

小鼠原发性皮肤新生隐球菌感染的实验研究

朱元杰, 温海*, 徐红, 顾菊林, 黄欣, 赵瑾

(第二军医大学长征医院皮肤性病科, 上海 200003)

[摘要] **目的:** 建立原发性小鼠新生隐球菌皮肤感染模型, 探讨免疫抑制状态在小鼠皮肤隐球菌感染形成中的作用。 **方法:** 24只 BALB/c 小鼠, 随机均分为免疫抑制组(腹腔注射 200 mg/kg 的环磷酰胺)和未抑制组。将新生隐球菌标准野生株 B3501 分别以 5×10^7 /ml 皮内接种于两组小鼠, 观察病程, 记录皮损形成与消退时间, 并进行皮损组织真菌培养与病理检查。 **结果:** 两组小鼠均于接种菌悬液后 2~9 d[免疫抑制组(3.42±1.17) d、未抑制组(4.25±1.42) d]产生了结节、丘疹、溃疡、传染性软疣样皮损, 并均于接种后 22~44 d[免疫抑制组(36.75±4.20) d、未抑制组(29.00±4.75) d]自愈。免疫抑制组小鼠皮损形成时间与未抑制组无显著性差异, 而消退时间晚于未抑制组($P < 0.05$)。皮损组织真菌培养与病理检查均确证为隐球菌感染。 **结论:** BALB/c 小鼠皮下接种隐球菌后发生原发性皮肤感染, 可以作为研究本病的动物模型。免疫抑制可能并不是原发性皮肤隐球菌感染的易感因素。

[关键词] 新生隐球菌; 皮肤真菌病; 免疫抑制法

[中图分类号] R 756 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)02-0143-03

Primary cutaneous cryptococcosis in mice: an experimental study

ZHU Yuan-jie, WEN Hai*, XU Hong, GU Ju-lin, HUANG Xin, ZHAO Jin (Department of Dermatology and Venereology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To establish an animal model of primary cutaneous cryptococcosis and to study the role of immune suppression in *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans*) infection. **Methods:** Twenty-four BALB/c mice were equally randomized into 2 groups: immunocompetent group and immunocompromised group. *C. neoformans* isolate, B3501, was intradermally inoculated at a concentration of 5×10^7 /ml into all mice. Mycology and histopathology examinations of the skin were done to confirm the infection. The skin damage courses were recorded and compared in 2 groups. **Results:** Different manifestations of skin infection, such as nodule, papule, ulcer and lesions mimicking molluscum contagiosum appeared 2-9 d after inoculation, with a mean of (3.42±1.17) d in immunocompromised group and (4.25±1.42) d in immunocompetent group. The lesions became self-cured 22-44 d after their onset, with a mean of (36.75±4.20) d in immunocompromised group and (29.00±4.75) d in immunocompetent group ($P < 0.05$). Cryptococcal infection was confirmed by mycology culture and histopathology examination. **Conclusion:** Intradermal inoculation with *C. neoformans* is feasible for establishing a cutaneous cryptococcosis model in BALB/c mice. Immunosuppression state may not be a key factor for primary cutaneous cryptococcosis.

[KEY WORDS] *Cryptococcus neoformans*; dermatomycoses; immunosuppression

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(2): 143-145]

新生隐球菌是一种重要的病原真菌, 对免疫功能受损或正常的宿主均可致病。皮肤隐球菌感染占隐球菌感染的 10%~15%; 隐球菌最早被作为病原菌也是从皮损中分离的^[1]。以前人们并没有认识到新生隐球菌可以直接感染人体皮肤; 直到最近几年, 原发性皮肤隐球菌感染才作为一种独立的疾病, 得到了绝大多数的真菌病和皮肤病研究者的公认^[2-4]。由于原发性皮肤隐球菌感染的确立时间不长, 因此目前对本病的认识非常有限。

我们拟建立隐球菌原发性皮肤感染模型, 对感染的病程加以观察, 探讨免疫状态在原发性皮肤隐球菌感染中的作用, 进一步认识原发性隐球菌皮肤感染。

1 材料和方法

1.1 材料 新生隐球菌标准野生株 B-3501(中国医学真菌保藏管理中心隐球菌专业实验室), 血清 D 型, 新生变种。清洁级 BALB/c 小鼠(第二军医大学实验动物中心), 体质量(15±3) g, 雌雄不限。YPD 培养液和平板, 环磷酰胺(上海华联制药有限公司, 批号 041016), 微量注射器(BD 公司)。

1.2 菌悬液制备 菌株经 2 次以上活化后, 接种于 YPD 培养液中培养。调整后的菌悬液接种于 YPD

[作者简介] 朱元杰, 博士, 讲师、主治医师。

E-mail: mycology@126.com

* Corresponding author. E-mail: wenhai98@sohu.com

平板确证菌悬液浓度。死菌悬液的制备为在菌悬液配制好后将隐球菌置于 121℃, 30 min 高压灭活, 灭活的菌悬液接种于 YPD 培养基验证活性。

1.3 动物接种 BALB/c 小鼠随机分为免疫抑制组与未抑制组, 每组 12 只。抑制组于皮内接种菌悬液前 2 d, 每只小鼠腹腔注射 200 mg/kg 环磷酰胺^[5]。将小鼠妥善固定后, 取腹部皮肤消毒灭菌, 微量注射器吸取新鲜配制的菌悬液, 绷紧并固定腹部皮肤, 以与皮面成 30°角进针后缓慢抬起针尖(越浅越好, 但不得穿破皮肤), 缓慢注射 0.1 ml 菌悬液, 轻压住注射口待无渗出。设注射 0.1 ml 无菌注射用水组为阴性对照, 注射 0.1 ml 热灭活的 B3501 菌悬液组为空白对照。预实验发现, 不论是免疫抑制小鼠还是未抑制小鼠, 以 1×10^3 /ml 皮内注射未见形成皮损(5 只实验小鼠均未形成), 1×10^5 /ml 少量小鼠形成皮损(5 只中有 2 只), 而 1×10^7 /ml 则可以使全部小鼠形成明显皮损。因此, 实验采取 5×10^7 /ml 浓度菌悬液。

1.4 原发性皮肤隐球菌感染的确立 在小鼠皮损形成后, 选取皮损溃疡处渗出物或切下部分结节性皮损, 接种于 YPD 培养基, 37℃ 恒温培养 72 h。同时, 选择皮损最明显的小鼠皮肤做组织病理与 PAS 染色。当皮损真菌培养为阳性, 同时组织病理发现隐球菌菌体, 确定原发性新生隐球菌皮肤感染。小鼠皮内接种菌悬液后, 每日观察小鼠皮损形成与转变情况, 记录小鼠皮损形成与消退时间。

1.5 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 12.0 统计分析软件对各组之间进行检验。

2 结果

2.1 皮损形成和消退时间 阴性对照组、空白对照组皮肤未见明显变化; 免疫抑制组及未抑制组小鼠在局部接种菌悬液后 2~9 d 形成皮损, 皮损表现为结节、溃疡、丘疹及传染性软疣样损害。一般皮损初起为小的丘疹、结节, 后逐渐增大(最大可达 0.7 cm×0.5 cm), 然后部分结节在中央出现小的溃疡。部分在 10 d 时形成传染性软疣样改变, 也有部分皮损初起即为小的溃疡, 后逐渐增大, 再缓慢愈合。全部小鼠的皮损均在接种后 22~44 d 内自愈。免疫抑制组和未抑制组皮损形成时间分别为 (3.42 ± 1.17) d 和 (4.25 ± 1.42) d, 两组无显著差异; 皮损消退时间分别为 (36.75 ± 4.20) d 和 (29.00 ± 4.75) d, 差异显著($P < 0.05$)。

2.2 皮损组织病理和皮损真菌培养 皮内接种 1 周与 2 周后, 皮损切下做组织病理 PAS 染色, 在真

皮及皮内可见大量隐球菌菌体(图 1)。各组在皮损形成后 1 周和 2 周, 皮损真菌培养均为阳性。结合组织病理, 可以确定小鼠原发性皮肤隐球菌感染成立。

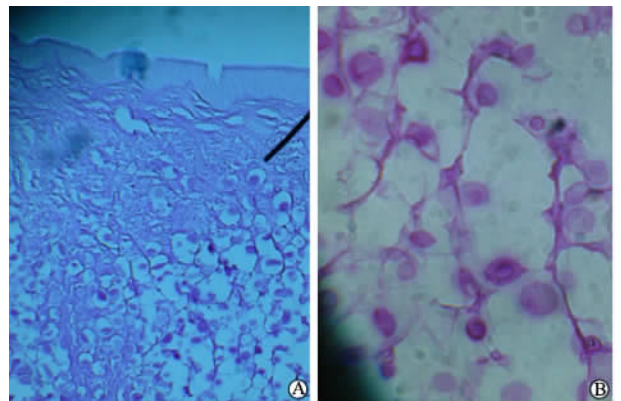


图 1 皮肤感染组织病理学检查

Fig 1 Histopathologic examination of infectious skin tissues

A: $\times 100$; B: $\times 400$

3 讨论

原发性皮肤隐球菌感染的研究刚刚开始。目前认为, 本病在免疫功能正常或受损的宿主中均可发生。皮损形态主要有结节、溃疡、传染性软疣样皮损和蜂窝织炎。对于免疫正常患者, 局部创伤后接种可能是最大的危险因素^[2,3]。本病的治疗目前还没有一个较好规范。BALB/c 小鼠为免疫正常的小鼠, 对隐球菌的易感性与人类类似, 在隐球菌感染的系统与局部感染的研究中得到了广泛应用, 是研究隐球菌感染的一种较好的动物模型^[1]。

我们通过对 BALB/c 小鼠皮内接种菌悬液的方法, 使其产生了结节、丘疹、溃疡、传染性软疣样皮损, 这种皮损表现与人的皮肤感染比较相似。皮损的真菌培养阳性, 组织病理在真皮及皮下组织发现大量隐球菌菌体, 证实局部皮内接种可以产生小鼠原发性皮肤隐球菌感染。热灭活的隐球菌菌悬液接种未发现这些皮损, 说明皮损的产生是与隐球菌的活性相关的。小鼠的皮损发生在接种后的早期, 具有一定的自限性, 在感染后 4~6 周可以自行恢复, 这种恢复与动物皮肤癣菌感染模型具有一定的相似性, 可能说明了动物皮肤对真菌感染具有一定抵抗作用。在人类原发性皮肤隐球菌感染中, 也有报道部分患者自愈^[2]。我们认为 BALB/c 小鼠皮下接种隐球菌后发生原发性皮肤感染, 可以作为研究本病的一项动物模型; 而且由于 BALB/c 小鼠在隐球菌肺部与中枢神经系统感染研究的广泛应用以及本身免疫状态可以在药物作用后得到有效抑制, 它更是

研究本病的皮损发生后播散的有力工具。

免疫低下与隐球菌感染的相关性密切,是隐球菌病的主要易感因素。如 HIV 感染者,应用免疫抑制剂者都是主要易感人群。目前认为在免疫正常的人群中,隐球菌的感染大多为一过性的;而当免疫功能受损后,由于隐球菌不能得到有效清除,会使感染逐渐加重并发生播散^[6]。免疫抑制与皮肤原发感染的关系目前还未见报道。环磷酰胺是一种肯定的免疫抑制剂,文献报道^[5,7]小鼠腹腔接种 200 mg/kg 后,免疫功能明显降低。我们通过对免疫抑制与免疫正常的小鼠皮内接种隐球菌后比较发现,在大剂量接种隐球菌后,不论免疫抑制与非抑制的小鼠均可以发生皮肤感染;免疫抑制仅可以使接种隐球菌后皮损消退的时间明显延长。提示小鼠隐球菌皮肤感染可能主要与接种的量相关,而与自身的免疫状态无关。免疫抑制可以使小鼠皮损消退的时间延长,可能与免疫抑制后机体环境更加利于隐球菌增殖,机体清除隐球菌的能力降低有关。根据目前对原发性皮肤隐球菌感染的报道,免疫抑制与免疫正常患者发病的比例大约为 1 : 1^[3];这也支持免疫抑制与皮肤隐球菌感染的发病之间可能没有联系,免疫抑制并不能成为原发性皮肤隐球菌感染的易感因

素。

[参考文献]

- [1] Casadevall A, Perfect JR. *Cryptococcus neoformans* [M]. Washington D. C. : American Society for Microbiology, 1998. 71-114.
- [2] Christianson JC, Engber W, Andes D. Primary cutaneous cryptococcosis in immunocompetent and immunocompromised hosts[J]. Med Mycol, 2003, 41:177-188.
- [3] Neuville S, Dromer F, Morin O, et al. Primary cutaneous cryptococcosis: a distinct clinical entity[J]. Clin Infect Dis, 2003, 36:337-347.
- [4] Revenga F, Paricio JF, Merino FJ. Primary cutaneous cryptococcosis in an immunocompetent host: case report and review of the literature[J]. Dermatology, 2002, 204:145-149.
- [5] 田小芸,焦瑞清,郑明明,等. rhM-CSF 对化疗小鼠抗白念珠菌感染的实验研究[J]. 南京大学学报(自然科学), 2002, 38:850-854.
- [6] Perfect JR, Wong B, Chang YC, et al. *Cryptococcus neoformans*: virulence and host defenses[J]. Med Mycol, 1998, 36:79-86.
- [7] 赵喜新,同杜海,王和平,等. 环磷酰胺引致小鼠白细胞减少模型及动力学分析[J]. 上海实验动物科学, 1998, 18:12.

[收稿日期] 2005-09-09

[修回日期] 2005-12-27

[本文编辑] 贾向春

Genetic association of vitamin D receptor polymorphisms with autoimmune hepatitis and primary biliary cirrhosis in the Chinese

Fan L, Tu X, Zhu Y, Zhou L, Pfeiffer T, Feltens R, Stoecker W, Zhong R (Center of Clinical Immunology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **BACKGROUND:** Autoimmune hepatitis (AIH) and primary biliary cirrhosis (PBC) are two autoimmune diseases of unknown etiology. Genetic factors appear to be involved in the pathogenesis of both diseases. Vitamin D has been shown to exert multiple immunomodulatory effects, which acts through its own receptor (VDR). Polymorphisms of VDR had been implicated in several autoimmune diseases. In the present study, the association between Chinese patients with AIH, PBC and the polymorphisms in exon 2, intron 8 and exon 9 of vitamin D receptor genes was studied. **METHODS:** Four candidate gene loci were investigated in 49 patients with AIH, 58 patients with PBC, and 160 healthy controls. The VDR polymorphisms were assessed by *Fok I*, *Bsm I*, *Apa I*, and *Taq I* endonuclease digestion after specific polymerase chain reaction (PCR) amplification. **RESULTS:** The result show a significant difference in *Fok I* polymorphism between AIH patients and controls ($\chi^2 = 5.47$, $P=0.019$), and a significant association in *Bsm I* polymorphisms between PBC patients and controls ($\chi^2 = 6.52$, $P=0.01$). Furthermore the distribution of *Fok I*, *Bsm I*, *Apa I*, and *Taq I* gene types differed between Chinese healthy controls and Caucasian healthy controls. **CONCLUSION:** It is suggested that there is a genetic link of VDR polymorphisms to autoimmune liver diseases such as AIH and PBC in Chinese patients. Further studies are needed to elucidate the mechanisms by which VDR polymorphisms contribute to the loss of immune tolerance in autoimmune diseases.

[J Gastroenterol Hepatol, 2005, 20:249-255]