·论 著·

不同浓度大肠杆菌制作大鼠慢性细菌性前列腺炎模型探讨

陈江川,刘城城,韩广玮,叶 钢,易善红 (第三军医大学新桥医院泌尿外科,重庆 400037)

[摘 要] **目的** 采用不同浓度大肠杆菌制作慢性细菌性前列腺炎模型。**方法** 选取 SD 大鼠 36 只,每组 12 只,随机分为空白对照组、低浓度组和高浓度组。高浓度及低浓度组给予相同剂量不同浓度的大肠杆菌注射大鼠前列腺,空白对照组注射等量生理盐水,4 周后切片观察并做炎症评分及细菌检测。**结果** 高浓度组 4 只大鼠死亡,高浓度以及低浓度组炎症评分均高于空白对照组($P<0.05$)。**结论** 低浓度组使用的细菌浓度更符合慢性细菌性前列腺炎的病理表现,且动物死亡率低,适用于大鼠慢性细菌性前列腺炎模型的建立。

[关键词] 慢性细菌性前列腺炎;大肠杆菌;大鼠模型;浓度

[中图分类号] R697.33;R-332 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2013)05-0463-03

Different concentrations of *Escherichia coli* in establishment of chronic bacterial prostatitis rat model

CHEN Jiang-chuan, LIU Cheng-cheng, HAN Guang-wei, YE Gang, YI Shan-hong (Department of Urology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To establish the rat model of chronic bacterial prostatitis with different concentrations of *Escherichia coli* (*E. coli*). **Methods** All of 36 SD rats were divided into to control group, low concentration group and high concentration group ($n=12$). The high and low concentration groups were injected with the same dosage but different concentrations of *E. coli*, and the control group was injected with the same amount of normal saline. The slice observation, chronic prostatitis symptom index and bacteria detection were performed after 4 weeks. **Results** There were 4 rats died in the high concentration group. The chronic prostatitis symptom index of both high concentration group and low concentration group were higher than that of control group ($P<0.05$). **Conclusion** The lower concentration of *E. coli* is more suitable for establish the rat model of chronic bacterial prostatitis with lower mortality of animal.

Keywords: chronic bacterial prostatitis; *Escherichia coli*; rat model; concentration

慢性细菌性前列腺炎是中青年男性的常见病,是一种极易复发的泌尿系感染疾病[1],近年来其发病率呈上升趋势。由于前列腺固有的解剖及生理特点,致使前列腺炎的临床征象多种多样,且难以治愈[2]。其临床症状及易复发的特性,使患者生理心理负担加大,生活质量下降。目前关于慢性细菌性前列腺炎的动物模型制作尚缺乏公认方案,寻找稳定的符合疾病病理表现的动物模型是研究慢性细菌性前列腺炎发病机制、诊断和治疗的重要前提。但是在制作慢性细菌性动物模型所用的细菌浓度存在争议[3-4]。为了探讨制作模型所用大肠杆菌的适宜浓度,本文分别采用 2 种不同浓度的大肠埃希菌注射液直接注射大鼠前列腺的方法制备慢性细菌性前列腺炎的大鼠模型,现将相关经验及结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

采用标准致病大肠埃希菌(ATCC25922,惠儿利生物公司提供),37 ℃培养过夜,以比浊法用灭菌生理盐水分别配成 4.2×10^7/mL 及 1.0×10^{10}/mL 浓度菌液,3% 戊巴比妥钠(购自国药集团化学试剂有限公司),10% 甲醛溶液(第三军医大学新桥医院中心实验室提供),光学显微镜(奥林巴斯公司提供)。

1.2 实验动物

雄性 Wistar 大鼠 36 只,体质量 200~250 g,清洁级,由第三军医大学附属新桥医院实验动物中心提供。

1.3 动物模型建立方法

SD 雄性大鼠 36 只随机分为 3 组,每组 12 只,分别为空白对照组、高浓度组和低浓度组。用 3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)用 1 mL 无菌注射器腹腔注射,与大鼠腹部皮肤呈斜角 30°进针,回抽无液体后将 3% 戊巴比妥钠注入大鼠腹腔,妥善麻醉后,备大鼠下腹部皮肤,常规消毒铺巾,取大鼠下腹部 1 cm 切口,严格无菌操作,无齿镊提起膀胱,暴露前列腺两叶,低浓度组用 1 mL 无菌注射器将浓度为 4.2×10^7/mL 菌液注射入大鼠前列腺背侧 0.5 μl,高浓度组注入 1.0×10^{10}/mL 浓度菌液 0.5 μl,对照组注入 0.5 μl 生理盐水。逐层关闭切口,缝皮前用碘

doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201305001

[基金项目] 第三军医大学临床科研基金资助项目(2009XLC22)

[通讯作者] 易善红,电话:(023)68774418,E-mail:yshh881@yahoo.com.cn.

[收稿日期] 2013-04-10 [修回日期] 2013-04-21

伏消毒皮肤,所有大鼠术后常规喂养 4 周,脱颈椎法处死大鼠,打开腹腔,取出大鼠前列腺组织。每份前列腺组织分为 2 份,1 份放入 10% 甲醛溶液中固定,石蜡包埋切片,HE 染色,另外 1 份称重后制作前列腺组织匀浆。

1.4 观察指标

1.4.1 石蜡切片 10% 福尔马林溶液固定 24 h,常规石蜡包埋切片,并用 HE 染色,每个标本切 8 张切片,切片厚度为 5 μm,光镜下观察大鼠的前列腺组织中的腺体、导管和间质的变化。根据 Bahk 等[5]方法计算石蜡切片中的病理得分:每张切片中随机取 5 个高倍视野,计算镜下视野中病变部位与整个视野的面积之比,无病变计 0 分,小于 25% 的计 1 分,25%~49% 计 2 分,50%~75% 计 3 分,大于 75% 计 4 分。全部数据资料均经 SPASS 18.0 软件进行统计学分析

1.4.2 前列腺细菌检测 分别取低浓度组以及高浓度组大鼠动物脱颈椎法处死后取出前列腺,电子天平称重。在无菌环境下,用无菌组织剪剪碎前列腺组织,每份前列腺用蒸馏水按 10 倍倍比稀释,制备前列腺组织匀浆。分别取室温静置 10 min 后的各组大鼠前列腺组织匀浆上清液 100 μl,接种到冷却至 48~50 ℃的 1.2% 营养琼脂培养基倾注摇匀平板,每份前列腺组织倾注 3 个平板,结果取其平均数,每个平板置普通温箱内 37 ℃培养 24 h 后分别计菌落数,以革兰氏染色镜检鉴定分离菌的性质。

2 结果

2.1 术后动物存活情况

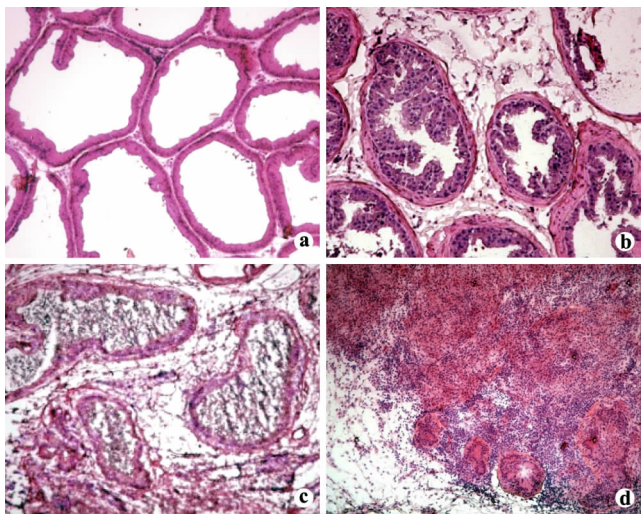
36 只大鼠均顺利完成手术过程,所有大鼠建模完成后,高浓度组大鼠分别于术后 3 d 死亡 1 只,术后 8 d 死亡 2 只,术后 2 周死亡 1 只,空白对照组及低浓度组大鼠无死亡,所有未死亡大鼠生命体征平稳,无寒战抽搐等情况发生。高浓度组大鼠死亡率 33.3%,空白对照组及低浓度组死亡率为 0。

2.2 肉眼观察

肉眼可见正常大鼠前列腺呈淡红色、质软,大小形态正常,与周围组织及膀胱无粘连;低浓度模型组大鼠前列腺组织呈灰白色,质地稍硬,左右叶体积增大,且与膀胱及周围组织轻度粘连;高浓度模型组大鼠前列腺充血较严重,质地较硬,且前列腺注射部位有单个大小约 4~7 mm 包块形成,包块质地较硬,呈淡黄色,前列腺与周围组织粘连严重。

2.3 前列腺病理切片及评分

空白对照组大鼠前列腺上皮细胞多为立方或柱状上皮,腔隙大小不一,皱襞多,间质内少量结缔组织及纤维结缔组织,间质内无淋巴细胞等炎性细胞浸润,纤维组织未见增生(图 1a)。低浓度组大鼠前列腺组织在光镜下可见间质疏松,腔隙间质有水肿,以淋巴细胞及单核细胞为主的慢性炎性细胞散布于组织,腺体内可见纤维组织增生,有肉芽组织出现,总体呈细菌性慢性炎症改变(图 1b)。高浓度组大鼠在光镜下可见腺体组织结构紊乱,腺腔扩张,大量中性粒细胞、淋巴细胞及浆细胞浸润腺体以及间质,腺上皮坏死脱落(图 1c),前列腺包块部位在镜下可见大量中性粒细胞及浆细胞浸润,腺体坏死,包块局部失去正常组织结构(图 1d)。各实验组大鼠前列腺病理评分见表 1。其中高浓度组及低浓度组与空白对照组比较有统计学差异($P<0.05$),高浓度组的腺体改变、炎细胞浸润腺体与低浓度组比较有统计学差异($P<0.05$)。



a:空白对照组;b:低浓度组;c:高浓度组;d:高浓度组脓肿前列腺组织

图 1 前列腺病理组织切片光镜观察(HE ×100)

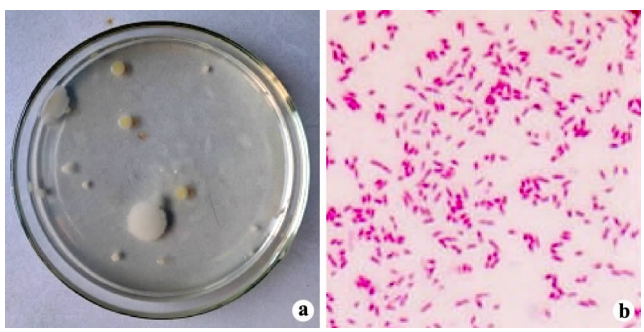
表 1 各组大鼠病理改变评分情况比较

分组	腺体改变	炎细胞浸润间质	纤维组织增生	炎细胞浸润腺体
空白对照组	0.14±0.11	0.24±0.17	0.37±0.22	0.12±0.08
低浓度组	3.5±0.64*	4.74±0.94*	5.24±1.12*	4.06±1.06*
高浓度组	7.1±1.32*#	5.64±1.54*	4.67±1.34*	7.74±1.14*#

*:与空白对照组比较,$P<0.05$;#:与低浓度组比较,$P<0.05$

2.4 前列腺细菌计数

前列腺组织匀浆培养可见,在培养皿中长出颜色为乳白色大小不一,圆形菌落,菌落边缘规整,半透明(图 2a),取菌落于革兰染色后放于镜下可见红色杆状菌(图 2b)。前列腺细菌计数结果见表 2,空白对照组不能检测出大肠杆菌,低浓度组大肠杆菌数明显低于高浓度组。



a:培养皿中长出乳白色大小不一、半透明的圆形菌落;b:菌落革兰染色光镜观察(×100)

图 2 前列腺组织匀浆细菌培养

2.5 其他组织的形态学改变

摘取各实验组大鼠肾、肝、脾、肠系膜淋巴结,光镜观察组织变化,均未发现炎症反应。

表 2 各实验组组织匀浆细菌计数

分组	n	镜下形态(革兰染色)	细菌数(cfu/g)
空白对照组	12	-	0
低浓度组	12	G - 短杆菌	6 400
高浓度组	12	G - 短杆菌	34 500

3 讨论

慢性前列腺炎是成年男性的常见病,由于前列腺固有的解剖结构及生理特点,造成了慢性前列腺炎的临床表现多样化,且治愈困难。虽然慢性前列腺炎并不是威胁生命的恶疾,但其严重影响患者的生活质量,是临床工作中的棘手问题。其中细菌感染是慢性前列腺炎的重要发病因素之一[6-7]。在临床上慢性前列腺炎患者中 5%~10% 的常规细菌培养中可以分离出细菌,其 90%~95% 为革兰氏阴性菌,其中 80% 为大肠埃希菌,其余为变形杆菌、绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌、类白喉菌等[8]。大肠杆菌是人和动物肠道中的正常栖居菌,在一定条件下可引起肠道外感染。大肠杆菌为泌尿系常见的感染菌种,其逆行感染可能导致男性尿道炎、前列腺炎、膀胱炎、肾盂肾炎等[9]。目前在慢性细菌性前列腺炎动物模型的建立上,使用大肠杆菌局部注射前列腺是较为肯定的方法[10-11],我们选择了 2 种不同浓度的大肠杆菌进行动物建模。低浓度组大鼠有 2 只在建模 4 周后,发现组织免疫自动清除了细菌,镜下未发现炎症改变,余下 10 只大鼠通过病理切片可见慢性炎症的产生。与空白对照组相比,可见间质疏松,内有淋巴细胞、单核细胞等炎性细胞浸润分布,腺体内肉芽组织增生。在高浓度组中,大鼠死亡率为 33.3%,在死亡大鼠的解剖中,发现其前列腺充血坏死,1 只死亡大鼠腹腔中有脓肿形成,考虑高浓度的菌液顺着针孔少部分溢出,导致腹腔感染,形成腹腔脓肿。高浓度组大鼠模型普遍可见前列腺内有淡黄色包块形成,在镜下可见包块内炎性细胞浸润,肉芽组织增生,腺体及上皮坏死,包块形成考虑与大肠杆菌浓度过高相关,过高的细菌浓度导致局部组织坏死,纤维增生,在注射位置形成包块。高浓度组在镜下可见大体呈亚急性改变,炎性细胞对腺体浸润以及腺体改变较低浓度组及空白对照组有明显增加,纤维组织增生较低浓度组减少。在前列腺细菌检测中,空白对照组前列腺里不能检测出细菌,低浓度及高浓度组均可检测出大肠杆菌,且高浓度组含菌量明显高于低浓度组,考虑高浓度组均有包块形成,包块内应有较多细菌,导致这一结果有差异。

对比 2 种不同浓度细菌制作慢性细菌性前列腺炎模型,低浓度组采用 4.2×10^7/mL 浓度制作模型,在生理病理上更接近于慢性细菌性前列腺炎,且动物模型更为稳定,动物死亡率相对较低,是较为可靠的建模浓度。我们采用直接注射法建立大鼠模型术后喂养 4 周后取前列腺标本,成功复制慢性细菌性前列腺炎大鼠模型,动物死亡率低,对其他脏器无影响,模型较为稳定,可作为慢性细菌性前列腺炎大鼠模型制作的可靠方法。

[参考文献]

[1] Wagenlehner FM, van Till JW, Magri V, et al. National Institutes of Health Chronic Prostatitis Symptom Index (NIH-CPSI) symptom evaluation in multinational cohorts of patients with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome[J]. Eur Urol, 2013, 63(5): 953 - 959.

[2] Magri V, Trinchieri A, Montanari E, et al. Prevalence of erectile and ejaculatory dysfunction in men with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome[J]. European Urology Supplements, 2012, 11(1): E44 - U375.

[3] Lee CB, Ha US, Yim SH, et al. Does finasteride have a preventive effect on chronic bacterial prostatitis? Pilot study using an animal model[J]. Urol Int, 2011, 86(2): 204 - 209.

[4] 贺菊乔,朱晓明,曹 晖,等. 紫金胶囊治疗大鼠慢性细菌性前列腺炎的实验研究[J]. 中国中医药科技, 2000, 7(2): 72 - 73.

[5] Bahk TJ, Daniels MD, Leon JS, et al. Comparison of angiotensin converting enzyme inhibition and angiotensin Ⅱ receptor blockade for the prevention of experimental autoimmune myocarditis[J]. Int J Cardiol, 2008, 125(1): 85 - 93.

[6] Lee SW, Cheah PY, Liong ML, et al. Demographic and clinical characteristics of chronic prostatitis: prospective comparison of the university of sciences malaysia cohort with the united states national institutes of health cohort[J]. J Urol, 2007, 177(1): 153 - 157.

[7] 袁宇峰,唐吉元,周占松,等. 108 例纳米细菌感染致Ⅲ型前列腺炎的诊断和治疗[J]. 局解手术学杂志, 2011, 20(2): 127 - 129.

[8] Schaeffer AJ, Landis JR, Knauss JS, et al. Demographic and clinical characteristics of men with chronic prostatitis: the national institutes of health chronic prostatitis cohort study[J]. J Urol, 2002, 168(2): 593 - 598.

[9] Zhang ZC, Jin FS, Liu DM, et al. Safety and efficacy of levofloxacin versus ciprofloxacin for the treatment of chronic bacterial prostatitis in Chinese patients[J]. Asian J Androl, 2012, 14(6): 870 - 874.

[10] 李 孟,刘修恒,黄 耿,等. 大鼠慢性细菌性前列腺炎模型的建立[J]. 中华男科学杂志, 2007, 13(6): 557 - 558.

[11] Kim HW, Ha US, Woo JC, et al. Preventive effect of selenium on chronic bacterial prostatitis[J]. J Infect Chemother, 2012, 18(1): 30 - 34.

(编辑:周小林)