

本文引用: 吴婧艺, 李 扬, 钱亚男, 张鑫源, 曹玉净. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染慢性骨髓炎大鼠胫骨骨缺损模型的构建与评估[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(10): 1831–1838.

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染慢性骨髓炎大鼠 胫骨骨缺损模型的构建与评估

吴婧艺¹, 李 扬², 钱亚男¹, 张鑫源¹, 曹玉净^{2*}

1.河南中医药大学骨伤学院,河南 郑州 450046;2.河南省中医院(河南中医药大学第二附属医院),河南 郑州 450002

〔摘要〕 目的 构建评估耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)(ATCC 43300)感染的胫骨骨缺损大鼠慢性骨髓炎模型。方法 50 只 Wistar 大鼠随机分为 5 组:对照组与 MRSA 感染浓度梯度组(A 组 1×10^5 CFU/mL、B 组 1×10^7 CFU/mL、C 组 1×10^9 CFU/mL、D 组 1×10^{11} CFU/mL),每组 10 只。在大鼠左侧胫骨制造骨缺损后采用直接注射法造模。术后 4 周,观察大体情况并进行 Petty 外观评分,ELISA 检测血清 C 反应蛋白(CRP)含量,行 X 线、微计算机断层扫描(micro-CT)影像学检查并进行 X 线 Norden 骨髓炎评分,HE 染色观察组织变化并进行 Smeltzer 病理学评分,细菌培养检测菌落计数。结果 在术后 4 周,与对照组相比,C 组与 D 组的 Petty 外观评分均升高($P < 0.01$);与 A 组相比,D 组 Petty 外观评分升高($P < 0.05$)。术后 4 周,与对照组及 A 组相比,B、C 与 D 组 CRP 含量均升高($P < 0.05$);与 B 组相比,C 组和 D 组 CRP 含量均升高($P < 0.05$);与 C 组相比,D 组 CRP 含量升高($P < 0.05$)。术后 4 周,与对照组相比,C 组和 D 组的 X 线 Norden 骨髓炎评分均升高($P < 0.01$),菌落数量均增加($P < 0.01$),B、C 与 D 组 Smeltzer 病理学评分均升高($P < 0.01$);与 A 组相比,D 组 X 线 Norden 骨髓炎评分升高($P < 0.01$),菌落数量增加($P < 0.05$),B、C 和 D 组 Smeltzer 病理学评分均升高($P < 0.01$);与 B 组相比,C 组和 D 组 Smeltzer 病理学评分均升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。结论 直接注射 $10 \mu\text{L}$ 浓度为 1×10^9 CFU/mL 的 MRSA (ATCC 43300)菌液于大鼠胫骨骨缺损处,可显著升高 CRP 含量与细菌负荷,诱发与慢性骨髓炎相符的病理表现,成功构建出稳定可靠的慢性骨髓炎动物模型。

〔关键词〕 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌;慢性骨髓炎;动物模型;骨缺损;胫骨感染;模型构建

〔中图分类号〕R274

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.10.005

Establishment and evaluation of a chronic osteomyelitis model with a tibial bone defect induced by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in rat

WU Jingyi¹, LI Yang², QIAN Ya'nan¹, ZHANG Xinyuan¹, CAO Yujing^{2*}

1. School of Orthopedics and Traumatology, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan 450046, China;

〔收稿日期〕2025-08-01

〔基金项目〕河南省科技攻关项目(252102311254, 242102310108);河南省中医药科学研究专项课题(2023ZY1008);河南中医药大学科研创新项目(2024KYCX07)。

〔通信作者〕* 曹玉净,男,博士,主任医师,博士生导师,E-mail:Bravecao@163.com。

2. *Henan Hospital of Traditional Chinese Medicine (The Second Hospital of Henan University of Chinese Medicine),*

Zhengzhou, Henan 450002, China

[Abstract] **Objective** To establish and evaluate a rat model of chronic osteomyelitis induced by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (ATCC 43300) infection in a tibial bone defect. **Methods** Fifty Wistar rats were randomized into five groups ($n=10$ per group): a control group and four MRSA infection groups with concentration gradients (Group A: 1×10^5 CFU/mL, Group B: 1×10^7 CFU/mL, Group C: 1×10^9 CFU/mL, Group D: 1×10^{11} CFU/mL). A bone defect was created in the left tibia of all rats, and the model was established using the direct injection method. At 4 weeks post-surgery, the rat general condition was observed and the wounds were assessed using the Petty appearance scoring system; serum C-reactive protein (CRP) level was measured by ELISA; X-ray and micro-computed tomography, micro-CT imaging were performed, followed by X-ray Norden osteomyelitis scoring; histopathological changes were observed via HE staining and evaluated using the Smeltzer pathological scoring system; bacterial colony counts were determined through bacterial culture. **Results** At 4 weeks post-surgery, compared with the control group, the Petty appearance scores of Groups C and D significantly increased ($P<0.01$); compared with Group A, the Petty appearance score of Group D significantly increased ($P<0.05$). At 4 weeks post-surgery, compared with the control group and Group A, the CRP levels in Groups B, C, and D were significantly elevated ($P<0.05$); compared with Group B, the CRP levels in Groups C and D significantly increased ($P<0.05$); compared with Group C, the CRP level in Group D was significantly higher ($P<0.05$). At 4 weeks post-surgery, compared with the control group, the X-ray Norden osteomyelitis scores and bacterial colony counts in Groups C and D significantly increased ($P<0.01$), and the Smeltzer pathological scores in Groups B, C, and D were significantly elevated ($P<0.01$). Compared with Group A, the X-ray Norden osteomyelitis score and bacterial colony count in Group D were significantly higher ($P<0.01$ and $P<0.05$, respectively), and the Smeltzer pathological scores in Groups B, C, and D significantly increased ($P<0.01$). Compared with Group B, the Smeltzer pathological scores in Groups C and D were significantly elevated ($P<0.05$ and $P<0.01$, respectively). **Conclusion** Direct injection of $10 \mu\text{L}$ of 1×10^9 CFU/mL MRSA (ATCC 43300) into the rat tibial bone defect can significantly elevate the CRP level and bacterial load, inducing pathological manifestations consistent with chronic osteomyelitis, and thus can successfully establish a stable and reliable animal model for chronic osteomyelitis.

[Keywords] methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; chronic osteomyelitis; animal model; bone defect; tibial infection; model establishment

慢性骨髓炎是骨组织的持续性感染性疾病,归属于中医学“附骨疽”范畴,以骨形成-吸收失衡、骨量丢失、坏死及炎症浸润为主要特征,常继发于创伤骨折、内固定手术、血性播散及糖尿病足溃疡^[1-2]。其治疗以局部清创联合抗生素及骨移植为主,但复发率高,患者常需多次手术,疗效欠佳,或致肢体畸形甚至截肢,极大降低生活质量,是临床治疗的棘手问题^[3-4]。在致病病原体中,金黄色葡萄球菌最为常见,

尤其是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA),临床检出率超过 50%^[5-6]。MRSA 可通过降低与抗生素的亲合力、改变靶点及增加药物外排,对抗生素产生耐药性,从而导致治疗的复杂性进一步加剧^[7]。目前,对 MRSA 感染的骨髓炎病理机制与宿主免疫应答规律仍缺乏充分认知,亟待开发针对耐药菌的理想治疗方案。

选择合适的动物模型以精准模拟人类骨髓炎病

理特征,并有效控制影响临床表现的多变量,是医学研究的重要组成部分^[8]。然而,目前慢性骨髓炎动物模型的构建尚未形成有效且统一的标准化方案,其稳定性与可重复性受多种因素制约,包括菌种选择、接种途径、菌量、植入物类型与位置、骨缺损尺寸等,即使剔除多数混杂变量,依旧难以实现标准化定量^[9-10]。其中,菌液浓度是关键影响因素,浓度过低造模不易成功,过高则易造成实验动物死亡^[11]。因此,本研究选用 MRSA 标准菌株 ATCC 43300,聚焦于菌液浓度这一关键变量,采用直接注射法在大鼠胫骨骨缺损处注入不同浓度的菌液构建感染模型,筛选最佳菌液浓度,以建立稳定高效的 MRSA 骨髓炎大鼠模型,为后续抗耐药菌药理机制及骨再生策略研究提供可靠基础。

1 实验材料

1.1 实验动物

50 只成年雄性 Wistar 大鼠,6~8 周龄,体质量 250~300 g,购自辽宁长生生物技术股份有限公司[动物生产许可证号:SCXK(辽)2020-0001],分笼饲养于河南省中医院中心实验室动物房。所有大鼠在光照/暗循环 12 h,温度(23±2)℃、湿度 50%±20%环境下自由饮水和摄食。所有实验都得到河南省中医院伦理委员会的批准,批准号:PZ-HNSZYY-2021006。所有操作均在伦理委员会的监督及指导下,严格按照动物实验相关规范进行。

1.2 主要试剂与耗材

MRSA(ATCC 43300)购自河南省工业微生物菌种工程技术研究中心,批号 241127;三溴乙醇购自北京普西唐生物科技有限公司,货号 T70002;组织固定液、HE 染色试剂盒均购自武汉赛维尔生物科技有限公司,货号 G1101、G1076;EliKine™ 大鼠 C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)ELISA 定量试剂盒购自武汉亚科因生物科技有限公司,货号 KTE4034;0.01 mol/L PBS(pH7.0~7.2)购自北京赛诺普科学仪器技术有限公司,货号 PB180329。

1.3 主要仪器

酶标检测仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司,型号 MR-96A);轮式病理切片机(德国 Leica 公司,型号 RM2265);4℃离心机(北京开源国创科技有限公司,型号 CF1524R);电动光学显微镜(北京百道亨仪器设备有限公司,型号 BX63);微型手持式颅钻(深圳市瑞沃德生命科技有限公司,型号 78001);超低温冰箱(中科美菱低温科技股份有限公司,型号 DW-HL100);电子天平(上海力辰仪器科技有限公司,型号 JT3003D);超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司,型号 SW-CJ-2D);组织摊片机(浙江省金华市科迪仪器公司,型号为:KD-P);全封闭式组织脱水机(武汉俊杰电子有限公司,型号:JJ-12J);恒温箱(上海百典仪器设备有限公司,型号 DHP-9031)。

2 方法

2.1 动物分组、菌液制备及造模过程

2.1.1 动物分组 经适应性喂养 1 周后,所有大鼠饮食、活动等状态均无明显差异,随后随机划分为 5 组:对照组以及 4 个 MRSA 感染浓度梯度组(A 组:1×10⁵ CFU/mL、B 组:1×10⁷ CFU/mL、C 组:1×10⁹ CFU/mL、D 组:1×10¹¹ CFU/mL),每组 10 只。

2.1.2 菌液制备 取 MRSA(ATCC 43300)标准菌株,接种于 LB 液体培养基,置于 37℃、180 r/min 的恒温振荡培养箱中过夜培养(12~16 h)。在生物安全柜内操作,4℃、3 000×g 离心 10 min 后弃去上清。根据预先建立的 OD₆₀₀ 值与细菌浓度的标准曲线,使用无菌生理盐水重悬并稀释菌体,调整至上述各目标浓度,现配现用或 4℃保存不超过 2 h。

2.1.3 造模过程 参考李江笔^[12]的方法造模:术前 6 h 禁食禁水,称量体重,按 10 mL/kg 的剂量,将 1.25%浓度的三溴乙醇经腹腔注射对大鼠进行麻醉,仰卧位固定;常规脱毛、备皮,使用聚维酮碘消毒液对大鼠左后肢进行常规消毒;取大鼠胫骨结节作为体表标志物,以胫骨结节内侧 3 mm、关节线下

3 mm 处为起点,锐性切开皮肤后钝性分离肌筋膜组织,充分显露胫骨内侧骨面;选取平坦处用颅钻做 3 mm×5 mm 皮质骨缺损,在即将钻入骨髓时停止钻孔,钻孔后有液体渗出可用棉球清理,直至无渗出或渗出缓慢;用移液枪吸取相应剂量的菌液或生理盐水至骨缺损位置,其中对照组注射 10 μ L 生理盐水,A~D 组分别注射 10 μ L 的浓度为 1×10^5 、 1×10^7 、 1×10^9 、 1×10^{11} CFU/mL MRSA(ATCC 43300)菌液,然后逐层缝合软组织及皮肤。按照统一标准,分笼饲养。最终因感染死亡或剔除,每组有效样本量为 $n=6$ 。

2.2 观测指标

2.2.1 造模术后大体观察及 Petty 外观评分 术后 4 周,观察各组大鼠大体情况并对手术部位进行拍照。根据观察及照片结果,按照 Petty 外观评分标准进行评分,包括手术部位发红、渗出、肿胀及创口愈合状态等指标,总分 5 分,评分越高,提示手术部位感染及损伤程度越严重^[13]。

2.2.2 血清 CRP 含量检测 术后 4 周,将大鼠放入采血罐中,露出尾部,乙醇消毒后剪去末端 3~4 mm,采血 2 mL 左右止血;全血样本收集于血清分离管中,室温静置 2 h;随后离心 20 min,吸取上清液,分装冻存于 -80 $^{\circ}$ C,检测前避免反复冻融。

2.2.3 影像学观察 术后 4 周行 X 线片。按照改良 X 线 Norden 骨髓炎评分标准进行半定量评估,总评分 7 分,评分越高感染程度越严重^[14-15]。此外,将行 X 线拍摄后的大鼠进行麻醉,置于超净台中取其胫骨组织样本,经微计算机断层扫描(micro-computed tomography, micro-CT)获取三维重建图像。

2.2.4 组织学观察 术后 4 周,将采集的大鼠胫骨标本置入 4%多聚甲醛固定液固定 48 h,采用 EDTA 脱钙液脱钙,再经乙醇脱水,随后将胫骨组织包埋进石蜡中,做纵断面切片行 HE 染色,之后置于高倍显微镜下观察并拍照。采用 SMELTZER 等^[16]的炎症评分系统进行病理学评分,包括髓腔内急性炎

性反应、髓腔内慢性炎性反应、骨膜炎性反应及骨坏死等项目,所有参数以 5 分制评分(0~4 分),各参数之和计算为组织学评分^[12,16]。

2.2.5 细菌学检查 术后 4 周,于超净台内取麻醉大鼠骨损伤处软组织(2 mm×3 mm)或使用无菌微量移液器吸取 10 μ L 深部脓液,立即投入 1 mL 无菌 PBS 中,0.5 h 后取 100 μ L 上述液体均匀涂布于无菌固体培养基平板,37 $^{\circ}$ C 过夜培养后行菌落计数。

2.3 统计学分析

使用 GraphPad Prism 9.5.1 软件进行统计分析。计量数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。先采用 Shapiro-Wilk 检验评估数据正态性,若数据符合正态分布且方差齐,则使用单因素方差分析;若方差不齐,则采用 Welch 校正后单因素方差分析;对非正态分布数据,则使用 Kruskal-Wallis H 非参数检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 造模术后大体情况观察及 Petty 外观评分

术后 4 周,对照组与 A 组大鼠创口基本愈合,无感染征象,整体状态良好;B 组大鼠术肢活动恢复,骨形态正常,但 50%创口未完全愈合,轻微开裂伴局部皮肤脓肿及溃破;C 组创口持续脓肿,可见窦道形成及骨形态异常增生;D 组感染情况最重,创口红肿开裂并伴脓性渗出,其中 3 例合并腹水及尾部坏死(断尾)等全身症状,2 只术肢畸形短缩并累及关节,另有 2 只大鼠分别于术后第 13 天、第 23 天因严重感染死亡,其余各组均无大鼠死亡,以上结果表明感染程度随 MRSA 浓度的升高而加剧。各组大鼠创口情况详见图 1。

Petty 外观评分结果显示,术后 4 周,与对照组相比,C 组和 D 组 Petty 外观评分均升高($P<0.01$);与 A 组相比,D 组 Petty 外观评分升高($P<0.05$)。详见表 1。



图 1 术后 4 周各组大鼠手术部位情况观察

Fig.1 Gross appearance of rat surgical sites in each group at 4 weeks post-surgery

表 1 术后 4 周各组大鼠创口 Pretty 外观评分比较
(分, $\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Comparison of Petty appearance scores of rat wounds among different groups at 4 weeks post-surgery (points, $\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	术后 4 周
对照组	1.00±0.00
A 组	2.00±0.89
B 组	3.00±0.89
C 组	3.83±0.41**
D 组	4.17±0.75**#

注:与对照组比较,** $P<0.01$,与 A 比较,* $P<0.05$ 。

3.2 血清 CRP 含量变化

术后 4 周,与对照组相比,B、C 和 D 组 CRP 含量均升高($P<0.05$);与 A 组相比,B、C 和 D 组 CRP 含量均升高($P<0.05$);与 B 组相比,C 组和 D 组 CRP 含量均升高($P<0.05$);与 C 组相比,D 组 CRP 含量升高($P<0.05$)。详见表 2。

3.3 影像学观察

术后 4 周,X 线扫描结果显示,对照组胫骨骨质

表 2 术后 4 周各组大鼠血清 CRP 含量变化
(mg/mL, $\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Changes in rat serum CRP levels in each group at 4 weeks post-surgery (mg/mL, $\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	术后 4 周
对照组	6.43±0.18
A 组	6.99±0.63
B 组	11.10±0.96*#
C 组	18.90±0.89*#△
D 组	21.50±0.97*#△▲

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与 A 组比较,* $P<0.05$;与 B 组比较, $\Delta P<0.05$;与 C 组比较,▲ $P<0.05$ 。

结构完整,未见死骨、骨质破坏、骨质增生及软组织包块影,影像学表现正常;A 组胫骨骨质结构大致正常,部分见胫骨变宽,疑似骨质破坏、轻度增生及软组织包块影,未见明确死骨形成,可能存在轻度病变;B 组胫骨出现可疑死骨,伴明确骨质破坏、增生及软组织包块影,病变程度较 A 组加重;C 组和 D 组胫骨均见明确死骨,且骨质破坏、异常增生及脓肿包块的表现均较为显著,病变程度严重。详见图 2。

Micro-CT 扫描结果显示,对照组胫骨各层面完整,未见异常;A 组骨缺损边缘轻度不整,轻微增生,未见死骨;B 组骨缺损范围扩大,破坏程度较 A 组加重,部分出现可疑死骨,骨质增厚;C 组骨破坏加剧,出现明确死骨,骨质增生、软组织肿胀明显;D 组骨缺损严重,大量死骨形成,增生极为显著,软组织肿胀严重。详见图 3。



对照组 A 组 B 组 C 组 D 组

图 2 术后 4 周各组大鼠 X 线影像

Fig.2 X-ray images of rats in each group at 4 weeks post-surgery

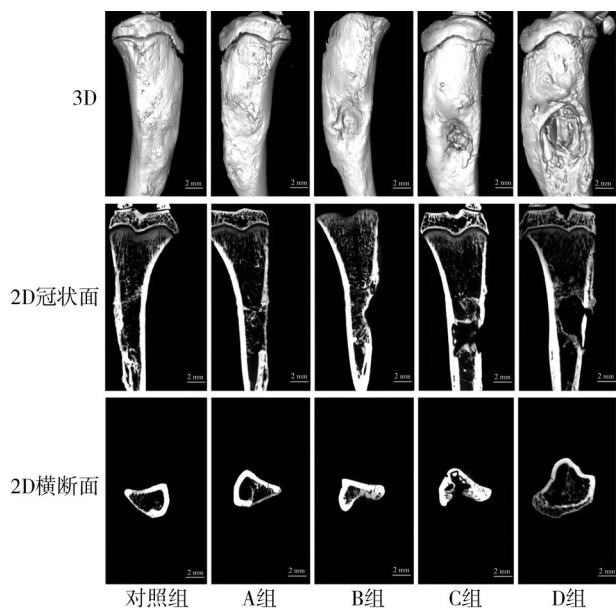


图3 术后4周各组大鼠 micro-CT 扫描重建图
(标尺=2 mm)

Fig.3 Reconstructed micro-CT images of rats in each group at 4 weeks post-surgery
(scale bar=2 mm)

3.4 组织学观察

术后4周,各组大鼠 HE 染色结果显示,对照组骨组织形态结构完整,骨基质呈均匀粉红色,骨细胞分布规则、密度正常,未见炎症细胞浸润、组织破坏及纤维结缔组织异常增生,骨髓腔形态规整,呈现正常骨组织的生理结构特征;A 组骨组织呈轻度损伤,骨基质连续性部分中断,局部骨小梁间可见少量炎症细胞浸润(以淋巴细胞为主),伴散在血管充血,骨干结构基本保留,新生骨、纤维结缔组织增生不明显,骨髓腔形态无显著狭窄,提示处于炎症轻度进展

阶段,部分标本的炎症反应和细菌负荷极轻,可忽略不计;B 组骨组织一侧损伤显著,原有骨干结构部分消失,可见大量新生骨无序排列,并侵入骨髓腔,增生的纤维结缔组织广泛分布,伴大量淋巴细胞浸润及局部出血,骨髓腔明显狭窄,未见脓肿及坏死骨碎片,提示炎症反应虽活跃,但以组织修复性增生为主要表现;C 组骨组织损伤严重,骨髓腔与骨干结构缺失,可见大量死骨及骨细胞坏死消失,损伤周围可见较多增生的纤维结缔组织与新生骨,并向骨髓腔深入,致骨髓腔显著狭窄,增生的结缔组织内可见大量的淋巴细胞浸润,偶见小脓肿,脓肿内可见少量的脓细胞,伴微小出血灶,提示炎症严重且持续进展,组织坏死与修复性重塑并存;D 组骨组织损伤极重,骨髓腔内可见大量脓肿,脓肿内可见大量的脓细胞,周围纤维结缔组织和新生骨显著增生,骨干坏死,骨细胞消失,被纤维结缔组织取代,结缔组织内淋巴细胞和粒细胞广泛浸润,提示感染程度最重,炎症反应、组织坏死与化脓性病变同步进展。详见图4。

3.5 各组大鼠 X 线 Norden 骨髓炎评分、菌落计数、Smeltzer 病理学评分比较

术后4周,与对照组相比,C 组和 D 组的 X 线 Norden 骨髓炎评分均升高($P<0.01$),菌落数量均增加($P<0.01$),B、C 与 D 组 Smeltzer 病理学评分均升高($P<0.01$);与 A 组相比,D 组 X 线 Norden 骨髓炎评分升高($P<0.01$),菌落数量增加($P<0.05$),B、C 和 D 组 Smeltzer 病理学评分均升高($P<0.01$);与 B 组相比,C 组和 D 组 Smeltzer 病理学评分均升高($P<0.05$, $P<0.01$)。详见表3。

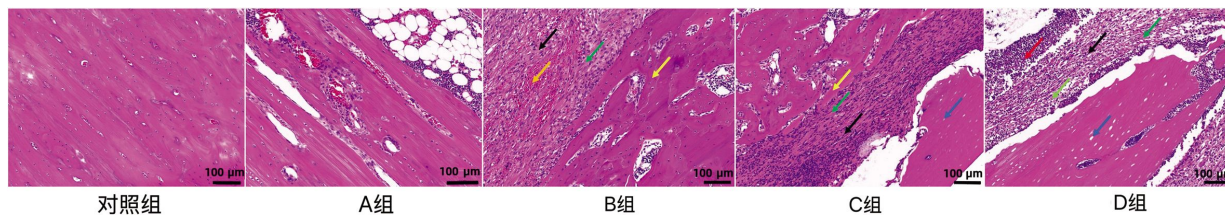


图4 术后4周各组大鼠胫骨 HE 染色($\times 200$)

Fig.4 HE Staining of rat tibia in each group at 4 weeks post-surgery ($\times 200$)

注:黑色箭头为淋巴细胞;橙色箭头为出血灶;绿色箭头为纤维结缔组织;黄色箭头为新生骨;蓝色箭头为骨细胞坏死消失;红色箭头为脓细胞;青色箭头为粒细胞。

表 3 术后 4 周各组大鼠 X 线 Norden 骨髓炎评分、菌落计数、Smeltzer 病理学评分比较($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 3 Comparison of X-ray Norden osteomyelitis scores, bacterial colony counts, and Smeltzer pathological scores among different groups of rats at 4 weeks post-surgery ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	X 线 Norden 骨髓炎评分/分	菌落计数($\times 10^3$ CFU/mL)	Smeltzer 病理学评分/分
对照组	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.83 $\pm$ 0.75
A 组	1.25 $\pm$ 0.76	0.17 $\pm$ 0.09	2.17 $\pm$ 1.72
B 组	4.83 $\pm$ 0.88	1.00 $\pm$ 0.40	8.67 $\pm$ 2.34***
C 组	6.00 $\pm$ 0.32**	1.60 $\pm$ 0.34**	12.00 $\pm$ 2.61*** Δ
D 组	6.58 $\pm$ 0.38***	2.01 $\pm$ 0.30***	13.50 $\pm$ 1.52*** $\Delta\Delta$

注:与对照组比较,** $P<0.01$;与 A 组比较,* $P<0.05$,*** $P<0.01$;与 B 组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

4 讨论

MRSA(ATCC 43300)是近年来骨髓炎机制研究中广泛使用的标准菌株^[7],本研究团队前期已证实中药复方清髓消炎汤可有效抑制其生物膜的形成^[8]。为推动基础研究成果临床转化,本研究以该菌株为致病菌,选用与人类生理特征相近且操作便捷的大鼠,采用直接注射法建立模型,避免内置物、人为骨折等复杂干扰因素^[10],更贴近临床慢性骨髓炎晚期伴骨缺损的病理状态。菌液浓度的高低直接决定着模型构建的成功与否^[9]。本次研究结果显示,1 $\times 10^7$ CFU/mL 浓度组(B 组)无动物死亡,与对照组相比,Petty 外观评分、X 线 Norden 骨髓炎评分、菌落计数无显著差异,血清 CRP 含量、Smeltzer 病理学评分降低,仅部分样本达到慢性骨感染标准,感染效果不佳;1 $\times 10^9$ CFU/mL 浓度组(C 组)上述检测指标均高于对照组,同时表现出骨质破坏、死骨形成及持续性炎症浸润,不仅感染率高而且无动物死亡,稳定性以及重复性良好;1 $\times 10^{11}$ CFU/mL 浓度组(D 组)上述检测指标虽然优于 1 $\times 10^9$ CFU/mL 浓度组(C 组),但因细菌负荷过高,动物死亡率达 20%,无法满足实验稳定性需求。综上,1 $\times 10^9$ CFU/mL 被确定为最优接种浓度。该浓度低于文献报道的金黄色葡萄球菌造模浓度(1 $\times 10^{11}$ CFU/mL),提示 MRSA 因表达纤溶酶敏感蛋白等毒力因子,更易在骨组织定植,故仅需较低浓度即可诱发感染^[12,19]。

从中医理论视角分析,本研究实验现象与中医学“附骨疽”的病机阐释高度契合。《灵枢·痈疽》载:“热气淳盛,下陷肌肤,筋髓枯,内连五脏,血气竭,当其痛下,筋骨内肉皆无余,故命曰疽。”MRSA 感染后出现的骨质破坏与异常增生并存现象,正符合“热毒

壅滞,蚀骨化脓”的核心病机,即热毒之邪侵袭骨络,致气血运行受阻,壅滞日久则腐骨化脓,表现为骨结构破坏与死骨形成;而骨组织异常增生是机体正气抗邪外出、力图修复的表现,但因邪毒壅盛,正气无力彻底祛邪,反致病理性代偿增生,最终形成“邪正相持”的胶着状态。结合 HE 染色结果进一步可见,不同菌液浓度组对应“附骨疽”不同证型阶段:1 $\times 10^7$ CFU/mL(B 组)浓度组以淋巴细胞浸润、修复性增生为主,属“热毒炽盛证(急发期)”;1 $\times 10^9$ CFU/mL 浓度组(C 组)呈现纤维增生与死骨并存,属“正虚毒恋证(迁延期)”;1 $\times 10^{11}$ CFU/mL 浓度组(D 组)伴重度骨坏死与腹水、断尾等全身症状,进展为“脾肾两虚证(危重期)”,病理损伤梯度与证型演变高度同步。其中,腹水的形成可归因于脾失健运,水湿内停;断尾则提示毒邪久羁、耗伤肾中精气,属“久疽及肾”的危重表现,这与中医“邪盛正衰”理论形成互证——高浓度菌液相当于“邪毒炽盛”,超出正气抵御能力,不仅加剧局部蚀骨化脓,更循经入里伤及脏腑,最终引发动物死亡,直观呈现“附骨疽”病程中“正邪消长”的核心病机规律。

本实验也存在一定的局限性。仅以术后第 4 周为单一观测时间点,实验周期较短,难以完整呈现慢性骨髓炎感染进展与骨破坏的长期动态。未来研究可延长观察周期并设置多时间点监测,同时补充 micro-CT 骨计量学等指标,进一步完善模型评估体系。

综上所述,直接注射 10 μ L 1 $\times 10^9$ CFU/mL MRSA(ATCC 43300)菌液于大鼠左侧胫骨内侧 3 mm $\times$ 5 mm 骨缺损处,可有效感染缺损部位,显著升高 CRP 含量与细菌负荷,诱发与慢性骨髓炎相符的病

理表现,且感染率高、稳定性好。该模型精准模拟附骨疽“热毒壅滞、正虚毒恋”的病理特征,为进一步探讨清髓消炎汤“清热解毒、益气活血、祛腐生肌”功效及其多靶点作用机制提供了理想的实验平台,也为抗感染骨修复材料的研发与转化奠定了研究基础。

参考文献

- [1] 甘锋平. 小檗碱联合万古霉素对钛合金表面生物膜形成的影响及抗菌机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2024.
- [2] 黄鹏程, 杨思敏, 钟文龙, 等. 基于“动定-序贯八法”理论探讨慢性骨髓炎的辨证论治[J]. 亚太传统医药, 2020, 16(4): 191-194.
- [3] 石守印, 周敏, 海拉提·巴合提, 等. 骨搬运结合载药硫酸钙治疗股骨慢性骨髓炎的疗效[J]. 实用骨科杂志, 2025, 31(5): 457-461.
- [4] 钱亚男, 吕秋霞, 李扬, 等. 基于网络药理学与体外实验研究清髓消炎汤治疗骨髓炎的作用机制[J]. 云南民族大学学报(自然科学版), 2023, 32(2): 151-164.
- [5] WEN H J, CHEN Z, CUI Y, et al. LncRNA NONHSAT009968 inhibits the osteogenic differentiation of hBMSCs in SA-induced inflammation via Wnt3a[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2021, 577: 24-31.
- [6] MASTERS E A, RICCIARDI B F, DE MESY BENTLEY K L, et al. Skeletal infections: Microbial pathogenesis, immunity and clinical management[J]. Nature Reviews Microbiology, 2022, 20(7): 385-400.
- [7] LIU W T, CHEN E Z, YANG L, et al. Emerging resistance mechanisms for 4 types of common anti-MRSA antibiotics in *Staphylococcus aureus*: A comprehensive review[J]. Microbial Pathogenesis, 2021, 156: 104915.
- [8] 田冬子, 沈伟伟, 李文帅, 等. 羊胫骨慢性骨髓炎模型的构建及评价[J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(14): 2937-2942.
- [9] 孙智, 隋钧皓, 章浩. SD大鼠股骨慢性骨髓炎模型构建与评价[J]. 海军军医大学学报, 2024, 45(5): 552-557.
- [10] 刘金月, 章猛奇, 卿明松, 等. 金黄色葡萄球菌性骨髓炎动物模型构建的研究与进展[J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(14): 2256-2262.
- [11] 邵陇龙, 甄平, 马永海, 等. 不同浓度耐甲氧西林金黄色葡萄球菌制备慢性骨髓炎模型对比研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2018, 32(4): 412-419.
- [12] 李江笔. 冲击波辅助抗生素治疗成骨细胞内金黄色葡萄球菌感染及机制研究[D]. 长春: 吉林大学, 2023.
- [13] PETTY W, SPANIER S, SHUSTER J J, et al. The influence of skeletal implants on incidence of infection. Experiments in a canine model[J]. The Journal of Bone and Joint Surgery American Volume, 1985, 67(8): 1236-1244.
- [14] NORDEN C W, SHINNERS E, NIEDERRITER K. Clindamycin treatment of experimental chronic osteomyelitis due to *Staphylococcus aureus*[J]. The Journal of Infectious Diseases, 1986, 153(5): 956-959.
- [15] 陈立喜, 陈元良, 卓泽铭, 等. 利奈唑胺对 MRSA 感染致慢性骨髓炎大鼠细菌负荷和骨修复的影响[J]. 天津医药, 2023, 51(7): 729-733.
- [16] SMELTZER M S, THOMAS J R, HICKRAON S G, et al. Characterization of a rabbit model of staphylococcal osteomyelitis[J]. Journal of Orthopaedic Research, 1997, 15(3): 414-421.
- [17] MLAMBO L K, ABBASILIASI S, TANG H W, et al. Bioactive metabolites of *Lactiplantibacillus plantarum* K014 against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ATCC43300 and in vitro evaluation of its antibacterial, antioxidant and anti-inflammatory activities[J]. Current Microbiology, 2022, 79(12): 359.
- [18] 钱亚男, 吕秋霞, 李扬, 等. 基于生物膜探讨清髓消炎汤对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的抑菌作用及其机制研究[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(10): 2377-2382.
- [19] BLEIZIFFER I, EIKMEIER J, POHLENTZ G, et al. The plasmin-sensitive protein *pls* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a glycoprotein[J]. PLoS Pathogens, 2017, 13(1): e1006110.

(本文编辑 陈晨)