

出血性大肠埃希菌 O157:H7 广东分离株 对小鼠致病性的研究

谢运冰, 顿 灿, 王 玉, 郭霄峰

(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:探索肠出血性大肠埃希菌 *Escherichia coli* O157:H7 广东分离株 021210 (Nal^R) [以下简称 O157:H7 021210 (Nal^R)] 对小鼠的半数致死量 (LD₅₀), 揭示其在小鼠体内产生的病理变化. 将 20 日龄的昆明鼠随机分组, 饮水中加入萘啶酮酸预处理, 消除肠道杂菌, 再分别以不同剂量腹腔注射 O157:H7 021210 (Nal^R), 进行临床观察和病理学检查. 测定出 LD₅₀, 试验结果表明一定剂量的 O157:H7 021210 (Nal^R) 可引起小鼠主要脏器及肠道发生病变.

关键词:肠出血性大肠埃希菌 O157:H7; 小鼠; 半数致死量; 病理变化

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2012)01-0120-03

Study of Pathological Changes in Mice Caused by Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 021210 Strain

XIE Yun-bing, DUN Can, WANG Yu, GUO Xiao-feng

(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The study was conducted to explore LD₅₀ and pathological changes in mice caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Methods weaned mice were inoculated via enterocoelia inoculation with different doses of *E. coli* O157:H7 021210 strain and simultaneously treated with nalidixic acid to determine LD₅₀. Many pathological changes were seen in mice caused by *E. coli* O157:H7.

Key words: enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7; mice; LD₅₀; pathological changes

肠出血性大肠埃希菌 *Escherichia coli* O157:H7 (以下简称 O157:H7) 可引起人的出血性结肠炎 (Hemorrhagic colitis, HC), 引发溶血性尿毒综合征 (Haemolytic uraemic syndrome, HUS) 及血栓性血小板减少紫癜 (Thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP) 等并发症. 近年来, O157:H7 引发人的疾病在世界各地包括中国时有暴发流行, 对人类健康和环境安全造成巨大威胁, 引起各国的广泛关注. 动物模型在研究肠出血性大肠埃希菌的毒力因子、发病机理及免疫保护反应方面具有重要作用, 对于研究和筛选新疫苗以及评价免疫保护力更是必不可少的. 目前报道的动物模型多采用小鼠, 也有采用牛、猪或乳兔等, 但由于多数实验动物对 O157:H7 均不

易感, 效果大都不理想^[1-4]. 笔者用萘啶酮酸对离乳小鼠进行处理, 提高了小鼠对 O157:H7 的易感性, 使小鼠出现严重的临床症状甚至死亡并测定出半数致死量 (LD₅₀), 为以后对 O157:H7 毒力因子的进一步研究奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 菌株

O157:H7 021210 (Nal^R) 株 [以下简称 021210 (Nal^R)], 由华南农业大学兽医学院微生物教研室谢运冰分离并保存.

1.2 试验动物

普通昆明鼠, 20 日龄, 体质量 10 ~ 12 g, 性别随

收稿日期: 2010-12-01

作者简介: 谢运冰 (1985—), 男, 硕士研究生; 通信作者: 郭霄峰 (1963—), 男, 教授, 博士, E-mail: xfguo@scau.edu.cn

机. 由广东省实验动物中心提供.

1.3 试剂

萘啶酮酸(Nalidixic acid)为 Sigma 公司产品.

1.4 菌液制备

将 021210 (Nal^R) 株划线接种于 LB 固体培养基,挑单菌落,液体 LB 培养基 37 ℃ 恒温振荡培养过夜,菌液 4 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,以 1 mL 8.5 g/L 的灭菌生理盐水重悬菌泥. 菌液同时作倍比稀释,涂布 LB 固体培养基,进行菌落计数.

1.5 动物接种

将 30 只 20 日龄左右的小鼠随机分为 6 组,每组 5 只,腹腔注射前 3 d 饮水中添加萘啶酮酸 (50 μg/mL),编号并称质量,记录所得数据. 腹腔注射 021210 (Nal^R),第 1 组每只 2.5×10^9 个活菌,第 2 组每只 5×10^8 个活菌,第 3 组每只 1×10^8 个活菌,第 4 组每只 2×10^7 个活菌,第 5 组每只 4×10^6 个活菌,第 6 组为对照组,每只注射生理盐水 200 μL.

1.6 观察

记录小鼠体质量并观察其临床症状,统计小鼠死亡数,按寇氏改良法计算 LD_{50} ,死亡小鼠剖检、进行病理学观察,组织学检查. 未死亡小鼠 8 d 后处死,剖检并进行病理学观察.

2 结果

2.1 临床观察

第 1~5 组小鼠腹腔注射 021210 (Nal^R) 1~2 d 后体质量骤降,行动迟缓,精神不振,食欲欲随注射剂量大小呈不同程度降低,被毛粗乱. 第 1 和第 2 组小鼠攻毒后 1~3 d 内陆续死亡,第 3 组有 4 只小鼠接种后 3~4 d 死亡,有 1 只小鼠 5 d 后症状减轻,体质量开始逐渐增加. 第 4 组有 2 只小鼠分别于 5~6 d 死亡. 第 5、6 组未见临床症状. 各组小鼠未出现腹泻症状. 各组平均体质量变化见图 1. 试验

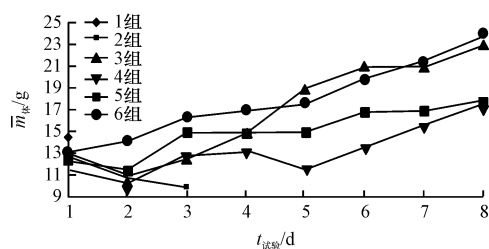


图 1 离乳小鼠感染不同剂量 021210 (Nal^R) 后平均体质量变化

Fig. 1 Average mass changes in weaned mice caused by 021210 (Nal^R)

结果表明,经萘啶酮酸处理后,021210 (Nal^R) 活菌对

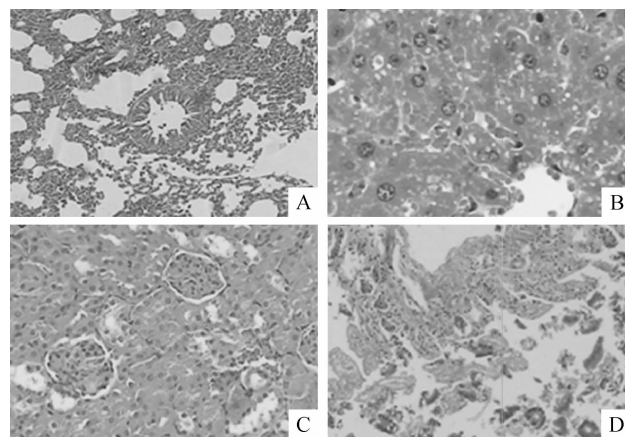
离乳小鼠的 LD_{50} 为 7.2×10^7 CFU.

2.2 病理学观察

将腹腔注射 021210 (Nal^R) 致死的小鼠剖检后观察发现其肺脏膨大,出现不同程度的淤血、水肿等病理变化;肝脏表面色泽变深,肿大,切面外翻;肾脏眼观无明显变化;腹腔内有黄色恶臭液体渗出,肠粘膜水肿,局部出现充血. 取肝脏血液、肾脏血液、腹水、肠积液培养,各组均可获得原 021210 (Nal^R) 菌株. 耐过小鼠和对照组小鼠 8 d 后剖检未见病变.

2.3 病理组织学观察

发病引起死亡的小鼠肺脏支气管上皮细胞脱落,肺泡壁严重淤血、炎性细胞浸润 (图 2A). 肝脏轻微淤血,肝细胞脂肪变性 (图 2B). 肾小管上皮细胞变性、肿胀,间质出血;肾小球毛细血管细胞肿胀 (图 2C). 肠管各层结构严重破坏,黏膜坏死脱落 (图 2D).



A: 肺脏; B: 肝脏; C: 肾脏; D: 肠道.

图 2 各器官病理组织学变化

Fig. 2 Pathological changes in organs

3 讨论

肠出血性大肠埃希菌 O157: H7 可通过食物、水传播,主要致病特点是通过特殊的粘附分子粘附靶器官,产生类志贺毒素 (Stx1 和 Stx2) 和肠溶血素 (hly) 等,感染后引起人的腹泻、出血性结肠炎、溶血性尿毒综合症和血小板减少性紫癜.

国内外的研究表明,成年的 IQI、BALB/c、昆明鼠等对 O157: H7 均不易感^[5-6]. Fujii 等^[7] 使用链霉素处理的小鼠,在接种 O157: H7 同时注射丝裂霉素,能导致急性致死性脑病,通常在 4 d 内死亡. 陈亢川等^[8] 以 O157: H7 经腹腔注射感染小鼠,出现了临床症状及死亡. 孙洋等^[9] 使用丝裂霉素和萘啶酮酸处理

的离乳小鼠,经口服途径感染 O157: H7,出现了主要病理变化和部分临床症状。但这些试验均未摸索出 O157: H7 的半数致死量,为后续的研究带来了不便。

本试验在小鼠饮水中加入萘啶酮酸(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。萘啶酮酸抑制了小鼠体内的正常菌群,增强了 021210 (Nal^R) 株对小鼠的易感性。经过腹腔注射活菌的小鼠 1~5 d 内发病、死亡,未出现腹泻症状。O157: H7 感染人引起的组织病理学变化为肠道的出血、水肿,本试验以 20 日龄昆明鼠为动物模型复制出了这种变化,且病变严重,肠管各层结构严重破坏,黏膜坏死脱落。021210(Nal^R) 株感染小鼠肺脏的病变更明显,组织病理变化包括支气管上皮细胞脱落,肺泡壁严重淤血、炎性细胞浸润,肺泡壁严重淤血,其原因可能是小鼠肺脏有更多的 Stx 受体——球丙糖酰基鞘氨醇。人肾脏组织病理学变化包括肾小球内皮细胞肿胀和血小板及纤维素在肾小球的沉积^[10]。本试验证明 021210(Nal^R) 株能够引起小鼠肾脏肾小管上皮细胞变性,间质出血,肾小球毛细血管细胞肿胀等实质细胞的损伤。肝脏淤血,肝细胞脂肪变性。本试验详细记录了小鼠从接菌到死亡或恢复期间的体质量变化过程,及其间小鼠的行为变化,并且测算出在该动物模型中 021210 (Nal^R) 株的 LD_{50} 。 LD_{50} 的测定使 021210(Nal^R) 株与其他不同菌株或疫苗候选株的比较有了一个准确的剂量参照,为以后的进一步研究做好了铺垫。

试验表明,离乳昆明小鼠通过萘啶酮酸的作用,对 O157: H7 感染的敏感性有一定提高,并由此测定出了小鼠的 LD_{50} ,感染 O157: H7 的小鼠出现了大量的组织病理学变化。 LD_{50} 的测定和该动物模型的建立为进一步研究肠出血性大肠埃希菌 O157: H7 的致病性、主要毒力因子的作用奠定了基础。

参考文献:

- [1] TAGUCHI H, TAKAHASHI M, YAMAGUCHI H, et al. Experimental infection of germ-free mice with hyper-toxigenic enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7, strain 6 [J]. Med Microbiol, 2002, 51(4): 336-343.
- [2] GRAUKE L J, KUDVA I T, YOON J W, et al. Gastrointestinal tract location of *Escherichia coli* O157: H7 in ruminants [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(5): 2269-2277.
- [3] DONNENBERG M S, TZIPORI S, MCKEE M L, et al. The role of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment *in vitro* and in a porcine model [J]. Clin Invest, 1993, 92(3): 1418-1424.
- [4] GARCIA A, MARINI R P, FENG Y, et al. A naturally occurring rabbit model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* induced disease [J]. Infect Dis, 2002, 186(11): 1682-1686.
- [5] ISOGAI E, ISOGAI H, HAYASHI S, et al. Effect of antibiotics, levofloxacin and fosfomycin on a mouse model with *Escherichia coli* O157 infection [J]. Microbiol Immunol, 2000, 44(2): 89-95.
- [6] 王忠泽, 侯晓军, 荫俊, 等. 抗大肠杆菌 O157: H7 鸡卵黄抗体的制备及其被动保护作用的研究 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2002, 18(2): 17-19.
- [7] FUJII J, KITA T, YOSHIDA S, et al. Direct evidence of neuron impairment by oral infection with verotoxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 in mitomycin-treated mice [J]. Infect Immun, 1994, 62(8): 3447-3453.
- [8] 陈亢川, 郭维植, 程法稷, 等. 福建省 O157 大肠杆菌调查 [J]. 中华预防医学杂志, 2000, 34(3): 156-158.
- [9] 孙洋, 刘军, 冯书章, 等. 肠出血性大肠杆菌 O157: H7 感染小鼠模型的初步建立 [J]. 实验动物科学与管理, 2003, 20(4): 6-9.
- [10] MOAKE J L. Haemolytic-uraemic syndrome: Basic science [J]. Lancet, 1994, 343: 393-397.

【责任编辑 柴 焰】