

文章编号:1000-7423(2000)-03-0138-03

TNF- α 和 ICAM-1 在脑型疟发病中的作用

车里穆¹ 牛宇欣² 李慧珠¹ 陈小宁³

(首都医科大学 1 寄生虫学教研室;2 遗传学教研室,北京 100054;3 承德医学院寄生虫学教研室,承德 067000)

摘要 [目的] 研究粘附分子 TNF- α 、ICAM-1 与脑型疟(cerebral malaria, CM)的关系,并通过体内注射外源性 TNF- α 来观察 ICAM-1 的表达情况及其对 CM 发生的影响。[方法] 通过建立 CM 小鼠模型,酶联免疫吸附实验(ELISA)检测感染小鼠血清 TNF- α 浓度。免疫组织化学 SP 法检测感染小鼠脑微血管的 ICAM-1 表达,结果用真彩色图象分析仪半定量分析。[结果] 发生 CM 小鼠的血清 TNF- α 明显高于其它小鼠,只有发生 CM 的小鼠脑微血管有 ICAM-1 表达,体内注射 rTNF- α 能促进 CM 的发生,并显著增加脑微血管的 ICAM-1 的表达。[结论] 大量的 TNF- α 在 CM 的发病中可能有直接致病作用,但主要通过调节脑微血管的 ICAM-1 表达发挥作用。

关键词: 脑型疟疾, TNF- α , ICAM-1, 伯氏疟原虫

中图分类号:R531.330.2

文献标识码:A

脑型疟(cerebral malaria, CM)是恶性疟最严重的致死性并发症,占恶性疟死亡人数的 20%~50%^[1,2]。我国恶性疟流行区主要在海南省及云南省,CM 时有发生,威胁着当地人们的生命和健康^[3]。

迄今,对 CM 发病机制的研究已有很大进展。小鼠 CM 模型研究发现,发生 CM 时脑血管内皮细胞(endothelium, EC)有细胞间粘附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)的高表达^[1,4]。死于 CM 的人脑血管 EC 有 CD36、ICAM-1 及凝血酶敏感蛋白(TSP)等的高表达^[5,6],因此人们认为这些分子可能在体内作为寄生疟原虫的红细胞(parasitized erythrocyte, PE)等细胞的粘附受体与 CM 的发生有密切关系。本实验用伯氏疟原虫 ANKA 株感染 CBA/J 小鼠作为 CM 模型,进一步探讨 TNF 和 ICAM-1 在 CM 发病中的作用。

材料与方法

1 疟原虫

伯氏疟原虫(*Plasmodium berghei*) ANKA 株,购自第二军医大学寄生虫学教研室;约氏疟原虫(*Plasmodium yoelii*) By265 株由本教研室提供。

2 实验动物

CBA/J 小鼠与 BALB/c 小鼠,雌性,6~8 wk,体重 18~22 g。

3 小鼠 CM 模型的建立

疟原虫复苏后,接种于昆明小鼠体内,第 5 天取尾血计算原虫率,按红细胞的疟原虫寄生率计算法计算,以 1×10^6 PE 腹腔注射转种到实验小鼠体内。

4 酶联免疫吸附实验(ELISA)检测血清 TNF 浓度

用 PBS(0.01 mol/L pH7.2)按 1:20 稀释样品,标准品 TNF- α 取 3 个浓度:3.2 ng/ml、0.64 ng/ml、0.128 ng/ml,加样品和标准品 100 μ l/孔,同一样品和标准品加两孔,湿盒内室温 2 h,洗板液洗 3 次,每次 3 min,加酶标兔抗 TNF100 μ l/孔,放湿盒内室温 1 h,洗板液洗 3 次,每次 3 min,加新配制的底物液 OPD100 μ l/孔,室温,约 10~15 min,加 50 μ l/孔终止液,在全自动微孔酶联检测仪以 490 nm 波长检测结果。

5 免疫组织化学 SP 法检测 ICAM-1

用过氧化物酶标记的链霉卵蛋白素(streptavidin peroxidase, SP)生物素技术检测 ICAM-1)。过氧化物酶标记的链霉卵蛋白素(SP)试剂盒(购自美国 Zymed 公司)。当小鼠出现中枢神经系统(central nervous system, CNS)症状时,将其处死,取脑,冰冻切片,厚度为 5 μ m,丙酮固定, PBS 洗 2 次,每次 3 min,0.3%过氧化氢(H₂O₂)孵育 5 min,水洗, PBS (0.01 mol/L pH7.2)1 次,每次 5 min,5%的正常山羊血清(PBS 稀释)孵育,室温,20 min,大鼠抗小鼠 ICAM-1 单克隆抗体 1:100(购自英国 Serotec Ltd),4 $^{\circ}$ C,过夜, PBS 洗 3 次,每次 5 min,加生物素化山羊抗大鼠单抗 1:100,37 $^{\circ}$ C,30 min, PBS 洗 3 次,每次 3 min,HRP-SP1:300,37 $^{\circ}$ C,20 min, DAB 显色,复染,封片,观察,记录并照相,对照染色用正常山羊血清代替一抗。

6 数据处理及统计学检验

实验数值均以均值士标准差表示($\bar{X} \pm SD$),数据统计采用 SYSTAT 软件包进行单因素方差分析,用 $P < 0.05$ 作为显著性差异的标准。

结 果

1 免疫组化 SP 法检测 ICAM-1

有中枢神经系统症状的小鼠脑微血管内皮 ICAM-1 染色为阳性,并出现大量的白细胞的聚集,同一组无症状的和对照组的染色均为阴性,未发现白细胞聚集(图 1)。

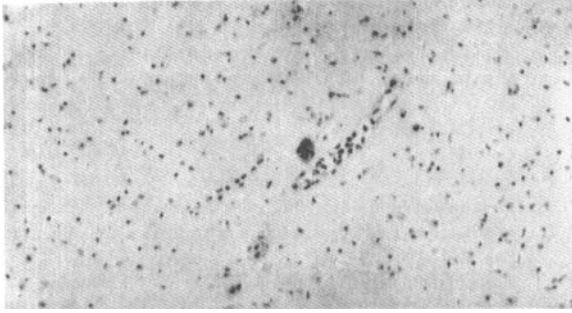


图 1 CBA/J 小鼠感染伯氏疟原虫 ANKA 株发生 CM 的脑冻切片,免疫组化 SP 染色,见大量白细胞凝集处的血管内皮 ICAM-1 染色阳性

Fig. 1 Cryopreserved mouse brain section showing positively stained ICAM-1 expression on the microvessel endothelial cell surface of *P. berghei* ANKA strain-infected CBA/J mice with CM

2 小鼠血清 TNF 浓度

中枢神经系统症状的小鼠血清 TNF- α 浓度 (3.957) 比未出现症状的小鼠的血清 TNF- α 浓度 (1.541) 显著增高 ($P < 0.05$), 感染伯氏疟原虫 ANKA 株的 BALB/c 小鼠的血清 TNF- α 浓度 (2.600) 较感染约氏疟原虫的 CBA/J (1.108) 和无中枢症状小鼠的 (1.541) 也明显升高, 后两者之间差异无显著性意义 (表 1)。

表 1 各组小鼠血清的 TNF 浓度
Table 1 Serum TNF concentration in different groups of mice

组别 Group	鼠株 Mouse strain	疟原虫 <i>Plasmodium</i>	鼠数 No. mice	症状 Symptom	血清 TNF- α (ng/ml) Serum TNF- α
1	CBA/J	<i>P. b</i> A	15	+	3.957 \pm 0.737
2	CBA/J	<i>P. b</i> ANKA	8	-	1.541 \pm 0.733
3	CBA/J	<i>P. y</i> ANKA	7	-	1.108 \pm 0.965
4	BALB/c	<i>P. b</i> ANKA	7	-	2.600 \pm 0.659

3 rTNF 对小鼠 CM 发病时间的影响

CBA/J 小鼠随机分成①与②组, BALB/c 小鼠随机分成③与④组, 各组鼠数均为 10 只, 以上小鼠均感染伯氏疟原虫 ANKA 株, 从感染的第 3 天起, 第 1 组和第 3 组小鼠每只每天腹腔注射 0.25 μ g/g 量的 rTNF- α , 直到出现中枢神经症状为止。注射 rTNF- α 后, 第 1 组小鼠的发病时间较早, 与 2、3 组的发病时间相比明显提前 ($P < 0.05$), 发病率提高到 100%, 第 3 组小鼠也有 70% 出现中枢神经系统症状, 发病时间平均为 10.14 d (表 2)。

表 2 rTNF 对小鼠 CM 发病时间的影响
Table 2 Effect of rTNF on the time of onset

组别 Group	鼠株 Mouse strain	鼠数 No. mice	rTNF (ip)	发病时间(d) Time of onset(d)
1	CBA/J	5	+	7.00 \pm 1.25*
2	CBA/J	5	-	9.88 \pm 1.81#
3	BALB/c	5	+	10.14 \pm 2.91
4	BALB/c	3	-	-

* $P < 0.05$; ①组与②组、③组 # $P > 0.05$; ②组与③组
* $P < 0.05$; Group 1 versus groups 2 and 3 # $P > 0.05$; Group 2 versus group 3

4 rTNF 对小鼠脑微血管 ICAM-1 表达的影响

为检测 rTNF- α 对 ICAM-1 表达的影响。对上述感染小鼠, 取脑作冰冻切片, 按不同部位连续切 3 张, 免疫组化 SP 法检测 ICAM-1 的表达, 用真彩色图象分析仪半定量分析。结果表明 (表 3), 第 1 组小鼠 ICAM-1 的表达 (14.233) 较各对照组的明显升高, 第 3 组的表达 (17.483) 较第 4 组的 (22.500) 明显升高 (表 3)。

表 3 rTNF- α 对小鼠脑微血管 ICAM-1 表达的影响
Table 3 Effect of rTNF- α on the expression of ICAM-1 in cerebral capillaries

组别 Group	鼠株 Mouse strain	鼠数 No. mice	TNF- α (ip)	ICAM-1
1	CBA/J	5	+	14.233 \pm 1.251*
2	CBA/J	5	-	17.034 \pm 1.765#
3	BALB/c	5	+	17.483 \pm 1.765
4	BALB/c	5	-	322.500 \pm 0.975@

* $P < 0.05$; ①组与②、③、④组 # $P > 0.05$; ②组与③组 @ $P < 0.05$; ④组与②、③组
* $P < 0.05$; Group 1 versus groups 2, 3 and 4; # $P > 0.05$; Group 2 versus group 3; @ $P < 0.05$; Group 4 versus groups 2 and 3

讨 论

机体感染疟原虫后, 原虫本身能激活巨噬细胞产生 TNF, 但实验证明 CM 中大量的 TNF 可能是免疫系统本身引起^[7]。少量的 TNF- α 在体内可保护机体抵抗疟原虫的致病作用^[8], 但过量的 TNF 本身能对机体造成病理损害。在正常小鼠体内注射大量的 TNF, 可使小鼠出现疟疾样症状^[9,10]。本文的研究表明, 只有发生 CM 的感染伯氏疟原虫 ANKA 株的 CBA/J 小鼠 (CM 敏感小鼠) 血清中的 TNF- α 浓度显著增高, 当从外界给其体内注射了一定量的 TNF- α 后, 使小鼠 CM 发病率升高到 100%, 发病时间明显提前。对照组中感染伯氏疟原虫 ANKA 株的 BALB/c (CM 非敏感小鼠) 小鼠血清 TNF- α 浓度较实验组中没有发生 CM 的那部分小鼠和其它对照组小鼠的明显增高, 但并未发生 CM, 表明高浓度的 TNF- α 这个单一因素尚不足以引起 CM 的发生, 但是注射了一定量的 TNF- α 后, 可能使体内的 TNF- α 浓度达到一定阈值, 使这一 CM 非敏感小鼠也有 70% 发生 CM。结果表明, 大剂量的 TNF- α 在体内可促进或引起 CM 的发生, 因此 TNF- α 在 CM

的发病机制中可能起着—个非常重要的中介作用。

ICAM-1(CD54)是粘附分子的一种,属于免疫球蛋白超族,是一种分子量为80~90 kDa的单链跨膜糖蛋白,其核心多肽为55 kDa,不同种类细胞其多肽链所含的寡糖分子数不同而分子量也不同^[11]。本实验用CM小鼠模型研究了ICAM-1在小鼠CM细胞粘附中的作用,结果CM敏感小鼠的脑微血管内膜有ICAM-1的明显表达,且与细胞粘附相吻合。为了观察体内TNF-α对ICAM-1的调节及与CM的关系,本实验在CM敏感鼠CBA/J和非敏感鼠BALB/c感染伯氏疟原虫ANKA株3d后,体内每天分别注射了相同大剂量的rTNF-α,直到小鼠发生CM,结果注射rTNF-α的CBA/J小鼠脑微血管内皮表达的ICAM-1明显高于未注射rTNF-α的CBA/J小鼠,并且前者的白细胞粘附加重,CM发生时间显著提前,发病率提高至100%。注射rTNF-α的非敏感鼠BALB/c也有70%发生CM,脑微血管ICAM-1的表达增加,与不注射rTNF-α的敏感鼠CBA/J的ICAM-1表达量无显著差异,发现也有白细胞的粘附。BALB/c小鼠为CM非敏感鼠,感染伯氏疟原虫ANKA株后,体内TNF-α虽也升高,但明显低于CM敏感鼠,当给体内注射大剂量的rTNF-α后,可能使其在体内达到了一定阈值,从而介导了一系列后续变化。CM敏感鼠感染3d后,体内可能已有TNF的升高,再给予大量的TNF-α,而诱导更大量的ICAM-1的表达和细胞粘附,使CM较对照组提前发生。可以认为,大剂量的TNF-α在体内可以上调脑微血管EC的ICAM-1表达,加促或引起CM的发生,因此TNF-α在CM的发病机制中可能

起着—个非常重要的中介作用。

参 考 文 献

[1] Falanga PB, Butcher EC. Late treatment with anti-LFA-1 (CD11a) antibody prevents cerebral malaria in a mouse model. *Eur J Immunol*, 1991, Sep; 21:2259~2263.

[2] Grau GE, Fajardo LF, Piguert PF, et al. Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. *Science*, 1987, 237:1210.

[3] 钱会霖. 恶性疟防治研讨会在山东省召开. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 1996,14:84.

[4] Grau GE, Pointaire P, Piguert PF, et al. Late administration of monoclonal antibody to leukocyte function-antigen 1 abrogate sincipient murine cerebral malaria. *Eur J Immunol*, 1991,21:2265.

[5] Ockenhouse CF, Tegoshi T, Maeno Y, et al. Human vascular endothelial cell adhesion receptors for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes, roles for endothelial leukocyte adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1. *J Exp Med*, 1992, 176:1183.

[6] Turner GDH, Morrison H, Jones M, et al. An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. *Am J Pathol*, 1994,145:1057.

[7] de Kossodo, S, Grau, GE. Profiles of cytokine production in relation with susceptibility to cerebral malaria. *J Immunol*, 1993, 151:4811.

[8] Kumaratilake LM, Rathjen DA, Mack P, et al. A synthetic tumor necrosis factor-alpha agonist peptide enhances human polymorphonuclear leukocyte-mediated killing of *Plasmodium falciparum* in vitro and suppresses *Plasmodium chabaudi* infection in mice. *Clin Invest*, 1995,95:2315.

[9] Clark IA, Cowden WB, Butcher GA, et al. Possible roles of tumor necrosis factor in the pathology of malaria. *Am J Pathol*, 1987,129:192.

[10] Polder TW, Eling WM, Jerusalem CR, et al. A cytochemical study of cerebral vascular lesions in mice infected with *Plasmodium berghei*. *J Neurol Sci*, 1991, 101:24.

[11] Dustin ML, Staunton DE, Springer TA. Supergene families meet in the immune system. *Immunol Today*, 1988, 9: 213.

收稿日期:1998-10-29

(编辑:李雅卿)

ROLE OF TNF-α AND ICAM-1 IN PATHOGENESIS OF CEREBRAL MALARIA

CHE Li-mu¹, NIU Yu-xin², LI Hui-zhu¹, CHEN Xiao-ning³

(1 Department of Parasitology, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100054; 2 Department of Genetics, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100054; 3 Department of Parasitology, Chengde Medical College, Chengde 067000)

Abstract [Objective] To investigate the role of TNF-α and ICAM-1 in the pathogenesis of cerebral malaria. [Methods] Immunohistochemical method and ELISA were employed to examine the expression of ICAM-1 on the brain microvessel endothelium and to detect the production of serum TNF-α in *P. berghei* ANKA strain infected-CBA/J mice. [Results] Serum TNF-α levels of mice were apparently higher and the ICAM-1 expression was more evident in *P. berghei* ANKA infected-CBA/J mice than in control groups. rTNF-α ip injection could enhance the development of CM and the expression of ICAM-1 on brain endothelial cells (EC). [Conclusion] Excessive production of TNF-α may mediate the expression of ICAM-1 on brain EC and hence cause the development of CM.

Key Words: Cerebral malaria (CM), ICAM-1, TNF-α, *Plasmodium berghei*.