

单增李斯特菌感染 TNF- α 人源化小鼠模型的建立与应用

唐 军, 孙萌萌, 徐艳峰, 占玲俊*

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 卫计委人类疾病比较医学重点实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 评价 TNF- α 单抗药物干预后宿主对单增李斯特菌感染的易感性变化。**方法** 动物分为 C57BL/6 小鼠感染对照组, TNF- α 人源化小鼠感染对照组, TNF- α 人源化小鼠阿达木单抗 (adalimumab) 干预组 ($n=6$)。对照组小鼠感染前 24 h 静脉注射生理盐水 200 μ L, adalimumab 组小鼠按照 10 mg/kg 在感染前 24 h 静脉注射阿达木单抗 200 μ L。经腹腔接种感染单增李斯特菌 1×10^4 CFU, 检测肝脏及脾脏组织荷菌量, 病理变化以及免疫细胞分布, 统计对照组与抗体干预组间的差异。**结果** 感染单增李斯特菌 4 d 后, 相对于对照组小鼠, 抗体干预组小鼠肝脏中微脓肿面积显著增大 ($P < 0.05$), 脾脏和肝脏组织荷菌量显著升高 ($P < 0.01$), 而巨噬细胞和 B 细胞的分布没有显著变化。**结论** TNF- α 对于宿主抵抗单增李斯特菌的免疫具有重要作用, TNF- α 单抗干预后宿主疾病进展显著加重。

【关键词】 TNF- α 单抗; 单增李斯特菌; 易感性; 小鼠模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 06-0010-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.06.003

Establishment and application of a TNF- α humanized mouse model of *Listeria monocytogenes* infection

TANG Jun, SUN Mengmeng, XU Yanfeng, ZHAN Lingjun*

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences; Key Laboratory of Human Disease Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine; Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective TNF- α monoclonal antibody drugs are widely used to treat conditions such as rheumatic arthritis and ankylosing spondylitis. On the other hand, it is also a wide concern that the application of these drugs may increase the susceptibility of patients to infections such as tuberculosis and listeriosis. The aim of this study was to establish a mouse model of *Listeria monocytogenes* infection and to evaluate the effect of TNF- α monoclonal antibody on the host susceptibility to this infection. **Methods** Six SPF 14-week old female C57BL/6 mice and 12 SPF 14-week old female TNF- α humanized mice were injected with saline or adalimumab intravenously, and challenged with intraperitoneal injection of 10^4 CFU *Listeria monocytogenes* 24 h later. After one day or 4 days, the mice were sacrificed to examine the pathological lesions and the bacterial load in the spleen and liver. **Results** Four days after infection, the area of microabscess in the

【基金项目】 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31600742); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程重大协同创新项目 (2016-I2M-1-013)。

【作者简介】 唐军 (1983—), 男, 助理研究员, 博士, 研究方向: 结核分枝杆菌等胞内菌的致病机制。E-mail: tjun1030@hotmail.com

【通信作者】 占玲俊 (1981—), 女, 副研究员, 博士, 研究方向: 系统性结核动物模型的建立与应用。E-mail: zhanlj@cnilas.org

liver tissues was significantly increased in the adalimumab-treated group. The bacterial load in the spleen and liver tissues of the adalimumab-treated group was significantly higher than that of the C57BL/6 mouse control group and TNF- α humanized mouse control group ($P < 0.05$). However, the distribution of macrophages in the liver tissues and B cells in the spleen tissues were similar among groups. **Conclusions** TNF- α plays an important role in the host immune responses to *Listeria monocytogenes* infection. After the intervention with TNF- α monoclonal antibody, the progress of host disease is significantly exacerbated.

【Key words】 TNF- α monoclonal antibody; *Listeria monocytogenes*; susceptibility; mouse model

肿瘤坏死因子(TNF- α)是在风湿性关节炎、克罗恩病等慢性炎症性疾病致病机制中起主要作用的一种促炎性因子。在类风湿关节炎和强直性脊柱炎的临床治疗上,英夫利昔单抗和阿达木单抗等 TNF- α 抑制剂是疗效最为显著的一类药物。但这些药物的使用也会带来一些风险,在治疗中需要特别注意。比如患者发生严重感染和其他机会性感染的风险增加,包括结核分枝杆菌、单增李斯特菌等引起的感染^[1-2]。在对这一类药物及其仿制药进行临床前研究的时候,有必要对这些潜在的不良反应进行评估^[3]。作为一种在自然环境中分布广泛的致病菌,单增李斯特菌往往对免疫功能低下的人群如新生儿、孕妇和免疫功能缺陷者等造成威胁^[4]。我们通过建立一种单增李斯特菌感染的 TNF- α 人源化小鼠模型,为评价 TNF- α 单抗类药物治疗引起的单增李斯特菌感染风险提供了一种研究模式,并应用该模型对阿达木单抗进行了初步评价。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验用 TNF- α 人源化小鼠 12 只,购于百奥赛图公司[SCXK(京)2015-0008],是将 C57BL/6 小鼠 17 号染色体上 *Tnf* 基因用人 *TNF* 基因进行原位替换,从而使人 *TNF* 基因在该品系小鼠上表达。野生型 C57BL/6,6 只,购于维通利华公司[SCXK(京)2012-0001]。实验动物均为 SPF 级,雌性,14 周龄,体重 22~24 g。动物饲养及实验在中国医学科学院医学实验动物研究所[SYXK(京)2015-0035] ABSL-2 实验室开展。动物实验方案经研究所实验动物管理和使用委员会(IACUC)批准,批准号为 ILAS-PL-2015-014。

1.2 实验材料

单核增生李斯特菌,编号 1.10753(ATCC 编号 19115),来源于中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC);阿达木单抗(adalimumab),艾伯维公司;PALCAM 选择性培养基(CM509 A),购自北京陆

桥;含 0.6% 酵母浸膏的胰酪胨大豆肉汤 TSB-YE (CM501 A),购自北京陆桥。

1.3 实验方法

1.3.1 菌液制备和动物感染

向菌种安瓿瓶中加入 0.5 mL TSB-YE 培养基,充分溶解后全部加入 7 mL TSB-YE 培养基中 37℃ 过夜培养。复苏增菌两次后,进行连续稀释,然后均匀涂布于 PALCAM 培养基上,培养 24~48 h 后对菌落进行计数,菌落为浅绿色,中心凹陷,菌落周围有黑色的水解环,计算菌液浓度(CFU/mL)。增菌后的菌液立刻置于 4℃ 保存,动物感染时将原菌液用生理盐水连续稀释一定比例后取 200 μ L 进行腹腔注射。注射所用菌液再次涂布平皿,培养计数后对接种菌量进行修正,实际注射量为每只 1×10^4 CFU。

1.3.2 动物分组

动物分为三组,每组 6 只:野生型 C57BL/6 小鼠感染对照组;TNF- α 人源化小鼠感染对照组;TNF- α 人源化小鼠 adalimumab 组。对照组小鼠感染前 24 h 静脉注射生理盐水 200 μ L,adalimumab 组小鼠则按照 10 mg/kg 在感染前 24 h 静脉注射阿达木单抗 200 μ L。

1.3.3 检测及分析方法

小鼠感染 1 d($n=3$)及 4 d($n=3$)后进行解剖,取肝及脾组织。一部分进行组织匀浆后,连续稀释并均匀涂布于 PALCAM 平板上,培养 24~48 h。计数并计算组织荷菌量。另一部分置于 10% 福尔马林溶液中固定,石蜡包埋后切片进行病理检测。苏木素-伊红(HE)染色:切片脱蜡,经苏木素染色,1% 盐酸酒精分化,氨水反蓝后伊红染色,脱水透明封片,然后观察组织相应的病理变化。免疫组织化学染色:组织切片脱蜡,使用柠檬酸钠进行抗原修复,封闭后加一抗 *Listeria monocytogenes* antibody(ab35132, Abcam)、F4/80 antibody(565409, BD)、TNF- α antibody(ab9635, Abcam)、CD45R antibody(550286, BD),4℃ 过夜后加二抗,DAB 显

色,苏木素复染后冲洗,脱水透明封片。切片经滨松 NanoZoomer S60 进行数字扫描后,使用 NDP 软件进行相关分析。

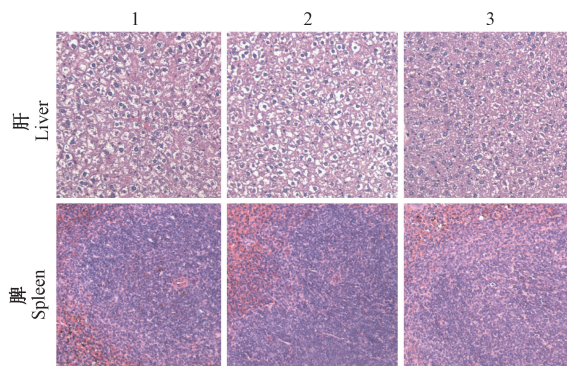
1.4 统计学方法

实验数据用 SPSS 15.0 统计软件进行数据处理,用平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 病理 HE 染色

感染后第 1 天,各组脾组织的病理变化不明显,肝组织均出现肝细胞水肿,无其他特异性病变,但各组间差异无显著性(图 1)。肝的病理改变表明单增李斯特菌已经侵袭进入这一重要的靶器官,并造成了一定的病理损伤。但在这一时间点病变较为轻微,尚不典型,各组间差异不明显,没有观察到 adalimumab 干预对疾病的早期影响。



注:(1)野生型小鼠对照组;(2)TNF- α 人源化小鼠对照组;
(3)TNF- α 人源化小鼠 adalimumab 干预组。

图 1 感染 1 d 后组织病理变化情况($\times 10$)

Note. (1) A WT control mouse. (2) A control TNF- α mouse.
(3) A TNF- α mouse injected with adalimumab.

Fig. 1 Pathological changes of the mouse
liver and spleen at one day after infection

感染后第 4 天,各组肝组织均出现明显的病理变化,为肝细胞坏死伴随炎性细胞浸润,且各组之间存在显著差异。这种广泛分布的微脓肿病变是李斯特菌病的一种典型病理表现,其数量和大小反映了疾病的严重程度。如图 2A 所示,野生型组 C57BL/6 小鼠肝中出现点状微脓肿,数量较少且面积小。TNF- α 人源化小鼠对照组表现与野生型组类似,而 adalimumab 组则表现为面积较大且数量较多的微脓肿。我们统计了每只小鼠肝数字化切片中全部微脓肿的数量和大小,如图 2B 所示。各组

间比较发现 adalimumab 组中微脓肿半径显著大于 TNF- α 人源化小鼠对照组及野生型组对照(图 2C)。这表明 adalimumab 干预显著加重了单增李斯特菌感染小鼠的肝脏病理损伤。

2.2 组织荷菌量

感染后第 4 天,取各组动物肝和脾,称重后测定其单增李斯特菌的荷菌量。结果显示,人源化 TNF- α 小鼠在肝脾组织中的荷菌量与野生型 C57BL/6 小鼠差异没有显著性。而 adalimumab 组的小鼠在以上两种组织中的荷菌量均显著高于野生型对照组和 TNF- α 人源化小鼠组(图 3)。

从病理变化和组织荷菌量的差异,可以看出 TNF- α 对于宿主抵抗单增李斯特菌的免疫具有重要作用,TNF- α 单抗干预后宿主疾病进展显著加重。此外,人 TNF- α 替代小鼠 TNF- α 之后,没有对宿主抵抗李斯特菌的免疫产生显著性的影响。

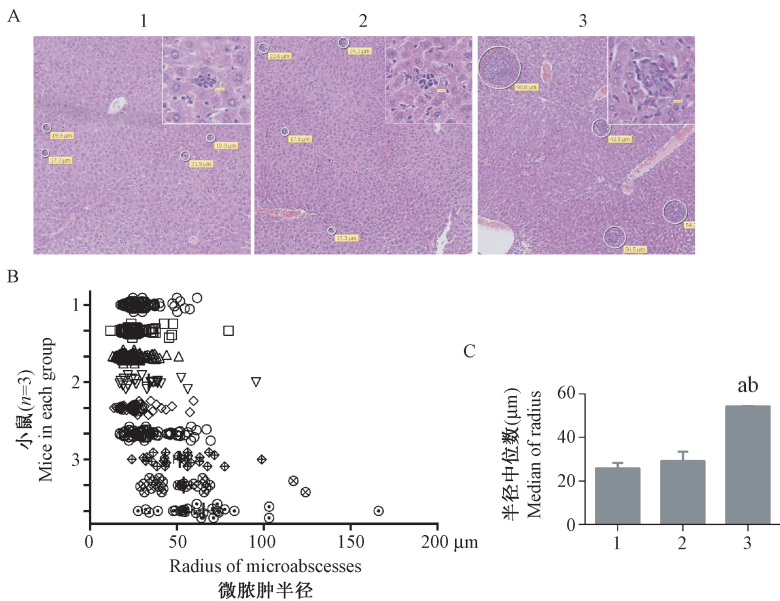
2.3 免疫组化分析

为了观察 TNF- α 受抗体阻断后,对各类免疫细胞在感染位点分布的影响,进一步检测了组织中 F4/80 和 CD45R^[5] 的表达分布情况。与荷菌量检测结果一致,adalimumab 组小鼠肝微脓肿内可见较多的单增李斯特菌存在。此外,该组病灶及周围也存在较高水平的 TNF- α 表达。通过巨噬细胞表面标记分子 F4/80 的分布可见,巨噬细胞也在微脓肿附近呈聚集分布,TNF- α 单抗干预未对巨噬细胞的募集产生显著影响。在脾内,CD45R 的表达分布在各组内也未见显著差异(图 4)。

从以上结果可见,adalimumab 作为在临床广泛使用的重要药物,对巨噬细胞、B 细胞等重要免疫细胞在宿主对单增李斯特菌感染应答时的分布并未产生显著干扰。但 TNF- α 单抗的干预确实加重了 TNF- α 人源化小鼠中单增李斯特菌感染引起的疾病。

3 讨论

本研究建立了一种单增李斯特菌感染的 TNF- α 人源化小鼠模型,并应用该模型初步评价了阿达木单抗对单增李斯特菌感染风险的影响。应用阿达木单抗阻断体内 TNF- α 作用,加剧了感染单增李斯特菌的 TNF- α 人源化小鼠的组织病理病变,增加了组织中的荷菌量,这说明 TNF- α 在宿主抵抗单增李斯特菌感染中起着比较重要的作用,使用 TNF- α 单抗类药物将显著增加患李斯特菌病的风险。



注:(A) HE 染色后镜下各组肝中微脓肿形态(大图×10,小图×40);(B) 各组每只小鼠肝切片中观察到的微脓肿半径分布,图中各点表示单个微脓肿;(C) 各组肝中微脓肿半径统计;(1)野生型小鼠对照组;(2)TNF-α 人源化小鼠对照组;(3)TNF-α 人源化小鼠 adalimumab 干预组;与野生型小鼠对照组比较,^a*P* < 0.05;与 TNF-α 人源化小鼠对照组比较,^b*P* < 0.05。

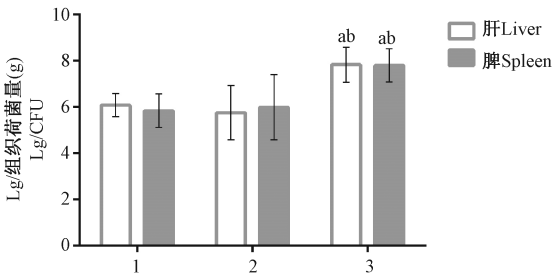
图2 感染4天后各组间肝微脓肿差异

Note. (A) The morphology of microabscesses in liver tissues after infection. HE staining (×10, ×40). (B) The radius distribution of microabscesses observed in the liver tissues of each mouse. Each spot indicates single microabscess. (C) The median radius and SD of microabscesses in the liver tissues. (1) WT mouse control group. (2) TNF-α mouse control group. (3) TNF-α humanized mouse group injected with adalimumab. Compared with the WT control group, ^a*P* < 0.05. Compared with the TNF-α mice control group, ^b*P* < 0.05.

Fig. 2 Comparison of microabscesses in the mouse liver tissues at 4 days after infection

从模型运用方面,本研究也初步证明了 TNF-α 人源化小鼠模型在 TNF-α 单抗类药物的临床前研究中具有比较广泛的应用前景。本研究使用的阿达木单抗是临床应用的全人源化单抗,也能与小鼠 TNF-α 交叉反应。但另一种单抗药物英夫利昔(infliximab)则仅可特异性结合人 TNF-α。对于英夫利昔及其他新的人 TNF-α 特异性单抗药物的相关研究来说,使用 TNF-α 人源化小鼠模型是非常必要的。

既保证对慢性炎症性疾病的显著疗效,又保留对机会致病菌的保护性免疫应答能力,是 TNF-α 拮抗药物研发的重要方向。例如,研究跨膜型和分泌型 TNF-α 在功能上的区别和联系对于精确调控宿主免疫具有重要意义,同时也是更精确的 TNF-α 拮抗药物研发的重要基础^[6-8]。鉴于小鼠 TNF-α 与人 TNF-α 功能上的显著差异^[9],不仅在对风湿性疾病的治疗效果上,还有在对患者发生机会性感染的风险评估上,TNF-α 人源化小鼠模型的研究对 TNF-α 拮抗药物研发都具有重要意义。

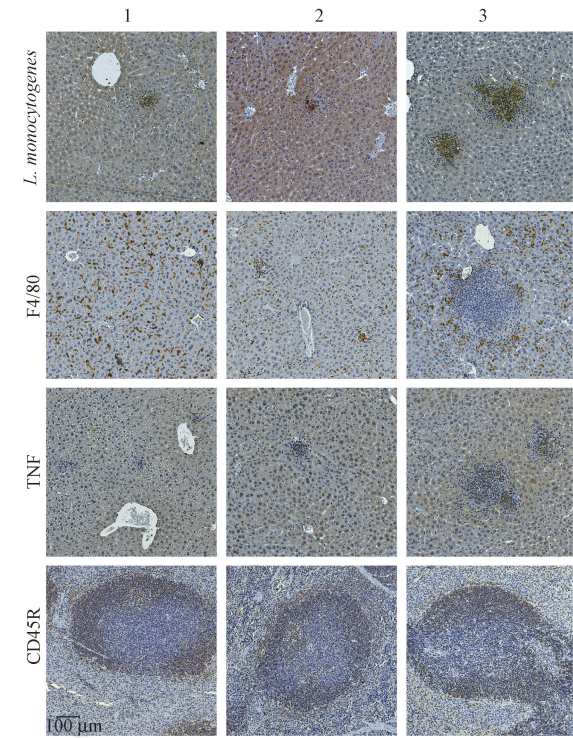


注:(1)野生型小鼠对照组;(2)TNF-α 人源化小鼠对照组;(3)TNF-α 人源化小鼠 adalimumab 干预组;与野生型小鼠对照组比较,^a*P* < 0.001;与 TNF-α 人源化小鼠对照组比较,^b*P* < 0.01。

图3 感染4d后各组间组织荷菌量差异

Note. (1) WT mouse control group. (2) TNF-α humanized mouse control group. (3) TNF-α mouse injected with adalimumab group. Compared with the WT mouse control group, ^a*P* < 0.001. Compared with the TNF-α mouse control group, ^b*P* < 0.01.

Fig. 3 Comparison of bacterial load in the mouse liver and spleen tissues at 4 days after infection



注:(1)野生型小鼠对照组;(2)TNF-α 人源化小鼠对照组;(3)TNF-α 人源化小鼠 adalimumab 干预组。

图 4 感染 4 d 后肝和脾微脓肿周围的变化
(免疫组化染色)

Note. (1) WT mouse control group. (2) TNF-α humanized mouse control group. (3) TNF-α mouse injected with adalimumab group.

Fig. 4 Changes of microabscesses in the liver and spleen tissues at 4 days after infection. Immunohistochemical staining

参考文献:

[1] Harris J, Hope JC, Keane J. Tumor necrosis factor blockers

influence macrophage responses to *Mycobacterium tuberculosis* [J]. J Infect Dis, 2008, 198(12): 1842 – 1850.

[2] Bodro M, Paterson DL. Listeriosis in patients receiving biologic therapies [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2013, 32(9): 1225 – 1230.

[3] Fallahi-Sichani M, Flynn JL, Linderman JJ, et al. Differential risk of tuberculosis reactivation among anti-TNF therapies is due to drug binding kinetics and permeability [J]. J Immunol, 2012, 188(7): 3169 – 3178.

[4] de Noordhout CM, Devleeschauwer B, Angulo FJ, et al. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis [J]. Lancet Infect Dis, 2014, 14(11): 1073 – 1082.

[5] Hojyo S, Miyai T, Fujishiro H, et al. Zinc transporter SLC39A10/ZIP10 controls humoral immunity by modulating B-cell receptor signal strength [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(32): 11786 – 11791.

[6] Olleros ML, Vesin D, Bisig R, et al. Membrane-bound TNF induces protective immune responses to *M. bovis* BCG infection: regulation of memTNF and TNF receptors comparing two memTNF molecules [J]. PLoS One, 2012, 7(5): e31469.

[7] Allie N, Alexopoulou L, Quesniaux VJ, et al. Protective role of membrane tumour necrosis factor in the host's resistance to mycobacterial infection [J]. Immunology, 2008, 125(4): 522 – 534.

[8] Fremond C, Allie N, Dambuza I, et al. Membrane TNF confers protection to acute mycobacterial infection [J]. Respir Res, 2005, 6: 136.

[9] Olleros ML, Chavez-Galan L, Segueni N, et al. Control of mycobacterial infections in mice expressing human tumor necrosis factor (TNF) but not mouse TNF [J]. Infect Immun, 2015, 83(9): 3612 – 3623.

[收稿日期] 2017 – 11 – 23

专家问答

问:干细胞治疗在医学研究中的应用及其优点

答:干细胞在医学界被称为“万用细胞”,它可以分化成多种功能细胞或组织器官。干细胞治疗范围很广,一般能治疗神经系统疾病、免疫系统疾病、还有其他的一些内外科疾病。

其在医学应用中的优点列举如下:

- (1)安全、低毒性或无毒性。
- (2)在尚未完全了解疾病发病的确切机理前也可以应用。
- (3)治疗材料来源充足,干细胞的培养和采集都不受限制。
- (4)治疗范围广阔。
- (5)是最好的免疫治疗和基因治疗载体。