

无菌大鼠深二度烫伤感染金黄色葡萄球菌机体 炎性反应的研究^{*}

李鸿雁¹ 颜克松² 马东升² 战大伟² 孙兆增¹

(1. 军事科学院军事医学研究院实验动物中心, 北京 100071) (2. 中国人民解放军总医院第四医学中心, 北京 100048)

摘要:目的 为探究无菌大鼠深二度烫伤创面感染金黄色葡萄球菌后机体的炎性反应, 试验应用无菌大鼠及 SPF 级大鼠分别建立深二度烫伤模型和烫伤后金黄色葡萄球菌感染模型, 分析愈合过程、炎性反应及病理变化。方法

20 只 6 周龄雌性 Wistar 无菌大鼠, 在超净工作台内采用恒温恒压烫伤仪 94 ℃ 作用 8 s 造成大鼠深二度烫伤, 随机分为两组, 一组伤口感染浓度为 1×10^8 CFU/mL 金黄色葡萄球菌 0.5 mL, 一组不做处理, 创面保持无菌状态; 20 只 6 周龄雌性 SPF 级 Wistar 大鼠, 在相同条件下烫伤, 随机分为两组, 一组伤口感染浓度为 1×10^8 CFU/mL 金黄色葡萄球菌 0.5 mL, 一组不做处理。分别观察 4 组大鼠的伤口结痂时间、脱痂时间和愈合时间, 并在烫伤前 (0 h), 烫伤后 24 h、48 h、3 d、5 d、7 d、10 d、14 d 时取血清, 检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 α (IL-1 α) 和表皮生长因子受体 (EGFR) 的变化; 烫伤后 24 h、3 d、7 d、10 d 伤口处皮肤 HE 染色, 观察病理变化。**结果** 感染金黄色葡萄球菌无菌大鼠伤口脱痂及愈合时间显著短于其他 3 组 ($P < 0.05$); 感染金黄色葡萄球菌 SPF 级大鼠, 结痂、脱痂及愈合时间显著长于其他 3 组 ($P < 0.05$); 感染金黄色葡萄球菌 SPF 级烫伤大鼠组由于双重损伤使血清炎性因子 TNF- α 、IL-1 α 水平升高, 且在烫伤后 72 h 显著高于其他 3 组 ($P < 0.05$); 无菌大鼠由于对烫伤及金黄色葡萄球菌刺激反应激烈, 烫伤后血清 TNF- α 、IL-1 α 和 EGFR 水平迅速升高, 且在烫伤 24 h 时显著高于 2 组 SPF 大鼠 ($P < 0.05$), 在烫伤 48 h 时血清 EGFR 水平显著高于两组 SPF 大鼠 ($P < 0.05$)。病理显示, 感染金黄色葡萄球菌 SPF 烫伤大鼠伤口处新生血管及肉芽组织生成时间均长于其他 3 组; 感染金黄色葡萄球菌无菌烫伤大鼠伤口处新生血管及肉芽组织生成时间均短于其他 3 组。**结论** 无菌大鼠由于其免疫系统处于休眠状态, 受到烫伤和金黄色葡萄球菌的双重刺激, 迅速激活其全身免疫系统, 加快了伤口愈合; SPF 烫伤大鼠感染金黄色葡萄球菌后产生的多种免疫逃避分子加重了机体的炎性反应, 延缓了伤口愈合。

关键词: 无菌大鼠; 金黄色葡萄球菌; 烫伤; 炎性反应; TNF- α ; IL-1 α ; EGFR

中图分类号: R-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)06-0009-06

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.06.003

近年来, 随着烧伤休克防治理论和临床救治技术的提高, 直接死于休克者已少见。感染已成为烧伤患者的主要致死原因, 是烧伤防治研究的重要课题和难题之一^[1]。金黄色葡萄球菌作为革兰阳性菌的代表是常见的皮肤条件致病菌, 存在于临床伤口护理各个环节^[2], 是引起人类化脓感染中最常见的病原菌, 可直接导致局部化脓感染、肺炎等, 甚至败血症、脓毒症等全身感染。烧烫伤动物模型作为现代烧伤外科领域基础与应用研究中的一个极为重

要的实验方法, 常选用猪、狗、羊、兔、大鼠、小鼠和豚鼠^[3]。烧伤创面脓毒症和创面用药的研究多用大鼠和小鼠^[4]。随着近年来微生态研究的深入, 采用无菌动物定植特定的病原菌, 成为研究特定病原菌对机体的作用机制的重要方法^[5-9], 本试验通过制备无菌大鼠烫伤模型并定向感染一定浓度的金黄色葡萄球菌和 SPF 级烫伤大鼠并定向感染金黄色葡萄球菌, 观察 4 种模型动物伤口结痂时间、脱痂时间和愈合时间, 分时项采样, 测定血清炎性因子、检查

收稿日期: 2019-06-03

^{*} 基金项目: 军队实验动物专项课题 (No. SYDW[2014]004)

作者简介: 李鸿雁 (1988—), 女, 技师, 硕士, 研究方向: 疾病动物模型. E-mail: 812596697@qq.com

通信作者: 战大伟 (1973—), 男, 副主任技师, 博士, 研究方向: 动物模型及疾病. E-mail: davidzhan@126.com

孙兆增 (1977—), 男, 副研究员, 博士, 研究方向: 实验动物分子微生物学. E-mail: laxszz@aliyun.com

伤口处皮肤病理损伤情况,探讨烫伤创面引发的损伤及金黄色葡萄球菌对烫伤愈合的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物: 6 周龄 SPF 级 Wistar 雌性大鼠 20 只,由斯贝福实验动物科技有限公司提供(生产许可证号: SCXK(京) 2016-0002)。饲养在符合 GB14925—2010 的屏障环境; 6 周龄无菌 Wistar 雌性大鼠 20 只,由解放军总医院第四医学中心动物实验室提供,饲养在隔离器内。

1.1.2 主要试剂与仪器: 金黄色葡萄球菌[CMCC (B) 26003]标准菌株购自南京一基生化科技有限公司; 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 α (IL-1 α)、表皮生长因子受体 (EGFR) ELISA 试剂盒及血平皿均购自北京欣仪生物科技有限公司。大鼠隔离器购自苏杭科技器材有限公司,恒温恒压烫伤仪购自山东省医学科学院; 恒温培养箱购自上海微川精密仪器有限公司; 酶标仪购自赛默飞世尔(上海)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 金黄色葡萄球菌菌液制备: 将标准金黄色葡萄球菌复苏后,采用标准划线法将细菌接种在血平皿中,倒置在 37℃ 恒温培养箱中培养 48 h,即可得到大量金黄色葡萄球菌菌落。用无菌接种环从培养皿中挑取 2~3 个菌落,放入装有少量无菌生理盐水的麦氏比浊管中,连续反复稀释混匀,直至比浊仪显示为 1.0 麦氏比浊度。此时,麦氏比浊管中金黄色葡萄球菌菌液的浓度为 3×10^8 CFU/mL,所得菌液用生理盐水 1:3 稀释到 1×10^8 CFU/mL。

1.2.2 染菌: 超净工作台用 75% 酒精擦拭后,紫外灯消毒 30 min。将无菌大鼠从隔离器中用密闭消毒

饲养盒取出,置于超净工作台内,按照 50 mg/kg 体质量腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,用刮胡刀片将大鼠背部刮至皮肤完全暴露。用恒温恒压烫伤仪 94℃ 作用 8 s,压力 500 g 在大鼠背部造成两个直径为 2.5 cm 的深二度烫伤伤口。随后大鼠随机分为两组,一组烫伤后直接传入大鼠隔离器内饲养观察,一组烫伤后伤口接种 1×10^8 CFU/mL 金黄色葡萄球菌菌液后传入另一隔离器内单独饲养。SPF 级大鼠采用相同方法烫伤后随机分为两组,一组烫伤后伤口接种 1×10^8 CFU/mL 金黄色葡萄球菌菌液 0.5 mL,一组不做处理,饲养在 IVC 内。

1.2.3 测定指标与方法: 肉眼观察 4 组大鼠伤口结痂、脱痂及愈合时间并记录。在烫伤后 24 h、48 h、3 d、5 d、7 d、10 d、14 d 时,眼眶取血,室温放置 20 min,3 000 r/min 离心 10 min,收集上清,ELISA 试剂盒检测 TNF- α 、IL-1 α 和 EGFR 水平; 烫伤后 24 h、3 d、7 d、10 d,每组选取 1 只大鼠取伤口处皮肤,4% 甲醛溶液固定,用于病理制片,HE 染色观察伤口处皮肤病理变化。

1.3 统计方法

实验数据采用 SPSS22.0 软件中的 One-Way ANOVA 进行组间单因素方差分析,邓肯氏法进行差异显著性分析,结果用 ($\bar{x} \pm s$) 表示,以 $P < 0.05$ 作为差异显著性判断标准。

2 结果

2.1 4 组大鼠伤口结痂、脱痂和愈合时间

由表 1 可知,感染金黄色葡萄球菌的两组烫伤大鼠结痂时间显著长于未感染金黄色葡萄球菌的两组大鼠 ($P < 0.05$); 感染金黄色葡萄球菌 SPF 大鼠脱痂及愈合时间显著长于感染金黄色葡萄球菌无菌大鼠 ($P < 0.05$)。

表 1 4 组大鼠结痂、脱痂和愈合时间

Table 1 The scab escharosis, decrustation and healing time of four groups of rats

组别 Groups	结痂时间/d Escharosis time/d	脱痂时间/d Decrustation time/d	愈合时间/d Healing time/d
无菌大鼠组 Grem-free rats group	3.4 $\pm$ 0.5 ^b	25.6 $\pm$ 0.8 ^b	33.5 $\pm$ 1.4 ^b
感染金黄色葡萄球菌无菌大鼠组 Staphylococcus aureus infection grem-free rats group	4.8 $\pm$ 0.3 ^a	21.8 $\pm$ 0.9 ^a	24.9 $\pm$ 1.0 ^a
SPF 级大鼠组 SPF rats group	3.7 $\pm$ 0.3 ^b	25.3 $\pm$ 0.7 ^b	31.9 $\pm$ 0.9 ^b
感染金黄色葡萄球菌 SPF 级大鼠组 Staphylococcus aureus infection SPF rats group	5.3 $\pm$ 0.4 ^c	27.4 $\pm$ 1.2 ^c	36.7 $\pm$ 1.3 ^c

注: 同列数据肩标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$); 肩标相同字母或无字母标注表示差异不显著 ($P > 0.05$)
Note: In the same column, value with different small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$); While same or no letter superscripts means difference ($P > 0.05$)

2.2 烫伤大鼠伤口皮肤病理观察

图 1-B、1-C 分别为感染金黄色葡萄球菌 SPF 大鼠烫伤 24 h 时皮肤和皮下组织, 皮肤细胞间质水肿, 肌层呈化脓性炎细胞浸润; 图 1-D 为感染金黄色葡萄球菌 SPF 大鼠烫伤 7 d 时皮肤及皮下组织, 可见新生血管; 图 1-E 为无菌大鼠烫伤 72 h 时皮肤及皮下组织, 可见新生血管; 图 1-F 为无菌大鼠烫伤 10 d 时皮肤及皮下组织, 有肉芽组织生成; 图 1-G 为感染金黄色葡萄球菌无菌大鼠烫伤 72 h 时皮肤及皮下组织, 有大量新生小血管和新生肉芽组织形成。

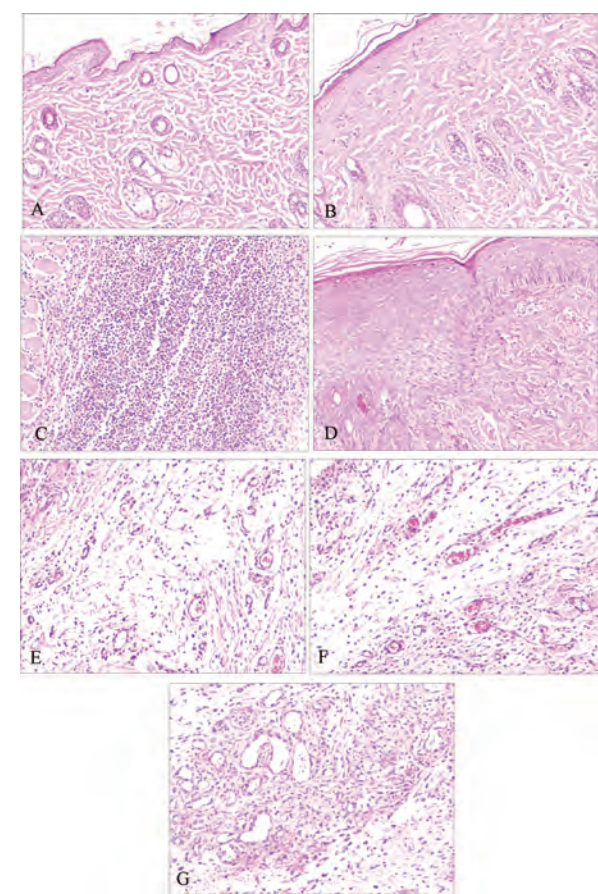


图 1 烫伤大鼠皮肤 HE 染色 (×100)

注: A: 正常皮肤; B、C: 感染金黄色葡萄球菌 SPF 大鼠皮肤烫伤 24 h; D: 感染金黄色葡萄球菌 SPF 大鼠皮肤烫伤 7 d; E: 无菌大鼠烫伤 72 h; F: 无菌大鼠烫伤 10 d; G: 感染金黄色葡萄球菌 无菌大鼠烫伤 72 h

Fig.1 The HE staining skin of burned rats

Note: A: Normal skin; B and C: The skin of SPF rat in *Staphylococcus aureus* infection group at 24 h after burned; D: The skin SPF rat in *Staphylococcus aureus* infection group at 72 h after burned; E: The skin of germ-free rat at 7 d after burned; F: The skin of germ-free rat group at 10 d after burned; G: The skin of germ-free rat in *Staphylococcus aureus* infection group at 72 h after burned

2.3 炎症因子检测结果

由图 2 可知, 4 组大鼠烫伤后血清 TNF- α 水平均显著升高 ($P<0.05$), 无菌大鼠及感染金黄色葡萄球菌无菌大鼠在烫伤 24 h 时, 血清 TNF- α 水平显著高于 SPF 大鼠组和感染金黄色葡萄球菌 SPF 大鼠组 ($P<0.05$);

烫伤 72 h 时, 感染金黄色葡萄球菌 SPF 大鼠组显著高于其他 3 组 ($P<0.05$); 烫伤 7 d 时, 无菌大鼠和感染金黄色葡萄球菌无菌大鼠组显著低于两组 SPF 大鼠 ($P<0.05$)。

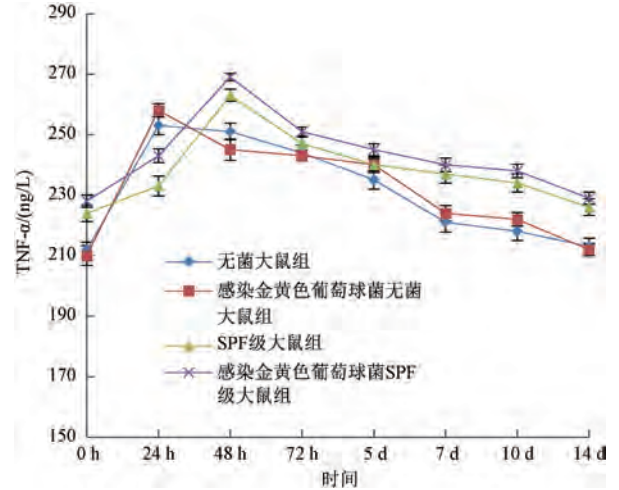


图 2 4 组大鼠血清 TNF- α 水平

Fig.2 The TNF- α level serum of rats in four groups (ng/L)

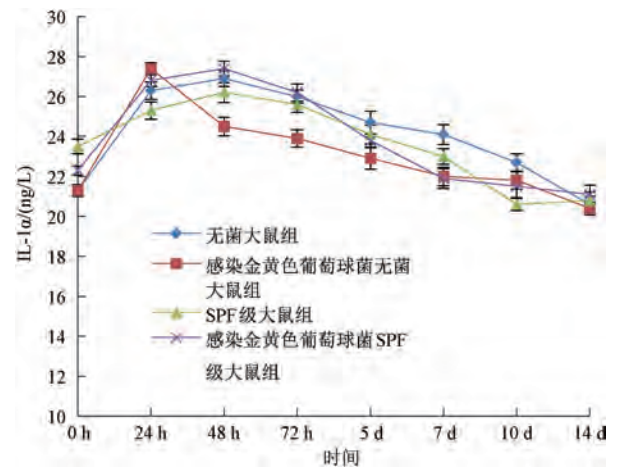


图 3 4 组大鼠血清 IL-1 α 水平

Fig.3 The IL-1 α level serum of rats in four groups (ng/L)

由图 3 可知, 4 组大鼠烫伤后血清 IL-1 α 水平均显著升高 ($P<0.05$), 无菌大鼠及感染金黄色葡萄球菌无菌大鼠在烫伤 24 h 时, 血清 IL-1 α 水平显著高

于 SPF 大鼠组和感染金黄色葡萄球菌 SPF 大鼠组 ($P < 0.05$); 烫伤 48 h 时, 无菌大鼠和感染金黄色葡萄球菌无菌大鼠组显著低于 SPF 大鼠组和感染金黄色葡萄球菌 SPF 大鼠组 ($P < 0.05$), 烫伤 72 h 时, 感染金黄色葡萄球菌 SPF 大鼠显著高于其他 3 组。

由图 4 可知, 4 组大鼠烫伤后血清 EGFR 水平均显著升高 ($P < 0.05$), 无菌大鼠及感染金黄色葡萄球菌无菌大鼠在烫伤 24 h、48 h 和 72 h 时血清 EGFR 水平显著高于 SPF 大鼠组和感染金黄色葡萄球菌 SPF 大鼠组 ($P < 0.05$), 感染金黄色葡萄球菌无菌大鼠显著高于无菌大鼠 ($P < 0.05$)。

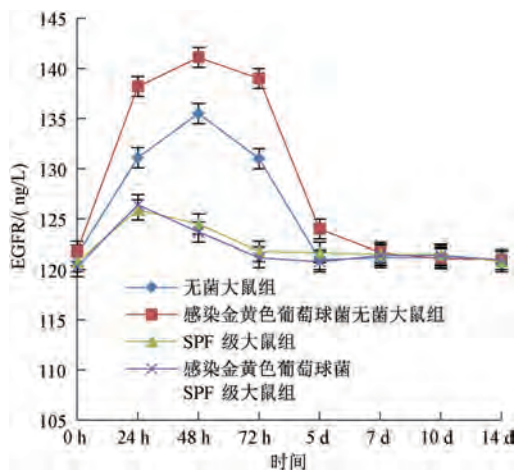


图 4 4 组大鼠血清 EGFR 水平

Fig.4 The EGFR level serum of rats in four groups (ng/L)

3 讨论

以往对烧伤并引发全身炎症反应综合征, 甚至发展为多器官功能障碍综合征的动物模型的制备与研究, 加深了我们对烧伤损伤机制的认识, 但是存在一定的不足, 不能分解分析烧伤后发生的两个过程: 由烧伤创面引发的多种细胞因子及炎症递质的过度释放, 从而引发的炎症反应; 由肠道菌群移位引发的全身性感染。由于无菌动物肠道没有菌群的存活, 制作的无菌动物烧伤模型, 能够准确分析烧伤创面引发的损伤以及机体的反应。

由于烧烫伤使皮肤的防御功能遭到破坏, 并且使创面产生丰富坏死组织和细胞, 形成了天然的培养基, 细菌更容易发生定植^[10-11]。目前烫伤后感染模型的制备方法有 2 种: 一种是动物烫伤后伤口擦刮标准菌株; 另一种是烫伤后伤口皮下注射标准菌株^[12-16]。沈娟等^[17]研究表明深Ⅱ度创面擦刮法接种 1×10^8

CFU/mL 金黄色葡萄球菌菌液可以制备感染创面防治研究的动物模型。所以本实验采用了浓度为 1×10^8 CFU/mL 的金黄色葡萄球菌感染无菌大鼠及 SPF 级大鼠, 均成功制备了大鼠烫伤感染模型。

金黄色葡萄球菌广泛存在, 甚至健康个体也会携带。美国疾病控制中心报告, 由金黄色葡萄球菌引起的感染占第二位, 仅次于大肠杆菌, 是人类化脓感染中最常见的病原菌之一。金黄色葡萄球菌擦刮法感染的 SPF 级烫伤大鼠, 使其出现化脓性感染, 伤口愈合缓慢。烧伤后机体处于应激状态, 炎症因子大量释放^[18], 其中 IL-1 α 是单核细胞、内皮细胞、成纤维细胞等在应答感染时产生的细胞因子所产生, 是一种参与免疫调节的促炎因子, 是炎症反应中主要中间介质, 可诱导内皮细胞活化, 刺激中性粒细胞释放炎症蛋白和炎症介质, 从而放大炎症反应^[19]; TNF- α 主要由单核吞噬细胞产生, 是体内最重要的多功能促炎细胞因子^[20], 通过增强中性粒细胞的功能, 使释放的炎症介质增加, 从而加重机体的损伤。实验中, 4 组大鼠烫伤 24 h 时, 感染金黄色葡萄球菌无菌大鼠组血清 IL-1 α 和 TNF- α 水平显著高于其他 3 组, 与 Balish 等^[21]的实验结果金黄色葡萄球菌在刺激无菌大鼠血清蛋白生成中起到显著作用相一致。EGFR 广泛分布于哺乳动物上皮细胞、成纤维细胞、胶质细胞、角质细胞等细胞表面, EGFR 信号通路对细胞的生长、增殖和分化等生理过程发挥重要的作用, 在创面愈合过程中具有重要作用^[22-23]。适度的细菌感染炎症刺激能够调动机体全身免疫机制, 有利于吞噬细胞和生长因子大量产生, 有利于伤口愈合^[24]。烫伤 24 h、48 h 和 72 h 时, 感染金黄色葡萄球菌无菌大鼠组血清 EGFR 水平显著高于其他 3 组, 与感染金黄色葡萄球菌无菌大鼠愈合速度显著短于其他 3 组的结果相一致。Bauer 等^[25]和 Levenson 等^[26]研究表明动物在出生后不久, 其免疫系统被大量细菌刺激而激活, 而无菌大鼠由于未受到菌群刺激, 因而其细胞免疫和体液免疫不完善。

SPF 大鼠烫伤后感染金黄色葡萄球菌, 由于金黄色葡萄球菌产生的多种蛋白酶破坏细胞外基质和细胞间联系^[27], 导致伤口化脓性感染, 延缓了伤口愈合; 无菌大鼠由于受到烫伤和金黄色葡萄菌分泌的超抗原的共同作用, 调动处于休眠状态的全身免疫系统^[28-29], 促进生长因子产生, 从而缩短了伤口愈合时间。

参考文献

- [1] Jeschke M G, Kamolz L P, Sj Berg F, *et al.* Handbook of Burns || Treatment of infection in burns [J]. 2012, 10.1007/978-3-7091-0348-7 (Chapter 15): 221-240.
- [2] Andrade C, Champagne S, Caruso D, *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an assessment of environmental contamination in a burn center [J]. Am J Infect Control, 2009, **37**(6): 515-517.
- [3] 陈华. 医学实验动物学 [M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2013.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典临床用药须知·化学药和生物制品卷 [S]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 76.
- [5] 廖秦平. 女性阴道微生态及阴道微生态评价 [J]. 实用妇产科杂志, 2010, **26**(2): 81-83.
- [6] Canesso M C, Lacerda N L, Ferreira C M, *et al.* Comparing the effects of acute alcohol consumption in germ-free and conventional mice: the role of the gut microbiota [J]. BMC Microbiology, 2014, **14**: 240.
- [7] Bekhed F, Ding H, Wang T, *et al.* The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage [J]. Proceedings of the National Academy Science of USA, 2004, **101** (44): 15718-15723.
- [8] Rebello D, Wang E, Yen E, *et al.* Hair Growth in Two Alopecia Patients after Fecal Microbiota Transplant [J]. ACG Case Reports Journal, 2017, **4**: 1-3.
- [9] Khosravi Y, Seow S W, Amoyo A A, *et al.* Helicobacter pylori infection can affect energy modulating hormones and body weight in germ free mice [J]. Sci Rep, 2015, **5**: 225-232.
- [10] Chandrasekaran N, Sugumar S, Mukherjee A. Eucalyptus oil nanoemulsion-impregnated chitosan film: Antibacterial effects against a clinical pathogen, *Staphylococcus aureus*, in vitro [C]. International Journal of Nanomedicine. Dove Medical Press, 2015.
- [11] Morton L M, Phillips T J. Wound healing update [J]. SeminCutanMed Surg, 2012, **31**(1): 33-37.
- [12] 孙堂卿, 黄国宝, 吴秋合, 等. 磨痂术对烫伤大鼠术后创面铜绿假单胞菌感染的干预作用研究 [J]. 中华医院感染学杂志, 2017, **27**(22): 519.
- [13] 刘烜凯, 张绪美, 张伟, 等. 大鼠烫伤模型及烫伤后感染模型的建立 [J]. 潍坊医学院学报, 2017, **39**(4): 248-250.
- [14] 刘建芳, 薛改, 候燕宁, 等. 创伤涂膜剂对烫伤大鼠感染绿脓杆菌的治疗作用 [J]. 解放军药学报, 2013, **29**(6): 506-508.
- [15] 赵超莉, 谢卫国, 宛仕勇, 等. 低强度微波照射对烫伤大鼠金黄色葡萄球菌所致感染创面溶菌酶含量的影响 [J]. 中华损伤与修复杂志, 2011, **6**(6): 889-893.
- [16] 潘立博, 胡日新, 王福金, 等. 比较硝酸银和抗生素治疗小鼠金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌创伤感染的效果 [J]. 实验动物科学, 2014, **31**(15): 18-23.
- [17] 沈娟, 金小宝, 朱家勇, 等. 烧烫伤创面感染的小鼠模型构建 [J]. 中国实验动物学报, 2013, **21**(3): 65-69.
- [18] Peng D, Huang W, Ai S, *et al.* Clinical significance of leukocyte infiltrative response in deep wound of patients with major burns [J]. Burns, 2006, **32**(8): 946.
- [19] Strieter R M, Kunkel S L, Keane M P, *et al.* Chemokines in lung injury [J]. Chest, 1999, **116**: 103S-110S.
- [20] Takahashi T, Hato F, Yamane T, *et al.* Activation of human neutrophil by cytokine-activated endothelial cells [J]. Cite Res, 2001, **88**: 422-429.
- [21] Balish E, Yale C E, Hong R. Serum proteins of gnotobiotic rats [J]. Infection and immunity, 1972, **6**(2): 112-118.
- [22] Yahata Y, Shirakata Y, Tokumaru S, *et al.* A novel function of angiotensin II in skin wound healing. Induction of fibroblast and keratinocyte migration by angiotensin II via heparin-binding epidermal growth factor (EGF)-like growth factor-mediated EGF receptor transactivation [J]. BiolChem, 2006, **281** (19): 13209-13216.
- [23] Yousif M H, Benter I F, Akhtar S. The role of tyrosine kinase-mediated pathways in diabetes-induced alterations in responsiveness of rat carotid artery [J]. Auton Autacoid Pharmacol, 2005, **25**(2): 69-78.
- [24] 李鸿雁, 战大伟, 孙兆增, 等. 无菌大鼠深二度烫伤感染模型机体炎症反应的研究 [J]. 中国畜牧兽医, 2018, **45** (12): 3623-3629.
- [25] Bauer H H, Gordon A, Wostman B S, *et al.* Defense mechanisms in germ-free animals [C]. New York, Academic Press Inc., 1968: 210-223.
- [26] Levenson S M, Kan-Gruber D, Gruber C, *et al.* Wound healing accelerated by *Staphylococcus aureus* [J]. Arch Surg, 1983, **118** (3): 310-320.
- [27] Giampiero P, Giulia N, Simonetta R, *et al.* *Staphylococcus aureus* Manipulates Innate Immunity through Own and Host-Expressed Proteases [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2017, **7**: 166-174.
- [28] Kim C, Karau M, Greenwood-Quaintance K, *et al.* Superantigen-Producing *Staphylococcus aureus* Elicits Systemic Immune Activation in a Murine Wound Colonization Model [J]. Toxins, 2015, **7**(12): 5308-5319.
- [29] Brady R A, Bruno V M, Burns D L, *et al.* RNA-Seq Analysis of the Host Response to *Staphylococcus aureus* Skin and Soft Tissue Infection in a Mouse Model [J]. PLOS ONE, 2015, **10** (4): e0124877.

Study on Inflammatory Response of the *Staphylococcus aureus* Infected Deep Second Degree Scald Germ-free Rats

LI Hongyan¹, YAN Kesong², MA Dongsheng², ZHAN Dawei², SUN Zhaozeng¹

(1.Laboratory Animal Center, Military Medical Sciences, Military Academy, Beijing 100071, China)

(2.Fourth Medical Center of People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100048, China)

Abstract: Objective We established a deep second-degree scald injury model which was infected with *Staphylococcus aureus* with germ-free rats and SPF rats, then we analyze the healing process, inflammatory response, and pathological changes about the four groups. **Method** Deep second degree scald wound model was performed in 20 six weeks old female germ-free rats at a temperature of 94 °C, 8s in a clean bench. The scald germ-free rats were randomly divided into two groups. One group was infected with *Staphylococcus aureus* with a concentration of 1×10^8 CFU/mL in the wound; Another group was not infected. 20 six weeks old female SPF Wistar rats were performed second degree scald wounds as the germ-free rats. The scab generating time, dislocation time and healing time of the four groups were observed, and serum samples were taken to detect the changes of IL-1 α , TNF- α and EGFR before burned (0 h) and 24 h, 48 h, 3d, 5 d, 7d, 10 d, 14 d after burned. The skins were taken to observe the pathological changes at 24 h, 3d, 7 d and 10 d after burned. **Result** The *Staphylococcus aureus* stained germ-free rats had a short period of decrustation and healing time ($P < 0.05$), while the *Staphylococcus aureus* stained SPF rats had a long period of scab generating time, decrustation and healing time ($P < 0.05$). Because of the double damage, the level of TNF- α and IL-1 α were elevated and they were significantly higher than the other three groups after 72 h scald ($P < 0.05$); The germ-free rats response stimulus to scald and *Staphylococcus aureus*, so the level of TNF- α , IL-1 α and EGFR were elevated and they were significantly higher the SPF rats at 24 h after burned. The level of EGFR about the *Staphylococcus aureus* stained germ-free rats was significantly higher than SPF rats at 48 h after burned. The pathological showed time of new blood vessels and granulation tissue formation about the *Staphylococcus aureus* stained SPF rats were significantly longer than the other three groups and time of new blood vessels and granulation tissue formation about the *Staphylococcus aureus* stained germ-free rats were significantly shorter than the other three groups. **Conclusion** The immune system of germ-free rats was in a state of dormancy, when it was stimulated by scald and *Staphylococcus aureus*, the systemic immune was activated and the wound healing was accelerated; the variety of immune evasion molecules secreted by *Staphylococcus aureus* aggravated the inflammatory response and wound healing was delayed.

Key words: Germ-free rat; *Staphylococcus aureus*; burn; Inflammatory reaction; TNF- α ; IL-1 α ; EGFR