

单核细胞增生李斯特菌 L 型对小鼠脾脏树突状细胞免疫调节作用影响的研究^{*}

韦 莉^{1,2}, Moshin Raza Kashif^{1,2}, 金齐力^{2,3}

1. 蚌埠医学院病原生物学教研室(蚌埠 233030); 2. 蚌埠医学院 感染与免疫安徽省重点实验室(蚌埠 233030);
3. 蚌埠医学院第二附属医院 检验科(蚌埠 233040)

【摘要】 目的 研究单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM)感染对树突状细胞(dendritic cell, DC)免疫功能的影响,探讨细菌型(WT)和 L 型(L-form)LM 对 DC 的免疫活化能力差异。**方法** 将 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、WT 组、L-form 组,3 组小鼠分别经尾静脉感染 PBS 液、细菌型 LM 和 L 型 LM,电镜观察脾脏 DC 超微结构特征;流式细胞术检测小鼠脾脏 DC 的数量、共刺激分子表达、胞内细胞因子分泌、脾脏 T 细胞亚群及其活化程度。**结果** 透射电镜可观察到对照组小鼠脾脏 DC 表面有大量丝状伪足,胞浆均匀,细胞核大而偏于一侧;吞噬细菌后,表面丝状伪足减少,胞质内空泡增多;小鼠感染后第 1 天脾脏中 DC 绝对值无明显升高或降低($P>0.05$),但成熟表型特征性分子表达上调($P<0.05$),L-form 感染组 DC 表面 CD80 和 CD86 分子均高于 WT 组($P<0.05$);小鼠感染 LM 后 $\text{TNF-}\alpha^+$ DC 比例明显升高,L-form 感染组分泌 $\text{TNF-}\alpha$ 的 DC 高于 WT 组($P<0.05$);感染 LM 后第 7 天,3 组小鼠脾脏 CD4^+ T 细胞和 CD8^+ T 细胞在淋巴细胞中所占比例差异均无统计学意义($P>0.05$),但 L-form 组 CD69^+ T 细胞比例高于 WT 组($P<0.05$)。**结论** L 型 LM 可介导相对高水平的 $\text{TNF-}\alpha$,促进 DC 成熟以增强其抗原递呈的能力。

【关键词】 单核细胞增生李斯特菌 L 型 树突状细胞

Research on Immunomodulatory Effects of *Listeria monocytogenes* L-form on Mouse Splenic Dendritic Cells WEI Li^{1,2}, Moshin Raza Kashif^{1,2}, JIN Qi-li^{2,3}. 1. Department of Microbiology and Parasitology, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China; 2. Anhui Provincial Key Laboratory of Infection and Immunity, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China; 3. Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233040, China

【Abstract】 Objective To study the effect of *Listeria monocytogenes* (LM) infection on dendritic cell (DC) immune function, and to compare the difference of immune activation ability on DC cell between bacterial form (WT) and L-form. **Methods** C57BL/6 mice were randomly divided into 3 groups and infected intravenously with LM WT, LM L-form or PBS respectively. The ultrastructural characteristics of splenic DC were observed by transmission electron microscopy (TEM). The number of splenic DC, the expression of costimulatory molecules, the secretion of cytokine and the activation of splenic T lymphocyte were detected by flow cytometry. **Results** TEM observation found that there were a large number of filamentous pseudopodia on the surface of splenic DC cells. The cytoplasm of DC was homogeneous and its nucleus was large. After phagocytosis of bacteria, the number of pseudopodia on the surface decreased and vacuoles in the cytoplasm increased. The number of splenic DC did not show significant changes at 1 d post infection ($P>0.05$). However, the expression of mature phenotypic molecules were significantly up-regulated ($P<0.05$), in L-form infection group, both CD80 and CD86 molecules expressed on DC surface were higher than WT group ($P<0.05$). Compared with control group, the proportion of $\text{TNF-}\alpha^+$ DC were elevated after LM infection, and the average percentage of $\text{TNF-}\alpha^+$ DC of L-form infection group was significantly higher than that of WT group ($P<0.05$). At 7 d after infection, the average percentage of CD69^+ T cells of L-form group was significantly higher than that of WT group ($P<0.05$). **Conclusion** LM L-form can induce relatively high levels of $\text{TNF-}\alpha$ and promote DC maturation so that to enhance their antigen presenting ability.

【Key words】 *Listeria monocytogenes* L-form Dendritic cell

^{*} 安徽高校科研创新平台团队项目(No. 2016-40),安徽省高校优秀青年人才支持计划项目(No. gxyq2018037)和蚌埠医学院科技发展基金(No. BYKF1709)资助

单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM)是一类兼性胞内寄生菌,能直接感染抗原递呈细胞(antigen presenting cells, APC),诱导有效的细胞免疫应答。目前,LM 感染

模型已被广泛用于研究胞内菌感染介导的细胞免疫反应。细菌 L 型是细菌细胞壁缺失型,包括 LM 在内的许多细菌均可形成稳定的 L 型^[1-2]。DIMOVA 等^[3]研究发现细菌缺失部分或全部细胞壁成分后,仍具有免疫原性,能刺激机体产生免疫反应。我们前期实验也证实:与原菌相比,L 型 LM 由于细胞膜性结构外露,具有更强的活化自然杀伤 T (NKT)细胞能力^[4]。

树突状细胞(dendritic cells, DC)是体内功能最强的专职 APC。根据 DC 发育程度不同分为 3 个阶段:前体 DC、未成熟 DC(immature DC, iDC)和成熟 DC(mature DC, mDC)。iDC 具有很强的抗原摄取、加工处理的能力,受到外源刺激后迅速通过淋巴管内皮细胞迁徙至淋巴结。其迁移的过程还伴随着它功能和表型的成熟,表面趋化因子及其受体等其他分子表达也发生变化^[5]。正常情况下,体内的大部分 DC 是 iDC,广泛分布于外来抗原易于接触的部位,通过吞噬、胞饮以及与其他各种细胞表面受体相互作用来捕获抗原。本研究中,我们利用动物模型,观察 L 型 LM 感染对小鼠脾脏 DC 的超微结构特征和免疫活化的影响,拟在前期研究基础上探讨 L 型 LM 对 DC 的免疫活化能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和实验动物 LM (GIM1.347 = ATCC19115)购于广东省微生物研究所微生物菌种保藏中心(GIMCC)。6~8 周雌性 C57BL/6 小鼠(体质量 20~25 g),健康清洁级,购自扬州大学动物实验中心,许可证号:SCXK 苏 2007-0001。

1.1.2 主要试剂和仪器 脑心浸液琼脂培养基(BHI, BIOSHARP 公司);RPMI1640 (GIBCO 公司);荧光标记抗小鼠单克隆抗体:anti-CD11c FITC (N418), anti-MHC II PerCP-Cy5.5 (NIMR-4), anti-CD40 PE (1C10), anti-CD80 PE (16-10A1), anti-CD86 PE(PO3.1), anti-TNF- α PE (TN3-19), anti-CD3 PerCP-Cy5.5 (145-2C11), anti-CD4 PE (GK1.5), anti-CD8 α APC (53-6.7), anti-CD69 FITC (H1.2F3) 及相应同型对照均购自美国 eBioscience 公司;流式细胞仪:FACS Calibur, 美国 BD 公司;透射电子显微镜:日本 Hitachi 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 LM 的 L 型诱导 采用纸片扩散法进行诱导,将 LM 均匀涂布于 L 型 BHI 培养基中,放置

40 U/片的苯唑青霉素纸片于培养基上,逐日观察抑菌圈内外及边缘菌落形态,反复传代后镜下可见革兰阴性长丝体,细胞壁染色显示细胞壁缺陷,在无苯唑青霉素培养基中未见恢复,为稳定 L 型。

1.2.2 实验动物感染 挑取 LM 标准菌落、L 型菌落分别接种于 BHI 液体培养基、高渗液体 L 型培养基,37 °C,100 r/min 振荡培养 18 h 至对数生长期,浓度调整至 1×10^6 CFU/mL 备用^[4]。C57BL/6 小鼠随机分为对照组、WT 组、L-form 组。各组小鼠分别尾静脉注射 0.2 mL 的 PBS、细菌型 LM 菌液 (2×10^5 CFU)、L 型 LM 菌液 (2×10^5 CFU),每天观察小鼠食欲、活动、反应变化等情况。

1.2.3 小鼠脾脏 DC 的分离获取 方法参考文献^[6]。感染后第 1 天处死小鼠,冲洗后 75%酒精浸泡 5 min。取脾脏置于 200 目不锈钢筛网上,加入少许 RPMI1640,剪碎脾脏组织,用注射器针芯轻轻研磨脾脏,研磨过程不断加入 RPMI1640 保持组织湿润,维持细胞活性。吸取脾细胞悬液至离心管中,洗涤 3 次 (1 300 r/min, 5 min),完全培养基重悬细胞并置于培养瓶中,37 °C,体积分数为 5% CO₂ 培养箱内孵育 2 h;完全培养基剧烈冲洗,弃悬浮细胞;加入完全培养基 37 °C,体积分数为 5% CO₂ 培养箱内孵育过夜,收集悬浮细胞。

1.2.4 电镜观察小鼠脾脏 DC 的细胞形态 细胞悬液用预冷 PBS 洗涤 2 次,弃上清,加入 3%戊二醛固定 2 h, PBS 漂洗,1%锇酸固定,梯度丙酮脱水,环氧树脂渗透包埋,超薄切片,铀铅双重染色后在透射电镜下观察并摄片。

1.2.5 DC 数量及表面共刺激分子表达水平的流式检测 如上述获取感染后第 1 天小鼠脾脏细胞悬液,离心洗涤后 Tris-NH₄CL 法裂解红细胞,洗涤、离心,收集到的细胞为脾脏淋巴细胞,调整其浓度为 1×10^7 mL⁻¹。用 anti-CD11c FITC、anti-MHC II PerCP-Cy5.5 和 anti-CD40 PE 或 anti-CD80 PE 或 anti-CD86 PE 标记后,室温暗处孵育 15 min, PBS 洗涤,细胞固定后于 24 h 内上流式细胞仪检测并进行三色分析。

1.2.6 胞内细胞因子的检测 按上述方法获取脾脏淋巴细胞悬液置于流式管中,每管加入 BFA (5 μ g/mL)阻断 5 h (37 °C, 体积分数为 5% CO₂),染色缓冲液洗涤一次 (1 500 r/min, 5 min),离心弃上清,轻轻震荡悬浮细胞。细胞表染时加入 anti-CD11c FITC、anti-MHC II PerCP-Cy5.5 室温暗处孵育 15 min,染色缓冲液洗涤两次;2% PFA 室温暗

处固定 30 min, 洗涤后用破膜剂室温暗处透膜 10 min, 洗涤、离心、弃上清, 加入 anti-TNF- α PE, 室温暗处胞内染色 30 min, 洗涤后加入 500 μ L 1% PFA 固定后流式细胞仪检测。

1.2.7 脾脏 T 细胞亚群及活化程度的检测 获取感染后第 7 天小鼠脾脏单细胞悬液, 用 anti-CD3 PerCP-Cy5.5、anti-CD4 PE、anti-CD8 α APC 和 anti-CD69 FITC 标记后, 上流式细胞仪检测。

1.3 统计学方法

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析和 q 检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠脾脏 DC 形态学特征

透射电镜显示可观察到 DC 表面有多个放射状突起, 从胞体较粗的起始部分发出大量的细长柔软、质地光滑的丝状伪足, 胞浆均匀, 胞内空泡少, 细胞核大而偏于一侧, 染色质均匀分布, 核膜清晰(图 1A)。内化吞噬 LM 后, 细胞表面丝状伪足减少, 胞质内空泡与溶酶体逐渐增多, 被吞噬细菌位于空泡内, 同时可观察到胞核浓缩, 染色质边缘化聚集于核膜等改变(图 1B)。

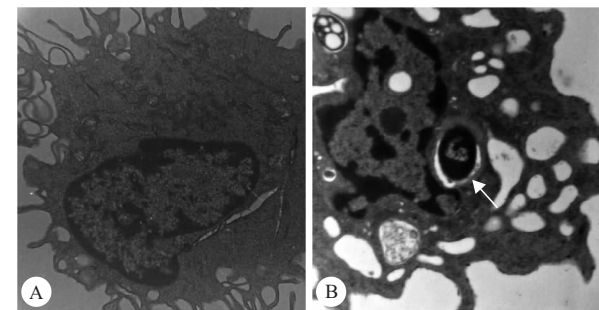


图 1 透射电镜观察 DC 的超微结构。×10 000
Fig 1 Observations on ultrastructure of DC by transmission electron microscope. ×10 000
A: Control group; B: WT group (arrow; LM)

2.2 LM 感染对小鼠脾脏 DC 数量及表型的影响

图 2 显示: 与对照组相比, WT 组和 L-form 组小鼠感染后第 1 天脾脏中 DC 绝对数量并无明显升高或降低。L-form 组与 WT 组比较, 差异也没有统计学意义($P > 0.05$)。感染后 WT 组和 L-form 组 DC 表面 CD40、CD80 和 CD86 分子的表达均上调($P < 0.05$), L-form 组脾脏 DC 表面 CD80 和 CD86 分子这两项指标平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)分别为 146.58 ± 10.35 和 $112.46 \pm$

8.15 , 均高于 WT 感染组(108.51 ± 10.70 , 80.43 ± 8.76)($P < 0.05$)。

2.3 LM 感染对小鼠脾脏 DC 细胞因子分泌的影响

感染 LM 后第 1 天, WT 组和 L-form 组小鼠脾脏 TNF- α^+ DC 比例较对照组升高($P < 0.05$)。见图 3。

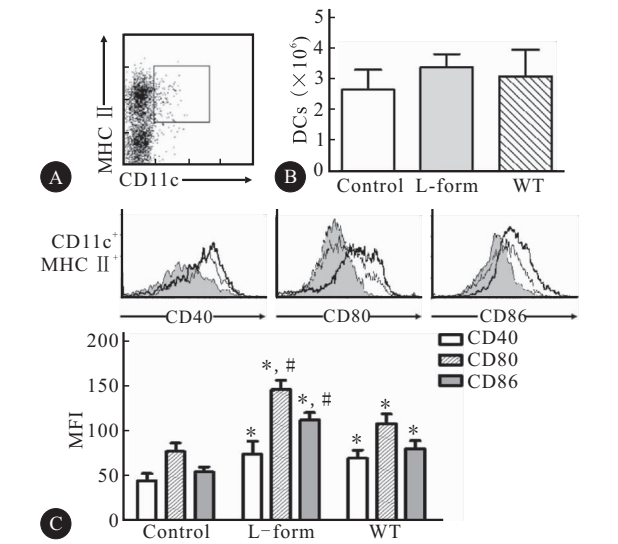


图 2 小鼠脾脏 DC 数量及共刺激分子的表达情况
Fig 2 The number of DCs and the expression of costimulatory molecules on DCs from spleen of C57BL/6 mice after LM infection

A: Cells were analyzed for CD11c $^+$ MHC II $^+$ (surface staining to identify splenic DCs) cell populations. Representative dot plots showing expression of CD11c and MHC II on cells from the spleen of a LM-infected mouse; B: The absolute DC number after infection; C: The histograms show the CD40, CD80 and CD86 expression on gated CD11c $^+$ MHC II $^+$ splenocytes from mice either untreated (Control) or given LM (WT) or L-form of LM (L-form). * $P < 0.05$, vs. control group; # $P < 0.05$, vs. WT group

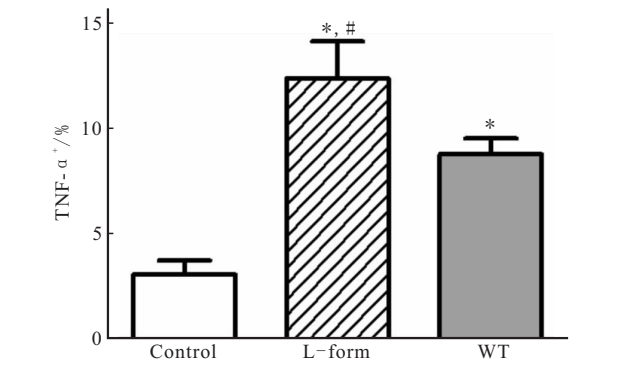


图 3 小鼠 LM 感染后脾脏 DC 细胞因子的分泌情况
Fig 3 The cytokine secretion of splenic DC from C57BL/6 mice after LM infection
* $P < 0.05$, vs. control group; # $P < 0.05$, vs. WT group

2.4 LM 感染对小鼠脾脏 T 细胞亚群及活化的影响

感染 LM 后第 7 天 3 组小鼠脾脏中 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞在淋巴细胞中所占比例差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 但 L-form 组 CD69⁺ T 细胞比例高于 WT 组 ($P<0.05$)。见图 4。

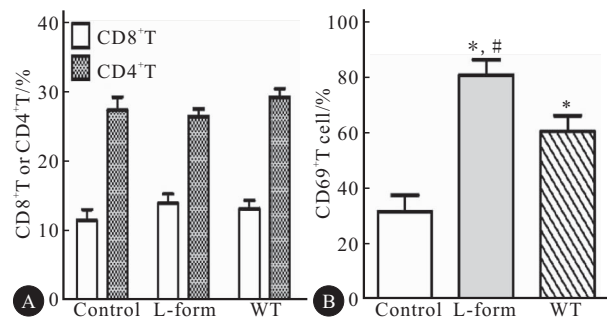


图 4 小鼠 LM 感染后脾脏 T 细胞亚群及活化情况

Fig 4 Flow-cytometric analysis of T cells from LM-infected mice
A: The population of CD4⁺ or CD8⁺ T cells; B: The expression of the activation marker CD69 on the splenic T cells of LM-infected mice was analyzed; * $P<0.05$, vs. control group; # $P<0.05$, vs. WT group

3 讨论

DC 主要起源于骨髓中 CD34⁺ 多潜能造血干细胞, 在组织中分布十分广泛。免疫稳定状态下, 分布于外周非淋巴组织的 DC 处于不成熟状态, 主要功能为抗原识别和摄取, 细胞表面表达一系列模式识别受体 (NLRs、TLRs 等) 与吞噬功能相适应, 不表达或低表达共刺激分子和黏附分子 (CD14、CD54、CD40、CD86)。感染发生时, iDC 会迁移向炎症部位, 摄取加工抗原并释放大量炎症因子如 TNF- α 等, 这些炎症因子进一步促进 APC 成熟和抗原递呈, 从而有效联结天然免疫和获得性免疫^[7]。

小鼠脾脏 DC 是研究最多的淋巴组织 DC。脾脏作为机体最大的免疫器官, 既可通过 T、B 细胞介导的免疫应答发挥特异性免疫功能, 也可通过吞噬作用实现非特异性免疫功能。研究发现免疫系统的激活很大程度上取决于吞噬过程^[8-9]。巨噬细胞吞噬后通过局部的炎症清除病原体, 不能有效激活初始免疫反应。与之不同的是, DC 能吞噬和消化病原体并递呈抗原肽, 有效激活初始 T 细胞及启动免疫应答, 是机体内联系先天性免疫和适应性免疫的专职吞噬性抗原呈递细胞。

电镜下观察发现, 小鼠脾脏 DC 表面有大量外

生型突起和分支, 缠绕编织成网状, 这种结构特点增加细胞与周围环境接触的范围, 使其在抗原捕获、吞噬等方面发挥更强大的作用, 与 DC 作为专职 APC 的功能相一致。吞噬 LM 后, 胞内丰富的线粒体和粗面内质网为吞噬作用提供能量以及溶酶体酶类物质, 被内化的细菌则将经过一系列胞内囊泡融合、转运, 完成抗原提呈过程。

细胞壁的肽聚糖是先天免疫识别细菌的重要靶标。DOMINGUE 等^[10]曾推测, 细菌缺乏细胞壁导致机体免疫识别低下, 这是 L 型感染病程慢性化的关键机制。然而, SCHNELL 等^[11]的研究结果并不支持这个假设, 他们发现 L 型 LM 在体内/外条件下均能诱导巨噬细胞炎症因子表达上调。我们在前期研究中也发现, L 型 LM 失去细胞壁, 暴露出细胞膜上的脂类能更有效地刺激 NKT 细胞增殖活化, 分泌 IFN- γ , 与 SCHNELL 等的研究结果相符。

本研究结果显示, L-form 感染组 DC TNF- α 的分泌量高于 WT 感染组。不同感染组之间细胞表面分子表达也存在差异, L 型 LM 感染 DC 表面 CD80、CD86 表达量均高于 WT 感染组。APC 表面 MHC-抗原肽复合物、抗原递呈相关分子与相应受体结合, 为 T 细胞活化提供双信号。T 细胞的活化状态可由检测细胞表面的活化标志物来完成, CD69 是 T 细胞活化时最早出现的标志物。我们在对 LM 感染后小鼠脾脏 T 淋巴细胞水平进行分析时发现: L-form 感染组小鼠脾脏 CD69⁺ T 细胞比例高于 WT 感染组。以上研究结果证实 L 型 LM 可介导更高水平的 TNF- α , 促进 DC 成熟以增强其抗原递呈的能力。

本研究利用透射电镜观察了 DC 吞噬过程的超微结构, 并比较了 DC 对 LM 细菌型和 L 型的免疫应答作用, 为利用 LM 构建活疫苗载体、阐明机体防御微生物感染机制等方面提供更多线索。近年来, 对于感染免疫应答过程中 DC 亚群的研究不断深入^[12], 不同 DC 亚群生物学特点、抗原加工及免疫应答能力方面存在差异。在下一步研究中, 将进一步探讨 LM 对不同 DC 亚群功能的影响, 为厘清 DC 与病原菌相互作用的细胞生物学基础提供依据。

参 考 文 献

[1] BRIERS Y, STAUBLI T, SCHMID M C, et al. Intracellular vesicles as reproduction elements in cell wall-deficient L-form bacteria. PLoS One, 2012, 7 (6): e38514

- [2012-06-06]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038514>.
- [2] DELL'ERA S, BUCHRIESER C, COUVÉ E, *et al.* *Listeria monocytogenes* L-forms respond to cell wall deficiency by modifying gene expression and the mode of division. *Mol Micro*, 2009, 73(2):306-322.
- [3] DIMOVA T, TERZIEVA A, DJEROV L, *et al.* Mother-to-newborn transmission of mycobacterial L-forms and V δ 2 T-cell response in placentobiome of BCG-vaccinated pregnant women. *Scientific Rep*, 2017, 7: 17366 [2017-12-12]. <https://www.nature.com/articles/s41598-017-17644-z>. doi:10.1038/s41598-017-17644-z.
- [4] 孔晓明. NKT 细胞在李斯特菌 L 型感染小鼠模型中的免疫应答研究. 蚌埠: 蚌埠医学院, 2012.
- [5] JULIANA M M, VIVIAN M R. Sensitivity of dendritic cells to microenvironment signals. *J Immunol Res*, 2016, 2016: 4753607 [2018-05-10]. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4753607>.
- [6] 程晓明, 王长征, 李淑平, 等. 小鼠脾脏树突状细胞的分离培养基鉴定. 第三军医大学学报, 2003, 25(23):2141-2142.
- [7] WICK M J. Monocyte and dendritic cell recruitment and activation during oral *Salmonella* infection. *Immunology Letters*, 2007, 112(2):68-74.
- [8] OLATUNDE A C, ABELL L P, LANDUYT A E, *et al.* Development of endocytosis, degradative activity, and antigen processing capacity during GM-CSF driven differentiation of murine bone marrow. *PLoS One*, 2018, 13(5): e0196591 [2018-05-10]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196591>.
- [9] PLATT C D, MA J K, CHALOUNI C, *et al.* Mature dendritic cells use endocytic receptors to capture and present antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(9):4287-4292.
- [10] DOMINGUE G J. Demystifying pleomorphic forms in persistence and expression of disease: are they bacteria, and is peptidoglycan the solution? *Discove Med*, 2010, 10(52):234-246.
- [11] SCHNELL B, STAUBLI T, HARRIS N L, *et al.* Cell-wall deficient *L. monocytogenes* L-forms feature abrogated pathogenicity. *Front Cell Infect Microbiol*, 2014, 4(60):1-11.
- [12] MEGE J L. Dendritic cell subtypes: a new way to study host-pathogen interaction. *Virulence*, 2016, 7(1):5-6.
- (2019-04-06 收稿, 2019-06-16 修回)
- 编辑 汤 洁