

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.01122

创伤弧菌致死性感染对小鼠血液系统的影响及主要脏器的病理变化

荣换玲^{1,2},殷萌¹,杜大海³,杨峰^{1*},张欣荣¹,张文学²

1. 第二军医大学药学院无机化学教研室,上海 200433
2. 河南师范大学生命科学院组织解剖学与免疫学教研室,新乡 453007
3. 第二军医大学长海医院实验诊断科,上海 200433

[摘要] **目的:**观察创伤弧菌致死性感染对小鼠血液系统的影响及主要脏器的病理变化,探讨其可能的致死机制。**方法:**建立创伤弧菌致死性感染小鼠模型,ELISA法检测小鼠血清TNF- α 、IL-1 β 、TF水平;采用全自动血液生化分析仪测定小鼠血清总胆红素、肌酐、尿素等生化指标含量;采用自动化血细胞分析仪进行全血细胞分析;创伤弧菌感染后8h,取小鼠心脏、肺、肝脏、脾脏、肾脏,光镜、电镜下观察器官病理改变。**结果:**创伤弧菌感染后小鼠血清TNF- α 、IL-1 β 、TF水平显著升高($P<0.05$);血清尿素、肌酐、总胆红素、淀粉酶及丙氨酸转氨酶、尿酸、天冬氨酸转氨酶表达均显著升高($P<0.05$);感染后白细胞计数、血小板计数、淋巴细胞百分比下降显著($P<0.05$),红细胞计数、单核细胞百分比及血红蛋白水平显著上升($P<0.01$)。感染后小鼠主要脏器均表现为充血、水肿、组织结构破坏,炎症细胞浸润,电镜下可见肝细胞凋亡。**结论:**创伤弧菌致死性感染可能通过引发机体过度炎症反应,激活凝血系统,诱发机体广泛组织损伤,导致不可逆性多器官功能衰竭,最终引起死亡。

[关键词] 创伤弧菌;炎症反应;多器官功能衰竭;致死机制

[中图分类号] R 734.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)10-1122-04

Effect of lethal *Vibrio vulnificus* infection on blood system and pathology changes of major organs in mice

RONG Huan-ling^{1,2}, YIN Meng¹, DU Da-hai³, YANG Feng^{1*}, ZHANG Xin-rong¹, ZHANG Wen-xue²

1. Department of Inorganic Chemistry, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Anatomy and Immunology, College of Life Sciences, He'nan Normal University, Xinxiang 453007
3. Department of Clinical Diagnosis, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the effect of lethal *Vibrio vulnificus* infection on the blood system and the pathology changes of the major organs in mice, and to explore the possible mechanism of the related death. **Methods:** Lethal *Vibrio vulnificus*-infection model was established with mice. The model mice were divided into two groups: a control group and an infection group. ELISA was used to examine the serum levels of TNF- α , IL-1 β , and TF. Serum total bilirubin (TBIL), creatinine (Cre), and blood urea nitrogen (BUN) were analyzed using automatic biochemical analyzer; whole blood cell analysis was also performed. The pathological changes of the heart, lung, liver, spleen, and kidney were observed under electron and light microscopes. **Results:** Compared with the control group, the serum levels of TNF- α , IL-1 β , and TF were significantly increased in mice after infection with *Vibrio vulnificus* ($P < 0.05$); the serum levels of BUN, Cre, TBIL, diastase and alanine aminotransferase (ALT) were significantly increased ($P < 0.05$). The ratios of WBC, platelet, and lymphocytes were all significantly decreased after infection compared with the control group ($P < 0.05$). The ratios of red blood cells, monocytes, and Hb level were significantly increased compared with the control group ($P < 0.05$). The pathological changes of major organs included hyperaemia, edema, inflammatory cell infiltration, and apoptosis. **Conclusion:** Lethal infection with *Vibrio vulnificus* can initiate super-inflammation reaction in mice; it can also activate the blood coagulation system and induce systemic tissue injury, finally leading to death.

[KEY WORDS] *Vibrio vulnificus*; super-inflammation reaction; multiple organ nonfunction; lethal mechanism

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(10):1122-1225]

[收稿日期] 2009-03-20 **[接受日期]** 2009-09-24

[基金项目] 国家自然科学基金(30600545),国家重大新药创制科技重大专项基金(2009ZXJ09003-028),第二军医大学专项基金(05JS08). Supported by National Natural Science Foundation of China (30530660), Science And Technology Major Projects of Major New Drug Development of China(2009ZXJ09003-028) and Special Fund of Second Military Medical University(05JS08).

[作者简介] 荣换玲,硕士生. E-mail: guoke7274@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81871220, E-mail: yangfeng1008@sohu.com

创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*, Vv) 是嗜盐性革兰阴性弧菌^[1], 广泛存在于世界各地的入海口或海岸地区的海水中, 可分为 3 种生物型(1、2、3 型), 其中 1 型是人类的主要致病菌^[2], 主要通过外伤接触含病菌的海水或生食海鲜两种途径感染^[3]。其感染后病死率高达 50% 以上, 伴发生休克患者的病死率甚至达 90% 以上, 从入院到死亡的时间约为 2 d^[4], 但其致死机制仍不清楚。因此, 本研究观察创伤弧菌致死性感染后小鼠血液各炎症因子及生化指标的变化及对主要脏器病理的影响, 探讨其可能的致死机制, 为 Vv 感染的临床诊治提供基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 创伤弧菌菌株购自中国普通微生物菌种保藏中心(编号 1.1758)。全自动血细胞分析仪为日本 Sysmex XS800i, 全自动干式生化分析仪为美国强生医疗器械公司 Vitros 250, 光镜为麦克奥迪公司 Motic DMBA200-VC, 透射电镜为飞利浦公司 Tecnai 10; TNF- α 、IL-1 β 、TF 的 ELISA 检测试剂盒购自上海博光生物科技有限公司; 细菌培养基为美国 Difco 公司 Marine Agar 2216 和 Marine Broth。

1.2 动物分组及处理 清洁级 ICR 小鼠 20 只, 雄性, 体质量 20~22 g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 实验动物许可证号 SCXK(沪)2007-0005, 按清洁级动物要求饲养。小鼠随机均分为 Vv 感染

组和对照组($n=10$), Vv 感染组在小鼠背部一侧皮下注射创伤弧菌菌液, 剂量为每只 1.0×10^8 cfu, 建立创伤弧菌感染致死模型; 对照组则在相同部位注射等量生理盐水。

1.3 小鼠血清炎症因子、生化指标的检测及全血血细胞分析 Vv 感染后 2 h, 收集血样, 离心取上清, 按照操作说明书采用 ELISA 法检测血清中 TNF- α 、IL-1 β 、TF 的含量; 采用全自动血液生化分析仪测定血清总胆红素、肌酐、尿素、尿酸、淀粉酶、丙氨酸氨基转移酶、门冬氨酸氨基转移酶等含量。Vv 感染组和对照组小鼠在感染后 5 h, 收集血样, 枸橼酸钠抗凝, 进行自动化血细胞分析仪检测。

1.4 小鼠主要脏器病理形态学观察 小鼠感染后 8 h, 取小鼠的心脏、肺、肝脏、脾脏、肾脏, 一部分用甲醛溶液固定 24 h, 石蜡包埋, 切片后进行 H-E 染色, 光镜下观察组织、细胞病理学改变; 另一部分用常规电镜技术进行包埋, 超薄切片, 染色, 于透射电镜下观察。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 12.0 统计软件进行组间 t 检验, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 创伤弧菌感染对小鼠血清炎症因子表达的影响 结果(表 1)表明: 与对照组相比, 创伤弧菌感染 2 h 后小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、TF 含量均显著升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 创伤弧菌感染 2 h 后小鼠 TNF- α 、IL-1 β 、TF 含量的变化

Tab 1 Changes of serum TNF- α , IL-1 β , and TF levels 2 h after *Vibrio vulnificus* infection

[$n=10, \bar{x} \pm s; \rho_B / (\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1})$]

Group	TNF- α	IL-1 β	TF
Control	927.30 \pm 49.50	301.75 \pm 45.40	517.00 \pm 8.46
Infected	2 012.27 \pm 143.23*	4 163.16 \pm 1 306.83*	4 267.21 \pm 1 540.53*

* $P < 0.05$ vs Control group

2.2 创伤弧菌感染后小鼠血液生化指标的变化 结果(表 2)表明: 创伤弧菌感染组小鼠尿素、肌酐、总胆红素、淀粉酶及丙氨酸转氨酶的水平显著升高($P < 0.05$); 尿酸、天冬氨酸转氨酶水平也显著升高($P < 0.01$)。

2.3 创伤弧菌感染对小鼠全血细胞分析的影响 结果(表 2)表明: 感染后小鼠的白细胞计数、淋巴细胞百分比明显下降($P < 0.05$), 单核细胞百分比水平明显上升($P < 0.01$); 红细胞计数、血红蛋白含量明显上升($P < 0.05$); 血小板计数显著下降($P < 0.01$)。

2.4 创伤弧菌感染后小鼠主要脏器的病理改变

2.4.1 H-E 染色检查结果 与对照组相比, 创伤弧菌

感染后小鼠各脏器发生明显病理改变。心脏: 心肌血管充血、心肌排列疏松、肌纤维断裂(图 1B); 肺: 肺间质充血、水肿、肺泡腔出血、肺泡间隔形态改变、肺泡坍塌、局灶性坏死(图 1D); 肝脏: 肝细胞充血、水肿明显(图 1F); 肾脏: 水肿和出血明显, 炎症细胞浸润, 可见大量巨噬细胞(图 1H); 脾脏: 可见脾索增宽, 脾窦及脾索模糊, 巨噬细胞增生明显, 骨髓内可见成片状分布的染色较深的细胞核碎片, 整个骨髓出血明显(图 1J)。

2.4.2 肝脏超微结构的改变 结果(图 2)表明: 与正常对照组相比, 创伤弧菌感染后小鼠肝脏细胞出现核固缩、线粒体肿胀且嵴消失、滑面内质网极度扩张呈囊状、核旁基质变空。

表 2 创伤弧菌感染 2 h 后小鼠血液生化指标检测及全血细胞分析结果

Tab 2 Result of blood biochemistry analysis and blood cell analysis 2 h after *Vibrio vulnificus* infection

(n=10, $\bar{x} \pm s$)

Group	Urea $c_B/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	UA $c_B/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	Creatinine $c_B/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	Total bilirubin $c_B/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	Diastase $\bar{z}_B/(\text{U} \cdot \text{L}^{-1})$	ALT $\bar{z}_B/(\text{U} \cdot \text{L}^{-1})$	AST $\bar{z}_B/(\text{U} \cdot \text{L}^{-1})$
Control	5.75±0.65	0.02±0.01	11.55±0.55	13.5±1.5	1 405.5±304.5	35.50±6.5	33.5±4.5
Infected	10.60±0.6*	0.07±0.01**	21.50±1.5*	22.0±3*	2 165.0±565*	51.61±0.58*	73.5±22.5**

Group	WBC ($\times 10^9/\text{L}$)	LYM/%	MO/%	RBC ($\times 10^{12}/\text{L}$)	Hb $\rho_B/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	PLT ($\times 10^9/\text{L}$)
Control	4.88±1.55	95.34±0.94	0.44±0.18	8.26±1.54	149.75±18.75	1 115.75±434.10
Infected	3.04±0.35*	70.08±4.08*	3.68±0.85**	14.60±1.90*	199.50±23.94*	530.17±154.87**

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs Control group

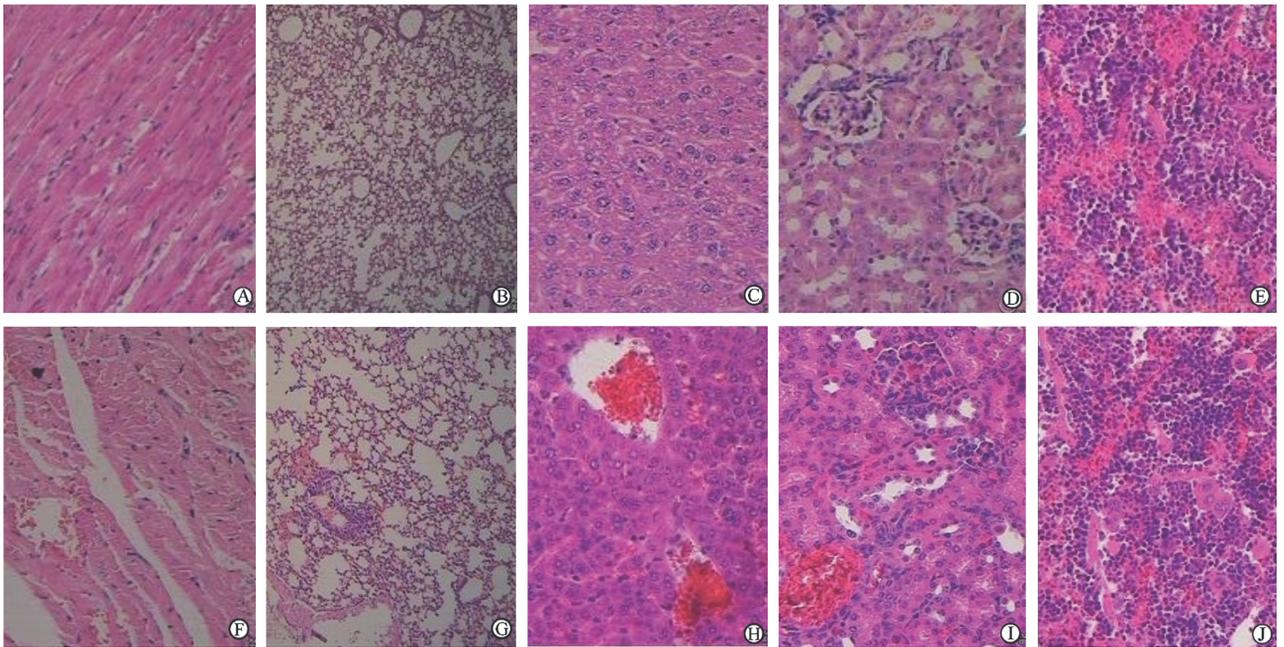


图 1 创伤弧菌感染后小鼠主要脏器病理改变

Fig 1 Light microscopy of major organs of mouse after *Vibrio vulnificus* lethal infection(H-E stainig)

A-E:Control group; F-J:Infected group; A,F:Heart;B,G:Lung; C,H:Liver; D,I:Kidney; E,J:Spleen. Original magnification: $\times 400$ (A,C-F, H-J); $\times 100$ (B,G)

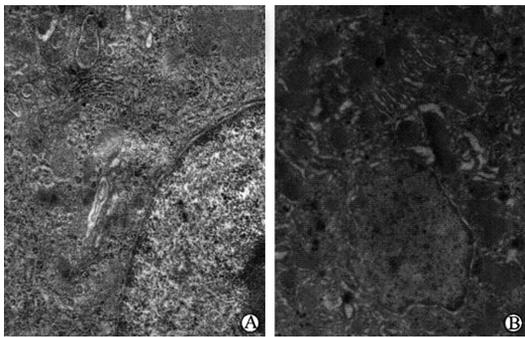


图 2 创伤弧菌感染后小鼠肝脏超微结构改变

Fig 2 Images of infected mouse liver by scanning electron microscope

A:Control group; B:Infected group. Original magnification: $\times 15\ 000$ (A); $\times 7\ 000$ (B)

3 讨论

TNF- α 作为感染发生时体内早期重要的炎症介质之一,可由感染病原或其代谢产物直接或间接刺激而大量产生。浓度过大可直接损伤血管内皮细胞,增加血管通透性,导致急性肺间质损伤,同时促进免疫炎症瀑布样连锁反应和 DIC 的发生,刺激其他细胞因子如 IL-6、血小板活化因子的产生,引起多器官功能损害、循环衰竭,组织氧供减少,最终导致感染性休克而死亡^[5-6]。IL-1 β 主要来源于被激活的巨噬细胞,可诱导机体急性期反应,与 TNF- α 协同诱导机体的过度炎症反应^[7]。

本研究结果表明,小鼠在感染创伤弧菌 2 h 后,

TNF- α 、IL-1 β 显著升高, TF 表达也显著上升, 表明创伤弧菌感染导致全身炎症反应发生, 并引起 TF (凝血因子 III) 表达增多。在严重感染或外伤时, 炎性介质如促炎性细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 通过诱导单核细胞、巨噬细胞或内皮细胞表达 TF, 激活 TF 凝血途径, 启动凝血系统^[8-9], 同时与 TNF- α 、IL-1 β 双向作用, 激活促炎性因子的信号转导, 参与炎症、组织损伤和败血症作用等^[10], 诱导机体病理性高凝血状态。

此外, 在感染创伤弧菌 2 h 后, 小鼠的尿素、肌酐、总胆红素、淀粉酶及丙氨酸氨基转移酶水平显著升高; 尿酸、门冬氨酸氨基转移酶水平也显著升高, 提示创伤弧菌感染引发了小鼠肝脏、肾脏、胰腺等器官功能的严重损害。血细胞分析结果显示, 创伤弧菌感染后小鼠机体内白细胞计数、淋巴细胞百分比显著下降, 单核细胞百分比水平显著上升; 红细胞计数、血红蛋白含量显著上升; 血小板计数显著下降。结果提示感染后期小鼠可能出现了凝血性血栓、出血病变或严重败血症^[11]。

器官病理形态学观察结果亦证实创伤弧菌感染后期, 小鼠的脾脏、肺、心脏、肝脏、肾脏存在不同程度的出血、器官组织结构损伤、细胞坏死和功能衰竭。肝脏超微结构显示创伤弧菌感染后期小鼠出现核固缩、线粒体肿胀且嵴消失等细胞凋亡的典型形态学改变, 表明创伤弧菌感染可诱导脏器细胞凋亡, 最终导致机体死亡^[12]。

综上所述, 本研究结果提示创伤弧菌可能通过诱发机体过度炎症反应, 激活凝血系统, 诱发机体代谢异常及广泛性组织损伤, 导致败血症、不可逆性系统性多器官损伤和功能衰竭, 最终导致机体死亡, 为创伤弧菌的临床诊治提供了帮助。

[参考文献]

- [1] Farmer J J 3rd. *Vibrio* ("Benecke") *vulnificus*, the bacterium associated with sepsis, septicaemia, and the sea[J]. Lancet, 1979, 2: 903.
- [2] Watanabe H, Miyoshi S, Kawase T, Tomochika K, Shinoda S. High growing ability of *Vibrio vulnificus* biotype 1 is essential for production of a toxic metalloprotease causing systemic diseases in humans[J]. Microb Pathog, 2004, 36: 117-123.
- [3] Stivers T L. Diagnosing and treating deadly *Vibrio vulnificus* infection[J]. J Emerg Nurs, 2008, 34: 139-141.
- [4] Bross M H, Soch K, Morales R, Mitchell R B. *Vibrio vulnificus* infection: diagnosis and treatment [J]. Am Fam Physician, 2007, 76: 539-544.
- [5] Amiot F, Fitting C, Tracey K J, Cavaillon J M, Dautry F. Lipopolysaccharide-induced cytokine cascade and lethality in LT alpha/TNF alpha-deficient mice[J]. Mol Med, 1997, 3: 864-875.
- [6] Girardin E, Grau G E, Dayer J M, Roux-Lombard P, Lambert P H. Tumor necrosis factor and interleukin-1 in the serum of children with severe infectious purpura[J]. N Engl J Med, 1988, 319: 397-400.
- [7] Shioi T, Matsumori A, Kihara Y, Inoko M, Ono K, Iwanaga Y, et al. Increased expression of interleukin-1 beta and monocyte chemoattractant and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1 in the hypertrophied and failing heart with pressure overload[J]. Circ Res, 1997, 81: 664-671.
- [8] Tentolouris C, Tousoulis D, Antoniadis C, Bosinakou E, Kotso-poulou M, Trikas A, et al. Endothelial function and proinflammatory cytokines in patients with ischemic heart disease and dilated cardiomyopathy[J]. Int J Cardiol, 2004, 94 (2-3): 301-305.
- [9] Østerud B, Bjørklid E. The tissue factor pathway in disseminated intravascular coagulation [J]. Semin Thromb Hemost, 2001, 27: 605-617.
- [10] Jiang X, Bailly M A, Panetti T S, Cappello M, Konigsberg W H, Bromberg M E. Formation of tissue factor-factor VIIa-factor Xa complex promotes cellular signaling and migration of human breast cancer cells[J]. J Thromb Haemost, 2004, 2: 93-101.
- [11] 李 飞, 孙书美. 血常规在医学检验中的应用[J]. 中国现代临床医学, 2007, 6(12): 8-9.
- [12] 臧传波, 吴荣谦, 宋旭华, 徐迎新, 李 荣. 脓毒症小鼠肝肺损伤机制的研究[J]. 第二军医大学学报, 2007, 28: 616-619.

Zang C B, Wu R Q, Song X H, Xu Y X, Li R. Mechanism of liver and lung injury in septic mice[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28: 616-619.

[本文编辑] 贾泽军