

可溶性虫卵抗原对小鼠骨髓源性树突状细胞表型及 Th17 细胞分化的影响

薛冰^{1,2}, 徐璐^{1,2}, 周亮³, 仇镇宁², 唐奇², 李玉华^{1,2}, 王祝鸣², 朱进^{1,2}, 冯振卿^{1,2*}, 管晓虹^{2*}

(¹南京医科大学病理学系, ²卫生部抗体技术重点实验室, 江苏 南京 210029; ³Department of Pathology, Northwestern University, IL 60208, USA)

[摘要] **目的:**探讨日本血吸虫可溶性虫卵抗原(soluble egg antigen, SEA)致敏小鼠骨髓源性树突状细胞(dendritic cells, DCs)后对其细胞表型及 Th17 细胞分化的影响。**方法:**收集 BALB/c 小鼠骨髓细胞, 应用粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)、白介素(interleukin, IL)-4 定向诱导小鼠骨髓细胞向 DCs 分化; 流式细胞仪检测 SEA 刺激培养后 DCs 表面分子的表达情况; 流式细胞术检测 DCs 分泌 IL-6、IL-23 的水平, ELISA 法检测 DCs 分泌转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)的水平; SEA 刺激 DCs 与 CD4⁺T 细胞共培养后检测培养上清中 IL-6、TGF- β 、IL-23 和 IL-17 细胞因子水平。**结果:**诱导培养出可供实验用的高纯度 DCs; SEA 刺激 DCs 能表达较高水平的 CD80、CD86、CD40、组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)-II 类分子; SEA 刺激 DCs 产生 IL-6 和 TGF- β 明显增多; SEA 刺激的共培养细胞上清中 IL-17 水平增高。**结论:**SEA 能够促进 DCs 成熟, 并诱导 CD4⁺T 细胞向 Th17 细胞分化。

[关键词] 日本血吸虫; 可溶性虫卵抗原; 树突状细胞; Th17 细胞

[中图分类号] Q254

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)05-616-05

Dendritic cells stimulated by the *Schistosoma japonicum* soluble egg antigen induce the differentiation of Th17 cell

XUE Bing^{1,2}, XU Lu^{1,2}, ZHOU Liang³, QIU Zhen-ning^{1,2}, TANG Qi², LI Yu-hua^{1,2}, WANG Zhu-ming², ZHU Jin^{1,2}, FENG Zhen-qing^{1,2*}, GUAN Xiao-hong^{2*}

(¹Department of Pathology, ²Key Laboratory of Antibody Technique of Ministry of Health, NJMU, Nanjing 210029, China; ³Department of Pathology, Northwestern University, IL 60208, USA)

[Abstract] **Objective:** To observe the functional changes of murine bone marrow derived dendritic cells (DCs) loaded with the soluble egg antigen (SEA), and its impact on the differentiation of Th17 cell. **Methods:** Murine bone marrow cells were induced to differentiate into DCs by GM-CSF and IL-4. Flow cytometry was used to measure IL-6 and IL-23 and ELISA was used to measure TGF- β concentrations in the supernatant of cultured DCs. CD4⁺T cells and DCs were co-cultured and then the concentrations of relevant cytokines in the culture supernatant were detected. **Results:** Highly purified DCs were induced and could be used for further experiments. DCs were stimulated with SEA to express high levels of CD40, CD80, CD86 and MHC-II. Meanwhile, DCs stimulated with SEA produced significantly higher concentrations of IL-6 and TGF- β than the blank control group. Co-cultured cells stimulated with SEA yielded significantly higher concentrations of IL-17 than the blank control group. **Conclusion:** Stimulation by SEA generates mature DCs, and can induce the differentiation of CD4⁺T cells towards Th17 cells.

[Key words] *Schistosoma japonicum*; soluble egg antigen (SEA), dendritic cell; Th17 cells

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(5): 616-620]

[基金项目] 国家自然科学基金(30972573), 国家“863”项目资助(2006AA02Z415)

* 通讯作者, E-mail: fengzhenqing@njmu.edu.cn; xhguan@163.com

Th17 细胞是一种新发现的 CD4⁺T 细胞亚群。研究表明, Th17 细胞通过其主要表达产物白介素(interleukin, IL)-17 在血吸虫感染免疫中发挥重要作用^[1-2]。本研究拟通过体外培养小鼠骨髓源性树突

状细胞(dendritic cells, DCs)和 CD4⁺T 细胞,检测日本血吸虫可溶性虫卵抗原(soluble egg antigen, SEA)刺激后 DCs 细胞表型的变化及其与 CD4⁺T 细胞共培养后相关因子的水平改变,观察其对 Th17 细胞分化的影响,为进一步了解 Th17 在日本血吸虫感染中的作用及机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

6~8 周龄雄性 BALB/c 小鼠,由扬州大学动物中心提供,动物许可证号:SCXK(苏)2007-0001。

重组小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)和 IL-4(美国 Peprotech 公司),脂多糖(LPS,美国 Sigma 公司),流式细胞术检测用荧光标记抗鼠 CD11c-FITC、CD80-FITC、组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)-II-FITC、CD86-PE、CD40-PE 单克隆抗体及其相应的同型对照(美国 eBioscience 公司),重组小鼠 IL-6、IL-23 流式细胞术检测试剂盒(美国 eBioscience 公司),转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) ELISA 检测试剂盒(上海 ExCell Biology 公司)。SEA 由江苏省血吸虫病防治研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 DCs 培养和分组

BALB/c 小鼠颈椎脱臼处死,75%乙醇浸泡 5 min,无菌条件下取小鼠股骨,收集骨髓细胞并用 Tris-NH₄Cl 裂解红细胞,PBS 洗涤后悬于含 GM-CSF(10 μ g/ml)和 IL-4(5 μ g/ml)的 RPMI1640 培养基中,调整细胞浓度至 1×10^6 个/ml,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂ 培养,隔日换液,补齐细胞因子,并于倒置显微镜下观察 DCs 的形态。培养 8 d 后收集悬浮细胞,流式细胞术检测细胞表面 CD11c,检测 DCs 纯度。同上述流程培养 DCs 8 d 后收集悬浮细胞,将其分 3 组:SEA 刺激组(100 μ g/ml SEA)、LPS 刺激组(1 μ g/ml 的 LPS)和 PBS 对照组,培养 24 h 后收集细胞及上清待测。

1.2.2 流式细胞术检测 DCs

刺激培养 DCs 24 h 后,收集 SEA 组、LPS 组和 PBS 对照组细胞,应用流式细胞仪检测 DCs 的表面标记:CD40、CD80、CD86、MHC-II 类分子及其相应的同型对照。实验重复 3 次。

1.2.3 检测 DCs 分泌细胞因子

收集刺激培养 24 h 后 SEA 组、LPS 组和 PBS

对照组的细胞培养上清,按照流式细胞仪和 ELISA 试剂盒的检测方法检测各组 DCs 培养上清中 IL-6、IL-23 和 TGF- β 的水平。

1.2.4 CD4⁺T 细胞的分选及与 DCs 共培养

BALB/c 小鼠颈椎脱臼处死,无菌操作取出脾脏。300 目金属筛网将其磨碎,收集脾细胞悬液并用 Tris-NH₄Cl 裂解红细胞,重悬于 PBS 中,加入 FITC-抗鼠 CD4 抗体及其对应的同型抗体进行对照,避光孵育 30 min。PBS 洗 2 遍后,重悬于 PBS 中,然后上机对 CD4⁺T 细胞进行分选。分选后的细胞按 1×10^6 个/ml 置于预包被抗 CD3 抗体(5 μ g/ml)的 24 孔板,加入 RPMI1640 全培养液(含 10%胎牛血清、抗 CD28 抗体 1 μ g/ml、青链霉素 100 U/ml)。分两组:一组加 SEA(20 μ g/ml),另一组加 PBS 作为对照,并加入上述 DCs 进行共培养(DCs:CD4⁺T 为 1:4)。两组 CD4⁺T 细胞和 DCs 细胞刺激培养 3 d 后收集细胞上清。

1.2.5 检测共培养细胞上清中细胞因子

收集两组 CD4⁺T 细胞和 DCs 细胞培养上清,用流式细胞术分别检测培养上清中 IL-6、IL-23、IL-17,ELISA 法检测 TGF- β 浓度。实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

应用 Stata7.0 软件对资料进行分析,数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组均数比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DCs 形态观察及 CD11c 的表达

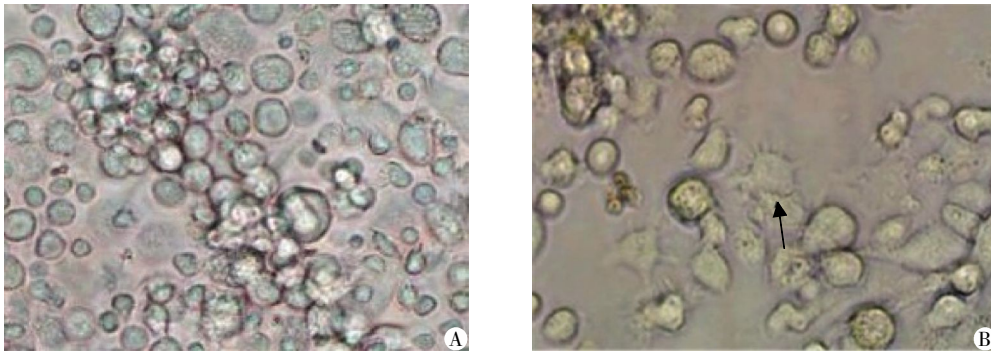
倒置显微镜观察,骨髓细胞在体外培养 1 d,可见大量细胞贴壁,细胞体积小,形状不规则,呈均匀分布的细胞集落。3~5 d 呈贴壁或半贴壁生长,有细胞聚集现象并成簇生长。7 d 时呈半贴壁成簇生长,增殖显著,细胞体积增大且可见刺突(图 1)。收集培养 8 d 的悬浮细胞,流式细胞术检测细胞表面 CD11c 表达率为 87.37%。

2.2 DCs 表面分子表达

刺激 24 h 后收集 3 组 DCs,通过流式细胞仪检测 DCs 的 MHC-II 类分子及共刺激分子 CD80、CD40、CD86 表达。与 PBS 对照组比较,LPS 组和 SEA 组 DCs 均可表达较高水平的 MHC-II 类分子、CD80、CD40 及 CD86(图 2)。

2.3 SEA 刺激 DCs 分泌细胞因子检测

收集刺激 24 h 后 3 组细胞的培养上清,检测 IL-6、IL-23 和 TGF- β 的水平。SEA 组 IL-6、IL-23 和



A:DCs 培养 3 d 的形态,可见大量细胞集落($\times 200$);B:DCs 培养 7 d 的形态,箭头示形态似 DC, 刺突明显的细胞($\times 400$)。

图 1 树突状细胞形态学观察

Figure 1 Morphological observation of DCs

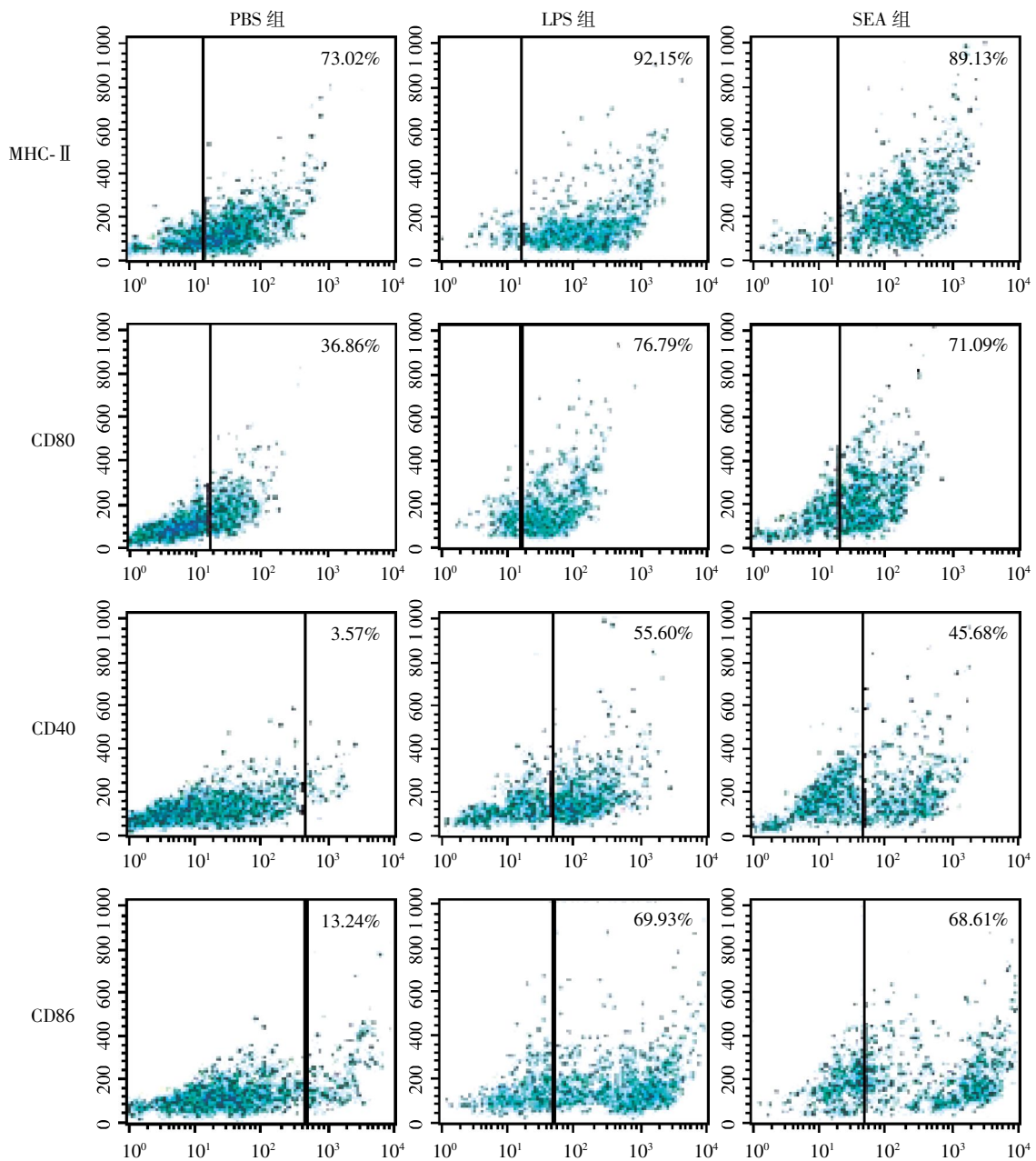


图 2 各组 DCs 表面共刺激分子的表达

Figure 2 Co-stimulatory molecules expression of DCs in each group

TGF- β 的水平明显高于 PBS 对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 3)。

2.4 CD4⁺T 细胞和 DCs 共培养的细胞上清中细胞因子检测

CD4⁺T 和 DCs 细胞共培养 3 d,与 PBS 对照组比较,SEA 组中共培养的细胞能分泌高水平的 IL-17,以及分泌诱导 Th17 细胞分化的相关细胞因子(IL-23、IL-6、TGF- β),差异有统计学意义($P < 0.01$,图 4)。

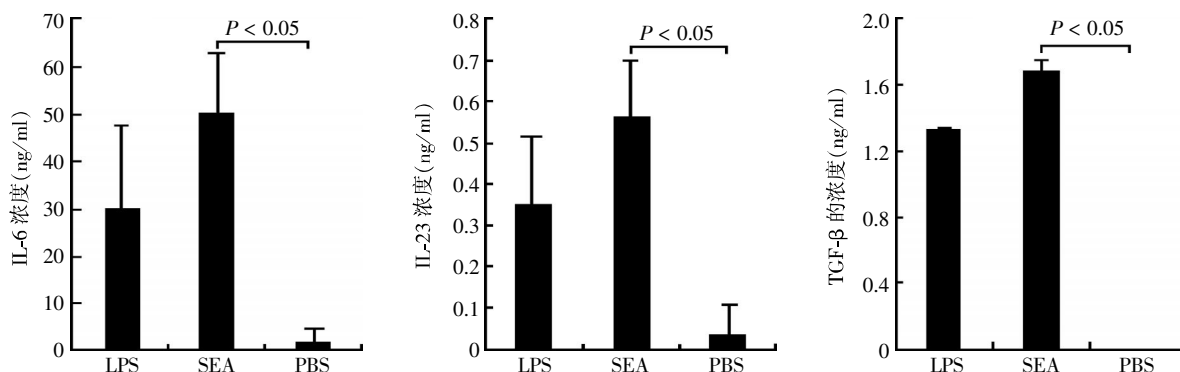


图 3 SEA 对 DCs 分泌细胞因子的影响

Figure 3 Effects of SEA on the cytokines level of DCs culture supernatant

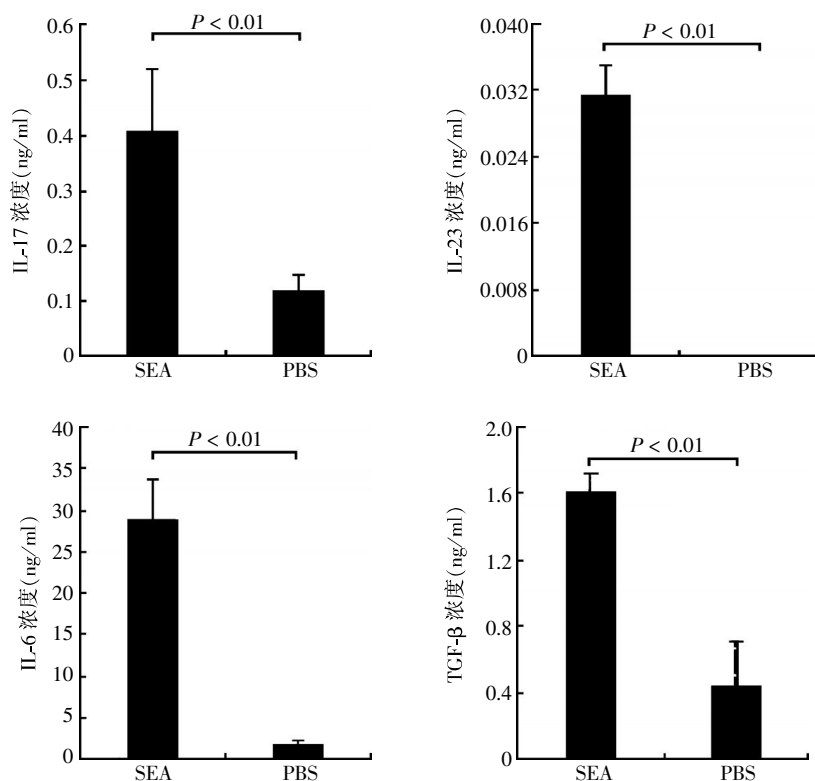


图 4 SEA 对 CD4⁺T 细胞和 DCs 共培养细胞上清中细胞因子的影响

Figure 4 Effects of SEA on the cytokines level of co-cultured CD4⁺T cell and DCs culture supernatant

3 讨论

Wynn 等^[2]依据 Th17 细胞所分泌的特征性细胞因子 IL-17 为其命名,并证实 Th17 细胞是区别于 Th1 和 Th2 细胞的一种新的 CD4⁺T 细胞亚群。目前很多研究表明 Th17 细胞通过分泌 IL-17 在抗曼氏血吸虫感染免疫中发挥重要作用^[3-4]。血吸虫抗原在

特异性诱导 Th17 细胞分化以及发挥免疫效应过程中受到多种细胞因子的调节,其中 IL-6、IL-23 和 TGF- β 等发挥着决定性作用^[5]。IL-6 和少量 TGF- β 的共同存在是 Th17 细胞分化启动的必要条件,IL-23 虽然在体外不能使 CD4⁺T 细胞向 Th17 细胞分化,但对其表型稳定和增殖非常重要^[6-9]。DCs 是一种能激活初始型 T 细胞并分泌相关细胞因子促进 Th0

细胞向不同方向分化的抗原提呈细胞,可以控制T淋巴细胞免疫应答的类型,并在启动免疫应答中扮演着重要角色。

本研究结果表明,SEA刺激可促进DCs细胞成熟,而成熟的DCs具有很强的抗原提呈能力并能刺激初始T细胞活化。细胞因子检测结果提示经SEA刺激培养的DCs分泌的细胞因子符合诱导CD4⁺T细胞向Th17细胞分化的微环境要求。CD4⁺T细胞和DCs共培养的检测结果显示,SEA刺激后的DCs可以诱导CD4⁺T细胞向Th17细胞分化,并再次证明SEA刺激DCs后可以分泌诱导CD4⁺T细胞向Th17细胞分化的相关细胞因子。

Rutitzky等^[10]研究发现在曼氏血吸虫感染的C57BL/6小鼠,IL-17可引起宿主肝脏的严重损害,利用中和抗体阻断IL-17可以减轻虫卵所致的慢性肝纤维化的严重程度,但机制尚不清楚。有研究证明类似血吸虫的免疫致病性寄生虫可通过诱导产生大量IL-17参与免疫病理损伤^[11]。在曼氏血吸虫感染过程中Th17细胞分泌的IL-17起到了明显促炎作用^[4],这说明Th17细胞在曼氏血吸虫的宿主免疫病理过程中具有重要作用。目前有研究者发现日本血吸虫感染6~8周龄的BALB/c小鼠脾脏中Th17细胞的数量及产生的IL-17较正常小鼠明显增高^[12]。针对日本血吸虫感染的研究目前多集中在建立动物感染模型后的细胞因子检测,缺乏对于其感染后特异性诱导Th17分化的机制研究。

本研究通过体外实验证明,SEA致敏DCs后其分泌的细胞因子可诱导CD4⁺T细胞向Th17细胞分化并产生IL-17,从而阐明了初始CD4⁺T细胞向Th17细胞分化并产生关键细胞因子IL-17的机制,为进一步研究Th17在日本血吸虫感染免疫中的作用和机制提供了理论依据。

尽管研究证实了DCs与Th17细胞相互作用在日本血吸虫病中起到重要作用,但也存在一些问题,如经SEA刺激的DCs虽能诱导CD4⁺T细胞向Th17细胞分化,但Th17细胞在日本血吸虫病的具体作用机制还有待进一步研究。日本血吸虫病细胞因子微环境的异常变化进一步阐明,通过调节DCs改变疾病Th17优势应答,有助于进一步加深对血

吸虫病发病机制的理解。

[参考文献]

- [1] Wynn TA. Th17: a giant step from Th1 and Th2 [J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(11): 1069-1070
- [2] Zhou L, Chong MM, Littman DR. Plasticity of CD4⁺T cell lineage differentiation [J]. *Immunity*, 2009, 30 (5): 646-655
- [3] Reece JJ, Siracusa MM, Southard TL, et al. Hookworm-induced persistent changes to the immunological environment of the lung [J]. *Infect Immun*, 2008, 76(8): 3511-3524
- [4] Wilson MS, Mentink-Kane MM, Pesce JT, et al. Immunopathology of schistosomiasis [J]. *Immunol Cell Biol*, 2007, 85(2): 148-154
- [5] Tato CM, Laurence A, O'Shea JJ. Helper T cell differentiation enters a new era; le roi est mort; vive le roi! [J]. *J Exp Med*, 2006, 203(4): 809-812
- [6] Kikly K, Lin L, Na S. IL-23/Th17 axis; therapeutic targets for autoimmune inflammation [J]. *Curr Opin in Immunol*, 2006, 18(6): 670-675
- [7] McGeachy MJ, Cua DJ. T cells doing it for themselves: TGF- β regulation of Th1 and Th17 cells [J]. *Immunity*, 2007, 26(5): 547-549
- [8] Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, et al. Th17: an effector CD4⁺T cell lineage with regulatory T cell ties [J]. *Immunity*, 2006, 24(6): 677-688
- [9] Mangan PR, Harrington LE, Quinn DB, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the Th17 lineage [J]. *Nature*, 2006, 441(7090): 231-234
- [10] Rutitzky LI, Stadecker MJ. CD4⁺T cells producing pro-inflammatory interleukin-17 mediate high pathology in schistosomiasis [J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2006, 101 (1): 327-330
- [11] Shainheit MG, Saraceno R, Bazzone LE, et al. Disruption of interleukin-27 signaling results in impaired gamma interferon production but does not significantly affect immunopathology in murine schistosome infection [J]. *Infect Immun*, 2007, 75(6): 3169-3177
- [12] 赵晶晶, 黄俊, 麦璟莹, 等. 日本血吸虫感染BALB/c小鼠脾脏细胞学的变化 [J]. *热带医学杂志*, 2009, 9 (2): 140-154

[收稿日期] 2011-12-25