

树突状细胞与马尔尼菲青霉酵母体外相互作用的研究

马 黎 席丽艳* 赵文杰 孙九峰 鲁长明 张军民 李希清 刘红芳

(中山大学附属第二医院皮肤科 广州 510120)

摘 要: 本文探讨了树突状细胞(DCs)在抗马尔尼菲青霉感染免疫中的作用。用细胞因子 rhGM-CSF 和 rhIL-4 诱导人外周血单核细胞分化为树突状细胞, 观察 DCs 的形态, 并用流式细胞仪进行 DCs 的表型测定, ELISA 方法检测培养上清液 IL-12p70 的浓度, 混合淋巴细胞反应检测 DCs 刺激 T 淋巴细胞的增殖能力, 实时荧光定量 PCR 检测趋化因子受体 CCR7、CXCR4 的 mRNA 的表达。倒置显微镜下可见诱导获得的 DCs 细胞形态不规则, 表面伸展大量树突。与马尔尼菲青霉酵母共同培养 24 h 后 DCs 的胞内含有大量的酵母细胞; 细胞表型 CD86、CD83、HLA-DR 和 CD40 的表达明显增高; 刺激 T 淋巴细胞增殖的能力增强; 趋化因子受体 CCR7 和 CXCR4 的 mRNA 表达量增加且能够产生 IL-12p70 但产生的量低于 LPS 刺激组。DCs 能吞噬加热灭活的马尔尼菲青霉酵母, 并趋于成熟, 抗原呈递能力增加, 但是产生 IL-12p70 的量较低, 可能造成宿主抗马尔尼菲青霉酵母的细胞免疫功能的不足。

关键词: 马尔尼菲青霉, 树突状细胞, 抗原呈递细胞

The Interaction Between Dendritic Cells and *Penicillium marneffei* Yeasts

MA Li XI Li-Yan* ZHAO Wen-Jie SUN Jiu-Feng LU Chang-Ming ZHANG Jun-Min
LI Xi-Qing LIU Hong-Fang

(Department of Dermatology, The Second Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120)

Abstract: To assay the influence of dendritic cells (DCs) on the function of anti-infective immunity to *Penicillium marneffei*. DCs were generated from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and pulsed with *Penicillium marneffei* yeasts. DCs morphology was observed by the inverted microscope and cell surface markers of DCs were analyzed by flow cytometry. The concentrations of IL-12p70 were detected by ELISA. Mixed lymphocyte reaction was performed to assay the proliferation of T cells. The mRNA of CCR7 and CXCR4 were detected by the Real-time PCR quantifications. The acquired DCs exhibited irregular appearance and numerous long dendrites under light microscope. DCs and *Penicillium marneffei* yeasts were co-cultured for 24 h, numerous yeasts were observed inside the cells; an enhanced expression of the cell sur-

face markers CD86、CD83、HLA-DR and CD40 were demonstrated; the expression of CCR7 and CXCR4 mRNA were also increased; the improved proliferation of T cells were observed in the mixed lymphocyte reaction. Yeasts-pulsed DCs secreted more IL-12p70 than that of non-pulsed, but less than that of LPS-pulsed DCs. DCs can engulf the *Penicillium marneffei* yeasts. When pulsed with *Penicillium marneffei* yeasts, DCs improved their expression of the co-stimulatory molecules and chemokine receptor CCR7、CXCR4, enhanced their capacity to process antigen. DCs play an important role in host defense against *Penicillium marneffei* infection. But the low level of the IL-12p70 production may lead to deficiency in the cell-mediated immunity against *Penicillium marneffei*.

Keywords: *Penicillium marneffei*, Dendritic cells, Antigen-presenting cells

马尔尼菲青霉病(*Penicilliosis marneffei*, PSM)是由马尔尼菲青霉(*Penicillium marneffei*, PM)引起的一种深部真菌感染性疾病。该病主要发生在东南亚地区如泰国、越南、柬埔寨、老挝、香港和我国广西、广东等地^[1]。近年来随着糖皮质激素、免疫抑制剂的广泛应用,器官移植、造血干细胞移植的广泛开展,特别是 HIV 感染率的不断增高,马尔尼菲青霉病的发病率也日渐增多,而且发病区域有扩大趋势,在我国的其他省份也相继出现马尔尼菲青霉病的报道^[2]。该病发病隐匿,治疗困难,病死率高达 80%以上,即使治疗有效的患者也必需使用有效的抗真菌药物维持治疗较长一段时间^[3]。

虽然该病的危害较大,但由于对该病的认识较晚,马尔尼菲青霉与宿主的相互作用、宿主对其的抗真菌免疫情况以及其致病机制并不完全清楚。有研究表明,马尔尼菲青霉的双相性的转变与其致病性存在着直接关系,尤其是酵母相可能与致病性密切相关^[4,5]。在先前的小鼠模型中发现,细胞免疫以及 Th1 型的细胞因子在宿主抵抗其感染中起重要作用^[6,7]。树突状细胞(Dendritic cells, DCs)是人体内抗原提呈功能最强的、唯一能激活初始 T 淋巴细胞(Native T cells)的专职抗原递呈细胞。其抗原递呈能力是巨噬细胞的 10~100 倍且可以根据不同的抗原产生不同的细胞因子诱导不同的免疫型别^[8]。本实验主要研究人的树突状细胞受马尔尼菲青霉酵母相细胞冲击后其功能的变化,初步探讨树突状细胞在宿主抗马尔尼菲青霉免疫中的作用,为进一步探讨其发病机制以及探索新的治疗手段奠定基础。

1 材料和方法

1.1 酵母细胞的制备

马尔尼菲青霉 SUMS0152 (经形态学及 DNA 测

序鉴定证实),由本真菌室从 1 名 2 岁的血液病患儿血液中分离。将在脑心浸汁培养基(BHI)平皿上转变好的酵母相接种于 BHI 液体培养基中,37 150 r/min 振荡培养 72 h,镜下观察有酵母细胞出现,离心收集。无菌磷酸盐缓冲盐水(Phosphate-buffered saline, PBS)洗涤 3 次后于 65 °C 水浴中加热 1 h,获得灭活的马尔尼菲青霉酵母相细胞,调整酵母细胞浓度为 10^7 /mL 备用。

1.2 人外周血单核细胞来源的树突状细胞的体外诱导培养

无菌采取健康人外周静脉血,肝素抗凝。用 Ficoll-Hypaque 密度梯度法和贴壁法获得单核细胞,加入含有细胞因子重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(Recombinant human granulocytemacrophage colonystimulating factor, rhGM-CSF; Wako, 日本, 1000 U/mL),重组人白介素-4(Recombinant human interleukin 4, rhIL-4; Wako, 日本, 500 U/mL)的 RPMI 1640 完全培养液(Gibco, 美国),置于 5% CO₂, 37 °C 培养箱中培养。第 3 天半量换液 1 次,第 7 天收集悬浮细胞为未成熟的树突状细胞。调整细胞浓度为 2×10^6 /mL 备用。将树突状细胞和马尔尼菲青霉酵母在 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中共同培养,细胞与酵母的比例为 1:5^[9]。实验组:经马尔尼菲青霉酵母冲击 24 h 的树突状细胞(DCs + PM),阴性对照组:未受马尔尼菲青霉酵母冲击的树突状细胞(DCs),阳性对照组:经脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS; Sigma 公司, 100 ng/mL)刺激 24 h 的树突状细胞(DCs+LPS)。

1.3 树突状细胞的表型分析

收集各组的树突状细胞,用 PBS 液调整细胞浓度为 1×10^6 /mL,加入离心管 100 μ L/管,分别加入异硫氰酸荧光素(Fluorescein isothiocyanate, FITC)或

藻红蛋白(Phycoerythrin, PE)荧光标记的单克隆抗体 CD1a、CD86、CD83、CD40、HLA-DR(Pharmingen 公司)。避光 4 标记 30 min, PBS 洗涤 2 次后用流式细胞仪(美国 BD 公司)检测。

1.4 IL-12p70 的检测

用酶联免疫吸附剂测定(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)法检测各组 DC 培养上清液中白介素(Interleukin, IL)-12p70 的含量, 操作严格按照试剂盒(武汉博士德公司)说明书进行。试剂盒最低检测量为 7.5 pg/mL。

1.5 混合淋巴细胞反应

另取健康人外周血, 按前述方法分离外周血单个核细胞, 收集非贴壁细胞为淋巴细胞。用尼龙毛(Bioscience, 美国)法分离同种异体效应 T 淋巴细胞。向刺激细胞(DCs)中加入丝裂霉素(浙江海正公司)30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中孵育 45 min 后取出用含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液洗涤 3 次, 重悬细胞。取 96 孔板, 分别以 1×10^4 、 5×10^3 个刺激细胞加入每孔。将反应细胞按 1×10^5 个加入每孔, 终体积为 200 μL , 每组设 3 个复孔。对照组只加入未致敏的 T 淋巴细胞。将培养板轻轻摇匀, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中孵育 96 h。在结束实验前 4 h, 按照 MTT 试剂盒(Chemicon, 美国)的说明书操作, 最后用酶联免疫检测仪(Labsystems Dragon 公司)于 570 nm 处, 测 OD 值并记录结果。按下式计算刺激指数(Stimulating index, SI), $\text{SI} = \text{实验组 OD 值} / \text{对照组 OD 值}$ 。

1.6 Real-time PCR 法对趋化因子受体 CCR7、CXCR4 的 mRNA 水平的检测

采用 Trizol 法提取细胞总 RNA, 紫外分光光度计评估其完整性并估算其产量。以 1 μg 的总 RNA 为模板合成 cDNA。采用嵌合荧光法实时 RT-PCR(两步法), 对目标基因进行相对定量分析, 操作均采用 TaKaRa 公司提供的试剂盒, 并按其说明书进行。内参采用 β -actin Real Time RT-PCR Primer (TaKaRa, 大连宝生物公司)。趋化因子受体 CCR7 编码基因的正向引物 5'-GCACAGCCTTCCTGTGTGGTT-3', 反向引物 5'-ATCGTCCGTGACCTCATCTTGAC-3', 扩增产物为 133 bp。CXCR4 编码基因的正向引物为 5'-GCCAACGTCAGTGAGGCAGA-3', 反向引物为 5'-GCCAACCATGATGTGCTGAAAC-3', 扩增产物

为 99 bp。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 s; 然后 95 $^{\circ}\text{C}$, 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$, 31 s, 共 40 个循环。检测仪器为 ABI PRISM7000 实时 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司)。

1.7 统计学处理

正态分布计量资料以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 三组间均数比较采用方差分析, 非正态分布计量资料及方差不齐时采用非参数检验。采用 SPSS11.5 统计软件处理数据, 显著性水平为 0.05。

2 结果

2.1 人外周血单核细胞来源树突状细胞的形态

从外周血获得的单核细胞经培养 7 d, 细胞由贴壁状态逐渐转为悬浮, 细胞体积显著增大, 形态不规则, 毛刺多而密。流式细胞仪检测细胞膜表面分子 CD1a 阳性率为 $79.2\% \pm 2.2\%$ ($n=3$)。DCs 和马尔尼菲青霉酵母共培养 6 h 即可以看见显著的吞噬现象, 24 h 后可见树突状细胞内含大量马尔尼菲青霉(见图 1)。

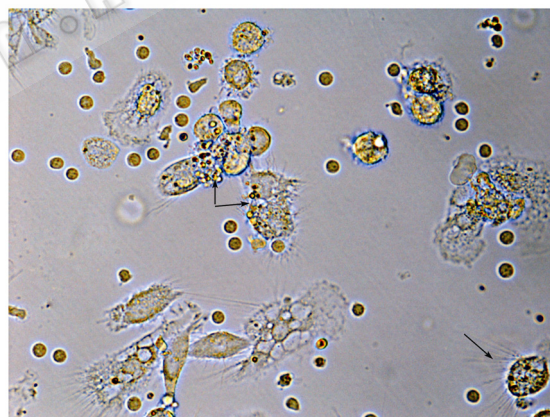


图 1 光镜下树突状细胞和马尔尼菲青霉酵母共培养 6 h 后的形态($\times 400$ 倍)

Fig. 1 Observation of morphology of DCs pulsed by PM under inverted microscope (after co-cultured 6 h, $\times 400$)

2.2 树突状细胞受马尔尼菲青霉酵母冲击后膜表面分子的变化

对 DCs 的表型检测发现, 培养 7 d 后, 标志 DCs 成熟状态的细胞表型 CD86、CD83、HLA-DR 和 CD40 比例较低; 而 DCs 与马尔尼菲青霉酵母共培养 24 h 后, 表型发生了改变, CD86、CD83、HLA-DR 和 CD40 的表达明显增高, 显示了 DCs 的进一步成熟(见图 2)。

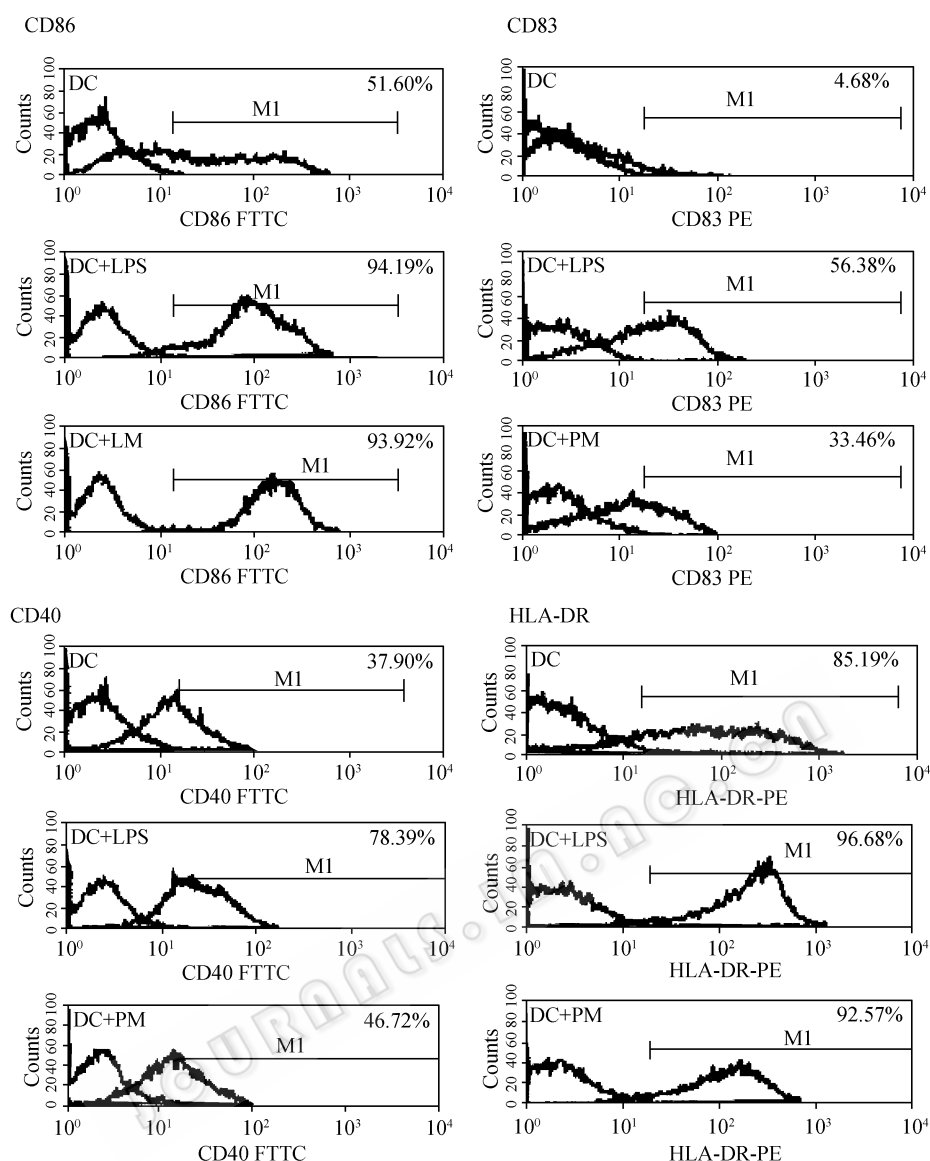


图2 经共培养 24 h 后, 各组树突状细胞的表型表达率(右上角)

Fig. 2 FACS analysis of DCs was performed after 24 h of incubation in the presence of PM or LPS

注: 实验重复 3 遍, 此为其中一次的实验结果

Note: Control DCs were incubated in medium only. Data are representative of three experiments

2.3 树突状细胞受马尔尼菲青霉菌冲击后分泌 IL-12p70 的变化

未受马尔尼菲青霉菌冲击的 DC 培养上清液中未检测到 IL-12p70 的产生, 而接受马尔尼菲青霉菌冲击的 DC 培养上清液中可以检测到 IL-12p70 的产生量为 $30.20 \text{ pg/mL} \pm 14.65 \text{ pg/mL}$, 但较 LPS 刺激组 $116.32 \text{ pg/mL} \pm 25.80 \text{ pg/mL}$ 低, 三组间在统计学上有显著性差异 ($n=8, P<0.05$)。

2.4 树突状细胞受马尔尼菲青霉菌冲击后刺激同种异体淋巴细胞增殖的能力

成熟的 DCs 高表达共刺激分子, 有较强的刺

激 T 淋巴细胞活化增殖的能力。马尔尼菲青霉菌冲击的树突状细胞和 LPS 刺激的树突状细胞刺激同种异体淋巴细胞增殖的能力较未受冲击的树突状细胞增强 ($n=6, P<0.05$), 马尔尼菲青霉菌相细胞冲击的树突状细胞和 LPS 冲击的树突状细胞在刺激同种异体淋巴细胞增殖的能力上在统计学上无显著性差异 ($n=6, P>0.05$) (见图 3)。

2.5 树突状细胞受马尔尼菲青霉菌冲击后趋化因子的表达情况

经马尔尼菲青霉菌冲击后的树突状细胞趋化因子受体 CCR7 的 mRNA 的表达量较未受冲击的树突状

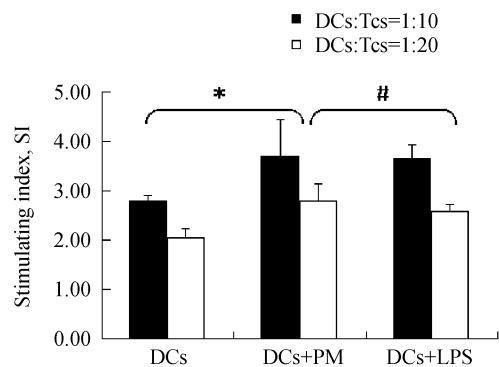


图 3 树突状细胞刺激同种异体淋巴细胞增殖的能力
Fig. 3 Stimulating effect of DCs on proliferation of T cell
(* $P<0.05$; # $P>0.05$)

细胞显著增高,其增高程度较 LPS 刺激组高,三组间在统计学上有显著性差异($n=5$, $P<0.01$)。而趋化因子受体 CXCR4 仅在马尔尼菲青霉刺激组增高($n=5$, $P<0.05$),在 LPS 刺激组未见其 mRNA 表达量增加(见表 1)。

表 1 各组趋化因子受体 CCR7 和 CXCR4 的 mRNA 的表达量		
Table 1 The expression of the CCR7 and CXCR4 mRNA		
	CCR7	CXCR4
DCs	1.00±0.00	1.00±0.00
DCs+LPS	4.00±1.86	0.76±0.37
DCs+PM	8.24±3.54	2.19±0.87

注:通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法分析相对基因表达差异
Note: Application of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method

3 讨论

本文应用细胞因子 GM-CSF 和 IL-4 使血液中单核细胞分化成树突状细胞。在正常情况下,绝大多数体内 DCs 处于非成熟状态,主要分布于与外来抗原易接触的部位,表达低水平的辅助刺激因子和粘附分子,具极强的抗原内吞和加工处理能力。在捕捉抗原后,其抗原捕获能力下降,主要组织相容复合物分子及辅助刺激因子、粘附分子的表达上调,同时改变其趋化因子受体表达,归巢至 T 细胞区,为 T 细胞提供第一信号和第二信号,并且能分泌细胞因子如 IL-12, 决定 Th 分化方向,这也是决定机体抗感染免疫应答效果的主要影响因素^[10]。在病原微生物与宿主的相互作用中,病原体会利用各

种策略在不同层次上干扰宿主对其的免疫。树突状细胞是体内功能最强并且是唯一能激活初始 T 淋巴细胞的抗原提呈细胞,被认为是联系固有免疫和适应性免疫的桥梁。病原微生物常常利用阻止树突状细胞的成熟、抗原提呈、迁移,阻止其诱导 Th1 型细胞免疫以及干扰其凋亡从而干扰宿主免疫,使其更容易在宿主体内生存及播散^[11]。

本实验结果显示: 体外培养的人外周血单核细胞来源的树突状细胞能吞噬加热灭活的马尔尼菲青霉酵母细胞。DCs 接受马尔尼菲青霉冲击后,逐渐成熟,其表型和形态改变,抗原呈递能力增加,刺激 T 淋巴细胞分化增殖的能力增强。经马尔尼菲青霉酵母冲击的树突状细胞能够分泌 IL-12p70,但其量小于 LPS 刺激组。DCs 接受马尔尼菲青霉冲击后,其趋化因子受体 CCR7、CXCR4 的表达增强,有利于树突状细胞向次级淋巴组织迁移。

我们在研究中观察到树突状细胞能够有效地吞噬灭活的马尔尼菲青霉酵母,并在该过程中能够上调膜表面分子 CD86、CD83、HLA-DR 和 CD40,同时获得了刺激 T 淋巴细胞增殖的能力。这与之前在树突状细胞与白念珠菌酵母、组织胞浆菌酵母、曲霉孢子等的相互作用研究中的结果一致^[12-15]。经马尔尼菲青霉酵母冲击的树突状细胞在功能成熟的同时能够高表达趋化因子受体 CCR7、CXCR4,能够与淋巴管上皮细胞高表达的次淋巴组织趋化因子 SLC/CCL21 结合,成熟 DCs 进入淋巴管,在 ELC/CCL19 的作用下定位于 T 淋巴细胞区,有利于树突状细胞和 T 淋巴细胞充分接触发挥免疫效应^[16]。然而我们仅在 PM 刺激组发现了趋化因子受体 CXCR4 的表达增高,这与之前在白念珠菌^[9]及结核杆菌^[17]的类似研究中的结果一致。目前 CXCR4 已被证实为 HIV 病毒的共受体^[18],也就是说 HIV 病毒也可以通过该受体进入免疫细胞,在细胞内增殖并随免疫细胞的迁移而在体内播散。由于马尔尼菲青霉病好发于 HIV 感染患者中,因而推测马尔尼菲青霉感染有可能会加快 HIV 感染者的艾滋病进程。但这个推测还有待进一步研究的证实。

以 IL-12、 γ -IFN、 α -TNF 为特征的 Th1 型的细胞免疫应答在宿主抵抗胞内病原体的过程中起着重要的作用。相反,以 IL-4、IL-5 和 IL-13 为特征的 TH2 型细胞免疫应答与真菌病的恶化和感染的严重

性相关^[19]。用亚致死量的马尔尼菲青霉的分生孢子感染小鼠,可以诱导产生高水平的 IL-12、 γ -IFN、 α -TNF 等 TH1 型细胞因子。而巨噬细胞和单核细胞只有在 γ -IFN、 α -TNF 等细胞因子的存在下才能够有效的吞噬和杀伤马尔尼菲青霉酵母。如果这些细胞因子缺乏,单核吞噬细胞杀伤马尔尼菲青霉酵母的能力则显著下降^[6]。我们观察到树突状细胞受马尔尼菲青霉酵母细胞冲击后,能够分泌 IL-12p70,但其分泌水平低于 LPS 刺激组。IL-12 是促进 Th 细胞向 Th1 方向转化的关键性细胞因子,同时在促进巨噬细胞、T 淋巴细胞、NK 细胞的增殖以及增强 NK 细胞的细胞毒活性,促进 LAK 细胞和 CTL 的形成过程中也具有重要作用^[20],因此受马尔尼菲青霉酵母冲击的树突状细胞虽然可以诱导 CD4⁺ T 细胞向细胞免疫方向转换,但其可能有能力上的不足。

综上所述,树突状细胞能够有效吞噬马尔尼菲青霉酵母,同时逐渐成熟并具备了向次级淋巴结趋化的能力,抗原呈递功能增强。能够产生前炎症因子 IL-12p70,促进 CD4⁺ T 细胞向具有抗真菌保护性免疫的 Th1 方向极化,但其产生的量较低,可能造成细胞免疫的功能不足。这可能是该菌容易在宿主体内生存及播散的原因之一。

参 考 文 献

- [1] Vanittanakom N, Cooper CR Jr, Fisher MC, *et al.* *Penicillium marneffeii* infection and recent advances in the epidemiology and molecular biology aspects. *Clin Microbiol Rev*, 2006, **19**(1): 95–110.
- [2] Liyan X, Changming L, Xianyi Z, *et al.* Fifteen cases of penicilliosis in Guangdong, China. *Mycopathologia*, 2004, **158**(2): 151–155.
- [3] Supparatpinyo K, Nelson KE, Merz WG, *et al.* Response to antifungal therapy by human immunodeficiency virus-infected patients with disseminated *Penicillium marneffeii* infections and in vitro susceptibilities of isolates from clinical specimens. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993, **37**(11): 2407–2411.
- [4] Xi L, Xu X, Liu W, *et al.* Differentially expressed proteins of pathogenic *Penicillium marneffeii* in yeast and mycelial phases. *J Med Microbiol*, 2007, **56**(Pt 3): 298–304.
- [5] Liu H, Xi L, Zhang J, *et al.* Identifying differentially expressed genes in the dimorphic fungus *Penicillium marneffeii* by suppression subtractive hybridization. *FEMS Microbiol Lett*, 2007, **270**(1): 97–103.
- [6] Sisto F, Miluzio A, Leopardi O, *et al.* Differential cyto-

- kine pattern in the spleens and livers of BALB/c mice infected with *Penicillium marneffeii*: protective role of gamma interferon. *Infect Immun*, 2003, **71**(1): 465–473.
- [7] Rongrungruang Y, Levitz SM. Interactions of *Penicillium marneffeii* with human leukocytes *in vitro*. *Infect Immun*, 1999, **67**(9): 4732–4736.
- [8] Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol*, 1991, **9**: 271–296.
- [9] Romagnoli G, Nisini R, Chiani P, *et al.* The interaction of human dendritic cells with yeast and germ-tube forms of *Candida albicans* leads to efficient fungal processing, dendritic cell maturation, and acquisition of a Th1 response-promoting function. *J Leukoc Biol*, 2004, **75**(1): 117–126.
- [10] Moll H. Dendritic cells and host resistance to infection. *Cell Microbiol*, 2003, **5**(8): 493–500.
- [11] Buentke E, Scheynius A. Dendritic cells and fungi. *APMIS*, 2003, **111**(7-8): 789–96.
- [12] Newman SL, Holly A. *Candida albicans* is phagocytosed, killed, and processed for antigen presentation by human dendritic cells. *Infect Immun*, 2001, **69**(11): 6813–6822.
- [13] Gildea LA, Morris RE, Newman SL. *Histoplasma capsulatum* yeasts are phagocytosed via very late antigen-5, killed, and processed for antigen presentation by human dendritic cells. *J Immunol*, 2001, **166**(2): 1049–1056.
- [14] Bozza S, Gaziano R, Spreca A, *et al.* Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. *J Immunol*, 2002, **168**(3): 1362–1371.
- [15] Gafa V, Lande R, Gagliardi MC, *et al.* Human dendritic cells following *Aspergillus fumigatus* infection express the CCR7 receptor and a differential pattern of interleukin-12 (IL-12), IL-23, and IL-27 cytokines, which lead to a Th1 response. *Infect Immun*, 2006, **74**(3): 1480–1489.
- [16] Sanchez-Sanchez N, Riol-Blanco L, Rodriguez-Fernandez JL. The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells. *J Immunol*, 2006, **176**(9): 5153–5159.
- [17] Rosas-Taraco AG, Arce-Mendoza AY. Mycobacterium tuberculosis upregulates coreceptors CCR5 and CXCR4 while HIV modulates CD14 favoring concurrent infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2006, **22**: 45–51.
- [18] Ansari AW, Heiken H, Moenkemeyer M, *et al.* Dichotomous effects of C-C chemokines in HIV-1 pathogenesis. *Immunol Lett*, 2007, **110**: 1–5.
- [19] Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today*, 1997, **18**(6): 263–266.
- [20] Brieland JK, Jackson C, Menzel F, *et al.* Cytokine networking in lungs of immunocompetent mice in response to inhaled *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun*, 2001, **69**(3): 1554–1560.