



利用免疫抑制小鼠模型检测真菌病毒对黄曲霉菌致病力影响

杨碧^{1,2}, 刘翔^{1,2}, 田询^{1,2}, 禹文峰^{1,2}, 齐晓岚^{1,2}, 江银辉^{1,2*}

1 贵州医科大学分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550004

2 贵州医科大学地方病与少数民族疾病教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550004

杨碧, 刘翔, 田询, 禹文峰, 齐晓岚, 江银辉. 利用免疫抑制小鼠模型检测真菌病毒对黄曲霉菌致病力影响. 微生物学报, 2022, 62(5): 1784–1794.

Yang Bi, Liu Xiang, Tian Xun, Yu Wenfeng, Qi Xiaolan, Jiang Yin-hui. Mycoviruses affect the virulence of *Aspergillus flavus* to immunosuppressed mouse model. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(5): 1784–1794.

摘要:【目的】构建用于比较黄曲霉(*Aspergillus flavus*, *A. flavus*)菌株之间致病力差异的小鼠感染模型, 并利用该模型评价真菌病毒 AfPV1 对宿主 *A. flavus* 致病力的影响。【方法】用不同浓度环磷酰胺腹腔注射 Institute of Cancer Research (ICR)小鼠, 根据白细胞的数量判断小鼠免疫抑制程度; 通过滴鼻和尾静脉两种感染方法接种不同浓度的 *A. flavus* 孢子量, 统计 14 d 以内小鼠的死亡率, 确定 *A. flavus* 最佳的孢子接种量; 通过小鼠组织的菌落负荷量以及肺部组织的病理观察, 确定 *A. flavus* 感染是否成功; 最后利用该小鼠模型评价真菌病毒 AfPV1 对寄主 *A. flavus* 致病力的影响。【结果】腹腔注射环磷酰胺的浓度为 250 mg/kg 时, 能够达到免疫抑制水平; 小鼠组织真菌负荷和病理组织切片观察显示 *A. flavus* 成功感染接种的 ICR 小鼠组织; 在滴鼻接种模型中, *A. flavus* 的孢子接种量为 40 μ L (1×10^6 CFU/mL)时比较适合评价 *A. flavus* 菌株之间的差异; 在尾静脉接种的模型中, *A. flavus* 的孢子接种量在 50 μ L (1×10^6 CFU/mL)比较适合评价 *A. flavus* 菌株

基金项目: 国家自然科学基金(32000017, 31660012); 贵州省科技计划(黔科合基础-ZK[2021]重点 030, 黔科合基础[2019]1277); 贵州省科技厅区域常见疾病与成体干细胞转化研究平台(黔科中引地[2019]4008); 贵州省教育厅(KY[2021]313)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (32000017, 31660012), by the Guizhou Provincial Natural Science Foundation (ZK[2021]zhongdian030, [2019]1277), by the Regional Common Diseases and Adult Stem Cell Transformation Research and Innovation Platform of Guizhou Provincial Department of Science and Technology [(2019)4008] and by the Department of Education of Guizhou Province (KY[2021]313)

*Corresponding author. Tel: +86-851-86752814; E-mail: jyh5265@163.com

Received: 9 September 2021; Revised: 13 November 2021; Published online: 3 March 2022

之间的差异; 病毒 AfPV1 能够引起 *A. flavus* 的致病力下降, 但是不影响 *A. flavus* 在小鼠肺部的定植量。【结论】本研究构建的小鼠感染模型能够评价 *A. flavus* 菌株之间致病力的差异; 真菌病毒 AfPV1 的感染降低了宿主 *A. flavus* 的致病力。

关键词: *Aspergillus flavus*; 真菌病毒; 免疫抑制小鼠; 感染模型; 尾静脉注射; 滴鼻接种

Mycoviruses affect the virulence of *Aspergillus flavus* to immunosuppressed mouse model

YANG Bi^{1,2}, LIU Xiang^{1,2}, TIAN Xun^{1,2}, YU Wenfeng^{1,2}, QI Xiaolan^{1,2}, JIANG Yinhui^{1,2*}

1 Key Laboratory of Molecular Biology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China

2 Key Laboratory of Endemic and Ethnic Diseases, Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China

Abstract: [Objective] To compare the virulence of different *Aspergillus flavus* strains and the effect of the mycovirus AfPV1 on *A. flavus* virulence to the established immunosuppressed mouse model. [Methods] Institute of Cancer Research (ICR) mice were intraperitoneally injected with different concentrations of cyclophosphamide, and the degree of immunosuppression was determined based on the number of white blood corpuscles. Different concentrations of *A. flavus* spores were inoculated through nasal drip and caudal vein, and the optimal inoculation amount of *A. flavus* spores was determined based on the mortality rate of mice within 14 days. Fungal load and pathological changes of lung tissue were employed to determine whether the mice were infected by *A. flavus*. The effect of AfPV1 on the virulence of *A. flavus* was finally evaluated with the mouse model. [Results] The cyclophosphamide at a dose of 250 mg/kg caused the immunosuppression of ICR mice. Fungal load and histological changes demonstrated that ICR mice were successfully infected by *A. flavus*. In the nasal inoculation model, the inoculation with 40 μL (1×10^6 CFU/mL spores) *A. flavus* was suitable for the evaluation of *A. flavus* virulence. In the model of caudal vein inoculation, the suitable inoculation dose of *A. flavus* was 50 μL (1×10^6 CFU/mL spores). AfPV1 weakened the virulence of *A. flavus* while did not affect the load of *A. flavus* in mice. [Conclusion] The constructed mouse infection model could evaluate the pathogenicity of *A. flavus* strains, and the mycovirus AfPV1 infection reduced the pathogenicity of *A. flavus*.

Keywords: *Aspergillus flavus*; mycovirus; immunosuppressed mice; infection model; caudal vein inoculation; nasal inoculation

真菌病毒是一类侵染真菌,以真菌为宿主的病毒,目前发现其基因组的核酸类型有3种:双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA),单链RNA(single-stranded, ssRNA),或DNA,目前报道的多数真菌病毒的基因组核酸是

dsRNA^[1-3]。关于曲霉属真菌病毒的研究始于50年前^[4-5],真菌病毒在各个分类系统中均有发现,在曲霉中检测到的真菌病毒包括双分病毒科(*Partitiviridae*),全病毒科(*Totiviridae*),产黄青霉病毒科(*Chrysoviridae*),呼肠孤病毒科

(*Reoviridae*), Mega 双 RNA 病毒科(*Megabirnaviridae*), 四分病毒科(*Quadriviridae*), 内源 RNA 病毒科(*Endornaviridae*)^[6]。

黄曲霉(*Aspergillus flavus*, *A. flavus*)是一种条件致病菌,是引起侵袭性和非侵袭性曲霉病的第二大病原体,仅次于烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*, *A. fumigatus*)^[7-9]。在过去的几十年里,患曲霉病的几率随着免疫抑制患者的增加而增加^[10]。而目前用于治疗曲霉感染的抗真菌药物只有多烯类(两性霉素 B)、三唑类(伊曲康唑、伏立康唑和泊沙康唑)和棘白菌素类(卡泊芬净和米卡芬净)3类^[11]。此外,抗真菌药物副作用大,容易引起 *A. flavus* 产生耐药性^[12-13]。因此,寻求高效低毒的治疗方案是当前急需解决的问题。真菌病毒能够选择性侵染真菌,大多数真菌病毒的感染对宿主真菌没有造成明显影响,但有些真菌病毒的感染能够导致宿主真菌生长发育及致病性衰退或变成弱毒菌株,这些弱毒相关的病毒为生物防治带来新的契机^[14]。如低毒力病毒 CHV1 (*Cryphonectria hypovorus* 1) 成功应用于栗疫病的防治^[15],低毒真菌病毒的治疗应用价值得到了广大研究者的关注^[16],但真菌病毒能否用于治疗人和动物的真菌感染仍然是一个未知问题^[17-18]。我们课题组前期分离得到一株能够引起 *A. flavus* 表型衰退、孢子产量减少和生长速度减慢的真菌病毒(*A. flavus partitivirus* 1, AfPV1)^[19],但其治疗潜力还需要进一步研究。

曲霉感染的动物模型在许多研究中都有报道,鸟禽类、豚鼠、家兔以及啮齿目动物均可作为肺曲霉病的感染模型,用来研究肺曲霉病、全身性疾病和真菌性角膜炎等^[20-21]。其中,小鼠基因组与人类基因组高度同源,小鼠的生理、生化指标及其调控机制和人类相同或相似,且

经济实惠,繁殖速度快,成为研究人员的首选模式生物。但他们大多专注于治疗技术和致病机制等,而应用于曲霉致病力评价方面的研究相对较少。故此,本研究欲比较曲霉感染小鼠构建模型的两种方法,得到能够稳定评价真菌病毒对宿主真菌毒力影响的脊椎动物感染模型。通过感染模型评价真菌病毒 AfPV1 对 *A. flavus* 致病力的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

ICR 雌性小鼠,6-8 周龄,体重为 20-24 g,购自贵州医科大学北校区动物房,许可证号:SCXK(京)2019-0010。分笼饲养,自由进食饮水,750 mL 饮用水中溶解 250 mg 四环素预防细菌感染,保持饲养环境清洁。

1.1.2 菌株

A. flavus LDF1,不携带任何病毒并标记嘧啶磺胺抗性,*A. flavus* LDF1b3(病毒 AfPV1 感染菌株 LDF1 的 *A. flavus*),菌株获得方法详见文献^[19],AfPV1 基因组序列已录入 NCBI GenBank (No. MK344768, MK344769, MK344770),由本课题组前期获得。

1.1.3 主要试剂和仪器

四环素(95%),磷酸盐缓冲液,吐温-80(70%),头孢霉素(916-964 μg/mg),北京 Solarbio 公司;环磷酰胺(97%),美国默克 Sigma-Aldrich 公司。

显微镜,LEICA DM500;生化培养箱,天津赛得利斯;离心机,GENESPEED 1730R;研磨机,塞维尔;血细胞计数板,Neubauer;通风橱,泸净净化 SW-TFG-15;超净台,苏州市金净净化设备科技有限公司。

1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA): 马铃薯 200 g, 加水煮烂, 4 层纱布过滤去除马铃薯泥, 葡萄糖 200 g 及琼脂粉 13 g, 蒸馏水定容至体积 1 000 mL, 121 °C 灭菌 20 min。

察氏培养基(g/L): NaNO₃ 3.0, KCl 0.5, K₂HPO₄·3H₂O 1.0, MgSO₄·7H₂O 0.5, FeSO₄·7H₂O 0.01, 蔗糖 30, 琼脂 15, 蒸馏水定容至体积 1 000 mL, 121 °C 灭菌 20 min。

1.3 菌悬液制备

将 *A. flavus* LDF1, LDF1b3 分别接种于 PDA 培养基上, 使其在 30 °C 培养箱中生长 5 d 之后, 用 10 mL 含 0.1%吐温-80 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS; pH 7.2-7.4) 冲洗 PDA 培养基表面的菌丝, 然后用 8 层灭菌的擦镜纸过滤, 收取曲霉孢子; 所得孢子悬液再经 8 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, PBS (含 0.1%吐温-80)再次重悬, 8 000 r/min 离心, 通过血细胞计数板计数并根据实验要求调整曲霉分生孢子的浓度为 1×10⁴ 个菌落形成单位(colony-forming units, CFU)/mL, 1×10⁶ CFU/mL, 1×10⁸ CFU/mL。

1.4 建立免疫抑制模型

以环磷酰胺的给药剂量分组, 分为 100 mg/kg 剂量组、150 mg/kg 剂量组、200 mg/kg 剂量组、250 mg/kg 剂量组、300 mg/kg 剂量组和生理盐水对照组, 每组 5 只小鼠。不同剂量环磷酰胺分别溶于生理盐水。所有小鼠均采用以下方法建立免疫抑制状态: 于实验 d0、d1、d2 分别通过腹腔注射 0.2 mL 环磷酰胺。对照组小鼠通过腹腔注射同等体积的生理盐水。于 d1、d2、d3、d5、d7 进行小鼠尾静脉采血, 血细胞计数板计数外周血白细胞数量, 根据白细胞减少的程度判断小鼠是否受到免疫抑制。

1.5 曲霉接种方法及分组

环磷酰胺是一种免疫抑制剂, 注射后对小鼠影响较大, 如活动减少、厌食, 较大的注射量能够引起小鼠死亡, 因此需要免疫对照组消除环磷酰胺对实验结果的影响。实验小鼠随机分组, 每组 20 只小鼠, 分为实验组、免疫对照组(mock)和空白对照组(untouched, UTC)。实验组根据接种孢子悬液浓度分为 3 组, 1×10⁴ CFU/mL 组、1×10⁶ CFU/mL 组、1×10⁸ CFU/mL 组; 根据感染菌株分为 2 组, 感染携带病毒菌株 LDF1b3 组, 感染不携带病毒菌株 LDF1 组。参考 Lan 等研究^[22], 尾静脉接种法: 用小鼠固定器固定小鼠, 通过小鼠尾静脉缓慢注射 50 μL 孢子悬液, 注射完毕用棉签进行止血。免疫对照组小鼠尾静脉注射同等体积生理盐水, 空白对照组不做处理。参考 Kalleda 等研究^[23], 滴鼻接种法: 5%的水合氯醛腹腔注射 0.1 mL/20 g 麻醉免疫小鼠, 用移液器混匀后吸取孢子悬液, 向小鼠两个鼻孔内分别缓慢滴入 40 μL 的孢子悬液, 使小鼠呈直立状态, 保持 10 min, 直至悬液完全被小鼠吸入。免疫抑制组滴入同体积生理盐水, 空白组不做处理。

1.6 动物感染过程监测及组织真菌负荷测定

小鼠感染曲霉后 14 d 内, 每日监测小鼠的生存状态, 进食量, 记录死亡数量, 计算存活率。尾静脉接种的小鼠在感染后 d1、d3、d5、d7 的相同时间点每组随机处死 5 只小鼠, 取小鼠的肝、肾和肺组织, 观察组织器官形态特征, 有无明显病灶感染。无菌条件下取 1 g 组织, 置于 10 mL PBS (含 0.1%吐温-80)中进行组织匀浆处理。滴鼻接种的小鼠在感染后 d1、d3、d5、d7 的相同时间点每组随机处死 5 只小鼠, 取小鼠的肺, 观察肺部形态特征, 有无明显病灶感染, 或明显充血。无菌条件下取 1 g 组织, 置

于 5 mL PBS (含 0.1%吐温-80)中进行组织匀浆处理。匀浆梯度稀释后,取 50 μ L 涂布在察氏培养基(含 200 μ g/mL 头孢霉素)上,每个脏器 3 个平行,30 $^{\circ}$ C 培养 3 d 后进行菌落计数,计算每克组织的菌落数(CFU)。

1.7 病理组织切片

无菌取下感染 3 d 后处死的小鼠组织,将小鼠组织用无菌 PBS 冲洗干净后,浸泡于 4% 多聚甲醛固定 72 h,将固定好的组织包埋于石蜡中,切片,苏木精和曙红染色(haema eosin, HE),对组织进行病理学检查;将切片进行六胺银染色(Grocott's methenamine silver, GMS),观察组织菌丝形成情况。

1.8 统计学分析

采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线并采用对数秩检验(log-rank)进行生存曲线分析,比较死亡率差异,公式为 $\frac{(Q_A - E_A)^2}{E_A} + \frac{(Q_B - E_B)^2}{E_B}$ (Q_A : 组 A 的所有观察数之和, Q_B : 组 B 的所有观察数之和, E_A : 组 A 所有的期望数之和, E_B : 组 B 的所有期望数之和);多重比较采用 Bonferroni's multiple comparisons test 检验分析组间白细胞数量差异,菌落负荷差异。所有实验数据的统计分析和作图均使用软件 Graph Pad Prism 7.0, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 免疫抑制小鼠模型的建立

相比于对照组,实验组小鼠腹腔注射环磷酰胺后,外周血白细胞数明显减少,实验第 7 天,100 mg/kg 组的白细胞数为(5 198 \pm 3 352)个/ μ L,与对照组白细胞数差异无统计学意义。150 mg/kg 组的白细胞数为(5 466 \pm 125)个/ μ L,与对照组白细胞数差异具有统计学意义($P=0.002$)。200 mg/kg 组的白细胞数为(3 633 \pm 125)个/ μ L,与对照组白细胞数差异具有统计学意义($P < 0.001$)。250 mg/kg 组的白细胞数为(1 783 \pm 75)个/ μ L,与对照组白细胞数差异具有统计学意义($P < 0.001$) (表 1)。在 300 mg/kg 实验组中,第 1 次注射环磷酰胺后有 2/5 的小鼠死亡,第 2 次注射环磷酰胺后有 4/5 的小鼠死亡,对照组及其余剂量实验组 d0-d7 内无小鼠死亡。100 mg/kg 实验组与 150 mg/kg 实验组白细胞数在 d7 开始回升,白细胞数恢复到近似正常小鼠的白细胞数量水平。200 mg/kg 实验组与 250 mg/kg 实验组在 d7 回升后白细胞数量仍旧低于正常水平。250 mg/kg 实验组的白细胞数量低于 200 mg/kg 实验组的白细胞数量,同时比正常水平白细胞数量低(7 292 \pm 100)个/ μ L,且无小鼠死亡,该白细胞数量水平与文献[24]报道使用的免疫抑制模型小鼠白细胞数量水平大

表 1 不同剂量环磷酰胺注射后小鼠外周血白细胞计数

Table 1 Leukocyte counts in mice peripheral blood after different doses of cyclophosphamide injection

Groups	Leukocytes counting in mice peripheral blood/ μ L				
	d1	d2	d3	d5	d7
100 mg/kg	4 400 \pm 1 737	2 783 \pm 730	2 150 \pm 285**	1 433 \pm 125**	5 198 \pm 3 352
150 mg/kg	7 725 \pm 1 075	2 833 \pm 125***	1 500 \pm 50***	730 \pm 5***	5 466 \pm 125**
200 mg/kg	8 466 \pm 1 674	2 133 \pm 325***	1 433 \pm 75***	700 \pm 275***	3 633 \pm 125***
250 mg/kg	4 750 \pm 1 237*	2 350 \pm 100***	493 \pm 10***	750 \pm 100***	1 783 \pm 75***
300 mg/kg	/	/	/	/	/
Control	7 040 \pm 10	7 025 \pm 925	8 575 \pm 1 025	7 950 \pm 600	9 075 \pm 125

Statistical analysis was performed for comparisons between experimental group and control group. ***: a significant correlation $P < 0.001$, **: a significant correlation $0.001 < P < 0.01$, *: a significant correlation $0.01 < P < 0.05$.

体一致, 因此 250 mg/kg 的环磷酰胺给药剂量作为构建免疫抑制模型剂量, 供后续实验使用。

2.2 *A. flavus* 引起的浓度依赖性死亡率

A. flavus LDF1 感染浓度分别为 1×10^4 、 1×10^6 、 1×10^8 CFU/mL, 感染 14 d 后的结果表明, 在尾静脉接种孢子悬液构建曲霉感染模型中, 感染孢子浓度为 1×10^4 CFU/mL 时, 感染小鼠在 d4 开始出现死亡, 死亡率为 1/20, 其 14 d 的终死亡率为 8/20; 感染孢子浓度为 1×10^6 CFU/mL 时, 感染小鼠在 d2 开始出现死亡, 死亡率为 2/20, d3 的死亡率为 5/20, 其 14 d 的终死亡率为 18/20; 感染孢子浓度为 1×10^8 CFU/mL 时, 感染小鼠在第 1 天开始出现死亡, 死亡率为 5/20, d3 的死亡率为 14/20, 其 14 d 的终死亡率为 17/20 (图 1A)。在滴鼻接种孢子悬液构建曲霉感染模型中, 感染孢子浓度为 1×10^4 CFU/mL 时, 感染小鼠在 d3 开始出现死亡, 死亡率为 1/20, 其 14 d 的终死亡率为 4/20; 感染孢子浓度为 1×10^6 CFU/mL 时, 感染小鼠在 d2 开始出现死亡, 死亡率为 1/20, 其 14 d 终死亡率为 7/20; 感染孢子浓度为 1×10^8 CFU/mL 时, 感染小鼠在 d2 开始出现死亡, 死亡率为 2/20, 其 14 d 终死亡率为 10/20 (图 1B)。两种接种方式的免疫抑制对照组及空

白对照组无小鼠出现死亡, 死亡率为 0。在尾静脉接种的模型中, 接种孢子浓度为 1×10^8 CFU/mL 的小鼠前期死亡率过高对后期统计分析不利, 而接种浓度为 1×10^4 CFU/mL 的小鼠死亡率过低, 接种浓度为 1×10^6 CFU/mL 的小鼠死亡率比较适合评价 *A. flavus* 菌株之间致病力的差异。因此接下来本实验均采用接种 1×10^6 CFU/mL 浓度进行研究。

2.3 携带病毒菌株 LDF1b3 与不携带病毒菌株 LDF1 的毒力比较

LDF1b3 与 LDF1 的接种浓度为 1×10^6 CFU/mL。在尾静脉接种小鼠模型中, 小鼠均在感染后 d2 开始出现死亡, LDF1b3 组死亡率为 1/20, LDF1 组为 2/20。感染 14 d 后, LDF1b3 组最终死亡率为 15/20, LDF1 组最终死亡率为 18/20 (图 2A)。结果具有显著性差异 ($P < 0.0001$)。在滴鼻接种小鼠模型中, LDF1b3 组在感染后 d4 开始出现小鼠死亡, 死亡率为 1/20, LDF1 组在感染后 d2 开始出现小鼠死亡, 死亡率为 1/20。感染 14 d 后, LDF1b3 组最终死亡率为 4/20, LDF1 组最终死亡率为 7/20 (图 2B)。结果具有显著性差异 ($P = 0.0153$)。两种接种方式的免疫抑制对照组及空白对照组无小鼠出现死亡, 死亡率为 0。

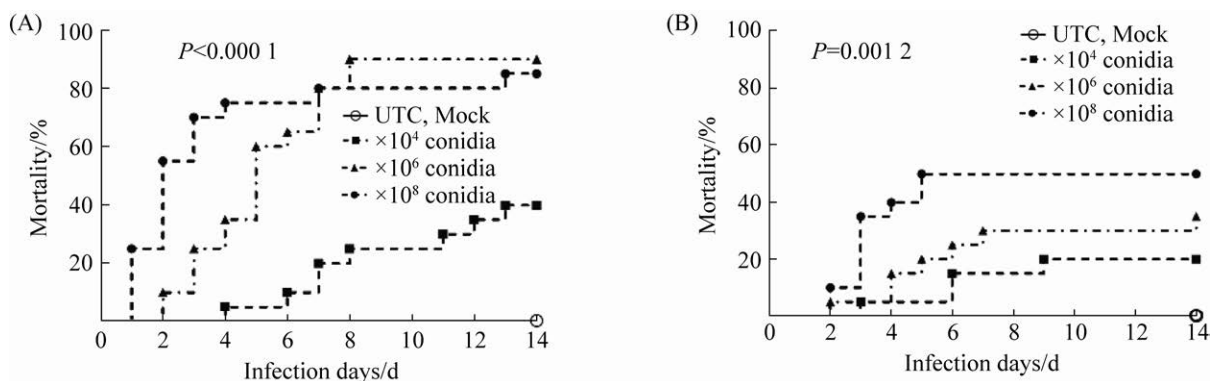


图 1 小鼠感染 LDF1 后生存曲线图

Figure 1 Survival curve of mice infected with LDF1. Mortality of mice infected with virus-free (LDF1) intravenously (A) and intranasally (B) for 14 d. A: $P < 0.0001$; B: $P = 0.0012$, a significant correlation.

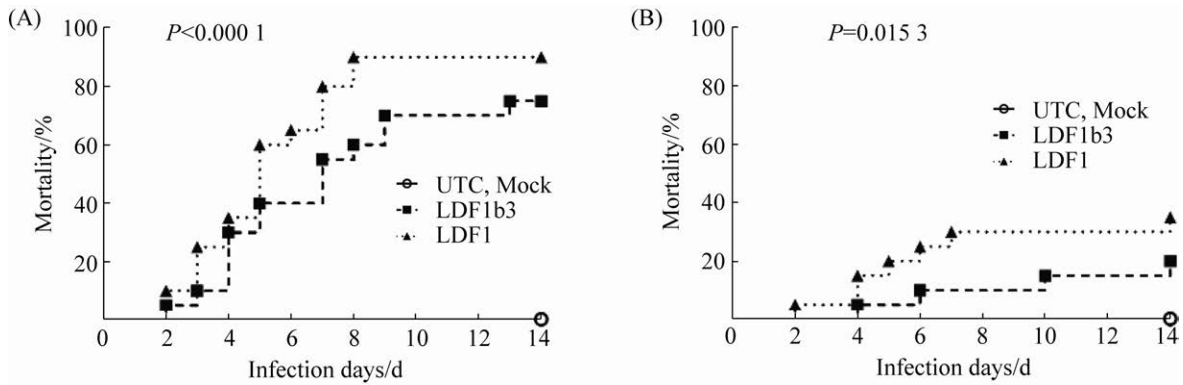


图 2 小鼠感染黄曲霉后的生存曲线图

Figure 2 Survival curve of mice infected with *A. flavus*. Mortality of mice infected intravenously (A) and intranasally (B) with virus-free (LDF1) and virus-infected (LDF1b3) strains for 14 d. A: $P < 0.000 1$; B: $P = 0.015 3$, a significant correlation.

因此两种接种感染方式均表明携带病毒菌株 LDF1b3 毒力低于不携带病毒菌株 LDF1 的毒力, 故真菌病毒 AfPV1 降低了宿主 *A. flavus* 致病力。

2.4 组织真菌负荷测定

实验结果表明, 小鼠在接种 LDF1b3 与 LDF1 孢子悬液后, 组织的真菌负荷随着时间的增加, 呈逐渐降低的趋势。在尾静脉接种模型中, 小鼠接种感染 d1、d3、d5、d7 后, LDF1b3 组小鼠肝组织的菌落负荷量比 LDF1 组少, 在 d7 时 LDF1b3 组肝组织真菌已被清除, LDF1 组仍有真菌定殖(图 3A、B、C); LDF1b3 组小鼠肺组织的菌落负荷量比 LDF1 组少, 在 d5 时 LDF1b3 组肺部真菌已被清除, LDF1 组 d5 仍有真菌定殖(图 3D、E、F); LDF1b3 组小鼠肾组织菌落负荷量与 LDF1 组相近, 在 d7 时两组均有真菌定殖(图 3G、H、I)。

在滴鼻接种模型中, 小鼠接种感染 d1、d3、d5、d7 后, LDF1b3 组小鼠肺部的菌落负荷量均比 LDF1 组少, 在 d7 时 LDF1b3 组肺部真菌已被清除, LDF1 组仍有真菌定殖(图 4A、B、C)。在两种接种模型中, 小鼠感染 LDF1b3 菌株后的组织菌落负荷数均低于感染 LDF1 菌株

后的菌落负荷数, 但多数差异没有统计学意义, 结果与已发表文献中 qPCR 的结果一致。

2.5 病理组织切片

小鼠接种 *A. flavus* LDF1 与 LDF1b3 后 3 d, 可见肺组织颜色暗红, 有明显充血, 六胺银染色切片可见明显菌丝团生成, HE 染色可见明显肺泡出血, 肺泡结构紊乱, 不规整, 肺泡之间间隔出现明显增宽、断裂等现象(图 5)。对照组肺组织较完整, 肺泡结构规整。结果表明 *A. flavus* LDF1 与 LDF1b3 均能成功感染小鼠。

3 讨论与结论

随着大量使用广谱抗生素, 对肿瘤患者进行放疗化疗, 以及对器官和干细胞移植的患者免疫抑制剂的使用, 免疫力低下人群逐渐增多, 导致曲霉病的发生率逐年升高^[25]。建立曲霉病模型是研究曲霉病的发病规律和发病机制的基础^[26]。在本研究中, 我们参考了前人构建小鼠曲霉病模型中的两种方法, 并进行适当改进旨在用于评价 *A. flavus* 菌株之间致病力的差异。研究发现两种感染 *A. flavus* 的方法各有优缺点。尾静脉注射法接种孢子悬液对操作者有一

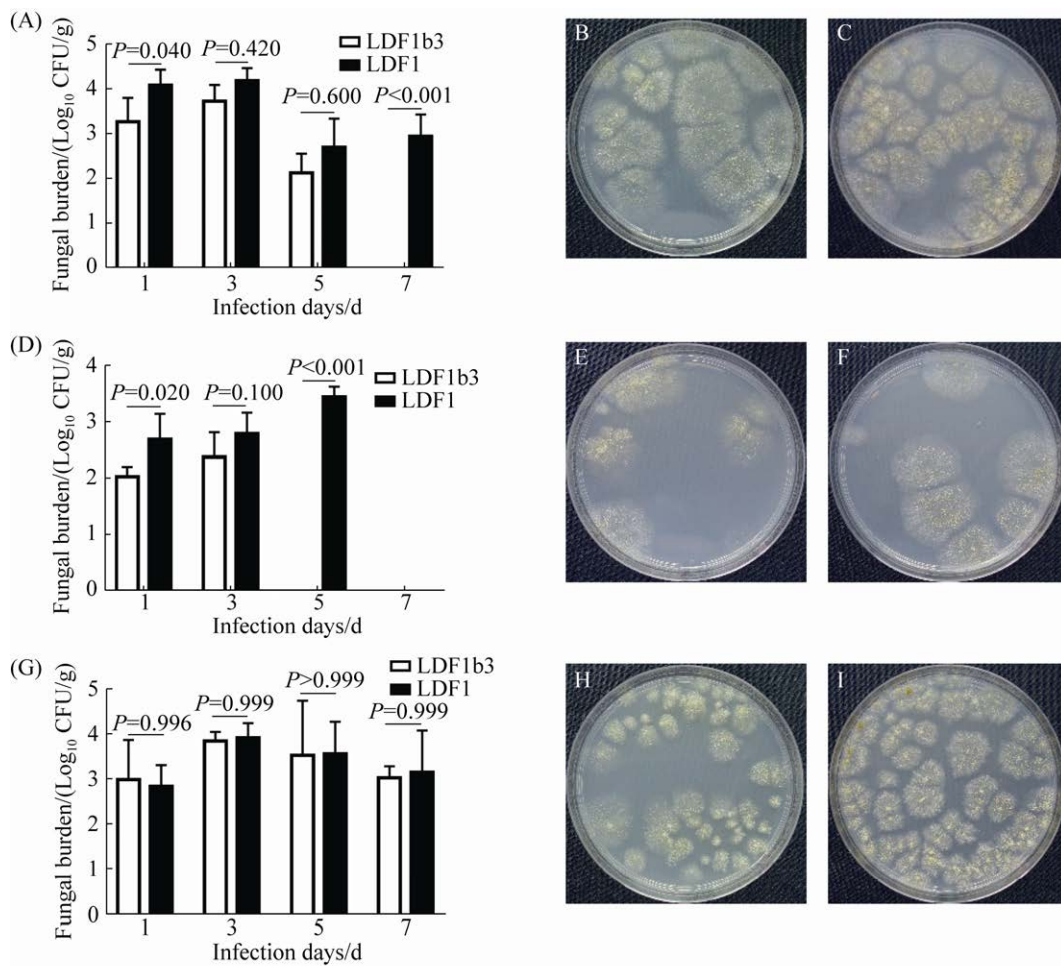


图 3 小鼠尾静脉接种感染 *A. flavus* 后肝, 肺, 肾组织匀浆平板菌落计数

Figure 3 Fungal loads in the liver, lung and kidney of mice with caudal vein inoculation of *A. flavus*. Time-course of fungal burden of liver (A), lung (D) and kidney (G) tissues; the colony plates of liver (B), lung (E), and kidney (H) on day 3 of infection with LDF1b3; the colony plates of liver (C), lung (F), and kidney (I) on day 3 of infection with LDF1; $P < 0.05$ a significant correlation.

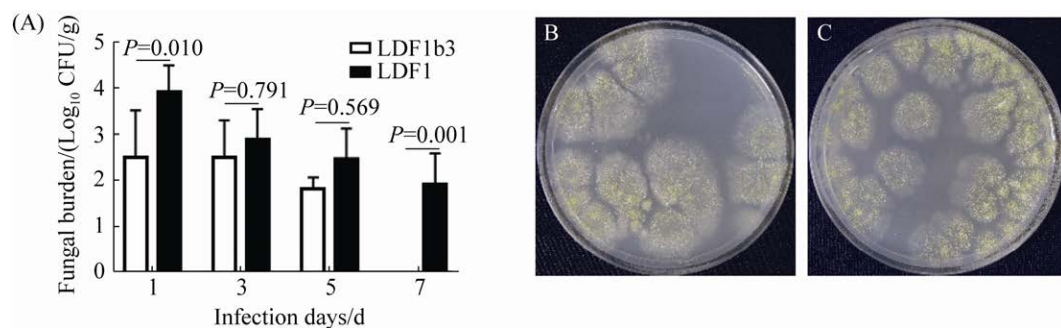


图 4 小鼠滴鼻接种感染 *A. flavus* 后肺组织匀浆平板菌落计数

Figure 4 Fungal loads in the lung of mice with nasal inoculation of *A. flavus*. Time-course of fungal burden of lung (A) tissues; the colony plates of lung on day 3 after infection with LDF1b3 (B) and LDF1 (C); $P < 0.05$ a significant correlation.

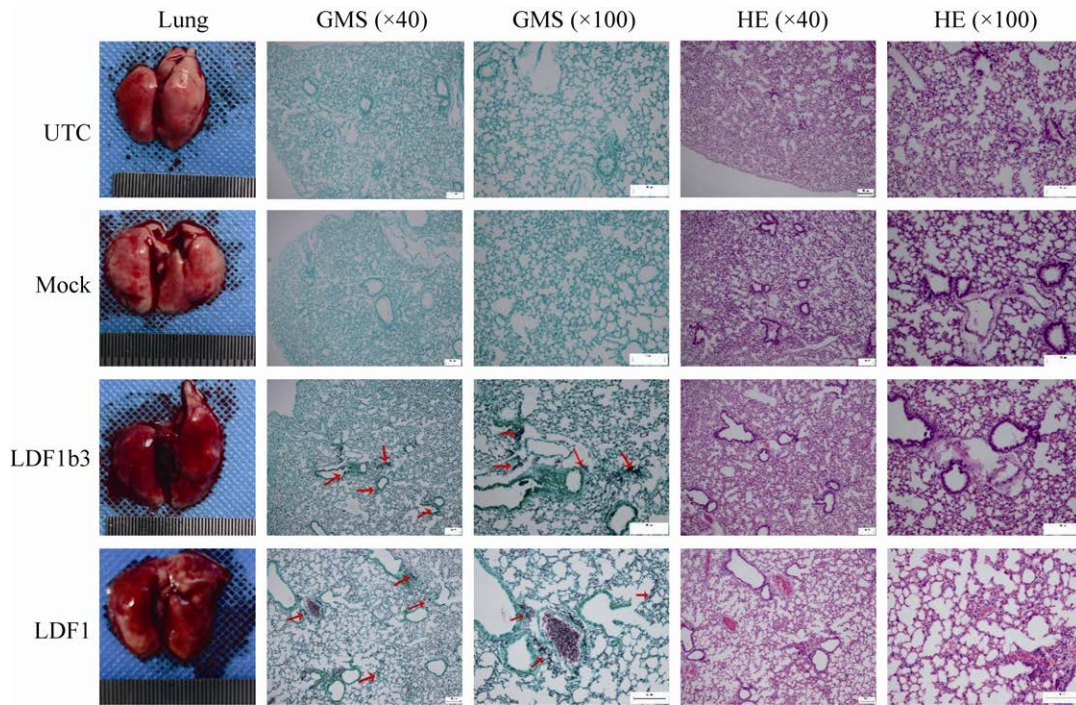


图5 小鼠感染 *A. flavus* 后组织病理表现

Figure 5 Histopathological features of mice infected with *A. flavus*. Red arrow: fungal mycelium mass.

定技术要求，在国内较少有人采用，但此方法能确定感染曲霉孢子浓度，且建立周期短，稳定性相对较好^[27]。滴鼻接种法操作简单，不会对小鼠造成很大的伤害，在模拟曲霉感染的过程中更加的真实，并且能够避免感染过程中因操作造成小鼠的意外死亡，但最终进入气道的孢子量个体间差异较大，不能保证动物模型疾病严重程度的均一性^[28]。同时，我们得到 250 mg/kg 的环磷酰胺给药剂量比较适合 ICR 小鼠的免疫抑制的构建(表 1)。在滴鼻接种模型中，*A. flavus* 的孢子接种量为 40 μL (1×10^6 CFU/mL)时比较合适评价 *A. flavus* 菌株之间的差异(图 1B)。在尾静脉接种的模型中，*A. flavus* 的孢子接种量在 50 μL (1×10^6 CFU/mL)比较合适评价 *A. flavus* 菌株之间的差异(图 1A)

A. flavus 是一种重要的条件致病真菌，能够引起免疫低下患者侵袭性曲霉病。目前用于

曲霉病治疗的抗真菌药物有限^[25,29]。此外，真菌抗生素副作用强，*A. flavus* 极容易对现有的抗真菌药物产生耐药性^[30]。真菌病毒是一种选择性感染真菌的病毒，有些真菌病毒能够引起寄主致病力衰退，因此具有治疗病原真菌感染的潜力^[31-32]。真菌病毒用于防治植物病原真菌已有较多的研究报告^[33-34]，但用于治疗人体和动物病原真菌未见任何报道。在本研究中，我们尝试使用真菌病毒作为治疗 *A. flavus* 感染的策略。通过分离我们得到的一种能够引起 *A. flavus* 表型衰退的真菌病毒 AfPV1^[19]。本研究通过构建小鼠感染模型，并利用该模型评价 AfPV1 对寄主 *A. flavus* 的致病力的影响。研究结果显示，病毒 AfPV1 能够引起 *A. flavus* 的致病力下降(图 2)，但是不影响 *A. flavus* 在小鼠肺部的定殖量(图 3 和图 4)。因此真菌病毒 AfPV1 对 *A. flavus* 的感染具有一定的治疗潜力。近年来，关于真菌病毒

会导致宿主真菌致病力降低的研究很多^[35-36],但是能够得到应用的真菌病毒较少。其中真菌病毒的寄主专一性限制了病毒感染其他寄主真菌^[17],治疗上不具有广谱性,如 AfPV1 不具备治疗烟曲霉感染的潜力。此外真菌病毒主要通过菌丝体融合进行传播^[18,37],有限的传播途径同样也限制真菌病毒治疗的应用。总之,本研究用免疫抑制小鼠构建了能够评价真菌病毒对 *A. flavus* 菌致病力影响的动物模型,并用该模型检测了真菌病毒 AfPV1 对 *A. flavus* 致病力的影响。真菌病毒 AfPV1 能够降低 *A. flavus* 的致病力,对治疗 *A. flavus* 的感染有一定的潜力,但应用于治疗还需进一步研究。

参考文献

- [1] Ghabrial SA, Castón JR, Jiang DH, Nibert ML, Suzuki N. 50-plus years of fungal viruses. *Virology*, 2015, 479/480: 356–368.
- [2] Kotta-Loizou I. Mycoviruses and their role in fungal pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, 2021, 63: 10–18.
- [3] Peyambari M, Roossinck MJ. Characterizing mycoviruses. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York, 2018: 13–24.
- [4] Buck KW. From interferon induction to fungal viruses. *European Journal of Epidemiology*, 1988, 4(4): 395–399.
- [5] Hollings M. Mycoviruses: viruses that infect fungi. *Advances in Virus Research*, 1978, 22: 1–53.
- [6] Kotta-Loizou I, Coutts RHA. Mycoviruses in aspergilli: a comprehensive review. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1699.
- [7] Cadena J, Thompson GR 3rd, Patterson TF. Invasive aspergillosis: current strategies for diagnosis and management. *Infectious Disease Clinics of North America*, 2016, 30(1): 125–142.
- [8] Kanj A, Abdallah N, Soubani AO. The spectrum of pulmonary aspergillosis. *Respiratory Medicine*, 2018, 141: 121–131.
- [9] Rudramurthy SM, Paul RA, Chakrabarti A, Mouton JW, Meis JF. Invasive aspergillosis by *Aspergillus flavus*: epidemiology, diagnosis, antifungal resistance, and management. *Journal of Fungi: Basel, Switzerland*, 2019, 5(3): 55.
- [10] Brown GD, Denning DW, Gow NAR, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden killers: human fungal infections. *Science Translational Medicine*, 2012, 4(165): 165rv13.
- [11] Perlin DS, Rautemaa-Richardson R, Alastruey-Izquierdo A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *The Lancet Infectious Diseases*, 2017, 17(12): e383–e392.
- [12] Paul RA, Rudramurthy SM, Meis JF, Mouton JW, Chakrabarti A. A novel Y319H substitution in CYP51C associated with azole resistance in *Aspergillus flavus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2015, 59(10): 6615–6619.
- [13] Yang XY, Chen W, Liang TY, Tan JW, Liu WX, Sun Y, Wang Q, Xu H, Li LJ, Zhou YB, Wang QQ, Wan Z, Song YG, Li RY, Liu W. A 20-year antifungal susceptibility surveillance (from 1999 to 2019) for *Aspergillus* spp. and proposed epidemiological cutoff values for *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*: a study in a tertiary hospital in China. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 680884.
- [14] Kyrychenko AN, Tsyganenko KS, Olishevskaya SV. Hypovirulence of mycoviruses as a tool for biotechnological control of phytopathogenic fungi. *Cytology and Genetics*, 2018, 52(5): 374–384.
- [15] 刘忱, 皮磊, 舒灿伟, 周而勋. 低毒真菌病毒在植物病害生物防治中的研究及应用进展. *分子植物育种*, 2018, 16(2): 552–559.
- [15] Liu C, Pi L, Shu CW, Zhou EX. The progress of research and application of hypoviruses in biological control of plant diseases. *Molecular Plant Breeding*, 2018, 16(2): 552–559. (in Chinese)
- [16] García-Pedrajas MD, Cañizares MC, Sarmiento-Villamil JL, Jacquat AG, Dambolena JS. Mycoviruses in biological control: from basic research to field implementation. *Phytopathology*, 2019, 109(11): 1828–1839.
- [17] Van De Sande WWJ, Vonk AG. Mycovirus therapy for invasive pulmonary aspergillosis? *Medical Mycology*, 2019, 57(Supplement_2): S179–S188.
- [18] Van De Sande WWJ, Lo-Ten-Foe JR, Van Belkum A, Netea MG, Kullberg BJ, Vonk AG. Mycoviruses: future therapeutic agents of invasive fungal infections in humans? *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official*

- Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 2010, 29(7): 755–763.
- [19] Jiang YH, Wang JX, Yang B, Wang QR, Zhou JJ, Yu WF. Molecular characterization of a debilitation-associated partitivirus infecting the pathogenic fungus *Aspergillus flavus*. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 626.
- [20] 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. 重庆医科大学博士学位论文, 2020.
- [21] 闫语, 曾澳, 何宇茜. 感染性角膜炎的模型制备. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2021, 35(5): 125–131.
Yan Y, Zeng A, He YX. Model preparation of infectious keratitis. *Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University*, 2021, 35(5): 125–131. (in Chinese)
- [22] Lan HH, Wu LH, Sun RL, Yang KL, Liu YH, Wu JF, Geng LP, Huang CZ, Wang SH. Investigation of *Aspergillus flavus* in animal virulence. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 2018, 145: 40–47.
- [23] Kalleda N, Amich J, Arslan B, Poreddy S, Mattenheimer K, Mokhtari Z, Einsele H, Brock M, Heinze KG, Beilhack A. Dynamic immune cell recruitment after murine pulmonary *Aspergillus fumigatus* infection under different immunosuppressive regimens. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1107.
- [24] 于利玲, 肖永红. 免疫抑制小鼠侵袭性肺曲霉病动物模型的建立. 中国抗生素杂志, 2009, 34(4): 259–263.
Yu LL, Xiao YH. Establishment of animal model of invasive pulmonary aspergillosis in immunosuppressed mice. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2009, 34(4): 259–263. (in Chinese)
- [25] Almeida F, Rodrigues ML, Coelho C. The still underestimated problem of fungal diseases worldwide. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 214.
- [26] Desoubeaux G, Cray C. Animal models of aspergillosis. *Comparative Medicine*, 2018, 68(2): 109–123.
- [27] Desoubeaux G, Cray C. Rodent models of invasive aspergillosis due to *Aspergillus fumigatus*: still a long path toward standardization. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 841.
- [28] Wang FY, Zhang CY, Jiang Y, Kou CX, Kong QT, Long NB, Lu L, Sang H. Innate and adaptive immune response to chronic pulmonary infection of hyphae of *Aspergillus fumigatus* in a new murine model. *Journal of Medical Microbiology*, 2017, 66(10): 1400–1408.
- [29] Tischler BY, Hohl TM. Menacing mold: recent advances in *Aspergillus* pathogenesis and host defense. *Journal of Molecular Biology*, 2019, 431(21): 4229–4246.
- [30] Espinel-Ingroff A, Sasso M, Turnidge J, Arendrup M, Botterel F, Bourgeois N, Bouteille B, Canton E, Cassaing S, Dannaoui E, Dehais M, Delhaes L, Dupont D, Fekkar A, Fuller J, Garcia-Effron G, Garcia J, Gonzalez GM, Govender NP, Guegan H, Guinea J, Houzè S, Lass-Flörl C, Pelaez T, Forastiero A, Lackner M, Magobo R. Etest ECVs/ECOFFs for detection of resistance in prevalent and three nonprevalent *Candida* spp. to triazoles and amphotericin B and *Aspergillus* spp. to caspofungin: further assessment of modal variability. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2021, 65(11): e0109321.
- [31] Sharma M, Guleria S, Singh K, Chauhan A, Kulshrestha S. Mycovirus associated hypovirulence, a potential method for biological control of *Fusarium* species. *Virusdisease*, 2018, 29(2): 134–140.
- [32] Jiang YH, Yang B, Liu JY, Wang QR, Zhang QF, Yu WF, Hsiang T. A novel mycovirus infecting *Aspergillus nidulans* that is closely related to viruses in a new genus of the family *Partitiviridae*. *Archives of Virology*, 2021, 166(2): 659–664.
- [33] Xie JT, Jiang DH. New insights into mycoviruses and exploration for the biological control of crop fungal diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 2014, 52: 45–68.
- [34] Romon-Ochoa P, Gorton C, Lewis A, Van Der Linde S, Webber J, Pérez-Sierra A. Hypovirulent effect of the *Cryphonectria hypovirus 1* in British isolates of *Cryphonectria parasitica*. *Pest Management Science*, 2020, 76(4): 1333–1343.
- [35] Zoll J, Verweij PE, Melchers WJG. Discovery and characterization of novel *Aspergillus fumigatus* mycoviruses. *PLoS One*, 2018, 13(7): e0200511.
- [36] Takahashi-Nakaguchi A, Shishido E, Yahara M, Urayama SI, Sakai K, Chibana H, Kamei K, Moriyama H, Gono T. Analysis of an intrinsic mycovirus associated with reduced virulence of the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 10: 3045.
- [37] Son M, Yu J, Kim KH. Five questions about mycoviruses. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(11): e1005172.

(本文责编 李磊)