

系统性念珠菌感染小鼠模型的制备

吴玉娥¹, 李航², 陈梅玲¹, 龚宝勇¹, 张钰¹, 黄韧^{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, 广州 510224)

【摘要】 **目的** 建立稳定的系统性念珠菌感染小鼠模型, 规范其操作方法。**方法** 采用环磷酰胺(CY)对小鼠进行免疫抑制后, 选择白色念珠菌(*C. albicans*)和非白念珠菌(*C. parapsilosis*)分别接种 ICR 小鼠, 从免疫抑制、菌株制备、接种剂量和接种途径等方面对建模过程进行质量控制, 通过生存分析、组织载菌量和病理学检查对模型进行评价。**结果** 建立的系统性念珠菌感染小鼠模型显示肾脏为靶器官, 多器官弥散性真菌感染的典型病理组织学改变。**结论** 通过对建模过程各环节进行规范, 可得到稳定的系统性念珠菌感染小鼠模型, 该模型可应用于系统性念珠菌感染的致病机理, 免疫防御及抗真菌药物筛选等研究领域。

【关键词】 念珠菌; 动物模型; 小鼠; 感染

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 03-0301-05

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2015.03.015

Preparation of a murine model of systemic *Candida albicans* infection

WU Yu-e¹, LI Hang², CHEN Mei-ling¹, GONG Bao-yong¹, ZHANG Yu¹, HUANG Ren¹

(1. Guangdong Key Laboratory of Laboratory Animals, Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangzhou 510663, China; 2. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510224, China)

【Abstract】 To establish a stable mouse model of systemic *Candida* infection and to set up related standard operation procedure. **Methods** ICR mice were infected with *C. albicans* or *C. parapsilosis* by tail vein injection after immunosuppression by cyclophosphamide. The quality control key points included immunosuppression, strain preparation, inoculation doses and the route of inoculation. Survival analysis, bacterial loads and pathological examination were performed to evaluate the prepared model. **Results** The developed model showed fungal-specific lesions in multiple organs, especially in the kidneys revealed by histopathological examination. **Conclusions** A stable mouse model of systemic *Candida albicans* infection can be successfully established by following standardized operation procedure. This mouse model may provide a useful tool for studies on pathogenesis and immune defense of fungal infection and new anti-fungal drug development and so on.

【Key words】 *Candida albicans*; Animal model; Mouse; Fungal infection

动物模型是研究感染性疾病发病机制的主要工具^[1,2]。因其可在整体动物上模拟病原和宿主(人)间的复杂作用,并且可以避免伦理问题直接研究病原对动物的组织或因子的作用,动物模型具有体外试验不可比拟的优势。近年来,临床上侵袭性念珠菌感染的发病率和死亡率不断上升,相对应出现了许多真菌感染的动物模型研究。根据不同的研究目的,研究者们通常会选择不同的动物种类和感染途径来建立动物模型,但目前最为常用的还是静脉感染小鼠模型^[3]。本实验室长期进行念珠菌感染动物模型研究,

在系统性念珠菌感染小鼠模型建立上积累了丰富的经验。我们的建模方法稳定,具可重复性,已成功应用于念珠菌毒力研究及抗真菌药物筛选^[4]。本文主要从菌株制备、静脉接种、剂量选择及模型评价等方面对模型建立的每个关键步骤进行详细描述,希望为其他科研工作者提供参考和帮助。

1 材料与方法

1.1 菌株

白色念珠菌(*C. albicans*) SC5314、CaR、CaS、

[基金项目] 广东省科技计划项目(No. 2010B060500019)资助。

[作者简介] 吴玉娥(1978-),女,助理研究员,E-mail: jadejoanjadejoan@163.com

[通讯作者] 黄韧(1959-),男,博士,研究员,E-mail: labking@sohu.com

CaDel、CaCoM-A、CaCoM-B 及非白念珠菌 (*C. parapsilosis*), 均为中国科学院微生物研究所张立新博士馈赠。

1.2 实验小鼠

SPF 级 ICR 小鼠, 体重 22 ~ 26 g, 4 ~ 6 周龄, 购于上海斯莱克实验动物有限公司【SCXK(沪)2012-0002】。动物实验在负压感染动物实验室进行【SYXK(粤)2012-0122】。动物实验开展经广东省实验动物监测所动物使用和管理委员会审批。

1.3 免疫抑制

环磷酰胺(江苏恒瑞制药厂)腹腔注射, 1 次/24 h, 共注射 3 次, 注射剂量为 100 mg/kg, 第 4 天进行念珠菌接种。

1.4 菌株制备

1.4.1 菌体培养

(1) 从 -80℃ 冰箱取出菌液, 解冻。使用灭菌接种环把解冻后的菌液接种到固体 YEPD 平板上, 30℃ 培养 26h, 观察菌体有无生长, 是否污染。

(2) 确定无污染后, 从培养皿上挑选单个菌落用无菌接种环接种到液体 YEPD^[2] 中, 30℃ 摇床培养 16 h, 200 r/min。

(3) 观察液体 YEPD 浑浊度, 浑浊为接种成功。

(4) 菌落形态观察: 取 1 滴乳酚甲苯胺蓝染色液加入 1 滴菌液, 混匀, 盖上盖玻片, 显微镜镜检。

1.4.2 分装保存

(1) 在超净工作台上将接菌成功的液体 YEPD 倒入已灭菌的 45 mL 离心管中, 离心 (3000 r/min, 10 min)。

(2) 丢弃上层液体, 加入适量灭菌生理盐水, 吹打混匀, 离心 (3000 r/min, 10 min)。重复二次。

(3) 丢弃上层液体, 加入适量灭菌生理盐水, 吹打混匀。使用 20% 无菌甘油-生理盐水配置成一定体积, 取 100 μL 于包被板中, 每个样品至少加两孔。用酶标仪测其 A 值, 使其 A 值达到 0.35 ~ 0.4 [此时菌液浓度为 (3 ~ 5) × 10⁷ CFU/mL], 分装置于 -80℃ 冰箱保存备用。

1.4.3 接菌前浓度调整

于 -80℃ 冰箱内取出备用菌液, 解冻后置于 36℃ 培养箱中复苏 1 h, 按照预计接菌浓度对菌液进行梯度稀释。例如, 预计接种浓度为 (3.0 ~ 5.0) × 10⁵ cells/mL, 则将菌液稀释 100 倍。留取 1 mL 稀释后的菌液, 用于确定实际接菌浓度。

1.4.4 确定实际菌液浓度

菌液经 10 倍梯度稀释, 选择三个稀释度的菌液, 分别取 0.2 mL 加入固体无菌 YEPD 培养基, 使

用灭菌的玻璃涂棒涂布均匀。30℃ 培养箱培养 36 h, 计算菌落数目, 菌落数在 30 ~ 300 之间的稀释度有效。按下面公式计算出菌液的含菌数: 每毫升原菌液活菌数 = 同一稀释度三个重复平皿菌落平均数 × 稀释倍数 × 5。

1.4.5 菌株保存稳定性测试

按照 1.4.3 和 1.4.4 所述, 对 -80℃ 冰箱保存的菌株 (以 CaR, CaS, CaDel, CaCoM-A 和 CaCoM-B 为例) 定期取出进行稳定性测试。

1.5 静脉接种

采用 1 mL 注射器, 每只小鼠经尾静脉接种酵母型菌进行感染。接种当天秤量每只小鼠体重, 根据体重确定每只小鼠的接种剂量, 常用接种剂量为 0.2 mL 菌液/20 g 小鼠。

1.6 模型评价指标

生存情况: 感染动物以死亡为评价指标。接种后, 每天观察小鼠两次, 连续观察 14 d。当发现下列情况中任何两项时, 安乐死小鼠, 以减少对其的疼痛和应激。① 弓背、被毛松乱; ② 体重下降超过起始体重的 20%; ③ 体温降低, 触之冰冷; ④ 活动明显减少; ⑤ 不能进食; ⑥ 斜颈或原地打转。在进行生存观察时, 将安乐死小鼠死亡时间记录到下一天。一般采用生存曲线对感染小鼠的生存情况进行描述, 采用 Log-rank test 统计方法对生存曲线进行比较分析, $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义^[5]。

靶器官载菌量检测: 在染菌后的第 2 天、4 天和 6 天, 每组至少取 3 只小鼠, 采集心、肝、脾、肺、肾和脑, 称重后加入 1 mL 无菌生理盐水研磨成匀浆液, 进行 10 倍梯度稀释, 选择适当的稀释浓度, 取 0.2 mL 接种于 YPD 固体培养基, 30℃ 培养箱培养 36 h, 进行菌落计数。菌落数在 30 ~ 300 之间的匀浆液稀释度有效。计算组织的载菌量 \log CFU/g。CFU/g = 3 个培养基的 CFU 的平均数 × 5 × 匀浆液体积 (mL) × 稀释倍数 ÷ 组织重量 (g)

病理组织学检测: 取小鼠主要靶器官心、肝、脾、肺、肾和脑, 中性福尔马林溶液固定后, 进行常规病理切片, 行 HE 和 PAS 染色。

2 结果

2.1 菌体形态学观察结果

以 CP 菌为例, 从 -80℃ 冰箱取出的菌种经培养, 镜检显示, CP 菌的形态处于酵母型, 未见假菌丝的出现 (图 1)。经台盼蓝染色镜检, 显示 90% 的菌体为活菌体。

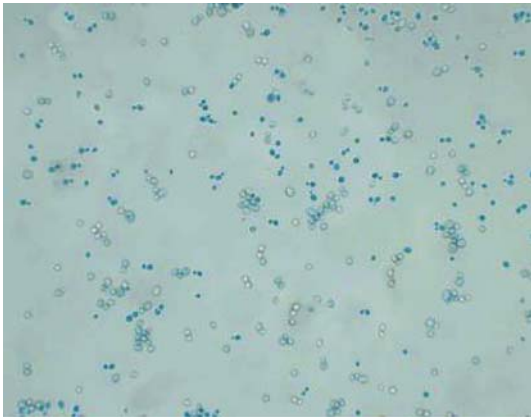


图 1 *C. parapsilosis* 形态观察(酵母型菌体形态)

Fig. 1 Morphologic observation of the *C. parapsilosis* (yeast type)

2.2 菌株保存稳定性测试结果

经过 7 个月的测试, CaR、CaS、CaDel、CaCoM-A 和 CaCoM-B 5 个菌株的活菌数一直保持稳定状态, 见图 2 所示。

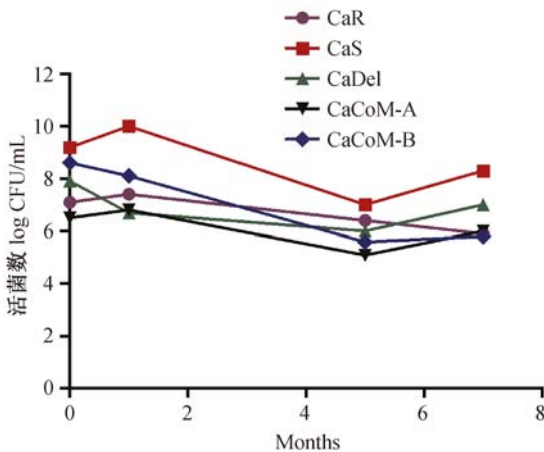


图 2 菌株保存稳定性测试结果

Fig. 2 Results of strains preservation stability test

2.3 免疫抑制结果

正常小鼠外周血白细胞总数约为 $(7 \sim 8) \times 10^9$ 个/L, 小鼠注射 CY 后第 1 天开始, 外周血白细胞总数出现明显下降趋势, 注射后第 4 天降至最低点约 1.6×10^9 个/L。第 5 天开始小鼠外周血白细胞总数开始回升, 至注射后第 8 ~ 12 天, 基本恢复到正常水平, 见图 1。根据实验结果, 我们选择免疫抑制后白细胞计数最低点(CY 给药后第 4 天)进行念珠菌接种。

2.4 生存情况

采用生存曲线对感染小鼠的生存情况进行描述和分析。选择相同接种剂量 (1.0×10^5 CFU/mL),

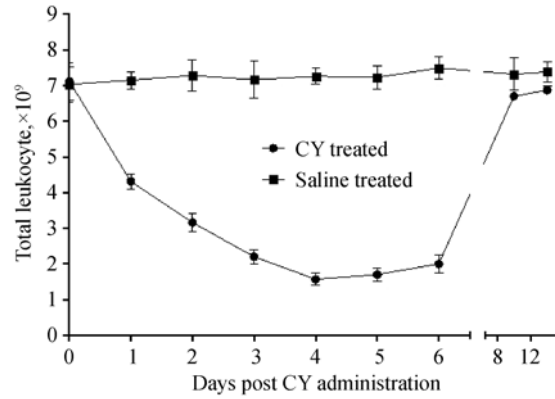


图 3 小鼠接种 CY 后外周血白细胞总数变化

Fig. 3 Total leukocyte counts in the cyclophosphamide-treated mice

CaR、CaDel、CaCoM-A 和 CaCoM-B 四个菌株引起小鼠死亡情况相近, 中位生存间分别是 7、8、7 d 和 6 d。采用 log-rank test 统计方法对生存曲线进行比较分析, 各组间无统计学差异。该结果说明在相同接种剂量下, 4 个菌株对小鼠的毒力无差异。见图 4 所示。

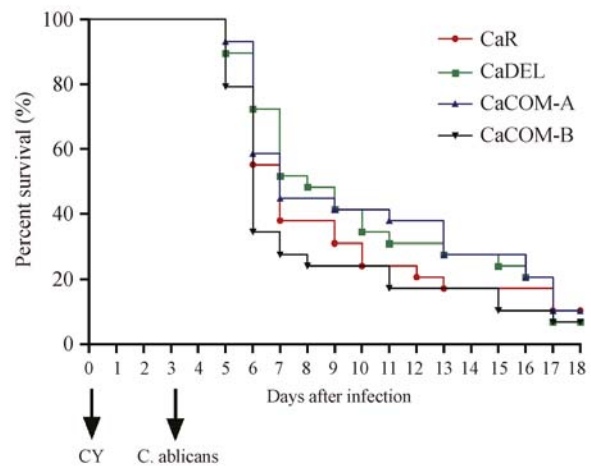


图 4 小鼠接种 CaR、CaDel、CaCOM-A 和 CaCOM-B 四个菌株后的生存情况

Fig. 4 Survival curves of the mice after inoculation of CaR, CaDel, CaCOM-A and CaCOM-B strain *Candida*

2.5 组织载菌量

在系统性真菌感染小鼠模型, 肾脏是真菌感染的主要靶器官。以 SC5314 为例, 接种剂量为 1.0×10^4 CFU/mL, 小鼠感染后第 2 ~ 4 天组织载菌量达高峰, 以肾脏载菌量最高, 可达到 $10^6 \sim 10^8$ CFU/g, 其他脏器如肝脏、脑、脾脏和肺脏等组织载菌量一般在 10^4 CFU/g, 随着感染时间延后, 各组织载菌量逐渐下降, 见图 5 所示。

2.6 组织病理变化

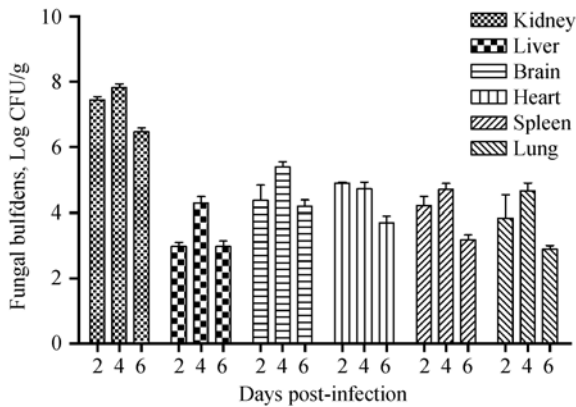


图 5 小鼠接种 SC5314 后各脏器组织载菌量变化

Fig. 5 Dynamic changes of tissue fungal burdens after SC5314 inoculation in the mice

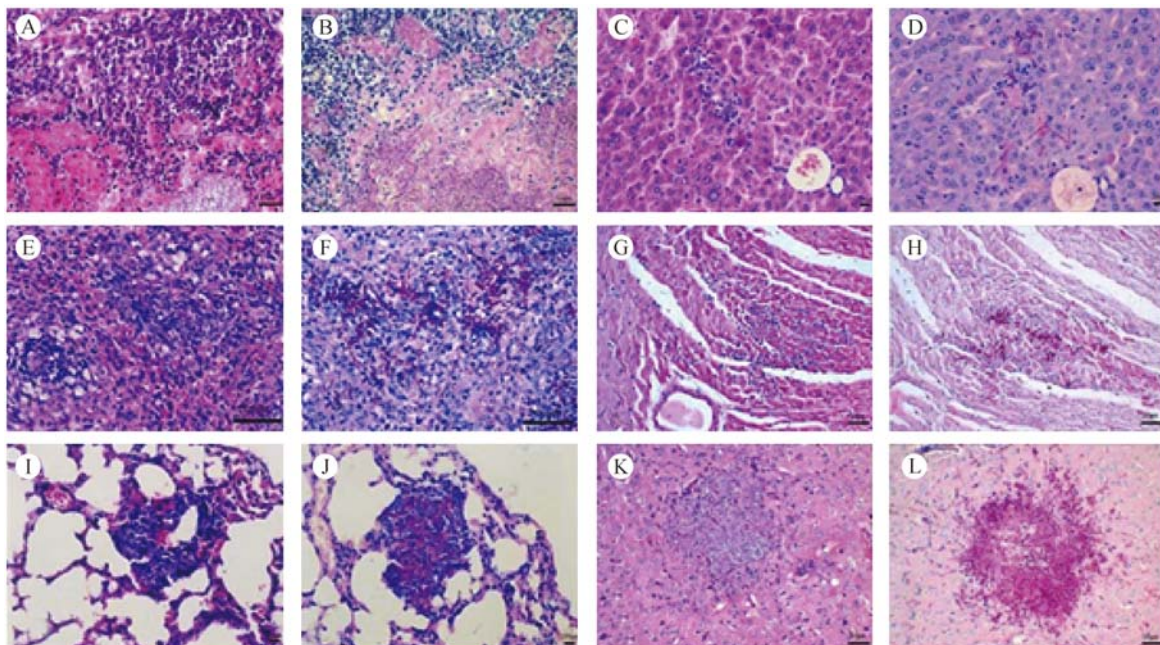
病理组织学观察显示以肾脏为靶器官,多器官弥散性真菌感染的典型病理组织学改变。除肾脏外,心脏、脑、肺、肝和脾亦可见真菌浸润病灶,见图 6 所示。

3 讨论

念珠菌形态学上的双向性与其毒力密切相关。在念珠菌弥散性感染小鼠模型建立过程中,菌体形

态是重要的质控要素。白色念珠菌和近平滑念珠菌 (*C. parapsilosis*) 均属于双向型真菌,在不同营养因素、化学因素或其他物理因素的作用下,可以由一种形态(酵母相)转变成另一种形态(菌丝相),当念珠菌从酵母相转变为菌丝相后,其毒力明显增强^[6]。我们在实验中发现,当给予免疫抑制小鼠接种 1.0×10^6 个/mL 菌丝型 *C. parapsilosis* 菌,可造成小鼠 48 h 内全部死亡;当给予免疫抑制小鼠接种相同剂量的酵母型菌,则小鼠全部死亡时间推迟为 8 天。菌丝型菌毒力明显增强,能使动物快速死亡,不适合建立动物模型。因此,严格进行菌体培养条件的质控,使注入实验动物体内的菌体为处于对数生长期的酵母型菌,是模型成功的关键。

真菌感染的发生是病原体、宿主及环境间相互作用的结果,念珠菌侵入人体后是否发病不仅取决于病原体的数量、毒力及入侵途径,也取决于宿主自身的免疫防御能力及各种外界因素的综合影响。临床上弥散性念珠菌病患者均处于不同程度的免疫缺陷状态^[7,8]。因此,为了模拟临床致病条件,在念珠菌弥散性感染小鼠模型的建立过程中首先要实现小鼠的免疫抑制。实验用形成免疫抑制的方法有多种,主要有抗肿瘤药阿糖胞苷,免疫抑制剂及激素可的松等。我们采用给小鼠注射免疫抑制剂环磷酰胺



注:A, C, E, G, I 和 K 分别为肾,肝,脾,心脏,肺和脑的 H. E. 染色切片。B, D, F, H, J 和 L 分别为肾,肝,脾,心脏,肺和脑的 PAS 染色切片。

图 6 小鼠接种 *C. parapsilosis* 后组织器官病理改变

Note. A: Kidney, C: Liver, E: Spleen, G: Heart, I: Lung, K: Brain. HE staining, showing representative alterations in the organs. B: Kidney, D: Liver, F: Spleen, H: Heart, J: Lung, L: Brain. PAS staining, showing the fungal mycelia infiltration in the organs.

Fig. 6 Histological changes in the organs of mice infected with *C. parapsilosis*

(CY),这种免疫抑制方式表现为白细胞数量下降,特别是嗜中性粒细胞的下降,不仅有利于念珠菌入侵感染,还有效地模拟了临床上较多见的嗜中性粒细胞下降引起的弥散性真菌病的病例。

菌株制备过程的质量控制是影响模型稳定性的关键环节。只有保证每批次实验小鼠接种的菌液浓度一致,才能保证模型的可重复性。本实验室采用一次性制备足够量的菌液,确定一个较高的菌液浓度(例如 5.0×10^7 CFU/mL)后进行分装, -80°C 冰箱保存备用。以后每次实验取出 1 支菌液,解冻后置于 30°C 培养箱中复苏 1 h,按照预计接种浓度对菌液进行梯度稀释。这样就可以保证每批次开展实验使用相同浓度的菌液。本保存方法经过半年的测试,保存的活菌数一直保持稳定状态。

静脉接种亦是影响模型重复性和稳定性的重要因素之一。真菌菌体较大,具有一定的重量,菌液放置一定时间后,菌体会自然下落并在容器下方沉积成丛。因此接菌时,每次抽取菌液前都要将菌液摇匀(至少 10 s),这样才能保证每次吸入的菌液浓度一致。通常采用 1 mL 注射器,经小鼠尾静脉接种菌液进行感染,常用接种剂量为 0.2 mL。当小鼠体重相差较大时,需要根据体重确定每只小鼠的接种剂量。静脉注射前可采用光照或涂擦酒精的方法使小鼠尾部血管扩张,以方便进针,注射完成后,按压注射位点约 30 s,防止菌液倒流。注射时,如因针头进入位置不当,偏离血管,则推注时阻力较大,并且出现注射部位皮肤变白,此时应立即停止注射,拔出针头,重新调整注射位置注射,一定要确保菌液完全接种入静脉。

系统性念珠菌感染小鼠模型建立过程中,除了需要考虑上述影响因素外,还要考虑感染菌株的致病性。具体实验中,由于选择的念珠菌种类不同,毒力不同,注射的菌量也不同。例如同样是利用念珠菌进行毒力研究,选择白色念珠菌 CaR 和近平滑念珠菌 CP 分别接种小鼠,要求接种后 2 周内小鼠死亡率达 90% 以上,则两个菌株的实际接种剂量分别为 1×10^5 CFU/mL 和 4.5×10^5 CFU/mL,两者相比较,CP 菌的毒力较低,达到相同实验目的需要的接种剂量要高。而感染菌株为 SC5314 时, 1×10^5 CFU/mL 接菌剂量可使小鼠在接种后 5 d 内全部死亡。因此,针对不同菌株我们都需要预先摸索不同接种剂量对动物的影响,并根据我们的实验目的来选择合适的接种剂量。

质量控制是决定动物模型成功建立的根本所在,忽略任何一个环节都会影响模型的稳定性。本文从免疫抑制、菌株制备、静脉接种、剂量选择及模型评价等多个方面对系统性念珠菌感染小鼠模型建立过程进行了逐一描述,指出影响模型质量的关键环节及质控方法。系统性念珠菌感染小鼠模型主要表现为以下特点:感染动物可出现死亡;静脉接种后短期内肾脏、心脏、脑及肺脏等多个脏器出现载菌量高峰,随后下降;病理组织学显示肾脏为靶器官,多器官弥散性真菌性感染的典型病理组织学改变。该模型可应用于系统性念珠菌感染的致病机理,免疫防御及抗真菌药物筛选等研究领域。

参 考 文 献

- [1] Szabo EK, MacCallum DM. The contribution of mouse models to our understanding of systemic candidiasis [J]. FEMS Microbiol Letters, 2011, 320(1): 1-8.
- [2] Repentigny LD. Animal models in the analysis of Candida host-pathogen interactions [J]. Microbiology, 2004, 7(4): 324-329.
- [3] MacCallum DM. Hosting infection: experimental models to assay candida virulence [J]. Int J Microbiol, 2012, Volume 2012, Article ID 363764, 12 pages.
- [4] Zhang LX, Yan KZ, Zhang Y, et al. High-throughput synergy screening identifies microbial metabolites as combination agents for the treatment of fungal infections [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(11): 4606-4611.
- [5] Salas V, Pastor FJ, Calvo E, et al. Anidulafungin in treatment of experimental invasive infection by *Candida parapsilosis*; *in vitro* activity, (1 \rightarrow 3)- β -d-glucan and Mannan serum levels, histopathological findings, and *in vivo* efficacy [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(11): 4985-4989.
- [6] van Asbeck EC, Clemons KV, Stevens DA. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility [J]. Crit Rev Microbiol, 2009, 35(4): 283-309.
- [7] Orasch C, Marchetti O, Garbino J, et al. *Candida* species distribution and antifungal susceptibility testing according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and new vs. old Clinical and Laboratory Standards Institute clinical breakpoints: a 6-year prospective candidaemia survey from the fungal infection network of Switzerland [J]. Clin Microbiol Infect, 2014, 20(7): 698-705.
- [8] Ha JF, Italiano CM, Heath CH, et al. Candidemia and invasive candidiasis: a review of the literature for the burns surgeon [J]. Burns, 2011, 37(2): 181-195.

[收稿日期] 2014-12-04