

邓书伟,杜春静,张玥,等. 肺孢子菌肺炎小鼠模型建立及免疫学评价 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 20-26.

Deng SW, Du CJ, Zhang Y, et al. Establishment and immunological evaluation of *Pneumocystis murina* pneumonia mouse model [J].

Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(1): 20-26.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.01.003

肺孢子菌肺炎小鼠模型建立及免疫学评价

邓书伟^{1,2,3}, 杜春静⁴, 张玥^{1,2,3}, 周妍希^{1,2,3}, 张亮⁵, 秦秋实⁶, 朱鏐变^{1,2,3,6*}

(1. 首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所, 新发突发传染病北京市重点实验室, 北京 100015;

2. 北京市感染性疾病研究中心, 北京 100015; 3. 国家传染病医学中心, 北京 100015; 4. 首都医科大学

附属北京地坛医院重症医学科, 北京 100015; 5. 首都医科大学附属北京地坛医院病理科, 北京 100015;

6. 北京大学地坛医院教学医院, 北京 100015)

【摘要】 目的 构建肺孢子菌肺炎(*Pneumocystis pneumonia*, PCP)小鼠模型并进行免疫学评价。方法 采用重度联合免疫缺陷(severe combined immunodeficiency, SCID)小鼠气管滴注肺孢子菌构建 PCP 模型, 通过实时荧光定量 PCR 及肺组织六胺银染色进行病原学鉴定, 通过苏木素-伊红染色评估肺组织损伤程度, 通过免疫荧光染色和流式细胞术进行免疫学评价。结果 模型组小鼠感染 6 周后, 肺组织肺孢子菌 rRNA 拷贝数显著高于假手术组, 六胺银染色可见肺孢子菌滋养体和包囊, 肺组织肺泡壁增厚, 肺间质增宽, 大量 Gr-1⁺ 中性粒细胞 CD68⁺ 巨噬细胞浸润, 中性粒细胞活化标志物髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)和巨噬细胞活化标志物一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)活化水平显著升高, 肺内及肺泡灌洗液的中性粒细胞和单核细胞数量及比例显著高于对照组和假手术组。结论 采用 SCID 小鼠进行气管滴注肺孢子菌能构建稳定的 PCP 小鼠模型, 该模型表现出与临床相似的免疫学特征。

【关键词】 肺孢子菌肺炎; 动物模型; 重度联合免疫缺陷小鼠; 中性粒细胞; 巨噬细胞

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 01-0020-07

Establishment and immunological evaluation of *Pneumocystis murina* pneumonia mouse model

DENG Shuwei^{1,2,3}, DU Chunjing⁴, ZHANG Yue^{1,2,3}, ZHOU Yanxi^{1,2,3}, ZHANG Liang⁵, QIN Qiushi⁶, ZHU Liuluan^{1,2,3,6*}

(1. Beijing Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China. 2. Beijing Infectious Diseases Research Center, Beijing 100015. 3. National Medical Center for Infectious Diseases, Beijing 100015. 4. Department of Critical Care Medicine, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015. 5. Pathology Department Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015. 6. Peking University Ditan Teaching Hospital, Beijing 100015)

Corresponding author: ZHU Liuluan. E-mail: zhuliuluan@ccmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To construct a mouse model of *Pneumocystis pneumonia* (PCP) and evaluate the immunological characteristics of the model mice. **Methods** A PCP model was established by endotracheal infusion of *Pneumocystis murine* into severe combined immune deficiency mice. The etiology was identified by quantitative real-time PCR and silver hexaammonium staining of lung tissue. The degree of lung tissue injury was assessed by HE staining, and immunological evaluation was performed by immunofluorescence staining and flow cytometry. **Results** After six weeks of *P. murina* infection, there were significantly more lung tissue rRNA copies from *P. murina* in the experimental group than the sham group. *P. murina* trophozoites and cysts were detected in lung tissue sections from mice in the experimental group

【基金项目】 国家自然科学基金(81871586, 82202415)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(81871586, 82202415).

【作者简介】 邓书伟(1998—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 感染免疫。Email: dengshuwei@126.com

【通信作者】 朱鏐变(1982—), 女, 研究员, 研究方向: 感染免疫。Email: zhuliuluan@ccmu.edu.cn

by silver hexaammonium staining. HE staining showed the alveolar walls of lung tissues in the experimental group were thickened, the lung interstitium was widened, and a large number of Gr-1⁺ neutrophils and CD68⁺ macrophages had infiltrated the lungs. The levels of myeloperoxidase, a marker of neutrophil activation, and nitric oxide synthase, a marker of macrophage activation, were significantly increased. Flow cytometry showed that the number and proportion of neutrophils and monocytes in the lungs and alveolar lavage fluid were significantly higher in the experimental group than the control and sham groups. **Conclusions** A stable PCP mouse model was established by endotracheal infusion of *P. murina* into SCID mice, which showed immunological characteristics similar to clinical signs.

【 Keywords 】 *Pneumocystis pneumonia*; animal model; severe combined immunodeficiency mouse; neutrophil; macrophage

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

肺孢子菌肺炎 (*Pneumocystis pneumonia*, PCP) 是艾滋病、肿瘤放化疗和器官移植患者等免疫低下人群常见的机会性感染及致死原因^[1]。随着各类免疫低下人群数目的增多, PCP 的发病率逐年攀升, 使得 PCP 的预防、治疗以及发病机制等方面的研究成为多学科关注热点^[2-4]。而构建 PCP 动物模型是研究肺孢子菌在宿主内的生活史、致病机制、药物筛选和疫苗研制的基础。

既往国内外实验室常使用大鼠或者日本大耳兔等动物构建 PCP 模型。由于小鼠具有与人类更接近的生化 and 遗传背景, 同时具有价格低廉、可获取性高、易于操作等优势, 近年来更多小鼠品系被用于制备 PCP 动物模型^[5-6]。目前国内外常使用免疫功能正常的小鼠构建 PCP 模型, 主要采用腹腔注射、皮下注射或口服地塞米松、醋酸氢化可的松等免疫抑制剂后, 使小鼠发生自然感染的方法。但上述模型构建方法因存在耗时较长、死亡率较高、免疫抑制剂注射次数多等缺点而难于获得理想的实验资料。

为获得耗时较短、操作简单、死亡率低且稳定的 PCP 小鼠模型, 使用 BALB/c 重度联合免疫缺陷 (severe combined immunodeficiency, SCID) 小鼠气管接种肺孢子菌 (*Pneumocystis murina*, *P. murina*) 构建 PCP 模型, 并通过病原学、分子生物学、细胞生物学实验技术对模型小鼠进行免疫学评价。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

19 只 SPF 级雄性 SCID 小鼠, 18 ~ 20 g, 6 ~ 8 周龄, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司【SCXK(京)2019-0008】, 饲养期间各组小鼠自由饮水。饲养环境: 昼夜各半循环照明, 湿度恒定, 温度

控制在 22 ~ 25℃。实验动物饲养及操作在中国食品药品检定研究院【SYXK(京)2022-0014】完成, 所有操作都符合首都医科大学动物实验及实验动物管理委员会的要求(AEEI-2020-054)。

1.1.2 主要试剂与仪器

肺孢子菌 (*Pneumocystis murina*, ATCC, PRA-111™), 六胺银染色试剂盒 (源叶, R30435), HE 染色试剂盒 (Solarbio, G1120), 胶原酶 IV (Sigma, C5183), RPMI-1640 培养基 (Gibco, A1049101), PrimeDirect® Probe RT-qPCR Mix (TaKaRa, RR650A), DAPI (Servicebio, G1012), 抗体 CD45 FITC (ThermoFisher Scientific, 11-0451-85), Gr-1 PE (BD Bioscience, 553128), CD11b PerCP-Cy5.5 (Tonbo, 65-0112-U025), CD48 APC (ThermoFisher Scientific, 17-0481-82), CD11c APC-Cy7 (Biolegend, 117324), Gr-1 (Servicebio, GB11129), CD68 (Servicebio, GB11067), MPO (Servicebio, GB11224), FITC-TSA (Servicebio, G1222), Cy3 标记山羊抗兔抗体 (Servicebio, GB21303), HRP 标记山羊抗兔抗体 (Servicebio, GB23303)。多色流式细胞仪 (BD Bioscience, FACS Canto II, 美国), 实时荧光定量 PCR 仪 (ThermoFisher Scientific, Applied Biosystems 7500, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 菌种保存及菌液制备

6 只 SCID 小鼠用于肺孢子菌保种传代, 参考 Zheng 等^[7]对肺孢子菌传代保种的方法, 将 1×10^6 的肺孢子菌包囊经鼻滴注 SCID 小鼠感染 6 周后麻醉处死小鼠, 取双侧肺组织剪碎, 使用 70 μm 细胞过滤器研磨滤过剪碎的肺组织, 使用无菌 PBS 吹吸过滤, 3000 r/min 离心 5 min 后弃去上清, 使用含 1% 链霉素及青霉素的 10% 二甲基亚砷和 90% 热灭活的胎牛血清制成的冻存液重悬, 液氮保存。

1.2.2 建立 PCP 动物模型

SCID 小鼠随机分为模型组 (Model)、假手术组 (Sham) 和空白对照组 (Control)。模型组和假手术组每组 5 只,空白对照组每组 3 只。模型组小鼠采用 200 μL 的 0.8% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,使用 0.2 μm 的 1 mL 胰岛素针气管内滴注 60 μL 含有 10^6 的肺孢子菌核糖体 RNA (rRNA) 拷贝数的肺组织匀浆液。假手术组小鼠气管内滴注 60 μL 正常 SCID 小鼠肺组织匀浆。空白对照组不做干预处理。

1.2.3 标本采集与制备

肺泡灌洗液细胞:模型组小鼠肺孢子菌感染 6 周,造模 6 周后,小鼠麻醉并行颈部脱臼处死,切开皮肤分离气管,引流管插入气管下端并固定,使用 1 mL 注射器插入引流管,吸取 500 μL 无菌 PBS 反复抽吸灌洗 3 次,收集全部肺泡灌洗液,1200 r/min 离心 5 min,底层细胞使用 100 μL PBS 重悬,获得肺泡灌洗液细胞。

肺组织:剪开小鼠胸腔行肺灌流,待全肺变白后取出双侧肺组织。左肺剪碎,加入 2 mL 消化液 (含 10% FBS 和 1 mg/mL 胶原酶 IV 的 RPMI-1640 培养基),37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床消化 30 min,使用 70 μm 细胞过滤器研磨,400 目滤网过滤,离心弃上清,收集肺组织白细胞,加入 300 μL PBS 重悬,用于流式细胞术分析和计数。右肺使用 4% 多聚甲醛固定。

1.2.4 实时荧光定量 PCR

使用 PrimeDirect[®] Probe RT-qPCR Mix 试剂盒检测小鼠肺组织匀浆中的肺孢子菌含量。探针序列为: 5'-FAM-CCCAGAATAATGAATAAAG-MGBNFQ-3'; 上游引物序列为: 5'-AGGTGAA AAGTCGAAAGGGAAAC-3', 下游引物为 5'-AAA ACCTCTTTTCTTTCACTCAGTAACA-3'。以肺孢子菌 rRNA 为模板构建表达质粒,作为标准品。

1.2.5 肺组织切片染色

将右侧完整肺组织 4% 多聚甲醛固定、石蜡包埋及病理切片,行常规苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 和六胺银染色,光镜下观察肺组织病理改变和肺孢子菌。

肺组织切片双重免疫荧光染色:肺组织切片脱蜡至水,抗原修复,牛血清白蛋白封闭,加入 1:200 稀释的一抗 Gr-1 湿盒内 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,加入相应 Cy3 二抗避光孵育 50 min,切片稍甩干后加入 FITC-TSA 避光孵育 10 min,洗涤。切片置于抗原修复液中微波处理,滴加 1:2000 稀释的一抗 CD68 湿盒 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,加入相应 HRP 二抗室温避光孵育 50 min,切片稍甩

干后滴加 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染色 10 min,封片,共聚焦显微镜观察。

1.2.6 流式细胞术

取 100 μL PBS 重悬的肺泡灌洗液细胞和肺组织白细胞加入抗 CD45、Gr-1、CD11b、CD48、CD11c 混合抗体进行 4 $^{\circ}\text{C}$ 染色,清洗,重悬,加入计数微珠,使用 FACS Canto II 流式细胞仪进行细胞分型和计数,使用 Flowjo 10.6.2 软件进行流式数据分析。

1.3 统计学分析

符合正态分布的实验数据以平均值 \pm 标准误差 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 表示,实验数据使用 Graphpad Prism 8.0 软件进行统计学分析,三组组间实验数据使用单因素方差分析进行比较。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织肺孢子菌含量

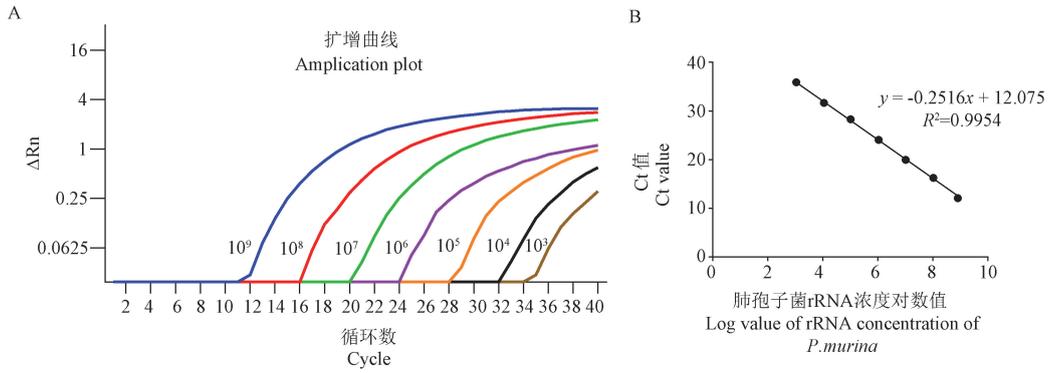
如图 1 所示,实时荧光定量 PCR 阳性质粒标准品的扩增曲线检测下限为 10^3 copies/ μL ,检测上限为 10^9 copies/ μL ,阳性标准品生成的标准曲线为 $y = -0.2516x + 12.075$, $R^2 = 0.9954$,线性关系良好。实时荧光定量 PCR 结果显示模型组的循环阈值 (Ct 值) 要明显低于空白对照组和假手术组,差异具有显著性 ($P < 0.01$)。同时模型组 Pc rRNA 拷贝数和空白对照组及假手术组相比较,差异具有显著性 ($P < 0.01$) (见表 1)。

2.2 肺组织原位病原学和病理检查

六胺银染色发现,模型组小鼠肺组织中可查见肺孢子菌子囊和滋养体 (图 2A),肺孢子菌阳性检出率为 80% (4/5),而空白对照组和假手术组六胺银染色镜检未见肺孢子菌滋养体或包囊。模型组小鼠肺组织六胺银染色可见肺孢子菌包囊呈圆形、椭圆形或月芽形,囊壁为淡褐色,囊内小体不着色,可见条索样结构。HE 染色可见空白对照组肺组织结构正常,假手术组肺组织结构可见轻度改变。与空白对照组和假手术组相比,模型组小鼠肺间质增宽,肺泡壁增厚,同时肺泡腔内可见泡沫样渗出,间质中有明显增多的中性粒细胞浸润 (图 2B)。

2.3 肺组织炎性细胞浸润分析

肺组织切片免疫荧光染色结果显示,空白对照组肺组织切片仅可见 DAPI 复染的细胞核,无 CD68 (绿色荧光) 和 Gr-1 (红色荧光) 阳性信号。假手术组中除可见 DAPI 复染的细胞核外,还可见少量



注: A:肺孢子菌 rRNA 阳性标准品的扩增曲线; B:肺孢子菌 rRNA 阳性标准品的标准曲线。

图 1 实时荧光定量 PCR 扩增曲线和标准曲线

Note. A. Amplification curve of the positive standard for the ribosomal RNA of *P. murina*. B. Standard curve of the ribosomal RNA positive standard for *P. murina*.

Figure 1 Quantitative real-time PCR amplification curve and standard curve

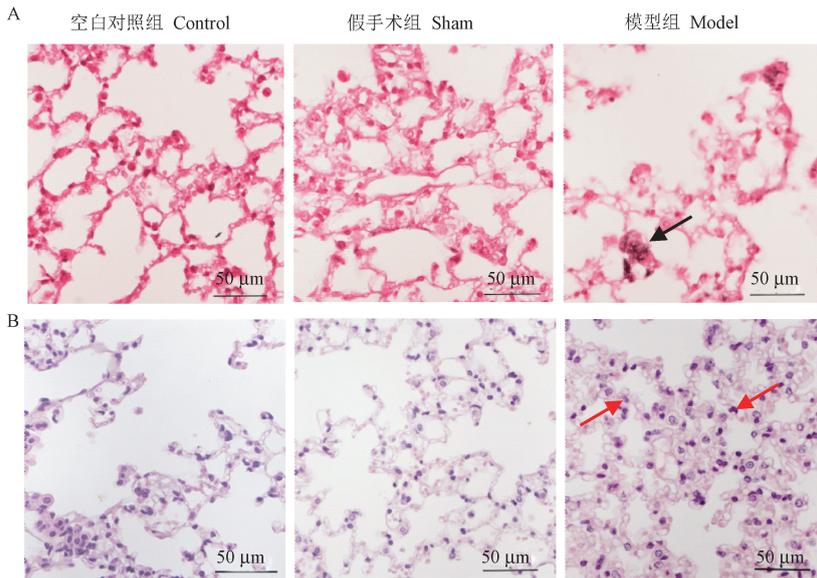
表 1 三组小鼠肺组织肺孢子菌检测结果比较

Table 1 Comparison of *P. murina* detection results in lung tissue of three groups of mice

指标 Index	空白对照组 Control	假手术组 Sham	模型组 Model	F 值 F value	P 值 P value
实时荧光定量 PCR (Ct value) qRT-PCR (Ct value)	30.83 ± 1.27	30.58 ± 0.56	21.92 ± 1.55 *	16.11	< 0.01
肺孢子菌 rRNA 浓度对数值 (Log10 copies/μL) Log value of rRNA concentration of <i>P. murina</i> (Log10 copies/μL)	3.03 ± 0.39	3.72 ± 0.31	6.56 ± 0.39 *	25.45	< 0.001
六胺银检测阳性率 Positive rate of gomori-methenamine silver stain	0	0	80%	/	/

注:六胺银检测阳性率:阳性样本量/检测的样本量;与假手术组相比, *P < 0.05。

Note. Positive rate of gomori-methenamine silver stain. Positive samples divided by the tested samples. Compared with sham group, *P < 0.05.



注: A:小鼠肺组织六胺银染色,黑色箭头所示为肺孢子菌包囊; B:小鼠肺组织 HE 染色,红色箭头所示为肺组织粒细胞浸润。

图 2 小鼠肺组织六胺银和 HE 染色

Note. A. Gomori-methenamine silver stain of mice lung tissue, and the cysts of *P. murina* are shown by the black arrow. B. HE staining of mouse lung tissue. The red arrow shows granulocytes infiltration.

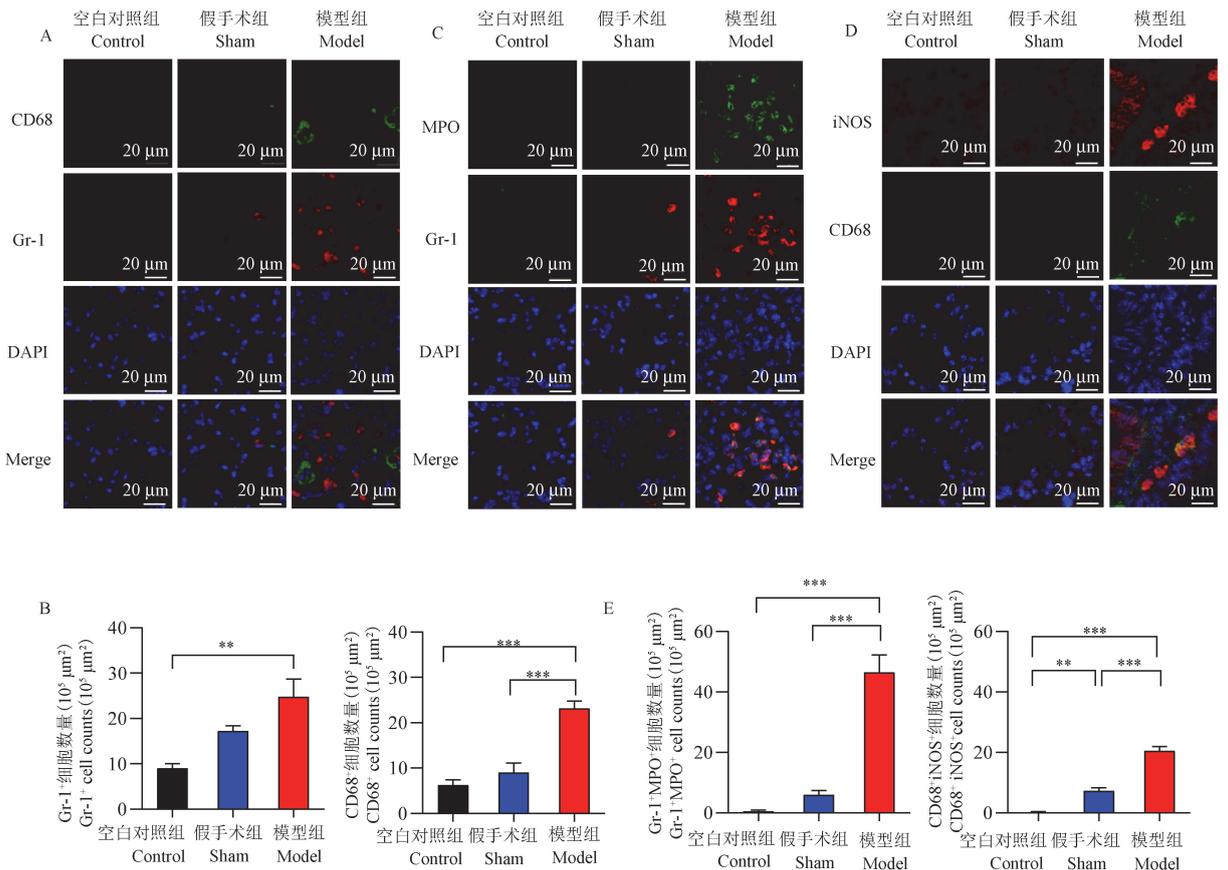
Figure 2 Gomori-methenamine silver and HE stain of mice lung tissue

CD68⁺巨噬细胞(绿色荧光)和 Gr-1⁺中性粒细胞(红色荧光)浸润于肺间质(图 3A)。与空白对照组和假手术组相比,模型组小鼠肺组织切片 CD68⁺巨噬细胞(绿色荧光)和 Gr-1⁺中性粒细胞(红色荧光)浸润明显增多。显微计数统计分析结果显示,模型组小鼠肺组织中性粒细胞计数高于空白对照组,差异具有显著性($P < 0.01$);模型组巨噬细胞计数高于空白对照组和假手术组,差异具有显著性($P < 0.001$) (图 3B)。此外,中性粒细胞活化标志髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)在模型组小鼠肺组织中的表达水平显著高于空白对照组和假手术组(图 3C, 3E);同时,巨噬细胞活化标志一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)在模型组小鼠肺组织中的表达水平显著高于空白对照组和假手

术组,差异具有显著性(图 3D, 3E),提示在模型组中的中性粒细胞和巨噬细胞活化水平显著升高。

2.4 流式分析肺脏免疫细胞变化

空白对照组、假手术组、模型组小鼠肺组织和肺泡灌洗液中性粒细胞和单核细胞变化见表 2。统计结果显示,肺组织中,与空白对照组和假手术组相比,模型组中性粒细胞计数和中性粒细胞占白细胞百分比均显著升高($P < 0.05$);同时模型组单核细胞计数及单核细胞占白细胞百分比也显著高于空白对照组和假手术组($P < 0.05$)。在肺泡灌洗液中,与空白对照组和假手术组相比,模型组中性粒细胞计数和中性粒细胞占白细胞百分比显著升高($P < 0.05$);同时模型组单核细胞计数和单核细胞占白细胞百分比也显著升高($P < 0.05$)。



注:A:肺组织 CD68⁺巨噬细胞和 Gr-1⁺中性粒细胞免疫荧光染色;B:巨噬细胞和中性粒细胞计数;C:肺组织 Gr-1 和 MPO 免疫荧光染色;D:肺组织 CD68 和 iNOS 免疫荧光染色;E:肺组织 Gr-1⁺MPO⁺活化中性粒细胞和 CD68⁺iNOS⁺活化巨噬细胞计数。两组间比较,** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 3 肺组织免疫荧光双重染色

Note. A. Lung tissue CD68⁺ macrophages and Gr-1⁺ neutrophils immunofluorescence staining. B. The counts of macrophages and neutrophils in the lung. C. Immunofluorescence staining for Gr-1 and MPO in lung tissue. D. Immunofluorescence staining for CD68 and iNOS in lung tissue. E. The counts of Gr-1⁺MPO⁺ activated neutrophils and CD68⁺iNOS⁺ activated macrophages in the lung. Compared between two groups, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 3 Double immunofluorescence staining of lung tissue

表 2 流式细胞术分析 PCP 模型小鼠免疫学变化

Table 2 Immunological changes of PCP model mice analyzed by flow cytometry

样本类型 Sample types	指标 Index	空白对照组 Control	假手术组 Sham	模型组 Model
肺 Lung	粒细胞计数($\times 10^4$) Neutrophils count($\times 10^4$)	0.03 ± 0.01	1.81 ± 0.98	25.4 ± 4.10*
	单核细胞计数($\times 10^2$) Monocytes count($\times 10^2$)	0.19 ± 0.18	0.75 ± 0.51	124.84 ± 26.68*
	粒细胞百分比(%) Percentage of neutrophils(%)	6.02 ± 1.48	40.44 ± 19.07	84.86 ± 3.36*
	单核细胞百分比(%) Percentage of monocytes(%)	0.31 ± 0.18	0.15 ± 0.08	4.23 ± 0.70*
	粒细胞计数($\times 10^2$) Neutrophils count($\times 10^2$)	1.58 ± 0.34	3.87 ± 1.32	322.79 ± 143.09*
	单核细胞计数($\times 10^2$) Monocytes count($\times 10^2$)	0.80 ± 0.13	0.91 ± 0.23	1.72 ± 1.04*
肺泡灌洗液 Bronchoalveolar fluid	粒细胞百分比(%) Percentage of neutrophils(%)	0.07 ± 0.02	0.20 ± 0.04	32.52 ± 12.26*
	单核细胞百分比(%) Percentage of monocytes(%)	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.39 ± 0.10*

注:粒细胞百分比;中性粒细胞占 CD45⁺白细胞的比例;单核细胞占 CD45⁺白细胞的比例;与假手术组相比,* $P < 0.05$ 。

Note. Percentage of granulocytes. Percentage of neutrophils to CD45⁺ white blood cells. Percentage of monocytes. Percentage of monocytes to CD45⁺ white blood cells. Compared with sham group, * $P < 0.05$.

3 讨论

本研究通过对 SCID 小鼠气道内接种肺孢子菌获得稳定的 PCP 模型。qRT-PCR 检测肺孢子菌感染具有高灵敏度和特异性,该方法已成熟用于 PCP 动物模型肺样本的肺孢子菌载量检测,以及早期肺孢子菌感染的临床辅助诊断^[8-10]。本研究通过 qRT-PCR 发现,模型组小鼠肺孢子菌载量显著高于空白对照组和假手术组,表明该研究的模型构建方法可靠。

模型组小鼠肺组织切片六胺银染色查见肺孢子菌包囊和滋养体,阳性检出率为 80%,HE 结果显示,与空白对照组和假手术组相比,模型组小鼠肺组织损伤明显,模型组小鼠肺组织可见明显的肺间质增宽,肺泡壁增厚、肺泡内红细胞渗出,大量中性粒细胞浸润。模型组小鼠肺组织损伤程度可能与小鼠品系及免疫背景有关。Walzer 等^[11]发现皮下注射免疫抑制剂诱导小鼠发生肺孢子菌感染,C3H/HeN 品系小鼠能发生重度感染,而 BALB/c 和 C57BL/6N 小鼠发生中度的肺孢子菌感染。Wright 等^[12]发现重度免疫缺陷的 CB17 小鼠能发生正常的肺孢子菌感染,但未出现肺部炎症。同时发现与 CD4⁺CD8⁺T 细胞耗竭的小鼠相比,CD4⁺T 细胞耗竭的小鼠在肺孢子菌感染后出现更严重的肺部炎症。当然,PCP 模型小鼠肺组织病理改变可能与肺孢子菌接种菌量及感染时间相关。Zhang 等^[13]发现,

PD-1 敲除的小鼠经地塞米松诱导免疫抑制后气管内接种肺孢子菌,PCP 小鼠的肺组织 HE 染色结果显示 PD-1 敲除小鼠的肺部炎症情况在肺孢子菌感染早期较轻,接种后的 3 ~ 7 周内炎症细胞浸润不断增加。McKinley 等^[14]发现在 PCP 模型小鼠中,CD4⁺CD25⁺的调节性 T 细胞发挥控制炎症反应的作用,肺孢子菌感染的初期 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞在 14 d 达到峰值,小鼠肺部炎症较轻,随着肺孢子菌接种时间的进展,CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞开始降低,此时小鼠肺泡灌洗液中炎症细胞越来越多,肺损伤也越来越重。

多项研究显示,肺泡灌洗液中分离的中性粒细胞可作为非艾滋免疫缺陷 PCP 病人的预后评估指标,也能作为艾滋 PCP 病人短期预后的独立风险因素^[15-17]。Zhang 等^[18]发现,在非艾滋免疫缺陷的 PCP 病人的肺泡灌洗液中有大量增多的中性粒细胞,这些 PCP 病人循环血液中的中性粒细胞和 CD4⁺T 细胞分别高表达 PD-L1 和 PD-1 分子,提示中性粒细胞可能通过调节淋巴细胞功能发挥杀菌作用。虽然目前关于中性粒细胞在 PCP 疾病进展中的具体作用及其机制还未阐明,但是动物研究发现随着 PCP 进展,肺组织损伤都伴随着中性粒细胞的大量浸润^[19]。这些在临床艾滋和非艾滋 PCP 病人及 PCP 动物研究中的结果均提示,中性粒细胞参与肺脏组织损伤。此外,炎症单核细胞可被募集至感染部位发挥直接杀菌作用,同时它也是巨噬细胞

及树突状细胞的前体细胞,但关于炎性单核细胞在肺孢子菌感染模型中很少有报道。为了进一步明确 PCP 小鼠模型肺内免疫学变化,本研究对肺组织进行了免疫荧光双重染色,同时对肺组织内细胞及肺泡灌洗液分离的细胞进行流式细胞术检测。肺组织免疫荧光双重染色结果显示,与空白对照组和假手术组相比,模型组小鼠肺组织中中性粒细胞和巨噬细胞浸润明显增多,同时细胞活化程度显著升高。流式检测发现,在肺泡灌洗液和肺组织中的中性粒细胞计数和百分比均显著高于空白对照组和假手术组,与既往报道的 PCP 动物肺组织大量粒细胞浸润结果一致。

综上,使用 SCID 小鼠经气管切开接种定量的肺孢子菌,不仅能获得稳定的 PCP 动物模型资料,还能通过控制小鼠初始感染程度以缩短成模时间和提高模型小鼠的存活率,该模型方法有望成为未来开展 PCP 研究的基础。

参 考 文 献(References)

- [1] Gillóniz C, Dominedò C, Álvarez-Martínez MJ, et al. *Pneumocystis pneumonia* in the twenty-first century: HIV-infected versus HIV-uninfected patients [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2019, 17(10): 787-801.
- [2] Ghembaza A, Vautier M, Cacoub P, et al. Risk factors and prevention of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with autoimmune and inflammatory diseases [J]. *Chest*, 2020, 158(6): 2323-2332.
- [3] Park JW, Curtis JR, Moon J, et al. Prophylactic effect of trimethoprim-sulfamethoxazole for *Pneumocystis pneumonia* in patients with rheumatic diseases exposed to prolonged high-dose glucocorticoids [J]. *Ann Rheum Dis*, 2018, 77(5): 644-649.
- [4] Wang J, Gigliotti F, Bhagwat SP, et al. Immune modulation with sulfasalazine attenuates immunopathogenesis but enhances macrophage-mediated fungal clearance during *Pneumocystis pneumonia* [J]. *PLoS Pathog*, 2010, 6(8): e1001058.
- [5] 郭鄂平,唐慕湘,宋明华. 小鼠卡氏肺孢子虫肺炎的实验研究 [J]. *陕西医学杂志*, 2004, 33(1): 12-13, 24.
- Guo EP, Tang MX, Song MH. Experimental study on *Pneumocystis carinii* pneumonia in mice [J]. *Shaanxi Med J*, 2004, 33(1): 12-13, 24.
- [6] Consortium MGS, Waterston RH, Lindblad-Toh K, et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome [J]. *Nature*, 2002, 420(6915): 520-562.
- [7] Zheng M, Shellito JE, Marrero L, et al. CD4⁺ T cell-independent vaccination against *Pneumocystis carinii* in mice [J]. *J Clin Invest*, 2001, 108(10): 1469-1474.
- [8] 刘文静,伊洁,窦亚玲,等. 实时荧光 PCR 和六胺银染色对肺孢子菌肺炎诊断价值的分析评价 [J]. *现代检验医学杂志*, 2017, 32(5): 28-31.
- Liu WJ, Yi J, Dou YL, et al. Evaluation of real-time PCR and gomori-methenamine silver stain for diagnosing of *Pneumocystis pneumonia* [J]. *J Mod Lab Med*, 2017, 32(5): 28-31.
- [9] Alshahrani MY, Alfai M, Ahmad I, et al. *Pneumocystis jirovecii* detection and comparison of multiple diagnostic methods with quantitative real-time PCR in patients with respiratory symptoms [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2020, 27(6): 1423-1427.
- [10] Gazonis S, Bergeron A, Menotti J, et al. *Pneumocystis jirovecii* and quantitative PCR: pneumonia or colonization? [J]. *Rev Mal Respir*, 2020, 37(4): 299-307.
- [11] Walzer PD, Powell RD Jr, Yoneda K. Experimental *Pneumocystis carinii* pneumonia in different strains of cortisonized mice [J]. *Infect Immun*, 1979, 24(3): 939-947.
- [12] Wright TW, Gigliotti F, Finkelstein JN, et al. Immune-mediated inflammation directly impairs pulmonary function, contributing to the pathogenesis of *Pneumocystis carinii* pneumonia [J]. *J Clin Invest*, 1999, 104(9): 1307-1317.
- [13] Zhang C, Rong HM, Li T, et al. PD-1 deficiency promotes macrophage activation and T-helper cell type 1/T-helper cell type 17 response in *Pneumocystis pneumonia* [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2020, 62(6): 767-782.
- [14] McKinley L, Logar AJ, McAllister F, et al. Regulatory T cells dampen pulmonary inflammation and lung injury in an animal model of *Pneumocystis pneumonia* [J]. *J Immunol*, 2006, 177(9): 6215-6226.
- [15] Lee JY, Park HJ, Kim YK, et al. Cellular profiles of bronchoalveolar lavage fluid and their prognostic significance for non-HIV-infected patients with *Pneumocystis jirovecii* pneumonia [J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(4): 1310-1316.
- [16] Kim SJ, Lee J, Cho YJ, et al. Prognostic factors of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients without HIV infection [J]. *J Infect*, 2014, 69(1): 88-95.
- [17] 李爱新,黄春洋,张宏伟,等. 艾滋病合并肺孢子菌肺炎患者近期预后危险因素分析 [J]. *中华医学杂志*, 2017, 97(11): 833-837.
- Li AX, Huang CY, Zhang HW, et al. Research on risk factors of short-term outcome in AIDS patients with *Pneumocystis pneumonia* [J]. *Nation Med J Chin*, 2017, 97(11): 833-837.
- [18] Zhang NN, Huang X, Zhang Y, et al. Programmed death ligand 1 is overexpressed by neutrophils in the blood of immunocompromised human immunodeficiency virus-negative patients with *Pneumocystis jirovecii* pneumonia [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2019, 132(10): 1237-1240.
- [19] Vassallo R, Standing JE, Limper AH. Isolated *Pneumocystis carinii* cell wall glucan provokes lower respiratory tract inflammatory responses [J]. *J Immunol*, 2000, 164(7): 3755-3763.