

网络出版时间: 2020-12-28 10:41 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20201224.1106.001.html>

◇ 基础医学研究 ◇

中国优势基因型弓形虫 Wh3 株诱导人单核巨噬细胞 THP-1 偏移极化的研究

张芳芳^{1,2}, 王 聪³, 罗庆礼^{1,4}, 沈继龙¹

摘要 目的 研究弓形虫 Wh3 株感染巨噬细胞后, 诱导巨噬细胞偏移分化情况。方法 获取弓形虫 Wh3 株、RH 株和 ME49 株, 感染人巨噬细胞 THP-1, 感染后 6、24 h 分别收集培养上清液和巨噬细胞。ELISA 检测培养上清液中巨噬细胞分泌的白细胞介素(IL)-6、IL-10、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、TGF- β 等细胞因子浓度。qRT-PCR 分析 M1/M2 相关基因 iNOS、Arginase-1 和 TNF- α 、IL-12、TGF- β 、IL-10 等细胞因子 mRNA 转录水平。Western blot 分析巨噬细胞 iNOS 和 Arginase-1 蛋白表达水平。结果 ELISA 检测培养上清液中细胞因子含量, 发现弓形虫 ME49 株感染巨噬细胞 6、24 h 后, IL-6 和 TNF- α 含量最高 ($P < 0.01$); 弓形虫 RH 株感染后 IL-10 和 TGF- β 含量最高 ($P < 0.01$); 弓形虫 Wh3 株感染后培养上清液细胞因子含量介于 RH 株和 ME49 株之间 ($P < 0.01$)。感染 ME49 株弓形虫的巨噬细胞 24 h 后 iNOS 转录水平及感染 6、24 h 后 TNF- α 和 IL-12 转录水平均升高 ($P < 0.001$); RH 株感染 6、24 h 后巨噬细胞的 IL-10 和 Arginase-1 的转录水平及感染 6 h 后 TGF- β 转录水平升高 ($P < 0.05$); 同样发现弓形虫 Wh3 株介于 RH 株和 ME49 株之间。Western blot 测定 iNOS、Arginase-1 也得到相似的结果。在感染 Wh3 株和 ME49 株弓形虫 24 h 后, iNOS 蛋白表达增高 ($P < 0.0001$), 而在感染 RH 株 24 h 后, Arginase-1 表达量升高 ($P < 0.001$)。结论 弓形虫 Wh3 株感染后, 巨噬细胞表现出介于 M1 和 M2 之间的极化方向, 且更接近于 M2 极化

方向。

关键词 巨噬细胞极化; 经典激活途径; 旁路激活途径; 弓形虫

中图分类号 R 382.5; R 392.12

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)02-0169-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.02.001

刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*, *T. gondii*) 是一种全球广泛传播的机会致病性原虫, 专性寄生在有核细胞内, 引起人畜共患寄生虫病。世界各地分离的弓形虫株基因型具有丰富的遗传多态性和地域差异^[1], 流行于欧洲和北美的主要有 I 型 (ToxoDB#10)、II 型 (ToxoDB#1) 和 III 型 (ToxoDB#2) 三种基因型, 均包含多个虫株; 流行于中国的弓形虫株优势基因型为 Chinese 1 型 (ToxoDB#9), 其中的 TgCtWh3 株 (以下简称 Wh3 株), 毒力介于强毒的 RH 株 (属于 I 型) 和弱毒的 ME49 株 (属于 II 型) 之间, 且同时具有 I 型虫株的棒状体蛋白激酶 ROP16_I 和 II 型虫株的致密颗粒蛋白 GRA15_{II}^[2-3]。ROP16_I 驱动巨噬细胞极化为旁路途径活化的巨噬细胞 (M2); 而 GRA15_{II} 诱导巨噬细胞极化为经典途径活化的巨噬细胞 (M1)。虽然 Wh3 株同时具有 ROP16_I 和 GRA15_{II}, 但其感染人巨噬细胞后, 诱导其分化偏移 M1 或 M2, 至今鲜有报道。该文采用 Wh3 株、RH 株和 ME49 株分别感染人单核巨噬细胞 THP-1, 了解 Wh3 株感染后巨噬细胞的分化偏移情况, 为深入探讨中国优势基因型弓形虫株致病性和免疫性, 具有重要的理论和实际意义。

1 材料与方 法

1.1 弓形虫株和细胞株 弓形虫 Wh3 株、RH 株由病原生物学安徽省重点实验室液氮保种, 复苏、腹腔接种 5~6 周龄昆明小鼠传代; ME49 株由含包囊的小鼠脑组织, 无菌匀浆经口灌胃保种、传代。人单核巨噬细胞 THP-1, 购自中国科学院上海细胞库, 病原生物学安徽省重点实验室液氮保种、传代。

1.2 主要试剂 FBS (加拿大 Wistent 公司);

2020-09-15 接收

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目 (编号: 2010CB530001);
国家自然科学基金 (编号: 81471983)作者单位: ¹ 安徽医科大学基础医学院病原生物学教研室, 病原生物学安徽省重点实验室, 人畜共患病安徽高校省级重点实验室, 合肥 230032² 安徽医科大学附属妇幼保健院 (安徽省妇幼保健院), 合肥 230001³ 合肥市第二人民医院检验科, 合肥 230011⁴ 安徽医科大学基础医学院病原与免疫学实验中心, 合肥 230032

作者简介: 张芳芳, 女, 硕士研究生;

沈继龙, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: shen-jilong53@126.com;

罗庆礼, 男, 助理研究员, 责任作者, E-mail: luoqingli@ahmu.edu.cn

DMEM 培养基、BCA 试剂盒、RIPA 细胞裂解液(上海碧云天公司); PMA(美国 Sigma 公司); TRIzol(美国 Invitrogen 公司); 硝酸纤维素膜(美国 Billerica 公司); 兔抗人 Arginase-1、兔抗人 iNOS 抗体和山羊抗兔 IgG H&L(HRP)(美国 Abcam 公司)、内参小鼠抗人 β -actin 和山羊抗小鼠 IgG 酶标记抗体(武汉 Proteintech 公司); 引物合成(上海生工生物公司); 白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-10, 肿瘤坏死因子(tumor necrosis factors, TNF)- α 和 TGF- β ELISA 检测试剂盒(武汉华美公司)。

1.3 弓形虫 Wh3 株和 RH 株的获取 分别取出液氮中冻存保种的弓形虫 Wh3 株速殖子和 RH 株速殖子, 迅速置于 37 °C 水浴中, 缓慢摇动至融化。冻存管内加入等量无菌生理盐水以稀释乙二醇的毒性, 轻轻吹打混匀, 调整浓度为 1×10^6 个/ml 速殖子。

1.4 弓形虫 ME49 株的获取 麻醉处死用于保种的感染 ME49 小鼠, 制备脑组织匀浆, 显微镜下计数包囊数, 调整包囊浓度, 部分予小鼠灌胃继续保种; 取约 200 个包囊, 进行昆明小鼠腹腔接种, 7 ~ 10 d 后小鼠出现活动减少、弓背、竖毛和明显腹水时, 无菌收集小鼠腹腔液, 用 27 G 针头注射器反复抽吸裂解细胞, 释放细胞内的速殖子; 腹腔液 1 350 r/min 离心 10 min, 收集弓形虫, 加适量 PBS 洗 1 次, 即可获得 ME49 速殖子; 用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基调整速殖子浓度备用。

1.5 THP-1 细胞系培养与刺激 THP-1 细胞在含 10% FBS RPMI 1640 的完全培养基中, 37 °C、5% CO₂ 培养, 细胞呈悬浮状态生长。实验前给予 200 ng/ml PMA 刺激作用 24 h, 诱导 THP-1 分化成人巨噬细胞, 并促使细胞贴壁生长^[4]; 用无菌 PBS 轻轻洗涤 3 次, 更换不含 PMA 的新鲜培养基培养过夜, 用于后续分别感染不同虫株的弓形虫。

1.6 RH-M ϕ 、Wh3-M ϕ 和 ME49-M ϕ 的获取 设 6 h 和 24 h 两大组: 每组均包含 Control 组, 即人 THP-1 对照组; RH 组, 即用 RH 株速殖子感染人 THP-1 组(RH-M ϕ); Wh3 组, 即用 Wh3 株速殖子感染 THP-1 组(Wh3-M ϕ); ME49 组, 即用 ME49 株速殖子感染人 THP-1 组(ME49-M ϕ)。上述 THP-1 细胞置 12 孔板中培养, PMA 刺激分化并贴壁生长后, 加入不同虫株的弓形虫。弓形虫与巨噬细胞比例为 2 : 1, 6 h 组细胞培养至 6 h 后, 24 h 组细胞培养至 24 h 后, 分别离心, 收集细胞培养上清液, -80 °C 冷冻保存, 备用; 收集沉淀, 分别为未感染 THP-1 细胞、RH-M ϕ 细胞、Wh3-M ϕ 细胞和 ME49-M ϕ 细胞,

加入 PBS 重悬细胞进行清洗, 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 沉淀细胞置 -80 °C 冷冻保存, 备用。

1.7 培养上清液细胞因子检测 采用 ELISA 法分别检测 6 h 和 24 h 收集的 THP-1 细胞、RH-M ϕ 细胞、Wh3-M ϕ 细胞和 ME49-M ϕ 细胞培养上清液中 IL-6、IL-10、TNF- α 和 TGF- β 浓度。

1.8 荧光定量 PCR 分析 M1/M2 相关基因转录水平 上述培养的每组巨噬细胞收集后, 离心弃去培养基, 加入 PBS 重悬细胞进行洗涤, 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min, 吸除上清液, 将所得巨噬细胞置冰上, 每管加入 TRIzol 1 ml, 反复吹打裂解细胞, 提取细胞总 RNA。按照试剂盒操作说明, 将 RNA 反转录制备出 cDNA, -20 °C 保存备用。以 β -actin 为内参进行荧光定量 PCR 反应, 条件如下: 预变性 94 °C, 5 min; 变性 94 °C, 1 min; 退火 56 °C, 1 min; 延伸 72 °C, 1 min; 4 °C 保存。扩增引物见表 1。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

基因名称	引物序列	扩增产物长度(bp)
Arginase-1	F: 5'-GTGGAACCTTGCATGCACAAC-3'	73
	R: 5'-CCTGGCAGATCGGGAATCTTT-3'	
IL-10	F: 5'-ACGGCGCTGTCATCGATT-3'	67
	R: 5'-GGCATTCTCACCTGCTCCA-3'	
IL-12	F: 5'-GCACATTCCTACTTCTCCG-3'	87
	R: 5'-CTTGTCCGTGAAGACTCTAT-3'	
iNOS	F: 5'-GTTCTCAAGGCACAGGTCTC-3'	127
	R: 5'-GCAGGTCACCTATGTCACTTATC-3'	
TGF- β	F: 5'-GACACCAACTATTGCTTCAG-3'	156
	R: 5'-CAGGCTCCAAATGTAGGG-3'	
TNF- α	F: 5'-GATCAATCGGCCGACTATC-3'	73
	R: 5'-TCCTCACAGGGAATGATCC-3'	
β -actin	F: 5'-CTCTCCAGCCTTCCTCTCT-3'	180
	R: 5'-CAGGCCAGTATCTCTCTCT-3'	

1.9 Western blot 测定 iNOS、Arginase-1 表达水平 按照说明书, 将上述收集冻存的各组细胞, 按照每孔 150 μ l 的体积加入细胞裂解液, 反复吹打后冰浴 10 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min, 所得上清液即细胞总蛋白溶液。BCA 法测各组蛋白浓度, 根据蛋白浓度进行上加样, 电泳、转膜、封闭, 加入 iNOS(1 : 1 000)、Arginase-1(1 : 1 000) 和 β -actin(1 : 5 000) 抗体, 4 °C 低速振荡孵育过夜后, 室温下 TBS-T 洗涤 3 次, 每次 10 min, 随即加入相应二抗(1 : 1 500), 室温孵育 1 h, 再次 TBS-T 洗涤。加入化学发光试剂后, 拍照分析各条带灰度值。

1.10 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。所有试验全部独立重复 3 次, 各组之间的培

养上清液细胞因子含量、巨噬细胞相关基因转录水平和蛋白表达水平,以 $\bar{x} \pm s$ 表示其平均含量。组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 培养上清液巨噬细胞 M1 极化细胞因子表达情况

上述各组细胞感染 3 株弓形虫速殖子培养 6、24 h 后,培养上清液经 ELISA 检测,结果见图 1。在培养 6 h 后,IL-6 表达量 3 虫株感染组均高于 Control 组 (5.62 ± 1.16) pg/ml,四组间差异有统计学意义 ($F = 701.7, P < 0.0001$),且三感染组中 ME49 组表达量 (103.95 ± 3.07) pg/ml 最高,Wh3 组 (35.29 ± 4.15) pg/ml 居中,RH 组 (20.74 ± 2.06) pg/ml 最少,组间差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); TNF- α 表达量 ME49 组 (15.81 ± 0.71) pg/ml 高于其他各组,四组间差异有统计学意义 ($F = 10.45, P < 0.005$),其他组之间差异无统计学意义;在培养 24 h 后,IL-6 表达量 ME49 组 (262.59 ± 41.44) pg/ml 和 Wh3 组 (119.56 ± 16.48) pg/ml 均高于 RH 组 (28.85 ± 11.67) pg/ml 和 Control 组 (11.24 ± 2.09) pg/ml,四组间差异有统计学意义 ($F = 61.95, P < 0.0001$),且 ME49 组表达量高于 Wh3 组 ($P < 0.01$),RH 组和 Control 组间差异无统计学意义; TNF- α 表达量 ME49 组 (17.34 ± 1.13) pg/ml 和 Wh3 组 (13.86 ± 0.11) pg/ml 均高于 RH 组 (12.07 ± 0.46) pg/ml 和 Control 组 (10.78 ± 0.65) pg/ml,四组间差异有统计学意义 ($F = 50.30, P < 0.0001$),且 ME49 组表达量高于 Wh3 组 ($P < 0.001$),RH 组和 Control 组间差异无统计学意义。

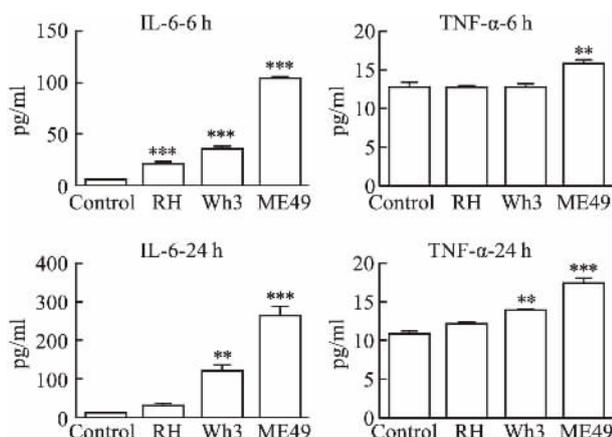


图1 培养上清液巨噬细胞 M1 极化细胞因子 ELISA 检测结果与 Control 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2.2 培养上清液巨噬细胞 M2 极化细胞因子表达情况

图 2 显示在培养 6 h 后,IL-10 表达量在三个感染组中均高于 Control 组 (4.84 ± 4.12) pg/ml,四组间差异有统计学意义 ($F = 18.49, P < 0.001$),且三组中 RH 组表达量 (21.70 ± 3.43) pg/ml 最高,Wh3 组 (14.53 ± 1.56) pg/ml 居中,ME49 组 (5.28 ± 2.95) pg/ml 最低,除了 ME49 组与 Control 组比较差异无统计学意义外,其他组间差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); TGF- β 表达量 RH 组 (1216.67 ± 546.73) pg/ml 高于其他各组 ($F = 4.811, P < 0.01$),其他组之间差异无统计学意义。在培养 24 h 后,IL-10 表达量同样是 RH 组 (24.43 ± 2.41) pg/ml 最高,Wh3 组 (18.64 ± 1.71) pg/ml 居中,ME49 组 (9.80 ± 3.66) pg/ml 最低 ($F = 22.19, P < 0.001$),组间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),三组中 ME49 组与 Control 组差异无统计学意义; TGF- β 表达量 RH 组 (2136.90 ± 707.94) pg/ml 和 Wh3 组 (1856.63 ± 602.36) pg/ml 高于其他两组,四组间差异有统计学意义 ($F = 8.139, P < 0.001$),而 RH 组和 Wh3 组之间以及 ME49 组和 Control 组之间差异无统计学意义。

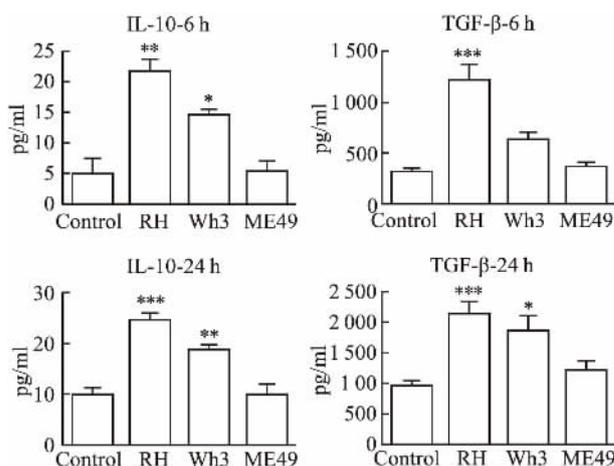


图2 培养上清液巨噬细胞 M2 极化细胞因子 ELISA 检测结果与 Control 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2.3 巨噬细胞 M1 相关基因转录水平

上述各组细胞培养 6、24 h 后, M1 相关基因 mRNA 转录水平见图 3。培养 6 h 后, iNOS 的 mRNA 转录水平 RH 组 (2.29 ± 0.17) 均高于其余三组,四组间差异有统计学意义 ($F = 55.20, P < 0.0001$), Wh3 组 (1.25 ± 0.08)、ME49 组 (1.30 ± 0.08) 和 Control 组 (1.03 ± 0.17) 之间差异无统计学意义; 培养 24 h 后, Wh3 组 (1.92 ± 0.13) 和 ME49 组 (2.27 ± 0.44) 均高于 RH

组(1.35 ± 0.15) 和 Control 组(1.05 ± 0.12), 四组间差异有统计学意义($F = 14.68, P < 0.01$), 且 Wh3 组和 ME49 组差异无统计学意义, RH 组和 Control 组差异也无统计学意义。培养 6 h 后, TNF- α 和 IL-12 的 mRNA 转录水平 ME49 组 [11.95 ± 1.419)、(5.73 ± 0.39)] 均高于其余三组, 四组间差异有统计学意义($F = 183.5, P < 0.0001$; $F = 234.7, P < 0.0001$), RH 组、Wh3 组和 Control 组之间差异无统计学意义; 培养 24 h 后, TNF- α 在三个感染组均高于 Control 组, 四组间差异有统计学意义($F = 7.484, P < 0.05$), 且三个感染组组间差异无统计学意义; IL-12 的 mRNA 转录水平在 Wh3 组(4.30 ± 0.56) 和 ME49 组(17.28 ± 1.06) 均高于 RH 组(1.81 ± 0.71) 和 Control 组(1.04 ± 0.13), 四组间差异有统计学意义($F = 348.9, P < 0.0001$), 且 ME49 组高于 Wh3 组($P < 0.0001$), RH 组和 Control 组差异无统计学意义。

2.4 巨噬细胞 M2 相关基因转录水平 图 4 所示各组细胞培养 6、24 h 后, M2 相关基因 mRNA 转录水平。培养 6、24 h 后, Arginase-1 的 mRNA 转录水平 RH 组 [(2.14 ± 0.06)、(2.50 ± 0.38)] 均高于其余三组, 差异有统计学意义($F = 55.20, P < 0.0001$; $F = 18.83, P < 0.001$), Wh3 组、ME49 组和 Control 组之间差异无统计学意义。在培养 6、24 h 后, 三个感染组 TGF- β 的 mRNA 转录水平均高于 Control 组, 差异有统计学意义($F = 34.13, P < 0.0001$; $F = 8.792, P < 0.01$), 且培养 6 h 后 RH 组(2.60 ± 0.25) 高于 Wh3 组(2.18 ± 0.24) 和 ME49 组(1.84 ± 0.08), 差异有统计学意义($P < 0.05$),

Wh3 组和 ME49 组之间差异无统计学意义; 而培养 24 h 后三个感染组间差异均无统计学意义。IL-10 的 mRNA 转录水平在培养 6 h 后, RH 组(4.37 ± 0.46) 和 Wh3 组(2.35 ± 0.50) 均高于 Control 组(1.01 ± 0.16), ME49 组(0.31 ± 0.20) 低于 Control 组, 各组间差异均有统计学意义($F = 72.14, P < 0.001$); 在培养 24 h 后三个感染组均高于 Control 组($F = 57.92, P < 0.0001$), 且三组中 RH 组(3.37 ± 0.07) 最高, Wh3 组(2.38 ± 0.33) 次之, ME49 组(1.60 ± 0.27) 最低, 各组间差异有统计学意义($P < 0.001$)。

2.5 巨噬细胞 iNOS 和 Arginase-1 表达水平 上述各组细胞培养 6、24 h 后, Western blot 检测 iNOS 和 Arginase-1 蛋白表达结果见图 5。培养 6 h 后, 各组均未检测到 iNOS 蛋白表达; 在培养 24 h 后, Control 组和 RH 组同样未检测到 iNOS 蛋白表达, Wh3 组(0.351 ± 0.057) 和 ME49 组(0.427 ± 0.014) 可见 iNOS 蛋白表达, 四组间差异有统计学意义($F = 127.8, P < 0.0001$), 而有 iNOS 表达的 Wh3 组和 ME49 组间差异无统计学意义。Arginase-1 在培养 6 h 后, RH 组(0.681 ± 0.041) 和 Control 组(0.721 ± 0.039) 表达量差异无统计学意义, 而 Wh3 组(0.568 ± 0.047) 和 ME49 组(0.333 ± 0.024) 表达量降低, 差异有统计学意义($F = 61.53, P < 0.0001$), 且 ME49 组更低($P < 0.001$); 24 h 后, RH 组表达量(0.595 ± 0.015) 较 Control 组(0.435 ± 0.047) 升高($P < 0.001$), ME49 组(0.186 ± 0.012) 较 Control 组降低($P < 0.0001$), Wh3 组(0.412 ± 0.023) 与 Control 组差异无统计学意义, 各组间差异有统计学意义。

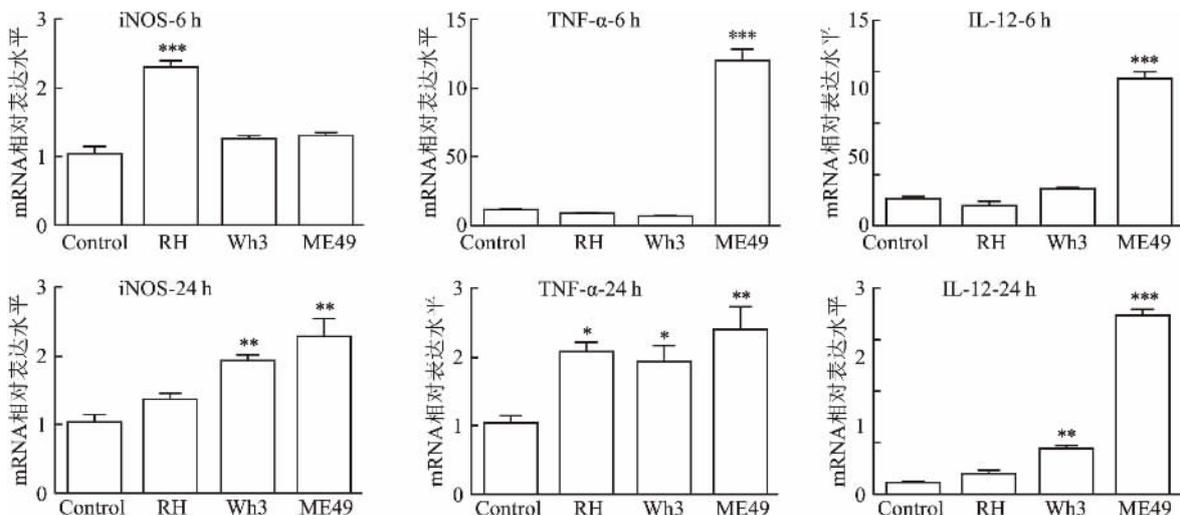


图 3 巨噬细胞 M1 相关基因转录水平

与 Control 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

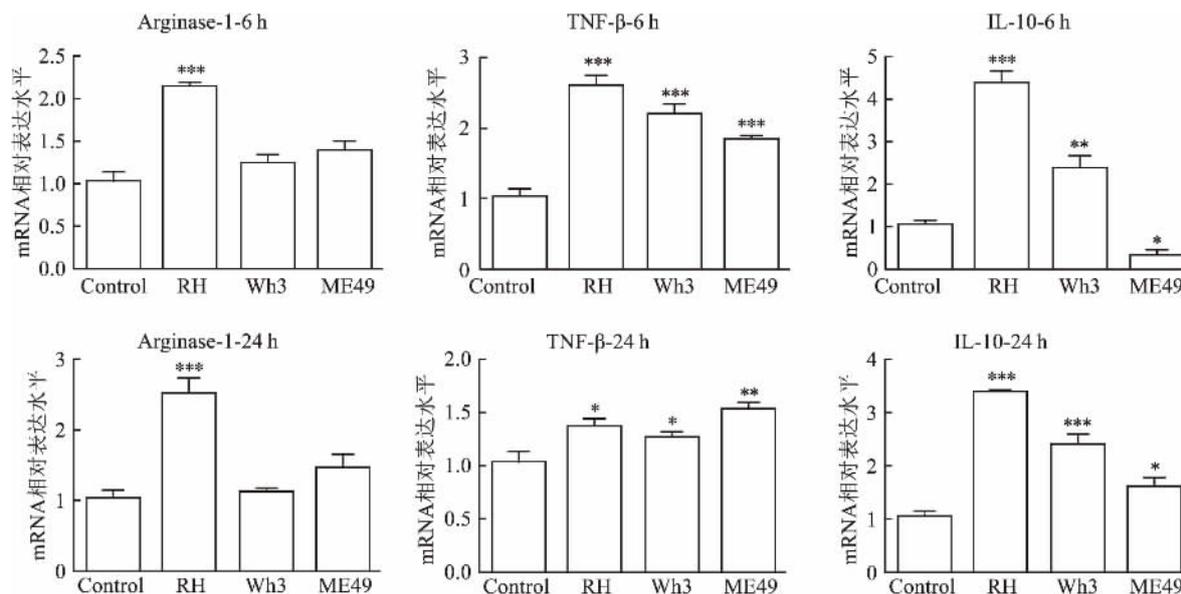


图4 巨噬细胞 M2 相关基因转录水平

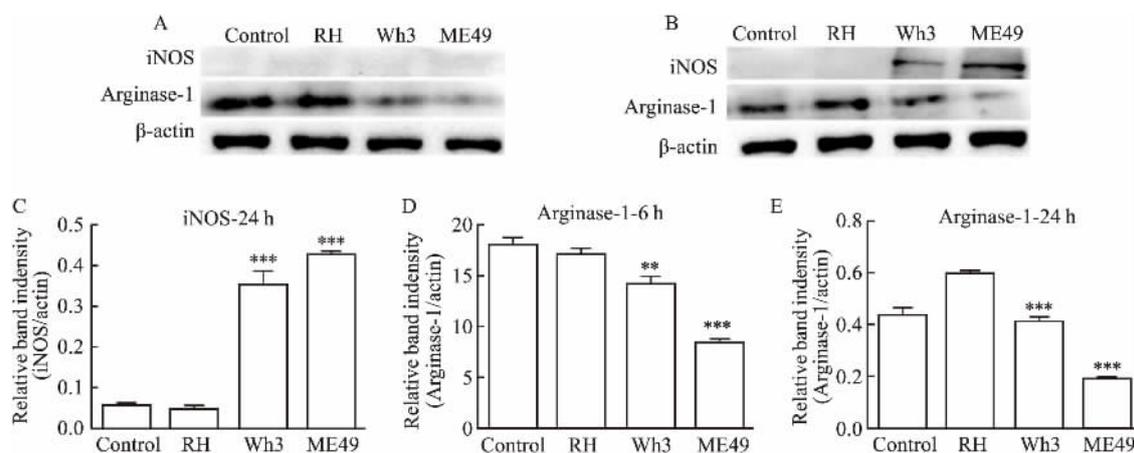
与 Control 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 

图5 巨噬细胞 iNOS、Arginase-1 表达水平

A: 感染后 6 h; B: 感染后 24 h; C、D、E: iNOS、Arginase-1 蛋白表达量分析; 与 Control 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 义 ($F = 109.1, P < 0.001$)。

3 讨论

巨噬细胞作为抵御病原体感染的第一道防线,在机体固有免疫和适应性免疫应答中发挥重要作用^[5]。研究表明巨噬细胞具有很多种类,表型和功能受周围微环境的调节,其通常存在于两个不同的亚群:具有促炎性的典型途径活化的巨噬细胞(M1)和抗炎及免疫调节作用旁路途径活化的巨噬细胞(M2)。细菌脂多糖和 Th1 型细胞因子(如 TNF)可诱导巨噬细胞向 M1 表型分化;Th2 型细胞因子(如 IL-4)可诱导巨噬细胞向 M2 表型分化^[6]。弓形虫作为有核细胞内寄生原虫,巨噬细胞是其理想的寄

生细胞。而巨噬细胞偏移或极化的状态不同,决定了弓形虫感染后机体的不同免疫应答反应,以及宿主感染后的预后和转归。

本研究选用的 THP-1 细胞,系人类白血病单核细胞,该细胞系目前已作为评价单核细胞和巨噬细胞活性的常用模型^[4]。悬浮生长的 THP-1 细胞经 PMA 刺激后,分化成巨噬细胞样细胞,分化的 THP-1 细胞更像天然单核细胞来源的巨噬细胞^[7]。

既往的研究发现,弓形虫毒力效应分子 ROP16 和 GRA15,具有丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)蛋白激酶活性,可诱导巨噬细胞向不同的方向极化,不同弓形虫株的 ROP16 和 GRA15 分子,存在多态性,具有不同的作用^[8]。I 型 RH 株 GRA15 不具有激酶活性,

而Ⅱ型虫株(PRU、ME49) 的 GRA15(GRA15_{II}) 蛋白可以直接磷酸化 NF- κ B p65 蛋白,使巨噬细胞向 M1 方向极化,诱导 Th1/Th17 和 NK 细胞活化^[9],产生促炎细胞因子 IL-1 β 、IL-6、IL-12、IL-23 和 TNF- α ^[10],高表达 iNOS 和产生 NO 和 ROS,驱动宿主的 Th1 型免疫应答,在感染早期即发挥强力的细胞内杀虫效应以控制感染,宿主获得强力的免疫力。Ⅱ型虫株(PRU、ME49) 的 ROP16 无磷酸化 STAT3/STAT6 激酶活性,Ⅰ型和Ⅲ型虫株(如 RH、CTG) ROP16(ROP16_{I/III}) 蛋白可以磷酸化 STAT3/STAT6 诱导巨噬细胞向 M2 方向极化^[11],产生 IL-10、TGF- β 等抗炎细胞因子^[10],高表达 Arginase-1 和产生大量的多巴胺,诱导宿主的 Th2 型免疫应答,结果使得虫体毒力增强,不能在组织内形成包囊进入隐性感染,而在巨噬细胞内大量繁殖,导致全身播散甚至致宿主死亡^[12]。

前期的研究表明,中国优势基因型 Chinese 1 Wh3 株,不同于其他的弓形虫株,同时具有 ROP16_{I/III} 和 GRA15_{II} 两种效应分子^[3]。实验证实,Wh3 株来源的 ROP16_{I/III} 分子可驱动巨噬细胞向 M2 型偏移^[13]; GRA15_{II} 蛋白可使巨噬细胞向 M1 方向极化,并已被用于治疗肝癌及血吸虫感染所致的肝纤维化等^[14-15]。因此,Wh3 株弓形虫感染后,诱导巨噬细胞向哪个方向偏移,一直是我们的关注焦点。

本研究通过 ELISA 检测弓形虫 RH 株、Wh3 株和 ME49 株感染巨噬细胞 6、24 h 后,培养上清液中细胞因子含量发现,IL-6 和 TNF- α 在巨噬细胞感染弓形虫 ME49 株后含量最高,表明 ME49 虫株可诱导巨噬细胞向 M1 极化; RH 虫株感染后 IL-10 和 TGF- β 含量最高,表明其可诱导巨噬细胞向 M2 极化;而在上述 ELISA 检测中发现,弓形虫 Wh3 株感染后培养上清液细胞因子含量介于 RH 株和 ME49 株之间。

在细胞因子和 iNOS、Arginase-1 的 mRNA 转录水平检测中发现,除 iNOS 在感染 6 h 后 RH 虫株升高外,iNOS 在感染 24 h 后,TNF- α 和 IL-12 在感染 6、24 h 后,弓形虫 ME49 株转录水平平均高于 Wh3 株和 RH 株,提示 ME49 虫株可诱导巨噬细胞向 M1 极化; RH 株感染 6、24 h 后 IL-10 和 Arginase-1 的 mRNA 转录水平及感染 6 h 后 TGF- β 转录水平平均高于 Wh3 株和 ME49 株,表明 RH 株可诱导巨噬细胞向 M2 极化;同样发现弓形虫 Wh3 株介于 RH 株和 ME49 株之间。

Western blot 测定 iNOS、Arginase-1 也得到相似的结果。在 Wh3 株和 ME49 株弓形虫感染 24 h 后,iNOS 蛋白表达增高,提示 Wh3 株和 ME49 株弓形虫可诱导巨噬细胞向 M1 方向极化;而 Arginase-1 在感染 Wh3 株和 ME49 株弓形虫后表达量降低,且感染 4 h 后,RH 株表达量升高,提示 RH 株弓形虫可诱导巨噬细胞向 M2 方向极化。

本研究中发现,iNOS 在 RH 虫株感染 6 h 后 mRNA 转录水平升高,但各组均未检测出 iNOS 蛋白表达,推测 mRNA 转录水平升高可能是因为在弓形虫感染早期,急性炎症反应诱导所致,与巨噬细胞的偏移或极化无关。

在 Wh3 株感染后,巨噬细胞表现出介于 M1 和 M2 之间的极化方向,本研究结果提示,其更接近于 RH 株的 M2 极化方向。然而,弓形虫 Wh3 株感染后诱导巨噬细胞极化方向,是虫体内的 GRA15_{II} 和 ROP16_{I/III} 效应分子的共同作用以及相互拮抗所致,或是还存在其他的分子共同参与作用,仍需我们进一步的探索。

参考文献

- [1] Su C, Khan A, Zhou P, et al. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(15): 5844-9.
- [2] Wang L, Chen H, Liu D, et al. Genotypes and mouse virulence of *Toxoplasma gondii* isolates from animals and humans in China [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53483.
- [3] Cheng W, Liu F, Li M, et al. Variation detection based on next-generation sequencing of type Chinese 1 strains of *Toxoplasma gondii* with different virulence from China [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16: 888.
- [4] Chanput W, Mes J J, Wichers H J. THP-1 cell line: an *in vitro* cell model for immune modulation approach [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 23(1): 37-45.
- [5] Gordon S. The macrophage: past, present and future [J]. *Eur J Immunol*, 2007, 37(Suppl 1): S9-17.
- [6] Biswas S K, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(10): 889-96.
- [7] Auwerx J. The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation [J]. *Experientia*, 1991, 47(1): 22-31.
- [8] Hunter C A, Sibley L D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2012, 10(11): 766-78.
- [9] Rosowski E E, Lu D, Julien L, et al. Strain-specific activation of the NF- κ B pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii*

- dense granule protein [J]. J Exp Med, 2011, 208(1): 195 – 212.
- [10] Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease [J]. J Cell Physiol, 2018, 233(9): 6425 – 40.
- [11] Wang C, Cheng W, Yu Q, et al. *Toxoplasma* Chinese 1 strain of WH3 Δ rop16_{I/III} gra15_{II} genetic background contributes to abnormal pregnant outcomes in murine model [J]. Front Immunol, 2018, 9: 1222.
- [12] Murray P J. Macrophages as a battleground for *toxoplasma* pathogenesis [J]. Cell Host Microbe, 2011, 9(6): 445 – 7.
- [13] 徐永伟,李 路,武 艺,等. ToxoROP16_{I/III} 诱导 M2 型巨噬细胞偏移抑制 M1 分泌炎症细胞因子的研究 [J]. 安徽医科大学学报,2019,54(9): 1354 – 60.
- [14] Li Y, Poppoe F, Chen J, et al. Macrophages polarized by expression of ToxoGRA15_{II} inhibit growth of hepatic carcinoma [J]. Front Immunol, 2017, 8: 137.
- [15] Xie Y, Wen H, Yan K, et al. *Toxoplasma gondii* GRA15_{II} effector-induced M1 cells ameliorate liver fibrosis in mice infected with schistosomiasis japonica [J]. Cell Mol Immunol, 2018, 15(2): 120 – 34.

Migration of human macrophages THP-1 induced by the dominant genotype of *toxoplasma gondii* Wh3 strain in China

Zhang Fangfang^{1,2}, Wang Cong³, Luo Qingli^{1,4}, et al

[¹Dept of Microbiology and Parasitology, Anhui Provincial Laboratory of Pathogen Biology and Anhui Key Laboratory of Zoonoses, School of Basic Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²The Affiliated Women and Child Health Care Hospital of Anhui Medical University (Anhui Women and Child Health Care Hospital), Hefei 230001; ³The Second People's Hospital of Hefei, Hefei 230011; ⁴Dept of Laboratory Center of Pathogen and Immunology, School of Basic Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032]

Abstract Objective To study the polarization of macrophages induced by *toxoplasma gondii* Wh3 strain. **Methods** Macrophages THP-1 were infected with *toxoplasma gondii* Wh3 strain, RH strain and ME49 strain. After 6 hours and 24 hours of infection, the supernatant and macrophages were collected. The concentrations of IL-6, IL-10, TNF- α and TGF- β of the supernatant were detected by ELISA. In macrophages, the mRNA transcription levels of M1/M2 related genes iNOS, arginase-1 and TNF- α , IL-12, TGF- β , IL-10 were detected by qRT-PCR, and the expression levels of iNOS and arginase-1 were analyzed by Western blot. **Results** The results of ELISA showed that the contents of IL-6 and TNF- α were the highest after infection by ME49 strain 6 hours and 24 hours ($P < 0.01$), and the highest of IL-10 and TGF- β were detected after infected with RH strain ($P < 0.01$). However, the content of cytokines in supernatant infection by Wh3 strain was between RH strain and ME49 strain. Some inflammatory factors and cytokines mRNA in macrophages were detected after 6 hours and 24 hours of infection, and iNOS, TNF- α and IL-12 significantly increased after infected with *toxoplasma gondii* ME49 strain ($P < 0.05$), arginase-1, IL-10 and TGF- β significantly increased after RH strain infection. It was also found that the levels of mRNA in macrophages infected with Wh3 strain was between RH strain and ME49 strain. After 24 hours of infection, the expression of iNOS protein increased with wh3 and me49 strains of *toxoplasma gondii* ($P < 0.0001$), while the expression of arginase-1 increased with RH strain ($P < 0.001$). **Conclusion** The polarization direction of macrophages was between M1 and M2 after infection with *toxoplasma gondii* Wh3 strain, and it was closer to M2.

Key words macrophage polarization; classically activated macrophage; alternatively activated macrophage; *toxoplasma gondii*