

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00829

## 建立铜绿假单胞菌肺部感染动物模型的两种方法

李斌<sup>△</sup>, 朱冬青<sup>△</sup>, 于红<sup>\*</sup>, 刘洪超, 刘士远

第二军医大学长征医院影像科, 上海 200003

**[摘要]** **目的** 用两种方法建立家兔铜绿假单胞菌肺部感染模型, 并根据病理学、影像学等指标进行评价、比较。**方法** 48只健康清洁级新西兰大白兔随机平均分成A、B、C、D 4组, A组采用经皮气管穿刺法, B组采用经鼻喷雾吸入法, 分别隔日接种铜绿假单胞菌反复感染家兔, C、D组施以无菌生理盐水分别作为穿刺对照组和吸入对照组。接种后隔日1次行胸部CT扫描。待家兔感染死亡后取肺脏进行病理学检查。从病理学、影像学 and 实验室检查等方面验证动物模型并对经皮气管穿刺法和经鼻喷雾吸入法两种建模方法进行比较评价。**结果** (1)病理学指标: 接种感染后早期死亡动物肺部均有不同程度的水肿、出血、结节样脓肿、实变表现, 镜下可见肺组织内大量中性粒细胞浸润, 灶状脓肿形成; 感染死亡较晚动物的肺部实变逐渐减少, 以局部肺不张、纤维增生、肉芽肿形成、淋巴细胞浸润为主要表现。(2)影像学指标: A、B两组胸部CT均表现为双侧多发斑片状模糊影, 部分可见实变及脓肿灶。A组于接种后第5天CT影像上首先发现病变, B组接种后第7天发现病变。**结论** 使用经皮气管穿刺法和喷雾吸入法接种铜绿假单胞菌至新西兰兔肺部, 均可成功建立兔铜绿假单胞菌急性慢性病程演变的原发肺部感染模型; 两种方法在可操作性、可控性、可适性等方面各有优点。

**[关键词]** 铜绿假单胞菌; 细菌性肺炎; 动物模型; 方法

**[中图分类号]** R 563.11

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2012)08-0829-04

## Two methods for establishing animal model of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection

LI Bin<sup>△</sup>, ZHU Dong-qing<sup>△</sup>, YU Hong<sup>\*</sup>, LIU Hong-chao, LIU Shi-yuan

Department of Imaging, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

**[Abstract]** **Objective** To establish rabbit model of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* (PA) infection by two different methods and make evaluation and comparison from the pathology, imaging and other aspects. **Methods** Totally 48 healthy New Zealand rabbits were randomly divided into 4 groups ( $n=12$ ): group A, B, C and D. Group A was inoculated with PA suspension via percutaneous tracheal puncturing; Group B was inoculated with PA suspension via spraying inhaling; and group C and D were treated with sterile saline suspension serving as puncturing control and inhaling control, respectively. PA inoculation was done in the four groups every other day, and chest CT scan was performed every other day after inoculation. Pulmonary pathological examination was done after the death of the animals. The two methods were evaluated and compared concerning the pathological, imaging, and laboratory findings. **Results** (1) Pathological findings in group A and B: For animals of early death, there were pulmonary edema of different degrees, hemorrhage, nodule-like abscess, and consolidation; moreover, severe neutrophil infiltration and abscess-like lesions in lung tissue were observed under the microscope. For animals of later death, the consolidation was gradually relieved and the main pathological findings included local atelectasis, fibrosis, granuloma formation, and lymphocyte infiltration. (2) Radiographic findings in group A and B: Chest CT showed bilateral multiple patchy opacities, with consolidation and abscess seen in some areas. Lesions on CT were found at 5 days after inoculation in group A and at 7 days after inoculation in group B. **Conclusion** Repeatedly inoculating PA suspension via both percutaneous tracheal puncturing and spraying inhaling can successfully establish rabbit model of pulmonary PA infection, and each method has their own advantages in performance, controllability, and adaptability.

**[Key words]** *Pseudomonas aeruginosa*; bacterial pneumonia; animal models; methods

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(8): 829-832]

动物模型被广泛地应用于肺部感染的研究中, 但是建立动物肺部感染模型, 尤其是慢性感染比较

**[收稿日期]** 2012-01-15 **[接受日期]** 2012-06-05

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30970800), 上海市科委重点项目(10411952800, 10JC1418100). Supported by National Natural Science Foundation of China (30970800), and Key Program of Shanghai Science and Technology Committee (10411952800, 10JC1418100).

**[作者简介]** 李斌, 博士生. E-mail: libin146@163.com; 朱冬青, 技士. E-mail: 496238621@qq.com

<sup>△</sup>共同第一作者(Co-first authors).

<sup>\*</sup>通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81886011, E-mail: yuhongphd@163.com

困难,主要原因是动物往往被动接受大剂量的致病细菌接种物,难以模拟真实的感染途径和体内自然的病程演变,且动物本身缺乏形成慢性肺部感染的基础疾病(如慢性阻塞性肺病、支气管扩张症、囊性纤维化等)。肺部细菌感染动物模型制作多采用气管切开术、气管插管、喷雾吸入接种病原微生物等<sup>[1-6]</sup>方法,制作过程中遇到的最大问题就是接种的细菌能很快被机体免疫识别并清除。为了最大可能地模拟肺部铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)感染的病程演变,本研究使用经皮气道穿刺和经鼻喷雾吸入两种方法接种PA至新西兰兔肺部,建立家兔PA肺部感染急慢性病程演变的动物模型,通过病理学、细菌学、影像学指标对模型进行评价,并对两种方法的造模效果进行比较。

## 1 材料和方法

1.1 实验动物与细菌 健康清洁级新西兰白兔48只,兔龄6~10个月,体质量2.0~2.3 kg,雌雄不拘,由上海市公共卫生临床中心动物实验中心提供。临床分离的PA由第二军医大学长征医院呼吸科实验室提供,采用VITEX微生物自动分析仪及药敏实验鉴定。

1.2 试剂 普通琼脂培养基;MH肉汤;0.9%灭菌生理盐水;戊巴比妥钠(德国分装)。

1.3 主要仪器设备 Somatom Sensation 16排螺旋CT(德国Siemens公司)、喷雾吸入器(江苏鱼跃医疗器械有限公司)、普通光学显微镜(日本Olympus公司)。

1.4 PA悬液的制备 从临床支气管扩张症患者痰液中分离的黏液型PA转种于琼脂培养基培养,保存于4℃冰箱内。挑取少许菌落放入MH肉汤中37℃孵育24 h,使用当天配制成浓度为 $1.5 \times 10^8$  CFU/ml(麦氏比浊法,相当于0.5个麦氏单位)的PA悬液。

1.5 实验动物的分组与处理 将48只兔随机分为4组,每组12只:经皮气管穿刺组(A组)、经鼻喷雾吸入组(B组)、穿刺对照组(C组)、吸入对照组(D组),于上海市公共卫生临床中心P2实验室动物房内分笼饲养。经耳缘静脉注射2%戊巴比妥钠1 ml/kg麻醉后,A组用2 ml一次性无菌注射器吸取 $1.5 \times 10^8$  CFU/ml的菌悬液1.5 ml采用经皮气管穿刺法接种,B组用喷雾吸入器使家兔经鼻咽吸入等量菌悬液;C、D组接种感染方式分别与A、B组相同,以1.5 ml无菌生理盐水替代菌悬液。所有兔均隔日施以处理因素,35 d后停止。

1.6 监测指标 处理后动物喂养方法相同,定期观察其生理状态、体质量、体温及血常规。

1.7 CT扫描 接种当天于接种前所有兔行胸部CT扫描以排除病变兔,接种后隔日1次CT扫描观察病变。使用儿童头部扫描SFOV(scan field of view),螺旋扫描,床进15 mm/周,动物取俯卧位,头先进;扫描条件:120 kV,200 mA;DFOV(display field of view)选择100~120 mm;扫描模式:1.0 mm×16;肺算法(60)和标准算法重建(40);常规层厚:3 mm。

1.8 标本采集 A、B组所有兔均待其自然死亡,最后处死C、D组家兔。动物死亡(自然死亡及处死)后尸检,观察肺脏大体变化,依照CT表现所显示的病变部位标本行病理检查(H-E染色及微生物镜检)。

1.9 肺组织匀浆细菌培养 取部分病变肺组织,以无菌PBS(pH 7.2)冲洗表面血污后称质量,放入组织研磨器内加入3 ml PBS,于4℃冰浴下制成肺组织匀浆,用玻璃棒均匀涂布于琼脂平板上,置于35℃温箱内24 h孵育培养。

1.10 统计学处理 应用SPSS 18.0软件进行统计学分析,实验所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料采用 $t$ 检验。检验水平( $\alpha$ )为0.05。

## 2 结果

2.1 模型建立结果 判断标准:(1)肺组织培养鉴定为PA;(2)观察期内兔胸部CT扫描发现病灶;(3)病理标本H-E染色镜下发现肺组织病变。满足(1)者视为接种成功,以上3条皆满足者视为兔PA肺部感染模型建立成功。接种前所有兔均行薄层螺旋CT胸部扫描,均未发现异常。除A组2只、B组1只兔因麻醉意外死亡,余A、B组兔PA肺部感染模型建立成功。A组接种后6、12、17 d分别有动物死亡,动物生存时间为7~39 d,平均生存时间25.1 d。B组动物生存时间为21~38 d,集中在21~28 d,平均生存时间24.9 d。两组平均生存时间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

2.2 动物的一般状况 A、B组新西兰兔早期有明显寒颤、发热、喘息急促、亢奋恐慌、毛发粗糙状况,后期出现反应迟钝、毛发黯淡、营养状态差,且平均体质量下降明显。C、D组新西兰兔未见明显异常。

2.3 胸部CT表现 A组3只肺内病变出现于接种后第5天,表现为肺内斑片状密度增高影,边缘模糊(图1A)。5只病变程度随时间而进展,表现为病变范围扩大,阴影增浓,见支气管充气征。B组2只于接种后第7天首次出现肺部感染征象(图1B)。病变程度随时间而逐渐进展,没有出现突然的病变进展。两组部分动物中出现肺实变及脓肿灶。

2.4 肺组织匀浆细菌培养 A、B 组兔死亡后取病变肺组织进行匀浆,于普通琼脂培养基 37℃ 细菌培养 24 h 后可见大小不等、边缘不齐,圆而扁平、表面光滑、湿润的菌落,在琼脂培养基上长出无色、细小、无光泽半透明菌落。在普通肉汤中呈均匀浑浊,形成浅绿色菌膜。行生化特性鉴定,分离菌可发酵葡萄糖、伯腔糖、木糖,不分解麦芽糖、蔗糖及甘露醇,可利用柠檬酸盐、还原硝酸盐,MR 及 VP 试验均为阴性。根据培养、形态及生化特性,可鉴定致病菌为 PA。



图 1 兔铜绿假单胞菌肺部感染 CT 表现

Fig 1 CT appearance of lung *Pseudomonas aeruginosa* infection

CT scan showed multiple, ill-defined opacities in lungs in the 5<sup>th</sup> day percutaneous tracheal puncture group (A) and in the 7<sup>th</sup> day spray inhalation group (B)

2.5 病理学观察 肺组织大体观察:早期死亡家兔肺脏充血水肿,体积增大(图 2A);一些家兔肺组织表面出现较多的脓肿灶及出血点。中期死亡的部分家兔肺脏开始出现体积减小,纤维素性渗出,脓肿及出血灶减小(图 2B);部分出现结节性及空洞性病变,部分出现肺大泡。较晚死亡的家兔肺脏体积减小,质地轻度变硬(图 2C)。

镜下观察:接种后早期急性炎症的表现有肺泡腔内大量出血、渗出,中性粒细胞浸润、灶状脓肿形成(图 3A)。急慢性混杂或急性炎症向慢性转化时表现为细支气管壁、管腔、肺泡间隔、肺泡腔内大量中性粒细胞和淋巴细胞浸润,部分肺组织内出现实变伴肺气肿,部分纤毛倒伏、脱落,部分出现肺泡 II 型上皮细胞增殖及肉芽肿形成趋势(图 3B)。慢性期出现肺泡间隔增厚,肺间质大量淋巴细胞和中性粒细胞浸润(以淋巴细胞为主),肉芽组织形成(图 3C),部分出现局部肺不张,纤维增生。A 组中有 3 只表现为急性肺部感染病理改变,3 只为急慢性炎中有混合表现,4 只为慢性为主的病理征象。B 组中有 4 只表现为急性炎症病理变化,4 只为急慢性兼有的病理改变,3 只表现为慢性炎症改变。

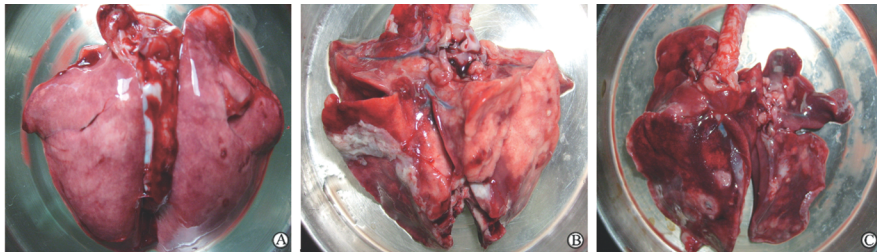


图 2 兔铜绿假单胞菌肺部感染大体标本改变

Fig 2 Macro-findings of lung *Pseudomonas aeruginosa* infection

A: Pulmonary edema was observed in swollen lung at the early infection stage; B: Fibrosis-like exudation and hemorrhage were seen at the middle infection stage; C: Granuloma formation was seen on the shrunken lung at the final stage of infection

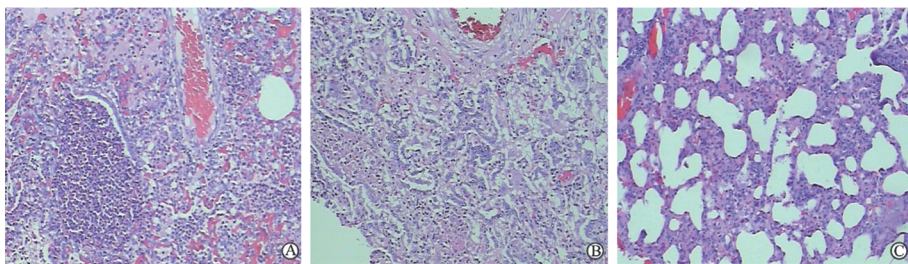


图 3 兔铜绿假单胞菌肺部感染病理变化(H-E 染色)

Fig 3 Pathological findings of lung *Pseudomonas aeruginosa* infection under microscope (H-E staining)

A: Focal abscess, pulmonary edema, hyperemia of alveolar wall in No. A2 rabbit of percutaneous tracheal puncture group; B: Hyperplasia of alveolar epithelium, neutrophil or lymphocyte infiltration in No. B10 rabbit of spray inhalation group; C: Thickening interval of alveolar, lymphocyte or macrophage infiltration in No. B2 rabbit of spray inhalation group. Original magnification:  $\times 100$

### 3 讨论

PA 原称绿脓杆菌(*Bacillus pyocyaneus*),1882 年

首先由 Gersard 从伤口脓液中分离得到。该菌广泛分布于自然界,亦常定植于人和动物的上呼吸道、消化道、皮肤、尿道等处。PA 为条件致病性的生物被膜

菌,其感染肺部时的发病条件、病理改变、临床特点及影像学表现与其他条件致病菌所致肺部感染有许多相似之处,并且存在生物膜的抗吞噬和渗透作用及染色体介导的多重耐药特性<sup>[7]</sup>,因此 PA 肺部感染的诊断及治疗相对困难。近年来 PA 感染日渐增多,尤其在医院内获得性肺炎的致病菌中居首位(约 10%)<sup>[8]</sup>,所以 PA 肺部感染的发病机制、病原学、预防治疗等成为研究热点。PA 肺部感染主要有原发性肺炎、败血症性出血性肺炎(继发性肺炎)两种形式<sup>[8]</sup>。原发性 PA 肺炎的感染途径又分外源性及内源性,外源性感染主要与医疗环境和各种侵袭性治疗损伤有关,而内源性感染则以咽部及胃肠道定植菌吸入为主<sup>[9]</sup>。参照文献[1]、[10]和[11],我们采用两种接种方式分别模拟两种感染途径,成功建立兔原发性 PA 肺部感染急慢性病程演变模型,并对其评价比较。

肺部感染的诊断及分期分级需参考临床症状体征、影像学表现、病理组织学改变和微生物学检查 4 个方面<sup>[12]</sup>。本研究中 A、B 两组新西兰兔在接种 PA 后均出现了不同程度的发热、体质量变化及精神不佳,两组胸部 CT 均在 1 周内出现肺部感染的征象;B 组较 A 组出现稍晚,原因可能是经皮气道穿刺接种的细菌到达肺部的路径较短,快速且直接,而经鼻喷雾吸入方式中上呼吸道的防御机制能将细菌过快地清除。由于本研究欲观察两种方法接种 PA 后肺部感染病程发展演变,从急慢性转化转归角度进行评价,所以未能设定相应的观察时间点定期处死动物做病理观察。A 组动物较 B 组的早期死亡率高,接种后 6、12、17 d 均有动物死亡,B 组动物的存活时间集中在 21~28 d,但是两者的平均生存时间差异没有统计学意义。推测 A 组动物接种后 1~3 周内表现为早期急性炎症为主的病理学改变,3~4 周内表现为急慢性混杂或转化的改变,5 周左右表现为慢性炎症为主。B 组 4~5 周时病理学表现为急性炎症或急性为主的急慢性混合炎症,5 周后出现慢性炎症病理改变。

严格执行无杂菌操作是建模成功的关键,特别在接种及尸检采集标本的过程中。接种前需备皮、消毒,以防将动物表皮的寄生菌带入气管内,而尸检时我们采用无菌静脉切开包,开胸后器械必须更换,以保证接触到肺标本的器械无菌,确保所制备模型的单一性。即便如此,A 组有 2 只、B 组 1 只发生了混合感染的情况,这种结果可能是无菌操作不严造成,但也不排除 PA 感染后更容易继发其他感染的可能。

目前肺部感染动物模型的细菌接种常见方法有气管切开术注入、气管插管注入、雾化吸入等方法<sup>[1-6]</sup>。本研究采用的经皮气道穿刺和经鼻喷雾吸入方式与气管切开和气管插管注入法相比,减少了

发生伤口感染、出血等并发症的风险。就两者比较,经皮气道穿刺可以直接有效地将细菌接种到肺内,但其准确定位一定程度地依赖于操作手法娴熟与否,且操作易造成其他病原菌混合感染;经鼻雾化吸入操作较简易,更符合真实的感染途径,但对细菌感染接种量的控制不严格。两种方法制作的动物模型的急慢性炎症的倾向性也略有不同,经皮气道穿刺接种模型组的急性炎症表现出现相对早且多,经鼻喷雾吸入模型组相对较多出现急慢性混合炎症或转化期表现。

使用经皮气管穿刺法和喷雾吸入法接种 PA 至新西兰兔肺部均可成功建立兔 PA 急慢性病程演变的原发肺部感染模型,两种方法在可操作性、可控性、可适性等方面各有优点。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] Schmiedl A, Kerber-Momot T, Munder A, Pabst R, Tschering T. Bacterial distribution in lung parenchyma early after pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Cell Tissue Res, 2010, 342: 67-73.
- [2] Pearson J P, Feldman M, Iglewski B H, Prince A. *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signaling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection [J]. Infect Immun, 2000, 68: 4331-4334.
- [3] Lapa e Silva J R, Guerreo D, Noble B, Poulter L W, Cole P J. Immunopathology of experimental bronchiectasis [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1989, 4: 297-304.
- [4] Cash H A, Woods D E, McCullough B, Johanson W G Jr, Bass J A. A rat model of chronic respiratory infection with *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Am Rev Respir Dis, 1979, 119: 453-459.
- [5] 李华强, 张文俊, 潘捷, 史源, 蒋东波. 免疫低下时绿脓杆菌肺炎大鼠肠源性感染的实验研究 [J]. 中国实用儿科杂志, 2001, 16: 286-288.
- [6] Byrd M S, Pang B, Mishra M, Swords W E, Wozniak D J. The *Pseudomonas aeruginosa* exopolysaccharide Psl facilitates surface adherence and NF-kappa B activation in A549 cells [J]. mBio, 2010, 1: e00140-103.
- [7] 小林宏行. 细菌菌膜的基础与临床 [J]. 雷雨, 译. 中国临床药理学杂志, 1999, 15: 299-307.
- [8] Fujitani S, Sun H Y, Yu V L, Weingarten J A. Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*: part I: epidemiology, clinical diagnosis, and source [J]. Chest, 2011, 139: 909-919.
- [9] Ewig S, Torres A. Infections of the lung with *Pseudomonas aeruginosa* [M]//Niederman M S, Sarosi G A, Glassroth J, eds. Respiratory infections, 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 377-391.
- [10] 郭向华, 郭润华, 宋志军. 大鼠慢性绿脓杆菌生物膜肺部感染模型细胞因子水平的变化 [J]. 现代医药卫生, 2010, 26: 2241-2242.
- [11] Li F, Wang W, Hu L, Li L, Yu J. Effect of ambroxol on pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa* with biofilm formation in an endotracheal intubation rat model [J]. Chemotherapy, 2011, 57: 173-180.
- [12] 中华医学会呼吸病学分会. 医院获得性肺炎诊断和治疗指南(草案) [J]. 中华结核和呼吸杂志, 1999, 22: 201-203.