

减毒结核分枝杆菌 H37Ra 感染小鼠模型的实验研究

张爱霞¹, 江京娣¹, 吕静竹², 汪洪涛¹, 宋传旺¹, 姚春艳¹, 钱中清¹

[摘要] 目的: 研究减毒结核分枝杆菌 (*M. tb*) H37Ra 感染小鼠模型及其病理损伤的机制。方法: 将清洁级 Balb/c 小鼠分为对照组和 *M. tb* 模型组, 各 3 只。将 H37Ra 按照每只小鼠 1×10^6 CFU 的剂量, 经尾静脉注射感染小鼠, 分别于感染 7、14 和 21 d 后, 无菌操作取小鼠肺和脾脏组织, 测量肺和脾脏的脏器系数, 匀浆后行活菌培养; 肺和脾脏组织冷冻切片, 行 HE 染色观察病理损伤情况。结果: 小鼠感染 *M. tb* 14 和 21 d 后, 脾脏脏器系数均较感染 7 d 后显著升高 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$)。感染 7 d 后, 肺和脾脏组织匀浆均可检出活菌, 脾脏组织 H37Ra 活菌量明显高于肺脏, 并随感染时间逐渐增加; 感染 14 d 后, 肺组织病理观察可见明显感染性病损。结论: *M. tb* H37Ra 经尾静脉注射感染小鼠模型可造成部分结核样病理性损伤。

[关键词] 减毒结核分枝杆菌; 组织病理损伤; 小鼠

[中图分类号] R 378.911

[文献标志码] A

DOI: 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2016.02.001

Study on the mouse model infected by *Mycobacterium tuberculosis* H37RaZHANG Ai-xia¹, JIANG Jing-di¹, LÜ Jing-zhu², WANG Hong-tao¹, SONG Chuan-wang¹, YAO Chun-yan¹, QIAN Zhong-qing¹

(1. Department of Immunology, Anhui Key Laboratory of Infection and Immunity,

2. Department of Biochemistry and Molecular Biology Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To Study on the pathological lesion in Balb/c mice infected with H37Ra. **Methods:** The mice were divided into control group and model group infected with *Mycobacterium tuberculosis*. Balb/c mice was injected via the tail vein with attenuated *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (1×10^6 CFU/mouse). After infection, living bacteria, organ weight index of lung or spleen, and histopathological lesion were detected after 7, 14, and 21 days of infection. **Results:** Compared with the group of control, the organ coefficient of spleen increased statistically after 14 days or 21 days of infection ($P < 0.01$ and $P < 0.05$); The number of living bacteria in spleen tissue of infected mice increased with the days of infection and was higher in spleen tissue than that in lung tissue. Tuberculosis-like lesions were observed in spleen and lung tissue of infected mice model. **Conclusions:** Attenuated *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra could induced tuberculosis-like lesions in Balb/c mouse via the tail vein injection.

[Key words] *Mycobacterium tuberculosis*; histopathological lesion; mice

H37Ra 是一种减毒结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. tb*), 因为其具有与 H37Rv 有毒株相似的免疫原性, 因而成为研究 *M. tb* 感染免疫应答机制的重要工具菌^[1-2]。H37Ra 在感染细胞模型中得到了较多的研究和应用^[3]。但是, 由于毒力缺失不能形成有毒株造成的典型结核病病理改变, 因而其感染动物模型的研究报道较少。近年来, 随着对 H37Ra 和 H37Rv 菌株毒力相关基因的逐步阐明, 从动物模型水平阐明 H37Ra 和 H37Rv 有毒株引发的免疫应答及病理差异的原因, 对于寻找抗结核新靶点具有越来越重要的价值^[4]。因此, 本研究对 *M. tb* H37Ra

感染小鼠模型及其病理损伤进行实验研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料 清洁级 Balb/c 小鼠 (雌雄各半, 6~8 周龄, 16~20 g), 购于蚌埠医学院实验动物中心, *M. tb* 减毒株 H37Ra (批号: 9302025) 购于中国药品生物制品检定所北京菌种保藏中心。MiddleBrook 7H11 培养基 Tween-80 均购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 *M. tb* 培养及其菌液制备 将 H37Ra 菌株接种于 7H11 固体培养基中, 并置于 37 °C 恒温培养箱内, 当达到对数生长期时 (约 1 个月), 用无菌接种环取少许细菌置 1 mL 装有少许 Tween-80 的匀浆器中, 反复研磨, 加入 Tween-80 洗涤 2 次, 10 000 r/min, 离心 2 min, 再用 1 mL 注射器加入少许 0.9% 氯化钠注射液对细菌悬液反复吹打, 使其分散为单个菌悬液。分光光度计 600 nm 处检测菌液浓度, 用

[收稿日期] 2015-05-10

[基金项目] 安徽省自然科学基金项目 (11040606M206); 安徽省高等学校省级自然科学研究重点项目 (KJ2013A188)

[作者单位] 蚌埠医学院 1. 免疫学教研室, 安徽省感染与免疫重点实验室, 2. 生物化学教研室, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 张爱霞 (1988 -) 女, 硕士研究生。

[通信作者] 钱中清, 博士, 硕士研究生导师, 教授。E-mail: qzq7778@hotmail.com

0.9%氯化钠注射液调细菌浓度 1×10^6 /mL,同时将结核菌悬液稀释 10 倍、100 倍、1 000 倍接种于 7H11 固体培养皿上培养 21 d,根据菌落数计算活菌浓度,调整 *M. tb* 浓度为 1×10^6 CFU/mL,分装于 EP 管中,置 4 ℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 *M. tb* 感染小鼠 将小鼠分为对照组和 *M. tb* 模型组,9 只/组。小鼠感染及饲养均在蚌埠医学院实验动物中心安全二级实验室进行,将浓度为 1×10^8 CFU/mL 的 *M. tb* H37Ra 细菌悬液,通过尾静脉注射的方法感染小鼠,感染剂量为每只小鼠 1×10^6 CFU,建立 *M. tb* 感染小鼠模型^[5-6]。

1.2.3 感染小鼠肺组织匀浆的活菌培养 小鼠感染 7、14、21 d 后,分别采用颈椎脱臼法处死小鼠,用 75% 乙醇消毒小鼠体表 5 min,注意防止乙醇进入小鼠的口鼻内。超净台无菌操作分离小鼠肺脏和脾脏,先后经 0.9% 氯化钠注射液、4% 硫酸和 0.9% 氯化钠注射液漂洗,置于 200 目不锈钢筛网平皿内研磨,加 PBS-Tween-80 1 mL 用玻璃匀浆器研磨,组织悬液经 PBS-Tween-80 按照 1:10 进行梯度稀释。取原倍、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 4 个稀释度的组织匀浆稀释液 100 μ L 接种于 7H11 固体斜面培养基斜面,每个稀释度平行接种 3 支斜面。37 ℃ 恒温培养 21 d,取每个斜面上的菌落数在 5 ~ 50 CFU 稀释度范围内进行组织荷菌量计算。每个时间点的小鼠组织用于荷菌量统计的稀释度相同。观察有无菌落形成;挑取菌落、涂片并行抗酸染色,镜下寻找抗酸染色阳性菌。

1.2.4 感染小鼠肺和脾脏组织病理观察 感染小鼠 7、14 和 21 d 后分别处死,肺叶和脾脏组织用 10% 的甲醛溶液固定 24 h 后,清水冲洗残留固定液,经乙醇梯度脱水,二甲苯溶液浸润透明,浸蜡,石蜡包埋,蜡块于 4 ℃ 冰箱保存备用。小鼠肺和脾脏组织蜡块 4 μ m 切片,常规二甲苯脱蜡,乙醇梯度脱水后,行 HE 染色,中性树脂封片,光学显微镜下观察肺和脾脏组织病理改变并拍照。

1.2.5 肺脏及脾脏脏器系数测定 感染小鼠 7、14 和 21 d 后,各组小鼠用乙醚迷晕于天平称质量后,采用颈椎脱臼法处死小鼠并用 75% 乙醇消毒小鼠体表 5 min,在超净台内解剖取出小鼠肺脏、脾脏组织,再分别称取肺和脾脏脏器质量,计算脏器系数:脏器质量指数 = 脏器质量(g)/小鼠质量(g) \times 100%^[7]。

1.3 统计学方法 采用重复测量的方差分析、*q* 检

验和 *t* 检验。

2 结果

2.1 *M. tb* 悬液活菌量的确定 将结核菌悬液 1×10^8 CFU/mL 稀释 10 倍、100 倍、1 000 倍接种于 7H11 固体培养皿培养 21 d 后,可见培养皿上长出乳白色菜花状结核菌落,稀释 10 倍的培养皿中结核菌活菌量约为 80 个,稀释 100 倍活菌量约为 8 个,稀释 1 000 倍未见明显结核菌落,确认 1×10^8 CFU/ml *M. tb* 悬液均为活菌。最终以每只 1×10^6 CFU 的剂量,将上述 *M. tb* 悬液通过尾静脉感染小鼠。

2.2 肺和脾脏组织匀浆活菌培养物抗酸染色结果 挑取上述小鼠肺和脾脏组织活菌培养 7、14、21 d 后生成的培养物,涂片、固定,抗酸染色后,油镜下观察可见:感染 7 d 后,在肺和脾脏组织匀浆均可检测到活 *M. tb*,感染 14 d 及 21 d 后,脾脏组织中活菌数量明显增多,且 *M. tb* 杆状形态更加细长,脾脏组织中活菌数量明显高于肺组织(见图 1)。

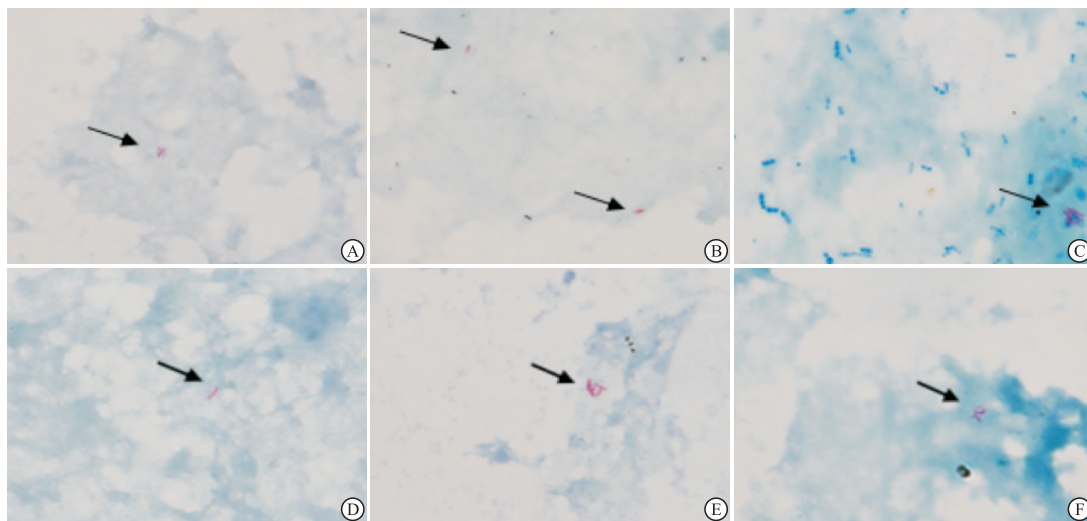
2.3 肺和脾脏组织病理观察结果 与对照组小鼠比较,感染 7 d 后小鼠肺及脾脏组织纹理清晰,间质正常,未见明显炎症性损伤;感染 14 d 后小鼠肺和脾脏纹理明显增粗,出现炎性细胞聚集,间质少量充血,炎性细胞浸润显著增多,但肺组织未见典型的干酪样结核性坏死;感染 21 d 后小鼠肺组织出现水肿,肺泡间隔减小,广泛炎性细胞浸润,并出现广泛性纤维坏死,也未见明显干酪样结节性病灶,脾脏组织结构紊乱,出现肉芽肿,部分小鼠脾脏组织可见明显充血坏死现象(见图 2、3)。

2.4 小鼠肺和脾脏脏器系数测定结果比较 对照组和 *M. tb* 模型组中小鼠感染 H37Ra 7 ~ 21 d,小鼠肺脏脏器系数差异均无统计学意义($P > 0.05$)(见表 1)。小鼠 *M. tb* 感染 14 d 后,脾脏脏器系数明显高于对照组($P < 0.01$);同一组不同感染时间显示,*M. tb* 模型组感染 14 d 和 21 d 的脾脏脏器系数均高于 7 d 组($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$)(见表 2)。

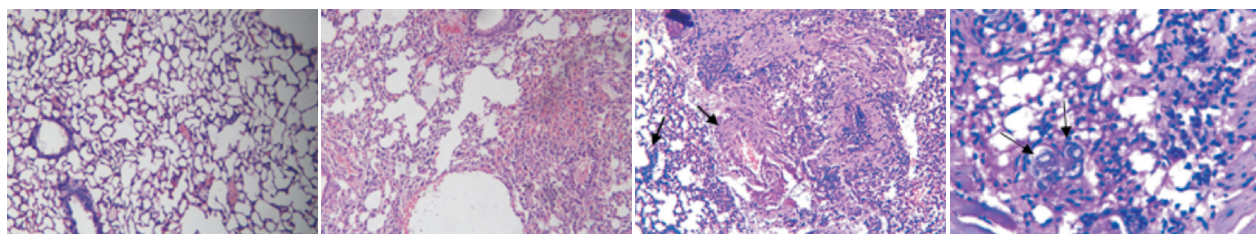
3 讨论

M. tb 感染小鼠模型能不同程度地模拟人体结核病发展过程,并且可以较为准确地评价结核病的病理损伤、存活时间以及免疫学机制,为研究感染状态下 *M. tb* 生理特性,抗原表达情况及解释 *M. tb* 感染免疫的机制提供重要参考信息。

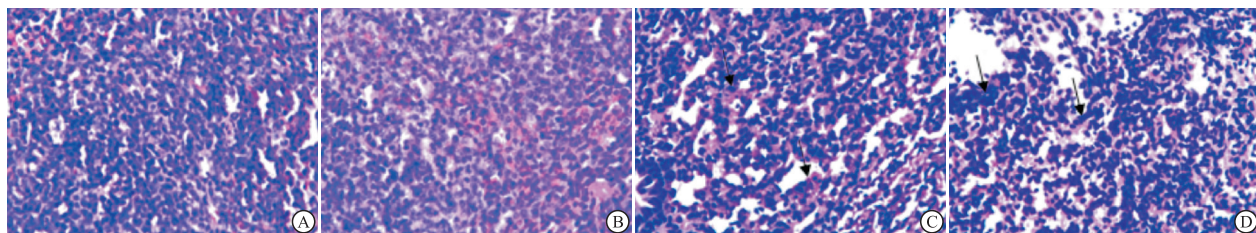
BLOCH 等^[8] 研究发现,给小鼠分别接种相同剂



A: 感染7 d肺组织研磨结果; B: 感染14 d肺组织研磨结果; C: 感染21 d肺组织研磨结果;
D: 感染7 d脾组织研磨结果; E: 感染14 d脾组织研磨结果; F: 感染21 d脾组织研磨结果
图1 H37Ra感染不同天数后小鼠肺和脾组织研磨细菌培养结果(抗酸染色)



A: 对照组小鼠肺组织病理切片; B: 感染7 d小鼠肺组织病理切片; C: 感染14 d小鼠肺组织病理切片; D: 感染21 d小鼠肺组织病理切片
图2 H37Ra感染不同天数后小鼠肺组织病理切片HE染色



A: 对照组小鼠脾组织病理切片; B: 感染7 d小鼠脾组织病理切片; C: 感染14 d小鼠脾组织病理切片; D: 感染21 d小鼠脾组织病理切片
图3 H37Ra感染不同天数后小鼠脾组织病理切片HE染色

表1 H37Ra 感染不同时间对小鼠肺脏脏器系数的影响
($n_i = 3; \bar{x} \pm s$)

分组	7 d	14 d	21 d
对照组	0.006 0 ± 0.000 68	0.007 9 ± 0.001 65	0.007 1 ± 0.000 72
M. tb 模型组	0.006 3 ± 0.001 83	0.006 7 ± 0.002 69	0.007 8 ± 0.000 65
<i>t</i>	0.27	0.66	1.25
<i>P</i>	>0.05	>0.05	>0.05

表2 不同天数 H37Ra 感染小鼠脾脏脏器系数的影响
($n_i = 3; \bar{x} \pm s$)

分组	7 d	14 d	21 d	<i>F</i>	<i>P</i>
对照组	0.005 9 ± 0.003 20	0.004 7 ± 0.001 28	0.006 3 ± 0.002 65	0.30	>0.05
M. tb 模型组	0.006 9 ± 0.001 30	0.009 3 ± 0.000 44 * *	0.010 6 ± 0.000 63 * *	1.44	<0.05
<i>t</i>	0.50	5.89	2.73	—	—
<i>P</i>	>0.05	<0.01	>0.05	—	—

q 检验:与感染7 d组比较 **P*<0.05, ***P*<0.01

量的活卡介苗(BCG)、H37Ra、石炭酸灭活的BCG和石炭酸灭活的H37Ra后,活的H37Ra免疫效果最好,而死的BCG免疫效果最差。故本实验H37Ra感染7 d后,从小鼠肺、脾脏均可检出M. tb活菌,说

明M. tb H37Ra可以有效感染小鼠。

本研究中,M. tb 减毒株H37Ra感染小鼠后,其脾脏脏器系数在感染14 d后呈现逐渐升高趋势,其肺部活菌量在感染后较长时间处于较低水平,病理

改变也比脾脏略轻。与 BCG 相比, H37Ra 具有更完整的免疫原性^[3]。本研究结果表明, H37Ra 感染可能在早期较强地激活了免疫应答反应, 免疫细胞激活和增殖, 导致脾脏脏质量指数明显增加。已有研究^[3-5]表明, 通过尾静脉感染 *M. tb* 有毒株 H37Rv, 小鼠模型的肝、脾、肺、肾等脏器系数明显增加, 同时心脏质量明显减轻。经尾静脉注射感染后, 在小鼠体内活菌数量还没有达到较高的水平时, 获得性免疫已经全面建立, 并发挥作用, 所以肺组织的活菌量可以在感染后较长一段时间内维持在一个很低的水平^[9]。

H37Ra 具有有毒株 H37Rv 的抗原性, 但毒力极弱, 对宿主相对安全, 因而其在动物和细胞研究中已有较多应用。但有关其感染小鼠模型及病理损伤的研究较少。本研究采用尾静脉血行感染的方式感染 *M. tb* H37Ra, 病理学观察结果表明, H37Ra 感染小鼠肺组织损伤程度较轻, 且无有毒株 H37Rv 感染后造成的典型干酪样坏死结节出现, 证实了 H37Ra 感染小鼠的毒力显著低于有毒株 H37Rv。为进一步研究 H37Ra 感染小鼠的免疫和病理损伤机制及其与有毒株 H37Rv 感染的差异奠定了基础。

[参 考 文 献]

[1] CASTAÑO D, GARCÍA LF, ROJAS M. Differentiation of human mononuclear phagocytes increases their innate response to

Mycobacterium tuberculosis infection [J]. Tuberculosis (Edinb), 2014, 94(3):207.

- [2] JENA L, KASHIKAR S, KUMAR S, *et al.* Effect of single amino acid mutations on function of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra by computational approaches [J]. Indian J Tuberc, 2014, 61(3):200.
- [3] SINGH IG, MUKHERJEE R, TALWAR GP. Resistance to intravenous inoculation of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv in mice of different inbred strains following immunization with a leprosy vaccine based on *Mycobacterium w* [J]. Vaccine, 1991, 9(1):10.
- [4] ROMAGNOLI A, ETNA MP, GIACOMINI E, *et al.* ESX-1 dependent impairment of autophagic flux by *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells [J]. Autophagy, 2012, 8(9):1357.
- [5] 刘来成, 王淑玲, 范雄林, 等. 结核菌 H37Ra 在小鼠体内诱导的免疫应答 [J]. 中国生物制品学杂志, 2008, 21(5):391.
- [6] 黎友伦, 王国治, 罗永艾. 结核分枝杆菌潜伏感染动物模型及评价 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2005, 28(8):552.
- [7] 刘福凯, 关雪, 杨昕蕾, 等. 不同周龄 Balb/c 小鼠脏器质量及其变化趋势分析 [J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(3):421.
- [8] BLOCH H, SEGAL W. Viability and multiplication of vaccine in immunization against tuberculosis [J]. Am Rev Tuberc, 1955, 71:228.
- [9] 向志光, 林树柱, 董娜, 等. 结核分枝杆菌感染小鼠的脾脏和肺脏组织菌量与病理变化 [J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(8):66.

(本文编辑 马启)

参考文献新标准对旧标准的主要修改(二)

2 增加“DOI”

为了适应网络环境下存取路径发展需要, 以便于读者快捷、准确地获取电子资源, 新标准增加了越来越广泛使用的“DOI”这一必备的著录项目。

当获取和访问路径中不含 DOI 时, 可依原文如实著录 DOI, 其前置符为“.”; 否则, 可省略 DOI。

示例:

[1] 陈建军. 从数字地球到智慧地球 [J/OL]. 国土资源导刊, 2010, 7(10): 93 [2013-03-20]. http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_hunandz_01010038.aspx. DOI:10.3969/j.issn.1672-5603.2010.10.038. (不含 DOI)

[2] FAN X, SOMMERS CH. Food irradiation research and technology [M/OL]. 2nd ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing, 2013: 25 [2014-06-26]. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781444305036.ch2/summary>. (含 DOI)