



耐药白色念珠菌弥散性感染小鼠模型的建立

李航, 龚宝勇¹, 罗银珠¹, 吴玉娥¹, 陈梅玲¹, 陈锐¹, 刘晓霖¹,
王晖², 黄韧¹, 张钰^{1*}

(1. 广东省实验动物监测所, 广东省实验动物重点实验室, 广州 510663; 2. 广东药学院中药学院, 广州 510006)

【摘要】 目的 为新药筛选建立耐药白色念珠菌弥散性感染小鼠模型。方法 对免疫抑制 ICR 小鼠静脉注射临床耐氟康唑白色念珠菌 CaR, 通过临床症状、生存情况、组织载菌量、组织病理、细胞因子分析以及药物治疗等方法对模型评价。结果 CaR 感染小鼠在接种后第 1 天出现死亡, 相比临床药敏菌株 CaS 感染组, 16 d 观察期内动物死亡率无显著性差异 (CaR, 90.7%; CaS, 86.2%, $P = 0.158$), 但观察早期 CaR 组死亡比 CaS 组快。感染第 4 天, 不同组织均可检测到念珠菌, 并发现与 CaS 组相比, 肾、脑组织载菌量具有显著性差异。真菌引起的典型肉芽肿样是肾、脑、心的主要组织病理学特征。利用流式细胞仪检测肾组织细胞因子, IL-1 α 、IL-6、TNF- α 、IFN- γ 等细胞因子变化显著, 与 CaS 组比较, IL-1 α 和 IFN- γ 显著升高, TNF- α 显著下降。CaR 和 CaS 感染小鼠给予 10 mg/kg 氟康唑治疗, 死亡率分别为 83.3%、37.5%, 具有显著性差异。结论 本研究成功建立了耐药白色念珠菌弥散性感染小鼠模型, 有望成为抗感染新药研发的重要工具。

【关键词】 耐药白色念珠菌; 感染; 模型

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)09-0025-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.09.005

The establishment of the drug-resistant *Candida albicans* disseminated infected mice model

LI Hang¹, GONG Bao-yong¹, LUO Yin-zhu¹, WU Yu-e¹, CHEN Mei-ling¹,
CHEN Rui¹, LIU Xiao-lin¹, WANG Hui², HUANG Ren¹, ZHANG Yu^{1*}

(1. Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangdong Key Laboratory of Laboratory Animals, Guangzhou 510663, China; 2. College of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

【Abstract】 Objective Establishing the drug-resistant *Candida albicans* disseminative infected mice model for new drug screening. **Methods** The disseminative infected mouse model was generated by intravenously injecting a clinical Drug-resistant *Candida albicans* strain (CaR) to immunosuppressive ICR mice. The features of model was evaluated by clinical symptom, survival condition, fungal burden in tissue, histopathology, cytokines assay and medication. **Results** After infected with CaR (0 day), the death of mice started at the first day, though, compared to clinical drug sensitive strain (CaS) infected group, the difference of mortality rate in 16-day observation period was not significant in two groups (CaR, 90.7%; CaS, 86.2%, $P = 0.158$), mice in CaR group died faster than those in CaS group at the early stage; On the fourth day of infection, *Candida albicans* could be detected in the different tissues, and we found fungal burden in

[基金项目] 广东省科技计划项目(2014A010107018)。

[作者简介] 李航(1988-), 男, 研究实习员, 研究方向: 实验动物疾病模型。

[通讯作者] 张钰(1970-), 女, 研究员, 研究方向: 实验动物疾病模型。E-mail: zhangyugzh@hotmail.com。

kidney and brain was a significant difference. The typical granuloma caused by fungal infection was the main histopathological feature observed in the kidney, brain and heart. Cytokines in renal tissue were detected by flow cytometry, The changes of IL-1 α , IL-6, TNF- α and IFN- γ in kidney were significant. Compared with CaS group, IL-1 and IFN- γ were significantly higher and TNF- α decreased significantly in CaR group. The mice of groups CaR and CaS were treated with 10 mg/kg fluconazole, the mortality rates were 83.3% and 37.5%, which have a significant difference.

Conclusions In this study, we successfully established a drug-resistant *Candida albicans* disseminative infected mice model which is potential tool for the development of new anti-infectious agent.

【Key words】 Drug-resistant *Candida albicans*; Infected; Model

白色念珠菌是一种常见的二相性条件致病菌,平时以酵母相寄居在人体中,酵母相白色念珠菌一般不致病。由于艾滋病、癌症放化疗、器官移植等患者免疫功能低下或免疫功能受到抑制,酵母相白色念珠菌会由共生菌发芽增殖为菌丝相致病菌,此时白细胞对其吞噬率及杀灭率大幅降低,这导致临床上白色念珠菌感染的比例大大提高^[1]。据统计,全身性白色念珠菌感染有着高达 31.8% 的死亡率^[2],也是医院重症监护病房第四大血液感染因素^[3,4]。

氟康唑为第三代三唑类抗真菌药,自上市后凭借良好的临床疗效被广泛应用,但长期大剂量使用导致院内感染耐药菌分离率越来越高,赵德军等^[5]检测出院内感染白色念珠菌的耐氟康唑菌株可达 10.4%,刘宇^[6]在院内感染白色念珠菌感染中耐氟康唑菌株检出率也有 10.0%,可见院内感染中白色念珠菌耐药菌感染问题日益严峻,这就亟需开展及加强抗耐药白色念珠菌药物的研究。动物模型作为疾病机理和药物开发研究的重要工具,建立耐药念珠菌感染动物模型对开展耐药菌株的药物筛选具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 5~6 周龄雌性 ICR 小鼠,体重 24~26 g,购自广东省医学实验动物中心 [SCXK(粤)2013-0002],饲养在广东省实验动物监测所负压屏障小鼠房 [SCXK(粤)2012-0122],实验动物饲料由广东省医学实验动物中心提供 [SCXK(粤)2013-0002]。实验研究计划通过广东省实验动物监测所 IACUC 审查(编号:IACUC2012006)。

1.2 供试菌株

临床耐氟康唑菌株 CaR、临床药敏菌株 CaS^[7]由中国科学院北京微生物研究所张立新研究员惠赠,均置于 -80℃ 冰箱保存。使用前利用活菌计数

法确定菌液浓度。

1.3 环磷酰胺诱导免疫抑制

ICR 小鼠适应性饲养 3 d 后,按体重(100 mg/kg)腹腔注射环磷酰胺(CY),连续注射 3 d。

1.4 感染动物生存实验

小鼠随机分为两组,分别尾静脉注射浓度为 5.0×10^5 CFU/mL 的 CaR、CaS 菌液 0.2 mL/只。每天定时观察感染小鼠临床症状及生存情况,及时将死亡小鼠取出。记录小鼠弓背、眼睛或鼻子出现分泌物、呼吸异常、离群等异常情况,当小鼠出现不能行走、濒临死亡时进行安乐死,记做第二天死亡。观察 16 d,统计小鼠生存情况。

1.5 指标检测

1.5.1 组织载菌量检测

在感染第 2、4、6 天,每组 5 只小鼠的心、肝、脾、肺、肾、脑组织取出后称重,加入 1.0 mL 无菌生理盐水研磨至匀浆,确定适当稀释度,吸取 0.2 mL 匀浆液接种于 YEPD 培养基,计算各组织载菌量。

1.5.2 组织病理诊断

在感染第 4 天,每组 3 只小鼠的心、肝、脾、肺、肾、脑组织取出后放入 10% 福尔马林溶液中,制备病理切片,进行 HE 染色和 PAS 染色。

1.5.3 细胞因子检测

将感染第 4 天小鼠肾组织匀浆液 4℃ 低温冷冻离心机 3000 r/min 离心 10 min,取上清液做细胞因子检测。

1.6 模型的药效评价应用

CaR 组和 CaS 组小鼠尾静脉注射 5.0×10^5 CFU/mL 白色念珠菌 0.2 mL/只,在感染后 5 h 给予小鼠按体重(10 mg/kg)灌胃给予临床药物氟康唑治疗,连续给药 5 d。观察 16 d,统计小鼠生存情况。

1.7 统计学方法

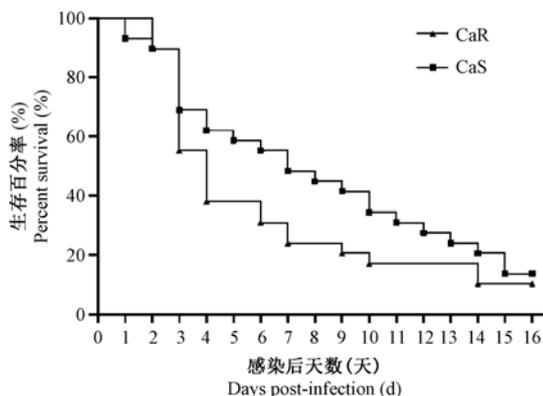
所有数据采用 GraphPad 5.0 软件进行数据分析处理,生存统计使用 log-rank Mantel-Cox 检验;实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示;组间差异性

用 *t* 检验, $P < 0.05$, 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 耐药念珠菌感染小鼠临床症状及生存情况

CaR 组和 CaS 组小鼠感染白色念珠菌临床症状基本一致, 感染后体质明显虚弱、立毛严重, 眼部出现分泌物, CaR 组感染第一天出现死亡, 而 CaS 组在感染第二天出现死亡。在感染早期, CaR 感染小鼠死亡率比 CaS 感染高, 中位生存期分别为 3.3 d、6.8 d; 感染后期小鼠出现身体倾斜、偏头等神经系统症状; 尸体剖检, 可见感染小鼠肾肿大, 表面有白色斑点, 其它组织未见明显病变。16 d 观察期内, 两种菌株感染动物死亡率分别为 90.7%、86.2%, 无显著差异, 结果见图 1。



注: 3 次独立实验。

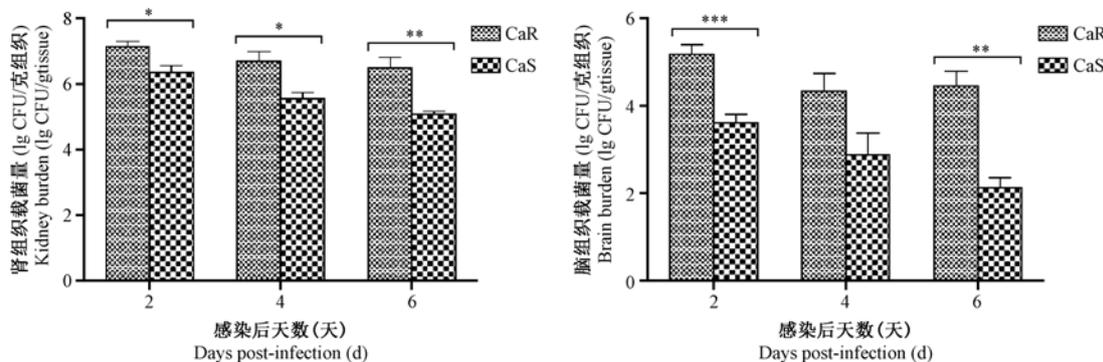
图 1 白色念珠菌感染小鼠生存曲线 ($n = 29$)

Note: 3 independent experiments.

Fig. 1 Survival curves of mice infected with Candida albicans

2.2 指标检测结果

2.2.1 耐药念珠菌感染小鼠组织载菌量变化



注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与 CaS 组相比。

图 2 组织载菌量 ($n = 5$)

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, Compared with the CaS group.

Fig. 2 Fungal burden in tissues

感染第 2 天 CaR 组小鼠各组织均可检测到念珠菌, 随着感染时间的推移, 各组织载菌量逐渐下降。其中, 感染主要靶器官肾组织载菌量较高, 大于 10^7 CFU/g 组织, 脑的载菌量在 $10^3 \sim 10^4$ CFU/g 组织, 明显高于 CaS 感染, 具有显著性差异, 结果见图 2。

2.2.2 感染小鼠组织病理变化

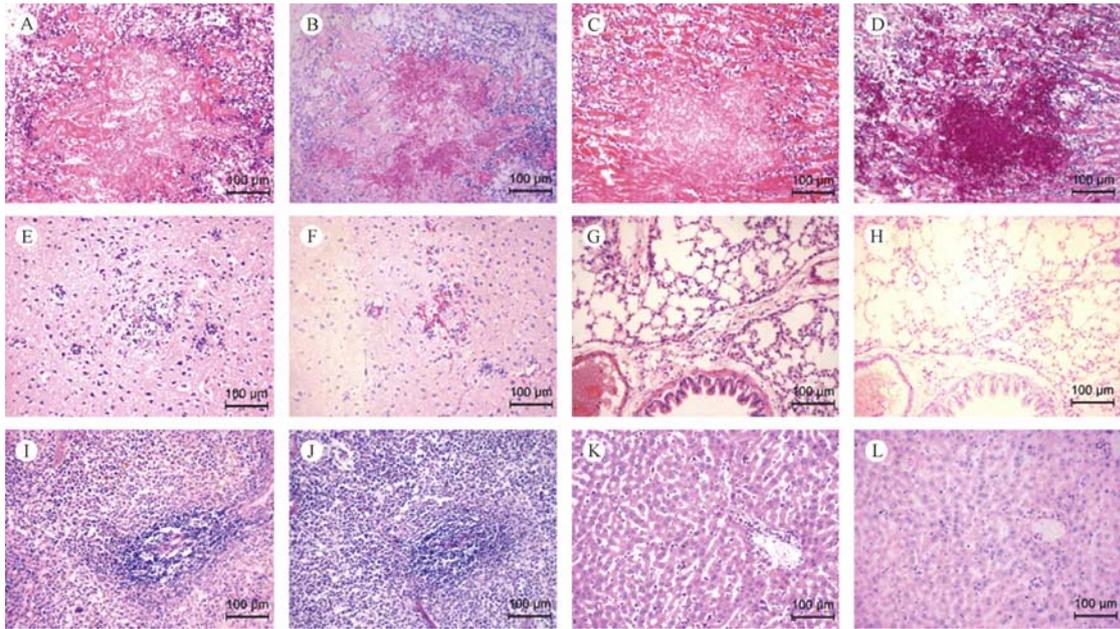
CaR 组小鼠各组织均可检测到念珠菌。组织病理检测显示, 肾、心、脑等能观察到典型的病理变化。其中, 肾组织的病理变化最为严重, HE 染色显示, 大部分肾小体结构破坏, 病灶周围出现中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞等大量炎症细胞浸润, 肾小管出血。心组织可观察到病灶中出现大量炎症细胞浸润, 伴随着细胞坏死, 心肌纤维断裂; 大脑皮质内也能观察到组织结构的破坏, 病灶中性粒细胞及小胶质细胞浸润。以上组织 PAS 染色病理切片均显示病灶区出现大量红色深染的酵母型、菌丝型共生的白色念珠菌。

肺、脾、肝组织较少出现典型的组织结构破坏, 结果见图 3。

以上组织病理变化与 CaS 感染小鼠组织相比未见明显变化。

2.2.3 耐药念珠菌感染小鼠免疫因子的变化

我们利用流式细胞仪对感染第 4 天小鼠肾组织匀浆液上清液进行细胞因子检测, 结果发现 IL-6、TNF- α 、IL-1 α 、IFN- γ 显示明显升高, 表现典型的非特异免疫反应。CaR 组与 CaS 组比较, 在感染第 4 天, IL-1 α 、IFN- γ 显示明显升高, TNF- α 明显下降, 具有显著性差异, 结果见图 4。

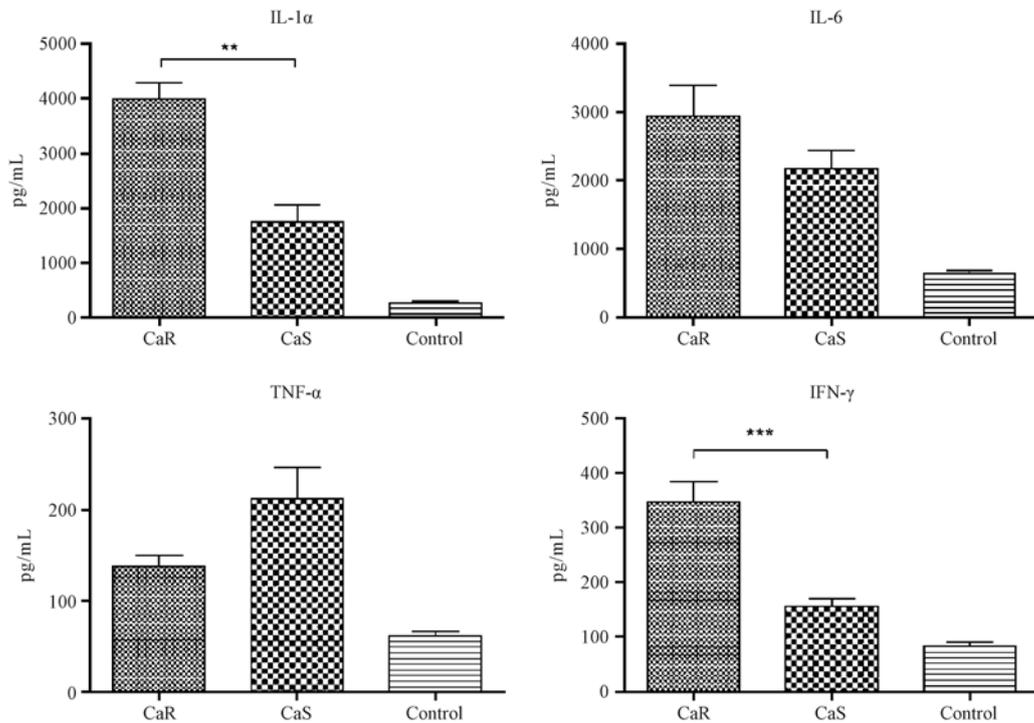


注: (A、C、E、G、I、K) 肾、心、脑、肺、脾、肝 HE 染色切片; (B、D、F、H、J、L) 肾、心、脑、肺、脾、肝 PAS 染色切片。

图 3 CaR 组感染第 4 天小鼠组织切片 (×20, bar = 100 μm)

Note. (A, C, E, G, I, K) H&E staining of kidney, heart, brain, lung, spleen, liver;
(B, D, F, H, J, L) PAS staining of kidney, heart, brain, lung, spleen, liver.

Fig. 3 Infected mice of CaR group tissue sections at day 4 after infection



注: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与 CaS 组相比。

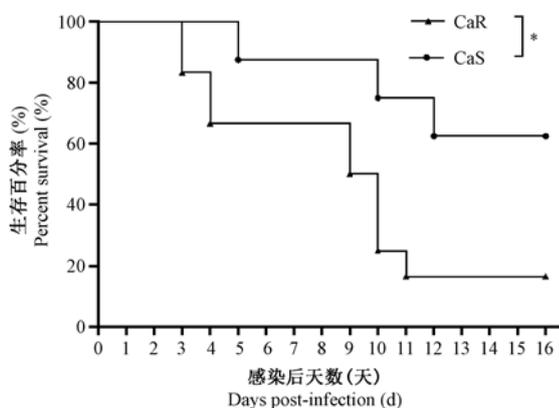
图 4 感染小鼠第 4 天肾组织细胞因子含量 ($n = 5$)

Note. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, Compared with the CaS group.

Fig. 4 Cytokine content of mice kidney at day 4 after infection

2.3 耐药念珠菌感染小鼠的药效评价

CaR 和 CaS 小鼠感染 1.0×10^5 CFU/只, 给予 10 mg/kg 氟康唑药物进行治疗, 在 16 d 观察期内, CaS 组生存率明显升高, CaS 组和 CaR 组动物死亡率分别为 37.5%、83.3%, 具有显著性差异(图 5)。



注: * $P < 0.05$, 与 CaS 组相比。3 次独立试验。

图 5 白色念珠菌感染小鼠给药后生存曲线 ($n = 29$)

Note. * $P < 0.05$, Compared with the CaS group. 3 independent experiments.

Fig. 5 Survival curves of mice infected with *Candida albicans* after administration

3 讨论

根据经典白色念珠菌弥散性感染小鼠模型的建立方法^[8], 腹腔注射环磷酰胺以降低小鼠体内白细胞数量^[9], 模拟临床免疫抑制及免疫功能低下患者; 然后尾静脉注射耐药念珠菌 CaR (1.0×10^5 CFU/只), 成功建立了耐药白色念珠菌弥散性感染小鼠模型。该模型以死亡为评价指标, 在感染 16 d 内, 动物死亡率约为 90%。

CaR 组与 CaS 组感染小鼠显示相似的疾病特征, 在感染的早期阶段, 虽然两组感染小鼠的生存分析不能显示显著性差异, 但 CaR 组小鼠中位生存时间 3.3 d, 明显低于 CaS 组 6.8 d; 又因感染念珠菌小鼠的肾指数变化与其肾脏载菌量、病理变化呈正相关, 肾指数能够较准确的反应机体感染白念菌的程度^[10], 在感染初期 CaR 组肾组织载菌量明显高于 CaS 组, 说明 CaR 菌株毒力与 CaS 菌株相比较强。

该模型显示出典型的弥散性感染特征。组织病理检测显示, 肾、脑、心组织能观察到典型的病灶, 大量炎性细胞浸润。小鼠实质组织感染第 2 天就能检测到念珠菌, 其中肾组织载菌量最高, 随着

感染时间的推移, 组织载菌量逐渐下降。说明感染初期动物感染最为严重, 随后机体进行非特异性免疫, 促炎因子 IL-6, IL-1 α , TNF- α , IFN- γ 显著升高, 有效调控了机体的抗感染过程。两组小鼠 IL-1 α 、IFN- γ 的显著性差异由念珠菌感染程度不同引起, 同时说明 IL-1 α 、IFN- γ 在抗感染过程中起重要作用。

利用建立的耐药念珠菌小鼠模型进行氟康唑药效评价, 给予 10 mg/kg 的氟康唑, CaS 组小鼠死亡率明显减低, 而 CaR 组小鼠死亡率较高, 说明 CaR 组小鼠不能获得有效保护, 耐药模型对氟康唑表现出耐药性。该模型的建立为我们提供了耐药菌株体内药物筛选和致病机理研究的平台, 这为后期研究抗感染新药提供体内筛选模型工具。

参考文献:

- [1] 廖万清, 顾菊林. 真菌耐药现状与对策[J]. 药学服务与研究, 2006, 6(3): 161-164.
- [2] Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH. Delaying the empiric treatment of *Candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, 49(9): 3640-3645.
- [3] Zaoutis TE, Argon J, Chu J, et al. The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: a propensity analysis[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2005, 41(9): 1232-1239.
- [4] Horn DL. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2009, 48(12): 1695-1703.
- [5] 赵德军, 邱洪, 胡昭宇, 等. 住院病人念珠菌感染的动态变化及耐药性监测[J]. 中国消毒学杂志, 2014, 31(2): 134-136.
- [6] 刘宇. 呼吸科院内尿路感染患者病原菌及耐药分析[J]. 临床肺科杂志, 2015, 20(2): 303-305.
- [7] Franz R, Kelly SL, Lamb DC, et al. Multiple Molecular Mechanisms Contribute to a Stepwise Development of Fluconazole Resistance in Clinical *Candida albicans* Strains[J]. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 1998, 42(12): 3065-3072.
- [8] Zhang L, Yan K, Zhang Y, et al. High-throughput synergy screening identifies microbial metabolites as combination agents or the treatment of fungal infections[J]. *PANS*, 2007, 104(11): 4606-4611.
- [9] 刘香梅, 张钰, 闵凡贵, 等. 环磷酰胺对近平滑念珠菌感染小鼠白细胞的影响[J]. 实验动物与比较医学, 2007, 27(2): 116-118.
- [10] 马贤德. 感染白色念珠菌小鼠肾指数与病情相关性及其在中药研究中的应用[D]. 辽宁中医药大学, 2010.

[修回日期] 2015-10-26