

两种病原菌联合诱导大鼠实验性乳腺炎研究

张大松,张源淑,邹思湘,陈伟华

(南京农业大学 农业部动物生理生化重点开放实验室,江苏 南京 210095)

[摘 要] 为深入研究奶牛乳腺炎提供一个更方便、经济的实验平台,试验建立了由金黄色葡萄球菌和大肠杆菌联合诱导的大鼠乳腺炎模型。分别用低浓度(金黄色葡萄球菌和大肠杆菌浓度均为 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$, L 组)和高浓度(金黄色葡萄球菌和大肠杆菌浓度均为 $1 \times 10^{12} \text{ mL}^{-1}$, H 组)细菌混合液,经乳头管灌注到大鼠第 4 对乳腺内,诱导大鼠的乳腺炎试验。结果表明,低浓度组(L 组)乳腺的病变主要以腺泡上皮发生轻度脂肪变性,腺泡腔的分泌物中有透明滴状物为主要特征,高浓度组(H 组)的乳腺腺泡结构破坏严重,腺泡中有较多的嗜中性粒白细胞浸润。L 组乳腺组织 IL-6 水平较对照组有所升高,H 组则有显著($P < 0.05$)下降,试验组血清 IL-6 水平均极显著($P < 0.01$)低于对照组;L 组和 H 组乳腺组织 TNF- α 水平分别显著($P < 0.05$)和极显著($P < 0.01$)高于对照组,血清 TNF- α 水平均极显著($P < 0.01$)低于对照组。试验组乳腺 NA Gase 活性均显著($P < 0.05$)和极显著($P < 0.01$)高于对照组;试验组血清 NA Gase 活性均低于对照组,其中 H 组极显著($P < 0.01$)下降。由上述结果可知,高低浓度的金黄色葡萄球菌和大肠杆菌联合诱导的大鼠乳腺炎模型均已成功建立。

[关键词] 大鼠;乳腺炎;联合诱导;金黄色葡萄球菌;大肠杆菌

[中图分类号] S852.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)07-0011-04

Inducing mastitis in rats by jointly using two pathogens

ZHANG Da-song, ZHANG Yuan-shu, ZOU Si-xiang, CHEN Wei-hua

(Key Laboratory Animal Physiology and Biochemistry, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: To provide a more convenient and economic method for mastitis, the experimental mastitis model by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* jointly via teat duct in rats was established. Lower concentration of mixture (the concentration of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* both $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$) and higher concentration of mixture (both $1 \times 10^{12} \text{ mL}^{-1}$) were inoculated into the fourth (abdominal) mammary gland via the teat duct respectively. The results showed that the lower group (L) was characterized by lipid denaturation both in alveolus and mammary epithelial cell; the mammary gland structure in H group was seriously destructed, and numbers of polymorphonuclear neutrophils (PMN) were accumulated in alveoli. The concentrations of IL-6 in mammary gland from L group increased but decreased ($P < 0.05$) in H group significantly, and IL-6 exhibited a significant decrease ($P < 0.01$) in sera. The TNF- α level in mammary gland from L ($P < 0.05$) and H ($P < 0.01$) group elevated significantly, however it decreased ($P < 0.01$) significantly in sera. The activity of NA Gase in mammary gland from rats increased significantly from L ($P < 0.05$) group and H ($P < 0.01$) group, however it decreased significantly in sera from L and H ($P < 0.01$) group. Based on above findings the experimental mastitis model by lower and higher

* [收稿日期] 2006-05-15

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30371049, 30671533)

[作者简介] 张大松(1980-),男,山东临沂人,硕士,主要从事泌乳生理生化研究。

[通讯作者] 邹思湘(1946-),男,江苏苏州人,教授,主要从事泌乳生理生化和营养生化研究。

dose of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* jointly via teat duct in rats were established successfully.

Key words : rat ;mastitis ;joint inducing ; *Staphylococcus aureus* ; *Escherichia coli*

乳腺炎(mastitis)是一种复杂的乳腺病,是包括乳腺感染、乳腺炎症、微循环和免疫障碍等的一种综合症。当乳腺受到物理或化学刺激并且免疫力低下时,细菌等微生物乘机入侵乳腺,繁殖并产生大量毒素破坏乳腺组织,影响动物机体的健康,降低产奶量,影响奶品质。奶牛乳腺炎每年给全球奶牛业造成数百亿的损失,世界各地均有发生,是一种对奶牛场危害最大、最常见的疾病^[1]。患乳腺炎的奶牛乳汁中以金黄色葡萄球菌的带菌率最高,其次是大肠杆菌和链球菌^[2]。通常情况下,奶牛乳腺炎是由多种细菌共同感染引起。本试验选择能导致奶牛乳腺炎的金黄色葡萄球菌和大肠杆菌为诱导菌,建立了一种较符合临床发病机制的乳腺炎动物模型,探索在复杂条件下,乳腺炎的致病机理以及病理变化过程,以期为进一步寻找更为有效的预防和治疗乳腺炎的方法提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

清洁级健康 SD 大鼠,购自中国药科大学实验动物中心,共 27 只,其中雌鼠 18 只,质量(260 ±15) g,均未孕;雄鼠 9 只,质量(320 ±15) g。适应性饲养 1 周后,将雌鼠与雄鼠按 2 : 1 同笼饲养,使之交配受孕。白细胞介素(Interleukin-6, IL-6)和肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor- α , TNF- α)放射免疫分析盒,均购于中国人民解放军总医院科技开发中心放免所;酶测定试剂盒均购于南京建成生物工程研究所。

金黄色葡萄球菌 CMCC 26081 (*Staphylococcus aureus*, S. au) 购自中国医学微生物菌种保藏管理中心(CMCC),大肠杆菌 CMCC 25922 (*Escherichia coli*, E. coli) 为动物医学院微生物研究室提供。

1.2 细菌准备

将金黄色葡萄球菌和大肠杆菌单个菌落接种于液体培养基中,在 37 °C 培养 18 ~ 20 h,无菌环境下取 100 μ L 均匀涂抹在普通琼脂平板上,37 °C 培养 18 ~ 20 h 后刮取菌苔,溶解于灭菌的 0.01 mol/L、pH 7.2 PBS 中,采用平板稀释计数法^[3]调整浓度分别为 2×10^5 mL⁻¹和 2×10^{12} mL⁻¹。灌注前分别取两种菌液等体积混合,轻摇混匀成混悬液。

1.3 试验设计

受孕雌鼠 18 只,随机分为 3 组:对照组(CON,大鼠乳房灌注灭菌的 0.01 mol/L、pH 7.2 的 PBS)、低浓度组(L 组,金黄色葡萄球菌和大肠杆菌在混悬液中的浓度都为 1×10^5 mL⁻¹)和高浓度组(H 组,金黄色葡萄球菌和大肠杆菌在混悬液中的浓度都为 1×10^{12} mL⁻¹),每组 6 只,各组均于产后 72 h 经乳头管灌注到大鼠第 4 对乳腺(双侧)内,灌注前 1 ~ 2 h 母鼠与仔鼠分离,灌注方法参考钟凯等^[4]建立的方法。

1.4 指标测定

1.4.1 乳腺病理组织学变化 灌注 72 h 后打开大鼠腹腔,观察乳腺病理变化,迅速取部分乳腺组织于 Bouin 氏液中固定,石蜡包埋,切片,HE 染色后光学显微镜下进行病理组织学观察。

1.4.2 乳腺组织和血清中细胞因子和酶活性的测定 采集 SD 大鼠颈静脉血,分离血清,取大鼠第 4 对乳头附近乳腺组织, - 20 °C 保存。放射免疫分析法测定乳腺组织及血清中 IL-6 和 TNF- α 水平;比色法测定乳腺组织及血清中 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶(NA Gase)。

1.5 数据处理

应用 EXCEL 和 SPSS11.0 进行数据处理分析,统计结果以“平均数 ±标准差($M \pm S$)”表示,差异显著性分析采用 t 检验。

2 结果与分析

2.1 SD 大鼠乳腺病理变化与病理形态学观察

低浓度组(L 组)大鼠无明显症状,剖检发现乳腺有轻微出血和水肿,并呈轻微的暗红色;高浓度组(H 组)大鼠精神沉郁,腹部明显肿大,剖检发现乳腺高度水肿,有大量浆液渗出,乳腺肿胀变硬,出血严重,乳腺颜色呈明显的暗红色。病理形态学观察发现,L 组大鼠乳腺少数腺上皮细胞坏死、脱落,间质充血变宽,轻微水肿,腺泡腔的分泌物中有大小不一的透明滴状物,并伴有腺泡腔缩小;H 组大鼠的乳腺腺泡结构破坏严重以致崩解,大多变性、坏死,腺泡腔内有脱落的上皮细胞,间质明显增宽,水肿严重,散在有大量的嗜中性粒细胞浸润;对照组的乳腺组织未见病理变化(图 1)。

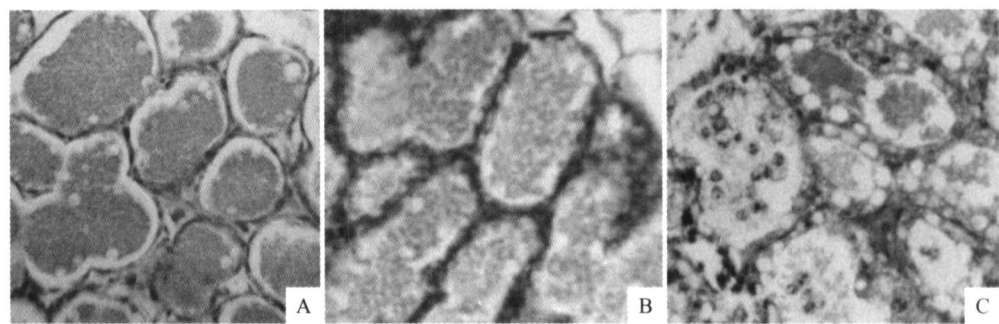


图 1 SD 大鼠灌注 PBS 和两种细菌混悬液后乳腺组织的显微结构观察结果 (H. E. ×600)
A. 对照组;B. 低浓度组;C. 高浓度组

Fig. 1 Microscopic observations of SD rat mammary gland after infused with PBS and two pathogens (H. E. ×600)
A. Control group ;B. L group ;C. H group

2.2 SD 大鼠乳腺组织和血清中细胞因子的变化

由表 1 可知 , L 组大鼠乳腺组织 IL-6 水平较对照组有所升高 , H 组则有显著 ($P < 0. 05$) 下降 , 试验组血清 IL-6 水平均极显著 ($P < 0. 01$) 低于对照组 ;

L 组大鼠乳腺组织 TNF- α 水平显著 ($P < 0. 05$) 高于对照组 , H 组极显著高于对照组 ($P < 0. 01$) , 试验组血清 TNF- α 水平均极显著 ($P < 0. 01$) 低于对照组。

表 1 SD 大鼠乳腺组织和血清中 IL-6、TNF- α 含量及 NA Gase 活性的变化

Table 1 Changes of IL-6、TNF- α and NA Gase in rat mammary gland

组别 Group	IL-6		TNF- α		NA Gase	
	乳腺组织/ (pg · mg ⁻¹) Mammary gland	血清/ (pg · mL ⁻¹) Plasma	乳腺组织/ (ng · mg ⁻¹) Mammary gland	血清/ (ng · mL ⁻¹) Plasma	乳腺组织/ (U · g ⁻¹) Mammary gland	血清/ (U · L ⁻¹) Plasma
对照组 Control group	45.74 ±6.48	90.34 ±6.75	8.15 ±1.03	7.02 ±1.93	121.70 ±23.54	115.44 ±56.36
低浓度组 L group	53.30 ±13.47	53.98 ±11.93 * *	11.32 ±1.17 *	3.48 ±1.55 * *	224.04 ±63.68 *	70.44 ±26.54
高浓度组 H group	33.65 ±7.62 *	42.32 ±6.60 * *	12.33 ±3.24 * *	3.49 ±0.72 * *	331.58 ±64.84 * *	58.20 ±18.04 * *

2.3 SD 大鼠乳腺组织和血清中 NA Gase 活性的变化

由表 1 可知 , L 组和 H 组乳腺组织中 NA Gase 活性分别显著 ($P < 0. 05$) 和极显著 ($P < 0. 01$) 高于对照组 ; L 组血清 NA Gase 活性低于对照组 , 但差异不显著 , H 组血清 NA Gase 活性极显著 ($P < 0. 01$) 低于对照组。

道。金黄色葡萄球菌为革兰氏阳性菌 , 大肠杆菌为革兰氏阴性菌 , 同时使用两种不同性质的细菌诱导的乳腺炎较单一细菌诱导的乳腺炎更具有临床意义。

3.1 病理变化

钟凯等^[4]研究发现 , 灌注 5 和 10 μ g 内毒素组的大鼠乳腺组织结构不清 , 但仍可辨认 , 腺泡腔内出现嗜中性粒白细胞 ; 灌注 50 μ g 内毒素组的大鼠乳腺组织破坏更为严重 , 乳腺组织结构消失 , 乳腺为大量密集的嗜中性粒白细胞浸润。朱于敏等^[6-7]研究发现 , 分别灌注大肠杆菌和金黄色葡萄球菌 , 低剂量组的乳腺腺泡上皮发生轻度脂肪变性 , 腺泡腔的分泌物中有大小不一的透明滴状物 , 高剂量组的乳腺腺泡结构破坏严重 , 腺泡腔内有脱落的上皮细胞和嗜中性粒白细胞。本试验中同时灌注这两种细菌的乳腺病理变化 , 与朱于敏等^[6-7]的研究结果相一致。

3.2 细胞因子

奶牛乳腺内细菌感染的致病机理研究较多 , 白

3 讨 论

早在 1970 年 , 由 Chandler 最先成功建立了小鼠的乳腺炎模型 , 后被广泛应用于试验性乳腺内感染的病理研究。小鼠的乳腺在解剖结构和功能上都是独立的 , 与奶牛乳腺结构相似^[5]。但小鼠的乳头痛管纤细 , 乳腺组织较少 , 不便于试验操作和病理标本的收集。选择大鼠作为试验动物 , 不但操作方便 , 而且相对于使用奶山羊和奶牛来说更为经济。

有关用金黄色葡萄球菌和大肠杆菌同时人工感染动物诱导乳腺炎的试验 , 国内外尚未见有资料报

细胞尤其是嗜中性粒白细胞的聚集是乳腺免疫保护机制的最重要组成部分。IL-6 和 TNF- α 被认为是局部炎症过程中最重要的白细胞聚集因子^[8], 本试验结果也证实了这一点。嗜中性粒白细胞在分别由大肠杆菌和金黄色葡萄球菌感染的乳腺炎中, 所起的重要作用已被研究证实, 大量的嗜中性粒白细胞是 TNF- α 的重要来源^[9], 嗜中性粒白细胞大量侵入乳腺组织引起细胞因子水平升高, 这与本试验结果一致。Persson 等^[10] 研究表明, 绵羊乳腺内灌注金黄色葡萄球菌使 TNF- α 升高。朱于敏等^[7] 研究也发现, 大鼠乳腺内灌注金黄色葡萄球菌后 TNF- α 水平有升高现象。本研究结果表明, 试验组血清 TNF- α 水平均极显著 ($P < 0.01$) 下降, 这可能与血液中嗜中性粒白细胞向乳腺组织大量迁移有关。低浓度组乳腺腺泡内只发现有极少量嗜中性粒白细胞浸润, 与乳腺病理组织变化相一致。

IL-6 由啮齿类动物的 Th₂ 及巨噬细胞产生, 它通过刺激造血作用, 促进免疫球蛋白的分泌以及肝脏急性期蛋白的合成来调节炎症反应。Hagiwara 等^[11] 研究表明, 乳腺内分别灌注金黄色葡萄球菌和大肠杆菌后, 奶牛乳汁和血清中 IL-6 水平较非感染奶牛都显著升高。这与本研究结果不同, 但与朱于敏等^[6-7] 的研究结果一致, 这可能是由于在低浓度组中, 啮齿类动物的乳腺防御机能尚未完全被破坏, 对乳腺还能起到一定的保护作用, 乳腺中 IL-6 升高, 调节炎症反应。但在高浓度组金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的共同作用下, 大鼠乳腺组织破坏严重, 完全丧失炎症的自我调节能力, IL-6 不断被耗竭, 导致其浓度显著下降。

3.3 NA Gase

本试验结果显示, 试验组乳腺 NA Gase 活性与分别单独使用金黄色葡萄球菌和大肠杆菌诱导的 NA Gase 变化趋势一致^[6-7]。炎症过程在促进了被破坏细胞内酶释放的同时, 促进了嗜中性粒白细胞的补充。血清中 NA Gase 活力下降, 这可能与嗜中性粒白细胞大量向乳腺迁移有关。

综上所述, 作为乳腺炎的两大类致病菌的典型代表, 本试验用高、低浓度的金黄色葡萄球菌和大肠杆菌成功地联合诱导了大鼠的乳腺炎模型, 为奶牛乳腺炎的深入研究提供了一个更方便、经济的试验平台。

【参考文献】

- [1] Candace A D V M. Mastitis vaccines: Alternative strategies for controlling environmental mastitis [J]. Large Animal Veterinarian, 1995, 5: 10-14.
- [2] 杨克礼, 刘士喜, 朱先春, 等. 奶牛临床型乳腺炎病原菌分离试验 [J]. 安徽农业科学, 2000, 28(5): 671-693.
- [3] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验 [M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2003.
- [4] 钟凯, 王艳玲, 邹思湘, 等. 乳头管灌注内毒素诱发大鼠实验性乳腺炎模型的建立 [J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(5): 654-658.
- [5] Sanchez M S, Ford C W, Yancey R J. Efficacy of tumor necrosis factor- α and antibiotics in therapy of experimental murine *Staphylococcal mastitis* [J]. J Dairy Sci, 1994, 77: 1259-1266.
- [6] 朱于敏, 马海田, 陈伟华, 等. CpG-DNA 对大肠杆菌诱导的大鼠实验性乳腺炎的影响 [J]. 农业生物技术学报, 2006, 14(5): 706-710.
- [7] 朱于敏, 苗晋锋, 邹思湘, 等. CpG-DNA 对金黄色葡萄球菌诱导的乳腺炎大鼠的保护研究 [J]. 中国农业科学, 2007, 40(1): 183-189.
- [8] Winter P, Colditz L G. Immunological response of the lactating ovine udder following experimental challenge with *Staphylococcus epidermidis* [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2002, 89: 57-65.
- [9] Rambeaud M, Almeida R A, Pighetti G M, et al. Dynamics of leukocytes and cytokines during experimentally induced *Streptococcus uberis mastitis* [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2003, 96: 204-208.
- [10] Persson W, Colditz K, Seow I G. Accumulation of leucocytes and cytokines in the lactating ovine udder during mastitis due to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* [J]. Research of Veterinary Science, 1997, 62: 63-66.
- [11] Hagiwara K, Yamanaka H, Hisaeda K, et al. Concentrations of IL-6 in serum and whey samples from healthy and mastitis cows [J]. Ve Res Communication, 2001, 25: 99-108.