

# 抗菌藥物實驗治療模型

## I. 小白鼠實驗感染綠膿桿菌的探討\*

鄭啓蔭 劉文富 黃 雄 閻桂華 林佛添 陳慧真 唐冀雪

(中國醫學科學院藥物研究所藥理室)

綠膿桿菌是創傷和燒傷創面感染的主要病原菌之一，本院輸血及血液學研究所報告19例燒傷患者發生敗血症，其中17例為綠膿桿菌所致。目前缺乏理想的抗綠膿桿菌藥物，多粘菌素的毒性又較大，急待尋找新藥以預防並控制綠膿桿菌的感染。本文的目的是建立合用的動物實驗感染模型，用以進行藥物篩選和實驗治療的研究，以便在了解實驗性敗血症的基礎上，尋找新的抗綠膿桿菌藥物。

### 一、材料和方法

綠膿桿菌是從臨床分離的，採用紙片冷凍真空干燥法保存。應用前將紙片種入肉湯培养基內，再轉種于肉湯瓊脂斜面培养基，培養18小時後應用，不在斜面培养基上传代，以免毒力改變。為了在感染動物時給予比較一致的菌量，在整個實驗過程中按下列方法製備菌液：從斜面培养基上刮下少許菌苔，種入1毫升肉湯培养基內，在37℃培養6小時後搖勻，取一白金耳菌液轉種于5毫升的肉湯培养基中，在37℃培養18小時後應用。以光电比色計（科偉581型，480 m $\mu$  濾光板）測定菌液的透光度，用平皿內稀釋培養法計算菌數。

實驗用18—22克健康小白鼠，均由本所動物房供給，飼養方面未作特殊處理。實驗用顆粒胃粘液素（美國 Armour 廠出品）加生理鹽水研成5%乳狀液，經15磅20分鐘滅菌後，貯存在冰箱中備用，曾給20只小白鼠腹腔注射各0.5毫升未見有何毒性，7日內仍健在。

Maclean & Dubos 氏<sup>[1]</sup>以體內各臟器菌量計數的方法，探討了葡萄球菌對小白鼠的毒力。本實驗在建立了適用於藥物過篩的實驗感染模型以後，又進一步探討了給小白鼠感染致死菌量後，各臟器內菌量的變化。方法是用5%胃粘液素菌懸液和生理鹽水菌懸液給小白鼠用100%致死量的綠膿桿菌靜脈或腹腔感染後，于不同時間（15分、30分、1、4、7、24、48及72小時）用無菌操作方法剪斷後肢取血，同時分別取出腦、肝、脾、肺、腎各臟器。以每5只小白鼠作為一組，取得的各臟器分別集中加無菌生理鹽水研磨成組織漿，經適當稀釋後，用培養法計算臟器內菌數。所得結果是代表5只小白鼠的混合數值，以其平均數表示每鼠該臟器內的菌數，比較各時間內同一臟器菌數的差異。

### 二、實驗結果

1. 培養條件和菌量的關係：控制感染量是實驗性感染所必需的一種條件，用上述方法

\* 本文1960年7月1日收到。

制备菌液，一般透光度在 16—23% 之間，每毫升含有  $1.45-2.78 \times 10^9$  个活菌。經适当稀释后，即可用于实验感染。

2. 胃粘液素对綠脓杆菌致病力的影响和半数致死菌量的測定：用靜脉注射(0.2 毫升/鼠)和腹腔注射(0.5 毫升/鼠)两种途径比較了 5% 胃粘液素和生理盐水稀释菌液用相同菌量感染小白鼠的死亡情况，借以了解 5% 胃粘液素对綠脓杆菌致病力的影响。經腹腔注射  $10^{-1}$  稀释的生理盐水菌液感染，能使全部小白鼠于 72 小时内死亡；注射胃粘液素菌液时，則  $10^{-3}$  稀释就获得了同样結果， $10^{-7}$  仍有少数动物死亡。因此认为，胃粘液素能显著地增強綠脓杆菌对小白鼠的致病力。

为了肯定感染所需菌量，了解所用菌株的毒力，測定了 5% 胃粘液素菌液对小白鼠的半数致死菌量（按 Reed & Muench 氏方法<sup>[2]</sup> 計算）（表 1）。实验治疗时，感染菌量通常是用  $LD_{50}$  的 100—1000 倍。在本实验条件下，这两种感染量都能使小白鼠在感染后 3—4 天内全部死亡。如果用  $LD_{50}$  的 10 倍菌量感染，小白鼠死亡 80—90%。

表 1 綠膿杆菌对小白鼠半数致死菌量的測定\*

| 途 径 | 菌液透光度 (%) | 菌数(个)/毫升           | 半 数 致 死 菌 量 |                     |
|-----|-----------|--------------------|-------------|---------------------|
|     |           |                    | 稀 释 度       | 活菌数(个)/鼠            |
| 腹 腔 | 15.5      | $2.25 \times 10^9$ | $10^{-4.9}$ | $1.416 \times 10^4$ |
|     | 12.5      | $3.34 \times 10^9$ | $10^{-5.5}$ | $0.528 \times 10^4$ |
| 靜 脉 | 33        | $1.84 \times 10^9$ | $10^{-2.4}$ | $1.465 \times 10^9$ |
|     | 14.5      | $3.67 \times 10^9$ | $10^{-3}$   | $0.734 \times 10^6$ |

\* 用 5% 胃粘液素稀释菌液

3. 腹腔感染有效对照藥物的寻找：按本实验常规培养方法制备菌液，以 5% 胃粘液素稀释菌液成  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$  两种浓度腹腔感染每鼠 0.5 毫升(相当  $LD_{50}$  的 1000 倍和 100 倍)，用不同藥物进行治疗。用于治疗的地霉素和鏈霉素曾用試管法測定了对本株綠脓杆菌的最低抑菌浓度：地霉素为 16 微克/毫升，鏈霉素为 8 微克/毫升。治疗实验的結果(表 2)說明鏈霉素腹腔注射的保护力最高，对于相当于 1000 倍  $LD_{50}$  菌量的腹腔感染，仍使 10 只小白鼠全部存活。鏈霉素皮下注射的疗效稍逊。在腹腔感染的情况下，皮下給药可以除去在腹腔内藥物和菌直接接触的可能。至于以地霉素所进行的实验，只限于口服，而且

表 2 小白鼠腹腔感染綠膿杆菌(5% 胃粘液素菌液)的治療实验

| 藥 物 | 途 径 | 剂 量      | 方 法                        | 感染菌量<br>( $LD_{50}$ 的倍数) | 七天存活<br>只 数 | 对 照 組，<br>存活只数 |
|-----|-----|----------|----------------------------|--------------------------|-------------|----------------|
| 地霉素 | 口服  | 10毫克/公斤  | 感染前 2 小时，感染后每<br>3 小时，总共三次 | 100                      | 1/10        | 0/10           |
|     | 口服  | ”        | ”                          | 10                       | 3/10        | 2/10           |
| 鏈霉素 | 腹腔  | 500 单位/鼠 | 感染后立刻一次                    | 1000                     | 10/10       | 0/10           |
|     | 腹腔  | ”        | ”                          | 100                      | 10/10       | 0/10           |
|     | 皮下  | ”        | ”                          | 1000                     | 3/10        | 0/10           |
|     | 皮下  | ”        | ”                          | 100                      | 9/10        | 0/10           |

次数不多,在此不做比较。

4. 經靜脉感染后,綠脓杆菌在小白鼠体内的分布情况:由靜脉感染(菌液  $10^{-1}$  稀释,注入 0.2 毫升)使形成急性菌血症。实验观察了感染后綠脓杆菌在小白鼠体内的分布和发病、死亡的关系(表 3、表 4)。

表 3 小白鼠靜脉感染綠膿杆菌生理盐水菌液后不同時間各种臟器內菌量的对数值

|     | 感 染 后 时 間 (小 时) |      |      |      |      |      |      |      |
|-----|-----------------|------|------|------|------|------|------|------|
|     | 15 分            | 30 分 | 1    | 5    | 8    | 24   | 48   | 72△  |
| 血液* | 5.15            | 4.67 | 3.70 | 3.12 | 4.19 | 4.24 | 2.30 | 2.12 |
| 脑   | —               | —    | 2.85 | 2.98 | 4.08 | 5.59 | 3.88 | 0    |
| 肺   | —               | —    | 4.46 | 4.10 | 5.53 | 5.89 | 5.37 | 3.11 |
| 肝   | —               | —    | 6.19 | 5.32 | 4.41 | 6.82 | 5.70 | 6.68 |
| 脾   | —               | —    | 6.05 | 4.94 | 4.39 | 3.0  | 3.78 | 0    |
| 肾   | —               | —    | 4.55 | 4.08 | 4.02 | 4.97 | 4.49 | 5.70 |

“0” 加生理盐水研磨后的組織漿用平皿培养計菌法未發現菌落。  
“—” 未測。  
\* 指每毫升血液內菌量。  
△ 72 小时,对照組死亡 2/5 只。

表 4 小白鼠靜脉感染綠膿杆菌后不同時間各种臟器內菌量的对数值  
(胃粘液素对菌分布的影响)

| 組 別       | 5%胃粘液素菌液感染組* |      |      |      |      | 生理盐水菌液感染組** |      |      |      |      |      |
|-----------|--------------|------|------|------|------|-------------|------|------|------|------|------|
| 感染后時間(小时) | 15 分         | 30 分 | 1    | 4    | 7    | 15 分        | 30 分 | 1    | 4    | 7    | 24   |
| 血 液       | 5.70         | 5.70 | 5.19 | 5.11 | 5.52 | 5.19        | 4.69 | 4.0  | 3.53 | 3.08 | 3.75 |
| 腦         | —            | —    | 4.47 | 4.35 | 5.57 | —           | —    | 3.33 | 3.42 | 3.98 | 7.06 |
| 肺         | —            | —    | 5.67 | 5.53 | 5.76 | —           | —    | 5.02 | 4.61 | 5.19 | 4.71 |
| 肝         | —            | —    | 7.48 | 7.26 | 6.48 | —           | —    | 5.85 | 5.56 | 4.74 | 6.16 |
| 脾         | —            | —    | 5.71 | 5.48 | 5.56 | —           | —    | 5.72 | 5.16 | 4.92 | 3.23 |
| 腎         | —            | —    | 5.53 | 5.56 | 5.89 | —           | —    | 4.71 | 4.45 | 5.28 | 7.07 |

\* 感染后 24 小时内死亡 19/20 只。      \*\* 感染后 24 小时内死亡 10/10 只。

从上面两表的数据說明:两次生理盐水菌液靜脉感染后,肝和腎內菌量于 24—72 小时内逐漸有明显的增加;感染后 15 分钟,血液內菌量最高,1 小时以后和肺內一样有不明显的波动,在 24 或 48 小时后有下降趋势;脾內菌量于 1 小时后逐漸下降,24 小时后显著下降;脑內菌量其中一次(表 4)于 24 小时内明显增加,另一次(表 3)則于 24 小时内增加而 72 小时内又复下降。以后又进行了一次脑內菌量改变的观察,結果是 12 小时内脑內菌量亦呈显著增加。肉眼检查肝、腎、脑中,均未发现脓瘍。

用 5%胃粘液素菌液感染的一組,同一条件下,可見各个脏器和血液內菌量都显著地維持在高水平。肝、腎、脑內菌量的变化和以生理盐水菌液感染的一組所得的結果(表 4)显然不同,由于小白鼠在 24 小时内几乎全部死亡,未能做更长时间的观察。

5. 經腹腔感染后,綠脓杆菌在小白鼠体内的分布情况:經腹腔感染(菌液  $10^{-3}$  稀释,注入 0.5 毫升)。实验观察了 5%胃粘液素对体内細菌分布的影响(表 5)。

結果說明:經腹腔感染也能使小白鼠产生敗血症。用 5%胃粘液素菌液感染,在同样

表 5 小白鼠腹腔感染綠膿桿菌后不同時間各種臟器內菌量的對數值  
(胃粘液素對菌分布的影響)

| 組 別   | 5%胃粘液素菌液感染組 |            |            |            |            | 生理鹽水菌液感染組  |            |            |            |            |
|-------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|       | 15 分        | 30 分       | 1          | 4          | 7          | 15 分       | 30 分       | 1          | 4          | 7          |
| 腹 腔 液 | 5.3<br>6.4  | 5.4<br>6.2 | 5.5<br>6.4 | 6.0<br>6.4 | 5.8<br>7.8 | 5.1<br>6.1 | 5.1<br>5.6 | 3.9<br>5.9 | 3.7<br>3.8 | 3.1<br>3.3 |
| 血 液   | —           | —          | 2.0<br>2.3 | 3.1<br>2.9 | 2.8<br>2.9 | —          | —          | 2.8<br>2.3 | 2.3<br>2.2 | 1.7<br>1.2 |
| 腦     | —           | —          | 0<br>0     | 1.7<br>1.9 | 0<br>0     | —          | —          | 0<br>0     | 2.2<br>0   | 0<br>1.1   |
| 肺     | —           | —          | 3.8<br>3.4 | 4.7<br>4.4 | ?<br>4.7   | —          | —          | 2.8<br>3.3 | 1.9<br>3.8 | 1.9<br>3.5 |
| 肝     | —           | —          | 3.9<br>3.9 | 6.0<br>5.7 | 6.7<br>6.2 | —          | —          | 3.4<br>3.5 | 3.0<br>3.7 | 1.4<br>3.4 |
| 脾     | —           | —          | 3.3<br>3.1 | ?<br>3.4   | ?<br>4.6   | —          | —          | 2.9<br>3.3 | 2.4<br>2.6 | 2.9<br>2.2 |
| 腎     | —           | —          | 4.5<br>4.2 | ?<br>4.3   | ?<br>4.8   | —          | —          | 3.2<br>1.9 | 2.1<br>2.2 | 2.0<br>1.1 |

“?” 結果未能算出。 “—” 未測定。

時間各臟器內菌量均比用生理鹽水菌液感染的高,並且肺、肝、腎、脾內菌量在感染后 7 小時內均呈上升趨勢,值得注意的是腹腔液中菌量呈極明顯的上升。在兩次實驗中用不同菌液感染,腦內菌量均無顯著升高甚至有時測不出來,這點和靜脈感染所得的結果不同。

三、討 論

為了對綠膿桿菌的感染有進一步的認識,以求在臨床控制感染,尋求適宜的動物病理模型就有特別重要意義。

文獻中曾報導,使小白鼠感染綠膿桿菌有不同方法。Canarile 氏等<sup>[3]</sup>用胃粘液素稀釋菌液經腹腔注射感染以研究葯物的合併療法。Hammond 氏等<sup>[4]</sup>用 X 光照射小白鼠后,口服感染獲得成功。Millican 氏等<sup>[5]</sup>用口服或注射 Cortisone 增加小白鼠對綠膿桿菌的感受性。文獻中曾記載胃粘液素可以增加腦膜炎球菌<sup>[6]</sup>、葡萄球菌、鏈球菌和肺炎雙球菌<sup>[7]</sup>對小白鼠的致病力,用不大的菌量就能使正常小白鼠感染。我們的實驗肯定了胃粘液素能增強綠膿桿菌對小白鼠的致病力,摸索了半數致死菌量作為感染量的根據;尋找了有效對照葯物,從而建立起適用於一定條件下的動物實驗治療的病理模型。

採用小白鼠為體內抗菌實驗的動物,既可節省葯物又能取得較大量的實驗數據。從已有的實驗結果可以認為本實驗方法能夠用於抗綠膿桿菌葯物的篩選。因為當以 100 倍和 1000 倍的 LD<sub>50</sub> 菌量感染時小白鼠全部死亡,以有效葯物治療則可見療效,但這個感染菌量可能太大,今後當進一步探討以便在篩選植物葯時如所含有有效成分不高也易見到療效。綠膿桿菌對多粘菌素最敏感,體外實驗 2 微克/毫升即可抑菌,但以此做為治療對照葯物則嫌價昂,不適合於過篩時做動物實驗,因此選擇了鏈黴素和地黴素作為有效對照葯物。至於這樣的實驗治療模型和臨床的感染是否相當,有待進一步觀察比較。

实验结果说明静脉感染 5% 胃粘液素菌液, 各脏器及血液内菌量在同时间内比用生理盐水菌液感染的要多得多。静脉感染致死量的生理盐水菌液后, 肝、肾和脑内在死亡前期菌量均有明显增加。所得三次脑内菌量的结果, 总的看来, 在 12—24 小时内菌量是上升的, 其中一次在 72 小时内菌量渐渐下降, 与其他两次结果并不矛盾, 可以认为可能由于感染量未足以使小白鼠死亡, 因而在 24—72 小时之间, 脑内菌量又复下降。

Gorrill 氏<sup>[9]</sup> 报导给小白鼠经静脉感染绿脓杆菌后也能产生肾脓肿, 并认为这是由于肾脏血管构造特点所致; 在实验性家兔绿脓杆菌败血症发现有神经症状及肝肾脓肿形成, 后者和我们上述肝、肾和脑内菌量上升可能是一致的。

腹腔感染 5% 胃粘液素菌液组, 可见腹腔液内及各脏器内菌量不断上升并维持在高水平。说明绿脓杆菌在腹腔液内继续繁殖, 有大量细菌从腹腔侵入血流形成败血症并转移到各脏器内。

研究感染后菌在体内的分布, 不但为筛选新药提出一个观察指标; 而且可以探讨动物恢复或死亡的原因, 借以分析药物的作用机制。

关于绿脓杆菌在体内的分布与有效药物疗效的关系等问题, 还在继续研究。

## 四、小 结

用 5% 胃粘液素做成菌液测定了一株临床分离的绿脓杆菌对小白鼠的毒力。以 100 倍和 1000 倍半数致死菌量做腹腔或静脉感染, 能使小白鼠获得全身性感染。这个动物实验模型可以用于抗绿脓杆菌药物的筛选。

比较了静脉和腹腔感染致死量绿脓杆菌(生理盐水菌液和 5% 胃粘液素菌液)后细菌在血液和脑、肺、肝、脾、肾各脏器内的分布情况。

实验说明胃粘液素能增强绿脓杆菌对小白鼠的致病力。

## 参 考 文 献

- [1] Maclean, S. J. & Dubos, R. J., *J. Exp. Med.*, **103**:87, 1956.
- [2] Reed, L. J. & Muench, H., *Am. J. Hyg.*, **27**:493, 1938.
- [3] Canarile, L. et al., *Antibiotic annual*, 1954, 210—218.
- [4] Hammond, C. W. et al., *J. Exp. Med.*, **102**(4):403, 1955.
- [5] Millican, R. C. et al., *Antibiotic annual*, 486, 1956—1957.
- [6] Miller, C. P. & Castle, R., *J. Inf. Dis.*, **58**:263, 1936.
- [7] Nungester, W. J. et al., *J. Inf. Dis.*, **59**:11, 1936.
- [8] Olitzki, L., *Bacteriol. Rev.*, **12**:149—172, 1948.
- [9] Gorrill, R. H., *J. Path. & Bact.*, **64**:857, 1952.

## EXPERIMENTAL INFECTIONS FOR ANTIBACTERIAL CHEMOTHERAPEUTIC STUDY

### I. INFECTION OF *PS. AERUGINOSA* IN MICE

KWANG, C. Y., LIU, W. F., WONG, H., YEN, K. H., LIN, F. T.,

CHEN, H. C. AND T'ANG, C. H.

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences)

The experimental results herein reported showed that mice infected with *Ps. aeruginosa* intraperitoneally or intravenously at an inoculum of 100 and 1000 LD<sub>50</sub> may be used for chemotherapeutic study of antibacterial drugs.

A difference in the number of bacteria present in the blood and in various organs was observed between the groups of mice infected with the bacteria suspended in normal saline and that infected with a bacterial suspension in 5% mucin. It appears that mucin enhanced the virulence of *Ps. aeruginosa* in mice.