

# 解脲脲原体垂直传播动物模型的建立

吕 杰, 李风云, 唐素兰

[摘要]目的: 建立妊娠期解脲脲原体(*ureaplasma urealyticum*, UU)生殖道感染垂直传播的动物模型。方法: 血清 4型 UU 标准株生殖道感染妊娠期昆明鼠, 通过 UU 病原学检查、免疫组化等技术, 观察妊娠期 UU 感染的垂直传播情况。结果:  $3.5 \times 10^4$  CCU/ml、 $5 \times 10^5$  CCU/ml 和  $10^6$  CCU/ml UU 感染的新生仔鼠肺、脾组织 UU 阳性率分别为 0%、2.7%、1.4%、74.4%、30.3%。结论: 通过 UU 生殖道感染妊娠期孕鼠, 成功构建妊娠期 UU 垂直传播的实验动物模型。

[关键词] 解脲脲原体; 垂直传播; 小鼠, 实验

[中国图书资料分类法分类号] R 375 [文献标识码] A

## The establishment of an animal model by *ureaplasma urealyticum* vertical transmission

LÜ Jie LI Fengyun TANG Sulan

(Department of Microbiology, Bengbu Medical College, Anhui Key Laboratory of Infection and Immunity, Bengbu 233030, China)

[Abstract] **Objective** To set up a vertical transmission animal model by genital infection with *ureaplasma urealyticum* (UU) during the course of pregnancy. **Methods**昆明鼠 were infected by serotype 4 UU during the period of pregnancy through vagina. The vertical transmission from mother to filial generation was observed by UU culture and immunohistochemical staining test. **Results** UU positive rates from the lung and spleen in the newborn mice by UU infection ( $3.5 \times 10^4$  CCU/ml,  $5 \times 10^5$  CCU/ml and  $10^6$  CCU/ml) were 0% and 2.7% and 1.4%, and 74.4% and 30.3%, respectively. **Conclusions** The UU vertical transmission animal model during the course of pregnancy was constructed successfully through genital infection with UU in the pregnant mice.

[Key words] *ureaplasma urealyticum*; vertical transmission; mice; laboratory

解脲脲原体 (*ureaplasma urealyticum*, UU) 是居于泌尿生殖道的常见微生物, 是引起多种妇产科疾病的潜在致病因素。大量临床资料报道, 妊娠期 UU 感染可通过垂直传播方式影响胚胎发育, 导致早产、胎膜早破、流产、新生儿出生低体重、新生儿间质性肺炎甚至围生儿死亡等诸多不良妊娠结局<sup>[1~7]</sup>。目前关于妊娠期 UU 感染对围生期疾病的研究仅限于临床病例的调查分析, 因此建立一个妊娠期 UU 感染垂直传播的动物模型, 对于进一步研究妊娠期 UU 感染与不良妊娠结局之间相关性并阐明其发病机制十分必要。本研究拟通过 UU 生殖道局部感染妊娠期孕鼠, 观察妊娠期 UU 感染垂直传播情况。

### 1 材料与方 法

1.1 实验动物 采用成年健康昆明种小鼠, 8~10 周龄, 雌性 25~30 g, 雄性 30~35 g, 由本院实验动物中心提供。

1.2 菌株 血清 4型 UU 标准菌株购于同济大学同济医院中心实验室。

1.2.1 菌液制备 将冻于  $-80^{\circ}\text{C}$  的 UU 标准菌株于  $37\sim45^{\circ}\text{C}$  水浴中静置 1 min 使其快速融化, 接种 UU 液体培养基,  $37^{\circ}\text{C}$  恒温箱培养 24~48 h, 见培养基由黄变红, 且液体澄清透亮无浑浊, 无沉淀, 可确认有 UU 生长。

1.2.2 解脲脲原体计数 采用颜色改变单位 (colour change unit, CCU) 法, 方法为: 取 12 只无菌试管, 每管加入 1.8 ml UU 液体培养基, 取对数生长期 UU 0.2 ml 加入第 1 管, 充分混匀后吸取 0.2 ml 加入第 2 管, 依此梯度稀释至最后 1 管, 置  $37^{\circ}\text{C}$  孵育, 以培养基颜色改变的最末 1 管为颜色改变单位 (CCU/ml)。根据实验需要将 UU 浓度调整为  $3.5 \times 10^4$  CCU/ml、 $5 \times 10^5$  CCU/ml 和  $10^6$  CCU/ml 三个浓度。

1.3 UU 培养基 UU 液体培养基参照 Taylor Robinson 培养基<sup>[8]</sup> 配制。

1.4 主要试剂 血清 4型 UU 标准株抗体由东南大学医学院公共卫生学院流行病学教研室提供; SP 免疫组化试剂盒购于福州迈新生物技术开发有限公司。

1.5 实验动物感染与分组 雌雄小鼠按 2:1 比例于晚 18 时合笼, 次日早 7 时检查雌鼠阴栓, 发现阴

[收稿日期] 2006-04-07

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究计划项目资助 (2004kz74)

[作者单位] 蚌埠医学院 微生物学教研室; 安徽省感染与免疫重点实验室, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 吕 杰 (1979-), 男, 硕士, 助教。

栓者为已交配,定为妊娠 0天,将妊娠鼠合笼饲养。于妊娠第 6天将孕鼠随机分为三组,根据感染剂量不同分为 A 组:  $3.5 \times 10^4$  CCU/ml; B 组:  $5 \times 10^5$  CCU/ml; C 组:  $10^6$  CCU/ml。分别于妊娠第 7、8 天, 10、11 天和 13、14 天,用微量加样器吸取 UU 菌液注入孕鼠生殖道内进行感染,剂量为每次  $150 \mu\text{l}$  共 6 次(孕鼠感染前生殖道拭子检查无 UU 感染)。

### 1.6 实验观察

1.6.1 UU 再分离培养 待孕鼠自然分娩后,无菌条件下取孕鼠胎盘、新生仔鼠脾、肺等组织接种于 UU 液体培养基,  $37^\circ\text{C}$  孵育,发现培养基由黄变红,且培养基澄清、无浑浊、无沉淀,可初步认为有 UU 生长,经  $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜滤过后取  $0.2 \text{ ml}$  接种于 UU 固体培养基,用无菌 L 型玻棒均匀涂布,  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$  下孵育 48~72 h 低倍镜下观察,若见有油煎蛋样菌落可进一步确认。

1.6.2 UU 抗原检测 采用 SP 免疫组化法检测 UU 抗原,取上述相关组织做 UU 免疫组化检测。一抗为兔抗血清 4 型 UU 标准株多克隆抗体(使用时 10 倍稀释),二抗为羊抗兔 IgG。阳性结果呈棕黄色颗粒。

1.7 统计学方法 采用  $\chi^2$  检验和四格表确切概率法。

## 2 结果

2.1 UU 培养结果 A 组孕鼠胎盘及新生仔鼠肺、脾组织中均未检出 UU。B 组孕鼠胎盘中 UU 检出阳性率为 7.1%,新生仔鼠肺、脾组织中 UU 阳性率分别为 2.7% 和 1.4%;鼠数分别为 10 只和 5 只。C 组孕鼠胎盘中 UU 阳性率为 74.3%,新生仔鼠肺、脾组织 UU 阳性率分别为 74.4% 和 30.3%;例数分别为 255 只和 108 只。A 组与 B 组各组织中 UU 阳性率差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),而 C 组与 A、B 组各组织中 UU 阳性率差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )(见表 1)。

表 1 各组孕鼠胎盘和仔鼠肺、脾组织中 UU 检出结果比较(只)

分组	孕鼠胎盘		仔鼠		
	n	UU 阳性	n	肺 UU 阳性	脾 UU 阳性
A 组	24	0	378	0	0
B 组	28	2	366	10	5
C 组	35	26**	356	255**	108**
合计	87	28	1 100	265	113
$\chi^2$	—	47.86	—	651.20	230.26
P	—	<0.005	—	<0.005	<0.005

$\chi^2$  分割法: 与 A 组和 B 组比较 \*\*  $P < 0.01$

2.2 UU 抗原检测结果 免疫组化结果显示,在 C 组孕鼠胎盘及新生仔鼠肺、脾组织中检测到大量 UU 抗原(见图 1~4)。

## 3 讨论

国内有学者用 UU 感染雄性大鼠,建立起 UU 感染与不育关系的动物模型<sup>[9]</sup>。UU 有 14 个血清型,各血清型别的致病力存有差异,流行病学调查显示,血清 4 型 UU 致病力最强,其与垂直传播引发不良妊娠结局的关系最为密切。本实验选用致病力最强的血清 4 型 UU 作为感染菌,以 3 个不同浓度的血清 4 型 UU 生殖道局部感染妊娠期母鼠,通过 UU 病原学分离及免疫组化等技术,发现在  $1 \times 10^6$  CCU/ml(浓度最高)组新生仔鼠的相关组织中培养出 UU 并检测到大量抗原,结果显示妊娠期孕鼠感染的 UU 传播给了子代。由于小鼠妊娠周期为 19~21 天,胚胎发育的 8.5 天是器官分化开始期,我们预实验发现若在小鼠妊娠早期如 3~4 天就对孕鼠进行感染处理,极易导致母鼠妊娠失败,这对观察 UU 的垂直传播有很大影响,因此我们选择从第 7 天开始感染;另一方面,小鼠器官分化结束是在妊娠中期,而 13~14 天是小鼠妊娠中期结束,因此我们选择在第 13~14 天对孕鼠进行最后一次感染处理。

新生儿感染 UU 的途径有宫内感染、分娩时经产道感染、出生后母婴接触感染三种。我们在孕鼠胎盘中分离培养出 UU 并检测到大量 UU 抗原,这一结果说明妊娠期间生殖道感染的 UU 可通过胎盘发生垂直传播,其具体途径可能是:妊娠期间下生殖道感染的 UU 上行引起宫内感染,我们在胚胎发育早期即对孕鼠进行感染,此时胎盘屏障功能尚不完善,由于 UU 为无壁微生物,具有一定可塑性,更有可能通过发育尚不完善的胎盘屏障发生垂直传播进入胎儿体内。

我们通过血清 4 型 UU 生殖道局部感染妊娠期孕鼠,成功构建出妊娠期 UU 生殖道感染的垂直传播动物模型,为进一步研究妊娠期间 UU 感染与各种不良妊娠结局、新生儿 UU 感染性疾病之间的关系及其发病机制奠定了基础。

(本文图 1~4 见封四)

### [ 参 考 文 献 ]

- [1] Cassell GH, Waites KB, Watson HL, et al. *Ureaplasma urealyticum* intrauterine infection: role in prenatally and disease in newborn [J]. *Clin Microbiol* 1993; 6(1): 69-87.
- [2] 赵先兰, 李筱梅, 李留霞, 等. 解脲支原体感染与胎膜早破中的作用 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2001, 9(3): 64-65.

# 神经胶质瘤组织中鸟氨酸脱羧酶的表达及其多胺含量检测的意义

王 春<sup>1</sup>, 武文娟<sup>2</sup>, 陈士文<sup>1</sup>, 赵 莉<sup>1</sup>

[摘要]目的: 探讨鸟氨酸脱羧酶(ornithine decarboxylase, ODC)的 mRNA 丰度及多胺含量的改变在神经胶质瘤发生中的作用。方法: RT-PCR 法检测神经胶质瘤组织中 ODC 的表达, 同时使用 HPLC 法检测瘤组织、正常神经组织中多胺的含量。结果: RT-PCR 结果证实神经胶质瘤组织中 ODC mRNA 丰度明显高于正常的神经组织; 瘤组织中精胺和精脒含量均高于正常神经组织 ( $P < 0.01$ ); 而腐胺的含量二者差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结论: ODC 的高活性及由此产生高含量精胺与神经胶质瘤的发生有一定关系, ODC 可能作为神经胶质瘤的肿瘤标志物, 在诊断和判断其预后方面有一定的意义; 抑制神经组织中 ODC 的表达有可能作为生物治疗神经胶质瘤重要手段。

[关键词] 神经胶质瘤; 鸟氨酸脱羧酶; 多胺

[中国图书资料分类法分类号] R 739.264

[文献标识码] A

## Clinical significance of determination of ornithine decarboxylase and polyamine in human gliomas

WANG Chun<sup>1</sup>, WU Wenjuan<sup>2</sup>, CHEN Shiwen<sup>1</sup>, ZHAO Li<sup>1</sup>

(1. Department of Anatomy; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology; Bengbu Medical College Bengbu 233030 China)

[Abstract] **Objective** To explore the significance of determination of ornithine decarboxylase (ODC) messenger RNA and content of polyamine in human glioma. **Methods** RT-PCR was used to examine ODC mRNA expression in human glioma and high performance liquid chromatograph (HPLC) was used to determine the content of polyamine in tumor compared with control group. **Results** The expression level of ODC mRNA was increased in gliomas than normal nervous tissues and the content of spermine and spermidine in tumor tissues was higher than in normal tissues ( $P < 0.01$ ), but there was no difference of the content of putrescine between glioma and normal tissues ( $P > 0.05$ ). **Conclusions** It was evidence that the high ODC activation and high content of spermine were closely correlated with the growth of glioma. ODC may represent a tumor marker and may play an important role in diagnosis and prognosis of glioma. It may be an important method for biological immunotherapy.

[Key words] polyamine; gliomas; ornithine decarboxylase

多胺是细胞增殖调控的重要物质, 生理性多胺包括腐胺 (putrescine, Pu)、精脒 (spermidine, Sd) 和精胺 (spermine, Sm), 在肿瘤组织中多胺的聚集对其生长有促进作用。鸟氨酸脱羧酶 (ornithine decarboxylase, ODC) 是多胺生物合成过程中的限速酶。肿瘤组织中 ODC 的含量均较正常组织有明显增高, 而且 ODC 的增高程度与肿瘤恶性程度呈正相

关<sup>[1]</sup>。ODC 基因表达增强、ODC 活性升高, 可导致多胺生物合成增加, 与肿瘤的发生、发展有密切关系<sup>[2,3]</sup>。神经胶质瘤是最常见的脑部恶性肿瘤, 约占颅内肿瘤的 40%。本研究旨在通过 RT-PCR 方法检测神经胶质瘤组织中 ODC 的表达, 同时对瘤组织和正常脑组织中多胺的含量进行检测, 探讨 ODC 的 mRNA 丰度及多胺含量的改变在神经胶质瘤的发生发展中的作用。

## 1 材料与方法

1.1 标本采集 从蚌埠医学院附属医院肿瘤外科收集, 分为两组, 一组送病理科进行病理诊断, 另一

[收稿日期] 2006-01-17

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究计划项目 (2004kj288zc)

[作者单位] 蚌埠医学院 1. 解剖学教研室, 2. 生物化学与分子生物学教研室, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 王 春 (1968-), 男, 讲师。

[3] 周丽萍, 周 洁, 包其郁, 等. 解脲支原体感染与早产及胎膜早破的关系 [J]. 中华妇产科杂志, 1999, 34(5): 287-289.

[4] 陈淑兰, 张 力. 沙眼衣原体和解脲支原体引起自然流产、不育的临床观察 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2000, 16(2): 114-115.

[5] 叶元康, 林特夫, 黄谷良. 溶脲支原体的分离及生物学特性 [J]. 中华微生物免疫学, 1984, 4(4): 253-256.

[6] Blanchard A, Yanez A, Dybvig K, et al. Evaluation of intraspecies genetic variation within the 16S rRNA gene of *mycoplasma hominis* and detection by polymerase chain reaction [J]. *J Clin Microbiol*

1993, 31(5): 1358-1361.

[7] Quinn PA, Shewchuk AB, Shuber J, et al. Serologic evidence of *ureaplasma urealyticum* infection in women with spontaneous pregnancy loss [J]. *Am J Obstet Gynecol* 1983, 145(2): 245-250.

[8] Sanchez J, Regan J. Vertical transmission of *ureaplasma urealyticum* from mothers to preterm infants [J]. *Pediatr Infect Dis* 1990, 9(6): 398-401.

[9] 徐 晨, 孙广芳, 朱云凤, 等. 溶脲支原体感染对大鼠生育及胚胎发育影响的研究 [J]. 生殖与避孕, 1996, 16(2): 125-129.

解脲脲原体垂直传播动物模型的建立(正文见 567 页)

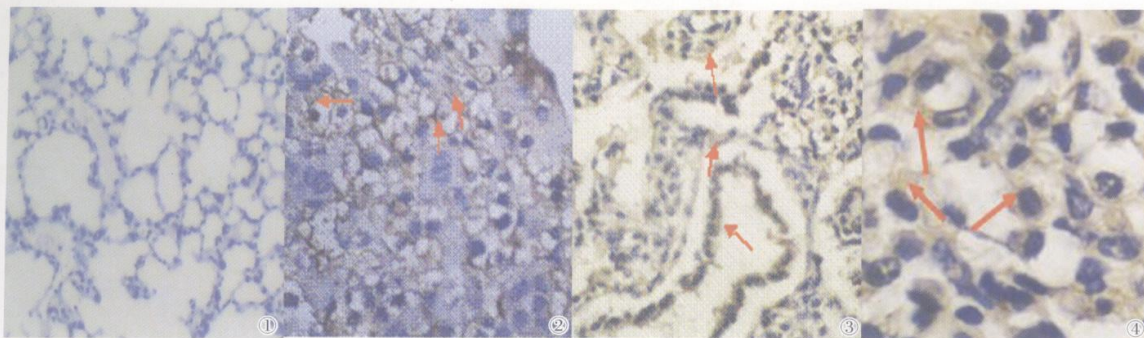


图1 免疫组化染色阴性对照 ×100 图2 C组母鼠胎盘组织免疫组化染色,可见 UU 抗原 ×1 000  
图3 C组仔鼠肺脏组织免疫组化染色,可见大量 UU 抗原 ×1 00 图4 C组仔鼠脾组织免疫组化染色,可见大量 UU 抗原 ×1 000

胶质瘤 p53、p16、bcl-2、c-fos 蛋白表达和细胞凋亡(正文见 572 页)

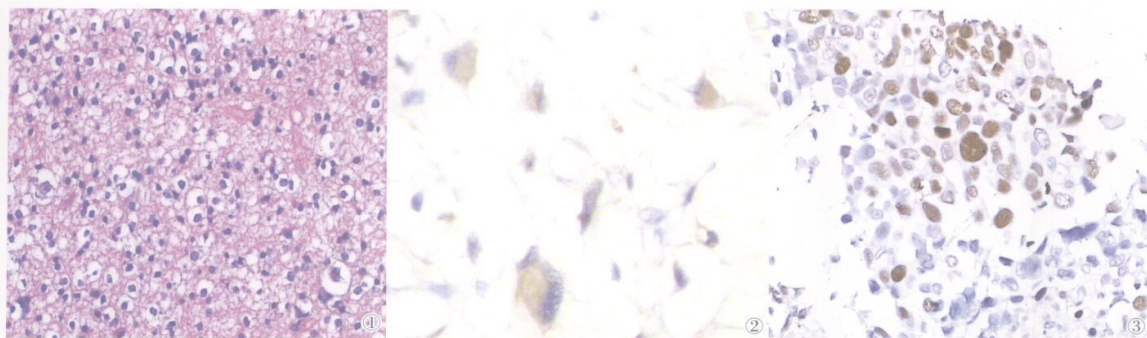


图1 胶质瘤Ⅱ级 HE 染色 ×100 图2 胶质瘤Ⅲ级,胞质内 bcl-2 蛋白表达阳性 IHC ×400 图3 胶质瘤Ⅳ级,核内阳性信号 ISEL ×200

蚌埠医学院学报

双月刊(1976年3月创刊)  
2006年第31卷第6期(总第144期)  
2006年11月15日出版

Journal of Bengbu Medical College

Bimonthly(Founded in March 1976)  
2006, Vol.31, No.6 (Sum 144)  
November 15, 2006

主管单位:安徽省教育厅  
主办单位:蚌埠医学院  
主 编:祝 延  
编辑出版:蚌埠医学院学报编辑部  
(安徽省蚌埠市东海大道 2600 号 233030)  
电话:(0552)3175456

电子信箱:bang@chinajournal.net.cn  
印 刷:蚌埠市光大彩色制印有限公司  
国内订阅:全国各地邮政局  
国内总发行:蚌埠市邮政局  
国外总发行:中国国际图书贸易总公司  
(北京 399 信箱)

Responsible Institution The Education Department of Anhui Province  
Sponsored by Bengbu Medical College  
Editor in Chief ZHU Yan  
Edited and Published by The Editorial Board of Journal of  
Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China  
Tel:(0552)3175456

E-mail bang@chinajournal.net.cn  
Printed by Bengbu Guangda Color Printing Co.Ltd  
Domestic Subscription Local Post Offices  
Domestic Distribution Bengbu Post Office  
Foreign Distribution China International Book Trading Corporation  
(P.O.Box 399, Beijing, China)

ISSN 1000-2200  
CN 34-1067/R

邮发代号:26-37 国外代号:BM 6535 广告经营许可证:皖蚌广字 039 号 国内定价:8.00 元