
- [31] Alicino C, Giacobbe DR, Orsi A, et al. Trends in the annual incidence of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: a 8-year retrospective study in a large teaching hospital in northern Italy [J]. *BMC Infect Dis*, 2015, 15: 415. DOI: 10.1186/s12879-015-1152-0.
- [32] Wang JT, Hsu LY, Lauderdale TL, et al. Comparison of outcomes among adult patients with nosocomial bacteremia caused by methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a retrospective cohort study [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (12): e0144710. DOI: 10.1371/journal.pone.0144710.
- [33] Fux CA, Shirliff M, Stoodley P, et al. Can laboratory reference strains mirror "real-world" pathogenesis? [J]. *Trends Microbiol*, 2005, 13 (2): 58–63. DOI: 10.1016/j.tim.2004.11.001.
- [34] Cassat J, Dunman PM, Murphy E, et al. Transcriptional profiling of a *Staphylococcus aureus* clinical isolate and its isogenic agr and sarA mutants reveals global differences in comparison to the laboratory strain RN6390 [J]. *Microbiology*, 2006, 152 (Pt 10): 3075–3090. DOI: 10.1099/mic.0.29033-0.
- [35] Bundy JG, Willey TL, Castell RS, et al. Discrimination of pathogenic clinical isolates and laboratory strains of *Bacillus cereus* by NMR-based metabolomic profiling [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, 242 (1): 127–136. DOI: 10.1016/j.femsle.2004.10.048.
- [36] Hajjar AM, Ernst RK, Tsai JH, et al. Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications [J]. *Nat Immunol*, 2002, 3 (4): 354–359. DOI: 10.1038/ni777.
- [37] Ciornei CD, Novikov A, Beloin C, et al. Biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* bacteria undergo lipopolysaccharide structural modifications and induce enhanced inflammatory cytokine response in human monocytes [J]. *Innate Immun*, 2010, 16 (5): 288–301. DOI: 10.1177/1753425909341807.
- [38] Mansfield S, Griebel M, Gutknecht M, et al. Sepsis and cytomegalovirus: foes or conspirators? [J]. *Med Microbiol Immunol*, 2015, 204 (3): 431–437. DOI: 10.1007/s00430-015-0407-0.
- [39] Fejér G, Szalay K, Gyory I, et al. Adenovirus infection dramatically augments lipopolysaccharide-induced TNF production and sensitizes to lethal shock [J]. *J Immunol*, 2005, 175 (3): 1498–1506. DOI: 10.4049/jimmunol.175.3.1498.
- [40] Nansen A, Christensen JP, Marker O, et al. Sensitization to lipopolysaccharide in mice with asymptomatic viral infection: role of T cell-dependent production of interferon- γ [J]. *J Infect Dis*, 1997, 176 (1): 151–157. DOI: 10.1086/514017.
- [41] Opal SM, Laterre PF, Francois B, et al. Effect of eritoran, an antagonist of MD2–TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial [J]. *JAMA*, 2013, 309 (11): 1154–1162. DOI: 10.1001/jama.2013.2194.
- [42] Wheeler AP, Bernard GR. Treating patients with severe sepsis [J]. *N Engl J Med*, 1999, 340 (3): 207–214. DOI: 10.1056/NEJM199901213400307.
- [43] Lewis AJ, Seymour CW, Rosengart MR. Current murine models of sepsis [J]. *Surg Infect (Larchmt)*, 2016, 17 (4): 385–393. DOI: 10.1089/sur.2016.021.
- [44] Rittirsch D, Hoels LM, Ward PA. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis [J]. *J Leukoc Biol*, 2007, 81 (1): 137–143. DOI: 10.1189/jlb.0806542.
- [45] Olszyna DP, Florquin S, Sewnath M, et al. CXC chemokine receptor 2 contributes to host defense in murine urinary tract infection [J]. *J Infect Dis*, 2001, 184 (3): 301–307. DOI: 10.1086/322030.
- [46] Castiglia V, Piersigilli A, Ebner F, et al. Type I interferon signaling prevents IL-1 β -driven lethal systemic hyperinflammation during invasive bacterial infection of soft tissue [J]. *Cell Host Microbe*, 2016, 19 (3): 375–387. DOI: 10.1016/j.chom.2016.02.003.
- [47] Wang JY, Chen YX, Guo SB, et al. Predictive performance of quick sepsis-related organ failure assessment for mortality and ICU admission in patients with infection at the ED [J]. *Am J Emerg Med*, 2016, 34 (9): 1788–1793. DOI: 10.1016/j.ajem.2016.06.015.
- [48] Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, et al. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 44 (5): 725–738. DOI: 10.1165/ajrm.2009-0210ST.
- [49] Lopes JA, Jorge S. The RIFLE and AKIN classifications for acute kidney injury: a critical and comprehensive review [J]. *Clin Kidney J*, 2013, 6 (1): 8–14. DOI: 10.1093/ckj/sfs160.
- [50] Hsieh T, Vaickus MH, Remick DG. Enhancing scientific foundations to ensure reproducibility: a new paradigm [J]. *Am J Pathol*, 2018, 188 (1): 6–10. DOI: 10.1016/j.ajpath.2017.08.028.
- [51] Chavan SS, Huerta PT, Robbiati S, et al. HMGB1 mediates cognitive impairment in sepsis survivors [J]. *Mol Med*, 2012, 18: 930–937. DOI: 10.2119/molmed.2012.00195.
- [52] McCullough PA, Shaw AD, Haase M, et al. Diagnosis of acute kidney injury using functional and injury biomarkers: workgroup statements from the tenth Acute Dialysis Quality Initiative Consensus Conference [J]. *Contrib Nephrol*, 2013, 182: 13–29. DOI: 10.1159/000349963.
- [53] Singer M. Biomarkers in sepsis [J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2013, 19 (3): 305–309. DOI: 10.1097/MCP.0b013e32835f1b49.
- [54] Walley KR, Lukacs NW, Standiford TJ, et al. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis [J]. *Infect Immun*, 1996, 64 (11): 4733–4738.
- [55] Osuchowski MF, Welch K, Siddiqui J, et al. Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality [J]. *J Immunol*, 2006, 177 (3): 1967–1974. DOI: 10.4049/jimmunol.177.3.1967.
- [56] Remick DG, Bolgos GR, Siddiqui J, et al. Six at six: interleukin-6 measured 6 h after the initiation of sepsis predicts mortality over 3 days [J]. *Shock*, 2002, 17 (6): 463–467. DOI: 10.1097/00024382-200206000-00004.
- [57] Turnbull IR, Javadi P, Buchman TG, et al. Antibiotics improve survival in sepsis independent of injury severity but do not change mortality in mice with markedly elevated interleukin 6 levels [J]. *Shock*, 2004, 21 (2): 121–125. DOI: 10.1097/01.shk.0000108399.56565.e7.
- [58] Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS international sepsis definitions conference [J]. *Crit Care Med*, 2003, 31 (4): 1250–1256. DOI: 10.1097/01.CCM.0000050454.01978.3B.
- [59] Shapiro N, Howell MD, Bates DW, et al. The association of sepsis syndrome and organ dysfunction with mortality in emergency department patients with suspected infection [J]. *Ann Emerg Med*, 2006, 48 (5): 583–590. DOI: 10.1016/j.annemergmed.2006.07.007.
- [60] Vincent JL, Moreno R, Takala J, et al. The SOFA (sepsis-related organ failure assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine [J]. *Intensive Care Med*, 1996, 22 (7): 707–710. DOI: 10.1007/bf01709751.
- [61] Vincent JL, de Mendonça A, Cantraine F, et al. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working Group on "Sepsis-related Problems" of the European Society of Intensive Care Medicine [J]. *Crit Care Med*, 1998, 26 (11): 1793–1800. DOI: 10.1097/00003246-199811000-00016.
- [62] Seymour CW, Coopersmith CM, Deutschman CS, et al. Application of a framework to assess the usefulness of alternative sepsis criteria [J]. *Crit Care Med*, 2016, 44 (3): e122–130. DOI: 10.1097/CCM.0000000000001724.
- [63] Tilney NL, Bailey GL, Morgan AP. Sequential system failure after

- rupture of abdominal aortic aneurysms: an unsolved problem in postoperative care [J]. *Ann Surg*, 1973, 178 (2): 117–122. DOI: 10.1097/0000658-197308000-00001.
- [64] Arulkumaran N, Sixma ML, Jentho E, et al. Sequential analysis of a panel of biomarkers and pathologic findings in a resuscitated rat model of sepsis and recovery [J]. *Crit Care Med*, 2017, 45 (8): e821–e830. DOI: 10.1097/CCM.0000000000002381.
- [65] Coldewey SM, Rogazzo M, Collino M, et al. Inhibition of IκB kinase reduces the multiple organ dysfunction caused by sepsis in the mouse [J]. *Dis Model Mech*, 2013, 6 (4): 1031–1042. DOI: 10.1242/dmm.012435.
- [66] Ozer EK, Goktas MT, Kilinc I, et al. Celecoxib administration reduced mortality, mesenteric hypoperfusion, aortic dysfunction and multiple organ injury in septic rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 86: 583–589. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.11.102.
- [67] Recknagel P, Gonnert FA, Westermann M, et al. Liver dysfunction and phosphatidylinositol-3-kinase signalling in early sepsis: experimental studies in rodent models of peritonitis [J]. *PLoS Med*, 2012, 9 (11): e1001338. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001338.
- [68] Jia P, Wu X, Dai Y, et al. MicroRNA-21 is required for local and remote ischemic preconditioning in multiple organ protection against sepsis [J]. *Crit Care Med*, 2017, 45 (7): e703–e710. DOI: 10.1097/CCM.0000000000002363.
- [69] Shindo Y, Unsinger J, Burnham CA, et al. Interleukin-7 and anti-programmed cell death 1 antibody have differing effects to reverse sepsis-induced immunosuppression [J]. *Shock*, 2015, 43 (4): 334–343. DOI: 10.1097/SHK.0000000000000317.
- [70] Unsinger J, Kazama H, McDonough JS, et al. Sepsis-induced apoptosis leads to active suppression of delayed-type hypersensitivity by CD8⁺ regulatory T cells through a TRAIL-dependent mechanism [J]. *J Immunol*, 2010, 184 (12): 6766–6772. DOI: 10.4049/jimmunol.0904054.
- [71] Drechsler S, Weixelbaumer KM, Weidinger A, et al. Why do they die? Comparison of selected aspects of organ injury and dysfunction in mice surviving and dying in acute abdominal sepsis [J]. *Intensive Care Med Exp*, 2015, 3 (1): 48. DOI: 10.1186/s40635-015-0048-z.
- [72] Lambden S, Kelly P, Ahmetaj-Shala B, et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 regulates nitric oxide synthesis and hemodynamics and determines outcome in polymicrobial sepsis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35 (6): 1382–1392. DOI: 10.1161/ATVBAHA.115.305278.
- [73] Lewis AJ, Yuan D, Zhang X, et al. Use of biotelemetry to define physiology-based deterioration thresholds in a murine cecal ligation and puncture model of sepsis [J]. *Crit Care Med*, 2016, 44 (6): e420–431. DOI: 10.1097/CCM.0000000000001615.
- [74] Albuszies G, Vogt J, Wachter U, et al. The effect of iNOS deletion on hepatic gluconeogenesis in hyperdynamic murine septic shock [J]. *Intensive Care Med*, 2007, 33 (6): 1094–1101. DOI: 10.1007/s00134-007-0638-7.
- [75] Biron BM, Ayala A, Lomas-Neira JL. Biomarkers for sepsis: what is and what might be? [J]. *Biomark Insights*, 2015, 10 (Suppl 4): 7–17. DOI: 10.4137/BMI.S29519.
- [76] Edmark C, McPhail MJW, Bell M, et al. LiFe: a liver injury score to predict outcome in critically ill patients [J]. *Intensive Care Med*, 2016, 42 (3): 361–369. DOI: 10.1007/s00134-015-4203-5.
- [77] Fan SL, Miller NS, Lee J, et al. Diagnosing sepsis: the role of laboratory medicine [J]. *Clin Chim Acta*, 2016, 460: 203–210. DOI: 10.1016/j.cca.2016.07.002.
- [78] Knaus WA, Wagner DP, Draper EA, et al. The APACHE III prognostic system. Risk prediction of hospital mortality for critically ill hospitalized adults [J]. *Chest*, 1991, 100 (6): 1619–1636. DOI: 10.1378/chest.100.6.1619.
- [79] Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F. A new simplified acute physiology score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study [J]. *JAMA*, 1993, 270 (24): 2957–2963. DOI: 10.1001/jama.270.24.2957.
- [80] Valette X, du Cheyron D. A critical appraisal of the accuracy of the RIFLE and AKIN classifications in defining "acute kidney insufficiency" in critically ill patients [J]. *J Crit Care*, 2013, 28 (2): 116–125. DOI: 10.1016/j.jcrc.2012.06.012.
- [81] Stortz JA, Raymond SL, Vira JC, et al. Murine models of sepsis and trauma: can we bridge the gap? [J]. *ILAR J*, 2017, 58 (1): 90–105. DOI: 10.1093/ilar/ilx007.
- [82] Shrum B, Anantha RV, Xu SX, et al. A robust scoring system to evaluate sepsis severity in an animal model [J]. *BMC Res Notes*, 2014, 7: 233. DOI: 10.1186/1756-0500-7-233.
- [83] Granger JJ, Ratti PL, Datta SC, et al. Sepsis-induced morbidity in mice: effects on body temperature, body weight, cage activity, social behavior and cytokines in brain [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2013, 38 (7): 1047–1057. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2012.10.010.
- [84] Mella JR, Chiswick E, Stepien D, et al. Antagonism of the neurokinin-1 receptor improves survival in a mouse model of sepsis by decreasing inflammation and increasing early cardiovascular function [J]. *Crit Care Med*, 2017, 45 (2): e213–e221. DOI: 10.1097/CCM.0000000000002075.
- [85] Braber S, Verheijden KA, Henricks PA, et al. A comparison of fixation methods on lung morphology in a murine model of emphysema [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010, 299 (6): L843–851. DOI: 10.1152/ajplung.00192.2010.
- [86] Williams JM, Duckworth CA, Vowell K, et al. Intestinal preparation techniques for histological analysis in the mouse [J]. *Curr Protoc Mouse Biol*, 2016, 6 (2): 148–168. DOI: 10.1002/cpmo.2.
- [87] Schuetz P, Kennedy M, Lucas JM, et al. Initial management of septic patients with hyperglycemia in the noncritical care inpatient setting [J]. *Am J Med*, 2012, 125 (7): 670–678. DOI: 10.1016/j.amjmed.2012.03.001.
- [88] Singamsetty S, Shah FA, Guo L, et al. Early initiation of low-level parenteral dextrose induces an accelerated diabetic phenotype in septic C57BL/6J mice [J]. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2016, 41 (1): 12–19. DOI: 10.1139/apnm-2015-0213.
- [89] Giugliano D, Marfella R, Coppola L, et al. Vascular effects of acute hyperglycemia in humans are reversed by L-arginine. Evidence for reduced availability of nitric oxide during hyperglycemia [J]. *Circulation*, 1997, 95 (7): 1783–1790. DOI: 10.1161/01.cir.95.7.1783.
- [90] Schierenbeck F, Wallin M, Franco-Cereceda A, et al. Evaluation of intravascular microdialysis for continuous blood glucose monitoring in hypoglycemia: an animal model [J]. *J Diabetes Sci Technol*, 2014, 8 (4): 839–844. DOI: 10.1177/1932296814532206.
- [91] Andersen SK, Gjedsted J, Christiansen C, et al. The roles of insulin and hyperglycemia in sepsis pathogenesis [J]. *J Leukoc Biol*, 2004, 75 (3): 413–421. DOI: 10.1189/jlb.0503195.
- [92] American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes: 2010 [J]. *Diabetes Care*, 2010, 33 Suppl 1: S11–61. DOI: 10.2337/dc10-S011.
- [93] Krinsley JS, Grover A. Severe hypoglycemia in critically ill patients: risk factors and outcomes [J]. *Crit Care Med*, 2007, 35 (10): 2262–2267. DOI: 10.1097/01.CCM.0000282073.98414.4B.
- [94] Vriesendorp TM, DeVries JH, van Santen S, et al. Evaluation of short-term consequences of hypoglycemia in an intensive care unit [J]. *Crit Care Med*, 2006, 34 (11): 2714–2718. DOI: 10.1097/01.CCM.0000241155.36689.91.
- [95] Waeschle RM, Moerer O, Hilgers R, et al. The impact of the severity of sepsis on the risk of hypoglycaemia and glycaemic variability [J]. *Crit Care*, 2008, 12 (5): R129. DOI: 10.1186/cc7097.
- [96] Ali NA, O'Brien JM Jr, Dungan K, et al. Glucose variability and mortality in patients with sepsis [J]. *Crit Care Med*, 2008, 36 (8): 2316–2321. DOI: 10.1097/CCM.0b013e3181810378.
- [97] Preechasuk L, Suwansakri N, Ipichart N, et al. Hyperglycemia and glycemic variability are associated with the severity of sepsis in nondiabetic subjects [J]. *J Crit Care*, 2017, 38: 319–323. DOI: 10.1016/j.jcrc.2016.12.005.
- [98] Hache G, Osuchowski M, Thiemermann C. Does insulin protect the brain in mice and man with sepsis? [J]. *Shock*, 2015, 44 (3): 287. DOI: 10.1097/SHK.0000000000000423.
- [99] Van den Berghe G, Wilmer A, Hermans G, et al. Intensive insulin therapy in the medical ICU [J]. *N Engl J Med*, 2006, 354 (5): 449–461. DOI: 10.1056/NEJMoa052521.
- [100] Dugo L, Collin M, Allen DA, et al. GSK-3β inhibitors attenuate the organ injury/dysfunction caused by endotoxemia in the rat [J]. *Crit Care Med*, 2005, 33 (9): 1903–1912. DOI: 10.1097/01.ccm.0000178350.21839.44.