

# 侵襲性白色念珠菌感染動物模式的 研究進展

林迪威 潘建雄

國家衛生研究院 感染症與疫苗研究所

## 前 言

侵襲性念珠菌病 (Invasive candidiasis) 及念珠菌菌血症 (candidemia) 是院內主要的感染症，這種疾病引發的原因常是與免疫功能低下或體內環境改變有關，隨著重症醫學治療的發展 (血液透析，中央靜脈導管放置，全靜脈營養)，及免疫功能不全病患族群的增加 (如接受化學藥物治療和免疫抑制劑、器官移植等相關治療)，在世界各醫院的侵襲性念珠菌病的案例逐年增加[1]。念珠菌為一種真菌，型態有兩種，分別為絲狀的菌絲體及球狀的芽孢體，在人體或周圍環境中都可能存在念珠菌屬 (*Candida species*) 存在。常見的人類致病念珠菌種包括 *Candida albicans* (白色念珠菌)，*C. tropicalis*，*C. glabrata*，*C. krusei*。在院內真菌感染中，念珠菌屬感染約占 70%，而念珠菌引起的感染病例中，白色念珠菌

約占 50% 至 70% [2]，嚴重時會引起致命的侵襲性念珠菌病或念珠菌血症的感染，各國發生率也不同 (表一)，

表一 各國念珠菌菌血症發病率

國家	發病率	參考文獻
全亞洲; ICU	<sup>a</sup> 2.2~41 <sup>pd</sup> 2.2	[8,9]
中國; ICU	<sup>a</sup> 3.2	[10]
印度; ICU	<sup>a</sup> 6.51	[9]
土耳其; ICU	<sup>a</sup> 12.3~42.7 <sup>pd</sup> 2.31	[9,10]
歐洲; ICU	<sup>a</sup> 2.6~16.5 <sup>pd</sup> 0.07~0.33	[10]
德國; ICU	<sup>a</sup> 0.24 <sup>pd</sup> 0.07	[10]
法國; ICU	<sup>a</sup> 6.7	[10]
義大利; ICU	<sup>a</sup> 0.26~1.65 <sup>pd</sup> 0.33	[10]

Special groups (a, per 1,000 admissions; pd, per 1,000 patient days)

ICU = Intensive Care Unit.

其念珠菌菌血症 (candidemia) 的死亡率約 40% [3]。另外，白色念珠菌感染也常見於長期使用抗生素治療感染患者，因服用抗生素除了會殺死致病菌種，也會殺死人體內正常的菌叢，並改變腸胃道菌叢的平衡，使得真菌過度生長，並引起念珠菌病[4]。念珠菌血症的念珠菌來源，可能是腸胃道黏膜或皮膚，但過去研究指出，腸胃道念珠菌才是引發念珠菌血症的主要來源[5]。在臨床診斷的血液培養方法，即使是嚴重的全身性侵襲性念珠菌感染患者，血液培養的陽性率仍只有 25~60% [6]，單純依靠血液培養診斷有其困難。其他快速診斷方式如 ELISA 或 PCR 方法仍在研發中[7]。

侵襲性念珠菌感染診斷上的延遲以及治療藥物的局限性是念珠菌菌血症導致高死亡率的主要原因。目前抗黴菌藥物是治療念珠菌感染的主要方法，但對侵襲性念珠菌感染治療效果有限及考量到抗藥性念珠菌病例的增加，其他治療方式也有相關研究，如念珠菌疫苗或免疫治療方式等[11]。考量到侵襲性念珠菌感染者多為老年人、慢性病或器官移植者，因此對於侵襲性念珠菌感染的致病機轉與早期診斷的研究，對臨床感染管控有其重要性。

小鼠是最常用於研究白色念珠菌致病機轉的動物模式，做法分成血液直接感染或透過口腔及消化道黏膜感染。過去侵襲性念珠菌病動物模式多是直接血液注射，但此法並不符合

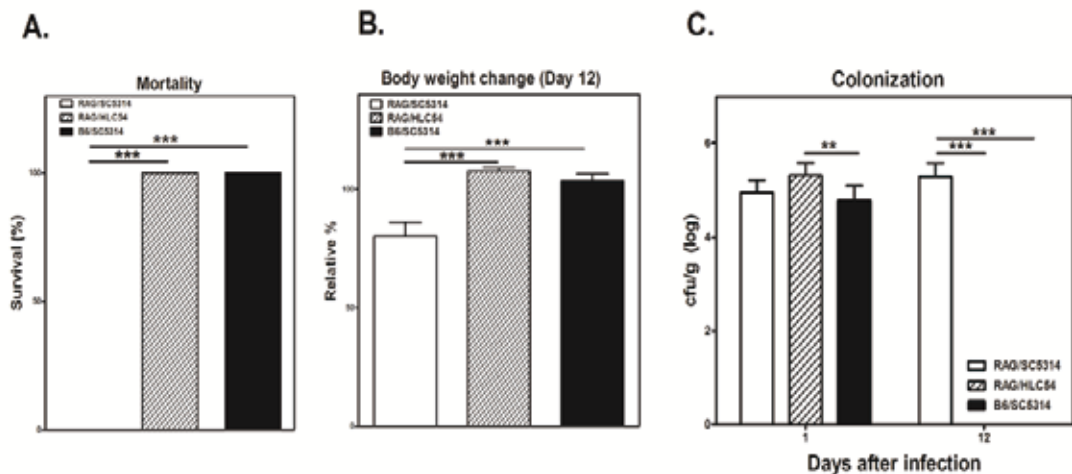
臨床疾病進程多是由消化道的念珠菌而來的情形。相對而言，消化道黏膜感染動物模式較符合人類感染情形，但也困難許多。因為白色念珠菌不是小鼠胃腸道的共生菌，因此一般是需要以廣效抗生素除去胃腸道菌叢才能讓白色念珠菌移生 (colonization) 在胃腸道或者需要使用癌症化療藥物破壞胃腸道黏膜或免疫抑制藥物才能讓胃腸道白色念珠菌引起侵襲性念珠菌病 [12-14]，過程繁瑣及花費昂貴的抗生素及化療/免疫抑制藥物。同時這些做法都會造成原有的正常胃腸道菌叢破壞，而無法研究白色念珠菌增生/侵襲造成的胃腸道菌叢改變，也不適合用來評估侵襲性黴菌診斷標記或治療效果。

## 實驗方法

在科技部整合型計畫支持下，我們利用免疫缺陷小鼠成功建立與人類臨床進程相似的侵襲性念珠菌的動物模式。因為免疫正常小鼠有健全的 T 細胞、B 細胞及 NK 細胞，可以有效防止侵襲性念珠菌症的發生，因此我們選擇缺少這些免疫細胞的免疫缺陷小鼠 (Rag2<sup>-/-</sup>IL2 $\gamma$ c<sup>-/-</sup>; RAG) 作為實驗組，在沒有外加廣效抗生素去除腸道菌相的條件下，經口服管餵  $1 \times 10^7$  cfu 白色念珠菌野生株 (SC5314) 及無法產生菌絲的突變株 (HLC54) 感染免疫缺陷小鼠後，發現只有野生株會造成小鼠死亡，突變株

感染小鼠則沒有任何小鼠死亡(圖一A)。對照組免疫正常小鼠感染白色念珠菌都存活。顯示侵襲性念珠菌症與宿主免疫系統及白色念珠菌毒力(菌絲形成)有關,與臨床觀察結果符合。我們也比較了其他念珠菌感染指標包括體重、胃腸道念珠菌量及組織侵襲程度。體重減輕代表胃腸道黏膜受損及發炎,結果與死亡情形一致;只有免疫缺陷小鼠感染白色念珠菌野生株才有明顯體重下降,時間約在9~12天(圖一B)。而在胃腸道念珠菌量監測,免疫缺陷小鼠感染白色念珠菌野生株從第一天糞便中就有約  $10^5$  cfu/g 的菌量直到死亡為止(圖一C)。免疫缺陷小鼠感染突變株後第一天有約  $10^5$  cfu/g 的菌量,但快速減少到

第12天就完全測不到,顯示突變株毒力較弱無法致病,最後被免疫缺陷小鼠清除。而免疫正常小鼠,即使感染白色念珠菌野生株也一樣不發病,且到第12天就完全清除。組織侵襲及發炎程度是以胃腸道及肝腎等作組織培養或切片作PAS染色,結果顯示胃腸道有最多白色念珠菌的是免疫缺陷小鼠感染白色念珠菌野生株,而菌量最多的組織是胃。而在有些免疫缺陷小鼠的肝或腎組織培養也有少量白色念珠菌落產生,顯示有可能是透過血液過去,但菌量不多因切片未發現白色念珠菌,只看到有發炎細胞增加。而野生株感染免疫缺陷小鼠的胃組織切片下可看到有明顯白色念珠菌聚集在黏膜及胃上皮組織間,伴隨



圖一 白色念珠菌感染免疫缺陷小鼠後造成胃腸道殖生並引起侵襲性念珠菌症。

免疫缺陷小鼠 (RAG) 與免疫正常小鼠 (B6) 經口服管喂食  $1 \times 10^7$  cfu 白色念珠菌野生株 (SC5314) 或非致病突變株 (HLC54) 後,每 2~3 天監測體重及生命徵候(依動物福祉考量,體重下降超過 20%,視同死亡),死亡率 (A) 與體重變化情形 (B) 如圖所示。糞便經稱重後以無菌 PBS 緩衝溶液稀釋培養於 YPD 培養基 48 小時後計算念珠菌菌落 (cfu) 的數目,並以 cfu/g stool 表示 (C)。統計分析是以 2-way ANOVA 及 1-way ANOVA 分析:  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  及  $p < 0.001$  分別以 \*, \*\* 及 \*\*\* 代表。

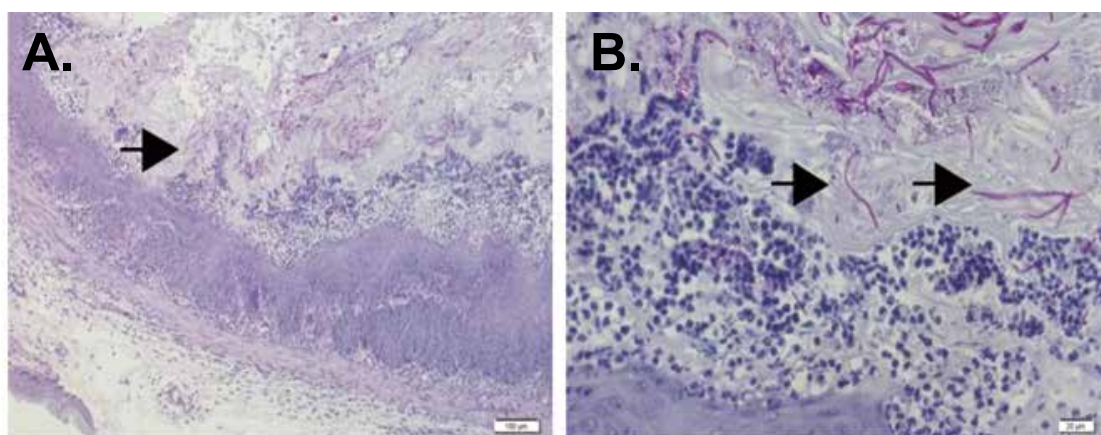
著大量嗜中性球發炎細胞聚集 (圖二 A&B)，顯示有明顯胃腸道侵襲的現象。相反的野生株白色念珠菌感染免疫正常小鼠胃組織切片，則沒有看到白色念珠菌或發炎細胞聚集。由上面實驗結果表示，發病小鼠體重明顯下降及肝腎培養出白色念珠菌，顯示有侵襲性念珠菌病的發生，與人類發病由胃腸道白色念珠菌引起侵襲性念珠菌病情形相同。

## 結 果

免疫缺陷小鼠 (RAG) 與免疫正常小鼠 (B6) 經口服管餵食  $1 \times 10^7$  cfu 白色念珠菌野生株 (SC5314) 或非致病突變株 (HLC54) 後，每 2~3 天監測體重及生命徵候 (依動物福祉考量，體重下降超過 20%，視同死亡)，死亡率 (A) 與體重變化情形

(B) 如圖所示。糞便經稱重後以無菌 PBS 緩衝溶液稀釋培養於 YPD 培養基 48 小時後計算念珠菌菌落 (cfu) 的數目，並以 cfu/g stool 表示 (C)。統計分析是以 2-way ANOVA 分析： $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  及  $p < 0.001$  分別以 \*, \*\* 及 \*\*\* 代表。

免疫缺陷小鼠與免疫正常小鼠經口服管餵食  $1 \times 10^7$  cfu 白色念珠菌野生株後，在感染後第 12 天犧牲小鼠，將胃部組織以福馬林固定進行染色或 PAS 染色，照片如圖所示。從圖 A 及 B 中，可以明顯看到免疫缺陷小鼠有發炎細胞聚集到胃部黏膜及黏膜下組織，同時也可看到白色念珠菌菌絲 (箭頭所示) 侵入到胃部黏膜。而免疫正常小鼠感染第 12 天後，胃組織並無發現白色念珠菌或發炎細胞聚集的情形。



圖二 白色念珠菌感染免疫缺陷小鼠後造成胃腸道黏膜破壞並引起發炎細胞浸潤。

免疫缺陷小鼠 (圖 A, B) 經口服管餵食  $1 \times 10^7$  cfu 白色念珠菌野生株後，在感染後第 12 天犧牲小鼠，將胃部組織以福馬林固定進行 PAS 染色 (圖 A&B)，顯微鏡低倍 (A; 100 倍) 及高倍 (B; 400 倍) 照片如圖所示。從圖 A 及 B 中，可以明顯看到免疫缺陷小鼠可看到白色念珠菌菌絲 (箭頭所示) 侵入到胃部黏膜 (A, B)。

## 討 論

過去研究指出，念珠菌感染病患引起的念珠菌血症，可能是腸胃道組織受到念珠菌的侵襲導致，但在黏膜感染念珠菌病的致病機轉仍不清楚。在體外實驗研究中發現，與 Th1 (IFN- $\gamma$ ，MIP-1 $\beta$ ) 功能亞群相比，白色念珠菌的特異性 CD4 T 細胞 Th17 亞群 (IL-17 和 IL-22) 對於念珠菌病有較強的抑制作用。最近的 HIV 病人白色念珠菌感染研究分析顯示，與 CMV 特異性 CD4 T 細胞相比，白色念珠菌特異性 CD4 T 細胞在體內更易感染 HIV 病毒，在 HIV 感染者體內，白色念珠菌的特異性 CD4 T 細胞會優先耗盡。這些數據表明，HIV 感染者早期失去對念珠菌感染免疫控制的潛在機制可能與黏膜念珠菌病有相關[15]。而我們的免疫缺陷小鼠動物模式正可以模擬 HIV 病人體內因缺乏 CD4 T 細胞所導致的念珠菌黏膜感染，並研究其致病機轉與可能的早期診斷標記。

## 致 謝

本篇研究是由科技部整合型專題計劃經費 (MOST 104-2314-B-400-025; 105-2314-B-400 -008 及 106-2314-B-400-004) 及國家衛生研究院內研究經費 (IV-106-PP-24) 支持。

## 參考文獻

1. Kaur H, Chakrabarti A: Strategies to reduce mortality in adult and neonatal candidemia in developing countries. *J. Fungi* 2017;3:41.
2. Chen YC, Chang SC, Luh KT, et al: Stable susceptibility of *Candida* blood isolates to fluconazole despite increasing use during the past 10 years. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:71-7.
3. Markogiannakis H, Pachylaki N, Samara E, et al: Infections in a surgical intensive care unit of a university hospital in Greece. *Int J Infect Dis* 2009;13:145-53.
4. Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ, Bow EJ, et al: Early treatment of candidemia in adults: A review. *Med Mycol* 2011;49:113-20.
5. Nucci M, Anaissie E: Revisiting the source of candidemia: skin or gut? *Clin Infect Dis* 2001;33:1959-67.
6. Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH, et al: Delaying the empiric treatment of *Candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:3640-5.
7. Lin MT, Lu HC, Chen WL, et al: Improving efficacy of antifungal therapy by polymerase chain reaction based strategy among febrile patients with neutropenia and cancer. *Clin Infect Dis* 2001;35:1621-27.
8. Tan BH, Chakrabarti A, Li RY, et al: Incidence and species distribution of candidaemia in Asia: A laboratory-based surveillance study. *Clin Microbiol Infect* 2015;21:946-53.
9. Chakrabarti A: Incidence, characteristics and outcome of ICU-acquired candidemia in India. *Intensive Care Med.* 2015;41:285-95.
10. Yapar N: Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther Clin Risk Manag* 2014;10:95-105.
11. Naglik JR, Fidel PL, Odds FC, et al: Animal models of mucosal *Candida* infection. *FEMS Microbiol lett* 2008;283:129-39.
12. Sifuentes-Osornio J, Corzo-León DE, Ponce-de-León LA, et al: Epidemiology of invasive fungal

- infection in Latin America. *Curr Fungal Infect Rep.* 2012;6:23-34.
13. Clemons KV, Gonzalez GM, Singh G, et al: Development of an orogastrointestinal mucosal model of candidiasis with dissemination to visceral organs. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:2650-7.
  14. Koh AY, Kohler JR, Coggshall KT, et al: Mucosal damage and neutropenia are required for *Candida albicans* dissemination. *PLoS Pathog* 2008;4:e35.
  15. Liu F, Fan X, Auclair S, et al: Sequential dysfunction and progressive depletion of *Candida albicans*-specific CD4 T cell response in HIV-1 infection. *PLoS Pathog* 2016;12:e1005663.