

大鼠子宫内膜炎模型的建立及其动态病理学观察

郝艳阳,王春江,赵 宝,齐雪峰,赵献军

(西北农林科技大学 动物医学院,陕西 杨凌 712100)

【摘要】 **【目的】**建立大鼠子宫内膜炎模型,为子宫内膜炎的发病机理及其预防治疗研究提供合适的动物病理模型。**【方法】**将 30 只清洁级雌性大鼠随机分为感染组(22 只)和对照组(8 只),采用手术法给大鼠子宫腔内感染致病性大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、无乳链球菌(菌液体积比为 2:1:1)的混合菌液,对照组大鼠未感染致病菌的混合菌液。分别于感染后第 3,6,9,12 天剖杀大鼠,检测其大体剖检病变和组织病理学变化,计算子宫指数,并对子宫内容物病原菌进行分离鉴定。**【结果】**感染后 3~12 d,感染组大鼠子宫指数均较对照组大鼠极显著增加($P<0.01$),感染大鼠子宫出现急性卡他性炎症(感染后第 3 天和第 6 天)、化脓性炎症(感染后第 9 天)和慢性增生性炎症(感染后第 12 天);感染前期可见子宫内上皮细胞脱落,黏膜层水肿、充血、出血,炎症细胞浸润;感染后期可见肌层增厚等病变。**【结论】**采用手术法成功建立了大鼠子宫内膜炎模型,且感染后第 3 天为造模成功的最佳时间。

【关键词】 子宫内膜炎;大鼠模型;手术法;组织病理学

【中图分类号】 S852.3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)04-0001-06

Establishment and dynamic histopathology observation of rats model with endometritis

HAO Yan-yang, WANG Chun-jiang, ZHAO Bao, QI Xue-feng, ZHAO Xian-jun

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** The research was to establish animal model of endometritis in rats to study the pathogenesis of the cow endometriosis, and to provide an *in vitro* model for prevention and treatment of the disease. **【Method】** 30 clean female rats were randomly divided into inoculated group with 22 and control group with 8. The mixed pathogenic bacteria of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* (bacteria liquid volume proportion was 2:1:1) were inoculated into uterine cavity using surgery method, while the control group was not inoculated. The macroscopic anatomical lesions, histopathological change and uterine index were detected on the 3rd, 6th, 9th, 12th day post inoculation (d. p. i.), and pathogenic bacteria were isolated from uterine elution at different time points also. **【Result】** The uterine index of infected rats increased more significantly than that of the control on the 3rd to 12th days post inoculation ($P<0.01$). Uterus of infected rats showed acute catarrhal inflammation (3 and 6 d. p. i.), suppurative inflammation (9 d. p. i.) and chronic proliferative inflammation (12 d. p. i.) with the progress of the infection. The damage of uterus including uterine epithelial cells shedding, hyperaemia, haemorrhage, and inflammation cells infiltrates was observed at early stage of infection, and muscularis thickening was shown later on. **【Conclusion】** Rat model of endometritis was established by using surgery method, and the appro-

* [收稿日期] 2009-10-30

[基金项目] 国家科技支撑计划项目“奶牛发展重大关键技术研究”与示范”(2006BAD04A11);陕西省农业攻关项目(2007K02-03-01);陕西省“13115”科技创新工程项目“高效绿色饲料生产关键技术研究”与示范”(2007ZDKG-15)

[作者简介] 郝艳阳(1984—),男,河南洛阳人,在读硕士,主要从事动物中毒性与营养代谢性疾病研究。

E-mail: haoyanyang2006@126.com

[通信作者] 赵献军(1961—),男,陕西蒲城人,教授,主要从事动物中毒性与营养代谢性疾病研究。

E-mail: zhaoxianjun458@sina.com

appropriate time for development of rat model of endometritis was on the 3rd day post inoculation.

Key words: endometritis; rat model; surgical method; histopathology

奶牛子宫内膜炎是严重危害奶牛养殖业发展的四大疾病之一,该病发病率高,流行范围广,影响奶牛泌乳量,增加饲养成本和淘汰率,给养牛业造成了巨大的经济损失^[1]。虽然国内对奶牛子宫内膜炎进行了广泛研究^[2-5],但多数文献仅局限于小量样本的临床观察和治疗研究,这与奶牛为大型家畜且经济价值较为昂贵有关,而且目前尚缺乏公认的小型经济的子宫内膜炎试验动物模型,这严重制约了对该病预防与治疗的深入研究。本研究通过手术法,将奶牛子宫内膜炎常见致病菌直接感染试验大鼠,建立子宫内膜炎大鼠模型,以期对奶牛子宫内膜炎的发病机理及其有效防控研究,提供方便、经济、合适的动物病理模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 清洁级雌性大鼠(合格证号:2007-001),8~12 周龄,体质量 250~280 g,购自第四军医大学实验动物中心,适应饲养 3 d 后备用。自制大鼠全价饲料,营养标准参考文献^[6]。

1.1.2 菌种 大肠埃希菌(C83903)、金黄色葡萄球菌(CVCC 2258)和无乳链球菌菌株(CGMCC 8405),均由西北农林科技大学动物医学院微生物实验室张耀相老师提供。

1.1.3 主要试剂 注射用青霉素钠(批号:C080800509),哈药集团制药总厂产品;速眠新 II 注射液(批号:20050104),军事医学科学院军事兽医研究所产品;复方碘酒(批号:080523),山东利尔康消毒科技有限公司产品;新洁尔灭消毒液(批号:20090202),德州安捷高科消毒制品有限公司产品;配置培养基的各种成分,北京奥博星生物技术有限责任公司产品。

1.1.4 培养基 伊红美兰琼脂培养基、高盐甘露醇琼脂培养基、叠氮化钠结晶紫血琼脂培养基和血清琼脂培养基,配置方法参考文献^[7]进行。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 将 30 只清洁级雌性大鼠随机分为感染组(22 只)和对照组(8 只)。

1.2.2 致病菌混合菌液的配制 将大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和无乳链球菌菌株,分别接种于伊红美兰琼脂培养基、高盐甘露醇琼脂培养基和叠氮化钠结

晶紫血琼脂培养基,进行细菌的纯化、镜检。纯化菌株经血琼脂平板增菌后,用生理盐水稀释比浊,将预试验菌液浓度分别稀释为 3×10^8 , 9×10^8 和 27×10^8 CFU/mL 3 个梯度^[8]。根据动物的存活率和大体剖检病变,确定 9×10^8 CFU/mL 为最佳感染浓度。将以上 3 种菌液按体积比 2:1:1 的比例配制成混合菌液^[8],4 °C 保存备用。

1.2.3 手术法感染菌液^[9-12] (1)麻醉。将速眠新 II 注射液按 0.67 mL/kg 的剂量,在大鼠大腿后侧肌肉进行注射,大鼠从注射速眠新 II 到全身麻醉需 4~5 min,可维持保定期 40~60 min。

(2)手术。在大鼠进入全麻状态后,将其腹部切开进行手术,在距阴门约 3 cm 的腹中线位置,朝阴门方向剪长约 1.5 cm 的开口,向右侧分离膀胱,向左侧分离肠系膜脂肪组织,即可看到呈 Y 字型子宫,用镊子可牵拉子宫角至创口。

(3)接种病原菌。对感染组大鼠注射 9×10^8 CFU/mL 的致病菌混合菌液,具体方法为:从子宫角结合部进针向卵巢方向刺入,在刺入过程中以螺旋形或反复进针的方法,造成子宫内膜机械损伤,之后在两侧子宫分别注入 0.1 mL 的混合菌液。感染完成后,矫正膀胱和子宫的位置,涂撒少量青霉素钠粉剂。连续螺旋缝合浆膜层和肌层,结节缝合皮肤层,缝合完毕后碘酊棉涂擦,每日消毒 1 次。恢复饮水,正常清洁饲养。对照组大鼠仅进行开腹和关腹手术,未进行子宫处理。

1.2.4 病料的采集 分别于感染后的第 3,6,9,12 天,随机脱颈椎处死 5 只感染组大鼠和 2 只对照组大鼠。剖检,记录大体剖检病变,分离大鼠子宫并计算子宫指数,子宫指数=(子宫湿质量/动物体质量) $\times 100$ ^[13]。用 pH 7.2 的无菌 PBS 液反复冲洗子宫后,取适量子宫内容物接种选择性培养基,进行病原菌的分离鉴定^[7]。

1.2.5 病理组织学观察 取 1 cm 子宫角中部,用甲醛固定后,将子宫组织用石蜡包埋后常规切片(厚度 4 μ m),苏木精伊红染色法(HE)染色^[14],光学显微镜观察。

2 结果与分析

2.1 感染子宫内膜炎大鼠的死亡情况统计及观察 感染后第 5 天发现 1 只大鼠死亡,对其剖检观

察可见,腹腔有黄色胶冻样渗出物,肠管浆膜层、腹壁浆膜层有散在出血点。渗出物经分离培养鉴定为大肠埃希菌。

2.2 感染子宫内膜炎大鼠子宫指数的变化

由表1可见,感染后3,6,9,12 d,对照组大鼠子

宫指数差异不显著,而感染组大鼠的子宫指数与对照组大鼠差异达极显著水平($P<0.01$)。感染后第3,6,9天,感染组大鼠子宫指数明显增大,至第9天时子宫指数达最大值,之后大鼠子宫指数减小,但极显著大于对照组大鼠。

表1 感染子宫内膜炎大鼠子宫指数的变化

Table 1 Change of uterine index of the rats with endometritis

感染后时间/d Time	组别 Group	子宫平均质量/g Uterine average weight	平均体质量/g Body average weight	子宫指数 Uterine index
3	对照组 Control group	0.605±0.052	275.0±9.9	0.220±0.011 a
	感染组 Inoculated group	1.695±0.095	275.0±5.9	0.617±0.042 b
6	对照组 Control group	0.608±0.058	279.5±2.1	0.218±0.023 a
	感染组 Inoculated group	1.936±0.045	276.4±5.5	0.701±0.026 c
9	对照组 Control group	0.603±0.040	280.5±2.1	0.215±0.016 a
	感染组 Inoculated group	2.948±0.067	282.8±5.6	1.043±0.042 d
12	对照组 Control group	0.629±0.011	284.0±1.4	0.220±0.005 a
	感染组 Inoculated group	1.165±0.154	286.2±6.0	0.430±0.034 e

注:同列数据后标不同小写字母者表示差异极显著($P<0.01$)。

Note: Different superscripts letters in the same column indicate extremely significant difference ($P<0.01$).

2.3 感染子宫内膜炎大鼠子宫的剖检观察

剖检后观察,对照组大鼠子宫颜色、硬度均无明显异常,浆膜面未见肿胀、充血(图1A)。感染后第3天,感染组大鼠双侧子宫轻度肿大,血管充血,子宫颈出血(图1B);感染后第6天,双侧子宫明显肿大,有光泽,充满大量渗出物,子宫角变粗,切开时有大量淡黄色、稀薄透明的液体流出(图1C);感染后

第9天,双侧子宫长度发生变化,不等长,子宫肿胀特别明显,子宫角呈灰白色,弹性降低,切开子宫有大量灰白色、恶臭的脓液流出,子宫壁变薄,出现明显的坏死灶,子宫颈和阴道有白色黏液充盈(图1D);感染后第12天,整个子宫缩小,长度变短,质地变硬,子宫壁增厚,弹性降低,管腔变小(图1E)。

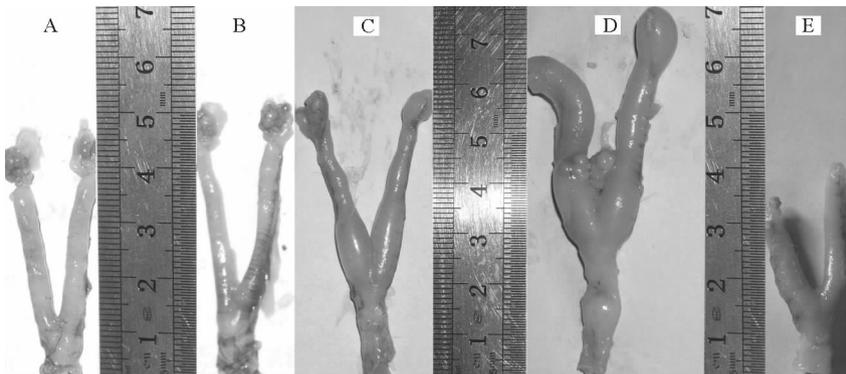


图1 感染子宫内膜炎大鼠子宫的剖检结果

A. 对照组;B. 感染后第3天;C. 感染后第6天;D. 感染后第9天;E. 感染后第12天

Fig. 1 Anatomical graph of rats uterine with endometritis

A. Control group; B. The 3rd day post inoculation; C. The 6th day post inoculation; D. The 9th day post inoculation; E. The 12th day post inoculation

2.4 感染子宫内膜炎大鼠子宫分泌物病原菌的分离检测

经鉴定感染子宫内膜炎大鼠子宫分泌物中的病原菌分别为大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和无乳链球菌,与接种的各病原菌形态一致。

2.5 感染子宫内膜炎大鼠子宫的组织病理学观察

镜检可见,对照组大鼠子宫壁各层结构清晰,间

质无炎症反应,无增生或萎缩现象,子宫黏膜上皮细胞完整无损(图2A)。

感染后第3天,大鼠子宫呈急性卡他性子宫内膜炎变化,黏膜层水肿增厚,血管扩张充血,黏膜层发生嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润(图2B)。部分黏膜上皮细胞变性、坏死、脱落、局部血管扩张充血(图2C)。

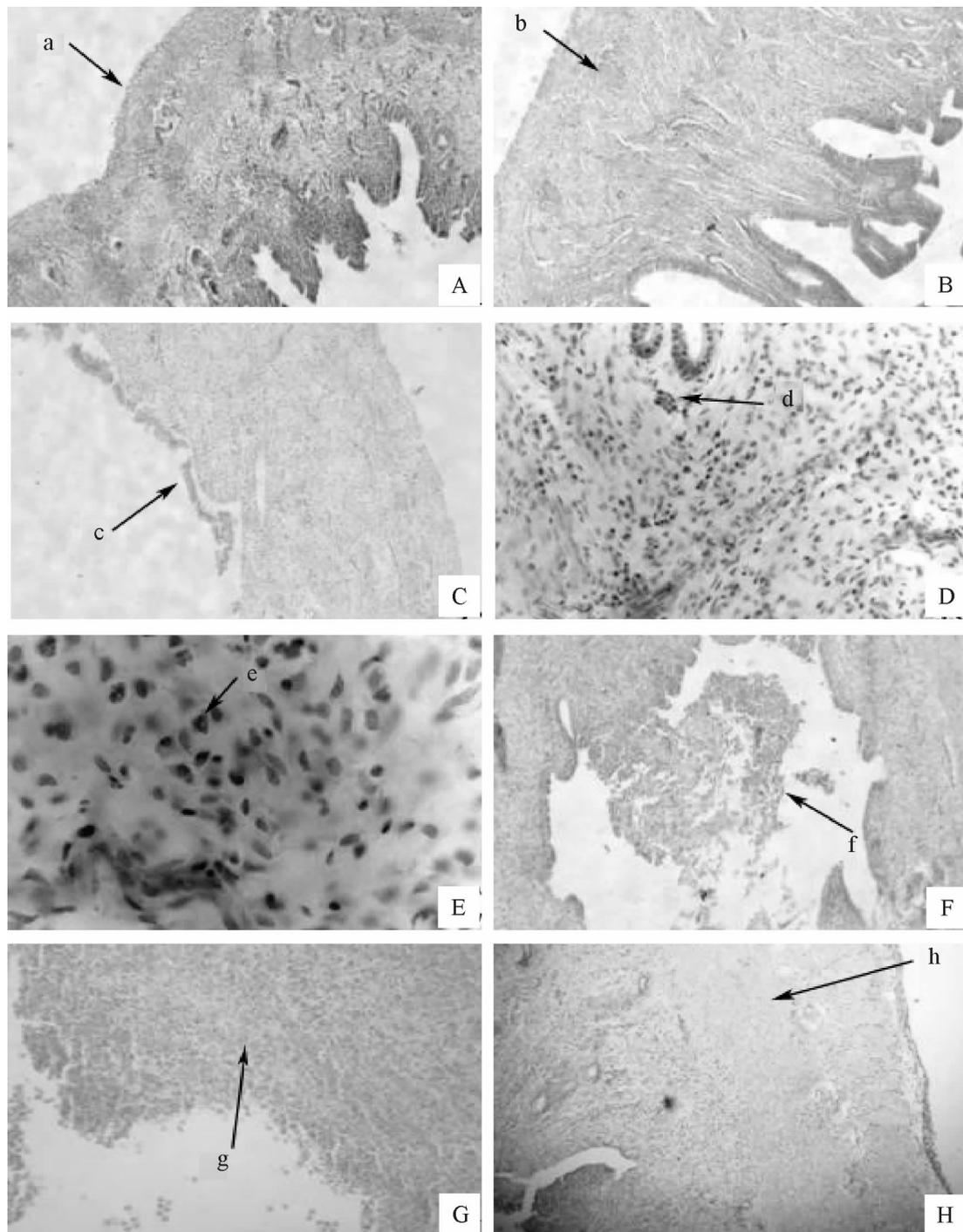


图 2 感染子宫内膜炎大鼠子宫的组织病理学的观察结果

A. 对照组大鼠子宫($\times 100$); B,C. 感染后第 3 天大鼠子宫($\times 100$); D. 感染后第 6 天大鼠子宫($\times 400$);
E. 感染后第 6 天大鼠子宫($\times 1\ 000$); F,G. 感染后第 9 天大鼠子宫($\times 100$); H. 感染后第 12 天大鼠子宫($\times 100$);
a. 结构清晰的正常子宫组织; b. 充血子宫组织; c. 脱落黏膜上皮细胞; d. 嗜中性粒细胞; e. 嗜酸性粒细胞;
f. 炎性细胞; g. 出血的黏膜层; h. 增厚的子宫肌层

Fig. 2 Histopathology observation of rats uterine with endometritis

A. Rats uterine of control group($\times 100$); B,C. Rats uterine of 3 days post inoculation($\times 100$); D. Rats uterine of 6 days post inoculation($\times 400$); E. Rats uterine of 6 days post inoculation($\times 1\ 000$); F,G. Rats uterine of 9 days post inoculation($\times 100$); H. Rats uterine of 12 days post inoculation($\times 100$); a. Clear structure of control group uterine; b. Severe hyperemia in uterus; c. The epithelial cells of uterus mucosa were shedding; d. Neutrophilic granulocyte infiltration; e. Eosinophil infiltration; f. Suppurative inflammation; g. Hemorrhage in uterus mucosa; h. Myometrium thickened

感染后第6天,大鼠子宫仍呈急性卡他性子宫内膜炎变化,黏膜层和肌层血管扩张、充血明显,管内有大量红细胞;黏膜水肿,黏膜层和固有层发生了大量的嗜中性粒细胞(图2D)、嗜酸性粒细胞和淋巴细胞的浸润(图2E)。

感染后第9天,大鼠子宫呈化脓性子宫内膜炎变化,子宫腔内蓄积大量的炎性细胞和脱落坏死的细胞碎片(图2F),并且黏膜层出血严重(图2G)。

感染后第12天,大鼠子宫呈慢性增生性炎症变化,各层组织均发生大量的炎性细胞浸润,黏膜上皮完全脱落。纵行肌和环形肌明显增厚,黏膜层、固有层、浆膜层变薄(图2H)。

3 讨论

3.1 子宫内膜炎大鼠模型的建立

家畜子宫内膜炎发生的原因多种多样,但主要与病原微生物的感染相关。据文献报道,导致家畜子宫内膜炎的主要病原菌包括致病性的大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、无乳链球菌等,此类病原体一般在配种、输精或分娩时感染子宫,并且常常是混合感染^[15-16]。子宫内膜损伤在子宫内膜炎的发生中也起着重要作用。据文献报道^[17],在子宫内膜完好的情况下,接种混合病原菌不能对子宫内膜造成病理损伤;子宫内膜的先期受损,是子宫内膜炎发生的先决条件。因此,本研究选用大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和无乳链球菌作为建模用病原菌,通过机械损伤破坏大鼠子宫黏膜,增加感染率,建立了接近于临床家畜子宫内膜炎的病理变化模型。

有文献报道,用体积分数5%的氨水或3%的冰乙酸作为子宫内膜的刺激药物,与混合病原菌协同作用,能对子宫产生病理性的损伤^[2-3]。但因刺激物的浓度、被排除及其对病原菌的抑制作用等多种因素的影响,使用化学刺激物存在诸多弊端。由于大鼠在正常情况下子宫颈口紧闭,很难用机械方法打开,虽然采用肌注雌二醇可使子宫有微弱的开张,但是一方面由于子宫颈口周围的肌层较薄,很容易刺破阴道将菌液注入腹腔,致使建模失败;另一方面灌注过程中的多次试探容易引入外界病原菌,难以保证模型感染目的病原菌^[3]。有文献报道^[18-22],雌二醇能抑制大肠埃希菌在子宫内膜上皮的黏附,而病原菌对黏膜上皮细胞的黏附作用,是病理过程的决定性因素。本试验采用手术法,将混合病原菌菌液接种于子宫腔内,可明显增加病原菌对子宫内膜黏膜的侵染、定植,提高建模成功率。

3.2 子宫内膜炎大鼠的病理学变化

临床上将家畜子宫内膜炎分为急性和慢性2种。一般而言,急性子宫内膜炎多发于产后,根据临床症状及阴门中排出的分泌物即可做出临床诊断。但如果病变轻微,一般很难确诊,尤其是在患隐性子宫内膜炎时更难以诊断。慢性子宫内膜炎可根据临床症状、发情时分泌物的性状、阴道检查、直肠检查和实验室检查的结果进行诊断^[1]。

本研究中,随着感染时间的延长,感染组大鼠子宫病变均由急性型炎症逐渐转变为慢性型炎症。通过比较观察各感染阶段的子宫大体剖检变化、子宫指数变化及组织病理变化发现,混合病原菌手术感染后第3天的试验大鼠,肉眼可见子宫红肿,镜检结果显示感染子宫有明显的炎症病变,子宫腔壁结构破坏,内膜充血水肿,并伴有大量炎性细胞的浸润,同时可见内膜上皮细胞变性、坏死、脱落,充血、淤血等典型炎症症状,说明手术感染后第3天为制作模型成功的最佳时期。

[参考文献]

- [1] 陈家璞. 乳牛疾病学 [M]. 北京:农业出版社,1992:270-278.
Chen J P. Science of dairy cattle disease [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1992: 270-278. (in Chinese)
- [2] 王国卿. 产后正常奶牛和子宫内膜炎患牛子宫内细菌的研究 [D]. 哈尔滨:东北农业大学,2000.
Wang G Q. The uterine bacteria in both postpartum normal and endometritis affected cows [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2000. (in Chinese)
- [3] Takacs T, Gathy L, Maehaty Z, et al. Bacterial contamination of the uterus after parturition and its effect on the reproductive performance of cows on large-scale dairy farms [J]. Theriogenology, 1990, 33: 851-866.
- [4] Elliott L, McMahon K J, Gier H T, et al. Uterus of the cow after parturition: bacterial content [J]. American Journal of Veterinary Research, 1968, 29: 77-78.
- [5] Hussain A M, Daniel R C, O'Boyle D. PostPartum uterine flora following normal and abnormal puerperium in cows [J]. Theriogenology, 1990, 34: 291-302.
- [6] 许东. 实用医学检验技术 [M]. 郑州:河南科学技术出版社, 1993: 380.
Xu D. The examination of practical medicine [M]. Zhengzhou: Henan Science and Technology Press, 1993: 380. (in Chinese)
- [7] 张哲元. 临床细菌学检验技术 [M]. 长春:长春出版社, 1997: 178-197.
Zhang Z Y. Clinical bacteriology testing technology [M]. Changchun: Changchun Publishing House, 1997: 178-197. (in Chinese)
- [8] 和翀翼. 防治奶牛子宫内膜炎新兽药的研究 [D]. 大庆:黑龙江八一农垦大学, 2008.

- He C Y. Studies on a new form of veterinary medicine for dairy cow with endometritis [D]. Daqing, Heilingjiang, Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2008. (in Chinese)
- [9] Mikamo H, Kawazoe R, Izumi K, et al. Therapeutic effects of herbal medicines (Juzentaiho-to and Ryutan-shakan-to) in a rat intrauterine infection (pyometra) model [J]. *Current Therapeutic Research*, 1997, 58: 454-458.
- [10] Mikamo H, Kawazoe K, Sato Y, et al. Therapeutic effects of a new quinolone, DU-6859a, on polymicrobial infections in a newly designed model of rat uterine endometritis [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1998, 41: 131-133.
- [11] Mikamo H, Kawazoe K, Sate Y, et al. Effects of crude herbal ingredients on serum levels of inflammatory cytokines in a rat uterine endometritis model [J]. *Current Therapeutic Research*, 1999, 60: 105-110.
- [12] Barbeito C, Woudwyk M, Cacciato C, et al. *Tritrichomonas foetus*: Experimental infection in pregnant BALB/C mice [J]. *Experimental Parasitology*, 2008, 120: 156-160.
- [13] 贺丰杰, 王晓静, 朱丽红. 活血化瘀中药靶向给药祛除大鼠子宫内膜的初步研究 [J]. *陕西中医学院学报*, 2005, 28(1): 11-14.
He F J, Wang X J, Zhu L H. Studies on the elimination of rat, s endometrium with target-administration of traditional Chinese blood-activating & stasis-removing drug [J]. *Journal of Shaanxi College of Traditional Chinese Medicine*, 2005, 28(1): 11-14. (in Chinese)
- [14] 芮菊生. 组织切片技术 [M]. 北京: 人民教育出版社, 1980: 80-93.
Rui J S. Tissue section technique [M]. Beijing, People's Education Press, 1980: 80-93. (in Chinese)
- [15] Vecchio R P, Matsas D J, Forin S, et al. Spontaneous uterine infections are associated with elevated prostaglandin F_{2α} metabolite concentrations in postpartum dairy cows [J]. *Theriogenology*, 1994, 41: 413-421.
- [16] Ambrose J D, Pattabiraman S R, Venkatesan R A. Types and incidence of aerobic bacteria indifferent puerperal conditions in bovines [J]. *Cheiom*, 1986, 15: 176-179.
- [17] 赵红琼, 简子健, 姚刚, 等. 建立大鼠实验性子宫内膜炎模型的探讨 [J]. *新疆农业大学学报*, 2008, 31(3): 5-8.
Zhao H Q, Jian Z J, Yao G, et al. A discussion of experimental endometritis model in rat [J]. *Journal of Xinjiang Agricultural University*, 2008, 31(3): 5-8. (in Chinese)
- [18] Nishikawa Y. Adherence of *Escherichia coli* in pathogenesis of endometritis and effects of estradiol examined by scanning electron microscopy [J]. *Infection And Immunity*, 1985, 47(1): 318-321.
- [19] Nishikawa Y, Baba T, Imori T. Effect of the estrous cycle on uterine infection induced by *Escherichia coli* [J]. *Infection and Immunity*, 1984, 43: 678-683.
- [20] Bondurant R H. Inflammation in the bovine female reproductive tract [J]. *Journal of Animal Science*, 1999, 77: 101-110.
- [21] Mikamo H, Kawazoe K, Sato Y, et al. Effects of crude herbal ingredients on intrauterine infection in a rat model [J]. *Current Therapeutic Research*, 1998, 59: 122-127.
- [22] Monteavaro C E, Soto P, Gimeno E J, et al. Histological and lectin binding changes in the genital tract of mice infected with *tritrichomonas foetus* [J]. *Journal of Comparative Pathology*, 2008, 138: 40-45.