维普资讯 http://www.cqvip.com

论著 文章编号:0253-3626(2007)01-0004-04

肠球菌小鼠腹膜炎模型的建立

吴利先,黄文祥,孙小平

(重庆医科大学附属第一医院感染科,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立肠球菌毒力相关性小鼠腹膜炎模型,用于肠球菌类毒力因子的研究。方法:用粪肠球菌标准毒株 OG1RF 和粪肠球菌 sprE 基因缺陷突变株来建立小鼠腹膜炎模型,通过腹膜炎指标的检测来判断毒力下降情况。结果:突变株在小鼠腹膜炎模型中的半数致死量(LD_{50})提高了 7 倍,存活率也明显高于标准株。6h 和 12h 外周血白细胞变化低于标准株,6h 腹水 TNF-α 水平和活化 TNF-α 低于标准株组。结论:肠球菌毒力相关性小鼠腹膜炎模型建立成功,可用于肠球菌其它可能毒力因子的研究。

【关键词】肠球菌;腹膜炎模型;毒力

【中国图书分类法分类号】R378 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-04-29

Construction of mouse peritonitis models of Enterococcus

WU Lixian, et al

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

【Abstract】*Objective*: To construct mouse peritonitis models of Enterococcus for the study of the putative virulence factor of Enterococcus. *Methods*: We used the standard strain OG1RF and sprE gene deficient mutant of Enterococcus faecalis to construct mouse peritonitis models. And the index of peritonitis was detected to measure the virulence decrease of sprE mutant. *Results*: It was showed that 50% lethal dose (LD50) of sprE mutant was 7 times than that of standard strain OG1RF, and its survival rate was also prominently that of OG1RF in the mouse peritonitis model; while the change of blood leukocytes of sprE mutant group was lower than that of standard stain at 6 hour and 12 hour; So were the TNF-α level in peritoneal fluid and active TNF-α in peritonitis at 6 hour. *Conclusion*: The peritonitis models of Enterococcus was constructed successfully, which would be used to study other putative virulence factor of Enterococcus face-ali.

【Key words】Enterococcus; Mouse peritonitis models; Virulence

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(Enterococcus faecalis)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。在国外小鼠腹膜炎模型常用于评价细菌毒力强弱和药物干预的效果[4,5],国内也有人用大鼠腹膜炎模型来评价抗生素的疗效[6]。为了寻找肠球菌的毒力因子研究的有效模型,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小鼠腹膜炎模型,来观察与标准菌株相比毒力下降情况和腹膜组织炎症因子的表达情况,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,博士生,副教授,
主要研究方向:细菌的致病机制和防治。

基金项目:国家自然科学基金项目(30475995)。

1 材料和方法

1.1 动物

清洁级 ICR 小鼠,雌性,22~25g 购自上海必凯实验动物有限公司。

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[7]。BHI培养基(美国 Defico 公司),小鼠细胞因子 TNF-α 检测试剂盒,山羊抗小鼠 TNF-a 抗体,兔抗山羊 IgG-FITC(深圳晶美),激光共聚

维普资讯 http://www.cqvip.com

焦显微镜(德国来卡),Sysmex R-3500 全自动血细胞分析仪(日本东亚公司)。

1.3 OG1RF 和 sprE mutant 感染鼠腹膜炎模型建立

1.3.1 无菌鼠粪提取物(sterile rat fecal extract,SRFE)的制备 鼠粪干燥,压碎成粉,用无菌蒸馏水配制成 50%浓度后离心,将鼠粪排泄物无菌分离,提取物高压灭菌,干燥后配成 20%的 SRFE 备用。

1.3.2 菌液的制备 各取 300ml BHI 肉汤培养基,分别接种 OG1RF 和 sprE mutant,以 150r/min37℃震荡培养过夜。10℃下 9000r/min 离心取沉淀。用 50ml 预冷的生理盐水混匀同前离心取沉淀,同法洗菌 3 次。最后沉淀用 20ml 预冷的盐水混匀,配制浓度为 5×10^{10}CFU/ml 的菌液 4℃保存备用[4]。

1.3.3 急性腹膜炎模型的建立 将小鼠随机分为 7 组,每组 6 只。将上述保存菌液均分别配制成 10^7、10^8、10^9cfu/ml 的浓度[9]。每个浓度用 1ml 加入 9ml 20%的 SPFE 混合,按 1ml 混合液每只的量进行小鼠腹腔注射,只注射 SRFE 作对照。每 3h 观察并记录死亡情况,绘制存活率曲线。同时绘制回归曲线计算半数致死量 LD_{50}[10]。对死亡的小鼠分别取肝、脾和肾匀浆和腹腔液进行细菌培养。

1.3.4 腹膜炎其它指标的检测 用上述方法另取 7 组小鼠同法注射后于 6h,12h 和 24h 分别取外周血用全自动细胞计数仪进行白细胞计数,正常小鼠作空白对照。6h 取血后的小鼠将其固定在解剖台上,从腹腔注射 2ml 生理盐水充分混匀后,吸出所有液体于 500r/min 离心 15min,取上清置 -80℃保存用于 TNF-α 的检测[11]。24h 取血后的小鼠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。

1.3.5 腹膜活性TNF-α蛋白检测[6] 取腹腔液检测 TNF-α 后的小鼠取脏层腹膜石蜡切片,于 60℃烘干融蜡后用二甲苯脱蜡,梯度乙醇处理,TNF-α 用柠檬酸钠缓冲液(pH6.0)微波中火修复 10min,10%正常兔血清 37℃封闭 30min,以 PBS 代替 I 抗做空白对照,加 I 抗 4℃孵育过夜,加 FITC 标记Ⅱ抗 37℃孵育 45min,碘化丙啶(PI,1∶100)复染细胞核 5min,激光共聚焦显微镜观察信号蛋白阳性表达并利用图像分析系统计算荧光信号的平均荧光强度或阳性细胞数(每只小鼠随机选取 10 个高倍视野)。

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($\bar{x}\pm s$),检测结果采用方差分析,组间两两比较用 SNK 法。

2 结 果

2.1 LD_{50}

参照 Reed 等[10]的方法绘制回归曲线计算得 OG1RF 的 LD_{50} 为 1.3×10^8,sprE mutant 的 LD_{50} 为 9.2×10^8,SprE 基因敲除后 LD_{50} 提高了约 7 倍。

2.2 存活率曲线

根据每 3h 观察记录死亡情况,绘制死亡率曲线。sprE mutant 组腹膜炎小鼠的存活率也较 OG1RF 组有明显提高,差异有显著性,结果见图 1。死亡小鼠肝、脾、肾匀浆和腹腔液培养显示为单一细菌感染致死。

2.3 外周血白细胞计数结果

外周血白细胞 6h 开始升高,12h 升高更明显,OG1RF 组升高较 sprE mutant 组明显。但 24h 后却急剧下降,OG1RF 组下降更明显,结果见表 1,此时小鼠开始有死亡。

2.4 急性期细胞因子检测结果

6h 后急性期细胞因子 TNF-α 急剧升高,OG1RF 组升高较 sprE mutant 组显著,结果见图 2。

2.7 活性 TNF-α 的检测结果

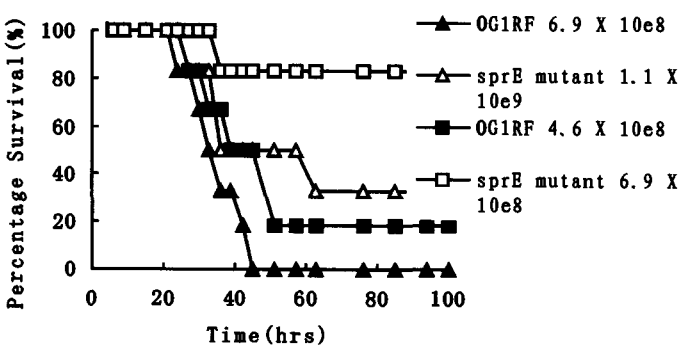


图 1 OG1RF 和 sprE mutant 致小鼠腹膜炎模型的存活率曲线

$P<0.01$,P 值指的是突变株 *sprE 在同样或更低细菌接种浓度下与 OG1RF 相比而言(△对▲或□对■)

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 腹膜炎模型动物感染后白细胞改变情况

Group	Numbers	The time of infection(h)		
		6	12	24
Control	6	4.35 ± 0.32	4.41 ± 0.25	4.36 ± 0.28
OG1RF	6	9.73 ± 0.25	12.61 ± 0.34	2.14 ± 026
sprE mutant	6	7.52 ± 0.32*	9.85 ± 0.23*	3.72 ± 0.21*

*$P < 0.05$, P 值指的是突变株 sprE 分别与对照组和 OG1RF 组比较而言

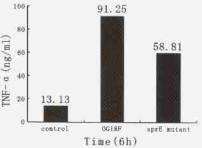


图 2 腹膜炎模型动物感染后 6h 急性炎症因子 TNF-α 的改变情况

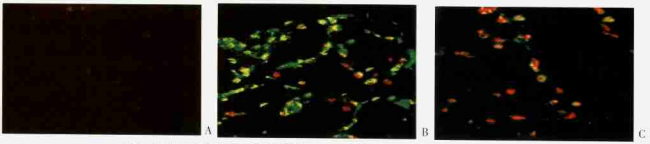


图 3 急性腹膜炎模型小鼠腹膜活性 TNF-α 蛋白的表达(荧光染色×400,6h)

A:对照组的 TNF-α; B:OG1RF 组的 TNF-α; C:sprE mutant 组 TNF-α

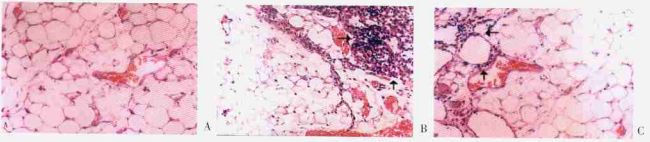


图 4 肠系膜病理切片(HE 染色×200,24h)

A:对照组:肠系膜中没有炎性细胞浸润; B:OG1RF 组:肠系膜中有大量的炎性细胞浸润; C:sprE mutant 组:肠系膜中有少量的炎性细胞浸润

对照组为阴性或微弱表达, 在 OG1RF 腹膜炎组高表达,sprE mutant 腹膜炎组显著低于 OG1RF 腹膜炎组,见图 3。

2.8 肠系膜切片

肠系膜超薄切片显示 OG1RF 组肠系膜炎症细胞浸润较 sprE mutant 组明显,见图 4。

3 讨 论

随着第 3 代头孢菌素在临床广泛应用,医院 G⁻杆菌感染的发生率有所下降,但由于抗生素的选择压力,导致 G⁺球菌感染的发生率明显上升,其中以葡萄球菌和肠球菌为主[1]。通常认为肠球菌毒力较

维普资讯 http://www.cqvip.com

弱，是人体正常菌群，很少导致人体感染。随着耐药肠球菌的逐渐增多且多重耐药，肠球菌感染越来越明显，给医院感染和治疗带来难题，肠球菌耐药性的研究也日趋引起重视。由于细菌的致病性主要由其毒力因子决定，导致肠球菌感染率上升的原因除了耐药率的升高外，可能与其毒力增强或获得新的毒力基因有关。研究粪肠球菌的毒力基因及其感染的发病机理，寻找其有效的保护性候选抗原，是预防和控制粪肠球菌感染最有效的方法。但是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。毒力因子的研究缺乏有效的动物模型来评价。小鼠腹膜炎模型是用于判断细菌毒力强弱指标 LD_{50} 的最经典的模型，一些新发现的病原菌以及通过减毒后获得的菌株都是用小鼠腹膜炎模型通过 LD_{50} 来判断其毒力，同时也是药物干预效果评价的重要指标[4]。为了进一步有效的研究肠球菌可能毒力因子致病性的强弱，笔者在构建了粪肠球菌 sprE 基因缺陷突变株的基础上，通过建立粪肠球菌感染的小鼠腹膜炎模型来评价 sprE 基因在粪肠球菌致病中的毒力作用。

在建立粪肠球菌小鼠腹膜炎模型的过程中，采用了 10^7、10^8、10^9CFU/ml 3 个细菌浓度。虽然 3 个浓度均可引起小鼠腹膜炎，但用 10^7CFU/ml 细菌浓度偏低，小鼠的死亡率极低甚至不死亡；10^9CFU/ml 细菌浓度又偏高，小鼠的死亡率很高，而且速度很快；10^8CFU/ml 细菌浓度相对来说比较合适。而 LD_{50} 是细菌毒力检测的最基本指标，是建立在不同死亡率浓度基础上绘制的回归曲线，并通过曲线计算出 LD_{50}。因此我们选择了 10^7、10^8、10^9CFU/ml 3 个细菌浓度所致的不同腹膜炎小鼠死亡率来绘制回归曲线计算 LD_{50}。实验结果显示在小鼠腹膜炎模型中 sprE mutant 的 LD_{50} 较 OG1RF 提高了 7 倍以上。在 OG1RF 基础上增大 sprE mutant 的细菌感染量，其存活率仍 OG1RF 株高，差异有显著性。在感染后 6h 小鼠发生了急性炎症，其急性期细胞因子 TNF-α 急剧升高，腹膜活化 TNF-α 的表达量也升高，但 OG1RF 升高比 sprE mutant 显著。感染后 6、12h 外周血白细胞均有升高，但 OG1RF 升高比 sprE mutant 明显，而 24h 后由于大量白细胞渗出到腹腔参与抗感染，加上小鼠全身感染严重，一般情况极差，濒临感染性休克、DIC、甚至死亡，小鼠造血功能严重受损，外周血白细胞急剧下降，OG1RF 的下降的幅度较 sprE mutant 明显。由此可见，小鼠毒力相关性腹膜炎模型构建是成功的。可利用此模型对肠球菌可能的其它毒力因子进行研究和评价。

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(6):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] Moy TI,Mylonakis E,Calderwood SB,et al.Cytotoxicity of hydrogen peroxide produced by Enterococcus faecium[J].Infect Immun,2004;72(8):4512-4520.

[4] Singh KV,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.

[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] 贾占军，余学清，王 欣，等.抗生素治疗对急性腹膜炎大鼠腹膜组织炎症因子表达及腹膜转运功能的影响[J].中国病理生理杂志，2005;21(7):1298-1304.

[7] 吴利先，黄文祥.粪肠球菌 sprE 基因的功能研究[J].中华微生物学与免疫学杂志，2005;25(10):841.

[8] XU Y,Singh KV,Qin X,et al.Analysis of a Gene Cluster of Enterococcus faecalis Involved in Polysaccharide Biosynthesis[J].Infect Immun,2000;68(2):815-823.

[9] Reed LJ,Muench H.A simple method of estimating fifty,percent endpoints[J].Am J Hyg,1938;27:493-497.

[10] Herve Dupont,Philippe Montravers,Jacqueline Mohler,et al. Disparate Findings on the Role of Virulence Factors of Enterococcus faecalis in Mouse and Rat Models of Peritonitis[J].Infect Immun,1998;66(6):2570-2575.