

血吸虫果糖二磷酸醛缩酶诱导 Th2 免疫偏移的研究

胡媛媛¹, 徐元宏¹, 沈继龙², 陈鹤²

摘要 目的 分析日本血吸虫感染以及虫源性糖蛋白果糖二磷酸醛缩酶(SjFBPA)刺激后小鼠脾脏细胞中白介素4(IL-4)、白细胞分化抗原CD8a因子表达量的动态变化,并探讨SjFBPA与辅助型T细胞(Th2)免疫应答的关系。方法 血吸虫尾蚴感染C57小鼠10只,设正常对照组。感染8周后处死小鼠,取脾脏制备淋巴细胞悬液;用藻红蛋白(PE)标记CD8a抗体,藻青蛋白(APC)标记IL-4抗体进行细胞染色;流式细胞仪检测细胞因子表达量的变化。10只正常C57小鼠处死后取脾脏制成淋巴细胞悬液,加SjFBPA蛋白体外刺激,按上述流程刺激方法检测细胞。结果 小鼠感染血吸虫8周后脾细胞中IL-4、CD8a的表达量分别为(22.39±5.93)%、(11.34±2.15)%,正常对照组脾细胞中IL-4、CD8a的表达量分别为(1.39±0.52)%、(1.98±0.84)%,差异有统计学意义($P < 0.01$)。SjFBPA体外刺激小鼠脾细胞的IL-4、CD8a的表达量分别为(14.14±1.16)%、(8.99±0.81)%,正常对照组脾细胞中IL-4、CD8a的表达量分别为(1.86±0.93)%、(1.69±0.56)%,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 SjFBPA在血吸虫感染中具有诱导Th2免疫偏移的作用,树突状细胞作为提呈细胞参与该免疫反应。

关键词 日本血吸虫;虫源性糖蛋白果糖二磷酸醛缩酶;Th2型免疫应答

中图分类号 R 383.24

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)11-1566-04

血吸虫病是一种由虫卵肉芽肿引起的慢性免疫性疾病,严重危害人类健康,全球大约有2亿人感染血吸虫,其中1.2亿人有典型症状^[1]。其病理基础是沉积于组织中成熟虫卵内毛蚴分泌的可溶性虫卵抗原(soluble eggs antigen, SEA),诱发宿主发生免疫应答后形成虫卵肉芽肿。血吸虫感染早期以1型辅助T细胞(T helper cells, Th1)反应为主;血吸虫尾蚴感染6周时雌虫开始产卵,宿主出现以Th2型细

胞反应为主的优势应答,体内Th2型细胞因子分泌增多。第8~9周后,Th2应答达到高峰,此后Th1和Th2型细胞因子分泌水平均有所下降;第12周后虫卵内毛蚴死亡,SEA逐渐减少至消失,肉芽肿体积减小,形成局部纤维化。发生Th1型向Th2型的免疫偏移。虫源性糖蛋白果糖二磷酸醛缩酶(schistosome fructose bisphosphate aldolase, SjFBPA)是糖代谢中重要的糖裂解酶,参与寄生虫能量的产生,对寄生虫的生存和活动至关重要^[2]。树突状细胞(dendritic cell, DC)是一种专职抗原提呈细胞,在激活T、B细胞的特异性免疫反应及免疫耐受中均起着重要作用^[3]。成熟DC激活T细胞能力很强,主要诱导免疫应答。该研究探讨SjFBPA对Th2免疫偏移的影响以及作用途径。

1 材料与方法

1.1 动物与蛋白 日本血吸虫感染钉螺购自江苏省血吸虫病防治研究所,常规方法逸出尾蚴,用于感染小鼠。20只健康C57小鼠购于安徽医科大学实验动物中心,6~8周龄,雄性,在清洁级环境下饲养。

1.2 试剂 DMEM培养基为美国Hyclone公司产品;新生及胎牛血清为杭州天杭生物科技有限公司产品;青霉素钠及硫酸链霉素、FITC标记CD4抗体、APC标记IL-4抗体、PE标记的CD8a抗体均来自美国Sigma公司。

1.3 方法

1.3.1 血吸虫感染小鼠 将20只小鼠随机分为两组,每组10只,一组经腹部感染日本血吸虫尾蚴15条,另一组作为空白对照组。于感染第8周后处死小鼠并制备脾单细胞悬液,PBS调整细胞数为 5×10^6 个/ml。

1.3.2 SjFBPA蛋白纯化 用实验室保存的菌种进行摇菌扩增,观察菌液光密度值(optical density, OD)大于0.6后加入异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl thiogalactoside, IPTG)诱导蛋白表达,8h后收集菌液,超声破碎离心取上清液进行层析纯化,纯化后取蛋

2015-07-31 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81171606)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院检验科,合肥 230022

²安徽人畜共患病研究所,合肥 230032

作者简介:胡媛媛,女,硕士研究生;

徐元宏,男,教授,主任技师,博士生导师, E-mail: xy-hong1964@163.com

白样品进行 SDS-PAGE 凝胶分析鉴定及凝胶定量软件 quantityone 纯度测量 其余蛋白放入 -80 °C 保存备用。

1.3.3 FBPA 蛋白刺激 取正常小鼠脱臼处死 取脾脏制备脾单细胞悬液 PBS 调整细胞数为 5×10^6 个/ml。加入 12 孔板中 纯化 FBPA 蛋白 每孔分别加 1 μ g LPS + 1 μ g FBPA 37 °C CO₂ 培养箱共培养 24 h。

1.3.4 细胞染色 将处理完的脾细胞悬液经 1 800 r/min 离心 10 min 弃上清液后收集进流式管中 相同条件处理的脾脏细胞分为两批 一批每管加入 1 μ l FITC 标记的 CD4 抗体 4 °C 避光 20 min 用 500 μ l Stain Buffer 洗涤两次后做打孔破膜处理: 每管加 100 μ l 破膜液 4 °C 避光 20 min 再加入 APC 标记 IL-4 抗体 Wash Buffer 洗涤两次 加入 500 μ l Stain Buffer 后等待上机测量; 另一批每管分别加入 1 μ l FITC 标记的 CD11c 抗体 PE 标记的 CD8a 抗体 4 °C 避光 20 min 后 Wash Buffer 洗涤两次 加入 500 μ l Stain Buffer 后等待上机测量。

1.3.5 流式细胞仪检测 先根据物理参数设活细胞门 然后以 CD4 设定 CD4⁺ T 细胞亚群 检测 CD4⁺ T 细胞亚群中细胞因子的表达率。再选出 Lin-CD11c⁺ 细胞 进一步分析这群 Lin-CD11c⁺ 细胞中 CD8 α 表达情况。每次检测前均用荧光微球对流式细胞仪进行光路和流路质控监测 保证仪器处于正常的工作状态。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 11.0 统计软件对数据进行整理和分析 组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 FBPA 蛋白纯化以及浓度测定 12% SDS-PAGE 凝胶分析图及 quantityone 对凝胶图谱进行分析 结果显示目的蛋白相对含量为 92%。见图 1。

2.2 FBPA 蛋白刺激小鼠脾脏细胞悬液后 IL-4 的表达量与正常脾脏细胞悬液的对比 正常对照组的小鼠脾脏细胞悬液中 IL-4 的表达量为 (1.86 \pm 0.93) % 而 FBPA 刺激后的小鼠脾脏细胞悬液中 IL-4 的表达量为 (14.14 \pm 1.16) % FBPA 刺激后的细胞因子 IL-4 表达量明显增多 (*t* = 38.165, *P* < 0.01) 提示出现 Th2 免疫偏移特征。见图 2。

2.3 血吸虫感染 8 周后小鼠脾脏细胞悬液的 IL-4 的表达量与正常脾脏细胞悬液的对比 正常脾脏细

胞悬液的 IL-4 的表达量为 (1.39 \pm 0.52) % 血吸虫感染 8 周后小鼠脾脏细胞悬液中 IL-4 的表达量为 (22.39 \pm 5.93) %。血吸虫感染后 8 周的 IL-4 表达量明显变化 (*t* = 8.878, *P* < 0.01) 提示已经呈 Th2 免疫偏移。见图 3。

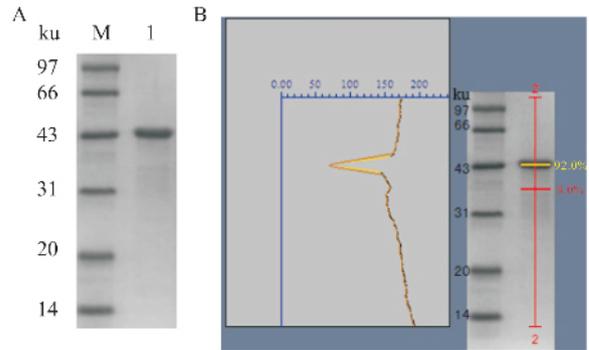


图 1 A 为 SDS-PAGE 凝胶分析

M: Marker; 1: 稀释 20 倍样本; B: quantityone 凝胶图谱分析

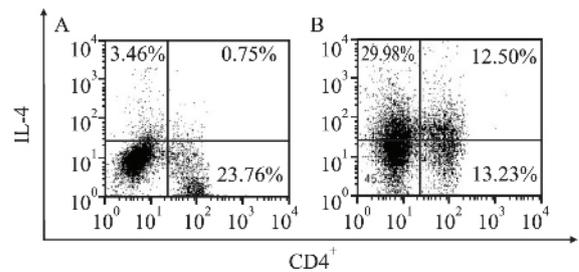


图 2 小鼠脾脏细胞悬液的 IL-4 表达量对比图

A: 正常脾脏细胞; B: FBPA 刺激小鼠脾脏细胞

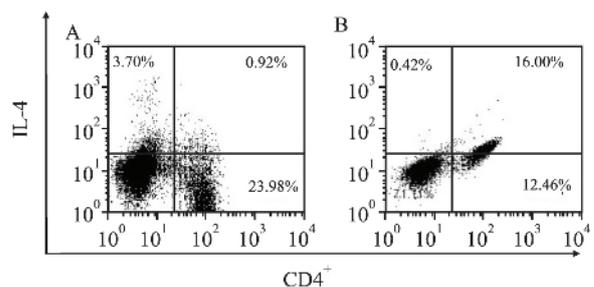


图 3 小鼠脾脏细胞悬液的 IL-4 表达量对比图

A: 正常脾脏细胞; B: 血吸虫感染 8 周后小鼠脾脏细胞

2.4 不同处理组小鼠脾脏细胞悬液中 IL-4 的含量百分比的对比 正常脾脏细胞悬液的 IL-4 含量百分比比较低 而血吸虫感染 8 周后以及用 FBPA 刺激后的小鼠脾脏细胞悬液中 IL-4 含量百分比明显升高 并且血吸虫感染 8 周比 FBPA 单一蛋白刺激的效果更为明显。见图 4。

2.5 FBPA 蛋白刺激小鼠脾脏细胞悬液后 CD8a

的表达量与正常脾脏细胞悬液的对比 正常脾脏细胞悬液的 CD8a 的表达量为 (1.69 ± 0.56) % ,FBPA 蛋白刺激小鼠脾脏细胞悬液后的 CD8a 的表达量为 (8.99 ± 0.81) % 。FBPA 蛋白刺激的细胞因子 CD8a 表达量明显变化 ($t = 15.695, P < 0.01$) ,提示参与提呈作用的 DC 细胞活化增多。见图 5。

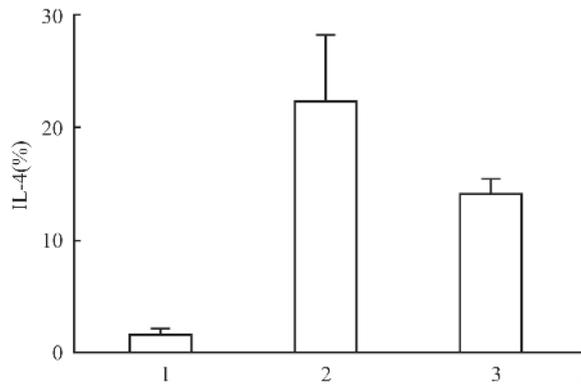


图4 小鼠脾脏细胞悬液中 IL-4 的含量百分比
1: 正常对照组; 2: 血吸虫感染 8 周后; 3: FBPA 刺激后

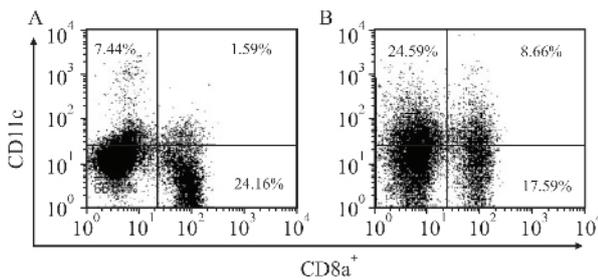


图5 小鼠脾脏细胞悬液的 CD8a 表达量对比
A: 正常脾脏细胞; B: FBPA 刺激小鼠脾脏细胞

2.6 血吸虫感染 8 周后小鼠脾脏细胞悬液的 CD8a 的表达量与正常脾脏细胞悬液的对比 正常脾脏细胞悬液的 CD8a 的表达量为 (1.98 ± 0.84) % ,血吸虫感染 8 周后小鼠脾脏细胞悬液的 CD8a 的表达量为 (11.34 ± 2.15) % 。血吸虫感染后 8 周的细胞因子 CD8a 表达量明显变化 ($t = 10.511, P < 0.01$) ,提示参与提呈作用的 DC 细胞活化增多。见图 6。

2.7 不同处理组小鼠脾脏细胞悬液中 CD8a+ 的含量百分比的对比 正常对照组脾脏细胞悬液的 CD8a+ 含量百分比比较低 ,而血吸虫感染 8 周后以及用 FBPA 刺激后的小鼠脾脏细胞悬液中 CD8a+ 含量百分比明显升高 ,由于血吸虫感染是综合作用 ,相比 FBPA 单一蛋白刺激的效果更为明显。见图 7。

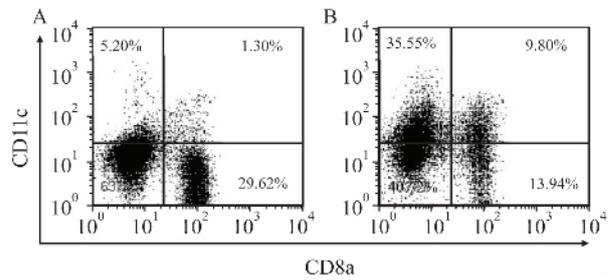


图6 小鼠脾脏细胞悬液的 CD8a 表达量对比
A: 正常脾脏细胞; B: 血吸虫感染 8 周后脾脏细胞

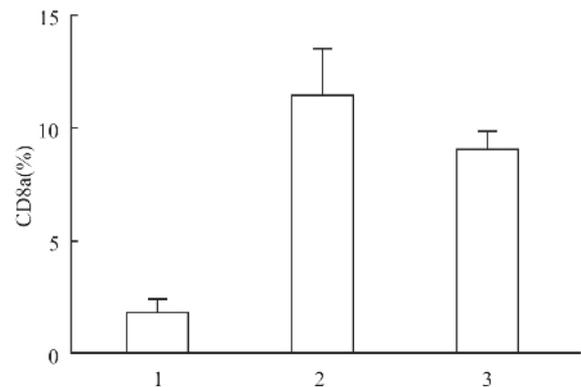


图7 小鼠脾脏细胞悬液中 CD8a+ 的含量百分比
1: 正常对照组; 2: 血吸虫感染 8 周后; 3: FBPA 刺激后

3 讨论

蠕虫感染诱导的宿主 Th2 免疫偏移已成为感染免疫调节研究的重要模型。研究^[4-6]显示 ,血吸虫对 Th1 介导的自身免疫性疾病和 Th2 介导的过敏症均有抑制作用 ,有研究^[7]表明 Th2 优势应答出现在雌虫产卵后 ,因此有研究者认为 ,虫卵是诱导 Th2 应答的主要成分。但是 ,曼氏血吸虫感染 4 周 (尚未产卵) 即出现 Th2 应答 ,单性尾蚴感染也可激发 Th2 优势应答^[8]。提示单个虫体表膜和分泌排泄抗原 (ESA) 中的糖脂以及糖蛋白可能是促进 Th2 免疫偏移的主要诱导分子。成熟 DC 激活 T 细胞能力很强 ,主要诱导免疫应答 ,而不成熟 DC 可诱导免疫耐受。近年来又提出了 DC1 和 DC2 的亚类分类的概念 ,认为 DC1 为髓系来源的 DC ,表达髓系标志 ,主要诱导 Th1 型应答; DC2 为淋巴系来源的 DC ,表达淋巴系的表面标志如 CD8 分子 (CD8a) ,具有诱导 Th2 型应答 ,参与免疫调节和免疫耐受的功能 ,在小鼠实验中表达淋巴系表面分子 CD8 α 的 DC 细胞被认为是 DC2。本实验中 SjFBPA 体外刺激小鼠脾脏细胞后引起的 IL-4 含量的变化显示出 Th2

免疫应答的特点,和血吸虫感染小鼠后8周脾脏细胞因子的变化特点相同,同时血吸虫感染小鼠8周后的DC细胞中表达CD8a⁺的细胞数也有一定的增加,FBPA蛋白刺激后的小鼠脾脏细胞中的DC细胞中表达CD8a⁺的细胞数也呈相同幅度的增加。

综上所述,SjFBPA通过DC细胞介导在血吸虫感染后诱导的Th2免疫偏移中起到重要作用,对揭示虫体免疫逃避、宿主免疫耐受、免疫偏移、免疫病理以及疫苗“失能”的分子机制有重要的指导意义。

参考文献

- [1] World Health Organization. WHO fact sheet on schistosomiasis [C]. WHO, Geneva, 1996.
- [2] Nandan D, Tran T, Trinh E, et al. Identification of leishmania fructose-1,6-bisphosphate aldolase as a novel activator of host macrophage Src homology 2 domain containing protein tyrosine phosphatase SHP-1 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 364(7): 601.
- [3] O'Connell P J, Li W, Wang Z, et al. Immature and mature CD8alpha⁺ dendritic cells prolong the survival of vascularized heart allografts [J]. Immunology, 2002, 168(1): 143.
- [4] Dunne D W, Cooke A. A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease [J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(6): 420.
- [5] Yang J, Zhao J, Yang Y, et al. Schistosoma japonicum egg antigens stimulate CD4⁺CD25⁺T cells and modulate airway inflammation in a murine model of asthma [J]. Immunology, 2007, 120(5): 8.
- [6] Zaccane P, Burton O T, Gibbs S, et al. Immune modulation by Schistosoma mansoni antigens in NOD mice: effects on both innate and adaptive immune systems [J]. J Biomed Biotechnol, 2010, 2010: 795210.
- [7] Schramm G, Haas H. Th2 immune response against Schistosoma mansoni infection [J]. Microbes Infect, 2010, 12(10): 881.
- [8] De Oliveira Fraga L A, Torrero M N, Tocheva A S, et al. Induction of type 2 responses by schistosome worms during prepatent infection [J]. J Infect Dis, 2010, 201(134): 464.

A novel research of Th2 immune deviation induced by SjFBPA

Hu Yuanyuan¹, Xu Yuanhong¹, Shen Jilong², et al

(¹Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Anhui Institute of Human and Animal Diseases, Hefei 230032)

Abstract Objective To analyze the dynamics of IL-4, CD8a in spleen cells of mice infected with cercariae of *Schistosoma japonicum* or SjFBPA and investigate the relationship between SjFBPA and the Th2-dominant response.

Methods 10 mice were infected by cercariae and 10 mice were uninfected. 8 weeks after infection, all mice were sacrificed. Spleen single cell suspension was prepared and analyzed by flow cytometry. Analysis was performed on the IL-4⁺CD8a⁺ cells of spleen cells stained with anti FITC-CD4, PE-CD8a, APC-IL-4 monoclonal antibody.

Results At 8 weeks, the percentage of IL-4⁺ and CD8a⁺ cells in infected with cercariae of *Schistosoma japonicum* mice was 24.5% and 7.65%, respectively, while the percentage of IL-4⁺ and CD8a⁺ cells in uninfected mice was 1.18% and 0.571%, indicating a gradual decline ($P < 0.05$). The percentage of IL-4⁺ and CD8a⁺ cells in infected with SjFBPA was 18.3% and 5.82%, the percentage of IL-4⁺ and CD8a⁺ cells in uninfected mice was 0.91% and 0.086%, indicating a gradual decline ($P < 0.05$).

Conclusion This study suggests that SjFBPA may have a potential value for the Th2 response. DC cells as presenting cells are involved in the immune response.

Key words *Schistosoma japonicum*; SjFBPA; Th2 response