

烟曲霉硫氧还蛋白还原酶对侵袭性曲霉病小鼠的免疫保护作用

刘倩 史利宁 商秀娟 陈笑 胡毓安 陈勇 李芳秋

(南京军区南京总医院解放军检验医学研究所中心实验科, 南京 210002)

【摘要】 目的 探讨烟曲霉硫氧还蛋白还原酶(thioredoxin reductase, TR)对侵袭性曲霉病(invasive aspergillosis, IA)的免疫保护作用。方法 C57BL/6 小鼠随机分为免疫组和对照组,免疫组小鼠用重组 TR 免疫 2 次。感染烟曲霉前用环磷酰胺和地塞米松对全部小鼠进行免疫抑制处理,通过气道穿刺法向气管内注入烟曲霉孢子悬液,建立 IA 疾病模型。观察两组小鼠的存活率、局部器官真菌载量、肺组织病理变化、肺泡灌洗液细胞分类计数,评估 TR 蛋白的免疫保护作用。结果 存活率:免疫组小鼠 7 d 存活率为 64.7%,对照组为 0。肺组织匀浆烟曲霉 CFU 中位数:存活小鼠为 0,死亡小鼠为 44 (P_{25} , P_{75} 为 21,70) ($P < 0.01$)。组织病理学检查:死亡小鼠肺肿胀出血、肺泡间隔增宽、大量炎症细胞聚集、组织灶状坏死,并有大量烟曲霉菌丝存在,而存活小鼠肺组织损伤程度轻,且组织间无菌丝。肺泡灌洗液涂片染色细胞计数显示:存活小鼠单个核细胞约占 84.2%,中性粒细胞仅占 15.8%;死亡小鼠单个核细胞占 33.6%,中性粒细胞约占 66.4%。结论 烟曲霉重组蛋白 TR 能诱导小鼠产生抵抗 IA 的免疫保护力,是一个有潜力的保护性抗原。

【关键词】 烟曲霉;硫氧还蛋白还原酶;免疫保护作用

【中图分类号】 R 379.6 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-3827(2015)10-0340-05

Protective effect of thioredoxin reductase GliT of *Aspergillus fumigatus* in a murine model of invasive aspergillosis

LIU Qian, SHI Li-ning, SHANG Xiu-juan, CHEN Xiao, HU Yu-an, CHEN Yong, LI Fang-qiu

(Institute of Medical Laboratory Sciences of PLA, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, PLA, Nanjing 210002, China)

【Abstract】 Objective To investigate the immunoprotection in mice immunized with thioredoxin reductase GliT of *Aspergillus fumigatus*. **Methods** C57BL/6 mice were randomly assigned into two groups: immunization group intramuscularly immunized with recombinant TR for two times; control group intramuscularly immunized with PBS instead of TR. Survival rate, *A. fumigatus* lung burdens, pathologic examination and cell count of alveolar lavage were evaluated. **Results** The survival rate of immunization group was 64.7% within 7 days after infection while that of control group was 0. The medians of CFUs from the lung tissues of the survivors and the nonsurvivors were 0 and 44 (P_{25} , P_{75} were 21,70) respectively ($P < 0.01$). Pulmonary pathology indicated that the lungs of the dead immunized mice and control mice showed alveolar hemorrhage, inflammatory cells recruitment, focal tissue necrosis and hyphal elements throughout the entire lung. In contrast, the lung tissues of the survivors were damaged slightly and free of hyphal elements. Alveolar lavage fluid smear showed that the counting of the survival is given priority to with mononuclear cells, accounting for about 84.2%, neutrophils accounted 15.8%. The counting of the nonsurvival is given priority to with neutrophils, accounting for about 66.4%, while 33.6% mononuclear cells. **Conclusion** Recombinant TR of *Aspergillus fumigatus* can induce a modest protection in a murine model of invasive aspergillosis and might be a potential protective antigen.

【Key words】 *Aspergillus fumigatus*; thioredoxin reductase GliT; protective effect

[Chin J Mycol, 2015, 10(6): 340-344]

基金项目:国家自然科学基金(81302536)

作者简介:刘倩,女(汉族),硕士研究生在读.E-mail:269525526@qq.com

通讯作者:李芳秋, E-mail: njlifq@163.com

近年来,由曲霉引起的感染在医院内侵袭性真菌感染中发病率仅次于念珠菌,位列第二,但死亡率远高于侵袭性念珠菌感染,达 40%~90%^[1],引发曲霉感染最常见的病原菌是烟曲霉,90%的曲霉病都是由其感染所致^[2]。由于侵袭性曲霉病(invasive aspergillosis, IA)的早期诊断困难,现有的抗真菌药物治疗效果有限,且有较强的肾毒性、肝毒性等不良反应^[3],抗 IA 治疗依然面临挑战。因此,以曲霉疫苗为基础的预防接种法为防治 IA 开辟了新的途径,受到了越来越多的重视^[4]。

本课题组在前期研究中用免疫蛋白质组学技术首次筛选鉴定了一个新的可与确诊 IA 患者血清发生强免疫反应的烟曲霉优势抗原,即硫氧还蛋白还原酶 GliT (thioredoxin reductase, TR)^[5]。经生物信息学分析显示,该蛋白为带信号肽的分泌蛋白,与人源蛋白质没有同源性,与其他微生物的同源性也很低^[6]。与烟曲霉其他蛋白相比,TR 的免疫原性很强,IA 患者体内有高水平的抗 TR IgG 抗体^[7]。因此我们推测:烟曲霉硫氧还蛋白还原酶是一种保护性抗原。为进一步评估烟曲霉 TR 抗侵袭性曲霉病的免疫保护作用,我们建立了重组 TR 免疫接种小鼠模型,用存活率、局部真菌生长量、组织病理检测、肺泡灌洗液分类计数等评估其在免疫抑制小鼠中抗烟曲霉呼吸道感染的保护效能。

1 材料与amp;方法

1.1 实验动物及分组

雌性 C57BL/6 小鼠共 56 只,6~8 周龄,体重(20±2) g,由南京大学模式动物研究所提供。随机取 20 只用于预实验筛选免疫接种抗原剂量和条件。其余 36 只用于考察免疫保护作用的疾病模型,随机分为免疫组和对照组,每组各 18 只。

1.2 菌株及菌液制备

烟曲霉 A1a 标准株获自中国微生物菌种保藏管理委员会医学真菌中心。将烟曲霉菌株接种于沙保斜面培养基,28℃ 培养 4 d。用无菌生理盐水(含 0.5% Tween 80)洗涤制成孢子悬液,6 层纱布过滤后,离心洗涤 2~3 次去上清,血球计数板进行孢子计数,将孢子悬液稀释至 2×10^8 /mL,置于 4℃ 冰箱备用,所制悬液于 7 d 内用完。

1.3 试剂与仪器

环磷酰胺(CY)注射液为通化茂祥制药有限

公司产品(批号 22022234),地塞米松磷酸钠注射液为辰欣药业股份有限公司产品(批号 37021969),免疫佐剂 QuickAntibody 为北京康碧泉生物科技有限公司产品。隔水式电热恒温培养箱为美国 Thermo 公司产品,显微镜为日本 Olympus 公司产品,血球计数板购自上海市求精生化试剂仪器有限公司。

1.4 免疫接种

20 只预实验小鼠分为 3 个剂量免疫接种组和 1 个对照组,每组 5 只。分别将 5 μg、10 μg、20 μg 重组 TR 抗原与佐剂 1:1 混合(v/v),肌肉注射免疫接种组小鼠,对照组同时接种 PBS 与佐剂混合物,共 2 次,每次间隔 2 周。末次接种后 2 周取尾静脉血,ELISA 方法测定抗 TR 抗体效价^[8]。根据预实验抗体产生结果,选择 5 μg 抗原对实验组小鼠进行免疫接种。

1.5 烟曲霉感染

感染前,先对免疫组和对照组小鼠进行免疫抑制。方案如下:感染前 4 d 腹腔注射环磷酰胺 150 mg/kg,感染前 1 d 腹腔注射环磷酰胺 75 mg/kg 及地塞米松 50 mg/kg。感染当天用 100 μL 水合氯醛(0.1 g/mL)腹腔注射使小鼠麻醉。将麻醉小鼠仰卧固定于泡沫板上,无菌切开颈部皮肤,分离组织暴露气管。注射器穿刺气管壁,向管腔注入 40 μL 烟曲霉孢子悬液(含 8×10^6 个孢子),立即提起小鼠前肢,令其保持直立状态 30 s,使菌液流入肺中,然后缝合颈部皮肤。将小鼠腹部朝下倾斜放置,直至完全苏醒。术后每 2 h 观察 1 次,包括体重、活动情况、死亡情况等,感染第 7 d 未死亡则记为存活。为防止细菌感染,感染前 1 h 每只小鼠肌肉注射 200 μg 左氧氟沙星,感染后饮水换成无菌蒸馏水,并加入磺胺甲基异恶唑(0.8 mg/mL)。

1.6 肺泡灌洗液采集及真菌载量计数

小鼠死亡后,将 1 mL 生理盐水由气管注入肺内,收集肺泡灌洗液,离心制备细胞涂片,瑞姬氏染色后行细胞分类计数。无菌解剖小鼠,分别取心、肝、肾脏组织接种于血平板,取部分肺组织称重后加生理盐水研磨(1 mg 组织+10 μL 生理盐水),取 10 μL 肺组织匀浆涂布沙保平板,28℃ 培养 2 d,CFU 计数评定肺真菌载量。感染第 7 天所有存活小鼠行脱颈处死,处理如上所述。

1.7 组织病理学检查

小鼠死亡后,解剖取右肺组织,用 10%福尔马

林固定,常规石蜡包埋切片,分别作 HE 染色和银染,进行病理学检查。

1.8 统计学分析

小鼠感染后以时间为横坐标,存活率为纵坐标绘制生存曲线。采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,偏态分布的计量资料用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示, Mann-Whitney 检验进行组间差异分析,细胞分类计数比较用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 血清抗体效价

预实验免疫组小鼠第二次接种重组 TR 两周后,取血清,用 PBS 稀释为 1:1 000、1:5 000、1:10 000,用 ELISA 测定抗体,取 5 只小鼠各个稀释度测定吸光度(A)的平均值。结果 5 μg 、10 μg 、20 μg 免疫剂量的小鼠血清抗体效价均为 1:10 000 以上,结果见图 1。因此,免疫保护实验全部采用 5 μg /只抗原剂量免疫小鼠。

2.2 存活情况

免疫组和对照组因感染当天各有 1 只死亡,实验有效数据来自 34 只小鼠。感染烟曲霉孢子后,所有小鼠活动减少、皮毛无光泽,体重下降。6 只免疫组小鼠在感染 2~4 d 死亡,11 只在感染 3 d 后状况出现好转,表现为活动逐渐增多、体重上升、毛发恢复光泽,至感染 7 d 后仍存活,存活率为 64.7%。对照组小鼠在感染 2~4 d 内全部死亡。两组小鼠生存曲线见图 2。

2.3 肺组织真菌菌落计数

肺组织匀浆菌落计数显示,免疫组小鼠(17 只)肺组织匀浆 CFU 中位数为 0 (P_{25}, P_{75} 为 0, 20.5),对照组小鼠(17 只)肺组织匀浆 CFU 中位数为 44 (P_{25}, P_{75} 为 33, 72),免疫组和对照组之间有显著性差异 ($P < 0.01$)。免疫组存活小鼠(11 只)肺组织匀浆 CFU 中位数为 0 (P_{25}, P_{75} 为 0, 0),对照组(17 只)和免疫组死亡小鼠(6 只)肺组织匀浆 CFU 中位数为 44 (P_{25}, P_{75} 为 21, 70),存活小鼠肺真菌载量显著低于死亡小鼠 ($P < 0.01$),免疫组中存活小鼠与死亡小鼠相比,肺真菌载量显著降低 ($P < 0.01$)。肺组织匀浆菌落计数见图 3。

2.4 肺外器官真菌培养

所有小鼠心、肝、肾组织接种血平板培养,均未见烟曲霉和细菌生长。

2.5 肺组织病理学

肉眼见存活小鼠肺颜色淡红,无明显结节及出血灶;死亡小鼠肺肿大,颜色暗红,可见明显结节及出血灶。组织切片 HE 染色显微镜下结果见图 4。图 4a 显示死亡小鼠肺组织内大量出血、肺泡间隔肿胀增宽、肺泡结构消失、大量炎细胞聚集、灶状坏死。图 4b 显示存活小鼠肺组织间质增生伴炎细胞浸润,未见出血及坏死。银染显示死亡小鼠肺组织成团烟曲霉菌丝,位于肺血管内及血管周围,见图 4c;而存活小鼠肺组织中未见真菌菌丝,见图 4d。

2.6 肺泡灌洗液细胞分类计数

肺泡灌洗液涂片瑞姬氏染色结果显示,免疫组小鼠单个核细胞约占 62.5%,中性粒细胞约占 37.5%;对照组小鼠单个核细胞约占 19.6%,中性粒细胞约占 80.4%,免疫组小鼠单个核细胞显著高于对照组小鼠 ($P < 0.01$)。存活小鼠涂片计数以单个核细胞为主,约占 84.2%,中性粒细胞占 15.8%;死亡小鼠涂片以中性粒细胞为主,约占 66.4%,单个核细胞占 33.6%,存活小鼠单个核细胞显著高于死亡小鼠 ($P < 0.01$)。

3 讨 论

以往研究 IA 多采用静脉接种感染、腹腔接种感染等途径建立动物模型,这些感染途径不能模拟 IA 的自然发病过程,而滴鼻法接种感染时菌量难以控制。本研究使用气管穿刺的方法感染小鼠,该方法更好地模拟了 IA 的发病过程,而且接种菌量也可准确控制。实验中感染烟曲霉后小鼠肺组织匀浆培养阳性、病理切片显示肺呈 IPA 典型病变,组织间有大量菌丝生成,说明 IA 小鼠模型成功建立。小鼠心、肝、肾组织培养结果表明烟曲霉只造成了小鼠肺部感染,并没有随血液流经其他器官形成播散性感染,这可能是由于感染到死亡经历时间较短的原因,实验过程中小鼠没有发生细菌感染,这说明通过术前注射左氧氟沙星以及术后饮水中加入磺胺甲基异恶唑可有效地预防细菌感染的发生。

预实验中免疫接种组小鼠分别用 5 μg 、10 μg 、20 μg 重组 TR 接种,ELISA 测血清 anti-TR 抗体水平显示无明显差异,该结果说明增加免疫接种 TR 的量不能增加 anti-TR 抗体的效价,因此,实验中免疫组小鼠接种抗原量均为 5 μg /只。

重组 TR 免疫小鼠抵抗随后烟曲霉感染的生

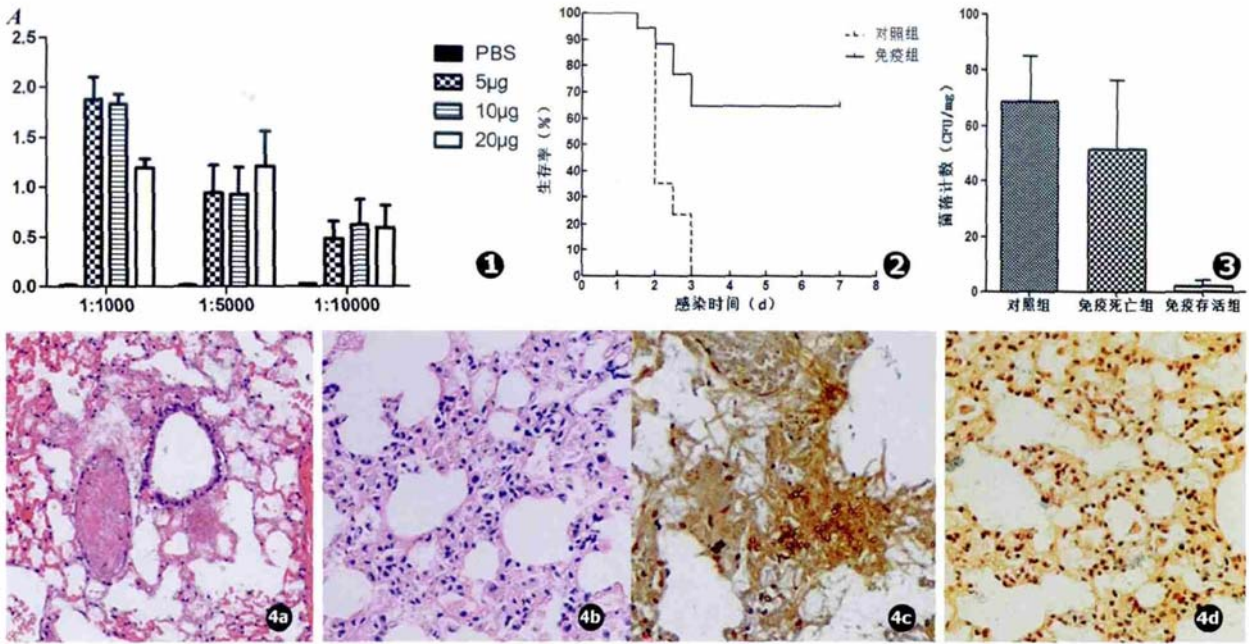


图 1 不同抗原量接种小鼠血清抗体测定结果 图 2 小鼠感染 8×10^6 个烟曲霉孢子后生存率曲线 图 3 小鼠肺组织匀浆平板菌落计数 (从左向右依次为对照组、免疫死亡组、免疫存活组) 图 4 小鼠肺组织病理学检查: a. 死亡小鼠肺组织切片 HE 染色图 ($\times 200$); b. 存活小鼠肺组织切片 HE 染色图 ($\times 200$); c. 死亡小鼠肺组织切片银染图 ($\times 400$); d. 存活小鼠肺组织切片银染图 ($\times 200$)

Fig.1 Serum antibody titers of mice vaccinated by different doses of antigens Fig.2 Survival curves of mice challenged with 8 million viable conidia during the observation period Fig.3 Pulmonary fungal burdens of mice (From left to right: the control group, the immunized nonsurvivors and the immunized survivors) Fig.4 Pathological examination of mice; a. Micrographs of hematoxylin and eosin staining of lung tissues from the nonsurvivors ($\times 200$); b. Micrographs of hematoxylin and eosin staining of lung tissues from the survivors ($\times 200$); c. Micrographs of Gomori silver staining of lung tissues from the nonsurvivors ($\times 400$); d. Micrographs of Gomori silver staining of lung tissues from the survivors ($\times 200$)

存率达 64.7%，与 Ito 等^[9]报道的重组 Asp3 免疫小鼠抵抗烟曲霉感染的存活率 (65%) 相近，但 Asp3 属于变应原，它可与过敏性肺曲霉病患者血清的 IgE 结合引起过敏反应。我们所用的重组 TR 不是过敏原，作为疫苗更为安全。但是如何能达到更加理想的保护效果还需进一步研究。

从肺组织真菌载量结果来看，免疫存活组小鼠肺组织匀浆菌落计数显著低于死亡小鼠 ($P < 0.01$)，同时，肺组织 HE 染色和银染结果显示存活小鼠的肺组织损伤程度轻，且组织间无菌丝，而对照组小鼠和免疫组死亡小鼠的肺组织均受到烟曲霉菌丝破坏，以上结果均表明重组 TR 蛋白可以诱导小鼠产生一定的免疫保护作用，虽然对小鼠进行了免疫抑制，但仍可以有效清除进入肺中的烟曲霉孢子，从而抵抗 IA 的发生。

肺泡灌洗液细胞分类计数显示，存活小鼠单个核细胞比例明显高于死亡小鼠，由此推测单个核细胞可能在抵抗烟曲霉感染中发挥了重要作用，而中性粒细胞并非该疫苗的效应细胞。这一结果与以

往文献报道一致，如 Diaz-Arevalo 等^[10]研究烟曲霉重组 Asp3 疫苗证实其效应细胞并非中性粒细胞，很可能是巨噬细胞，Bozza 等^[11]评估了几种分泌蛋白、膜蛋白、糖脂和多糖作为疫苗在移植鼠模型中诱导保护作用，结果发现保护性抗原免疫小鼠时肺泡灌洗液细胞分类计数以单个核细胞为主，相反非保护性抗原免疫小鼠时中性粒细胞为主。

综上所述，烟曲霉重组 TR 蛋白具有免疫原性，可以诱导小鼠产生中度的保护性免疫作用，但仍需要进一步优化免疫佐剂量、佐剂、免疫途径等，与其他重组抗原联合免疫以提高免疫效果。与此同时，重组 TR 蛋白诱导产生保护性免疫的机理仍有待于进一步研究，为侵袭性曲霉病预防疫苗提供候选抗原。

参考文献

[1] Kriengkauykiat J, Ito JI, Dadwal SS. Epidemiology and treatment approaches in management of invasive fungal infections [J]. Clin Epidemiol, 2011, 3(1): 175-191.

- [2] Cornely OA, Aversa F, Cook P, et al. Evaluating the role of prophylaxis in the management of invasive fungal infections in patients with hematologic malignancy[J]. *Eur J Haematol*, 2011, 87(4): 289-301.
- [3] Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America[J]. *Clin Infect Dis*, 2008, 46(3): 327-360.
- [4] Chaudhary N, Staab JF, Marr KA. Healthy human T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* antigens[J]. *PLoS One*, 2010, 5(2): 389-394.
- [5] Shi LN, Li FQ, Lu JF, et al. Immunoproteomics based identification of thioredoxin reductase GliT and novel *Aspergillus fumigatus* antigens for serologic diagnosis of invasive aspergillosis[J]. *BMC Microbiol*, 2012, 12(1): 11.
- [6] Singh B, Oellerich M, Kumar R, et al. Immuno-reactive molecules identified from the secreted proteome of *Aspergillus fumigatus*[J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(11): 5517-5529.
- [7] Shi LN, Li FQ, Lu JF, et al. Antibody specific to thioredoxin reductase as a new biomarker for serodiagnosis of invasive aspergillosis in non-neutropenic patients[J]. *Clin Chim Acta*, 2012, 413(9-10): 938-943.
- [8] 史利宁, 陆静芬, 马春芳, 等. 抗烟曲霉硫氧还蛋白还原酶 GliT 抗体对侵袭性曲霉病的诊断价值[J]. *临床检验杂志*, 2013, 31(3): 174-177.
- [9] Ito JI, Lyons JM, Hong TB, et al. Vaccinations with recombinant variants of *Aspergillus fumigatus* allergen Asp f3 protect mice against invasive aspergillosis. *Infect Immun*[J]. *Infect Immun*, 2006, 74(9): 5075-5084.
- [10] Diaz-Arevalo D, Ito JI, Kalkum M. Protective effector cells of the recombinant Asp f3 anti-Aspergillosis vaccine[J]. *Front Microbiol*, 2012, 3: 299.
- [11] Bozza S, Clavaud C, Giovannini G, et al. Immune sensing of *Aspergillus fumigatus* proteins, glycolipids, and polysaccharides and the impact on Th immunity and vaccination[J]. *J Immunol*, 2009, 183(4): 2407-2414.

[收稿日期] 2015-08-19

[本文编辑] 卫凤莲

• 消息 •

2016 全国中西医结合皮肤性病学术年会 征文通知

经中国中西医结合学会批准,中国中西医结合学会皮肤性病专业委员会定于 2016 年 4 月 21~25 日在青岛维景国际大酒店召开全国中西医结合皮肤性病学术年会。此次会议将发扬历年年会的优良传统,注重中西医结合治疗皮肤病的新方法及新的研究进展等方面的学术交流,内容密切联系临床,切合皮肤科医师的实际需求,会议将邀请知名专家做特邀演讲,阐述皮肤科相关领域的最新研究进展,创造形式多样、内容充实、紧张热烈、活跃互动的学术交流形式,达到全国皮肤科中医、西医、中西医结合医师共同展现才华、获取知识和信息、增进友谊的目的,欲参加会议者请仔细阅读本通知并按规定的时间和要求投稿。

一、投稿要求

①投稿内容:皮肤科各种基础研究论文、皮肤科临床诊断和治疗等方面的论文、典型与疑难病例等。②投稿方式:中文全文和 400 字以内的中文摘要,请通过电子邮件投稿, E-mail: pfkxh@126.com。来稿请注明 2016 会议征文,截稿日期:2016 年 3 月 3 日。③会议交流形式:特邀讲演、大会发言、分会发言、书面交流。

二、联系方式

上海市黄浦区成都北路 500 号峻岭广场 19 楼 1908 室,上海长征医院《中国真菌学杂志》编辑部,邮编:200003, E-mail: pfkxh@126.com, 联系人:施慧, 021-81885497, 手机:13764560811

中国中西医结合学会皮肤性病专业委员
2015 年 6 月 26 日