



白色念珠菌经口感染 ICR 小鼠建立系统性感染模型

罗银珠^{1,2}, 潘金春^{1,2}, 何丽芳^{1,2}, 闵凡贵^{1,2}, 叶秋莹³,
陈锐^{1,2}, 吴玉娥^{1,2}, 黄韧^{1,2}, 张钰^{1,2*}

(1. 广东省实验动物监测所, 广州 510663; 2. 广东省实验动物重点实验室, 广州 510663; 3. 广东药学院, 广州 510224)

【摘要】 目的 探究白色念珠菌(*C. albicans*)经口感染 ICR 小鼠建立系统性感染模型, 观察 *C. albicans* 经黏膜感染后在小鼠体内组织增殖及分布规律。方法 46 只 ICR 雄性小鼠随机分为模型组 A($n=20$)、模型组 B($n=20$)、对照组($n=6$)。模型组采用棉签法口腔接种 *C. albicans*(7×10^6 cfu/mL), 对照组同方法接种等容积生理盐水。模型组 A 小鼠用于临床、生存、剖检观察试验; 模型组 B 接种后第 3、5、7 天随机解剖 5 只小鼠用于组织载菌量和病理检验(对照组每个时间点解剖 2 只), 活菌平板计数法检测小鼠组织载菌量, 光镜观察小鼠舌、胃、肝、肾病理组织学变化。结果 模型组小鼠接种后第 3 天舌面出现明显白斑并随时间加重引起死亡, 第 5 天小鼠死亡率超过 50%, 第 7 天死亡率达 100%, 并能从舌(87.5%)、胃(87.5%)及内脏组织肝(54.5%)、肾(50.5%)、肺(20%)和心脏(4%)中分离到 *C. albicans*, 显微镜观察在舌、食道、胃、肝、肾存在菌丝的增殖, 对照组未见 *C. albicans* 生长, 提示模型组小鼠因 *C. albicans* 黏膜感染引起小鼠播散性的系统性感染。结论 *C. albicans* 可在一定条件下突破黏膜免疫屏障引起小鼠机会性系统性感染, 从而加重感染死亡。

【关键词】 白色念珠菌; 小鼠口腔; 黏膜模型; 系统性感染; 小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)06-0591-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.06.007

Establishment of a ICR mouse model of systemic *C. albicans* infection induced by oral inoculation

LUO Yin-zhu^{1,2}, PAN Jin-chun^{1,2}, HE Li-fang^{1,2}, MIN Fan-gui^{1,2},
YE Qiu-ying³, CHEN Rui^{1,2}, WU Yu-e^{1,2}, HUANG Ren^{1,2}, ZHANG Yu^{1,2*}

(1. Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangzhou 510663, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Laboratory Animals, Guangzhou 510663; 3. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510224)

【Abstract】 **Objective** To establish a mouse model of systemic *C. albicans* infection by oral inoculation of the pathogen and observe the proliferation and distribution of *C. albicans* in vivo tissues. **Methods** Male ICR mice ($n=46$) were used as the experiment group ($n=40$) and blank group ($n=6$). Cotton swabs with *C. albicans* were used to infect the mice (7×10^6 CFU/mL), and the blank group with saline. The mice of the experiment group were randomly divided into two groups: model group A for clinical assessment ($n=20$) and model group B for tissue fungal burden detection ($n=20$). Clinical score, survival and autopsy were carried out among the model group A. Five mice were randomly killed from the model group B at 3 d, 5 d and 7 d after infection, respectively (blank group killed 2 mice each time). Microbial load tablet method was used to detect the tissue fungal burdens in different tissues, meanwhile samples of tongue, esophagus, stomach, liver, kidney, lung of infected mice were taken for pathological examination. **Results** White spot appeared on the surface of tongue since 3 d postinfection and increased with time and finally caused death. The mortality reached over 50% at 5 d. *C. albicans* was not only detected from the tongue (87.5%), stomach (87.5%), liver (54.5%), kidney (50.5%), lung (20%) and heart (4%), but also was microscopically seen mycelia proliferation in the tongue, stomach,

[基金项目] 广东省科技计划项目(编号:2014A010107018)。

[作者简介] 罗银珠(1983-), 女, 兽医师, 研究方向: 病原学及实验动物模型研究。E-mail: agluo122@sina.com

[通讯作者] 张钰(1970-), 女, 研究员, E-mail: zhangyugzh@hotmail.com

liver, and kidney, yet not seen in the control group, showing that *C. albicans* caused disseminated systemic infection through mucosal infection in mice. **Conclusions** *C. albicans* can induce opportunistic systemic infection by breakthrough the mucosal immune barrier, so as to increase the infection to death.

【Key words】 *Candida albicans*. Oral cavity; Mucosal infection; Systemic infection; Mouse
Corresponding author: ZHANG Yu. E-mail: zhangyuzh@hotmail.com

口腔念珠菌病已成为世界范围内日益严重的院内口腔感染性真菌性疾病,其中白色念珠菌(*Candida albicans*, *C. albicans*)是主要致病病原,感染比例占口腔念珠菌病的 50% 以上^[1-4]。*C. albicans* 是一种人类共生的二相性微生物,可以在皮肤、黏膜表面、肠胃消化道和女性泌尿生殖系统存在,当机体免疫力降低或环境改变时可由共生酵母相发芽转变为毒力更强的菌丝相,从而引起侵袭性的白色念珠菌病^[5-8]。近年来,随着抗生素、免疫抑制剂、器官移植、导管介入等治疗手段的广泛应用及一些肿瘤、血液病、获得性免疫缺陷病等严重疾病的发生率升高,由念珠菌黏膜感染引起患者系统性念珠菌病报道增多^[9, 10]。*C. albicans* 感染模型、毒力因子及与宿主相互作用等研究不断深入^[11-17],但小鼠黏膜感染念珠菌引起播散性系统性感染的报道却不多,本研究旨在对 *C. albicans* 口腔黏膜接种引起的小鼠机会性系统性感染进行研究和阐述,为进一步研究 *C. albicans* 黏膜感染机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物、分组及前处理

SPF 级 ICR 雄性小鼠,46 只,5 周龄,体重 24 ~ 26 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2012-0001】,饲养于广东省实验动物监测所二级生物安全负压感染实验室内【SYXK(粤)2012-0122】,实行光照/黑暗各 12 h 昼夜循环,自由进食,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。

动物使用前以棉拭子涂抹口腔黏膜后作 *C. albicans* 培养,筛选出 *C. albicans* 培养阴性动物做为实验动物。动物分为模型组(40 只)和空白组(6 只)。模型组平分 A, B 两组,均使用 *C. albicans* 口腔棉签法感染,模型组 A 于生存率、体重及口腔打分,模型组 B 用于载菌量及病理检测,为避免动物感染过程中出现死亡而导致数据丢失,模型组 B 感染数量比计划采样量(15 只)多 5 只。空白组小鼠同方法感染等容积生理盐水并进行与实验组相同的实验项。所有动物感染前 1 d 醋酸泼尼松 100 mg/

kg 肌注,同时 0.08% 盐酸四环素连续饮水给药至感染后第 3 天。动物口腔感染操作前用 1.5% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(加热保温,麻醉时长 1.5 h)。

1.2 菌株及菌体悬液制备

C. albicans SC5314 株(ATCC: MYA-2876)为中国科学院微生物研究所张立新博士馈赠。从 -80℃ 冰箱取出菌液,接种到固体 YEPD 平板上,30℃ 培养 36 h 后,挑选单个菌落于液体 YEPD 中,30℃ 摇床培养 24 h,180 r/min。将扩大培养好的菌液离心,沉淀用生理盐水重悬洗涤 3 次,最后用生理盐水调整浓度至 7×10^6 CFU/mL,备用。

1.3 动物口腔黏膜接种

参考文献^[14, 18],动物麻醉后,用灭菌棉签在配制好的菌液中浸泡 3 min,放置到实验鼠小鼠口腔内(对照组以灭菌生理盐水代替),轻轻旋转使棉签表面菌液充分接触口腔上颚,脸颊及舌面,并停留口腔 1.5 h。

1.4 感染程度评价

1.4.1 临床评分及生存观察

模型组 A 小鼠每天进行口腔评分、称重、死亡情况及临床表现记录。口腔打分标准:正常,0 分;少量白斑(<20%),1 分;中量白斑(21% < 90%),2 分;大量白斑 > 91% 尚可开口采食,3 分;大量白斑 > 91% 且口腔黏糊,难开口,流涎明显,4 分。

1.4.2 载菌量检测

模型组 B 小鼠感染后第 3、5、7 天分别随机解剖 5 只小鼠,麻醉后无菌取组织(舌、胃、肝、肾、心脏、肺)放于灭菌离心管内,-20℃ 保存备用。组织载菌量测定:将组织称重后放到装有 1 mL 灭菌生理盐水研磨器内,研磨 30 s 后,倍比稀释后,取 100 μL 混悬液涂到固体 YEPD 平板,每个浓度做 2 个平行板,30℃ 培养 36 h 后数菌落数。对死亡小鼠进行尸检。

1.4.3 病理检测

模型组 B 感染小鼠解剖做载菌量检测的同时,各取舌、食道、胃、肝、肾组织用 4% 多聚甲醛固定 24 h,再按常规步骤制作石蜡切片,采用 HE 染色和 PAS 染色,光学显微镜下观察拍照。

1.5 数据处理及统计分析

实验结束,口腔临床打分及体重结果以 $\bar{x} \pm s$ 表

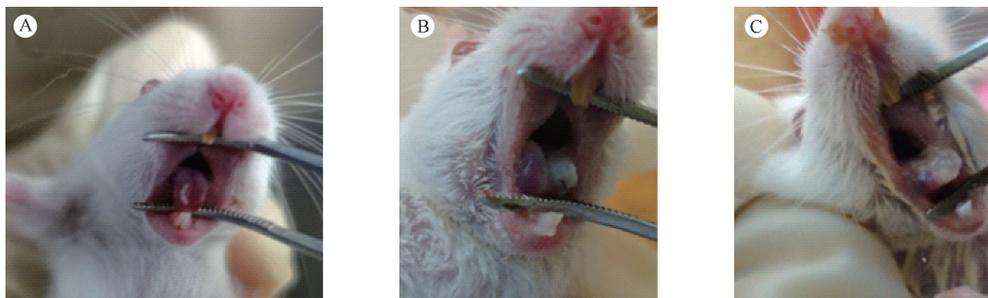
示,组织载菌量结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 GraphPad Prim 5.01 进行数据处理及图表形成。

2 结果

2.1 口腔黏膜感染小鼠临床变化和评价

感染后 2 d 小鼠舌头出现少量淀粉样白斑,3 d

口腔白斑明显(见图 1B),到 5 d 口腔白斑占据舌面 90% 以上(见图 1C),实验后期大部分鼠口腔打分超过 3 分(见图 2A),小鼠表现出口腔有唾液流出到口腔周围,小鼠口腔干燥,采食、吞咽乃至张口难,精神萎靡,体重降低(见图 2B),接种后第 5 天死亡率达到 50% 以上,第 7 天达 100% (见图 2C)。

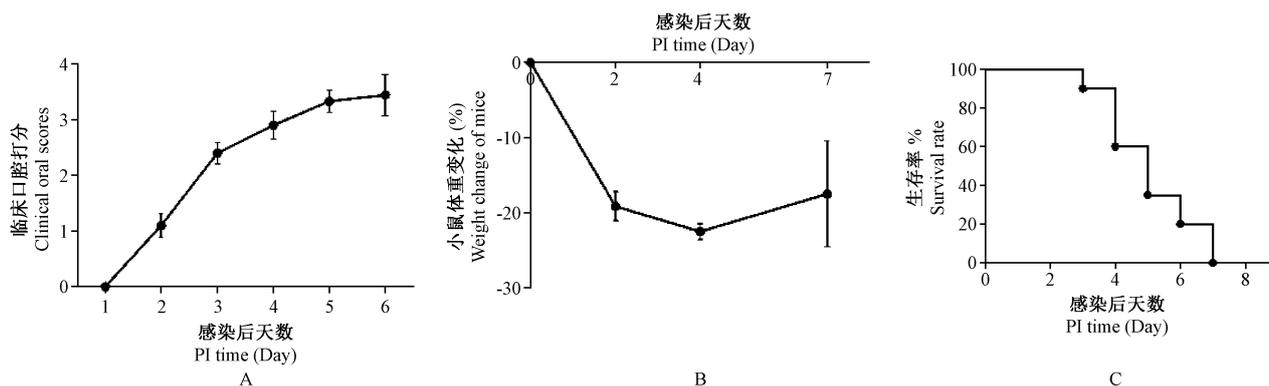


注:A:对照组小鼠;B&C:感染小鼠(3 d,5 d)。

图 1 *C. albicans* 口腔黏膜感染小鼠舌头白斑

Note. A: Mice of the control group. B&C: Experimental group(3 d,5 d).

Fig. 1 Gross appearance of tongue leukoplakia in the mice induced by oral mucosal *C. albicans* infection



注:PI:感染后;A:口腔临床打分;B:体重变化曲线;C:生存曲线。

图 2 *C. albicans* 口腔黏膜感染小鼠临床评价($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

Note. PI: Postinfection evaluation of the orally infected mice. A: Oral clinical scores. B: The body weight change curve. C: The survival curve

Fig. 2 Clinical assessment of the mice infected by oral mucosal inoculation of *C. albicans*

2.2 口腔黏膜感染小鼠组织载菌量检测

接种后第 3、5、7 天,*C. albicans* 在舌和胃中均能检出较高浓度的载菌量,但在舌上的定值从第 3 天到第 7 天呈减少趋势,而胃内载菌量则维持在一定水平。肾与肝也检测到一定量的 *C. albicans*,载菌量低于胃和舌(见图 3)。舌与胃的检出率均为 87.5% (21/24)。此外,每个时间点个别鼠内的肾、肝、肺、心脏检出了 *C. albicans*,检出率分别为 54.5% (12/22), 50.0% (12/24), 20.0% (5/25), 4.0% (1/25),说明菌已从黏膜扩散到了内脏组织。

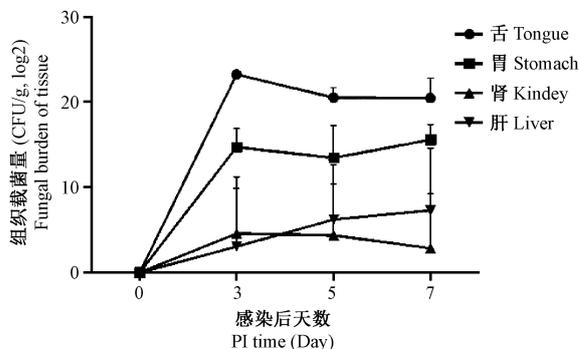


图 3 *C. albicans* 口腔黏膜感染小鼠载菌量检测($\bar{x} \pm S \bar{x}$, $n = 5$ /时间点)

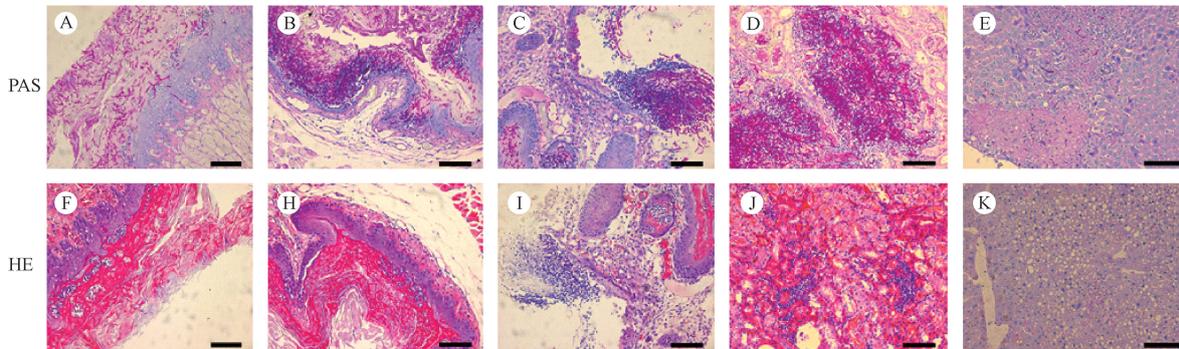
Fig. 3 Fungal burdens of the mice infected by oral mucosal inoculation of *C. albicans*

模型组 B 一共感染 20 只小鼠,除在感染后 4 d 和 6 d 死亡 5 只小鼠,3 d 和 5 d 均为活剖小鼠,7 d 3 只为活剖,2 只为死亡鼠(死亡时间 1~2 h)。

2.3 口腔黏膜感染小鼠组织病理学检查

选择检出阳性菌的模型组 B 动物的部分组织

进行 HE 和 PAS 染色,显示,大量酵母型和菌丝型菌体侵袭舌、食道、胃黏膜表面,偶尔见菌丝相 *C. albicans* 侵袭黏膜下层,肾脏与肝也可见到菌丝的定殖;HE 染色结果显示以中性粒细胞和巨噬细胞为主的炎性细胞浸润。见图 4。



注:A-E:依次为舌、食道、胃、肾、肝 PAS 染色;F-J:对应组织的 HE 染色。

图 4 *C. albicans* 口腔黏膜感染小鼠组织 PAS/HE 染色(标尺 = 100 μm)

Note. A-E:Tongue, esophagus, stomach, kidney, and liver, PAS staining. F-J:The same organs, HE staining.

Fig. 4 PAS/HE staining of different organ tissues of the mice infected by oral mucosal inoculation of *C. albicans*

3 讨论

念珠菌在口腔中存在可以表现为无临床症状的健康带菌者或有临床体征的口腔念珠菌病。在口腔念珠菌病中,白念珠菌引起的感染占 65% 左右^[19]。本研究选用 *C. albicans* SC5314 株作为建立口腔念珠菌黏膜感染模型的目标菌株,以便更客观了解与临床相近的典型口腔念珠菌病的发生与发展过程。*C. albicans* 以共生酵母相存在于健康人群中的黏膜表面,有研究表明^[20, 21],口腔念珠菌病的发病机制受到很多因素影响,既与念珠菌本身的形态、菌的数量、菌体表面结构及粘附力有关,还与宿主的防御机制有关。宿主的防御机制包括局部机械性及全身因素如上皮屏障、口腔菌丛相互作用和稳定、口腔分泌液、内分泌、营养因素、免疫功能、抗生素和激素的使用、化疗和放疗以及恶性疾病等。本研究模拟临床条件对模型小鼠进行醋酸泼尼松肌肉注射及四环素饮水,制造便于 *C. albicans* 粘附的宿主环境。根据 *C. albicans* 在营养丰富的培养基中繁殖一代需至少 1.5 h 特征^[22],本研究在感染初期,对带菌棉签在模型小鼠口腔停留时间控制在 1.5 h,以便菌体成功粘附并繁殖。

研究显示,小鼠感染 *C. albicans* 后第 3 天 *C. albicans* 成功定殖口腔黏膜并逐渐形成典型淀粉样白斑。病原菌借助宿主吞咽,饮水等进入到食道和胃等消化道管腔。与此同时,*C. albicans* 在感染后 3 d

可在感染鼠肝、肾等内脏组织检测到阳性菌,表明病原菌已成功突破小鼠消化道黏膜上皮屏障,通过血液或淋巴循环等进入动物体内引起播散性系统性感染。*C. albicans* 毒素及其分泌的蛋白酶是促进菌粘附、入侵、炎症坏死及血管通透性增加的重要帮凶,可致宿主死亡。Moyes 等的最新研究^[20]显示念珠菌在与宿主上皮细胞相互作用时可产生一种假丝酵母细胞溶解酶(candidalysin)的毒素,在念珠菌黏膜感染中起了重要作用,以上因素综合作用下导致 *C. albicans* 在本实验中出现了突破消化系统黏膜屏障后进入机体内循环系统引起系统性感染。小鼠口腔和全身念珠菌病模型与人类念珠菌病非常相似,中性粒细胞和巨噬细胞在宿主抗念珠菌感染中起到重要的第一道防线,本实验结果显示各组织出现大量的单核细胞浸润现象与此理论吻合。结合本次实验的载菌量及病理组织学结果,发现肾与肝是 *C. albicans* 重要的内脏组织靶器官,这与吴玉娥等^[17]念珠菌系统性感染模型结果相吻合。值得注意的是,病原菌入侵到感染鼠内脏器官呈现机会性扩散,有约 94.1% 小鼠出现 3 个组织同时出现菌体检测阳性(舌、胃、肝及舌、胃、肾),4 个组织同时出现菌体检测阳性约为 33.4% (舌、胃、肝、肾及舌、胃、肝、肺),约有 8.3% 小鼠能从肾与肝内脏组织检出阳性菌而在黏膜感染部位无检测到阳性菌,以上情况提示白色念珠菌由黏膜感染入侵蔓延至系统感染过程中与动物个体的免疫机能、黏膜特征或黏膜上皮微

生物菌群等差异而有所不同,具体机制仍需进一步研究。

综上所述,本实验证实了白色念珠菌口腔黏膜感染有系统扩散的现象和事实,揭示 *C. albicans* 可在特殊条件下(如宿主免疫力低下或免疫抑制)突破宿主在抗念珠菌感染的先天免疫系统及适应性免疫系统屏障引起机会性系统性感染,为研究 *C. albicans* 口腔黏膜性感染与系统性感染相互关系提供实验依据,也为白色念珠菌经口感染 ICR 小鼠建立系统性感染模型的研究提供新的视野。

参 考 文 献

- [1] Doi AM, Pignatari AC, Edmond MB, et al. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian National Surveillance Program [J]. PLoS One, 2016, 11(1): e0146909.
- [2] Barchiesi F, Orsetti E, Gesuita R, et al. Epidemiology, clinical characteristics, and outcome of candidemia in a tertiary referral center in Italy from 2010 to 2014 [J]. Infection, 2016, 44(2): 205 - 213.
- [3] Tadec L, Talarmin JP, Gastinne T, et al. Epidemiology, risk factor, species distribution, antifungal resistance and outcome of Candidemia at a single French hospital: a 7-year study [J]. Mycoses, 2016, 59(5): 296 - 303.
- [4] Luzzati R, Cavinato S, Deiana ML, et al. Epidemiology and outcome of nosocomial candidemia in elderly patients admitted prevalently in medical wards [J]. Aging Clin Exp Res, 2015, 27(2): 131 - 137.
- [5] Freire F, Ferraresi C, Jorge AO, et al. Photodynamic therapy of oral Candida infection in a mouse model [J]. J Photochem Photobiol B Biol, 2016, 159: 161 - 168.
- [6] Nilsby I, Norden A. Studies of the occurrence of Candida albicans [J]. Acta Med Scand, 1949, 133(5): 340 - 345.
- [7] Valentincic M. [Candida albicans] [J]. Prir Clovek Zdravje, 1951, 6(1-2): 47 - 48.
- [8] Corcelle L. Keratitis caused by Candida albicans [J]. Bull Soc Ophthalmol Fr, 1957, 11(9): 618 - 20.
- [9] Salvatori O, Puri S, Tati S, et al. Innate immunity and saliva in Candida albicans-mediated oral diseases [J]. J Dent Res, 2016, 95(4): 365 - 371.
- [10] Ramla S, Sharma V, Patel M. Influence of cancer treatment on the Candida albicans isolated from the oral cavities of cancer patients. Supportive care in cancer [J]. Support Care Cancer, 2016, 24(6): 2429 - 2436.
- [11] Rahman D, Mistry M, Thavaraj S, et al. Murine model of concurrent oral and vaginal Candida albicans colonization [J]. Methods Mol Biol, 2012, 845: 527 - 535.
- [12] Rahman D, Mistry M, Thavaraj S, et al. Murine model of concurrent oral and vaginal Candida albicans colonization to study epithelial host-pathogen interactions [J]. Microbes Infect, 2007, 9(5): 615 - 622.
- [13] Yoshioka H, Ito-Kuwa S, Nakamura K, et al. [Virulence of Candida dubliniensis in comparison with Candida albicans using an experimental model of mouse oral candidiasis [J]. Med Mycol J, 2012, 53(2): 135 - 145.
- [14] Takakura N, Sato Y, Ishibashi H, et al. A novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush [J]. Microbiol Immunol, 2003, 47(5): 321 - 326.
- [15] Tashiro M, Kimura S, Tateda K, et al. Pravastatin inhibits farnesol production in Candida albicans and improves survival in a mouse model of systemic candidiasis [J]. Med Mycol, 2012, 50(4): 353 - 360.
- [16] Luisa Gil M, Murciano C, Yanez A, et al. Role of Toll-like receptors in systemic Candida albicans infections [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2016, 21: 278 - 302.
- [17] 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, (03): 301 - 305.
- [18] Solis NV, Filler SG. Mouse model of oropharyngeal candidiasis [J]. Nat Protoc, 2012, 7(4): 637 - 642.
- [19] 孙康德, 张家胜, 陈旭, 等. 口腔白念珠菌 3 种致病相关分泌型水解酶检测方法的建立及应用 [J]. 检验医学, 2016, 31(5): 355 - 358.
- [20] Moyes DL, Wilson D, Richardson JP, et al. Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection [J]. Nature, 2016, 532(7597): 64 - 66.
- [21] 李丹, 崔凡, 熊俊浩. 白念珠菌对宿主的黏附机制 [J]. 中国真菌学杂志, 2014(5): 316 - 320.
- [22] 徐岩英, 胡碧琼. 口腔念珠菌及其致病性的研究 [J]. 中华口腔医学杂志, 1997(3): 52 - 54.

[收稿日期] 2016 - 07 - 08