

IFN- γ 联合 TNF- α 活化小鼠腹腔巨噬细胞 抗不同毒力株弓形虫的作用*

张爱民¹ 杨惠珍² 杨 杨² 钱宗立²

1 上海铁道大学医学院寄生虫学教研室 上海 200331
2 上海第二医科大学寄生虫学教研室 上海 200025

提要 目的: 比较 IFN- γ 联合 TNF- α 体外活化的小鼠腹腔巨噬细胞 (M Φ) 对强毒株 RH 株及弱毒株 Fukaya 株的抗虫作用。方法: 体外以 IFN- γ 与 TNF- α 联合活化昆明系小鼠腹腔M Φ , 观察其对入侵的 RH 株及 Fukaya 株速殖子的抗虫作用, 测定培养上清中 NO 的水平。结果: 在以 IFN- γ 100U + TNF- α 100U 活化的M Φ 中, 入侵 24 h 后的 RH 株弓形虫速殖子被完全杀灭, 而 Fukaya 株速殖子则缓慢增殖, 且前者培养上清中 NO 水平显著高于后者。结论: IFN- γ 活化的M Φ 对入侵的 RH 株和 Fukaya 株速殖子的抗虫作用存在差异, 这可能与 NO 的水平有关。
关键词 γ 干扰素 α 肿瘤坏死因子 弓形虫 巨噬细胞 一氧化氮

弓形虫不同虫株感染同一宿主, 其发病过程及转归往往存在较大的差异, 表现出虫株间的毒力上的差别。这种差别实质上是宿主对不同虫株免疫过程以及不同虫株对宿主免疫逃避过程间的差别。我们的实验结果表明, 体外 γ 干扰素 (IFN- γ) 活化的巨噬细胞 (M Φ) 可抑制并杀灭入侵的弓形虫 RH 强毒株速殖子, 而 NO 是其重要的抗虫效应因子^[1]。本文进一步观察 IFN- γ 与 α 肿瘤坏死因子 (TNF- α) 联合活化的M Φ 对 Fukaya 弱毒株的作用, 比较活化M Φ 对该两株弓形虫抗虫作用的差异。

材料与方 法

实验动物和弓形虫虫株 昆明系小鼠, 清洁级, 雌性, 体重 20~ 23 g, 购自中国科学院上海动物实验中心。弓形虫 RH 株引自天津医科大学寄生虫学教研室, Fukaya 株由日本筑波大学 Yano 教授惠赠。

主要试剂 鼠重组 γ 干扰素 (rMu-IFN- γ)、RPM I 1640 培养基 (Gibco BRL), 人重组肿瘤坏死因子- α (rHu-TNF- α) (第二军医大学微生物教研室), N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸 (HEPES) (Boehringer Mannheim), L-谷氨酰胺 (Sigma), 丙酮酸钠, 小牛血清, N-1-萘乙二胺盐酸盐, 对氨基苯磺酰胺, 亚硝酸钠, 硅胶 H (国产)。

小鼠腹腔M Φ 的培养及弓形虫速殖子的侵袭按参考文献^[1]进行, 即将硅胶 H 刺激的昆明系小鼠腹腔M Φ 收集, 培养于 24 孔板, 48 h 后加入一定量 IFN- γ 及 TNF- α 刺激 24 h。然后按每孔 5×10^5 加入纯化的 RH 及 Fukaya 株弓形虫速殖子, 侵袭 2 h 后洗去未侵入的虫体。此时记为零点。

本次实验分为以下 6 组 RH 株: IFN- γ 100U + TNF- α 100U 组; IFN- γ 50U + TNF- α 100U 组。Fukaya 株: IFN- γ 100U + TNF- α 100U 组; IFN- γ 50U + TNF- α 100U 组。另设 RH 株及 Fukaya 株细胞因子空白对照组。各组分别于 0、4、12 及 24 h 取样。各组样本数 n = 3。

NO 相对浓度测定 采用 Griess 法^[2]测定各组不同时间培养上清中的 NO 浓度。

弓形虫繁殖情况观察 每组于不同时间点取出各孔的盖玻片, 经 0.15 mol/L PBS 漂洗, 吹干, 甲醇固定, 姬氏液染色后光镜下计数M Φ 内的弓形虫数。每张盖玻片随机计数 100 个M Φ 细胞, 计算各组各时间样本均数。IFN- γ 联用 TNF- α 组及空白对照组计算各时间相对同组零点弓形虫数的递增倍数 (R)。

$$R = \frac{\text{不同时间点每百M}\Phi\text{的弓形虫数}}{\text{零点每百M}\Phi\text{的弓形虫数}}$$

当某组某时间 R 小于相应空白对照组 R 值, 为弓形虫繁殖受到抑制; 当 $0 < R < 1$ 时, 为弓形虫停止繁殖; 当 R = 0 时, 为弓形虫被完全杀灭。

统计学处理 t 检验。

结 果

两株弓形虫相应组别间每百M Φ 的弓形虫数及虫体递增倍数比较 实验结果显示, 12 h 及 24 h IFN- γ 联合 TNF- α 活化的M Φ 的弓形虫数均显著低于空白对照组。尤其是 RH 组, 当 IFN- γ 剂量达 100 U 时, M Φ 内入侵的弓形虫速殖子在 24 h 可被

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39470636)

完全杀灭 (R= 0)。但 Fukaya 株弓形虫速殖子却仍可在 IFN- γ 100 U + TNF- α 100 U 活化的M Φ 内缓慢增殖 (R> 1) (表 1)。

两株弓形虫相应级别间培养上清中 NO 浓度的

比较 与相应 RH 株各组相比较, Fukaya 各剂量组培养上清中 NO 浓度增幅较小, 两虫株 IFN- γ 100 U + TNF- α 100 U 组间 NO 浓度差异具有显著性意义 (表 2)。

表 1 RH 株与 Fukaya 株各组间每百 M Φ 的虫体数及虫体递增倍数比较
Table 1 Comparison of the parasite number in one hundred M Φ s and the increasing fold of this number at different times between RH groups and Fukaya groups

| 组别 Group | 0 h | | 4 h | | 12 h | | 24 h | | | | | | | | | |
|---|-------|------|--------|------|-------|------|--------|------|-------|------|--------|------|--------|-------|--------|-------|
| | RH | | Fukaya | | RH | | Fukaya | | | | | | | | | |
| | N | R | N | R | N | R | N | R | | | | | | | | |
| IFN- γ 100 U + TNF- α 100 U | 10.00 | 1.00 | 16.33 | 1.00 | 7.33 | 0.73 | 18.67 | 1.14 | 4.33 | 0.43 | 14.33 | 0.88 | 0.00 | 0.00 | 36.00 | 2.20 |
| IFN- γ 50 U + TNF- α 100 U | 13.33 | 1.00 | 15.33 | 1.00 | 7.00 | 0.53 | 14.00 | 0.91 | 6.00 | 0.45 | 24.33 | 1.59 | 13.00 | 0.98 | 38.67 | 2.52 |
| 对照组 Control group | 9.00 | 1.00 | 17.67 | 1.00 | 24.00 | 2.67 | 31.67 | 1.79 | 69.33 | 7.70 | 100.33 | 5.68 | 385.00 | 42.78 | 552.33 | 31.26 |

表 2 RH 株与 Fukaya 株各组间 NO 浓度的比较
Table 2 Comparison of NO concentration between RH groups and corresponding Fukaya groups

| 组别 Group | 0 h | | 4 h | | 12 h | | 24 h | |
|---|------------------|-------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| | RH | Fukaya | RH | Fukaya | RH | Fukaya | RH | Fukaya |
| IFN- γ 100 U + TNF- α 100 U | 41.89 \pm 2.93 | 36.49 \pm 2.01 | 62.93 ^a \pm 3.27 | 56.04 ^a \pm 12.35 | 92.36 ^b \pm 12.86 | 56.69 ^b \pm 1.14 | 135.33 ^c \pm 23.44 | 70.98 ^c \pm 7.01 |
| IFN- γ 50 U + TNF- α 100 U | 35.50 \pm 2.29 | 35.87 \pm 2.62 | 54.91 \pm 13.06 | 47.30 \pm 5.18 | 57.82 \pm 2.68 | 55.47 \pm 4.74 | 66.07 ^d \pm 7.85 | 67.17 ^d \pm 15.04 |
| 对照组 Control group | 25.69 \pm 2.01 | 38.17 \pm 12.68 | 27.36 \pm 1.88 | 25.82 \pm 1.93 | 32.50 \pm 0.66 | 31.02 \pm 1.89 | 40.26 \pm 5.85 | 35.78 \pm 4.13 |

a 与 d a vs d P< 0.05; b 与 c b vs c P< 0.01

讨 论

本实验同时采用 RH 株及 Fukaya 株侵袭经相同剂量的 IFN- γ 和 TNF- α (IFN- γ 100U + TNF- α 100U、IFN- γ 50U + TNF- α 100U) 刺激的M Φ , 以比较 IFN- γ 联合 TNF- α 活化的M Φ 对两者抑制作用是否存在差异。结果发现, IFN- γ 50U + TNF- α 100U 可以有效地活化M Φ 并抑制RH 的繁殖, 其 24 h 时间点繁殖率仅为 0.98 (R< 1), 说明完全抑制了虫体的繁殖; 当 IFN- γ 100U + TNF- α 100U 作用 24 h 则可完全杀灭入侵的 RH 株弓形虫速殖子。而在 Fukaya 株, 以上两剂量组 24 h 的虫体繁殖率分别为 2.52 和 2.20, 虽然与 Fukaya 株空白对照组的 31.26 相比也显示出较为明显的抑制作用, 但相对于该两组零点, 虫体在M Φ 内仍呈缓慢繁殖, 表明活化的M Φ 抗 RH 强毒株作用较抗 Fukaya 株的作用为强。

比较两虫株不同剂量组产生的NO 相对浓度,

在 IFN- γ 50U + TNF- α 100U 时, 两虫株较为接近, 而在 IFN- γ 100U + TNF- α 100U 时, RH 株显著高于 Fukaya 株。

综上所述, 活化的M Φ 对 Fukaya 株的抑制作用较之对 RH 株的抑制作用为弱, 原因可能在于 NO 的生成受到了抑制。据报道, NO 的产生是由于 IFN- γ 在转录水平上诱导氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) mRNA 表达的结果^[3]。若无其它因素, 相同剂量的 IFN- γ 刺激相同来源、相同数量M Φ 后所产生的 NOS 不应当存在差异。因此, 实验中两虫株 IFN- γ 100U + TNF- α 100U 剂量组间 NO 的差异可能是由于 Fukaya 株的入侵启动了某种抑制活性氮中间物 (reactive nitrogen intermediates, RNI) 产生的机制, 这些机制可能包括: 影响 NOS mRNA 的转录或翻译, 减少酶的产量; 影响 NOS 的活力; Fukaya 本身消耗精氨酸, 减少 NOS 的底物浓度等, 这些均有待进一步深入探讨。Candolfi^[4,5]实验表明, 弓形虫急性感染中淋巴细胞对刀

豆凝集素 A (Con A) 和弓形虫可溶性抗原的增殖反应降低的原因在于 RN I。由于淋巴细胞尤其是 CD8⁺ T 淋巴细胞在抗弓形虫感染中亦发挥着重要作用^[6], 因此, 过多的 RN I 可能造成宿主细胞免疫功能的抑制, 从而有助于感染的急性化。结合这些报道, 本实验结果似乎可解释为: Fukaya 株对 NO 水平下调可能使宿主细胞免疫机能受抑程度较 RH 株为轻, 致使细胞免疫发挥更强的保护性免疫而使感染呈慢性化过程。Hayashi 等^[7]认为, NO 在体内发挥着抗虫作用, 又对宿主免疫反应产生抑制, 这两方面动态消长影响着宿主与弓形虫间的平衡并关系到弓形虫感染的慢性化过程。

参 考 文 献

- 1 张爱民, 杨惠珍, 杨杨, 等 IFN- γ 活化小鼠腹腔巨噬细胞抗弓形虫作用的剂量相关性及其与 TNF- α 的协同作用 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 1998; 16: 436-440
- 2 Langemans JA, van-der-Hulst ME, Nibbering PH, et al Endogenous tumor necrosis factor alpha is required for enhanced antimicro-

bial activity against *Toxoplasma gondii* and *Listeria monocytogenes* in recombinant gamma interferon-treated mice Infect Immun 1992; 60: 5107-5112

- 3 Adams LB, Hibbs JB, Taintor RR, et al Microbiostatic effect of murine activated macrophages for *Toxoplasma gondii* Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine J Immunol 1990; 144: 2725-2729
- 4 Candolfi E, Hunter CA, Remington JS Mitogen- and antigen-specific proliferation of T cells in murine toxoplasmosis is inhibited by reactive nitrogen intermediates Infect Immun 1994; 62: 1995-2001
- 5 Candolfi E, Hunter CA, Remington JS Roles of gamma interferon and other cytokines in suppression of the spleen cell proliferative response to concanavalin A and *Toxoplasma* antigen during acute toxoplasmosis Infect Immun 1995; 63: 751-756
- 6 Shirahata T, Yanashita T, Ohta C, et al CD8⁺ T lymphocytes are the major cell population involved in the early gamma interferon response and resistance to acute primary *Toxoplasma gondii* infection in mice Microbiol Immunol 1994; 38: 789-796
- 7 Hayashi S, Chan CC, Gazzinelli RT, et al Contribution of nitric oxide to the host parasite equilibrium in toxoplasmosis J Immunol 1996; 156: 1476-1481

1998年11月23日收稿 1999年7月7日修回
(编辑: 富秀兰)

ANTI-TOXOPLASMA EFFECT OF ACTIVATED MOUSE MACROPHAGES INDUCED BY INTERFERON- γ COMBINED WITH TNF- α *

ZHANG Aimin¹, YANG Huizhen², YANG Yang², QIAN Zhongli²

1 Department of Parasitology, Medical School, Shanghai Tiedao University, Shanghai 200331
2 Department of Parasitology, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025

ABSTRACT

AM: To compare the inhibitory effect of the macrophages activated by IFN- γ combined with TNF- α against RH strain and Fukaya strain. **METHODS:** The average parasite proliferation rates of the two strains within the cytokine-activated M Φ s were calculated at different times post-challenge, the nitric oxide (NO) levels in the medium supernatant were simultaneously determined. **RESULTS:** In the macrophages activated by 100 U each of IFN- γ and TNF- α , the invaded tachyzoites of RH strain were completely killed, while the invaded tachyzoites of Fukaya strain remained slow proliferation with significantly lower levels of NO detected at 24 h post challenge. **CONCLUSION:** The difference in the anti-*Toxoplasma* effect of the activated macrophages against RH and Fukaya strains might be attributed to the different amount of NO produced by the macrophages.

Key words: Interferon- γ , tumor necrosis factor- α , *Toxoplasma gondii*, macrophage, nitric oxide

* Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 39470636)