

DOI: 10.14188/j.1671-8852.2025.0092

文章编号 1671-8852(2026)03-0292-05

ST22-t309 型金黄色葡萄球菌诱导的慢性化脓性 中耳炎对小鼠听力的影响

李采霓 贺祖宏 陈 雄

武汉大学中南医院耳鼻咽喉头颈外科 武汉 湖北 430071

摘要 目的:探讨ST22-t309型金黄色葡萄球菌诱导的慢性化脓性中耳炎对小鼠听力的影响。方法:使用ST22-t309型金黄色葡萄球菌耳后听泡内注射的方法构建慢性中耳炎的小鼠模型,选取合适的金黄色葡萄球菌菌液浓度给予模型组小鼠注射,对照组注射同等量的生理盐水。随后,通过听性脑干反应(ABR)检测小鼠的听力水平,Micro CT观察小鼠中耳结构变化,免疫荧光观察小鼠内耳毛细胞的损伤情况。结果:选择600 nm光密度(OD_{600})=0.6的菌液作为后续实验的注射液可以构建较为长期且稳定的小鼠慢性中耳炎模型。与对照组相比,模型组小鼠听力水平明显下降,ABR检测波形紊乱,听力阈值明显升高($P<0.05$)。Micro CT显示模型组小鼠中耳结构较对照组未出现明显改变。此外,免疫荧光染色提示模型组小鼠内耳毛细胞出现大面积损伤,且与ABR检测结果相一致,而对照组小鼠内耳毛细胞基本完好。结论:金黄色葡萄球菌诱导的中耳炎可能通过损伤内耳毛细胞造成小鼠永久性听力损失。

关键词 金黄色葡萄球菌;中耳炎;听力损失

中图分类号 R764.21

文献标志码 A

Effect of chronic suppurative otitis media induced by ST22-t309- *Staphylococcus aureus* on hearing in mice

LI Caini, HE Zuhong, CHEN Xiong

Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Zhongnan Hospital of Wuhan University,
Wuhan 430071, Hubei, China

Abstract

Objective: To investigate and analysis the effect of chronic otitis media induced by ST22-t309-*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) on hearing in mice. **Methods:** The mouse model of chronic otitis media was constructed by using intra-auricular injection of ST22-t309-*S. aureus*. The mice were divided into control and model groups, and the appropriate concentration of *S. aureus* solution was injected into the model group, while the control group was injected with the same amount of saline. Subsequently, the hearing level of the mice was detected by auditory brainstem response (ABR), the structural changes of the middle ear were observed by Micro CT, and the damage of the inner ear hair cells was observed by immunofluorescence. **Results:** The bacterial solution with optical density at 600 nm (OD_{600})=0.6 was chosen as the injection solution in the subsequent experiments, as it could construct a more long-term and stable model of chronic otitis media. Compared with those in the control group, the mice in the model group showed a significant decrease in hearing level, disturbed wave-

课题来源:国家自然科学基金面上项目(编号:82271183)。

作者简介:李采霓,女,2000—,医学硕士生,主要从事中耳炎的基础研究,E-mail:licaini1234@163.com。

通信作者:陈雄,E-mail:zn_chenxiong@whu.edu.cn。

forms in the ABR test, and significantly higher hearing thresholds ($P < 0.05$). Micro CT showed that the middle ear structure of the mice in the model group did not show any significant changes as compared with that of the control group. In addition, immunofluorescence staining showed that the inner ear hair cells in the model group displayed large arithmetic rows, which was consistent with the results of ABR detection, while the hair cells in the control group were basically intact. **Conclusion:** *Staphylococcus aureus* induced otitis media may affect hearing in mice by damaging inner ear hair cells.

Key Words *Staphylococcus aureus*; Otitis Media; Hearing Loss

中耳炎是中耳最常见的感染性疾病之一,以中耳积液为主要症状,或伴有耳痛、耳鸣、鼓膜穿孔等^[1]。目前认为,80%左右的儿童在3岁之前会经历至少一次急性中耳炎的发作,且在之后的儿童时期会有40%左右的患儿经历多次反复发作,这一比例在发展中国家中更为突出^[1-3]。中耳炎反复发作或可导致疾病向慢性中耳炎的发展,继而导致严重颅内并发症以及不可逆的听力损失,影响患儿正常交流和认知功能发育^[2]。中耳炎因其常见多发,且在儿童群体中症状易被忽视,尤其是在贫穷地区,对儿童听力、认知及发育都带来了严重的负担。铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA)是慢性中耳炎患者的主要致病分离物^[4-5],近年来,国内慢性中耳炎的临床分离株主要以金黄色葡萄球菌为主^[5],且研究^[6-10]发现ST22-t309型金黄色葡萄球菌在感染性疾病中的占比逐渐增高且有取代现有主要流行株ST5、ST59的趋势。因此,本研究初步探究由ST22型金黄色葡萄球菌诱导的慢性中耳炎对听力损失造成的影响,以期为之防治中耳炎并发症提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物 2023—2024年从斯贝福(北京)生物科技有限公司获得的5周龄C57BL/6J小鼠,饲养于武汉大学实验动物中心。所有程序均按照动物福利机构指南进行,并经武汉大学动物实验中心实验动物管理与使用委员会批准(编号:WP20230379)。经筛选后选取听力正常且无中耳炎的小鼠,分为模型组(SA组)和对照组(CTRL组)。模型组小鼠通过手术耳后注射金黄色葡萄球菌菌液,对照组注射同等剂量的生理盐水,并在手术后持续观察小鼠鼓膜、中耳及听力状况。

1.2 菌液准备 本实验所用菌株(ST22-t309型金黄色葡萄球菌)来源于武汉大学中南医院检验科。将甘油冷冻保存的金黄色葡萄球菌在TSB琼脂板

上划线,并在37℃下培养过夜。然后,挑取单菌落置于10 mL TSB中,在37℃摇床上培养6~8 h以获取菌液。每次动物实验之前,测量了菌液的600 nm光密度(OD_{600})值,以确定浓度没有明显差异,并最终确定了体内接种的浓度 $OD_{600}=0.6$ 时的菌液。

1.3 动物模型建立 小鼠通过腹腔内注射50 mg·mL⁻¹的戊巴比妥钠进行麻醉,随后进行常规消毒以及耳后备皮,并在显微镜下进行手术。在小鼠左耳后做1~2 cm切口,分离各层筋膜及肌肉组织,充分暴露听泡结构后,在听泡上钻一小孔,8 μL的金黄色葡萄球菌或生理盐水被注射到中耳腔内^[11-12]。注射完成后使用组织胶封闭小孔以防止液体流出。接种后,小鼠保持俯卧姿势持续30 min。所有的实验均在下午进行。在接种后的14 d内密切观察所有小鼠状态、鼓膜和中耳情况。

1.4 鼓膜形态 小鼠通过腹腔内注射50 mg·mL⁻¹的戊巴比妥钠进行麻醉,充分暴露鼓膜结构,并在显微镜下拍照观察。收集各组小鼠内耳组织以备后续实验。

1.5 听性脑干反应(ABR)检测 模型建立14 d后,小鼠通过腹腔内注射50 mg·mL⁻¹的戊巴比妥钠进行麻醉,放入TDT工作站的隔音箱中,电极的正极插入小鼠大脑中线皮下,负极插入小鼠耳后皮下,地线插入对侧耳后皮下。检查电极指示灯,确认连接正常。电脑打开测试软件后分别在短声(click)和短纯音不同频率(8、16、32 kHz)刺激声下,记录小鼠听力的临界阈值。

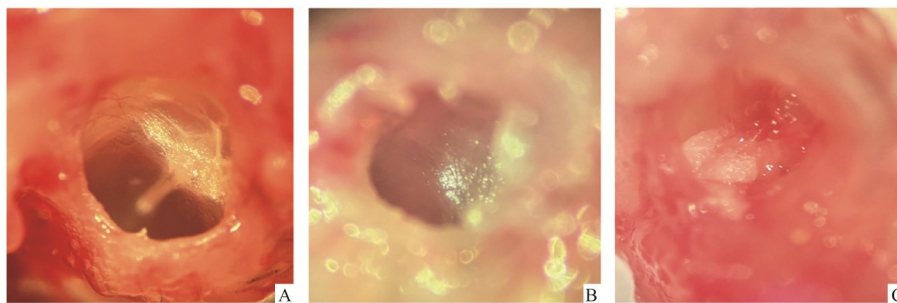
1.6 免疫荧光检测 收集各组小鼠耳蜗组织,4%多聚甲醛固定过夜后换10%的乙二胺四乙酸溶液脱钙,每天换液,连续3 d。脱钙完成后,在显微镜下分离组织取出基底膜。随后在室温下分别用4% PFA固定15 min,2% Triton X-100渗透15 min,以及10% 驴血清阻断1 h,每个步骤之间用PBS冲洗至少3次,每次5~10 min。随后用PBS稀释的Myosin7a(1:500),每孔加入100 μL后4℃孵育过夜。

用 PBS 冲洗至少 3 次,每次 5~10 min,之后加入 PBS 稀释的荧光二抗(1:500)4℃避光孵育过夜。用 PBS 避光漂洗 3 遍,每遍 10 min。加入 PBS 稀释的 DAPI(1:1 000)室温避光孵育 1 h。孵育结束后,用 PBS 漂洗 3 次,每次 10 min。取出盖玻片放在载玻片上,每个样本滴加一滴抗淬灭荧光封片剂,盖上盖玻片,在玻片边缘涂上指甲油封片,在共聚焦显微镜下拍照,并进行数据处理和分析。

1.7 统计学分析 数据分析采用 Microsoft Excel 和 GraphPad Prism 9.3.1 软件进行。两组间均值比较采用 *t* 检验。当 $P < 0.05$ 时,认为差异有统计学意义。每项实验至少进行了 3 次独立重复以确保结果的可靠性。

2 结果

2.1 注射金黄色葡萄球菌构建慢性中耳炎小鼠模型 使用不同的细菌浓度(OD_{600} 分别为 0.2、0.4、0.6、0.8)进行小鼠耳后听泡内注射,并在 3、7、14 d 后观察小鼠一般情况和中耳炎症。结果显示, $OD_{600}=0.2$ 或 0.4 时,小鼠仅在第 3 天表现出轻微中耳分泌物的增加,并在第 7 天时症状消退; $OD_{600}=0.8$ 时,小鼠在注射后 1 d 内表现出较高致死率。而 $OD_{600}=0.6$ 时,模型组小鼠在注射后 3~7 d 内表现出中耳炎症逐渐加重,包括搔耳动作的增加、耳部分泌物增多、鼓膜充血(图 1)、中耳积液等症状,并在 14 d 后持续存在。因此,我们选择 $OD_{600}=0.6$ 时的金黄色葡萄球菌菌液进行后续的实验。

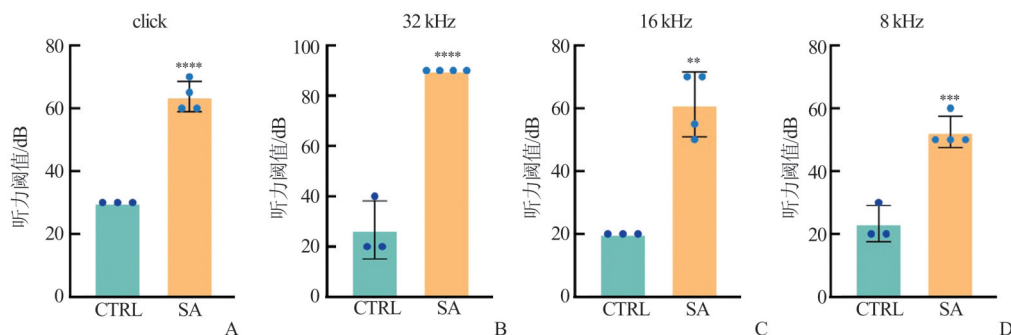


A. CTRL 组,注射生理盐水 2 周后;B. SA 组,注射金黄色葡萄球菌菌液 3 d;C. SA 组,注射金黄色葡萄球菌菌液 2 周后。

图 1 小鼠显微镜下鼓膜形态及炎症水平

2.2 金黄色葡萄球菌诱导中耳炎对小鼠听力的影响 使用 ABR 检测各组小鼠在短声(click)和短纯音不同频率(8、16、32 kHz)刺激声下的听力阈值,阈值越高提示小鼠听力水平越差。结果显示,模型组小鼠的 click 短声阈值(63.75 dB)显著高于对照组(30.00 dB)($P < 0.0001$);此外,对照组小鼠的短纯

音测试在各频率段听力基本正常,8、16、32 kHz 平均听阈分别为 23.33、20.00、26.67 dB;而模型组小鼠各频率 ABR 波形紊乱,听力阈值明显增高,在 8、16、32 kHz 的平均听阈分别为 52.50、61.25、90.00 dB,其中中高频听力受损尤为严重。各频率间差异具有统计学意义($P < 0.05$,图 2)。



A. click 阈值比较;B~D. 不同频率(8、16、32 kHz)短纯音刺激下的听力阈值; $n=4$,** $P < 0.005$,*** $P < 0.001$,**** $P < 0.0001$ 。

图 2 手术 2 周后各组小鼠的听力水平

2.3 金黄色葡萄球菌诱导中耳炎对小鼠中耳听小骨结构的影响 使用 Micro CT 观察小鼠中耳组织结构的形态变化。与对照组相比,模型组小鼠中耳

听小骨结构无明显异常,骨结构完整清晰,未见明显损伤或缺失,见图 3。提示金黄色葡萄球菌诱导中耳炎对听小骨无损伤或损伤较轻,因此模型组小

鼠听力损失并非中耳结构变化引起。

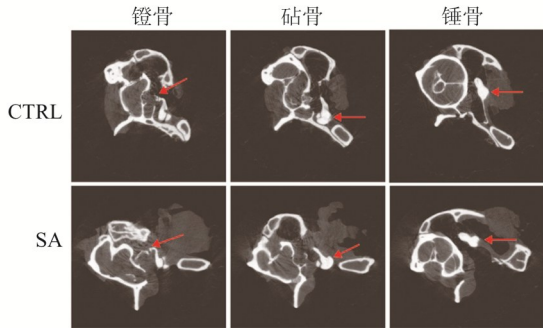


图3 两组小鼠手术2周后的听小骨 MicroCT 影像
注:图中红色箭头指示部位为相应听小骨区域。

2.4 金黄色葡萄球菌诱导中耳炎对内耳毛细胞的影响 为了判断小鼠内耳毛细胞的损伤情况,使用 Anti-Myosin VIIa 抗体特异性标记了小鼠内耳毛细胞,并在激光共聚焦显微镜下进行了观察。底转毛细胞存活率多影响高频区域听力,顶转毛细胞影响低频听力。结果(图4)显示,对照组小鼠基底膜上绿色荧光标记的毛细胞排列整齐,且没有缺损。而模型组小鼠中可见毛细胞排列稍紊乱,且绿色荧光标记的毛细胞多有缺损,尤其是在中转和底转层面上,外毛细胞出现大部分的脱落。提示模型组小鼠内耳毛细胞受损严重,且以高频区域为主,与之前检测的听力水平一致。

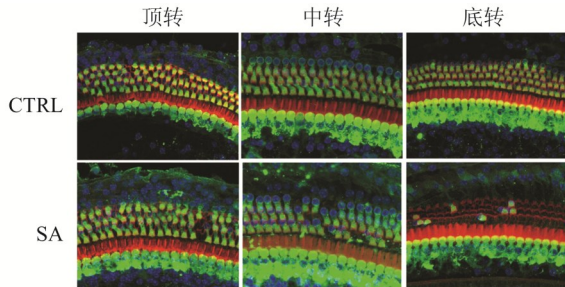


图4 两组小鼠手术2周后内耳基底膜免疫荧光染色成像

注:上图分别展示了小鼠基底膜顶、中、底转区域毛细胞的排列;红色荧光表示 Phalloidin,绿色荧光表示 Myosin VIIa,蓝色荧光表示 DAPI,放大倍数:63×。

3 讨论

听力损失通常分为外周性和中枢性,中枢性听力损失一般以听觉中枢及其传导通路障碍所致,外周性听力损失更为常见,主要包括传导性(由外耳或中耳部位传导结构功能障碍引起)和感音神经性(由耳蜗或螺旋神经节部位障碍引起)听力损失^[13]。本研究通过对模型小鼠听力水平和内耳毛细胞的检测确定了慢性中耳炎小鼠出现了感音神经性听力损失^[14]。

中耳炎是常见耳部感染性疾病,以鼓膜充血红肿穿孔、中耳渗出为主要表现。关于正式区分中耳炎由急性期转向慢性期的时间目前缺乏一个官方的统一定义,根据世界卫生组织(WHO)的报告^[15],持续2周及以上的中耳化脓性感染即可认定为慢性化脓性中耳炎。在临床实践中,部分医师的判断标准从2周到3个月不等,多有差异。中耳炎的迁延不愈或是来自鼻腔咽喉的慢性病变均会导致患者病情向慢性中耳炎发展,中耳持续的化脓性感染可能造成永久性听力损失、乳突炎甚至颅内感染等,带来严重的疾病负担^[15-16]。儿童期间中耳炎反复发作可影响患儿听力,导致语言功能形成障碍或发育迟缓^[2]。

目前根据已有的研究统计,慢性中耳炎与感音神经性听力损失之间的相关性在不断提高。有研究^[17]在慢性中耳炎患者之中观察到了一部分群体出现了感音神经性听力损失,但由于纵向研究和样本数量的缺乏,关于二者之间的具体联系以及慢性中耳炎引起听力损失的具体机制尚未有明确的说明。另有研究^[18]表明,随着年龄的增加,中耳炎相关的感音神经性听力损失的发生率也在不断增加,且损伤程度或与中耳炎持续时间呈正相关。本研究通过使用中耳炎常见菌种金黄色葡萄球菌成功诱导小鼠慢性中耳炎模型,并在2周后观察到小鼠明显的内耳毛细胞损伤和感音神经性听力损失,进一步证实慢性中耳炎与感音神经性聋之间的密切关系。具体的分子机制仍需后续实验进一步探究。

中耳炎最常见的病因是中耳的细菌感染,目前主要流行菌包括肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌等,其中慢性中耳炎患者多表现为铜绿假单胞菌或金黄色葡萄球菌感染^[19]。过往报道过的广泛流行的金黄色葡萄球菌多以 ST5、ST59 为主,且地域差别较大。在最近的临床研究中,ST22-t309 型金黄色葡萄球菌流行趋势逐渐增大,并占据优势地位,且主要在皮肤、软组织化脓性感染中检出,提示研究其针对性诊治策略的必要性。目前关于中耳炎动物模型的构建以小鼠为主,主要操作以直接向中耳腔内注射为主,包括经鼓膜注射^[11]和直接经耳后听泡内注射^[20]两种切口进行方式。本研究通过在耳后作切口直接向听泡内注射,避免了手术过程中对鼓膜造成的人为损伤,使后续实验结果更加可信。尽管已经验证了 ST22-t309 型金黄色葡萄球菌对小鼠慢性化脓性中耳炎的重要意义,但目前仍缺乏临床证据的支持,后续我们将持续收集临床样本以期提供更多有利证据。

综上所述,目前国内慢性中耳炎的主要流行菌以金黄色葡萄球菌为主,其ST22-t309型流行趋势逐渐加大。本研究以耳后听泡注射金黄色葡萄球菌诱导了小鼠慢性中耳炎模型,诱导中耳持续性炎症感染,并进一步导致了内耳毛细胞的损伤,造成小鼠永久性的听力损失。本研究揭示了ST22-t309型金黄色葡萄球菌诱导的慢性中耳炎与感音神经性耳聋之间的密切联系,为进一步防治慢性中耳炎严重并发症提供了新的理论基础。然而本研究仅在动物水平进行了初步验证,相关的分子机制仍需要后续实验进一步探索。



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

参考文献

- [1] ROVERS M M, SCHILDER A G, ZIELHUIS G A, et al. Otitis media[J]. Lancet, 2004, 363(9407): 465-473.
- [2] AARHUS L, TAMBS K, KVESTAD E, et al. Childhood otitis media: A cohort study with 30-year follow-up of hearing (the HUNT study)[J]. Ear Hear, 2015, 36(3): 302-308.
- [3] EMMETT S D, KOKESH J, KAYLIE D. Chronic ear disease[J]. Med Clin North Am, 2018, 102(6): 1063-1079.
- [4] XU F, KONG W L, PENG J J, et al. Analysis of main pathogenic bacteria and drug sensitivity in patients with chronic suppurative otitis media and middle ear cholesteatoma in China[J]. Biotechnol Lett, 2020, 42(8): 1559-1566.
- [5] XU J H, DU Q, SHU Y L, et al. Bacteriological profile of chronic suppurative otitis media and antibiotic susceptibility in a tertiary care hospital in Shanghai, China [J]. Ear Nose Throat J, 2021, 100(9): NP391-NP396.
- [6] MA M B, TAO L Y, LI X Y, et al. Changes in molecular characteristics and antimicrobial resistance of invasive *Staphylococcus aureus* infection strains isolated from children in Kunming, China during the COVID-19 epidemic[J]. Front Microbiol, 2022, 13: 944078.
- [7] FU P, NIJATI Y, LI T T, et al. Clinical and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in bone and joint infection among children[J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2023, 22(1): 104.
- [8] XIAO N, YANG J H, DUAN N, et al. Community-associated *Staphylococcus aureus* PVL⁺ ST22 predominates in skin and soft tissue infections in Beijing, China[J]. Infect Drug Resist, 2019, 12: 2495-2503.
- [9] YUAN W C, LIU J H, ZHAN Y C, et al. Molecular typing revealed the emergence of *pvl*-positive sequence type 22 methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in Urumqi, Northwestern China[J]. Infect Drug Resist, 2019, 12: 1719-1728.
- [10] XIONG M Y, ZHAO J, HUANG T, et al. Molecular characteristics, virulence gene and wall teichoic acid glycosyltransferase profiles of *Staphylococcus aureus*: A multicenter study in China[J]. Front Microbiol, 2020, 11: 2013.
- [11] XIA A P, THAI A, CAO Z X, et al. Chronic suppurative otitis media causes macrophage-associated sensorineural hearing loss[J]. J Neuroinflammation, 2022, 19(1): 224.
- [12] KHOMTCHOUK K M, KOUHI A, XIA A, et al. A novel mouse model of chronic suppurative otitis media and its use in preclinical antibiotic evaluation[J]. Sci Adv, 2020, 6(33): eabc1828.
- [13] CUNNINGHAM L L, TUCCI D L. Hearing loss in adults[J]. N Engl J Med, 2017, 377(25): 2465-2473.
- [14] HE Z H, KONG W J, ZOU S Y, et al. Editorial: Hearing loss: From pathogenesis to treatment[J]. Front Cell Neurosci, 2022, 16: 907483.
- [15] World Health Organization. Chronic suppurative otitis media: Burden of illness and management options[R]. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2004.
- [16] MONASTA L, RONFANI L, MARCHETTI F, et al. Burden of disease caused by otitis media: Systematic review and global estimates[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e36226.
- [17] PREVATT A R, SEDWICK J D, GAJEWSKI B J, et al. Hearing loss with semicircular canal transection and *Pseudomonas aeruginosa* otitis media[J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2004, 131(3): 248-252.
- [18] MAHDIANI S, LASMININGRUM L, ANUGRAH D. Management evaluation of patients with chronic suppurative otitis media: A retrospective study[J]. Ann Med Surg, 2021, 67: 102492.
- [19] DHINGRA S, VIR D, BAKSHI J, et al. Mapping of audiometric analysis with microbiological findings in patients with chronic suppurative otitis media (CSOM): A neglected clinical manifestation[J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2023, 60(3): 212-232.
- [20] 黄益飞, 金春芳, 项云, 等. 听泡穿刺注射法构建 C57BL/6 小鼠急性中耳炎模型[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2015, 50(4): 318-323.
- HUANG Y F, JIN C F, XIANG Y, et al. A mouse model for acute otitis media *via* transbullar injection[J]. Chin J Otorhinolaryngol Head Neck Surg, 2015, 50(4): 318-323.

(2025-02-07 收稿)

编辑 张 峻