

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00016

兔实验性非侵袭性真菌性上颌窦炎模型的制备

王 骥¹, 刘 锋^{2*}, 葛前进¹

1. 解放军 150 中心医院耳鼻咽喉科, 洛阳 471031

2. 第二军医大学长海医院耳鼻咽喉科, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨实验性非侵袭性真菌性上颌窦炎动物模型的制备方法。**方法** 25 只新西兰大白兔(共 50 侧鼻窦)分为 7 组:空白对照组(6 侧)、假手术对照组(6 侧)、黏膜划伤组(6 侧)、窦口阻塞组(6 侧)、仅注入烟曲霉菌组(8 侧)、注入烟曲霉菌并予以黏膜划伤组(9 侧)、注入烟曲霉菌加窦口阻塞组(9 侧)。以上鼻窦自然开口是否予以封闭以及鼻窦黏膜是否划伤作为分组标准。观察以上组别在接种烟曲霉菌后成为真菌性鼻窦炎的的可能性。于接种后 14 d 及 28 d, 根据上颌窦内分泌物真菌培养、分泌物涂片及病理检查结果判定各组制模成功率。**结果** 注入烟曲霉菌加窦口阻塞组上颌窦分泌物烟曲霉菌培养阳性率 14 d 为 88.9%(8/9 侧), 28 d 为 77.8%(7/9 侧)。而注入烟曲霉菌并予以黏膜损伤组上颌窦分泌物烟曲霉菌培养阳性率 14 d 为 44.4%(4/9 侧), 28 d 为 22.2%(2/9 侧)。**结论** 窦口阻塞加注入烟曲霉菌的方法可成功制造实验性非侵袭性真菌性上颌窦炎模型。

[关键词] 鼻窦炎; 真菌性; 动物模型; 非侵袭性**[中图分类号]** R 765.41 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)01-0016-05

A new method to create experimental model of noninvasive fungal sinusitis in rabbits

WANG Jian¹, LIU Feng^{2*}, GE Qian-jin¹

1. Department of Otorhinolaryngology, No. 150 Hospital of PLA, Luoyang 471031, Henan, China

2. Department of Otorhinolaryngology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate a new method for creating experimental model of noninvasive fungal sinusitis in rabbits. **Methods** Twenty-five New Zealand white rabbits (50 sides) were divided into seven groups: control group ($n=6$ sides), sham-operation group ($n=6$ sides), mucosal-scratched group ($n=6$ sides), ostia-blocked group ($n=6$ sides), *Aspergillus fumigatus* inoculated group ($n=8$ sides), mucosal-scratched plus *Aspergillus fumigatus* inoculated group ($n=9$ sides), and ostia-blocked plus *Aspergillus fumigatus* inoculated group ($n=9$ sides). The experiment was divided according to whether the maxillary sinus mucosa was wounded or not and whether the natural ostia were blocked or not. On days 14 and 28 after *Aspergillus fumigatus* inoculation, histopathologic and mycological examinations of both maxillary cavities and mucous membrane were performed to confirm the establishment of the model. **Results** *Aspergillus fumigatus* plus ostial obstruction group had a positive rate of 88.9% (8/9 sides) on day 14 and 77.8% (7/9 sides) on day 28 in fungal culture. *Aspergillus fumigatus* plus mucosa wound yielded a positive rate of 44.4% (4/9 sides) on day 14 and 22.2% (2/9 sides) on day 28. **Conclusion** *Aspergillus fumigatus* inoculation combined with an blocked ostium can be used to establish experimental model of noninvasive maxillary fungal sinusitis.

[Key words] sinusitis; fungi; animal models; noninvasive

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(1):16-20]

真菌性鼻窦炎(fungal sinusitis, FS)随着细菌学、血清学、组织病理学和放射影像学技术的进步得以早期确诊,因此在免疫功能正常的人群的发病率日益增加。真菌性鼻窦炎临床上分为非侵袭性和侵袭性两大类型^[1],其中曲霉菌引起的非侵袭性真菌性鼻窦炎(noninvasive fungal sinusitis, NFS)在临床

较为常见^[2],但其发病机制至今未明。为更好地研究真菌性鼻窦炎的发病机制、病理生理,评价新的诊断方法、治疗及预后等,需建立有效的实验性真菌感染动物模型。

以往报道实验模型的构建及相关研究主要以细菌性模型为多,以真菌制模及研究鲜有^[3-4]。兔上颌

[收稿日期] 2011-09-23

[接受日期] 2011-12-12

[作者简介] 王 骥, 硕士, 主治医师, E-mail: tiandb@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81873573, E-mail: doctor_fliu@163.com

窦的解剖和生理特点更接近于人类,有较大的容量和实验手术操作可行性,经常被用作实验性模型^[5]。兔的鼻窦温度维持在 $(35.2 \pm 0.7)^\circ\text{C}$ 左右,这样的环境适合烟曲霉菌生长^[6]。因此,本实验选择新西兰大白兔作为实验动物,探讨实验性非侵袭性真菌性上颌窦炎动物模型的制备方法。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组 25只体健的两性新西兰大白兔,体质量 $2.0 \sim 3.0 \text{ kg}$,购自第二军医大学实验动物中心[许可证号:SCXK(沪)2007-0003]。实验前每只实验兔单独置于同样条件的笼子中1周,排除鼻部疾病,在整个实验过程中可随时获得水和食物。将实验兔分为以下7组:第1组(空白对照组6侧:不开放上颌窦,不接种烟曲霉菌),第2组(假手术对照组6侧:不接种烟曲霉菌,注入生理盐水),第3组(黏膜划伤组6侧:划伤黏膜,注入生理盐水),第4组(窦口阻塞组6侧:封闭上颌窦口,注入生理盐水),第5组(仅注入烟曲霉菌组8侧:注入烟曲霉菌混悬液),第6组(注入烟曲霉菌并给予黏膜划伤组9侧:划伤黏膜,注入烟曲霉菌混悬液),第7组(注入烟曲霉菌加窦口阻塞组9侧:封闭上颌窦口,注入烟曲霉菌混悬液)。

1.2 实验菌种及接种方法 烟曲霉菌[CMCC(F)A1a]菌株购自中国微生物菌种保藏管理委员会医学真菌中心,使用时转种至新鲜配制的沙堡氯霉素琼脂糖斜面培养基, 37°C 下培育4d后恢复毒力,制成浓度为 $1.0 \times 10^7 \text{ CFU/ml}$ 的孢子生理盐水混悬液备用。在接种烟曲霉菌的各组实验兔上颌窦内注入 0.5 ml 、浓度为 $1.0 \times 10^7 \text{ CFU/ml}$ 的烟曲霉菌分生孢子生理盐水混悬液。不接种烟曲霉菌的各组注入 0.5 ml 生理盐水。

1.3 手术器械和物品 直径 3 mm 、视角为 0° 、 30° (Storz)鼻窦内镜及有关手术器械,LS-A型额带射灯,微型体视放大镜($\times 4$),沙堡真菌培养基,细菌培养皿,细菌培养箱,真菌培养箱,VITEK全自动细菌鉴定仪,BX50型奥林巴斯显微镜及相关成像设备等。术中使用的器械、物品均经灭菌处理。

1.4 实验方法 以 20% 乌拉坦耳缘静脉注射(5 ml/kg),全麻成功后将兔仰卧位固定于操作台上,术区备皮,常规消毒铺巾。切口处注入少许含肾上腺素的 1% 利多卡因局部浸润麻醉。平行鼻背约 1 cm 处纵形切开上颌窦前壁皮肤,分离皮下组织及骨膜,

凿开上颌窦前壁,用洞凿钳将前壁开口扩大约 4 mm 。

应用体视放大镜或鼻窦内镜观察上颌窦内情况,并取上颌窦内的分泌物作细菌及真菌培养。用 0° 鼻内镜观察上颌窦自然开口和上颌窦黏膜情况。

窦口阻塞组实验兔封闭窦口采用切口周围筋膜组织封闭,将窦口四周黏膜用耳科手术刀搔刮制成新鲜创面,取切口周围筋膜将窦口封闭。缝合皮下组织及皮肤,术后切口涂金霉素软膏 3 d ,全身不使用抗生素。判断窦口是否完全封闭主要看缝合的皮肤是否随呼吸运动,如有运动者为不全阻塞,不动者为完全阻塞。

每天观察兔子的生活能力和感染情况。在第14天和第28天,用鼻内镜观察双侧上颌窦黏膜情况和窦腔分泌物,同时取分泌物标本,送真菌和细菌培养,并行窦腔分泌物涂片检查。所有实验兔于第28天后用空气栓塞法处死,双侧上颌窦黏膜和周围骨骼标本送病理检查,病理切片染色同时采用H-E和PAS染色两种。

1.5 真菌学及细菌学检验 尽快将上颌窦腔分泌物标本送至专业检验医师处,按常规操作进行真菌学及细菌学检验。真菌标本在需氧环境下,培养皿于 37°C 放置 8 d 。细菌标本在需氧环境下,培养平板放置于 37°C 培养 24 h 。

1.6 统计学处理 利用SPSS 13.0软件进行统计学分析,采用Fisher精确检验。比较接种烟曲霉菌各组间的真菌培养阳性率。检验水平(α)为 0.05 。

2 结果

2.1 一般情况 实验前,用鼻内镜检查实验兔窦腔:上颌窦自然窦口开放;鼻窦黏膜光滑,无肿胀,无充血,无脓性分泌物。除空白对照组,每一个上颌窦分泌物培养结果均未见烟曲霉菌及其他真菌生长,常规细菌学检查未检出细菌。

术后,实验兔饮食活动正常,手术切口愈合良好,未出现感染、红肿,其中接种烟曲霉菌组实验兔于接种 3 d 后出现喷嚏较多现象。组4、组6及组7的部分实验兔接种 7 d 后有脓性涕自前鼻孔流出。

2.2 真菌学、细菌学检验及病理结果 于术后 14 d 和 28 d 打开上颌窦前壁,观察上颌窦腔内情况,如分泌物、黏膜反应、窦口封闭等。用消毒棉签蘸取分泌物后迅速送细菌学检查及真菌学检查,28d后取上颌窦内黏膜进行病理检查。真菌培养阳性组分泌物涂片可见烟曲霉菌菌丝及孢子(图1A),可见烟曲霉菌标志性烧瓶状孢子头(图1B);真菌培养可见沙

堡培养基灰绿色真菌生长(图2)。各组真菌培养阳性结果见表1、表2。

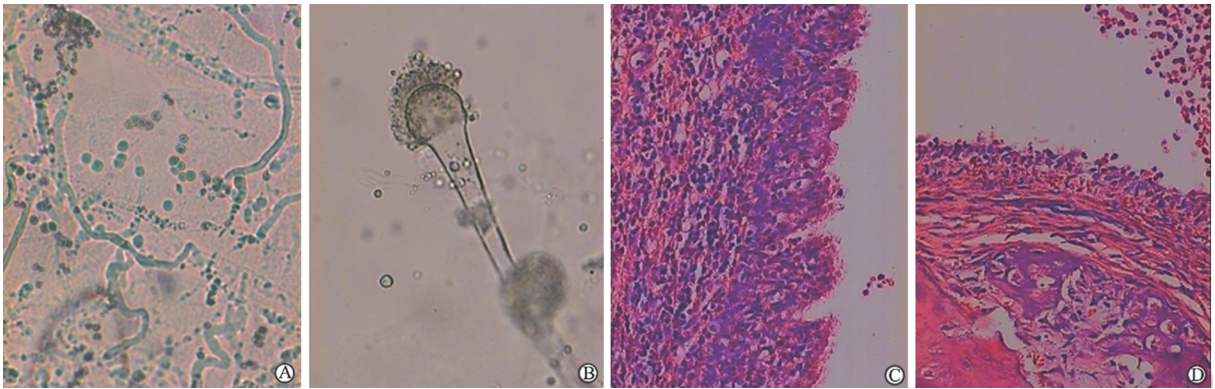


图1 分泌物涂片显微镜观察(A,B)和真菌炎症兔上颌窦黏膜病理学特征(C,D)
 Fig 1 Laboratory examination of secretions (A,B) and mucosa histopathological examination of rabbit maxillary fungal sinusitis (C,D)

A: Maxillary sinus secretions showing hyphae and spores; B: *Aspergillus fumigatus* conidia head is like a flask; C: Epithelial degeneration, mucosal thickening, shedding some cilia, mucous and submucosal infiltration of inflammatory cells; D: Epithelial degeneration, severe mucosal damage, submucosal fibrosis, mucosal and submucosal infiltration of inflammatory cells. H-E staining(C,D). Original magnification: $\times 400$ (A, B), $\times 200$ (C,D)



图2 分泌物真菌培养
 Fig 2 Mycological examination of secretions

接种 14 d 后,组 1、2、5 细菌学检查结果阴性,组 3、4、6、7 黏膜划伤或窦口阻塞,细菌培养结果阳性(多杀巴氏菌 6 侧,犬巴氏菌 10 侧,洋葱伯克霍尔德菌 1 侧);接种 28 d 后,组 1、2 细菌学检查结果阴性,组 3、4、5、6、7 黏膜划伤或窦口阻塞,细菌培养结果阳性(多杀巴氏菌 6 侧,犬巴氏菌 9 侧,洋葱伯克霍尔德菌 2 侧)。

组织病理学检查上颌窦黏膜,可见上皮细胞变性,黏膜增厚或纤维化,纤毛部分脱落,黏膜及黏膜下大量炎性细胞浸润或出现(图 1C、1D)。

表 1 入组 14 d 后上颌窦内分泌物烟曲霉菌培养结果

Tab 1 *Aspergillus fumigatus* culture results of maxillary cavity secretions after 14 d

Group	n	Result of cultivation										Negative rate n(%)	Positive rate n(%)
Group 1	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6(100)	0(0)
Group 2	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6(100)	0(0)
Group 3	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6(100)	0(0)
Group 4	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6(100)	0(0)
Group 5	8	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	7(87.5)	1(12.5)
Group 6	9	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	5(55.6)	4(44.4)
Group 7	9	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	1(11.1)	8(88.9)*

N=50

Group 1: Control group; Group 2: Sham-operation group; Group 3: Mucosal-scratched group; Group 4: Ostia-blocked group; Group 5: *Aspergillus fumigatus* inoculated group; Group 6: Mucosal-scratched plus *Aspergillus fumigatus* group; Group 7: Ostia-blocked plus *Aspergillus fumigatus* group. Fisher's exact test. * $P < 0.05$ vs group 5

表 2 入组 28 d 后上颌窦内分泌物烟曲霉菌培养结果

Tab 2 *Aspergillus fumigatus* culture results of maxillary cavity secretions after 28 d

N=50

Group	n	Result of cultivation									Negative rate n(%)	Positive rate n(%)
Group 1	6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6(100)	0(0)
Group 2	6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6(100)	0(0)
Group 3	6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6(100)	0(0)
Group 4	6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6(100)	0(0)
Group 5	8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	8(100)	0(0)
Group 6	9	—	+	—	—	—	—	—	+	—	7(77.8)	2(22.2)
Group 7	9	—	+	—	+	+	+	+	+	+	2(22.2)	7(77.8)*

Group 1: Control group; Group 2: Sham-operation group; Group 3: Mucosal-scratched group; Group 4: Ostia-blocked group; Group 5: *Aspergillus fumigatus* inoculated group; Group 6: Mucosal-scratched plus *Aspergillus fumigatus* group; Group 7: Ostia-blocked plus *Aspergillus fumigatus* group. Fisher's exact test. * $P < 0.05$ vs group 5

3 讨论

国内外有多篇关于烟曲霉菌致兔实验性感染模型制备成功的报道,包括侵袭性感染模型^[7-9]。这些实验表明,兔对烟曲霉菌感染敏感。但应用兔作为实验性真菌性鼻窦炎模型目前仅见 Dufour 等^[6]及 Chakrabarti 等^[10]的报道。

曲菌是一种广泛存在于自然界的腐生菌,是正常人体皮肤及黏膜的常驻真菌,真菌性鼻窦炎有 80% 为曲菌感染,其中烟曲霉菌最为常见^[11]。相比较 Chakrabarti 等^[10]在实验中选用黄曲霉,本实验选用常见的烟曲霉菌作为菌种,考虑到烟曲霉菌的条件致病性,本实验采用不接种烟曲霉菌组与接种烟曲霉菌组作对照,并增设空白对照组,结果证实真菌感染需要一定量的孢子。实验中接种用的烟曲霉菌混悬液浓度为 1.0×10^7 CFU/ml 的分生孢子,比 Dufour 等^[6]采用的浓度 (1.0×10^8 CFU/ml 的分生孢子)小,可能与实验动物所处环境及烟曲霉菌种的毒力有关。与 Dufour 等^[6]实验中的分组不同,本实验接种烟曲霉菌组与不接种烟曲霉菌组分离,接种烟曲霉菌组给予双侧上颌窦同时接种,避免实验动物双侧鼻腔交叉感染而影响实验结果。

我们分析接种烟曲霉菌组得知,单纯接种一定量真菌并不足以诱发真菌性鼻窦炎,因为黏膜的局部免疫防御及黏膜的自我清洁功能有助于清除窦腔内的孢子,从而阻止真菌性鼻窦炎的发生。其中组 5(仅注入烟曲霉菌组)和组 6(注入烟曲霉菌并给予黏膜划伤组)中的 3 侧上颌窦接种后 14 d 烟曲霉菌培养结果为阳性,接种 28 d 后烟曲霉菌培养转为阴性,这表明兔上颌窦黏膜的局部免疫防御及纤毛运

动传输系统的自我清洁功能的恢复起到了关键作用^[6]。组 6 和组 7 中均有部分同时出现了细菌感染,这些细菌均为条件致病菌。其中组 6 有 2 侧 28 d 后真菌培养仍为阳性。虽然组 6 窦口开放,但因为黏膜划伤,局部黏膜免疫力及纤毛运动传输系统功能下降,细菌繁殖,进一步降低局部黏膜免疫力及纤毛运动传输系统功能,从而降低真菌孢子的清除,这可能有助于真菌性鼻窦炎的形成^[12-13]。在组 7(注入烟曲霉菌加窦口阻塞组)中使用筋膜封闭窦口,避免人工材料引起的异物反应影响,烟曲霉菌接种 14 d 后真菌培养阳性率为 88.9%(8/9 侧),28 d 后真菌培养阳性率为 77.8%(7/9 侧),其中 1 侧窦口于 14 d 后因阻塞筋膜脱落,上颌窦自然开口重新开放,疾病转归。结果表明窦口阻塞是真菌性鼻窦炎发病的最主要因素。上颌窦自然开口的阻塞可导致上颌窦窦腔通气引流障碍,使动脉血氧分压(partial pressure of oxygen in artery, PaO₂)下降、动脉血二氧化碳分压(partial pressure of carbon dioxide in artery, PaCO₂)上升、pH 下降,窦黏膜血流减少,渗出增加。这些变化均可降低黏膜纤毛运动功能,使上颌窦自洁功能受累,从而使一些“正常菌落”过度繁殖。这些条件均为有利于真菌生长繁殖的因素^[14]。

本实验中的所有动物模型均未有侵袭性真菌性上颌窦炎发生,考虑与实验动物全身免疫状态、真菌菌种的毒力、真菌种类和数量有关。

本实验通过接种较少剂量烟曲霉菌成功构建了兔实验性非侵袭性真菌性上颌窦炎模型。实验动物发病时间较长,未出现因全身感染死亡,较好地模拟了非侵袭性真菌性鼻窦炎的发病过程,可用于真菌

性鼻窦炎的真菌学、免疫学、发病机制、病理生理、诊断评估及手术治疗的研究。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 肯尼迪 D W 主编. 鼻窦疾病的诊断和治疗[M]. 赵长青, 李泽卿, 译. 北京, 中国医药科技出版社, 2006:179-180.
- [2] Ferreiro J A, Carlson B A, Cody D T 3rd. Paranasal sinus fungus balls[J]. Head Neck, 1997, 19:481-486.
- [3] 张晶, 周兵. 兔鼻窦炎模型造模方法比较及应用[J]. 国际耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2009, 33:91-93.
- [4] Kara C O, Cetin C B, Demirkan N, Sengül M, Topuz B, Pinar H S, et al. Experimental sinusitis in a rhinogenic model[J]. Laryngoscope, 2004, 114:273-278.
- [5] Casteleyn C, Cornillie P, Hermens A, Van Loo D, Van Hoo-rebeke L, van den Broeck W, et al. Topography of the rabbit paranasal sinuses as a prerequisite to model human sinusitis [J]. Rhinology, 2010, 48:300-304.
- [6] Dufour X, Kauffmann-Lacroix C, Goujon J M, Grollier G, Rodier M H, Klossek J M. Experimental model of fungal sinusitis: a pilot study in rabbits[J]. Ann Otol Rhinol Laryngol, 2005, 114:167-172.
- [7] 刘军, 沈永年, 吕桂霞, 陈伟, 刘维达. 侵袭性曲霉菌病兔模型的构建[J]. 中国皮肤性病杂志, 2006, 20:449-451.
- [8] Asif A R, Oellerich M, Armstrong V W, Gross U, Reichard U. Analysis of the cellular *Aspergillus fumigatus* proteome that reacts with sera from rabbits developing an acquired immunity after experimental aspergillosis[J]. Electrophoresis, 2010, 31:1947-958.
- [9] Ayçiçek A, Cetinkaya Z, Kiyici H, Kenar F, Aşık G, Kiraz N. The effects of caspofungin and voriconazole in an experimental fungal infection of the ear due to *Aspergillus* [J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2009, 266:1703-1709.
- [10] Chakrabarti A, Jatana M, Sharma S C. Rabbit as an animal model of paranasal sinus mycoses[J]. J Med Vet Mycol, 1997, 35:295-297.
- [11] 杨秀敏, 王毓新, 刘铭, 刘华超, 周兵. 100例真菌性鼻窦炎的病原菌分析[J]. 耳鼻咽喉-头颈外科, 2000, 77:9-13.
- [12] 刘锋, 周水森, 张速勤, 许月. 家兔实验性上颌窦炎黏膜病理及超微结构变化[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志, 2005, 19:216-218.
- [13] 卫红齐, 王秋萍, 李泽卿, 周玫, 陈伟, 吴昆旻. 家兔急性鼻窦炎上颌窦黏膜病理改变[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2007, 14:431-434.
- [14] 刘铭, 刘华超, 韩德民. 鼻及鼻窦的霉菌性疾病[J]. 耳鼻咽喉-头颈外科, 2000, 7:252-256.

[本文编辑] 商素芳

《军医大学学报(英文版)》征稿、征订启事

《军医大学学报(英文版)》(*Journal of Medical Colleges of PLA*)是由第二、三、四军医大学及南方医科大学(原第一军医大学)共同主办、国内外公开发行人(CN 31-1002/R, ISSN 1000-1948)的高级药理学综合性英文学术刊物,1986年6月创刊。本刊主要报道基础、临床、预防、军事医学、药理学和中国医学等领域的最新科研成果、新理论、新技术和新方法。辟有专家论坛、基础研究、临床研究、经验交流、短篇报道、个案报告等栏目。

本刊为中国英文版科技论文统计源期刊,并被纳入中国期刊网、万方数据库和中文科技期刊数据库等国内所有重要检索系统,已被美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(VINITI Abstract Journal)、波兰《哥白尼索引》(IC)和荷兰《斯高帕斯》(Scopus)等国际知名检索系统收录,期刊全文已进入爱思唯尔(Elsevier)科技出版集团所属的 ScienceDirect 全文数据库(<http://www.elsevier.com/locate/jmcpla>)。

为了弘扬科研创新精神,推动医学事业发展,促进海内外学术交流,本刊面向全国和海外作者征稿。

来稿要求:来稿请附中文的文题、作者姓名、单位名称及较详细的中文摘要和3~8个关键词,参考文献放在文末。来稿务必写清个人通讯地址及联系电话,编辑部在接到稿件30日内通知作者稿件是否被采用。

刊发周期:由全国相关学科领域的知名专家和权威人士进行审稿,对审稿通过的论文2~6个月内安排刊出。国家、省部级基金资助和重点攻关项目稿件优先发表。

本刊为双月刊,A4开本,80g铜版纸彩色印刷,每期定价15元,全年90元。可在当地邮局订阅(邮发代号4-725),漏订者可来函本刊编辑部办理邮购。

地址:上海市翔殷路800号《军医大学学报(英文版)》编辑部,邮编:200433

联系人:徐佳

电话:021-81870788 转 818 分机

E-mail: jydxxb@yahoo.com.cn