

网络出版时间: 2019-3-26 13:45 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20190322.1759.017.html>

霍乱毒素 B 亚单位对小鼠免疫细胞及细胞因子的影响

李向阳¹ 杨莹¹ 张励才² 颜超¹ 孔凡运¹ 郑葵阳¹ 汤仁仙¹

摘要 目的 探讨侧脑室注射霍乱毒素 B 亚单位(CTB)对小鼠免疫细胞及细胞因子的影响。方法 C57 雌性小鼠侧脑室注射 CTB 运用流式细胞术检测外周血免疫细胞亚群变化;流式微球捕获芯片技术(CBA)检测血清中细胞因子及趋化因子的变化。结果 CTB 能够明显升高单核巨噬细胞、CD4⁺T 细胞及 B 细胞的比例;炎症因子 γ 干扰素(IFN- γ)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-9(IL-9)及趋化因子巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)、巨噬细胞炎性蛋白-1 β (MIP-1 β)、B 淋巴细胞趋化因子(BLCL)、 γ 干扰素诱导的单核因子(Mig)、调节活化正常 T 细胞表达与分泌的趋化因子(RANTES)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)也相应升高。结论 侧脑室注射 CTB 能够明显改变小鼠免疫应答状态。

关键词 霍乱毒素 B 亚单位;趋化因子;细胞因子

中图分类号 R 392.12

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)04-0585-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.04.017

霍乱肠毒素(cholera toxin, CT)是霍乱弧菌的主要毒力因子,CT 具有 A 亚单位(CTA)和 B 亚单位(CTB),两者能形成紧凑而稳定的六聚体蛋白,A 亚单位是霍乱毒素的活性部分,B 亚单位能与有核细胞细胞膜上的神经节苷酯(monosialoganglioside, GM1)结合,基于这一原理,使得 CTB 可以选择性地被那些富含神经节苷脂 GM1 的神经细胞所摄取,从而特异性地标记神经细胞。CTB 除去了 CT 的毒性,具有很强的免疫原性,能够有效刺激机体分泌抗毒素抗体,是目前用的最多的黏膜免疫佐剂之一^[1-2]。但是对于机体免疫系统的影响,尤其是作

为神经元示踪剂,在对小鼠进行侧脑室注射之后对免疫系统的影响没有相关文献报道。该研究通过运用 CTB 对 C57 小鼠进行侧脑室注射,观察小鼠免疫系统的表现,包括免疫细胞、炎症因子、趋化因子的变化,为后续的实验奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物 7~8 周龄 SPF 级雌性 C57 小鼠 20 只,20 g/只,由徐州医科大学实验动物中心提供,饲养于徐州医科大学实验动物中心,环境温度 25℃,湿度 55%。

1.2 主要试剂 霍乱毒素 B 亚单位(CTB)购自上海 Absin 公司;Rabbit anti-CTB antibody 购自美国 Sigma 公司;FITC-anti-Rabbit antibody、FITC-anti-MouseCD4、PE-cy7-anti-MouseCD3、APC-Cy7-anti-MouseCD11b、APC-anti-MouseCD19、PerCP-Cy5.5-anti-Mouse F4/80 荧光抗体均购自美国 ebioscience 公司;LEGENDplex™ kits 购自美国 Biolegend 公司。

1.3 实验分组及用药 小鼠分为两组:磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)组和 CTB 组。CTB 组侧脑室注射 CTB(250 ng/100 g 体质量, PBS 溶解),注射体积为 2 μ l,对照组注射等体积 PBS。

1.4 侧脑室注射 小鼠经麻醉后,固定于脑立体定位仪,消毒,剪开头顶皮肤,暴露白色骨缝及前囟点;侧脑室注射定位坐标:前囟后 0.5 mm,旁开 1.0 mm,深 2.0 mm;进针深度以针尖刺入硬脑膜为起始,注射量为 2 μ l/只,注射时间为 30 s,停针 1 min;拔出微量进样器针头,缝合头部皮肤。

1.5 免疫荧光检测脑液核神经元 取第 7 天小鼠脑组织,冰冻切片,切片厚度 20 μ m,经 PBS 洗涤,封闭后 Rabbit anti-CTB antibody 孵育 24 h;洗涤后,加 FITC-anti-Rabbit antibody 孵育 2 h 后,洗涤,荧光显微镜观察。

1.6 流式细胞术检测免疫细胞变化 取第 7 天小鼠抗凝血 50 μ l,分别加入 FITC-anti-MouseCD4、PE-cy7-anti-MouseCD3、APC-Cy7-anti-MouseCD11b、APC-anti-MouseCD19、PerCP-Cy5.5-anti-MouseF4/80 荧光抗体 4℃孵育 30 min;经裂红、洗涤后,流式细胞仪

2018-11-27 接收

基金项目:徐州市科技项目(编号:KC17098);国家自然科学基金(编号:81572019);江苏省高校优势学科建设工程(编号:KY-LX14-1448)

作者单位:¹徐州医科大学病原生物学与免疫学教研室,江苏省免疫与代谢重点实验室,徐州 221004

²徐州医科大学麻醉学教研室,江苏省麻醉学重点实验室,徐州 221004

作者简介:李向阳,男,实验师;

汤仁仙,女,教授,责任作者, E-mail: tangrenxian-4@163.com

检测。

1.7 LEGENDplex™ kits 检测炎症因子变化 取第7天小鼠血清 25 μl , 加入检测微球及检测抗体, 室温孵育 2 h 后, 上机检测, LEGENDplex 软件数据分析。

1.8 LEGENDplex™ kits 检测趋化因子变化 取第7天小鼠血清 25 μl , 加入检测微球及检测抗体, 室温孵育 2 h 后, 上机检测, LEGENDplex 软件数据分析。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组之间比较采用 t 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫荧光标记触液核神经元 免疫荧光结果显示: CTB 组小鼠触液核神经元染色呈阳性(绿色

荧光), PBS 对照组触液核神经元染色呈阴性(无绿色荧光)。见图 1。

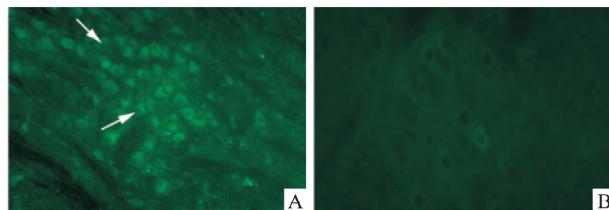


图1 CTB 标记触液核神经元 免疫荧光 $\times 200$

A: CTB 组, 触液核神经元(箭头所示); B: PBS 组

2.2 流式细胞术检测免疫细胞亚群变化 流式细胞术结果显示: CTB 组小鼠免疫细胞包括 CD4^+ T 细胞、B 细胞及单核巨噬细胞均高于 PBS 对照组($t = 8.17, 6.85, 8.64$, $P < 0.05$), 差异有统计学意义。见图 2。

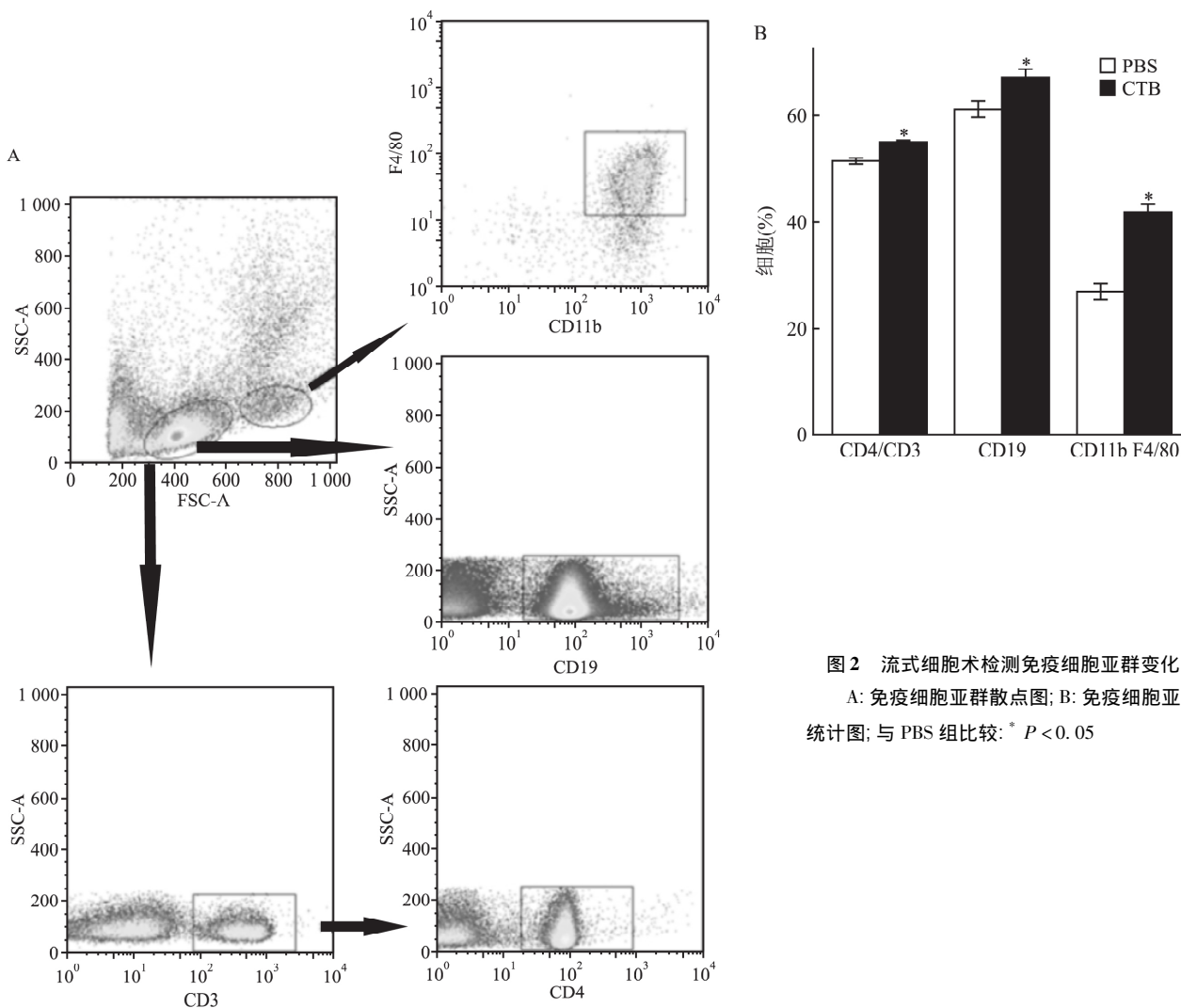


图2 流式细胞术检测免疫细胞亚群变化

A: 免疫细胞亚群散点图; B: 免疫细胞亚群统计图; 与 PBS 组比较: * $P < 0.05$

2.3 流式细胞术检测炎症因子变化 流式细胞术结果显示: CTB 组小鼠炎症因子包括炎症因子 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor, TNF- α)、白细胞介素-6(interleukin 6, IL-6)、白细胞介素-9(interleukin 9, IL-9) 均高于 PBS 对照组, 差异有统计学意义($t = 6.17, 4.37, 4.52, 7.38, P < 0.05$)。见图 3。

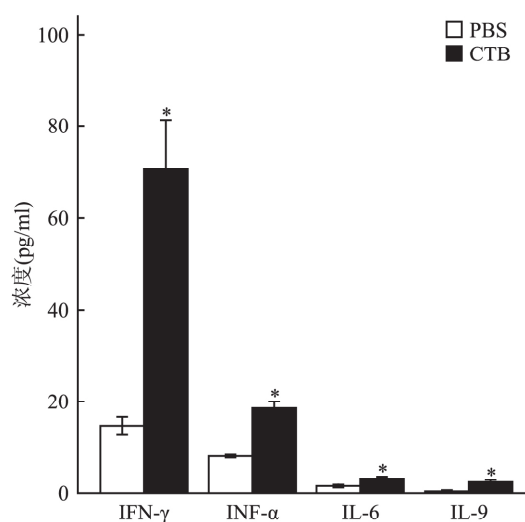


图3 流式细胞术检测炎症因子变化
与 PBS 组比较: * $P < 0.05$

2.4 流式细胞术检测趋化因子变化 流式细胞术结果显示: CTB 组小鼠趋化因子包括巨噬细胞炎性蛋白-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α , MIP-1 α)、巨噬细胞炎性蛋白-1 β (macrophage inflammatory protein-1 β , MIP-1 β)、B 淋巴细胞趋化因子(B lymphocyte chemoattractant, BLC)、 γ 干扰素诱导的单核因子(monokine induced by IFN- γ , MIG)、调节活化正常 T 细胞表达与分泌的趋化因子(regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted, RANTES)、单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemoattractant protein 1, MCP1) 均高于 PBS 对照组, 差异有统计学意义($t = 3.77, 7.06, 2.87, 3.38, 12.25, 4.37, P < 0.05$)。见图 4。

3 讨论

CTB 来源于霍乱弧菌, 作为霍乱毒素中的非毒性亚单位, 能够与细胞表面的 GM1 结合, 具有跨膜传递的作用; 它可以选择性地被神经细胞所摄取, 从而特异性地标记神经细胞。此外 CTB 也具有免疫佐剂活性, 能够刺激机体免疫系统产生免疫应答, 能

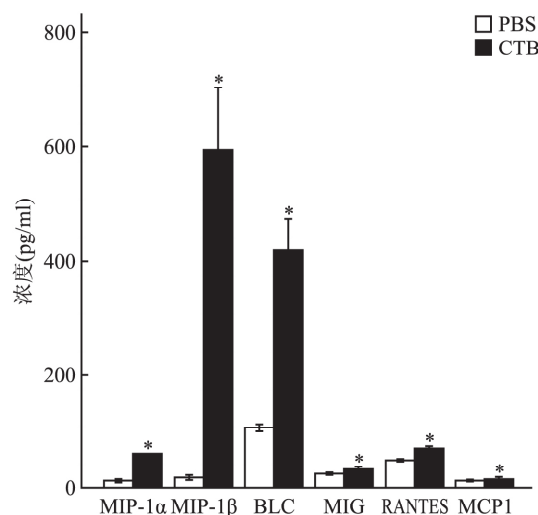


图4 流式细胞术检测趋化因子变化
与 PBS 组比较: * $P < 0.05$

够增强树突状细胞的活化与成熟^[3-4]。

本研究通过对 C57 雌性小鼠侧脑室注射 CTB 试剂来观察其对免疫系统的影响。实验结果显示, CTB 能够明显改变小鼠免疫细胞状态, CD4⁺ T 细胞、B 细胞及单核巨噬细胞明显升高, 同时相关炎性细胞因子、趋化因子也明显升高。

CTB 有很强的免疫原性, 能够调节 Th1 型和 Th2 型细胞免疫应答; 同时能够辅助抗原诱导机体分泌特异性抗体, 通过调节 B 细胞免疫应答, 产生 IgG 抗体, 此外还可以诱导较强黏膜免疫应答, 增强机体抗感染能力^[5]。此外本研究又检测了单核细胞的变化, 其数量较正常组明显升高; 单核细胞作为机体固有免疫和获得性免疫的重要组成部分, 参与抗原提呈、吞噬及 T 细胞功能调节; CTB 进入机体以后可以明显改变单核细胞的免疫应答状态。CTB 通过调节巨噬细胞增加促炎因子的分泌及共刺激分子受体 CD80、CD86 的表达, 导致 T 细胞活化和分化^[6]。

TNF- α 属于 TNF 超家族成员, 免疫细胞、非免疫细胞均可产生, 在炎症反应、细胞凋亡、细胞分化中起重要作用。其主要功能是刺激中性粒细胞吞噬、抗感染、改变细胞的特性, 调节其他组织的代谢活性, 在炎症反应中作为前炎症反应因子起促炎作用^[7]。IFN- γ 主要由活化的巨噬细胞、T 细胞、NK 细胞合成分泌, 是淋巴细胞增殖、分化的调节性物质, 同时发挥抗病毒效应。IFN- γ 可以诱导单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞、星状细胞等主要组织相

容性复合类抗原的表达,参与抗原提呈和特异性免疫应答的识别过程^[8]。IL-6 是一种多功能细胞因子,在急性期免疫反应、宿主防御、造血等方面起重要作用,在炎症反应中主要发挥促炎作用^[9]。IL-9 主要由 Th9 细胞分泌,此外肥大细胞、自然杀伤 T 细胞等也可以分泌;IL-9 与其受体结合后,发挥其生物学作用,如增加肥大细胞在炎症部位聚集,促进固有淋巴细胞的生存,介导 B 细胞分化,促进免疫球蛋白 E 分泌等^[10-11]。CTB 进入小鼠体内后,作用于免疫系统,免疫细胞活化,大量炎症因子分泌,尤其以 IFN- γ 升高最为明显,进一步调节机体免疫应答。

趋化因子是由组织细胞分泌的小分子蛋白,主要功能是招募血液中的淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞等进入感染发生的部位,在炎症反应中有重要作用。MCP1 是单核/巨噬细胞主要趋化因子,MIP-1 α (CCL3)、MIP-1 β (CCL4) 为巨噬细胞炎性蛋白,三者趋化单核/巨噬细胞、T 细胞的同时激发胞内信号通路,发挥促炎、促吞噬等作用^[12-13]。BLC、RANTES、MIG 可趋化嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞迁移至炎症及感染部位^[14-15]。本实验显示,小鼠注射 CTB 后以单核细胞相关趋化因子升高最为明显。这与外周血流式检测结果相一致。

小鼠侧脑室注射 CTB 以后,可以刺激机体免疫系统,导致免疫细胞、细胞因子发生相应改变,尤其以单核细胞及其相关炎症因子、趋化因子变化最为明显,实验结果为后续的实验奠定了基础,但是至于 CTB 对脑神经元定位示踪以后,对免疫系统影响的具体机制及其细胞因子之间的网络关系,仍需进一步探讨。

参考文献

- [1] Sanchez J, Holmgren J. Cholera toxin structure, gene regulation and pathophysiological and immunological aspects [J]. Cell Mol Life Sci 2008 65(9): 1347-60.
- [2] Baldauf K J, Royal J M, Hamorsky K T, et al. Cholera toxin B: one subunit with many pharmaceutical applications [J]. Toxins, 2015 7(3): 974-96.
- [3] Gloudemans A K, Plantinga M, Guilliams M, et al. The mucosal adjuvant cholera toxin B instructs non-mucosal dendritic cells to promote IgA production via retinoic acid and TGF- β [J]. PLoS One 2013 8(3): e59822.
- [4] Anosova N G, Chabot S, Shreedhar V, et al. Cholera toxin, *E. coli* heat-labile toxin, and non-toxic derivatives induce dendritic cell migration into the follicle-associated epithelium of Peyer's patches [J]. Mucosal Immunol, 2008 1(1): 59-67.
- [5] Brunner R, Jensen-Jarolim E, Pali-Schöll I. The ABC of clinical and experimental adjuvants-a brief overview [J]. Immunol Lett, 2010 128(1): 29-35.
- [6] Wiedinger K, Romlein H, Bitsakis C. Cholera toxin B induced activation of murine macrophages exposed to a fixed bacterial immunogen [J]. Ther Adv Vaccines, 2015 3(5-6): 155-63.
- [7] Gubernatorova E O, Tumanov A V. Tumor necrosis factor and lymphotoxin in regulation of intestinal inflammation [J]. Biochemistry (Mosc) 2016 81(11): 1309-25.
- [8] Su W L, Perng W C, Huang C H, et al. Association of reduced tumor necrosis factor alpha, gamma interferon, and interleukin-1beta (IL-1beta) but increased IL-10 expression with improved chest radiography in patients with pulmonary tuberculosis [J]. Clin Vaccine Immunol, 2010 17(2): 223-31.
- [9] Charrad R, Berraies A, Hamdi B, et al. Anti-inflammatory activity of IL-37 in asthmatic children: correlation with inflammatory cytokines TNF- α , IL- β , IL-6 and IL-17A [J]. Immunobiology 2016, 221(2): 182-7.
- [10] 明婷婷, 丁绍威, 胡超杰, 等. CD4 + IL-9 + T 细胞在实验性动脉粥样硬化中的作用 [J]. 安徽医科大学学报 2017 52(6): 824-8.
- [11] Chowdhury K, Kumar U, Das S, et al. Synovial IL-9 facilitates neutrophil survival, function and differentiation of Th17 cells in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Res Ther 2018, 20(1): 18.
- [12] Wang Q, Ren J, Morgan S, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) regulates macrophage cytotoxicity in abdominal aortic aneurysm [J]. PLoS One 2014, 9(3): e92053.
- [13] Scully P, Macsharry J, O'Mahony D, et al. Bifidobacterium infantis suppression of Peyer's patch MIP-1 α and MIP-1 β secretion during salmonella infection correlates with increased local CD4⁺ CD25⁺ T cell numbers [J]. Cell Immunol, 2013 281(2): 134-40.
- [14] Barbi J, Oghumu S, Rosas L E, et al. Lack of CXCR3 delays the development of hepatic inflammation but does not impair resistance to *Leishmania donovani* [J]. J Infect Dis, 2007 195(11): 1713-7.
- [15] Aldinucci D, Colombatti A. The inflammatory chemokine CCL5 and cancer progression [J]. Mediators Inflamm, 2014, 2014: 292376.

网络出版时间: 2019-3-26 13:45 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20190322.1759.018.html>

卵白蛋白诱导家兔过敏性紫癜动物模型的建立和评价

侯兆玉 张晓翠 张红利 邓芳

摘要 目的 建立卵白蛋白(OVA)诱导家兔过敏性紫癜动物模型,为进一步研究过敏性紫癜的发病机制提供理论依据。方法 20只家兔随机分两组:模型组和对照组($n=10$)。模型组给予配方中药煎剂喂饮,1次/d,每次1 ml,连续3周;对照组给予等量生理盐水喂饮。模型组末次喂饮当日,腹腔注射乳化溶液1 ml,1次/周,连续3周。对照组给予等量生理盐水腹腔注射。末次腹腔注射7 d后,模型组兔耳缘静脉注射浓度为10 mg/ml的OVA生理盐水溶液0.5 ml,同时后背剃毛,并将浓度为0.3%的OVA生理盐水皮内注射1 ml,分5点注射,每点0.2 ml。对照组分别以相同的方法和剂量皮内注射生理盐水。注射后观察对比模型组和对照组动物的一般情况,24 h后检测实验室指标以及3周后检测皮肤、肾脏等组织的病理结果。结果 模型组中6只家兔出现皮下紫斑,模型组与对照组在血液黏稠度、血常规及尿常规、IgA、IgG、C3、C4等指标方面差异有统计学意义。模

型组家兔皮肤组织病理表现为真皮层水肿,毛细血管扩张、出血,炎症细胞浸润及血管壁的IgA沉积。肾脏组织病理表现为肾小球系膜增厚、系膜细胞及基质增生、囊腔蛋白渗出及局灶性慢性肾炎伴大量免疫复合物沉积。结论 配方中药煎剂喂饮、连续OVA刺激、静脉及皮内大剂量OVA冲击的方式,可成功模拟较可靠稳定的过敏性紫癜动物模型。

关键词 过敏性紫癜;兔模型;病理

中图分类号 R 392.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)04-0589-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.04.018

过敏性紫癜(Henoch-Schönlein purpura, HSP)是一种好发于儿童、以IgA免疫复合物沉积为主的自身免疫性小血管炎^[1]。该病常累及皮肤、胃肠、肾脏、关节等全身各部位,临床表现为皮肤紫斑、腹痛、消化道出血、蛋白尿、血尿、关节肿痛等。HSP病因未明,目前多认为与其发病关系密切的因素有:感染、药物、食物及遗传因素等^[2]。临床HSP的诊断主要依据EULAR/PRIS统一标准,可触性皮疹(必要条件)伴以下任何一条:①弥漫性腹痛;②任何部位活检示IgA沉积;③关节炎/关节痛;④肾脏受损表现(血尿、蛋白尿)。目前对HSP的发病机制尚未完全明确,因此限制了对其发病机制、诊断和治疗

2018-11-19 接收

基金项目:安徽省公益性技术应用研究联动计划项目(编号:1704J0804027);安徽省教育厅高校优秀拔尖人才培养项目(编号:gxhjZD07)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院儿科,合肥 230022

作者简介:侯兆玉,女,硕士研究生;

邓芳,女,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: dengfang@ahmu.edu.cn

Effect of cholera toxin B subunit on immune cells and cytokines in mice

Li Xiangyang¹, Yang Ying¹, Zhang Licai², et al

¹Dept of Pathogenic Biology and Immunology, Xuzhou Medical University, Jiangsu Key Laboratory of Immunity and Metabolism, Xuzhou 221004;

²Dept of Anesthesiology, Xuzhou Medical University, Jiangsu Key Laboratory of Anesthesiology, Xuzhou 221004)

Abstract Objective To explore the effect of cholera toxin subunit B on the immune system of mice. **Methods** Intra-lateral ventricle(LV) of C57 female mice were injected with toxin subunit B. Immunocyte in peripheral blood were detected by flow cytometry; Cytokine and chemokines in serum were detected by flow cytometry with Cytometrion Bead Array(CBA). **Results** Data showed that CD3⁺CD4⁺T cells, B cells and mononuclear macrophage were higher than PBS control group. IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-9 inflammation cytokines and MIP-1 α , MIP-1 β , BLC, MIG, RANTES, MCP1 chemokine were higher than PBS control group. **Conclusion** Cholera toxin subunit B can obviously change the state of immune response in mice.

Key words cholera toxin subunit B; chemokines; cytokines