维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)04-0437-04

肠球菌兔心内膜炎模型的建立

吴利先[1],黄文祥[1],伍 群[2],罗 涛[1],孙小平[1]

(1. 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学重点实验室;2. 重庆医科大学科研处 重庆 400016)

【摘 要】目的:建立肠球菌毒力相关性兔心内膜炎模型,用于肠球菌类毒力因子的研究。方法:用粪肠球菌(Enterococcus faecalis)标准毒株 OG1RF 和粪肠球菌 sprE 基因缺陷突变株来建立兔心内膜炎模型,通过心内膜炎相关指标的检测来判断毒力下降情况。结果:突变株在兔心内膜炎模型中产生赘生物的大小、重量以及菌落计数都明显低于标准株。结论:肠球菌毒力相关性兔心内膜炎模型建立成功,可用于肠球菌其他可能毒力因子的研究。

【关键词】肠球菌;毒力;心内膜炎模型

【中国图书分类法分类号】R378 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-06-05

Establishment of rabbit endocarditis models caused by enterococcus

WU Li-xian, et al

(*Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To establish Rabbit endocarditis models caused by Enterococcus faecalis for studying virulence of Enterococcus. *Methods*: Standard strain OG1RF and sprE gene deficient mutant of Enterococcus faecalis were used to establisb Rabbit endocarditis models. The index of endocarditis was detected to show virulence change. *Results*: The size, weight and Colony count of vegetation of sprE mutant groups were smaller than those of wild-type OG1RF groups in a rabbit endocarditis model. *Conclusion*: The Rabbit endocarditis models caused by Enterococcus were establised successfully, which would be used to study other virulence factor of Enterococcus faecalis.

【Key words】 Enterococcus; Virulence; Endocarditis models

近年来,临床上耐药革兰阳性菌感染的形势越来越严重,其中肠球菌是主要的病原菌之一,已成为医院内感染病原菌的第 3 位(9%~12%)[1]。随着粪肠球菌染色体全基因组测序工作的开展和完成,通过应用新的遗传学方法和生物信息学技术研究其致病性取得了明显进展[2,3]。由于粪肠球菌感染致病机制复杂,有许多因子参与该病的发生,用遗传学方法和生物信息学技术发现的可能的致病因子需要动物模型来验证和评价。目前仅限于用小鼠腹膜炎模型来评价细菌毒力强弱和药物干预的效果[4,5]。但近年来,肠球菌引起的心内膜炎病例明显上升,为了寻找肠球菌的毒力因子研究的更为有效模型,我们用粪肠球菌标准菌株 OG1RF 和粪肠球菌 sprE 基因缺陷突变株来建立毒力相关性兔心内膜炎模型,通过比较 2 组赘生物的大小、重量和菌落计数等来判断毒力下降情况,为进一步研究肠球菌的可能的毒力因子提供依据和工作基础。

作者介绍:吴利先(1972-),女,副教授,博士,
研究方向:细菌的致病机制和防治。
通讯作者:黄文祥,男,教授,E-mail:wenxiang_huang@163.com。
基金项目:国家自然科学基金项目(30475995);
重庆市自然科学基金重点项目(渝科发计字 2004-47)。

1 材料和方法

1.1 动物

雌性新西兰兔,30 只,体重 2.0~2.5kg,由重庆医科大学实验动物中心提供,实验前禁食 12h。

1.2 菌株和试剂

粪肠球菌标准菌株 OG1RF(ATCC 47077),由得克萨斯州立大学医学院 Barbara 教授馈赠。粪肠球菌 sprE 基因缺陷突变株命名为 sprE mutant 由本实验组构建[6]。BHI 培养基购自美国 Defico 公司。

1.3 方法

1.3.1 无菌性心内膜炎的制备 新西兰兔,耳缘静脉缓慢注射 3%的戊巴比妥钠溶液 0.5ml/kg,麻醉后固定于手术台上,暴露颈部正中位置,备皮消毒后切开正中部位皮肤,分离皮下组织及肌肉,分离出右侧颈总动脉。用动脉夹将其近心端

维普资讯 http://www.cqvip.com

夹闭，用手术缝线将远端结扎。将右侧颈总动脉剪一小斜切口，将一端联接血压计的无菌导管(外径 1.2mm)插入，去掉动脉夹，缓慢将向前推进导管，同时注意血压的情况。在颈总动脉内的血压一般在 100～120mmHg。当导管前端通过主动脉瓣进入左心室时，会看到血压有徒然的下降，同时波动幅度加大，多在 40～50mmHg。同时，进行插管的手可感到较强的心脏搏动感，证明导管前端已进入左心室腔内。然后再稍稍向前推移一点，将导管末端结扎后固定于皮下，缝和手术切口，消毒后放回笼中正常饲养，制备由导管损伤而形成的无菌性心内膜炎。

1.3.2 动物分组和感染 24h 后，随机分为 3 组，第 1 组为对照组(6 只)，即只作插管，不进行细菌感染。另两组为感染组，分别从耳缘静脉注射含有 10^8CFU 的 OG1RF 和 sprE mutant 菌培养液 1ml。注射后第 2d 自耳中动脉取血作培养，培养结果阴性者立即淘汰。

1.3.4 指标检测 观察饲养 5d 后，取耳中动脉血 1ml，做细菌培养并进行菌落计数，评价单位为 CFU/ml。然后静脉注射过量的戊巴比妥钠将其处死。立即在无菌条件下打开胸腔，小心分离出右侧颈总动脉，沿导管剪开，观察导管位置。凡是导管不在心脏内的一律淘汰。然后仔细检查并分离主动脉瓣赘生物及心室腔内的赘生性(壁性赘生物)，在无菌条件下称重，加入 1ml 生理盐水匀浆后做细菌培养和菌落计数，评价单位为 CFU/g 赘生物。并对心内膜进行病理切片观察病变情况。

1.4 统计学处理

实验结果采用 SPSS11.0 软件进行分析。计量资料采用 t 检验($x \pm s$)，检测结果采用方差分析，组间两两比较用 SNK 法。

2 结 果

2.1 判断模型成功的条件

本实验判断心内膜炎是否成功必须具备：(1)注射细菌后第 2d 血液培养结果阳性；(2)导管前端在心室腔内；(3)主动脉瓣有赘生物；(4)有壁性赘生物。这四者缺一不可，不符合条件者予以淘汰[7]。

2.2 实验结果

对照组：处死后发现，本组 6 只动物导管前端均在心脏内，主动脉瓣及心室腔内均无赘生物生长。OG1RF 感染组 8 只，手术后未感染前死亡 1 只，感染后第 2d 死亡 1 只。将最后 6 只兔处死后发现，每个动物的主动脉根部瓣膜与导管的接触缘均有大小不等的息肉状或疣状赘生物，单个或多个成排环型排列，质地松软，呈灰白色半透明状。每个动物均有壁性赘生物，较主动脉瓣赘生物大，其形状不规则，质地更脆弱，颜色为绿、黄、红、白色混合存在，特别容易剥脱。sprE mutant 感染组 8 只，手术后未感染前死亡 1 只，处死后，发现导管未在心腔予以剔除 1 只。剩余 6 只处死后发现，每只动物均有赘生物，分布与 OG1RF 感染组相似，但从肉眼上看，OG1RF 组的赘生物较 sprE mutant 组明显多而大(图 1)。组织切片发现：在主动脉根部、二尖瓣及左心室底部心内膜均有赘生物形成。OG1RF 组赘生物周围瓣膜纤维化增厚，有大量炎细胞侵润及出血，赘生物有局部坏死。内膜充血水肿明显，呈弥漫性炎细胞侵润，并有溃疡形成；心肌组织有局灶性变性、坏死、纤维化、心肌间质水肿，有炎细胞侵润，sprE mutant 组炎症相对较轻(图 2)。血液培养、赘生物重量及培养结果显示差异有显著性，结果见表 1。

3 讨 论

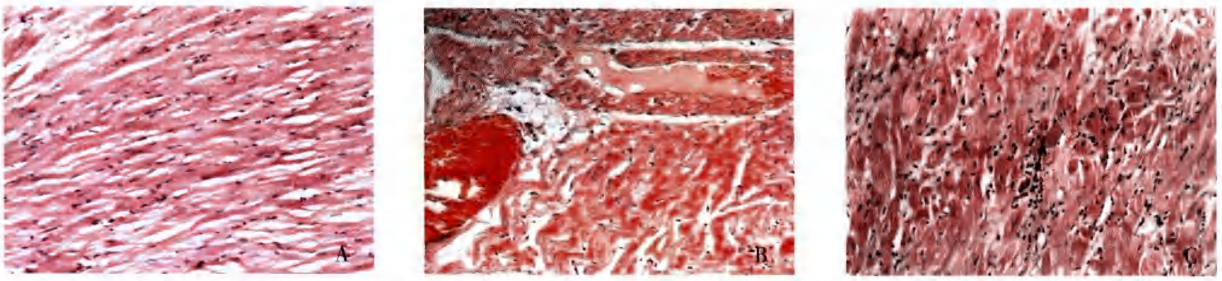
粪肠球菌感染的致病机制复杂，有许多因子参与该病的发生，SprE 虽然证实与细菌耐高温和抗氧化作用相关，但与粪肠球菌毒力的相关性尚不清



A. 对照组：主动脉瓣、二尖瓣和室壁光滑无赘生物；B. 野生株组 OG1RF 组：主动脉瓣、二尖瓣和室壁上均有大块淡黄色赘生物；C. sprE 突变组：hyl mutant 组 主动脉瓣、二尖瓣和室壁上有小的颗粒状赘生物

图 1 赘生物肉眼观

维普资讯 http://www.cqvip.com



A. 对照组:心肌纤维形态和排列大致正常; B. OG1RF 组:赘生物周圈有出血、炎细胞侵润、脓性血栓,局部有坏死,周围组织纤维化增厚,心肌组织有局灶变性、坏死、纤维化; C. sprE 突变组 心肌局部见炎症细胞侵润和维母细胞增生,心肌间质水肿、有炎细胞侵润

图 2 心内膜,病理切片(苏木素-伊红 染色× 200)

表 2 兔心内膜炎模动物感染后赘生物重量、血液培养和菌落计数结果

分组	数量	体重(g)	菌落计数(CFU/ml)	瓣膜赘生物		室壁赘生物	
				重量(g)	菌落计数(CFU/g)	重量(g)	菌落计数(CFU/g)
对照组	6	2.38	0	0	0	0	0
OG1RF	6	2.41	$(3.67 \pm 0.65) \times 10^{3*}$	$0.1075 \pm 0.0182^{*}$	$(3.53 \pm 0.56) \times 10^{6*}$	$0.1976 \pm 0.0226^{*}$	$(7.22 \pm 0.63) \times 10^{6*}$
SprE mutant	6	2.43	$(4.18 \pm 0.38) \times 10^{2**}$	$0.0199 \pm 0.0228^{**}$	$(2.37 \pm 0.68) \times 10^{5**}$	$0.1368 \pm 0.0181^{**}$	$(7.43 \pm 0.49) \times 10^{5**}$

sprE mutant 与对照组、OG1RF 组相比较,$^{**}P<0.01$;OG1RF 组与对照组相比较,$^{*}P<0.01$

楚。兔心内膜炎模型则可用于临床上引起急性或亚急性心内膜炎的病原菌毒力强弱的判断,特别是用于药物疗效评价的指标。临床上既可用于评价心内膜炎病人瓣膜功能严重失调而导致心力衰竭时的情况,本实验建立的模型同时还增加了既可反映心内膜的感染情况,又可直接或间接反映心脏功能损害程度的指标,更有利于观察一些既有抗菌作用又有心脏保护作用的药物的疗效,对于评价细菌的毒力和筛选治疗亚急性心内膜炎的药物具有重要的价值[7-9]。

心内膜炎的发生主要与 2 个因素有关[10]:(1)心内膜损伤。胶原纤维暴露,血小板和纤维蛋白沉积,形成血小板纤维蛋白微血栓,并可机化,为细菌的粘着创造了条件。本实验作心脏插管就是为造成主动脉瓣和心室腔内膜损伤。(2)菌血症。在有心内膜损伤的情况下,如有大量细菌入侵,细菌即可附着到已有损伤的心内膜表面,生长繁殖,引起炎症。从本实验结果来看,模型制作非常成功,2 个感染组存活到最后的动物的模型成功率为 100%,而且检测结果差异有显著性。这里需要注意几个关键性的问题:①导管的粗细、柔软度要合适。如果导管过粗会增加插管的难度,过硬会刺伤血管或心脏,导致动物死亡。②分离赘生物时要仔细、小心,不要弄破赘生物。同时也要与周围组织分离好。③本实验所用的细菌量较大。巍瑾等[11]用金黄色葡萄球菌作心内膜炎时,金黄色葡萄球菌的用量仅为 10^{6}CFU,而我们用到了 10^{8}CFU,一是由于粪肠球菌本身毒力远远小于金黄色葡萄球菌,10^{6}CFU 的量不会导致严重的全身感染;二是我们在预实验中发现用 10^{6}CFU 的量不足以导致心内膜炎,10^{7}、10^{8}、10^{9}CFU 的量都可以有赘生物形成,但 10^{7}CFU 的量所形成的赘生物较小。从我们的实验结果,10^{8}CFU 的粪肠球菌所致的赘生物比较大,易于分离。④本实验所用的时间相对较短。张春芬等[7]在用甲型溶血链球菌制备兔心内膜炎模型时,感染了 7d。而我们只感染 5d,这主要是由于我们在预实验中发现低于 5d,赘生物太小,难以分离。7d 时虽然赘生物较大,易于分离,但是 OG1RF 和 sprE mutant 感染组的赘生物接近,无法比较。只有在 5d 时,赘生物大小可以分离,而且 OG1RF 和 sprE mutant 感染组的赘生物相比较差异最为明显。因此选择了 10^{8}CFU 的细菌浓度,感染 5d 分离赘生物检测用于细菌毒力判断。而感染 7d 分离赘生物检测可能用于筛选治疗心内膜炎的药物较为合适。

维普资讯 http://www.cqvip.com

本实验通过建立粪肠球菌感染的兔心内膜炎模型来评价 sprE 基因在粪肠球菌致病中的毒力作用。实验结果显示在兔心内膜炎模型,所形成的赘生物无论从肉眼观,还是赘生物称重,菌落计数等方面 OG1RF 组都比 sprE mutant 组明显。由此可见,兔心内膜炎模型构建是成功的。可利用此模型对肠球菌的毒力进行研究和评价。

参 考 文 献

[1] Jones RN. Impact of changing pathogens and antimicrobial susceptibility patterns in the treatment of serious infections in hospitalized patients[J]. Am J Med,1996;100(6A):3-12.

[2] Kristich CJ,Li YH,Cvitkovitch DG,et al. Esp-Independent Biofilm Formation by Enterococcus faecalis[J]. J Bacteriology,2004;186(1):154-163.

[3] Mylonakis E,Engelbert M,Qin X,et al. The Enterococcus faecalis fsrB gene,a key component of the fsr quorum-sensing system, is associated with virulence in the rabbit endophthalmitis model[J]. Infect Immun,2002;70(8):4678-4681.

[4] Singh KV,Qin X,Weinstock GM,et al. Generation and testing of mutants of Enterococcus faecalis in a mouse peritonitis model[J]. J Infect Dis,1998;178(5):1416-1420.

[5] Pai SR,Singh KV,Murray BE. In Vivo Efficacy of the Ketolide ABT-773(Cethromycin) against Enterococci in a Mouse Peritonitis Model[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy,2003;47(8):2706-2709.

[6] 吴利先,黄文祥.sprE 基因敲除粪肠球菌突变株的构建和功能的初步研究[J]. 中国人兽共患病学报,2006;22(9):828-832

[7] 张春芬,张金萍,王 清,等.免急性细菌性心内膜炎的制作方法[J]. 中国现代应用医学杂志,2000;17(3):174-178.

[8] Jacqueline C,Asseray N,Batard E,et al. In vivo efficacy of linezolid in combination with gentamicin for the treatment of experimental endocarditis due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus[J]. International Journal of Antimicrobial Agents,2004;24(4):393-396.

[9] Singh KV,Qin X,Weinstock GM,et al. Generation and testing of mutants of Enterococcus faecalis in a mouse peritonitis model[J]. J Infect Dis,1998;178(5):1416-1420.

[10] Besnier JM,Bastides F,Choutet P,et al. Therapy of infections due to methicillin susceptible Staphylococcus aureus(MSSA)[J]. Med Mal Infect,1997;27(1):225.

[11] 魏 瑾,李家泰.甲氧西林耐药金葡菌所致实验性心内膜炎的研究[J]. 中国临床药理学杂志,1996;12(1):46.

(责任编辑:谭乐勤)

(上接第 418 页)

[1] Moss ML,Jin SL,Milla ME,et al. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour necrosis factor-alpha [J]. Nature,1997;385(6618):733-736.

[2] 日本生理学会,主编. 生理学实验[M]. 第3版.北京:北京人民卫生出版杜,1980.180.

[3] Amantha T,Carl PB,Daniel DC. Tumor necrosis factor-α converting enzyme/ADAM 17 mediates MUC1 shedding[J]. The Journal of Biological Chemistry,2003;278(5):3386-3394.

[4] Black RA,Rauch CT,Kozlosky CJ,et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells[J]. Nature,1997;385(6618):729-733.

[5] 郑 展,徐振晔.表皮生长因子受体及其信号转导通路与中西药肿瘤靶向治疗[J]. 中西医结合学报,2005;3(4):318-321.

[6] Fata JE,Chaudhary V,Khokha R.Cellular turnover in the mammary gland is correlated with systemic levels of progesterone and not 17beta-estradiol during the estrous cycle[J]. Biol Reprod,2001;65(3):680-688.

[7] 孔利佳,汤宏斌,主编.实验动物学[M]. 第 1 版.湖北:湖北科学技术出版社,2002.12.

[8] Profet M. Menstruation as a defense against pathogenas transported by sperm[J]. Q Rev Biol,1993;68(3):335-386.

[9] Herz Z,Northey D,Lawyer M,et al.Acrosome reaction of bovine Spermatozoa in vivo:Sites and effects of stages of the estrous cycle [J]. Biol Reprod,1985;32(5):1163-1168.

(责任编辑:冉明会)