

## UU1、UU3 和 UU4 致昆明小鼠下生殖道致病性的研究 \*

谭 飞 杨连娟 莫小辉 樊国彪 王秀丽<sup>△</sup>

(上海市皮肤病医院 上海 200443)

**摘要 目的:**研究解脲脲原体(*Ureaplasma Urealyticum*, UU)的第 1 血清型(UU1)、第 3 血清型(UU3)和第 4 血清型(UU4)对昆明小鼠下生殖道的致病性。**方法:**将 100 只昆明小鼠随机分为 5 组:空白组、雌二醇组、UU1 组、UU3 组和 UU4 组,每组 20 只;空白组和雌二醇组为对照组,UU1 组、UU3 组和 UU4 组为实验组;雌二醇组和实验组雌二醇化后 1 周,将 UU1、UU3 和 UU4 分别接种至 UU1、UU3 和 UU4 组小鼠泌尿生殖道,将液体培养基接种至空白组和雌激素组。2 周后检测各组小鼠泌尿生殖道的 IL-8、SIgA、TNF- $\alpha$  并取小鼠子宫组织行病理检查。**结果:**实验组小鼠 UU 接种都获得成功。IL-8、SIgA、TNF- $\alpha$  检测结果显示:实验组和对照组比较有显著性差异;UU4 组和 UU1 组及 UU3 组比较有显著性差异;空白组和雌二醇组比较无显著性差异;UU1 组和 UU3 组比较无显著性差异。病理显示:UU1、UU3 和 UU4 组昆明小鼠子宫组织有炎细胞浸润,UU4 组小鼠宫颈病变更明显。对照组小鼠子宫未见明显改变。**结论:** UU1、UU3 和 UU4 可能导致昆明小鼠下生殖道产生病理反应;UU4 可能短期致病力更强。

**关键词:**解脲脲原体;动物模型;致病性

**中图分类号:**Q95-3,R711.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)03-456-04

## Study on the pathogenicity of UU1, UU3 and UU4 in the lower genital tract of female KM mice\*

TAN Fei, YANG Lian-juan, MO Xiao-hui, FAN Guo-biao, WANG Xiu-li<sup>△</sup>

(Shang Hai Skin Disease Hospital, Shanghai, 200443, China)

**ABSTRACT Objective:** To preliminarily evaluate the pathogenicity of 3 serovars (1,3 and 4) of *Ureaplasma Urealyticum*(UU1, UU3 and UU4) in female KM mice's lower genital tract according to the changes of cytokine and pathology results. **Methods:** Establishment of animal model: 100 KM mice were randomly divided into control groups (including blank group and estradiol group) and test groups (including UU1 group, UU3 group and UU4 group). Except for the blank group all the mice received estradiol treatment once a week. After the second injection of estradiol, UU1, UU3 and UU4 were respectively inoculated intravaginally into groups of UU1, UU3 and UU4 of oestradiol-treated young adult KM strain mice. Liquid culture medium were inoculated intravaginally into control groups. On the 14th day after inoculation UU tests were taken. Detection of IL-8, SIgA and TNF- $\alpha$  from the mice's lower genital tracts and pathological examination of mice uterus were performed. **Results:** UU tests of the control groups were negative and all the test groups were positive. The levels of IL-8, SIgA and TNF- $\alpha$  in test groups were significantly higher than the control groups, with statistical difference ( $P < 0.05$ ), and UU4 group were significantly higher than the UU1 and UU3 groups ( $P < 0.05$ ), while blank group and estradiol group, UU1 group and UU3 group had no significant difference ( $P > 0.05$ ). Pathology results: the control groups had no significant change in the uterus; the test groups showed interstitial infiltration of polymorphonuclear leukocyte in the uterus and the pathological change of UU4 group were worse. **Conclusions:** Serovars (1,3 and 4) of *Ureaplasma Urealyticum* may committ pathogenicity in the lower genital tract of female KM mice and the disorder caused by UU4 may be more severe in short duration.

**Key words:** *Ureaplasma urealyticum*; Animal model; Pathogenicity

**Chinese Library Classification(CLC):** Q95-3, R711.3 **Document code:** A

**Article ID:**1673-6273(2011)03-456-04

## 前言

当前,UU 对女性下生殖道的致病性存在争议。一方面,有研究显示,UU 是女性宫颈炎、盆腔炎、阴道炎等疾病的重要致病因素;另一方面,正常的人群 UU 的检出率达 10%-40%,孕妇甚至可达 80%,这提示 UU 可能是人类的正常寄生菌群。为进一步阐明 UU 的致病性,学术界将 UU 分为 14 个血清型,各血

清型 UU 的致病性是目前关注的焦点<sup>[1-5]</sup>。本实验通过建立动物模型来研究不同血清型 UU 的致病性。

## 1 材料与方法

## 1.1 实验动物和试剂

实验用昆明小鼠 100 只,SPF 级,22+2g,8 周龄,购自上海第二军医大学实验动物中心;UU 液体培养基和固体培养基由

\* 基金项目:上海市卫生局科研计划课题资助项目(2008Y105),上海皮肤病医院专项业务课题项目

作者简介:谭飞(1976-),男,主治医师,硕士,研究方向:皮肤病性病基础与临床

<sup>△</sup>通讯作者:王秀丽,Email:tanfeitru@126.com

(收稿日期:2010-11-08 接受日期:2010-11-30)

法国梅里埃公司(bioMerieux co.,Ltd) 提供;苯甲酸雌二醇注射液由上海通用药业股份有限公司提供, 编号:090802;实验菌株 :UU1 (ATCC27813)、UU3 (ATCC27815)、UU4 (ATCC27816)由我院中心实验室保藏;小鼠 IL-8、SIgA、TNF-a 检测试剂盒由上海蓝基生物有限公司提供, 产品编号分别为: E03II0056、E03S0003、E03T0008。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 实验动物接种 将 100 只昆明小鼠随机分为 5 组, 每组 20 只, 每组分笼饲养;第 1 组为空白组, 第 2 组为雌二醇组, 第 3 组为 UU1 组、第 4 组为 UU3 组、第五组为 UU4 组。其中空白组和雌二醇组为对照组, UU1、UU3、UU4 组为实验组。将苯甲酸雌二醇注射液 0.2mg 腹腔注射至雌二醇组及 UU1、UU3、UU4 组, 1 周后进行 UU 接种。接种时, 将 UU1 标准株复苏后, 调整浓度至 1\*10e6ccu, 取 50ul 接种至 UU1 组小鼠阴道。UU3 组和 UU4 组按相同方法分别接种 UU3 和 UU4 标准株。空白组和雌二醇组同法接种液体培养基。接种 2 周后, 取小鼠阴道分泌物进行培养鉴定。

1.2.2 小鼠生殖道分泌物 IL-8、SIgA、TNF-a 检验 小鼠接种 UU 后 2 周, 取阴道分泌物进行检测, 实验步骤按照试剂盒说明书进行: 取出试剂盒, 于室温(20-25℃)放置 15-30 分钟; 取出酶标板, 按照标准品的次序分别加入 50μ l 的标准品溶液于空白微孔中; 空白微孔中加入 50μ l 的样品, 空白对照加入 50μ l 的蒸馏水; 在样品孔中加入 10μ l 的生物素; 在各孔中加入 100μ l

的酶标记溶液; 将酶标板用封口胶密封后, 37℃ 孵育反应 1 小时; 充分清洗酶标板 3-5 次, 保持各孔有充足的水压; 酶标板洗涤后用吸水纸彻底拍干; 各孔加入显色剂 A、B 液各 50μ l; 20-25℃ 下避光反应 15 分钟; 各孔加入 50μ l 终止液, 终止反应。结果判断: 30 分钟内在波长 450nm 的酶标仪上读取各孔的 OD 值; 以 OD 值为纵坐标, 以标准品的浓度为横坐标, 绘制曲线图; 根据样品的 OD 值查找对应的浓度。

1.2.3 小鼠子宫组织病理 所有小鼠在接种菌液后第 14 天颈椎脱臼处死, 剪取子宫组织, 将所取标本行 HE 染色, 光学显微镜下观察病理改变。

1.3 统计学分析

各分组所得计量数据采用均数± 标准差 ( $\bar{X} \pm S$ ) 表示, 用 SPSS16.0 软件处理数据, 两组间均数比较用 t 检验, 多组均数间用 Student-Newman-Keuls 检验 (S-N-K 检验)。检验水准  $\alpha = 0.05$ ,  $p < 0.05$  表示有统计学意义。

2 结果

2.1 接种结果

接种 2 周后, 取各组阴道分泌物培养鉴定, UU1、UU3、UU4 组小鼠均接种成功; 对照组分泌物培养则成阴性。

2.2 SIgA、IL-8 和 TNF-a 检测结果

小鼠阴道分泌物 SIgA、IL-8 和 TNF-a 检测结果如 Tab1 所示。

表 1 小鼠分泌物 SIgA、IL-8 和 TNF-a 检测结果( $\bar{X} \pm S$  pg/ml)  
Tab1 the results of detection of SIgA, IL-8 and TNF-a( $\bar{X} \pm S$  pg/ml)

|                 | SIgA        | TNF-a         | IL-8        |
|-----------------|-------------|---------------|-------------|
| Blank group     | 10.88± 0.84 | 797.76± 16.77 | 64.71± 3.74 |
| Estradiol group | 10.51± 0.73 | 797.59± 17.61 | 64.14± 3.68 |
| UU1 group       | 12.20± 0.85 | 880.80± 36.96 | 67.79± 3.72 |
| UU3 group       | 12.20± 0.89 | 886.22± 55.00 | 67.68± 3.05 |
| UU4 group       | 13.31± 1.79 | 913.17± 35.45 | 70.59± 3.67 |

根据 S-N-K 两两检验结果, 对照组(空白组和雌二醇组)和实验组(UU1、UU3、UU4 组)差异有显著性, 对照内空白组和雌二醇组差异无显著性, 实验组内 UU1 和 UU3 组差异无显著性, UU4 和 UU1、UU3 组差异有显著性。实验组 IL-8、TNF-a、SIgA 高于对照组; 而 UU4 组高于 UU1、UU3 组。

2.3 病理检查结果

空白组、雌二醇组、UU1 组、UU3 组和 UU4 组的小鼠子宫组织切片在光学显微镜下观察的情况分别如图 1、图 2、图 3、图 4 和图 5。

3 讨论

解脲脲原体对女性患者下生殖道的致病性一直存在争议<sup>[6-10]</sup>。一个重要的原因就是 UU 的动物感染模型不容易建立。近期有学者研究发现, 小鼠雌激素化可以提高建立 UU 感染模

型的成功率<sup>[11]</sup>。本课题通过将小鼠雌激素化, 成功建立昆明小鼠下生殖道感染模型, 初步研究了 UU1、UU3、UU4 的致病性。研究显示阴道炎患者临床症状的出现与否与 SIgA 水平是相关的, 检测 SIgA 有助于泌尿生殖道感染的诊断和治疗<sup>[10,12]</sup>。任平等<sup>[13]</sup>发现阴道分泌物 IL-8 的增高与阴道局部微生物感染有关, IL-8 的高低是判别炎症是否控制的一项指标并可指导临床用药。TNF-α 是一种重要的细胞因子, 参与了炎症反应的许多环节, 在一定程度上反映了炎症反应的严重程度; 文献提示 TNF-α 分泌水平与 UU 感染存在一定联系<sup>[14]</sup>。本实验选取这三种细胞因子作为研究对象, 检测其分泌水平, 探测 UU 的致病性<sup>[15-17]</sup>。

从试验结果看, 小鼠成功接种 UU 后 2 周, 试验组(UU1、UU3 和 UU4 组)小鼠的分泌的 IL-8、SIgA、TNF-a 比空白组和雌激素组高( $p < 0.05$ )。从病理结果看, 试验组小鼠子宫切片显示小鼠子宫内膜腺体肿胀、断裂, 内膜及粘膜下组织可见炎症

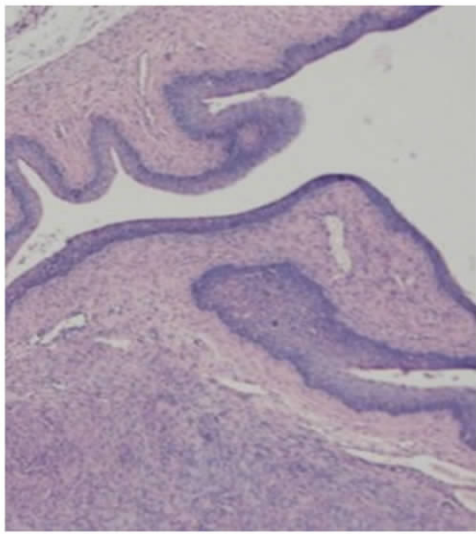


图 1 空白组小鼠子宫切片(HE,40× )  
Fig1 Blank group uterus(HE,40× )

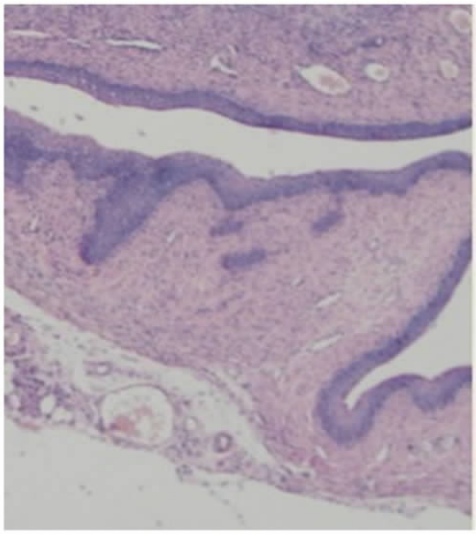


图 2 雌二醇组小鼠子宫切片(HE,40× )  
Fig2 Estradiol group uterus(HE,40× )

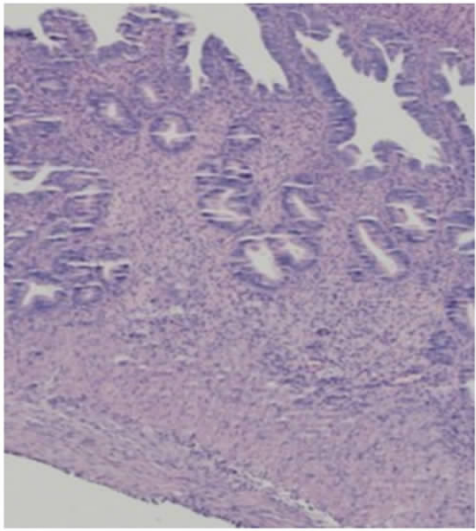


图 3 UU1 组小鼠子宫切片(HE,40× )  
Fig3 UU1 group uterus(HE,40× )

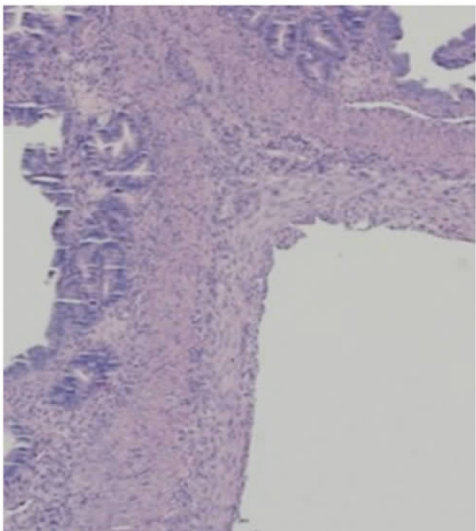


图 4 UU3 组小鼠子宫切片(HE,40× )  
Fig4 UU3 group uterus(HE,40× )

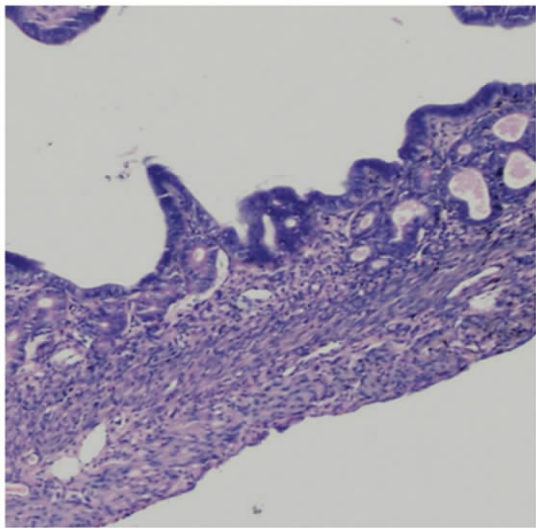


图 5 UU4 组小鼠子宫切片(HE,40× )  
Fig5 UU4 group uterus(HE,40× )

细胞浸润;空白组和雌二醇组小鼠子宫内膜组织基本正常,粘膜表面完整,无明显炎症细胞浸润。提示 UU1、UU3 和 UU4 都可能引起昆明小鼠的下生殖道病变。

进一步分析实验组各组情况:UU4 组小鼠下生殖道的分泌的 IL-8、SIgA、TNF- $\alpha$  比 UU1 组、UU3 组高( $p<0.05$ );病理切片显示, UU4 组子宫内膜水肿更明显, 内膜下组织炎症细胞浸润更明显。这提示不同的血清型 UU 的致病性可能存在差异;UU4 可能导致的损害比 UU1、UU3 更严重。

综上所述, UU1、UU3 和 UU4 在短期内可能都能导致昆明小鼠下生殖道病变, 而且 UU4 可能导致的损害更严重。由于 UU 感染是一个非常复杂的过程, 许多问题特别是 UU 长期感染 / 携带等问题需要进一步研究。

参 考 文 献(References)

[1] Kasper DC, Mechtler TP, Reischer GH, et al.The bacterial load of Ureaplasma parvum in amniotic fluid is correlated with an increased intrauterine inflammatory response [J].Diagn Microbiol Infect Dis.



- 2010,67(2):117-21
- [2] Govender S, Theron GB, Odendaal HJ, et al. Prevalence of genital mycoplasmas, ureaplasmas and chlamydia in pregnancy [J]. J Obstet Gynaecol, 2009,29(8):698-701
- [3] 马睿,李怀芳,叶鸿,等.盆腔炎发生与解脲脲原体感染的关系[J]. 同济大学学报(医学版),2010,31(3):77-79  
Ma Rui, Li Huai-fang, Ye Hong, et al. Relationship between pelvic inflammatory disease and Ureaplasma urealyticum infection[J]. Journal of Tongji University (Medical Science), 2010,31 (3):77-79 (In Chinese)
- [4] 陈晓伟,郑华,钟淑霞.女性生殖道解脲脲原体感染与细菌性阴道病的关系[J].中国皮肤性病杂志,2010,24(1):44-46  
Chen Xiao-wei, Zheng Hua, Zhong Shu-xia. The Relevance between the Infection of Ureaplasma Urealyticum and Bacterial Vaginosis in Female Genital Tract[J]. The Chinese Journal of Dermatovenereology, 2010,24(1):44-46 (In Chinese)
- [5] Xiao L, Glass JI, Paralanov V, et al. Detection and characterization of human Ureaplasma species and serovars by real-time PCR [J]. J Clin Microbiol, 2010,48(8): 2715-23
- [6] Kasper DC, Mechtler TP, Reischer GH, et al. The bacterial load of Ureaplasma parvum in amniotic fluid is correlated with an increased intrauterine inflammatory response [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2010,67(2):117-21
- [7] Govender S, Theron GB, Odendaal HJ, et al. Prevalence of genital mycoplasmas, ureaplasmas and chlamydia in pregnancy [J]. J Obstet Gynaecol, 2009,29(8):698-701
- [8] Rakovskaia IV, Gorina LG, Barkhatova OI, et al. Persistence of Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum in organism of infected animals. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol, 2009,4:81-5
- [9] Bayraktar MR, Ozerol IH, Gucluer N, et al. Prevalence and antibiotic susceptibility of Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum in pregnant women. Int J Infect Dis, 2010,14(2): 90-5
- [10] 吴移谋,叶元康.支原体学[M].北京:人民卫生出版社,2008:134-142  
Wu Yi-mou, Ye Yuan-kang. Mycoplasmaology[M]. BEIJING: The people's medical publishing house, 2008:134-142(In Chinese)
- [11] D.TAYLOR-ROBINSON, P.M.FURR. Observations on experimental colonisation of mice by ureaplasmas of human origin [J]. J Med Microbiol, 2002(51): 866-870
- [12] 陆春,朱国兴,卢荣标.解脲脲原体对女性生殖道致病性的研究进展[J].新医学,2008,39(2):132-133  
Lu Chun, Zhu Guo-xing, Lu Rong-biao, et al. Research progress of ureaplasma urealyticum infection in the female lower genital tract[J]. New Medicine, 2008,39(2):132-133 (In Chinese)
- [13] 任平,祝杏珍,官洁,等.阴道分泌物白细胞介素8与孕妇下生殖道感染关系的研究[J].中华围产医学杂志,2004,7(2): 79-82  
Ren Ping, Zhu Xing-zhen, Guan Jie, et al. Relationship between concentration of IL-8 in vaginal discharge and adverse pregnancy outcomes in women with lower genital tract infection[J]. Chinese Journal of Perinatal Medicine, 2004,7(2): 79-82 (In Chinese)
- [14] Crouse DT, English BK, Livingston L, et al. Genital mycoplasmas stimulate tumor necrosis factor-alpha and inducible nitric oxide synthase production from a murine macrophage cell line[J]. Pediatr Res, 1998,44:785-790
- [15] Li YH, Brauner A, Jonsson B, et al. Ureaplasma urealyticum-induced production of proinflammatory cytokines by macrophages [J]. Pediatr Res, 2000,48: 114-119
- [16] Manimtim WM, Hasday JD, Hester L, et al. Ureaplasma urealyticum Modulates Endotoxin-Induced Cytokine Release by Human Monocytes Derived from Preterm And Term Newborns and Adults [J]. Infect Immun, 2001,69: 3906-3915
- [17] Li R, Xi Y, Liu X, Chen G, et al. Expression of IL-1alpha, IL-6, TGF-beta, FasL and ZNF265 during sertoli cell infection by ureaplasma urealyticum. Cell Mol Immunol, 2009,6(3):215-21