

小鼠烫伤模型及其在中草药抗菌作用研究中的初步运用

刘林祥 宋红月 牛惠珍

(中国中医研究院中药研究所,北京)

摘要 小白鼠经烫伤后在烫伤部位皮下立即接种极少量绿脓杆菌可以导致动物有规律地死亡。烫伤面积约为小鼠体表面积 6%,接种量 $1-2 \times 10^4$ CFU。用胃膜素制成细菌悬液,接种量可以减少至 40—50 CFU。庆大霉素及氯霉素能有效地保护动物。多粘菌素及所试的十多种中草药及其粗提物均未能显示保护作用。

关键词 烫伤模型;中药体内作用

绿脓杆菌在医院环境中能够很好地存活,是医院继发感染的一个重要病原。烧伤感染,特别是对多种抗生素具抵抗力的绿脓杆菌的感染,常引起菌血症或脓毒血症,以至死亡。用各种方法烧伤小鼠,再在烧伤部位接种绿脓杆菌即可造成大多数动物死亡^[1,2]。这个方法可以应用于细菌毒力、免疫及药物作用等方面的研究。我们用操作简便的方法制成一个烧伤面积较小的小鼠烫伤模型,用少量绿脓杆菌感染可造成有规律地死亡。利用这一模型对一些中草药及部分粗提物的抗烧伤感染作用进行了研究。

材料及方法

(一) 动物

体重 14—16g 小白鼠,昆明种,不分雌雄。将动物背部的毛拔去,暴露面积约 2.5cm^2 。

(二) 细菌

绿脓杆菌(本室编号 215)系本室由东直门医院外科脓肿患者分离的菌株,形态及染色特性典型,能稳定地产生绿脓菌青素,曾在小鼠体内传二代以增强毒力。取平板培养基上分离的单个菌落一个接种于 2ml 普通营养肉汤中, 37°C 培养 7 小时,再取 0.1ml 7 小时培养物转种于 10ml 肉汤(置 25ml 三角瓶内)中,继续培养 17

小时。用平板计数法计算每 ml 培养物中活菌数 (CFU/ml)。用这种方法获得的细菌培养物菌龄及菌数均比较稳定,而且因为培养时间短,细菌代谢旺盛,培养液中毒素也比较少。

(三) 烫伤及感染

在铜质热滤漏斗中加满水,将它固定在铁架上。用酒精灯在漏斗上突出的加热柄底部加热使水沸腾,并在整个实验期间保持沸腾状态。将小鼠背部皮肤裸露部分紧贴漏斗壁烫 3.5 秒,然后立即于烫伤部位皮下接种 7—17 小时培养物 0.1ml。部分实验用 5% 胃膜素(北京市生物化学制药厂产品)悬液制备接种物。感染后逐日观察动物情况并记录死亡数。

(四) 药物制备及给药

大部分药物用水煎液,部分药物用加水蒸馏、水煎酒沉或酒精提取制成各种粗提物。灌胃给单味中药量按体表面积公式^[3]计算,每鼠每日约合成人用药一两。通过腹腔内、皮内等途径给药时,预先做小鼠急性毒性死亡试验,以小鼠最高耐受量为给药量。抗生素给药量(腹腔内、皮内、肌肉内等)亦按上述公式计算。一般每日给药二次。感染前三次,感染后三次,共六次。

结 果

(一) 烫伤时间与死亡率

为确定烫伤而不致死的条件，将不同大小的小鼠随机分成若干组，拔毛后每组在背部烫伤一定时间，观察 72 小时。从表 1 可以看出，不同年龄大小的动物对烫伤的耐受性差别不显著，但烫伤时间超过 5 秒即出现死亡。我们在以后的多次实验中进一步确定了烫 3.5 秒可以使 90% 以上的小鼠存活而同时对细菌感染的敏感性能大大提高。

表 1 烫伤时间与小鼠死亡率

烫伤时间 (s)	不同鼠龄组小鼠死亡率(%)		
	14—16g	16—18g	18—22g
3	0	0	0
5	40	16.6	0
7	30	50	33.3
9	60	83	66.6
11		83	50
15		100	
20		100	

(二) 烫伤及胃膜素对动物敏感性的影响

将动物背部的毛拔去后，随机分为 3 部分，每一部分又分为若干小组，每小组 6 只。第一部分不烫伤，用肉汤稀释的绿脓杆菌 7—17 小时培养物皮下接种，每只 0.1ml。然后将接种物用肉汤做 10 倍连续稀释成不同稀释度，每稀释度接种一组动物。第二部分烫伤 3.5 秒，烫伤后立即在烫伤部位感染，接种物及接种方法同第一部分。第三部分烫伤同第二部分，但接种物不用肉汤而用 5% 胃膜素悬液稀释。感染后逐日记录动物死亡数，共观察 7 天，分别计算各组的半数致死量 (LD₅₀)。表 2 为实验结果。烫伤后动物对绿脓杆菌的敏感性提高了二万多倍，而烫伤后再用胃膜素稀释的菌液接种又可以再提高 200 多倍，半数致死量下降到 10CFU 以下。无菌肉汤，胃膜素悬液，接种物的无菌滤

表 2 烫伤及胃膜素对小鼠敏感性的影响

动物	接种物中是否含胃膜素	LD ₅₀ (CFU)
正常	—	6.1×10 ⁷
烫伤	—	2.5×10 ³
烫伤	+	<10

液同样接种给正常或烫伤动物均不引起动物病变或死亡。

(三) 抗生素对烫伤后绿脓杆菌感染的保护作用

动物烫伤后，立即在烫伤部位皮下接种绿脓杆菌 7—17 小时培养物 (肉汤稀释)，每只 0.1ml，含菌 1.9×10⁴CFU(7.5LD₅₀)。感染后 1, 7, 24, 31 及 48 小时通过腹腔给予动物各种抗生素溶液 (多粘菌素 B 给药途径见表 3)，每只 0.5ml。抗生素均以生理盐水稀释。实验结果 (表 3) 表明庆大霉素及氯霉素均可在此动物模型上显示其保护作用，但多粘菌素 B 以多种途径给药的几次实验均未显示有效的保护作用。

(四) 不同菌种的烫伤感染

用同样的方法感染金黄色葡萄球菌及乙型溶血性链球菌，结果与绿脓杆菌者不同。烫伤后，皮下接种多至 2.2×10⁸CFU 的金黄色葡萄球菌只能引起 36% 的死亡。将此菌液继续稀释后再接种则不出现死亡。以胃膜素稀释的乙型链球菌的 7—17 小时培养物感染烫伤小鼠，其半数致死量比同样条件下绿脓杆菌的感染量要高一万多倍。

(五) 中草药对烫伤后绿脓杆菌感染的保护作用

我们研究了在平皿扩散试验中对绿脓杆菌 (215[#]) 显示较强抑制作用的药物 (中药研究资料, 1979 年第 2 期, 内部资料) 对体内感染的保护作用。已研究的药物有: 诃子、柳皮、升麻、儿茶、泽兰、侧柏叶、仙鹤草、金钱草、吴茱萸、芦荟、石苇、夏枯草、鸡血藤、石榴皮、连翘及苏木等 16 味中草药的水煎液; 山腊梅挥发油; 升麻、藜草、大青木叶等药的各种提取物。此外, 还研究了大青木叶及柳皮、大青木叶及氯霉素、大青木叶及庆大霉素的联合作用。水煎液给药多用灌胃, 有的同时还经腹腔内注射给药。提取物多用腹腔内及皮下途径。山腊梅油除其他途径外, 还用局部涂擦给药。给药次数一般为感染前后各三次, 或仅在感染前或感染后三至五次。每个药物或其提取物的试验都至少重复一次。

表 3 几种抗生素对烫伤感染小鼠的保护作用

抗生素(浓度)	小 鼠 死 亡		小 鼠 存 活	
	死亡数/试验动物数	X ² 测验	平均存活天数 (d)	t 测验
对照(生理盐水)	26/30		1.7	
氯霉素 (0.02mg/ml)	7/10		2.0	
(0.1mg/ml)	6/10		2.5	
(0.5mg/ml)	4/10	P<0.025	3.8	P<0.025
(2.5mg/ml)	3/10	P<0.001	4.4	P<0.005
庆大霉素 (400u/ml)	4/10	P<0.025	3.9	P<0.025
多粘菌素 B(600u/ml)				
腹腔内	6/6		1.3	
肌肉内	9/10		1.7	
皮下	6/10		2.8	

表 4 中草药水煎剂对烫伤感染小鼠的保护作用

药物	生药浓度 (g/ml)	给药途径*	死亡数/试验动物数
升麻	0.50	P. O.	8/10, 9/10, 8/10
	0.05	I. p.	9/10, 10/10, 10/10
	0.05	I. m.	10/10, 9/9, 10/10
	0.05	s. c.	10/10, 10/10, 10/10
泽兰	0.26—0.50	P. O.	7/8, 8/10, 11/11
	0.125	I. m.	10/10
	0.125	s. c.	10/10
	0.06	I. p.	10/10
苏木	0.50	P. O.	10/10, 8/10
	0.20	I. p.	10/10, 10/10
	0.20	I. m.	8/10, 10/10
	0.20	s. c.	9/10, 9/10
柳树皮	0.25—0.50	P. O.	8/8, 9/11, 8/8
	0.025	I. m.	8/8
诃子	0.12	P. O.	5/10
薏草	0.10	P. O.	8/10, 8/10
鲜柳枝	1.00	P. O.	7/10
	0.0125	I. p.	8/8, 10/10
侧柏叶	0.50	P. O.	7/8, 7/10
石苇	0.50	P. O.	9/10
夏枯草	0.50	P. O.	8/10
鸡血藤	0.50	P. O.	9/10
仙鹤草	0.50	P. O.	10/10
金钱草	0.50	P. O.	10/10
吴茱萸	0.50	P. O.	10/10
芦荟	0.50	P. O.	10/10
石榴皮	0.50	P. O.	9/10, 10/10
连翘	0.50	P. O.	9/10
对照(水)			累计 226/285

表 5 中草药粗提物对烫伤感染小鼠的保护作用

药物	生药浓度	给药途径	死亡数/实验动物数
山腊梅油	1.2%(v/v)	P. O.	6/10, 6/10
	0.16%(v/v)	I. p.	6/10, 13/16
	2%(v/v)	外涂	5/9, 7/8
升麻酒沉物	0.5g/ml (下同)	P. O.	7/10
	0.05	I. p.	10/10, 10/10, 16/16, 10/10
薏草酸酒液	0.01	P. O.	7/8
	0.05	I. p.	6/10, 8/10
薏草醚提液	0.02	I. p.	8/10
大青木叶醚提物	0.02	P. O.	7/7
	0.0013	I. m.	8/10
	0.005	I. p.	6/8, 10/10, 6/10
大青木叶醇提物	0.10	I. m.	10/10
	0.25—0.50	P. O.	10/10, 7/7, 6/7
	0.0125	I. p.	5/8
石榴皮醇提物	0.25	I. p.	10/10
对照(水)			累计 73/82

表 6 药物联合对烫伤感染小鼠的保护作用

药物	生药浓度 (g/ml)	给药途径	死亡数/实验鼠数
大青木叶+柳枝醇提物	0.50+1.00	P. O.	9/10
	0.125+0.125	P. O.	8/8
	0.0125+0.0125	I. p.	6/8
	0.00625+0.00625	I. p.	7/8
大青木醇提物+氯霉素	0.001+0.0001	I. p.	8/10, 9/10, 9/10
大青木醇提物+庆大霉素	0.001+400u	I. p.	6/10, 9/10, 9/10
对照(水)			累计 51/65

* P. O. (灌胃) I. P. (腹腔内) I. M. (肌肉内)
a. c. (皮下)

有的重复过五至六次。在所试过的中草药及其提取物中,或几种中西药物的联合试验中,都没有发现具显著保护作用的药物(表4、5、6)

讨 论

在绿脓杆菌感染的研究中,近年来多用烧伤的方法提高动物的敏感性。我们建成的实验模型也证明了这点:烧伤部位皮下感染的半数致死量可少于10个细菌。这与国外一些作者的结果一致,而烧伤面积在我们的实验中只有6%左右,比他们采用的30—35%要小^[1,4]。这样就减少了因烧伤致死的可能性,为了保护动物,有些作者^[4,5]在动物烧伤后立即补给占体重15%的生理盐水。我们用较小面积、较短时间烫伤的方法省去了这一步骤,从而也减少了实验影响因素。这个模型感染量小,动物剪感性高,特点与临床烧伤感染相近,而且,抗生素的实验证明有效药物能显示其保护作用。因此我们认为用这个模型来研究抗烧伤感染是合适

的。

根据文献和我们在其他研究中所得到的结果,在体外抑菌实验中抑菌作用强的抗生素,大部分可以在动物模型的体内研究中得到反映。在本研究中,在体外扩散法中表现较强抑菌作用的中草药及其提取物均不能有效地保护动物。造成抗生素与这些中草药在体内外表现差异的原因,我们已在另文中^[6]讨论过。我们还将继续研究这个问题。

参 考 文 献

- [1] Stieritz, D. D. and I. A. Holder: *J. Inf. Dis.* **131**: 688—691, 1975.
- [2] Bondi, A. et al.: *Abstr. Ann. Meeting, American Society for Microbiology*, p. 6, 1978.
- [3] Pinkel, D.: *Cancer Res.*, **18**:853, 1958.
- [4] Rosenthal, S. M. et al.: *Fed. Proc.*, **11**:387, 1952.
- [5] McRipley, R. J. and D. W. Garrison: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **115**:336—338, 1964.
- [6] 刘林祥,宋红月: *微生物学通报*, **10**: 168—171, 1983