

日本血吸虫感染小鼠肝脏及骨髓中 L-4, L-5 和 L-10 水平的动态变化*

曾令兰 罗端德 刘 薇 郭劲松 李淑莉

同济医科大学附属协和医院传染病教研室 武汉 430022

提要 目的: 探讨小鼠感染日本血吸虫后肝脏与骨髓产生 Th2 细胞因子的变化。方法: 采用免疫组化测定, 并用多媒体病理图文定量分析, 观察感染后第 8、10 及第 12 周小鼠肝脏及骨髓 L-4、L-5 和 L-10 的变化。结果及结论: 在感染小鼠肝脏, L-4、L-5 和 L-10 随感染时间的延长而明显升高, 且以 L-4 最为明显。而在骨髓, L-4 随感染时间延长而升高, 但在第 10 及 12 周时明显低于肝脏; L-5 在感染的第 12 周内明显高于肝脏, L-10 在感染的 10wk 前呈增高趋势, 但第 12 周下降, 并明显低于肝脏。小鼠的肝脏是感染日本血吸虫后机体免疫应答的主要场所, 而在感染骨髓中, L-5 存在明显的自分泌。

关键词 小鼠 日本血吸虫病 白细胞介素 4 白细胞介素 5 白细胞介素 10

小鼠感染日本血吸虫病后, 机体产生免疫应答反应, 肝脏形成血吸虫性肉芽肿, Th2 细胞因子包括 L-4、L-5、L-10 和 Th1 细胞因子, 包括 L-2、IFN- γ 和 TNF 起着交叉调节作用, 前者抑制后者的产生, 在肝纤维化的形成中起重要作用^[1], 而骨髓是生成 Th2 细胞因子, 尤其是生成 B 细胞的重要场所, 肝脏与骨髓 Th2 细胞因子是否存在变化, 它们之间有何关系, 国内外均未作过系统研究。我们运用免疫组织化学法对此作了定位和定量研究。

材料与方 法

实验动物 42 只昆明系小鼠, 体重 25~ 30 g, 随机分为 4 组, 即感染第 8、10 和第 12 周 3 组, 每组 10 只小鼠和对照组 12 只小鼠。感染组每只小鼠接种日本血吸虫尾蚴 25 条, 于感染后的相应天数颈椎脱臼处死, 取肝脏置液氮罐中保存备用。取小鼠股骨, 用 4 号针头抽 RPM I 1640 冲洗出骨髓细胞, 加 1 滴小牛血清涂片, 置 - 20℃ 冰箱保存备用。

实验材料 第一抗体 L-4、L-5 和 L-10 购自 Innogenetics 公司, ABC 试剂盒购自 Vector 实验室 (U. S. A.)。

免疫组化检测 将液氮保存的组织冰冻切片或冰箱保存的骨髓片, 用纯丙酮固定, 室温干燥, 用 1.5% 双氧水/甲醇室温下作用 10 min, 以灭活内源性过氧化酶, PBS 稀释正常马血清 (1:50), 室温下 20 min, 再加入第一抗体, L-4 与 L-5 以 1:25 稀释, L-10 以 1:50 稀释, 4℃ 饱和湿度过夜, 次日用 PBS 洗 2 次, 每次 5 min, 加入 1:200 稀释的生物素化的羊抗兔 IgG, 37℃ 30 min, PBS 洗 2

次, 每次洗 5 min, 用混合的 A、B 液 (3:2) 37℃ 作用 30 min, PBS 洗 2 次, 每次 5 min, 加 3, 3'-二氨基联苯胺 (DAB) 显色 5~ 10 min, 清水洗净, 甘油明胶封片, 观察结果。

定量分析 用 M P Z A S-500 多媒体彩色病理图文分析系统, 每张片至少随机取 100 个点, 计算平均积分光度。

结 果

肝脏 感染 8wk 后即可见肝脏表面有成串虫卵结节, 第 12 周为甚。肝内 L-4、L-5 及 L-10 可分布于细胞内和细胞外。分泌以上细胞因子具有 Th2 细胞特征的阳性细胞主要分布于汇管区虫卵肉芽肿外层, 环状包绕整个肉芽肿, 而内层则较少, 呈散在分布, 有时可见 Th2 细胞因子阳性物质位于卵壳上 (图 1)。

L-4、L-5 及 L-10 积分光度明显高于正常 ($P < 0.01$), 而且随感染时间的延长而升高, 其中以 L-4 为最甚, L-10 次之, L-5 最后 (表 1), 在感染的第 12 周, L-4、L-10 和 L-5 分别为正常的 56、32 和 23 倍。但与感染 12 周的骨髓相比, 分别为 2.9、4.1 和 0.7 倍。

骨髓 具有 Th2 细胞因子特性的阳性细胞均匀分布于骨髓细胞中, 分为强阳性 (呈棕褐色) 和弱阳性 (呈棕黄色) 两种细胞。随感染时间的延长, 阳性细胞的着色逐步加深 (图 2, 图 3)。L-5 在感染的 12wk 内升高明显, 在第 12 周为正常的 37 倍 ($P < 0.01$), 同期感染肝脏的 1.5 倍。L-4 呈缓慢

* 湖北省血吸虫病防治委员会基金资助项目 (No. 1994-19)

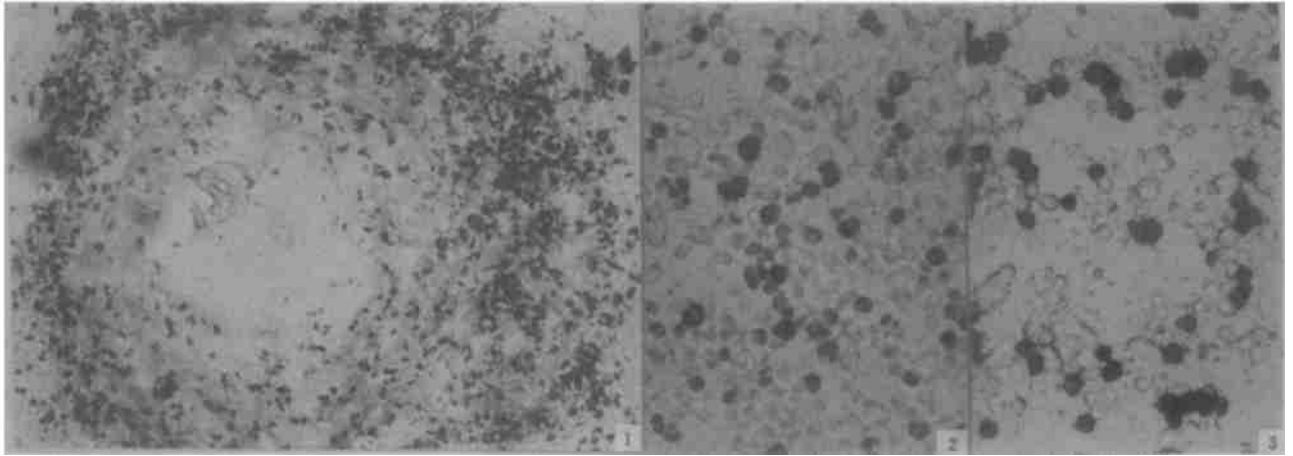


图1 小鼠感染 10 wk 时, 肝脏以虫卵为中心形成肉芽肿, L-10 阳性细胞环状包绕。100 × 图2 小鼠感染 10 wk 时, 骨髓细胞 L-5 阳性细胞均匀分散在骨髓细胞中, 有胞浆呈棕褐色的强阳性细胞和胞膜呈棕黄色的弱阳性细胞 200 × 图3 小鼠感染 12wk 时, 骨髓 L-5 阳性细胞显示棕黑色, 并呈阳性细胞聚集现象 200 ×

Fig 1 Infected mouse liver at 10 wk postinfection showing granuloma with eggs in its centre and L-10 positive cells surrounded the granuloma 100 × Fig 2 Infected mouse bone marrow at 10 wk postinfection, showing well-distributed L-5 positive cells The strong positive cells showed brown cytoplasm and the weak positive cells showed yellow cell membrane 200 × Fig 3 Infected mouse bone marrow at 12 wk postinfection, showing L-5 positive cells in brown and black, and positive cell aggregation 200 ×

表 1 感染日本血吸虫小鼠肝脏, 骨髓 L-4, L-5 及 L-10 的积分光度比较

Table 1 Comparison of L-4, L-5 and L-10 integrating luminosity of liver and bone marrow in *S. japonicum*-infected mice ($\bar{X} \pm S$)

		对照组 Control group (n= 12)	感染组 Infected group		
			8 wk (n= 10)	10 wk (n= 10)	12 wk (n= 10)
L-4	肝脏 Liver	2.93 ± 0.89	47.05 ± 2.81*	121.90 ± 5.02**	164.98 ± 8.12**
	骨髓 Bone marrow	8.56 ± 1.55	54.07 ± 4.74*	52.82 ± 3.50*	57.20 ± 13.03*
L-5	肝脏 liver	4.21 ± 1.16	36.43 ± 2.83**	78.24 ± 1.28**	97.79 ± 5.54**
	骨髓 Bone marrow	3.84 ± 0.63	63.62 ± 7.35**	82.65 ± 8.29**	143.30 ± 11.69**
L-10	肝脏 Liver	3.55 ± 1.12	39.27 ± 2.83**	84.82 ± 1.93**	113.14 ± 5.56**
	骨髓 Bone marrow	5.58 ± 1.01	55.20 ± 4.42**	52.03 ± 7.93**	27.43 ± 9.67*

* 与对照组比较 Compared with the control $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

上升趋势, 在感染的第 12 周仅为正常的 6.7 倍。L-10 在感染的 10 wk 内缓慢上升, 12 wk 时明显下降, 为正常的 4.9 倍。

讨 论

日本血吸虫病的慢性期和晚期的免疫病理变化与曼氏血吸虫病是一致的^[2], 属于迟发性免疫变态反应。曼氏血吸虫感染之初引起一个以产生 IFN- γ 的 T 细胞占优势的应答, 而当虫体成熟排卵之后, 又诱导出一个以产生 L-4 和 L-5 为主的应答。如果小鼠事先用射线照射过的血吸虫虫体或虫卵抗原免疫之后, 再感染血吸虫, 则可防止 L-4 与 L-5 占优势的应答, 也可防止长期感染的发生^[3]。Th2 细胞因子, 尤其是 L-4 升高的作用有 3 点: 调节 L-5 和 L-10 的产生, 在 Th2 三种细胞因子中, L-4 占主导地位, 用抗 L-4 的抗体在虫卵沉积前处理小鼠显示 L-4、L-5 和 L-10 产生降低^[4]; 在保护再感染中 Th2 应答起主要作用, 因为 L-4 不但

能调节 B 细胞生长和膜抗原的表达, 而且有激活巨噬细胞和细胞毒 T 细胞的作用^[3]; Th2 细胞因子有对抗 Th1 细胞因子的作用, Th1 细胞因子能对抗虫卵肉芽肿的炎症反应, 减少细胞外基质的分泌和沉积, 抑制肝纤维化。所以 Th2 细胞因子的升高有加速肝纤维化的作用^[5]。我们的实验属于日本血吸虫病的慢性期, 实验结果也证实这一点, L-4、L-5 和 L-10 在感染的 12 wk 内始终非常明显的增高, 其中 L-4 增高更为明显。由于 Th2 细胞因子能对抗 Th1 细胞因子抑制肝纤维化的作用, 因此在日本血吸虫病小鼠, 肝脏内 Th2 细胞因子的增高起着促进肝纤维化形成的作用。

在骨髓 Th2 细胞因子升高的曲线与肝脏不同, 虽然未找到类似的研究报道, 但 Chensue 在曼氏血吸虫病小鼠同时作过肉芽肿和淋巴结对虫卵反应的 L-4、L-10 和 IFN- γ 的关系实验, 用抗 IFN- γ 的单抗使肉芽肿增加 40%, 而局部的 L-4 与 L-10 增加, IFN 及 TNF 降低, 在淋巴结 IFN- γ 减少 50%,

而 L-2、L-4、L-10 和 L-5 分别增加了 2、4、5 倍和 6 倍^[6]，表明 Th2 细胞因子在肉芽肿形成中的作用。L-5 的增加并占首位，我们观察骨髓的结果与其类似。为何骨髓 L-5 的增高占优势，我们认为：

L-5 虽然主要由 T 细胞产生，但骨髓 B 细胞对 L-5 的产生存在着明显的自分泌。自分泌指的是某类细胞产生的细胞因子又回头作用于该类细胞。在我们的研究中骨髓 Th2 阳性细胞随感染时间延长抗原增强证明了此点；L-5 的升高可增强其杀伤蠕虫的活性，这与其诱导嗜酸性粒细胞的生长分化有关，肝脏肉芽肿的形成需要嗜酸性粒细胞的参与，因此它需要骨髓的生成和释放调节。

参 考 文 献

1 Wahl SM, Frazier-Jessen M, Jin WW, et al Cytokine regulation

of schistosome-induced granuloma and fibrosis *Kidney Int*, 1997; 51 1370- 1375

2 刘约翰主编 传染病学 第 2 章 日本血吸虫病 上海:上海科技出版社, 1998: 725- 728

3 陈文杰主编 血液分子细胞生物学 第 8 章 白细胞介素 北京:中国医药出版社, 1993 157- 158

4 Cheever AW, Williams ME, Wynn TA, et al Anti-L-4 treatment of *Schistosoma mansoni*-infected mice inhibits development of T cells and non-B, non-T cells expression Th2 cytokines while decreasing egg-induced hepatic fibrosis *J Immunol* 1994; 153 753- 759

5 贺永文, 刘薇, 曾令兰, 等 干扰素对血吸虫病小鼠肝纤维化的影响 *中华医学杂志*, 1996; 76 371- 374

6 Chensue SW, Wamington KS, Ruth J, et al Cross-regulatory role of interferon-gamma (IFN-gamma), L-4 and L-10 in schistosome egg granuloma formation: *in vivo* regulation of Th activity and inflammation. *Clin Exp Immunol* 1994; 98 395- 400

1998 年 8 月 24 日收稿 1999 年 4 月 12 日修回

(编辑: 李雅卿)

DYNAMIC CHANGES IN L-4, L-5 AND L-10 IN LIVER AND BONE MARROW OF MICE INFECTED WITH SCHISTOSOMA JAPONICUM*

ZENGLinglan, LUODuande, LUWei, GUOJingsong, LIShuli

Department of Infectious Diseases, Union Hospital, Tongji Medical University, Wuhan 430022

ABSTRACT

AM: To observe the changes in Th2 cytokines in the liver and bone marrow of mice infected with schistosomiasis japonica **METHODS:** ABC immunohistochemical staining technique and multimedia pathological picture analysis were used. Meanwhile, L-4, L-5 and L-10 derived from livers and bone marrows of infected mice were observed at wk 8, 10 and 12 after infection. **RESULTS AND CONCLUSION:** In the livers of infected mice, the levels of L-4, L-5 and L-10 increased obviously with a prolongation of the infection duration, L-4 being the highest. However, in the bone marrow of infected mice, L-4 level increased slowly with the duration of the infection, being lower than those in the liver at wk 10 and 12 after infection. The level of L-5 was higher than that in the liver within 12 wk. At wk 10 after infection L-10 tended to increase, but decreased thereafter and was obviously lower than that in the liver. In mice infected with *Schistosoma japonicum*, the immune response occurred mainly in the liver. L-5 in the bone marrow showed auto-secretion.

Key words: Mouse, schistosomiasis japonica, interleukin 4, interleukin 5, interleukin 10

* Supported by the Foundation of Schistosomiasis Prevention and Therapy Committee of Hubei Province (No. 1994-19)