

· 基础论著 ·

小鼠侵袭性肺曲霉菌病模型的建立

陈海龙 宫立众 郭建巍 黄友章 陈晓平 李莉 赵德峰 刘毅 沈建良

【摘要】 目的 建立小鼠侵袭性肺曲霉菌病(IPA)的动物模型。**方法** 将90只小鼠随机分为5组,模型组:于接种前4天和接种前1天腹腔注射环磷酰胺200 mg/kg,通过鼻腔吸入浓度为 1×10^{11} /L烟曲霉菌孢子悬液40 μ l。非环磷酰胺对照组:除以0.9%氯化钠注射液(NS)代替环磷酰胺外,其余操作同模型组。环磷酰胺对照组:以NS代替烟曲霉菌滴鼻,其余操作同模型组。空白对照组:用NS代替环磷酰胺行腹腔注射,以NS代替烟曲霉菌孢子,其余操作同模型组。重组人粒细胞集落刺激因子(G-CSF)组:在模型组基础上,接种真菌孢子1天后皮下注射G-CSF 20 μ g \cdot kg $^{-1}$ ·d $^{-1}$ 。通过肺组织病理、肺组织真菌培养和血清半乳糖甘露聚糖测定(GM试验)等确定肺侵袭性曲霉菌病模型是否构建成功。**结果** 肺曲霉菌培养、血清GM试验和病理切片等结果均表明,模型组和G-CSF组均发生了IPA,其余各组均无IPA发生。**结论** 成功建立了小鼠肺曲霉菌模型。

【关键词】 侵袭性肺曲霉菌病;动物模型

Construction of mouse model of invasive pulmonary aspergillosis CHEN Hai-long*, GONG Li-zhong, GUO Jian-wei, HUANG You-zhang, CHEN Xiao-ping, LI Li, ZHAO De-feng, LIU Yi, SHEN Jian-liang.

*Department of Hematology, Navy General Hospital, Beijing 100048, China

Corresponding author: GONG Li-zhong, Email: gonglizhong@hotmail.com

【Abstract】 Objective To establish a model of invasive pulmonary aspergillosis (IPA) in mouse. **Methods** Total of 90 mouse were divided into 5 groups randomly. Mouse in model group received cyclophosphamide (intraperitoneal 200 mg/kg, 4 th day and 1 st day before inoculation) and *aspergillus A. fumigatus conidia* suspension (intranasal 40 μ l/mice, 1×10^{11} /L). Mouse in non-immunosuppressant control group received normal saline instead of cyclophosphamide and other procedures were the same as the model group. Mouse in immunosuppressant control group received normal saline instead of *A. fumigatus conidia* suspension and other procedures were the same as the model group. Mouse in normal saline control group received normal saline instead of cyclophosphamide and normal saline instead of *A. fumigatus conidia* suspension. Mouse in G-CSF group were given at dose of 20 μ g \cdot kg $^{-1}$ ·d $^{-1}$ from 1st day and other procedures were the same as the model group. Pathologic examination, culture of the lungs of mice and GM-test were conducted to determine whether the IPA model was successfully establish. **Results** IPA was confirmed in all mice in the model group and the G-CSF group 5 days after inoculation of *A. fumigatus conidia* based on pathologic examination and culture of lung tissue and GM-test. No-IPA was found in the non-immunosuppressant control group, the immunosuppressant control group and the normal saline control group. **Conclusions** The IPA model in mouse was successfully constructed.

【Key words】 Invasive pulmonary aspergillosis; Animal model

随着广谱抗菌药物和免疫抑制剂在临床中的大量使用,器官移植和创伤性诊疗操作的广泛开展,真菌感染的发生率逐年提高,已经成为严重威胁生命的

感染性疾病之一^[1-2]。相当部分血液病患者由于粒细胞缺乏时间过长、化疗剂量的增大、骨髓移植后免疫抑制剂和激素使用的增多,导致真菌感染的风险显著增大,尤其是曲霉菌的感染,目前已经成为发病率最高的真菌感染^[3],而最常见的感染位置为肺部。为深入开展侵袭性肺曲霉菌病(invasive pulmonary aspergillosis, IPA)的基础和临床研究,本研究建立

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.03.003

基金项目:海军总医院创新培育基金(No. CX200907)

作者单位:100048,北京,北京市海军总医院血液科(陈海龙、宫立众、黄友章、陈晓平、赵德峰、刘毅、沈建良);海军总医院检验科(郭建巍);解放军252医院传染科(陈海龙)

通讯作者:宫立众, Email: gonglizhong@hotmail.com

了肺侵袭性曲霉菌病的动物模型,报道如下。

材料与方法

一、实验材料

1. 烟曲霉菌的获得、培养和孢子悬液的制备:从1例急性白血病骨髓移植后患者肺部侵袭性真菌感染肺泡灌洗液分离培养出的经过形态和GM试验证实的烟曲霉菌菌株。另一菌株于北京大学第一医院皮肤科李若愚教授实验室保存。传代后接种于沙保罗培养基斜面上,30℃孵箱内生长期7~10 d,以0.9%氯化钠注射液冲洗、接种针轻刮斜面收获成熟孢子,400目筛过滤去掉菌丝和培养残渣,生理盐水洗涤,用血细胞计数板计数,调整孢子浓度为 1×10^{11} /L备用。

2. 实验药品:环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司,产品批号:10120721),重组人粒细胞刺激因子注射液(G-CSF,惠尔血,麒麟鲲鹏中国生物制药有限公司生产,产品批号:20090254),注射用亚胺培南西司他丁钠(默沙东,产品批号:100604)。

二、方法

1. 实验动物饲养及分组:选取4周龄昆明种小鼠共90只,体重(20 ± 2) g,购自军事医学科学院实验动物所,饲养于海军总医院动物实验中心,清洁级环境,标准饲养,自由饮水。

90只小鼠随机分为5组,模型组(第1组):于接种前4天和接种前1天分别腹腔注射环磷酰胺200 mg/kg,通过鼻腔吸入浓度为 1×10^{11} /L烟曲霉菌孢子悬液40 μ l。非环磷酰胺对照组(第2组):除未用环磷酰胺外,其余操作同模型组。环磷酰胺对照组(第3组):以0.9%氯化钠注射液代替烟曲霉菌滴鼻外,其余操作同模型组。空白对照组(第4组):用0.9%氯化钠注射液代替环磷酰胺行腹腔注射,以0.9%氯化钠注射液代替烟曲霉菌孢子滴鼻,其余操作同模型组。重组人粒细胞集落刺激因子组(第5组):在模型组基础上,皮下注射G-CSF,20 μ g \cdot kg $^{-1}$ \cdot d $^{-1}$ 。实验重复3次,每次、每组6只小鼠,前2次用本院患者肺泡灌洗液中培养出来的曲霉菌,第3次换用北京大学第一医院的菌种。

各组小鼠均在鼻腔吸入孢子后腹腔注射亚胺培南/西司他丁钠200 mg/kg预防细菌感染,1次/8 h,连续2 d,共6次。

2. 白细胞计数:小鼠接种前4天和前1天,接种孢子后3天和5天分别剪尾取血20 μ l,常规血细胞计数仪行白细胞计数。

3. 半乳甘露聚糖(GM)试验:每组第5~7天,股动脉放血后取血清,采用ELISA法

(BIO-RAD公司产品),曲霉菌酶免检测试剂盒(Platelia™ *Aspergillus* EIA)行GM检测,按说明书操作并根据试剂盒提供的标准阈值血清及换算公式计算出吸收度指数(I),即被检血清的GM值,吸收光度(A)指数(I) = $A_{\text{被检血清}}/A_{\text{标准血清均值}}$ 。

4. 肺组织真菌培养:所有动物每天至少观察1次至第14天,第1~14天死亡的动物均在无菌条件下将肺整体取出,左肺置于福尔马林液中固定,右肺取出加入5 ml 0.9%氯化钠注射液,漂洗后,通过300目筛,制成悬液,加入0.9%氯化钠注射液1 ml稀释后,取0.2 ml接种于沙保罗斜面,30℃、4 d后观察培养结果。将濒死的小鼠及第15天仍存活的小鼠麻醉,于无菌条件下将肺取出,其余操作同上述。

5. 肺病理检查:小鼠左肺福尔马林固定,石蜡包埋切片,苏木静-伊红(HE)染色,光镜下观察。

三、统计学处理

采用SPSS 16.0软件进行统计学分析,各组计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、实验动物的一般状况

第1、3、5组动物,注射环磷酰胺后,可见毛发光泽差、脱毛。吸入孢子后第2天部分小鼠即精神萎靡、活动减少、饮水和进食减少,出现呼吸困难,体重减轻直至死亡,第1、5组动物第5天开始出现死亡,存活天数平均为7 d,第3组动物吸入孢子后第7天后开始恢复,直至14 d时尚未死亡。第14 d时,第1组小鼠全部死亡,第2、4组小鼠存活天数均超过14 d,第3组小鼠死亡1只,第5组小鼠全部死亡。

二、实验动物白细胞计数的变化

接种前小鼠白细胞计数为(6.23 ± 0.36) $\times 10^9$ /L,注射环磷酰胺后白细胞计数下降,接种前1天降至(2.53 ± 0.14) $\times 10^9$ /L,接种当天白细胞计数为(0.93 ± 0.06) $\times 10^9$ /L,接种后3 d、7 d、10 d和14 d,白细胞计数分别为(1.53 ± 0.17) $\times 10^9$ /L、(4.60 ± 0.31) $\times 10^9$ /L、(6.59 ± 0.36) $\times 10^9$ /L和(7.26 ± 0.30) $\times 10^9$ /L。接种孢子时,小鼠白细胞计数处于最低水平,7 d后白细胞计数基本恢复正常,符合实验要求。

三、肺组织培养

第1组可见烟曲霉菌生长,制成湿片于显微镜可见大量的分生孢子(图1)。第5组组织培养镜下观察结果同第1组。第2、3、4组均未见烟曲霉菌生长。



注：显微镜下可见大量分生孢子、顶囊和分生孢子梗

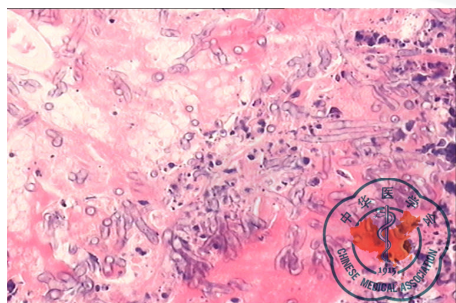
图1 小鼠肺组织培养湿片

四、血清半乳甘露聚糖的测定

第1组、第2组、第3组、第4组、第5组的血清半乳甘露聚糖测定(GM)值分别为 3.64 ± 0.39 、 0.31 ± 0.05 、 0.33 ± 0.04 、 0.31 ± 0.05 和 3.90 ± 0.36 ，第1组的GM试验显著高于第2、3、4组，95%CI分别为 $3.13 \sim 3.52$ 、 $3.12 \sim 3.50$ 、 $3.13 \sim 3.52$ 和 $-0.45 \sim -0.07$ ， P 均 < 0.05 。第5组GM值显著高于第1组， $P = 0.009$ ；第2组与第3、第4组之间差异并不显著， P 分别为 0.867 和 0.990 ，第5组GM显著高于第2、第3、第4组，95%CI分别为 $3.40 \sim 3.78$ 、 $3.38 \sim 3.77$ 和 $3.39 \sim 3.78$ ， P 均 < 0.05 。

五、病理学结果

第1组、第5组小鼠肺坏死组织内，可见大量菌丝生长(图2)，第2、3、4组未见出血和坏死，亦未见霉菌菌丝。



注：小鼠肺组织内可见坏死和大量真菌生长(HE染色，400×)

图2 小鼠肺组织的镜下观察

讨论

小鼠给予环磷酰胺后，白细胞和粒细胞计数水平平均下降，此时呼吸道吸入真菌孢子，吸入后7 d左右几乎全部死亡，血中GM水平显著升高，肺组织悬液可培养出真菌，病理切片可见坏死和真菌菌丝，提示小鼠罹患侵袭性肺曲霉病。相反，未用免疫抑制剂吸入真菌孢子，或用免疫抑制剂不吸入孢子的小鼠均未发生死亡，均未出现血GM水平的

升高，肺组织悬液未培养出真菌，切片亦未发现炎症和真菌菌丝，提示对照组均未发展为侵袭性曲霉菌病，模型组和2个对照组小鼠的综合情况提示本实验成功构建了小鼠肺侵袭性曲霉菌病，重复性良好。

曲霉菌孢子在自然界中广泛存在，每人每天都要吸入一定量的烟曲霉孢子，吸入的孢子是否引发疾病，主要取决于曲霉菌孢子的致病力和机体的抵抗力，两方面综合作用的结果决定是否发病，健康人吸入的曲霉菌孢子很少发病，是由于该菌被机体固有免疫机制有效清除。但当机体的抵抗力降低，不能有效清除曲霉菌孢子时，就导致侵袭性曲霉菌病。机体抵抗力降低主要见于中性粒细胞减少、造血干细胞移植、血液系统恶性肿瘤、获得性免疫缺陷综合征、器官移植后长期免疫抑制剂使用等。本实验中，给予免疫抑制剂和吸入孢子的小鼠发生侵袭性肺曲霉病(IPA)，给予免疫抑制剂不吸入曲霉菌孢子或不给予免疫抑制剂而吸入曲霉菌孢子的小鼠均不发病，提示抵抗力的降低和吸入曲霉菌孢子是IPA发生的重要致病因素。腹腔注射环磷酰胺后出现骨髓毒性作用，造成一定时间的白细胞减少/粒细胞缺乏，极易感染其他病原菌，导致实验动物因感染其他病原菌死亡，建立模型失败，因此，本研究在动物模型中加用了广谱抗菌药物，避免了其他病原菌感染所导致的死亡。

临床上，尽管IPA的发病率明显增加，但与其他感染性疾病的发生率相比仍然较低，临床上很难收集到足够的病例进行研究，因此很多研究仍只能通过动物实验进行^[4-5]。建立动物模型，为寻找曲霉病的致病因子、阐述IPA的发病机制、评价和验证诊断方法、预防治疗、评价治疗效果和药物疗效等提供了基础。目前用于建立IPA动物模型动物有大鼠、小鼠、兔和豚鼠等，但仍以小鼠为多^[6-8]。

半乳甘露聚糖是广泛存在于曲霉菌和青霉菌细胞壁的一类多糖，是现在临床检测曲霉菌抗原的常用实验方法。曲霉菌抗原阳性结果可早于临床表现、痰培养、痰涂片和影像学发现病灶的时间^[9-10]，GM水平的动态监测，还可协助判断真菌的播散程度、治疗反应和预后^[11-12]。因此，GM检测广泛应用于临床曲霉菌病的诊断和治疗效果的判断。在本研究发现实验组和G-CSF组小鼠均可见血中GM水平显著高于几个对照组，提示GM的水平测定可用于诊断侵袭性曲霉菌病。G-CSF组的GM水平显著高于实验组，可能的解释是使用G-CSF后，粒细胞的功能

增强,吞噬和杀伤曲霉菌的能力增强,曲霉菌的破坏增多,导致血中GM水平升高。

参 考 文 献

- 1 Denning DW. Therapeutic outcome of invasive aspergillosis. Clin Infect Dis,1996,23(3):608-615.
- 2 Schwartz S, Ruhnke M, Ribaud P, et al. Improved outcome in central nervous system aspergillosis, using voriconazole treatment. Blood,2005,106(8):2641-2645.
- 3 Pagano L, Cain M, Candoni A, et al. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the + SEIFEM-2004 study. Haematologica,2006,91(8):1068-1075.
- 4 Kauffman HF, Tomee JF. Defense mechanism of the airways against aspergillus fumigatus: role in invasive aspergillosis. Chen Immunol,2002,81(1):94-113.
- 5 Brakhage AA. Systemic fungal infections caused by Aspergillus species: epidemiology, infection process and virulence determinants. Curr Drug Targets,2005,6(8):875-886.
- 6 Tansho S, Abe S, Ishibashi H, et al. Efficacy of intravenous itaconazole against invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic mice. J Infect Chemother,2006,12(6):355-362.
- 7 Lewis RE, Liao GL, Hou JG, et al. Comparative analysis of amphotericin B lipid complex and fungal clearance in a murine model of acute invasive pulmonary aspergillosis. Antimicrob Agents Chemother,2007,51(4):1253-1258.
- 8 Takemoto K, Yamamoto Y, Ueda Y, et al. Comparative study on the efficacy of AmBisome and Fungizone in mouse model of pulmonary aspergillosis. J Antimicrob Chemother,2006,57(4):724-731.
- 9 Maertens J, Van Eldere J, Verhaegen J, et al. Use of circulating galactomannan screening for early diagnosis of invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients. J Infect Dis,2002,186(9): 1279-1306.
- 10 姚佳峰, 苏东, 黄勇, 等. 半乳甘露聚糖试验诊断血液病患者并发侵袭性曲霉感染的初步探讨. 中国实验血液学杂志,2009,17(3):765-769.
- 11 石岩, 刘大为, 隆云, 等. 血清半乳甘露聚糖在重症患者肺部曲霉菌感染分级诊断中的作用. 中华内科杂志,2009,48(3):225-230.
- 12 Boutboul F, Alberti C, Leblanc T, et al. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients:increasing antigenemia is associated with progressive disease. Clin Infect Dis,2002(7):34:939-943.

(收稿日期: 2012-08-14)

(本文编辑: 孙荣华)

陈海龙, 宫立众, 郭建巍, 等. 小鼠侵袭性肺曲霉菌病模型的建立[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2013, 7 (3): 336-339.