

黄清梅,白发明,朱云蕾,等. 宫内感染动物模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(12): 120-124.
Huang QM, Bai FM, Zhu YL, et al. Progress in understanding intrauterine infection in animal models [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(12): 120-124.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.12.019

宫内感染动物模型的研究进展

黄清梅,白发明,朱云蕾,韦冰梅,陈玉君*

(广西医科大学第二附属医院儿科,南宁 530007)

【摘要】 宫内感染可由多种病原体侵入妊娠子宫腔内,引起异常妊娠及新生儿疾病等母婴不良结局,但由于发病机制尚未明确,治疗效果欠佳,预后差。因此,建立稳定、可靠的宫内感染动物模型有助于对其发病机制、药物作用机制及预防等方面进行更深入的研究,对降低母婴不良结局及改善预后有重要的意义。目前国内外建立宫内感染的动物模型主要有:大肠杆菌或脂多糖诱导的宫内感染模型、解脲支原体宫内感染动物模型、念珠菌宫内感染动物模型、巨细胞病毒宫内感染动物模型等,本文主要从实验动物的选择、不同造模方法的实验设计及其优缺点等方面进行综述。

【关键词】 宫内感染;动物模型;研究进展

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 12-0120-05

Progress in understanding intrauterine infection in animal models

HUANG Qingmei, BAI Faming, ZHU Yunlei, WEI Bingmei, CHEN Yujun*
(the Second Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530007, China)

【Abstract】 Intrauterine infection can be caused by a variety of pathogens invading into the uterine cavity during pregnancy and can cause abnormal pregnancy, neonatal diseases and other adverse outcomes for mothers and infants. However, its pathogenesis is not yet clear, the effects of treatments are poor, and the prognosis is not good. Therefore, establishment of a stable and reliable animal model of intrauterine infection will facilitate further research into its pathogenesis, mechanisms of drug action, and prevention, which is of great significance for reducing adverse outcomes of mothers and infants and to improve the prognosis. At present, the animal models of intrauterine infection established in China and elsewhere mainly include *Escherichia coli* or lipopolysaccharide-induced intrauterine infection, *Ureaplasma urealyticum* intrauterine infection, *Candida* intrauterine infection, and cytomegalovirus intrauterine infection. This article mainly reviews the selection of experimental animals, the experimental design of different modeling method and their advantages and disadvantages.

【Keywords】 Intrauterine infection; animal models; research progress

宫内感染是指病原微生物侵入羊膜腔引起的羊水、胎盘(蜕膜、绒毛膜和羊膜)及胎儿的感染。宫内感染是引起早产的主要原因,约占早产原因的50%^[1-4]。宫内感染引起的早产可增加新生儿败血症、新生儿呼吸窘迫综合征、新生儿坏死性小肠结肠炎、支气管肺发育不良、动脉导管未闭、脑出血、

【基金项目】 广西自然科学基金资助项目(2017GXNSFAA198165)。
【作者简介】 黄清梅(1987—),女,主治医师,硕士研究生,主要从事新生儿疾病相关研究。E-mail: huangqing418@163.com
【通信作者】 陈玉君(1964—),女,博士,教授,硕士生导师,主要从事新生儿疾病研究。E-mail: chenyujuan1006@163.com

听力障碍、脑性瘫痪等疾病的发生风险^[5-7]。然而,关于宫内感染的发病机制及其引起的早产儿多脏器损伤的机制目前尚未明确。因此,建立重复性高、稳定性好的宫内感染动物模型对深入研究宫内感染的发病机制、发生发展及早期干预,预防或减轻宫内感染分娩母婴不良结局具有重要的意义。本文就目前宫内感染动物模型建立的研究进展进行综述。

1 动物模型的选择

研究宫内感染的动物模型主要包括啮齿类动物、羊、猪及灵长类动物。羊是较早用来研究分娩机制的动物。羊的妊娠期较长(约 147 d)、单胎,有利于纵向标本收集及研究宫内感染致病菌长期暴露或药物干预对胎儿的影响,且羊的体积庞大,母羊和胎儿在妊娠期间均能接受长期置管及手术干预研究。但羊的价格昂贵、性成熟和繁殖慢,且基因组和免疫学尚未完全明确^[8],使其在实际实验研究的应用上受到限制。灵长类动物在子宫解剖结构、妊娠期长短、分娩过程及产仔数等方面与人类极为相似,但灵长类动物价格相对昂贵、伦理要求高,且是人畜共患疾病的潜在来源,因此较少用于宫内感染动物模型的研究。啮齿类动物中的大鼠和小鼠因相对经济、易于饲养、妊娠期短(大鼠约为 22 d,小鼠约为 20 d)、能够快速达到性成熟、繁殖快、易于管理及实验操作等特点,因此大鼠、小鼠最常用于宫内感染动物模型的研究。大鼠分娩时在调节子宫收缩的分子途径方面与人类有相似之处,比如催产素受体(oxytocin receptors, OTR)和缝隙连接蛋白 connexin 43 等分子的上调、参与 cAMP-PKA 信号通路的分子和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)等分子的下调^[9-10]。然而,使用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)或者大肠杆菌建立大鼠宫内感染模型引起早产儿分娩的实验方法较有限,需要连续注入 LPS 才能成功诱导早产儿分娩^[11];也有研究报道^[12],使用大肠杆菌建立宫内感染大鼠模型并不能引起早产儿分娩,而大鼠对宫内感染刺激不敏感的原因目前尚未明确。相比较而言,使用 LPS 或大肠杆菌等通过腹腔注射或羊膜腔内给药途径建立宫内感染模型在小鼠中成功率较高^[11],且小鼠的基因组与人类较相似,具有较好的免疫系统特征,并受益于大量的商用抗体、小干扰 RNA (siRNA)和微阵列平台的可用性,故得

到广泛使用。

2 宫内感染造模的相关病原体

2.1 大肠杆菌或 LPS 诱导的宫内感染模型

大肠杆菌是泌尿生殖道的条件致病菌,在一般情况下不会致病;但在胎膜早破或机体免疫力下降时,泌尿生殖道细菌上行性感染可引起宫内感染。研究表明^[13-15],大肠杆菌是引起宫内细菌感染的最常见病原菌之一。因此,大肠杆菌或者来源于大肠杆菌的 LPS 最常用于宫内感染模型的建立。2004 年,袁天明等^[16]选择对孕 15 d 的大鼠麻醉后于下腹作 1.5 cm 正中切口,找到左右子宫角并分别于两个胎囊之间每毫升接种 $1.5 \times 10^8 \sim 2.0 \times 10^8$ 个的大肠杆菌悬浮液 0.2 mL,以子宫壁及胎盘内血管充血、水肿,并见大量中性粒细胞浸润表明造模成功。该法建模后母鼠无明显临床症状,但子宫及胎盘病理变化明显,早产率为 70%,由于该方法接种的是活菌,其造模后引起的宫内感染过程与人类自然感染的亚临床型宫内感染过程较接近,可用于宫内感染对早产儿相关疾病影响的研究。但该造模方法手术操作难度大、对孕鼠创伤大、大肠杆菌用药剂量较难把控,且有创操作中术后潜在的外界污染可能加重宫内感染的过程。因此,采用该造模方法进行宫内感染的研究受到一定的限制。

针对上述造模方法的缺点,经过研究者不断的改进,有些缺点已逐渐得到改善。如:Burda 等^[17]和 Elovitz 等^[18]将 LPS 替代大肠杆菌注射于孕鼠两个胎囊之间成功复制了小鼠宫内感染模型,用于研究宫内感染对胎儿脑损伤的影响。该造模方法能成功诱导宫内感染局部炎症反应过程,且能够根据实验需要精确计算 LPS 的剂量,但该模型仍存在实验操作复杂、创伤大、术口易污染等缺点,且麻醉过程中由于孕鼠呼吸循环的波动可能对胎鼠脏器损伤有一定的影响,因此,不适用于模拟临床上宫内感染对胎儿脏器损伤的研究。Rinaldi 等^[19]针对上述缺点进行了改进,对孕鼠麻醉后采用超声引导下经腹部注射 LPS 于两胎囊之间,成功模拟了宫内感染局部炎症反应及免疫反应过程,该造模方法具有创伤小、手术操作相对简单等优点,且早产率及子宫胎盘炎症反应与上述侵入性剖腹胎囊注药造模方法相似,缺点是要求具有对孕鼠超声的设备及技术,因此无法广泛应用。卢刻羽等^[20]通过对孕 18 d 的大鼠腹腔注射不同剂量的 LPS 研究宫内感染致

新生鼠肺损伤模型的构建方法,该研究发现,腹腔注射 0.7 mg/kg LPS 构建宫内感染模型较成功,孕鼠死亡率和流产率较低,孕鼠胎盘和新生鼠肺组织损伤改变较明显,该造模方法具有操作简单、创伤小、成功率高等优点,因此被广泛应用。Dell'Ovo 等^[21]在大鼠孕 20 d 时腹腔注射不同剂量的 LPS 建立宫内感染模型进行研究发现,腹腔注射 640 $\mu\text{g/kg}$ 的 LPS 时能最大程度诱导胎儿脑损伤而不引起孕鼠死亡。Fricke 等^[22]在 C57BL 小鼠孕 15.5 d 时进行腹腔注射 100 $\mu\text{g/kg}$ 成功建立了宫内感染致胎儿肠损伤模型。可见,不同的 LPS 剂量均能引起与临床相类似的宫内感染表现,且其对胎儿的影响在不同的器官间是不同的。

2.2 解脲支原体宫内感染动物模型

解脲支原体是介于细菌与病毒之间无细胞壁、具有自我复制能力的最小病原体,寄生于人体泌尿生殖道^[23],是引起宫内感染和早产的主要致病菌^[1]。因此,解脲支原体也是常用于建立宫内感染动物模型的常见病原体。Normann 等^[24]在小鼠孕 13.5 d 时麻醉后切开下腹部暴露子宫,将解脲支原体血清 3 型悬浮液羊膜腔内注射 5000 菌落形成单位(colony-forming units, CFU)每个胎囊,在孕 17.5 d 时剖腹产分娩,此方法成功建立了解脲支原体感染宫内感染模型。建模后发现,模型组新生小鼠大脑皮层神经元钙结合蛋白阳性细胞数和钙网膜蛋白阳性细胞数显著低于对照组,其建模后新生小鼠脑损伤的病理变化及大脑发育异常的临床表现较典型,更接近宫内感染致早产儿脑损伤的发病表现。但该造模方法操作复杂,对孕鼠创伤大,整个实验过程死亡率较高,不适于推广。Van 等^[25]在母羊孕 127 d 时采用超声引导下羊膜腔内注射解脲支原体 10^7 CCUs 成功建立了解脲支原体宫内感染致胎儿肠损伤模型,该方法造模胎儿暴露于解脲支原体 6 d,与对照组相比,造模组新生小羊肠粘膜组织损伤改变较明显。Collins 等^[26]分别在母羊孕 110、117、121 d 时采用超声引导下羊膜腔内注射解脲支原体 2×10^7 CFU 诱导宫内感染模型,三组在母羊孕 124 d 时剖腹产分娩,该方法造模能引起肺组织炎症反应及结构改变,且产前暴露于解脲支原体的时间越长肺组织损伤改变越明显。该造模方法操作简单可行,成功率高,且羊的妊娠周期长,多为单胎妊娠,更能形象地模拟人类怀孕晚期宫内感染炎症反应过程。缺点是羊的价格昂贵,繁殖周期长,且需要

有相应超声设备及实验技术。

2.3 念珠菌宫内感染动物模型

念珠菌也是孕妇生殖道感染的常见病原菌。研究报道^[27],高达 40% 的妊娠妇女阴道中存在念珠菌感染,检出率是非妊娠妇女的两倍。尽管在临床上,母亲念珠菌宫内感染通过垂直传播引起新生儿先天性念珠菌感染的病例报道较少。但随着科学技术的发展,已有研究发现^[28-30],在自发早产的妊娠妇女羊水中检测出念珠菌感染。念珠菌宫内感染可引起胎儿死亡、胎儿念珠菌感染及神经系统发育障碍^[31-32]。研究发现^[33-34],对妊娠期无症状念珠菌感染的妇女予根除念珠菌治疗可降低发生流产和早产的风险。但关于妊娠期念珠菌宫内感染引起胎儿损伤的机制目前尚未明确,目前关于念珠菌宫内感染的动物模型研究报道也较少。Payne 等^[35]选择绵羊为研究对象,通过超声引导下羊膜腔内注射白色念珠菌 10^7 CFU 建立宫内感染模型,注射白色念珠菌后 1~2 d 剖宫产分娩的胎羊皮肤、肺组织及羊水中均有明显的炎症改变。Nikiforou 等^[36]用同样的方法造模后发现,注射后 3~5 d 剖宫产分娩的胎羊肠组织及外周血中均检测到白色念珠菌的侵入性生长,引起胎羊肠损伤及真菌血症。可见,该造模方法稳定可靠,且绵羊多为单胎妊娠、体积大、孕期长,妊娠过程与人类较相似,可用于念珠菌宫内感染与母婴不良结局的相关研究。

2.4 巨细胞病毒宫内感染动物模型

巨细胞病毒也是引起宫内感染最常见的病原体之一,可引起胎儿发育畸形,对社会造成巨大的危害。据报道^[37],巨细胞病毒宫内感染是发达国家新生儿感觉神经性听力损失和神经发育异常的主要原因。因此,建立稳定、可靠的巨细胞病毒宫内感染模型具有重要的意义。Juanjuan 等^[38]通过对孕 12.5 d 的小鼠胎盘接种 1×10^6 PFU/mL 的小鼠巨细胞病毒成功建立了巨细胞病毒宫内感染致听力损伤模型。刘海智等^[39]通过对孕龄 10~11 d 的 BALB/C 小鼠经胎盘分别接种感染性滴度不同的巨细胞病毒成功建立了宫内感染模型。建模后孕鼠出现不同程度的病毒血症现象,与模型对照组相比,不同病毒滴度组孕鼠流产或死胎的发生率显著升高,仔鼠小头畸形及低出生体重的发生率显著升高,其临床表现更接近人类巨细胞病毒宫内感染的发病表现。此外,经胎盘接种巨细胞病毒,使孕鼠及胎盘成功感染病毒,并经胎盘传播给胎仔的垂直

传播模式与人类巨细胞病毒宫内感染的疾病传播模式及发病机制较相似。但陈莉等^[40]研究发现,胎盘接种巨细胞病毒的方法建立巨细胞病毒宫内感染模型成功率较低。可能由于该方法属于有创操作,手术难度大,操作过程对实验技术人员要求较高,因此,较难开展实施。

2.5 其他病原体宫内感染动物模型

乙型肝炎病毒、梅毒螺旋体、人类获得性免疫缺陷病(HIV)等病原体引起的宫内感染均可通过母体血液垂直感染胎儿,引起严重不良后果,但目前尚未见有相对应的宫内感染动物模型的研究报道。因此,仍需大量的动物实验和临床研究来探索与人类妊娠过程接近,能够形象逼真地模拟临床上真实宫内感染机制的动物模型,推动基础实验研究和临床试验的进展。

综上所述,引起宫内感染的病原体多种多样,发病机制复杂,且应用不同的动物针对不同的研究目标使用的造模方法各不同。因此,在以后的研究中应根据不同的研究目的结合不同造模方法的优缺点选择合适的造模方法,使所建立的动物模型尽可能模拟疾病的发生发展及演变过程,为进一步研究宫内感染的发病机制、药物作用机制及预防保健等方面提供基础研究平台,以降低母婴不良结局、改善预后、减轻社会负担。

参考文献:

- [1] Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery [J]. N Engl J Med, 2000, 342(20): 1500-1507.
- [2] Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, et al. The preterm parturition syndrome [J]. BJOG, 2006, 113(3): 17-42.
- [3] Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, et al. Epidemiology and causes of preterm birth [J]. Lancet, 2008, 371(9606): 75-84.
- [4] Malloy MH. Chorioamnionitis: epidemiology of newborn management and outcome United States 2008 [J]. J Perinatol, 2014, 34(8): 611-615.
- [5] Lau J, Magee F, Qiu Z, et al. Chorioamnionitis with a fetal inflammatory response is associated with higher neonatal mortality, morbidity, and resource use than chorioamnionitis displaying a maternal inflammatory response only [J]. Am J Obstet Gynecol, 2005, 193(3): 708-713.
- [6] Aziz N, Cheng YW, Caughey AB. Neonatal outcomes in the setting of preterm premature rupture of membranes complicated by chorioamnionitis [J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2009, 22(9): 780-784.
- [7] Wu YW. Systematic review of chorioamnionitis and cerebral palsy [J]. Ment Retard Dev Disabil Res Rev, 2002, 8(1): 25-29.

- [8] Kemp MW, Saito M, Newnham JP, et al. Preterm birth, infection, and inflammation advances from the study of animal models [J]. Reprod Sci, 2010, 17(7): 619-628.
- [9] Arthur P, Taggart MJ, Zielenk B, et al. Relationship between gene expression and function of uterotonic systems in the rat during gestation, uterine activation and both term and preterm labour [J]. J Physiol, 2008, 586(24): 6063-6076.
- [10] Fang X, Wong S, Mitchell BF. Effects of RU486 on estrogen, progesterone, oxytocin, and their receptors in the rat uterus during late gestation [J]. Endocrinology, 1997, 138(7): 2763-2768.
- [11] Nielsen BW, Bonney EA, Pearce BD, et al. A cross-species analysis of animal models for the investigation of preterm birth mechanisms [J]. Reprod Sci, 2016, 23(4): 482-491.
- [12] Hirsch E, Filipovich Y, Romero R. Failure of *E.coli* bacteria to induce preterm delivery in the rat [J]. J Negat Results Biomed, 2009, 8: 1.
- [13] 邓兰英. 新生儿宫内感染的产前因素与细菌病原体的临床研究 [J]. 中国计划生育和妇产科, 2018, 10(6): 88-91.
- [14] 应海琼, 徐道芬, 单晓雪, 等. 晚期妊娠宫内感染对母婴的影响 [J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(4): 614-616, 620.
- [15] Goncalves LF, Chaiworapongsa T, Romero R. Intrauterine infection and prematurity [J]. Ment Retard Dev Disabil Res Rev, 2002, 8(1): 3-13.
- [16] 袁天明, 俞惠民, 李建平. 细菌性宫内感染致早产大鼠模型的建立 [J]. 浙江医学, 2004, 26(4): 33-34, 50.
- [17] Burd I, Brown A, Gonzalez JM, et al. A mouse model of term chorioamnionitis: unraveling causes of adverse neurological outcomes [J]. Reprod Sci, 2011, 18(9): 900-907.
- [18] Elovitz MA, Brown AG, Breen K, et al. Intrauterine inflammation, insufficient to induce parturition, still evokes fetal and neonatal brain injury [J]. Int J Dev Neurosci, 2011, 29(6): 663-671.
- [19] Rinaldi SF, Makieva S, Frew L, et al. Ultrasound-guided intrauterine injection of lipopolysaccharide as a novel model of preterm birth in the mouse [J]. Am J Pathol, 2015, 185(5): 1201-1206.
- [20] 卢羽翼, 朱伟伟, 梁宏露, 等. 孕鼠腹腔注射脂多糖致新生鼠脑损伤模型的构建 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2014, 34(6): 727-733.
- [21] Dell'Ovo V, Rosenzweig J, Burd I, et al. An animal model for chorioamnionitis at term [J]. Am J Obstet Gynecol, 2015, 213(3): 387.
- [22] Fricke EM, Elgin TG, Gong H, et al. Lipopolysaccharide-induced maternal inflammation induces direct placental injury without alteration in placental blood flow and induces a secondary fetal intestinal injury that persists into adulthood [J]. Am J Reprod Immunol, 2018, 79(5): e12816.
- [23] Waites KB, Katz B, Schelonka RL. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens [J]. Clin Microbiol Rev, 2005, 18(4): 757-789.

- [24] Normann E, Lacaze-Masmonteil T, Eaton F, et al. A novel mouse model of Ureaplasma-induced perinatal inflammation; effects on lung and brain injury [J]. *Pediatr Res*, 2009, 65 (4): 430-436.
- [25] van Gorp C, de Lange IH, Spiller OB, et al. Protection of the ovine fetal gut against ureaplasma-induced chorioamnionitis; a potential role for plant sterols [J]. *Nutrients*, 2019, 11 (5): 968.
- [26] Collins JJ, Kallapur SG, Knox CL, et al. Inflammation in fetal sheep from intra-amniotic injection of Ureaplasma parvum [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010, 299 (6): L852-L860.
- [27] Hay P, Czeizel AE. Asymptomatic trichomonas and candida colonization and pregnancy outcome [J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2007, 21(3): 403-409.
- [28] Chaim W, Mazor M, Wiznitzer A. The prevalence and clinical significance of intraamniotic infection with Candida species in women with preterm labor [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 1992, 251 (1): 9-15.
- [29] DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP, et al. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation [J]. *PLoS One*, 2008, 3(8): e3056.
- [30] Combs CA, Gravett M, Garite TJ, et al. Amniotic fluid infection, inflammation, and colonization in preterm labor with intact membranes [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2014, 210(2): e1-e15.
- [31] Benjamin DK Jr, Stoll BJ, Fanaroff AA, et al. Neonatal candidiasis among extremely low birth weight infants: risk factors, mortality rates, and neurodevelopmental outcomes at 18 to 22 months [J]. *Pediatrics*, 2006, 117(1): 84-92.
- [32] Darmstadt GL, Dinulos JG, Miller Z. Congenital cutaneous candidiasis: clinical presentation, pathogenesis, and management guidelines [J]. *Pediatrics*, 2000, 105(2): 438-444.
- [33] Roberts CL, Rickard K, Kotsiou G, et al. Treatment of asymptomatic vaginal candidiasis in pregnancy to prevent preterm birth; an open-label pilot randomized controlled trial [J]. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2011, 11: 18.
- [34] Roberts CL, Algert CS, Rickard KL, et al. Treatment of vaginal candidiasis for the prevention of preterm birth: a systematic review and meta-analysis [J]. *Syst Rev*, 2015, 4: 31.
- [35] Payne MS, Kemp MW, Kallapur SG, et al. Intrauterine Candida albicans infection elicits severe inflammation in fetal sheep [J]. *Pediatr Res*, 2014, 75(6): 716-722.
- [36] Nikiforou M, Jacobs EM, Kemp MW, et al. Intra-amniotic Candida albicans infection induces mucosal injury and inflammation in the ovine fetal intestine [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 29806.
- [37] Kenneson A, Cannon MJ. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection [J]. *Rev Med Virol*, 2007, 17(4): 253-276.
- [38] Juanjuan C, Yan F, Li C, et al. Murine model for congenital CMV infection and hearing impairment [J]. *Virol J*, 2011, 8: 70.
- [39] 刘海智. 小鼠巨细胞病毒宫内感染实验模型研究 [D]. 武汉: 华中科技大学; 2006.
- [40] 陈莉, 陈素华, 刘海智, 等. 经胎盘接种小鼠巨细胞病毒宫内感染模型建立 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2006, 14(3): 55-56, 63.

[收稿日期]2020-06-19