

文章编号: 1000-7423(2010)-01-0021-05

【论著】

弓形虫感染鼠小肠 IgA 分泌细胞数量与 IgA 水平动态变化

申金雁, 孟晓丽, 殷国荣*, 王海龙, 刘红丽

【摘要】 目的 动态观察弓形虫速殖子经口感染小鼠诱导 IgA 分泌细胞(IgASCs)数量和抗体应答水平。方法 BALB/c 小鼠 96 只, 随机选取 12 只以 PBS 灌胃(0.5 ml/只), 其余小鼠用 RH 株弓形虫速殖子灌胃(1×10^4 个/只), 分别于感染后 2、4、6、8、10、12 和 14 d 各随机处死 12 只。免疫组化检测小鼠十二指肠、空肠和回肠黏膜中 IgASCs 数量, ELISA 测定小肠液和血清 IgA 水平。结果 IgASCs 分布于小肠黏膜固有层中, 不同肠段 IgASCs 数量的变化规律各异。随感染后时间的推移, 十二指肠黏膜 IgASCs 数量呈上升趋势。感染后 2~8 d, 空肠黏膜的 IgASCs 数量升高, 随后下降, 至 14 d 降至感染前水平。回肠黏膜 IgASCs 数量在感染后 2~6 d 升高, 随后下降, 12 d 降至低于感染前水平。感染后小肠液 IgA 水平持续增高, 血清 IgA 无明显变化。十二指肠、空肠和回肠黏膜的 IgASCs 数量与小肠液 IgA 水平的相关性分别为 $r=0.732$ ($P<0.01$)、 $r=0.116$ ($P>0.05$) 和 $r=-0.429$ ($P<0.01$)。结论 弓形虫速殖子经口感染小鼠可诱导十二指肠 IgASCs 高水平表达和小肠液 IgA 水平增高, 两者呈正相关。小肠液中高水平的 IgA 主要由十二指肠黏膜 IgASCs 分泌。

【关键词】 刚地弓形虫; 抗体分泌细胞; IgA; 黏膜免疫

中图分类号: R382.5

文献标识码: A

Kinetics of IgA Secreting Cells and IgA in Small Intestine of Mice Induced by *Toxoplasma gondii* Tachyzoite Infection

SHEN Jin-yan, MENG Xiao-li, YIN Guo-rong*, WANG Hai-long, LIU Hong-li

(Institute of Medical Parasitology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

【Abstract】 Objective To investigate the kinetics of IgA secreting cells (IgASCs) in small intestine and the specific antibody level induced by *Toxoplasma gondii* tachyzoite infection in mice. **Methods** Ninety-six BALB/c mice were randomly divided into 2 groups, 12 were intragastrically given 0.5 ml PBS as control, the rest were each intragastrically infected with 1×10^4 tachyzoites of the virulent RH strain *Toxoplasma gondii*. On the day 2, 4, 6, 8, 10, 12, and 14 post infection, 12 mice were sacrificed respectively. The quantity of IgASCs in mucosa of duodenum, jejunum and ileum was detected by immunohistochemistry analysis. IgA in sera and in intestinal washes was determined by ELISA. **Results** The IgASCs were found in lamina propria of the small intestine mucosa. The amount of IgASCs in duodenal mucosa increased gradually with the time after infection, while in jejunal mucous membrane it increased from the day 2 to 8, and then decreased to the level of before infection on day 14. The amount of IgASCs in ileal mucous membrane also increased from day 2 to 6, then descended gradually and on the day 12 to a level lower than that of before infection. IgA level in the intestinal washes increased continually but there was no significant change in serum samples. The correlation between IgA level in intestinal washes and the quantitative change of IgASCs in mucosa of duodenum, jejunum and ileum was $r=0.732$ ($P<0.01$), $r=0.116$ ($P>0.05$) and $r=-0.429$ ($P<0.01$), respectively. **Conclusion** *Toxoplasma gondii* infection induces a high level expression of IgASCs in duodenum and an increase of IgA antibody in the intestinal washes, showing a positive correlation. The high level IgA in the intestinal washes is mainly from IgASCs of the duodenal mucosa.

【Key words】 *Toxoplasma gondii*; Antibody secreting cell; IgA; Mucosal immunity

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30640057)

* Corresponding author, E-mail: guorongyin@163.com

作者单位: 山西医科大学医学寄生虫学研究所寄生虫学教研室, 太原 030001

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30640057)

* 通讯作者: E-mail: guorongyin@163.com

弓形虫速殖子经口感染侵入肠黏膜, 在肠黏膜上皮细胞内大量增殖, 通过循环系统播散全身致病^[1]。肠黏膜屏障是抵抗弓形虫感染的首道防线, 在阻止弓形虫入侵和播散中发挥重要作用^[2]。分泌型 IgA

(sIgA)是机体分泌量最多的抗体，以肠道的含量最高，与肠黏膜共同构成阻止病原体入侵的有效屏障。

抗体分泌细胞(antibody secreting cells, ASCs)大量存在于病原体或异体蛋白易于入侵的部位，如淋巴结的髓索、脾的红髓、消化道及呼吸道的固有层和慢性炎症部位^[3,4]。病原体(抗原)入侵机体后，ASCs 提供最早期和最快速的抗体分泌。机体 80% 以上的 ASCs 存在于肠黏膜固有层内，大部分 IgA 由肠黏膜固有层的长寿命 ASCs 合成，少部分由呼吸道、唾液腺和生殖道黏膜的 ASCs 合成。

研究表明，IgA 可抑制蠕虫的生长和生殖^[5,6]。Bungiro 等^[7]研究证实，sIgA 可与黏膜和系统免疫应答共同作用，对钩虫感染起免疫保护作用。研究证实，弓形虫感染或弓形虫可溶性速殖子抗原(STAg)鼻内免疫小鼠均可诱导小肠分泌高水平的 sIgA^[8-10]，但具体是由哪段小肠分泌，尚不清楚。本研究观察小肠不同部位黏膜 IgASCs 的动态变化及其与小肠液中 sIgA 水平的关系，探讨 IgASCs 在抗弓形虫感染的黏膜免疫应答中的作用。

材料与方法

1 实验动物及虫株来源

7~8 周龄 BALB/c 小鼠(SPF 级)，雌雄各半，购自中国医学科学院实验动物研究所。RH 株弓形虫由北京大学医学部寄生虫学教研室高兴政教授馈赠，本室液氮保存。

2 动物分组

BALB/c 小鼠 96 只，随机取 12 只以 PBS 灌胃(0.5 ml/只，对照组)，其余小鼠以 RH 株弓形虫速殖子 1×10^4 个/只(溶于 0.5 ml PBS)灌胃，于感染后 2、4、6、8、10、12 和 14 d 各随机取 12 只，眼静脉丛取血后处死，并取小肠(含十二指肠、空肠和回肠)用于以下实验。

3 小鼠血清及小肠液 IgA 检测

分离小鼠血清，ELISA 法测定 IgA 水平。弓形虫速殖子可溶性抗原(STAg)包被酶标板，4℃过夜；弃孔中液体，加封闭液于 37℃封闭 40 min，洗涤液洗涤 3 次，每次 3 min；加入待测血清样品 100 μl (1:50)，每份样品加双孔，37℃ 60 min，洗涤 3 次，每次 3 min；每孔加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠 IgA(美国 Sigma 公司)100 μl (1:1 000)，37℃ 60 min，洗涤 3 次，每次 3 min；加入底物邻苯二胺(OPD-H₂O₂)，每孔 100 μl，置 37℃避光显色 30 min，加入终止液 50 μl 终止反应，酶标仪(ZS-2)

测定吸光度(A_{492})。

按文献[8]方法，将小鼠小肠置于平皿中，剪成 2~3 cm 的小段，3 ml PBS 冲洗所有肠段 3 次，收集肠腔冲洗液，700×g 离心 10 min，取上清，-20℃保存备用。小肠液 sIgA 测定方法同血清 IgA 测定。

4 小鼠小肠黏膜 IgA 分泌细胞检测

取小鼠十二指肠、空肠和回肠各 1 cm，PBS 洗涤，鲍氏液(Bouin's solution)固定，常规石蜡切片。组织切片经脱蜡、复水、灭活内源性酶、微波修复抗原、增敏二氨基联苯胺(DAB)显色、苏木素复染及脱水，中性树胶封片。每张切片随机选取 10 个视野，光镜下计数 IgASCs 数量。

5 统计学分析

采用 SPSS 11.5 软件对组内实验数据进行方差分析，组间用 *t* 检验分析。IgASCs 数量与 sIgA 水平进行 Pearson 相关分析。

结 果

1 小鼠血清和小肠冲洗液 IgA 水平动态变化

小鼠血清 IgA 水平在感染后 10 d 内略有升高，随后略有下降，但无统计学差异(图 1)。随感染后时间的推移，小肠冲洗液中 sIgA 水平呈升高趋势，并持续至实验结束(感染后 14 d)(图 2)。

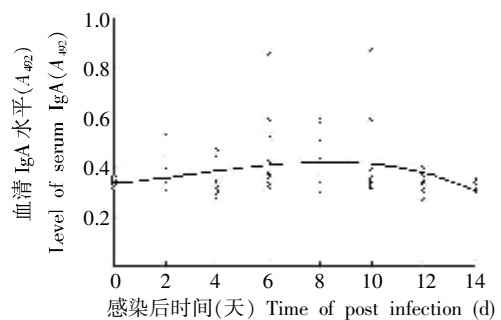


图 1 弓形虫感染对小鼠血清 IgA 水平的影响
Fig.1 Effect of *T. gondii* infection on serum IgA level

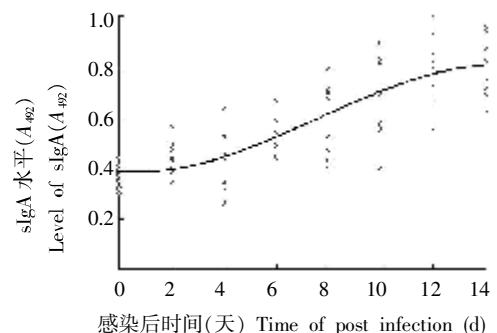


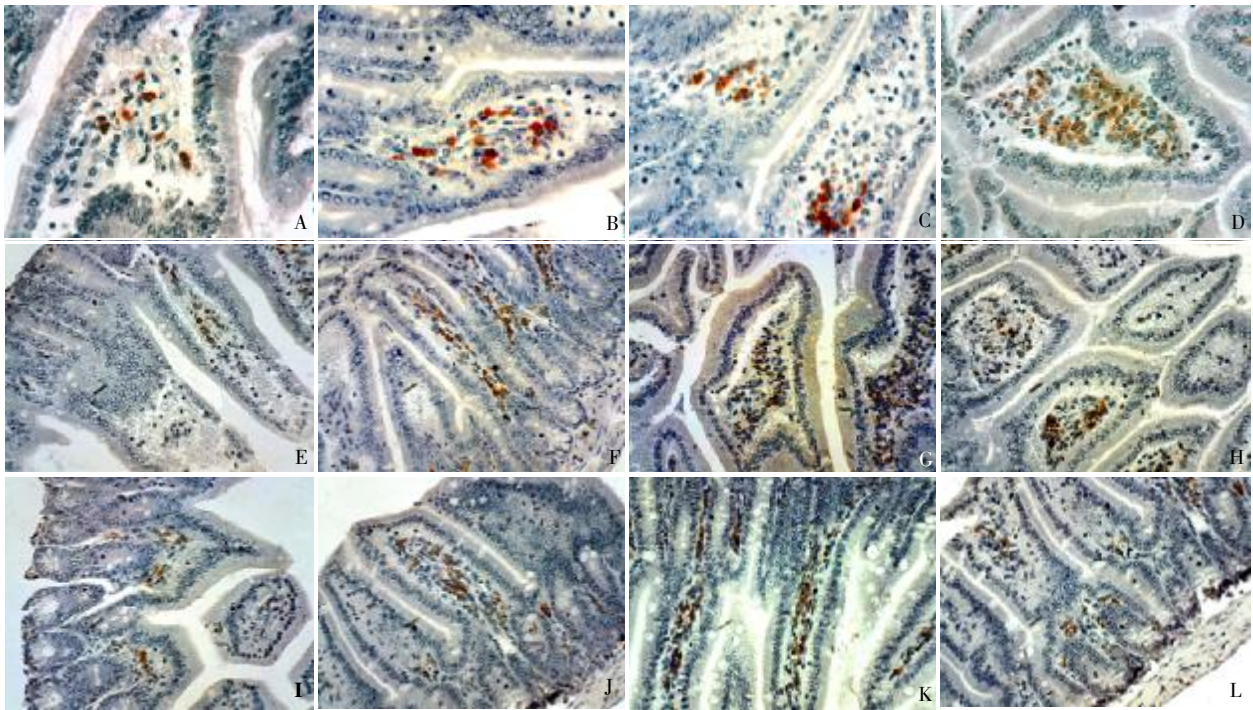
图 2 弓形虫感染对小鼠小肠冲洗液 sIgA 水平的影响
Fig.2 Effect of *T. gondii* infection on sIgA level in small intestinal washes

2 小肠 IgASCs 动态变化

小鼠从感染至被处死 (第 14 天), 十二指肠黏膜固有层中 IgASCs 数量持续增高(图 3A~D、图 4A); 空肠黏膜的 IgASCs 数量在感染后 2~8 d 升高, 随后迅速下降, 至 14 d 下降至感染前水平 (图 3E~H、图 4B); 回肠黏膜 IgASCs 数量在感染后 2~6 d 升高, 随后下降, 至 12 d 下降至低于感染前水平(图 3I~L、图 4C)。

3 小肠 IgA 分泌细胞与小肠液 sIgA 水平相关性

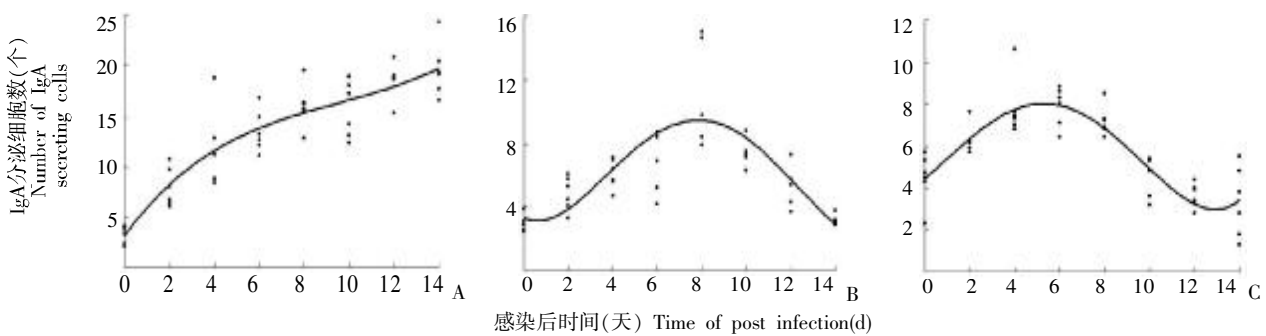
Pearson 相关分析显示, 小肠冲洗液 sIgA 水平与十二指肠黏膜 IgASCs 数量呈正相关($r=0.732, P<0.01$), 与空肠黏膜 IgASCs 数量无相关 ($r=0.116, P>0.05$), 与回肠黏膜 IgASCs 数量呈负相关 ($r=-0.429, P<0.01$) (图5)。



A、E、I: 未感染, B、F、J: 感染后 4 d, G: 感染后 6 d, C、K: 感染后 8 d, H: 感染后 12 d, D、L: 感染后 14 d。
A, E, I: No infection, B, F, J: 4 d after infection; G: 6 d after infection; C, K: 8 d after infection; H: 12 d after infection; D, L: 14 d after infection.

图 3 十二指肠(A~D)、空肠(E~H)和回肠(I~L)黏膜固有层中 IgASCs(棕黄色, ×400)

Fig.3 IgA-secreting cells (buffy cells) in the mucosal lamina propria of duodenum (A~D), jejunum (E~H) and ileum (I~L)(in pale brown, ×400)



A: 十二指肠, B: 空肠, C: 回肠。
A: Duodenum, B: Jejunum, C: Ileum.

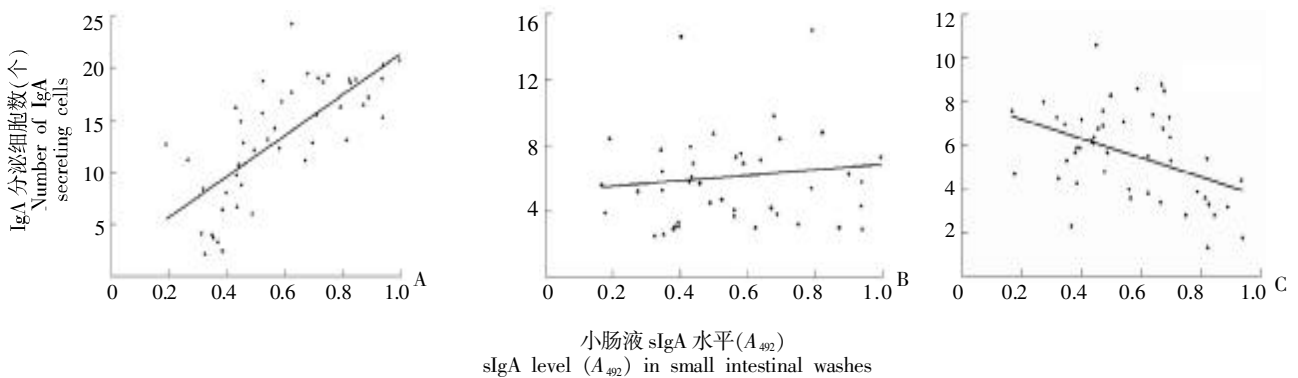
图 4 感染弓形虫小鼠小肠黏膜固有层中 IgASCs 数量动态变化

Fig.4 Kinetics of IgASCs amount in the mucosal lamina propria of intestinal mucosa of *T. gondii*-infected mice

讨 论

肠上皮细胞是消化道抵抗弓形虫入侵的首要细

胞, 研究表明, IgA 的跨细胞途径可干扰弓形虫在细胞内的增殖^[11]。本实验中小鼠经口感染弓形虫速殖子后, 血清 IgA 无明显变化, 小肠液 IgA 水平持续增高,



A: 十二指肠, B: 空肠, C: 回肠。
A: Duodenum, B: Jejunum, C: Ileum.

图 5 感染弓形虫小鼠小肠黏膜固有层中 IgASCs 数量与小肠液 sIgA 水平的相关性
Fig.5 Correlation between the IgASCs amount in mucosal lamina propria of intestine and sIgA in small intestinal washes of *T. gondii*-infected mice

黏膜部位针对弓形虫抗原启动了强烈的黏膜 IgA 抗体应答, 发挥局部黏膜免疫作用。

sIgA 是外分泌液和黏膜部位主要的免疫球蛋白, McLeod 等^[12]运用免疫荧光和 ELISA 法检测表明, 经口感染 Me49 株弓形虫缓殖子小鼠肠道分泌物中的 sIgA 可减少肠上皮细胞初次感染。Kasper 等^[13]将 sIgA 与弓形虫共孵育, 弓形虫对肠上皮细胞的感染力降低。由此可见, IgA 可有效抑制弓形虫对宿主细胞的侵袭损伤, 弓形虫特异性 IgA 是黏膜免疫的主要效应成分。

经口感染弓形虫小鼠的唾液、肠液和乳汁内 IgA、IgG 和 IgM 含量增高, 肠液和乳汁内的 sIgA 均可识别包括 P30 在内的多种弓形虫蛋白抗原^[14]。可见弓形虫感染后黏膜免疫产生的 sIgA 通过与弓形虫抗原的作用可抑制弓形虫感染的继续发展。

在抗原刺激下, 肠黏膜分泌 IgA、IgM 和 IgG 的 ASCs 比例为 81.9:15.7:2.5, 以分泌 IgA 的 ASCs 数量最多, 而 IgASCs 分泌的 sIgA 在胃肠道局部体液免疫中起着极为重要的作用。IgASCs 在黏膜相关淋巴组织 (MALT) 中分化, IgASCs 的归巢需要归巢分子 47 和 CCR9 与其配体黏膜地址素细胞黏附分子 1 和 CCL25 相互作用, 而这些分子一起在小肠表达^[15]。小鼠经口感染弓形虫后, 全身多处 MALT 的免疫细胞被激活, 形成庞大的免疫应答网络, 刺激小肠黏膜部位产生大量 IgASCs, 肠腔内 sIgA 水平持续升高, 发挥抗虫效应。

本研究显示, BALB/c 小鼠经口感染弓形虫 RH 株速殖子可诱导 IgA 分泌细胞高表达, 发挥局部黏膜免疫作用, 而不同肠段 IgASCs 数量的变化规律各异。十二指肠、空肠和回肠黏膜的 IgASCs 数量与小肠液 IgA 的相关性分别为正相关、零相关和负相关, 表明小肠液中高水平的 IgA 主要由十二指肠黏膜的

IgASCs 分泌。由于回肠黏膜内具有集合淋巴小结, 因而产生强烈的应答, 引起严重的急性回肠炎, 导致回肠黏膜大面积损伤^[15], 回肠黏膜固有层中 IgASCs 数量低于感染前水平, 不能持续分泌 sIgA。十二指肠腺体较多, 绒毛发达, 呈宽大的叶状, 其黏膜免疫应答较回肠缓慢, 引起十二指肠慢性炎症。因而, 十二指肠对弓形虫速殖子的入侵产生持续的黏膜免疫应答, 分泌 IgA 的 ASCs 高水平表达, 持续分泌 sIgA, 发挥局部黏膜免疫作用。

参 考 文 献

- [1] Kasper L, Courret N, Darche S, et al. *Toxoplasma gondii* and mucosal immunity[J]. Int J Parasitol, 2004, 34(3): 401-409.
- [2] Bout DT, Mevelec MN, Velge-Roussel F, et al. Prospects for a human *Toxoplasma* vaccine[J]. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord, 2002, 2(3): 227-234.
- [3] Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development[J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(3): 230-242.
- [4] Calame KL. Plasma cell: finding new light at the end of B cell development[J]. Nat Immunol, 2001, 2(12): 1103-1108.
- [5] Stear MJ, Strain S, Bishop SC. How lambs control infection with *Ostertagia circumcincta*[J]. Vet Immunol Immunopathol, 1999, 72 (1-2): 213-218.
- [6] Capron A, Riveau G, Grzych JM, et al. Development of a vaccine strategy against human and bovine schistosomiasis. background and update[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1995, 90(2): 235-240.
- [7] Bungiro RD Jr, Sun T, Harrison LM, et al. Mucosal antibody responses in experimental hookworm infection[J]. Parasit Immunol, 2008, 30(5): 293-303.
- [8] Han JF, Yin GR, Liu HL, et al. The IgA anti-*Toxoplasma gondii* antibody profiles in sera and intestinal secretions of the orally infected BALB/c mice[J]. J Trop Med, 2004, 4(1): 19-21, 33. (in Chinese)
(韩剑峰, 殷国荣, 刘红丽, 等. 经口感染弓形虫 BALB/c 小鼠血清及肠道分泌物中 IgA 抗体含量的检测[J]. 热带医学杂志, 2004, 4(1): 19-21, 33.)
- [9] Shi R, Yin GR, Meng XL, et al. Mucosal immune responses after intranasal immunization with CpG ODN plus *Toxoplasma gondii* STAg in mice[J]. Chin J Pub Hlth, 2008, 24(10): 1197-

1199. (in Chinese)
(石蓉, 殷国荣, 孟晓丽, 等. CpG ODN 联合 STAg 滴鼻免疫小鼠诱导的黏膜 IgA 免疫应答[J]. 中国公共卫生, 2008, 24(10): 1197-1199.)
- [10] Yin GR, Meng XL, Ma GY, *et al.* Intranasal immunization with mucosal complex vaccine protects mice against *Toxoplasma gondii* [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2007, 25(4): 290-294. (in Chinese)
(殷国荣, 孟晓丽, 马广源, 等. 弓形虫复合黏膜疫苗鼻内免疫小鼠抵抗弓形虫感染作用的观察[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2007, 25(4): 290-294.)
- [11] Bout D, Moretto M, Dimier-Poisson I, *et al.* Interaction between *Toxoplasma gondii* and enterocyte[J]. Immunobiology, 1999, 201(2): 225-228.
- [12] McLeod R, Mack DG. Secretory IgA specific for *Toxoplasma gondii*[J]. J Immunol, 1986, 136(7): 2640-2643.
- [13] Kasper LH, Buzoni-Gatel D. Ups and downs of mucosal cellular immunity against protozoan parasites[J]. Infect Immun, 2001, 69(1): 421-429.
- [14] Charde T, Velge-Roussel F, Mevelec P, *et al.* Mucosal and systemic cellular immune responses induced by *Toxoplasma gondii* antigens in cyst orally infected mice[J]. Immunology, 1993, 78(3): 421-429.
- [15] Mora JR, Von Andrian UH. Differentiation and homing of IgA-secreting cells[J]. Mucosal Immunol, 2008, 1(2): 96-109.
- [16] Mennechet FJ, Kasper LH, Rachinel N, *et al.* Lamina propria CD4⁺T lymphocytes synergize with murine intestinal epithelial cells to enhance proinflammatory response against an intracellular pathogen1[J]. J Immunol, 2002, 168(6): 2988-2996.

(收稿日期: 2009-07-11 编辑: 衣凤芸)