

• 论 著 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2022.16.008

血清 BG、GM 在不同免疫状态下肺烟曲霉菌感染大鼠中的实验研究*

黄宛虹¹, 磨立达^{1△}, 罗晓璐¹, 陈松林², 刘泽端¹

1. 南宁市第四人民医院/广西医科大学附属南宁市传染病医院/广西艾滋病临床治疗中心(南宁)检验科, 广西南宁 530023; 2. 广西中医药大学第一附属医院检验教研室, 广西南宁 530023

摘要:目的 构建不同免疫状态下肺烟曲霉菌感染的大鼠模型, 研究免疫缺陷严重程度与肺烟曲霉菌感染的关系。方法 注射生理盐水及不同浓度的地塞米松和环磷酰胺建立不同免疫状态的大鼠模型, 经鼻滴 1×10^7 CFU/mL 烟曲霉菌标准菌株孢子悬液引起肺烟曲霉菌感染, 并于感染 1、3、5、7、9 d 分别随机处死每组 1/5 大鼠, 收集大鼠血液标本, 动态观察半乳甘露聚糖(GM)、(1,3)- β -D-葡聚糖(BG)、白细胞计数(WBC)、中性粒细胞计数(NEUT)、CD4⁺T 细胞水平变化, 同时取肺组织标本进行病理组织检查和真菌培养。150 只大鼠均分为 6 组, 组 1 为正常对照组, 组 2 为低剂量免疫抑制组, 组 3 为高剂量免疫抑制组, 组 4 为正常状态感染组, 组 5 为低剂量免疫抑制感染组, 组 6 为高剂量免疫抑制感染组。结果 与组 1 比较, 组 4 在感染 1~5 d 时 WBC 明显升高, 组 6 则在感染 1~7 d WBC 明显降低, 但在感染 9 d 时明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 吸入烟曲霉菌后, CD4⁺T 细胞水平均有降低的趋势, 组 4 在感染 7 d、组 5 在感染 3 d、组 6 在感染 5 d 时与组内其他时期比较均明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 组 4、组 5 中, GM 水平在感染 3 d 时明显高于组内其他时期, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 组 6 GM 水平各时期与感染 1 d 比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); BG 水平在各组中均未见明显改变, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。组 6 肺组织呈重度水肿、出血、中性粒细胞浸润等表现, 较组 4 病变程度明显加重。病变程度具有剂量依赖性和时间依赖性。结论 在肺烟曲霉菌感染中, GM 水平先于 BG 水平明显升高, 不同免疫状态下 GM 水平不一, 正常及免疫力轻度受损者, GM 水平出现一过性增高, 肺组织轻度受损, 重度免疫抑制者 GM 水平持续升高, 肺组织损伤明显加重, 即不同免疫状态可影响肺烟曲霉菌感染的发展和转归。

关键词: 烟曲霉菌; 免疫抑制; 免疫状态; 半乳甘露聚糖; (1,3)- β -D-葡聚糖

中图分类号: R446.6

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2022)16-2189-07

Experimental study of serum BG, GM in rats with aspergillus pneumoniae infection under different immune conditions*

HUANG Wanhong¹, MO Lida^{1△}, LUO Xiaolu¹, CHEN Songlin², LIU Zeduan¹

1. Department of Clinical Laboratory, Nanning Fourth People's Hospital/Nanning Infectious Diseases Hospital Affiliated to Guangxi Medical University/Guangxi AIDS Clinical Treatment Center (Nanning), Nanning, Guangxi 530023, China; 2. Laboratory Teaching and Research Section, the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530023, China

Abstract: **Objective** To establish rat models of aspergillus pneumoniae infection with different immune conditions and to study the correlation between the severity of immune deficiency and aspergillus pneumoniae infection. **Methods** Rat models of different immune conditions were established by injecting normal saline and different concentrations of dexamethasone and cyclophosphamide. Aspergillus pneumoniae infection model was induced by nasal drip of 1×10^7 CFU/mL aspergillus fumigatus spore suspension, 1/5 of rats were randomly killed after infection 1, 3, 5, 7 and 9 days. Blood samples were collected to observe galactomannan (GM), (1,3)- β -D-glucan (BG), white blood cell count (WBC), neutrophil count (NEUT), CD4⁺T cell levels. Lung tissue samples were also taken, pathological examination and fungi culture were performed. A total of 150 rates were divided into 6 groups on average, group 1 was normal control group, group 2 was low dose immunosuppression group, group 3 was high dose immunosuppression group, group 4 was normal infection group, group 5 was low dose immunosuppressive infection group, group 6 was high dose immunosuppressive infection group. **Results** Compared with group 1, WBC was significantly higher in group 4 after infection 1—5 days,

* 基金项目: 广西壮族自治区南宁市科学研究与技术开发计划项目(20183039-5); 广西壮族自治区南宁市人才小高地专项资金资助项目(2018014)。

作者简介: 黄宛虹, 女, 主管技师, 主要从事感染性疾病诊断方面的研究。△ 通信作者, E-mail: 1773398578@qq.com。

and significantly lower in group 6 after infection 1—7 days, but significantly higher after infection 9 days ($P < 0.05$). After inhalation of aspergillus, the levels of $CD4^+$ T cell in group 4 after infection 7 days, group 5 after infection 3 days and group 6 after infection 5 days were significantly lower than those of other periods ($P < 0.05$). In group 4 and group 5, GM levels after infection 3 days were significantly higher than those in other periods ($P < 0.05$). In group 6, the levels of GM in other period had significant differences compared with after infection 1 days ($P < 0.05$). BG levels had no significant change in each period ($P > 0.05$). Group 6 showed severe edema, hemorrhage and neutrophil infiltration, which was more severe than group 4. The degree of lung lesion was dose-dependent and time-dependent. **Conclusion** In aspergillus pneumoniae infection, GM level increases more early than BG level. In different immune conditions, GM level is different. In normal and mild immunocompromised patients, GM level increases temporarily, lung tissue is slightly damaged, GM continuously increases in severe immunosuppressive patients, the lung injury obviously aggravates, that is to say, the development and outcome of aspergillus pneumoniae infection could be influenced by different immune conditions.

Key words: aspergillus; immunosuppression; immune conditions; galactomannan; (1,3)- β -D-glucan

近年来,由于抗菌药物的广泛应用、恶性肿瘤发病率升高、器官移植术的开展、人类免疫缺陷病毒感染患者增多、各种导管侵入性操作,以及免疫抑制剂、糖皮质激素的使用等导致肺部真菌感染发病率逐年增加,且关于免疫功能正常者患肺部真菌感染相关疾病的报道越来越多。免疫功能正常者感染烟曲霉菌的原因及机制均尚不明确,其中部分患者很可能存在某种潜在疾病,如恶性肿瘤^[1-2],因此,明确不同免疫状态下肺烟曲霉菌感染的原因及机制是亟待解决的问题,而 $CD4^+$ T 细胞是目前公认的反映患者免疫力的指标,半乳甘露聚糖(GM)、(1,3)- β -D-葡聚糖(BG)在侵袭性肺烟曲霉菌病(IPA)中有较高的诊断价值,是诊断 IPA 的良好指标。故本研究通过构建不同免疫状态下肺烟曲霉菌感染的大鼠模型,动态分析血清 BG、GM、白细胞计数(WBC)在肺烟曲霉菌感染中的水平变化,以明确免疫缺陷严重程度与肺烟曲霉菌感染的关系。

1 材料与方法

1.1 材料来源 烟曲霉菌菌株购自中国科学院微生物研究所,编号 3.15720。实验动物为 BALB/c 清洁级雄性 SD 大鼠 150 只,6~8 周龄,体质量为 280~320 g,购自浙江维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(浙)2019-0001]。大鼠分组分笼饲养,每笼 2 只,清洁级环境,标准饲养,自由饮水。本研究符合动物实验要求,经过医院动物实验伦理审查。

1.2 仪器与试剂 环磷酰胺和地塞米松购自 Sigma 公司;沙保弱培养基购自广州迪景科技有限公司;生理盐水购自旭东海普药业有限公司;甲醛组织固定剂由中山市康乃欣生物医疗科技有限公司生产;苏木精-伊红染色剂由上海化学试剂有限公司生产;全自动细菌内毒素检测系统及其配套的 BG 检测试剂为湛江安度斯生物有限公司产品;嘉兴科瑞迪医疗器械有限公司生产的 HB-300E 全自动酶联免疫分析仪及丹娜生物科技有限公司生产的 GM 检测试剂;美国 BD 公司

生产的 FACS Via 流式细胞仪及其配套试剂;日本 SYSMEX 公司生产的 XT-2000i 全自动血液分析仪及其配套试剂;德国徕卡公司生产的 EG11504 显微镜。所有试剂均于有效期内使用。

1.3 方法

1.3.1 培养基配制 1 g 葡萄糖、1 g 蛋白胨和 0.5 g 酵母提取物加入 100 mL 的蒸馏水中,混合均匀,分装至玻璃试管中,将松紧适宜的棉塞塞进试管,牛皮纸包扎灭菌。

1.3.2 烟曲霉菌孢子悬液的制备 将烟曲霉菌株冻干粉用液体培养基复活后,取 30 μ L 移植于含液体培养基的试管中,28 $^{\circ}$ C 培养 5 d,孢子悬液转入 15 mL 离心管中,3 000 r/min 离心 15 min,去除上清液,孢子重悬在生理盐水中,调整孢子悬液浓度为 1×10^7 CFU/mL。

1.3.3 实验分组及模型构建 将 150 只大鼠均分为以下 6 组:组 1 为正常对照组;组 2 为低剂量免疫抑制组;组 3 为高剂量免疫抑制组;组 4 为正常状态感染组;组 5 为低剂量免疫抑制感染组;组 6 为高剂量免疫抑制感染组。组 1、组 4 连续注射生理盐水 3 d,组 2、组 5 连续注射地塞米松 0.3 mg/kg+环磷酰胺 37.5 mg/kg 3 d,组 3、组 6 连续注射地塞米松 0.6 mg/kg+环磷酰胺 75 mg/kg 3 d;第 4 天、第 5 天组 1、组 2、组 3 经鼻滴生理盐水,组 4、组 5、组 6 经鼻滴 1×10^7 CFU/mL 孢子悬液;各组将实验开始第 6 天定义为感染 1 d,在感染 1、3、5、7、9 d 这 5 个时间点分别处死 1/5 大鼠取肺组织及血液标本。

1.3.4 实验室指标检测 通过酶联免疫吸附试验的竞争法检测 GM 水平,光度法检测 BG 水平,全自动全血五分类法检测 WBC、中性粒细胞计数(NEUT)。流式细胞计数:取 100 μ L 大鼠抗凝全血,加入相应水平抗体,避光孵育 30 min,加入红细胞裂解液,混匀后避光静置 10 min,离心弃上清液,加入 500 μ L 磷酸盐缓冲液(PBS),离心弃上清液,重复洗涤两次。加 500

μL 流式上样缓冲液重悬后,用流式细胞仪分析 CD4^+ T 细胞水平。

1.3.5 肺组织真菌培养及病理组织检查 所有大鼠自实验开始每天均观察一次至实验结束,实验中大鼠死亡后或麻醉处死大鼠后,于无菌条件下取出完整肺组织,左肺用 40% 甲醛溶液固定,石蜡包埋切片,苏木精-伊红染色法(简称 HE 染色法)染色,光镜下观察。右肺采用 5 mL 0.9% 氯化钠注射液漂洗后,用 300 目筛网过滤,制成悬液,加 1 mL 0.9% 氯化钠注射液稀释,取 0.2 mL 接种于沙保弱琼脂培养基斜面,置于 28 °C 温箱培养 4 d,观察结果。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行数据处理及统计分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用 One-way ANOVA 分析,两两比较采用 Dunnett T3 检验;不符合正态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,多组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 实验动物的一般状况 组 1 饮水、进食、活动无明显异常,体质量每天增加约 7 g,无死亡;组 2 饮水、

进食、活动先减少后增加,体质量在感染 1~5 d 每天减轻约 8 g,感染 6~7 d 未见明显改变,到感染 9 d 时增加约 6 g,全程均无死亡;组 3 饮水、进食、活动减少,体质量在感染 1~7 d 每天减轻 6~10 g,感染 9 d 时体质量未见改变,全程均无死亡;组 4 一般情况同组 1;组 5 饮水、进食、活动减少,精神萎靡,体质量在感染 1~5 d 每天减轻约 10 g,感染 6~7 d 未见明显改变,到感染 9 d 时增加约 5 g,感染 8 d 时有 1 只出现尿血,全程均无死亡;组 6 饮水、进食、活动减少,毛无光泽、蜷缩、颤抖,体质量每天减轻 9~10 g,在感染 8~9 d 时 1 只血便,2 只死亡。

2.2 不同免疫状态下烟曲霉菌感染大鼠外周血 NEUT 动态分析 在感染 1 d 时,组 2、组 5、组 3、组 6 NEUT 均不同程度降低,特别是组 3、组 6 NEUT $< 0.10 \times 10^9/\text{L}$,达到 NEUT 缺乏标准,且与组 1 比较,NEUT 明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。组 6 感染 9 d 时 NEUT 较该组其他时期明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$),且与同时期组 1 比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 不同免疫状态下烟曲霉菌感染大鼠 NEUT 动态分析($\bar{x} \pm s, \times 10^9/\text{L}$)

组别	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d
组 1	1.54 ± 0.29	2.22 ± 1.52	1.23 ± 0.16	2.01 ± 1.44	1.54 ± 0.49
组 2	0.61 ± 0.16	1.28 ± 0.28	1.59 ± 0.87	2.22 ± 1.10	3.02 ± 1.83
组 3	0.09 ± 0.03 ^a	0.61 ± 0.27	0.68 ± 0.27	1.66 ± 0.78	3.26 ± 1.35
组 4	2.84 ± 0.62	3.24 ± 1.30	2.15 ± 0.48	2.39 ± 0.40	2.36 ± 0.68
组 5	0.83 ± 0.19	0.92 ± 0.03	1.60 ± 0.49	2.11 ± 0.63	1.98 ± 0.98
组 6	0.04 ± 0.03 ^{ab}	0.33 ± 0.19 ^b	0.72 ± 0.15 ^b	0.89 ± 0.40 ^b	7.15 ± 2.24 ^a

注:与同时期组 1 比较,^a $P < 0.05$;与同组感染 9 d 比较,^b $P < 0.05$ 。

2.3 不同免疫状态下烟曲霉菌感染大鼠外周血 WBC 动态分析 与组 1 比较,感染 1~7 d 时,组 3、组 6 WBC 明显降低,而组 4 WBC 在感染 1~5 d 明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),但到感染 7 d 及以后组 1 和组 4 WBC 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。组 3 和组 6 在感染 1 d 时 WBC 均处于极低水平,感染 3 d 时升高,至感染 9 d 时较前面几天明显升高,达正常或高水平,组 3 和组 6 同组中其他时期 WBC 与感染 9 d 时比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1、表 2。

2.4 不同免疫状态下烟曲霉菌感染大鼠免疫细胞动态分析 同时期组间 CD4^+ T 细胞水平比较,感染 7 d 时,组 1 与组 4 比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);组 2 与组 5 比较,除在感染 7 d 时差异无统计学意义($P > 0.05$),其余各时期比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);而各时期组 3 与组 6 比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。在组内不同时期 CD4^+ T 细胞水平比较中,组 2 感染 1、3、5 d 低于感染 7、9 d,差异有统计学意义($P < 0.05$),感染 3 d 明显低于感染 1 d,差

异有统计学意义($P < 0.05$);组 3 感染 3 d 达低值,与其他时期比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),感染 5 d 明显低于感染 7 d,差异有统计学意义($P < 0.05$);组 4 感染 7 d 达低值,明显低于感染 1、3、5、9 d,差异有统计学意义($P < 0.05$);组 5 感染 3 d 明显低于其余时期,差异有统计学意义($P < 0.05$);组 6 感染 3、5、7、9 d 比感染 1 d 时明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。不同免疫状态下大鼠吸入烟曲霉菌后 CD4^+ T 细胞水平变化不同,达到低值的时间不同,组 4 在感染 7 d CD4^+ T 细胞水平达低值,组 5 在感染 3 d 时达低值,组 6 在感染 5 d 时达低值。见表 3。

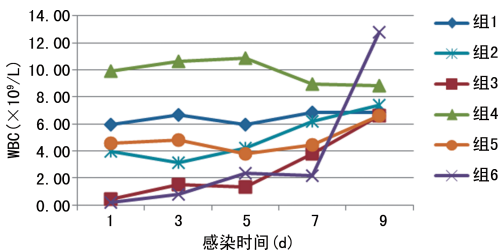


图 1 不同免疫状态下烟曲霉菌感染大鼠 WBC 动态图

表 2 不同免疫状态下烟曲霉菌感染大鼠 WBC 动态变化分析($\bar{x} \pm s$, $\times 10^9/L$)

组别	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d
组 1	5.93±0.87	6.68±1.14	5.94±0.72	6.85±1.11	6.85±1.54
组 2	3.95±0.23 ^a	3.11±0.35 ^a	4.19±0.86	6.17±0.63	7.41±0.61
组 3	0.41±0.11 ^{abd}	1.49±0.69 ^{ad}	1.31±0.60 ^{ad}	3.76±1.10 ^{ad}	6.58±1.05
组 4	9.91±1.78 ^{abc}	10.64±1.02 ^{abc}	10.85±1.13 ^{abc}	8.94±0.37 ^a	8.84±0.41
组 5	4.58±0.48 ^c	4.82±0.67	3.79±0.62	4.46±0.69	6.60±0.96
组 6	0.21±0.15 ^{abd}	0.76±0.18 ^{ad}	2.38±0.84 ^{ad}	2.20±0.82 ^{ad}	12.70±2.53 ^a

注:与同时期组 1 比较,^a $P<0.05$;与同时期组 2 比较,^b $P<0.05$;与同时期组 3 比较,^c $P<0.05$;与同组感染 9 d 比较,^d $P<0.05$ 。

表 3 不同免疫状态下烟曲霉菌感染大鼠 CD4⁺T 细胞水平动态分析($\bar{x} \pm s$, 个/微升)

组别	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d
组 1	1 836.00±294.85	1 700.67±198.91	1 568.00±140.99	1 229.75±102.41	1 679.67±71.52
组 2	471.80±19.81	318.20±49.21 ^d	349.40±67.63	732.40±34.66 ^{def}	762.60±53.85 ^{def}
组 3	123.80±33.99 ^e	25.00±16.42	82.40±22.30 ^e	219.80±49.97 ^{ef}	352.80±166.11 ^e
组 4	2 439.67±362.02 ^{gh}	1 170.00±106.47 ^{gf}	1 679.67±71.52 ^g	378.20±28.57 ^a	1 547.75±180.56 ^g
组 5	814.60±113.74 ^{be}	116.50±10.38 ^b	546.40±72.86 ^{beg}	731.60±75.24 ^e	552.00±34.48 ^{beg}
组 6	350.60±15.96 ^c	197.20±60.81 ^{cd}	30.25±18.84 ^{cd}	83.40±8.05 ^{cd}	290.20±24.97 ^{cd}

注:与同时期组 1 比较,^a $P<0.05$;与同时期组 2 比较,^b $P<0.05$;与同时期组 3 比较,^c $P<0.05$;与同组感染 1 d 比较,^d $P<0.05$;与同组感染 3 d 比较,^e $P<0.05$;与同组感染 5 d 比较,^f $P<0.05$;与同组感染 7 d 比较,^g $P<0.05$;与同组感染 9 d 比较,^h $P<0.05$ 。

2.5 不同免疫状态下烟曲霉菌感染大鼠 GM、BG 水平动态分析 组内各时期 GM 水平比较,组 4 感染 3 d 分别与组内其他时期比较,GM 水平明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);组 5 感染 1 d 与感染 9 d 比较,差异无统计学意义($P>0.05$),感染 1、5、7、9 d 与感染 3 d 比较,差异有统计学意义($P<0.05$);组 6 中,GM 水平从感染 3 d 起均明显高于感染 1 d,差异有统计学意义($P<0.05$),其余组内各时期比较,差异

无统计学意义($P>0.05$)。感染 3 d 时组 4 GM 水平较组 1 明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);感染 5 d 时,组 5 GM 水平较组 2 明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);感染 1~9 d,组 6 GM 水平较组 3 明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 4。组 6 有 3 只大鼠在感染 9 d 时 BG >100 pg/mL,而 BG 水平在各组各时期比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 5。

表 4 不同免疫状态下烟曲霉菌感染大鼠 GM 水平动态分析($\bar{x} \pm s$, $\mu g/L$)

组别	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d
组 1	0.41±0.14	0.44±0.09	0.55±0.24	0.32±0.14	0.41±0.22
组 2	0.30±0.05	0.37±0.12	0.35±0.07	0.51±0.18	0.42±0.16
组 3	0.39±0.08	0.48±0.09	0.48±0.30	0.32±0.09	0.42±0.16
组 4	0.50±0.14 ^e	2.35±0.36 ^{ac}	0.87±0.61 ^e	0.36±0.18 ^e	0.32±0.15 ^e
组 5	0.29±0.06 ^e	2.14±0.23 ^a	0.93±0.10 ^{bce}	0.55±0.08 ^{cef}	0.34±0.06 ^e
组 6	0.47±0.17 ^c	2.91±0.49 ^{acd}	3.08±0.81 ^{acd}	2.34±0.49 ^{acd}	3.97±0.97 ^{acd}

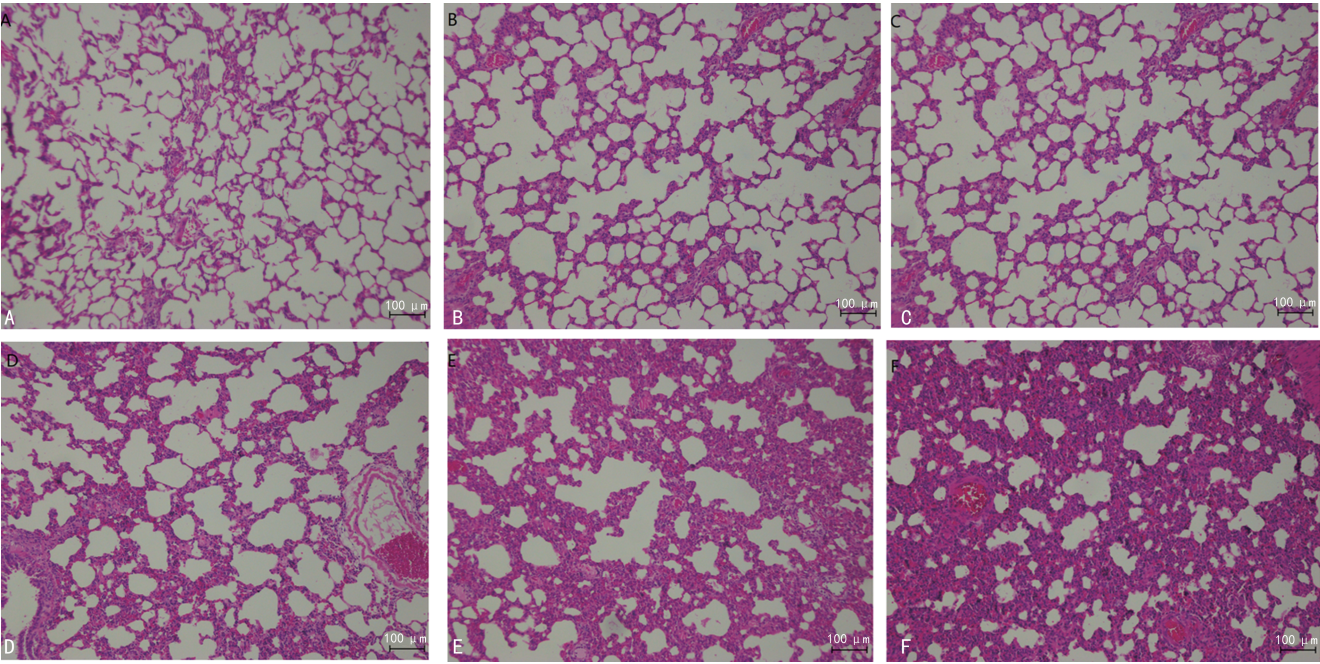
注:与同时期组 1 比较,^a $P<0.05$;与同时期组 2 比较,^b $P<0.05$;与同时期组 3 比较,^c $P<0.05$;与同组感染 1 d 比较,^d $P<0.05$;与同组感染 3 d 比较,^e $P<0.05$;与同组感染 5 d 比较,^f $P<0.05$ 。

2.6 不同免疫状态下烟曲霉菌感染大鼠肺组织培养与病理表现 组 4 与组 5 在感染 3 d 时部分培养阳性,到感染 9 d 时再无真菌生长;而组 6 肺组织在感染 1、3、5、7、9 d 时培养阳性,烟曲霉菌菌落呈烟绿色;光镜下,组 1 大鼠肺泡结构完整,肺泡间隔无增宽,肺间质无明显水肿,肺泡腔内无炎症细胞及液体渗出(图 2A);组 2、组 3 可见轻至中度肺泡支气管水肿,组 4

可见轻度的弥漫性肺水肿,上述 3 组均可见中性粒细胞浸润、出血等病理改变(图 2B、C、D);组 5、组 6 较组 4 肺部病变程度加重,病变程度随着免疫抑制剂剂量的增加呈明显加重,呈现较明显的剂量依赖性,且随着给药时间的增加,病变程度呈明显加重趋势,时间依赖性较强(图 2E、F)。组 2、组 3、组 5 感染 9 d 时病理改变持续存在。

表 5 不同免疫状态下烟曲霉菌感染大鼠 BG 水平动态分析[$\bar{x} \pm s$ 或 $M(P_{25}, P_{75})$, pg/mL]

组别	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d
组 1	16.60±4.15	10.30(10.00,19.00)	17.88±10.54	10.86±1.92	11.80(11.10,12.30)
组 2	19.48±1.39	13.40(13.00,13.90)	12.70±2.44	16.02±0.92	12.00(11.30,13.90)
组 3	16.56±3.02	16.90(15.20,17.20)	15.86±5.10	14.14±7.30	18.90(15.60,22.11)
组 4	10.18±0.40	11.60 (11.10,15.50)	13.46±3.28	15.54±5.10	16.80(11.60,28.30)
组 5	23.70±3.96	14.50(13.00,15.00)	54.40±21.74	15.70±3.49	23.00(21.00,24.00)
组 6	11.50±3.35	15.60 (14.50,20.00)	19.62±6.72	33.08±20.36	41.00(17.30,147.00)



注：A、B、C、D、E、F 分别为组 1、组 2、组 3、组 4、组 5、组 6 感染 5 d 时肺组织病理图。

图 2 不同免疫状态下烟曲霉菌感染大鼠 5 d 时肺组织病理表现(HE 染色,×100)

3 讨 论

肺烟曲霉菌感染是一种严重的机会性感染,在机体免疫力低下时,容易经呼吸道吸入烟曲霉菌而引起感染。正常情况下人体吸入少量烟曲霉菌不致病,但近年来免疫轻度受损者感染烟曲霉菌的情况越来越多^[3-5]。发生肺烟曲霉菌感染患者的免疫状态有所不同,约 18%无基础肺疾病^[6-7]。非粒细胞缺乏的肺烟曲霉菌感染患者中,约 19%无任何潜在疾病,并且非严重免疫缺陷患者的病死率不低于严重免疫缺陷患者^[8-9]。本研究中,组 4 与组 5 在感染 3 d 时 GM 水平有一过性升高,考虑出现该结果与烟曲霉菌进入大鼠体内初期阶段,机体免疫屏障未能短时间内清除病原菌有关,但在感染 5 d 后逐渐恢复正常。在大鼠吸入烟曲霉菌后,机体免疫对其作出反应,不同免疫状态下 CD4⁺T 细胞水平变化不同,组 4 大鼠机体在抵抗烟曲霉菌感染,机体清除烟曲霉菌后即感染 7 d 时有一过性的免疫力降低状态,而后则恢复正常;组 5 前期受到免疫抑制及烟曲霉菌感染的双重作用,在感染 3 d 时免疫力最低,表现为 CD4⁺T 细胞水平最低,而

后 CD4⁺T 细胞水平升高但在感染 9 d 时又降低,考虑为机体免疫力与病原菌相互作用产生的结果;组 6 CD4⁺T 细胞水平达低值的时间比组 1 早,且比组 5 的轻度免疫抑制大鼠晚,分析原因为由于免疫抑制严重,机体在烟曲霉菌入侵时未能在短时间内清除病原菌,导致烟曲霉菌感染,从而使机体免疫力进一步降低,因此表现为 CD4⁺T 细胞在感染 5、7 d 时处于低水平,感染 9 d 时有所回升,考虑为免疫抑制剂作用减弱引起。早期研究中烟曲霉菌可诱导树突状细胞产生曲霉特异性 T 细胞,且曲霉特异性 T 细胞过继免疫疗法可使造血干细胞移植受者产生特异性免疫应答反应,同时形成长期的抗真菌保护作用,说明免疫力在肺烟曲霉菌感染中发挥重要作用^[10-12]。同时免疫力正常或轻度受损者在肺烟曲霉菌入侵时的病理机制变化及转归引起了学者们的重视,本研究推荐在构建大鼠模型进行相关机制的研究时选择感染后 5~7 d 的大鼠为佳。

本研究中组 4 WBC 在感染 1~5 d 时明显升高,到感染 9 d 时恢复正常水平,组 4 与组 5 GM 水平在

感染 3 d 时明显升高,其他时期相对正常,考虑这两组在感染 3 d 时机体与烟曲霉菌相互作用,原始 CD4⁺T 细胞水平较高,免疫力相对正常,在烟曲霉菌入侵时,血液中的单核-巨噬细胞和中性粒细胞系统能够立即识别病原菌,启动 Toll 样受体等信号转导通路,引起感染部位中性粒细胞和单核-巨噬细胞聚集,并释放细胞因子及趋化因子,吞噬并杀灭烟曲霉菌^[13-15];也正因为对烟曲霉菌的抵抗作用,导致组 4 CD4⁺T 细胞水平降低并在感染 7 d 或感染 3 d 时达低水平后又逐渐升高。在真菌培养中,组 4 和组 5 感染 3 d 时培养出真菌,但到感染 9 d 时再无真菌生长,同时组 4 肺组织显示轻度的弥漫性肺水肿、中性粒细胞浸润等病理改变,而组 2、组 3、组 5 肺组织均表现为轻至中度肺泡支气管水肿、炎症细胞浸润等病理改变,到感染 9 d 时病理改变持续存在,可见机体的免疫反应仍对肺组织产生了一定损伤^[16]。

组 6 中由于使用了高剂量免疫抑制剂,WBC、NEUT 在感染 1~3 d 普遍较低,处于粒细胞缺乏状态,CD4⁺T 细胞水平在感染 5 d 时低于 50 个/微升,使得机体在烟曲霉菌入侵时不能及时发挥作用,导致烟曲霉菌增殖,表现为肺组织烟曲霉菌培养阳性及 GM 水平自感染 3 d 起较组 1 明显升高,组织病理表现为肺泡壁毛细血管充血明显,片状的肺泡腔内可见蓝紫色颗粒状的渗出物,存在少量炎症细胞浸润,以单核-巨噬细胞为主并伴少量中性粒细胞浸润。随着免疫抑制剂对血液系统骨髓抑制作用的减弱,大鼠血液 NEUT 升高,在感染 9 d 时,组 6 WBC、NEUT 明显高于组 1,CD4⁺T 细胞仍处于低水平,提示烟曲霉菌感染的发生。该研究结果与李志云等^[17]的研究结果一致。GM 保持高水平,真菌培养阳性,大鼠肺组织炎症反应进一步发展,肺组织大量弥漫性出血、水肿,正常肺泡结构消失,提示在免疫抑制作用消失后,一方面烟曲霉菌的侵袭作用和毒素对肺组织结构进一步破坏,造成肺组织坏死,另一方面高水平的免疫反应进一步造成肺组织的病理损伤^[18-19]。据报道,血液 BG 水平升高出现较迟,主要用于疾病监测^[20],本研究中仅组 6 在感染 9 d 时有 3 只大鼠 BG>100 pg/mL,与赵勇等^[21]研究结果有一定差距,分析可能与试剂的灵敏度、临界值、标本量等有关,具体原因有待进一步研究。

综上所述,免疫力正常或轻度受损者感染烟曲霉菌后,GM 水平表现为一过性升高,但仍有肺组织病理损伤,重度免疫抑制者受烟曲霉菌侵入及增殖的影响,GM 水平持续增高,肺组织损伤明显加重,可见不同免疫状态可影响肺烟曲霉菌感染的发展和转归。

参考文献

- [1] ANDRIYANI Y. Falciparum malaria infection with invasive pulmonary aspergillosis in immunocompetent host-case report[J]. IOP Conference Series (EES), 2018, 125 (1):012080.
- [2] 徐媛,陈敏,廖万清. 中国侵袭性曲霉菌病流行病学现状[J]. 中国真菌学杂志,2018,13(1):57-60.
- [3] 王星,吴琦,周洋洋,等. 免疫功能正常宿主侵袭性肺曲霉菌病的诊断及治疗:附 2 例分析[J]. 山东医药,2015,55 (43):83-84.
- [4] 黄静,沈庆,文秀芳,等. 无免疫缺陷侵袭性曲霉气管-支气管炎合并支气管肺炎 1 例报道[J]. 上海交通大学学报(医学版),2015,35(7):1087-1090.
- [5] 曲丹,李钰,李彤,等. 无免疫功能缺陷者侵袭性肺曲霉病 3 例并文献复习[J]. 中国现代医学杂志,2010,20(4):612-615.
- [6] 许向华,夏初,黄怡. 免疫功能正常小鼠侵袭性肺曲霉病模型建立[J]. 临床军医杂志,2020,48(2):155-158.
- [7] LIANG S,JIANG R,LU H W,et al. Immunity status of invasive pulmonary aspergillosis patients with structural lung diseases in Chinese adults[J]. J Thor Dis, 2017, 9 (2):247-253.
- [8] DAI Z,ZHAO H,CAI S,et al. Invasive pulmonary aspergillosis in non-neutropenic patients with and without underlying disease: a single-centre retrospective analysis of 52 subjects[J]. Respiriology, 2013, 18(2):323-331.
- [9] CHAKRABARTI A,KAUR H,SAVIO J,et al. Epidemiology and clinical outcomes of invasive mould infections in Indian intensive care units(FISF study)[J]. J Crit Care, 2019, 51:64-70.
- [10] 赵作涛,孙铮,万喆,等. 体外制备和增殖烟曲霉特异性 T 细胞的研究[J]. 中国真菌学杂志,2010,5(5):257-263.
- [11] BOLLARD C,HESLOP H. T cells for viral infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant [J]. Blood, 2016, 127(26):3331-3340.
- [12] PERRUCCIO K,TOSTI A,BURCHIELLI E,et al. Transferring functional immune responses to pathogens after haploidentical hematopoietic transplantation[J]. Blood, 2005, 106 (13):4397-4406.
- [13] 谢小梅,李祥,罗闯丹,等. 侵袭性肺曲霉病发生发展过程中 TLRs/NF-κB 信号通路的激活和不同功能细胞因子的产生[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2011,31(3):213-219.
- [14] KALE S D,AYUBI T,CHUNG D,et al. Modulation of immune signaling and metabolism highlights host and fungal transcriptional responses in mouse models of invasive pulmonary aspergillosis[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):17096.

(下转第 2198 页)

好、易于接受新鲜事物、乐于助人等常见原因有关外,还与高原地区献血人群职业特征有关。该地区献血人群以公务员、军人为主体的,这部分人群包含了大量的援藏人员和驻藏军人,年龄普遍偏低,文化水平以本科、大专及高中为主,这也间接影响了高原地区无偿献血人群的学历分布特征。以公务员、军人、医务人员等为主体的无偿献血人群带有一定的指令献血计划特征,通常出现于采供血工作开展的初始阶段,今后随着高原地区采供血工作的深入开展,要着力转变这种现状。此外,高原地区献血人群中“不明学历”和“不明职业”者的比例过高,需要进一步完善献血者信息的采集,这样才有利于今后针对性地开展无偿献血招募工作。

本研究显示,在无偿献血者民族分布上,汉族是无偿献血的主要群体,但藏族是昌都市的主体民族(93%以上),因而需要进一步加强对藏族居民关于无偿献血的宣传工作,普及献血知识,促进其加入无偿献血队伍^[9-10]。该地区重复献血(献血次数 ≥ 2 次)、一次献血量 400 mL 的献血者所占比例较低,远低于浙江^[7]、北京^[11]等地区的相关研究结果,提示昌都市无偿献血的招募工作应该由一次献血 200 mL 向 400 mL 转变,以及加强固定无偿献血者队伍的建设。

综上所述,高原地区无偿献血人群具有其独特的人口学特征,要改变目前以公务员、军人为献血主体人群的现状,有针对性地对藏族、女性、低文化水平人群的无偿献血宣传工作,同时,还应通过采取相关措施提高重复献血人数,鼓励和引导一次献血 400 mL 等,制订适宜当地的献血者招募策略。

参考文献

- [1] 张玉华,赵敬湘,王瑛,等.急进高原高海拔地区高原反应发生情况分析及其紧急献血可行性初步探讨[J].军事医学,2014,38(9):672-674.
- [2] 李向国,余慧芳.新常态下青海无偿献血长效机制的探讨[J].中国输血杂志,2016,29(9):983-985.
- [3] 邓真群.高原无偿献血者招募困难原因分析及对策[J].世界最新医学信息文摘,2018,18(75):202-203.
- [4] 西藏自治区统计局,西藏自治区第七次全国人口普查领导小组办公室.西藏自治区第七次全国人口普查主要数据公报[N].西藏日报(汉),2021-05-20(2).
- [5] 朱永明.血液安全:WHO 的观点[J].中国输血杂志,2010,23(10):760-761.
- [6] 刘娟,李小薇,赵莲,等.高原低压低氧环境对红细胞携氧的影响[J].中国输血杂志,2017,30(8):872-873.
- [7] 王翠娥,潘凌凌,郑茵红,等.浙江省无偿献血人群人口学特征分析[J].预防医学,2018,30(3):244-247.
- [8] 高勇,王黎,马杰,等.大连市 2011—2015 年无偿献血人群的分布特点及变化趋势[J].临床输血与检验,2018,20(1):39-42.
- [9] 毛瑞,孙景春.拉萨市采供血信息血状况与无偿献血人群分布特征分析[J].实用医技杂志,2016,23(2):148-150.
- [10] 陈晓芬.高原民族地区街头无偿献血者特征调查分析及对策[J].甘肃医药,2012,31(1):70-71.
- [11] 江峰,陈霄,高颂明.2013—2019 年北京地区无偿献血人群人口学特征变化趋势[J].北京医学,2020,42(8):767-769.

(收稿日期:2021-11-16 修回日期:2022-03-23)

(上接第 2194 页)

- [15] 罗琴. Toll 样受体 7(TLR7)在侵袭性肺曲霉病中的作用及机制研究[D]. 重庆:重庆医科大学,2020.
- [16] 肖冠英,肖艳华,陈谐捷,等.艾滋病相关的机会性感染性疾病的临床病理特征[J].广州医科大学学报,2019,47(1):22-28.
- [17] 李志云,尧雪洲.观察长期慢性烟曲霉孢子雾化吸入对大鼠气道重塑的影响[J].药物生物技术,2020,27(2):107-111.
- [18] 陈菲,李培,徐小勇,等.过度炎症反应是免疫抑制侵袭性肺曲霉病小鼠死亡的重要原因[J].国际呼吸杂志,2014,

34(22):1690-1695.

- [19] 吴婷,孙禾,苏欣,等.炎症反应和免疫应答在肺曲霉病中的作用[J].中国感染与化疗杂志,2015,15(3):281-285.
- [20] 宋一祎,李华茵.侵袭性肺曲霉病实验室检测方法的研究进展[J].中国临床医学,2018,25(5):804-809.
- [21] 赵勇,王红,任爱民,等.血浆 β -1,3-D-葡聚糖对深部真菌感染诊断的研究[J].中国真菌学杂志,2007,2(4):202-206.

(收稿日期:2021-12-03 修回日期:2022-04-02)