

结核性脑膜炎动物模型的建立

陈兰举¹, 潘家华², 张慧洁¹, 陈名武¹, 丁周志¹, 周 瑞¹

[摘要]目的: 建立结核性脑膜炎的小鼠模型。方法: C₅₇BL系雄性小鼠眼球后静脉丛注射结核分枝杆菌 H₃₇RV(0.35 mg/0.05 ml)(1×10⁶)建立结核性脑膜炎模型。4周后肉眼观小鼠脑的病变程度, 并取脑组织进行匀浆培养, 测定菌落数。结果: 小鼠经结核分枝杆菌攻击后 1周开始出现食欲降低, 逐渐消瘦, 被毛失去光泽, 寒战, 体温降低, 活动量大幅度减少, 攻击力逐渐下降至丧失; 从感染后 2周开始出现死亡, 个别小鼠出现褪毛和行为异常; 脑组织培养 4周后, 形成结核菌落。结论: 此种方法成功建立了结核性脑膜炎动物模型。

[关键词] 结核, 脑膜; 模型, 动物; 小鼠

[中国图书资料分类法分类号] R 529.3 [文献标识码] A

An animal model of tuberculous meningitis

CHEN Lan-ju¹, PAN Jia-hua², ZHANG Hui-jie¹, CHEN Ming-wu¹, DING Zhou-zhi¹, ZHOU Rui¹
(2 Department of Pediatrics, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004
2 Department of Pediatrics, Anhui Provincial Hospital, Hefei 230001, China)

[Abstract] Objective: To establish the animal model of tuberculous meningitis. Methods: Mycobacterium tuberculosis H₃₇RV(0.35 mg/0.05 ml) was injected into C₅₇BL mice through the venous plexus behind the eyeball. After four weeks, the changes of brain tissue were observed. The brain tissue used for homogenate culture and count of colony. Results: After one week of Mycobacterium tuberculosis infection, the mice began to lose appetite and manifested anorexia, emaciated clothing hair, chill and hypothermia, their activity amount decreased and aggressivity fell off to deprivation. After two weeks of infection, the mice began to die, some mice showed faded hair and abnormal behavior. Four weeks after the brain tissue was cultured, the tuberculous colony was observed. Conclusions: It is feasible to establish the animal model of tuberculous meningitis with this method.

[Key words] tuberculous meningeal models; animal mice

近十年来, 全球结核病的发病率呈增高趋势。据世界卫生组织调查, 全世界约有三分之一的人口感染了结核菌, 每年潜在感染中的一部分人演变为活动性结核病^[1]。我国结核病疫情非常严重, 为全球结核病高负担国家之一^[2]。结核性脑膜炎在结核菌感染疾病中表现形式最严重, 是结核病死亡主要原因, 并且有高致残率^[3]。结核性脑膜炎的预防、治疗以及预后已成为临床上关注的问题。到目前为止, 在结核性脑膜炎的研究工作中, 尚无成熟的动物模型可供研究之用。国内外有关结核病动物模型及其实验研究的资料很多, 但是结核性脑膜炎动物模型的实验资料尚未见报道。由于结核性脑膜炎的治疗和预后尚不完善, 建立较理想的动物模型对结核性脑膜炎的药物筛选、疗效分析、基础研究都具有十分重要的意义。本文就我们进行的结核性脑膜炎动物模型的建立作一报道。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 C₅₇BL系雄性健康小鼠 40只, SPF级, 4~6周龄, 体重 18~22 g, 购自中国医学科学院实验动物研究所, 饲养于安徽龙科马生物制药有限公司动物实验中心 SPF级动物室。小鼠分笼饲养, 自由取食饮水。喂养动物房间通风良好, 按昼夜节律采光 12 h, 保持室温 18~26 °C, 湿度 45%~65%, 并定期用紫外线空气消毒。

1.1.2 H₃₇RV标准毒力株 由安徽龙科马生物技术有限公司动物实验中心提供, 毒力指数为 60。

1.2 方法

1.2.1 结核菌悬液制备 H₃₇RV标准毒力株接种于罗氏鸡蛋培养基上, 37 °C斜面常规培养, 3~4周后长出菌落。用接种环挑取生长良好、干湿适当的菌落, 称重 70 mg, 加生理盐水 10 ml, 充分研磨后, 混匀, 制成结核菌悬液, 浓度为 0.35 mg/0.05 ml(1×10⁶)。

1.2.2 动物分组及模型建立 随机抽取小鼠 20只(结核性脑膜炎感染组), 用乙醚麻醉完全后, 经双侧眼球后静脉丛分别缓慢注入上述结核菌悬液共 0.05 ml, 余下 20只小鼠(生理盐水对照组)用同样方法注入等量的生理盐水。

[收稿日期] 2006-10-17

[基金项目] 安徽省卫生厅自然科学基金资助项目(2002B034)

[作者单位] 1 蚌埠医学院第一附属医院 儿科, 安徽 蚌埠 233004
2 安徽省立医院 儿科, 安徽 合肥 230001

[作者简介] 陈兰举(1949-), 男, 研究生导师, 主任医师, 教授。

1.2.3 观察指标 观察两组小鼠脑有无结核病变:

(1)肉眼观察脑病变程度。(2)小鼠感染 4 周后,用颈椎脱臼法处死,无菌条件下,感染组和对照组随机挑取一部分新鲜脑组织,分别称重为 0.216 g 和 0.270 g 加入 4 倍新鲜脑组织重量的无菌生理盐水后置于高速匀浆机中研磨成匀浆,再加入 5 倍新鲜脑组织重量的 4% 硫酸放置 15 min 制得原液(浓度为 10^{-1})。将原液用生理盐水稀释 100 倍、1 000 倍、10 000 倍、100 000 倍(稀释倍数视结核病变程度而定),选取 4 个稀释度的菌悬液各 0.05 ml 分别接种于改良罗氏培养基斜面上并均匀涂抹(每稀释度接种 2 管于培养基斜面上)。置于 37℃ 培养箱中,常规培养 4 周后观察菌落的生长情况,并进行菌落计数。

2 结果

2.1 病程变化 结核性脑膜炎动物模型制成后,感染组小鼠整体的结核中毒症状表现逐渐明显,主要有以下几个方面:小鼠经结核分枝杆菌攻击后 1 周开始出现食欲降低,逐渐消瘦。被毛失去光泽;寒战,体温降低,活动量大幅度减少,攻击力逐渐下降至丧失。从感染后 2 周开始出现死亡,个别小鼠出现褪毛和行为异常。生理盐水对照组小鼠状态无异常改变。为了延长感染组小鼠的存活时间,降低死亡率,我们对小鼠加强护理,每天更换垫料和饮水。并增加营养,加喂新鲜苹果、熟蛋黄、花生米等。小鼠生存状态取得一定的改善,感染组小鼠死亡速度减慢,但死亡率仍高达 26.7% (8/30)。

2.2 结核病变 (1)肉眼观察:与对照组相比,感染组个别小鼠颅骨隆起,解剖后肉眼观察脑沟有脓液溢出,脑组织出现渗出性和化脓性改变。(2)匀浆培养:感染组脑组织匀浆培养 4 周后,培养基上可见结核菌落形成,4 个稀释浓度菌落计数分别为 81 个、12 个、1 个、0 个。

3 讨论

结核性脑膜炎是结核杆菌感染疾病中最严重的表现形式,如果没有及时发现,有较高的病死率^[4]。尽管经过有效的抗结核治疗,结核性脑膜炎尤其是儿童患者病死率仍然很高,而且预防神经系统后遗症更加重要^[5]。其治疗效果和预后与诊断早晚、治疗是否及时有密切关系,但由于早期临床表现特异性差,常被误诊为隐球菌性脑膜炎、化脓性脑膜炎、病毒性脑膜炎等疾病而延误治疗,所以尽早明确诊断是治疗成功的关键。结核性脑膜炎小鼠脑组织中的结核杆菌主要在巨噬细胞内,被巨噬细胞吞噬的结核杆菌处于酸性和低氧状态,繁殖能力弱,繁殖速

度慢,但是抗结核药物对其作用差^[6],这就不难理解为何临床上结核性脑膜炎治疗效果和预后差。

动物模型的临床经过与结核菌株的毒力、注射部位和方法以及注射剂量等多种因素有关。结核菌的毒力相同而感染途径不同,对各脏器、组织的损害也不相同。感染途径相同,结核菌的毒力不同,对各脏器的损害程度也不相同^[7]。重要的是通过实验,对各方面因素进行合适的调整,建立一个理想的、稳定的动物模型进行研究。李定越等^[8]研究发现, C₅₇BL 系小鼠对结核杆菌比较敏感,是结核菌实验动物模型的最佳选择。我们参照段连山^[9]关于家兔实验性结核脑膜炎形成的研究的实验方法,用 H₃₇RV 标准毒力株,经 C₅₇BL 系小鼠的球后静脉丛感染来建立结核性脑膜炎模型,并进行脑组织匀浆培养来判断模型是否成功。为了避免污染和交叉感染因素,定期对空气进行紫外线消毒。生理盐水对照组无结核病变,表明无机会感染。实验结果证实:我们用此种方法建立的动物模型,从临床学角度小鼠发病率为 100%。而且脑组织匀浆培养结果证实,我们的动物模型是成功的。本实验为脑膜炎模型建立了较简便的操作方法,但是,感染组小鼠病死率比较高,可能是 C₅₇BL 系小鼠对结核菌比较敏感,注射的结核菌剂量过大,使小鼠免疫功能受到严重抑制的缘故。这也提示我们在以后的研究工作中可以采用不同的感染途径,不同的感染剂量,对动物进行感染对比,通过多次的探讨、摸索和改进,以获得比较理想的结核性脑膜炎动物模型,这将使我们更深入的了解结核性脑膜炎,而且对治疗的药物筛选、疗效分析以及基础研究都提供了依据。

[参考文献]

- [1] Beamer GL, Turner J. Murine models of susceptibility to tuberculosis [J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2005, 53(6): 469-483.
- [2] 张立兴. 结核病现状与对策 [J]. 中国全科医学, 2004, 4(9): 677-678.
- [3] 王俊平, 吴琦. 结核性脑膜炎诊断与治疗研究进展 [J]. 国外医学·呼吸系统分册, 2005, 25(1): 49-51.
- [4] Guseva EM, Djukanova M, Iga Gorovenko L, et al. Causes of death from tuberculosis in children under the present day conditions [J]. Probl Tuberk Bolezni Lech 2005, (9): 31-33.
- [5] Smith A, Peng A, Waecker NJ, Jr, et al. Prediction of neurologic sequelae in childhood tuberculosis meningitis: A review of 20 cases and proposal of a novel scoring system [J]. Pediatr Infect Dis J 2005, 24(3): 207-212.
- [6] 谢惠安, 阳国太, 林善祥, 等. 现代结核病学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 507.
- [7] 漆浩珊, 卢润生, 杨奇, 等. 不同毒力菌株与感染途径在建立结核动物模型中的作用 [J]. 四川医学, 1997, 18(3): 150-152.
- [8] 李定越, 卢润生, 蒋绍双, 等. 结核病实验动物模型 [J]. 四川医学, 2003, 24(7): 761-762.
- [9] 段连山. 实验动物结核病模型的建立及其在药效学中的应用 [J]. 四川生理科学杂志, 2003, 25(3): 123-126.