

文章编号:1000-7423(2003)-06-0357-04

## 泡球蚴感染 BALB/c 小鼠 IgG 亚类和细胞因子的动态观察

李富荣<sup>1</sup> 石佑恩<sup>2</sup> 史大中<sup>3</sup> D. A. Vuitton<sup>4</sup> P. S. Craig<sup>5</sup>

**【摘要】** 目的 观察小鼠感染泡球蚴后其体液免疫的动态变化。方法 BALB/c 小鼠感染泡球蚴后,分别于 2、4、8、12、16、20 及 25 wk(IgG 含量达高峰)取脾脏制备淋巴细胞悬液体外培养,分别以多房棘球蚴抗原(EmAg)、伴刀豆球蛋白 A (ConA) 刺激诱生可溶性白细胞介素 2 受体(IL-2R)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )及白细胞介素 1(IL-1);以植物凝集素(PHA)刺激诱生干扰素 $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )。检测培养上清中 IL-2R、TNF- $\alpha$ 、IL-1 及 IFN- $\gamma$  含量。各组均设 RPMI1640 培养液平行对照。检测血清中一氧化氮(NO)及特异性免疫球蛋白 G(IgG)亚类水平。结果 小鼠感染泡球蚴 16 wk 后 NO 水平明显升高,IgG、IgG1 和 IgG3 水平升高,IgG2a 及 IgG2b 呈低水平。感染后的前 12 wk,脾淋巴细胞以分泌 IL-2R 和 TNF- $\alpha$  为主,12 wk 后以 IFN- $\gamma$  为主、16 wk 后以 IL-1 为主。结论 小鼠感染泡球蚴后的前 8 wk 呈 Th1 反应。感染后期 Th2 反应逐渐增强。

**【关键词】** 泡球蚴; BALB/c 小鼠; 细胞因子; 免疫球蛋白 G 亚类; 一氧化氮

中图分类号:R383.33

文献标识码:A

### Kinetic Analysis of Cytokines and Immunoglobulin G Subclass in BALB/c Mice Infected with *Echinococcus alveolaris*

LI Fu-rong<sup>1</sup>, SHI You-en<sup>2</sup>, SHI Da-zhong<sup>3</sup>, DA Vuitton<sup>4</sup>, PS Craig<sup>5</sup>

(1 Clinical Medical Research Center, Shenzhen People's Hospital, Second Affiliated Teaching Hospital of Ji'nan University, Shenzhen 518020; 2 Department of Parasitology, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030; 3 Department of Parasitology, Lanzhou Medical College, Lanzhou 730000; 4 Centre Hospitalier Universitaire, Besancon, France; 5 Department of Biological Sciences, University of Salford(UK))

**【Abstract】 Objective** To observe the dynamic change of immune response in mice infected with *Echinococcus alveolaris* (AE) at difference period of time, and to explore hostalveo's immune regulation. **Methods** The infection lasted and was followed up for 25 weeks. The spleen cells from BALB/c mice infected with AE stimulated with EmAg and ConA or PHA *in vitro*. IL-2R, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 and specific IgG subclasses were determined by ELISA. NO was tested by chemical assay. **Results** NO level sharply rised in 16 weeks after BALB/c mice were infected with AE. The levels of IgG1 and IgG3 significantly increased 8 weeks after infection, and remained elevating throughout the period of observation. IgG3 showed slight increase, IgG2a and IgG2b appeared low level following infection. The production of IL-2R and TNF $\alpha$  increased significantly 8 weeks of infection, while IL-2R sharply decreased in 12 weeks of infection. During the period of 2-12 weeks of infection there was an increase in IL-1 secreting. The level of IL-1 and TNF $\alpha$  rapidly increased since 16 weeks post infection. High level of IFN- $\gamma$  was detected during the period of observation, and showed a peak at 12 weeks. **Conclusion** Th1 is the major response in the early stage of infection, which is replaced by Th2 response in later period of infection.

**【Key words】** *Echinococcus alveolaris*, BALB/c mice, cytokine, IgG subclass, NO

Supported in part by the STD-2 programme of the European Community, the Wellcome Trust, and the British Council's academic links with China scheme.

泡球蚴在宿主肝脏呈现酷似肿瘤的浸润性生长,可诱发宿主的体液免疫和细胞免疫<sup>[1]</sup>。研究证实体液免疫在控制寄生虫的生长中也发挥着重要作用<sup>[2]</sup>,在大多数患者血清发现特异性抗体,包括 IgG、IgA 及 IgM,同时 IgE 抗体与寄生虫囊泡周围的肉芽肿反应有关。

#### 抗原引起的特异性 T 细胞反应和免疫调节活动

基金项目:欧共体基金资助项目(STD-2)

作者单位:1 深圳市人民医院,暨南大学医学院第二附属医院临床医学研究中心,深圳 518020;

2 华中科技大学同济医学院寄生虫学教研室,武汉 43000;

3 兰州医学院寄生虫学教研室,兰州 730000;

4 法国贝尚松大学中心医院;

5 英国苏尔沃德大学生命科学院

被认为是受细胞因子调节的。它可影响 T 淋巴细胞, B 淋巴细胞等免疫应答。动态观察淋巴细胞分泌的细胞因子,可了解其在调节多房棘球蚴(AE)增殖中的作用<sup>[3]</sup>。由于泡球蚴病患者早期诊断困难,以及并发症的发生,结果的确切性也难以肯定。因此,继发性泡球蚴感染小鼠模型被用于研究感染宿主的免疫反应类型,了解宿主与寄生虫之间的关系。本研究动态观察了感染泡球蚴小鼠血清中特异性 IgG 亚类和一氧化氮(NO)水平,并检测脾淋巴细胞在体外受泡球蚴粗抗原(EmAg)、伴刀豆球蛋白 A (ConA) 或植物凝集素(PHA)刺激后产生的细胞因子水平,以探讨感染泡球蚴不同时间宿主的分子免疫调节机制。



## 材料与方 法

### 1 材 料

1.1 动物和动物模型 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所肖树华教授提供的第 4 代转种泡球蚴小鼠,处死后在无菌条件下取出泡球蚴,除去结缔组织等,剪碎,5 g AE 组织加入青霉素(100 U/ml)生理盐水 20 ml 制成 AE 悬液(含有活的原头节 100 个/ml)。35 只雌性 BALB/c 小鼠,8~9 周龄,体重 18~20 g(武汉生物制品研究所实验动物中心提供),分成 7 组,每组 5 只,每只腹腔注射 0.5 ml AE 悬液,分别于感染后 2、4、8、12、16、20 及 25 wk 时取脾脏备用。另 5 只健康小鼠作为对照。

1.2 抗原 AE 于 4 °C 22 kHz 超声处理 2 min,3 500 g 离心 10 min,上清即泡球蚴粗抗原(EmAg),稀释至工作浓度 1 mg/ml 备用。用于检测特异性抗体的棘球蚴抗原(CFCF)为绵羊肝脏细粒棘球蚴囊液,3 500 g 离心 10 min,上清液再经半饱和硫酸铵盐析获得纯抗原,蛋白质浓度为 40 mg/ml。

1.3 生物试剂 NO 检测试剂盒、TNF- $\alpha$ 、ELISA 试剂盒,均购自北京邦定生物医学公司。ConA 为 Sigma 公司产品,PHA 为广州医工所产品(10 mg/支),sIL-2R ELISA 试剂盒由白求恩医科大学免疫教研室提供,小鼠 IL-1、INF- $\gamma$  ELISA 试剂盒购自深圳晶美生物工程公司,山羊抗小鼠 IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 单克隆抗体购自 Sigma 公司,辣根过氧化物酶标记的驴抗山羊 IgG 购自华美生物工程公司。

### 2 方 法

2.1 特异性 IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b 及 IgG3 抗体的 ELISA 检测 按 Dreweck 等<sup>[4]</sup>方法进行。

2.2 NO 测定 按试剂盒说明书进行。

2.3 sIL-2R、TNF $\alpha$ 、IL-1 的诱生及测定 将 BALB/c 小鼠脾脏制成  $5 \times 10^6$ /ml 脾细胞悬液,加入 24 孔细胞培养板,1 ml/孔,分别加入 EmAg 10  $\mu$ g/ml、ConA 10  $\mu$ g/ml、EmAg 10  $\mu$ g + ConA 10  $\mu$ g/ml,体外培养。37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养 48 h,3 000 g 离心 10 min,收集上清液,-85 °C 冻存。检测 TNF- $\alpha$ 、sIL-2R、IL-1 ELISA,按试剂盒说明书进行。另设 RPMI1640 培养液平行对照孔。

2.4 IFN- $\gamma$  的诱生及测定 将脾细胞浓度调至  $5 \times 10^6$ /ml,加入 24 孔细胞培养液,1 ml/孔,分别加入 EmAg 10  $\mu$ g/ml、PHA 10  $\mu$ g/ml、EmAg 10  $\mu$ g + PHA 10  $\mu$ g/ml。培养 72 h,收集上清,-85 °C 保存。按照 ELISA 检测试剂盒说明书进行。另设 RPMI 1640 培养液平行对照孔。

## 结 果

### 1 血清中 IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b 及 IgG3 水平测定

特异性 IgG 抗体自感染泡球蚴后开始增加,在 4 wk 和 12 wk 时呈现小高峰,25 wk 时达高峰。IgG1 抗体自 8 wk 后开始升高( $\bar{x} \pm s$  值为  $0.696 \pm 0.256$ ),20 wk 时持续增高( $0.848 \pm 0.190$ ),25 wk 达高峰( $1.060 \pm 0.126$ )。IgG2a、IgG3 抗体水平呈缓慢上升趋势,IgG2b 抗体水平无明显变化(图 1)。对照组阴性血清 ELISA 检测 A<sub>490 nm</sub> 值,IgG 为  $38.0 \pm 6.3$ ,IgG1 为  $52.0 \pm 2.5$ ,IgG2a 为  $37.0 \pm 14.7$ ,IgG2b 为  $42.0 \pm 2.6$ ,IgG3 为  $29.0 \pm 3.0$ (图 1)。

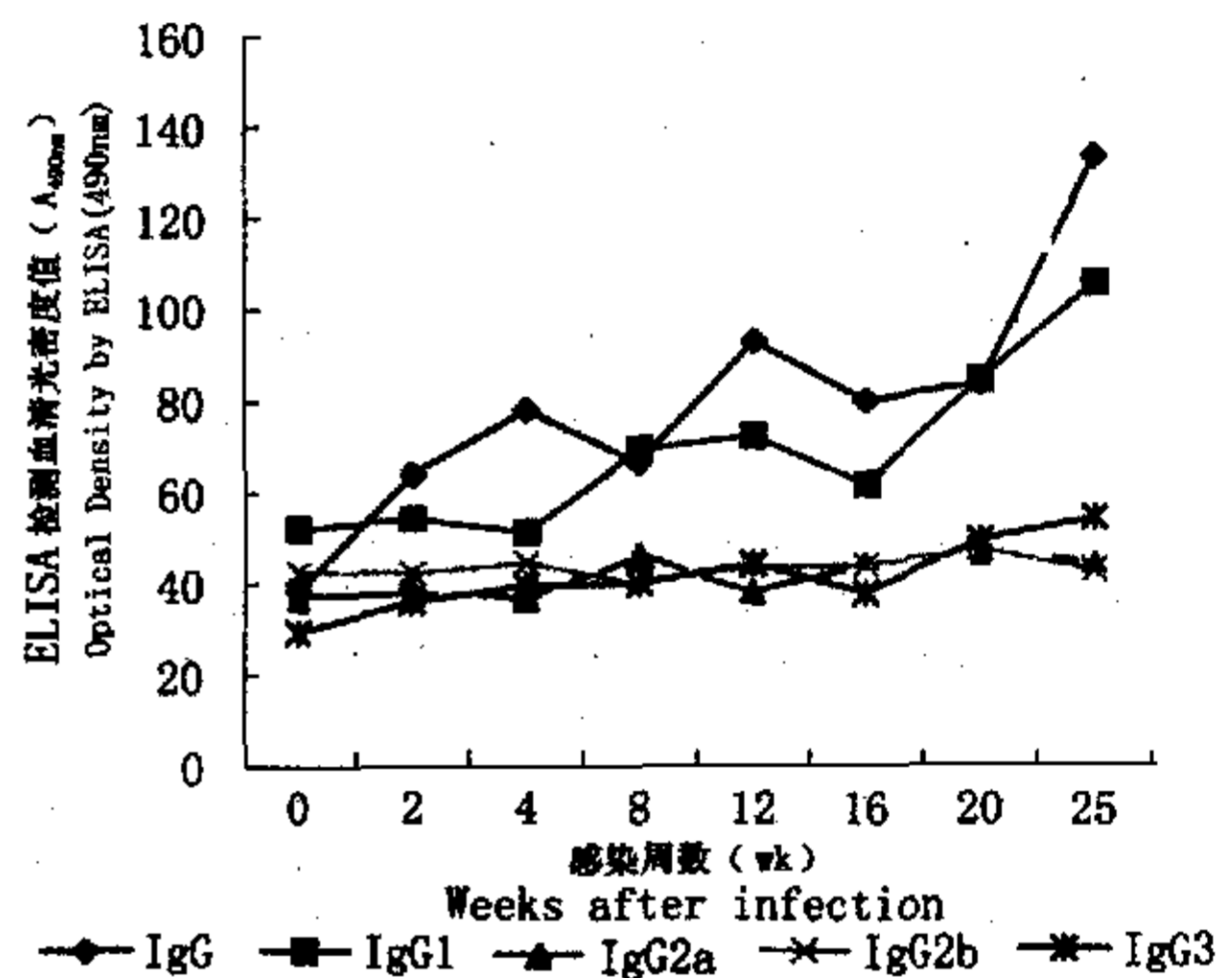


图 1 泡球蚴感染 BALB/c 小鼠血清中 IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 抗体水平动态测定

Fig. 1 Detection of serum IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG3 antibody level in BALB/c mice infected with *Echinococcus alvarius*

### 2 血清中 NO 含量测定

图 2 可见,小鼠感染泡球蚴早期,血清中 NO 水平有轻度升高,4 wk 时开始下降,16 wk 以后明显增高并维持在高水平。

### 3 sIL-2R、TNF $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 和 IL-1 的动态变化

3.1 sIL-2R 图 3 可见,感染泡球蚴小鼠脾淋巴细胞体外培养,在 EmAg、ConA 和 EmAg + ConA 刺激下分泌 IL-2。通过检测 sIL-2R 可了解脾淋巴细胞分泌 IL-2 的水平。结果,自感染开始 sIL-2R 即升高,8 wk 时达到高峰,后逐渐降低至正常水平。EmAg 刺激组 sIL-2 水平明显较 ConA 刺激组高,EmAg + ConA 刺激组则无明显增强作用。RPMI 1640 培养液对照组,在各感染不同时间 sIL-2 分泌量几乎无变化,始终维持在较低水平。



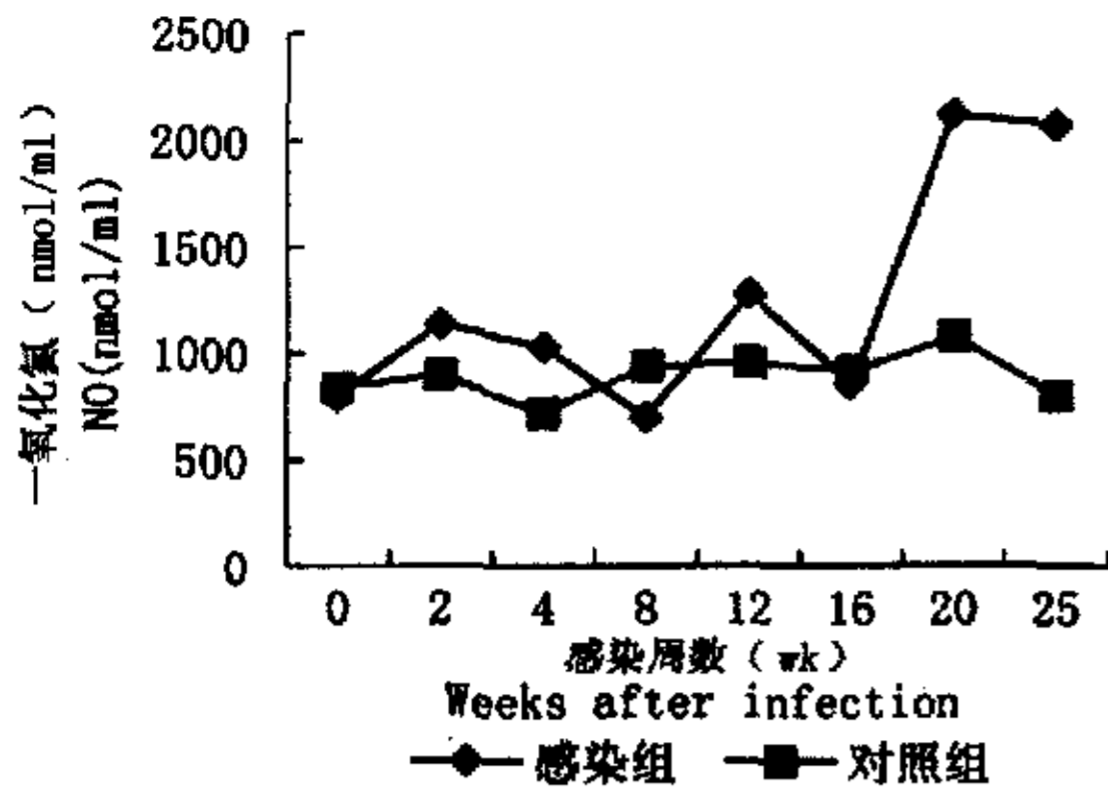


图 2 泡球蚴感染 BALB/c 小鼠血清中 NO 水平的动态测定  
Fig. 2 Detection of NO in serum of BALB/c mice infected with *Echinococcus alveolaris*

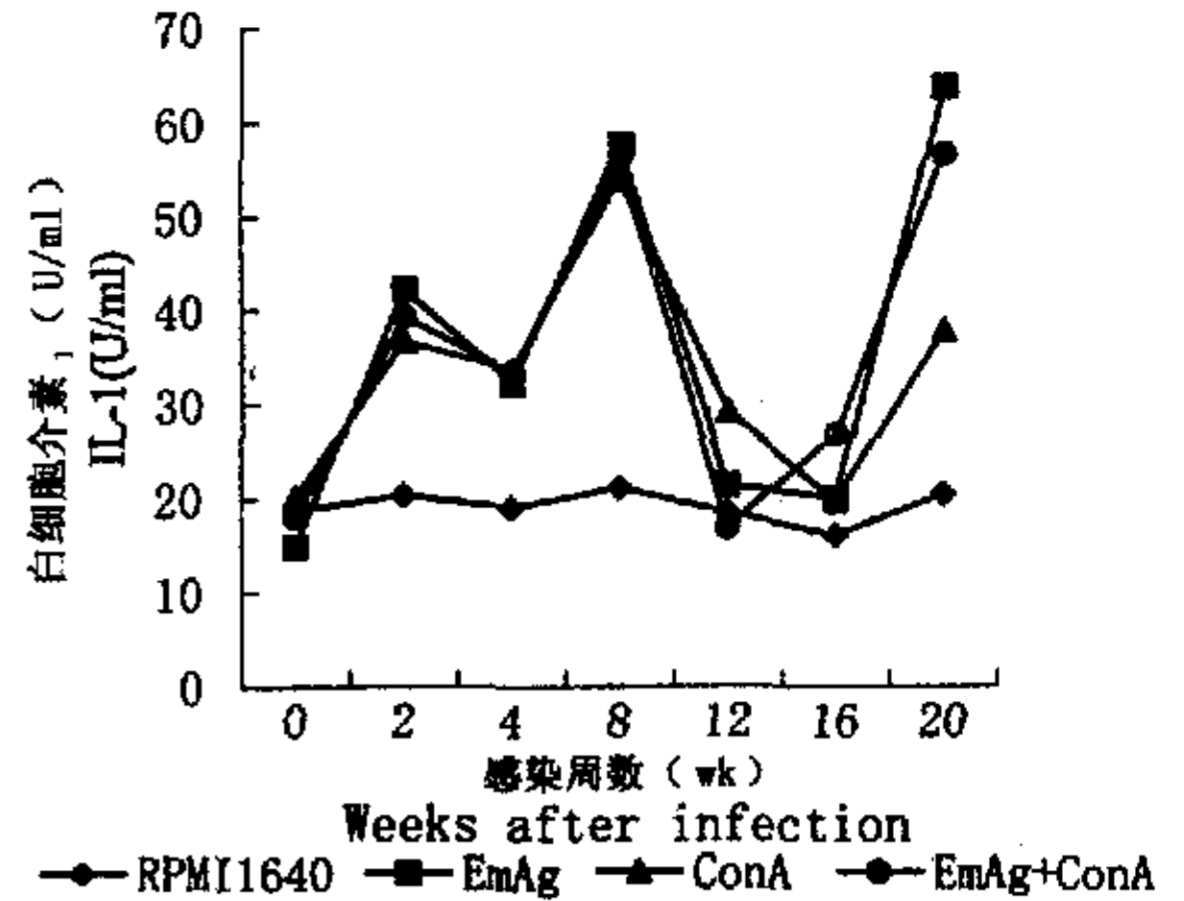


图 4 感染泡球蚴 BALB/c 小鼠脾淋巴细胞在体外受 ConA 及 EmAg 刺激 TNF-α 水平的动态变化  
Fig. 4 Dynamic changes in TNF-α levels secreted by *in vitro* ConA and antigen-stimulated splenic cells from BALB/c mice infected with *Echinococcus alveolaris*

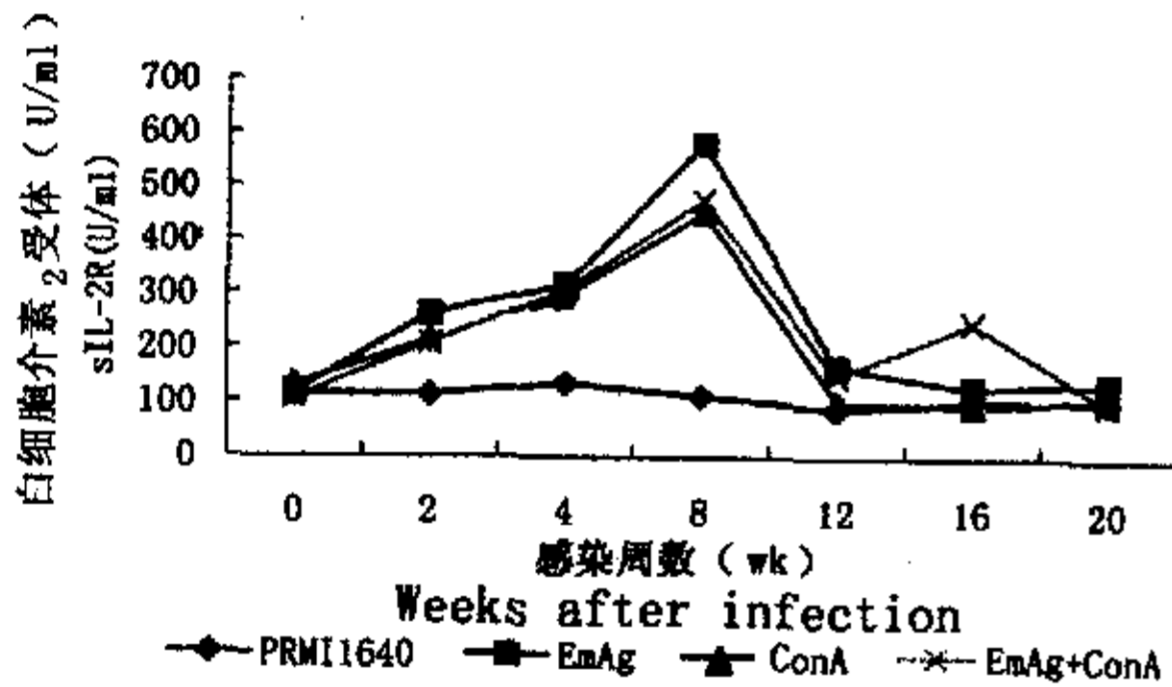


图 3 感染泡球蚴 BALB/c 小鼠脾淋巴细胞在体外受 ConA 及抗原刺激 IL-2R 水平的动态变化  
Fig. 3 Dynamic changes in IL-2R levels secreted by *in vitro* ConA and antigen-stimulated splenic cells from BALB/c mice infected with *Echinococcus alveolaris*

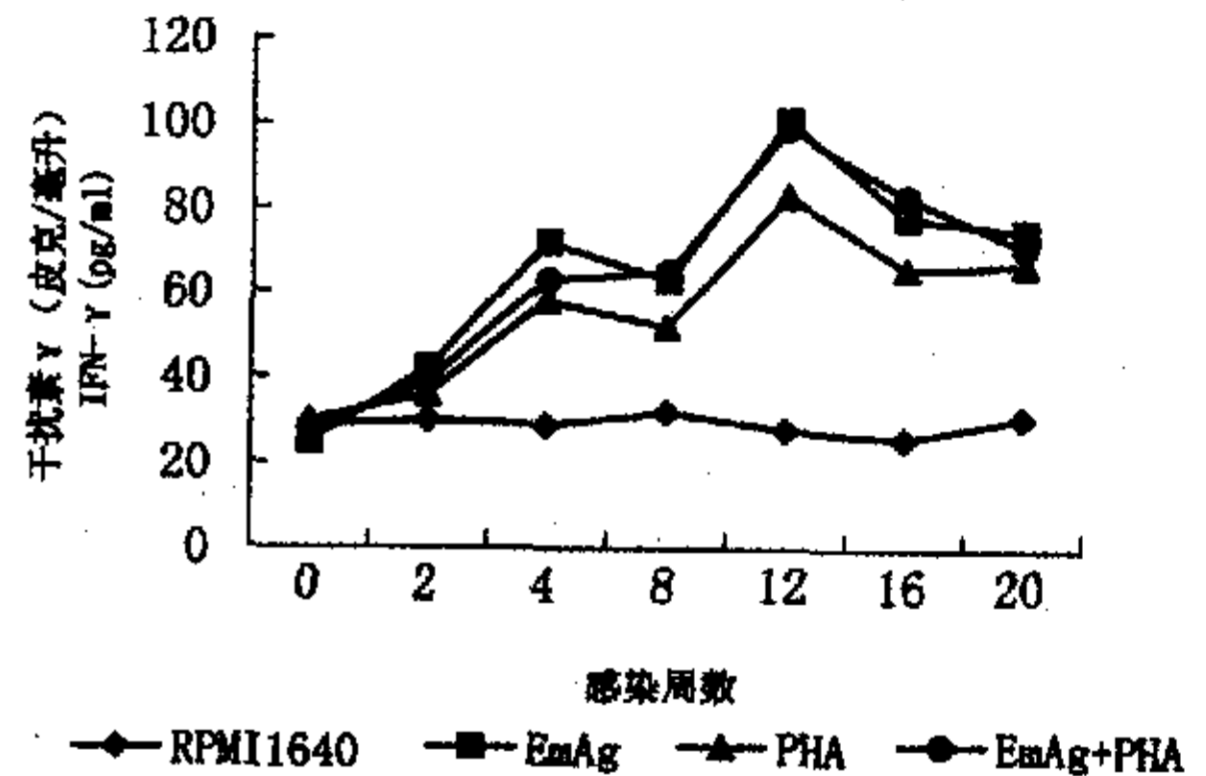


图 5 感染泡球蚴 BALB/c 小鼠脾淋巴细胞在体外受 PHA 及 EmAg 刺激 IFN-γ 水平的动态变化  
Fig. 5 Dynamic changes in IFN-γ levels secreted by *in vitro* ConA and antigen-stimulated splenic cells from BALB/c mice infected with *Echinococcus alveolaris*.

3.2 TNF-α 图 4 可见, 3 个刺激组, TNF-α 水平自感染后 2 wk 均开始上升, 在 2~4 wk 维持相对较高水平, 之后有所下降, 12 wk 又上升, 25 wk 达高峰。EmAg 刺激组 TNF-α 水平明显高于 ConA 刺激组, EmAg + ConA 刺激组加强作用不明显。RPMI 1640 对照组持续较低水平。

3.3 IFN-γ PHA 及 EmAg 刺激组, IFN-γ 水平自感染开始即上升, 4 wk 达小高峰, 之后至 8 wk 略下降。8 wk 后增高, 并于 12 wk 时达高峰, 后有所下降但仍维持在一个相对较高水平。EmAg 刺激组 IFN-γ 水平明显高于 PHA 刺激组, EmAg + PHA 刺激组无明显加强刺激作用。RPMI1640 对照组始终无明显变化(图 5)。

3.4 IL-1 图 6 表明 IL-1 的分泌自感染开始即增加, 在 2 wk 及 8 wk 时达到 2 个分泌高峰, 8 wk 后快速降至相对较低水平, 16 wk 后迅速升高, 20 wk 达到新的高峰。EmAg 刺激组较 ConA 刺激组分泌量高, EmAg

+ ConA 刺激组未见明显加强刺激作用。RPMI 1640 对照组, 分泌量仍维持较低水平。

## 讨 论

Liu 等<sup>[5]</sup>证实, 细粒棘球蚴原头节腹腔感染小鼠后, 特异性抗体 IgA 及 IgM 呈低水平, IgG 升高, 在 16 wk 升至最高并维持至 68 wk; 相似的结果在 Haralabidis 等<sup>[6]</sup>对细粒棘球蚴感染的小鼠中也观察到。本研究, IgG 在 12 wk 升至高水平并持续至 25 wk。已知 NO 通过直接和间接作用抑制和杀伤体内寄生虫, 是体内抗寄生虫感染的一种重要防御性介质, 另外还参与调节宿主与寄生虫间的平衡关系, 细胞因子 IFN-γ、TNFα 和 IL-1 等均可作用于巨噬细胞等而诱导产生 NO<sup>[6]</sup>。Bories 等<sup>[7]</sup>在对 C57BL/6J 小鼠感染泡球蚴后观察 80 d 尿中亚硝酸代谢产生的 NO 量, 未见增加。本文在感染 16 wk 前(140 d)也未见 NO 的增加, 但在



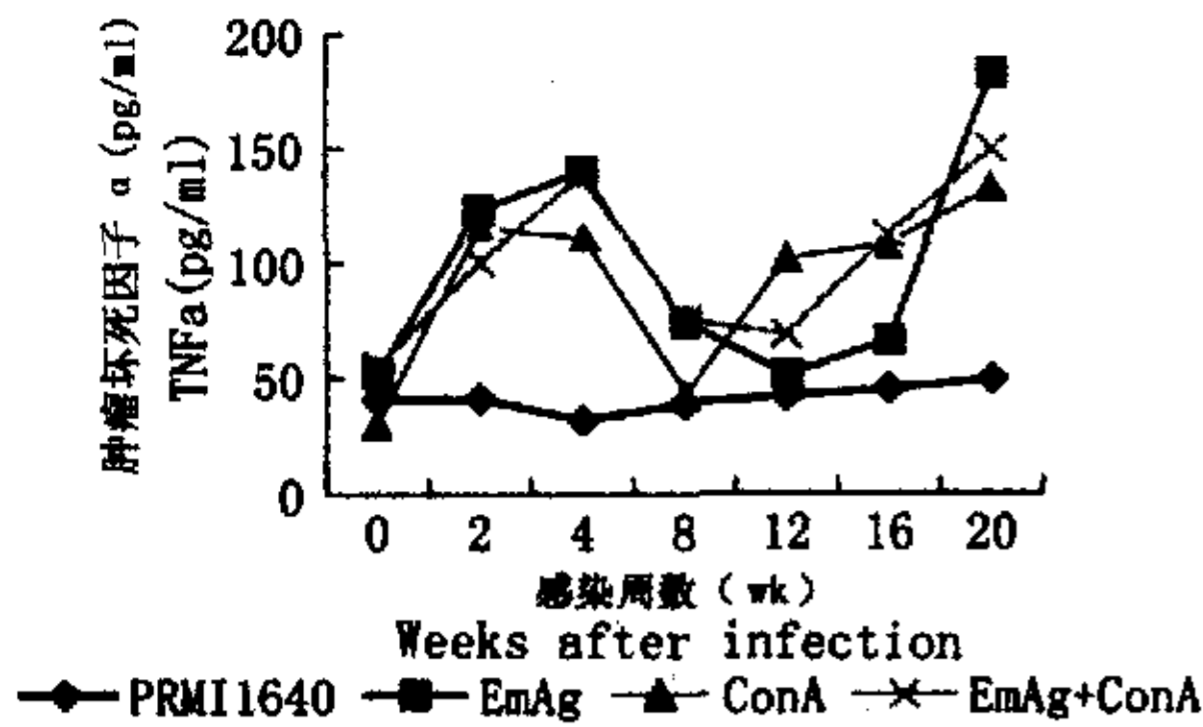


图 6 感染泡球蚴 BALB/c 小鼠脾淋巴细胞在体外受 ConA 及 EmAg 刺激 IL-1 活性的动态变化  
Fig. 6 Dynamic changes in IL-1 levels secreted by *in vitro* ConA and antigen-stimulated splenic cells from BALB/c mice infected with *Echinococcus alveolaris*

20 wk 开始 NO 迅速升高并维持高水平, 其机制尚不清楚, 可能与小鼠体内 20 wk 时 IFN- $\gamma$ 、TNF $\alpha$  和 IL-1 的迅速升高有关。宿主 NO 抗寄生虫感染可通过 NO 直接作用, 或 NO 与超氧阴离子 O<sup>2-</sup> 结合成过氧化亚硝酸根阴离子 (ONOO<sup>-</sup>) 而发挥作用<sup>[8]</sup>。

细胞因子是由 T 细胞产生, 在寄生虫病调节体液免疫和细胞免疫中发挥着重要作用。IL-2 和 IFN- $\gamma$  为 T 细胞亚群 CD4<sup>+</sup> Th1 释放的细胞因子, 在观察中发现, 泡球蚴感染小鼠脾细胞在 ConA 及 EmAg 刺激后产生的 IL-2 的拮抗蛋白 IL-2R 在 2 wk 开始升高, 8 wk 达到高峰; IFN- $\gamma$  在 4 wk 开始升高, 12 wk 达高峰; 后均开始下降, 在 20 wk 时均降至低水平。这可能表明随着 CD4<sup>+</sup> 细胞分化为 Th2 型, 并产生相应的细胞因子 IL-4、IL-5 和 IL-10, 它们均对 Th1 起下调作用, 致使 IL-2R、IFN- $\gamma$  诱生水平明显受到抑制。

已有实验表明, Th1 细胞被激活后产生的细胞因子 IFN- $\gamma$  激活巨噬细胞产生 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1<sup>[9]</sup>。在本实验中发现泡球蚴感染后期, TNF $\alpha$  和 IL-1 在 16 wk 后诱生水平迅速升高, 并持续高水平, 与 IFN- $\gamma$  有相关关系。IL-1 是 T 细胞激活的协同刺激因子, 可使 T 细胞产生 IL-2 及表达 IL-2R, IL-1 可直接促进 B 细胞增殖和分化, 亦可通过促进 Th2 细胞产生 IL-4、IL-5 和 IL-6 等而间接作用 B 细胞。TNF $\alpha$  可刺激单核/巨

噬细胞分泌 IL-1, 从而间接参与 T、B 细胞激活, 可诱导 B 细胞产生 IgG2a。本文检测 IgG2a 特异性抗体结果相反, 在感染前 12 wk IgG2a 在血清中无明显改变, 而特异性 IgG1 和 IgG3 水平明显增加, 这与 Haralabidis 等<sup>[6]</sup> 观察结果一致。因此, 在泡球蚴感染的慢性阶段, Th1 反应逐渐下降被 Th2 的反应代之, 感染小鼠血清中特异性 IgG1、IgG3 和 IgG 水平升高, 而 IgG2a 水平低下和 IFN- $\gamma$  水平的增高, 表明 Th1 类型反应在继发性泡球蚴感染小鼠似乎是次要的, 呈现强 Th2 和弱 Th1 反应。以上资料表明, 在继发性小鼠泡球蚴感染过程中, 第 8 周前以 Th1 反应为主, 形成保护性免疫, 后逐渐被 Th2 反应所取代, 16 ~ 20 wk 后 Th2 反应为主, 有利于泡球蚴增殖。

在泡球蚴感染免疫中, T 细胞亚群之间、细胞因子之间以及 T 细胞亚群与细胞因子之间既相互联系、相互作用, 又相互制约, 随着 T 细胞亚群的结构与功能在分子水平上进一步阐明, 必将推动对泡球蚴病免疫机制的研究。

#### 参 考 文 献

- [1] Bauder B, Auer H, Schilcher F, et al. Experimental investigations on the B and T cell immune response in primary alveolar echinococcosis [J]. *Parasite Immunol*, 1999, 21: 409 - 421.
- [2] Wen H, Craig PS. Immunoglobulin G subclass responses in human cystic and alveolar echinococcosis [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1994, 51: 741 - 748.
- [3] Godot V, Harraga S, Beurton I, et al. Resistance/susceptibility to *Echinococcus multilocularis* infection and cytokine profile in humans. I. Comparison of patients with progressive and abortive lesions [J]. *Clin Exp Immunol*, 2000, 121: 484 - 490.
- [4] Dreweck CM, Luder CG, Soboslay PT, et al. Subclass specific serological reactivity and IgG4 specific antigen recognition in human echinococcosis. *Trop Med Int Hlth*, 1997, 2: 779 - 787.
- [5] Liu D, Lightowers MW, Rickard MD. Examination of murine antibody response to secondary hydatidosis using ELISA and immunoelectrophoresis [J]. *Parasite Immunol*, 1992, 14: 239 - 248.
- [6] Haralabidis S, Karagouni E, Frydas S, et al. Immunoglobulin and cytokine profile in murine secondary hydatidosis [J]. *Parasite Immunol*, 1995, 17: 625 - 630.
- [7] Bories C, Liance M, Bories PN, et al. No evidence for increased production of nitric oxide in C57BL/6J mice infected with *Echinococcus multilocularis* [J]. *Ann Trop Med Parasitol*, 1996, 90: 641 - 644.
- [8] 孔宪寿. 一氧化氮和寄生虫感染 [J]. *国外医学寄生虫病分册*, 1996, 23: 244 - 248.
- [9] Dreweck CM, Soboslay PT, Schulz-Key H, et al. Cytokine and chemokine secretion by human peripheral blood cells in response to viable *Echinococcus multilocularis* metacystode vesicles [J]. *Parasite Immunol*, 1999, 21: 433 - 438.

(收稿日期: 2002-05-22 编辑: 富秀兰)