

doi:10.3969/j.issn.1003-6350.2012.09.009

## • 实验研究 •

## 饲喂高浓度创伤弧菌对小鼠消化道的损伤研究

郑 晶, 翁 阳, 王明华

(海南医学院病理教研室 海南医学院附属医院, 海南 海口 571101)

**【摘要】** 目的 探讨高浓度创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*, Vv)经食道感染小鼠的致病特点。方法 22只昆明小鼠, 实验组16只, 均强制性喂食Vv菌液( $4.2 \times 10^{12}$  cfu/ml)0.6 ml/只; 对照组6只, 喂食灭菌液体培养基(Marine broth 2216)0.6 ml/只。观察小鼠一般情况, 分别于实验后12 h及48 h采血并处死8只实验组小鼠和3只对照组小鼠, 进行血液的Vv分离培养并取其消化道及重要脏器组织进行病理学观察。结果 48 h组8只小鼠, 有4只血培养结果为阳性; Vv经食道感染小鼠后导致其出现腹泻等消化道症状, 病理学结果显示实验组小鼠食道及胃黏膜上皮部分缺损, 小肠绒毛明显水肿, 结肠肠壁平滑肌溶解断裂, 消化道黏膜、黏膜下、肌层均可见不同程度的中性粒细胞浸润; 小鼠主要脏器也出现不同程度的损伤, 以肺和肾脏的广泛出血性损伤为主。结论 (1)高浓度Vv经食道进入小鼠胃组织后能部分存活, 并进入肠道繁殖, 从而引起小鼠腹泻症状, 损伤小鼠消化道组织, 并可入血引发败血症, 导致小鼠肺、肾等多脏器的和损伤, 造成小鼠死亡。(2)Vv可经消化道感染, 所致炎症性病变特点为蜂窝织性炎。

**【关键词】** 创伤弧菌; 胃肠道; 感染; 蜂窝织炎**【中图分类号】** R-332   **【文献标识码】** A   **【文章编号】** 1003—6350(2012)09—024—03

**Pathogenicity of infections with *Vibrio vulnificus* in mice through the enteron.** ZHENG Jing, WENG Yang, WANG Ming-hua. Department of Pathology, Hainan Medical College, Haikou 571101, Hainan, CHINA

**【Abstract】** Objective To study the characteristics of infections through the alimentary canal with *Vibrio vulnificus* (Vv) in mice. Methods Twenty-two KM mice (SPF) were randomly divided into two groups, the study group (n=16) and the control group (n=6). The animal model of *Vibrio vulnificus* infections through the alimentary canal was established by feeding Vv inoculum ( $4.2 \times 10^{12}$  cfu/ml, strain 1.175 8) of 0.6 ml to each mouse in the study group. And the mouse in the control group was fed with sterile culture medium (Marine broth 2216). Eight mice in the study group and three mice in the control group were killed 12 h and 48 h after treatment. The Vv from the blood were cultured, and the pathological changes of the alimentary canal and other organs were observed under microscope. Results Of the eight mice killed 48 h after treatment, four showed positive blood cultures. In the study group, The gastric and esophagus mucosa was damaged with degeneration and necrosis of the epidermic cells. The edema of small intestinal villous was also observed. The neutrophil infiltration was observed in each layer of digestive tract. And different degrees of injury were also observed in the main viscera of the mice in study group, which is the most severe in lung and kidney. The pathological changes of lung and kidney were characterized by hemorrhagia, degeneration and necrosis of the cells. Conclusion The injury of digestive tract could be induced by Vv in high concentration. Vv reproduction in digestive tract leads to primary septicemia, resulting in the death of the mice finally. Vv infection in digestive tract was characterized by Phlegmonous inflammation.

**【Key words】** *Vibrio vulnificus*; Gastrointestinal tract; Infection; Phlegmonous inflammation

基金项目: 海南省自然科学基金(编号: 309036)

作者简介: 郑 晶(1979—), 女, 湖北省黄冈市人, 讲师, 博士。

应用与评价[J]. 中华放射学杂志, 2004, 38(12): 1256-1259.

[9] Cruz CH, Sorensen AG. Diffusion tensor magnetic resonance imaging of brain tumors [J]. Neurosurg Clin N Am, 2005, 16(1): 115-134.

[10] Kinoshita M, Yamada K, Hashimoto N. Fiber-tracking does not accurately estimate size of fiber bundle in pathological condition: initial neurosurgical experience using neuronavigation and subcortical

white matter stimulation [J]. Neuroimage, 2005, 25(2): 424-429.

[11] Bogomohiy DL, Petrovich NM, Hou BL, et al. Functional MRI in the brain tumor patient [J]. Top Magn Reson Imaging, 2004, 15(5): 325-335.

(收稿日期: 2011-11-22)

创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*, *Vv*)作为一种机会性致病弧菌,虽然自然存在于墨西哥湾、大西洋、太平洋海岸海水和海生物中,但其被人们所认识的时间并不长,曾被称为嗜盐弧菌、嗜盐性非霍乱弧菌、乳糖阳性弧菌、海水弧菌等<sup>[1-2]</sup>。直到1979年, Farmer<sup>[3]</sup>根据本菌的基本生化及形态特征认为本菌应属嗜盐弧菌群,并正式将其命名为 *Vv*。很多临床病例已经证明,进食受 *Vv* 污染的食物造成 *Vv* 感染后可引起严重的食物中毒症状,主要表现为原发性败血症进而出现多脏器功能衰竭,这也是导致患者死亡的主要原因<sup>[4-6]</sup>。而由 *Vv* 单独引起急性胃肠炎的病例却少有报道<sup>[7-8]</sup>。那么,经消化道感染的细菌如何引起败血症呢?要阐明这一问题,首先要揭示 *Vv* 对胃肠道本身的损伤作用如何。为此,我们在建立 *Vv* 食源性感染的动物模型基础上进行了相关实验性研究。

## 1 材料与方法

1.1 菌株来源 购于中国科学院微生物研究所菌种保藏管理中心,菌株编号 ATCC 27562。购回后进行冷冻干燥菌种的恢复培养,培养基为 Marine broth 2216, 30℃恒温培养24 h后应用于实验。并用标准平板计数法测得菌液浓度为  $4.2 \times 10^{12}$  cfu/ml。

1.2 动物及分组 SPF级6~8周龄昆明小鼠22只(雌雄各半),由海南医学院实验动物中心提供。实验组16只,对照组6只。实验组及对照组又各随机分成两组,分别为12 h组和48 h组,实验小鼠每组8只,对照小鼠每组3只。实验组及对照组小鼠实验前均禁食12 h。

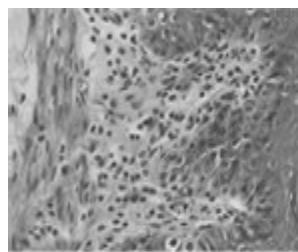


图1 食道黏膜下层中性粒细胞浸润

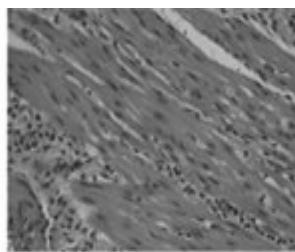


图2 胃肌层中性粒细胞浸润

显,尤其以肺和肾脏的广泛出血性损伤为主。

2.3 分离培养果 实验12 h组8只小鼠血培养结果均为阴性。实验组48 h组小鼠死亡3只,未进行血培养。5只死亡小鼠中有3只血培养结果为阳性。

## 3 讨论

创伤弧菌的感染途径有两种:一是经消化道感染。生的或未熟透的贝甲类海产品(尤其是牡蛎)是导致创伤弧菌食源性感染的主要传播媒介,表现为原发性创伤弧菌性败血症;二是通过皮肤伤口侵入,皮

1.3 实验方法 1 ml注射器装好已灭菌的小鼠灌胃针头,强制饲喂小鼠。每只实验组小鼠被喂食1 ml的 *Vv* 悬液。同样的方法给每只对照组小鼠饲喂1 ml灭菌的 Marine broth 2216 液体培养基。饲喂后密切观察小鼠一般情况,包括毛发、精神状态、进食量和排便量及大便性状。喂食后12 h,分别无菌剪断实验12 h组8只小鼠及对照12 h组3只小鼠鼠尾,挤血一滴于灭菌的 Marine broth 2216 液体培养基中,30℃培养24 h,阳性者转种 Marine agar 2216 固体培养基,培养后挑取单个菌落进行生化特性鉴定。采血后用断椎法处死小鼠并解剖,取出消化道及主要脏器组织固定于10%中性福尔马林固定液中,常规方法制成HE切片进行病理学观察。喂食后48 h,实验及对照48 h组小鼠处理方法同12 h组。

## 2 结果

2.1 一般情况 实验组小鼠在喂食 *Vv* 悬液后均先后不同程度的出现了竖毛、少动及进食量减少的情况。在喂食10 h后,实验组小鼠开始出现排便次数增加及排稀便症状。12 h实验组小鼠无死亡,48 h实验组小鼠有3只死亡。对照组小鼠无明显异常。

2.2 病理学观察 实验组16小鼠均出现了消化道不同程度的损伤,表现为:食道及胃黏膜上皮部分缺损,小肠绒毛水肿,消化道黏膜、黏膜下、肌层均可见不同程度的中性粒细胞浸润及血管扩张充血(图1~图4);48 h组实验小鼠小肠绒毛水肿更为明显,并出现结肠肠壁平滑肌溶解断裂。实验组小鼠主要脏器也出现不同程度的损伤,死亡小鼠脏器损伤更为明

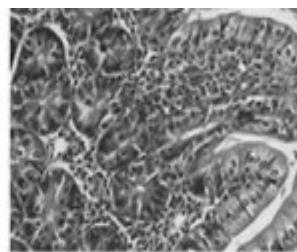


图3 小肠黏膜中性粒细胞浸润

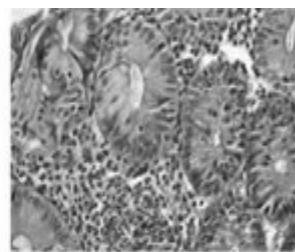


图4 结肠黏膜中性粒细胞浸润

肤破损处接触了含有 *Vv* 的海水后在原皮肤伤口处形成红斑并剧烈疼痛,发展迅速,继发败血症。Chang 等<sup>[9]</sup>总结了18例 *Vv* 感染的临床资料,其中14例为食源性的原发性败血症,4例为创伤感染。Klontz 等<sup>[10]</sup>对62例创伤弧菌感染患者的流行病学资料进行了研究,发现92%的原发性败血症患者和71%的感染创伤弧菌的患者均在1周内有生吃过海鲜。1993年4月至1996年5月间,美国洛杉矶县共报告了16例 *Vv* 食源性感染病例,其中12例(75%)患有肝病,所有患者都发展

成败血症，并且在发病前1~2 d都吃过生牡蛎<sup>[11]</sup>。因此，经消化道感染是临床Vv感染性疾病的常见原因。并且食源性创伤弧菌感染引发的严重后果并不在于其引起的非特异性胃肠炎，而在于其引起的原发性创伤弧菌性败血症，一旦出现败血症，其危害极大，往往会导致患者死亡。那么，经消化道感染的细菌如何入血并引起败血症呢？要阐明这一问题，首先要揭示Vv对胃肠道本身的损伤作用如何。笔者前期实验结果表明一定数量的Vv经食道感染小鼠后未引起相应的消化道症状，对胃黏膜造成的损伤也表现为一过性和局限性<sup>[12]</sup>。Vv为嗜盐性海生弧菌，最适合其生长的盐度为3%~6%，并适合在碱性环境中生长。因此，进入小鼠胃环境的Vv实际上大部分已丧失其正常的生物学活性。在本实验中，我们将一次性饲喂小鼠的Vv悬液浓度大大提高，由 $4.7 \times 10^7$  cfu/ml提高至 $4.2 \times 10^{12}$  cfu/ml，结果导致实验组小鼠出现了消化道症状及相应的消化道损伤。这一结果表明，较多数量的Vv进入胃组织后，部分细菌能够在胃酸环境下存活并进入肠道繁殖引起相应病变。本实验中Vv感染引起的消化道损伤包括：食道及胃黏膜上皮部分缺损，小肠绒毛水肿，平滑肌断裂溶解。已有研究表明，Vv产生的一系列胞外酶及毒素是其重要的毒力因素，例如金属蛋白酶、细胞毒素及卵磷脂酶，它们分别与溶解胶原蛋白、细胞溶解及细胞线粒体膜的溶解密切相关<sup>[13~16]</sup>。Vv在局部繁殖释放上述毒素及酶可能导致了小鼠消化道的相应损伤。有关Vv感染所引起胃肠炎症反应特点的研究国内外目前还鲜有报道。本实验结果中值得注意的是Vv感染所引起的炎症反应特点：蜂窝织性炎，表现为消化道黏膜、黏膜下、肌层均可见不同程度的中性粒细胞浸润，即中性粒细胞的弥漫浸润。胃肠道组织结构较为疏松，而蜂窝织性炎就好发于结构疏松的脏器和组织中。另外本研究中实验组小鼠主要脏器也出现不同程度的损伤，死亡小鼠脏器损伤更为明显，且部分实验小鼠Vv血培养结果为阳性。这说明菌体能迅速通过受损的肠黏膜侵入血液，导致原发性Vv性败血症，并引起部分实验小鼠的死亡，这一结果亦与笔者前期的相关研究结果相同<sup>[17]</sup>。

#### 参考文献

- [1] Roland FP. Leg gangrene and endotoxin shock due to *Vibrio parahaemolyticus*-an infection acquired in New England coastal waters[J]. N Engl J Med 1970, 282: 1306.
- [2] Hollis DG, Weaver RE, Baker CN, et al. Halophilic *Vibrio* species isolated from blood cultures[J]. J Clin Microbiol, 1976, 3: 425.
- [3] Farmer JJ III. *Vibrio vulnificus*.The bacterium associated with sepsis, Septicaemia, and the sea [J]. Lancet, 1979, 2: 902.
- [4] 马骢, 郭建巍, 郝秀红, 等. 中国海域分离的Vv的致病性及其对抗生素的敏感性研究[J]. 第四军医大学学报(J Fourth Mil Med Univ), 2009, 30 (6): 493-496.
- [5] Bisharat N, Agmon V, Finkelstein R, et al. Clinical, epidemiological, and microbiological features of *Vibrio vulnificus* biogroups 3 causing outbreaks of wound infection and bacteraemia in Israel. Israel Vibrio Study Group [J]. Lancet, 1999, 354(9188): 1421-1424.
- [6] Michael A, Horseman, Salim Surani. A comprehensive review of *Vibrio vulnificus*: an important cause of severe sepsis and skin and soft-tissue infection [J]. International Journal of Infectious Diseases, 2011, 15(3): 157-166.
- [7] 施云程, 叶启明, 董庆元. 上海地区儿童弧菌性肠炎50例[J]. 世界华人消化杂志, 1998, 6: 334-335.
- [8] 郑静. 霍乱样Vv感染一例[J]. 中华传染病杂志, 1995, 13(2): 97.
- [9] Chang JJ, Sheen IS, Peng SM, et al. *Vibrio vulnificus* infection-report of 8 cases and review of cases [J]. Changgeng Yi Xue Za Zhi, 1994, 17(4): 339-346.
- [10] Klontz KC, Lieb B, Schreiber M, et al. Syndromes of *Vibrio vulnificus* infection-clinical and epidemiologic features in Florida cases, 1981~1987 [J]. Ann Intern Med, 1988, 109: 318-323.
- [11] Moscola L. *Vibrio vulnificus* infections associated with eating raw oysters\_Los angeles[J]. MMWR, 1996, 45(29): 621-622.
- [12] 郑晶, 申洪, 陈清. Vv经食管感染小鼠的致病性研究. 世界华人消化杂志 [J]. 2005, 13(7): 860-863.
- [13] Miyoshi SI, Narukawa H, Tomochika K, et al. Action of *Vibrio vulnificus* metalloprotease on human plasma proteinase-proteinase inhibitor systems:a comparative study of native protease with its derivative modified by polyethylene glycol[J]. Microbiol Immunol, 1995, 9: 959-966.
- [14] Young Ran Kim, Bang Ul Kim, Soo Young Kim, et al. Outer membrane vesicles of *Vibrio vulnificus* deliver hemolysin-hemolysin VvhA into epithelial cells to induce cytotoxicity [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010, 399(4): 607-612.
- [15] Takashige Kashimoto, Shunji Ueno, Takeshi Koga, et al . The aromatic ring of phenylalanine 334 Is essential for oligomerization of *Vibrio vulnificus* Hemolysin [J]. J Bacteriol, 2010, 192(2): 568-574.
- [16] Kashimoto T, Ueno S, Ehara H, et al . Oligomerization is essential for apoptotic activity of *Vibrio vulnificus* hemolysin[J]. J Vet Med Sci, 2009 , 71(10): 1403-1406.
- [17] 郑晶, 申洪, 陈清. 海水环境Vv感染的病理学研究[J]. 中华创伤杂志, 2007, 23(11): 74-78.

(收稿日期: 2012-02-28)