

免疫抑制大鼠 MRSA 定植模型的构建*

董鹏霞¹, 托 娅^{2△} (1. 内蒙古医科大学, 呼和浩特 010050; 2. 内蒙古医科大学附属医院检验科, 呼和浩特 010050)

【摘要】 目的 应用环磷酰胺(CTX)构建免疫抑制大鼠耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)鼻黏膜定植模型。**方法** 将 Wistar 大鼠随机分为对照组和模型组, 每组 12 只, 雌雄各半。模型组大鼠在细菌定植前 3 d 连续肌肉注射 CTX(40 mg/kg), 造成大鼠免疫抑制, 红霉素软膏处理大鼠鼻腔固有菌群, 通过滴鼻方式滴入 10 μ L 新鲜 MRSA 悬液, 连续滴注 3 d。对照组大鼠鼻腔红霉素软膏处理后连续 3 d 滴入 10 μ L 的新鲜 MRSA 悬液。免疫抑制前后分别对模型组大鼠外周血象及免疫学指标进行监测, 并且对免疫抑制及细菌定植后大鼠鼻黏膜组织进行检测。**结果** 模型组大鼠肌肉注射 CTX 6 d 后(CTX 组), 与肌肉注射 CTX 前 1 d(空白组)比较发现, 大鼠外周血象, CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺ T 淋巴细胞, B 淋巴细胞, 以及 NK 细胞较给药前均明显下降($P < 0.01$)。小剂量高浓度的 MRSA 悬液鼻腔滴注, 细菌定植一段时间后, 经免疫组化染色可见金黄色葡萄球菌分布于鼻黏膜组织中。**结论** 成功构建了免疫抑制大鼠 MRSA 定植模型, 该模型可用于进一步研究宿主免疫抑制状态对 MRSA 毒力及耐药性的影响及机制。

【关键词】 甲氧西林; 金黄色葡萄球菌; 免疫抑制; 淋巴细胞; 鼻腔定植

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.07.002 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)07-0880-03

Construction of immunosuppressed rat model of MRSA colonization* DONG Peng-xia¹, TUO Ya^{2△} (1. Inner Mongolia Medical College, Hohhot, Inner Mongolia 010050, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Inner Mongolia Medical College Hospital, Hohhot, Inner Mongolia 010050, China)

【Abstract】 Objective To establish immunosuppressed rat model of MRSA colonization by using cyclophosphamide(CTX). **Methods** Wistar rats were randomly divided into control group and model group, with 6 male rats and 6 female rats in each group ($n=12$). Before bacterial colonization, the rats of model group were given CTX (40 mg/kg) via intramuscular injection for 3 d to depress the immune system. Erythromycin was used to process rats' nasal natural flora, and 10 μ L fresh MRSA bacterial suspension was dropped into nasal for 3 d. The rats of control group were given 10 μ L fresh MRSA bacterial suspension via nasal drip for 3 d, after treatment of erythromycin. The hemogram and immunological indexes of rats of model group were monitored before and after immunologic suppression. And the nasal mucosa tissues of rats were detected after immunologic suppression and bacterial colonization. **Results** 6 d after and 1 d before CTX injection, the rats of model group were called CTX group and blank group, respectively. Comparing with blank group, the hemogram, CD3⁺, CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺ T lymphocytes, B lymphocytes, and NK cells significantly decreased in CTX group ($P < 0.01$). After nasal drip administration with low dose and high concentration of MRSA suspension, the MRSA had colonized on rats' nasal mucosa. Then Staphylococcus aureus distributed in the nasal mucosa tissues were visible via immunohistochemical staining. **Conclusion** The immunosuppressed rat model of MRSA colonization has been established successfully, which can be used in the further research of the effect and mechanism of host immune suppression to the virulence and drug resistance of MRSA.

【Key words】 methicillin; Staphylococcus aureus; immunosuppression; lymphocytes; nasal colonization

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)是造成住院患者医院感染发生及高病死率的主要病原之一^[1-2]。MRSA 在住院患者鼻前庭部位可持续定植达 6 个月或更长, 其持续定植患者是造成 MRSA 医院内传播的主要传染源^[3], MRSA 感染的发生多与免疫低下、实施侵入性治疗和广谱抗菌药物的长期使用等有关。随着异质性万古霉素中介耐药的金黄色葡萄球菌(hVISA)检出率的增高^[4], 以及耐万古霉素金黄色葡萄球菌(VRSA)的不断报道^[5], MRSA 感染控制及新型抗感染药物研

发已成为一个亟待解决的难题。本研究旨在构建免疫抑制大鼠 MRSA 定植模型及正常大鼠 MRSA 定植模型, 为进一步研究宿主环境对 MRSA 毒力变异机制的影响提供实验数据, 并为结合宿主因素研发新型抗 MRSA 感染药物提供新的思路和依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集内蒙古医科大学附属医院检验科临床微生物室常规方法及 Vitek2 鉴定为 MRSA 的临床菌株。

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81260244); 内蒙古自治区自然科学基金资助项目(2014MS0854);

内蒙古医科大学附属医院重大科研项目(NYFY-ZD2012015)。

作者简介: 董鹏霞, 女, 内蒙古医科大学 2012 级在读硕士研究生, 主要从事机体免疫功能及疾病分子诊断。

△ 通讯作者, E-mail: antuoya@163.com。

1.2 菌液制备 血平板上挑取 MRSA 单个菌落,在 LB 液体培养基中 37 ℃ 振荡孵育过夜,当细菌生长至对数期时,12 000 r/min 离心 5 min 收集细菌,用无菌生理盐水快速洗涤 2 次,然后悬浮细菌至 1×10^9 CFU/mL。

1.3 实验动物 SPF 级 Wistar 大鼠 24 只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2012-0001。体质量 180~220 g,雌雄各半,分笼饲养,动物饲养温度 20~24 ℃,相对湿度 50%~60%,自由饮食及饮水。

1.4 仪器与试剂 注射用环磷酰胺(CTX,山西普德药业股份有限公司,批号 04130501);日本日立公司 MEK6450k 三分类血球计数仪;溶血素、FACScalibur 流式细胞仪及大鼠 CD3-APC、CD4-PE、CD8a-FITC、CD45RA-FITC、CD161a-PE 荧光单抗购自美国 BD 公司;兔抗金黄色葡萄球菌单克隆抗体和鼠抗兔第二抗体由华大蛋白公司免疫动物制备。

1.5 模型制备方法 24 只大鼠随机分为模型组(12 只)和对照组(12 只),雌雄各半。模型组大鼠在细菌定植前 3 d 连续肌内注射 CTX(40 mg/kg),10%水合氯醛麻醉,每次在鼻腔定植细菌前,用微型小棉棒取鼻黏膜分泌物接种至血平板,37 ℃ 恒温箱培养 18~24 h。红霉素软膏作用鼻腔固有菌群数分钟后,鼻腔滴入 10 μ L 已制备好的新鲜 MRSA 悬液,连续滴注 3 d。选取 CTX 注射前 1 d(空白组)、注射 6 d 后(CTX 组)两个时间点,对模型组各大鼠外周血进行血常规检测及淋巴细胞亚群分析;对照组大鼠直接麻醉后取鼻黏膜分泌物血平板培养,红霉素软膏作用数分钟后鼻腔滴注 10 μ L 新鲜 MRSA 悬液连续 3 d。

1.6 模型指标评价

1.6.1 大鼠鼻黏膜菌群观察 收集细菌鼻腔定植 0、3、7、14 d(分别记为 Day 0、Day 3、Day 7、Day 14)后大鼠的鼻黏膜分泌物,观察血平板上模型组和对照组各大鼠鼻黏膜上 MRSA 的生长变化状况。

1.6.2 大鼠外周血血象检测 EDTA 抗凝血 20 μ L,加入 2 mL 的标本稀释液中混匀,用三分类血球计数仪检测大鼠外周血中的白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血红蛋白(HGB)及血小板(PLT),统计检测结果。

1.6.3 大鼠外周血淋巴细胞分析 取 EDTA 抗凝全血 50 μ L,分别加入 2 支上样管中,管 A 加入抗大鼠 CD3-APC、CD4-PE 及 CD8a-FITC 混合物 8 μ L;管 B 加入抗大鼠 CD3-APC、CD45RA-FITC 及 CD161a-PE 混合物 8 μ L;漩涡振荡混匀,室温避光孵育 10 min。每管加入 1 $\times$ 溶血素 1 mL,室温避光 7 min,1 500 r/min 离心 5 min,生理盐水洗涤 1 次,500 μ L 生理盐水重悬,流式细胞仪检测 T 淋巴细胞亚群、B 淋巴细胞及自

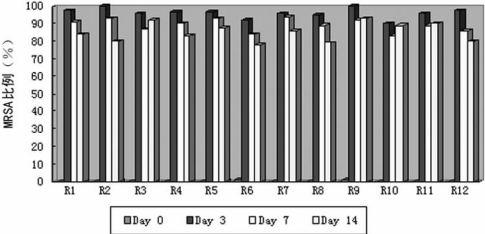
然杀伤(NK)细胞比例。

1.6.4 大鼠鼻黏膜组织病理学观察 处死各组动物后,取部分鼻黏膜组织做组织切片,运用免疫组织化学染色方法确认 MRSA 在大鼠鼻黏膜组织的成功定植。

1.7 统计学处理 应用 SPSS13.0 统计软件进行数据处理及统计学分析,正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P<0.01$ 为差异有统计学意义。

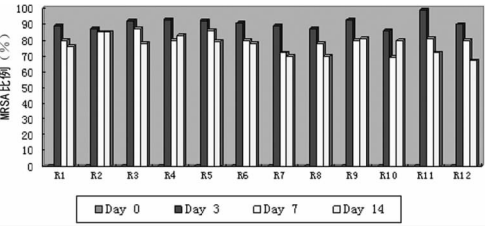
2 结 果

2.1 大鼠鼻黏膜分泌物培养后 MRSA 定植菌的变化 造模开始时(Day 0),大鼠鼻黏膜凝固酶阴性葡萄球菌(CNS)菌群比例较高,MRSA 几乎为零。连续定植 3 d 后,取不同时间点(Day 3、Day 7、Day 14)的大鼠鼻黏膜分泌物培养后,发现随着红霉素软膏对鼻腔固有菌群的处理及 MRSA 菌株的持续定植,模型组大鼠鼻黏膜内 MRSA 菌株的定植数量较对照组明显增加。见图 1~2。



注:R1~R12 为 12 只模型组 Wistar 大鼠编号。

图 1 模型组 Wistar 大鼠不同时间点鼻黏膜分泌物 MRSA 菌群变化趋势



注:R1~R12 为 12 只对照组 Wistar 大鼠编号。

图 2 对照组 Wistar 大鼠不同时间点鼻黏膜分泌物 MRSA 菌群变化趋势

2.2 CTX 对外周血血液学检测指标的影响 大鼠肌内注射 CTX(40 mg/kg)6 d 后,血液学检查可见外周血 WBC、PLT 均出现迅速下降,与肌内注射 CTX 前一天比较差异有统计学意义($P<0.01$)。同时 RBC、HGB 亦明显降低($P<0.01$)。见表 1。

表 1 注射 CTX 前后大鼠外周血血液学指标的变化($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	WBC($\times 10^9$ /L)	RBC($\times 10^{12}$ /L)	HGB(g/L)	PLT(10^9 /L)
空白组	12	13.43 $\pm$ 2.35	7.05 $\pm$ 0.35	159.67 $\pm$ 7.38	1 139.75 $\pm$ 152.93
CTX 组	12	2.09 $\pm$ 1.08*	5.95 $\pm$ 0.81*	127.25 $\pm$ 16.07*	137.75 $\pm$ 43.89*

注:与空白组比较,* $P<0.01$ 。

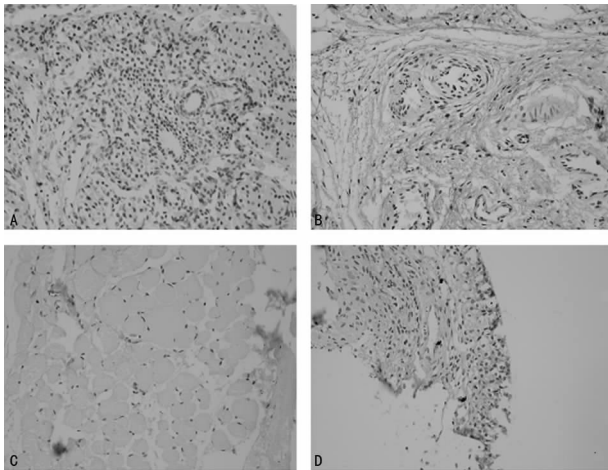
表 2 注射 CTX 前后大鼠外周血 T 淋巴细胞亚群、B 淋巴细胞及 NK 细胞的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	CD3 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺	B 淋巴细胞	NK 细胞
空白组	12	36.79 $\pm$ 7.57	28.69 $\pm$ 5.70	8.04 $\pm$ 2.12	13.56 $\pm$ 6.33	8.33 $\pm$ 3.24
CTX 组	12	23.26 $\pm$ 8.67*	17.05 $\pm$ 6.04*	5.50 $\pm$ 2.02*	3.37 $\pm$ 3.25*	2.84 $\pm$ 1.68*

注:与空白组比较,* $P<0.01$ 。

2.3 CTX 对外周血 T 淋巴细胞亚群、B 淋巴细胞及 NK 细胞的影响 肌内注射 CTX 前后大鼠外周血 T 淋巴细胞亚群、B 淋巴细胞和 NK 细胞变化情况见表 2。与肌内注射 CTX 前比较,肌内注射 CTX 6 d 后可导致大鼠外周血中 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺ T 淋巴细胞,B 淋巴细胞,以及 NK 细胞的比例明显降低($P<0.01$)。见表 2。

2.4 定植 MRSA 后鼻黏膜组织染色结果 连续 3 次小剂量鼻腔滴注 MRSA 新鲜悬液,在细菌定植两周后取各实验组部分动物鼻黏膜组织做石蜡切片,经免疫组化染色后,模型组大鼠鼻黏膜组织细胞膜及细胞质(图 3B)中均可见大量 MRSA,对照组大鼠鼻黏膜组织中可见有适量 MRSA 分布于细胞膜(图 3C)或细胞质(图 3D)。见图 3。



注:A 为阴性对照,B 为模型组,C、D 为对照组。

图 3 大鼠鼻黏膜组织免疫组化染色结果

3 讨 论

金黄色葡萄球菌是临床常见的致病性较强的细菌,容易感染自身免疫功能低下、使用免疫抑制剂和肿瘤患者等人群,可引起严重的急性或慢性感染。有研究表明,人群中 MRSA 定植率大约为 1.5%^[6],金黄色葡萄球菌的鼻腔定植是诱发某些感染的危险因素,如菌血症、术后感染及呼吸道感染等。研究发现,HGB 可通过特定机制促进金黄色葡萄球菌鼻腔定植,主要因 HGB 能够抑制 agr 菌群传感系统的感应和表达 agr 效应分子 RNAⅢ的下降,含有 HGB 的鼻腔分泌物有能力调节金黄色葡萄球菌各种毒力因子的基因表达,促进细菌在鼻腔的定植^[7]。因此,如何有效消除鼻腔耐药菌株的定植,切断其传播途径,对防治医院内 MRSA 的传播和感染,降低患者的病死率有着重要意义。

CTX 作为细胞毒性化疗药物,在杀伤肿瘤细胞的同时,可杀伤体内增生活跃的免疫细胞。目前国内已有大量研究表明,CTX 能抑制动物的体液免疫和细胞免疫应答,造成实验动物的免疫抑制^[8-9]。淋巴细胞作为体内主要的免疫效应细胞,其数量和亚群的变化对机体免疫状态有一定的提示作用,本研究通过肌内注射 CTX 构建大鼠免疫抑制状态,经检测发现给予 CTX 一定时间后,大鼠外周血 WBC、T 淋巴细胞亚群、B 淋巴细胞及 NK 细胞较正常时均明显降低,表明免疫抑制状态构建成功,可以用来模拟临床上化疗后患者的免疫功能状态。

此外,实验过程中发现,每组大鼠鼻腔滴注等量 MRSA 悬液后,处于免疫抑制状态下的大鼠 MRSA 定值明显增多,这与 Wang 等^[10]在临床调查中发现接受化学药物治疗的恶性肿瘤患者 MRSA 定植率较高有一定的相似性,即在特定病理状态

下更有利于 MRSA 的定植,同时与临床上出现的院内感染中 MRSA 易感染免疫功能低下的患者相一致。

总之,本实验构建的免疫抑制 MRSA 鼻黏膜定植模型,旨在更多地了解细菌鼻腔定植所涉及的宿主因素和细菌分子机制。结合宿主因素和病原学特征对金黄色葡萄球菌致病机制做进一步研究,既可为 MRSA 定植患者进行局部去除定植处理提供新的思路 and 依据,同时对于临床上处于免疫抑制状态的患者,对其宿主环境与金黄色葡萄球菌毒力演变及耐药机制的相关性进行深入研究,为临床耐药菌株的治疗和控制探索新的方法。

参考文献

[1] 王俊瑞,向茜,尚欣荣,等.定植压力与耐甲氧西林金黄色葡萄球菌医院内交叉传播相关性研究[J].中华检验医学杂志,2010,36(10):936-941.

[2] Xu BL,Zhang G,Ye HF,et al. Predominance of the Hungarian clone (ST-239-Ⅲ) among hospital-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates recovered throughout mainland China [J]. J Hosp Infect, 2009, 71 (3):245-255.

[3] Larsson AK,Gustafsson E,Nilsson AC,et al. Duration of methicillin-resistant Staphylococcus aureus colonization after diagnosis;a four-year experience from southern Sweden[J]. Scand J Infect Dis,2011,43(6/7):456-462.

[4] Sun W,Chen H,Liu Y,et al. Prevalence and characterization of heterogeneous vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus isolates from 14 cities in China[J]. Antimicrob Agents Chemother,2009,53(9):3642-3649.

[5] Thati V,Shivannavar CT,Gaddad SM. Vancomycin resistance among methicillin resistant Staphylococcus aureus isolates from intensive care units of tertiary care hospitals in Hyderabad[J]. Indian J Med Res,2011,134(5):704-708.

[6] Gorwitz RJ,Kruszon-Moran D,McAllister SK,et al. Changes in the prevalence of nasal colonization with Staphylococcus aureus in the United States,2001-2004[J]. J Infect Dis,2008, 197(9):1226-1234.

[7] Pynnonen M,Stephenson RE,Schwartz K,et al. Hemoglobin promotes Staphylococcus aureus nasal colonization [J]. PLoS Pathog,2011,7(7):100-104.

[8] 周顺长,史宵燕,辛华雯,等.不同途径给以环磷酰胺诱发 BALB/c 小鼠免疫低下的结果比较[J].实验动物与比较医学,2006,26(1):38-39.

[9] 赵连梅,纪昕,潘晓明,等.淫羊藿苷对化疗后免疫抑制小鼠的免疫促进作用[J].中国免疫学杂志,2009,25(12): 1092-1099.

[10] Wang JR,Wang M,Huang YF,et al. Colonization pressure adjusted by degree of environmental contamination;a better indicator in predicting methicillin resistant Staphylococcus aureus acquisition [J]. Am J Infect Control, 2011,39(9):763-769.