

兔急性细菌性心内膜炎的制作方法*

张春芬 张金萍¹ 王 清 王保生² 李建美 董海新³ 辛 勤 伦学庆³ (济宁 272113 济宁医学院药
理教研室 ;¹ 组织胚胎学教研室 ;² 病理解剖学教研室 ;³ 附属医院)

摘要 目的 :建立一种简单易行而且成功率高的兔细菌性心内膜炎模型。方法 :自麻醉新西兰兔颈总动脉插一导管至左心室 ,24h 后随机分为对照组和感染组。感染组自耳缘静脉注射 10^9 cfu 甲型溶血链球菌 ,对照组注射 1 ml 的生理盐水。7d 后抽血进行血液培养 ,处死后观察主动脉瓣赘生物、左心室腔内附壁赘生物及心脏组织学改变。结果 :感染组每只存活到最后的动物在主动脉瓣和左心室底部均有大小不等的赘生物生长 ;血液及赘生物培养液中均有细菌 ;光镜下观察到赘生物外 ,心内膜、心肌组织均见局灶变性、坏死、出血、纤维化和炎性细胞浸润 ,心肌间质水肿 ,并有炎性细胞浸润。而对照组主动脉瓣和左心室底部均无赘生物形成 ;光镜下见心尖部心内膜有损伤、脱落 ;血液培养结果阴性。结论 :用这种方法制作兔实验性细菌性心内膜炎成功率高 ,简单易行。

关键词 兔 ;心内膜炎 ;甲型溶血链球菌

A method for the establishment of experimental rabbit endocarditis

Zhang Chunfen (Zhang CF) , Zhang Jinping (Zhang JP) , Wang Qing (Wang Q) , *et al* (Department of

* 山东省自然科学基金青年基金资助 ,编号为 Q94 C0818

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the rabbit model of experimental endocarditis caused by α hemolytic streptococcus. **METHODS:** Rabbits were anesthetized we inserted a sterile polythelene catheter across the aortic valve from the right caroid artery into the left ventricle. 24h after the operation, the animals were divided into two group: control group and infection group. Each animal of infection group was injected with 10^9 CFU α hemolytic streptococcus through peripheral ear vein. 7d after injection, all animals were sacrificed, the vegetation at cardial valve and endocardial of the left ventricle were removed, weighted, and the number of organisms in blood and vegetation was counted. **RESULTS:** Each infection animal had cardial valve vegetation and endocardial vegetation. Infected organisms were found in blood and vegetation. Vegetations were found at aortic and buttom of left vetricle, and local degeneration, necrosis, fibrosis, inflammatory cell infiltration and interstitial edema in the endocardium and myocardium. The control animals had no vegetation, but had inflammatory injury in the endocardium. **CONCLUSION:** This method is simple and reliable for making rabbit endocarditis model.

KEY WORDS rabbit, endocarditis, α hemolytic streptococcus

建立一种简单、易行、成功率高的心内膜炎动物模型,对筛选新的治疗心内膜炎的药物是非常必要的。本实验给因插心脏导管造成心内膜损伤的新西兰兔感染甲型溶血链球菌,建立细菌性心内膜炎模型,并予以评价。

1 材料

1.1 动物 新西兰兔,雌雄各半,体重 2.0~3.0kg(济南医科院实验动物中心),实验前禁食 12h。

1.2 菌种 本实验所用菌株由中国药品生物制品检定所细菌保存中心提供,国际标准菌号为 32209。用琼脂培养基加肉汤 37℃ 恒温培养 48h。

2 方法

2.1 插心脏导管 新西兰兔,耳缘静脉缓慢注射 3% 的戊巴比妥钠溶液 0.5 ml/kg,麻醉后固定于手术台上,暴露颈部正中位置,备皮消毒后切开正中部位的皮肤,分离皮下组织及肌肉,分离出右侧颈总动脉。用动脉夹将其近心端夹闭,用手术缝合线将远端结扎。将右侧颈总动脉剪一小口,将一端联接血压计的无菌导管(外径 1.2 mm)插入,去掉动脉夹,缓慢将导管向前推进,同时注意血压的情况。颈总动脉内的平均血压一般在 100 mmHg 左右。当导管前端通过主动脉瓣进入左心室时,会看到血压有徒然的下降,平均动脉压在 70 mmHg 左右,波动幅度明显加大。同时,进行插管的手可感到较强的心脏搏动感,证明导管前端已进入左心室腔内。然后再稍稍向前推移一点,将导管末端结扎后固定于皮下,缝合手术切口,消毒后放回笼中正常饲养。

2.2 实验分组 将术后大鼠随机分为两组,一组为对照组(8 只),即只作插管,不进行细菌感染;另一组为感

染组(13 只),从耳缘静脉注射细菌。

2.3 感染细菌量的确定 实验前,我们曾用 10^6 cfu, 10^7 cfu, 10^8 cfu 和 10^9 cfu 甲型溶血链球菌感染不同的插管后的动物,发现 10^6 cfu 的菌量偏小,较难形成赘生物, 10^7 cfu 的量所形成的赘生物较小。从我们的实验结果, 10^9 cfu 的甲型溶血链球菌所致的赘生物比魏谨^[1]和 Munro 等^[2]报道的赘生物大几倍。这样更有利于筛选治疗心内膜炎的药物。

2.4 感染细菌 术后 24h,感染组从耳缘静脉注射含有 10^9 cfu 的甲型溶血链球菌培养液 1 ml。对照组注射等量的生理盐水。注射后第 2 天取血作细菌培养,培养结果阴性者立即淘汰。

2.5 血液菌落计数和赘生物观察 7d 后,取动脉血 1 ml,做细菌培养并进行菌落计数,评价单位为 cfu/ml。然后静脉注射过量的戊巴比妥钠将其处死。立即在无菌条件下打开胸腔,小心分离出右侧颈总动脉,沿导管剪开,观察导管位置。凡是导管不在心脏内的一律淘汰。随机取对照组 6 例,感染组 6 例进行以下实验:检查并分离主动脉瓣及心室腔内的赘生物(壁性赘生物),在无菌条件下称重,加入 1 ml 生理盐水均浆后做细菌培养和菌落计数,评价单位为 cuf/g 赘生物。剩余的对照组 2 例,感染组 7 例心脏标本用福尔马林溶液固定,作组织学检测。

3 结果

3.1 判断模型是否成功的条件 本实验判断心内膜炎是否成功必须具备以下条件:①血液培养细菌阳性;②导管前端在心室腔内;③主动脉瓣有赘生物;④有壁性赘生物。这四者缺一不可,不符合条件者予以淘汰。到目前为止,国内外学者都以前三个条件作为必备条

件^[3],不观察壁性赘生物是否形成。我们在实验中发现,按照我们的插管方法,导管的位置较深,导管前端都能到达左心室中部偏下,甚至到达心室底部。在心脏不断的收缩与舒张过程中,心内膜不断与导管产生摩擦,致使心内膜受到损伤。感染后细菌极容易附着,形成赘生物。所以我们又增加一个指标——壁性赘生物,并测定其大小与每克赘生物中所含的细菌数,使模型更加接近于临床上心内膜炎累及心室壁的情况。

3.2 对照组 处死后发现,本组所用动物导管前端均在心脏内,主动脉瓣及心室内均无赘生物生长(图1)。显微镜下发现,心尖部心内膜和主动脉瓣内膜均有不同程度的损伤,少量粘膜缺损(图2)。



图1 对照组,主动脉根部、二尖瓣、左心室底部均未见赘生物



图2 对照组,40×心内膜表面脱落、缺损,心肌组织正常

3.3 感染组 处死后发现,每个动物的主动脉根部,瓣膜与导管的接触缘均有大小不等的息肉状或疣状赘生物,单个或多个成排环型排列,质地松软,呈灰白色半透明状。每个动物均有壁性赘生物,较主动脉瓣赘生物大,其形状不规则,质地更脆弱,颜色为绿、黄、红、白色混合存在,特别容易剥脱(图3)。组织切片发现:在主动脉根部、二尖瓣及左心室底部心内膜均有赘生物形成。赘生物周围瓣膜纤维化增厚,有大量炎细胞浸润及出血,赘生物有局部坏死,有的赘生物中可见细

菌菌落;心内膜充血水肿明显,呈弥漫性炎细胞浸润,并有溃疡形成,表面有脓性血栓,底部有肉芽组织增生和纤维变性;心肌组织有局灶性变性、坏死、纤维化、心肌间质水肿,有炎细胞浸润(图4,5)。血液培养、赘生物称重及细菌培养结果见表1。



图3 模型组,主动脉内膜、左心室底部均有赘生物

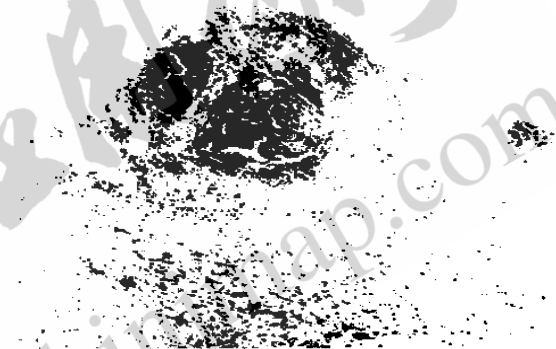


图4 模型组心内膜赘生物,40×赘生物周围有出血、炎细胞浸润、脓性血栓,局部有坏死,周围组织纤维化增厚。心肌组织有局灶变性、坏死、纤维化。心肌间质水肿,有炎细胞浸润

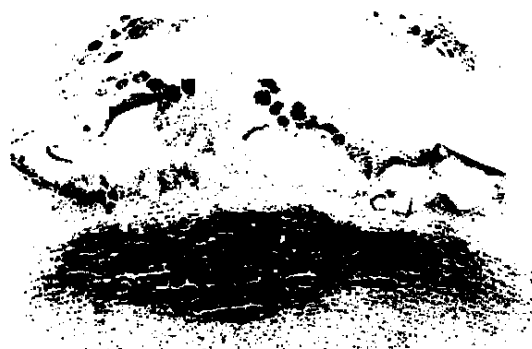


图5 模型组主动脉赘生物,40×赘生物有局部坏死和细菌菌落

4 讨论

感染性心内膜炎的发病主要与两个因素有关^[4]:

①心内膜损伤,胶原纤维暴露,血小板和纤维蛋白沉

表 1 血液培养、赘生物称重及菌落计数结果

分 组	编 号	体重/kg	血液菌落计数 / cfu·ml ⁻¹	主动脉瓣赘生物		壁性赘生物	
				重量/g	菌落计数/cfu·g ⁻¹	重量/g	菌落计数/cfu·g ⁻¹
感染组	1	2.65	1.0×10 ³	0.1861	4.84×10 ⁶	0.2814	3.34×10 ⁵
	2	2.30	6.0×10 ³	0.3299	5.00×10 ⁶	0.2354	4.04×10 ⁵
	3	2.05	2.0×10 ³	0.0853	2.15×10 ⁷	0.2241	6.43×10 ⁶
	4	2.40	1.0×10 ³	0.1388	1.01×10 ⁷	0.1299	6.92×10 ⁶
	5	2.40	1.0×10 ³	0.1485	1.00×10 ⁶	0.1332	9.76×10 ⁵
	6	2.20	1.0×10 ³	0.0847	1.18×10 ⁶	0.1296	4.24×10 ⁶
	$\bar{x} \pm s$	2.30	2.0×10 ³ *	0.1622 *	2.53×10 ⁶ *	0.1889 *	5.79×10 *
对照组		±	±	±	±	±	±
		0.20	2.0×10 ³	0.0909	1.90×10 ⁶	0.0664	2.41×10
	1	2.80	0	0	(-)	0	(-)
	2	2.68	0	0	(-)	0	(-)
	3	2.70	100	0	(-)	0	(-)
	4	2.45	0	0	(-)	0	(-)
	5	2.38	0	0	(-)	0	(-)
	6	2.56	0	0	(-)	0	(-)
	$\bar{x} \pm s$	2.60	16.7	0	0	0	0
		±	±	±	±	±	±
		0.16	40.8	0	0	0	0

注：* $P < 0.001$ vs control group

积,形成血小板纤维蛋白微血栓,并可机化,为细菌的粘着创造了条件。本实验作心脏插管就是为造成主动脉瓣和心室腔内膜损伤。②菌血症:在有心脏内膜损伤的情况下,如有大量细菌入侵,细菌即可附着到已有损伤的心内膜表面,生长繁殖,引起炎症。本实验用的甲型溶血链球菌对心脏内膜有较强的粘着力,是导致亚急性心内膜炎最常见的细菌。

从本实验结果来看,模型制作是非常成功的,感染组存活到最后的动物的模型成功率为100%。但要注意几个关键性的问题:①导管的粗细、柔软度要合适。如果导管过粗会增加插管的难度,过硬会刺伤血管或心脏,导致动物死亡。②在插管过程中要注意用力适当,缓慢进入。如果已经插入了较大一段导管而仍未见血压的明显变化,而且没有手感,这可能是导管折叠在颈总动脉内所致;如果未见血压变化而手感特别强,可能是导管卡到了主动脉根部,可退出后重新插入。③在导管突破主动脉瓣后可再稍稍向前送一点,一则可以保证导管不会随心脏的跳动而脱出,二则保证导管前端与心室壁产生摩擦而造成损伤,确保感染后壁性赘生物形成。④分离赘生物时要仔细、小心,不要弄碎赘生物。同时也要与周围组织分离好。⑤甲型溶血链球菌生长缓慢,进行血液培养时至少要培养48h。

本实验首次将壁性赘生物作为评价心内膜炎模型是否成功的必要条件,使动物心内膜炎模型更接近于临床病人的实际情况。心脏底部有附壁血栓或壁性赘生物时,往往很快会累及心脏功能,壁性赘生物的大小可间接反映心脏功能的受累及情况。本实验所作的心肌组织学检测则可直接了解心脏组织结构的变化情况。这种动物模型更加接近临床上心内膜炎病人瓣膜功能严重失调而导致心力衰竭时的情况,更有利于观察一些既有抗菌作用又有心脏保护作用的药物的疗效。

综上所述,本模型制作具有成功率高、赘生物大、操作简单的特点,同时还增加了既可反映心内膜的感染情况,又可直接或间接反映心脏功能损害程度的指标,对筛选治疗亚急性心内膜炎的药物具有重要的价值。

参考文献

1 魏瑾,李家泰.甲氧西林耐药金葡萄菌所致实验性心内膜炎的研究.中国临床药理学杂志,1996,12(1):46.
2 Munro C, Marcina M. Sucrose - derived exopolysaccharides of streptococcus matans V403 contribute to infectivity in endocarditis. Mol Microbiol, 1993, 8: 133.

3 Viscount HB , Munro CL , Burnette CD , *et al* .Imunization with FimA protects against streptococcus parasanguis endocarditis in rats .Infect Immun ,1997 ,65: 994 .

4 Besnier JM ,Bastides F ,Choutet P ,*et al* .Therapy of infections

due to methicillin susceptible staphylococcus aureus(MSSA) .
Med Mal Infect ,1997 ,27: 225 .

收稿日期 :1999 - 03 - 01