

条件性感染金黄色葡萄球菌关节炎小鼠模型的建立和分析

叶秋莹^{2,1}, 李舸¹, 罗银珠¹, 刘书华¹, 李韵峰¹, 贾欢欢¹,
吴玉娥¹, 张钰^{1*}, 王晖^{2*}

(1. 广东省实验动物监测所, 广东省实验动物重点实验室, 广州 510663; 2. 广东药科大学中药学院, 广州 51006)

【摘要】 目的 建立与分析条件性感染金黄色葡萄球菌感染关节炎模型, 为关节炎机理研究及药物开发提供动物模型。**方法** 先对小鼠进行环磷酰胺免疫抑制处理, 再尾静脉接种金黄色葡萄球菌, 通过关节外观特征观察、关节炎指数分析和病理观察评分对模型进行评价。**结果** 接种后第1天开始, 小鼠关节部位轻微肿胀, 关节组织病变由少量滑膜增生且排列疏散紊乱, 发展至滑膜增厚, 往关节腔内延伸生长, 中性粒细胞浸润增多等病理变化。**结论** 成功建立条件性感染 SA 模型, 能在较短时间内模拟人关节炎的临床症状和病程发展, 且在感染和免疫机理方面体现了人关节炎发病病因。

【关键词】 关节炎; 小鼠模型; 金黄色葡萄球菌感染; 炎症

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)06-0607-04

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.06.010

Establishment and analysis of a mouse model of *Staphylococcus aureus*-induced arthritis

YE Qiu-ying^{1,2}, LI Ge¹, LUO Yin-zhu¹, LIU Shu-hua¹,
LI Yun-feng¹, JIA Huan-huan¹, WU Yu-e¹, ZHANG Yu^{1*}, WANG Hui^{2*}

(1. Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangdong Key Laboratory of Experimental Animals, Guangzhou 510663, China; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

【Abstract】 Objective To establish and analyze a mouse model of *Staphylococcus aureus*-induced arthritis (*Staphylococcus aureus* septic arthritis, SA), and provide an animal model for arthritis mechanism research and drug development. **Methods** Mice were immunosuppressed with cyclophosphamide, then intravenously inoculated with *Staphylococcus aureus*. The gross characteristics of the joints were observed, the arthritis indexes were analyzed, and the pathological scores of the model mice were evaluated. **Results** From the first day after bacterial inoculation, the mouse joints were swollen. Pathological examination revealed lesions varying from mild and disarranged joint synovial hyperplasia to synovial thickening and intra-articular invasion, and increased neutrophil infiltration. **Conclusions** A mouse model of *Staphylococcus aureus*-induced arthritis is successfully established in this study. This model can be developed in a relatively short time, can not only simulate the clinical symptoms and signs and disease progression of human arthritis, but also to a certain extent reflects the etiology, infection and immunological mechanisms of human arthritis.

【Key words】 Arthritis; Mouse model; *Staphylococcus aureus* infection; Inflammation

[基金项目] 广东省科技计划项目 (2013B040400007, 2014A030304029, 2013B010102006)。

[作者简介] 叶秋莹 (1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药药理学。E-mail: 812317730@qq.com

[通讯作者] 王晖, 男, 教授, E-mail: gdwanghui2006@126.com; 张钰, 女, 研究员, E-mail: Zhangyugzh@hotmail.com

Corresponding author: WANG Hui, E-mail: gdwanghui2006@126.com; ZHANG Yu, Email: Zhangyugzh@hotmail.com

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*) 是一种普遍存在的革兰阳性球菌, 对人和动物具有很强的致病作用^[1-2], 当免疫功能降低时, 体内定植的菌株可导致局部化脓性感染, 也是化脓性关节炎最常见的病原菌。炎症性关节炎 (inflammatory arthritis) 是以多关节炎症为主要表现的全身性疾病^[3]。在发病过程中, 往往伴随着滑膜的持续性增生、炎症细胞浸润、软骨及骨的破坏等临床病理学特征, 但是, 其疾病发生发展和持续的时间长。如何建立成模时间短或能更好地演化关节炎病程且与关节炎临床诊治指标衔接的模型具有重要的价值。因此, 本文对采用优化的建模方法建立条件性感染金黄色葡萄球菌关节炎小鼠模型 (*Staphylococcus aureus* septic arthritis, SA), 对其进行临床指标分析评价, 探讨该模型在关节炎疾病研究中的优缺点及其应用。

1 材料与方法

1.1 材料

SPF 级 ICR 雌性小鼠 20 只, 5 周龄, 购自于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK (京) 2012-0001】, 均饲养于广东省实验动物监测所动物实验室【SYXK (粤) 2012-0122】。动物实验前适应性喂养 1 周, 采用自由饮水、采食的饲养方式。动物房温度、湿度分别维持在 20~26℃、40%~70% 左右。

环磷酰胺 (安道生公司); 金黄色葡萄球菌 (M39B8) 由广东省中医院检验科惠赠; HI1220 烘片机、HI1210 摊片机、TP1020 自动脱水机、EG1150 组织包埋机、RM2255 旋转切片机和显微镜 (德国 Leica)。

1.2 方法

1.2.1 模型的建立

通过参考文献^[4-5], 改良了造模方法。实验前处理: 感染前 3 d 进行免疫抑制处理, 每天注射环磷酰胺腹腔 (100 mg/kg), 1 次/24 h, 共注射 3 次。免疫抑制处理后, 尾静脉接种 5×10^6 CFU/mL 金黄色葡萄球菌敏感菌悬液 (0.2 mL/只)。

1.2.2 炎症指数评分

SA 模型组于接种后, 每日对小鼠进行炎症指数评分。

关节炎指数 (arthritis index, AI) 评分标准^[6]: ①脚部关节没有红肿为 0 分; ②小趾关节轻微红肿为 1 分; ③趾关节和足跖肿胀为 2 分; ④踝关节以下的足爪肿胀为 3 分。四肢得分相加为该小鼠关节炎总评分。

1.2.3 病理学观察及评分^[7-8]

于模型 AI 评分为最高峰时期剖杀小鼠。具体操作如下: 沿腿根部剪下病变小鼠后腿, 除去病变关节的皮毛和多余的皮下组织, 保留膝关节, 4% 甲醛固定 48 h, 10% EDTA 脱钙液脱钙 1 个月, 每 2 d 换一次脱钙液。常规梯度酒精脱水、二甲苯透明, 石蜡包埋, 制备 4 μ m 片厚的病理切片。HE 染色后显微镜下观察关节组织病理改变, 包括关节周围炎症, 滑膜增生、软骨及骨质破坏程度, 并进行病理损伤评分。

1.2.4 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。计量资料数据以均数 $\pm$ 标准差表示。

2 结果

2.1 模型临床特征观察及评分

在实验过程中, SA 模型小鼠出现爬行减缓, 运动功能受损, 采食、饮水量减少等症状, 甚至出现动物死亡现象。SA 模型小鼠在接种后 1 d 出现关节轻微肿胀, 3 d 时, 足爪肿胀程度最为严重, 关节炎指数达到最高, 之后, 小鼠关节肿胀程度逐渐减轻, 至 10 d 时, 关节炎指数评分恢复正常。见图 1、2。

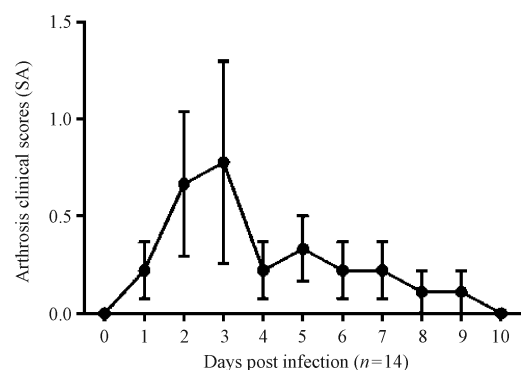


图 1 小鼠关节炎评分指数

Fig. 1 Scores of arthritis indexes in the mice

2.2 组织病理学观察

显微镜检 SA 模型小鼠关节由少量滑膜增生且排列疏散、紊乱, 发展至高峰期滑膜增厚, 往关节腔

内延伸生长,且出现淤血、水肿、中性粒细胞浸润增多,但随着时间延长,滑膜增生速度逐渐减缓,仍见少量中性粒细胞等炎症细胞浸润。根据病理损伤评分标准对病理切片分析,得出 SA 模型小鼠滑膜细胞增殖、炎症细胞浸润、骨质侵蚀评分分别为(2 ± 0)、(1.6 ± 0.5774)、(2.5 ± 0.5774)。病理切片结果见图 3。

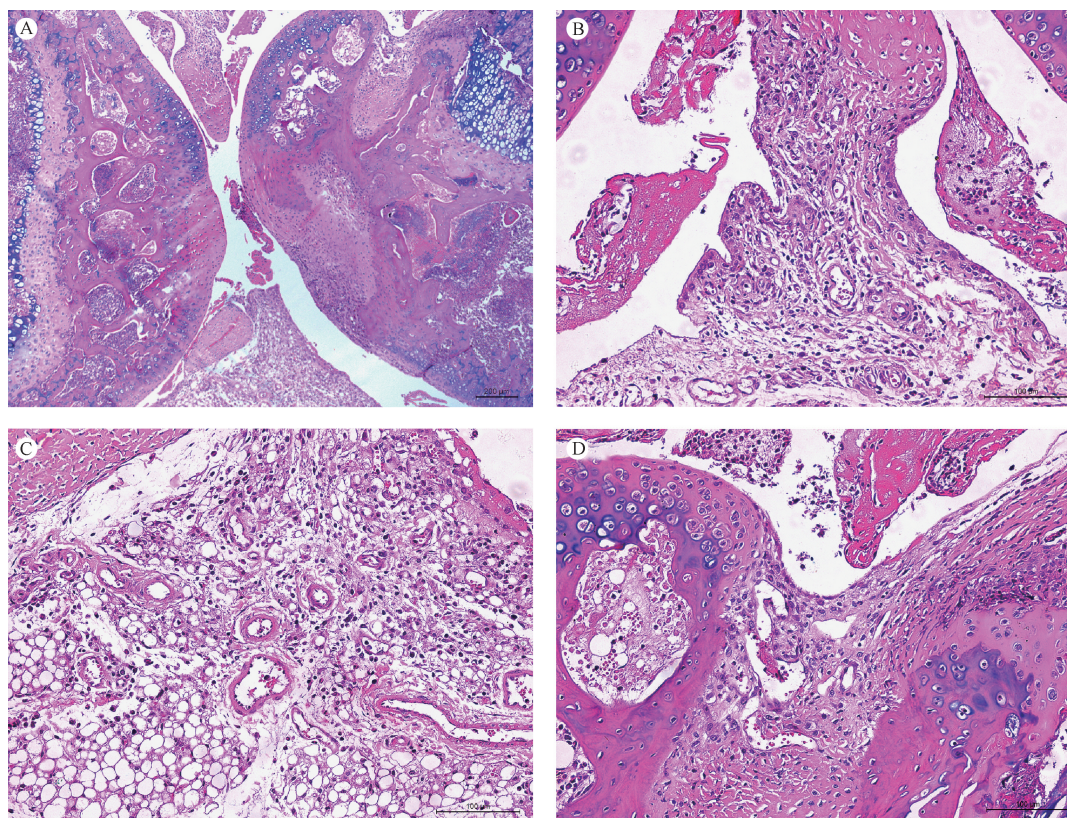


图 2 小鼠后爪肿胀程度

Fig. 2 Swollen hind paw of a mouse

3 讨论

本研究对现有 SA 造模方法进行优化,改进成为条件性感染金黄色葡萄球菌感染关节炎小鼠模型。先对小鼠进行免疫抑制处理,再接种金葡菌进行造模,结果发现该模型小鼠发病时间相比于其他关节炎模型和未经过免疫抑制处理的 SA 小鼠模型快,实验耗时短,且能较快模拟出临床关节炎疾病的病程。而现有的 SA 小鼠模型,感染后的临床症状、病理学变化随着实验周期延长更加严重,病程发展较缓慢。本文选取关节外观观察、关节肿胀评分、组织病理学观察三方面的临床评价指标,对所建立的条件性感染 SA 小鼠模型进行评价,结果发现模型小鼠的临床症状、病理学变化都比较符合临床急性风湿性关节炎的特点^[9],出现以红肿热痛的为主要表现,滑膜充血水肿增厚,炎症细胞(多以中性粒细胞为主)浸润,滑膜反折处向关节软骨表面延伸,侵蚀破坏关节软骨和软骨下骨质等临床病理变化,但不遗留关节强直和畸形,表明成功地建立了条件性感



注:A. 低倍镜下观察到膝关节($\times 50$),其中B:滑膜增生($\times 200$);C:炎症细胞浸润($\times 200$);D:骨侵蚀($\times 200$)。

图 3 小鼠膝关节病理组织学

Note. A. The knee joint observed under low magnification ($\times 50$). B. Synovial hyperplasia ($\times 200$).

C. Inflammatory cell infiltration ($\times 200$). D. Bone erosion ($\times 200$).

Fig. 3 Histological changes of the mouse knee-joints

染 SA 小鼠模型。

金黄色葡萄球菌在免疫抑制情况下,致病作用将会增强,是导致感染性关节炎(SA)产生的常见原因之一^[10]。相关文献报道,金葡菌的表面有不同类型的胶原蛋白,该蛋白是机体中各结缔组织的主要结构基质,由特定的基质金属蛋白酶(MMPs)降解形成的^[11]。MMPs 能协助清理细菌感染,引发免疫反应,但过多的 MMPs 可导致软组织、结缔组织结构的破坏,引起基质降解和关节破坏^[12-13]。有研究结果表明,关节滑膜面的组织病理学变化也表明,注射侧关节的病变程度明显比对侧关节严重,说明金黄色葡萄球菌在小鼠关节炎的发生、发展中也发挥了一定的直接作用^[11]。所以,本文所创建的方法及模型,可以从感染和免疫机理方面较好体现了人关节炎发病的病因,也能表现人关节炎的病程发展。

此外,根据本实验模型小鼠病理模型的评价结果,该模型小鼠还具有自限性,因其随着实验周期延长,侵入关节腔的细菌被机体内固有免疫细胞快速清除后,关节炎症状能明显减轻甚至消退。但是,模型发病率偏低,稳定性差是该模型的不足之处,且建模过程中需要调整接种细菌浓度、动物死亡和关节炎症状出现之间的平衡关系。依本实验结果分析,为关节炎致病机制研究及临床治疗药物研发奠定了重要的实验基础和提供了良好的动物模型。

参 考 文 献

- [1] Shawna FG, Scott DK, Frank RD. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* immune evasion and virulence [J]. *Mol Med*, 2010, 88(2): 109–114.
- [2] 金涛,李璐,金卉,等. 金黄色葡萄球菌感染致化脓性关节炎的临床研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2015, 25(19): 4418–4420.
- [3] Raatz Y, Ibrahim S, Feldmann M, et al. Gene expression profiling and functional analysis of angiogenic markers in murine collagen-induced arthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2012, 14: 1–18.
- [4] Josefsson E, Tarkowski A. *Staphylococcus aureus*-induced inflammation and bone destruction in experimental models of septic arthritis [J]. *Periodont Res*, 1999, 34: 387–392.
- [5] Na M, Jarneborn A, Ali A. Deficiency of the complement component 3 but not factor B aggravates *Staphylococcus aureus* septic arthritis in mice [J]. *Infect Immunity*, 2016, 84: 930–939.
- [6] Bruns L, Frey O, Morawietz L. Immunization with an immunodominant self-peptide derived from glucose-6-phosphate isomerase induces arthritis in DBA/1 mice [J]. *Arthritis Res Ther*, 2008, 11(4): 1–11.
- [7] Gjertsson I, Lagerquist MK, Kristiansson E. Estradiol ameliorates arthritis and protects against systemic bone loss in *Staphylococcus aureus* infection in mice [J]. *Arthritis Res Ther*, 2012, 14: 1–8.
- [8] Tsubaki T, Arita N, Kawakami T, et al. Characterization of histopathology and gene-expression profiles of synovitis in early rheumatoid arthritis using targeted biopsy specimens [J]. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7(4): 825–836.
- [9] Kanangat S, Postlethwaite A, Hasty K, et al. Induction of multiple matrix metalloproteinases in human dermal and synovial fibroblasts by *Staphylococcus aureus*; implications in the pathogenesis of septic arthritis and other soft tissue infections [J]. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8(6): 1–14.
- [10] Elkington PT, O’Kane CM, Friedland JS. The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease [J]. *Clin Exp Immunol*, 2005, 142(1): 12–20.
- [11] Dinjaski N, Fernández-Gutiérrez M, Selvam S, et al. PHACOS, a functionalized bacterial polyester with bactericidal activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(1): 14–24.
- [12] 斯日古楞, 么宏强, 员宝山. 小鼠金黄色葡萄球菌性关节炎模型的建立及其病理学研究[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2013, (05): 84–85 + 167.
- [13] Kanangat S, Postlethwaite A, Hasty K. Induction of multiple matrix metalloproteinases in human dermal and synovial fibroblasts by *Staphylococcus aureus*; implications in the pathogenesis of septic arthritis and other soft tissue infections [J]. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8(6): 1–14.

[收稿日期] 2016–10–08