

· 基础研究 ·

“皮肤物理抗菌膜”专利技术在小鼠生殖道
淋病奈瑟球菌感染中的预防作用

方先林 戴玉田 尹跃平 兰厚金 周六化

【摘要】 目的 探讨“皮肤物理抗菌膜”专利技术在小鼠淋病奈瑟球菌(简称淋球菌)感染中的预防作用,以寻求淋病预防新方法。**方法** (1)模拟雄鼠向雌鼠传播淋球菌:将淋球菌 WHO-L 菌株接种于经过苯甲酸雌二醇预处理的雌性 BALB/c 小鼠阴道。实验组小鼠阴道使用“皮肤物理抗菌膜”长效抗菌材料,对照组小鼠阴道使用去离子水。接种后第 2、4、5 天取阴道分泌物做淋球菌培养,比较两组检出率;接种后 2~10 d 监测小鼠阴道分泌物涂片染色中多形核白细胞(PMN)平均数占总细胞百分数。(2)模拟雌鼠向雄鼠传播淋球菌:用玻璃棒代替小鼠阴茎,与已感染淋球菌的雌鼠模拟性交。实验组玻璃棒用长效抗菌材料浸泡,对照组用去离子水。洗脱玻璃棒头部分泌物,做淋球菌分离培养,比较两组检出率。**结果** (1)模拟雄鼠向雌鼠传播淋球菌实验中,实验组淋球菌培养阳性率低于对照组(第 4 天:10.0% 比 57.5%;第 5 天:7.5% 比 45.0%,均 $P < 0.01$);实验组小鼠在接种后 5~8 d PMN 百分比显著低于对照组(均 $P < 0.05$)。(2)模拟雌鼠向雄鼠传播淋球菌实验中,第 1、2 天实验组玻璃棒头部分泌物淋球菌培养阳性率分别为 8.3% 和 0,显著低于对照组(72.7% 和 45.5%,均 $P < 0.01$)。**结论** 长效抗菌材料通过形成物理抗菌膜,可以预防雌性小鼠生殖道淋球菌的感染或定植,同时能对雄性小鼠能起到液态安全套的作用。

【关键词】 奈瑟球菌,淋病; 材料试验; 长效抗菌材料

Prevention of *Neisseria gonorrhoeae* genital tract infection with patented technology of physical antimicrobial dermal film in a murine model FANG Xian-lin*, DAI Yu-tian, YIN Yue-ping, LAN Hou-jin, ZHOU Liu-hua. *Department of Urology, Affiliated Gulou Hospital, Medical College of Nanjing University, Nanjing 210008, China

Corresponding author: DAI Yu-tian, Department of Urology, Affiliated Gulou Hospital, Medical College of Nanjing University, Nanjing 210008, China, Email: ytdai@hotmail.com

【Abstract】 **Objective** To explore a new method of preventing *Neisseria gonorrhoea* (*N. gonorrhoeae*) by simulating intercourse in mice and verify the effect of a long-acting antibacterial material in the gonococcal infection in mice. **Methods** (1) Simulated male-female gonococcal transmission; the estradio-treated BALB/c female mice were inoculated with *N. gonorrhoeae* WHO-L via a vaginal route. In treated group, the mice received the long-acting antibacterial material via vaginal route while deionized water was administered in the control group. At Days 2-10 post-inoculation, the average number of polymorphonuclear cells (PMNs) was monitored in stained smears of vaginal cells from test mice. And the vaginal fluid was cultured for *N. gonorrhoeae* at Days 2, 4, 5 post-inoculation. *N. gonorrhoeae* genital tract infection was determined to compare the difference between the two groups. (2) Simulated female-male gonococcal transmission; a treated or sham glass rod was used instead of male mice's penis to simulate intercourse in gonococcus-infected female mice. The vaginal fluid on top of glass top was eluted and cultured for *N. gonorrhoeae* and the difference of relevance ratios compared. **Results** (1) In the experiment of simulated male-female gonococcal transmission, At Days 4 and 5, the positive rates of culture for *N. gonorrhoeae* of the tested group were lower than those of the control group, and there was significant difference between both groups (10.0% vs 57.5%, 7.5% vs 45.0%, both $P < 0.01$). The percentage of PMNs in the treated group was significantly lower than that of the control group at Days 5-8 post-inoculation (all $P < 0.05$). (2) In the experiment of simulated female-male gonococcal transmission, the positive rates of culture for *N. gonorrhoeae* from the vaginal fluid on top of glass top were 8.3% and 0 at Days 1 and 2 in

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2011.06.011

作者单位:210008 南京大学医学院附属鼓楼医院泌尿外科(方先林、戴玉田、兰厚金、周六化);中国医学科学院皮肤病研究所微生物实验室(尹跃平)

通信作者:戴玉田, Email: ytdai@hotmail.com

the tested group respectively. And they were significantly lower than those of the control group (72.7% and 45.5% respectively, both $P < 0.01$). **Conclusion** After topical application in murine vagina, the long-acting antibacterial material forms a layer of physically antibacterial molecular film to prevent the occurrence of *N. gonorrhoeae* genital tract infection or colonization in mice. It may be used as a liquid condom for male mice.

【Key words】 *Neisseria gonorrhoeae*; Materials testing; Long-acting antibacterial material

淋病是世界范围内发病率较高的性传播疾病之一。安全套是预防淋病的主要方式。随着“皮肤物理抗菌膜”技术的问世,为淋病的预防提供了一种新的途径。本研究通过构建淋病奈瑟球菌(简称淋球菌)小鼠实验动物模型,模拟淋病性交传播方式,观察使用“皮肤物理抗菌膜”对小鼠淋球菌感染率的影响。

一、材料与方法

1. 菌株和实验动物:淋球菌标准株 WHO-L,由中国医学科学院皮肤性病研究所尹跃平博士惠赠。清洁级 BALB/c 雌性小鼠(6~8 周)80 只,20~22 g,购自南京医科大学动物中心[SCXK(苏)2005002]。

2. 材料和试剂:苯甲酸雌二醇(油针剂,1 mg/ml),天津金耀有限公司。Thayer-Martin(T-M)培养基。2%“洁悠神”长效抗菌材料(主要成分为有机硅季铵盐),南京神奇科技公司。

3. 实验小鼠的雌激素预处理^[1]:所有小鼠均饲养在无菌隔离饲养笼内,水和食物都进行了无菌处理。预处理前用自制的阴道拭子取小鼠阴道脱落上皮细胞涂于洁净玻璃片上,瑞氏染色后,镜下观察细胞形态。确认小鼠处于发情间期(有较多的有核上皮细胞及中性粒细胞)。每只小鼠经腹部皮下注射 1 mg/ml 的苯甲酸雌二醇 0.1 ml,每 2 天注射 1 次,共 6 次。淋球菌接种前 2 d,用万古霉素盐酸盐 0.8 mg/只、链霉素盐酸盐 1.2 mg/只腹腔内注射,2 次/d,以抑制小鼠阴道共生菌的生长。

4. 淋球菌菌液的制备:收获在 T-M 淋球菌培养基上培养 20~24 h 的淋球菌(标准株),混悬于含有 0.5% mmol/L CaCl_2 、1 mmol/L MgCl_2 和 1% 明胶的磷酸盐缓冲液(PBS)中,充分混匀,微孔滤膜过滤。配制 Mc Farland 比浊液,用比对法调整菌液至 3×10^8 CFU/ml。

5. 模拟雄鼠向雌鼠性交传播淋球菌实验^[1]:将已用雌激素处理后的雌鼠分 2 组:实验组和对照组(每组 40 只)。实验前 2 h 分别用 5 mmol/L HEPES 50 μl 清洗阴道。实验组小鼠在阴道内用接种枪滴入 10 μl 2% 有机硅季铵盐;对照组小鼠阴道内滴入

10 μl 去离子水。分别在阴道内静置 30 min,使有机硅季铵盐及去离子水充分与小鼠阴道壁接触。用玻璃棒代替小鼠阴茎,玻璃棒头部分次沾取 10 μl 淋球菌混悬液,玻璃棒头部分别在 2 组小鼠阴道内反复抽送 5 min,使菌液与阴道壁充分接触后退出玻璃棒。在性交实验后第 2、4、5 天用阴道拭子分别取阴道分泌物,样本溶于 100 μl PBS 液中,涂布于 T-M 培养基上,在 36 $^{\circ}\text{C}$, 5%~10% CO_2 条件下缸培养 24 h。观察有无淋球菌生长,可疑者对细菌菌落做革兰染色,氧化酶实验。于接种后 2~10 d 通过监测阴道分泌物中多形核白细胞(PMN)平均数百分比来反映局部炎症变化。

6. 模拟雌鼠向雄鼠性交传播淋球菌实验:将模拟雄鼠向雌鼠性交传播淋球菌实验中的对照组中第 4 天淋球菌培养阳性小鼠作为模型动物,随机(完全随机抽样)分成 2 组:实验组($n=12$);对照组($n=11$),并记为感染后 0 d。实验时分别于感染后 1、2 d 进行模拟性交实验。具体操作为:用玻璃棒代替阴茎;实验组玻璃棒头部使用 2% 有机硅季铵盐浸泡;对照组用去离子水浸泡。于感染后第 1、2 天,分别用玻璃棒头部在阴道内反复抽送 5 min 后,退出玻璃棒。用 PBS 液洗脱玻璃棒头部分泌物,按上法进行淋球菌培养,比较淋球菌检出率的差异。

7. 统计学处理:用 SPSS 11.5 软件,两组间 PMN 百分比数据采用 Student t 检验,两组间淋球菌培养阳性率数据采用 χ^2 检验。

二、结果

1. 雌激素对小鼠阴道上皮细胞的影响:注射雌激素后阴道涂片检查可见 2 组小鼠均处于发情期,镜下特征为:大量不规则、折叠卷曲、核消失的角化上皮细胞比例增高(占有上皮细胞总数的 90%~95%),见图 1。

2. 模拟雄鼠向雌鼠性交传播淋球菌实验结果:在淋球菌攻击后第 2 天,2 组淋球菌培养均为阴性;第 4、5 天实验组淋球菌培养阳性率分别为 10.0% (4/40) 和 7.5% (3/40),对照组阳性率分别为 57.5% (23/40) 和 45.0% (18/40),实验组淋球菌培养阳性率均显著低于对照组($\chi^2 = 19.654, 14.528$,

均 $P < 0.01$)。淋球菌攻击后第 4 天可见 PMN 细胞吞噬淋球菌反应(图 2);第 5~8 天,对照组中 PMN 百分比均高于实验组(均 $P < 0.05$,图 3)。PMN 平均数百分比持续升高 2 d 即可认为产生炎症。

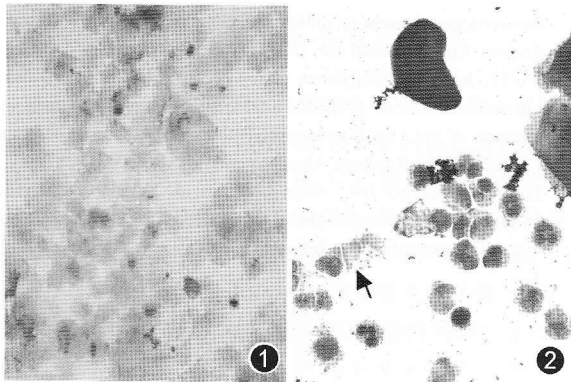


图 1 接种前发情期小鼠阴道分泌物涂片 瑞氏 $\times 100$

图 2 接种淋球菌后第 4 天小鼠阴道分泌物涂片 革兰 $\times 1000$ 箭头处为 PMN 胞质内淋球菌

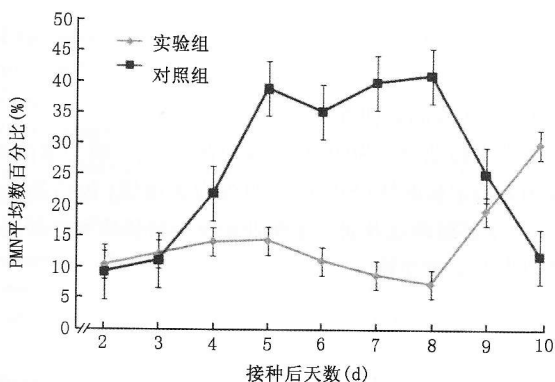


图 3 两组小鼠阴道分泌物中多形核白细胞 (PMN) 平均数百分比比较

3. 模拟雌鼠向雄鼠性交传播淋球菌实验结果:第 1、2 天实验组玻璃棒头分泌物淋球菌培养阳性率分别为 8.3% (1/12) 和 0 (0/12), 对照组阳性率分别为 72.7% (8/11) 和 45.5% (5/11), 实验组阳性率显著低于对照组(均 $P < 0.01$)。

三、讨论

女性淋病患者易发生一系列不良后果,包括盆腔炎、不育、异位妊娠、流产、新生儿眼炎和失明等;此外,淋病显著增强了人类免疫缺陷病毒 (HIV) 的传播^[2]。淋球菌主要感染下生殖道黏膜的上皮细胞及少部分的直肠、口咽和结膜黏膜上皮细胞;该病的传播依赖于:(1)接触部位:①女性传给男性:20%~30%是通过单一的性交接触;②男性传给女性:60%~80%是通过单一的性交接触(在阴道内

射精导致感染);(2)接触的次数。淋病的潜伏期在 2~7 d,少数男性感染者无症状,而大部分女性患者不表现出症状。据美国疾病预防控制中心 (CDC) 估计每年在美国有超过 70 万新淋病感染者,但是只有一半被报告至 CDC,因为其中有大部分感染者属无症状或未被检测出来的隐性感染者^[3-4]。这些隐性感染者的存在给淋病的防治工作带来了巨大的挑战,同时伴随着不断出现的新的耐药菌株,增加了淋病的发病率,影响到淋病的控制策略^[2]。

用雌激素处理的小鼠模型是惟一的小动物生殖道淋球菌感染模型。Song 等^[5]研究表明淋球菌可侵入小鼠生殖道深层组织,如固有膜,感染部位主要为阴道上部及宫颈部。这说明经雌激素处理的小鼠生殖道感染模型,更倾向于下生殖道感染模型,而不是阴道定植模型。关于雌激素可增加小鼠生殖道对淋球菌的易感性的机制目前仍不清楚。可以肯定的是在小鼠发情周期的早期阶段,当雌激素水平较高,阴道共栖菌较低时可表现出对淋球菌的短暂易感性。通过给予外源性的雌激素,小鼠无菌化处理,或者通过使用抗生素抑制阴道共栖菌的生长等手段可以延长淋球菌在小鼠生殖道的定植和感染,从而获得相对较为稳定的小鼠生殖道淋球菌感染模型;用小鼠来模拟人类淋球菌感染,是基于雌性小鼠和女性的下生殖道在生理学上的一些相似性^[6-8]。

目前我国研制的新型“皮肤物理抗菌膜”专利技术,即“洁悠神”长效抗菌喷雾剂作为一种高分子活性剂,其水溶性制剂喷洒在皮肤、黏膜表面形成一层致密的正电荷网状膜;对带负电荷的细菌、真菌、病毒等病原微生物具有强力吸附作用,通过静电力作用达到杀灭或抑制病原微生物,不会产生耐药性。本研究中淋球菌攻击后 5~8 d,实验组雌性小鼠 PMN 平均数百分比显著低于对照组,对阴道拭子分离培养的结果发现,在模拟性交后第 4、5 天,实验组淋球菌培养阳性率低于对照组,说明实验组雌性小鼠没有产生生殖道感染。另外在模拟雄鼠向雌鼠性交传播淋球菌的实验中,实验组玻璃棒头分泌物淋球菌培养阳性率显著低于对照组,说明“皮肤物理抗菌膜”能显著降低其头部携带的淋球菌。通过上述两个模拟实验均证明了“皮肤物理抗菌膜”在预防小鼠淋球菌感染中有效,能起到液态安全套的作用。但能否应用于女性淋病的防治,需要进一步的临床实验证实。

本实验的缺点是小鼠淋球菌感染模型不够稳定,感染时间较短,这使得其应用受到限制。随着转

基因小鼠的应用,解决宿主限制性问题,这些问题有望得到解决。

参 考 文 献

[1] Jerse AE, Crow ET, Bordner AN, et al. Growth of Neisseria gonorrhoeae in the female mouse genital tract does not require the gonococcal transferrin or hemoglobin receptors and may be enhanced by commensal lactobacilli. *Infect Immun*, 2002, 70: 2549-2558.

[2] Cohen MS, Hoffman IF, Royce RA, et al. Reduction of concentration of HIV-1 in semen after treatment of urethritis: implications for prevention of sexual transmission of HIV-1. AIDS CAP Malawi Research Group. *Lancet*, 1997, 349: 1868-1873.

[3] Datta SD, Sternberg M, Johnson RE, et al. Gonorrhea and chlamydia in the United States among persons 14 to 39 years of age, 1999 to 2002. *Ann Intern Med*, 2007, 147: 89-96.

[4] Bignell C, IUSTI/WHO. 2009 European (IUSTI/WHO)

guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. *Int J STD AIDS*, 2009, 20: 453-457.

[5] Song W, Condron S, Mocca BT, et al. Local and humoral immune responses against primary and repeat Neisseria gonorrhoeae tract infections of 17 β -estradiol treated mice. *Vaccine*, 2008, 26: 5741-5751.

[6] Edwards JL, Apicella MA. The molecular mechanisms used by Neisseria gonorrhoeae to initiate infection differ between men and women. *Clin Microbiol Rev*, 2004, 17: 965-981.

[7] Wu H, Jerse AE. Sialylation of gonococcal gcal LOS occurs during experimental murine gonococcal tract infection//Programs and abstracts of the 13th International Pathogenic Neisseria Conference (Oslo). Oslo: Nordberg Aksidenstrykkeri AS, 2002: 228.

[8] Jerse AE, Sharma ND, Simms AN, et al. A gonococcal efflux pump system enhances bacterial survival in a female mouse model of genital tract infection. *Infect Immun*, 2003, 71: 5576-5582.

(收稿日期:2010-06-11)

(本文编辑:赵景辉)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对论文中实验动物描述的要求

根据国家科学技术部 1988 年颁布的《实验动物管理条例》和卫生部 1998 年颁布的《医学实验动物管理实施细则》,本刊对论文中有关实验动物的描述,要求写清楚以下事项:(1)品种、品系及亚系的确切名称;(2)遗传背景或其来源;(3)微生物检测状况;(4)性别、年龄、体重;(5)质量等级及合格证书编号;(6)饲养环境和实验环境;(7)健康状况;

(8)对动物实验的处理方式。

医学实验动物分为四级:一级为普通级;二级为清洁级;三级为无特定病原体(SPF)级;四级为无菌级(包括悉生动物)。卫生部课题及研究生毕业论文等科研实验必须应用二级以上的实验动物。

第四届全国深部真菌感染学术会议征文通知

由中华医学会呼吸病学分会、中华医学会感染学分会主办,血液、皮肤、ICU 等相关学科专家协办的第四届全国深部真菌感染学术会议,将于 2011 年 3 月 25—28 日在珠海召开。会议将邀请国内外知名专家就真菌感染的基础和临床研究、实验室诊断与检查、院内感染的控制与流行病学等方面的最新进展展开讨论。欢迎呼吸科、感染科、血液科、皮肤科、检验科、内科、外科、妇科、儿科、ICU、器官移植、微生物研究等有关人员踊跃投稿参会。

征文内容:(1)深部真菌感染的病原学、流行病学、组织病理学、发病机制;(2)深部真菌感染的诊断学,包括实验室诊断和影像学诊断;(3)医院内真菌感染的防控;(4)免疫功

能低下相关真菌感染的防治;(5)各系统真菌感染的研究进展;(6)抗真菌药物研究进展。

征文要求:包括全文及摘要,全文不超过 4000 字;摘要应包括研究目的、材料和方法、结果、结论,字数 800~1000 字。投稿可即日起通过电子邮件或邮寄(需提供电子文件)给组委会。

投稿邮箱:sbjz2011@126.com, sbjz2011@163.com。邮寄地址:北京朝阳区工体东路 8 号 A2 座 801 室(邮政编码 100020)。联系人:马丽英,电话/传真:010-65041809/65005315。