

地鼠结肠炎模型的研究

刘林祥 张相勇 宋红月 牛惠珍 李志军

(中医研究院中药研究所, 北京)

近年来国外的研究证明, 难辨梭状芽孢杆菌 (*Clostridium difficile*) 及其毒素是人类伪膜性结肠炎的病因。地鼠小肠结肠炎被认为是最接近于该病的模型。我们用青霉素及庆大霉素的混合液经各种途径给予地鼠后建立了地鼠结肠炎模型。给药后动物出现腹泻、死亡、盲肠显著肿大, 部分盲肠并有出血或水样内容物。万古霉素可以保护动物免于死亡, 使盲肠内容物中病原体消失。

关键词 难辨梭状芽孢杆菌; 结肠炎模型

伪膜性结肠炎是一种和抗生素治疗相关联的严重疾病。它的病原为一种厌氧菌——难辨梭状芽孢杆菌 (*Clostridium difficile*)^[1-3]。在伪膜性结肠炎及部分抗生素腹泻患者的粪便中可以分离到这种细菌^[4], 并可测出它所产生的毒素^[5]。这种毒素能被索氏梭状芽孢杆菌 (*Clostridium sordellii*) 的抗毒素或某些多价抗气性坏疽血清中和^[6]。给地鼠注射洁霉素^[7]或氯洁霉素 (clindamycin)^[2] 动物大多死于小肠结肠炎。后来的研究发现, 大多数抗生素都有不同程度的这种作用^[8]。病原学、病理学及组织学的研究表明, 地鼠结肠炎是迄今最接近于伪膜性结肠炎的模型^[4]。

我们的目的是结合本研究室的条件建立地鼠结肠炎模型, 以便进一步研究中药的治疗作用。

材料和方法

(一) 动物

金黄地鼠, 70—90g, 雄性, 由中国预防医学中心流行病学微生物学研究所供给。随机分组, 每组动物饲养在一铁丝笼内。

(二) 抗生素

青霉素 G 钾盐、庆大霉素 (市售注射剂)、噻

孢霉素、卡那霉素、万古霉素、红霉素 (卫生部药品生物制品检定所标准品)、利福霉素 (Sigma Chemical Co.)。除红霉素用乙醇、利福霉素用二甲亚砜溶解, 最后以蒸馏水稀释至所需浓度外, 其余均直接用水溶解。

(三) 诱发地鼠结肠炎

经腹腔、皮下、肌肉或灌喂将各种抗生素按实验所需量给予地鼠。给药间隔及次数根据具体实验而定。停药后, 逐日观察动物的健康、腹泻及死亡情况。经一定时间后, 将动物拉颈处死, 称重, 切开腹腔, 结扎迴肠末端及结肠起端, 无菌操作取出盲肠, 置无菌平皿内。称重后, 迅速移至无菌室进行细菌分离。因为地鼠结肠炎的突出病变特征为盲肠扩张, 充血肿大, 所以实验结果以盲肠指数 (盲肠重 ÷ 体重 × 100) 表示。

结果

(一) 几种抗生素诱发地鼠结肠炎的试验

我们观察了红霉素、卡那霉素、利福霉素、噻孢霉素、青霉素及庆大霉素经腹腔注入及灌喂给予地鼠后的发病情况。给药量为: 前 4 种抗生素每次每只 5mg, 用青霉素及庆大霉素则分别为 10 万及 1 万单位。

本文于 1984 年 2 月 15 日收到。

对照组给予同体积的蒸馏水,每日2次,共5天。停药后5天解剖。动物盲肠肿大,因出血颜色变深,部分盲肠充气并有水样内容物。用盲肠指数做t测验,红霉素、青霉素及庆大霉素处理的动物与对照组有显著差异,其余抗生素则不显著。考虑到抗生素的供应、价格等因素,我们决定以青霉素及庆大霉素注射液作为建立地鼠结肠炎模型的抗生素。

(二) 青霉素、庆大霉素及二者的混合液诱发地鼠结肠炎

动物分组后,每8小时灌喂一次,给药5天。每次每只给药量:青霉素10万单位,庆大霉素1万单位,青霉素和庆大霉素

混合液(分别为10万及1万单位)。停药后10天解剖。结果青霉素组7只动物中有6只于停药后5—6天死亡。实验组动物体重下降,盲肠肿大,含血内容物,盲肠指数与给水对照组相比均有显著差异(表1)。

(三) 青霉素与庆大霉素混合液不同注射量与盲肠指数的关系

本实验用两种方法进行。第一种方法是灌喂上述剂量药物,但给药次数不同,结果三个实验组分别与对照组相比,盲肠指数均有显著差异,相互之间差异不显著(表2)。在第二种方法中,给药次数相同,每次给药量不同,结果也与第一种方法的结果相同(表3)。

表1 青霉素及庆大霉素诱发地鼠结肠炎

Table 1 Induction of hamster colitis by penicillin and gentamicin

组别 Group	动物数(只) Number of animals tested	平均体重(g) Mean body weight			盲肠重 Cecal weight ($m \pm S. E.$)	盲肠指数 Cecal index ($m \pm S. E.$)	盲肠指数 t测验 Cecal index t test
		实验开始 at start	解剖时 at autopsy	平均增减 mean change			
青霉素 Penicillin	7	92.9	72.1	-20.8	3.38 \pm 0.46	4.70 \pm 0.80	P<0.001
庆大霉素 Gentamicin	7	88.2	72.3	-15.9	11.00 \pm 1.05	15.24 \pm 1.69	P<0.001
青霉素+庆 大霉素 Penicillin+ gentamicin	6	93.6	76.5	-17.1	5.36 \pm 0.54	6.63 \pm 0.71	P<0.001
对照 Control	7	89.1	97.8	+8.7	2.82 \pm 0.25	2.91 \pm 0.47	

表2 青霉素-庆大霉素混合液不同给药次数与盲肠指数关系

Table 2 Relationship between the administration frequency of penicillin-gentamicin mixture and the cecal index

给药次数 Frequency of administration	动物数(只) Number of animals tested	盲肠重(g) Cecal weight	盲肠指数 Cecal index ($m \pm S. E.$)	盲肠指数 t测验 Cecal index t test
10	6	76.9 \pm 4.93	9.62 \pm 5.73	P<0.05
6	6	4.68 \pm 2.27	5.50 \pm 2.51	P<0.05
2	5	5.67 \pm 0.67	5.18 \pm 0.80	P<0.001
对照 Control	5	2.54 \pm 0.46	2.83 \pm 0.59	

表 3 不同量青霉素-庆大霉素混合液与盲肠指数关系

Table 3 Relationship between various amount of penicillin-gentamicin mixture and the cecal index

给药量(单位/只/次) Antibiotic dosage (units/animal/injection)	动物数(只) Number of animals tested	盲肠重(g) Cecal weight ($m \pm S. E.$)	盲肠指数 Cecal index ($m \pm S. E.$)	盲肠指数 t 测验 Cecal index t test
青霉素 40 万+庆大霉素 2 万 Penicillin (400,000) + gentamicin (20,000)	6	4.84 \pm 1.21	7.28 \pm 1.97	P<0.001
青霉素 20 万+庆大霉素 1 万 Penicillin (200,000) + gentamicin (10,000)	6	4.23 \pm 1.31	6.14 \pm 1.39	P<0.001
青霉素 10 万+庆大霉素 5000 Penicillin(100,000) + gentamicin (5,000)	6	5.37 \pm 0.55	7.05 \pm 0.71	P<0.001
青霉素 5 万+庆大霉素 2500 Penicillin (50,000) + gentamicin(2,500)	4	4.00 \pm 0.84	5.46 \pm 0.81	P<0.001
蒸馏水 Dist. water	6	3.03 \pm 0.19	3.19 \pm 0.36	

表 4 给药后不同时间的地鼠盲肠指数

Table 4 Cecal indexes calculated at intervals after the administration of antimicrobial agents

组别 Group	动物数(只) Number of animals tested	停药后解剖时间(天) Time of autopsy (days after discon- tinuing administra- tion)	体重(g) Body weight		盲肠重(g) Cecal weight ($m \pm S. E.$)	盲肠指数 Cecal index ($m \pm S. E.$)	盲肠指数 t 测验 Cecal index t test
			给药前 before admi- nistration	解剖时 at autopsy			
1	5	4	73.1 \pm 2.8	67.4 \pm 5.5	4.68 \pm 1.53	6.89 \pm 1.53	P<0.01
2	5	4	79.7 \pm 12.8	81.5 \pm 14.7	2.48 \pm 0.39	3.09 \pm 0.49	
3	4	7	66.7 \pm 6.0	76.3 \pm 8.15	3.96 \pm 0.48	5.19 \pm 0.39	P<0.001
4	4	7	83.0 \pm 4.9	95.3 \pm 12.4	2.60 \pm 0.49	2.80 \pm 0.45	
5	4	14	67.1 \pm 7.4	82.0 \pm 13.8	3.12 \pm 0.63	3.79 \pm 0.32	P<0.025
6	5	14	81.0 \pm 9.7	90.7 \pm 4.6	2.11 \pm 0.28	2.26 \pm 0.19	

(四) 青霉素-庆大霉素混合液灌喂地鼠后不同时间的盲肠指数

将动物随机分做 6 组: 1、3、5 组灌喂抗生素混合液 6 次; 2、4、6 组灌喂蒸馏水。停药后 4 天、7 天及 14 天分别将 1、2 组, 3、4 组及 5、6 组解剖。结果在 14 天内给药组及对照组的盲肠指数的差别均显著, 只是随着停药后时间的延长, 盲肠指数似有减小的趋势(表 4)。

(五) 地鼠性别与盲肠指数

国外各实验室均使用雄性地鼠做结肠炎模型。在我们的实验中用不同性别的动

物作试验, 结果未见差异(表 5)。灌喂抗生素方法同前。

(六) 万古霉素的保护作用

实验组于抗生素攻击前 48 小时开始经口服给予万古霉素, 每日二次, 每次每只 8mg, 共 10 天。停药后第 10 天剖杀动物, 取盲肠称重并将其内容物接种 CCA 平板^[9]分离难辨梭状芽孢杆菌(分离、鉴定及毒素测定结果另文发表)。结果(见表 6)青霉素和庆大霉素组的动物于停药后 4—7 天全部腹泻, 并于同期内陆续死亡 9 只, 而同时给予万古霉素的动物只有 1 只死亡

表 5 地鼠性别与盲肠指数

Table 5 Sex of the hamster and the cecal index

动物性别 Sex of animal	动物数(只) Number of animals tested	盲肠重(g) Cecal weight (m±S. E.)	盲肠指数* Cecal index (m±S. E.)
雄性 Male	10	5.24±1.10	8.50±1.87
雌性 Female	5	7.30±2.63	10.21±3.21
对照(雄性) Control (male)	10	2.73±0.41	3.66±1.03

* t 测验: 雌雄动物组分别与对照组相比, $P < 0.001$; 雌雄动物两组之间相比, $P > 0.2$ 。

t test: Either male or female group compared to the control, significant ($P < 0.001$). No significant ($P > 0.2$) was observed in comparison of male group with female group.

表 6 万古霉素的保护作用

Table 6 Protection with vancomycin

组别 Group	动物数 (只) Number of animals tested	体重变化(g) Change in body weight (m±S. E.)			盲肠指数 Cecal index (m±S.E.)	腹泻数 (只) Number of animals with diarrhea	死亡数 (只) Number of deaths	停药后平 均存活 (天) Mean survival days	难辨梭菌分 离阳性数 Number of isolation positive for <i>C.</i> <i>difficile</i>
		给药前 at start	解剖时 at autopsy	平均增减 mean change					
青霉素+庆大霉素 Penicillin + gentamicin	10	67.2±3.5	59.9±7.6	-7.3	3.99±1.71	10	9*	5.3	3
青霉素+庆大霉素 +万古霉素 Penicillin+genta- micin + vancomycin	10	65.5±4.6	66.4±5.4	+0.9	11.32±3.54	0	1*	9.0	0
万古霉素对照 Control (vancomycin)	10	64.7±1.9	73.9±3.2	+9.2	9.80±1.02	0	0	10	0
蒸馏水对照 Control (distilled water)	10	70.3±4.5	84.9±6.9	+14.6	2.87±0.31	0	0	10	0

* $P < 0.001$

(死亡时间为第 3 天, 在给药期间, 有可能为非特异性死亡), 而且无一腹泻, 因而保护作用明显。青霉素和庆大霉素组的病原菌分离阳性率虽然不高(3/9), 但其他三组均未分离到梭状芽孢杆菌。

讨 论

地鼠小肠结肠炎是迄今被认为研究人类伪膜性结肠炎及抗生素性腹泻的最好模型。地鼠小肠结肠炎模型的主要标志是:

腹泻、盲肠肿大及出血; 停药后一定时间内出现死亡; 由盲肠内容物中可分离到难辨梭状芽孢杆菌; 盲肠内容物含有可被索氏梭状芽孢杆菌抗毒素中和的毒素和炎症。本研究使用青霉素和庆大霉素诱发地鼠结肠炎, 尸体解剖观察到盲肠水肿明显, 由于少量出血颜色变深, 盲肠内容物中可以分离到梭状芽孢杆菌; 用组织培养细胞可以测得盲肠内容物中含有致细胞病变的毒素, 其作用可以被索氏梭状芽孢杆菌抗毒

素中和。虽然我们尚未进行结肠的组织学观察,但是由于主要病变稳定,与对照相比差别显著,万古霉素有明显的保护作用,所以可以认为这个模型已初步建成。

诱发地鼠结肠炎模型的最佳抗生素是氯洁霉素。一次皮下注射即可引起明显病变,而且出现规律性死亡^[10]。在我们的模型中,单独使用青霉素G钾盐时动物死亡率较高,但不规律;青霉素与庆大霉素的混合液则一般死亡率很低,而且停药后两周盲肠肿大仍较明显。我们认为在研究中药治疗时,停药后动物存活较长时间可能更为有利。万古霉素的保护作用及良好的临床疗效已为众多的实验及临床研究所证实^[10,11]。我们实验中动物腹泻及死亡的实验结果也说明了这点。

关于实验动物的性别与诱发结肠炎的关系,我们只进行过一次实验,所以还不能作出肯定的结论。文献报道中均使用雄性地鼠,但未见有对这种性别选择的解释。除这次实验外,我们均使用了雄性地鼠。

我们建立的这种地鼠结肠炎模型诱发方法简单,病原鉴定技术也不复杂,一般实验室均可采用。它可以作为进一步临床及药物治疗研究的基础。

参 考 文 献

- [1] 刘林祥: 国外医学(微生物学分册), 4: 153—158, 1983.
- [2] Bartlett, J. G. et al.: *J. Inf. Dis.*, 136: 701—705, 1977.
- [3] George, R. H. et al.: *Brit. Med. J.*, 1: 695—697, 1978.
- [4] Bartlett, J. G. et al.: *Rev. Inf. Dis.*, 1: 370—378, 1979.
- [5] Larson, H. E. et al.: *Brit. Med. J.*, 1: 1246—1248, 1977.
- [6] Chang, T. W. et al.: *Infect. Immun.*, 22: 418—422, 1979.
- [7] Small, J. D.: *Lab. Anim. Care*, 18: 411—420, 1968.
- [8] Fekety, R. et al.: *Rev. Inf. Dis.*, 1: 386—396, 1979.
- [9] Chang, T. W. and S. L. Gorbach: *J. Clin. Microbiol.*, 15: 465—467, 1982.
- [10] Browne, R. A. et al.: *John Hopkins Med. J.*, 141: 183—192, 1977.
- [11] Mogg, G. A. G. et al.: *Scand. J. Inf. Dis., Suppl.* 22: 41—45, 1980.

STUDIES ON THE HAMSTER COLITIS MODEL

Liu Linxiang Zhang Xiangyong Song Hongyue

Niu Huizhen Li Zhijun

(Institute of Chinese Materia Medica, Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing)

Evidence generated during the last few years firmly implicated *Clostridium difficile* as the etiological agent of antibiotic-associated pseudomembranous colitis. The hamster colitis induced by antimicrobial agents has been considered so far as the best animal model for the human disease.

The present study achieved success in inducing hamster colitis by a combin-

tion of penicillin G and gentamicin. A few days after being administered by various routes with the mixture, the hamster developed colitis in which cecum extended, haemorrhage and diarrhea occurred and a few of the treated animals succumbed to the disease. Taking "cecal index" as a parameter, the difference between the challenged and the control animals was statistically significant. The

protective effect of vancomycin was evident as judged by the mortality and the rate of diarrhea of the experimental animals.

The inducing process of the model is relatively simple. It provides a basis for

further study on the model, clinical and drug therapy of the disease.

Key words

Clostridium difficile; Colitis model

JOURNALS.IM.AC.CN