

唐梓宁,陈相池,刘学武,等. 免疫抑制介导大鼠侵袭性黑曲霉菌肺病模型的构建与评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(6): 63-72.

Tang ZN, Chen XC, Liu XW, et al. Construction and evaluation of an immunosuppression-mediated model of invasive *Aspergillus niger* lung disease in rats [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(6): 63-72.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.06.008

免疫抑制介导大鼠侵袭性黑曲霉菌肺病模型的构建与评价

唐梓宁^{1,2}, 陈相池^{1,2}, 刘学武^{1,2}, 周志敏^{1,2}, 厉巧^{1,2}, 肖洒^{1,2}, 姜德建^{1,2}, 彭冬冬^{1,2*}

(1.湖南普瑞玛药物研究中心有限公司,长沙 410329;2.新药药效与安全性评价湖南省重点实验室,长沙 410329)

【摘要】 目的 本研究建立免疫抑制大鼠侵袭性黑曲霉菌肺病模型,为抗侵袭性肺曲霉病药物药效学评价及机制研究提供理论支持。方法 将 60 只 SD 大鼠随机分为正常对照组、环磷酰胺对照组、环磷酰胺+真菌感染低、中、高剂量组,每组 12 只动物。每天进行一般临床观察,分别于造模第 3、7 天采用 ELISA 法检测血清中免疫球蛋白 G(IgG)、免疫球蛋白 M(IgM)、血清半乳糖甘露聚糖(GM)水平,并检测外周血 CD4⁺、CD8⁺ 细胞比例及白细胞(WBC)、中性粒细胞(Neu)含量,同时观察肺泡灌洗液黑曲霉菌负荷和大鼠肺组织形态学变化。结果 环磷酰胺对照组、环磷酰胺+真菌感染低、中、高剂量组大鼠造模后均出现自主活动减少及竖毛,且环磷酰胺+真菌感染低、中、高剂量组大鼠伴有呼吸急促,可闻及肺部湿音;与正常对照组比较,环磷酰胺对照组大鼠血中 CD4⁺、WBC、Neu、IgG、IgM 水平均显著减少,CD8⁺ 比例显著增加($P<0.05$, $P<0.01$);与环磷酰胺对照组比较,环磷酰胺+真菌感染中、高剂量组大鼠血中 IgG、IgM、CD4⁺ 水平均显著减少($P<0.05$, $P<0.01$),环磷酰胺+真菌感染低、中、高剂量组大鼠血中 WBC、Neu 水平均显著减少($P<0.05$, $P<0.01$),环磷酰胺+真菌感染中、高剂量组大鼠血中 CD8⁺ 水平显著升高($P<0.05$, $P<0.01$),环磷酰胺+真菌感染低、中、高剂量组大鼠血中 GM 水平及肺泡灌洗液黑曲霉菌负荷均显著增加($P<0.05$, $P<0.01$);环磷酰胺+真菌感染低、中、高剂量组大鼠肺组织出现菌丝分布和肺泡上皮破坏、肺泡内支气管上皮杯状细胞增多,炎症细胞浸润,其病变程度与造模剂量呈正相关。结论 本研究采用黑曲霉菌联合环磷酰胺免疫抑制剂构建侵袭性黑曲霉菌肺病模型,病程与菌液浓度和造模时间呈正相关,证实细胞免疫在该病发病机制方面中发挥重要作用,同时免疫球蛋白也可影响侵袭性肺曲霉病疾病的发展过程,推测侵袭性肺曲霉病发病机制可能与体液免疫中免疫球蛋白水平有关。

【关键词】 侵袭性肺曲霉病;免疫抑制;体液免疫;细胞免疫

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 06-0063-10

Construction and evaluation of an immunosuppression-mediated model of invasive *Aspergillus niger* lung disease in rats

TANG Zining^{1,2}, CHEN Xiangchi^{1,2}, LIU Xuewu^{1,2}, ZHOU Zhimin^{1,2}, LI Qiao^{1,2}, XIAO Sa^{1,2},
JIANG Dejian^{1,2}, PENG Dongdong^{1,2*}

(1. Hunan Prima Drug Research Center Co. Ltd, Changsha 410329, China.

2. Hunan Key Laboratory of Pharmacodynamics and Safety Evaluation of New Drugs, Changsha 410329)

【Abstract】 Objective This study established a model of invasive *Aspergillus niger* lung disease in immunosuppressed rats to provide theoretical support for the pharmacodynamic evaluation of anti-invasive pulmonary

[基金项目] 湖南省企业科技创新创业团队支持计划(2021)。

[作者简介] 唐梓宁(1997—),男,研究方向:新药药效与安全性评价。E-mail: tangzininga@163.com

[通信作者] 彭冬冬(1990—),男,研究方向:新药药效与安全性评价。E-mail: pengdongdong@hnse.org

aspergillosis drugs and mechanism studies. **Methods** Sixty SD rats were randomly divided into a normal control group; cyclophosphamide control group, and cyclophosphamide+fungal infection low, medium, and high dose groups, with 12 animals in each group. General clinical observations were performed daily, and the serum levels of immunoglobulin (Ig)G and IgM and galactomannan (GM) were detected by ELISA on the 3rd and 7th days of modeling. Simultaneously, the ratio of CD4⁺ and CD8⁺ cells, content of white blood cells (WBCs) and neutrophils (Neu) in peripheral blood, the *Aspergillus niger* load in alveolar lavage, and morphological changes to rat lung tissue were observed. **Results** Rats in the cyclophosphamide control and cyclophosphamide+fungal infection groups showed reduced voluntary activity and erect hair after modeling, and rats in the cyclophosphamide+fungal infection group also had shortness of breath and audible wet rhonchi in the lungs. Compared with the normal control group, rats in the cyclophosphamide control group showed significant reductions in the levels of CD4⁺, WBC, Neu, IgG, and IgM in the blood, and their proportion of CD8⁺ cells was significantly higher ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the cyclophosphamide control group, rats in the cyclophosphamide+fungal infection medium- and high-dose groups had significantly reduced blood levels of IgG, IgM, and CD4⁺ cells ($P < 0.05$, $P < 0.01$); while the cyclophosphamide+fungal infection low-, medium-, and high-dose groups had significantly reduced blood levels of WBC and Neu ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Additionally, rats in the cyclophosphamide+fungal infection medium- and high-dose groups had significantly increased blood CD8⁺ cells ($P < 0.05$, $P < 0.01$), Blood GM levels and the alveolar lavage *Aspergillus niger* load were significantly increased in rats in the cyclophosphamide+fungal infection low-, medium-, and high-dose groups compared with the cyclophosphamide control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The lung tissues of the cyclophosphamide+fungal infection low-, medium-, and high-dose groups showed mycelial distribution and destruction of alveolar epithelium, increase of bronchial epithelial cup cells in the alveoli, and infiltration of inflammatory cells, and the degree of lesions was positively correlated with the modeling dose. **Conclusions** In this study, we used *Aspergillus niger* combined with cyclophosphamide immunosuppressant to construct a model of invasive *Aspergillus niger* lung disease. The duration of the disease was positively correlated with the concentration of bacterial fluid and modeling time, confirming that cellular immunity plays an important role in the pathogenesis of the disease. At the same time, Ig can also affect the development of invasive pulmonary aspergillosis, and it is speculated that the pathogenesis may be related to the level of Ig produced by humoral immunity.

[Keywords] invasive pulmonary aspergillosis; immunosuppression; humoral immunity; cellular immunity

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

侵袭性肺曲霉病(invasive pulmonary aspergillosis, IPA)是指由曲霉菌侵入支气管及肺组织,进而引起局限性肉芽肿或广泛化脓性组织病理损伤的真菌感染性疾病,主要感染免疫力低下人群^[1-3]。在自然界中有多种曲霉菌能够引起人类和动物的感染,最常见的致病菌为烟曲霉,其次为黄曲霉和黑曲霉等^[4]。虽然黑曲霉为低毒力真菌,通常不会引起侵袭性感染,但其易通过空气传播感染免疫抑制治疗或接受化疗后中性粒细胞减少或实质性器官移植的患者,在患者气管内定植、感染引发 IPA,从而导致 IPA 的发病率和病死率逐年升高,因此黑曲霉的病例报告逐渐走入大众视野,并引起人们广泛的关注。有研究证明免疫细胞可参与侵袭性肺曲霉菌病的发病机制,但体液免疫在该病发病机制中的作用尚不清楚^[5-9]。因此本研究拟采用黑曲霉菌联合环磷酰胺免疫抑制剂构建大鼠侵袭性黑曲霉菌肺病模型,进一步验证细胞免疫是否参与该病的发病机制,同时探讨体液免疫介导大鼠侵袭性黑

曲霉菌肺病的发病机制,为该类疾病模型的构建以及药物的药效作用评价提供新的方向。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只,5~6 周龄,体重 160~180 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供[SCXK(湘)2019-0004],饲养于湖南普瑞玛药物研究中心有限公司屏障环境动物实验室 ABSL-II (长卫健实备字(2021)第 B010 号)[SYXK(湘)2020-0015],期间给予大鼠全价颗粒饲料,自由饮水,室温 20~26 ℃,湿度 40%~70%,光照明暗各 12 h,通风良好,动物实验经湖南普瑞玛药物研究中心有限公司实验动物管理伦理委员会批准(IACUC-2022(3)045),实验过程中遵循 3R 原则。

1.1.2 真菌

黑曲霉菌,编号:500373389,由中南大学湘雅二

医院检验科提供,在病原微生物 BSL- II 实验室培养和扩增,实验前 2 d 将菌株复苏并接种于实验室自制培养基上,于 CO₂ 恒温培养箱 37 ℃ 培养 48 h,收集真菌并用 0.9% 氯化钠注射液分别稀释浓度为 1×10⁷、1×10⁸、1×10⁹ CFU/mL 的混悬液,2~8 ℃ 备用。

1.2 主要试剂与仪器

注射用环磷酰胺(规格:每瓶 0.2 g,有效期 2022.12,生产单位:Baxter Oncology GmbH);舒泰 50(规格:每瓶 5 mL,批号:8EM1A,生产单位:法国维克有限公司);大鼠半乳甘露聚糖(GM)试剂盒、大鼠免疫球蛋白 G(IgG)、免疫球蛋白 M(IgM)试剂盒(规格:96 T,生产单位:黄石市艾恩斯生物科技有限公司);CD3 Monoclonal Antibody(Invitrogen);CD4 Monoclonal Antibody(BD Pharmingen);CD8 Monoclonal Antibody(Biolegend)。

BC-5000Vet 型兽用五分类血液细胞分析仪(深圳迈瑞公司);C6 流式细胞仪(美国 BD);BCR-MI02-72-C11-PPSU 大鼠独立通气笼盒系统(山东新华医疗器械股份有限公司);BSC1300-II-B2 型生物安全柜(山东新华医疗器械股份有限公司);DFC 420C 病理成像系统(德国 Leica 公司生产);BX43 型生物显微镜+MD50 型数码成像系统(日本奥林巴斯公司);Spectra Max i3x 多功能酶标仪(上海美谷光子公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 分组与造模

取检疫合格 SPF 级 SD 大鼠 60 只,按体重随机分为正常对照组、环磷酰胺对照组、环磷酰胺+真菌感染低、中、高剂量组(1×10⁷、1×10⁸、1×10⁹ CFU/mL),每组 12 只。除正常对照组外其余各组大鼠腹腔注射 45 mg/kg 环磷酰胺,隔天 1 次,连续注射 3 次,诱导大鼠免疫力低下,正常对照组大鼠同期腹腔注射等量的 0.9% 氯化钠注射液。末次注射后 24 h,各组大鼠轻微麻醉后,将其仰卧解剖板上呈 30~45° 角倾斜位置,用 1 mL 的注射器吸取黑曲霉菌悬液 0.5 mL,连接穿刺长针,耳镜下暴露大鼠气管,注入气管内,抽出插管后,实验动物仍旧保持原倾斜位置约 10 s,使残留感染悬液,由于重力的作用流入支气管和肺泡内而引起感染,当天造模 1 次,复制侵袭性肺曲霉病模型。

1.3.2 黑曲霉菌鉴定

选择真菌 ITS 通用引物(ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS2: 5'-

TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')为待测菌液(Sample1)扩增引物,使用 TSINGKE 植物 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,扩增目标菌株的 ITS rDNA 序列,将 PCR 产物进行测序。根据测序的结果,通过 NCBI 数据库进行相似序列搜索,使用 MEGA 软件构建菌株发育树。

1.3.3 一般体征观察

每天观察各组大鼠活动状态、背毛、呼吸、自主活动等。

1.3.4 免疫球蛋白及血清半乳甘露聚糖含量测定

各组于造模第 3、7 天(D3、D7),各组选取 6 只动物采用颈静脉采血 0.5 mL,3000 r/min 离心 10 min,取上清液,采用大鼠 ELISA 试剂盒检测血清中 IgG、IgM、GM 含量。

1.3.5 细胞免疫指标检测

各组于造模 D3 和 D7,各组选取 6 只动物采用颈静脉采血 1 mL,采用流式细胞仪检测淋巴细胞亚群 CD4⁺、CD8⁺ 百分比。

1.3.6 血常规检测

各组于造模 D3 和 D7,各组选取 6 只动物采用颈静脉采血 0.5 mL,置于 1.5 mL EDTA 抗凝 EP 管中,采用兽用五分类血液细胞分析仪检测血中白细胞、中性粒细胞数量。

1.3.7 肺泡灌洗液中黑曲霉菌负荷量测定

各组于造模 D3 和 D7,各组选取 6 只动物按 60 mg/kg 腹腔注射舒泰 50 后,腹主动脉放血安乐死,解剖取肺,将大鼠右肺中下叶进行结扎,采用 4 mL 的 0.9% 氯化钠注射液,从气管开口处注入右肺上叶进行肺泡灌洗,收集肺泡灌洗液。取肺泡灌洗液进行 10 倍、100 倍、1000 比例稀释:10⁻¹、10⁻² 和 10⁻³。无菌条件下分别吸取原液及 10⁻¹、10⁻² 和 10⁻³ 3 个稀释度的菌液 0.1 mL,均匀涂布到沙氏葡萄糖琼脂培养基上,每个稀释度重复 2 个平板,平放恒温箱上 30 min 左右,使菌液渗入培养基表层内,然后倒置平板于 (35±2) ℃ 恒温箱中培养 3 d,真菌计数结果参考 GB4719.15-2016 霉菌计数。

1.3.8 肺组织病理学观察

分别于造模 D3 和 D7,各组选取 6 只动物按 60 mg/kg 腹腔注射舒泰 50 后,腹主动脉放血安乐死,解剖取左侧肺组织置于 10% 中性福尔马林液中固定,切片包埋,HE 染色,利用病理成像系统观察肺组织形态学的改变。

1.4 统计学方法

本实验数据采用 SPSS 22.0 统计软件进行分

析, 计量资料采用平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$), 两组间数据比较, 采用 t 检验, 多组间数据进行方差齐和正态性检验比较, 以 $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果

2.1 黑曲霉菌鉴定

如图 1 所示, 对 Sample1 菌液 ITS rDNA 扩增产物进行进行测序, 根据测序结果, 构建菌株发育树。根据形态学特征和分子特征的鉴定结果, 确认 Sample1 为黑曲霉菌 (*Aspergillus niger*)。

2.2 一般体征观察

试验期间正常对照组大鼠活动状态佳, 背部毛发光泽, 呼吸频率稳定, 无明显异常变化; 环磷酰胺对照组和各真菌感染组大鼠均出现自主活动减少及竖毛现象, 且真菌感染组大鼠伴有呼吸急促, 可闻及肺部湿罗音, 随着造模时间延长, 部分动物出

现萎靡不振。

2.3 大鼠血清中免疫球蛋白含量的变化

表 1、表 2 所示, 与正常对照组比较, 造模 D3 和造模 D7 环磷酰胺对照组大鼠血清中 IgG、IgM 的含量显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与环磷酰胺对照组比较, 造模 D3 和造模 D7 环磷酰胺+真菌感染中、高剂量组大鼠血清中 IgG、IgM 的含量显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。

2.4 大鼠血清中曲霉菌血清标志物 GM 含量变化

如表 3 所示, 与正常对照组比较, 造模 D3 和造模 D7 环磷酰胺对照组大鼠血清半乳甘露聚糖含量无统计学意义; 与环磷酰胺对照组比较, 造模 D3 和造模 D7 环磷酰胺+真菌感染低、中、高剂量组血清半乳甘露聚糖含量均显著升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。

2.5 大鼠血中淋巴细胞亚群的变化

如表 4、表 5 及图 2 所示, 与正常对照组比较,

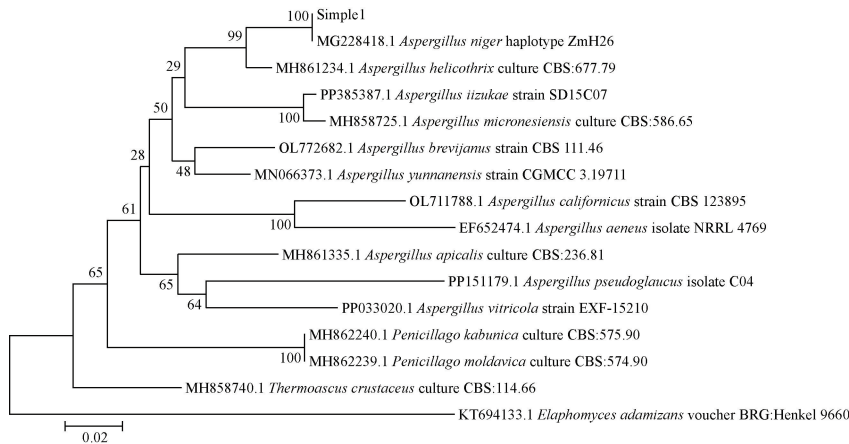


图 1 Sample1 待测菌液系统发育树
Figure 1 Phylogenetic tree of Sample1 bacterial fluids to be tested

表 1 黑曲霉菌对免疫抑制大鼠血清 IgG 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 1 Effect of *Aspergillus niger* on serum IgG in immunosuppressed rats

组别 Groups	染菌剂量 /(CFU/mL) Bacterial dose	IgG/(mg/mL)	
		造模 D3 Modeling D3	造模 D7 Modeling D7
正常对照组 Normal control group	/	13.26±0.87	12.68±0.83
环磷酰胺对照组 Cyclophosphamide control group	/	11.51±1.17*	10.31±0.63**
低剂量组 Low-dose group	1×10 ⁷	10.56±0.64	10.28±0.98
环磷酰胺+真菌感染 Cyclophosphamide + fungal infection	中剂量组 Medium-dose group	8.72±1.01##	9.47±0.71#
	高剂量组 High-dose group	8.60±0.76##	8.32±0.66##

注: 与正常对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与环磷酰胺对照组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the normal control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with the cyclophosphamide control group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

造模 D3 和造模 D7 环磷酰胺对照组大鼠外周血中 CD4⁺ 细胞比例显著降低, CD8⁺ 细胞比例显著升高 ($P<0.05, P<0.01$); 与环磷酰胺对照组比较, 造模 D3 和造模 D7 环磷酰胺+真菌感染中、高剂量组大鼠外周血中 CD4⁺ 细胞比例显著降低, CD8⁺ 细胞比例显著升高 ($P<0.05, P<0.01$)。

表 2 黑曲霉菌对免疫抑制大鼠血清 IgM 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of *Aspergillus niger* on serum IgM in immunosuppressed rats

组别 Groups	染菌剂量 /(CFU/mL) Bacterial dose	IgM/(mg/mL)	
		造模 D3 Modeling D3	造模 D7 Modeling D7
正常对照组 Normal control group	/	1. 20±0. 18	1. 32±0. 06
环磷酰胺对照组 Cyclophosphamide control group	/	1. 01±0. 07 *	1. 11±0. 10 **
环磷酰胺+真菌感染 Cyclophosphamide + fungal infection	低剂量组 Low-dose group	1×10 ⁷	0. 94±0. 11
	中剂量组 Medium-dose group	1×10 ⁸	0. 90±0. 10 [#]
	高剂量组 High-dose group	1×10 ⁹	0. 84±0. 06 ^{##}
			0. 85±0. 10 ^{##}

注: 与正常对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与环磷酰胺对照组相比, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$ 。
Note. Compared with the normal control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with the cyclophosphamide control group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$.

表 3 黑曲霉菌对免疫抑制大鼠血清半乳糖甘露聚糖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of *Aspergillus niger* on GM in immunosuppressed rats

组别 Groups	染菌剂量 /(CFU/mL) Bacterial dose	血清半乳甘露聚糖/(pg/mL) GM	
		造模 D3 Modeling D3	造模 D7 Modeling D7
正常对照组 Normal control group	/	517. 70±4. 57	526. 55±21. 67
环磷酰胺对照组 Cyclophosphamide control group	/	523. 80±18. 12	512. 45±12. 36
环磷酰胺+真菌感染 Cyclophosphamide + fungal infection	低剂量组 Low-dose group	1×10 ⁷	562. 85±20. 29 [#]
	中剂量组 Medium-dose group	1×10 ⁸	563. 33±17. 04 [#]
	高剂量组 High-dose group	1×10 ⁹	590. 73±32. 31 ^{##}

注: 与环磷酰胺对照组相比, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$ 。
Note. Compared with the cyclophosphamide control group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$.

表 4 黑曲霉菌对免疫抑制大鼠外周血 CD4⁺ 细胞比例的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of *Aspergillus niger* on the percentage of CD4⁺ cells in the peripheral blood of immunosuppressed rats

组别 Groups	染菌剂量 /(CFU/mL) Bacterial dose	CD4 ⁺ /%	
		造模 D3 Modeling D3	造模 D7 Modeling D7
正常对照组 Normal control group	/	73. 5±3. 6	70. 9±1. 7
环磷酰胺对照组 Cyclophosphamide control group	/	66. 8±4. 4 *	67. 8±2. 1 *
环磷酰胺+真菌感染 Cyclophosphamide + fungal infection	低剂量组 Low-dose group	1×10 ⁷	61. 8±2. 7
	中剂量组 Medium-dose group	1×10 ⁸	60. 5±2. 0 [#]
	高剂量组 High-dose group	1×10 ⁹	59. 6±2. 7 ^{##}
			59. 4±2. 9 ^{##}

注: 与正常对照组相比, * $P<0.05$; 与环磷酰胺对照组相比, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$ 。
Note. Compared with the normal control group, * $P<0.05$. Compared with the cyclophosphamide control group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$.

表 5 黑曲霉菌对免疫抑制大鼠外周血 CD8⁺ 细胞比例的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of *Aspergillus niger* on the percentage of CD8⁺ cells in the peripheral blood of immunosuppressed rats

组别 Groups	染菌剂量 /(CFU/mL) Bacterial dose	CD8 ⁺ /%	
		造模 D3 Modeling D3	造模 D7 Modeling D7
正常对照组 Normal control group	/	22. 5±2. 0	23. 5±1. 6
环磷酰胺对照组 Cyclophosphamide control group	/	26. 1±1. 0 **	26. 1±1. 8 *
环磷酰胺+真菌感染 Cyclophosphamide + fungal infection	低剂量组 Low-dose group	1×10 ⁷	28. 7±3. 5
	中剂量组 Medium-dose group	1×10 ⁸	31. 9±1. 6 ^{##}
	高剂量组 High-dose group	1×10 ⁹	32. 2±2. 8 ^{##}

注:与正常对照组相比, **P*<0.05, ***P*<0.01;与环磷酰胺对照组相比, #*P*<0.05, ##*P*<0.01。
Note. Compared with the normal control group, **P*<0.05, ***P*<0.01. Compared with the cyclophosphamide control group, #*P*<0.05, ##*P*<0.01.

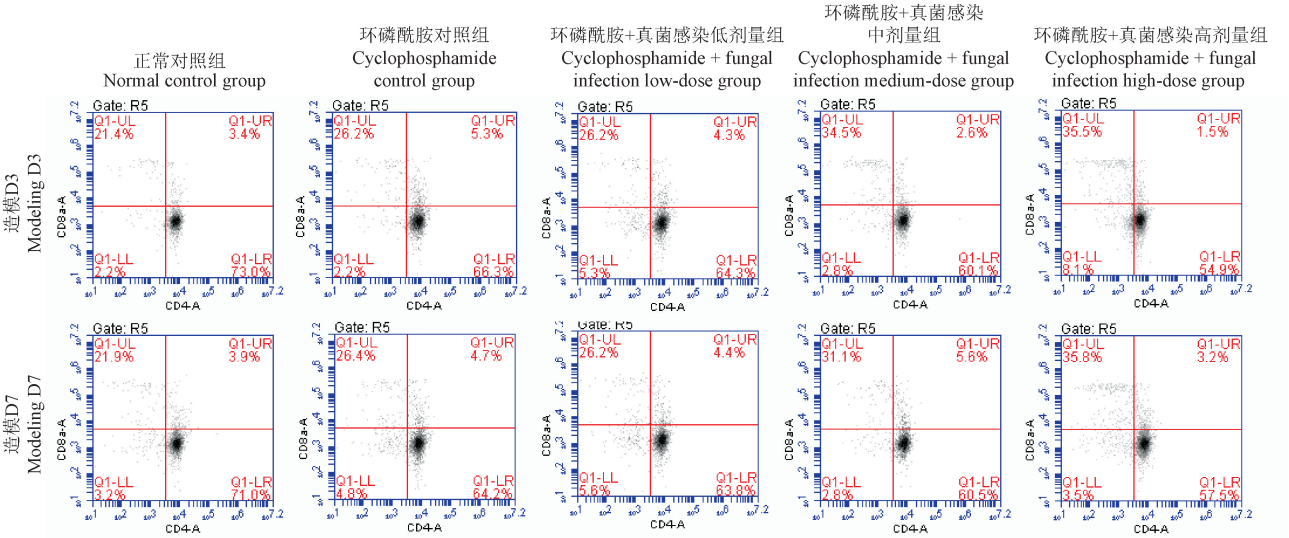


图 2 黑曲霉菌感染免疫抑制大鼠后机体外周血中 CD4⁺、CD8⁺ 细胞比例的变化 (*n*=6)

Figure 2 Changes in the ratio of CD4⁺ and CD8⁺ cells in the peripheral blood of immunosuppressed rats infected with *Aspergillus niger*

2.6 大鼠血中白细胞、中性粒细胞数量的变化

如表 6、表 7 所示,与正常对照组比较,造模 D3 和造模 D7 环磷酰胺对照组大鼠白细胞和中性粒细胞总数均显著降低 (*P*<0.05, *P*<0.01);与环磷酰胺对照组比较,造模 D3 环磷酰胺+真菌感染低、中、高剂量组白细胞总数均显著降低,造模 D7 环磷酰胺+真菌感染低、中、高剂量组白细胞总数和中性粒细胞总数均显著降低 (*P*<0.05, *P*<0.01)。

2.7 大鼠肺泡灌洗液中曲霉菌负荷量变化

如表 8 及图 3 所示,与正常对照组比较和环磷酰胺对照组比较,造模 D3 和造模 D7 各感染组大鼠肺泡灌洗液中曲霉菌负荷量均显著增高 (*P*<0.01);各感染组间比较,造模 D3 环磷酰胺+真菌感染高剂

量组和造模 D7 环磷酰胺+真菌感染中、高剂量组肺泡灌洗液中曲霉菌负荷量均显著高于环磷酰胺+真菌感染低剂量组 (*P*<0.05, *P*<0.01)。

2.8 大鼠肺组织形态学变化

如图 4 所示,镜下观察正常对照组和环磷酰胺对照组动物肺泡、细支气管黏膜及肺泡腔于各时期均未见异常;环磷酰胺+真菌感染低、中、高剂量组动物分别经气管注射 1×10⁷、1×10⁸、1×10⁹ CFU/mL 的曲霉菌悬液后,各感染组动物肺均出现少量至大量菌丝分布和不同程度肺泡上皮破坏、血管出血、肺泡内支气管上皮杯状细胞增多、炎症细胞浸润等症状,且病程随着造模时间的延长和接种菌液剂量的提高呈增重趋势。

表 6 黑曲霉菌对免疫抑制大鼠外周血白细胞数量的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 6 Effect of *Aspergillus niger* on the number of WBC in peripheral blood of immunosuppressed rats

组 别 Groups	染菌剂量 /(CFU/mL) Bacterial dose	白细胞总数/(10^9 /L) WBC	
		造模 D3 Modeling D3	造模 D7 Modeling D7
正常对照组 Normal control group	/	6. 34±0. 84	6. 41±0. 85
环磷酰胺对照组 Cyclophosphamide control group	/	3. 65±0. 58 **	4. 75±1. 38 *
环磷酰胺+真菌感染 Cyclophosphamide + fungal infection	低剂量组 low-dose group	1×10 ⁷	1. 84±0. 81 ^{##}
	中剂量组 medium-dose group	1×10 ⁸	1. 11±0. 38 ^{##}
	高剂量组 high-dose group	1×10 ⁹	0. 72±0. 15 ^{##}

注:与正常对照组相比, * $P<0. 05$, ** $P<0. 01$;与环磷酰胺对照组相比, ^{##} $P<0. 01$ 。
Note. Compared with the normal control group, * $P<0. 05$, ** $P<0. 01$. Compared with the cyclophosphamide control group, ^{##} $P<0. 01$.

表 7 黑曲霉菌对免疫抑制大鼠外周血中性粒细胞数量的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 7 Effect of *Aspergillus niger* on the number of Neu in peripheral blood of immunosuppressed rats

组别 Groups	染菌剂量 /(CFU/mL) Bacterial dose	中性粒细胞总数/(10^9 /L) Neu	
		造模 D3 Modeling D3	造模 D7 Modeling D7
正常对照组 Normal control group	/	1. 29±0. 19	1. 46±0. 14
环磷酰胺对照组 Cyclophosphamide control group	/	0. 18±0. 06 **	0. 37±0. 09 **
环磷酰胺+真菌感染 Cyclophosphamide + fungal infection	低剂量组 Low-dose group	1×10 ⁷	0. 11±0. 09
	中剂量组 Medium-dose group	1×10 ⁸	0. 16±0. 18
	高剂量组 High-dose group	1×10 ⁹	0. 09±0. 08

注:与正常对照组相比, ** $P<0. 01$;与环磷酰胺对照组相比, # $P<0. 05$, ^{##} $P<0. 01$ 。
Note. Compared with the normal control group, ** $P<0. 01$. Compared with the cyclophosphamide control group, # $P<0. 05$, ^{##} $P<0. 01$.

表 8 黑曲霉菌对免疫抑制大鼠肺泡灌洗液中曲霉菌负荷量的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 8 Effect of *Aspergillus niger* on *Aspergillus* load in alveolar lavage fluid of immunosuppressed rats

组别 Groups	染菌剂量 /(CFU/mL) Bacterial dose	真菌计数/(10^5 CFU/mL) Fungal count	
		造模 D3 Modeling D3	造模 D7 Modeling D7
正常对照组 Normal control group	/	0. 00±0. 00	0. 00±0. 00
环磷酰胺对照组 Cyclophosphamide control group	/	0. 00±0. 00	0. 00±0. 00
环磷酰胺+真菌感染 Cyclophosphamide + fungal infection	低剂量组 Low-dose group	1×10 ⁷	1. 56±0. 29 ^{##}
	中剂量组 Medium-dose group	1×10 ⁸	2. 54±1. 04 ^{##}
	高剂量组 High-dose group	1×10 ⁹	4. 79±2. 08 ^{###+}

注:与环磷酰胺对照组相比, ^{##} $P<0. 01$;与环磷酰胺+真菌感染低剂量组相比, * $P<0. 05$, ** $P<0. 01$ 。
Note. Compared with the cyclophosphamide control group, ^{##} $P<0. 01$. Compared with the Cyclophosphamide + fungal infection low-dose group, * $P<0. 05$, ** $P<0. 01$.

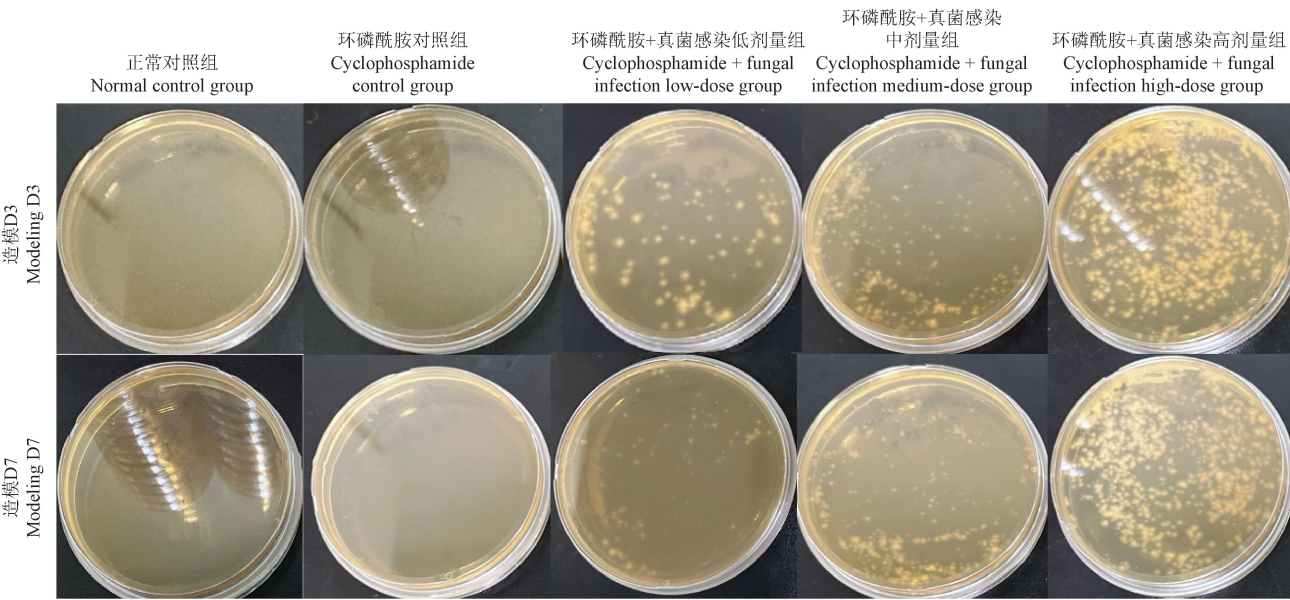


图 3 黑曲霉菌感染免疫抑制大鼠后机体肺泡灌洗液中曲霉菌负荷量的变化($n=6$)

Figure 3 Changes in *Aspergillus* load in the alveolar lavage fluid of the organism after infection of immunosuppressed rats by *Aspergillus niger*

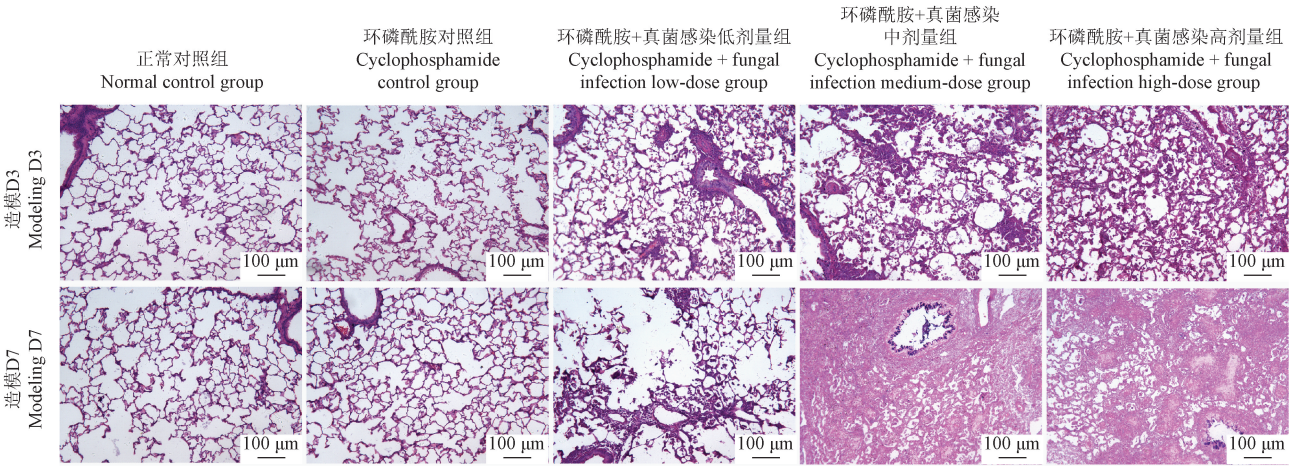


图 4 黑曲霉菌感染免疫抑制大鼠后机体肺组织病理变化(HE)

Figure 4 Histopathologic changes in the lungs of immunosuppressed rats infected with *Aspergillus niger* (HE)

3 讨论

黑曲霉菌为条件致病菌,当机体免疫功能正常时,支气管上皮的纤毛会将大多数曲霉菌孢子排除在肺部之外,若机体免疫屏障遭到破坏,曲霉菌将在肺部大量繁殖和沉积,进而引起 IPA,由于该病具有治疗难度高、预后差等特点,其病死率居高不下,仍为医疗界急需解决的持续性难题,因此探究侵袭性黑曲霉菌肺病发病机制成为该病防治的首要任务^[10-12]。侵袭性黑曲霉菌是一种严重的真菌感染,常见于免疫系统受损的人群,其发病因素包括长期使用免疫抑制剂、器官移植、化疗、恶性肿瘤等。其

中环磷酰胺是一种烷化剂,在多种肿瘤的治疗过程中均有所使用,但与此同时,环磷酰胺表现为骨髓抑制和白细胞下降,阻断 T/B 细胞的分化过程,对细胞和体液免疫均有抑制作用,进而增加机体对 IPA 的易感性^[13-15]。为真实模拟患者接受免疫抑制治疗或化疗后感染 IPA 的发生发展过程及发病机制,本研究采用黑曲霉菌联合环磷酰胺免疫抑制剂构建大鼠侵袭性黑曲霉菌肺病模型,通过观察各组大鼠体征、细胞及体液免疫指标水平、血常规、GM 含量、肺组织真菌定植和肺组织病理变化对不同处理组大鼠模型进行评价,在验证细胞免疫参与该病发生的同时,并进一步探讨体液免疫对 IPA 发病的

影响。

IPA 的诊断指标包括真菌抗原检测、组织病理学检查和病原学检查等,其中真菌抗原检测技术已在临床中广泛应用,动物感染后血清中 GM 的水平与组织的真菌负荷量成正比,当菌丝生长时,GM 可作为最早释放的抗原,从薄弱的菌丝顶端释放;组织病理学检查和病原学检查作为传统诊断方法可通过检测真菌侵袭和肺组织破坏情况来确定病变范围和疾病发生发展的程度^[16-17]。在本实验条件下,环磷酰胺对照组动物中性粒细胞在不同时间点均显著低于正常对照组,且出现自主活动减少及竖毛现象,提示动物均处于免疫抑制状态;当环磷酰胺免疫抑制的大鼠给予不同浓度黑曲霉菌后,GM 含量明显升高,肺组织出现肺泡上皮破坏、炎症细胞浸润等症状,病程随着造模时间的延长和接种菌液剂量的提高呈增重趋势,且肺泡灌洗液培养后均可见大量黑曲霉菌,虽随着造模时间的延长,曲霉菌负荷量总体呈降低趋势,但负荷量仍处较高位置,提示动物仍处于肺感染严重阶段,且上述症状与彭冬冬等^[18]构建大鼠混合菌细菌性肺炎症状相符,表明 IPA 模型构建成功。

真菌可引起急性呼吸道感染,免疫系统作为重要防线可抵御病原微生物入侵,在细胞免疫过程中,T 淋巴细胞在全身免疫器官和组织中发挥免疫功能,CD4⁺主要表达于辅助 T 细胞,CD8⁺是 T 淋巴细胞的一个亚群,二者对免疫功能的判断具有重要作用^[19-21]。本研究结果与王润超等^[22]报道趋势相近,证实机体细胞免疫受损后可引起 T 淋巴细胞动态平衡紊乱,进而抑制效应细胞抗曲霉菌的能力,导致机体易感曲霉菌,引发 IPA。在体液免疫过程中,T 细胞参与调节 B 细胞的活化和分泌,活化的 B 细胞可产生抗感染作用的 IgG、IgM,直接参与机体体液免疫反应,其中 IgG 具有活化补体作用,可与巨噬细胞、自然杀伤细胞联合,具有抗感染作用,IgM 有溶解细菌的作用,在感染早期起到抗感染作用^[23-24]。本研究结果显示,与正常对照组相比,环磷酰胺免疫抑制和黑曲霉菌联合环磷酰胺免疫抑制的大鼠 IgG、IgM 水平均显著降低,与此同时,黑曲霉菌联合环磷酰胺免疫抑制的大鼠大鼠 IgG、IgM 水平显著低于环磷酰胺对照组,结合细胞免疫结果,提示环磷酰胺可介导机体免疫功能受损,导致 T 细胞协助的 B 细胞分泌抗体功能减弱,促使体液免疫功能紊乱,抗感染作用不足,导致黑曲霉菌在机体

不断复制和传播,引发 IPA;此外,机体在抵抗黑曲霉菌感染时消耗大量免疫球蛋白,加重体液免疫功能的紊乱,可能是 IgG、IgM 水平降低的原因之一。

综上所述,本研究采用黑曲霉菌联合环磷酰胺免疫抑制剂构建侵袭性黑曲霉菌肺病模型,从动物临床症状、血常规、血清半乳甘露聚糖含量、肺组织真菌定植和肺组织病理方面对模型进行评价,其中高剂量黑曲霉菌联合环磷酰胺免疫抑制剂构建肺炎模型较为严重,病程与菌液浓度和造模时间呈正相关,此外通过细胞及体液免疫指标检测后,进一步证实细胞免疫在该病发病机制方面中发挥重要作用,同时免疫球蛋白也可影响 IPA 疾病的发展过程,推测 IPA 发病机制可能还与体液免疫中免疫球蛋白水平有关。

参考文献:

- [1] HÉRIVAUX A, WILLIS J R, MERCIER T, et al. Lung microbiota predict invasive pulmonary aspergillosis and its outcome in immunocompromised patients [J]. Thorax, 2022, 77 (3): 283-291.
- [2] 周黎明. 内参标化的肺泡灌洗液半乳甘露聚糖试验在侵袭性肺曲霉病诊断中的价值研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2018. ZHOU L M. Study on the value of galactomannan test in alveolar lavage fluid standardized by internal reference in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis [D]. Nanchang: Nanchang University, 2018.
- [3] GEBREMARIAM T, ALKHAZRAJI S, ALQARIHI A, et al. APX001 is effective in the treatment of murine invasive pulmonary aspergillosis [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2019, 63 (2): e01713-e01718.
- [4] 栗方, 曹彬, 曲久鑫, 等. 侵袭性肺曲霉病小鼠动物模型建立的实验研究 [J]. 中华临床医师杂志 (电子版), 2015, 9 (8): 1403-1407. LI F, CAO B, QU J X, et al. Study of animal model of invasive pulmonary aspergillosis in immunosuppressed mice [J]. Chin J Clin Electron Ed, 2015, 9 (8): 1403-1407.
- [5] SONG L, ZHAO Y, WANG G, et al. Investigation of predictors for invasive pulmonary aspergillosis in patients with severe fever with thrombocytopenia syndrome [J]. Sci Rep, 2023, 13 (1): 1538.
- [6] SEIF M, KAKOSCHKE T K, EBEL F, et al. CAR T cells targeting *Aspergillus fumigatus* are effective at treating invasive pulmonary aspergillosis in preclinical models [J]. Sci Transl Med, 2022, 14 (664): eabh1209.
- [7] DENNING D W. Therapeutic outcome in invasive aspergillosis [J]. Clin Infect Dis, 1996, 23 (3): 608-615.
- [8] TONG X, LIU T, JIANG K, et al. Clinical characteristics and prognostic risk factors of patients with proven invasive pulmonary aspergillosis: a single-institution retrospective study [J]. Front

- Med, 2021, 8; 756237.
- [9] ATCHADE E, JEAN-BAPTISTE S, HOUZÉ S, et al. Fatal invasive aspergillosis caused by *Aspergillus niger* after bilateral lung transplantation [J]. Med Mycol Case Rep, 2017, 17; 4–7.
- [10] 林亚纳, 张小菲, 洪亚妮, 等. 不同免疫状态侵袭性肺曲霉病患者实验室指标分析 [J]. 中国免疫学杂志, 2023, 39(10): 2211–2216.
- LIN Y N, ZHANG X F, HONG Y N, et al. Laboratory index analysis of patients with invasive pulmonary *Aspergillus* with different immune status [J]. Chin J Immunol, 2023, 39(10): 2211–2216.
- [11] 刘继红, 陈黛诗, 李展, 等. 流感病毒及新型冠状病毒相关侵袭性肺曲霉病的诊治进展 [J]. 解放军医学院学报, 2023, 44(10): 1151–1156.
- LIU J H, CHEN D S, LI Z, et al. Progress in diagnosis and treatment of influenza-associated pulmonary aspergillosis and COVID-19-associated pulmonary aspergillosis [J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2023, 44(10): 1151–1156.
- [12] 金文芳. 侵袭性肺曲霉病的临床特点及其危险因素分析 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2019.
- JIN W F. Clinical characteristics and risk factors of invasive pulmonary aspergillosis [D]. Hefei: Anhui Medical University, 2019.
- [13] 吴佳敏, 张晨阳, 卢芳国, 等. 免疫抑制剂对小鼠流感病毒性肺炎模型建立的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34(10): 1446–1450.
- WU J M, ZHANG C Y, LU F G, et al. Effect of immunosuppressive agent on establishment of influenza virus pneumonia in mice [J]. Chin J Immunol, 2018, 34(10): 1446–1450.
- [14] 康慧琳, 樊卫平, 雷波, 等. 不同剂量环磷酰胺对小鼠免疫功能的影响 [J]. 免疫学杂志, 2018, 34(4): 308–312.
- KANG H L, FAN W P, LEI B, et al. The immunosuppression and immunoenhancement effects of cyclophosphamide on normal mice [J]. Immunol J, 2018, 34(4): 308–312.
- [15] FENG C, ZHANG M, ZHANG S, et al. Therapeutic effects of pentoxifylline on invasive pulmonary aspergillosis in immunosuppressed mice [J]. BMC Pulm Med, 2021, 21(1): 31.
- [16] 马欣雨, 于世寰. 侵袭性肺曲霉病检测方法进展 [J]. 临床与病理杂志, 2020, 40(6): 1584–1589.
- MA X Y, YU S H. Progress in detection methods of invasive pulmonary aspergillosis [J]. J Clin Pathol Res, 2020, 40(6): 1584–1589.
- [17] VANDEWOUDE K H, BLOT S I, DEPUYDT P, et al. Clinical relevance of *Aspergillus* isolation from respiratory tract samples in critically ill patients [J]. Crit Care, 2006, 10(1): R31.
- [18] 彭冬冬, 陈相池, 夏伟, 等. 大鼠混合细菌感染性肺炎模型的建立与评价 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 800–807.
- PENG D D, CHEN X C, XIA W, et al. Establishment and evaluation of a mixed bacterial pneumonia rat model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(6): 800–807.
- [19] LAWLER C, STEVENSON P G. A CD4⁺ T cell-NK cell axis of gammaherpesvirus control [J]. J Virol, 2020, 94(3): e01545–e01519.
- [20] ZANDER R, SCHAUDER D, XIN G, et al. CD4⁺ T cell help is required for the formation of a cytolytic CD8⁺ T cell subset that protects against chronic infection and cancer [J]. Immunity, 2019, 51(6): 1028–1042.
- [21] 刘欢, 王锁英, 李红. 利可君对流感病毒感染伴中性粒细胞减少患儿的疗效评估 [J]. 江苏大学学报(医学版), 2023, 33(4): 333–337.
- LIU H, WANG S Y, LI H. Evaluation of the effect of Leucogen on neutropenia in children with influenza virus infection [J]. J Jiangsu Univ Med Ed, 2023, 33(4): 333–337.
- [22] 王润超, 万哲, 李若瑜. 21 例侵袭性肺曲霉病患者 Th 以及 Treg 细胞的检测 [J]. 中国真菌学杂志, 2014, 9(5): 287–292.
- WANG R C, WAN Z, LI R Y. Detection of helper T cells and regulatory T cells of 21 cases with invasive pulmonary aspergillosis patients [J]. Chin J Mycol, 2014, 9(5): 287–292.
- [23] 黄晓茹, 林珊, 张忠龙, 等. 鼻病毒引起儿童支气管肺炎 41 例免疫功能变化分析 [J]. 福建医药杂志, 2023, 45(2): 67–69.
- HUANG X R, LIN S, ZHANG Z L, et al. Analysis of immune function changes in 41 children with bronchopneumonia caused by rhinovirus [J]. Fujian Med J, 2023, 45(2): 67–69.
- [24] 江娟, 李静, 夏可, 等. 反复肺炎患儿肠道菌群与免疫功能指标变化及相关性研究 [J]. 陕西医学杂志, 2023, 52(9): 1200–1203.
- JIANG J, LI J, XIA K, et al. Changes of intestinal flora and immune function indexes in children with recurrent pneumonia and their correlation [J]. Shaanxi Med J, 2023, 52(9): 1200–1203.

[收稿日期]2023-10-25