文章编号:1000-5404(2008)01-0067-03

论著

低毒力菌株小鼠细菌性腹膜炎模型的建立

罗 涛[1,2],黄文祥[2],吴利先[2] (重庆医科大学附属第一医院:感染科,重庆市传染病寄生虫病重点实验室,[2]老年病科,重庆 400016)

摘 要:目的 将无菌鼠粪提取物(sterile rat fecal extracts,SRFE)应用于低毒力菌株小鼠急性细菌性腹膜炎模型的构建并评价其应用效果。**方法** 用 SRFE 和/或 5% 高活性干酵母液将菌液稀释至感染动物所需终浓度,每只小鼠腹腔注射 0.5 ml 菌液,比较添加前后最低致死剂量的变化;比较 SRFE 浓度改变及与 5% 高活性干酵母液配伍体积比改变时小鼠死亡率的变化。**结果** 添加 20% SRFE 后,细菌的最低致死剂量降低了 78% ~90%。增加 SRFE 的浓度,可提高小鼠死亡率。单用 SRFE 的效果并不理想,仍需与 5% 高活性干酵母液配伍使用。SRFE 和 5% 高活性干酵母液不同体积比(2∶1 或 3∶1)时的小鼠死亡率无显著性差异($P>0.05$)。**结论** 在建立低毒力菌株小鼠急性细菌性腹膜炎模型时 SRFE 的添加可有效降低细菌的最低致死剂量。

关键词:无菌鼠粪提取物;小鼠急性细菌性腹膜炎
中图法分类号:R-332;R378;R572.2 **文献标识码:**A

Establishment of mouse septic peritonitis model with low pathogenic bacteria

LUO Tao[1,2], HUANG Wen-xiang[2], WU Li-xian[2] ([1]Department of Infectious Diseases, the Key Laboratory of Infectious Disease and Parasitic Disease of Chongqing, [2]Department of Geriatrics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To apply sterile rat fecal extracts (SRFE) in the establishment of mice septic peritonitis models and evaluate its effect. Methods SRFE and/or 5% yeast were added to dilute the broth of different bacteria, 0.5 ml of which was injected into each mouse's peritoneal cavity. Minimal lethal dose (MLD) was compared when there was SRFE or not. Mortality of mice was compared as the change of concentration of SRFE and different ratio (SRFE:5% yeast). Results MLD was decreased 78% ~90% with the application of SRFE. Mortality of mice was increased with rise of SRFE concentration. The application of SRFE alone was not so effective and 5% yeast was necessary to cooperate with SRFE. Different ratio of SRFE and 5% yeast didn't affect the mortality of mice ($P>0.05$). Conclusion The application of SRFE can decrease MLD effectively when form mice septic peritonitis models, especially for those bacteria with low pathogenicity.

Key words: sterile rat fecal extracts; mouse septic peritonitis

小鼠急性细菌性腹膜炎模型是研究细菌致病性以及评价抗感染药物疗效的经典方法,但是对于毒力较低的细菌则不容易建模。在构建低毒力菌株小鼠急性细菌性腹膜炎模型时,即便不断提高菌液浓度,仍无法获得满意的最低致死剂量。过去通常的做法是在菌液中添加灭菌干酵母液[1]、胃膜素[2,3]等物,以提高细菌毒力。但我们在动物实验中发现,当所用细菌毒力较低时,即便添加上述物质,仍不容易获得满意的实验结果。我们在建立低毒力菌株小鼠急性细菌性腹膜炎模型时,参考文献[4],尝试在菌液中加入无菌鼠粪提取物(sterile rat fecal extracts,SRFE),获得较理想的实验效果。

基金项目:重庆市自然科学基金重点项目(渝科发计字 2004-47)
Supported by the Key Program of Natural Science Foundation of Scientific Committee of Chongqing (2004-47)
作者简介:罗 涛,女,重庆市人,博士研究生,讲师,主要从事细菌耐药性及致病性方面的研究。电话:(023)89012430,E-mail:loto7869@yahoo.com.cn
通信作者:黄文祥,电话:(023)89012430,E-mail:wengxiang_huang@163.com
收稿日期:2007-07-03;修回日期:2007-11-09

1 材料与方法

1.1 添加剂

高活性干酵母(北方同正),配成 5%(质量浓度)后高压灭菌;无菌鼠粪提取物(自制)。均经培养鉴定无菌。

1.2 实验菌株

我室保存的临床分离株,包括大肠埃希菌 1252,产 TEM-1 ESBLs;肺炎克雷伯菌 422,产 SHV-5 ESBLs;耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(methicillin resistant staphylococcus aureus, MRSA)39 和 113(头孢西丁纸片法及 mecA 基因阳性)。粪肠球菌 V583(万古霉素耐药),由得克萨斯州立大学医学院 Barbara 教授馈赠。

1.3 实验动物

清洁级 BABL/c 小鼠 260 只,体质量 18 ~22 g,雌雄各半。购自本校实验动物中心,动物合格证号 SCXK(渝 20020001)。

1.4 培养基

MH 固体及液体培养基,杭州天和微生物制品厂出品。BHI (brain and heart infusion) 液体培养基,Dfico 公司产品。

1.5 实验方法

1.5.1 无菌鼠粪提取物(sterile rat fecal extracts,SRFE)的制备 标准化制备方法参考文献[4]。收集新鲜大鼠粪,淘洗去

杂物,烤箱干燥,碾磨成粉,过筛,使粉末尽可能细小。加入蒸馏水使浓度为20% 及30%(质量浓度),高压灭菌、离心后,无菌分离上层的液体即为无菌鼠粪提取物。经细菌培养鉴定无菌。分装保存,供实验使用。

1.5.2 菌液稀释 将实验用菌于实验前1 d接种于2 ml MH肉汤中,37 ℃培养6 h,取此菌液0.1 ml转种于10 ml MH肉汤内,37 ℃培养18 h,即为实验用菌原液。两株MRSA因生长缓慢,采用BHI培养基。将菌原液适当稀释,用5% 高活性干酵母液和/或SRFE稀释至感染动物所需终浓度。

1.5.3 最低致死剂量(minimal lethal dose,MLD)测定 将雄性和雌性小鼠分别编号,使用随机数字表法将小鼠分为26组,每组10只,雌雄各半。将菌原液适当稀释,用5%高活性干酵母液和/或SRFE稀释为不同浓度,一组为1个浓度,再每只小鼠腹腔注射0.5 ml菌液,记录感染后1周内各组死亡数或存活数,10只小鼠全部死亡组的最低浓度为MLD。实验分组:①大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌及粪肠球菌各分为添加5%高活性干酵母液和5%高活性干酵母液+20% SRFE组,共6组,了解添加SRFE后对MLD的影响;②MRSA39和113在未使用添加剂时按菌液浓度由低到高各分为4组,了解不使用添加剂时,不同菌液浓度下小鼠的死亡率;其次固定菌液浓度,按添加5%高活性干酵母液和/或SRFE的不同各分为3组,了解不同浓度SRFE对小鼠死亡率的影响;最后固定菌液浓度,按30% SRFE和5%高活性干酵母液不同体积比各分为2组,了解其不同体积比对小鼠死亡率的影响,总共18组。③对照组设2组,各注射5%高活性干酵母液和20% SRFE,剂量为0.5 ml,不添加菌液,了解前述2种添加剂对小鼠死亡率的影响。

1.5.4 小鼠急性细菌性腹膜炎模型鉴定(粪肠球菌V583组) 对注射粪肠球菌V583组小鼠(菌液浓度4.0×10^9 CFU,以5%高活性干酵母液+20% SRFE稀释)进行腹膜炎模型鉴定。设对照组1组(10只,选取方法同1.5.3),注射5%高活性干酵母液+20% SRFE 0.5 ml。

1.5.4.1 细菌培养和鉴定 对死亡的小鼠在无菌条件下分别取肝和脾匀浆进行细菌培养和鉴定。

1.5.4.2 白细胞计数 对小鼠用测得的最低致死剂量细菌进行腹腔注射,于感染前,感染后6、12和24 h分别取外周血用全自动细胞计数仪进行白细胞计数,对照组注射5%活性干酵母液+20% SRFE。

1.5.4.3 肠系膜病理切片检测 上述24 h取血后的小鼠处死后取肠系膜进行内脏超薄病理切片,观察肠系膜炎症细胞浸润情况。

1.6 统计学处理

各组小鼠死亡率的比较使用χ^2检验中四格表的确切概率检验法直接计算P值。小鼠外周血白细胞计数的比较使用t检验。

2 结果

2.1 添加SRFE前后最低致死剂量的变化

用大肠埃希菌1252、肺炎克雷伯菌422、粪肠球菌V583等毒力较高的菌株建立小鼠急性细菌性腹膜炎模型时,分别采用5% 高活性干酵母液稀释菌液,及用20% SRFE和5%高活性干酵母液(体积比2∶1)混合后稀释菌液,分别对小鼠腹腔注射,比较使用不同添加剂时的最低致死剂量。从表1结果可看出,添加20% SRFE后,毒力较高的细菌的最低致死剂量降低了78%~90%。2组对照组均无小鼠死亡。

表1 添加20%SRFE前后细菌的最低致死剂量的改变($n=10$)

细菌	稀释剂	最低致死剂量(CFU)
大肠埃希菌1252	5% 高活性干酵母液	7.5×10^9
	5% 高活性干酵母液+20% SRFE	9.0×10^8
肺炎克雷伯菌422	5% 高活性干酵母液	1.0×10^{10}
	5% 高活性干酵母液+20% SRFE	1.0×10^9
粪肠球菌V583	5% 高活性干酵母液	1.8×10^{10}
	5% 高活性干酵母液+20% SRFE	4.0×10^9

2.2 不同浓度及配比SRFE对最低致死剂量的影响

两株MRSA系由医院内感染患者呼吸道分离的致病菌,毒力较低,且生长缓慢,我们使用了营养较丰富的BHI培养基。从表2可以看到,在不添加任何物质时,尽管不断增加菌液浓度,小鼠死亡率始终低于50%,无法获得满意的最低致死剂量。

表2 单纯使用菌液时小鼠的死亡率($n=10$)

细菌	菌液浓度(CFU)	小鼠死亡数	小鼠死亡率(%)
MRSA39	3.05×10^9	0	0
	4.06×10^9	0	0
	6.10×10^9	1	10
	1.22×10^{10}	3	30
MRSA113	7.30×10^9	0	0
	9.73×10^9	0	0
	1.46×10^{10}	1	10
	2.92×10^{10}	2	20

在添加20% SRFE后,结果仍不令人满意。于是我们尝试增加SRFE的浓度,并比较其与5% 高活性干酵母液不同配比时的效果(表3)。

从表3可以看出,30% SRFE的效果优于20% SRFE,增加SRFE的浓度,可提高小鼠死亡率($P<0.05$)。但是单用30% SRFE的效果并不理想,仍需与5% 高活性干酵母液配伍使用。表4比较了30% SRFE和5% 高活性干酵母液不同体积比时的小鼠死亡率。30% SRFE和5% 高活性干酵母液不同体积比时效果相似,无明显差异($P>0.05$)。故最后确定条件为:当细菌毒力较低时,可选用30% SRFE,与5% 高活性干酵母液2∶1或3∶1配比后,稀释菌液。最终MRSA39和MRSA113的最低致死剂量分别确定为4.06×10^9和9.73×10^9 CFU。而在此浓度下,如不添加任何物质(酵母液或SRFE),则无小鼠死亡。

表3 不同浓度及配比SRFE对最低致死剂量的影响($n=10$)

细 菌	稀释后菌液浓度(CFU)	稀释剂	小鼠死亡数	小鼠死亡率(%)
MRSA39	3.05×10^9	(Ⅰ)20% SRFE和5% 高活性干酵母液(体积比2∶1)	2	20[a]
		(Ⅱ)30% SRFE和5% 高活性干酵母液(体积比2∶1)	7	70
		(Ⅲ)单用30% SRFE	1	10[a]
MRSA113	7.3×10^9	(Ⅰ)20% SRFE和5% 高活性干酵母液(体积比2∶1)	3	30
		(Ⅱ)30% SRFE和5%高活性干酵母液(体积比2∶1)	5	50[b]
		(Ⅲ)单用30% SRFE	0	0

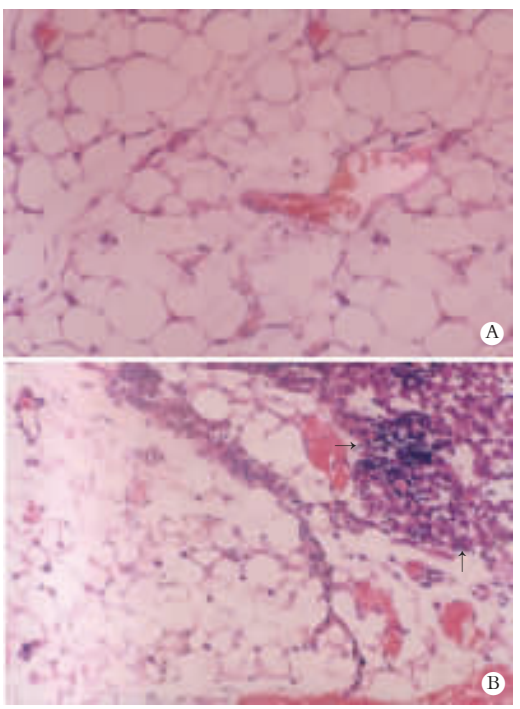
a:$P<0.05$,与MRSA39 Ⅱ组比较;b:$P<0.05$,与MRSA113 Ⅲ组比较

表 4　30%SRFE 和 5% 高活性干酵母液不同体积比时的小鼠死亡率（$n=10$）

细菌	稀释后菌液浓度（CFU）	30% SRFE 和 5% 高活性干酵母液体积比	小鼠死亡数（只）	小鼠死亡率（%）
MRSA39	4.06×10^9	2∶1	10	100
		3∶1	10	100
MRSA113	9.73×10^9	2∶1	10	100
		3∶1	10	100

2.3　建立模型的鉴定

在观察期内，对照组无小鼠死亡，将其处死解剖后，腹腔及脏器大体观未见明显异常，肝、脾细菌培养未见细菌生长。对注射粪肠球菌 V583 菌液后死亡小鼠进行解剖，发现小鼠的肝、脾有淤血，腹膜、大网膜充血水肿，肝、脾及肠管等脏器表面有少量脓性纤维性渗出物附着，腹腔液浑浊伴臭味。死亡小鼠的肝、脾细菌培养经鉴定为粪肠球菌，表明小鼠为实验接种细菌感染致死。肠系膜组织切片也显示肠系膜炎症细胞浸润明显，见图 1。



A：对照组；B：实验组；↑ 炎症细胞浸润

图 1　小鼠肠系膜病理变化　（HE×200）

注射细菌后小鼠外周血的白细胞有明显上升，在 12 h 达到高峰，在 24 h 开始降低，而对照组小鼠的白细胞在注射前后无明显变化。两组小鼠外周血的白细胞在注射前无明显差异（$P>0.05$），注射后的各个时点均有显著性差异（$P<0.05$），见表 5。

表 5　腹膜炎模型动物感染后白细胞改变情况（$n=10$，1×10^9/L）

组别	感染时间（h）			
	0	6	12	24
对照组	4.32±0.31	4.35±0.32	4.41±0.25	4.36±0.28
V583 组	4.30±0.29	9.75±0.23[a]	12.41±0.33[a]	2.12±0.27[a]

a：$P<0.05$，与对照组比较

3　讨论

在研究细菌致病性及测定抗生素的体内抗菌活性时，小鼠急性细菌性腹膜炎模型是非常重要的方法。传统的方法是在菌液中添加灭菌干酵母液、胃膜素等物，以提高细菌毒力。但是，一些临床分离菌株，特别是从医院内感染患者体内分离的菌株，往往由体内正常菌群或定植菌在长期抗生素的选择压力下衍变而来，其本身致病力较弱，用于感染小鼠时，即便增加细菌浓度，小鼠死亡率仍较低，无法获得满意的最低致死剂量；而且最低致死剂量浓度过高时，不易观察到浓度递减所带来的效应。此时如能加用无菌鼠粪提取物，可有效降低细菌的最低致死剂量，使小鼠急性细菌性腹膜炎模型的构建取得成功。

我们对构建模型的验证表明小鼠腹膜炎由细菌引起，模型构建成功。SRFE 等添加剂对小鼠的白细胞无明显影响，病理切片也证实单独使用 SRFE 不会引起小鼠肠系膜的炎症细胞浸润。但是，当 SRFE 与菌液共用后可增加细菌的毒力。Singh 等[5] 的实验中发现 SRFE 的添加使粪肠球菌 OG1RF 的 LD_{50} 降低了 10 倍以上。因此他们认为，在评价潜在毒力较低因而需要较高注射量的微生物时，SRFE 的添加是非常有用的。我们在实验中研究了不同浓度 SRFE 在小鼠急性细菌性腹膜炎模型构建中的影响，并尝试在低毒力菌株构建模型时添加适当比例的 5% 高活性干酵母液。从动物实验结果我们也可以看到，单纯注射 SRFE 对小鼠的生存没有影响；但是普通菌株加用 20% SRFE 后，细菌的最低致死剂量降低了 78% ~90%，使小鼠急性细菌性腹膜炎模型的建立变得容易。对于毒力较低的细菌，可增加 SRFE 的浓度，必要时添加适当比例的 5% 高活性干酵母液以获得满意的最低致死剂量。

本实验室已用 SRFE 建立粪肠球菌小鼠腹膜炎模型，并应用于粪肠球菌突变株的毒力研究[6]。本研究表明，鼠粪收集容易，SRFE 的制备简单，成本低，其添加可有效降低细菌的最低致死剂量，使小鼠急性细菌性腹膜炎模型的建立更易取得成功。

参考文献：

[1] 李小青，黄文祥，郑行萍，等. 美洛西林-三唑巴坦的体内外抗菌活性[J]. 中国新药与临床杂志，2006，25(3)：189 - 192.

[2] 颜天华，卢是月，黎露刚，等. 国产注射用枸橼酸阿奇霉素体内外抗菌作用研究[J]. 中国医药导刊，2004，6(3)：195 - 196.

[3] 王秋静，路　航，杨世杰. 氟罗沙星静脉给药对小鼠腹腔感染的保护作用和毒性实验[J]. 白求恩医科大学学报，2001，27(1)：35 - 36.

[4] Gollapudi S V，Gupta A，Thadepalli H，*et al*. Use of lymphokines in treatment of experimental intra-abdominal abscess caused by Bacteroides fragilis[J]. Infect Immun，1988，56(9)：2369 - 2372.

[5] Singh K V，Qin X，Weinstock G M，*et al*. Generation and testing of mutants of Enterococcus faecalis in a mouse peritonitis model[J]. J Infect Dis，1998，178(5)：1416 - 1420.

[6] 孙小平，黄文祥，吴利先. 粪肠球菌基因 hyl_1 功能的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2007，29(14)：1425 - 1428.

（编辑　冷怀明）