

HLA-A * 0201 转基因小鼠侵袭性肺曲霉病模型的建立与鉴定

赵作涛¹, 孙 铮¹, 李丽丽¹, 万 喆¹, 朱 平², 李若瑜¹
(北京大学第一医院 1. 皮肤性病科//真菌和真菌病研究中心, 2. 血液科, 北京 100034)

摘要:【目的】建立 HLA-A * 0201 转基因小鼠侵袭性肺曲霉病模型, 并进行实验室鉴定。【方法】在真菌孢子感染前, 给予 HLA-A * 0201 转基因小鼠腹腔注射环磷酰胺。乙醚麻醉后, 小鼠经鼻腔吸入 3 组不同浓度的 (3×10^6 , 3×10^7 , 3×10^8 mL⁻¹) 烟曲霉孢子悬液。阴性对照组小鼠吸入 PBS。感染后 36 h, 处死各组小鼠, 取肺组织病理行 HE、PAS 以及 GMS 染色分析, 以验证感染是否成功并计算肺侵袭性肺曲霉感染小鼠模型成模率。肺组织研磨涂皿后行菌落计数, 分析小鼠肺曲霉负载量。【结果】小鼠肺组织病理检查显示, 正常肺组织结构遭到显著破坏, 大量菌丝生长并可见菌丝侵犯血管现象, 证实侵袭性肺曲霉病模型造模成功。在免疫抑制的方法和条件恒定时, 3 种孢子浓度由低到高成模率分别为 36.7%、76.7%、96.7%。各实验组成模小鼠肺组织研磨液在 PDA 培养基上均有大量烟曲霉菌落生长, 未感染小鼠组未见烟曲霉菌落生长。【结论】成功建立 HLA-A * 0201 转基因小鼠侵袭性肺曲霉病模型, 在免疫抑制的方法和条件恒定时, 模型成模率与接种孢子悬液的浓度成正比, 采用高浓度的孢子悬液 (3×10^8 mL⁻¹) 时, 可以达到较高的成模率。

关键词: 烟曲霉; 侵袭性肺曲霉病; HLA-A * 0201 转基因小鼠; 环磷酰胺

中图分类号: R756 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2014)01-0116-06

Establishment and Identification of an Invasive Pulmonary Aspergillosis Mouse Model in HLA-A * 0201 Transgenic Mice

ZHAO Zuo-tao¹, SUN Zheng¹, LI Li-li¹, WAN Zhe¹, ZHU Ping², LI Ruo-yu¹
(1. Department of Dermatology and Venereology Research Center for Medical Mycology and Mycoses,
2. Department of Hematology, First Hospital, Peking University, Beijing 100034, China)

Abstract: 【Objective】 To Establish and identify an invasive pulmonary aspergillosis mouse model in HLA-A * 0201 transgenic mice. 【Methods】 The HLA-A * 0201 transgenic mice were treated with cyclophosphamide before challenge with fungal conidia. *Aspergillus fumigatus* (BMU 01200, provided by Research Center for Medical Mycology and Mycoses, Department of Dermatology and Venereology, First Hospital, Peking University) conidia suspension of various concentrations (3×10^6 /mL, 3×10^7 /mL, 3×10^8 /mL) were intranasal dripped right after the mice were anesthetized by diethyl ether. The mice administrated with PBS were employed as negative controls. 36 h post infection, the mice of different groups were sacrificed and lung tissue histopathology analysis with HE, PAS and GMS staining were performed. Colony forming unit (CFU) counting was also executed to confirm the infection. 【Results】 Histopathology analysis characterized by lung tissue destruction and hyphal invasion demonstrated the invasive pulmonary *Aspergillus fumigatus* infection in the mice model. The invasive pulmonary *Aspergillus fumigatus* infection of mice was also identified by CFU counting of grind lung tissue in four experimental mice groups, the success rate of which 0, 36.7%, 76.7% and 96.7%, respectively. 【Conclusions】 We successfully established an invasive pulmonary aspergillosis mouse model in HLA-A * 0201 transgenic mice, with the highest success rate of 96.7% in the group of the highest conidia dose administrated. This model could be utilized to investigate the immunotherapy effect of human HLA-A * 0201 restricted *Aspergillus fumigatus* antigen peptide specific T lymphocytes against *Aspergillus fumigatus* in vivo.

Key word: *Aspergillus fumigatus*; invasive pulmonary aspergillosis; HLA-A * 0201 transgenic mouse; cyclophosphamide

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2014, 35(1): 116-121]

收稿日期: 2013-04-03

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(30800041)

作者简介: 赵作涛, 医学博士, E-mail: zhaozuotaotao@163.com; * 通信作者: 李若瑜, 博士生导师, 教授, E-mail: lrymm@medmail.com.cn

近年来,随着免疫受损患者不断增多,侵袭性曲霉病(invasive aspergillosis, IA)的发生呈上升趋势,且病情十分严重,在白血病和骨髓移植受者等重症免疫受损患者 IA 的病死率可高达 90%,已经成为这类患者死亡的主要原因之一,而 IA 最主要的致病真菌是烟曲霉,如何有效地治疗 IA 成为目前研究的热点和难点^[1-5]。目前临床主要还是以各种抗真菌药物作为 IA 的主要治疗手段,抗真菌药物治疗效果不理想且副作用较大,进一步阐明 IA 的发病机制,从而寻找包括细胞学和免疫学技术在内的更为有效的治疗方法越来越成为目前急需解决的重要问题。烟曲霉特异性的 T 细胞免疫在 IA 的发病机制以及免疫治疗 IA 中具有重要作用,进一步研究免疫活性 T 细胞在感染宿主体内杀伤烟曲霉的效果需要首先解决建立动物感染模型的问题^[6-14]。我们引进了 HLA-A * 0201 转基因小鼠模型,可以表达国人最常见的 HLA-A * 0201 位点基因,小鼠 HLA-A * 0201 表达阳性的 T 淋巴细胞可以识别针对 HLA-A * 0201 位点的抗原表位,因而可以模拟体内环境进一步研究烟曲霉抗原多肽特异性 T 淋巴细胞在 IA 发病机制中的作用^[15-17]。对于 HLA-A * 0201 转基因小鼠如何建立侵袭性肺曲霉病的模型尚未见报道,因而本研究利用转人基因 HLA-A * 0201 小鼠来建立 IA 模型,并验证模型建立是否成功,以期为进一步研究 HLA-A * 0201 表达阳性的烟曲霉多肽特异性 T 淋巴细胞体内免疫治疗侵袭性肺曲霉病以及探讨 T 细胞免疫在 IA 发病机制中的作用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 研究对象

实验小鼠:HLA-A * 0201 转基因小鼠(C57BL/6 背景)购自美国 Jackson Laboratory,于 SPF 环境饲养,转基因小鼠表达人类 MHC-I 类分子 HLA-A * 0201^[18]。实验菌株:烟曲霉 BMU 01200,由北京大学第一医院皮肤性病科、北京大学真菌和真菌病研究中心提供,为临床分离来自白血病患者侵袭性肺曲霉病的肺组织感染灶的菌株,经过形态学、生理、生化以及分子生物学鉴定^[7]。

1.2 菌悬液的制备

将-70℃保存的菌种转种于 PDA 培养基试管斜面,挑选单菌落,PDA 培养基 37℃培养 5 d。用

2 mL 含有 0.1% Tween20 的生理盐水冲洗试管斜面。收集孢子液,用 8 层无菌纱布过滤,以除去菌丝及培养基成分。在显微镜下用血球计数板计数,使用 PBS 调整孢子液浓度分别为 3×10^6 、 3×10^7 、 3×10^8 mL⁻¹。同时取计数烟曲霉孢子悬液,涂布于 PDA 培养皿,验证孢子活力^[7]。

1.3 实验动物的选择、分组与常规准备

HLA-A * 0201 转基因小鼠,6~8 周龄,体质量 22~25 g,SPF 级。置于层流架内饲养。饲料为⁶⁰Co 照射过的无菌饲料,饮水中加入四环素(500 μg/mL)预防细菌感染。依据接种孢子悬液浓度不同分成实验组:A(3×10^6 mL⁻¹),B(3×10^7 mL⁻¹),C(3×10^8 mL⁻¹)3 组,每组 30 只小鼠;对照组 D(PBS),10 只小鼠。

1.4 建立实验小鼠免疫抑制状态

四组小鼠在接种烟曲霉孢子悬液前 4 d(-4 d)腹腔注射环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司)300 mg/kg,-1 d(100 mg/kg)。

1.5 实验小鼠的麻醉

感染当天,将一片无菌脱脂棉放入透明 1 L 容积的玻璃缸内并倒入适量乙醚,将小鼠放入缸内,立即盖上盖子,见小鼠由起初的兴奋状态转入抑制,全身放松后,立即取出小鼠。

1.6 孢子接种

左手抓小鼠使之呈直立状,中指压紧口部,使之只能用鼻呼吸,无名指轻压腹部,使膈肌上移。用加样枪吸取 30 μL 孢子悬液(A、B、C 三组小鼠予以各自相应的孢子浓度,D 组为无孢子的 PBS 作为对照),由鼻孔滴入,放松腹部,并保持小鼠直立状态 1 min 左右。

1.7 验证侵袭性肺曲霉病模型是否成功

接种烟曲霉孢子悬液 36 h 后,每组取 5 只小鼠的肺组织,甲醛溶液固定,石蜡包埋,切片,行 HE 染色,PAS 染色和银染,观察光镜下是否有菌丝侵犯肺组织,以及感染后的宿主免疫反应。

1.8 计数各组建模小鼠的肺组织真菌载量并计算相应成模率

取 3 组建模小鼠各 30 只以及对照组小鼠 10 只,在接种孢子悬液或 PBS 后 36 h,过量吸入乙醚处死小鼠后打开胸腔,剪断下腔静脉,用 5 mL 注射器从右心室注入 PBS 灌洗肺循环系统,直至肺组织由红变白。切取全部肺组织,置入无菌培养皿,PBS 液漂洗除去表面血污,无菌滤纸吸取多余

水分。取各组相同部位肺组织置于无菌塑料管,称质量,加入 1 mL 生理盐水,用组织匀浆器研磨,将稀释 1、10、100、1 000 倍的组织匀浆液涂在 PDA 培养基上,37 °C 培养 36 h 后计数菌落形成单位(colony forming unit, CFU), 计算肺组织中烟曲霉载量, 即每组小鼠肺组织培养的菌落形成单位(CFU), 乘以稀释倍数再除以肺组织质量, 并计算对照组 D 以及 A、B、C 组小鼠在各自相应接种孢子浓度下的成模率。

1.9 统计学方法

各组小鼠肺组织真菌负载量及 IA 成模率均采用 *t*-test 方法, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 肺组织病理切片显微镜下观察

经验证, 用于接种小鼠的烟曲霉孢子悬液活力大于 99%。经鼻孔接种孢子悬液 36 h 后, 感染成功的小鼠肺组织比较 HE 染色, PAS 染色和银染色病理检查结果。HE 染色方法烟曲霉成分显示的不如其他两种方法清楚, 但是对于显示炎症细胞的浸润, 观察免疫反应更为有利; 而 PAS 染色中, 孢子和菌丝被染成特征性的粉红色; GMS 染色, 真菌成分被染成黑色, 更加有利于观察。由图 1A 可见, 小鼠肺组织正常结构遭到破坏, 肺泡塌陷; 大量烟曲霉孢子和菌丝形成, 并有菌丝成分侵犯血管的现象(管腔中可见红细胞), 伴有中性粒细胞浸润及核碎屑, 周边有灶性炎性坏死区, 多量组织细胞、少量淋巴细胞及中性粒细胞浸润, 偶见少量浆样细胞。而未接种孢子悬液(PBS 对照组)的小鼠肺组织结构正常, 肺泡充盈良好, 血管管壁完整, 未发现非肺组织成分, 如图 1 所示。

2.2 各组小鼠肺组织匀浆菌落计数

经鼻孔接种烟曲霉孢子悬液 36 h 后, 不同浓度分组小鼠的肺组织经匀浆化、倍比稀释、涂皿并于 36 h 后计数菌落形成单位, 即为衡量肺组织真菌负载量的指标, 菌落经鉴定为烟曲霉。随着 ABC 三组小鼠的接种孢子悬液浓度由低到高, 虽然每组小鼠都有感染成功的个体, 但数目却随着接种孢子浓度的增高而增多, 每组感染的个体中真菌载量(CFU 计数)也随接种孢子浓度的增高而增大, 差异具有统计学意义, 可以作为今后治疗干预效果的指标。对照组 D 组每只小鼠 CFU 计数值皆

为阴性(图 2)。

2.3 计算各组小鼠成模率

小鼠造模成功的比率即成模率的界定为: 病理照片上有菌丝侵袭生长破坏肺组织的证据。实验组中, A 组小鼠 30 只, 其中 11 只小鼠肺组织病理学支持且肺组织匀浆有菌落生长, 成模率为 36.7%; B 组小鼠 30 只, 其中 23 只小鼠肺组织病理学支持且肺组织匀浆有菌落生长, 成模率为 76.7%; C 组小鼠 30 只, 其中 29 只小鼠肺组织病理学支持且肺组织匀浆有菌落生长, 成模率为 96.7%。而接种 PBS 的 10 只对照组(D 组)小鼠肺组织病理图像未见真菌成分且肺组织研磨液涂皿未见菌落生成。由此可见, 在免疫抑制条件相同的情况下, 随着 A、B、C 三组小鼠的接种孢子悬液浓度由低到高, 成模率也呈现由低到高的变化, 差异具有统计学意义(图 3)。

3 讨 论

侵袭性曲霉病是一种主要由烟曲霉引起、通常侵犯免疫受损人群的破坏性和致死率极高的恶性感染, 病情的发展和转归取决于烟曲霉的侵袭力和宿主的抗真菌免疫能力之间的平衡^[1-3,6]。通常情况下, 对于免疫力正常的宿主, 以中性粒细胞和巨噬细胞为代表的强有力的固有性免疫应答足以将侵入体内的烟曲霉完全清除; 同时, 以 T 淋巴细胞为主导的特异性免疫应答会迅速介入, 协助固有性免疫系统共同抵御感染^[1-3,6]。然而, 由于侵袭性曲霉病的发病人群主要构成是造血干细胞移植患者、实体器官移植患者、肿瘤化疗患者、HIV 感染者等等免疫严重受损患者, 他们往往具有固有性和适应性免疫应答能力的严重削弱, 对于烟曲霉这种生长繁殖非常迅速的病原真菌的侵犯无能为力^[1-6]。目前临床上对于这种病人主要治疗方法是系统应用抗真菌药物, 不良反应大, 治疗效果不尽如人意。

目前国内外研究者以及研究者前期工作针对侵袭性真菌感染的 T 淋巴细胞免疫进行了深入研究, 显示出较好的抗真菌效果, 有可能在将来为真菌病的非药物治疗带来新的手段, 这些研究往往采用人类的 T 淋巴细胞与真菌(包括烟曲霉)进行相互作用, 研究其对真菌的抑制和杀伤效果, 缺点是无法进行体内研究^[7,19-20]。鉴于我国汉族人表达

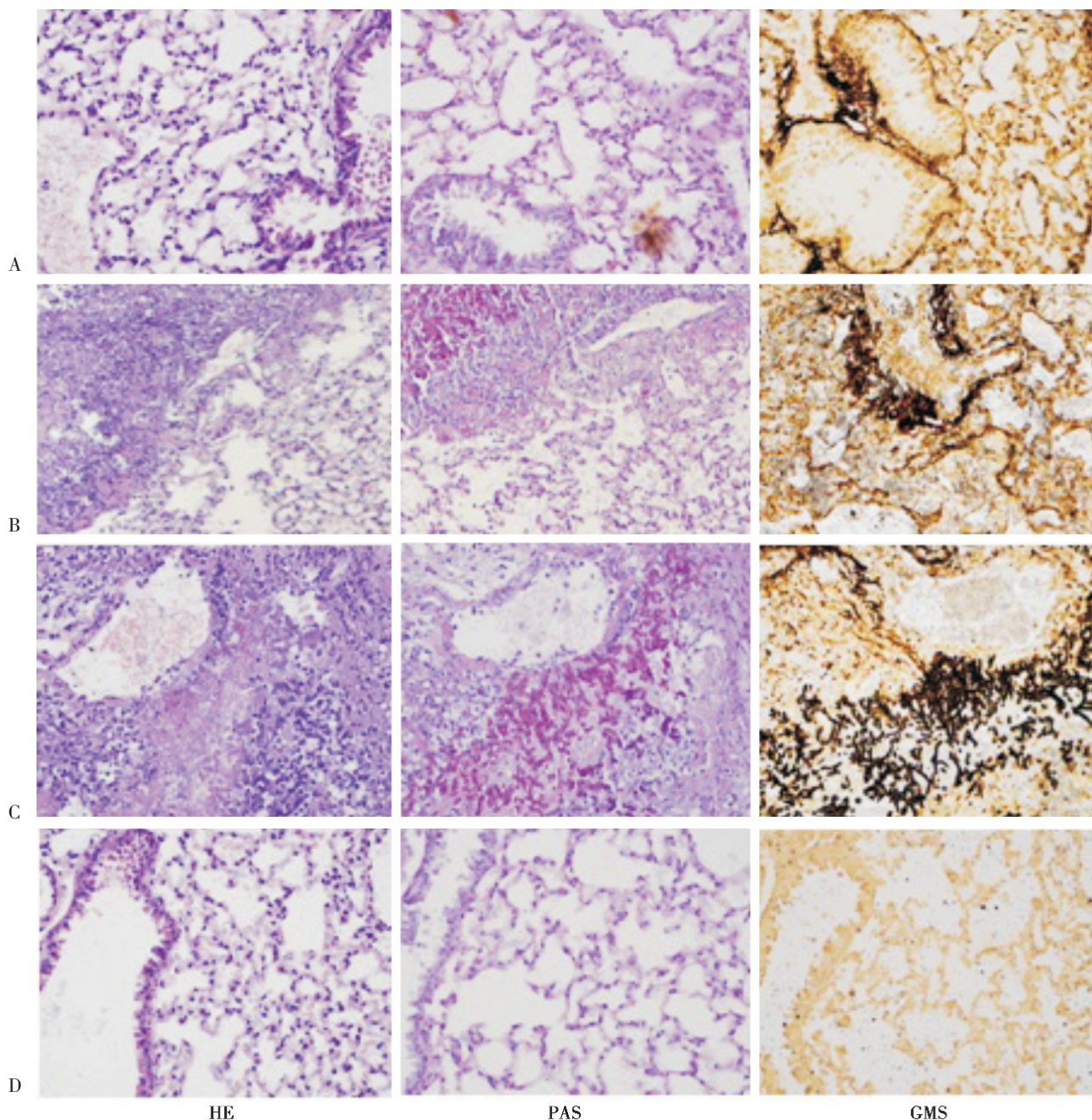


图 1 侵袭性肺曲霉病模型小鼠以及未感染对照组小鼠肺组织病理切片

Fig.1 Lung tissue histopathology analysis of mice infected with *Aspergillus fumigatus* and negative control mice

A, B, C, D group represents 3×10^6 , 3×10^7 , 3×10^8 mL⁻¹ and PBS control, respectively. HE: hematoxylin and eosin staining; PAS: Periodic acid Schiff staining; GMS: Gomori-Grocott methenamine silver staining. $\times 400$

人白细胞抗原位点 HLA-A * 0201 的几率最高, 我们选择 HLA-A * 0201 转基因小鼠建立感染动物模型^[15-17]。正是由于这种小鼠的抗原提呈细胞与淋巴细胞之间相互作用时对抗原肽片的限制性与人体相同, 在小鼠体内模拟了人体烟曲霉侵袭性感染和 T 细胞识别和免疫治疗的过程, 对今后开展细胞学免疫治疗的临床研究和应用具有借鉴意义, 也为

我们下一步的烟曲霉抗原多肽特异性 T 淋巴细胞的体内免疫治疗烟曲霉感染研究带来了可能性。

目前用来建立侵袭性曲霉病动物模型常用的免疫抑制剂为糖皮质激素、环磷酰胺、或二者联用^[21-23]。糖皮质激素对所有的免疫细胞均造成不利影响, 并最大限度地降低淋巴细胞的免疫辅助和杀伤功能, 将妨碍我们进一步利用此模型进

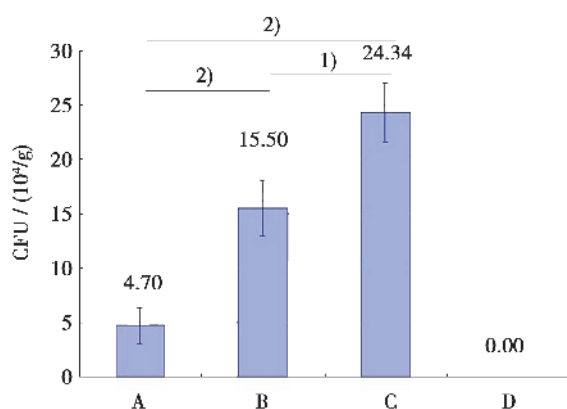


图 2 各组小鼠肺组织真菌负载量

Fig.2 Fungal Burden in lung tissue of different experimental mice groups

Experimental group A: $(4.70 \pm 1.64) \times 10^4/g$, B: $(15.50 \pm 2.51) \times 10^4/g$, C: $(24.34 \pm 2.70) \times 10^4/g$; Control group D: $(0.00 \pm 0.00) \times 10^4/g$. $n_A = n_B = n_C = 30$, $n_D = 10$; 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$

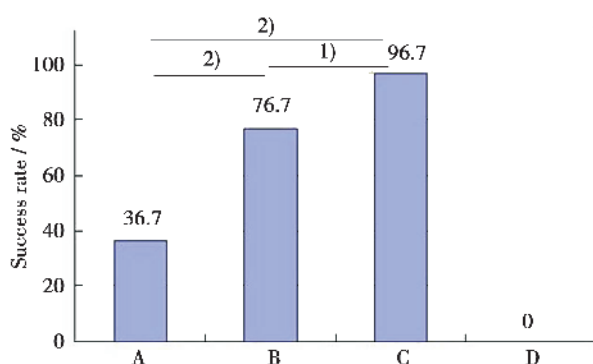


图 3 各组小鼠的 IA 成模率

Fig.3 Success rate of IA in different mice groups

Experimental group A: 36.7%, B: 76.7%, C: 96.7%; Control group D: 0%. $n_A = n_B = n_C = 30$, $n_D = 10$; 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$

行 T 淋巴细胞杀伤烟曲霉的效果,因而未予采取。而环磷酰胺的免疫抑制机制是抑制骨髓造血功能,使白细胞生成减少,加上中性粒细胞本身寿命很短,仅仅数小时,所以可以在短时间内被清零,从而极大程度地抑制了固有免疫功能^[22-23]。而且其半衰期短,仅为 6 h,可以为模型动物快速代谢掉,在发挥了即时的免疫抑制作用的同时,又不至于对后续进入体内的治疗性 T 细胞产生太大的影响。所予以环磷酰胺的剂量和方法的确定,参考了同类研究文献,并经过反复的实践和调整才最终得出,既能够达到足够的免疫抑制强度,又能避免由于小鼠骨髓抑制过度造成的非感染性死亡^[22-23]。

在众多用于构建侵袭性曲霉病的小鼠中,

C57BL/6 被认为是较难成模的,本实验对用于经鼻孔接种小鼠的孢子悬液浓度进行了梯度测试,发现在可行的限度内,随着接种孢子悬液浓度的增加,模型成模效率也随之显著性提高,比如在浓度高达 $3 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$,成模率达到 96.7%,从而保证后续研究中动物实验较好的均一性和客观性。之所以选择这样的浓度梯度,兼顾了实验设计的科学性和可行性,在浓度过高时孢子在吐温盐水中过快沉积会导致吸取入注射器的悬液浓度均匀性难以保证,并且如果剂量过大,不符合实际情况且小鼠迅速死亡,不利于观察治疗效果以及发病机制的研究,而浓度过低时预实验表明感染成功的机会不大(低于 5%),合适的孢子浓度对于成功构建模型具有重要意义。

另外,不同小鼠的品系和特点不同,免疫抑制剂的生产厂商各异,药物的效能和生物利用度的差别很大,所以通过预实验摸索出最佳的药物剂量是很重要的。通过反复试验总结出建立肺部感染模型还要注意以下问题:①乙醚麻醉深度要足够,取出小鼠在其刚恢复深大自主呼吸时种菌,不然会造成实验小鼠的呛咳,菌液不仅不能顺利进入肺组织,而且会感染鼻脑导致小鼠死亡。②孢子悬液要一滴一滴有一定间隔时间滴至鼻孔旁由其被动吸入,切忌短时间快速灌入,以免菌液流入胃内造成消化道的感染。

本研究通过反复的尝试和探索,通过组织病理检查和肺组织匀浆涂血培养证实成功建立了 HLA-A * 0201 的转基因小鼠侵袭性肺曲霉病的动物模型,为日后开展人类 HLA-A * 0201 限制性的烟曲霉抗原多肽特异性 T 细胞免疫治疗 IA 的临床研究和应用奠定了基础,也为实验室研究人员面对一种新的模型动物时,如何摸索出成熟有效的建模方法,提供了一点研究思路。

参考文献:

- [1] Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis [J]. Clin Microbiol Rev, 1999, 12(2): 310-350.
- [2] Kontoyannis DP, Bodey GP. Invasive aspergillosis in 2002: an update [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2002, 21(3): 161-172.
- [3] Denning DW. Invasive aspergillosis [J]. Clin Infect Dis, 1998, 26(4): 781-804.
- [4] Marr KA, Carter RA, Boeckh M, et al. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant

- recipients: changes in epidemiology and risk factors[J]. Blood, 2002, 100(13): 4358-4366.
- [5] Fukuda T, Boeckh M, Carter RA, et al. Risks and outcomes of invasive fungal infections in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants after nonmyeloablative conditioning [J]. Blood, 2003, 102(3): 827-833.
- [6] 孙铮, 赵作涛, 万喆, 等. 烟曲霉感染的宿主防御机制以及相关免疫学研究进展[J]. 中国真菌学杂志, 2010(5): 307-311.
Sun Z, Zhao ZT, Wan Z, et al. The defense mechanisms of host immunity against *Aspergillus fumigatus* and updates [J]. Chin J Mycol, 2010(5): 307-311.
- [7] 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): 257-263.
Zhao ZT, Sun Z, Wan Z, et al. Generation and expansion of *Aspergillus fumigatus* specific T cells in vitro [J]. Chin J Mycol, 2010(5): 257-263.
- [8] 赵作涛, 孙铮, 万喆, 等. 烟曲霉抗原 Asp f16 HLA-A * 0201 限制性的 CD8+ CTL 抗原表位生物信息学预测与实验室鉴定[J]. 中国真菌学杂志, 2011(2): 87-92.
Zhao ZT, Sun Z, Wan Z, et al. Prediction and Identification of new HLA-A * 0201-restricted CD8+ CTL epitopes from *Aspergillus fumigatus* antigen Asp f16 [J]. Chin J Mycol, 2011(2): 87-92.
- [9] Cenci E, Mencacci A, Bacci A, et al. T cell vaccination in mice with invasive pulmonary aspergillosis [J]. J Immunol, 2000, 165(1): 381-388.
- [10] Hebart H, Bollinger C, Fisch P, et al. Analysis of T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* antigens in healthy individuals and patients with hematologic malignancies [J]. Blood, 2002, 100(13): 4521-4528.
- [11] Cenci E, Mencacci A, Fe dC, et al. Cytokine- and T helper-dependent lung mucosal immunity in mice with invasive pulmonary aspergillosis [J]. J Infect Dis, 1998, 178(6): 1750-1760.
- [12] Beck O, Topp MS, Koehl U, et al. Generation of highly purified and functionally active human TH1 cells against *Aspergillus fumigatus* [J]. Blood, 2006, 107(6): 2562-2569.
- [13] Tramsen L, Koehl U, Tonn T, et al. Clinical-scale generation of human anti-*Aspergillus* T cells for adoptive immunotherapy [J]. Bone Marrow Transplant, 2009, 43(1): 13-19.
- [14] 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.
- [15] Ma SL, Tang NL, Tam CW, et al. Association between HLA-A alleles and Alzheimer's disease in a southern Chinese community [J]. Dement Geriatr Cogn Disord, 2008, 26(5): 391-397.
- [16] Hei AL, Li W, Deng ZH, et al. Analysis of high-resolution HLA-A, -B, -Cw, -DRB1, and -DQB1 alleles and haplotypes in 718 Chinese marrow donors based on donor-recipient confirmatory typings [J]. Int J Immunogenet, 2009, 36(5): 275-282.
- [17] Yang L, Wang LJ, Shi GL, et al. Analysis of HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 alleles in Chinese patients with lung cancer [J]. Genet Mol Res, 2010 27, 9(2): 750-755.
- [18] Strowig T, Gurer C, Ploss A, et al. Priming of protective T cell responses against virus-induced tumors in mice with human immune system components [J]. J Exp Med, 2009, 206(6): 1423-1434.
- [19] Ramadan G, Davies B, Kurup VP, et al. Generation of Th1 T cell responses directed to a HLA Class II restricted epitope from the *Aspergillus* f16 allergen [J]. Clin Exp Immunol, 2005, 139(2): 257-267.
- [20] Ramadan G, Davies B, Kurup VP, et al. Generation of cytotoxic T cell responses directed to human leucocyte antigen Class I restricted epitopes from the *Aspergillus* f16 allergen [J]. Clin Exp Immunol, 2005, 140(1): 81-91.
- [21] 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 [J]. 中国抗生素杂志, 2009, 34(4): 3-7.
Yu LL, Xiao YH. Establishment of animal model of invasive pulmonary aspergillosis in immunosuppressed mice [J]. Chin J Antibiotics, 2009, 34(4): 3-7.
- [22] 荣令, 周新. 中性粒细胞减少小鼠的侵袭性肺曲霉病模型的构建 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2008, 8(5): 373-376.
Rong L, Zhou X. Construction of netropenic mouse model of invasive pulmonary aspergillosis [J]. Chin J Infect Chemother, 2008, 8(5): 373-376.
- [23] 罗阔丹, 施昱, 谢小梅, 等. 小鼠侵袭性肺曲霉病模型的建立 [J]. 江苏医药, 2008, 34(1): 66-68.
Luo HD, Shi Y, Xie XM, et al. Establishment of animal model of invasive pulmonary aspergillosis in immunosuppressed mice [J]. Jiangsu Med J, 2008, 34(1): 66-68.