

# 创伤弧菌经食管感染小鼠的致病性

郑晶, 申洪, 陈清

郑晶, 申洪, 南方医科大学病理学教研室 广东省广州市 510515  
陈清, 南方医科大学热带卫生学系流行病学教研室 广东省广州市 510515

郑晶, 女, 1979-04-21 生, 湖北省黄冈市人, 汉族. 2002 年湖北邵阳医学院本科毕业, 2002 年南方医科大学硕士. 主要从事感染病理学及定量病理学的研究. 广东省自然科学基金资助项目, No. 4020381

通讯作者: 申洪, 510515, 广东省广州市, 南方医科大学病理学教研室.

hongshen@fimmu.com

电话: 020-61648227 传真: 020-61640212

收稿日期: 2005-01-28 接受日期: 2005-02-26

## Pathogenicity of *Vibrio vulnificus* infection in mice through enteron

Jing Zheng, Hong Shen, Qing Chen

Jing Zheng, Hong Shen, Department of Pathology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Qing Chen, Department of Epidemiology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Supported by National Science Foundation of Guangdong Province, No. 4020381

Correspondence to: Hong Shen, Department of Pathology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China. hongshen@fimmu.com

Received: 2005-01-28 Accepted: 2005-02-26

### Abstract

**AIM:** To characterize the *Vibrio vulnificus* (Vv) infection transmitted through the alimentary canal in mice.

**METHODS:** Thirty-nine KM mice (SPF) were divided randomly into 2 groups: the study group ( $n = 24$ ) and the control group ( $n = 15$ ). The model of alimentary canal transmitted Vv infection was established by feeding each mouse with 0.6 mL ( $4.7 \times 10^{10}$  cfu/L) Vv inoculum (strain 1.1 758). The mice in the control group were fed with sterile culture medium. The pathological changes of the alimentary canal were examined under microscope. Vv taken from the tissues was cultured. The morphology of Vv in acid (close to the gastric juice) and at low salinity (9 g/L NaCl) was also examined.

**RESULTS:** No digestive symptom such as vomiting or diarrhea was observed in the mice fed with Vv. The Vv culture results of the tissues were negative. However, degeneration and necrosis of the epithelial cells were observed in the gastric mucosa. Anamorphic and swollen Vv was found in the stomach under microscope in the study group. Vv processed in acid and low salt was also anamorphic and swollen.

**CONCLUSION:** Vv cannot survive in the acidic gastric juice with low salinity naturally, but it can still induce acute injury of the gastric mucosa. Vv strain 1.1 758 infected via enteron has a mild pathogenicity in the gastric mucosa.

**Key Words:** *Vibrio vulnificus*; Enteron; Pathogenicity

Zheng J, Shen H, Chen Q. Pathogenicity of *Vibrio vulnificus* infection in mice through enteron. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(7): 860-863

### 摘要

**目的:** 探讨创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*, Vv)经食管感染小鼠的致病特点.

**方法:** 39 只 SPF 级昆明小鼠(雌性 20 只, 雄性 19 只), 实验组 24 只, 均强制性喂食 Vv 菌液( $4.7 \times 10^{10}$  cfu/L, 菌株编号 1.1 758)0.6 mL/只;对照组 15 只, 喂食灭菌培养基(含 35 g/L NaCl 的碱性蛋白胨水)0.6 mL/只. 观察小鼠一般情况, 分别于实验后 12、32 及 72 h 各处死 8 只实验组小鼠和 5 只对照小鼠, 取其食管、胃及肠组织进行病理学观察, 同时进行 Vv 分离培养, 并取胃组织进行扫描电镜观察. 另外用强酸及低盐处理 Vv 菌后, 行光镜观察及增菌培养.

**结果:** Vv 经食管感染小鼠后并未导致其出现呕吐、腹泻等消化道症状, 且 Vv 的分离培养结果均为阴性, 但病理学及扫描电镜结果显示实验组小鼠胃黏膜表面附着有极度肿胀变形的 Vv 菌体, 且附着处部分胃黏膜上皮细胞脱落、溶解坏死. 强酸低盐处理过的 Vv 部分肿胀变形, 且增菌培养结果为阴性.

**结论:** Vv 在正常小鼠的胃酸环境中不能存活, 难以进入肠道繁殖, 通常不引起小鼠呕吐和腹泻症状, 但可轻度损伤小鼠胃黏膜上皮; 1.1758 Vv 株属消化道感染弱毒力株.

**关键词:** 创伤弧菌; 消化道; 致病性

郑晶, 申洪, 陈清. 创伤弧菌经食管感染小鼠的致病性. 世界华人消化杂志 2005;13(7):860-863

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/860.asp>

### 0 引言

创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*, Vv)是弧菌属第 5 群

细菌. 生的或未加工熟的贝甲类海产品(尤其是牡蛎)是导致创伤弧菌食源性感染的主要传播媒介. 很多临床病例已经证明, 进食被Vv污染的食物可引起创伤弧菌食物中毒, 主要表现为严重的蜂窝组织炎和败血症<sup>[1-2]</sup>, 由Vv单独引起急性胃肠炎的病例却极为少见<sup>[3]</sup>. 因此, 食源性感染Vv后对消化道的致病性问题还尚待阐明. 为此, 我们在建立Vv经食管感染的小鼠模型基础上, 进行了相关实验性研究.

## 1 材料和方法

1.1 材料 Vv购于中国科学院微生物研究所普通微生物保藏管理中心, 菌株编号 1.1758, 无荚膜, 乳糖发酵阴性. 购回后进行冷冻干燥菌种的恢复培养, 培养基为 35 g/L NaCl 的碱性蛋白胨水, 培养后的 Vv 悬液用标准平板计数法测得菌液浓度为  $4.7 \times 10^{10}$  cfu/L, 即应用于实验. SPF 级 6-8 wk 昆明小鼠 39 只(雌性 20 只, 雄性 19 只), 由本校实验动物中心提供. 实验组 24 只, 又随机分成 3 组, 分别为 12 h 组、32 h 组和 72 h 组, 每组 8 只; 每个不同时间组各 5 只作为对照, 即对照组小鼠共 15 只. 实验组及对照组小鼠实验前均禁食 12 h.

1.2 方法 取已灭菌的装有小鼠灌胃针头的 1 mL 注射器, 吸取 Vv 悬液 0.8 mL, 抓取小鼠, 将针头置于小鼠口腔内(灌胃针头末端圆钝, 可避免损伤小鼠), 缓慢推进注射器, 使 Vv 悬液滴入小鼠口腔, 强制喂食, 每只实验组小鼠被喂食 0.6 mL 的 Vv 悬液. 用同样的方法给每只对照组小鼠喂进 0.6 mL 已灭菌的 35 g/L NaCl 碱性蛋白胨水. 密切观察小鼠, 包括毛发、精神状态、体温、进食量和排便量及大便性状等一般情况. 喂食后 12 h 断椎法处死实验组里 12 h 组 8 只小鼠及对照组 5 只小鼠, 并按徐景野 *et al*<sup>[4]</sup> 的方法对处死小鼠的胃肠组织用两种方法进行了 Vv 的分离培养, 一种是直接分离法, 即取每只处死小鼠的部分食管、胃及肠组织分别无菌碾碎后, 不经增菌培养, 直接将组织匀浆划线接种于弧菌选择性培养基硫代硫酸盐-枸橼酸盐-胆盐-蔗糖琼脂(thiosulfate-citrate-bile salt-sucrose, TCBS)平板; 另一种是增菌分离法, 即将上述碾碎组织匀浆先分别接种于 35 g/L NaCl 碱性蛋白胨水中, 36℃过夜增菌后, 划线转种于 TCBS 平板. 另将每只小鼠余下的食管、肠及部分胃组织固定于 40 g/L 甲醛溶液中, 并按常规方法制成 HE 切片进行病理学观察. 再将上述未固定的胃组织用 pH 值为 7.4 的 PBS 缓冲液反复冲洗后置于 25 g/L 的戊二醛溶液中固定, 4℃过夜, 经过梯度丙酮脱水, 乙酸异戊酯置换, 临界点干燥后喷金进行扫描电镜观察(日立 S-450, 本校电镜室). 32 h 组和 72 h 组的处理方法同 12 h 组. 在体外将上述用于饲喂小鼠

的 Vv 菌悬液离心, 去上清, 加入灭菌的含 9 g/L NaCl 的酸性溶液(已用盐酸将其 pH 值调至 2.2, 与小鼠胃环境 pH 值接近), 摇匀, 处理 4 h 后, 取一滴滴于玻片上, 革兰染色, 进行光镜观察, 余下的离心去上清后, 加入 6 mL 已灭菌的 35 g/L NaCl 碱性蛋白胨水作增菌培养. 在进行动物实验前, 我们也对 Vv1.1758 菌体进行了透射电镜观察(日本电子 JEM-1200, 本校电镜室), 方法为将上述恢复培养后的 Vv 悬液离心, 使 Vv 在离心管底部成团块, 吸出上清, 取 Vv 团块进行常规透射电镜脱水、染色以及超薄切片后观察.

## 2 结果

实验组小鼠在喂食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, 但在喂食 24 h 后, 上述情况都恢复正常. 且在实验过程中, 实验组小鼠的排便量及大便性状并未发生改变, 无呕吐, 体温也未见升高. 对照组小鼠无异样.

2.1 病理学观察 实验组 12 h 组 8 只小鼠及 32 h 组 8 只小鼠的胃组织均可见部分胃黏膜表面附着有数量不等 Vv 菌体, 大部分菌体明显肿胀变形, 弧形消失, 呈椭圆形或圆形, 且菌体附着处胃黏膜腺上皮细胞出现脱落和溶解坏死, 但病变仅限于黏膜层表面, 黏膜下层、肌层及浆膜层均未见 Vv 菌体. 12 h 组 Vv 菌数量较多, 胃黏膜上皮细胞溶解坏死也较明显(图 1A), 在黏膜层深处及固有膜内可见较多的中性粒细胞浸润以及血管扩张充血(图 1D); 32 h 组 Vv 数量明显减少, 且胃黏膜病变有所减轻(图 1B); 而 72 h 组已不见或仅见极少量的 Vv, 胃黏膜已基本恢复正常(图 1C). 实验组 24 只小鼠的食管及肠组织均未见明显病理学改变. 对照组 15 只小鼠食管、胃及肠组织均未见异常, 胃黏膜表面亦未见 Vv 菌体.

2.2 扫描电镜观察 实验组小鼠(12 h 组)部分胃黏膜表面见数量较多的 Vv, 菌体肿胀变形, 且肿胀程度不一, 呈圆球或橄榄球状(图 2), 与光镜下的形态相符. 对照组未见上述 Vv 菌体.

2.3 分离培养及体外强酸低盐处理结果 实验组小鼠食管、胃及肠组织的 Vv 分离培养结果均为阴性, 即增菌后划线转种于 TCBS 平板上未见菌落生长. 对照组也为阴性. 体外强酸低盐处理后, 在光镜下见 Vv 肿胀变形, Vv 增菌培养结果为阴性. 正常 Vv 弯曲, 呈弧形或杆状, 菌体表面未见荚膜层(图 3).

## 3 讨论

Vv 感染主要表现为败血症及蜂窝组织炎等, 一旦出现败血症, 死亡率都大于 50%<sup>[5-10]</sup>, 而 Vv 单独引起胃肠炎的病例却极少. 那么为什么 Vv 与本属其他菌不

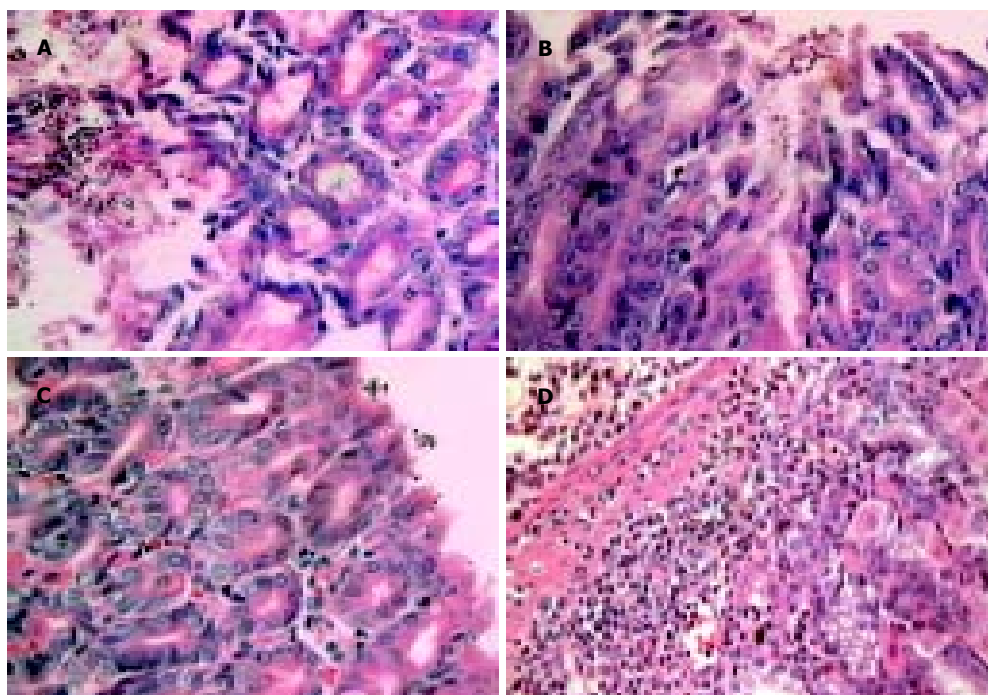


图1 小鼠胃黏膜病理学 HE  $\times 400$ . A: 12 h 大量 Vv 附着处胃黏膜上皮脱落, 细胞溶解坏死; B: 32 h 胃黏膜损伤减轻, 上皮细胞部分仍有变性和坏死, Vv 减少; C: 72 h 极少量 Vv, 黏膜已基本正常; D: 黏膜深层及固有膜内可见大量恢复中性粒细胞浸润和血管扩张充血.

同, 例如霍乱弧菌<sup>[11]</sup>, 副溶血弧菌<sup>[12]</sup>等, 在经食管感染该菌后很少出现或者不出现消化道症状呢? 我们知道, Vv 为嗜盐性海生弧菌, 最适合其生长的盐度为 3–6%, 无盐或盐度超过 8% 均不能生长<sup>[13]</sup>, 且适合在碱性环境中生长. 而在本实验中, Vv 经过食管进入小鼠胃以后, 强酸低盐的胃环境并不适合 Vv 的生长, 甚至可以将其杀灭. 这一点可通过以下的结果来证明: (1) 在光镜下我们可以看到, 实验组小鼠胃黏膜表面附着有 Vv, 且大部分菌体肿胀变形, 而在胃组织黏膜层深部以下各层及细胞内均未查见 Vv, 说明进入小鼠胃内的 Vv 已丧失运动能力. 另外通过对胃黏膜表面的扫描电镜观察, 也同样看到呈圆球或橄榄球状肿胀变形的 Vv 菌体. 而对照组小鼠胃黏膜表面未见上述菌体. (2) 实验组小鼠胃及肠组织的 Vv 分离培养结果均为阴性. (3) 体外模拟小鼠胃环境处理 Vv 后, 光镜也可以观察到其肿胀, 变形, 并且将处理

后的 Vv 作增菌培养结果亦为阴性. 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, 尤其是丧失其运动活性, 并且不能生长繁殖, 因此 Vv 并不能像霍乱弧菌那样经食管感染小鼠后, 在肠道大量繁殖, 他在强酸性的胃环境中已大部分被杀灭, 因此, 也就没有 Vv 在肠道大量繁殖从而也不会引起相应的消化道症状. 在本实验中, 我们还看到 Vv 对其附着处的胃黏膜造成了损伤. 已有研究表明, Vv 产生的一系列酶及毒素是其重要的毒力因素, 例如弹性蛋白酶和胶原酶、溶细胞素以及卵磷脂酶等, 他们分别与感染局部组织的坏死、细胞的溶解以及细胞线粒体膜的溶解密切相关<sup>[14–19]</sup>. 而本实验中 Vv 附着处的胃黏膜损伤就表现为黏膜坏死脱落, 腺上皮解离, 细胞坏死溶解, 但是这些损伤表现为一过性和局限性, 随着时间的推移, 损伤减轻明显, 并且可完全恢复. 在本实验中, Vv 到达胃以

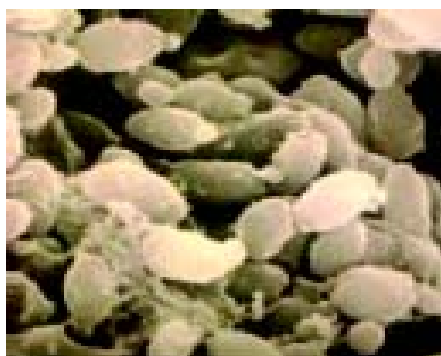


图2 胃黏膜表面附着 Vv 明显肿胀, 且肿胀程度不一. SEM  $\times 5000$ .

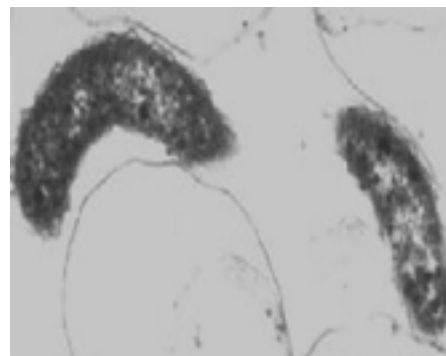


图3 正常 Vv 弯曲, 呈弧形, 菌体表面未见荚膜层 SEM  $\times 25000$ .

后,大部分会被强酸性的胃环境灭活,但灭活不是一瞬间就可以达到,而且到达胃的Vv有一定的数量,那么在这个过程中,没被灭活的Vv有可能在附着处释放以上毒素和酶,损伤局部胃黏膜.损伤因素并不是持续存在的,当大多数Vv被杀灭后,就没有上述的毒素和酶释放出来.并且本实验所使用的Vv菌株(编号1.1758),我们通过透射电镜观察发现其为无荚膜株,而无荚膜的创伤弧菌一般只具有较弱的致病性<sup>[16, 20]</sup>.因此,本实验中Vv对实验组小鼠胃黏膜的损伤就表现为上述的一过性和局限性.本实验结果证明,1.1758创伤弧菌株属消化道感染弱毒力致病株.此外,感染Vv后对机体的影响除了与Vv本身的毒力有关外,还与感染的菌量及机体的免疫力密切相关.免疫力低下尤其是慢性肝病患者是发生创伤弧菌食物中毒的高危人群<sup>[21-23]</sup>.本实验已证明1.1758Vv株经食管感染小鼠后可对小鼠胃黏膜造成轻度损伤,其损伤程度的进一步量化研究可应用超微病理学技术结合定量病理学技术来进行<sup>[24-25]</sup>.

#### 4 参考文献

- Johnson RW, Arnett FC. A fatal case of *Vibrio vulnificus* presenting as septic arthritis. *Arch Intern Med* 2001;161:2616-2618
- Sie MY, Ip-yam PC, Oon LL. *Vibrio vulnificus* septicemia. *Anaesth Intensive Care* 2002;30:77-81
- 施云程, 叶启明, 董庆元. 上海地区儿童弧菌性肠炎 50 例. 华人消化杂志 1998;6(特刊 7):334-335
- 徐景野, 朱荷仙, 叶智军, 吕贤善, 邱华士. 两种分离法在海产品致病性弧菌检验中的应用与比较. 中国卫生检验杂志 1995;5:280-281
- Bisharat N, Agmon V, Finkelstein R, Raz R, Ben-Dror G, Lerner L, Soboh S, Colodner R, Cameron DN, Wykstra DL, Swerdlow DL, Farmer JJ 3rd. Clinical, epidemiological, and microbiological features of *Vibrio vulnificus* biogroup 3 causing outbreaks of wound infection and bacteraemia in Israel. *Israel Vibrio Study Group Lancet* 1999;354:1421-1424
- Nakafusa J, Misago N, Miura Y, Kayaba M, Tanaka T, Narisawa Y. The importance of serum creatine phosphokinase level in the early diagnosis, and as a prognostic factor, of *Vibrio vulnificus* infection. *Br J Dermatol* 2001;145:280-284
- Sato T, Inatomi Y, Yonehara T, Fujioka S, Hashimoto Y, Hirano T, Uchino M. A patient with *Vibrio vulnificus* meningoen-
- cephalitis. *Rinsho Shinkeigaku* 2005;45:18-21
- 应斌宇, 孙来芳, 卢中秋, 周丽萍, 周志宏, 方周溪. 创伤弧菌原发性脓毒症的临床研究. 中华急诊医学杂志 2003;12:121-122
- 卢中秋, 周铁丽, 胡国新, 张秀华, 李秉熙, 赵初环, 陈寿权. 创伤弧菌的致病性及抗菌药物的治疗作用. 中华急诊医学杂志 2003;12:525-526
- Midturi J, Baker D, Winn R, Fader R. Tubo-ovarian abscess caused by *Vibrio vulnificus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005;51:131-133
- 张波, 周霞秋. 霍乱的早期症状及病原学特点 39 例. 新消化病学杂志 1996;4:342
- 秦恩强, 王凝芳, 赵敏, 叶文华. 副溶血弧菌肠炎 81 例临床特点分析. 中国新医药 2004;3:83-84
- 陈光远, 梁陶, 冯欣. 创伤弧菌的分离鉴定. 临床检验杂志 1994;12:194
- Hiady WG, Klontz KC. The epidemiology of *Vibrio* infections in florida, 1981-1993. *J Infect Dis* 1996;173:1176-1183
- Miyoshi SI, Narukawa H, Tomochika K, Shinoda S. Actions of *Vibrio vulnificus* metalloprotease on human plasma proteinase- proteinase inhibitor systems: a comparative study of native protease with its derivative modified by polyethylene glycol. *Microbial Immunol* 1995;39:959-966
- Hayat U, Reddy GP, Bush CA, Johnson JA, Wright AC, Morris JG Jr. Capsular types of *Vibrio vulnificus*: an analysis of strains from clinical and environmental sources. *J Infect Dis* 1993;168:758-762
- Lee SE, Ryu PY, Kim SY, Kim YR, Koh JT, Kim OJ, Chung SS, Choy HE, Rhee JH. Production of *Vibrio vulnificus* hemolysin in vivo and its pathogenic significance. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;324:86-91
- Lee JH, Rho JB, Park KJ, Kim CB, Han YS, Choi SH, Lee KH, Park SJ. Role of flagellum and motility in pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* 2004;72:4905-4910
- 吴斌, 卢中秋. 创伤弧菌感染的致病机制研究现状. 中国急救医学 2004;24:834-835
- Joseph LA, Wright AC. Expression of *Vibrio vulnificus* capsular polysaccharide inhibits biofilm formation. *J Bacteriol* 2004;186:889-893
- Vibrio vulnificus* infections associated with eating raw oysters- Los Angeles, 1996. *Morb Mortal Wkly Rep* 1996;45:621-624
- Izumikawa K, Hazama H, Izumikawa K, Hara K, Miyazaki Y, Kamihira S, Kohno S. A case of a sudden death from *Vibrio vulnificus* septicemia in a patient with liver cirrhosis. *Kansenshogaku Zasshi* 1999;73:1159-1162
- Stabellini N, Camerani A, Lambertini D, Rossi MR, Bettoli V, Virgili A, Gilli P. Fatal sepsis from *Vibrio vulnificus* in a hemodialyzed patient. *Nephron* 1998;78:221-224
- 吴正蓉, 申洪. 大肠肿瘤组织线粒体形态结构定量研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1372-1374
- 申洪, 沈忠英. 实用病理学技术. 第一版. 广州: 中山大学出版社, 1991:64-89

编辑 潘伯荣 审读 张海宁