

【论著】

文章编号:1000-7423(2004)-01-0029-04

# 干扰素- $\gamma$ 对感染日本血吸虫小鼠 GTP 酶表达的影响

季旻珺 蔡晓萍 苏川 吴海玮 李光富  
王勇 朱翔 王新军 张兆松 吴观陵\*

**【摘要】** 目的 探讨干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )对小鼠抗日本血吸虫感染保护力的机制。方法 采用高密度寡核苷酸芯片(Affymetrix 芯片)结合半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法,对 BALB/c 小鼠感染日本血吸虫过程中脾脏 CD4<sup>+</sup> T 细胞进行基因转录水平分析,获得 IFN- $\gamma$  诱导鸟苷三磷酸(GTP)酶家族成员的变化图谱;并对其中 IFN- $\gamma$  诱导 GTP 酶(IGTP)进行分子克隆和序列测定。结果 小鼠自然感染日本血吸虫过程中,IFN- $\gamma$  诱导 GTP 酶家族成员的基因表达呈现特征性变化,感染后 3 wk,基因表达上调或变化不显著;感染后 6 wk 至 13 wk,基因表达持续受到抑制。这种变化特征经 RT-PCR 方法所证实。从小鼠脾脏可扩增出 IGTP 全长基因,但退火温度降低时出现 IGTP 基因转录缺失。结论 小鼠急性感染日本血吸虫后,体内 IFN- $\gamma$  通路逐步受到抑制,针对血吸虫感染的依赖 IFN- $\gamma$  的抗感染保护力下降。

**【关键词】** 日本血吸虫;干扰素- $\gamma$ ;鸟苷三磷酸酶

中图分类号:R392.11

文献标识码:A

## Studies on the Characteristic of Interferon- $\gamma$ Mediating Resistance in Mice Infected with *Schistosoma japonicum*

JI Min-jun, CAI Xiao-ping, SU Chuan, WU Hai-wei, LI Guang-fu, WANG Yong,  
ZHU Xiang, WANG Xin-jun, ZHANG Zhao-song, WU Guan-ling\*

(Institute for Molecular Biology of Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the molecular characteristic of interferon- $\gamma$  mediating protective immunity against schistosomiasis japonica in mice. **Methods** CD4<sup>+</sup> T cells were isolated from spleens of mice infected with *Schistosoma japonicum* at different time-points. The cDNA microarray technique combined with RT-PCR was used to explore IFN- $\gamma$  inducible GTPase family gene expression profile of CD4<sup>+</sup> T cell. IGTP, a representative IFN- $\gamma$  inducible GTPase having vital anti-infection activity, was amplified from spleen of BALB/c mice using RT-PCR, then cloned into pGEM(r)-T easy vector for sequencing. **Results** IFN- $\gamma$  inducible GTPase family had the similar characteristic over the course of *S. japonicum* infection. The gene expression of these members were up-regulated or had little change at 3 wk post-infection, then down-modulated from 6 wk to 13 wk post-infection, which was also confirmed by RT-PCR. As for IGTP, two inserts were identified after sequencing. One was 142 bp shorter than another, but the fragment was lost due to low annealing temperature. **Conclusion** There is a dramatic inhibition of IFN- $\gamma$  pathway and IFN- $\gamma$ -dependent anti-infective immunity during the infection of *S. japonicum*.

**【Key words】** *Schistosoma japonicum*; interferon- $\gamma$ ; guanosine triphosphatase(GTPase)

Supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 30100156)

\* Corresponding author, E-mail: glwu@njmu.edu.cn

干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 具有广泛的生物学功能,如免疫调节、抗病毒、抗肿瘤、调控细胞增殖和分化等,其功能的多样性是通过诱导多种 IFN 刺激基因的表达而实现的<sup>[1]</sup>。IFN- $\gamma$  作为 Th1 型免疫应答中重要的代表性细胞因子,参与日本血吸虫的抗感染保护力。最直接的证据来自辐照尾蚴免疫实验动物诱导产

生高水平 IFN- $\gamma$ , 获得高达 80% 的保护力<sup>[2]</sup>。IFN- $\gamma$  对日本血吸虫抗感染机制的研究受到更多学者的关注,但是对 IFN- $\gamma$  作用的下游分子及其涉及的效应机制仍知之甚少。对胞内感染的研究发现,IFN- $\gamma$  诱导的鸟苷三磷酸(GTP)酶家族是 IFN- $\gamma$  通路中重要的抗感染因子,其家族成员包括 IFN- $\gamma$  诱导 GTP 酶(interferon gamma induced GTPase, IGTP), T 细胞特异性蛋白(TGTP),类 G 蛋白 47(LRG47),预测 GTP 结合蛋白 47(IRG47),IFN 诱导高尔基体和内质网相关的相对分子质量(Mr)为 47 000 的 GTP 酶(IIGP)和 IFN- $\gamma$  诱导 GTP 酶(interferon-ginduced

基金项目:国家自然科学基金(No. 30100156)

作者单位:南京医科大学病原生物学系,南京 210029

\* 通信作者 E-mail: glwu@njmu.edu.cn

GTPase, GTP1)。它们均能编码 47 000 ~ 48 000 蛋白, 其中包含 GTP 结合序列, 有可能参与抗原或细胞因子等的细胞内处理和转运过程。Gregory 等<sup>[3]</sup>发现 IGTP 在 IFN- $\gamma$  的作用下能够表达于免疫细胞及非免疫细胞, 能够激发这两类细胞共同发挥生物学作用。本课题组采用高密度寡核苷酸芯片 (Affymetrix 芯片) 研究小鼠自然感染日本血吸虫过程中 CD4<sup>+</sup>T 细胞的应答特征时, 观察到小鼠体内 IFN- $\gamma$  诱导 GTP 酶家族成员的基因转录水平随着血吸虫感染的进程出现特征性变化, 并对其中 IGTP 的分子克隆进行了初步研究。

## 材料与方法

### 1 日本血吸虫自然感染小鼠模型

取 8 wk 雌性 BALB/c 小鼠 (购自中科院上海实验动物中心), 按常规经腹部皮肤感染日本血吸虫尾蚴 20 条/只, 清洁级饲养。分别于感染后 0、3 wk (虫卵沉积前, 感染早期)、6 wk (虫卵大量沉积, 感染急性期) 和 13 wk (病理上显示进入感染慢性期) 剖杀小鼠。

### 2 磁性细胞分选法分离、纯化小鼠脾 CD4<sup>+</sup>T 细胞

无菌取脾, 制成单个核细胞悬液。利用吸附单克隆抗体-磁珠分离系统 (MACS) 分离、纯化 CD4<sup>+</sup>T 细胞。磁珠为 mouse CD4 (L3T4) MicroBeads (购自德国 Miltenyi Biotech 公司)。按说明书操作, 以阳性选择方式分离获得 CD4<sup>+</sup>T 细胞, 纯化后与 FITC 标记大鼠抗小鼠 CD4 单克隆抗体 (购自美国 PharMingen 公司) 共孵育, 流式细胞仪鉴定 CD4<sup>+</sup>T 细胞的纯度 >92%。

### 3 高密度寡核苷酸微阵列分析 CD4<sup>+</sup>T 细胞基因表达

取感染后 0、3、6 和 13 wk 小鼠各 5 只, 取脾按组混合, 共 4 个样本。分离、纯化小鼠脾 CD4<sup>+</sup>T 细胞, 用 TRIzol<sup>®</sup> Reagent (购自美国 Gibco-BRL 公司) 提取总 RNA。以 15  $\mu$ g 总 RNA 为模板合成双链 cDNA, 采用 BioArray<sup>™</sup> High Yield<sup>™</sup> RNA transcript labeling Kit 体外转生成生物素标记的 cRNA; 再经过纯化和片段化处理后, 取 30  $\mu$ g cRNA 与 GeneChip<sup>®</sup> Murine Genome U74Av2 芯片 (美国 Affymetrix 公司) 杂交。洗脱后, 用链酶亲和素-藻红蛋白进行染色; 最后经 the agilent geneArray scanner 扫描检测信号。数据分析在 the microarray suite software version 5.0 上进行。

### 4 逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 法验证 IGTP、TGTP 和 IRG47 基因的相对表达水平

取感染后 0、3、6 和 13 wk 小鼠各 5 只, 分离、纯化各鼠脾 CD4<sup>+</sup>T 细胞。用 TRIzol<sup>®</sup> Reagent 提取总 RNA。取 1  $\mu$ g RNA, 在 AMV 逆转录酶、Oligo (dT)<sub>15</sub> 引物 (购自美国 Promega 公司) 的作用下, 反转录成单链 cDNA。取 2  $\mu$ l cDNA 为模板, 加入各基因的特异性引物, 在 Tag 酶作用下, 进行聚合酶链反应 (PCR)。同时扩增 GAPDH 作为内参照。各取 7  $\mu$ l PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 在 Gel1000 凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司) 上扫描各特异性条带的灰度, 计算同一标本中 IGTP、TGTP、IRG47 与 GAPDH 的灰度比值 (即相对表达值)。数据在 SPSS 10.0 软件下处理, 采用单因素方差检验 (ANOVA) 分析组间差异。

### 5 BALB/c 小鼠 IGTP 全长基因的获取和序列测定

根据 GenBank 公布的 C57BL/6 小鼠的 IGTP 全长序列 (基因登录号: U53219), 设计两端引物, 以 BALB/c 小鼠脾脏的 cDNA 为模板, 在 pfu DNA 聚合酶作用下, PCR 扩增 BALB/c 小鼠的 IGTP 全长基因。将 IGTP 的 PCR 产物加 “A” 尾, 依说明书克隆入 pGEM<sup>®</sup>-T easy 质粒载体, 即 “T-A 克隆”。筛选阳性克隆 (显示白斑) 后, 抽提质粒, 以 T7、SP6 为测序引物, 在 ABI 377 全自动 DNA 测序仪上, 应用四色荧光、双脱氧末端终止法进行序列测定。测序结果与 GenBank 登录的 C57BL/6 小鼠 IGTP 基因序列进行比对分析。

## 结果

### 1 基因表达谱芯片分析 IFN- $\gamma$ 诱导 GTP 酶家族的表达

对四张芯片进行标准化处理后, 比对芯片中相应的基因信号, 结果发现 IFN- $\gamma$  诱导 GTP 酶家族中的 6 个成员在日本血吸虫感染过程中呈现相同或相似的变化趋势 (表 1)。即在感染 3 wk, 基因表达水平升高或变化不显著, 从感染 6 wk 至感染 13 wk, 基因表达水平呈 “下降” 曲线, 至感染 13 wk, 基因表达受到明显的抑制。

### 2 RT-PCR 法验证 IGTP、TGTP 和 IRG47 在不同感染时期中的表达

2.1 RT-PCR 方法扩增出特异性条带 根据 IGTP、TGTP、IRG47 和 GAPDH 的引物进行 PCR 扩增, 电泳显示在预期的位置出现特异性条带 (图 1)。引物序列及相应扩增片段长度见表 2。

2.2 不同感染时间的比较分析 特异性 PCR 扩增产物电泳后, 经 Gel Doc 1000 凝胶成像系统扫描并计算同一标本中 IGTP、TGTP、IRG47 与 GAPDH 的灰

度比值, 比较不同感染时期样本中 IGTP、TGTP 和 IRG47 的相对表达值。从表 3 可看出, IGTP、TGTP

和 IRG47 在感染后 3 wk 表达增强, 随着感染进程, 表达逐步受到抑制, 与基因芯片的结果基本一致。

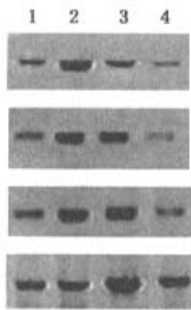
表 1 IFN- $\gamma$  诱导 GTP 酶家族在日本血吸虫感染过程中的基因转录水平

基因登录号 GenBank accession No.	基因描述 Gene description	感染后不同时间小鼠信号强度 Intensity at different time-points PI			
		0 wk	3 wk	6 wk	13 wk
L38444	TGTP	5 918.90	5 432.60	2 569.70	1 934.70
M63630	IRG47	3 082.10	3 761.20	2 151.80	1 929.80
U53219	IGTP	2 286.20	3 746.90	1 684.20	1 503.10
AJ007972	GTP1	1 374.40	1 653.90	819.60	671.00
AJ007971	HGP	775.50	2 959.40	1 128.00	702.10
U19119	LRG47	645.90	676.90	416.40	443.90

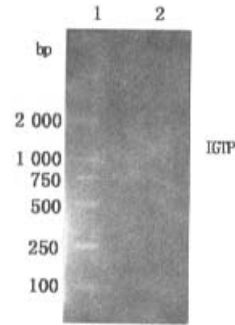
注: \* PI 感染后 Note: PI post infection

表 2 引物序列及相应扩增片段长度列表  
Table 2 The sequences of specific primers and the length of specific amplicons

扩增产物 Amplification product	引物序列 Sequence of specific primers	产物长度 Length of product (bp)
GAPDH	5'-GGT CAC CAG GGC TGC CAT TT-3'	928
	5'-GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA GC-3'	
TGTP	5'-CCC AGC CCA CAA GCG TCA CGT A-3'	386
	5'-CTG CAG CGA CTG GCC CAC CA-3'	
IRG47	5'-GGA CCT GCC TGG GAC TGG GAC A-3'	393
	5'-CGC TTG TGC CCA GGG AGC TCC T-3'	
IGTP	5'-ATG GAT TTA GTC ACA AAG TTG C-3'	1 272
	5'-TCA GTG AAT TTC GGG AGG GAG-3'	



小鼠感染后 1 0 wk 2 3 wk 3 6 wk 4 13 wk  
1 0 wk PI 2 3 wk PI 3 6 wk PI 4 13 wk PI  
图 1 不同感染时期 IGTP、TGTP 和 IRG47 特异性扩增产物的电泳图  
Fig.1 Specific amplicons of IGTP, TGTP and IRG47 from RNA samples of different time-points post-infection (PI)



1 DNA 标志物 2 扩增的 PCR 产物  
1 DNA marker DL 2000 2 PCR product of IGTP  
图 2 以 RT-PCR 方法扩增 BALB/c 小鼠 IGTP 基因的电泳结果  
Fig.2 The band of IGTP amplified from spleen of BALB/c mice using RT-PCR

表 3 RT-PCR 法分析 IGTP、TGTP 和 IRG47 在日本血吸虫不同感染时期中的相对表达 (样本数 = 5)

Table 3 Band intensity of semi-quantitative RT-PCR for IGTP, TGTP and IRG47 genes in mice infected with *S. japonicum* (No. samples = 5)

基因登录号 GenBank accession no.	基因描述 Gene description	不同感染时期样品与 GAPDH 的比值 Ratio to the band intensity of GAPDH ( $\bar{x} \pm s$ )			
		0 wk	3 wk	6 wk	13 wk
U53219	IGTP	0.33 $\pm$ 0.08	0.66 $\pm$ 0.10*	0.31 $\pm$ 0.06	0.20 $\pm$ 0.03
L38444	TGTP	0.47 $\pm$ 0.08	0.80 $\pm$ 0.24*	0.43 $\pm$ 0.13	0.27 $\pm$ 0.08**
M63630	IRG47	0.76 $\pm$ 0.08	0.90 $\pm$ 0.20	0.59 $\pm$ 0.08	0.45 $\pm$ 0.07**

注: \* 感染 3 wk 与感染 0 wk 相比, 基因表达增加有显著性改变 ( $P < 0.05$ ) \*\* 感染 13 wk 与感染 0 wk, 基因表达降低有显著性改变 ( $P < 0.05$ ) Note: \*  $P < 0.05$ , 3 wk PI group vs 0 wk PI group \*\*  $P < 0.05$ , 13 wk PI group vs 0 wk PI group

### 3 聚合酶链反应扩增 IGTP 全长基因及序列测定

3.1 聚合酶链反应扩增 IGTP 全长基因 根据 C57BL/6 小鼠 IGTP 全长基因两端设计引物, 以 BALB/c 小鼠脾脏 cDNA 作为模板, 进行 PCR 扩增。56  $^{\circ}$ C 扩增, 电泳结果显示在  $>1\ 000$  bp 处出现两条相邻的泳动条带 (图 2)。

3.2 IGTP 序列测定与分析 IGTP 重组 T 载体中的插入片段进行测序后, 与 GenBank 登录的 C57BL/6 小鼠的 IGTP 基因序列 (U53219) 相比对, 发现一个 PCR 扩增序列与 C57BL/6 小鼠的序列基本一致, 仅存在几个核苷酸的差异, 从起始密码子至终止密码子共有 1 272 bp, 认为这是正确的 BALB/c 小鼠的 IGTP

序列。提交 GenBank 获取相应的登录号 AY225483。

另一个 PCR 扩增产物在起始密码子下游 172 bp 处存在 142 bp 的碱基缺失,其余的序列与 U53219 基本一致。缺失的 142 bp 序列如下:

```
172 bp → ggtaaggcgg gtagacagagg gaaattitaca gaaagtgata ggrtatgtca
          aagatgaaat tcagagtaag tcaagataca gagtaaagat tctgtgact
          ggggactctg gcaatggcat gtcaatcttc atcaatgcc tta ← 313 bp
```

对缺失的 142 bp 碱基在 DNASIS 软件中进行二级结构预测,显示 142 bp 碱基的首尾能够形成大环。实验发现,退火温度较低时,主要表现为缺失基因的存在;随着退火温度渐高,正确 IGTP 基因得以扩增。

## 讨 论

IFN 刺激基因由 IFN 诱导产生,处于 IFN 通路的不同环节,表达功能性蛋白质,以体现 IFN 效应的多样性。以往的研究表明 IFN- $\gamma$  诱导 GTP 酶家族是 IFN- $\gamma$  刺激基因中参与宿主防御功能的重要效应因子。本研究首次采用高密度寡核苷酸芯片研究 CD4<sup>+</sup> T 细胞的应答特征时,观察到小鼠自然感染日本血吸虫过程中 IFN- $\gamma$  诱导 GTP 酶家族成员的基因表达呈现特征性变化,并且这种变化特征可由 RT-PCR 方法所证实。结果提示在日本血吸虫感染早期,这些基因表达上调,这与针对血吸虫童虫或成虫产生 Th1 型优势应答的时间相符合<sup>[4]</sup>,其表达受到 IFN- $\gamma$  的调控。从感染急性期直至慢性期,基因的表达持续受到抑制,说明在日本血吸虫卵大量出现以后,宿主体内的 IFN- $\gamma$  通路逐步受到抑制,这种抑制状态则反映出宿主针对血吸虫感染的依赖 IFN- $\gamma$  的抗感染保护力下降。

芯片结果中反映出 IFN- $\gamma$  诱导 GTP 酶家族中各基因的信号强度有较大的差异,可以推测这些 IFN- $\gamma$  诱导的 GTP 酶在对抗血吸虫感染中的作用可能是不同的。尽管这些基因均具有抗病原体感染的能力,但是它们调节抗病原体感染的途径并非相同,表现为抗感染的作用时效不同,并且针对不同的疾病谱。Gregory 等<sup>[5]</sup>研究发现,IGTP 基因缺陷的小鼠对弓形虫的感染完全失去了抵抗力,而野生型小鼠在感染后继续存活,说明 IGTP 是重要的抗弓形虫感染的效应分子。LRG47 也能有效限制弓形虫的早期感染,而 IRG47 在弓形虫感染的晚期才发挥部分抗性<sup>[6]</sup>。IGTP 不能有效清除李斯特菌病毒,而 LRG47 基因缺陷小鼠完全失去了对李斯特菌感染的抗力,说明 LRG47 基因在抵抗李斯特菌感染时扮演重要的角色。LRG47 基因似乎对于控制胞内感染是有效的,但是在日本血吸虫感染过程中,LRG47 基因的表达水平是最低的,抗感染的作用可能最微弱。因此,IFN- $\gamma$

可能是通过不同的分子介质来介导抵抗胞内感染(如:病毒、胞内菌、原虫)和胞外感染(如:蠕虫)的效应。

IFN- $\gamma$  诱导 GTP 酶家族在感染 3 wk 的表达水平升高,提示在日本血吸虫感染早期,激发宿主 IFN- $\gamma$  效应对免疫控制血吸虫病应当是积极有效的,因此对 IFN 通路中具有抗感染作用的分子研究是极其必要的。IGTP 是干扰素通路中具有抗病原体感染特性的代表性效应分子。因此,本研究希望获得 IGTP 全长基因,以便对其蛋白特性以及所具有更广泛的抗感染和免疫调节效应深入理解。

依据 C57BL/6 小鼠 IGTP 全长基因两端设计的引物,采用 RT-PCR 方法,获得了 BALB/c 小鼠 IGTP 全长基因,并将其成功克隆入 pGEM<sup>®</sup>-Teasy 载体。测序结果发现,存在着具有相关性的两种 PCR 产物。其中的一个 PCR 产物与 GenBank 中 C57BL/6 小鼠的 IGTP 基因(U53219)具有极高的相似性,可以确认为这是 BALB/c 小鼠的 IGTP 基因。另一个 PCR 产物,在起始密码子后 172 bp 处存在着基因缺失,对缺失的 142 bp 碱基加以分析,发现在缺失基因的首尾易形成互补而环化,尤其是在退火温度比较低时,PCR 扩增严谨性降低,更容易发生碱基缺失。本实验中,IGTP 由 BALB/c 小鼠脾脏组织反转录而来,几乎所有真核生物 RNA 转录的初级产物都经过一系列变化才成为有生物活性的 RNA 分子,所以不排除 IGTP 在 BALB/c 小鼠体内存在着两种不同的剪切体。对 IFN- $\gamma$  刺激基因的表达调控及其生物学功能的探讨必将成为日本血吸虫感染过程中 IFN- $\gamma$  机制研究的核心内容,这为今后病原体感染的防治工作和疫苗研制提供理论依据。

## 参 考 文 献

- [1] Der SD, Zhou A, Williams BR, et al. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95:15623-15628.
- [2] Bickle QD, Bogh HO, Johansen MV, et al. Comparison of the vaccine efficacy of gamma-irradiated *Schistosoma japonicum* cercariae with the defined antigen Sj62(IrV-5) in pigs [J]. Vet Parasitol, 2001, 100:51-62.
- [3] Taylor GA, Jeffers M, Largaespada DA, et al. Identification of a novel GTPase, the inducibly expressed GTPase, that accumulates in response to interferon gamma [J]. J Biol Chem, 1996, 271:20399-20405.
- [4] Pearce EJ, Caspar P, Grzych JM, et al. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth *Schistosoma mansoni* [J]. J Exp Med, 1991, 173:159-166.
- [5] Taylor GA, Colazo CM, Yap GS, et al. Pathogen-specific loss of host resistance in mice lacking the IFN- $\gamma$ -inducible gene IGTP [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97:751-755.
- [6] Colazo CM, Yap GS, Sempowski GD, et al. Inactivation of LRG47 and IRG47 reveals a family of interferon  $\gamma$ -inducible genes with essential, pathogen-specific roles in resistance to infection [J]. J Exp Med, 2001, 194:181-187.

(收稿日期:2003-07-08 编辑:庄兆农)