

# 肠道真菌过增殖小鼠模型的建立\*

唐欢<sup>1</sup>, 李凡<sup>2</sup>, 魏泓<sup>3</sup>

(1. 重庆中国三峡博物馆, 重庆 400015; 2. 重庆市中医院 肾病科, 重庆 400011;  
3. 第三军医大学 基础部 实验动物学教研室, 重庆 400038)

**摘要:**通过给予头孢曲松造成 SPF 级 BALB/c 小鼠(*Mus musculus*)发生肠道菌群紊乱,进而通过连续灌胃密度为  $2 \times 10^7$  CFU/mL 的白假丝酵母(*Candida albicans*)菌液以建立小鼠肠道真菌过增殖模型;通过镜检、活菌计数、结肠组织病理切片、电镜观察等方法评价白假丝酵母在小鼠体内黏附定植的情况。实验结果显示,大剂量头孢曲松处理后,活菌计数结果显示小鼠肠道菌群出现重度失衡;灌胃真菌后,镜检可见酵母相和菌丝相的白假丝酵母,PAS 染色可见小鼠结肠粘膜表面黏附有大量染成红色的圆形真菌孢子;扫描电镜观察发现小鼠结肠表面黏附大量卵圆型白假丝酵母的酵母相细胞。研究认为大剂量抗生素处理结合真菌灌胃,可成功建立小鼠肠道真菌过增殖模型。

**关键词:**肠道菌群;肠源性感染;白假丝酵母;动物模型

**中图分类号:**Q954.3

**文献标志码:**A

**文章编号:**1672-6693(2014)06-0116-04

近年来,真菌内源性感染的发生率和病死率持续升高。以肝胆外科病房深部真菌感染调查为例,肝胆外科病房深部真菌感染以白假丝酵母(*Candida albicans*)为主,占感染总数的 47.4%<sup>[1]</sup>,而一般念珠菌深部感染的病死率高达 40%。越来越多的研究揭示,肠道微生态失衡是导致内源性真菌感染发生的主要原因,因此在 2001 年,李兰娟<sup>[2]</sup>提出用微生态学理论和方法研究感染的发生、发展、结局并引导感染向宿主健康方向发展,由此感染微生态学得以建立和发展。

抗生素的不当使用将直接危害人体健康,长期服用治疗剂量抗生素会增加临床病人二重感染的发病几率。感染的前提是条件性致病菌的黏附和定植,肠道内真菌达到一定数量后可通过多种途径易位、扩散于体内其他组织器官(如逆行至呼吸道感染)和血液循环,并可以导致全身性真菌感染。因此,本研究拟通过抗生素使用和真菌增殖模拟二重感染的发生,进而建立小鼠肠道菌群真菌过增殖模型,为模拟真菌在体内粘附、定植、扩散、移位的过程提供动物模型,为深入研究肠道微生态与感染发生发展之间的关系提供重要的实验工具。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物和菌种

体重 18~20 g 的 BALB/c 小鼠(*Mus musculus*),SPF 级,全雌,由第三军医大学实验动物中心提供。小鼠饲养于顶部有空气滤膜的小鼠笼内,食物与饮水经高温高压灭菌后随机提供,寄养于实验动物中心 SPF 动物房内。分笼前,所有供试小鼠于同一鼠笼中饲养 1 周<sup>[3]</sup>。造模用白假丝酵母菌株 SC5314 由加拿大生物技术研究所以 Anne Marcil 博士惠赠。

### 1.2 建模

BALB/c 小鼠灌胃用头孢曲松溶液浓度为 125 mg/mL,单次灌胃剂量为 0.2 mL,上下午各 1 次,抗生素连续处理时间为 5 d。第 6 d 开始连续灌胃 0.5 mL 密度为  $2 \times 10^7$  CFU/mL 的供试菌株菌液至第 10 d。为了确保肠道微生物的持续定植,一只正常的 BALB/c 小鼠始终与抗生素处理的小鼠饲养在一起<sup>[4]</sup>。小鼠粪便收集时间点为第 0 d、第 5 d 和第 10 d。

\* 收稿日期:2013-12-02 修回日期:2014-01-16 网络出版时间:2014-11-19 21:49

资助项目:国家“973”计划课题(No. 2013CB531406)

作者简介:唐欢,女,副研究馆员,博士,研究方向为微生物生态学,E-mail: tanghuan3gm@163.com;通讯作者:魏泓,E-mail: weihong63528@163.com

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20141119.2149.024.html>

### 1.3 粪便光镜镜检

采用革兰染色法。

### 1.4 粪便菌群分析

采用活菌计数法<sup>[5]</sup>。无菌收集小鼠粪便 0.5~1.0 g,加入灭菌试管中,添加无菌玻璃珠对小鼠粪便进行均质,混匀后进行 10 倍倍比稀释,选择合适浓度在选择培养基上培养计数。待菌落长出后,以菌落形态、革兰染色鉴定所需目的菌(表 1)。

表 1 肠道菌群检验用培养基及鉴定方法<sup>[5]</sup>

	培养基	培养条件	鉴定方法
厌氧总菌	BHI	37 °C, 厌氧培养 48 h	BHI 平板上的所有菌落
乳杆菌	MRS	37 °C, 厌氧培养 48 h	镜检为 G+、形态规则、无芽孢的所有菌落
双歧杆菌	BSM	37 °C, 厌氧培养 48 h	镜检为 G+、形态不规则的所有菌落
肠杆菌	EMB	37 °C, 24 h	镜检 G- 的所有菌落
肠球菌	SCE	37 °C, 24 h	褐色圈, 镜检 G+ 的所有菌落

### 1.5 结肠病理切片

脱颈椎处死小鼠后,取结肠样 1 cm×1 cm,置于滤纸片上小心裁开,轻微冲洗后,腔面朝向滤纸面,置中性甲醛溶液中固定,石蜡包埋,切片;常规 HE、PAS 染色,光镜观察,并做图像分析。

### 1.6 电镜观察

取结肠组织 2 cm×2 cm,纵行剪开肠管,置生理盐水漂洗数次;用 3% 的戊二醛固定,常规漂洗数次;1% 锇酸固定,饱和醋酸铀过夜;系列丙酮脱水,环氧丙烷置换,环氧树脂包埋,超薄切片,扫描电镜观察。

### 1.7 统计学处理

所有数据以“平均值±标准差”(Mean±SD)表示。数据采用 SPSS 12.0 软件进行统计学分析,组间比较采用 Student-*t* 检验, $p < 0.05$  表示差异具有显著的统计学意义, $p < 0.01$  表示差异具有极显著统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 粪便光镜镜检结果

经过大剂量头孢曲松灌胃 5 d 后的小鼠,粪便含水量较正常小鼠显著增加,稀软膨大不成型。经革兰染色镜检后发现,与正常小鼠相比,实验组小鼠粪便中细菌减少,镜检视野内观察不到细菌(封三彩图 1-1、1-2)。白假丝酵母持续灌胃后,可以在小鼠肠道内定植,通过镜检可发现数目众多的卵圆型白假丝酵母,以酵母相(封三彩图 1-3)及菌丝相(封三彩图 1-4)存在于小鼠粪便中。

### 2.2 活菌计数结果

头孢曲松作用 5 d 后,实验组小鼠肠道菌群出现重度失衡现象(表 2),可培养厌氧总菌极显著减少( $p < 0.01$ );双歧杆菌、肠杆菌检测不到;在 SPF 条件下的小鼠则仍无真菌检出。自然恢复 5 d 后,厌氧总菌仍然可以恢复到与正常组无差异的水平;而双歧杆菌、乳杆菌恢复缓慢,极显著低于正常小鼠( $p < 0.01$ );肠球菌、肠杆菌增殖现象明显。由于人为向 SPF 级小鼠连续灌胃了 5 d 的  $10^7$  CFU 的白假丝酵母,因此在第 10 d 时,活菌计数仍可检出超过  $10^6$  CFU/g Feces 的真菌,说明白假丝酵母在小鼠肠道内可以定植。

表 2 灌胃头孢曲松水溶液对 SPF 小鼠粪便菌群组成的影响( $n=6$ )

时间	厌氧总菌	双歧杆菌	乳杆菌	肠球菌	肠杆菌	真菌
第 0 d	8.44±0.25	6.66±0.16	7.41±0.65	7.09±0.23	3.18±0.23	ND <sup>a</sup>
第 5 d	3.69±0.13 <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	2.67±0.22 <sup>a</sup>	3.54±0.28 <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
第 10 d	8.21±0.13	3.53±0.39 <sup>a</sup>	3.85±0.56 <sup>a</sup>	7.46±0.18 <sup>a</sup>	4.43±0.48 <sup>a</sup>	6.53±0.04 <sup>a</sup>

注:结果用平均值±标准差的 10 的对数值(log 10)表示;标有上标 a 的数据为与第 0 d 的数据比较,差异极显著( $p < 0.01$ );ND 表示未检测到(小于 100 CFU)。

### 2.3 病理检测结果

HE 染色见正常组小鼠结肠黏膜完整,上皮刷状缘清晰可见,黏膜下血管正常,腺体结构排列紧致规则,无充

血、无水肿(封三彩图 2-1)。HE 染色见大剂量头孢曲松灌胃处理后的小鼠结肠柱状上皮轻度水肿,部分脱落于肠腔,肠绒毛内毛细血管索心轻度扩张充血(封三彩图 2-2)。PAS 染色后见结肠粘膜表面黏附有大量染成红色的圆形真菌孢子(封三彩图 2-3)。

#### 2.4 电镜检测结果

扫描电镜所见,正常小鼠结肠表面完整,黏附一层菌膜,菌膜所含细菌种类多样,杆菌、球菌清晰可见;经过大剂量头孢曲松处理后,小鼠结肠上皮缺乏完整性,出现空洞,膜菌群几乎完全被破坏,菌膜消失,仅有少量残留细菌附着于肠黏膜表面。经白假丝酵母灌胃后的小鼠,其结肠表面黏附大量卵圆型白假丝酵母的酵母相细胞(封三彩图 3)。

### 3 讨论

白假丝酵母本是人体肠道菌群的原籍菌,但是数量较少,正常条件下不致病。但大量研究已经证实,头孢曲松的使用会造成人体肠道菌群内白假丝酵母菌的增殖<sup>[6-7]</sup>,众多学者认为,这种现象是由于肠道菌群的定植抗力下降引起的。白假丝酵母对于肠上皮细胞黏附能力与上皮细胞环境中菌群数量密切相关<sup>[8]</sup>,一旦肠道菌群数量减少,黏附于肠上皮细胞上的白假丝酵母数量则会增多,形成芽管以菌丝体形式生长后,对肠黏膜深部的侵袭继续加重;此外白晓东等人<sup>[9]</sup>发现,肠腔表面的 IgA 抗体能够局部抑制白假丝酵母对于肠上皮细胞的黏附,而双歧杆菌、乳杆菌数量的急剧下降会导致肠腔表面 IgA 的分泌随之减少,因此对于白假丝酵母黏附的能力也显著减弱,为之进一步侵袭肠黏膜深部、造成肠源性感染提供了条件;Kerstin 等人<sup>[10]</sup>发现,随着双歧杆菌、乳杆菌的减少,粪便的 pH 值出现大幅度下降,一些酶活性也随着厌氧总菌的下降而减弱,因此菌群拮抗条件性致病菌的作用被弱化。

本研究结果表明:经过 125 mg/mL 头孢曲松的处理 5 d,小鼠粪便中的厌氧总菌数量会下降 4 至 5 个数量级,极显著地低于正常小鼠粪便内的厌氧总菌( $p < 0.01$ ),该结果与众多抗生素诱导的肠道菌群失调动物模型的结果基本一致<sup>[11-13]</sup>。Welling 等人<sup>[14]</sup>研究头孢曲松对于人体肠道菌群的影响时发现,以 1 mg/d 的剂量连续服用头孢曲松 5 d 后,肠杆菌、乳杆菌、双歧杆菌及厌氧总菌受到的影响最大,而志愿者肠道内的白假丝酵母菌数量增长;de Vries 等人<sup>[15]</sup>的研究也获得类似结果,除了上述菌群的变化外,肠球菌在服用头孢曲松 10 d 后开始出现增殖。本研究建立的小鼠模型也获得与二者相同的体内实验结果。此外,白假丝酵母菌是一类双相真菌,可以以孢子形态或者菌丝体形态生长。很多研究表明,从酵母态向菌丝态的转换往往伴随着对宿主侵袭毒力的增强<sup>[16]</sup>,转换的起始形态以芽管形成为起点,促进白假丝酵母菌对粘膜表面的黏附进而穿透上皮层<sup>[17]</sup>,并且菌丝相能够帮助白假丝酵母成功逃逸吞噬作用从而对组织造成直接损伤<sup>[18]</sup>。本研究中粪便光镜镜检结果已发现有菌丝相白假丝酵母的存在,可见大剂量头孢曲松处理后,白假丝酵母的侵袭性已有所表现。

本实验建立的小鼠肠道真菌过增殖模型可以较好的模拟白假丝酵母在小鼠结肠粘膜表面的粘附现象,且活菌计数的结果表明白假丝酵母能够定植于小鼠肠道。本模型的建立,除了为感染微生态学研究提供实验基础外,还可以为抗真菌药物的开发和评价提供体内筛选模型。

#### 参考文献:

- [1] 梁军兵,潘君素,陈琪,等.肝胆外科病房深部真菌感染调查及其危险因素分析[J].中华医院感染性杂志,2012,22(19):4245-4247.  
Liang J B, Pan J S, Chen Q, et al. Risk factors for deep fungal infections in hepatobiliary surgery surgical wards[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2012, 22(19): 4245-4247.
- [2] 李兰娟.感染微生物学[M].北京:人民卫生出版社,2002.  
Li L J. Infectious microbiology[M]. Beijing: People's Medical Publishing house Co., LTD, 2002.
- [3] 贺永亮,雷艳,袁静,等.残留剂量恩诺沙星对 SPF 小鼠肠道菌群数量和多样性的影响研究[J].中国微生态学杂志,2008,20(2):97-101.  
He Y L, Lei Y, Yuan J, et al. Effects of residual dose Enro-
- [4] Noverr M C, Noggle R M, Toews G B, et al. Role of antibiotics and fungal microbiota in driving pulmonary allergic responses[J]. Infect Immun, 2004, 72(9): 4996-5003.
- [5] 唐欢,李伟,周晓杨,等.残留剂量头孢曲松长期作用对 SPF 级 Balb/c 小鼠肠道菌群的影响[J].中国微生态学杂志,2010,22(8):676-678.  
Tang H, Li W, Zhou X Y, et al. Effect of long term exposure to residual dose ceftriaxone on SPF Balb/c mice intestinal flora[J]. Chinese Journal of Microecology, 2010, 22(8): 676-678.
- [6] van Ogtrop M L, Guioit H F, Mattie H, et al. Modulation of

- the intestinal flora of mice by parenteral treatment with broad-spectrum cephalosporins[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1991, 35(5):976-982.
- [7] Payne S, Gibson G, Wynne A, et al. *In vitro* studies on colonization resistance of the human gut microbiota to *Candida albicans* and the effects of tetracycline and *Lactobacillus plantarum* LPK[J]. *Curr Issues Intest Microbiol*, 2003, 4(1):1-8.
- [8] 郭宁如, 吕桂霞, 吴绍熙. 念珠菌体外粘附上皮细胞的观察[J]. *中国医学科学院学报*, 1994, 16(4):312-315.  
Guo N R, Lü G X, Wu S X. The adherence reaction between *Candida* and cultured cell *in vitro* [J]. *Acta Academiae Medicinae Sinicae*, 1994, 16(4):312-315.
- [9] 白晓东, 肖光夏, 刘贤华. 白色念珠菌粘附肠上皮细胞及 IgA 对其作用的体外观察[J]. *第三军医大学学报*, 1999, 21(5):381-382.  
Bai X D, Xiao G X, Liu X H. Study on the adhesion of *Candida albicans* to IEC-6 and the effect of IgA on the adhesion *in vitro* [J]. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 1999, 21(5):381-382.
- [10] Orrhage K, Sjostedt S, Nord C E. Effect of supplements with lactic acid bacteria and oligofructose on the intestinal microflora during administration of cefpodoxime proxetil [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2000, 46(4):603-612.
- [11] 林远夫, 汤家铭, 杨幼明, 等. 抗生素诱发的小鼠肠道菌群失调[J]. *上海实验动物科学*, 1998, 18(1):39-41.  
Lin Y F, Tang J M, Yang Y M, et al. Flora imbalance of mouse induced by antibiotics [J]. *Shanghai Laboratory Animal Science*, 1998, 18(1):39-41.
- [12] 吴力克, 熊德鑫, 梁冰, 等. 复合益生菌剂“海生元”对实验性肠道菌群失调症调整作用的研究[J]. *中国微生态学杂志*, 2003, 15(4):196-198.  
Wu L K, Xiong D X, Liang B, et al. Correcting action of a complex-probiotic-preparation (Hai Sheng Yuan) on experimental intestinal flora imbalance [J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2003, 15(4):196-198.
- [13] Johnson S A, Nicolson S W, Jackson S. The effect of different oral antibiotics on the gastrointestinal microflora of a wild rodent (*Aethomys namaquensis*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2004, 138(4):475-483.
- [14] Welling G W, Meijer-Severs G J, Helmus G, et al. The effect of ceftriaxone on the anaerobic bacterial flora and the bacterial enzymatic activity in the intestinal tract [J]. *Infection*, 1991, 19(5):313-316.
- [15] de Vries-Hospers H G, Tonk R H J, van der Waaij D. Effect of intramuscular ceftriaxone on aerobic oral and faecal flora of 11 healthy volunteers [J]. *Scand J Infect Dis*, 1991, 23(5):625-633.
- [16] Teresa B, Barbara B, Klaus S, et al. Calcineurin is essential for virulence in *Candida albicans* [J]. *Infect Immun*, 2003, 71(9):5344-5354.
- [17] Kretschmar M, Hube B, Bertsch T, et al. Germ tubes and proteinase activity contribute to virulence of *Candida albicans* in murine peritonitis [J]. *Infect Immun*, 1999, 67(12):6637-6642.
- [18] Marciel A, Harcus D, Thomas D Y, et al. *Candida albicans* killing by RAW 264.7 mouse macrophage cells: effects of *Candida* genotype, infection ratios, and gamma interferon treatment [J]. *Infect Immun*, 2002, 70(11):6319-6329.

## Establishment of a Mice Model of Fungal Over-growth in Gastrointestine

TANG Huan<sup>1</sup>, LI Fan<sup>2</sup>, WEI Hong<sup>3</sup>

(1. China Three Gorges Museum, Chongqing 400015; 2. Renal Department of Internal Medicine, Traditional Chinese Medicine Hospital of Chongqing, Chongqing 40001; 3. Department of Laboratory Animal Science, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract:** To establish a mice model with intestinal fungal infection, 50 mg/d ceftriaxone was given to the SPF BALB/c mice intragastrically for 5 days and next the *Candida albicans* was inoculated in order to simulate the over-growth of fungi. Changes of mice fecal flora were observed by optical microscope and SEM directly. Enumerations of intestinal microflora and the elimination of *Candida albicans* were detected by vital cell counting. Treatment with ceftriaxone at dosage of 50 mg/d would result in a severe damage of murine intestinal microflora. After *Candida albicans* were given intragastrically for 5 days, both yeast and hyphal cells of *Candida albicans* could be detected in the feces of the mice. Both pathological and SEM detection showed that *Candida albicans* grew as spherical yeast cells to the mice colonic mucus. So a mice model of fungal over-growth in gastrointestinal could be induced by inoculation with *Candida albicans* after treated with ceftriaxone.

**Key words:** intestinal microflora; enterogenic infection; *Candida albicans*; animal model