

细粒棘球绦虫重组抗原铁蛋白诱导小鼠骨髓树突状细胞免疫应答的机制研究*

王娅娜^{1,2}, 王强³, 王婵¹, 赵巍^{1,2,3△}

1. 宁夏医科大学基础学院 医学遗传学与细胞生物学教研室(银川 750004); 2. 宁夏医科大学包虫病重点实验室(银川 750004);
3. 宁夏医科大学科学技术研究中心(银川 750004)

【摘要】 目的 探索细粒棘球绦虫重组抗原铁蛋白(rEg. ferritin)免疫小鼠产生抵抗原头蚴感染的保护机制。**方法** 利用 rEg. ferritin 和囊液(HF)两种细粒棘球绦虫抗原与小鼠骨髓树突状细胞(BMDC)进行体外培养,共分6组:HF组(加入 HF 30 $\mu\text{g/mL}$)、rEg. ferritin 组(加入抗原 rEg. ferritin 1 $\mu\text{g/mL}$)均为单独刺激组,rEg. ferritin+LPS 组(加入抗原 rEg. ferritin 1 $\mu\text{g/mL}$ 和 LPS 100 ng/mL)和 HF+LPS 组(加入 HF 30 $\mu\text{g/mL}$ 和 LPS 100 ng/mL)为联合刺激组,LPS 阳性对照组(加入 LPS 100 ng/mL),空白对照组(不加任何抗原)。通过电镜检测各组 BMDC 形态学的变化;流式细胞技术检测各组 DC 的表面分子表达、吞噬能力及诱导 T 细胞增殖能力的变化;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测各组 BMDC 培养上清液中所含 Th1 型〔白介素(IL)-12p70,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)〕和 Th2 型(IL-6 和 IL-10)细胞因子含量。**结果** rEg. ferritin 组和 rEg. ferritin+LPS 组 BMDC 具有成熟的形态,表面突起数目高于空白对照组、HF 组和 HF+LPS 组($P<0.05$);高表达 MHC II、CD80、CD86 及 CD40 分子,与空白对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$);诱导 T 细胞增殖能力强于空白对照组、HF 组和 HF+LPS 组($P<0.05$),吞噬能力弱于 HF 组;高表达 IL-6、IL-12p70、TNF- α 及 IL-10,与空白对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** rEg. ferritin 可以刺激 BMDC 细胞成熟,促进 T 增殖,释放高含量的 Th1 型及 Th2 型细胞因子,激活 Th1 型或 Th2 型细胞,引发免疫应答。

【关键词】 重组抗原铁蛋白 树突状细胞 免疫应答

Effect of Recombinant Antigen Ferritin on DC Induce Immune Response WANG Ya-na^{1,2}, WANG Qiang³, WANG Chan¹, ZHAO Wei^{1,2,3△}. 1. Department of Medical Genetic and Cell Biology of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. Key Laboratory of Hydatid Disease of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 3. Center of Scientific Technology of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China
△ Corresponding author, E-mail: zw-6915@163.com

【Abstract】 Objective To explore the immunoreaction against protoscolex infection by the recombinant ferritin of echinococcus granulosus (rEg. ferritin) immunized mice. **Methods** Bone marrow derived stem cells (BMDCs) were collected and exposed in different antigens by cell culture and included 6 groups, there were hydatid fluid (HF) group (HF 30 $\mu\text{g/mL}$), rEg. ferritin group (rEg. ferritin 1 $\mu\text{g/mL}$), rEg. ferritin+LPS group (rEg. ferritin 1 $\mu\text{g/mL}$ and LPS 100 ng/mL), HF+LPS group (HF 30 $\mu\text{g/mL}$ and LPS 100 ng/mL), LPS group (LPS 100 ng/mL) and control (not add antigen). Morphology of BMDCs in different groups were detected by scan electron microscope (SEM). Phagocytic-ability, T cell multiplication capability and surface marker expression of BMDCs in different groups were detected by flow cytometry. Cytokines of Th1 [interleukin (IL)-12p70, tumor necrosis factor- α (TNF- α)] and Th2 (IL-6 and IL-10) in supernatant of BMDCs in different groups were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** rEg. ferritin or rEg. ferritin+LPS stimulated BMDCs maturation, which the dendrites number of BMDCs in these 2 groups were more and longer than control, HF and HF+LPS groups ($P<0.05$), and induced higher levels of surface molecules major histocompatibility complex II (MHC II), CD80, CD86 and CD40, also had strong ability to induce T cell multiplication than control, HF, HF+LPS groups ($P<0.05$), but had weak phagocytosis than HF group, and secreted higher levels of IL-6, IL-12p70, TNF- α and IL-10 than control group. **Conclusion** BMDCs are stimulated with rEg. ferritin and became maturation. By activating T cell and releasing more cytokines of Th1 and Th2, rEg. ferritin can induce BMDCs to produce Th1 and Th2 immunoreaction.

【Key words】 Recombinant antigen ferritin Dendritic cell Immunoreaction

细粒棘球绦虫能长期寄生于宿主体内引起包虫

病,是由于寄生虫与宿主之间产生了非常复杂的免疫反应。宿主产生抗寄生虫反应,寄生虫也产生了一套逃逸机制^[1]。然而关于这方面机制的研究报道很少。树突状细胞(DC)是一种专职的抗原提呈细

* 宁夏自然科学基金(No. NZ16208)资助

△ 通信作者, E-mail: zw-6915@163.com

胞,在这个过程中发挥着重要的作用,它是连接固有免疫与获得性免疫的桥梁,同时参与炎症反应及免疫耐受^[2]。DC 细胞不同的形态具有不同的功能。报道发现不同的寄生虫抗原作用 DC 可诱导不同的免疫应答反应^[3]。本课题组前期研究发现:细粒棘球绦虫重组抗原铁蛋白(rEg. ferritin)免疫的小鼠可获得高的免疫保护力,抵抗细粒棘球绦虫原头蚴的攻击感染^[4]。但相关机制不明确,本研究拟通过 rEg. ferritin 与 DC 共培养,观察该抗原诱导 DC 产生的形态、功能的变化及免疫应答反应,从而进一步探讨 rEg. ferritin 诱导小鼠抵抗原头蚴的机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和材料

6~8 周龄 C57BL/6 雄鼠购自宁夏医科大学实验动物中心。包虫患者的包裹液(HF)来自宁夏医科大学附属医院肝胆外科手术,术中无菌抽取, -20℃冻存备用。rEg. ferritin 的表达蛋白由本室提供^[5]。考马斯亮兰购自 BIOMOL 公司;IPTG、甲叉双丙烯酰胺、丙烯酰胺购自 Promega 公司;酵母提取物、蛋白提取物购自 OXOID 公司;溶菌酶, DNA I 酶购自北京华美公司;咪唑、L-谷氨酰胺、 β -巯基乙醇购自 Amersco 公司;Triton114、红细胞裂解液购自 Solarbio;1%的青/链霉素、RPMI1640 购自美国 Gibico 公司;胎牛血清、PBS 购自美国 Hyclone 公司;蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(PMSF)、LPS 来自大肠杆菌 strain 0111:B4, FITC-dextran 购自 Sigma 公司;巨噬细胞粒细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白介素(IL)-4 购自 R&D 公司;荧光染料羧基荧光素双乙酸盐,琥珀酰亚胺酯(CFSE)购自 Introvgen 公司;丝裂霉素 C 购自德国 Merk 公司;蛋白纯化树脂购自 Roche 公司;鼠 IL-12p70 酶联免疫吸附试验(ELISA) kit、鼠 IL-10 ELISA kit、鼠 IL-6 ELISA kit、鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA kit 购自杭州联科生物 Sunny;抗鼠 CD11c-PE(DC 细胞的抗原分子),抗鼠主要组织相容性复合体 II (MHC II)-PE-cyanin5,抗鼠 CD80-FITC,抗鼠 CD86-FITC,抗鼠 CD40-PE-Cyanin5 均购自 eBioscience;CD4⁺ T-FITC 磁珠购自 Miltenyi 公司;其它化学试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 抗原的纯化及复性 rEg. ferritin 主要以包涵体表达于大肠杆菌中,通过 Ni²⁺亲和层析柱纯化(按照罗氏亲和层析法说明书中包涵体纯化方

法)。由于 rEg. ferritin 后期要用于细胞培养,需要无菌的可溶性蛋白,所以对纯化的蛋白要进行复性及除菌。将蛋白放于透析袋中,置于蛋白复性缓冲液中,低温,每 8 h,更换一次 PBS 缓冲液,并进行内毒素的检测及 0.45 μm 过滤除菌, -20℃保存。

1.2.2 小鼠骨髓树突状细胞(bone marrow dendritic cell, BMDC)的获取及培养 按文献^[6]的方法,颈椎脱臼处死 2 只 6~8 周的 C57BL/6 雄鼠,无菌条件获取股骨和胫骨的骨髓细胞。加入红细胞裂解液,静置 4~7 min,离心 1 000 r/min,弃上清,进行计数。用含 10% FBS, 2 mmol/L 谷氨酰胺, 50 $\mu\text{mol/L}$ β -巯基乙醇, 10 ng/mL GM-CSF, 5 ng/mL IL-4 的全培养基将细胞浓度调至 $2 \times 10^6/\text{mL}$, 然后接种到 12 孔细胞培养板中, 37℃, 体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养, 分别于第 3 天、第 5 天进行半量换液, 补足 GM-CSF 和 IL-4 细胞因子的量。培养至第 7 天, 收集 BMDC。

1.2.3 BMDC 的分组 收集第 7 天的 BMDC, 用不含 GM-CSF、IL-4 的 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液稀释至 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$, 接种 24 孔细胞培养板中, 分 6 组, HF 组(加入 HF 30 $\mu\text{g/mL}$)、rEg. ferritin 组(加入抗原 rEg. ferritin 1 $\mu\text{g/mL}$)均为单独刺激组, rEg. ferritin + LPS 组(加入抗原 rEg. ferritin 1 $\mu\text{g/mL}$ 和 LPS 100 ng/mL)和 HF + LPS 组(加入 HF 30 $\mu\text{g/mL}$ 和 LPS 100 ng/mL)为联合刺激组, LPS 阳性对照组(加入 LPS 100 ng/mL), 空白对照组(RPMI 1640 培养基上不加任何抗原)。单独刺激组和 2 个对照组在加入试剂后 37℃, 5% CO₂ 培养 20 h; 联合刺激组则需要在加入 rEg. ferritin 或 HF 以 37℃、体积分数 5% CO₂ 培养 20 h 后, 加入 LPS 继续培养 20 h。

1.2.4 扫描电镜(SEM)观察 BMDC 的表面形态 收集各组 BMDC, 每组取 1×10^5 细胞附着在爬片上生长 20 h, 加入体积分数 2.5% 戊二醛固定 1 h, 1% 锇酸后固定 0.5 h, 用乙醇梯度脱水, 加入叔丁醇, 真空泵进行干燥处理, 用真空离子溅射喷镀铂金膜, 扫描电镜 S-3400N 观察各组 BMDC 的表面形态。每组随机选取 100 个 BMDC, 统计含有树突状突起的 BMDC 和无树突状突起的 BMDC(突起 < 3 记为无突起), 并比较。再从每组含有突起的 BMDC 中随机挑选 20 个, 计数并统计每个 BMDC 所含突起的平均数目。

1.2.5 吞噬能力测定 收集各组 BMDC, 加入 FITC-dextran 40 kDa(终浓度 1 mg/mL), 放置

4℃孵育 1 h,离心,加入 500 μL 1% PFA,流式细胞仪检测 BMDC 吞噬 FITC 标记的右旋多糖的含量。每个样本做三次重复,取 10 000 个细胞进行分析。通过 FITC 荧光强度的强弱来反应吞噬能力,荧光强度超过空白对照组则吞噬能力强。

1.2.6 同种异体混合淋巴细胞反应 (mix lymphocyte reaction, MLR)

1.2.6.1 CD4⁺ T 细胞的获取及标记 脱颈处死 6~8 周野生型 C57 BL / 6 小鼠,无菌摘取脾脏,经 200 目滤网研磨过滤,收集脾细胞悬液,加入红细胞裂解液,离心 10 min;然后按照 Miltenyi Biotec CD4⁺ 磁珠说明书进行阳性磁珠分选;获得 CD4⁺ T 细胞,按 1×10⁷ 个细胞比例加入 CFSE 至终浓度为 2.5~5 μmol/L,37℃避光孵育 15 min,用预冷的 FBS 终止反应,用含 10% FBS 的 RPMI 1640 洗涤 2 次,最后稀释至所需浓度,全过程均需避光。

1.2.6.2 同种异体混合淋巴细胞培养 各组 2×10⁵ BMDC 加入丝裂霉素 C(终浓度 25 μg/mL)处理 37℃,30 min,作为刺激细胞;CD4⁺ T 细胞作为效应细胞,按 BMDC : CD4⁺ T 的不同细胞个数比例 (1 : 10、1 : 20、1 : 50) 进行混合培养,同时以不加刺激细胞为对照孔,每孔终体积为 200 μL,设三个复孔,在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 5 d,上流式细胞仪,以增殖峰荧光强度判定 T 细胞的增殖能力,以反映 BMDC 的抗原提呈能力。

1.2.7 ELISA 检测细胞因子 收集各组培养 BMDC 的上清液,按照小鼠 TNF-α、IL-10、IL-6、IL-12p70 试剂盒说明书的方法,通过 ELISA 检测培养上清液中各因子的含量,每个检测样本设立三个复孔,通过 570 nm 或者 630 nm 双波长进行检测。其中 IL-12p70, TNF-α 为 Th1 型细胞因子,IL-6 和 IL-10 为 Th2 型细胞因子。

1.2.8 BMDC 细胞表面分子的检测 收集各组 BMDC 每组分 2 管,分别加 anti-mouse MHC II-PE- Cy5、anti-mouse CD80-FITC、anti-mouse CD11c-PE 和 anti-mouse CD86-FITC、anti-CD40-PE-cy5,加入流式细胞检液 500 μL,设立空白对照,避光置于 4℃孵育 30 min,流式细胞仪检测 BMDC 表面分子。每个样本至少检测 1×10⁴ 个细胞。

1.2.9 统计学方法 所有的数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,α=0.05。

2 结果

2.1 重组蛋白的纯化及复性

重组蛋白 rEg. ferritin 通过 Ni²⁺ 亲和层析柱及蛋白复性,通过电泳获得一条单一的相对分子质量约 20×10³ 的蛋白条带,HF 可见多条带。见图 1。

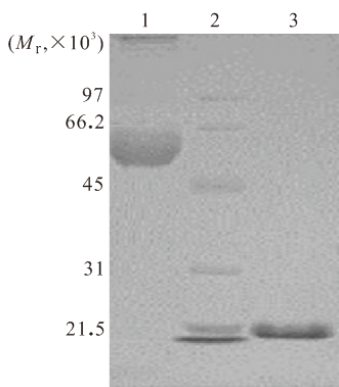


图 1 细粒棘球绦虫几种蛋白的纯化
Fig 1 Proteins of Echinococcus granulosus purification
1: HF; 2: Protein marker; 3: rEg. ferritin

2.2 BMDC 的形态变化

扫描电镜显示,成熟 BMDC,表面粗糙,褶皱多,体积大,表面含有大量的突起,突起细且长,具有典型的成熟 BMDC 形态。未成熟 BMDC 体积小,表面相对光滑,有少数或无毛刺样突起(图 2)。发现 rEg. ferritin、LPS、rEg. ferritin + LPS、和 HF + LPS 组中的有突起的 BMDC 占总 BMDC 的百分比差异无统计学意义,但高于 HF 组和对对照组 (*P* < 0.001)。见表 1。HF + LPS 组的 BMDC 含有树突起的数目低于 rEg. ferritin、LPS、rEg. ferritin + LPS 组 (*P* < 0.05),见表 2。

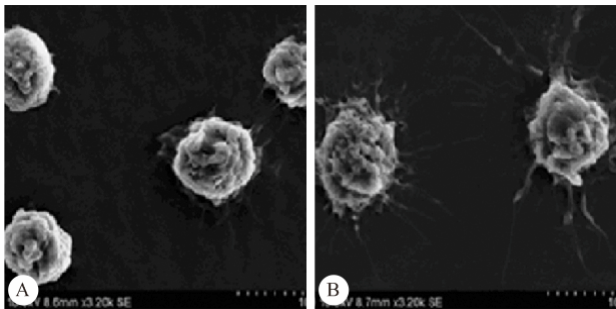


图 2 BMDC 形态的变化。SEM ×3200
Fig 2 Morphological changes of BMDCs. SEM ×3200
A: Immature BMDCs; B: Mature BMDCs

2.3 吞噬能力的测定

由图 3 可见,rEg. ferritin 及 rEg. ferritin + LPS 均能降低 DC 的吞噬能力,与空白对照组相比差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。相反,HF 组 BMDC 具有高效的吞噬能力 (*P* < 0.05),然而,LPS 的加入

表 1 不同组含有树突的 BMDC 数目

Group	<i>n</i>	The number of BMDCs with dendrites
Control	100	22
HF	100	21
rEg. ferritin	100	88 *
LPS	100	90 *
rEg. ferritin+LPS	100	87 *
HF+LPS	100	73 *

* $P<0.01$, vs. control and HF groups

表 2 各组含树突的 BMDC 平均所含毛刺的数目

Group	<i>n</i>	Dendrites per cell
Control	20	8.150±0.850
HF	20	7.500±0.854
rEg. ferritin	20	39.300±2.568 *·#·△
LPS	20	37.950±2.142 *·#·△
rEg. ferritin+LPS	20	38.450±1.915 *·#·△
HF+LPS	20	23.300±1.847 *·#

* $P<0.001$, vs. control group; # $P<0.001$, vs. HF group;

△ $P<0.001$, vs. HF+LPS group

大幅度降低了 HF+LPS 组 BMDC 吞噬的能力,与 rEg. ferritin、LPS 及 rEg. ferritin+LPS 相比差异无统计学意义。

2.4 T 细胞增殖能力的检测

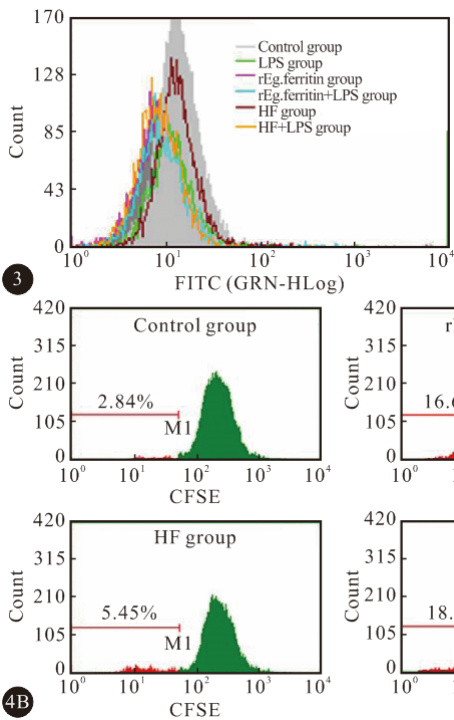


图 3 BMDC 吞噬能力的测定

除 LPS 组和空白对照组外,其余 4 组 BMDC 与 T 细胞在 1 : 10 的条件下,与 1 : 50、1 : 20 相比,BMDC 能更好地激活 T 细胞的增殖(图 4A)。从总体趋势看,HF 组与空白对照组相比 T 细胞增殖能力小幅增高($P>0.05$),差异无统计学意义;HF 与 LPS 联合刺激虽然能够促进 T 细胞的增殖能力,但与 HF 组和空白对照组相比,差异无统计学意义。从总体趋势看,rEg. ferritin 组 BMDC 激活 T 细胞的增殖高于空白对照组、HF 组和 HF+LPS 组($P<0.001$),但与 LPS 组和 rEg. ferritin+LPS 组相比差异无统计学意义(图 4B)。

2.5 细胞因子的含量的测定

见图 5。HF 组分泌大量 IL-6 和少量的 TNF- α 、IL-10;不分泌 IL-12p70。HF 与 LPS 联合刺激,IL-12 p70 表达量较 HF 组稍有提高但差异无统计学意义,TNF- α 的表达量较 HF 组提高($P<0.001$),IL-10 的表达量无明显变化,但仍低于 rEg. ferritin 组和 rEg. ferritin+LPS 组($P<0.001$),IL-6 增加高于 HF 组、rEg. ferritin 组和 rEg. ferritin+LPS 组($P<0.001$)。rEg. ferritin 组 BMDC 分泌 IL-6 高于 HF 组,但差异无统计学意义($P>0.05$);

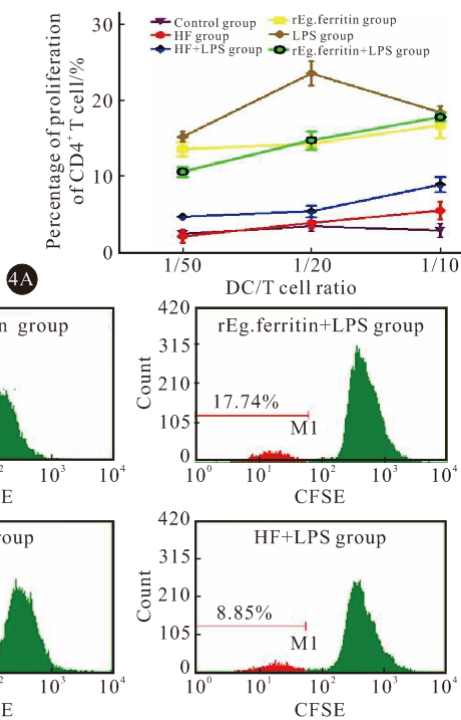


图 4 各组 BMDC 对 T 细胞增殖能力的检测

Fig 3 Phagocytic ability of BMDCs in different groups Fig 4 Effect of differentiated BMDCs on T-cell proliferation
BMDCs stimulated with different antigen uptake FITC-dextran capability was detected by flow cytometry; 4A: Selection the optimal ratio of BMDCs effected on different antigens and T-cell (BMDC : T ratio, 1 : 10, 1 : 20, 1 : 50 different colour representative different groups); 4B: Proliferation of CD4⁺ T cell was measured by determining the CFSE fluorescence intensity through FACS. T-cell was labeled with CFSE

分泌大量的 IL-10、IL-12p70 和 TNF- α , 高于除 rEg. ferritin+LPS 组外的其余组, 差异有统计学意义($P<0.001$)。rEg. ferritin+LPS 组 IL-12p70 和

TNF- α 的表达量较 rEg. ferritin 组进一步增高($P<0.001$), IL-10 的表达量较 rEg. ferritin 组稍有下降, 但差异无统计学意义。

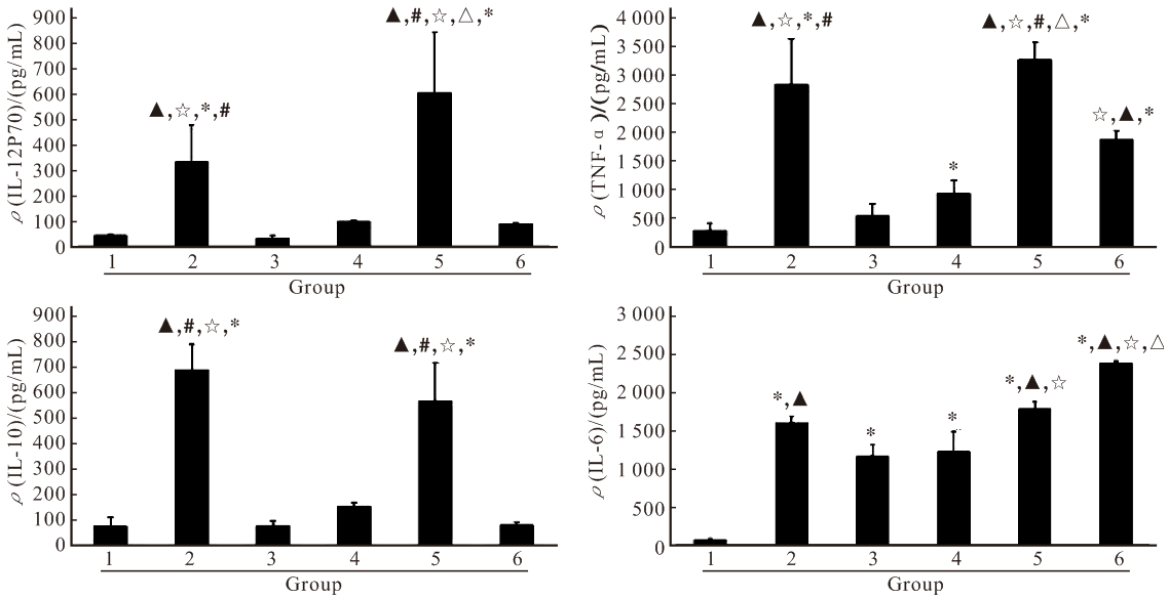


图 5 各组培养 BMDCs 的上清液中细胞因子的含量

Fig 5 Expression of cytokines in BMDCs stimulated with different antigens

Group 1: Control group; Group 2: rEg. ferritin group; Group 3: HF group; Group 4: LPS group; Group 5: rEg. ferritin+LPS group; Group 6: HF+LPS group; * $P<0.001$, vs. group 1; $\triangle$ $P<0.001$, vs. group 2; $\blacktriangle$ $P<0.001$, vs. group 3; $\star$ $P<0.001$, vs. group 4; # $P<0.001$, vs. group 6

2.6 BMDCs 表面分子表达量的测定

见表 3。rEg. ferritin 能够致敏 BMDC, 诱导其成熟, 与空白对照组相比, 上提 CD80、CD86 和 CD40 的表达 ($P<0.05$), 而 MHC II 的表达量无明显增高。rEg. ferritin+LPS 联合致敏 BMDC, 除提高了 MHC II 的表达, 其余与 rEg. ferritin 单独刺激

BMDC 表面分子表达效果差异无统计学意义 ($P>0.05$)。HF 组与空白对照组 BMDC 均低表达 CD80、CD86、MHC II 和 CD40 ($P>0.05$), HF 组加入 LPS 刺激后, 表面分子表达量有轻微的提高, 尤以 CD40 分子显著, 但是仍低于 rEg. ferritin 刺激的 BMDC ($P<0.05$)。

表 3 不同抗原刺激 BMDCs 表面分子的表达/%

Table 3 Fluorescence intensities for expression of surface molecular of BMDCs stimulated with different antigens/%

Group	CD80	MHC II	CD86	CD40
Control	16.88 $\pm$ 2.10	50.12 $\pm$ 7.00	15.95 $\pm$ 3.20	10.85 $\pm$ 1.10
rEg. ferritin	23.83 $\pm$ 1.34*·#·▲	53.86 $\pm$ 5.20*·▲·☆	26.07 $\pm$ 3.46*·#·▲·☆	27.42 $\pm$ 4.67*·#·▲·☆
HF	17.24 $\pm$ 3.71	48.22 $\pm$ 6.60	16.20 $\pm$ 2.10	10.96 $\pm$ 3.10
LPS	21.61 $\pm$ 3.85*·#	61.53 $\pm$ 5.59*·#·▲	32.33 $\pm$ 2.92*·#·▲	23.33 $\pm$ 4.79*·#
rEg. ferritin+LPS	20.10 $\pm$ 1.61*	62.70 $\pm$ 9.73*·#·▲	25.57 $\pm$ 1.35*·#·▲·☆	26.37 $\pm$ 2.62*·#·▲
HF+LPS	19.01 $\pm$ 4.24	49.58 $\pm$ 1.89	19.42 $\pm$ 1.00	19.34 $\pm$ 3.90*·#

* $P<0.05$, vs. control group; # $P<0.05$, vs. HF group; $\blacktriangle$ $P<0.05$, vs. HF+LPS group; $\triangle$ $P<0.05$, vs. rEg. ferritin group; $\star$ $P<0.05$, vs. LPS group

3 讨论

经本课题组前期研究发现 rEg. ferritin 可作为一种具有疫苗潜质的分子^[4]。HF 则是细粒棘球蚴生存、代谢及寄生虫与宿主相互作用的场所, 以往研究认为 HF 能影响机体的免疫调节反应, 加速细粒

棘球蚴在哺乳动物体内的生长^[7]。因此选这两种抗原, 对比观察它们诱导 DC 产生的免疫应答反应的异同, 进而探讨 rEg. ferritin 诱导小鼠产生免疫保护的机制。

通过扫描电镜观察各组 BMDC 的形态实验中, 我们发现各组 BMDC 表面的突起数目根据不同抗

原的刺激呈现差异性变化。推测这些突起具有特殊的功能,它们可能是一种反应 DC 成熟度和抗原提呈能力的信号,同时它们可作为传输信号,DC 与 T 细胞的接触就是建立在这些突起的基础上^[8]。因此突起的数目与 BMDC 激活 T 细胞的数目及增殖能力有关,从而影响效应 T 细胞亚群的增殖及诱导的免疫应答反应。

在对 BMDC 表面分子表达和 T 细胞增殖能力检测的实验中发现, HF 组的 BMDC 表面分子均低表达,且刺激 T 细胞增殖能力很弱,说明 HF 不能诱导 BMDC 成熟。但是与 LPS 联合刺激后,可以上提各种表面分子的表达,尤其是 CD40;同时降低 BMDC 的吞噬能力,促进 BMDC 成熟;SEM 观察进一步发现, HF+LPS 组 BMDC 表面毛刺状突起的数目显著增多。在这个过程中 CD40 可能起着非常重要的作用。CD40 是肿瘤坏死因子 TNF 受体家组的成员之一,可促进 DC 成熟,提高 CD80 和 CD86 的表达,提高共刺激信号^[9]。

DC 的不同亚群决定 DC 诱导不一样的免疫反应^[3]。有学者认为不成熟的 DC 就能产生 Th2 型反应,也有人认为单纯性的 IL-12p70 缺乏,就能阻止 Th1 型反应,而产生 Th2 型反应^[10]。目前普遍认为如果 DC 产生大量的 IL-12、TNF- α 和少量的 IL-6,可诱导 Th0 向 Th1 型细胞分化,相反,则诱导 Th0 向 Th2 型细胞分化。本研究发现, HF 作用于 BMDC 可产生大量的 IL-6 和少量的 IL-10、TNF- α , 不分泌 IL-12p70,阻止了 Th0 向 Th1 型细胞分化,而向 Th2 型细胞分化,这一现象可能与寄生虫逃避机制有关,这与 RIGANO 等^[11]和 KANAN 等^[12]的研究一致。当 HF 加入 LPS 联合刺激时, IL-6、TNF- α 的含量较 HF 组高($P<0.001$), IL-12p70 的含量较 HF 组稍有提高。众所周知 LPS 诱导 DC 产生 Th1 型免疫应答, HF 不能有效的刺激 DC 成熟,大部分 DC 处于未成熟状态,当 LPS 加入后,这些 DC 被刺激,从未成熟形态转为成熟形态,并上提了表面分子,提高了 Th1 型细胞因子 TNF- α 的含量。

rEg. ferritin 组与 rEg. ferritin+LPS 组 BMDC 各项指标除 IL-12p70 表达水平外,均无显著差异。推测 rEg. ferritin 自身就能较好的刺激 BMDC 成熟,能较强的激发 T 细胞的增殖,能分泌大量的细胞因子,虽然 LPS 也能诱导 BMDC 成熟,但是可能没有多余的未成熟 BMDC 受到 LPS 的作用,所以

在联合刺激组中加入 LPS 后,结果并未观察到设想的协同效应。rEg. ferritin 分泌高含量的 Th1 型和 Th2 型细胞因子,推测它在不同的时间激活 Th1 型或 Th2 型细胞,诱导不同的免疫应答反应。然而关于具体的产生不同免疫应答反应的时间,以何种方式激发小鼠产生免疫保护机制还不明确,需进一步的探究。

参 考 文 献

- [1] MAIZELS RM, BALIC A, GOMEZ-ESCOBAR N, *et al.* Helminth parasites-masters of regulation. *Immunol Rev*, 2004, 201(1):89-116.
- [2] MAIZELS RM, HEWITSON JP. Myeloid cell phenotypes in susceptibility and resistance to helminth parasite infections. *Microbiol Spectr*, 2016, 4 (6): 1-2 [2017-04-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28087937>. doi: 10.1128/microbiolspec.MCHD-0043-2016.
- [3] TERRAZAS CA, SÁNCHEZ-MUÑO ZF, MEJÍADOMÍNGUEZ AM, *et al.* Cestode antigens induce a tolerogenic-like phenotype and inhibit LPS inflammatory responses in human dendritic cells. *Int Journal Bio Sci*, 2011, 7(9):1391-1400.
- [4] WANG YN, LI ZJ, BO Y, *et al.* Recombinant ferritin protects mice against challenge with *Echinococcus granulosus*? *Acta Parasitologica*, 2009, 54(4):335-340.
- [5] 丁 聘, 王娅娜, 王 洁, 等. 细粒棘球绦铁蛋白基因的重组、表达、纯化及免疫学特性鉴定. *宁夏医科大学学报*, 2009, 31(2):146-149.
- [6] MARGOS MC, GRANDGIRARD D, LEIB S, *et al.* *In vitro* induction of lymph node cell proliferation by mouse bone marrow dendritic cells following stimulation with different *Echinococcus multilocularis* antigens. *J Helminthol*, 2011, 85(2):128-137.
- [7] MAMUTI W, SAKO Y, NAKAO M, *et al.* Recent advances in characterization of *Echinococcus* antigen B. *Parasitol Int*, 2006, 55(Suppl):S57-S62.
- [8] BENVENUTI F, HUGUE S, WALMSLEY M, *et al.* Requirement of Rac1 and Rac2 expression by mature dendritic 23 cells for T cell priming. *Science*, 2004, 305(5687):1150-1153.
- [9] HANIG J, LUTZ M B. Suppression of mature dendritic cell function by regulatory T cells *in vivo* is abrogated by CD40 licensing. *J Immunol*, 2008, 180(3):1405-1413.
- [10] SHER A, PEARCE E, KAYE P. Shaping the immune response to parasites: role of dendritic cells. *Curr Opin Immunol*, 2003, 15(4):421-429.
- [11] RIGANO R, BUTTARI B, PROGUMO E. *Echinococcus granulosus* antigen B impairs human dendritic cell differentiation and polarizes immunature dendritic cell maturation towards a Th2 cell response. *Infect Immun*, 2007, 75(4):1667-1678.
- [12] KANAN JH, CHAIN BM. Modulation of dendritic cell differentiation and cytokine secretion by the hydatid cyst fluid of *Echinococcus granulosus*. *Immunology*, 2006, 118(2):271-278.

(2017-04-09 收稿, 2017-09-11 修回)

编辑 吕 熙