

树突状细胞甘露糖受体在旋毛虫感染中的变化研究

刘博宇,王 丞,邢 鑫,陈宏亮,姜 晶,蔡亚南,赵 权,王春风,杨桂连*

(吉林农业大学动物科学技术学院,吉林省动物微生态制剂工程研究中心,长春 130118)

[收稿日期] 2015-07-13 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2015) 10-0042-04 [中图分类号] S852.7

[摘 要] 应用流式细胞术(FCM)检测旋毛虫感染后小鼠肠系膜淋巴结(MLN)中树突状细胞(DC)上甘露糖受体(MR)的影响。培养小鼠骨髓源树突状细胞(BMDC)并负载旋毛虫排泄/分泌抗原(ES 抗原),FCM 检测 BMDC 上 MR 的变化情况。结果显示,感染第 7 天 MLN 中 DC 表面 MR 出现下调,但在 14 d 后出现上调,差异显著($P < 0.05$)。体外实验发现,BMDC 负载 ES 抗原后 MR 出现下调,直到第 48 小时出现上调,差异显著($P < 0.05$)。本研究证明旋毛虫感染后可以引起树突状细胞上 MR 的变化,表明 MR 可能是 ES 抗原的识别受体。这为研制旋毛虫树突状细胞疫苗提供了支持,并对寄生虫免疫逃避机制的研究提供了思路。

[关键词] 甘露糖受体;旋毛虫;树突状细胞

Effect of *Trichinella spiralis* Infection on Mannose Receptor of Dendritic Cell on Mice

LIU Bo-yu, WANG Cheng, XING Xin, CHEN Hong-liang,

JIANG Jing, CAI Ya-nan, ZHAO Quan, WANG Chun-feng, YANG Gui-lian*

(College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University; Jilin Provincial Engineering Research

Center of Animal Probiotics, Changchun 130118, China)

Abstract: To investigate the effect of *Trichinella spiralis* infection on MR of dendritic cell (DC) in mesenteric lymph nodes (MLN) on mouse and with cultivation of mouse bone marrow-derived dendritic cells (BMDC) and pulsed of *Trichinella spiralis* excretory / secretory (ES) antigens, The change of MR on BMDC was detected by FCM. The results showed that the MR receptor on the dendritic cells of MLN was down regulated in seventh days, but it was up-regulated in 14 days. The difference was significant ($P < 0.05$). In vitro experiments showed that MR was down regulated and it was up-regulated at 48 h, the difference was significant ($P < 0.05$). This study proved that *Trichinella spiralis* infection can cause changes MR on dendritic cells and it is indicated that MR may be the recognition receptor of ES antigen. With the research of dendritic cell vaccine, this study can provides support to DC vaccine of *Trichinella spiralis* and immune escape mechanism research of parasite.

Key words: MR; *Trichinella spiralis*; dendritic cell

基金项目: 国家“863”计划项目(2013AA102806, 2011AA10A215); 国家自然科学基金项目(31272552)

作者简介: 刘博宇, 硕士, 从事动物寄生虫免疫学研究。

通讯作者: 杨桂连。E-mail: yangguilian@jlau.edu.cn。

旋毛虫病历史悠久,多年来一直无法彻底消除。作为一种有着重要研究价值的人兽共患寄生虫病,旋毛虫在机体的免疫逃避一直是众多研究者关注的焦点。ES 抗原是旋毛虫在宿主体内寄生时分泌的复合抗原,已被证实在宿主对旋毛虫的免疫反应中起着重要的作用^[1-2]。ES 抗原多以糖蛋白的形式存在,含有大量的甘露糖、岩藻糖等糖类结构,这使其可能可以被 C 型凝集素受体识别^[3]。DC 既是最强的专职抗原递呈细胞,又是连接固有免疫与适应性免疫的重要桥梁。MR 是 DC 上的 C 型凝集素受体,可以识别甘露糖结构,研究发现 MR 配体可刺激或抑制多种细胞因子的分泌^[4-5]。抗原的识别与递呈是适应性免疫启动的关键环节,DC 对抗原的摄取更是其引发免疫反应的第一步。MR 作为模式识别受体,在抗原的摄取上有着关键的作用。本研究利用流式细胞术,检测旋毛虫感染小鼠后不同时间点肠系膜淋巴结中树突状细胞上 MR 的变化情况,并检测体外培养的小鼠骨髓源树突状细胞与旋毛虫 ES 抗原刺激后不同时间点的受体表达的变化情况,以初步探讨是否树突状细胞上的 MR 受体在旋毛虫感染过程中的起到作用,以便为旋毛虫免疫逃避机制的研究及树突状细胞疫苗的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 虫种和实验动物 旋毛虫由本实验室保种。4~6 周龄 SPF 级雌性 BABL/C 小鼠 60 只、4~6 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 10 只,均购自北京华阜康生物科技股份有限公司。

1.1.2 主要试剂 小鼠 FC BLOCK 封闭抗体购自美国 eBioscience 公司;PE 标记的抗小鼠 MR 单克隆抗体购自美国 Biolegend 公司;FITC 标记的抗小鼠 CD11c 单克隆抗体购自美国 BD 公司;小鼠白介素-4(IL-4)和小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF),均购自美国 Peprotech 公司;FACS 缓冲液购自美国 BD 公司。

1.1.3 主要仪器 BD FACSCanto II 流式细胞仪购自美国 BD 公司;恒温摇床购自施都凯仪器设备(上海)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 旋毛虫肌幼虫的收集 将实验室保种的小鼠处死,剪碎肌肉组织后用人工消化液(含 1% 胃蛋白酶和 1% 浓盐酸)在 37℃ 摇床内消化 4 h,60

目筛网过滤去渣。用 37℃ 预热的生理盐水数次清洗虫体后计数,获取旋毛虫肌幼虫。

1.2.2 旋毛虫肌幼虫 ES 抗原的制备 收集的幼虫经培养,过滤,透析,浓缩后用 0.22 μm 细菌过滤器过滤即得纯净的旋毛虫肌幼虫 ES 抗原。SDS-PAGE 鉴定。

1.2.3 旋毛虫感染后小鼠肠系膜淋巴结中 DC 上 MR 受体变化研究 36 只雌性 balb/c 小鼠随机分为 2 组,每组 18 只,实验组每只灌服旋毛虫肌幼虫 200 条。空白组不作处理。两组小鼠分别于灌胃后第 7、14、21、28、35、42 天时取脾脏和肠系膜淋巴结,每次每组取 3 只。取肠系膜淋巴结制备单细胞悬液,计数。调整细胞至 1×10^6 个每管,制备未加抗体的阴性管和两个单标管。样品管加入 FC BLOCK 抗体,孵育 15 min 以避免荧光抗体的非特异性结合。加入 FITC-CD11c、PE-MR 抗体 4℃ 孵育 1 h,FACS 缓冲液清洗两次以洗去未结合的抗体,送检。

1.2.4 小鼠骨髓源树突状细胞的培养及纯度测定

改良 Talmor 等^[6]的方法制备 BMDC。即脱颈处死雄性 C57BL/6 小鼠后浸入 75% 酒精中消毒片刻,无菌冲出骨髓。调整细胞浓度至 1×10^6 /mL,10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基培养 24 h 后去除未贴壁细胞,加入 DC 完全培养基(10% 胎牛血清 + 40 ng/mL 白介素 4 + 40 ng/mL GM-CSF + 100 IU/mL 青链霉素 + 3.9 mg/L β 巯基乙醇),隔天半量换液,至第 7 天轻轻吹打后收集所有悬浮细胞既为 BMDC。BMDC 计数后取部分细胞加入 FC BLOCK,孵育 15 min 后加入 FITC-CD11c 抗体 4℃ 孵育 1 h,FACS 缓冲液清洗两次以洗去未结合的抗体,送检纯度。

1.2.5 ES 抗原体外刺激 BMDC 后 MR 的表达量变化 将培养的 BMDC 分至 48 孔板中,每孔 2×10^5 个细胞,加入 200 μL DC 完全培养基,实验共分 6 组,其中一组空白组,其他分为 6、12、24、36、48 h 组。分别按照上述五个时间点加入 ES 抗原,每孔 100 μg/mL。加入抗体同 1.2.2 项,送检。

1.2.6 数据分析与统计 应用统计分析软件进行处理,实验数据用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 t 检验进行两两比较,*表示($P < 0.05$)差异显著,**表示差异极显著($P < 0.01$),有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 旋毛虫肌幼虫 ES 抗原的制备及小鼠骨髓源

树突细胞的培养 将获取的 ES 抗原进行 SDS - PAGE 鉴定,鉴定结果得到约为 43、45 和 49 kDa 的条带(图 1),符合旋毛虫 ES 抗原的特征。应用流式细胞术对培养出的 BMDC 进行纯度检验。结果显示其纯度可以达到实验的需求(图 2)。

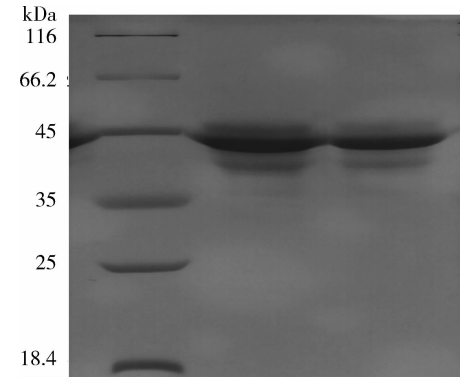


图 1 SDS - PAGE 分析 ES 抗原

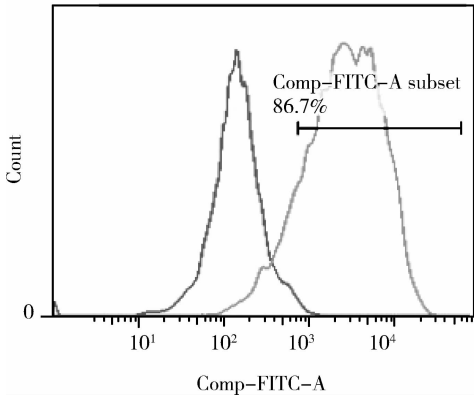


图 2 流式细胞术检测 BMDC

2.2 旋毛虫感染后小鼠肠系膜淋巴结中树突状细胞表面 MR 表达量 结果显示在肠系膜淋巴结中,第 7 天 MR 的表达下调,随后开始上调,但第 28 天表现出和对照组接近相同的情况。在第 35 天又观察到 MR 的上调,第 42 天与对照组相比基本持平(图 3)。

2.3 ES 抗原体外刺激 BMDC 后 MR 表达量变化 流式结果显示,与对照组相比,MR 在第 6 ~ 36 h 出现了下调,差异显著 ($P < 0.05$),48 h 出现了升高,差异显著 ($P < 0.05$)(图 4)。

3 讨论与小结

寄生虫的免疫逃避一直以来都是研究的热点,越来越多的 C 型凝集素受体被证实是寄生虫的感染及免疫逃避中起到了一定作用。抗原的识别与

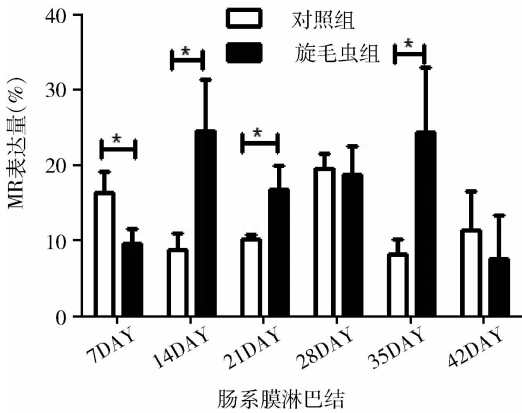


图 3 MLN 中 MR 的影响 (* 表示差异显著 $P < 0.05$)

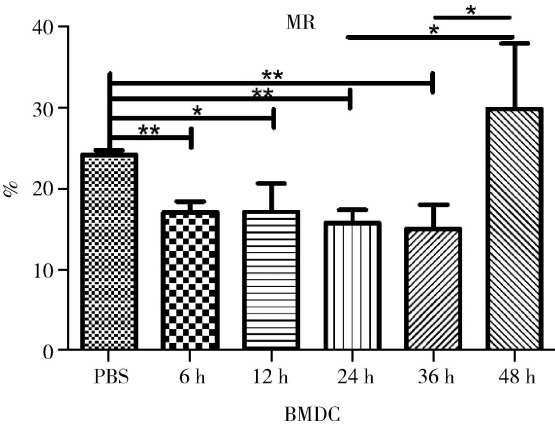


图 4 负载 ES 抗原的 BMDC 上 MR 的变化 (* 表示差异显著 $P < 0.05$; ** 表示差异极显著 $P < 0.01$)

递呈在免疫逃避中极为关键,黄海斌等研究发现球虫感染可以在后期引发淋巴细胞的变化,推测可能由于缺乏抗原的持续刺激所导致,而淋巴细胞的活化需要抗原递呈等过程作为前提^[7]。MR 作为发现较早的 C 型凝集素受体,具有抗原识别的功能,在一些研究中已经发现了其作用^[8]。如克氏锥虫利用巨噬细胞上的 MR 逃避固有免疫,使其可以长期寄生^[9]。由于 MR 的胞质尾部缺少信号转导序列,故其多与其他受体联合引发信号转导。Aranzamendi 等的研究证明 ES 抗原可以在体外条件下通过 TLR4 激活 MYD88 信号通路来压制 DC 成熟,但 ES 抗原作为一种复合抗原,很可能并非只通过一种受体识别^[10]。血吸虫的研究发现血吸虫可溶性虫卵抗原可以利用 MR 下调炎症反应,这提示旋毛虫的 Th2 型偏转可能也利用 MR^[11]。在神经囊尾蚴病的研究中发现敲除 MR 基因的小鼠的生存率更高,这表明囊尾蚴可能利用 MR 来损伤宿主^[12]。基于

MR 在其他寄生虫领域的研究,

在本研究中,体外应用 ES 抗原刺激 BMDC, 我们发现在感染初期, DC 上的 MR 呈现下降趋势, 这可能是由于 DC 利用 MR 介导吞噬 ES 抗原所导致。中后期 DC 上的 MR 逐渐上升, 推测此时 DC 已逐渐成熟, 抗原摄取能力逐渐降低, 抗原递呈能力逐渐增强。在体内实验中我们发现感染第 7 - 21 天 MR 的表达均出现上调, 这可能与旋毛虫的寄生部位主要在肠道有关。这表明 MR 在旋毛虫 ES 抗原混合对宿主的刺激中发挥了作用。第 28 天 MR 没有变化, 但在 35 天却有上调, 由于旋毛虫在 21 天后基本进入长期寄生状态, 这可能是由于感染未成功或组内差异较大造成的。结合体内及体外实验, MR 在旋毛虫感染过程中在 MLN 出现先下调后上调的趋势, 推测可能 DC 利用 MR 识别 ES 抗原的甘露糖结构, 这将有助于 DC 对 ES 抗原的识别。可能由于感染初期 DC 利用 MR 来识别 ES 抗原, 导致受体下调后激活了机体免疫, 上调了 MR 以便更好的识别抗原。但也不排除 ES 抗原利用 MR 抑制 DC 成熟。旋毛虫慢性感染可引起 Th2 型免疫反应, 但其引发这种反应的具体机制还不清楚。MR 作为模式识别受体, 可以激活多种细胞因子的分泌变化, 在抗原的识别和递呈中有着重要的作用。DU 等的研究证明 ES 抗原可以利用 MR 通过 Myd88 途径激活细胞因子以减轻脓毒败血症的损害^[13]。本研究发现在旋毛虫感染过程中, DC 上的 MR 参与了机体对旋毛虫的免疫反应。推测 DC 对 ES 抗原的吞噬作用可能依赖于 MR 的介导, 但 MR 在旋毛虫感染中起到的具体作用还不清楚, 有待于进一步研究。寄生虫病对畜牧业危害甚大, 研制出有效的新型疫苗至关重要, 但寄生虫病的疫苗研究却相对滞后。抗原的摄取与递呈是机体产生特异性免疫反应的关键, 本研究可为旋毛虫病新型疫苗的研究提供一定的基础支持。

参考文献:

[1] Devos T, Dick T A. *Trichinella spiralis*: the effect of oral immunization and the acjuvancy of cholera toxin on the mucosal and systemic immune response of mice [J]. Exp Parasitol, 1993, 76

(2): 182 - 191.

- [2] 赵 葛, 杨文涛, 王春风, 等. 旋毛虫对宿主免疫应答调节机制的研究进展[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2013, 4, 31 (2): 151 - 154.
- [3] Wisniewski N, Mc Neil M, Grieve R B, *et al.* Characteriation of Novel Fucosyl - and Tyvelosyl - containing Glycoconjugates from *Trichinella spiralis* Muscle Stage Larvae[J]. Mol. Biochem. Parasitol, 1993, 61(1): 25 - 35.
- [4] Gazi U, Martinez. Pomares L. Influence of the mannose receptor in host immune responses [J]. Immunobiology, 2009, 214(7): 554 - 561.
- [5] 戴志红, 蒋 卉, 李 翠, 等. 模式识别受体及其分子佐剂研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2012, 46(12): 61 - 66.
- [6] Talmor M, Mirza A, Turly S, *et al.* Generation of large numbers of immature and mature dendritic cells from rat bone marrow cultures [J]. Eur J Immunol, 1998, 28: 811 - 817.
- [7] 黄海斌, 张许科, 杨文涛, 等. *E. tenella* 初次感染雏鸡外周血 T 淋巴细胞亚群及增殖能力变化的动态研究[J]. 中国兽药杂志, 2014, 48(10): 6 - 10.
- [8] Vázquez - Mendoza A I, Carrero J C, Rodriguez - Sosa M. Parasitic infections: a role for C - type lectins receptors[J]. Biomed Res Int, 2013, 2013: 456352.
- [9] Garrido Vanina V, Dulgerian Laura R, Stempin Cinthia C, *et al.* The increase in mannose receptor recycling favors arginase induction and Trypanosoma cruzi survival in macrophages [J]. International journal of biological sciences, 2011, 7(9): 1257 - 1272.
- [10] Aranzamendi C, Fransen F, Langelaar M, *et al.* *Trichinella spiralis* - secreted products modulate DC functionality and expand regulatory T cells *in vitro* [J]. Parasite Immunol, 2012, 34(4): 210 - 223.
- [11] Klaver E J, Kuijk L M, Lindhorst T K. Schistosoma mansoni Soluble Egg Antigens Induce Expression of the Negative Regulators SOCS1 and SHP1 in Human Dendritic Cells via Interaction with the Mannose Receptor[J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0124089.
- [12] Mishra PK1, Morris E G, Garcia J A, *et al.* Increased accumulation of regulatory granulocytic myeloid cells in mannose receptor C type 1 - deficient mice correlates with protection in a mouse model of neurocysticercosis [J]. Infect Immun, 2013, 81(4): 1052 - 1063.
- [13] Du L, Liu L, Yu Y, *et al.* Trichinella spiralis Excretory - Secretory Products Protect against Polymicrobial Sepsis by Suppressing MyD88 via Mannose Receptor[J]. BioMed research international, 2014, 2014: 898646.

(编辑: 侯向辉)