

安徽医科大学学报

Acta Universitatis Medicinalis Anhui

ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目： 黄曲霉产生的细胞外囊泡对黄曲霉感染的治疗评价
作者： 周建鸿，汪莉，姚朗宣，张春林，江银辉
网络首发日期： 2025-07-08
引用格式： 周建鸿，汪莉，姚朗宣，张春林，江银辉. 黄曲霉产生的细胞外囊泡对黄曲霉感染的治疗评价[J/OL]. 安徽医科大学学报.
<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20250707.1416.006>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

黄曲霉产生的细胞外囊泡对黄曲霉感染的治疗评价

周建鸿^{1,2}, 汪莉^{1,2}, 姚朗宣^{1,2}, 张春林^{1,2}, 江银辉^{1,2}

(贵州医科大学¹分子生物学重点实验室、²地方病与少数民族疾病教育部重点实验室, 贵阳 550004)

摘要 **目的** 探讨黄曲霉细胞外囊泡 (EVs) 对黄曲霉感染的治疗效果。**方法** 使用超速离心法提取黄曲霉的 EVs, 通过纳米颗粒跟踪分析 (NTA) 检测和鉴定 EVs; qRT-PCR 和酶联免疫吸附试剂盒检测黄曲霉 EVs 对骨髓源巨噬细胞 (BMDMs) 极化的影响和几种细胞因子的表达水平, 包括肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、干扰素- γ (IFN- γ)、白介素-6 (IL-6) 和白介素-10 (IL-10); 构建大蜡螟感染模型, 设置黄曲霉 EVs 的 3 个浓度组 (0.2、2、20 μg /条幼虫) 作为实验组, PBS 作为感染模型对照组, 同时设置 3 种形式的阴性对照组, 包括 PBS 组、穿刺组, 空白对照组, 通过大蜡螟感染模型的存活率评价黄曲霉 EVs 对黄曲霉感染的治疗效果。**结果** 黄曲霉 EVs 粒径在 20~550 nm 之间; 黄曲霉 EVs 能够使 BMDMs 向 M1 表型和 M2 表型极化, 并产生细胞因子, 包括 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 和 IL-10; 大蜡螟感染模型结果显示黄曲霉 EVs 可提高黄曲霉感染后大蜡螟的存活率。**结论** 黄曲霉产生的 EVs 可促进 BMDMs 的促炎细胞因子和抗炎细胞因子表达, 促进 BMDMs 向 M1 表型和 M2 表型极化, 同时增加大蜡螟感染黄曲霉后的存活率。

关键词 黄曲霉; 细胞外囊泡; 巨噬细胞; 细胞因子; 极化; 大蜡螟

中图分类号 R 379.6

文献标志码 A

Therapeutic evaluation of extracellular vesicles produced by *Aspergillus flavus* in *Aspergillus flavus* infections

Zhou Jianhong^{1,2}, Wang Li^{1,2}, Yao Langxuan^{1,2}, Zhang Chunlin^{1,2}, Jiang Yinhui^{1,2}

(¹Key Laboratory of Molecular Biology, ²Key Laboratory of Endemic and Ethnic Diseases, Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang 550004)

基金项目：国家自然科学基金项目 (编号：32000017)；贵州省自然科学基金资助项目 [贵州省科技计划 (编号：黔科合基础-ZK[2021]重点 030)；贵州医科大学优秀青年人才培养计划项目 [编号：贵医大优秀青年人才 (2023) 101 号]

作者简介：周建鸿，女，硕士研究生；

江银辉，男，教授，硕士生导师，博士生导师，通信作者，E-mail:jyh5265@163.com

Abstract Objective To explore the therapeutic effect of extracellular vesicles (EVs) of *Aspergillus flavus* on *A. flavus* infection. **Methods** The extracellular vesicles (EVs) of *Aspergillus flavus* were isolated using ultracentrifugation and detected/identified by nanoparticle tracking analysis (NTA). Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits were used to assess the effect of *A. flavus* EVs on the polarization of bone marrow-derived macrophages (BMDMs) and the expression levels of several cytokines, including tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-10 (IL-10). The *Galleria mellonella* infection model was constructed. Three concentration groups of *A. flavus* EVs (0.2, 2, and 20 $\mu\text{g/larvae}$) were set as the experimental groups, and PBS was used as the control group for the infection model. Meanwhile, three forms of negative control groups were established, including the PBS group, the pierced control group, and the negative control group. The therapeutic effect of *A. flavus* EVs on *A. flavus* infection was evaluated by the survival rate of the *G. mellonella* infection models. **Results** The particle size of *A. flavus* EVs ranged from 20 to 550 nm. *A. flavus* EVs could polarize BMDMs into both M1 and M2 phenotypes and induce the production of cytokines, including TNF- α , IFN- γ , IL-6, and IL-10. The results of the *G. mellonella* infection model showed that *A. flavus* EVs could improve the survival rate of *G. mellonella* after *A. flavus* infection. **Conclusion** The EVs produced by *A. flavus* can promote the expression of both pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in BMDMs, induce M1 polarization and M2 polarization of BMDMs, and increase the survival rate of *G. mellonella* after *A. flavus* infection.

Key words *Aspergillus flavus*; extracellular vesicles; macrophage; cytokines; polarization; *Galleria mellonella*

Found programs National Natural Science Foundation of China (No.32000017); Natural Science Foundation of Guizhou Province [No.Qiankehe Basic ZK(2021) Key 030]; Excellent Young Talent Training Program of Guizhou Medical University [No.Guizhou Medical University Excellent Young Talent (2023) No. 101]

Corresponding author Jiang Yinhui , E-mail: jyh5265@163.com

黄曲霉 (*Aspergillus flavus*, *A. flavus*) 是曲霉菌属中一种丝状真菌, 可导致人体皮肤、神经系统或骨骼等感染曲霉病, 并且会对粮食安全和经济作物造成巨大损失^[1]。有研究^[2]报道, 细胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs) 可直接从质膜释放或在多泡体 (multivesicular bodies, MVBs) 与质膜融合过程中释放, 其携带来自亲代细胞的如核酸、蛋白和脂质等生物活性分子。在细胞通讯和真菌感染的免疫发病机制中起至关重要作用^[3]。研究^[2]表明黄曲霉菌 EVs 能够诱导巨噬细胞产生炎症介质, 如肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 (interleukin-10, IL-6) 和 IL-10 等。而曲霉病的临床常用药物由于副作用强, 毒性大^[4], 导致曲霉病的治疗更加困难和复杂, 因此, 寻求安全有效的治疗方案极为重要。研究^[5]发现 EVs 可以降低感染烟曲霉的大蜡螟的死亡率。课题组前期构建得到黄曲

霉菌株 LD-F1, 透射电镜观察菌丝的内部结构发现 EVs^[6], 因此探索黄曲霉产生的 EVs 对黄曲霉的感染是否有一定的治疗作用, 为临床治疗曲霉病一定的参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、菌株和昆虫 小鼠骨髓源巨噬细胞来源于实验室; 黄曲霉菌株 LD-F1 由本实验室构建; 大蜡螟幼虫, 质量为 200~300 mg/条, 共 260 条, 通体为浅黄色, 购自天津惠裕德生物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂和仪器 重组鼠源 IFN- γ 、重组鼠源 IL-4 (货号: HY-P7071、HY-P7080) 均购自美国 MedChemExpress 公司; 特优级澳洲胎牛血清 (货号: SX3000) 购自浙江硕华生命科学研究股份有限公司; 重组鼠源 IL-12 P40 (货号: 210-12-2UG)、DMEM 高糖培养基 (货号: C11995500BT)、血细胞计数板均购自美国赛默飞世尔科技有限公司; PBS 缓冲液 (货号: P1020) 购自北京索莱宝科技有限公司; ELISA KIT TNF- α 、IFN- γ 、IL-6、IL-10 (货号: CME0004-F-096、CME0003-096、CME0006-F-096、CME0016-F-096) 均购自北京四正柏生物科技有限公司; 逆转录试剂盒 (货号: KR123) 购自北京天根生化科技有限公司; 2 \times HQ SYBR qPCR Mix (Without ROX) 试剂盒 (货号: ZF501-2) 购自北京庄盟生物基因科技有限公司; 离心机 (型号: GENESPEED 1730R) 购自北京索莱宝科技有限公司; 生化培养箱 (型号: MJX-80B) 购自赛得利斯实验分析仪器制造厂; 超速离心机 (型号: CP100NX) 购自上海艾本德国际贸易有限公司; 细菌过滤器购自北京兰杰柯科技有限公司; 多功能酶标仪 (型号: Synergy Neo2 Hybrid) 购自江苏无锡百泰克生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 培养基制备

1.2.1.1 基本培养基制备 称取葡萄糖 4 g, 20 \times 盐溶液 20 mL, 微量元素溶液 400 μ L, 蒸馏水加至 400 mL, 121 $^{\circ}$ C 灭菌 20 min。

1.2.1.2 马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (potato dextrose agar, PDA) 制备 称取马铃薯 200 g, 加水煮烂, 4 层纱布过滤去除马铃薯泥, 称取葡萄糖 20 g, 琼脂粉 13 g, 蒸馏水定容至体积 1 000 mL, 121 $^{\circ}$ C 灭菌 20 min。

1.2.1.3 DMEM 完全培养基制备 取 89% 高糖 DMEM 培养基, 10% 浓度胎牛血清, 1% 浓度的双抗, 配制为 DMEM 完全培养基制备。

1.2.2 菌悬液制备 将黄曲霉菌株 LD-F1 接种于 PDA 培养基上, 30 $^{\circ}$ C 培养 5 d, 用含 0.1% 吐温 80 的 PBS 10 mL 冲洗培养基表面菌丝, 用灭菌的 8 层擦镜纸过滤, 将过滤后的黄曲霉孢子收集于离心管, 8 000 r/min 离心 10 min 后弃上清液, 用 PBS 再次重悬, 血细胞计数板计数。根据实验要求调整曲霉分生孢子的浓度为 1×10^4 CFU/mL 和 2×10^7 CFU/mL。

1.2.3 细胞外囊泡的提取 将计数好的黄曲霉孢子 2×10^7 个接种在加入氨苄西林的 400 mL 基本培养基内, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 空气浴培养 72 h。用灭菌的 8 层擦镜纸过滤后获得上清液,

在 4 °C 条件下 3 000 r/min 离心 30 min, 除去较大的细胞碎片和杂质沉淀。在 4 °C 条件下 8 000 r/min 离心 60 min, 进一步除去较大颗粒。用 0.22 μm 的细菌过滤器过滤除去细菌, 在 4 °C 条件下 16 000 r/min 超速离心 90 min 后弃上清液, 重复多次, 最后用 PBS 重悬纯化 1 次, 在 4 °C 条件下 16 000 r/min 超速离心 90 min 后弃上清液, 用 500 μL 无菌无核酸酶的超纯水悬浮提取的 EVs, -80 °C 保存备用。

1.2.4 细胞外囊泡纳米颗粒追踪分析 (nano particles tracking analysis, NTA) 检测 提取的 EVs 样本从 -80 °C 冰箱取出后送于深圳汇芯生物科技有限公司。采用德国 Particle Metrix 公司生产的 NTA 仪 (型号: Zeta View PMX-120) 对 EVs 进行检测, 包括纳米颗粒粒径分布、颗粒浓度和 zeta 电位, 其中 NanoSight NS300 对从黄曲霉培养上清液中分离的 EVs 进行纳米颗粒跟踪分析。

1.2.5 巨噬细胞培养 取 5 mL 高糖 DMEM 完全培养基于 15 mL 离心管中, 37 °C 预热, -80 °C 冰箱取骨髓源巨噬细胞 (bone marrow-derived macrophages, BMDMs) BMDMs 放入 37 °C 水浴锅中快速化冻, 转入超净工作台中, 将 BMDMs 加入到含预热培养基中 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液得到细胞沉淀。用 5 mL 完全培养基重悬细胞, 转移至 T25 培养瓶, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。24 h 后观察细胞生长到 80%~90% 时, 可进行细胞实验或细胞传代培养。

1.2.6 细胞因子检测 BMDMs 复苏生长稳定后进行计数重悬, 铺板在 48 孔板中, BMDMs 浓度为 1.5×10^6 个/mL, 铺板密度为 7.5×10^5 个/孔, 单独培养基培养和加入 LPS (1 μg/mL) + IFN-γ (2 ng/mL) 分别用作阴性对照和阳性对照。参考 Da et al^[7] 的研究, 实验组分别将浓度为 0.31、1.25、5.00、20.00 μg/mL 提取的黄曲霉 LD-F1 的 EVs 作用于 BMDMs, 放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 48 h 后, 将获得的 BMDMs 悬液通过 1 000 r/min 离心 10 min 后, 收集上清液后通过 ELISA 检测包括 TNF-α、IFN-γ、IL-6 和 IL-10 等细胞因子的表达水平。

1.2.7 BMDMs 极化检测

1.2.7.1 细胞分组与培养 Medium 组仅加入培养基做阴性对照; M1 诱导组添加 IFN-γ (2 ng/mL) + IL-12p40 (50 ng/mL); M2 诱导组添加 IL-10 + IL-4 (50 ng/mL); EVs 组添加 10 μg/mL 的 EVs。BMDMs 复苏培养生长稳定后进行细胞计数, 重悬铺 24 孔板中, 细胞密度为 2×10^6 个/mL, 1×10^6 个/孔, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 6 h。

1.2.7.2 提取细胞 RNA 细胞培养 6 h 后, 去除细胞培养液, 预冷 PBS 清洗细胞, 在 24 孔板的每孔加 0.25 mL TRIzol 试剂, 使细胞裂解后转移至离心管中, 室温静置 5 min。加入 0.2 mL 三氯甲烷, 颠倒混匀后 15~30 °C 放置 2~3 min, 4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 15 min 后转移上层水相至新的 Ep 管中。加入等量的异丙醇, 混匀, 室温静置 10 min, 4 °C 条件下, 12 000 r/min 离心 10 min 产生白色沉淀。弃上清液, 1 mL 预冷的 75% 的乙醇 (DEPC 水配制) 洗涤

沉淀物。4 °C条件下，7 500 r/min 离心 5 min，弃上清液。冰上风干 5~10 min，用适量 DEPC 水溶解沉淀物，所得到的溶解液即为细胞的总 RNA，保存于-80 °C备用。

1.2.7.3 引物设计 根据基因序列，设计相应引物序列，由上海生物工程有限公司合成引物序列。

表 1 引物序列

Tab.1 Primer sequence

| Gene Name | Primer Sequences |
|---------------------------|----------------------------------|
| <i>β-actin</i> | F: 5'-CCTAAGGCCAACCGTGAAAA-3' |
| | R: 5'-GAGGCATACAGGGACAGCAC-3' |
| <i>YMI</i> | F: 5'-TCACAGGTCTGGCAATTCTTCTG-3' |
| | R: 5'-ACTCCCTTCTATTGGCCTGTCC-3' |
| <i>Arginase-1 (Arg-1)</i> | F: 5'-GTTCCCAGATGTACCAGGATTC-3' |
| | R: 5'-CGATGTCTTTGGCAGATATGC-3' |
| <i>FIZZ1</i> | F: 5'-CCTGAGATTCTGCCCCAGGAT-3' |
| | R: 5'-TTCCTGGGACCATCAGCTGG-3' |
| <i>iNOS2</i> | F: 5'-CCGAAGCAAACATCACATTCA-3' |
| | R: 5'-GGTCTAAAGGCTCCGGGCT-3' |

1.2.7.4 逆转录定量 PCR 反应 使用逆转录试剂盒，按照说明书操作，将提取的 RNA 逆转录为 cDNA。使用 2×HQ SYBR qPCR Mix (Without ROX) 试剂盒，按照说明书操作配制 PCR 反应体系，具体为：2×HQ SYBR qPCR Mix (Without ROX) 10 μL，10 μmol/L 的 Forward Primer 0.4 μL，10 μmol/L 的 Reverse Primer 0.4 μL，10 μmol/L 的 Template DNA/cDNA 2 μL，ddH₂O 7.2 μL。再依据说明书采用两步法 PCR 反应程序设定，首先进行预变性，95 °C、30 s，1 个循环；95 °C、10 s 变性，60 °C、30s 退火/延伸，循环 35 ~ 40 次；最后进行融解曲线分析，采用仪器默认程序执行。

1.2.8 实验分组及处理 选取体表颜色呈浅黄色，质量为 200~300 mg 的大蜡螟幼虫，每组 20 条，分为实验组、感染模型对照组和阴性对照组。实验组分别为 0.2 μg EVs 组 (EVs 0.2 μg/条幼虫+黄曲霉孢子)、2 μg EVs 组 (EVs 2 μg/条+黄曲霉孢子)、20 μg EVs 组 (EVs 20 μg/条幼虫+黄曲霉孢子)，经左前足注射 EVs，37 °C 的黑暗培养 2 d 后相同部位注射 10 μL 孢子 (1×10⁴ CFU/mL)；感染模型对照组为 PBS 组 (PBS+黄曲霉孢子)，经左前足注射 10 μL PBS，37 °C 的黑暗培养 2 d 后相同部位注射 10 μL 孢子 (1×10⁴ CFU/mL)；同时设置 3 种形式阴性对照组 (Control group)：包括 PBS 组 (注射 10 μL PBS，37 °C 的黑暗培养 2 d 后相同部位注射 10 μL PBS)、穿刺 (pierced control, PC) 组 (穿刺但不注射 PBS，37 °C 的

黑暗培养 2 d 后相同部位再次穿刺)，空白对照 (negative control, NC) 组 (不作任何处理)。所有大蜡螟幼虫在 37 °C 的黑暗环境中培养 5 d, 观察记录大蜡螟的死亡情况 (触摸刺激后没有运动的幼虫即为死亡) 推测出最佳的治疗浓度。

1.2.9 计算黄曲霉在大蜡螟幼虫中定殖量 依据最佳的作用浓度, 实验组注射最佳浓度 EVs, 37 °C 的黑暗培养 2 d 后相同部位注射 10 μL 孢子 (1×10^4 CFU/mL); 感染模型对照组注射 10 μL PBS, 37 °C 的黑暗培养 2 d 后相同部位注射 10 μL 孢子 (1×10^4 CFU/mL), 分别黑暗培养 2 d 后, 取存活幼虫 5 只, 用 70% 乙醇消毒表面, 加入 PBS 将幼虫匀浆、稀释并涂布在 PDA (含 100 μg/mL 的头孢霉素抑制细菌生长) 培养基上, 37 °C 孵育 48 h, 通过计数对比黄曲霉的菌落数, 计算黄曲霉在大蜡螟幼虫中定殖量, 联合判断 EVs 对大蜡螟的治疗效果。

1.2.10 统计学处理 使用 GraphPad Prism 软件 9.0 版进行统计分析。所有实验均重复 3 次, 正态分布计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线, 并采用 Log-rank 检验进行生存曲线的比较, 比较死亡率差异。多重比较采用 Tukey's multiple comparisons test 检验分析组间差异; 非正态分布或方差不齐数据采用非参数 Kruskal-Wallis *H* 检验和 Dunnett's *t* 检验分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄曲霉的 EVs 特征 NTA 确定了 EVs 的大小和分布特征, 见图 1。这些 EVs 的尺寸和分布情况如图 1A 所示, 大小从 20~550 nm 不等, 平均大小为 202 nm, SD10 的粒径大小为 120.9 nm, SD 50 的粒径大小为 199.1 nm, SD90 的粒径大小为 306.6 nm。NanoSight NS300 录制的视频截图黄曲霉产生的细胞外囊泡见图 1B。

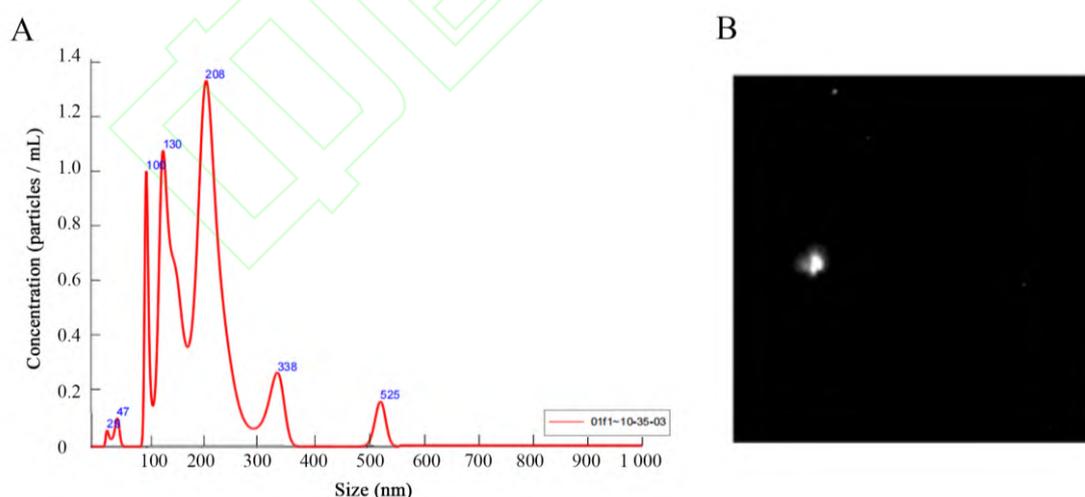


图 1 NTA 检测黄曲霉的 EVs

Fig.1 NTA detection of the EVs of *A. flavus*

A: Graphs of particle size distribution and concentration of *A. flavus* EVs based on spectroscopy;
B: Video screenshots from NanoSight NS300 demonstrating EVs presence.

2.2 黄曲霉 EVs 诱导巨噬细胞产生细胞因子 为评估黄曲霉产生的 EVs 对 BMDMs 的影响, 本实验将 BMDMs 与不同浓度的黄曲霉 EVs 共同培养后, 通过 ELISA 检测细胞因子表达情况。图 2 研究结果显示与阴性对照 Medium 组相比, 黄曲霉 EVs 能够促进细胞因子的表达。当 EVs 浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 时, BMDMs 分泌 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 和 IL-10 的水平分别为 3 000 pg/mL、100 pg/mL、150 pg/mL 和 12 pg/mL, 与 Medium 组相比, 表达水平明显提高 (均 $P<0.0001$)。

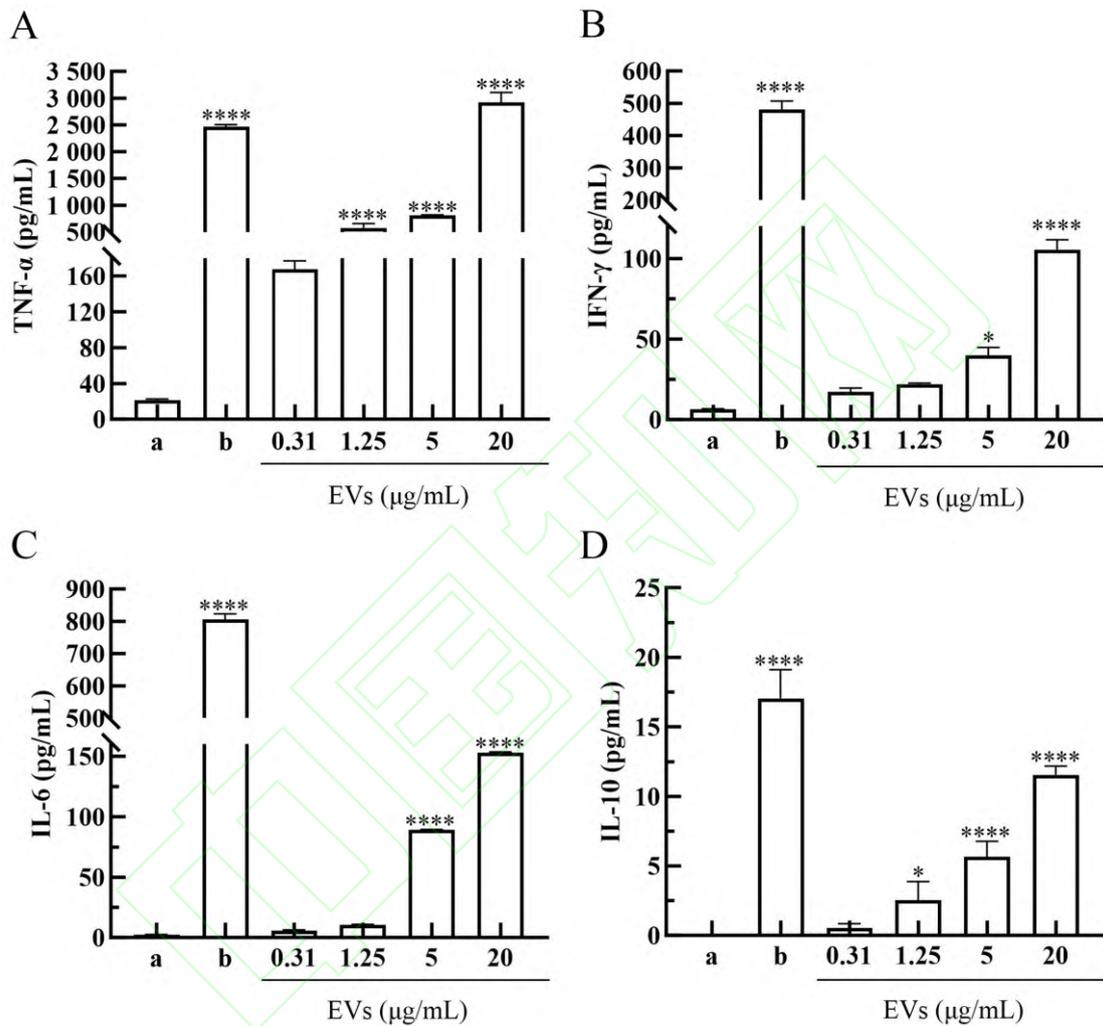


图 2 不同浓度的黄曲霉 EVs 对 BMDMs 的细胞因子表达影响

Fig. 2 The effects of *Aspergillus flavus*-derived EVs at different concentrations on cytokine expression in BMDM

A-D: TNF- α , IFN- γ , IL-6 and IL-10 expression levels in BMDMs treated with different concentrations of *A. flavus* EVs; a: Medium group; b: LPS+IFN- γ group; * $P<0.05$, **** $P<0.0001$ vs Medium group.

2.3 黄曲霉产生的细胞外囊泡诱导巨噬细胞 M1 极化 如图 3A 所示, 与阴性对照 Medium 组相比, 在 EVs (10 $\mu\text{g/mL}$) 的作用于 BMDMs 后, EVs 组 iNOS (M1 型极化标志物) mRNA 表达水平增加了近 40 倍 ($t=39.09$; $P<0.0001$)。M2 极化标志物 YM1 和 Arginase-1 (图 3B、

3C) 的 mRNA 的表达水平也比阴性对照 Medium 组高, 分别增加了近 5 倍和 16 倍 ($t=11.88$ 、 15.39 ; 均 $P<0.0001$)。因此, 这些数据表明, 黄曲霉产生的 EVs 促进巨噬细胞向经典 M1 型极化同时也能促进其向 M2 型极化。

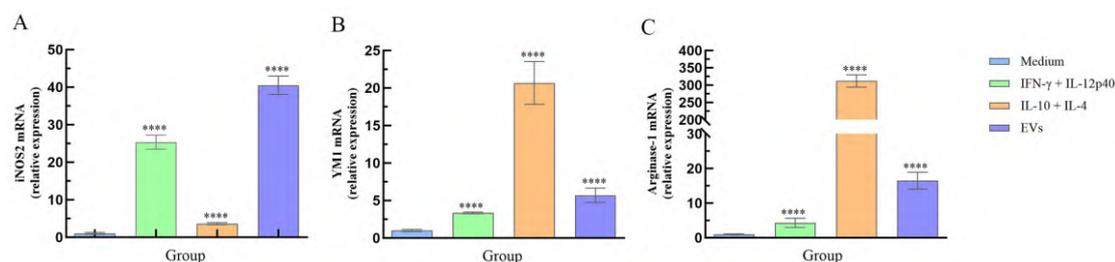


图 3 黄曲霉 EVs 对 BMDMs 极化的影响

Fig.3 The effects of *A. flavus* EVs on polarization of BMDMs

A-C: mRNA expression level of inducible nitric oxide synthase (iNOS2), chitinase - like 3 (chitinase3, YM1) and arginase - 1 (Arg-1) in response to *A. flavus* EVs; **** $P<0.0001$ vs Medium group.

2.4 黄曲霉产生的细胞外囊泡提高感染黄曲霉的大蜡螟的存活率

在大蜡螟感染模型中评估了黄曲霉产生的 EVs 是否会影响大蜡螟的存活, 注射 EVs 2 d 后再接种黄曲霉孢子的 5 d 的结果如图 4 所示, 感染模型对照组在感染后 d 2 的存活率为 60% (12/20), d 5 的存活率为 30% (6/20); 在注射 EVs 浓度为 0.2 μg /条幼虫时, 感染孢子 d 2 存活率为 70% (14/20), 在感染后 d 5 的终存活率为 40% (8/20); 在注射 EVs 浓度为 2 μg /条幼虫时, 感染孢子 d 2 存活率为 80% (16/20), 在感染后 d 5 的终存活率为 55% (11/20); 在注射 EVs 浓度为 20 μg /条幼虫时, 感染孢子 d 2 存活率为 80% (16/20), 在感染后 d 5 的存活率为 60% (12/20), 与感染模型对照组相比大蜡螟的存活率提高 ($P=0.0408$), 提示 EVs 预处理可提高感染黄曲霉的大蜡螟幼虫存活率。

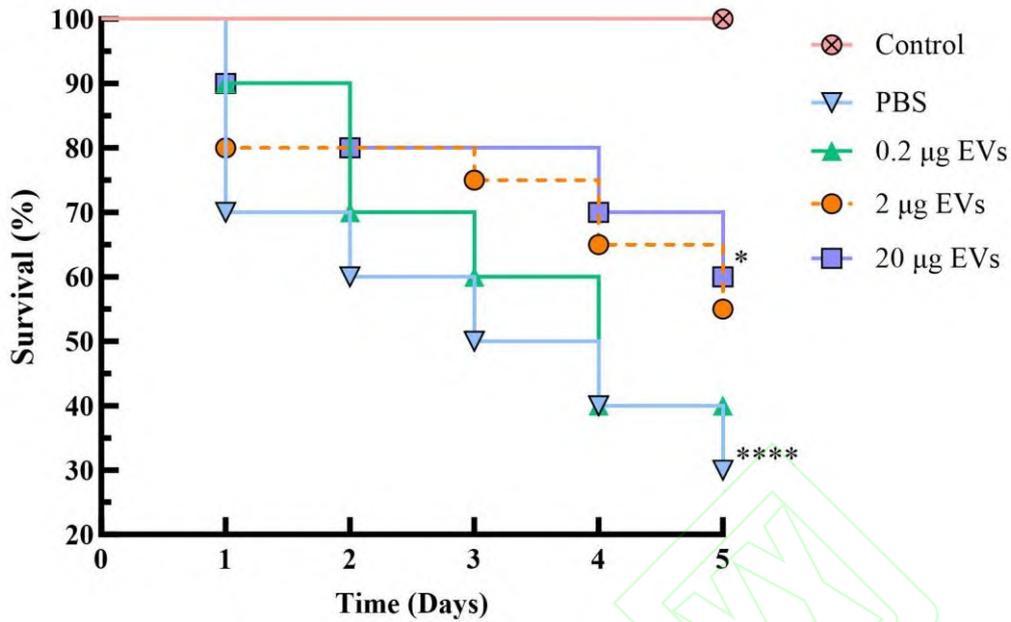


图4 黄曲霉 EVs 对黄曲霉感染的大蜡螟的影响

Fig.4 The effects of *A. flavus* extracellular vesicles on *G. mellonella* infected with *A. flavus*

* $P < 0.05$; **** $P < 0.0001$ vs Control group.

2.5 黄曲霉 EVs 能减少大蜡螟模型中真菌负荷 检测黄曲霉分生孢子在黄曲霉 EVs 预处理的大蜡螟体内定殖情况，进一步探究黄曲霉 EVs 对黄曲霉感染的大蜡螟的影响。结果如图 5 所示，EVs 预处理的大蜡螟体内真菌定殖更少。当 EVs 浓度为 2 µg/条幼虫时，幼虫体内真菌定殖量与阴性感染模型对照组相比减少 ($t=2.689$; $P<0.05$)，而当 EVs 浓度为 20 µg/条幼虫时，幼虫体内真菌定殖量与阴性感染模型对照组相比减少更多 ($t=3.581$; $P<0.01$)。EVs 作用后分别导致黄曲霉 CFU 水平降低和幼虫存活率的提高，这些结果提示黄曲霉 EVs 可能引发宿主先天免疫系统对病原体的清除。

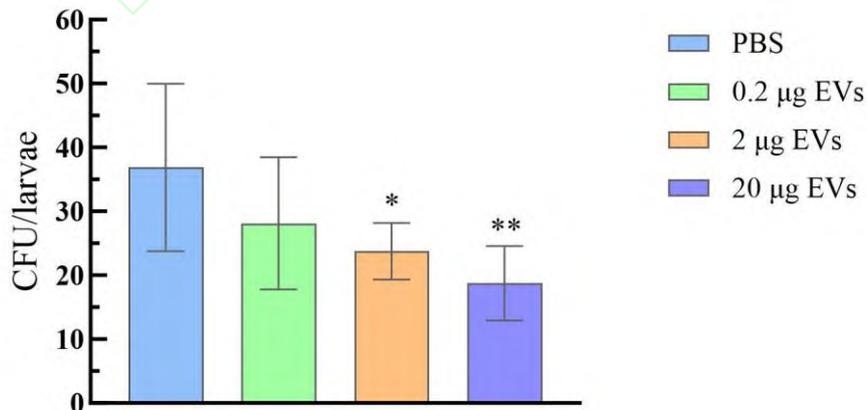


图5 黄曲霉 EVs 对大蜡螟体内黄曲霉孢子的影响

Fig.5 The effects of *A. flavus* EVs on *A. flavus* conidia in *G. mellonella*

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs PBS group.

3 讨论

EVs 具有生物活性, 能跨越生物屏障, 可介导细胞间信息交流, 被认为是生物化合物的重要载体, 并且与真菌感染的致病性、细胞通讯和免疫原性等多种功能有关^[8]。有研究^[9]表明黄曲霉等真菌所产生的 EVs 可以影响病原体与宿主免疫细胞之间的相互作用关系, 调节宿主免疫功能, 增强杀真菌活性。这表明真菌 EVs 与宿主细胞的相互作用可能为治疗真菌感染性疾病提供新的参考依据。

真菌孢子被机体吸入后会在呼吸道沉积定殖, 巨噬细胞能够将外源性病原真菌吞噬、杀灭和清除, 发挥抗感染作用, 并释放细胞因子, 激活适应性免疫反应参与炎症反应^[10]。TNF、IFN、IL-6、IL-8 等为促炎因子可促进炎症发生, IL-4、IL-10 等为抗炎因子发挥抑制炎症作用^[11]。在本研究中, NTA 结果显示 EVs 的大小差异较大, 在 20 到 550 nm 之间不等, 平均大小为 202 nm。黄曲霉 EVs 诱导巨噬细胞产生促炎因子 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 和抗炎因子 IL-10, 其产生水平在 EVs 刺激下呈剂量依赖性显著升高, 尤其是当 EVs 浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 诱导巨噬细胞产生促炎因子 TNF- α , IFN- γ , IL-6 水平均高于阴性对照, 有显著差异。这一结果与 Brauer et al^[2]研究结果一致, 证明在黄曲霉 EVs 的刺激下促进 BMDM 产生促炎因子, 从而引发炎症反应, 有利于清除真菌。同时 EVs 也能促进抗炎因子 IL-10 的表达, 提示其可能通过调控免疫应答的平衡, 在激活抗真菌防御的同时避免宿主过度炎症损伤^[11]。这种调节可能是黄曲霉与宿主长期进化的适应性策略, 也为开发兼具抗真菌和抗炎功能的新型疗法提供了理论依据。

巨噬细胞主要分化为 M1 表型和 M2 表型, M1 型经典活化巨噬细胞, 其分泌促炎细胞因子并激活抗微生物机制, 利于杀灭病原体; M2 型交替活化巨噬细胞, 其高表达 IL-10 等抗炎因子, 可减轻炎症、促进伤口愈合与组织修复^[12]。有研究^[13]表明 M1 极化和 M2 极化抑制均对烟曲霉和荚膜芽孢杆菌感染具有保护作用, 因此参照其研究设计本实验, 图中每组阳性指标表达量显著高于空白对照, 证明实验体系可实现极化诱导, 结果显示 EVs 作用下 BMDMs 向 M1 表型和 M2 表型极化的水平明显升高, 这种双向极化可能由 EVs 中多组分信号 (如 PAMP 与免疫调节分子) 的协同作用所致, 既维持宿主基础抗真菌防御, 又避免过度炎症损伤, 实现对巨噬细胞极化的精细调控。本研究利用在功能上模仿哺乳动物先天免疫系统建立黄曲霉模型^[14], 实验结果显示 EVs 作用下感染曲霉病后的大蜡螟存活率提高, 证明黄曲霉 EVs 与免疫反应有关。有研究^[15]发现用白色念珠菌 EVs 预刺激粗隆梭菌可以降低 CFU 水平, 提高幼虫的存活率, Brauer et al^[2]研究显示黄曲霉 LD-F1 的 EVs 预刺激可提高大蜡螟存活率, 结果与本实验研究结果相一致。本研究实验数据表明, 用 EVs 预刺激大蜡螟可能导致免疫系统启动, 有利于真菌清除, 提高实验中感染曲霉病的大蜡螟幼虫的存活率。

本研究证明黄曲霉 LD-F1 能够产生 EVs, 且具有免疫活性, 能诱导的巨噬细胞产生炎症介质, 黄曲霉来源的 EVs 具有促进巨噬细胞向 M1 型和 M2 型极化的作用, 并对感染黄曲霉的大蜡螟幼虫具有保护作用, 为治疗黄曲霉引起的曲霉病提供了新的参考。

参考文献

- [1] Sugui J A, Kwon-Chung K J, Juvvadi P R, et al. *Aspergillus fumigatus* and related species[J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2014, 5(2): a019786. doi: 10.1101/cshperspect.a019786.
- [2] Brauer V S, Pessoni A M, Bitencourt T A, et al. Extracellular vesicles from *Aspergillus flavus* induce M1 polarization *in vitro*[J]. mSphere, 2020, 5(3): e00190-20. doi: 10.1128/msphere.00190-20.
- [3] Darkwah S, Park E J, Myint P K, et al. Potential roles of muscle-derived extracellular vesicles in remodeling cellular microenvironment: proposed implications of the exercise-induced myokine, irisin[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 634853. doi: 10.3389/fcell.2021.634853.
- [4] Sharma C, Kumar R, Kumar N, et al. Investigation of multiple resistance mechanisms in voriconazole-resistant *Aspergillus flavus* clinical isolates from a chest hospital surveillance in Delhi, India[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2018, 62(3): e01928-17. doi: 10.1128/AAC.01928-17.
- [5] Freitas M S, Bitencourt T A, Rezende C P, et al. *Aspergillus fumigatus* extracellular vesicles display increased *Galleria mellonella* survival but partial pro-inflammatory response by macrophages[J]. JoF, 2023, 9(5): 541. doi: 10.3390/jof9050541.
- [6] Jiang Y, Wang J, Yang B, et al. Molecular characterization of a debilitation-associated partitivirus infecting the pathogenic fungus *Aspergillus flavus*[J]. Front Microbiol, 2019, 10: 626. doi: 10.3389/fmicb.2019.00626.
- [7] da Silva T A, Roque-Barreira M C, Casadevall A, et al. Extracellular vesicles from *Paracoccidioides brasiliensis* induced M1 polarization *in vitro*[J]. Sci Rep, 2016, 6: 35867. doi: 10.1038/srep35867.
- [8] Nievas Y R, Coceres V M, Midlej V, et al. Membrane-shed vesicles from the parasite *Trichomonas vaginalis*: characterization and their association with cell interaction[J]. Cell Mol Life Sci, 2018, 75(12): 2211-26. doi: 10.1007/s00018-017-2726-3.
- [9] Arango Duque G, Descoteaux A. Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases[J]. Front Immunol, 2014, 5: 491. doi: 10.3389/fimmu.2014.00491.
- [10] Varol C, Mildner A, Jung S. Macrophages: development and tissue specialization[J]. Annu Rev Immunol, 2015, 33: 643-75. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112220.

- [11] Gul B, Anwar R, Saleem M, et al. *Cassia absus*-mediated upregulation of IL-4, IL-10 and downregulation of IL-1 β , IL-6, TNF- α , NF- κ B, IFN- γ in CFA-induced arthritis model[J]. *Inflammopharmacology*, 2023, 31(3): 1241-56. doi: 10.1007/s10787-023-01185-1.
- [12] 李健飞, 段植, 刘倩, 等. STING 通路的活化诱导巨噬细胞极化促进 T 细胞免疫应答 [J]. *安徽医科大学学报*, 2024, 59(11): 1974-81. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.11.012.
- [12] Li J F, Duan Z, Liu Q, et al. M1 polarization of macrophage induced by STING signaling promotes T cell immune response[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2024, 59(11): 1974-81. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.11.012.
- [13] Jiang H R, Milovanović M, Allan D, et al. IL-33 attenuates EAE by suppressing IL-17 and IFN- γ production and inducing alternatively activated macrophages[J]. *Eur J Immunol*, 2012, 42(7): 1804-14. doi: 10.1002/eji.201141947.
- [14] Mannix-Fisher E, McLean S. The antimicrobial activity of silver acetate against *Acinetobacter baumannii* in a *Galleria mellonella* infection model[J]. *PeerJ*, 2021, 9: e11196. doi: 10.7717/peerj.11196.
- [15] Vargas G, Rocha J D B, Oliveira D L, et al. Compositional and immunobiological analyses of extracellular vesicles released by *Candida albicans*[J]. *Cell Microbiol*, 2015, 17(3): 389-407. doi: 10.1111/cmi.12374.