

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2018.10.005

· 论 著 ·

## 免疫抑制 BALB/c 小鼠系统性白假丝酵母菌感染生物指标模型的建立

李继红, 邓洁华, 赵宜乐, 王刚生

(河北医科大学第二医院, 河北 石家庄 050000)

**[摘要]** **目的** 探讨经腹腔注射白假丝酵母菌建立免疫抑制 BALB/c 小鼠系统性感染的生物指标模型, 为研究白假丝酵母菌感染的致病机制和抗真菌药物的药效学提供相关动物模型。**方法** 对免疫抑制组 BALB/c 小鼠(腹腔注射环磷酰胺 200 mg/kg·d, 连续 2 d)经腹腔注射白假丝酵母菌增强毒力株 0.25 mL(浓度为  $1 \times 10^7$  CFU/mL)建立系统性白假丝酵母菌感染模型; 取小鼠尾静脉血进行白细胞和中性粒细胞计数, 取小鼠组织进行真菌镜检、培养、病理检查以及(1, 3)- $\beta$ -D-葡聚糖检测。**结果** 免疫抑制组与对照组小鼠用药后第 4 天白细胞计数、中性粒细胞计数、平均体重比较, 差异均具有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。白假丝酵母菌感染组生存率为 30.00%, 对照组生存率为 100.00%, 两组生存率比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。对注射真菌后第 2~14 天死亡小鼠以及第 14 天存活小鼠进行解剖, 发现肺、肝、肾组织出现多处脓肿, 以肾组织感染最为显著; 小鼠组织真菌直接镜检可见大量菌丝体, 组织培养均为白假丝酵母菌, 组织病理可见大量菌丝体、炎细胞及组织坏死。白假丝酵母菌感染组肺、肾组织(1, 3)- $\beta$ -D-葡聚糖均增高, 与对照组比较, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。**结论** 本实验方法可以成功建立免疫抑制 BALB/c 小鼠系统性白假丝酵母菌感染的动物模型。

**[关键词]** 白假丝酵母菌; 组织真菌学; 组织病理学; (1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖; 感染

**[中图分类号]** R379.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2018)10-0878-06

## Establishment of animal model of systemic *Candida albicans* infection in immunosuppressive BALB/c mice

LI Ji-hong, DENG Jie-hua, ZHAO Yi-le, WANG Gang-sheng (The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish a biological model of systemic infection in immunosuppressed BALB/c mice by intraperitoneal injection of *Candida albicans* (*C. albicans*), and provide animal model for studying the pathogenesis of *C. albicans* infection and pharmacodynamics of antifungal agents. **Methods** *C. albicans* infection model of immunosuppressed BALB/c mice (intraperitoneally injected with cyclophosphamide 200 mg/kg·d for consecutive 2 days) was established through intraperitoneal injection of 0.25 mL virulence-enhanced strain of *C. albicans* (concentration:  $1 \times 10^7$  CFU/mL). Vein blood of mice tail was taken for detecting white blood cell count and neutrophil count, mice tissue were collected for microscopic fungal examination, culture, pathological examination, and (1, 3)- $\beta$ -D-glucan detection. **Results** There were significant differences in white blood cell count, neutrophil count, and average body weight between immunosuppressive group and control group on the 4th day after treatment (all  $P < 0.05$ ). The survival rate of *C. albicans* infection group and control group were 30.00% and 100.00% respectively, difference between two groups was statistically significant ( $P < 0.05$ ). Dissection of mice which died on day 2-14 and survival mice on day 14 after injection of *C. albicans* found that there were multiple abscess in lung, liver, and kidney tissue, especially kidney infection; a large number of fungal mycelia could be seen by direct microscopic examination of mice tissue, *C. albicans* was found through tissue culture, histopathology examination showed a large

[收稿日期] 2017-12-15

[基金项目] 河北省自然科学基金(H2013206316)

[作者简介] 李继红(1971-),女(汉族),河北省石家庄市人,副主任检验师,主要从事微生物学研究。

[通信作者] 王刚生 E-mail: djh092@163.com

number of mycelia, inflammatory cells and tissue necrosis. The levels of (1,3)- $\beta$ -D-glucan in lung and kidney tissue of *C. albicans* infection group were both significantly higher than those of control group (both  $P < 0.05$ ). **Conclusion**

Animal model of systemic *C. albicans* infection in immunosuppressed BALB/c mice can be successfully established by this method.

[Key words] *Candida albicans*; tissue mycology; histopathology; (1,3)- $\beta$ -D-glucan; infection

[Chin J Infect Control, 2018, 17(10): 878-883]

近年来,系统性假丝酵母菌感染发病率呈升高趋势,多数由白假丝酵母菌(*Candida albicans*)引起,其病死率高达 40% 以上,故引起临床广泛关注<sup>[1]</sup>。目前对系统性白假丝酵母菌感染的发病机制研究尚不清楚,药物治疗远远达不到临床需求;通过建立系统性白假丝酵母菌感染的动物模型,不但能从整体上探讨白假丝酵母菌感染的致病机制,且对研究新型抗真菌药物的体内药效具有重要的意义<sup>[2]</sup>。动物模型具有体外实验不可比拟的优势,可在整体上模拟病源与宿主间的复杂关系<sup>[3]</sup>。故本实验采用 BALB/c 小鼠腹腔注射环磷酰胺造成小鼠免疫抑制后,再经腹腔注射白假丝酵母菌建立系统性白假丝酵母菌感染的生物指标模型。现将结果报告如下。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

1.1.1 菌株与动物 白假丝酵母菌(ATCC 90028)由中国科学院微生物研究所提供,经动物实验提取致病菌株;菌株采用 Vitek2 YST(由法国生物梅里埃公司提供)进行鉴定。雄性 BALB/c 小鼠 6~8 W,体重 22~25 g,SPF 级,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,实验动物生产许可证编号为 SCXK(京)2012-0001。

1.1.2 药物与试剂 环磷酰胺由江苏恒瑞药业有限公司提供,(1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖试剂盒由湛江安度斯生物有限公司提供,LKM 型动态试管检测仪由 Lad Kinetics Ltd 公司提供。BECKMAN COULTER HMX 全自动五分类血细胞分析仪由美国 Beckman Coulter 公司提供。

1.1.3 实验地点 动物实验地点为河北医科大学第二医院动物实验中心,饲养条件为 IVR 层流柜、温度 22℃、湿度 50%~70%。本研究经河北医科大学第二医院伦理委员会审批。

### 1.2 实验方法

1.2.1 建立免疫抑制小鼠模型的方法 40 只

BALB/c 小鼠随机分为免疫抑制组(30 只)和免疫抑制对照组(10 只)。免疫抑制组小鼠经腹腔注射环磷酰胺(200 mg/kg·d),连续 2 d;在用药前 1 d 及用药后第 2、4、6、8 天,取小鼠尾静脉血,采用 BECKMAN COULTER HMX 全自动五分类血细胞分析仪进行白细胞和中性粒细胞计数,同时观察小鼠生活状态。免疫抑制对照组小鼠经腹腔注射 0.9% 生理盐水 0.25 mL,1 次/d,连续 2 d。

1.2.2 建立白假丝酵母菌感染模型的方法 60 只 BALB/c 小鼠随机分为感染组(30 只)和对照组(30 只)。感染组小鼠经腹腔注射环磷酰胺(200 mg/kg·d,连续 2 d),在用药第 3 天时,经腹腔注射白假丝酵母菌 0.25 mL(浓度为  $1 \times 10^7$  CFU/mL),分别对注射真菌后第 2~14 天死亡小鼠以及第 14 天存活小鼠(采取颈椎脱臼法处死)进行解剖,即刻取小鼠组织进行真菌镜检、培养和病理检查,同时对肺、肾组织进行(1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖测定。对照组小鼠经腹腔注射环磷酰胺(200 mg/kg·d,连续 2 d),在用药第 3 天时,经腹腔注射 0.9% 生理盐水 0.25 mL。

1.2.3 菌悬液制备 将白假丝酵母菌(ATCC 90028)制备成  $1 \times 10^7$  CFU/mL 菌悬液,以 0.25 mL 注射到免疫抑制组用药第 3 天的 BALB/c 小鼠腹腔内,于注射真菌菌悬液后第 7 天取肾组织置于葡萄糖蛋白胨培养基内,37℃ 孵育箱培育 5 d,经 Vitek 2 YST 鉴定为白假丝酵母菌,然后再将此白假丝酵母菌制备成菌悬液,重复上述方法 3 次后,最后获取的白假丝酵母菌为增强毒力菌株,将增强毒力菌株用 0.1% 吐温 80 生理盐水制备成浓度为  $1 \times 10^7$  CFU/mL 的菌悬液备用。将菌悬液用 0.1% 吐温 80 生理盐水稀释 10 倍,取 100  $\mu$ L 接种于葡萄糖蛋白胨培养基内,37℃ 培养 2 d,计算白假丝酵母菌菌株的存活率<sup>[4-5]</sup>。

1.2.4 (1,3)- $\beta$ -D 葡聚糖检测方法 采用速率比浊法检测(1,3)- $\beta$ -D 葡聚糖:(1)取小鼠肺、肝组织匀浆 500 mg,以 400 g 离心 10 min;(2)取上清 100  $\mu$ L,加入样品稀释瓶中,在旋涡混合器上轻轻

混匀,然后插入 75 °C 试管恒温仪中加热 10 min;  
 (3)取 0.25 mL 试剂复溶液加入(1, 3)-β-D 葡聚糖检测试剂中;(4)取本试剂盒所配的专用反应试管,先取已制备好的样品供试溶液 100 μL 加入反应试管中,然后再加入 50 μL(1, 3)-β-D 葡聚糖检测试剂溶液,每个样品供试溶液平行两管;(5)加样完毕,依次拿起试管在旋涡混合器上轻点一下,使试管中的溶液混合均匀,然后把各试管逐一插到 LKM 型动态试管检测仪中,反应开始,37°C 反应 75 min,读取结果。

1.3 统计方法 应用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。计量资料采用均数 ± 标准差表示,计数资料比较采用卡方检验,组间比较采用两独立样本 *t* 检验。以  $P \leq 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 免疫抑制小鼠模型建立情况 免疫抑制组小鼠在用药后第 4 天白细胞计数和中性粒细胞计数均下降至最低值,低于其对照组,两组白细胞和中性粒细胞计数比较,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ );免疫抑制组小鼠在用药后第 4 天平均体重为(18.00 ± 2.05) g,同期其对照组平均体重为(25.00 ± 2.06)g,两组体重比较,差异有统计学意义( $t = -8.557$ ,  $P < 0.01$ )。免疫抑制组小鼠均出现饮水和饮食明显减少、喜静、少动、消瘦、毛发稀疏等现象,用药后第 8 天白细胞计数、中性粒细胞计数及生活状态逐渐恢复正常,观察 28 d 无小鼠自然死亡现象。见表 1。

表 1 环磷酰胺对小鼠白细胞和中性粒细胞影响的实验室检测结果(× 10<sup>9</sup>/L)

Table 1 Laboratory detection results of effect of cyclophosphamide on leukocytes and neutrophils in mice(× 10<sup>9</sup>/L)

时间	白细胞计数		<i>t</i>	<i>P</i>	中性粒细胞计数		<i>t</i>	<i>P</i>
	免疫抑制组	对照组			免疫抑制组	对照组		
用药前 1 天	6.82 ± 1.22	6.84 ± 1.36	0.045	0.965	58.31 ± 8.29	62.81 ± 5.22	1.606	0.117
用药后第 2 天	3.09 ± 0.55	7.09 ± 1.67	11.603	0.000	32.38 ± 8.26	69.27 ± 5.80	13.039	0.000
用药后第 4 天	1.48 ± 0.68	6.83 ± 1.60	14.960	0.000	16.82 ± 1.20	10.35 ± 3.82	8.302	0.000
用药后第 8 天	7.68 ± 1.21	6.96 ± 1.18	1.639	0.109	62.46 ± 8.29	57.35 ± 3.20	18.814	0.000

### 2.2 白假丝酵母菌感染模型建立情况

2.2.1 生存率 白假丝酵母菌感染组小鼠于注射白假丝酵母菌第 2 天后开始出现死亡,于第 8 天死亡率达 70.00%(21/30)。白假丝酵母菌感染组生

存率为 30.00%,对照组生存率为 100.00%,两组生存率比较,差异有统计学意义( $\chi^2 = 32.308$ ,  $P < 0.05$ )。见表 2。

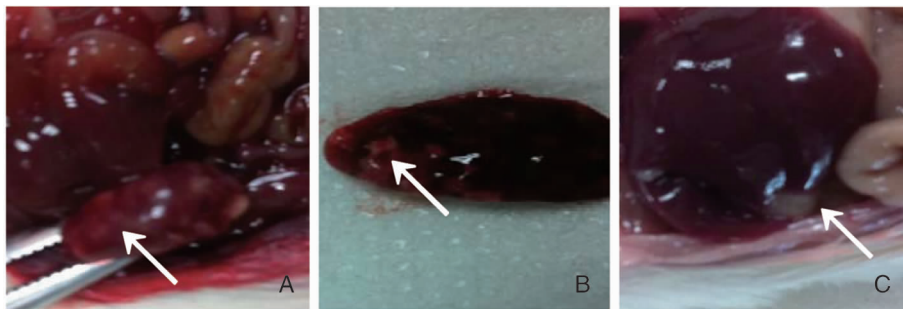
表 2 白假丝酵母菌感染组与对照组小鼠注射真菌后不同时间死亡情况(只)

Table 2 Death of mice in *C. albicans* infection group and control group at different time after injection of fungus(No. of mice)

组别	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天	第 8 天	第 9 天	第 10 天	第 11 天	第 12 天	第 13 天	第 14 天
感染组( <i>n</i> = 30)	2	6	6	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0
对照组( <i>n</i> = 30)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

2.2.2 组织镜检与培养结果 对注射真菌后第 2 ~ 14 天死亡小鼠以及第 14 天存活小鼠进行解剖,发现肺、肝、肾组织出现多处脓肿,肉眼可见肾组织 ≥ 10 处的脓肿坏死灶,其余组织脓肿及坏死灶均

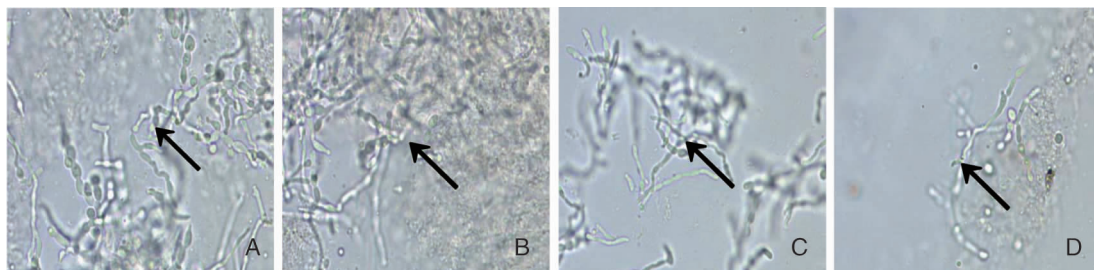
< 10 处,见图 1。取小鼠组织直接镜检发现肾、肺、肝、肠组织均可见大量菌丝和芽生孢子,见图 2。对小鼠组织进行真菌培养发现心、肺、肝、肾、肠、胸膜组织均有白假丝酵母菌生长,见图 3。



A:肾;B:肺;C:肝

图 1 小鼠组织脓肿坏死灶

Figure 1 Abscess necrotic focus of mice tissue



A:肾;B:肺;C:肝;D:肠

图 2 小鼠组织镜检图(×400)

Figure 2 Microscopic examination of mice tissue (×400)

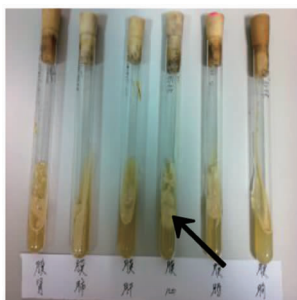
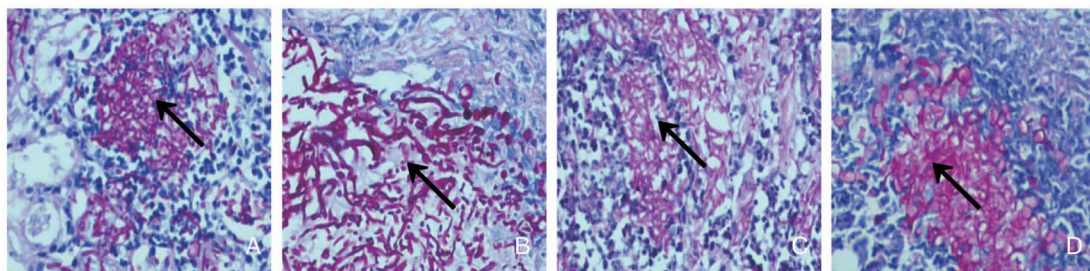


图 3 小鼠组织培养结果图

Figure 3 Culture result of mice tissue

2.2.3 组织病理学结果 白假丝酵母菌感染组小鼠经 PAS 染色电镜下(10×40)可见肺、肝、肾、肠组织中均可见大量菌丝和芽生孢子、组织坏死及炎性细胞浸润。见图 4。

2.2.4 肾、肺组织(1,3)-β-D-葡聚糖检测结果 小鼠肺、肾组织行(1,3)-β-D-葡聚糖检测结果显示,白假丝酵母菌感染组肺、肾组织(1,3)-β-D-葡聚糖均增高,与对照组比较,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。见表 3。



A:肾;B:肺;C:肝;D:肠

图 4 小鼠组织 PAS 染色镜检图(×400)

Figure 4 Microscopic detection result of PAS staining of mice tissue (×400)

表 3 白假丝酵母菌感染组与对照组肺、肾组织(1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖检测结果(pg/mL)

Table 3 Detection results of (1,3)- $\beta$ -D-glucan in lung and kidney tissue of *C. albicans* infection group and control group (pg/mL)

组别	肺组织	肾组织
感染组	5 930.83 ± 236.52	5 181.33 ± 223.67
对照组	76.69 ± 20.34	75.62 ± 18.34
<i>t</i>	70.354	71.486
<i>P</i>	0.000	0.000

### 3 讨论

系统性白假丝酵母菌感染是导致免疫力低下患者死亡的重要原因之一,其感染能力与菌株毒力、宿主免疫力密切相关<sup>[6]</sup>,BALB/c 小鼠是常用实验动物,是假丝酵母菌耐受鼠<sup>[7]</sup>,国内外关于建立系统性假丝酵母菌感染动物模型方法的文献报道很多,以往研究多经尾静脉途径注射假丝酵母菌造成血流感染而建立系统性假丝酵母菌感染模型<sup>[8-9]</sup>;Diez-Orejas 等<sup>[10]</sup>用健康雄性 BALB/c 小鼠以及 Calera 等<sup>[11]</sup>用健康雄性昆明小鼠,均经尾静脉途径注射白假丝酵母菌建立系统性白假丝酵母菌感染的动物模型。本实验先通过对雄性 BALB/c 小鼠腹腔注射环磷酰胺后(200 mg/kg·d,连续 2 d),于用药后第 4 天小鼠血白细胞和中性粒细胞均降至最低,观察 28 d 小鼠无死亡现象,说明此方法能有效诱导小鼠免疫抑制。然后在免疫抑制小鼠用药后第 3 天,经腹腔注射白假丝酵母菌增强毒力株 0.25 mL(浓度为  $1 \times 10^7$  CFU/mL),成功建立了免疫抑制 BALB/c 小鼠系统性白假丝酵母菌感染的动物模型,目前国内尚未见通过此方法造模的相关报道。经腹腔注射白假丝酵母菌造成小鼠腹腔器官浸润和肠系膜淋巴吸收进入血液而造成系统感染,这与腹部外科手术造成肠道假丝酵母菌种植腹腔而引起的系统性白假丝酵母菌感染相类似<sup>[12-13]</sup>。因此,该方法既避免了经小鼠尾静脉注射操作的难度,又模拟了腹部外科手术导致系统性白假丝酵母菌感染的菌株体内播散方式,有利于了解人类常见系统性白假丝酵母菌感染的途径及发病机制。此方法操作简单,成功率较高,适合系统性白假丝酵母菌感染模型的建立。

系统性假丝酵母菌感染具有器官特异性<sup>[14]</sup>。本研究显示,腹腔注射白假丝酵母菌建立的小鼠感染模型,各脏器感染以肾脏感染最为显著。腹腔注射白假丝酵母菌首先引起肾组织严重损伤,肉眼可

见肾组织多处脓肿,组织真菌直接镜检可见大量菌丝体,组织病理可见大量菌丝体、炎细胞及组织坏死;此外肝、肺、心、肠、胸膜等,也是白假丝酵母菌感染的重要靶器官,组织病理均可见菌丝、芽生孢子及炎性细胞浸润。

(1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖广泛存在于真菌细胞壁中,是真菌细胞壁重要组成部分,几乎所有真菌细胞壁都含有(1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖,其中以酵母样菌含量最高,当真菌侵入人体血液或组织,经吞噬细胞吞噬消化后,(1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖可以从胞壁中释放出来,在血液、组织、体液中含量增加,因此,(1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖已成为检测真菌相关感染的一个有意义的生物指标<sup>[15]</sup>。目前临床上血清(1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖的检测方法主要用于诊断曲霉菌、假丝酵母菌感染<sup>[16-17]</sup>。此实验研究显示,白假丝酵母菌感染组肺、肾组织(1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖均增高,与对照组比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),说明(1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖的检测方法,不但可诊断曲霉菌、假丝酵母菌感染,同样也适用于系统性白假丝酵母菌感染的靶向脏器组织的检测。故可以通过观察药物对脏器组织内真菌细胞壁(1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖影响的药效及靶位脏器真菌感染的诊断。

总之,系统性白假丝酵母菌感染动物模型的建立,需要考虑被感染动物的易感性或抗性。首先选择合适的动物种类、免疫抑制动物模型的制备、感染菌株的致病性、菌悬液浓度、接种途径等;实验中依据真菌学(直接镜检、组织培养)、病理学、(1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖测定的方法,制定各项定性生物指标,建立系统性白假丝酵母菌感染的生物指标动物模型。本实验通过对雄性 BALB/c 小鼠腹腔注射环磷酰胺后(200 mg/kg·d,连续 2 d),能有效诱导小鼠免疫抑制;然后在用药后第 3 天,经腹腔注射白假丝酵母菌增强毒力株 0.25 mL(浓度为  $1 \times 10^7$  CFU/mL),可以成功建立免疫抑制 BALB/c 小鼠系统性白假丝酵母菌感染的动物模型。

### [参考文献]

- [1] Dimopoulos G, Karabinis A, Samonis G, et al. Candidemia in immunocompromised and immunocompetent critically ill patients: a prospective comparative study[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2007, 26(6): 377-384.
- [2] Szabo EK, MacCallum DM. The contribution of mouse models to our understanding of systemic candidiasis[J]. FEMS Microbiol Lett, 2011, 320(1): 1-8.

- [3] 吴玉娥, 李航, 陈梅玲, 等. 系统性念珠菌感染小鼠模型的制备[J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(3):301-305.
- [4] 阿米娜·阿不拉, 斯拉甫·艾白, 古力娜·达吾提, 等. 鞣花酸体外抗真菌活性及对小鼠白色念珠菌感染模型的治疗作用研究[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(3):399-403.
- [5] 候天文, 陈兴, 贺占国, 等. 经腹腔注射建立免疫抑制BALB/c小鼠系统性念珠菌感染模型的研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2012, 7(9):649-652.
- [6] Koh AY, Kohle JR, Coggsall KT, et al. Mucosal damage and neutropenia are required for *Candida albicans* dissemination[J]. PLoS Pathog, 2008, 4(2): e35.
- [7] 刘嘉铭, 刘巾男, 魏明天, 等. 白色念珠菌生物膜与耐药抗性的研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2010, 5(11):869-871.
- [8] Pitarch A, Diez-Orejas R, Molero G, et al. Analysis of the serologic response to systemic *Candida albicans* infection in a murine model[J]. Proteomics, 2001, 1(4): 550-559.
- [9] Li WQ, Hu XC, Zhang XH, et al. Immunisation with the glycolytic enzyme enolase confers effective protection against *Candida albicans* infection in mice[J]. Vaccine, 2011, 29(33): 5526-5533.
- [10] Diez-Orejas R, Molro G, Navarro-Garcia F, et al. Reduced virulence of *Candida albicans* MKCl mutants; a role for mitogen-activated protein kinase in pathogenesis[J]. Infect Immun, 1977, 65(2): 833-837.
- [11] Calera JA, Zhao XJ, De Bernardis F, et al. Avirulence of *Candida albicans* CaHK1 mutants in a murine model of hematogenously disseminated candidiasis[J]. Infect Immun, 1999, 67(8): 4280-4284.
- [12] 李著, 孙坚, 邓杰, 等. 腹部大手术后深部真菌感染的临床与真菌学分析[J]. 中国真菌学杂志, 2010, 5(5):286-288.
- [13] Savolainen J, Rantala A, Nermes M, et al. Enhanced IgE response to *Candida albicans* in postoperative invasive candidiasis[J]. Clin Exp Allergy, 1996, 26(4): 452-460.
- [14] Lionakis MS, Lim JK, Lee CC, et al. Organ-specific innate immune responses in a mouse model of invasive candidiasis[J]. J Innate Immun, 2011, 3(2): 180-199.
- [15] 于婷, 蔡彤, 黄清泉. 1, 3- $\beta$ -D-葡聚糖定量测定在真菌感染诊断中的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(23):3186-3188.
- [16] Metan G, Koç AN, Kaynar LG, et al. What is the role of the (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan assay in the screening of patients undergoing autologous haematopoietic stem-cell transplantation? [J]. Mycoses, 2013, 56(1): 34-38.
- [17] Karageorgopoulos DE, Qu JM, Korbila IP. Accuracy of  $\beta$ -D-glucan for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: A meta-analysis[J]. Clin Microbial Infect, 2013, 19(1): 39-49.

(本文编辑:刘思娣、陈玉华)