

. 实验研究 .

兔细菌性脑室炎模型的建立

原高明 孟晓峰 郭孝龙 崔 涛 程小兵 郝晓伟 李泓江 史保中

【摘要】目的 探讨兔细菌性脑室炎模型的制作方法。方法 将成年新西兰大白兔 36 只随机分为模型组、对照组和正常组，每组 12 只。模型组侧脑室注入浓度为 1×10^6 CFU/ml 的表皮葡萄球菌混悬液 0.5 ml；对照组侧脑室内注入 0.5 ml 生理盐水。结果 与造模前相比，模型组造模后肛温、血白细胞总数和中性粒细胞百分比以及脑脊液蛋白含量、细胞总数、白细胞数均明显升高 ($P<0.05$)，而脑脊液糖含量、氯化物含量均明显降低 ($P<0.05$)。对照组及正常组肛温、血、脑脊液指标无明显改变。模型组血细菌培养阴性，脑脊液细菌培养阳性；对照组及正常组血、脑脊液细菌培养阴性。病理观察示模型组室管膜下大量中性粒细胞浸润，对照组所见正常。结论 接种 0.5 ml 浓度为 1×10^6 CFU/ml 的表皮葡萄球菌混悬液可成功建立兔细菌性脑室炎。

【关键词】细菌性脑室炎；模型；表皮葡萄球菌；兔

【文章编号】1009-153X(2018)03-0173-03 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 742.6; R 332

Establishment of bacterial ventriculitis model in rabbits

YUAN Gao-ming¹, MENG Xiao-feng², GUO Xiao-long¹, CUI Tao¹, CHENG Xiao-bing¹, HAO Xiao-wei¹, LI Hong Jiang², SHI Bao-zhong¹. 1. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital, He'nan University of Sciences and Technology, Luoyang 471003, China; 2. Department of Neurosurgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Medical School, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200011, China

【Abstract】Objective To establish a model of bacterial ventriculitis in rabbit. Methods Thirty-six adult healthy New Zealand white rabbits were randomly divided into three groups of 12 animals each, i.e. model group, in which 0.5ml staphylococcus epidermidis suspension with 1×10^6 CFU/ml was injected into the lateral ventricle of each rabbit, operation control group, in which 0.5ml 0.9% sodium chloride was injected into the lateral ventricle of each animal and normal control group, in which nothing was injected. The rectal temperature was monitored and total leukocyte count and neutrophils percentages of blood and the contents of glucose, protein and chloride of CSF were detected 6 and 12 hours after the injection. The blood and CSF were taken in order to culture bacteria before the animal sacrifice. All the animals were killed 12 hours after the injection and brain tissue was histopathologically observed. Results The rectal temperature, total leukocyte count and neutrophils percentage of blood and protein content, total number of cells and leukocyte count of CSF were significantly higher and glucose level and chloride level of CSF were significantly lower in the model group than those in the operation control and normal control groups ($P<0.05$). There were insignificant difference in the above-mentioned indexes between the operation control and normal control groups ($P>0.05$). The blood bacterial culture and CSF bacterial culture were negative and positive respectively in the model group and all negative in the operation control and normal control groups. The pathological observation showed that neutrophile granulocytes infiltrated into the ependymal tissues in the model group and the cerebral tissues were normal in the operation control and normal control groups. Conclusion The bacterial ventriculitis model can successfully be established by the injection of 0.5ml staphylococcus epidermidis suspension with 1×10^6 CFU/ml into ventricles in the rabbits.

【Key words】Bacterial ventriculitis; Staphylococcus epidermidis; Model; Rabbit

脑室炎指发生在脑室系统及其周围的炎症^[1]，病死率高，治疗比较棘手^[2]。由于脑室炎临床发病率较低，要深入研究，离不开满意的实验模型^[3]。本文探讨兔细菌性脑室炎模型的制作方法。

1 材料与方法

- 1.1 实验动物及分组 清洁级新西兰大耳白兔 36 只（由河南科技大学动物实验中心提供），体重 (2.5 ± 0.2) kg。随机分为模型组、对照组和正常组，每组 12 只。
- 1.2 菌株 标准表皮葡萄球菌(ATCC 35984，菌株来源于卫生部临检中心)转种在血平板培养基上，在 37 ℃培养箱中培养 24 h 见有单个菌落形成后，放置在 4 ℃冰箱内保存。待实验动物麻醉成功后在培养

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2018.03.011
作者单位: 471003 洛阳, 河南科技大学第一附属医院神经外科(原高明、孟晓峰、郭孝龙、崔 涛、程小兵、郝晓伟、史保中); 200011 上海, 上海交通大学医学院附属第九人民医院神经外科(李泓江)
通讯作者: 史保中, E-mail: sbzmd20569@163.com

基上收集其菌落,用生理盐水连续稀释配制成 1×10^6 CFU/ml(CFU 指菌落形成单位)浓度的细菌混悬液备用。

1.3 造模方法 模型组动物 3%戊巴比妥钠麻醉后俯卧位固定于立体定向仪上,头顶正中纵行切口(起于两眼眶最高点连线中点后 2 cm,长 2 cm),显露冠状缝和矢状缝,牙科台钻在冠状缝后 5 mm 中线偏右 4 mm 处钻一直径 2 mm 骨孔,5.5 号静脉输液针垂直颅骨进入约 5 mm 即进入侧脑室,1 ml 注射器抽取 0.6 ml 脑脊液,留作标本。将标准表皮葡萄球菌混悬液(浓度为 1×10^6 CFU/ml)0.5 ml 以 0.1 ml/min 的速度缓慢注入侧脑室,完毕后停留 2 min,拔出穿刺针,观察无活动性出血后用庆大霉素盐水冲洗术区,骨蜡封闭骨孔,缝合头皮。对照组动物侧脑室穿刺成功后,留取 0.6 ml 脑脊液标本,按同样速度注入生理盐水 0.5 ml,余操作同模型组。

1.4 观察指标 造模后观察 12 h。观察指标:①一般情况:肛温、精神饮食情况、四肢活动、对外界刺激的反应;②血液检测:造模后 6、12 h 从耳缘静脉取血 1 ml,检测白细胞数量和中性粒细胞百分比;③脑脊液检测:造模后 12 h 经小脑延髓池取 0.6 ml 脑脊液,检测细胞总数、白细胞数以及糖、蛋白和氯化物浓度;④细菌学培养:造模后 12 h 取血液和脑脊液做细菌学培养;⑤病理学检查:造模后观察 12 h,4%多聚甲醛灌注固定后,开颅取脑,脑组织在 4%多聚甲醛中固定 48 h,常规石蜡包埋,5 μ m 层厚切片,HE 染色后荧光显微镜下观察。

1.5 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行处理,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 模型组和对照组动物造模后 1.5~2.5 h 清醒,能自由活动,进食。模型组动物造模后 6~8 h 逐渐出现呼吸变浅,频率加快,肛温升高(表 1),行走不稳,易于激惹;10~12 h 逐渐出现不能站立,呼吸深而慢,对外界刺激反应迟钝。而对照组和正常组动物无明显变化。

2.2 血常规检测结果 与造模前相比,模型组造模后 6、12 h 血白细胞总数、中性粒细胞百分比均明显升高($P<0.05$)。与对照组及正常组相比,模型组血白细胞总数、中性粒细胞百分比均明显升高($P<0.05$)。见表 2。

2.3 脑脊液检测分析 与造模前相比,模型组造模后

12 h 脑脊液蛋白含量、细胞总数及白细胞数均明显升高($P<0.05$),而脑脊液糖含量、氯化物含量均显著降低($P<0.05$)。与对照组及正常组相比,模型组造模后 12 h 脑脊液蛋白含量、细胞总数及白细胞数均明显升高($P<0.05$),而糖含量、氯化物含量均明显降低($P<0.05$)。见表 3、4。

2.4 细菌学培养结果 ①血液:模型组、对照组及正常组造模后血细菌培养均阴性。②脑脊液:模型组造模后 12 份标本均培养出细菌,并鉴定为表皮葡萄球菌;对照组及正常组 12 份标本均未培养出细菌。

2.5 病理学观察 模型组动物镜下见蛛网膜下腔不同程度增宽,脑水肿明显,侧脑室及室管膜下见弥漫性中性粒细胞浸润(图 1A)。对照组镜下所见正常(图 1B)。

3 讨论

目前临床上细菌性脑室炎的治疗有多种方法,但整体疗效差,尚无统一治疗方案,难以比较各种方法的优缺点,因此有必要建立动物模型来进行研究。

脑脊液细菌培养是判断活体动物脑室炎是否存在金标准^[4]。因此,本实验将细菌培养作为判断活体动物感染的唯一标准;脑脊液培养结果显示,模型组感染率为 100%,说明均能形成脑室炎;对照组感染率为 0,说明无菌操作条件下,单纯脑室穿刺不会造成脑室感染;血培养结果均呈阴性,说明单纯脑室穿刺和浓度为 1×10^6 CFU/ml 的表皮葡萄球菌均不会造成菌血症。

表 1 造模前后肛温变化情况(℃)

组别	肛温		
	造模前	造模后 6 h	造模后 12 h
模型组	38.82±0.47	41.02±0.27 [*]	41.02±0.09 ^{*#}
对照组	38.65±0.35	38.39±0.62	38.21±0.32
正常组	38.49±0.17	38.31±0.41	38.24±0.65

注:与造模前相应值比,* $P<0.05$;与对照组相应值比,# $P<0.05$

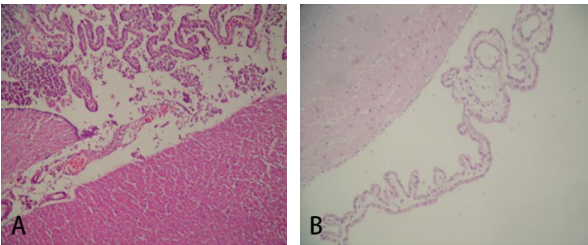


图 1 造模后病理检查结果(HE,×40)

A. 模型组; B. 对照组

表 2 造模前后血白细胞总数及中性粒细胞百分比变化

组别	白细胞总数($\times 10^9/L$)			中性粒细胞百分比(%)		
	造模前	造模后 6 h	造模后 12 h	造模前	造模后 6 h	造模后 12 h
模型组	4.82±0.52	11.02±0.78*	19.02±0.12*#	44.82±0.61	66.02±0.07*	89.02±0.19*#
对照组	5.15±0.37	6.39±0.33	4.19±0.15	45.65±0.32	42.39±0.47	43.29±0.61
正常组	4.49±0.11	4.29±0.62	4.34±0.18	42.49±0.17	41.23±0.63	42.38±0.42

注:与造模前相应值比,* $P<0.05$;与对照组相应值比,# $P<0.05$

表 3 造模前后脑脊液细胞总数和白细胞数变化($\times 10^6/ml$)

组别	细胞总数		白细胞数	
	造模前	造模后 12 h	造模前	造模后 12 h
模型组	0.012±0.002	0.182±0.008*#	0	0.131±0.048*#
对照组	0.010±0.002	0.008±0.002	0	0
正常组	0.008±0.001	0.009±0.004	0	0

注:与造模前相应值比,* $P<0.05$;与对照组相应值比,# $P<0.05$

表 4 造模前后脑脊液糖、蛋白和氯化物变化

组别	糖(mmol/L)		蛋白(mg/L)		氯化物(mmol/L)	
	造模前	造模后 12 h	造模前	造模后 12 h	造模前	造模后 12 h
模型组	5.82±0.42	1.02±0.11*#	237.12±29.04	2031.72±48.15*#	111.84±2.51	91.27±1.45*#
对照组	5.65±0.32	5.29±0.63	215.47±21.24	261.25±27.74	107.08±3.56	103.17±3.17
正常组	6.49±0.17	6.53±0.09	234.45±18.07	245.41±19.71	105.17±4.13	106.47±4.28

注:与造模前相应值比,* $P<0.05$;与对照组相应值比,# $P<0.05$

病理学观察是判断离体组织感染是否存在的金标准^[5]。本研究病理结果显示,模型组蛛网膜下腔不同程度增宽,脑水肿明显,侧脑室及室管膜下见弥漫性中性粒细胞浸润,这些均是脑室炎的证据^[6,7];而对照组和正常组均显示正常脑组织结构。

脑室炎模型的建立,理论上有三种方法。第一种是模拟临床上脑室置管引流术,将细菌接种在引流管内^[8]。由于脑脊液在引流管内的单向流动,细菌较难进入脑室造成感染。另外由于兔侧脑室较小,脑脊液含量不多,较长时间的引流可能导致脑脊液过度引流而产生新的症状^[9],所以,我们推测此方法的造模成功率可能不高。第二种是静脉注射细菌,通过血液循环到达脑室引起脑室炎,此种方法的成功率可能很低。在临床工作中,我们经常遇到全身感染严重的病人而无中枢神经系统的感染,且此种方法形成的不仅是脑室炎,必定会伴有不同程度的菌血症或败血症,此类型脑室炎与临床常见的类型不尽一致。第三种是脑室直接接种细菌,此方法简单易行。本实验成功率为 100%,且未形成菌血症。

本实验在脑室穿刺接种细菌时,穿刺点选在冠状缝后 5 mm 中线旁开 4 mm 垂直颅骨进针^[10]。通过兔尸体解剖,我们发现此点是兔俯卧位时侧脑室的

最高点,距离脑表面最近,在穿刺操作时进针方向和深度容易把握,且穿刺成功率高,穿刺后没有出现神经功能缺损。这与胡学强等^[11]报道的在冠状缝穿刺相比较更容易操作。

总之,本实验研究结果显示在兔侧脑室接种 0.5 ml 浓度为 1×10^6 CFU/ml 的表皮葡萄球菌混悬液可以成功建立细菌性脑室炎模型,对研究细菌性脑室炎的发生、诊断及其治疗将有一定的实用价值。

【参考文献】

[1] Satyarthee GD. Expanding horizon of neuroendoscopic procedure from endoscopic-assisted tumor resection, vascular surgery, and management of hydrocephalus to diagnostic and therapeutic management of pyogenic ventriculitis [J]. World Neurosurg, 2017, 104: 1024–1025.

[2] 史保中, 孟晓峰, 崔涛等. 脑室-腹腔分流术后颅内感染的外科处理(附 12 例报告) [J]. 中国临床神经外科杂志, 2007, 12(12): 748–749.

[3] 张伟伟. 动物模型与实验外科[J]. 中华实验外科杂志, 2003, 20(4): 293–295.

(下转第 181 页)

(上接第 175 页)

- [4] AK Chan, HS Birk, JK Yue, *et al.* Bilateral external ventricular drain placement and intraventricular irrigation combined with concomitant serial prone patient positioning: a novel treatment for gravity-dependent layering in bacterial ventriculitis [J]. *Cureus*, 2017, 9(4): 1175.
- [5] Brouwer MC, van de Beek D. Management of bacterial central nervous system infections [J]. *Handb Clin Neurol*, 2017, 140: 349–364.
- [6] Dandurand C, Letourneau L, Chaalala C, *et al.* Pyogenic ventriculitis as clinical presentation of diverticulitis [J]. *Can J Neurol Sci*, 2016, 43(4): 576–577.
- [7] 张晓东,刘守勋,赵海康. 颅脑手术后并发脑室炎的诊断

及治疗[J]. *中国现代医学杂志*, 2003, 13(12): 107–108.

- [8] 曹海泉,何永生,黄光富. 导管相关性脑室炎的诊断及治疗研究进展[J]. *中华神经医学杂志*, 2007, 6(12): 1293–1296.
- [9] 李小勇,王忠诚,李银平,等. 脑积水脑室-腹腔分流相关性脑室炎治疗方案的探讨[J]. *中国危重病急救医学*, 2005, 17: 558–560.
- [10] 赵 飞. 利用细菌性脑膜炎鼠模型评价侧脑室给药的治疗效果[D]. 上海交通大学, 2015.
- [11] 胡学强,王世芳,陆正齐. 尿激酶联合自体血浆治疗实验性兔脑室出血[J]. *中国脑血管病杂志*, 2004, 1(7): 313–316.

(2017-10-09 收稿, 2017-11-18 修回)