

免疫抑制继发艰难梭菌相关性腹泻 C57BL/6 小鼠模型的建立方法研究^Δ

马富智^{1,2*}, 李 萌³, 于小红³, 朱 琳², 阿依曼·叶尔江², 赵奎君³, 章从恩^{3#1}, 马致洁^{2#2} (1. 云南中医药大学中药学院, 昆明 650500; 2. 首都医科大学附属北京地坛医院药学部, 北京 100015; 3. 首都医科大学附属北京友谊医院药学部, 北京 100050)

中图分类号 R975;R978.1

文献标志码 A

文章编号 1672-2124(2025)01-0006-08

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2025.01.002



摘 要 目的:建立免疫抑制继发艰难梭菌相关性腹泻(CDAD)C57BL/6小鼠模型,为今后新药研究提供更有针对性的动物模型选择。方法:采用C57BL/6小鼠,分为空白组、免疫抑制CDAD模型组(DXMS+MOD组)、免疫正常CDAD模型组(MOD组)、地塞米松组和混合抗菌药物组。在造模后第1、8日2个时间点取材,通过脾脏和胸腺指数、血常规检测、免疫细胞占比、细胞因子分泌水平以及分泌型免疫球蛋白A(sIgA)含量分析各组小鼠免疫状态情况;通过体重变化率、死亡率、临床评分、粪便黏稠度评分、毒素水平检测和结肠病理变化评价模型组小鼠的CDAD病情。结果:与MOD组比较,DXMS+MOD组小鼠造模后第1、8日的脾脏指数($P<0.001$, $P<0.05$)、胸腺指数($P<0.001$)显著降低;白细胞计数($P<0.01$)、淋巴细胞百分比($P<0.001$)显著降低,中性粒细胞百分比($P<0.001$)显著升高;B细胞($P<0.001$)、CD4⁺T细胞($P<0.001$, $P<0.01$)比例和CD4⁺/CD8⁺($P<0.001$)显著降低,CD8⁺T细胞比例($P<0.001$)显著升高,上述差异均有统计学意义。与MOD组比较,DXMS+MOD组小鼠造模后白细胞介素6(第1日: $P<0.001$;第8日: $P<0.01$)、单核细胞趋化蛋白1(第1日: $P<0.001$)、肿瘤坏死因子 α (第8日: $P<0.01$)和 γ 干扰素(第8日: $P<0.01$)水平显著降低,差异均有统计学意义。造模后第1、8日,DXMS+MOD组小鼠sIgA含量较MOD组呈现降低趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$)。相比于MOD组,DXMS+MOD组小鼠体重降低更明显,且两组在造模后第2日($P<0.01$)、第3日($P<0.05$)和第4日($P<0.05$)的差异有统计学意义。造模后,DXMS+MOD组小鼠的粪便黏稠度评分(第5日: $P<0.05$)、临床症状评分(第1日: $P<0.05$;第3、5和7日: $P<0.001$)始终高于MOD组,差异均有统计学意义。造模后第1、8日,DXMS+MOD组的艰难梭菌负载量较MOD组显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。结肠病理结果显示,DXMS+MOD组肠道屏障破坏更严重且出现死亡情况。结论:DXMS+MOD组小鼠可在整个造模过程以及造模完成后7d内保持免疫低下状态,其CDAD症状相比MOD组更加严重,毒素水平更高,肠道屏障破坏更严重。本研究建立了符合临床特点的免疫抑制继发CDAD动物模型,为今后的相关科学研究提供了更有针对性的动物模型选择。

关键词 艰难梭菌相关性腹泻;免疫低下状态;动物模型;C57BL/6小鼠

Establishment of C57BL/6 Mouse Model of *Clostridium Difficile*-Associated Diarrhea Secondary to Immunosuppression^Δ

MA Fuzhi^{1,2*}, LI Meng³, YU Xiaohong³, ZHU Lin², AYIMAN Yeerjiang², ZHAO Kuijun³, ZHANG Congen³, MA Zhijie² (1. School of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China; 2. Dept. of Pharmacy, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; 3. Dept. of Pharmacy, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To establish the C57BL/6 mouse model of *Clostridium difficile*-associated diarrhea (CDAD) secondary to immunosuppression, so as to provide a more targeted selection of animal models for future new drug research. **METHODS:** C57BL/6 mice were extracted to be divided into the blank group, immunosuppressed CDAD model group (DXMS+MOD group), immune-normal CDAD model group (MOD group), dexamethasone group and mixed antibiotics group. Samples were taken at the 1st and 8th days after modelling, the immune status of mice in each group were analyzed by spleen and thymus indexes, routine blood tests, immune cell percentage, cytokine

^Δ 基金项目:国家重点研发计划资助(No. 2023YFC2308200);国家自然科学基金资助项目(No. 82374053);高层次公共卫生人才建设项目(No. 学科带头人-02-28)

* 硕士研究生。研究方向:中药药理学。E-mail: m18562316669@163.com

通信作者 1:副主任药师,副教授。研究方向:中药药理与毒理。E-mail: zce820@163.com

通信作者 2:主任药师,副教授。研究方向:中药药理与毒理。E-mail: 13811647091@163.com

secretion level and secretory immunoglobulin A (sIgA) content. The CDAD condition of model mice were evaluated through the change rates of body weight, mortality rates, clinical scores, faecal consistency scores, detection of toxin levels and pathological changes of colon. RESULTS: Compared with the MOD group, the DXMS+MOD group had significantly lower spleen ($P<0.001$, $P<0.05$) and thymus indexes ($P<0.001$), significantly lower white blood cell counts ($P<0.01$) and lymphocyte percentages ($P<0.001$), significantly higher neutrophilic granulocytes percentages ($P<0.001$); significantly lower B cells ratios ($P<0.001$), $CD4^+$ T cells ratios ($P<0.001$, $P<0.01$) and $CD4^+/CD8^+$ ($P<0.001$), and significantly higher $CD8^+$ T cells ratios ($P<0.001$) at the 1st and 8th days after modelling, the differences were statistically significant. Compared with the MOD group, the IL-6 ($P<0.001$ at the 1st day, $P<0.01$ at the 8th day), MCP-1 ($P<0.001$ at the 1st day), TNF- α ($P<0.01$ at the 8th day) and IFN- γ ($P<0.01$ at the 8th day) levels in the DXMS+MOD group were significantly lower, with statistically significant differences. At the 1st and 8th days after modelling, the sIgA content in the DXMS+MOD group showed a decreasing compared with the MOD group, while the difference was not statistically significant ($P>0.05$). Compared with the MOD group, the mice in the DXMS+MOD group showed a more obvious decrease in body weight, and the differences between two groups were statistically significant at the 2nd ($P<0.01$), 3rd ($P<0.05$) and 4th ($P<0.05$) days after modelling. After modelling, the faecal consistency scores ($P<0.05$ at the 5th day) and clinical symptom scores ($P<0.05$ at the 1st day, $P<0.001$ at the 3rd, 5th and 7th days) of the DXMS+MOD group were higher than those in the MOD group, with statistically significant differences. At the 1st and 8th days after modelling, the *C. difficile* load of the DXMS+MOD group was significantly higher than that of the MOD group ($P<0.01$), with statistically significant difference. The colonic pathology results showed more severe intestinal barrier disruption and mortality in the DXMS+MOD group. CONCLUSIONS: Mice in the DXMS+MOD group could remain immunocompromised throughout the modelling process and for 7 days after completion of modelling, and the CDAD symptoms are more severe compared with those in the MOD group, with higher toxin levels and more severe intestinal barrier disruption. This study has established an animal model of CDAD secondary to immunosuppression that meets the clinical characteristics, which provides more targeted selection of animal model for future related scientific research.

KEYWORDS *Clostridium difficile*-associated diarrhea; Immunosuppression; Animal model; C57BL/6 mice

艰难梭菌是一种革兰阳性、厌氧、产芽孢的致病细菌,对不良环境抵抗能力强,利于其在体内外传播^[1]。艰难梭菌相关性腹泻(*Clostridium difficile* associated diarrhea, CDAD)是由长期或滥用抗菌药物引发的艰难梭菌感染性疾病,其症状从轻微腹泻到严重伪膜性结肠炎,占抗菌药物相关性腹泻的25%~30%^[2]。

CDAD的发病不仅与抗菌药物的使用相关,与人体的免疫状态也密切相关。免疫抑制/低下状态人群(服用免疫抑制剂的患者;老年人、婴幼儿、肿瘤患者和围手术期患者等)的CDAD发病率和死亡率高^[3-5]。研究发现,当CDAD患者处于免疫抑制状态或者免疫低下状态时,会导致艰难梭菌毒素增加,延缓肠道菌群的恢复,进而延缓CDAD的恢复,使病情更加严重,病死率升高^[6]。使用单一免疫抑制剂的患者患CDAD的概率较未使用免疫抑制剂的患者高3.2倍,使用2种及以上免疫抑制剂的患者患CDAD的风险是未使用免疫抑制剂患者的6.5倍^[7]。美国疾病控制与预防中心在2013年的报告中将艰难梭菌确定为抗菌药物耐药性威胁“紧急威胁”类别中的3种细菌之一,根据该报告,约50%的感染发生在65岁以上人群中,但>90%的死亡发生在65岁及以上的人群中,高龄被认为是CDAD严重后果的危险因素。此外,Ben-Horin等^[8]的研究发现,发生CDAD前使用过免疫抑制剂的患者其死亡率会显著升高;Das等^[9]发现,处于免疫抑制状态的患者复发艰难梭菌感染的风险更大。

免疫正常的CDAD小鼠模型通常是由混合抗菌药物自由

饮水后给予克林霉素腹腔注射,目的是打乱小鼠的肠道菌群稳态从而使艰难梭菌更容易定植。但上述造模方法仍有部分局限性:(1)模型与临床现实不完全相符,即无法准确模拟免疫抑制/低下患者的状况,不能准确反映部分临床患者群体对艰难梭菌感染的敏感性以及感染后的病理生理变化;(2)免疫正常动物的肠道屏障功能相对健全,较难观察和分析药物在受损肠道屏障修复方面的具体作用和效果。动物模型的精准建立是科学探讨疾病的重要前提,因此,本研究拟建立免疫抑制继发CDAD小鼠模型,以克服免疫正常动物模型的不足,为今后的新药研究提供更有针对性的动物模型选择。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级5周龄C57BL/6小鼠,初始体重为(20 ± 2)g,雄鼠,购于斯贝福(北京)生物技术有限公司,许可证号为SCXK(京)2019-0010,于SPF级动物实验室饲养,饲养环境温度为20~26℃,湿度为40%~70%,通风良好,12h黑白轮换照明。动物饲养使用标准鼠饲料和水,所有动物实验按照首都医科大学附属北京友谊医院动物伦理委员会制定的伦理准则进行。

1.2 仪器

实时荧光定量PCR仪、流式细胞仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);五分类全自动动物血液细胞分析仪(北京科月华诚科技有限公司);酶标仪(美国Bio Tek公司);电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司);生物显微镜(德国Leica仪器有限公司)。

1.3 药品与试剂

甲硝唑(货号:S17079)、万古霉素(货号:S17059)、庆大霉素(货号:S17024)、克林霉素(货号:S63729)和卡那霉素(货号:S17025)等购自上海源叶生物科技有限公司。黏菌素(货号:MB1064)购自大连美仑生物技术有限公司,地塞米松(货号:ST1254)购自上海碧云天生物技术股份有限公司。艰难梭菌 630(货号:ATCC BAA-1382)由首都医科大学附属北京友谊医院检验科提供。Mouse Custom 4-plex 试剂盒(货号:T2C0421142)购自北京旷博生物技术股份有限公司。粪便 DNA 提取试剂盒(货号:D5625010000L22T020)购自美国 Omega Bio-Tek 公司。小鼠分泌型免疫球蛋白 A(sIgA)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(货号:E-EL-M1040)购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司。

2 方法

2.1 动物造模

60 只小鼠适应性饲养 1 周,进行称重,随机分为 5 组($n=12$),分别为空白组(CON 组)、免疫抑制 CDAD 模型组(DXMS+MOD 组)、免疫正常 CDAD 模型组(MOD 组)、地塞米

松组(DXMS 组)及混合抗菌药物组(ABX 组)。

动物实验方案见图 1。从第-6 日至第-3 日,CON 组小鼠正常饮水,DXMS+MOD 组和 DXMS 组小鼠自由饮用由混合抗菌药物+地塞米松配置的水(卡那霉素 0.4 mg/mL;万古霉素 0.045 mg/mL;甲硝唑 0.215 mg/mL;黏菌素 850 U/mL;庆大霉素 0.035 mg/mL;地塞米松 0.1 mg/mL),MOD 组和 ABX 组小鼠则自由饮用混合抗菌药物水(卡那霉素 0.4 mg/mL;万古霉素 0.045 mg/mL;甲硝唑 0.215 mg/mL;黏菌素 850 U/mL;庆大霉素 0.035 mg/mL)。-3 日以后,所有小鼠恢复正常饮水。第-1 日,除 CON 组外,其他组小鼠给予 10 mg/kg 的克林霉素腹腔注射,CON 组小鼠给予相同体积的 0.9%氯化钠溶液腹腔注射。第 0 日,除 CON 组、DXMS 组和 ABX 组外,其他组小鼠采用灌胃方式给予艰难梭菌芽孢 10^5 CFU/只,500 μ L),CON 组、DXMS 组和 ABX 组小鼠给予相同体积 0.9%氯化钠溶液。第 1 日,每组随机安乐死 6 只小鼠,取材进行后续分析。第 1—7 日,每日观察剩余小鼠体重及状态。第 8 日,安乐死所有小鼠,取材进行后续分析。

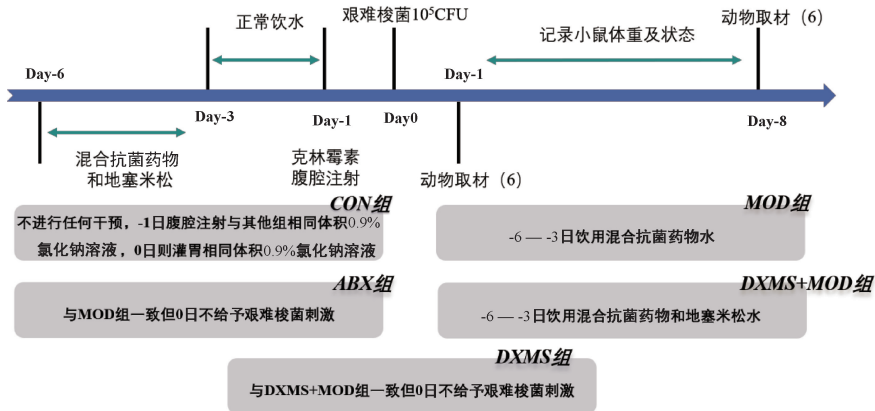


图 1 实验流程示意图

2.2 艰难梭菌培养

将艰难梭菌菌株接种于哥伦比亚血琼脂平板上,标准厌氧条件下,37 $^{\circ}$ C 培养 7 d。用无菌环从培养基中收集艰难梭菌,然后用磷酸盐缓冲溶液(PBS)重悬。为了分离艰难梭菌孢子,将艰难梭菌悬浮液在 65 $^{\circ}$ C 下热处理 20 min 以消除营养细胞。热处理后的悬浮液在 1 500 r/min、离心半径为 18.9 cm、25 $^{\circ}$ C 的条件下离心 5 min,PBS 洗 2~3 次,弃上清液。所得沉淀物在液体培养基中重悬,将其在-80 $^{\circ}$ C 保存备用。

2.3 临床症状评估和粪便稠度评估

CDAD 临床症状评估标准见表 1^[10]。粪便稠度通过 3 种视觉分级量图进行评估和分类:(1)成形,粪便保持其形状,呈棕色,评分为 1 分;(2)半成形或柔软,不会倾倒,呈黄色,评分为 2 分;(3)液体状,轻易倾倒,呈黄色,评分为 3 分。

2.4 脾脏和胸腺指数测定

第 1、8 日小鼠处死后,对小鼠进行称重,解剖并取其脾脏和胸腺,用吸水纸吸取脾脏和胸腺表面液体,称重并记录。脾脏指数=脾脏质量(mg)/小鼠体重(g);胸腺指数=胸腺质量(mg)/小鼠体重(g)。

2.5 实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(RT-qPCR)检测小鼠粪便毒素水平

使用粪便 DNA 提取试剂盒对小鼠粪便中的微生物总 DNA 进行抽提,得到的 DNA 溶液-20 $^{\circ}$ C 存储。采用 RT-qPCR 检测小鼠粪便中艰难梭菌毒素 B 水平,引物及探针序列见表 2^[11]。反应条件:采用两步法 PCR 扩增标准程序,(1)预变性,95 $^{\circ}$ C、30 s,1 个循环;(2)变性,95 $^{\circ}$ C、3 s,50 $^{\circ}$ C、30 s,40 个循环。

表 1 临床评分标准

分类	0 分	1 分	2 分	3 分
活跃程度	正常	警惕/缓慢移动	嗜睡/摇晃的	触摸才会移动
姿态	正常	背部倾斜	缩成一团	缩成一团/鼻子向下
外表	正常	毛发凌乱	皮肤粗糙	非常蓬乱/不整洁
腹泻程度	正常	软硬/颜色改变(淡黄色)	湿尾/便秘/血便	水样便/无便(肠梗阻)
眼睛/鼻子	正常	眯着眼/半闭着	几乎闭眼/有液体流出	闭眼/有液体流出

表 2 引物及探针序列

引物	序列 5'-3'
上游引物	ATATCAGAGACTGATGAC
下游引物	TAGCATATTGAGACAATATGTT
Taqman 探针	FAM-CTGGAGAATCTATATTGTAGAAACTG-BHQ

2.6 QBPlex 流式高通量多因子检测

按照 Mouse Custom 4-plex 试剂盒 [肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、 γ 干扰素 (IFN- γ)、白细胞介素 6 (IL-6) 和单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1)] 的说明书,对小鼠血浆样本进行处理。荧光聚苯乙烯微球已事先被抗原特异的抗体包被,已包被了抗体的微球混合物与样本孵育,样本中的待检物 (TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 和 MCP-1) 与微球上包被的抗体结合,然后加入生物素标记的抗体混合物,与结合于捕获抗体 (微球) 的待检物特异性结合,加入 Streptavidin-PE,与生物素结合。最后用流式细胞仪检测荧光,结合抗原标准品的标准曲线,实现对蛋白抗原的定量检测。

2.7 血常规检测

采用五分类全自动动物血液细胞分析仪对小鼠血液进行检测。首先将仪器进行液路清洗及系统自检,然后进行本底计算,最后进行血液上机检测。检测结果以 Excel 表形式呈现。

2.8 流式细胞术检测免疫细胞亚群检测

小鼠安乐死后,解剖小鼠并取出肠系膜淋巴结放入预冷的 PBS 中,将肠系膜淋巴结放入 40 μ m 滤网中用 1 mL 注射器的柄头轻轻碾磨,取适量 PBS 冲洗滤网。将细胞悬液转入 1.5 mL 离心管中,在 400 r/min、离心半径为 8.8 cm、4 $^{\circ}$ C 的条件下离心 5 min,PBS 重悬备用。

每个样本中加入 CD45、CD3、CD4、CD8 和 B220 抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,PBS 洗涤,使用流式细胞仪上机检测 CD4 $^{+}$ T 细胞、CD8 $^{+}$ T 细胞、B220 $^{+}$ 细胞比例及 CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$,采用 FlowJo

分析数据。

2.9 小鼠盲肠内容物中 sIgA 水平检测

盲肠内容物 (50 mg) 用 200 μ L 的 PBS 浸泡匀浆,在 400 r/min、离心半径为 8.8 cm、4 $^{\circ}$ C 的条件下离心 10 min,上清液用于进一步分析。样品上清液稀释 5 000 倍,按照小鼠 sIgA ELISA 试剂盒说明书进行检测。记录酶标仪记录 450 nm 处的吸光度。数据用四参数 Logistic 函数拟合。

2.10 结肠组织病理检测

取小鼠结肠组织,卷成 roll 卷,放入 4% 多聚甲醛中固定,然后进行石蜡包埋、切片,并用苏木精-伊红 (HE) 染色,在显微镜下观察结肠切片的病理变化情况。

2.11 统计学方法

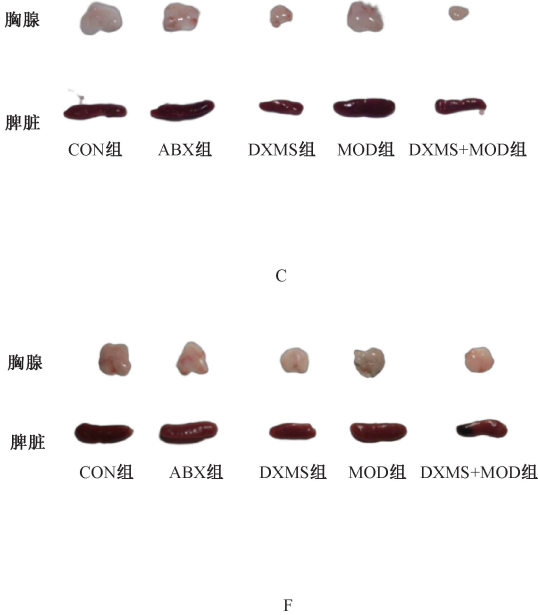
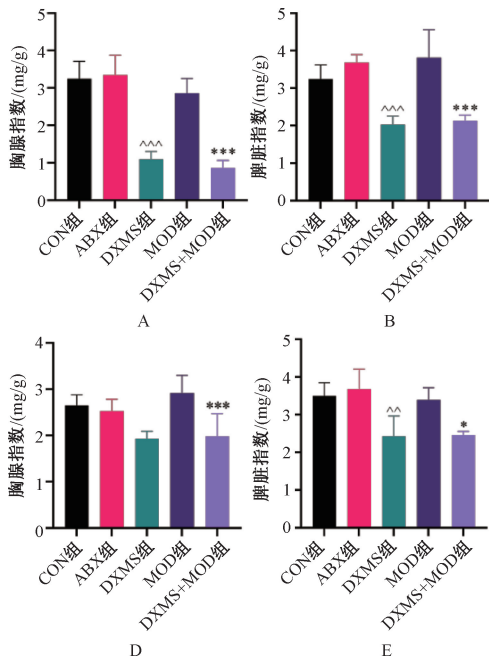
数据采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 One-way ANOVA 分析确定统计显著性, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠免疫状态

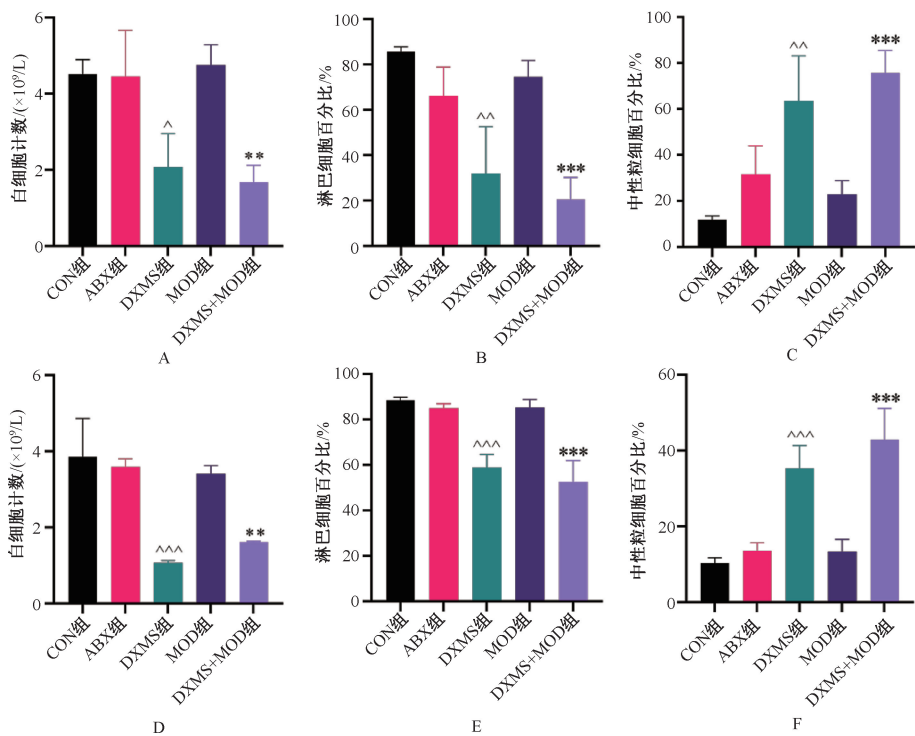
3.1.1 小鼠脾脏和胸腺指数及其形态变化:造模后第 1 日,DXMS 组小鼠脾脏指数、胸腺指数较 ABX 组显著降低 ($P < 0.001$),DXMS+MOD 组小鼠较 MOD 组显著降低,差异均有统计学意义 ($P < 0.001$);观察胸腺和脾脏形态,DXMS 组和 DXMS+MOD 组小鼠脾脏和胸腺较其他组明显变小;造模后第 8 日,DXMS 组和 DXMS+MOD 组小鼠的胸腺指数、脾脏指数与其他组相比仍处于较低水平,见图 2。

3.1.2 小鼠外周血常规检测:造模后第 1、8 日,DXMS 组小鼠较 ABX 组、DXMS+MOD 组小鼠较 MOD 组的白细胞计数、淋巴细胞百分比显著降低,中性粒细胞百分比显著升高,见图 3。



A—C. 造模后第 1 日胸腺指数 (A)、脾脏指数 (B) 及脾脏和胸腺形态 (C); D—F. 造模后第 8 日胸腺指数 (D)、脾脏指数 (E) 及脾脏和胸腺形态 (F); DXMS 组与 ABX 组相比, $P < 0.05$, $^{*}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$; DXMS+MOD 组与 MOD 组相比, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ 。

图 2 各组小鼠脾脏和胸腺指数及其形态

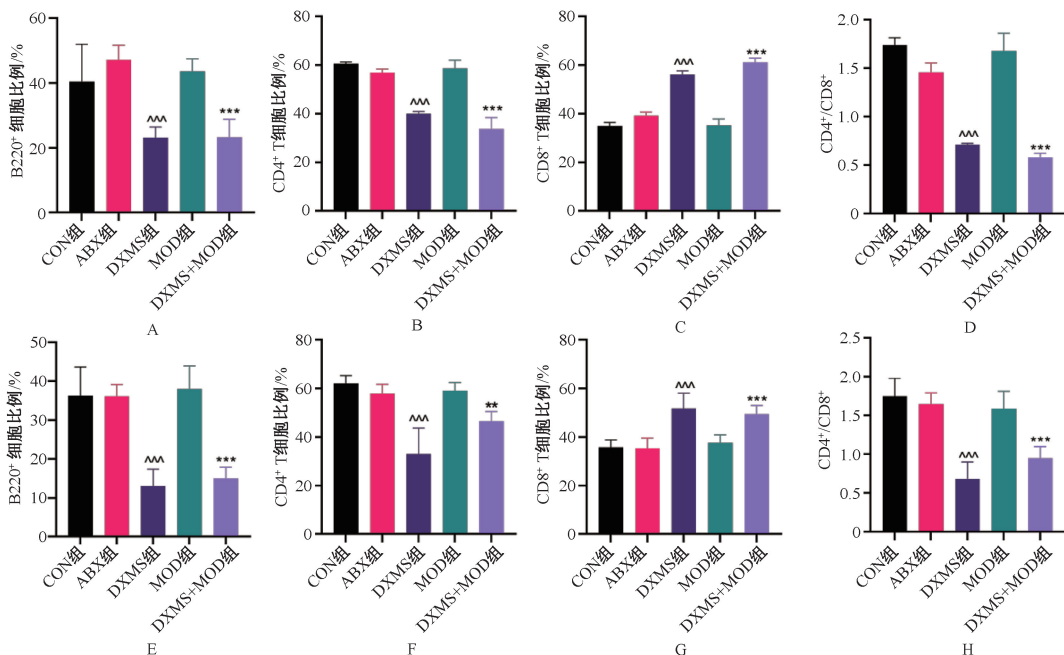


A—C. 造模后第1日血常规检测,白细胞计数(A)、淋巴细胞百分比(B)及中性粒细胞百分比(C);D—F. 造模后第8日血常规检测,白细胞计数(D)、淋巴细胞百分比(E)及中性粒细胞百分比(F);DXMS组与ABX组相比, $P<0.05$, $\sim P<0.01$, $\sim\sim P<0.001$;DXMS+MOD组与MOD组相比, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 。

图3 各组小鼠血常规检测

3.1.3 流式细胞术分析各组小鼠免疫细胞占比:造模后第1日,DXMS组和DXMS+MOD组小鼠B细胞、CD4⁺T细胞比例和CD4⁺/CD8⁺显著降低($P<0.001$),CD8⁺T细胞比例显著升

高($P<0.001$),差异均有统计学意义;造模后第8日各免疫细胞占比与第1日结果表现出相同的趋势,表明地塞米松会抑制小鼠T细胞的活性,见图4。

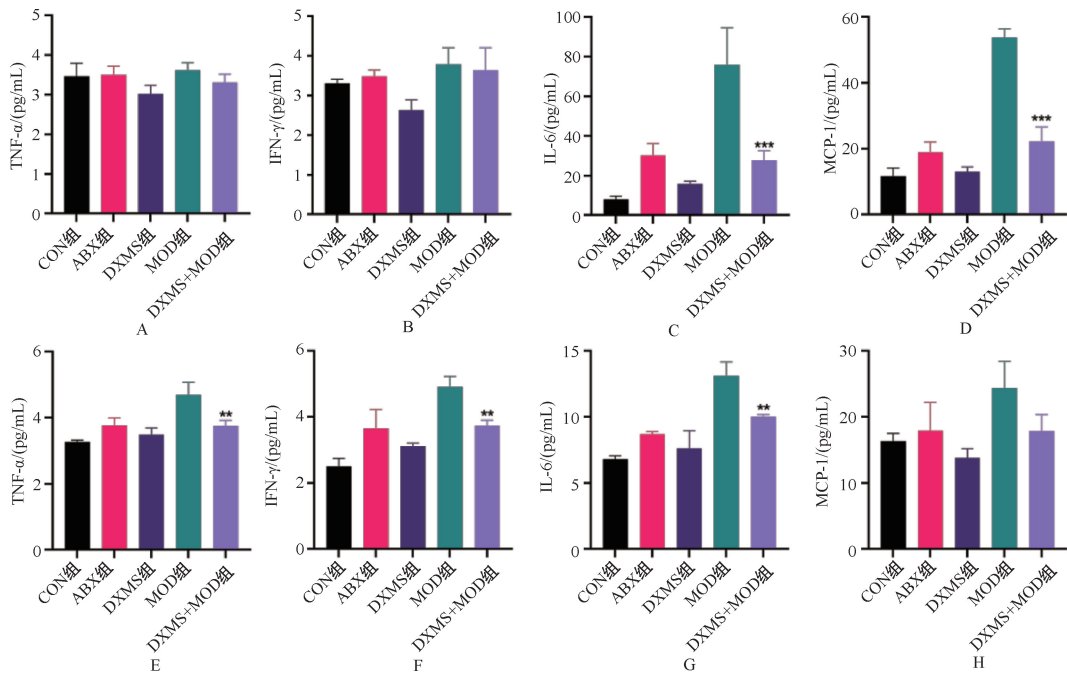


A—D. 造模后第1日流式细胞术检测,B220⁺细胞比例(A)、CD4⁺T细胞比例(B)、CD8⁺T细胞比例(C)及CD4⁺/CD8⁺(D);E—H. 造模后第8日流式细胞术检测,B220⁺细胞比例(E)、CD4⁺T细胞比例(F)、CD8⁺T细胞比例(G)及CD4⁺/CD8⁺(H);DXMS组与ABX组相比, $\sim P<0.05$, $\sim\sim P<0.01$, $\sim\sim\sim P<0.001$;DXMS+MOD组与MOD组相比, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 。

图4 流式细胞术分析各组小鼠免疫细胞占比

3.1.4 小鼠血浆细胞因子分泌水平检测:造模后第1、8日,DXMS组小鼠IL-6、TNF- α 、IFN- γ 和MCP-1水平均较ABX组有降低趋势;造模后第1日,DXMS+MOD组小鼠IL-6、MCP-1

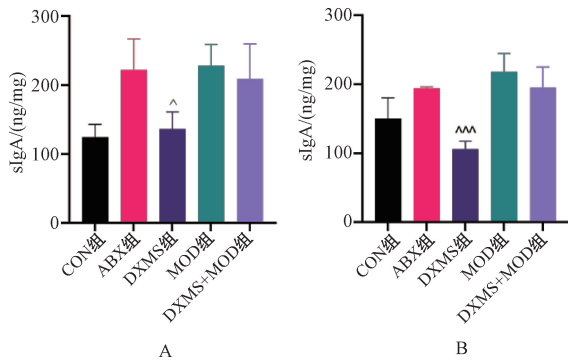
水平较MOD组显著降低,差异均有统计学意义($P<0.001$);造模后第8日,DXMS+MOD组小鼠IL-6、TNF- α 和IFN- γ 水平较MOD组显著降低,差异均有统计学意义($P<0.01$),见图5。



A—D. 造模后第1日血浆细胞因子检测,TNF- α (A)、IFN- γ (B)、IL-6(C)及MCP-1(D);E—H. 造模后第8日血浆细胞因子检测,TNF- α (E)、IFN- γ (F)、IL-6(G)及MCP-1(H);DXMS组与ABX组相比, $^{\sim}P<0.05$, $^{\sim\sim}P<0.01$, $^{\sim\sim\sim}P<0.001$;DXMS+MOD组与MOD组相比, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ 。

图5 流式高通量多因子检测各组小鼠血浆细胞因子水平

3.1.5 小鼠盲肠内容物sIgA含量检测:造模后第1、8日,DXMS组小鼠较ABX组、DXMS+MOD组小鼠较MOD组盲肠内容物sIgA含量呈现降低趋势,见图6。



A. 造模后第1日盲肠内容物sIgA检测;B. 造模后第8日盲肠内容物sIgA检测;DXMS组与ABX组相比, $^{\sim}P<0.05$, $^{\sim\sim}P<0.01$, $^{\sim\sim\sim}P<0.001$;DXMS+MOD组与MOD组相比, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ 。

图6 ELISA法检测小鼠盲肠内容物中sIgA水平

3.2 模型组小鼠CDAD症状

3.2.1 感染艰难梭菌后小鼠的状态变化:第0日动物模型建立完成后,开始观察记录各组小鼠的体重情况、临床症状和粪便黏稠度。(1)CON组小鼠体重持续升高,MOD组、DXMS+MOD组小鼠在模型建立后第1日体重迅速降低,第3日开始逐步升高。相比于MOD组,DXMS+MOD组小鼠体重降低更加

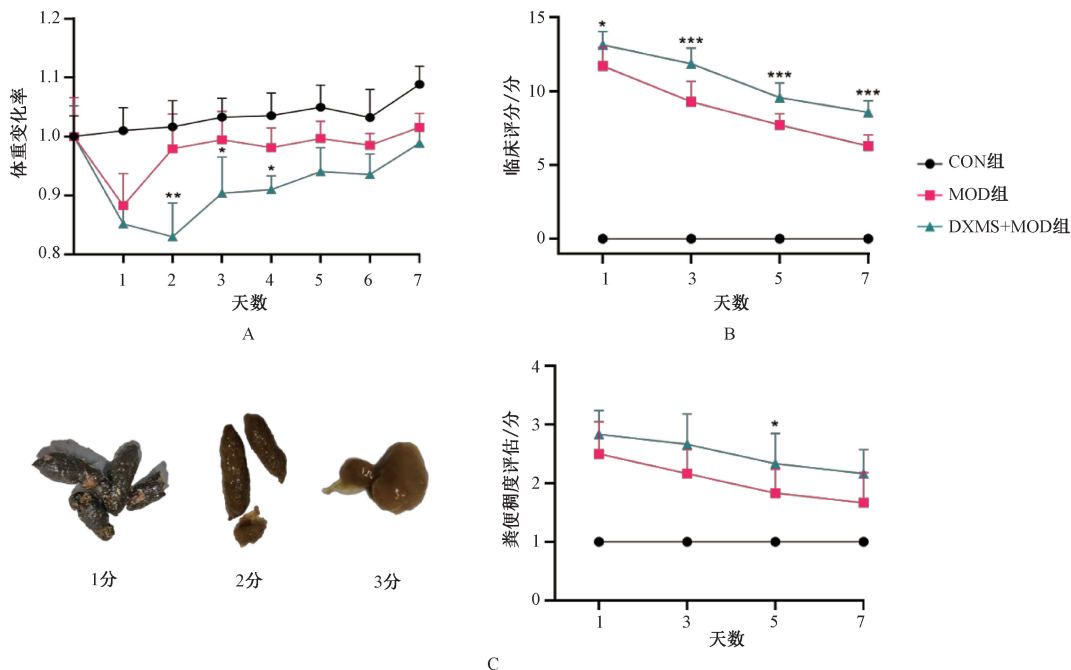
明显,且在模型建立后第2日($P<0.01$)、第3日($P<0.05$)和第4日($P<0.05$)的差异有统计学意义。(2)在整个实验过程中,DXMS+MOD组小鼠的粪便黏稠度评分、临床症状评分始终高于MOD组,DXMS+MOD组小鼠的整体状态更差,见图7。

3.2.2 小鼠生存情况及艰难梭菌毒素B水平检测:造模后第1、8日,DXMS+MOD组小鼠粪便中艰难梭菌负载量较MOD组显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$);在整个实验过程中,MOD组小鼠没有出现死亡的情况,而DXMS+MOD组在造模后第1、2日出现死亡的情况,死亡率为30%,见图8。

3.2.3 小鼠结肠组织病理染色:CON组小鼠结肠黏膜上皮细胞完整,排列紧密,未观察到其他显著异常;MOD组小鼠固有层有大量炎症细胞浸润,造模后第8日观察到少量黏膜上皮细胞脱落;DXMS+MOD组小鼠造模后第1日观察到有少量炎症细胞浸润并伴随黏膜上皮细胞脱落,造模后第8日观察到黏膜上皮细胞脱落情况更加严重,肠道屏障被严重破坏,见图9。

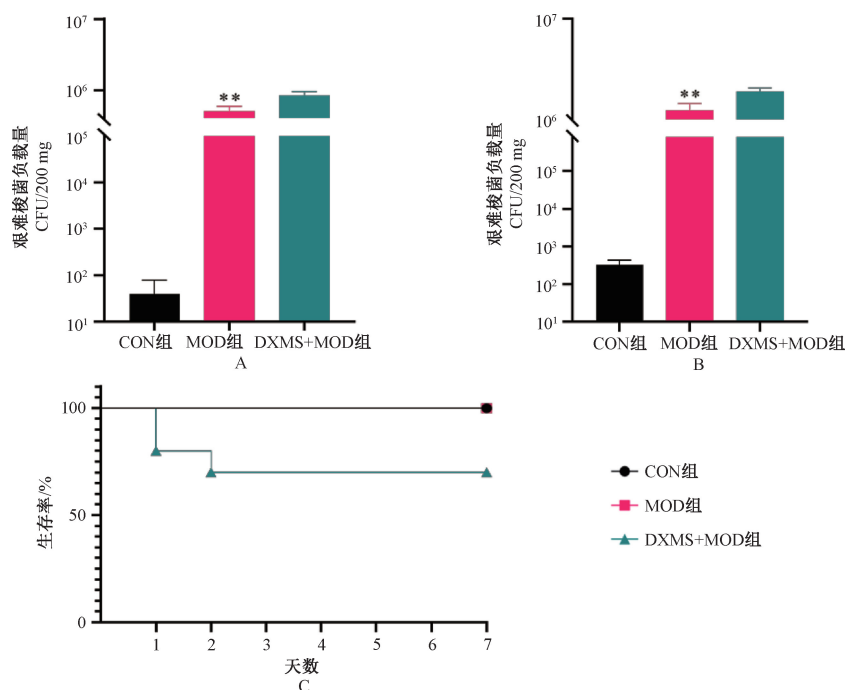
4 讨论

由于广谱抗菌药物的广泛使用,全球范围内CDAD的发病率逐渐升高^[12]。艰难梭菌因其易耐药、芽孢外界存活时间长和传播性强等特点,在医院内及护理机构中暴发流行,严重威胁公共卫生安全^[13-15]。CDAD的发病与人体的免疫状态密切相关,当CDAD患者处于免疫抑制状态或者免疫低下状态时,会使艰难梭菌更易入侵肠道组织,延缓患者肠道菌群的恢复,进而使疾病更加严重,死亡率升高^[6]。本研究的目的是建立免疫抑制继发CDAD小鼠模型,从而更好地模拟CDAD易感



A. 体重变化率;B. 临床症状评分;C. 粪便黏稠度;DXMS+MOD 组与 MOD 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图7 小鼠状态评价



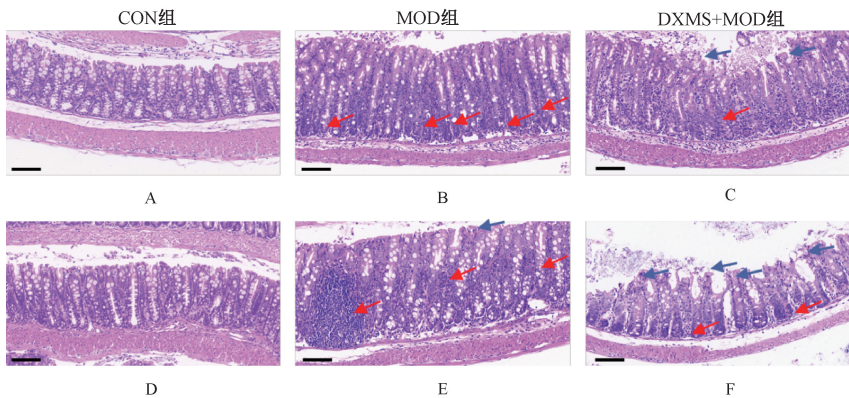
A. 造模后第1日艰难梭菌负载量;B. 造模后第8日艰难梭菌负载量;C. 小鼠生存率;DXMS+MOD 组与 MOD 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图8 小鼠生存率及艰难梭菌负载量比较

人群的病理生理变化。

理想状态下,动物模型在接触艰难梭菌刺激和给药治疗期间应当处于免疫抑制状态。因此,本研究分为2个时间点取材,在艰难梭菌刺激后的第1日进行第1次取材,此次取材的目的在于验证在艰难梭菌刺激时,小鼠是否处于免疫抑制状态;同样的,第8日取材的目的在于验证是否在整个造模过程以及后续治疗过程中小鼠处于免疫抑制状态。小鼠脾脏和胸

腺指数常用于评估免疫功能的强弱,能够反映实验动物免疫系统的健康状态。血常规指标,如白细胞总数、中性粒细胞百分比和淋巴细胞百分比等,均与免疫状态密切相关。CD3 是成熟 T 细胞表面的标志物,用于识别 T 淋巴细胞的活化^[16]。CD4 和 CD8 通常在成熟 T 细胞中表达,CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞分别作为主要的辅助细胞和效应细胞,是适应性免疫的重要组成部分^[17],其比值可以反映 T 细胞的活性。sIgA 是黏膜免疫的



A—C. 造模后第 1 日的 CON 组(A)、MOD 组(B)和 DXMS+MOD 组(C);D—F. 造模后第 8 日的 CON 组(D)、MOD 组(E)和 DXMS+MOD 组(F)。

图 9 结肠组织 HE 染色图(×200)

主要抗体,能够阻止病原体侵入组织,构成机体对抗病原的第一道防线^[18]。通过综合分析小鼠在 2 个时间点的脾脏和胸腺指数、血常规结果、免疫细胞比例、细胞因子分泌水平以及 sIgA 含量,发现 DXMS 组和 DXMS+MOD 组小鼠在整个建模过程及造模后 7 d 内均处于免疫低下状态。

临床上,免疫状态低下的 CDAD 患者常表现出更加严重的病理生理变化。本研究对免疫状态正常的 CDAD 小鼠和免疫状态低下的 CDAD 小鼠进行了综合分析。体重变化率、临床症状、粪便黏稠度及死亡率能够直观反映 CDAD 症状的严重程度。研究结果表明,DXMS+MOD 组小鼠较 MOD 组体重变化波动更大,临床评分、粪便黏稠度评分以及死亡率更高。艰难梭菌毒素 A&B 是 CDAD 的主要致病因素,其水平反映了细菌在小鼠肠道中的数量、繁殖和发育的情况。取第 1 日和第 8 日的粪便,进行 RT-qPCR 检测,结果表明,DXMS+MOD 组小鼠表现出更高的艰难梭菌负载量。结肠病理结果表明,DXMS+MOD 组小鼠结肠组织出现了更严重的病变,肠道屏障破坏更加严重。

综上所述,动物模型的精准建立是科学探讨疾病的重要前提,本研究建立了由地塞米松诱导的免疫抑制继发 CDAD C57BL/6 小鼠模型,此模型与临床实际更加贴合,CDAD 病症更加典型,为今后的相关科学研究提供了更有针对性的动物模型选择。

参考文献

- [1] MARTIN J S H, MONAGHAN T M, WILCOX M H. *Clostridium difficile* infection: epidemiology, diagnosis and understanding transmission[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016, 13(4): 206-216.
- [2] MCFARLAND L V. Antibiotic-associated diarrhea: epidemiology, trends and treatment[J]. *Future Microbiol*, 2008, 3(5): 563-578.
- [3] D'AOUST J, BATTAT R, BESSISOW T. Management of inflammatory bowel disease with *Clostridium difficile* infection[J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(27): 4986-5003.
- [4] AVNI T, BABITCH T, BEN-ZVI H, et al. *Clostridioides difficile* infection in immunocompromised hospitalized patients is associated with a high recurrence rate[J]. *Int J Infect Dis*, 2020, 90: 237-242.
- [5] 张文婷, 赵红梅, 罗艳红, 等. 儿童炎症性肠病艰难梭菌感染及其易感因素分析[J]. *中国当代儿科杂志*, 2021, 23(7): 718-723.

- [6] KIM H B, WANG Y K, SUN X M. Detrimental role of immunosuppressive drug, dexamethasone, during *Clostridium difficile* infection in association with a gastrointestinal microbial shift [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2016, 26(3): 567-571.
- [7] GONG S S, FAN Y H, HAN Q Q, et al. Nested case-control study on risk factors for opportunistic infections in patients with inflammatory bowel disease[J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(18): 2240-2250.
- [8] BEN-HORIN S, MARGALIT M, BOSSUYT P, et al. Combination immunomodulator and antibiotic treatment in patients with inflammatory bowel disease and *Clostridium difficile* infection[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2009, 7(9): 981-987.
- [9] DAS R, FEUERSTADT P, BRANDT L J. Glucocorticoids are associated with increased risk of short-term mortality in hospitalized patients with *Clostridium difficile*-associated disease [J]. *Am J Gastroenterol*, 2010, 105(9): 2040-2049.
- [10] FACHI J L, SÉCCA C, RODRIGUES P B, et al. Acetate coordinates neutrophil and ILC3 responses against *C. difficile* through FFAR2[J]. *J Exp Med*, 2020, 217(3): e20190489.
- [11] 中华预防医学会. 艰难梭菌感染诊断(T/CPMA 008-2020)[J]. *中华医院感染学杂志*, 2021, 31(2): 315-320.
- [12] 张雪梅, 袁振亚, 乔嘉凯, 等. 肠道菌群与抗生素相关性腹泻的关系[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(9): 2386-2393.
- [13] 王丽, 所鸿. 艰难梭菌的耐药性及耐药机制研究进展[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(20): 97-99.
- [14] 赵宝鑫, 强翠欣, 赵建宏. 艰难梭菌芽孢形成与萌发的研究进展[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2020, 20(5): 565-571.
- [15] NASIRI M J, GOUDARZI M, HAJIKHANI B, et al. *Clostridioides (Clostridium) difficile* infection in hospitalized patients with antibiotic-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis [J]. *Anaerobe*, 2018, 50: 32-37.
- [16] 金方方, 娄金丽. CD3 分子高表达 T 细胞的生物学特性与应用研究进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2019, 40(5): 601-604.
- [17] HUANG X J, NIE S P, CAI H L, et al. Study on *Dendrobium officinale* O-acetyl-glucomannan (Dendronan): Part IV. Immunomodulatory activity in vivo [J]. *J Funct Foods*, 2015, 15: 525-532.
- [18] 柳丽松, 柳鸾, 李艳, 等. 分泌型免疫球蛋白 A 在黏膜免疫中的作用[J]. *医学综述*, 2015, 21(11): 1927-1929.

(收稿日期:2024-08-14 修回日期:2024-09-13)