

体液免疫抗白念珠菌感染的研究

傅颖媛 莫冰 曾小平 况南珍 张志

(江西医学院免疫学教研室 南昌 330006)

摘要:探讨抗白念珠菌 IgY 及其免疫血清对多种动物模型感染白念珠菌的保护作用。制备烧伤继发感染白念珠菌大鼠、白念珠菌性阴道炎小鼠及免疫功能低下小鼠多种动物感染模型,分别应用抗白念珠菌 IgY、鼠免疫血清和生理盐水对照,观察比较各自的作用。抗白念珠菌 IgY 对烧伤继发感染白念珠菌大鼠及白念珠菌性阴道炎小鼠均有明显的保护作用;鼠免疫血清则对阻止远程靶器官的白念珠菌扩散有较好的作用。体液免疫成份抗白念珠菌 IgY 及其免疫血清对烧伤继发感染白念珠菌大鼠、白念珠菌性阴道炎小鼠及免疫功能低下小鼠均有良好的保护作用。

关键词:白念珠菌, 体液免疫

中图分类号: R379.4, R392.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 05-0057-04

RESEARCH OF HUMORAL IMMUNITY AGAINST *CANDIDA ALBICANS* INFECTION

FU Ying-Yuan MO Bing ZENG Xiao-Ping KUANG Nan-Zhen ZHANG Zhi

Department of Immunology, Jiangxi medical college, Nanchang 330006

Abstract: To study the role of anti-*C. albicans* IgY and serum in protection of *C. albicans* infection of several animal models. To develop three animal models of *C. albicans* infection: a burned rat model of *C. albicans* infection, a mouse model of vaginal candidiasis and a immunosuppression mouse model of *C. albicans* infection. And we compared the contribution of anti-*C. albicans* IgY and serum to the clearance of the *C. albicans* in three animal models of *C. albicans* infection. Anti-*C. albicans* IgY can protect against *C. albicans* infection in a burned rat model of *C. albicans* infection and a mouse model of vaginal candidiasis. The serum can effectively protect the mice from disseminated candidiasis in a immunosuppression mouse model. Humoral immunity component involving anti-*C. albicans* IgY and serum protect against *C. albicans* infection in a burned rat model of *C. albicans* infection, a mouse model of vaginal candidiasis and a immunosuppression mouse model of *C. albicans* infection.

Key words: *Candida albicans*, Humoral immunity

有关抗白念珠菌感染免疫机制多年来一直存在着争议,本研究制备烧伤继发感染白念珠菌大鼠、阴道感染白念珠菌小鼠及免疫功能低下小鼠多种动物感染模型,分别应用抗白念珠菌 IgY、鼠免疫血清和生理盐水对照,观察比较各自的作用。以探讨并肯定体液免疫的特异性成份,免疫血清及抗白念珠菌 IgY 在机体抗白念珠菌感染中的作用,为临床防治白念珠菌感染提供依据。

1 材料与方法

1.1 白念珠菌抗原制备

自我院烧伤中心烧伤继发感染白念珠菌患者多处创面及临床白念珠菌性阴道炎患

江西省自然科学基金资助项目 (No.974028)

江西省科学技术厅资助项目 (E970102)

收稿日期: 2001-07-15, 修回日期: 2001-12-06

者阴道分泌物中分离出白念珠菌,经形态、生化与标准白念珠菌(2.2086,由中国预防科学院提供)比较及PCR鉴定。进行纯培养,并按一定比例,将其配成适当浓度菌液后超声粉碎。

1.2 抗白念珠菌鼠、兔血清制备

选用BALB/c近交系小鼠及家兔,分别适量皮下多点注射免疫小鼠及兔,一周后,再次同量分别于鼠尾静脉及兔耳缘静脉加强免疫,二周后,开始收集血清,56℃ 30min灭活后,置-20℃备用。

1.3 抗白念珠菌IgY制备

按文献[1]制备。

1.4 免疫血清与IgY的活性测定

分别选用白念珠菌标准株、临床株及纯化的白念珠菌抗原成分,采用ELISA、间接血球凝集试验。

1.5 实验动物模型制备及分组

1.5.1 免疫功能低下白念珠菌感染鼠模型制作与分组:选用BALB/c近交系小鼠(江西省实验动物中心提供),体重20g,雌雄各半,室温适应饲养1d后,按本室常规方法^[2]于每鼠背部皮下注射环磷酰胺(CP)100mg/kg体重,隔日重复1次,造成小鼠免疫功能低下,表现为鼠外周血淋巴细胞百分率下降30%以上,T淋巴细胞增殖培养CPM值及SI值均降低1倍以上,然后再以不同方式造成白念珠菌感染。

(1)阴道感染白念珠菌组:第4d,每鼠经阴道感染白念珠菌,每次 5×10^6 /鼠,同日IgY防治组于感染前8h,每次用抗白念珠菌IgY 0.1mg/鼠,相应对照组则以等量NS代IgY,重复2d。48h后引颈处死小鼠,行细菌学检查。

(2)腹腔感染白念珠菌组和鼠免疫血清实验组:每鼠腹腔注射0.2mL同系鼠免疫血清,其对照则代以0.2mL NS。第5d,各鼠均腹注48h培养的白念珠菌悬液 2×10^7 ,第8d,引颈处死小鼠,进行细菌学检查。

1.5.2 烧伤大鼠继发白念珠菌感染鼠模型制作:选用SD大鼠(江西医学院动物科学部提供)20只,体重 190 ± 10 g,雌雄各半,室温 23 ± 3 ℃,实验前单笼喂养3d后,按常规方法麻醉、脱毛,造成体表25%~30% III度烫伤,并即刻腹腔注射生理盐水(NS 4mL/100g),以抗休克。烫伤创面用无菌纱布擦干,再分组感染防治。感染组,烫伤后1h后创面均匀涂布1mL菌液(2.5×10^5 cfu/mL),待吸收后,第3h按常规烧伤治疗(创面涂布磺胺嘧啶银霜剂)、包扎,单笼饲养,常规饮食,自由饮水;IgY防治组,则于烫伤后第2h创面均匀涂布IgY(1mg/mL),其余处理均同感染组。

1.6 细菌学检查

1.6.1 血液、腹腔液及脾、肾细菌学检查:(1)分别定量无菌取小、大鼠心抗凝血。(2)解剖取出完整阴道,NS反复冲洗内壁,收集洗液;(3)用PBS定量冲洗小鼠腹腔3遍,收集洗液;(4)分别取鼠脾、肾,去筋膜,洗净,过200目铜网,使成单细胞悬液,用PBS液分别将各脾、肾悬液稀释成5mL。最后分别取上述各鼠血、阴道内壁洗液、腹腔液、脾、肾悬液30μL,接种于沙保氏固体培养基上,培养48h后,扫描并计算培养基上白念珠菌菌落数。

1.6.2 大鼠烧伤痂皮细菌学研究:定量剪取烧伤大鼠痂皮,过200目铜网,制成单细胞悬液,定量接种于沙保氏培养基上,置33℃ 48h,观察并计算白念珠菌菌落数。

2 结 果

2.1 白念珠菌诱导机体产生的抗体效价测定结果

表 1 表明,抗白念珠菌 IgY、免疫兔血清及免疫鼠血清在体外均能与白念珠菌起良好的免疫反应,有较高的抗体效价。

表 1 抗白念珠菌抗体效价测定结果

	IgY	免疫兔血清	免疫鼠血清
ELISA	1:10,000	1:2,400	1:2,400
间接血球凝集试验	1:3,113	1:1,600	1:1,680

2.2 抗白念珠菌 IgY 对阴道感染白念珠菌小鼠的保护作用

图 1 表明 BALB/c 小鼠阴道感染白念珠菌后,应用 IgY 组小鼠 24 ~ 48h 后白念珠菌检出率明显降低,与不用 IgY 对照组比较有极其显著性差异 ($P < 0.001$)。

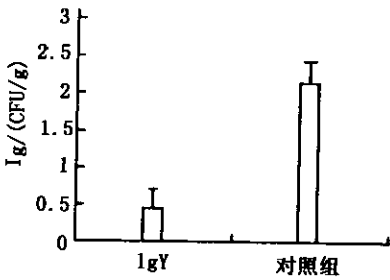


图 1 阴道感染白念珠菌小鼠阴道内壁白念珠菌培养结果

2.3 鼠抗白念珠菌免疫血清抗感染作用

图 2 表明 BALB/c 小鼠经腹腔感染白念珠菌后,腹腔局部应用免疫血清组小鼠腹腔液中白念珠菌数明显减少,与未被动免疫血清比较,第 2 组有极其显著性差异 ($P < 0.005$);脾脏菌落数亦明显减少,有极其显著性差异 ($P < 0.001$);肾脏菌落数较对照有所减少,但无统计意义。

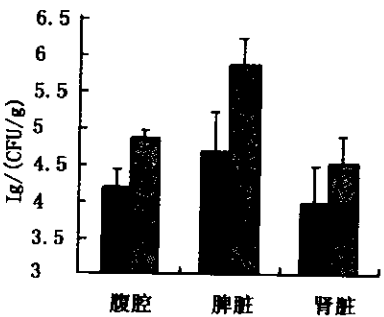


图 2 48h 后腹腔感染白念珠菌小鼠腹腔液、脾脏、肾脏白念珠菌培养结果
■ 腹腔注射免疫血清组, ■ 未注射免疫血清的对照组

2.4 抗白念珠菌 IgY 对烧伤大鼠继发白念珠菌感染的预防作用

图 3 结果表明,烧伤大鼠继发感染白念珠菌后应用 IgY 预防组白念珠菌检出率明显减低,与不用 IgY 的感染组比较有非常显著性差异 ($P < 0.01$)。

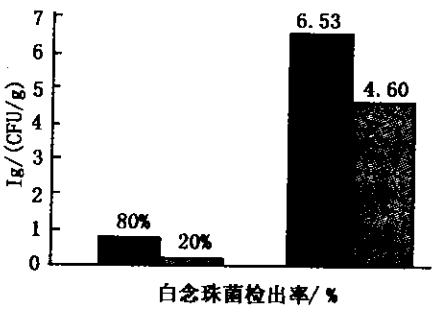


图 3 烧伤大鼠继发感染白念珠菌 48h 后痂皮白念珠菌培养结果
■ 感染组, ■ IgY 组

3 讨论

白念珠菌属深部感染的条件性致病真菌,是烧伤、肿瘤、糖尿病、移植、艾滋病等免疫功能低下病人的主要感染性微生物^[3,4]。近 20 年来,白念珠菌在临床真菌感染中已跃居第 1 位,其病死率高达 60% ~ 90%^[4]。加上各种新的广谱抗生素投放市场,临床上多种抗生素的同时应用,导致菌群失调,造成原本免疫力下降的各种疾病患者极易继发感染白念珠菌,而有关机体抗白念珠菌免疫的问题,一直存在争议,早期的多数研究只肯定细胞免疫在抗白念珠菌感染中的保护作用,否定体液免疫在抗白念珠菌感染中的保护作用^[5,6],但近年来,陆续有报道发现了一些抗白念

珠菌的保护性抗体^[1,7-9,10],但有关抗白念珠菌 IgY 与免疫血清对多种白念珠菌感染模型的作用,尚未见报道。作者制备了兔、鼠免疫血清和抗白念珠菌 IgY,应用于免疫功能低下和白念珠菌性阴道炎小鼠及烧伤继发白念珠菌感染大鼠;探讨它们的保护作用,并与细胞免疫及吞噬细胞作用进行了比较(另文总结)。实验结果从不同角度表明,对白念珠菌感染的小鼠或大鼠,不论是特异性免疫血清还是抗白念珠菌 IgY 均有良好的保护作用,被动免疫抗白念珠菌抗体(免疫血清和 IgY)可使机体获得被动抗感染能力。

本实验所用 IgY,是近年免疫应用学方面的一大研究热点。IgY 的多种生物学作用,已倍受研究者的青睐。我们制备的抗白念珠菌 IgY,在多种白念珠菌感染模型中都起到了良好的保护作用,因此我们有理由相信,该 IgY 有可能成为抗白念珠菌感染的一种有效制剂。

参 考 文 献

- [1] 傅颖媛,曹 勇,杨 慧,等.中国烧伤创疡杂志,2000,42: 9~11.
- [2] 傅颖媛、黄淑云、刘茂林,等.微生物学通报,1995,22(3): 172~175.
- [3] Cardenas-Freytag L, Cheng E, Mayeux P, *et al.* Infect Immun, 1999, 69(2): 826~833.
- [4] Heelan J S, Siliezar D, Coon K. J Clin Microbid, 1996, 34(11): 2847~2849.
- [5] Sinha B K, Prasad S, Monga D P. Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg [A], 1987, 266(1~2): 316~322.
- [6] Matthews R, Hodgetts S, Burnie J. J Infect Dis, 1995, 171(6): 1668~1671.
- [7] Han Y, Ulrich M A, Cutler J E. J Infect Dis, 1999, 179(6): 1477~84.
- [8] Polonelli L, Seguy N, Conti S, *et al.* Clin Diagn Lab Immunol, 1997, 4(2): 142~146.
- [9] Han Y, Morrison R P, Cutler J E. Infect Immun, 1998, 66(12): 5771~5776.
- [10] De Bernardis F, Boccanera M, Adriani D, *et al.* Infect Immun, 1997, 65(8): 3399~3405.