DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.06.032
第22卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 6
588 2000年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)06-0588-03

抗白念珠菌单抗的保护性研究

王 鲁,刁庆春,刘荣卿,钟白玉 (第三军医大学附属西南医院皮肤科 重庆,400038)

提 要:目的 证实抗白念珠菌保护性抗体存在,为保护机制以及保护性工程抗体的研究打下基础。方法 在实验动物模型中观察单抗影响白念珠菌感染动物存活时间、感染动物重要脏器的组织病理变化、相应组织中白念珠菌cfu等。结果 1B5、3E8这2株单抗能显著延长致死量白念珠菌感染小鼠存活时间,减少感染小鼠主要脏器组织中白念珠菌cfu,减轻相应组织的病理损害。结论 1B5和3E8皆是具有保护作用的抗白念珠菌胞壁外膜单克隆抗体。

关键词:白念珠菌;单克隆抗体;保护性抗体
中图法分类号:R379.4;R392.11 文献标识码:A

Protective study of the monoclonal antibodies against candida albicans

WANG Lu, DIAO Qing-chun, LIU Rong-qin, ZHONG Bai-yu (Department of Dematology, Southwest hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To confirm the existence of the protective antibody against candida albicans in systemic candidiasis. Methods Three strains of the monoclonal antibody (McAb) on the surface of cell wall of Candida albicans were generated. Results In the protective McAb screening experiment, it was found that McAb 1B5 and McAb 3E8 can prolong survival time, lower candida albicans' colony form unit (cfu) in the kidneys, liver and brain of mice infected with candida albicans and diminish the histopathologic lesions of experimental mice. Conclusions The two McAbs-1B5, 3E8 are the protective monoclonal antibody against antigens on the cell wall suface of candida albicans.

Key words: candida albicans; monoclonal antibody; protective antibody

目前,白念珠菌(以下简称白念)已成为医院感染中最常见的病原菌之一[1,2]。近来研究发现机体体液免疫在抗系统性念珠菌感染中发挥重要作用[3]。本研究将已制备的3株抗白念胞壁外膜成分单克隆抗体——1B5、3E8、4C7单抗[4],运用了系统性念珠菌病动物模型实验研究中,观察单抗对白念感染动物的保护作用。

1 材料与方法

1.1 菌种及实验动物

本科真菌室保存菌株——白念$_{19}$(白$_{19}$),重新培养、鉴定。BALB/C纯系小鼠由本校实验动物中心提供。

1.2 三株抗白念胞壁外膜单克隆抗体的制备及其1B5单抗的鉴定[4]

1.3 单抗对致死量白念感染小鼠存活时间的影响[5,6]

1.3.1 实验动物分组 8~10周龄BALB/C小鼠随机分成4组——1B5组、3E8组、4C7组和阴性对照组,每组10只小鼠。

1.3.2 腹水单抗预处理 参考徐志凯[7]方法。

1.3.3 实验步骤 4组小鼠经腹腔分别注入相应1B5、3E8、4C7腹水单抗和阴性腹水(不含单抗的SP 2/0腹水)各0.2 ml,4 h后每只小鼠经尾静脉注入白$_{19}$菌液0.1 ml(含白$_{19}$静止时相孢子10^7),间隔12 h观察小鼠存活情况,记录小鼠死亡时间。

1.4 单抗对半数致死量白念感染小鼠肾、肝、脑脏器的重量变化、组织病理以及相应组织中白念菌落形成单位(cfu)的影响[8]

1.4.1 实验动物分组 8~10周龄BALB/C小鼠随机分成3组——1B5组、3E8组和阴性对照组,每组10只小鼠。

1.4.2 腹水单抗预处理 同前述

1.4.3 实验步骤 3组小鼠经腹腔分别注入1B5、3E8腹水单抗和阴性腹水0.2 ml,4 h后经小鼠尾静脉注入白$_{19}$菌液(含白$_{19}$静止时相孢子5×10^6),48 h后小鼠脱颈处死,无菌条件下摘取各组小鼠肾、肝、脑脏器并称重,一半脏器组织放入Bouin's液固定,做组织病理学检查(HE染色,PAS染色),另一半用以

作者简介:王 鲁(1963—),男,山东省莱阳市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事医学真菌学方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68754000—73080

收稿日期:1999-08-19;修回日期:2000-03-24

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

测定相应组织中白念 cfu。

1.5　统计学处理

非连续性数据资料采用非参数秩和检验; 连续性数据资料采用单因素方差分析。

2　结果

2.1　单抗对致死量白念感染小鼠的存活时间的影响

2 单组注射组-1B5 组和 3E8 组小鼠的存活时间显著长于阴性对照组小鼠的存活时间; 4C7 组小鼠的存活时间与阴性对照组无显著差异, 见表 1。

表 1　致死量白念感染小鼠存活时间($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Survival time of mice infected with lethal dose of candida albicans($\bar{x}\pm s$)

Groups	(t/d)	n
1B5	9.3±1.6 **	10
3E8	8.8±1.3 **	10
4C7	4.5±0.7 *	10
Control	4.4±0.7	10

*: $P>0.05$ *vs* control; **: $P<0.01$ *vs* control

2.2　单抗对半数致死量白念感染小鼠肾、肝、脑组织中白念 cfu 的影响

1B5 和 3E8 组小鼠肾、肝组织中白念 cfu 显著低于阴性对照组, 1B5 和 3E8 组小鼠脑中白念 cfu 为 0, 而对照组中脑组织白念 cfu 为$(14.36\pm3.75)\times10^3$/g, 见表 2。

表 2　半数致死量白念感染小鼠肾、肝、脑中的白念 cfu($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Tab 2　Candida albicans cfu in the kidneys, liver and brain of mice infected with half lethal dose of candida albicans($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Groups	($\times10^3$/g)		
	Kindey	Liver	Brain
1B5	99.69±11.927 *	12.21±1.818 *	0
3E8	170.85±16.643 *	12.83±1.575 *	0
Control	859.41±62.185	93.11±8.692	14.36±3.751

*: $P<0.01$ *vs* control

2.3　单抗影响半数致死量白念感染小鼠肾、肝、脑组织病理变化

1B5、3E8 组 20 只小鼠中有 4 只小鼠肾脏和 1 只小鼠肝脏普通病理切片发现有 1~2 处轻度炎性细胞聚集, PAS 染色未见白念孢子和菌丝, 其余小鼠肾、肝、脑组织中未见明显病理学改变。阴性对照组中所有小鼠肾、肝、脑组织皆有明显组织病理学改变, 三种组织中皆可见到较多灶性炎症细胞浸润灶, PAS 染色发现肾脏炎性浸润灶中有大量的白念孢子、菌丝; 各脏器损害严重程度依次为: 肾> 肝> 脑。

2.4　单抗对半数致死量白念感染小鼠肾、脑脏器的重量变化影响

1B5 和 3E8 组小鼠肾、肝、脑脏器重量显著低于阴性对照组中小鼠肾、肝、脑脏器的重量, 见表 3。

表 3　半数致死量白念感染小鼠肾、肝、脑脏器的重量(g, $\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Tab 3　Weight of the kidneys, liver, brain of mice infected with half lethal dose of candida albicans(g, $\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Groups	Kidney	Liver	Brain
1B5	0.246±0.0.0165 *	0.82 ±0.0283 *	0.249±0.0195 *
3E8	0.234±0.0.0151 *	0.811±0.0145 *	0.28 ±0.0137 *
Control	0.282±0.0.0148	0.924±0.0158	0.435±0.0196

*: $P<0.01$ *vs* control

3　讨论

80 年代中末期以来, Matthews 等[9] 发现抗白念珠菌 HSP 90 亚单位(分子量约 47×10^3)抗原的抗体与系统性念珠菌病的转归有关, 这种抗体能延长白念感染小鼠的存活时间。Han 等提供了抗白念保护性抗体免疫存在的有力证据, 单抗-MAbB6.1 能保护免疫功能正常小鼠和联合免疫缺陷小鼠抵抗白念的攻击, 延长小鼠存活时间, 减少感染小鼠肾、肝组织中白念 cfu[8, 11]。抗白念粘附素受体 iC3b 抗体能阻断白念对人真皮微血管内皮细胞的粘附, 动物实验中该单抗具有保护作用[12]。

针对抗体保护性研究, 取决于以下三个实验结果: ①抗体能否延长致死量白念感染小鼠的存活时间; ②抗体能否减少白念感染小鼠重要脏器组织中白念 cfu; ③抗体能否减轻感染小鼠主要脏器组织的病理损害。本文通过单抗影响致死量白念珠菌感染小鼠存活时间实验筛选得到 2 株能延长致死量白念感染小鼠存活时间的抗白念胞型外膜成分单抗——1B5 和 3E8。再将单抗-1B5、3E8 进行其它保护性实验研究, 结果表明 1B5 和 3E8 单抗皆能显著降低半数致死量白念感染小鼠肾肝组织有白念 cfu。这里应特别指出, 2 株单抗注射组中小鼠脑组织内白念 cfu 为"0", 并非表明这 2 株单抗能完全阻止白念对小鼠脑组织的侵袭, 客观的解释是单抗 1B5、3E8 既能降低感染小鼠肾、肝组织中白念 cfu, 同样也能减少脑组织中白念 cfu, 只是我们在检测该项指标时对接种物稀释过量, 导致单抗组小鼠脑

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

组织中白念 cfu 检测结果“阴性”。在感染小鼠重要脏器组织病理变化检测中，1B5 和 3E8 这 2 株单抗能显著减轻白念珠菌所致感染小鼠肾、肝、脑等主要脏器的组织病理损害。故而，我们从定量病原菌角度得出 1B5 和 3E8 2 株单抗皆能降低白念感染小鼠肾、肝、脑等重要脏器组织中白念感染数目，明显改善由白念感染所致小鼠肾、肝、脑等主要脏器的病理损害。另外，我们还发现 1B5、3E8 2 株单抗能减少白念感染小鼠肾、肝、脑脏器组织的重量变化，推测这可能是单抗减轻感染小鼠主要脏器炎性水肿的结果。

在检测感染小鼠重要器官组织中白念 cfu 时，不论是阴性对照组中的肾、肝、脑，还是单抗注射组中肾、肝脏器，尽管各组以及因组织不同而白念 cfu 检测值不同，但皆有白念 cfu 阳性检出结果，而在相应组织病理学检查中，仅有阴性对照组中肾组织 PAS 染色发现白念孢子和菌丝，而阴性对照组的肝、脑组织以及单抗注射组的肾、肝、脑组织切片 PAS 染色均未发现孢子和菌丝，在这一点，我们也认为在保护性抗体筛选实验中，检测真菌 cfu 的敏感性要比检查相应组织病理学改变强[12]。

因此，通过抗白念珠菌单抗保护性实验，我们可以得出以下结论：2 株抗白念珠菌胞壁外膜成份单克隆抗体 1B5 和 3E8，皆能减少白念珠菌感染小鼠主要脏器组织中白念珠菌感染数目，减轻相应组织的病理损害，延长致死量白念珠菌感染小鼠的存活时间。故而，3E8 和 1B5 皆是具有保护作用的抗白念珠菌胞壁外膜成分的单克隆抗体。

参考文献：

[1] Jarvis W R. Epidemiology of nosocomial fungal infection with emphasis on candida species[J]. Clin Infect Dis, 1995, 20(4): 1 526—1 530.

[2] Voss A, Le-Noble J, Verdugn F, *et al*. Candidemia in intensive care unit patients risk factor for mortality[J]. Infection, 1997, 25(1): 8—11.

[3] Matthews R C. Pathogenicity determinants of candida albicans: potential targets for immunotherapy[J]. Microbiology, 1994, 140(8): 1 505—1 511.

[4] 王 鲁，刁庆春，刘荣卿，等. 三株抗白念珠菌单克隆抗体的制备与鉴定[J]. 第三军医大学学报，2000，22(1)：97—98.

[5] Mukherjee J, Scharff M, Cryptococcus neaformans infection can elicit protective antibodies in mice[J]. Can J Microbiol, 1994, 40(4): 888—892.

[6] Allendoerfer R, Magee D, Smith J, *et al*. Induction of tumor necrosis factor-alpha in murine candida albicans infection[J]. J Infect Dis, 1993, 167(5): 1 168—1 172.

[7] 徐志恺. 实用单克隆抗体技术[M]. 西安：科学技术出版社，1992. 1—142.

[8] Han Y, Culter J. Antibody response that protects against disseminated candidiasis[J]. Infect Immun, 1995, 63(7): 2 714—2 719.

[9] Matthews R C, Hodgetts S, Burnie J. Preliminary assessement of a human recombinant antibody fragment to hsp90 in murine invasive candidiasis[J]. J Infect Dis, 1995, 171(6): 1 668—1 671.

[10] Han Y, Kanbe T, Cherniak R, *et al*. Biochemical cheracterization of candida albicans epitopes that can elicit protective and nonprotective antibodies[J]. Infect Immun, 1997, 65(10): 4 100—4 107.

[11] Lee K H, Yoon M S, Chun W H. The effects of monoclonal antibodies against iC3b receptors in mice with experimentally induced disseminated candidiasis[J]. Immunology, 1997, 92(1): 104—110.

[12] Mwkherjee J, Scharff M, Casadevall A. Variable efficiency of passive antibody administration against diverse cryptococcus neaformans strains[J]. Infect Immun, 1995, 63(8): 3 353—3 359.

（编辑 刘 鹏）

（上接 584 页）

往往依赖于高速或超速冷冻离心机，且操作步骤繁锁，一般实验室难以满足实验条件[2]。本文介绍一种简单、有效的小分子量 DNA 沉淀方法-$ZnCl_2$ 沉淀法，具体操作步骤如下：① 准确测量 DNA 样品的体积；②加入 0.05 倍 DNA 样品体积的 1 mol/L Tris·HCl(pH7.0)及 0.01 倍 DNA 样品体积的 10 mmol/L EDTA(pH 8.0)，混匀；③加入 0.01 倍 DNA 样品体积的 10 mmol/L 磷酸纳缓冲液(pH 7.0)，混匀；④ 加入 0.025 倍 DNA 样品体积的 0.1 mol/L $ZnCl_2$(pH 3.0)，混匀；⑤室温放置 30 min；⑥12 000 r/min，室温，离心 15 min；⑦小心移去上清；⑧70% 乙醇漂洗沉淀，12 000 r/min，离心 5 min，弃上清；⑨重复步骤(8)1 次；⑩待乙醇挥发完全后，将样品溶于一定体积的 TE(pH 8.0)中，备用。

该方法无需特殊仪器、试剂，操作简单、迅速。沉淀效果好，样品 DNA 浓度下限可达 0.1 μg/ml。

关键词：DNA；沉淀法
中图法分类号：R342.3 文献标识码：B

参考文献：

[1] Ausubel F M, Roger Brent, King Ston R, *et al*. Short Protocouls in Molecular Biology[M]. Boston: John Wiley of Sons Inc, 1995. 3, 31, 33, 35.

[2] Eduard K. DNA Extraction by Zinc[J]. Nucleic Acuds Res, 1997, 25(10): 1 870—1 871.

（编辑 陈聪莲）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net