

潜伏性结核分枝杆菌感染动物模型

Animal models of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection

王应辉(WANG Ying-hui)^{1,2}, 王洪海(WANG Hong-hai)², 曹健(CAO Jian)^{1,3} 综述 张雪莲(ZHANG Xue-lian)² 审校

(1 河南工业大学生物工程学院, 河南 郑州 450001; 2 复旦大学生命科学学院遗传学研究所遗传工程国家重点实验室, 上海 200433; 3 中原工学院, 河南 郑州 450007)

(1 College of Bioengineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China; 2 Institute of Genetics, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China; 3 Zhongyuan University of Technology, Zhengzhou 450007, China)

[关键词] 结核; 结核分枝杆菌; 潜伏感染; 动物模型

[中图分类号] R378.91+1 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9638(2011)04-0312-04

全球 1/3 的人口感染结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB), 其中大部分为潜伏感染^[1]。研究人员对 MTB 潜伏感染的关注度日益增高。笔者针对当前研究 MTB 潜伏感染所使用的各种动物模型进行综述, 分析包括小鼠、豚鼠、兔以及非人灵长类的动物模型优势和局限性, 以期研究人员正确选择合适的 MTB 潜伏感染动物模型以及深入开展潜伏感染的研究提供帮助。

结核病(tuberculosis, TB)是世界上感染率和发病率较高的传染病之一, 其病原菌为 MTB。2009 年, 有 940 万人感染 TB, 全球已感染人数达 1 400 万, 130 万人死于 TB^[1]。我国卫生部 2011 年数据显示, 2010 年, 尽管发病率和死亡率比 2009 年有所下降, 但全国 TB 发病人数仍近 100 万之多。潜伏性 MTB 感染被定义为 MTB 复合群感染后的一种亚临床状态, 无临床症状、无细菌学依据、无放射检查征象、PPD 皮试或 T-spot 阳性^[2-3]。数量庞大的潜伏感染人群已经成为降低 MTB 感染率和发病率的一个主要障碍之一。尽管 TB 已被广泛认识, 但对于其潜伏性感染的深入研究还相当少, 缺少准确的潜伏性感染动物模型就是其中的原因之一。而对潜伏期 MTB 生物学特征认识的不足, 又进一步制约了潜伏性 MTB 感染动物模型的建立。

尽管存在诸多困难, 研究人员还是建立了一些

能够模拟 MTB 潜伏感染某些特征动物模型, 包括小鼠、豚鼠、兔以及猴等。这些为研究 MTB 的潜伏感染、TB 再复发的发病机制、抗结核药物临床前的实验评价、候选疫苗以及诊断试剂的筛选等提供了有用的模型。

1 潜伏性 MTB 感染的小鼠模型

1.1 低菌量模型 用 5~10 CFU MTB H37Rv 通过呼吸道感染小鼠, 在 3 个月内, 小鼠肺部 MTB 达到 $10^3 \sim 10^4$ CFU 并维持稳定达数月之久^[4-5]。这种模型由于只依赖宿主本身的免疫反应来控制感染从而达到潜伏态, 因此它在模拟人潜伏感染时就具备优势, 但其缺点是潜伏感染时组织带菌量非常高 ($1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ CFU), 可以导致小鼠最终死于 TB, 这可能大大高于人潜伏感染时的带菌量。

1.2 Cornell 模型及 3 种改进法 1952 年康奈尔大学 McCune 和同事研发的 Cornell 模型^[6-7] 由于能够较好地模拟人潜伏感染时带菌量很低、成本较低等特征, 已被多家实验室使用。主要用于检测药物治疗、疫苗和潜伏态免疫学以及潜伏性 TB 的细菌学研究。成功建立 Cornell 模型所使用的小鼠、药物、感染剂量以及治疗方法等都可以有所不同。Repique 等^[8] 用 10^4 CFU MTB H37Rv 菌株皮下感

[收稿日期] 2010-12-29

[基金项目] 国家“八六三”高技术研究发展计划资助项目(2007AA02Z316)
国家“十一五”重大传染病计划资助项目(2008ZX10003006-2)
国家自然科学基金项目(30901828)

[作者简介] 王应辉(1984-), 男(汉族), 河南省郑州市人, 研究生, 主要从事微生物学研究。

[通讯作者] 张雪莲 E-mail: xuelianzhang@fudan.edu.cn

染小鼠 4 周后,通过含有 85 μg /L 异烟肼(isonicotinic acid hydrazide, INH)和 50 μg /L 利福平(ri-fampin, RIF)的饮用水来处理小鼠 12 周,此时肺和脾的组织匀浆的 CFU 计数几乎为 0。Miyazaki 等^[9]用 3.95×10^6 CFU MTB CDC1551 有毒株感染杂交系雌性小鼠,当日按饮食中浓度约 0.13% INH 和 0.50% 吡嗪酰胺(alidnamide, PZA)饲喂小鼠,连续处理 12 周,最终药物用量达到每 kg 体重 25 mg INH, 1 000 mg PZA。接下来 4 周停止用药处理,此时小鼠体内组织匀浆检测 MTB 为阴性。

1999 年,Scanqa 等^[10]建立了 3 种 Cornell 模型的改进型,该改进型模型根据接种量、药物剂量、治疗时间以及停药时间等不同条件而建立,详见表 1。改进型 A:用 5×10^3 CFU MTB Erdman 菌株经静

脉感染小鼠,4 周后再用 INH(0.10 g/L)和 PZA (15 g/L)治疗 4 周,小鼠脾和肺部的菌量可降至很低水平;2 周后再用干扰素(IFN)- γ 中和剂和免疫抑制剂处理小鼠 3 个月左右,小鼠肺部的菌量增加可以超过 750 倍和 1 000 倍。改进型 B:用 5×10^3 CFU MTB Erdman 菌株经静脉感染小鼠,4 周后再用 INH(0.10 g/L)和 PZA (15 g/L)治疗 12 周,8 周后用多种免疫抑制剂处理小鼠,处理后 4~7 个月,小鼠脾和肺部也只能检测到较低的菌量。改进型 C:用 1×10^5 CFU MTB Erdman 菌株经静脉感染小鼠 4 周,用 INH(0.10 g/L)和 PZA(8 g/L)治疗 12 周,11 周后用肿瘤坏死因子(TNF)- α 抗体处理小鼠,3 个月后小鼠脾和肺部有活菌存在,4 个月后又出现重激活。

表 1 Cornell 模型及其改进型总结

模型	接种量(CFU)	感染时间 ^a	药物浓度 ^b	治疗时间	治疗后间歇期
Cornell 模型	1×10^6 3×10^6	20 min	INH(0.12%) PZA(2.00%)	12 周	时间长短不同
改进型 A	5×10^3	4 周	INH(0.10 g/L) PZA(15 g/L)	4 周	2 周
改进型 B	5×10^3	4 周	INH(0.10 g/L) PZA(15 g/L)	12 周	8 周
改进型 C	1×10^5	4 周	INH(0.10 g/L) PZA(8 g/L)	12 周	11 周

a:用药物治疗之前

b:在 Cornell 模型中,药物通过食物服用;在改进型中,药物通过饮水服用

比较 Cornell 模型及其 3 种改进型,主要是在感染细菌数量、开始使用药物治疗以及治疗时间方面的不同。该类模型在通过药物治疗后,都能够使小鼠带菌量达到很低水平并维持数周,这较好地模拟了人潜伏感染的情况。但 Cornell 模型实验结果高度依赖于建立潜伏态的实际操作参数,而且,即使同一实验室使用相同的条件,也只能出现 0%^[8]~70%^[11]不同的重现率。而 3 种改进型模型可减少实验参数对模型的影响,这对于大规模使用这一模型的研究人员而言很重要。

2 豚鼠模型

尽管豚鼠被认为是非常好的 TB 动物模型之一,但几乎没有人用此模型研究潜伏性 MTB 感染。Kashino 等^[12]用 10^7 CFU MTB 链霉素营养缺陷型菌株 18b 感染豚鼠,并在感染前 2 h 皮下注射 20 mg 链霉素,使 MTB 在豚鼠体内生长,此后 3 周每天注射链霉素,停止使用链霉素后,就建立了潜伏

态。6 个月后,豚鼠脾和肺部的菌量降至 100 CFU 以下。在感染期间,豚鼠的体重在 28 周内稳定增加 2 倍且未表现出任何发病的临床症状,豚鼠的肺、脾与肝脏的组织病理学模拟了人结核肿块;来自感染豚鼠的外周血单核细胞与 PPD 有强烈反应,对感染豚鼠进行结核菌素皮试,结果显示强阳性。

相比小鼠模型,豚鼠的肺部感染能够产生典型的肉芽肿结构,内部充满坏死和正在分解的细胞^[13],这与人所患 TB 极其相似。因此,豚鼠潜伏感染模型的使用将可以成为人类 MTB 潜伏感染研究的重要工具。该模型的不足之处在于豚鼠对 MTB 高度敏感,低菌量就足以使其发生进行性 MTB 感染甚至死亡。

3 兔模型

Manabe 等^[14-15]通过含有 MTB H37Rv 的气雾感染兔子,感染剂量为 $10^4 \sim 10^6$ CFU,5 周后所有兔子肺部的带菌量达到最高,右上肺叶菌量达到

$2.07 \times 10^3 \sim 2.8 \times 10^4$ CFU, 36 周后 1/3 的兔子体内产生至少 1 个含有活菌的干酪样肉芽肿。若感染 5 周后用皮质类固醇进行免疫抑制,可引起 MTB 的重激活,其中 72% 的兔子右上部肺叶匀浆液经培养后呈阳性,而对照组均呈阴性。Lurie 等^[16]首先提出,近交兔对 MTB 具有较强抵抗力,感染兔的肺部菌量在 4 周后达到峰值,但 4 个月后所有兔子全肺匀浆培养呈阴性。然而在 6 个月后,兔肺组织匀浆培养开始出现少量菌落,这表明肺组织内少部分 MTB 呈现持留态。这种模型的特征是可以使感染动物体内的菌体处于持留态,其带菌量极低,并在免疫力受到抑制时出现重激活。同时,兔模型还可以较好地模拟类似人的干酪样坏死。因此,这种模型对研究药物的抗持留分枝杆菌的功效具有巨大的吸引力。该模型中远交兔与近交兔对 MTB 的抗性和敏感性有很大不同^[17];远交兔对 MTB 的抗性和敏感性个体差异较大,而近交兔难以获得。

4 非人灵长类动物模型

使用非人灵长类动物作为 TB 模型已有很长历史,但由于多种原因,猴子模型在过去 30 年很少被应用。Walsh 等 1996 年证实^[18],低剂量 MTB 感染短尾猴并不一定引起致命性 TB,这就暗示短尾猴可能成为人类 TB 的最佳模型。随着市场上出现各种可用于短尾猴模型的免疫的出现,猴子模型首先被应用于获得性免疫缺陷综合征(AIDS)研究。近年来,开始有人利用短尾猴来研究 TB,这种模型无疑昂贵而稀缺,但只有它能够重现人类潜伏性 TB 的临床特征^[19]。当用低剂量 MTB 感染时,有将近一半的短尾猕猴能够存活 3 年,这段时间内猴子的胸透显影无症状,也没有临床症状,但结核菌素皮试呈阳性,这与人潜伏性感染很相似。此模型还可用于检测抗结核药物治疗潜伏性 TB 的功效。利用此模型和条件性基因沉默技术^[20]可以建立首个用于验证治疗潜伏性 TB 药物靶标的实验策略^[21]。

Capuano 等^[19]以不超过 25 CFU MTB Erdman 菌株经支气管镜感染短尾猕猴肺部,结核菌素皮试和对抗原免疫反应结果显示所有猴子感染成功。在感染 0.5~2 个月后,胸透结果显示 64% 的猴子出现明显感染或疾病症状;15~20 个月后,将近 40% 的猴子没有任何症状,这与人潜伏性 TB 的临床特征一样。低剂量感染短尾猕猴模型可能能够模拟所有种类的人类 MTB 感染,这是研究潜伏性 MTB 感

染病理学和免疫学最好的模型。

5 结论与展望

综合分析各种动物模型,小鼠是目前 TB 研究中最实用、应用最广泛的模型,但不能表现出典型的结核肉芽肿和肺部空洞;豚鼠能产生肉芽肿且可以发生针对 TB 的迟发性变态反应;兔模型也能产生肉芽肿及肺部空洞,感染 MTB 的兔子所出现的皮肤超敏反应可以精确地复制出人体感染后的皮肤反应^[22],但针对建立此种模型的药物及动物纯种系较难获得;猕猴模型是唯一能够重现人潜伏性 TB 临床特点的动物,但猴子易出现自发重激活,且数量稀少、价格昂贵。

尽管目前各种 MTB 潜伏性感染的动物模型建立受到诸多因素的影响,在模拟人潜伏性 MTB 感染特征上都存在一定缺陷,仍需进一步改进和建立新的 MTB 潜伏感染动物模型。但是,这些模型依然都能够模拟一些人类潜伏性 MTB 感染的特征,而且不同的模型都具有各自的优势,这为研究 MTB 潜伏性感染的发病机制和治疗药物提供了有用的工具。

[参考文献]

- [1] World Health Organization. The global plan to stop TB 2011 - 2015 [R]. Johannes-burg, 2010: 1 - 10.
- [2] Orme I M. A mouse model of the recrudescence of latent tuberculosis in the elderly[J]. Am Rev Respir Dis, 1988, 137 (3): 716 - 718.
- [3] Kim S H, Lee S O, Par I A, et al. Diagnostic usefulness of a T cell-based assay for latent tuberculosis infection in kidney transplant candidates before transplantation[J]. Transpl Infect Dis, 2010, 12(2): 113 - 119.
- [4] Flynn J L, Scanga C A, Tanaka K E, et al. Effects of aminoguanidine on latent murine tuberculosis[J]. J Immunol, 1998, 160(4): 1796 - 1803.
- [5] 黎友伦, 王国治, 罗永艾. 结核分枝杆菌潜伏感染动物模型及评价[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2005, 8(8): 552 - 554.
- [6] McCune R M, Feldmann F M, Lambert H P, et al. Microbial persistence I. The capacity of tubercle bacilli to survive sterilization in mouse tissues[J]. J Exp Med, 1966, 123(3): 445 - 468.
- [7] McCune R M, McDermott W, Tompsett R, et al. The fate of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse tissues as determined by the microbial enumeration technique II. The conversion of tuberculous infection to the latent state by the administration of pyrazinamide and a companion drug[J]. Exp Med, 1956, 104 (5): 763 - 802.

- [8] Repique C J, Li A, Collins F M, *et al.* DNA immunization in a mouse model of latent tuberculosis: effect of DNA vaccination on reactivation of disease and on reinfection with a secondary challenge[J]. *Infect Immun*, 2002, 70(7): 3318 - 3323.
- [9] Miyazaki E, Chaisson R E, Bishai W R. Analysis of rifampin for preventive therapy in the Cornell mouse model of latent tuberculosis[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43(9):2126 - 2130.
- [10] Scanca C A, Mohan V P, Joseph H, *et al.* Reactivation of latent tuberculosis: variations on the Cornell murine model[J]. *Infect Immun*, 1999, 67(9):4531 - 4538.
- [11] Dhillona J, Mitchison D A. Effect of vaccines in a murine model of dormant tuberculosis[J]. *Tuber Lung Dis*, 1994, 75(1): 61 - 64.
- [12] Kashino S S, Napolitano D R, Skobe Z, *et al.* Guinea pig model of *Mycobacterium tuberculosis* latent/dormant infection [J]. *Microbes and Infect*, 2008, 10(14 - 15):1469 - 1476.
- [13] Turner O C, Basaraba R J, Orme I M. Immunopathogenesis of pulmonary granulomas in the guinea pig after infection with *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Infect Immun*, 2003, 71(2): 864 - 871.
- [14] Manabe Y C, Kesavan A K, Lopez-Molina J, *et al.* The aerosol rabbit model of TB latency, reactivation and immune reconstitution inflammatory syndrome[J]. *Tuberculosis*, 2008, 88(3): 187 - 196.
- [15] Manabe Y C, Dannenberg A M Jr, Tyagi S K, *et al.* Different strains of *Mycobacterium tuberculosis* cause various spectrums of disease in the rabbit model of tuberculosis[J]. *Infect Immun*, 2003, 71(10):6004 - 6011.
- [16] Lurie M B, Dannenberg A M. Macrophage function in infectious disease with inbred rabbits[J]. *Bacteriol Rev*, 1965, 29(4):466 - 476.
- [17] Gupta U D, Katoch V M. Animal models of tuberculosis[J]. *Tuberculosis*, 2005, 85(5 - 6):277 - 293.
- [18] Walsh G P, Tan E V, Dela Cruz E C, *et al.* The Philippine cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) provides a new non-human primate model of tuberculosis that resembles human disease[J]. *Nat Med*, 1996, 2(4):430 - 436.
- [19] Capuano S V, Croix D A, Pawar S, *et al.* Experimental *Mycobacterium tuberculosis* infection of cynomolgus macaques closely resembles the various manifestations of human *M. tuberculosis* infection[J]. *Infect Immun*, 2003, 71(10): 5831 - 5844.
- [20] Gandotra S, Schnappinger D, Monteleone M, *et al.* In vivo gene silencing identifies the *Mycobacterium tuberculosis* proteasome as essential for the bacteria to persist in mice[J]. *Nat Med*, 2007, 13(2):1515 - 1520.
- [21] Barry C E, Boshoff H I, Dartois V, *et al.* The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7(12):845 - 855.
- [22] 刘芳, 杨华, 周文江, 等. 结核分枝杆菌动物模型及其应用[J]. *实验动物与比较医学*, 2009, 12(6):429 - 433.

(上接第 311 页)

结合病史需进行 HIV 抗体检查, 若为阳性, 则需考虑特殊菌感染, 尽快完善相关病原学检查。对于高度疑似的患者要注意与结核病、隐球菌病及组织胞浆菌病等进行鉴别。

对于马尔尼菲青霉菌感染的治疗, 建议使用两性霉素 B 和伊曲康唑代替氟康唑, 因已有文献多次报道该菌对氟康唑不敏感或易产生抗药性, 治疗后易复发^[6]。据泰国治疗大量 AIDS 合并马尔尼菲青霉菌病的经验报道^[7], 该病最有效的治疗药物是两性霉素 B 和伊曲康唑。完成治疗后口服伊曲康唑 (200 mg/d) 维持治疗, 预防复发^[8], 直至经过 HAART 后患者 CD4 + T 淋巴细胞计数达到 100/ μ L 以上且持续 6 个月以上方可中止维持治疗^[9]。本例病例因及早启动 HAART, 有助于患者免疫功能的恢复, 同时给予强有力的抗真菌治疗是其病情得以快速控制的主要原因。

[参 考 文 献]

- [1] 陈灏珠, 林果为. 实用内科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009:668 - 669.
- [2] Cooper C R Jr, Haycocks N G. *Penicillium marneffeii*: an insurgent species among the penicillia[J]. *J Eukaryot Microbiol*, 2000, 47(1): 24 - 28.
- [3] 康来仪, 潘孝彰. 艾滋病防治学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2008:116.
- [4] 秦启贤. 临床真菌学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2001:287 - 294.
- [5] 李希青, 席丽艳, 鲁长明, 等. 艾滋病合并马尔尼菲青霉菌病 11 例临床分析[J]. *中华皮肤科杂志*, 2006, 39(8):436 - 438.
- [6] Deng Z L, Ma Y. Disseminated *Penicilliosis marneffeii* complicated with osteolytic lesions[J]. *J Mycol Med*, 1995, 5(3):44 - 49.
- [7] Duong T A. Infection due to *Penicillium marneffeii*, an emerging pathogen: review of 155 reported cases[J]. *Clin Infect Dis*, 1996, 23(1):125 - 130.
- [8] 邓卓霖, 刘新民. 艾滋病合并马尔尼菲青霉菌感染一例[J]. *中华内科杂志*, 2000, 39(5):348.
- [9] 沈银忠, 卢洪洲, 张仁芳, 等. 艾滋病合并马尔尼菲青霉菌感染一例[J]. *中华传染病杂志*, 2010, 28(2):126.