

rhG-CSF和氟康唑联合应用对粒细胞减少小鼠 念珠菌肺感染的疗效^①

张扣兴^② 唐英春 张天托 饶宪 毕筱刚

(中山医科大学附属第三医院呼吸内科; 广州, 510630)

摘要 为了研究人类重组粒细胞集落刺激因子 (rhG-CSF) 对中性粒细胞减少小鼠白色念珠菌肺感染的预防和治疗作用, 腹腔注射环磷酰胺的小鼠被分成 4 组: ① 对照组, 气管内注射白色念珠菌; ② 感染前皮下注射 rhG-CSF; ③ 感染后 12h 腹腔注射氟康唑; ④ rhG-CSF 和氟康唑联合应用。结果显示注射白色念珠菌前 4d, 皮下注射 rhG-CSF $100\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 对中性粒细胞减少合并白色念珠菌肺感染小鼠有明显的保护作用; 白色念珠菌感染后 24h, 肺内中性粒细胞数较对照组明显增多; rhG-CSF 和氟康唑联合应用较单独应用疗效好。

关键词 中性粒细胞减少 药物治疗; 白色念珠菌病 药物治疗; 粒细胞集落刺激因子 治疗应用; 氟康唑 / 治疗应用; 药物治疗, 联合

中图分类号 R 519.3

免疫功能低下是导致病人易患侵袭性真菌感染的主要因素, 白色念珠菌是引起全身性真菌感染最主要的致病菌之一, 以肺部感染最为常见, 是病人致死的主要原因之一^[1]。虽然抗真菌药越来越多, 但临床上粒细胞减少时效果较差。粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 可以通过刺激中性粒细胞的生长, 增强机体的免疫功能^[2]。为此, 我们以白色念珠菌肺感染的中性粒细胞减少小鼠作为病理模型, 观察重组人类粒细胞集落刺激因子 (rhG-CSF) 与抗真菌药并用的疗效。

1 材料和方法

1.1 菌株

白色念珠菌为临床分离株, 在 0.3% 低糖浸膏培养基中经 18h 震荡培养后, 用生理盐水洗涤 2 次, 调整菌液浓度至 $\times 10^6\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 备用。并对其毒力进行测定, 此白色念珠菌对小白鼠的半致死量 (LD_{50}) 为 $2 \times 10^6\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

1.2 白色念珠菌肺感染动物模型的制作

按 Polak-Wyss^[3] 的方法并稍作修改, 简述如下: 给 7 周龄的雄性 SPF Balb/c 小鼠腹腔内注射环磷酰胺 ($200\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。实验证实注射环磷酰胺后 4d 嗜中性粒细胞数最低, 故实验小鼠在注射环磷酰胺

后 4d, 经戊巴比妥麻醉后, 从气管给小鼠注射 $50\mu\text{L}$ 的白色念珠菌悬液 ($5 \times 10^6\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$)。为了防止其他细菌的感染, 在接种白色念珠菌前 1d, 每天给小鼠腹腔内注射亚胺硫霉素-西拉司丁钠 (Imipenem/Cilastatin Sodium, IPM/CS) $200\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (日本万有制药), 连续 3d。用这一模型观察 rhG-CSF 和抗真菌药 (氟康唑) 的疗效, 用药时间均为 5d。

1.3 实验用药物

rhG-CSF (日本中外制药), 分别采用 ① 3 种剂量 $1\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, $10\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $100\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 从气管接种白色念珠菌前 4d 开始连续皮下注射; ② 在接种白色念珠菌前 4d、2d 和当天开始连续皮下注射 rhG-CSF, 剂量为 $100\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$; ③ 在接种白色念珠菌前 4d 开始连续皮下注射 rhG-CSF, 剂量为 $100\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 并和氟康唑并用。

氟康唑 (Fluconazole, FCZ) (辉瑞制药厂), 从接种白色念珠菌后 12h 开始连续腹腔内注射, 采用 3 种剂量, 分别为 $10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 和 $50\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。

1.4 实验组和对照组的病理学检查

注射 rhG-CSF ($100\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) 小白鼠和对照组 (注射生理盐水) 小鼠, 分别在接种白色念珠菌后 6h、12h、24h、36h、48h 和 72h 经乙醚麻醉后腋静脉放血, 每次每组处死 2 只, 在无菌条件下迅速取出

① 日本琉球大学医学部资助课题; ② 第一作者, 1962 年出生, 男, 硕士, 讲师

两肺,死亡小鼠则随时取出两肺,用10%福尔马林液固定,石蜡包埋,组织切片用HE和PAS染色,光镜下观察。

1.5 末梢血中性粒细胞测定

对照组为皮下注射生理盐水,实验组为皮下注射rhG-CSF($100\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),均在注射环磷酰胺后1h开始。每天从小鼠尾静脉采血,每天 $200\mu\text{L}$,用血细胞计数器进行计数,同时涂片进行分类。

1.6 统计学处理

中性粒细胞数($\bar{x}\pm s$)用 t 检验进行比较;生存率比较用 i^2 检验。

2 结果

2.1 末梢血嗜中性粒细胞变化

对照组(6只)在注射环磷酰胺后的第4天嗜中性粒细胞数最低,然后逐渐上升,至第6天接近正常。实验组(6只)则在第3天嗜中性粒细胞数最低,随后上升,于第5天开始高于注射前水平,为 $10120.0\pm 834.8/\text{mm}^3$,与对照组 $104.2\pm 16.9/\text{mm}^3$ 比较有显著性差异 $P < 0.05$ 。

2.2 rhG-CSF疗效观察

试验不同剂量的rhG-CSF对小鼠生存率的影响:对照组(30只)在接种白色念珠菌后4d全部死亡;rhG-CSF组生存率均高于对照组,且随着rhG-CSF的剂量增大,生存率提高,剂量为 $100\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 组(30只),生存率为53.3%,与对照组比较有非常显著性差异, $P < 0.01$ 。试验开始应用rhG-CSF时间对肺感染小鼠生存率的影响:注射rhG-CSF后小鼠生存率均有提高,尤以在接种白色念珠菌前2d(30只)和前4d(30只)生存率提高更明显,分别为36.7%和53.3%,与对照组(2只)比较有显著性差异,分别为 $P < 0.0$ 和 $P < 0.01$ 。

2.3 rhG-CSF和氟康唑并用的疗效

对照组(2只)在接种白色念珠菌后4d全部死亡;单独应用氟康唑,剂量为 $10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 组(24只)和 $50\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 组(23只),生存率分别为16.7%和34.8%;并用rhG-CSF($100\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)后,生存率分别提高至60.9%(23只)和83.3%(24只)。联合应用组与单独应用rhG-CSF组比较有显著性差异 $P < 0.05$;与对照组和单独应用氟康唑组比较有非常显著性差异 $P < 0.01$ 。

2.4 小白鼠肺病理学改变

接种白色念珠菌后不同时间肺的病理学改变。

发现皮下注射生理盐水的对照组肺泡内中性粒细胞少,支气管和肺泡内有大量白色念珠菌浸润;rhG-CSF组,肺泡内中性粒细胞数明显增多,白色念珠菌数少,较局限,且有破坏的迹象,尤以接种白色念珠菌后24h两者区别更为明显。

3 讨论

近年来,由于机体免疫功能低下,感染的病例日益增多,感染大部分为重症且难治,是临床上急待解决的问题。这类感染中以白色念珠菌所致最为常见。白色念珠菌是人体的常在菌,主要分布于体表和口腔,无基础疾患免疫功能正常的人很少致病。预实验显示正常小鼠气管接种 $2\times 10^7\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的白色念珠菌,无例死亡;而预先腹腔注射环磷酰胺致嗜中性粒细胞减少的小鼠,气管接种白色念珠菌的半致死量(LD_{50})为 $2\times 10^6\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$,接种量为 $5\times 10^6\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时全部小鼠死亡,说明嗜中性粒细胞在防御真菌感染方面起了很重要作用。

嗜中性粒细胞来源于多能干细胞,约6~14d在骨髓中成熟,在血液中只能生存几小时。嗜中性粒细胞寿命短,需不断补充,在血液循环中半衰期约6h,血管外约为24h^[3]。临床上应用的很多化疗药物均有不同程度杀伤嗜中性粒细胞的副作用,使机体免疫状态受到抑制,易造成白色念珠菌的机会感染,这种感染单纯用抗真菌药往往不能起到理想的效果。近年来,由于细胞因子(Cytokine)的研究进展,特别是有些细胞因子的基因重组技术的建立,为生物反应调节疗法提供了可能,并且日益受到重视。已经有人报道单独应用G-CSF或和抗生素联合应用治疗绿脓杆菌感染的动物模型,起到了明显的疗效,特别是对有粒细胞减少动物的感染有更明显的疗效^[4]。我们实验进一步证实rhG-CSF可以明显促进嗜中性粒细胞的增加。实验显示预先应用rhG-CSF,可以提高中性粒细胞减少并白色念珠菌肺感染动物的生存率。在接种白色念珠菌前4d应用rhG-CSF生存率最高,可能是由于注射rhG-CSF 2d后中性粒细胞开始升高,4d后达最高值,随后开始下降的原因,这提示我们临床上需掌握用rhG-CSF的时机和疗程。

我们的结果显示抗真菌药(氟康唑)联合应用rhG-CSF明显提高了中性粒细胞减少合并白色念珠菌肺部感染小鼠的生存率。由于中性粒细胞减少至肺泡中中性粒细胞聚集减少,白色念珠菌易在肺部浸润,并大量繁殖,甚至播散,这时即使应用敏感的

抗真菌药,亦不能阻止白色念珠菌的浸润和播散,只能杀灭部分白色念珠菌。应用 rhG-CSF,通过提高中性粒细胞数,同时增强中性粒细胞的趋化作用,则可阻止白色念珠菌的浸润和播散,使病灶局限化,有利于抗真菌药杀灭白色念珠菌。本实验证实了这一点,应用 rhG-CSF,肺部白色念珠菌数明显减少,病灶局限,肺组织破坏少;而对照组肺部有大量白色念珠菌,病灶范围大,肺组织破坏明显。

(本文实验在日本琉球大学第一内科完成,期间得到了斋藤厚教授、普天间朝彦和比嘉太博士的指导和帮助,特此致谢)

参 考 文 献

- immunocompromised patients. *Clin Infect Dis*, 1992, 14 suppl 1: s120
- Polak-Wyss A. Protective effect of rhG-CSF on *Candida* infections in normal and immunosuppressed mice. *Mycoses*, 1991, 34(1): 109
- Bainton D F, Ull got T L, Farquhar M G. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J Exp Med*, 1971, 134(3): 907
- Yasuda H, Ajiki Y, Shimazoto T, *et al*. Therapeutic efficacy of G-CSF alone and in combination with antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* infections in mice. *Infect Immun*, 1990, 58(9): 2502

(1996-04-12收稿 1996-09-30修回)

1 Meunier F, Aoun M, Bitar N. Candidemia in

COMBINED EFFECT OF rhG-CSF AND FLUCONAZOLE ON PULMONARY CANDIDIASIS IN NEUTROPENIC MICE

Zhang Kouxing Tang Yingchun Zhang Tiantuo Rao Xian Bi Xiaogang

(Department of Internal Medicine, The Third Affiliated Hospital,
Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510630)

To study the prophylactic and therapeutic effects of human recombinant granulocyte-colony stimulating factor (rhG-CSF) on pulmonary candidiasis in neutropenic mice, the mice were injected intraperitoneally with cyclophosphamide ($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and divided into four groups ① vehicle, only intratracheal injection with 5×10^6 *Candida albicans*; ② subcutaneous injection with rhG-CSF 4, 2 or 0 day(s) before the infection; ③ intraperitoneal injection with fluconazole 12h after the infection; ④ injection with a combination of rhG-CSF and fluconazole. The results showed that rhG-CSF, especially with $100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ and four days before injection of *Candida albicans*, had significant protection against pulmonary candidiasis in neutropenic mice. The infiltration of polymorphonuclear leukocytes (PMNs) to the infected lung at 24h after injection of *Candida albicans* was more remarkable in the rhG-CSF treated mice than that in the controlled mice. Combined treatment with rhG-CSF and fluconazole was more effective than the treatment with either agent alone.

Subject headings neutropenia/drug therapy; candidiasis/drug therapy; granulocyte colony-stimulating factor/therapeutic use; fluconazole/therapeutic use; drug therapy, combination