

崔煦然,丁军颖,赵京霞,等. 左氧氟沙星耐药小鼠模型的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(6): 105 - 111.

Cui XR, Ding JY, Zhao JX, et al. Exploration of the method of establishing a mouse model of levofloxacin resistance by infection with *Pseudomonas aeruginosa* combined with low-dose levofloxacin administration [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(6): 105 - 111.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.06.017

左氧氟沙星耐药小鼠模型的建立

崔煦然^{1,2,3}, 丁军颖^{1,2,3}, 赵京霞^{1,2,3}, 郭玉红^{1,2,3}, 崔晓兰^{4*}, 刘清泉^{1,2,3*}

(1.首都医科大学附属北京中医医院,北京 100010;2.北京市中医研究所,北京 100010;
3.中医感染性疾病基础研究北京市重点实验室,北京 100010;4.中国中医科学院中药研究所,北京 100700)

【摘要】 目的 检测低浓度左氧氟沙星对铜绿假单胞菌(PA)感染小鼠肺炎模型的影响,探索左氧氟沙星耐药产生的方法。方法 采用PA感染小鼠致肺炎模型,各实验中小鼠按体重随机分组,以不同的菌液浓度、感染次数、给药方法,以小鼠体重变化规律、小鼠肺指数为评价指标,分析左氧氟沙星的治疗效果,探讨模型建立的可行性。结果 低浓度左氧氟沙星对PA(1×10^9 cfu/mL)单次感染小鼠,模型组1、模型组2肺指数与正常组比较均有显著性差异($P < 0.01$);左氧氟沙星组2与模型组2比较无显著性差异。低浓度左氧氟沙星对PA(1×10^{10} cfu/mL)单次感染小鼠,模型组1和模型组2与正常组比较,均有显著性差异($P < 0.01$)。左氧氟沙星组3与模型组2比较,结果无显著性差异。左氧氟沙星组1、2均能显著降低模型组肺指数;PA重复感染小鼠实验中,模型组1和模型组2与正常组比较,均有显著性差异($P < 0.01$)。左氧氟沙星组2与模型组2比较,无显著性差异。各实验中,小鼠感染后第二天,体重较正常组降低,结果无显著性差异。结论 实验条件下,低浓度左氧氟沙星对PA(1×10^{10} cfu/mL)单次感染小鼠、低浓度左氧氟沙星对PA重复感染小鼠中,动物模型可在一定程度上模拟临床中耐药产生的现象。

【关键词】 铜绿假单胞菌;动物模型;耐药性;肺炎;左氧氟沙星

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019)06-0105-07

Exploration of the method of establishing a mouse model of levofloxacin resistance by infection with *Pseudomonas aeruginosa* combined with low-dose levofloxacin administration

CUI Xuran^{1,2,3}, DING Junying^{1,2,3}, ZHAO Jingxia^{1,2,3}, GUO Yuhong^{1,2,3}, CUI Xiaolan^{4*}, LIU Qingquan^{1,2,3*}

(1. Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100010, China.
2. Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100010. 3. Basic Research of Infectious Diseases of TCM in Beijing Key Laboratory, Beijing 100010. 4. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700)

【Abstract】 Objective To explore the method of establishing a mouse model of levofloxacin resistance by infection with *Pseudomonas aeruginosa* (PA) in combination with a low-dose levofloxacin administration. **Methods** The model of pneumonia was induced by infecting mice with a PA standard strain. Different concentrations of bacterial suspension, times

【基金项目】 国家科技重大专项课题(2013ZX09102026);北京市医院管理局重点医学专业发展计划专项(ZYLX201611);国家自然科学基金(81673934)。

【作者简介】 崔煦然(1988—)女,研究实习员,研究方向:中医感染性疾病基础研究。E-mail: cxrsunflower@126.com

【通信作者】 刘清泉(1965—)男,教授,博士生导师。E-mail: liuqingquan2003@126.com。

崔晓兰(1961—)女,研究员,博士生导师。E-mail: cuixiaolan2812@126.com。*共同通信作者

of infection and levofloxacin administration method were analyzed. The therapeutic effect of levofloxacin was analyzed and the feasibility of establishing the model was determined by measuring body weight changes and lung index of the mice.

Results There were significant differences in lung indexes between the model groups 1 and 2 and normal group ($P < 0.01$), and there was no significant difference between levofloxacin group 2 and model group 2 after single infection of PA (1×10^9 cfu/mL) in mice treated with low-dose levofloxacin. In the experiment of single infection of PA (1×10^{10} cfu/mL) plus low-dose levofloxacin, there were significant differences between the model groups 1 and 2 and the normal group ($P < 0.01$), and there was no significant difference between levofloxacin group 3 and model group 2. Levofloxacin groups 1 and 2 significantly reduced the lung index in model group. In the experiment of repeated infection of PA in mice, there were significant differences between model groups 1 and 2 and normal group ($P < 0.01$). There was no significant difference between the levofloxacin group 2 and model group 2. In each experiment, the body weight of mice in the experimental groups was lower than that of the normal group on the second day after infection, although this was not significantly different. **Conclusions** Under the experimental conditions used in our study, this animal model can simulate the phenomenon of drug resistance to a certain extent generated by PA (1×10^{10} cfu/ml) single infection and PA repetitive infection combined with administration of a low-dose levofloxacin.

【Keywords】 *Pseudomonas aeruginosa*; animal model; drug resistance; pneumonia; levofloxacin; mouse

细菌性肺炎是常见的重症肺炎。铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)是引起医院获得性肺炎和呼吸机相关肺炎最多见的革兰阴性杆菌之一^[1],常见发生于患有多种基础疾病或免疫力低下的患者^[2-3]。PA 耐药性强,耐药谱广,对多种抗菌药物表现为天然或获得性耐药^[4]。1979 年, Cash 等^[5]以气管切开注射的方式构建了 PA 致小鼠肺部感染的模型;1994 年,童明庆等^[6]采用肺炎克雷伯菌攻击小鼠肺脏造成肺部感染,从而成功地建立了小鼠实验性支气管肺炎模型;2009 年李建生等^[7]采用细菌滴注和凤热刺激结合模型的方法建立了肺炎克雷伯杆菌肺炎痰热证模型。这些模型的制备充分证实了细菌性肺炎模型的可行性。为了探索 PA 体内耐药性产生的变化和治疗方法,需要建立一种实验模型来进行深入研究。因此,本实验拟通过体内实验,结合重症肺炎诊断标准进行左氧氟沙星耐药研究。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 ICR 小鼠 96 只,雌雄各半,体重为 (14 ± 1) g,购自北京维通利华试验动物技术有限公司, [SCXK(京)2012-0001]。实验在中国医学科学院中药研究所生物安全实验室 [SYXK(京)2013-0035] 进行,实验操作经过北京市中医研究所动物伦理委员会审批,审批编号:2015010201,并按照实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。

1.1.2 细菌株

PA 标准株 27853,购自 ATCC,实验室传代 1 次后, -80°C 冰箱保存。

1.2 主要试剂与仪器

左氧氟沙星片:第一三共制药(北京)有限公司,生产批号:BNO11A1;氯化钠注射液:石家庄四药有限公司产品,批号 1402261909;MH 肉汤:Oxoid 公司,批号 1583507;乙醚为普通市售分析纯。

生物安全柜:购自 Thermo 公司,型号 ThermoMSC1.8/1.2;电子天平(称肺重):购自梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司,型号 AL204;电子天平(称体重):购自上海越平科学仪器有限公司,型号 YP1002;恒温振荡培养箱:购自哈尔滨市东联电子技术开发有限公司,型号 HZQ-F160;超低温冰箱:购自 Thermo 公司,型号 ULT Freezer。

1.3 实验方法

1.3.1 剂量设计

(一)左氧氟沙星:人临床用量为 $0.3 \text{ g}/60 (\text{kg} \cdot \text{d})$,试验时小鼠的等效剂量为 $0.055 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 。试验中低剂量标准认为未达到临床左氧氟沙星使用剂量。本次试验采用五个剂量,即 0.0275 、 0.037 、 0.055 、 0.073 、 $0.092 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,分别为临床剂量的 0.5 、 0.67 、 1 、 1.33 、 1.67 倍, 0.0275 、 $0.037 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 即为低剂量。药物试验时,小鼠按 $0.2 \text{ mL}/10 \text{ g}$ 体重灌胃给药。

(二)PA 菌液:取一定量的菌液,加入 MH 营养肉汤中, 37°C 恒温振荡培养 24 h。试验时,采用比浊法调整菌液至试验浓度。

1.3.2 低浓度左氧氟沙星对 PA (1×10^9 cfu/mL) 单次感染小鼠肺炎模型的作用^[8]

取 ICR 小鼠 30 只,雌雄各半,按体重等级随机分为正常组、模型组 1、左氧氟沙星临床治疗剂量组(左氧氟沙星组 1)、低浓度左氧氟沙星刺激 3 d 组(模型组 2)、低浓度左氧氟沙星刺激后治疗组(左氧氟沙星组 2),每组 6 只。各组动物麻醉后,以 1×10^9 cfu/mL 浓度的菌液滴鼻感染,每只 50 μ L。感染后 1 h,各给药组按 0.2 mL/10 g 灌胃给药,每天 1 次,连续 6 d,模型对照组在同等条件下蒸馏水灌胃。各组小鼠每天称重 1 次(感染当天记为第 1 天),并观察小鼠状态,于第 7 天称重后,将小鼠断颈处死,取肺部,记录肺重。

1.3.3 低浓度左氧氟沙星对 PA(1×10^{10} cfu/mL) 单次感染小鼠肺炎模型的作用^[8]

取 ICR 小鼠 36 只,雌雄各半,按体重等级随机分为正常组、模型组 1、左氧氟沙星临床治疗剂量组 1(左氧氟沙星组 1)、左氧氟沙星临床治疗剂量组 2(左氧氟沙星组 2)、低浓度左氧氟沙星刺激 3 d 组(模型组 2)、低浓度左氧氟沙星刺激后治疗组(左氧氟沙星组 3),每组 6 只。各组动物用乙醚轻度麻醉,以 1×10^{10} cfu/mL 浓度的菌液滴鼻感染,每只 50 μ L。感染后 1 h,各给药组按 0.2 mL/10 g 灌胃给药,每天 1 次,连续 6 d,模型对照组在同等条件下蒸馏水灌胃。各组小鼠每天称重 1 次(感染当天记为第 1 天),并观察小鼠状态,于第 7 天称重后,将小鼠断颈处死,取肺部,记录肺重。

1.3.4 低浓度左氧氟沙星对 PA 重复感染小鼠肺炎模型的作用^[8]

取 ICR 小鼠 30 只,雌雄各半,按体重等级随机分为正常组、模型组 1、左氧氟沙星临床治疗剂量组(左氧氟沙星组 1)、低浓度左氧氟沙星刺激 3 d 组(模型组 2)、低浓度左氧氟沙星刺激后治疗组(左氧氟沙星组 2),每组 6 只。各组动物用乙醚轻度麻醉,以 1×10^9 cfu/mL 浓度的菌液滴鼻感染,每只 50 μ L。感染后 1 h,各给药组按 0.2 mL/10 g 灌胃给药,每天 1 次,连续 3 d,模型对照组在同等条件下蒸馏水灌胃。于第 4 天,各组动物再次用乙醚轻度麻醉,以 1×10^9 cfu/mL 浓度的菌液滴鼻感染,每只 50 μ L。感染后 1 h,各给药组按 0.2 mL/10 g 灌胃给药,每天 1 次,连续 3 d,模型对照组在同等条件下蒸馏水灌胃。各组小鼠每天称重 1 次(感染当天记为第 1 天),并观察小鼠状态,于第 7 天称重后,将小鼠断颈处死,取肺部,记录肺重。

1.3.5 诊断标准^[9]

参照文献中大鼠细菌性肺炎模型诊断标准,本次试验小鼠肺炎模型的判定标准确定为

(1) 出现行动缓慢、毛色暗淡、摄食饮水量减少等;(2) 肺组织增重;(3) 诱导 \rightarrow 给药组,肺组织增重即视为耐药性产生。

1.4 统计学方法

实验结果采用平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验法,实验结果以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 低浓度左氧氟沙星对 PA(1×10^9 cfu/mL) 单次感染小鼠肺炎模型的作用

2.1.1 状态观察

各组小鼠感染前一般状态正常。第 2 天,模型组 1、模型组 2、左氧氟沙星组 2 小鼠表现出蜷缩聚集、行动缓慢、毛色暗淡、部分小鼠眼眶可见分泌物,摄食摄水量减少;左氧氟沙星组 1 小鼠毛色暗淡、行动缓慢、摄食摄水量减少。第 3 天,模型组 1、模型组 2、左氧氟沙星组 2 小鼠毛色暗淡、行动缓慢、聚集现象不明显,摄食摄水量增加;左氧氟沙星组 1 小鼠毛色暗淡、摄食摄水量增加。第 4~7 天各组小鼠逐渐恢复,一般状态与正常组小鼠相似。正常组小鼠在实验过程中一般状态无明显变化。

2.1.2 体重观察

在试验周期内,正常组小鼠体重每天均有增长;各感染组小鼠体重呈现“V”型趋势,体重值与正常组比较无显著性差异;于第 3 天,各感染组小鼠体重逐渐增长,增长趋势基本一致;至第 7 天,感染组小鼠体重值基本达到正常小鼠体重水平。结果如图 1 所示。

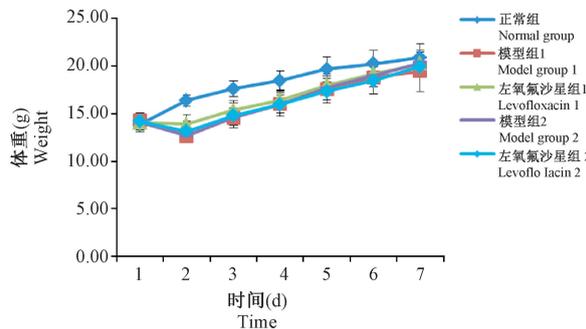


图 1 低浓度左氧氟沙星对 PA(1×10^9 cfu/mL) 单次感染小鼠体重变化

Figure 1 Weight changes in the single PA infection mice (1×10^9 cfu/mL) plus a low-dose levofloxacin

表 1 低浓度左氧氟沙星对 PA(1×10^9 cfu/mL) 单次感染小鼠肺炎模型的作用Table 1 Effect of a low-dose levofloxacin and single PA infection on the mice with pneumonia (1×10^9 cfu/mL)

组别 Groups	左氧氟沙星刺激剂量(g/(kg·d)) Dose of levofloxacin	左氧氟沙星刺激 3 天 Levofloxacin stimulation for 3 days	左氧氟沙星治疗剂量(g/(kg·d)) Therapeutic dose of levofloxacin	肺指数 Lung index
正常组 Normal group	—	—	—	0.67±0.04
模型组 1 Model group 1	—	—	—	0.82±0.06 ^{##}
左氧氟沙星组 1 Levofloxacin group 1	0.055	左氧氟沙星 Levofloxacin	0.055	0.74±0.08
模型组 2 Model group 2	0.0275	—	—	0.80±0.04 ^{##}
左氧氟沙星组 2 Levofloxacin group 2	0.0275	左氧氟沙星 Levofloxacin	0.055	0.89±0.12

注:与正常组比较,^{##} $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the normal group,^{##} $P < 0.01$.

2.1.3 肺指数检测

各感染组小鼠肺指数均有不同程度的增高,其中模型组 1、模型组 2 肺指数与正常组比较,均有显著性差异($P < 0.01$);左氧氟沙星组 1 肺指数与各组比较,均无显著性差异;左氧氟沙星组 2 与模型组 2 比较,结果无显著性差异。结果如表 1 所示。

2.2 低浓度左氧氟沙星对 PA (1×10^{10} cfu/mL) 单次感染小鼠肺炎模型的作用

2.2.1 状态观察

各组小鼠感染前一般状态正常。第 2 天,感染组小鼠皆表现出蜷缩聚集、行动缓慢、毛色暗淡、部分小鼠眼眶可见分泌物,摄食摄水量减少。第 3 天,感染各组小鼠毛色暗淡、行动缓慢、摄食摄水量不明显;左氧氟沙星组 2 小鼠毛色暗淡、摄食摄水量增加。第 4~7 天各组小鼠逐渐恢复,左氧氟沙星组 1、2 小鼠恢复迅速,至第 7 天,一般状态与正常组小鼠相似。正常组小鼠在实验过程中一般状态无明显变化。

2.2.2 体重观察

图 2 结果显示:在试验周期内,正常组小鼠体重每天均有增长;各感染组小鼠体重呈现先下降后增长的趋势:于第二天体重明显下降(或者增长缓慢),体重值与正常组比较无显著性差异;于第三天,各感染组小鼠体重逐渐增长,增长速度各不相同,其中左氧氟沙星 2 组小鼠体重增长速度相对较快;至第七天,左氧氟沙星组 1、2 小鼠体重值基本达到正常小鼠体重水平。

2.2.3 肺指数检测

表 2 结果显示:各感染组小鼠肺指数均有不同程度的增高;模型组 1 和模型组 2 与正常组比较,结果均有显著性差异($P < 0.01$)。左氧氟沙星组 1、2

肺指数结果与模型组比较,均有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$);左氧氟沙星组 3 与模型组 2 比较,结果无显著性差异。

2.3 低浓度左氧氟沙星对 PA 重复感染小鼠肺炎模型的作用

2.3.1 状态观察

实验第 1~4 天,各组小鼠一般状态表现与实验低浓度左氧氟沙星对 PA (1×10^9 cfu/mL) 单次感染中小鼠第 1~4 天表现相似。第 5 天各感染组小鼠摄食摄水量减少、行动缓慢、毛色暗淡,但较第一次感染后状态相对较好。第 6~7 天,感染组小鼠一般状态迅速恢复,与正常组小鼠相似。正常组小鼠在实验过程中一般状态无明显变化。

2.3.2 体重观察

图 1 结果显示:正常组小鼠体重在试验周期内,每天均有增长;各感染组中,左氧氟沙星组 1 小鼠体重较正常组比较,增长趋势相似;其他各组小鼠体重整体均呈现“W”型增长趋势:第一次感染后,于第二天体重均有下降,于第三天,各组小鼠体重逐渐增长,结果与正常组比较均无显著性差异。各组小鼠第二次感染后,左氧氟沙星组 1 小鼠体重较正常组比较,呈现增长趋势;其余各组小鼠,体重均有所下降。于第六天,各组小鼠体重逐渐增长,结果与正常组比较均无显著性差异。

2.3.3 肺指数检测

表 5 结果显示,各感染组小鼠肺指数均有增高;模型组 1 和模型组 2 与正常组比较,均有显著性差异($P < 0.01$)。左氧氟沙星组 1 与模型组 1 比较,结果有显著性差异($P < 0.01$);左氧氟沙星组 2 与模型组 2 比较,结果无显著性差异。

表 2 低浓度左氧氟沙星对 PA(1×10^{10} cfu/mL) 单次感染小鼠肺炎模型的作用
Table 2 Effect of a low-dose of levofloxacin on the mice after single PA infection (1×10^{10} cfu/mL)

组别 Groups	左氧氟沙星刺激剂量(g/(kg·d)) Stimulation dose of levofloxacin	左氧氟沙星刺激 3 天 Levofloxacin stimulation for 3 days	左氧氟沙星治疗剂量(g/(kg·d)) Therapeutic dose of levofloxacin	肺指数 Lung index
正常组 Normal group	—	—	—	0.68±0.05
模型组 1 Model group 1	—	—	—	1.0±0.11 ^{##}
左氧氟沙星组 1 Levofloxacin group 1	—	左氧氟沙星 Levofloxacin	0.073	0.80±0.1 [*]
左氧氟沙星组 2 Levofloxacin group 2	—	左氧氟沙星 Levofloxacin	0.092	0.72±0.06 ^{**}
模型组 2 Model group 2	0.037	—	—	1.04±0.22 ^{##}
左氧氟沙星组 3 Levofloxacin group 3	0.037	左氧氟沙星 Levofloxacin	0.073	1.07±0.13

注:与正常组比较,^{##} $P < 0.01$ 。与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the normal group,^{##} $P < 0.01$. Compared with the model group,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$.

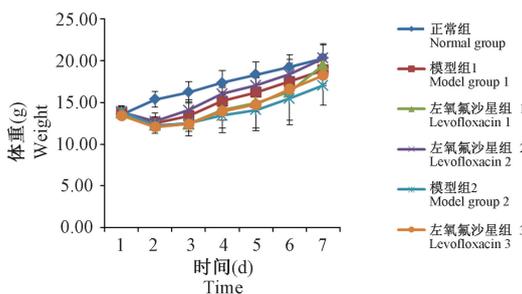


图 2 低浓度左氧氟沙星对 PA(1×10^{10} cfu/mL) 单次感染小鼠体重变化

Figure 2 Effect of a low-dose of levofloxacin on weight changes in mice with single PA infection (1×10^{10} cfu/mL)

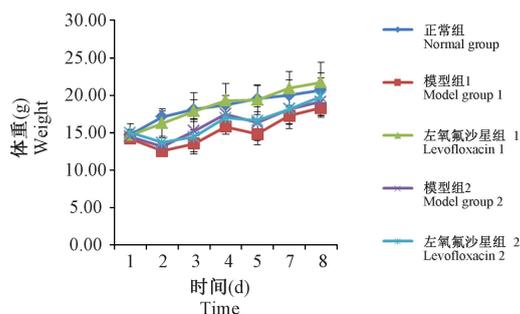


图 3 低浓度左氧氟沙星对 PA 重复感染小鼠体重变化

Figure 3 Effect of a low-dose of levofloxacin on weight changes in mice with repeated PA infection

表 3 低浓度左氧氟沙星对 PA 重复感染小鼠肺炎模型的作用

Table 3 Effect of a low-dose of levofloxacin on the mice with pneumonia receiving repeated PA infection

组别 Groups	左氧氟沙星刺激剂量(g/(kg·d)) Stimulation dose of levofloxacin	左氧氟沙星刺激 3 天 Levofloxacin stimulation for 3 days	左氧氟沙星治疗剂量(g/(kg·d)) Therapeutic dose of levofloxacin	肺指数 Lung index
正常组 Normal group	—	—	—	0.56±0.04
模型组 1 Model group 1	—	—	—	1.04±0.11 ^{##}
左氧氟沙星组 1 Levofloxacin group 1	0.092	左氧氟沙星 Levofloxacin	0.092	0.80±0.11 ^{**}
模型组 2 Model group 2	0.037	—	—	1.02±0.19 ^{##}
左氧氟沙星组 2 Levofloxacin group 2	0.037	左氧氟沙星 Levofloxacin	0.092	0.96±0.12

注:与正常对照组比较,^{##} $P < 0.01$ 。与模型组比较,^{**} $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the normal group,^{##} $P < 0.01$. Compared with the model group,^{**} $P < 0.01$.

3 讨论

铜绿假单胞菌(PA)是医院感染的重要条件致病菌^[10-11],尤其易发生 ICU 病房和老年人肺部感染^[12],而对该菌的致病性和耐药性的研究,理想的动物模型是研究基础。PA 属于致病力低而抗药性较强的一种杆菌^[13],可从淡水和土壤中分离^[4],广泛分布于肠道、皮肤及呼吸道^[14-15]。近些年,PA 肺

炎发病率呈不断升高趋势^[16]。左氧氟沙星是一种临床广泛应用的氟喹诺酮类药物^[17],对 PA 具有良好的抗菌活性。部分监测数据表明,PA 对氟喹诺酮类药物的耐药性现状仍需重视^[18]。左氧氟沙星为氟喹诺酮类药物之一^[19],具有口服生物利用度高、半衰期长、不良反应小等特点,主要通过抑制细菌的 DNA 旋转酶发挥抗菌作用^[20]。左氧氟沙星对多数肠杆菌科细菌,有较强的抗菌活性^[21]。但随着

细菌耐药现象的加剧,耐左氧氟沙星 PA 也成为临床常见菌株^[22]。同时,结合文献检索结果,细菌感染模型的构建,体外多涉及抗生素刺激诱导细菌耐药性产生、耐药基因表达变化等^[23-24];体内感染研究多涉及到囊性纤维化模型、烧伤模型等^[25]。因此,本次试验旨在探讨左氧氟沙星诱导致 PA 感染小鼠肺炎耐药模型的建立方法。

小鼠对多种病原体具有易感性,常用来研究微生物及寄生虫对机体的感染途径、发病机制及综合防治。实验中以小鼠肺炎模型为基础^[8],通过不同的给药方法、不同感染次数,模拟不合理用抗生素而致药效降低甚至无效的临床问题。通过组间对照比较分析,以体重和肺指数为评价指标,旨在探讨一种简单而可行的实验方法,实验共涉及三部分:①低浓度左氧氟沙星对 PA (1×10^9 cfu/mL) 单次感染小鼠肺炎模型的作用中,结果可推测出 PA 感染可致小鼠肺部感染;同时左氧氟沙星组 2 与模型组 2 比较结果无显著性差异,提示低剂量左氧氟沙星干预,对于该模型小鼠的有效治疗产生了影响;结合左氧氟沙星组 1 小鼠肺指数与各组比较均无显著性差异,猜测该条件下 PA 感染的浓度稍低,或者在该实验条件下左氧氟沙星的治疗剂量稍低。②在上述实验结果的基础上,增高 PA 感染菌液的浓度,并适当提高左氧氟沙星的治疗剂量进行实验。低浓度左氧氟沙星对 PA (1×10^{10} cfu/mL) 单次感染小鼠肺炎模型的作用中,结果显示该条件下 PA 感染小鼠成功;左氧氟沙星组 1、2 均能显著性降低模型组肺指数,表明该方法下左氧氟沙星产生了有效治疗作用;结合左氧氟沙星组 3 与模型组 2 比较结果无显著性差异,提示低剂量左氧氟沙星干预,对于该模型小鼠的有效治疗产生了影响。进而推测低浓度左氧氟沙星可致 PA 感染小鼠肺炎模型对左氧氟沙星耐药性产生。③进一步优化实验方法,以低浓度菌液重复感染小鼠,结果显示:该条件下 PA 感染小鼠成功。左氧氟沙星组对模型小鼠产生了有效治疗作用;而左氧氟沙星组 2 结果提示低剂量左氧氟沙星干预,对于该模型小鼠的有效治疗产生了影响。该实验提示,低浓度左氧氟沙星可致 PA 感染小鼠肺炎模型对左氧氟沙星耐药性产生。此外,各试验中小鼠体重监测结果中各组小鼠感染 PA 后,第二天体重较正常组比较虽无显著性差异,但均有下降趋势,表明 PA 肺炎模型小鼠感染成功可以参考体重数据。

综合以上信息分析,小鼠滴鼻感染致细菌肺炎模型操作简单,在此条件下通过左氧氟沙星不同给药量和给药方式的作用,实验低浓度左氧氟沙星对 PA (1×10^{10} cfu/mL) 单次感染小鼠、低浓度左氧氟沙星对 PA 重复感染小鼠中,动物模型可在一定程度上模拟临床中耐药产生的现象。但本次实验中评价指标相对单一,后续试验中应注重实验动物生理病理状态,以及相关机制的研究。

参考文献:

- [1] Bielen K, Jongers B, Malhotra-Kumar S, et al. Animal models of hospital-acquired pneumonia: current practices and future perspectives [J]. *Ann Transl Med*, 2017;5(6):132.
- [2] Yayan J, Ghebremedhin B, Rasche K. Antibiotic resistance of pseudomonas aeruginosa in pneumonia at a single university hospital center in Germany over a 10-year period [J]. *PLoS One*, 2015;10(10):e0139836.
- [3] 刘国星.铜绿假单胞菌肺炎证候特点及扶正解毒化痰方对MDRPA 体外抑菌实验研究[D]. 北京:北京中医药大学,2018.
- [4] Lavoie EG, Wangli T, Kazmierczak BI. Innate immune responses to Pseudomonas aeruginosa infection [J]. *Microbes Infect*, 2011;13(14-15):1133-1145.
- [5] Cash HA, Woods DE, Mc Cullough B, et al. A rat model of chronic respiratory infection with Pseudomonas aeruginosa [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1979,119(3):453-459.
- [6] 童明庆,戴传彪,赵旺胜,等.小鼠细菌性支气管炎模型的建立[J].*南京医学院学报*,1994,38(1):1-4.
- [7] 李建生,张艳霞,周红艳等.细菌性肺炎痰热证模型的建立与评价[J].*中医杂志*,2009,50(9):822-825.
- [8] Takashima K, Tateda K, Matsumoto T, et al. Establishment of a model of penicillin-resistant Streptococcus pneumoniae pneumonia in healthy CBA/J mice [J]. *J Med Microbiol*, 1996,45(5):319-322.
- [9] 丁军颖,高翔,洪燕英,等.不同感染途径致大鼠肺炎模型制备的比较[J].*中国实验动物学报*,2017,25(6):600-604.
- [10] 巫俊琴,程曦.2014-2016 年某院铜绿假单胞菌耐药性监测[J].*中国微生物学杂志*,2017,29(11):1285-1288.
- [11] 辛大平,彭彬,虞田,等.帕珠沙星与左氧氟沙星治疗院内铜绿假单胞菌肺炎的临床研究[J].*湖南中医药大学学报*, 2012,32(12):26,28.
- [12] 侯芳,吕媛.不容忽视的细菌耐药[J].*中国抗生素杂志*, 2017,42(03):203-206.
- [13] Moradali MF, Ghods S, Rehm BH. Pseudomonas aeruginosa lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017;7:39.
- [14] 左虹.铜绿假单胞菌医院感染现状及耐药性分析[J].*检验医学与临床*,2013,10(2):159-160.
- [15] 李绪定.碳青霉烯类治疗铜绿假单胞菌肺炎的临床效果分析[J].*医学信息*,2018,31(13):134-136.

- [16] 魏建新,杨青.多重耐药铜绿假单胞菌不同药物治疗疗效的比较[J].中国现代药物应用,2015,9(18):118-119.
- [17] 李浩.左氧氟沙星联合头孢哌酮舒巴坦对老年肺炎临床疗效[J].北方药学,2018,15(09):108-109.
- [18] 王良.2012-2016 年某院铜绿假单胞菌感染情况及耐药性分析[J].中国医院统计,2017,24(3):228-231.
- [19] Segatore B, Setacci D, Perilli M, et al. Italian survey on comparative levofloxacin susceptibility in 334 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999;43(2):428-431.
- [20] 菅凌燕,何晓静,于莹.黄芩苷联合左氧氟沙星对铜绿假单胞菌生物膜的影响及相关机制[J].中国医院药学杂志,2012,32(14):1097-1100.
- [21] Stockmann C, Sherwin CM, Ampofo K, et al. Development of levofloxacin inhalation solution to treat *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis [J]. *Ther Adv Respir Dis*, 2014;8(1):13-21.
- [22] 陈建安,周静,张丽华,等.2006 至 2010 年铜绿假单胞菌分布及耐药性分析[J].实验与检验医学,2011,29(5):539-540+542.
- [23] 高雅婷.环丙沙星体外诱导对铜绿假单胞菌 QS 基因调控影响的研究[D].太原:山西医科大学,2018.
- [24] 张智琪.氟喹诺酮类药物诱导铜绿假单胞菌生物膜及耐药机制研究[D].太原:山西医科大学,2018.
- [25] Papaioannou E, Utari PD, Quax WJ. Choosing an appropriate infection model to study quorum sensing inhibition in *pseudomonas* infections [J]. *Int J Mol Sci*. 2013;14(9):19309-19340.

[收稿日期]2018-11-28

(上接第 56 页)

- [8] 张玲,虞旻珍,张欣,等.穴位贴敷对变应性鼻炎大鼠 IL-4、LTC4 的影响[J].中医药学报,2017(6):37-40.
- [9] Liu L, Wang LP, He S. Immune homeostasis: Effects of Chinese herbal formulae and herb-derived compounds on allergic asthma in different experimental models [J]. *Chin J Integr Med*, 2018, 24(5):390-398.
- [10] Fahy JV. Type 2 inflammation in asthma — present in most, absent in many [J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15(1):57-65.
- [11] 姜丽娜,姚春艳,金齐力,等. Th1 型相关细胞因子对中性粒细胞吞噬功能的影响[J].蚌埠医学院学报,2008,33(3):256-259.
- [12] Arredondo LR, Deng C, Ratts RB, et al. Role of nerve growth factor in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Eur J Immunol*, 2001, 31(2):625-633.
- [13] Qin Q, Wang Z, Pan P, et al. Lung dendritic cells undergo maturation and polarization towards a T helper type 2-stimulating phenotype in a mouse model of asthma: Role of nerve growth factor [J]. *Exp Ther Med*, 2014, 8(5):1402-1408.
- [14] Zhang XG, Xue Z, Zhao YT, et al. Therapeutic effects of liver soothing pingchuan formula decoction on experimental asthma in BALB/c mice via regulation of nerve growth factor-tyrosine kinase A pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(5):6977-6984.
- [15] Shi Y, Jin Y, Guo W, et al. Blockage of nerve growth factor modulates T cell responses and inhibits allergic inflammation in a mouse model of asthma [J]. *Inflamm Res*, 2012, 61(12):1369-1378.
- [16] 张静.神经生长因子对哮喘小鼠肺组织 γ -氨基丁酸 A 受体表达及气道黏液分泌的影响[D].郑州:郑州大学,2013.
- [17] 欧阳若芸,胡成平,陈平,等.神经生长因子对哮喘大鼠 Th1/Th2 类细胞因子表达的调控研究[J].中国实用内科杂志,2006,26(20):1613-1616.

[收稿日期]2018-10-29