

· 实验研究 ·

血小板对巨噬细胞抑制和吞噬真菌的促进作用

张芬芬¹ 刘素素² 岳娟² 简守璐² 司玮² 代闫芳² 魏静静² 张红敏²¹锦州医科大学河南省人民医院研究生培养基地, 郑州 450003; ²河南省人民医院眼科 河南省立眼科医院 河南省眼科研究所 河南省眼科学与视觉科学重点实验室, 郑州 450003

张芬芬现在德州市人民医院眼科 253000

通信作者: 张红敏, Email: zhm0906@163.com

【摘要】 目的 研究血小板在巨噬细胞杀伤真菌中的作用。方法 培养小鼠巨噬细胞系(RAW264.7), 提取腐皮镰孢菌孢子, 分离小鼠血小板。实验分为单纯孢子组、孢子+巨噬细胞组和混合血小板组, 分别接种真菌孢子、等比例孢子+巨噬细胞以及血小板+孢子+巨噬细胞进行培养。分别于培养后 1、2、3 和 4 h 于转盘式激光扫描共焦显微镜上任意选取各组 5 个视野进行拍照, 计算各组巨噬细胞吞噬率、吞噬指数和真菌孢子出芽率, 于培养后 4、6 和 8 h 观察并测量各组菌丝伸长度。设置单纯巨噬细胞组、孢子+巨噬细胞组和混合血小板组, 应用细胞分析仪进行细胞毒性测定。结果 混合血小板组培养后 1、2、3 和 4 h 的巨噬细胞吞噬率和吞噬指数均明显高于相应时间点孢子+巨噬细胞组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。培养后 1、2、3 和 4 h 各组孢子出芽率总体比较差异均有统计学意义($H = 60.05, 37.89, 55.15, 60.52$, 均 $P < 0.001$); 孢子+巨噬细胞组培养后 1、2、3 和 4 h 孢子出芽率均低于相应时间点单纯孢子组, 而混合血小板组培养后 1、3 和 4 h 孢子出芽率均低于孢子+巨噬细胞组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。培养后 4、6 和 8 h 时各组菌丝伸长度总体比较差异均有统计学意义($H = 13.76, P = 0.001; H = 43.57, P < 0.001; H = 60.87, P < 0.001$); 培养 4、6 和 8 h 时孢子+巨噬细胞组菌丝伸长度均低于相应时间点单纯孢子组, 培养 6 h 和 8 h 混合血小板组菌丝长度均低于相应时间点孢子+巨噬细胞组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。培养后 0、6、12、18 和 24 h 各组细胞指数总体比较差异均无统计学意义($F = 0.02, 1.08, 1.61, 1.58, 2.52$, 均 $P > 0.05$)。培养后 30、36、42 和 48 h 各组细胞指数总体比较, 差异均有统计学意义($F = 10.81, 8.08, 5.61, 5.72$, 均 $P < 0.05$); 孢子+巨噬细胞组细胞指数明显低于单纯巨噬细胞组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。结论 血小板可促进巨噬细胞对真菌的吞噬和抑制作用, 并且可能有拮抗真菌细胞毒性的作用。

【关键词】 角膜炎, 病理; 巨噬细胞; 真菌; 血小板; 吞噬功能; 出芽率**基金项目:** 国家自然科学基金项目(81770902); 河南省自然科学基金项目(162300410163); 河南省科技创新人才计划项目(144100510015)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.12.002

Promoting effect of platelets on macrophage inhibition and phagocytosis of fungiZhang Fenfen¹, Liu Susu², Yue Juan², Jian Shoujun², Si Wei², Dai Yanfang², Wei Jingjing², Zhang Hongmin²¹Henan Provincial People's Hospital of Jinzhou Medical University Graduate Training Base, Zhengzhou 450003, China; ²Department of Ophthalmology, Henan Provincial People's Hospital, Henan Eye Hospital, Henan Eye Institute, Henan Key Laboratory of Ophthalmology and Vision Science, Zhengzhou 450003, China

Zhang Fenfen is working at Department of Ophthalmology, Dezhou People's Hospital, Dezhou 253000, China

Corresponding author: Zhang Hongmin, Email: zhm0906@163.com

【Abstract】 Objective To study the effects of platelets on macrophages phagocytosis and inhibition of fungi.**Methods** Macrophages were cultured, *Fusarium Pythium* spores were extracted and platelets were isolated from blood of mouse. Simple spore group, spore+macrophage group and mixed platelet group were set, and were inoculated with fungal spore, equal proportion spore+macrophage and platelet+spore+macrophage, respectively. The prepared plate was placed on a spinning disk laser scanning confocal microscope at 1 hour, 2, 3 and 4 hours after culture, five visual fields were randomly selected at the corresponding time points for photography. The phagocytic rate, phagocytic index and fungal spore germination rate were calculated. Fungal hyphae length of each group at 4, 6 and 8 hours after culture were calculated. The single macrophage group, spore+macrophage group and mixed platelet group were set and

the cytotoxicity was measured by real-time cell analyzer. The breeding and use of mice was in according with the ARVO statement. This study was approved by the Experimental Animal Ethics Committee of Henan Eye Institute (HNEECA-2017-04). **Results** The phagocytic rate and phagocytic index of macrophages in mixed platelet group at 1 hour, 2, 3 and 4 hours after culture were significantly higher than those in spore + macrophage group at corresponding time point (all at $P < 0.05$). There were significant differences in spore germination rate at 1 hour, 2, 3 and 4 hours after culture among different groups ($H = 60.05, 37.89, 55.15, 60.52$; all at $P < 0.001$). The spore germination rates of spore+macrophage group at 1 hour, 2, 3 and 4 hours after culture were lower than those of simple spore group, while the spore germination rates of mixed platelet group at 1 hour and 3, 4 hours after culture were lower than that of spore + macrophage group, the differences were statistically significant (all at $P < 0.01$). There were significant differences in fungal hyphae length at 4, 6 and 8 hours after culture among the three groups ($H = 13.76, 43.57, 60.87$; all at $P \leq 0.001$). The fungal hyphae lengths of spore+macrophage group at 4, 6 and 8 hours after culture were lower than those of simple spore group, and the fungal hyphae lengths of mixed platelet group at 6 and 8 hours after culture were lower than those of spore+macrophage group at the corresponding time point. The differences were statistically significant (all at $P < 0.05$). There was no significant difference in cell index between 0 hour, 6, 12, 18 and 24 hours after culture ($F = 0.02, 1.08, 1.61, 1.58, 2.52$; all at $P > 0.05$). There were significant differences in cell index among different groups at 30, 36, 42 and 48 hours after culture ($F = 10.81, 8.08, 5.61, 5.72$; all at $P < 0.05$). The cell indexes in spore+macrophage group at different time points were significantly lower than those in simple macrophage group (all at $P < 0.01$). **Conclusions** Platelets can promote the phagocytosis and inhibition of macrophages on fungi, and platelets may have antagonistic effect on fungal cytotoxicity.

[**Key words**] Keratitis/pathology; Macrophage; Fungi; Platelets; Phagocytosis; Germination rate

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81770902); Henan Provincial Natural Science Foundation (162300410163); Henan Science and Technology Innovation Talent Project (144100510015)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.12.002

真菌性角膜炎(fungal keratitis, FK)是真菌侵袭角膜后引起的以角膜溃疡及炎性细胞浸润为主的感染性角膜病变。流行病学及病例观察研究均显示在中国 FK 的主要病原菌是以镰刀菌属和曲霉菌属为首的丝状真菌,其临床治疗棘手且药物治愈率低,预后较差^[1-2]。因此对 FK 发病机制进行深入研究,探寻其新的治疗思路至关重要。本课题组前期的研究显示,在小鼠 FK 病灶区有大量巨噬细胞、中性粒细胞及血小板聚集。巨噬细胞与中性粒细胞作为主要的免疫细胞在机体感染后被募集到病灶区以产生防御,但血小板在 FK 病灶区聚集的作用尚不清楚。研究表明,血小板除了在血栓形成和止血调节中的功能外,在免疫防御和炎症反应中也有重要价值,血小板在革兰阴性菌、疟原虫、病毒及曲霉菌等病原菌感染过程中起免疫调节作用^[3-7]。本课题组前期体内实验研究发现,应用血小板抗体去除小鼠血小板的 FK 小鼠,其角膜穿孔率较单纯 FK 小鼠明显上升,提示血小板可能在角膜真菌感染过程中亦发挥重要作用。中性粒细胞与巨噬细胞是杀伤真菌的主要免疫细胞,血小板可增强中性粒细胞杀伤真菌的功能^[8]。然而,血小板对巨噬细胞吞噬真菌方面的作用尚未可知。本研究中应用小鼠巨噬细胞、真菌孢子和小鼠血小板体外共培养的方法,探

讨血小板对巨噬细胞吞噬及杀伤真菌的作用及其可能机制,为 FK 的治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 巨噬细胞 小鼠 RAW264.7 巨噬细胞系购自中国科学院上海细胞库。用 DMEM 培养液培养于 37℃、体积分数 5% CO₂、95%湿度的细胞培养箱中。

1.1.2 真菌菌株 腐皮镰孢菌标准株(编号:3.5840),购自中国科学院微生物研究所,用马铃薯葡萄糖琼脂培养基培养于 28℃ 真菌生化培养箱中。

1.1.3 实验动物 SPF 级 8~12 周龄昆明白雄性小鼠,体质量 23~30 g,购自郑州大学实验动物中心。小鼠的饲养与使用均遵照美国视觉与眼科学研究协会制定的 ARVO 声明,并经河南省眼科研究所实验动物伦理委员会批准(批文号:HNEECA-2017-04)。

1.1.4 主要试剂及仪器 DMEM 培养液、青链霉素混合液、L-谷氨酰胺、胰蛋白酶-EDTA 消化液(北京索莱宝科技有限公司);胎牛血清(美国 HyClone 公司);枸橼酸葡萄糖抗凝液(美国 Sigma 公司);马铃薯葡萄糖琼脂培养基(青岛海博生物技术有限公司);瑞姬染液(南京建成科技有限公司);钙荧光白(calcofluor white,

CFW) (美国 Fluka 公司); 抗小鼠 CD41-PE (美国 eBioscience 公司)。细胞培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 真菌生物化学培养箱 (广东省医疗器械厂); 离心机 (美国 Beckman Coulter 公司); 转盘式激光扫描共焦显微镜 (Revolution XD, 英国 Andor 公司); 实时无标记细胞功能分析仪 (xCELLigence RTCA S16, 杭州艾森生物有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 选取培养 5~7 d、形态类圆形的巨噬细胞, 胰蛋白酶-EDTA 消化液消化使细胞悬浮, 终止消化后 $300\times g$ 离心 5 min, 应用 DMEM 培养液重悬细胞沉淀并计数。将细胞按照 5×10^5 /孔均匀接种于 12 孔板中, 放入 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 、95% 湿度的细胞培养箱中培养 2 h 后使用。

1.2.2 真菌孢子提取 选取培养 4~7 d 的白色絮状菌株用于实验。轻轻刮取琼脂斜面菌落至含无菌 DMEM 培养液的玻璃试管中使真菌悬浮, 应用对折 2 次的无菌纱布将真菌悬液过滤至无菌离心管中并计数, 置于冰盒中备用。

1.2.3 小鼠血小板分离 按照 0.01 ml/g 腹腔内注射体积分数 1% 戊巴比妥麻醉小鼠并将其固定于平面上, 用颈椎脱臼法处死小鼠后用含 500 μl 枸橼酸葡萄糖抗凝液的 2 ml 注射器抽取心脏血。将抗凝全血置于 EP 管中, 轻轻颠倒混匀, $300\times g$ 离心 10 min。取上层富血小板血浆于新 EP 管中, $600\times g$ 离心 10 min, 弃去上清液, 应用管内剩余上清液轻轻振荡混匀血小板沉淀后吸取 2 μl 均匀涂布于载玻片上, 用瑞姬染液染色后在光学显微镜下进行纯度计数, 确保血小板纯度大于 95%。其余血小板沉淀用 DMEM 培养液稀释后计数并室温保存。

1.2.4 实验分组处理 单纯孢子组中孢子按照 5×10^5 /孔均匀接种于 12 孔板中。孢子+巨噬细胞组中孢子和巨噬细胞按照数量比 1:1 接种于 12 孔板中。混合血小板组中孢子、巨噬细胞和血小板按照数量比 5:5:100 均匀铺于 12 孔板中进行混合培养。每孔体积 1.5 ml, 真菌用质量分数 0.2% CFW 染色, 血小板用 CD41-PE 染色。孢子及血小板均现取现用, 且铺板过程不超过 30 min, 将铺好的培养板置于 CO_2 培养箱中培养并计时。实验重复 3 次。

1.2.5 吞噬率及吞噬指数的测定 各组分别于培养后 1、2、3 和 4 h 将 12 孔板置于转盘式激光扫描共焦荧光显微镜的孵育装置中 ($37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 、95% 湿度), 每组任意选取 400 倍显微镜下 5 个视野拍照, 将各通道荧光图片与光学图片融合后计数巨噬细胞总数、吞

噬孢子的巨噬细胞数及被吞噬的孢子数, 计算各组巨噬细胞吞噬率 (5 个视野中吞噬孢子的巨噬细胞总数/巨噬细胞总数 $\times 100\%$) 及吞噬指数 (5 个视野中被吞噬的孢子总数/巨噬细胞总数 $\times 100\%$)。

1.2.6 孢子出芽率及菌丝长度测定 混合血小板组中孢子、巨噬细胞和血小板按照数量比 1:5:100 铺板, 其余培养方法同 1.2.4。分别于培养后 1、2、3 和 4 h 在每组 400 倍显微镜下任意选取 5 个视野拍照。将各通道荧光图片与光学图片融合后计数视野中孢子出芽个数及孢子总数, 计算各组孢子出芽率 (5 个视野中孢子出芽总数/孢子总数 $\times 100\%$)。分别于培养后 4、6 和 8 h 在每组中任意选取 5 个视野于 400 倍显微镜下拍照。将各通道荧光图片与光学图片融合后用 Imaris 7.2 软件分别测量各组视野中真菌菌丝的长度。

1.2.7 巨噬细胞毒性测定 将巨噬细胞以 5×10^4 /孔的密度均匀接种于微孔板中, 置于细胞培养箱中培养 12 h, 使细胞生长处于潜伏期与对数生长期交界。按照 1.2.6 中孢子+巨噬细胞组和混合血小板组比例将孢子及血小板加入含细胞的微孔板中, 静置 30 min 后将微孔板与细胞功能分析仪连接, 放入培养箱中培养并计时, 使用实时无标记细胞功能分析仪进行细胞毒性测定。该系统通过贴壁细胞附着于微孔板底部的微电极所产生的电阻抗值实时监测细胞增生情况, 反映细胞毒性水平。用电阻抗值整合而成的无量纲参数即细胞指数, 表示细胞毒性变化^[9], 细胞指数与细胞毒性水平呈负相关。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计学软件 (美国 IBM 公司) 进行统计分析。各组吞噬率、吞噬指数、孢子出芽率及菌丝伸长度的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈偏态分布, 以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示, 吞噬率及吞噬指数组间比较采用 Mann-Whitney U 检验, 孢子出芽率及菌丝伸长度组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验。巨噬细胞毒性测定定量资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布, 以 $\text{mean}\pm\text{SD}$ 表示, 不同组间细胞指数总体比较采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 LSD- t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 孢子+巨噬细胞组和混合血小板组培养后不同时间点巨噬细胞对真菌孢子的吞噬功能比较

转盘式激光扫描共焦荧光显微镜下可见 2 个组巨噬细胞、真菌孢子及血小板均匀分布, 出现巨噬细胞吞噬真菌孢子现象, 被吞噬的孢子全部或部分局限于巨

噬细胞胞质内;同一时间点混合血小板组中吞噬孢子的巨噬细胞数均多于孢子+巨噬细胞组,且随观察时间延长,2 个组吞噬孢子的巨噬细胞数逐渐增加(图 1)。培养后 1、2、3 和 4 h,混合血小板组巨噬细胞吞噬率均高于孢子+巨噬细胞组,差异均有统计学意义($U=760.00、735.00、588.50、569.50$,均 $P<0.05$) (表 1)。

培养后 1、2、3 和 4 h,混合血小板组巨噬细胞吞噬指数均明显高于孢子+巨噬细胞组,差异均有统计学意义($U=742.00、818.50、569.00、646.50$,均 $P<0.05$) (表 2)。

2.2 单纯孢子组、孢子+巨噬细胞组和混合血小板组培养后不同时间点真菌孢子出芽率比较

转盘式激光扫描共焦荧光显微镜下观察可见,两端呈钝圆形短柱状的真菌孢子由一端出芽后形成菌丝并不断伸长;同一时间点单纯孢子组孢子出芽个数最多,孢子+巨噬细胞组次之,混合血小板组最少;随观察时间延长,各组真菌孢子出芽个数均不断增多(图 2)。各组培养后 1、2、3 和 4 h 孢子出芽率总体比较差异均有统计学意义($H=60.05、37.89、55.15、60.52$,均 $P<0.001$)。培养后 1、2、3 和 4 h 孢子+巨噬细胞组孢子出芽率均低于单纯

孢子组,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$) ;而培养后 1、3 和 4 h 混合血小板组出芽率均低于孢子+巨噬细胞组,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$) (表 3)。

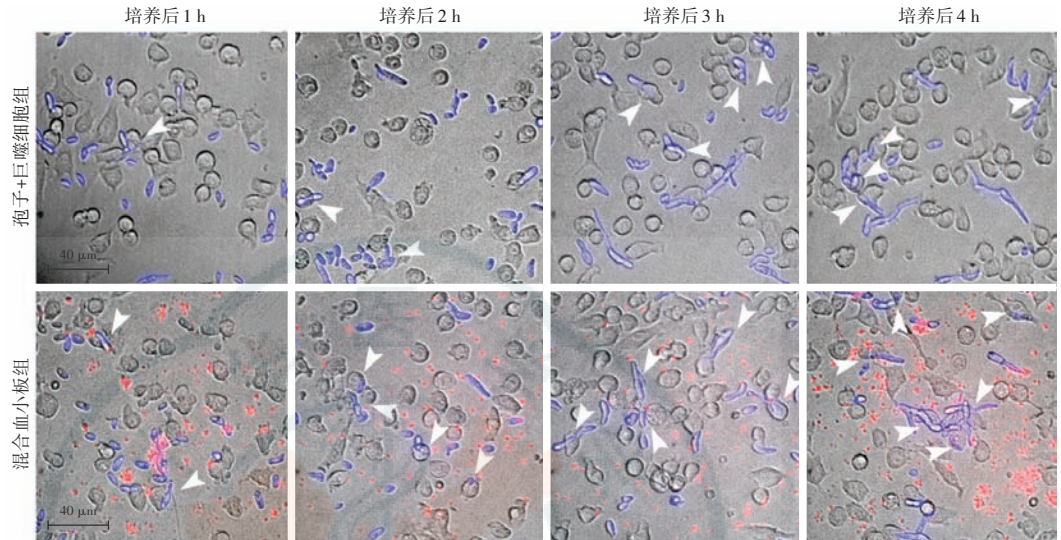


图 1 孢子+巨噬细胞组和混合血小板组培养后不同时间点巨噬细胞吞噬真菌孢子显微镜荧光图片与光学图片融合图($\times 400$,标尺=40 μm) 蓝色荧光所示为真菌(CFW 染色),红色荧光为血小板(CD41-PE 染色),可见部分巨噬细胞吞噬真菌孢子现象(箭头)。随培养时间的延长,孢子+巨噬细胞组及混合血小板组吞噬孢子的巨噬细胞数均不断增加。同一时间点混合血小板组吞噬孢子的巨噬细胞数均多于孢子+巨噬细胞组

表 1 孢子+巨噬细胞组和混合血小板组培养后不同时间点巨噬细胞吞噬率比较 [% , $M(P_{25}, P_{75})$]

组别	样本量	培养后各时间点巨噬细胞吞噬率			
		1 h	2 h	3 h	4 h
孢子+巨噬细胞组	9	5.13(2.94, 6.90)	8.33(5.26, 13.95)	13.16(7.41, 17.65)	15.00(11.11, 22.22)
混合血小板组	9	6.45(4.00, 10.00)	12.82(8.62, 16.67)	16.67(13.04, 22.50)	23.08(18.92, 25.81)
U 值		760.00	735.00	588.50	569.50
P 值		0.009	0.005	<0.001	<0.001

(Mann-Whitney U 检验)

表 2 孢子+巨噬细胞组和混合血小板组培养后不同时间点巨噬细胞吞噬指数比较 [% , $M(P_{25}, P_{75})$]

组别	样本量	培养后各时间点巨噬细胞吞噬指数			
		1 h	2 h	3 h	4 h
孢子+巨噬细胞组	9	5.13(2.94, 6.90)	8.51(5.41, 13.33)	11.90(8.33, 16.00)	15.22(11.11, 23.08)
混合血小板组	9	6.67(4.00, 10.20)	12.20(8.33, 15.00)	17.50(13.33, 21.62)	21.43(15.91, 26.67)
U 值		742.00	818.50	569.00	646.50
P 值		0.006	0.031	<0.001	0.001

(Mann-Whitney U 检验)

表 3 3 个组培养后不同时间点真菌孢子出芽率比较 [% , $M(P_{25}, P_{75})$]

组别	样本量	培养后各时间点孢子出芽率			
		1 h	2 h	3 h	4 h
单纯孢子组	6	56.82(43.32, 65.60)	76.75(65.88, 88.05)	90.00(80.04, 95.73)	90.91(90.00, 100.00)
孢子+巨噬细胞组	6	32.07(27.88, 41.73) ^a	57.14(53.92, 64.07) ^a	72.73(68.28, 80.00) ^a	86.74(80.00, 90.91) ^a
混合血小板组	6	23.70(19.54, 27.12) ^b	54.30(45.11, 61.07)	64.20(55.56, 70.04) ^b	75.00(66.67, 78.95) ^b
H 值		60.05	37.89	55.15	60.52
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与单纯孢子组比较,^a $P<0.01$;与孢子+巨噬细胞组比较,^b $P<0.01$ (Kruskal-Wallis H 检验)

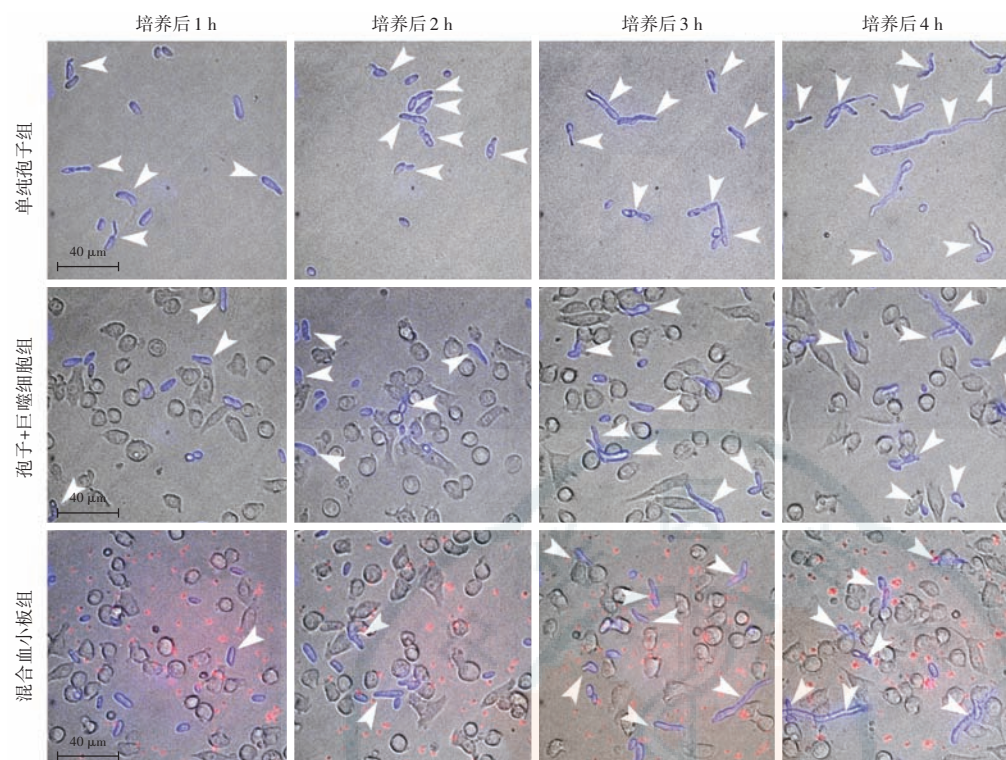


图 2 3 个组培养后不同时间点真菌孢子出芽显微镜荧光图片与光学图片融合图 (×400, 标尺 = 40 μm) 蓝色荧光所示为真菌 (CFW 染色), 红色荧光为血小板 (CD41-PE 染色), 白色箭头所示为部分真菌孢子出芽现象。随时间延长, 各组孢子出芽数均不断增多。同一时间点单纯孢子组孢子出芽个数最多, 孢子+巨噬细胞组次之, 混合血小板组最少

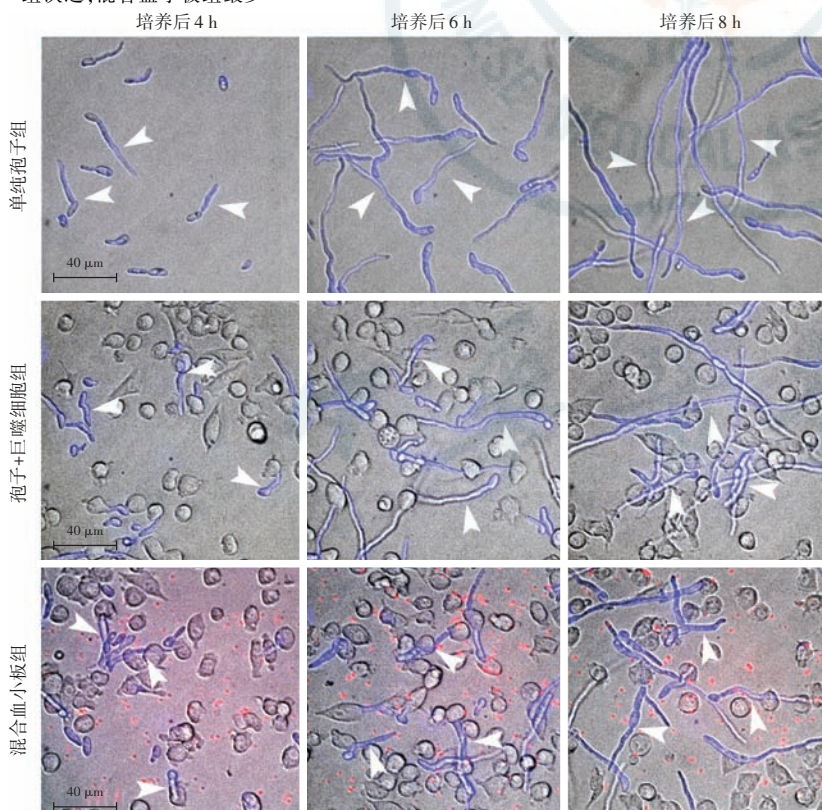


图 3 3 个组培养后不同时间点真菌菌丝生长显微镜荧光图片与光学图片融合图 (×400, 标尺 = 40 μm) 蓝色荧光所示为真菌孢子 (CFW 染色), 红色荧光为血小板 (CD41-PE 染色), 白色箭头所示为部分真菌菌丝。随观察时间延长, 各组菌丝均逐渐生长, 培养后 8 h 菌丝长度最长且局部交叉生长。同一时间点菌丝长度比较, 单纯孢子组最长, 孢子+巨噬细胞组次之, 混合血小板组最短

2.3 单纯孢子组、孢子+巨噬细胞组和混合血小板组培养后不同时间点真菌菌丝长度比较

转盘式激光扫描共焦荧光显微镜下观察可见, 真菌由孢子出芽后继续生长为粗长的菌丝, 且随观察时间延长各组菌丝长度逐渐增加, 至培养后 8 h, 各组部分菌丝重叠交叉后继续生长。3 个组培养后同一时间点菌丝长度比较, 单纯孢子组最长, 孢子+巨噬细胞组稍次之, 混合血小板组最短 (图 3)。各组培养后 4、6 和 8 h 菌丝长度总体比较, 差异均有统计学意义 ($H = 13.760、43.570、60.870$, 均 $P < 0.05$)。培养后 4、6 和 8 h 孢子+巨噬细胞组

菌丝长度均低于相应时间点单纯孢子组, 差异均有统计学意义 ($P = 0.009、0.013、0.011$)。培养后 6 h 和 8 h 混合血小板组菌丝长度均低于相应时间点孢子+巨噬细胞组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$) (表 4)。

2.4 单纯巨噬细胞组、孢子+巨噬细胞组和混合血小板组培养后不同时间点巨噬细胞毒性比较

3 个组培养后 0、6、12、18 和 24 h 细胞指数总体比较, 差异均无统计学意义 ($F = 0.02、1.08、1.61、1.58、2.52$, 均 $P > 0.05$)。3 个组培养后 30、36、42 和 48 h 细胞指数总体比较, 差异均有统计学意义 ($F = 10.81、8.08、5.61、5.72$, 均 $P < 0.05$); 其中各时间点孢子+巨噬细胞组细胞指数明显低于单纯巨噬细胞组, 差异均有统计学意义 ($P = 0.000、0.001、0.008、0.009$), 而孢子+巨噬细胞组细胞指数略低于混合血小板组, 差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$) (表 5)。

表 4 3 个组培养后不同时间点真菌菌丝长度比较 [μm , $M(P_{25}, P_{75})$]

组别	样本量	培养后不同时间点菌丝伸长度		
		4 h	6 h	8 h
单纯孢子组	4	26.90(20.90, 39.55)	68.00(41.53, 96.60)	88.00(59.13, 120.45)
孢子+巨噬细胞组	4	22.15(16.88, 36.10) ^a	55.60(35.00, 80.00) ^a	75.90(47.40, 105.00) ^a
混合血小板组	4	25.15(16.38, 32.80)	43.40(29.70, 61.50) ^b	56.70(40.10, 75.70) ^b
H 值		13.76	43.57	60.870
P 值		0.001	<0.001	<0.001

注:与单纯孢子组比较,^a $P<0.05$;与孢子+巨噬细胞组比较,^b $P<0.01$ (Kruskal-Wallis H 检验)

表 5 3 个组培养后不同时间点巨噬细胞毒性比较 (mean±SD)

组别	样本量	培养后不同时间点细胞指数									
		0 h	6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h	42 h	48 h	
单纯巨噬细胞组	7	0.81±0.21	1.00±0.35	1.26±0.37	1.67±0.39	2.02±0.37	2.44±0.32	2.43±0.43	2.38±0.58	2.20±0.58	
孢子+巨噬细胞组	7	0.79±0.25	0.83±0.33	1.06±0.31	1.44±0.31	1.71±0.26	1.90±0.16 ^a	1.84±0.20 ^a	1.71±0.30 ^a	1.52±0.33 ^a	
混合血小板组	7	0.80±0.27	0.76±0.27	0.96±0.26	1.37±0.30	1.70±0.29	2.01±0.15	1.95±0.17	1.76±0.28	1.53±0.32	
F 值		0.02	1.08	1.61	1.58	2.52	10.81	8.08	5.61	5.72	
P 值		0.977	0.361	0.227	0.234	0.109	0.001	0.003	0.013	0.012	

注:与单纯巨噬细胞组比较,^a $P<0.01$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验)

3 讨论

FK 是一种高度致盲的感染性眼病,在中国北方地区,其主要致病原因是农业生产中植物性外伤后并发的真菌感染^[1]。临床上对 FK 的治疗以抗真菌药物为主,但抗真菌药物的生物利用度及预后较差,即使 FK 得到适当的抗真菌药物治疗,仍有可能出现角膜穿孔及后期形成的角膜瘢痕,从而致盲,因此 FK 的治疗仍是眼科临床的一大挑战。研究 FK 的发病机制可为临床研发新型、有效的药物治疗奠定科学基础。

本课题组前期实验结果显示,在小鼠 FK 模型病灶区有大量中性粒细胞、巨噬细胞和血小板聚集;应用抗体去除小鼠血小板后,FK 模型鼠的角膜感染加重且穿孔率升高,提示血小板可能在角膜真菌感染过程中发挥作用。中性粒细胞与巨噬细胞是机体的主要免疫细胞,在感染区迅速聚集以抵御真菌感染。大量血小板在 FK 病灶区与免疫细胞共同聚集是否亦参与机体免疫反应尚有待进一步研究。

近来研究表明,血小板除了具有止血作用外,在炎症和免疫反应中也起到关键作用。血小板表面可表达多种受体并具有多种存储颗粒,其中 α -颗粒存储丰富,含有多种细胞因子和趋化因子,可在炎症或组织损伤部位迅速释放以调节免疫细胞活性并诱导细胞向炎症部位迁移和募集^[10-12]。血小板表面表达多种 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLR)及组织相容性复合体

I 类分子,可通过识别病原体相关分子模式和损伤相关的分子模式来感知危险信号并承担抗原递呈作用,介导炎症反应^[12-15]。

本研究中结果显示,孢子+巨噬细胞组和混合血小板组巨噬细胞吞噬率和吞噬指数随共培养时间延长呈上升趋势,且同一时间点混合血小板组巨噬细胞吞噬率和吞噬指数均高于孢子+巨噬细胞组。Czakai 等^[16]研究结果显示,富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)增强了巨噬细胞吞噬烟曲霉分生孢子的能力,但巨噬细胞、孢子和 PRP 共培养观察时间仅为 15 min。本研究中持续观察了共培养后 1、2、3 和 4 h 巨噬细胞的吞噬情况,进一步证明在真菌感染时,巨噬细胞能够吞噬病原菌,且血小板显著提高巨噬细胞的吞噬作用。Rossato 等^[17-18]的研究表明缺乏 TLR-2 或 TLR-4 均能使巨噬细胞吞噬能力受损。有研究显示, C 型凝集素受体(C-type lectin receptor, CLR),如 Dectin-1 受体,在识别真菌细胞壁 β -葡聚糖后可介导真菌的吞噬作用并产生细胞因子引发炎症反应^[19-21]。血小板表面可表达多种 TLR 和 CLR^[12-13],推测其可能通过自身表达或刺激细胞 TLR 和 CLR 表达上调参与炎症反应,促进巨噬细胞吞噬真菌。

本研究结果显示,孢子+巨噬细胞组孢子出芽率和菌丝长度低于单纯孢子组,但高于混合血小板组。在共培养后 4 h,混合血小板组菌丝长度高于孢子+巨噬细胞组,但差异无统计学意义,考虑其可能与本研究

纳入的样本量不足有关。Rødland 等^[7]研究表明,曲霉菌可诱导血小板的活化以增强单核细胞的炎症反应,并未阐明血小板及单核细胞对真菌的作用。本研究结果表明,在真菌感染过程中巨噬细胞抑制孢子出芽和真菌生长,且血小板促进巨噬细胞对真菌生长的抑制作用。

Banks 等^[22]研究报道在巨噬细胞吞噬炭疽杆菌芽孢后,孢子会萌发并开始吞噬溶酶体内产生毒素。细菌毒素成分可在芽孢萌发的早期阶段合成并分泌,且对巨噬细胞、中性粒细胞等免疫细胞产生毒性作用^[23]。本研究结果显示,单纯巨噬细胞组细胞指数最高,加入真菌孢子共培养后巨噬细胞的细胞指数有所降低,表明真菌对巨噬细胞有细胞毒性作用。混合血小板组巨噬细胞的细胞指数较孢子+巨噬细胞组有一定程度上升,但差异无统计学意义,推测血小板可能有拮抗真菌孢子细胞毒性的作用,未来仍需扩大样本量进一步研究其相关机制。

综上所述,本研究结果表明在真菌感染期间,血小板参与机体免疫反应,可促进巨噬细胞对真菌孢子的吞噬及对真菌生长的抑制作用,且血小板可能有缓解真菌细胞毒性的作用。血小板参与炎症反应的机制复杂,其对巨噬细胞的作用机制尚待进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- Xie L, Zhong W, Shi W, et al. Spectrum of fungal keratitis in north China [J]. *Ophthalmology*, 2006, 113 (11) : 1943 - 1948. DOI: 10. 1016/j. ophtha. 2006. 05. 035.
- 王璐璐, 韩雷, 张月琴, 等. 真菌性角膜炎的临床转归及影响因素分析 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2016, 34 (8) : 734 - 738. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2016. 08. 015.
Wang LL, Han L, Zhang YQ, et al. Prognosis of clinical treatment for fungal keratitis and its influence factors [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2016, 34 (8) : 734 - 738. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2016. 08. 015.
- Palankar R, Kohler TP, Krauel K, et al. Platelets kill bacteria by bridging innate and adaptive immunity via platelet factor 4 and FcγRIIA [J]. *J Thromb Haemost*, 2018, 16 (6) : 1187 - 1197. DOI: 10. 1111/jth. 13955.
- Assinger A, Laky M, Schabbauer G, et al. Efficient phagocytosis of periodontopathogens by neutrophils requires plasma factors, platelets and TLR2 [J]. *J Thromb Haemost*, 2011, 9 (4) : 799 - 809. DOI: 10. 1111/j. 1538-7836. 2011. 04193. x.
- McMorran BJ, Marshall VM, de Graaf C, et al. Platelets kill intraerythrocytic malarial parasites and mediate survival to infection [J]. *Science*, 2009, 323 (5915) : 797 - 800. DOI: 10. 1126/science. 1166296.
- Seyoum M, Enawgaw B, Melku M. Human blood platelets and viruses: defense mechanism and role in the removal of viral pathogens [J]. *Thromb J*, 2018, 16 : 16. DOI: 10. 1186/s12959-018-0170-8.
- Rødland EK, Ueland T, Pedersen TM, et al. Activation of platelets by *Aspergillus fumigatus* and potential role of platelets in the immunopathogenesis of *Aspergillosis* [J]. *Infect Immun*, 2010, 78 (3) : 1269 - 1275. DOI: 10. 1128/IAI. 01091-09.
- 张红敏, 刘素素, 许中中, 等. 小鼠真菌性角膜炎中主要免疫细胞的作用 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2012, 30 (9) : 779 - 784. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2012. 09. 003.
- Zhang HM, Liu SS, Xu ZZ, et al. Effects of immunocyte on the process of fungal keratitis [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2012, 30 (9) : 779 - 784. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2012. 09. 003.
- Zaid TM, Yeung TL, Thompson MS, et al. Identification of FGFR4 as a potential therapeutic target for advanced-stage, high-grade serous ovarian cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19 (4) : 809 - 820. DOI: 10. 1158/1078-0432. CCR-12-2736.
- Thomas MR, Storey RF. The role of platelets in inflammation [J]. *Thromb Haemost*, 2015, 114 (3) : 449 - 458. DOI: 10. 1160/TH14-12-1067.
- Koenen RR. The prowess of platelets in immunity and inflammation [J]. *Thromb Haemost*, 2016, 116 (4) : 605 - 612. DOI: 10. 1160/TH16-04-0300.
- Ponomarev ED. Fresh evidence for platelets as neuronal and innate immune cells: their role in the activation, differentiation, and deactivation of Th1, Th17, and Tregs during tissue inflammation [J]. *Front Immunol*, 2018, 9 : 406. DOI: 10. 3389/fimmu. 2018. 00406.
- Shiraki R, Inoue N, Kawasaki S, et al. Expression of Toll-like receptors on human platelets [J]. *Thromb Res*, 2004, 113 (6) : 379 - 385. DOI: 10. 1016/j. thromres. 2004. 03. 023.
- D' Atri LP, Schattner M. Platelet toll-like receptors in thromboinflammation [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2017, 22 : 1867 - 1883.
- Cognasse F, Nguyen KA, Damien P, et al. The inflammatory role of platelets via their TLRs and siglec receptors [J/OL]. *Front Immunol*, 2015, 6 : 83 [2019-04-11]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25784910>. DOI: 10. 3389/fimmu. 2015. 00083.
- Czakai K, Dittich M, Kaldorf M, et al. Influence of platelet-rich plasma on the immune response of human monocyte-derived dendritic cells and macrophages stimulated with *Aspergillus fumigatus* [J]. *Int J Med Microbiol*, 2017, 307 (2) : 95 - 107. DOI: 10. 1016/j. ijmm. 2016. 11. 010.
- Rossato L, Silvana Dos Santos S, Ferreira LG, et al. The impact of the absence of Toll-like receptor-2 during *Sporothrix brasiliensis* infection [J]. *J Med Microbiol*, 2019, 68 (1) : 87 - 94. DOI: 10. 1099/jmm. 0. 000876.
- Rossato L, Santos S, Ferreira LG, et al. The importance of Toll-like receptor 4 during experimental *Sporothrix brasiliensis* infection [J]. *Med Mycol*, 2019, 57 (4) : 489 - 495. DOI: 10. 1093/mmy/my048.
- Kim SH, Zhong X, Kim W, et al. Taurine chloramine potentiates phagocytic activity of peritoneal macrophages through up-regulation of dectin-1 mediated by heme oxygenase-1-derived carbon monoxide [J]. *FASEB J*, 2018, 32 (4) : 2246 - 2257. DOI: 10. 1096/fj. 201700817R.
- 段志敏, 杜蕾蕾, 刘彩霞, 等. Dectin-1 介导人急性单核细胞白血病细胞巨噬细胞样细胞吞噬白念珠菌的作用研究 [J]. *中华皮肤科杂志*, 2018, 51 (6) : 425 - 428. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0412-4030. 2018. 06. 006.
Duan ZM, Du LL, Liu CX, et al. Roles of Dectin-1 in phagocytosis of *Candida albicans* by macrophage-like cells derived from a human acute monocytic leukemia cell line THP-1 [J]. *Chin J Dermatol*, 2018, 51 (6) : 425 - 428. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0412-4030. 2018. 06. 006.
- Goodridge HS, Reyes CN, Becker CA, et al. Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a 'phagocytic synapse' [J]. *Nature*, 2011, 472 (7344) : 471 - 475. DOI: 10. 1038/nature10071.
- Banks DJ, Barnajian M, Maldonado-Arocho FJ, et al. Anthrax toxin receptor 2 mediates *Bacillus anthracis* killing of macrophages following spore challenge [J]. *Cell Microbiol*, 2005, 7 (8) : 1173 - 1185. DOI: 10. 1111/j. 1462-5822. 2005. 00545. x.
- Cote CK, Welkos SL. Anthrax toxins in context of *Bacillus anthracis* spores and spore germination [J]. *Toxins (Basel)*, 2015, 7 (8) : 3167 - 3178. DOI: 10. 3390/toxins7083167.

(收稿日期: 2019-05-11 修回日期: 2019-10-28)

(本文编辑: 张宇)