

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00731

## 维生素 C 对小鼠系统性白念珠菌感染的影响

黄海<sup>△</sup>, 王彦<sup>△</sup>, 李明邦, 李德东, 许懿, 姜远英\*

第二军医大学药学院药理学教研室, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 观察维生素 C 对系统性白念珠菌感染病情的影响。**方法** 50 只 ICR 小鼠随机分为 5 组 ( $n=10$ ), 通过尾静脉注射白念珠菌菌液建立系统性白念珠菌感染小鼠模型。维生素 C 通过灌胃或腹腔注射给药, 剂量为 50 mg/kg 或 500 mg/kg; 考察小鼠生存时间; 检测肾脏载菌量; 制作肾脏组织病理学标本评估真菌感染程度。**结果** 补充维生素 C 后, 各实验组与空白组中位生存时间均为 4~5 d, 各组间无明显差异; 补充维生素 C 后, 实验组 lgCFU/g 分别为 8.342、8.412、7.350、7.764, 与空白组 lgCFU/g 7.134 比较, 肾脏载菌量增加 ( $P<0.05$ )。肾脏组织病理学结果显示受检小鼠均有肾脓肿及肾小管上皮变性(肾病)损害, 损害程度没有明显差异, 表明维生素 C 不能缓解白念珠菌感染的病情。**结论** 补充维生素 C 对小鼠系统性白念珠菌感染病情没有改善作用, 甚至可能导致病情恶化。

**[关键词]** 抗坏血酸; 白念珠菌; 系统性真菌感染

**[中图分类号]** R 519.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)07-0731-03

### Influence of ascorbic acid supplementation on systemic Candidiasis in mice

HUANG Hai<sup>△</sup>, WANG Yan<sup>△</sup>, LI Ming-bang, LI De-dong, XU Yi, JIANG Yuan-ying\*

Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To examine the influence of ascorbic acid supplementation on mouse model of *Candida albicans* infection. **Methods** Mouse models of systemic *Candida albicans* infection were established by the tail vein injection of *Candida albicans* suspension and were randomly divided into five groups ( $n=10$ ). Ascorbic acid was administered by gavage or intraperitoneal injection at a dose of 50 mg/kg or 500 mg/kg. The survival time and renal fungal burden of mice were observed. Renal histopathology specimens were stained by H-E and PAS staining to assess kidney damage. **Results** The median survival periods of animals in both ascorbic acid supplementation group and blank control group were 4-5 days. The lgCFU/g values were 8.342, 8.412, 7.350, and 7.764 in experimental groups and 7.134 in the blank control group. Supplementation of ascorbic acid had significant influence on renal fungal burden ( $P<0.05$ ). Kidney histopathology examination showed renal abscess and renal tubule disorders in mice in all groups, indicating that ascorbic acid supplementation did not alleviate *Candida albicans* infections. **Conclusion** Ascorbic acid supplementation can not improve the condition of systemic *Candida albicans* infection in mice, and can even exacerbate the condition.

**[Key words]** ascorbic acid; *Candida albicans*; systemic fungal infections

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(7): 731-733]

白念珠菌为临床最常见的条件致病菌, 可引起浅表黏膜感染乃至威胁生命的系统性真菌感染<sup>[1]</sup>。维生素 C 具有抗炎、抗病毒、抗菌作用, 被广泛用于各种感染性疾病的预防和治疗, 如感冒、艾滋病、幽门螺旋杆菌感染等<sup>[2-8]</sup>, 但其对白念珠菌感染的影响尚未明确。本实验研究维生素 C 对白念珠菌感染小

鼠生存时间、肾脏载菌量和肾脏病理的影响。

### 1 材料和方法

#### 1.1 主要材料

1.1.1 实验动物 ICR 小鼠(购于上海斯莱克实验动物有限责任公司), 6~8 周龄, 体质量 18~22

**[收稿日期]** 2010-02-03 **[接受日期]** 2010-03-30

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30500628, 30672626, 30825041, 30630071), 国家重点基础研究发展计划("973 计划")(2005CB523105), 上海市教育发展基金会晨光计划(2007CG51), Supported by National Natural Science Foundation of China (30500628, 30672626, 30825041, 30630071), National Basic Research Project (2005CB523105), and Shanghai Educational Development Foundation (2007CG51).

**[作者简介]** 黄海, 硕士生。E-mail: huanghai414@yahoo.cn; 王彦, 副教授。E-mail: wangyansmmu@126.com

<sup>△</sup>共同第一作者(Co-first authors)

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81871375, E-mail: jiangyy@smmu.edu.cn

g,全部雌性。动物的选择和动物实验方法参考文献<sup>[9]</sup>。实验用小鼠符合《实验动物之饲养管理与使用的规定》([http://www.nap.edu/openbook.php?record\\_id=5140&page=R1](http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=5140&page=R1))。

1.1.2 菌株 白念珠菌 SC5314 由 William A Fonzi 教授 (Department of Microbiology and Immunology, Georgetown University, Washington DC, USA) 惠赠。

1.2 构建系统性白念珠菌感染模型 白念珠菌 SC5314 培养在 30℃ YPD 培养基 (酵母浸膏蛋白胨葡萄糖培养基) 中, 采集对数生长期细胞, 洗涤, 悬浮在生理盐水中调菌密度到  $1 \times 10^6$  /ml。所有小鼠尾静脉注射真菌悬液 (0.1 ml/10 g 体质量)。

1.3 生存分析 模型构建好后, 50 只小鼠随机分为 5 组。A 组是模型对照组, 感染念珠菌后不予治疗; B、C 组分别灌胃维生素 C 50 mg/kg 和 500 mg/kg; D、E 组分别腹腔注射维生素 C 50 mg/kg 和 500 mg/kg。所有小鼠尾静脉注射上述菌悬液建立感染模型, 2 h 后给予维生素 C。维生素 C 连续给药 7 d。空白组 (A 组) 予以等容量生理盐水。连续 24 d 观察小鼠生存情况, 每天 2 次。独立重复实验 2 次, 每组 10 只。Kaplan-Meier 和 Life Table 法分析小鼠的生存情况。Log-rank 法评估生存曲线<sup>[9]</sup>。

1.4 载菌量分析 用菌落形成单位 (cfu) 表示。如上述方法建立小鼠系统性白念珠菌感染模型。25 只小鼠随机分成 5 组。A 组是模型对照组, 感染念珠菌后不予治疗。B~E 组给药方法和时间同 1.3, 每天给药 1 次, 连续 7 d, 第 8 天将小鼠颈椎脱臼法处死, 无菌取其双侧肾脏, 称质量, 在 5 ml 生理盐水中以匀浆器研磨成颗粒, 铺于沙堡葡萄糖琼脂平板, 30℃ 培养 2 d, 观察平板上长出的菌落数, 计量肾脏菌落形成单位。

1.5 组织病理学分析 用以观察小鼠肾脏组织真菌感染的病理相。如 1.3 方法, 建立小鼠感染模型, 25 只小鼠随机分 5 组 ( $n=5$ ), 每天给药 1 次, 连续 7 d。第 8 天处死小鼠, 无菌取出小鼠双侧肾脏, 10% 的甲醛缓冲液固定, 包埋于石蜡, 切片。肾脏组织切片经 H-E 和 PAS 染色, 光学显微镜下观察组织病理学改变及真菌感染情况。

1.6 统计学处理 生存分析 Kaplan-Meier 和 Life Table 法分析小鼠的生存情况, Log-rank 法评估生存曲线。载菌量分析用 ANOVA 和 post hoc 进行。

## 2 结果

2.1 生存分析 灌胃或腹腔注射维生素 C (50 mg/kg 或 500 mg/kg) 对感染小鼠的生存时间没有显著

影响, 中位生存时间均为 4~5 d, 各组小鼠生存时间没有明显差别。

2.2 维生素 C 对肾脏载菌量的影响 结果显示 (图 1), 空白组 A 平均菌落数 (lgCFU/g) 为 7.134, 与 B 组灌胃维生素 C 50 mg/kg (8.342)、C 组灌胃维生素 C 500 mg/kg (8.412)、D 组腹腔注射维生素 C 50 mg/kg (7.350) 和 E 组腹腔注射维生素 C 500 mg/kg (7.764) 比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。D、E 组的肾脏载菌量低于对应剂量的灌胃组 ( $P < 0.05$ )。维生素 C 对真菌感染后的肾脏没有治疗作用, 甚至有恶化作用, 而且以灌胃方式给予维生素 C 恶化作用更明显。

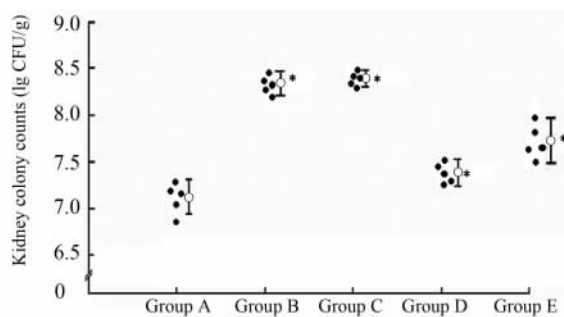


图 1 小鼠肾脏载菌量 (CFU)

Fig 1 Kidney CFU assay of mice with systemic Candidiasis

A: Model control; B: 50 mg/kg vitamine C, *i. g.*; C: 500 mg/kg vitamine C, *i. g.*; D: 50 mg/kg vitamine C, *i. p.*; E: 500 mg/kg vitamine C, *i. p.* \*  $P < 0.05$  vs group A;  $n=5$ ,  $\bar{x} \pm s$

2.3 小鼠肾脏切片的病理检查结果 结果显示全部受检动物均有肾脓肿及肾小管上皮变性 (肾病) 损害, 损害程度基本相同 (图 2)。空白对照组: 肾脏内可见多个脓肿形成, 浸润细胞以中性粒细胞, 淋巴细胞, 浆细胞为主, 部分肾小管上皮变性, 坏死 (H-E 染色); 有大量真菌菌丝 (PAS 染色)。B~E 组结果也没有明显差异。结果与生存分析结果也相符。

## 3 讨论

所建立的小鼠系统性白念珠菌感染模型与人体感染比较相似, 感染的最主要靶器官都是肾脏<sup>[10]</sup>。我们首先构建小鼠系统性白念珠菌感染模型, 然后依次进行了小鼠的生存时间、肾脏的载菌量测定和肾脏组织病理学分析等实验。尾部静脉注射白念珠菌建立白念珠菌感染模型的用量是在参考文献<sup>[9,11]</sup>和预实验的基础上确定的。在预实验中, 我们设计的一系列的白念珠菌的菌量用于尾静脉注射, 菌量越多小鼠的生存时间越短, 最后我们确定了合适的

注射菌量使小鼠的死亡时间控制在建模后 1 周左右。结果显示,无论灌胃还是腹腔注射,无论高剂量(500 mg/kg)还是低剂量(50 mg/kg)的维生素 C,与模型对照组比生存时间没有差别。肾脏载菌量实验结果表明,通过不同给药途径(灌胃和腹腔注射)

给予不同剂量维生素 C,与模型对照组比菌落数增加( $P < 0.05$ )。病理学分析观察白念珠菌感染后的小鼠肾脏,结果表明,各组的分析基本一致,肾脏内可见多个脓肿形成,浸润细胞以中性粒细胞、淋巴细胞、浆细胞为主;PAS 染色可见大量真菌菌丝。

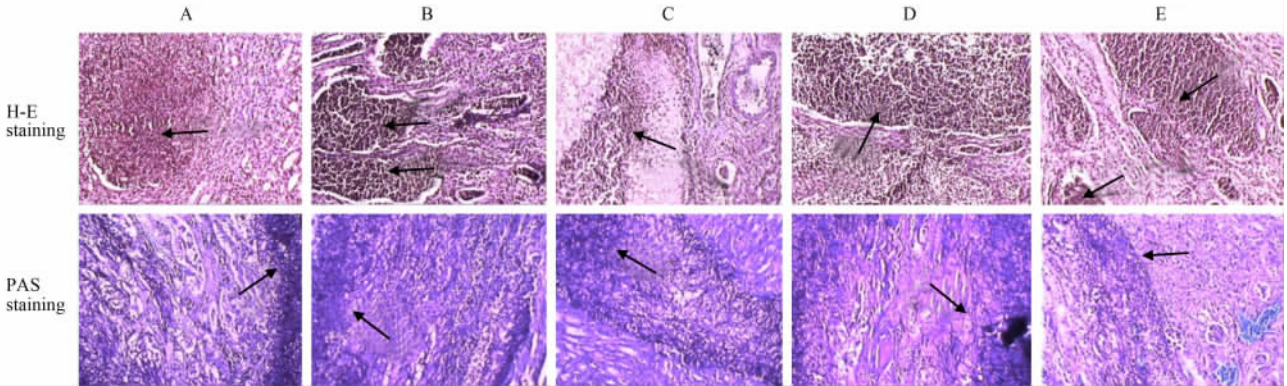


图 2 小鼠肾脏病理切片

Fig 2 Histopathological analysis of kidneys from mice with systemic Candidiasis

A: Model control; B: 50 mg/kg vitamin C, *i. g.*; C: 500 mg/kg vitamin C, *i. g.*; D: 50 mg/kg vitamin C, *i. p.*; E: 500 mg/kg vitamin C, *i. p.*. Arrows indicate abscesses; arrowheads indicate fungi

研究表明,一方面维生素 C 可能保护机体,大剂量维生素 C 可对抗自由基损伤,保护宿主细胞以及亚细胞器<sup>[12]</sup>;改善心血管功能;增强机体免疫功能及参与解毒、减轻组织损伤、促进组织修复。另一方面,维生素 C 作为最典型的抗氧化物质,可能削弱免疫细胞呼吸爆发所释放活性氧的杀菌作用,从而保护了病原真菌。本研究结果表明,维生素 C 对白念珠菌感染小鼠没有积极的治疗作用,大量维生素 C 非但没有治疗作用还可能加重白念珠菌感染。

## [参考文献]

- [1] Castón-Osorio J J, Rivero A, Torre-Cisneros J. Epidemiology of invasive fungal infection[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2008, 32 (Suppl 2): S103-S109.
- [2] Li W, Maeda N, Beck M A. Ascorbic acid deficiency increases the lung pathology of influenza virus-infected gulo<sup>-/-</sup> mice[J]. *J Nutr*, 2006, 136: 2611-2616.
- [3] Arroll B. Non-antibiotic treatments for upper-respiratory tract infections (common cold) [J]. *Respirat Med*, 2005, 99: 1477-1484.
- [4] Cathcart R F III. Ascorbic acid in the treatment of acquired immune deficiency syndrome (AIDS) [J]. *Medical Hypotheses*, 1984, 14: 423-433.
- [5] Stephensen C B, Marquis G S, Jacob R A, Kruzich L A, Douglas S D, Wilson C M. Vitamins C and E in adolescents and young adults with HIV infection[J]. *Am J Clin Nutr*, 2006, 83: 870-879.
- [6] Kim H J, Kim M K, Chang W K, Choi H S, Choi B Y, Lee S S.

Effect of nutrient intake and *Helicobacter pylori* infection on gastric cancer in Korea: a case-control study[J]. *Nutr Cancer*, 2005, 52: 138-146.

- [7] Baysoy G, Ertem D, Ademoglu E, Kotiloglu E, Keskin S, Pehlivanoglu E. Gastric histopathology, iron status and iron deficiency anemia in children with *Helicobacter pylori* infection [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2004, 38: 146-151.
- [8] Park J H, Kim S Y, Kim D W, Lee W G, Rhee K H, Youn H S. Correlation between *Helicobacter pylori* infection and ascorbic acid levels in whole blood, plasma, and gastric juice, and the pH of gastric juice in Korean children [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2003, 37: 53-62.
- [9] Zhang L, Yan K, Zhang Y, Huang R, Bian J, Zheng C, et al. High-throughput synergy screening identifies microbial metabolites as combination agents for the treatment of fungal infections[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 4606-4611.
- [10] Papadimiyriou J M, Ashman R B. The pathogenesis of acute systemic candidiasis in a susceptible inbred mouse strain [J]. *J Pathol*, 1986, 150: 257-265.
- [11] Cornet M, Bidard F, Schwarz P, DaCosta G, Blanchin-Roland S, Dromer F, et al. Deletions of endocytic components VPS28 and VPS32 affect growth at alkaline pH and virulence through both RIM101-dependent and RIM101-independent pathways in *Candida albicans* [J]. *Infect Immun*, 2005, 73: 7977-7987.
- [12] Wang Y, Jia X M, Jia J H, Li M B, Cao Y Y, Gao P H, et al. Ascorbic acid decreases the antifungal effect of fluconazole in the treatment of candidiasis [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2009, 36: e40-e46.

[本文编辑] 尹 茶