论著

文章编号:1000-5404(2006)20-2024-03

约氏疟原虫子孢子感染对大鼠腹腔巨噬细胞B7.1、B7.2分子表达的影响

宋 蓓,张锡林,段建华,吕 杨 (第三军医大学基础医学部病原生物学教研室,重庆 400038)

提 要: 目的 研究约氏疟原虫感染后协同刺激分子B7.1、B7.2在大鼠腹腔巨噬细胞的表达情况,探讨B7.1、B7.2分子在宿主抵抗疟原虫感染免疫中的作用。**方法** 利用约氏疟原虫感染大鼠的动物模型,分别在感染约氏疟原虫子孢子后2、12、24、48、72 h分离获得大鼠腹腔巨噬细胞,通过免疫荧光及激光扫描共聚焦显微镜技术定量分析B7.1、B7.2分子表达情况。**结果** 在宿主感染约氏疟原虫后巨噬细胞B7.1、B7.2分子表达增加;B7.1上调较缓慢,并在72 h后出现回落;B7.2上调非常迅速,在48 h达到峰值,从72 h开始略有下降;在所选时间范围内B7.2的表达水平始终高于B7.1($P<0.05$)。**结论** 疟原虫子孢子感染大鼠后,B7.1、B7.2分子表达水平发生改变,提示协同刺激因子参与了宿主免疫系统活化,推测该现象与受疟原虫感染哺乳动物机体的免疫防御、免疫调控密切相关。

关键词: B7.1,B7.2;约氏疟原虫;抗原递呈细胞;激光扫描共聚焦显微镜

中图法分类号: R382.31;R392.12;R392.13 **文献标识码**: A

Expressions of B7.1 and B7.2 in macrophagus of rats infected by *Plasmodium yoelii*

SONG Bei, ZHANG Xi-lin, DUAN Jian-hua, LU Yang (Department of Pathogenic Biology, College of medicine Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the expression levels of B7.1 and B7.2 in the macrophagus of rats infected with the *Plasmodium yoelii* sporozoites and investigate the roles of these costimulators in parasite infection immunity. Methods The mammal model was established by infecting rats with the sporozoites, then macrophagus was separated from the rat abdominal cavity 2, 12, 24, 48, 72 h after infection. The expressions were quantitative analyzed by immunofluorescence staining and laser scanning confocal microscopy. Result The expressions of B7.1 and B7.2 were upregulated after infected with the sporozoites. The expression of B7.1 was slowly induced and then descended at 72 h. B7.2 was rapidly induced and maximally expressed at 48 h and downregulation at 72 h. The expression of B7.2 was significantly higher than that of B7.1 at all time points assayed after stimulation ($P<0.05$). Conclusion The changes of B7.1 and B7.2 expressions on macrophagus manifest these costimulators are involved in activating the mammal host immune defense and immunoregulation after *Plasmodium yoelii* sporozoites invaded.

Key words: B7.1,B7.2;*Plasmodium yoelii*; antigen presenting cells;laser scanning confocal microscope

宿主感染疟原虫后产生的保护性免疫反应十分复杂,并且寄生虫病慢性感染、隐性感染以及可诱导免疫逃避的特点更增加了研究的难度。巨噬细胞(macrophage, M)是机体免疫体系中重要的免疫效应细胞,可非特异性直接清除各种异物、杀伤病原体,并且具有抗原提呈的作用在疟疾免疫中具有重要地位[1]。本实验选用大鼠腹腔巨噬细胞,通过免疫荧光及激光扫描共聚焦显微镜(confocal scanning optical microscopy, CLSM)技术对感染约氏疟原虫子孢子2、12、24、48、72 h后B7.1、B7.2活化、表达情况进行定位检测及定量分析,从而为疟疾的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 约氏疟原虫、蚊媒和动物

约氏疟原虫(*Plasmodium yoelii*)BY265株:每周用昆明株小鼠血传1次,每5周蚊传1次。斯氏按蚊(Anopheles Stephens)Hor株:由本实验室在(23±0.5)℃、相对湿度(70±5)%的养蚊室饲养,供实验使用。6~8周龄雌性Wistar大鼠,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371261)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30371261)
作者简介:宋 蓓(1980-),女,河南省新乡市人,硕士研究生,技师,主要从事疟原虫免疫方面的研究。电话:(023)68752243
通讯作者:张锡林,电话:(023)68752243,E-mail:jsczxl@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2006-07-08;修回日期:2006-09-11

体质量 150 ~ 200 g，昆明株小鼠，体质量 18 ~ 25 g，均由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2　主要试剂和仪器

兔抗鼠的异硫氰酸荧光素（FITC）标记的单克隆抗体 CD80、CD86 购自 BioLegend 试剂公司，碘化丙叮（PI），激光扫描共聚焦显微镜（Leica TCS-NT 165211）。

1.3　疟原虫感染率计算

斯氏按蚊吸约氏疟原虫感染小鼠血后，第 15 天检查蚊唾液腺子孢子，每笼吸取 10 只斯氏按蚊，计算每笼斯氏按蚊的腺感染率[腺感染率 =（感染蚊数/检查蚊总数）×100%]，选择腺感染率≥70 % 的斯氏按蚊确定为实验组，供实验使用。

1.4　动物感染及腹腔巨噬细胞采集处理

斯氏按蚊经 -20 ℃冷冻麻醉 5 min 后，去腹部，立即放冰上研磨，加 500 μl 1640 培养液于 4 ℃，300 r/min 离心 5 min。取上清经血细胞计数板计数，以约 5×10^5 个子孢子/只的浓度，经尾静脉注射大鼠。感染 2、12、24、48、72 h 后，经麻醉颈椎脱臼处死大鼠，腹腔注射预冷的 EDTA（0.5 mg/ml PBS）10 ml，轻揉腹部 1 min，吸取腹腔液并以 600 r/min，4 ℃离心 5 min，弃上清；加 pH 7.2 的 PBS 洗涤，以 600 r/min，4 ℃离心 5 min，弃上清，重复 2 次。以 100 μl EDTA 混匀细胞，以每张玻片 8 μl 细胞悬液的量进行推片。置室温干透后，以 4 % 多聚甲醛磷酸缓冲液固定 30 min，以 pH 7.2 的 PBS 冲洗 2 次，室温晾干，置 -20 ℃待用。对照组为注射正常蚊组织大鼠，操作同上。

1.5　免疫荧光染色

每张细胞推片滴加用 100 μl（1∶10 000）稀释的 FITC 标记兔抗鼠 IgG 单克隆抗体 CD80/CD86 置湿盒 37 ℃反应 30 min，用 pH 7.2 的 PBS 冲洗 3 次。再加 5 μg/ml 碘化丙啶（PI）染液100 μl，室温避光 15 min，pH 7.2 的 PBS 冲洗 3 次，80% 甘油封片。

1.6　激光扫描共聚焦显微镜观察

使用 Leica 激光扫描共聚焦显微镜观察，扫描选用的参数：EX（激发波长）：488 nm，EM（发射波长）绿（FITC）：BP（带通滤片）525/30 nm，红（PI）：LP（长通滤片）590 nm，功率：30%，扫描速度：慢扫描。物镜为 40 倍油镜（NA：1.30），Zoom 为 1.0，光学扫描断层厚度（Step）为 1.0 μm。图像资料在屏幕上观察、照相。选择细胞较密集的区域，每高倍视野选取 15 ~ 20 个巨噬细胞，使用 Leica confocal software 软件分析荧光强度，该部分实验重复 3 次，以平均荧光强度作为蛋白的相对表达量。

1.7　统计学分析

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析。

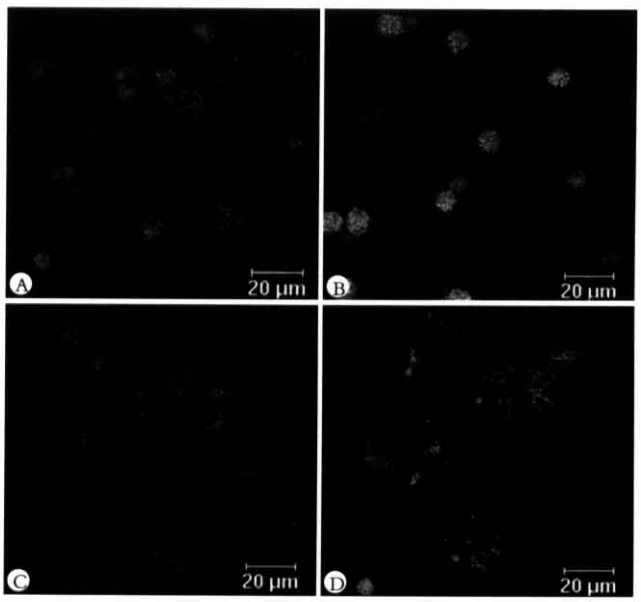
2　结果

2.1　大鼠感染情况组织学鉴定结果

感染约氏疟原虫 43 h 后，经麻醉颈椎脱臼处死大鼠，参考 Lau 等[2]的方法，解剖大鼠后取其Ⅲ区肝组织。取约 100 mg Ⅲ区肝组织，浸泡于卡氏固定液（Carroys）固定 1 ~ 1.5 h，以 95% 乙醇洗涤 2 次后，保存于 80% 乙醇中，常规石蜡包埋，制作连续切片，厚度为 5 μm，HE 染色，镜下观察到红外期裂殖子，说明感染成功。

2.2　激光扫描共聚焦显微镜检测 B7.1、B7.2 分子结果

宿主感染约氏疟原虫后 2 ~ 72 h 区间，B7.1 表达增加：B7.1 上升较缓慢，并在 72 h 后出现回落；B7.2 上调非常迅速在 48 h 达到峰值后在 72 h 开始略有下降；在所选时相区间内（2 ~ 72 h）B7.2 的表达水平始终高于 B7.1；不同时相点受感染巨噬细胞所表达 B7.1 和 B7.2 的定位有所不同：2 h 主要在细胞质内和细胞核内，细胞膜仅有少量 B7.1 表达。随着时间点推延 B7.1、B7.2 在细胞膜的表达逐渐增加，在细胞质、细胞核表达量减少，在 48 h 时几乎完全在细胞膜上；正常对照组巨噬细胞表面只能检测到 B7.2，检测不到 B7.1。见图 1。



A：B7.1，24 h；B：B7.1，48 h；C：B7.2，24 h；D：B7.2，48 h

图 1　不同时间点 B7.1、B7.2 在大鼠腹腔巨噬细胞表达情况
（激光扫描共聚焦显微镜）

2.3　B7.1、B7.2 在大鼠腹腔巨噬细胞的平均荧光强度

使用 Quantify software 软件分析 B7.1、B7.2 分子荧光强度，每个时相点计数 50 个细胞计算其平均荧光强度。各时相点 B7.1、B7.2 分子平均荧光强度见表 1 所示。

表 1　不同时相点 B7.1、B7.2 在大鼠腹腔巨噬细胞的平均荧光强度（$\bar{x} \pm s$）

分子	对照组	2 h	12 h	24 h	48 h	72 h
B7.1（CD80）	0	22.2 ± 6.09[a]	25.9 ± 5.56[a]	27.8 ± 4.99[a]	39.7 ± 4.57[a]	22.8 ± 3.17[a]
B7.2（CD86）	13.9 ± 5.04	20.4 ± 5.63[a]	32.4 ± 4.87[a]	36.1 ± 4.81[a]	40.6 ± 5.26[a]	26.4 ± 4.48[a]

a：$P < 0.05$，与对照组比较

3　讨论

宿主免疫系统接受疟原虫刺激后产生的保护性免疫包括体液免疫和细胞免疫，由共刺激分子提供的协

同刺激信号可调节免疫细胞增殖反应及效应功能。研究表明,T 细胞活化需要识别双信号系统,即抗原肽-主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex,MHC)提供的第一信号和共刺激分子提供的协同刺激信号[3]。协同刺激信号启动并调节活化级联反应,促进 T 细胞生长、分化产生细胞因子,并提供防止 T 细胞凋亡的生存信号。迄今为止,B7:CD28/CTLA-4 被认为是最重要的共刺激途径。B7:CD28 信号是诱导初次免疫应答所必需的,其传导主要在抗原递呈细胞(APCs)与 T 细胞作用的起始阶段对 TCR 信号进行修饰补充,并将多种信号整合传递,放大增强免疫应答效应[4],其作用已在移植、自身免疫病等研究领域得到肯定,但在抗疟原虫感染免疫中的作用尚未明确。

本实验利用约氏疟原虫子孢子感染大鼠动物模型,分别在感染约氏疟原虫后 2、12、24、48、72 h 分离获取大鼠腹腔巨噬细胞,通过免疫荧光技术及激光扫描共聚焦显微镜技术对 B7.1、B7.2 分子表达情况进行检测并定量分析。结果表明:在所选择的时相点区间内,B7.1、B7.2 分子表达呈升高趋势,但 B7.1 分子上升速度较缓慢,并在 72 h 后开始下降,B7.2 分子上调非常迅速在 48 h 达到峰值后于 72 h 出现回落。与以往研究资料一致[5],正常对照组巨噬细胞表面只能检测到 B7.2,检测不到 B7.1;并且在所选时相区间内 B7.2 的表达水平始终高于 B7.1($P<0.01$)。此外,激光扫描共聚焦显微镜定位观测显示:受感染巨噬细胞 B7.1、B7.2 分子表达随着时间点推延从细胞质、细胞核逐渐转移到细胞膜,此现象提示接受疟原虫刺激后,协同刺激分子活化,合成、表达增加并开始行使功能。

B7.2 组成性表达于 APCs 表面,接受抗原刺激后迅速上调与 CD28 相互作用并在 48 h 达到峰值;B7.1 经诱导表达非常缓慢,并在较长一段时间保持稳定,故推测在 T 细胞活化早期主要由 B7.2 提供 T 细胞活化所需的共刺激信号,而B7.1则在后续的 T 细胞克隆增殖中发挥作用。有研究显示,B7.1、B7.2可调节 Th_1/Th_2分化,其中 B7.1 优先促进 Th_1型 T 细胞分化,B7.2 则增加 IL-4 产生及 Th_2型 T 细胞免疫应答[6]。在疟原虫感染期间,B7:CD28 协同刺激途径对于调节 $CD4^+$ T 细胞反应有重要作用,可影响 IL-4 的量,而且 IL-4 和 IFN-γ 在感染不同阶段对于宿主抵抗红内期疟原虫有显著作用[7]。B7.1 与 T 细胞上的 CD28 受体结合能稳定多种细胞因子(尤其是 IL-2)的 mRNA,为 T 淋巴细胞活化提供所必须的第二信号,阻断这种结合能够导致 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞的免疫无能或凋亡。

最新研究表明,通过 B7:CD28/CTLA-4 协同刺激通路转导的信号远比以往研究预想得复杂,虽然 B7.1、B7.2 在基因结构、氨基酸组成及分布上有很多相似之处,但二者在生化特性、表达动力学以及对 CD28 和 CTLA-4 亲和力的差别可能造成其在不同阶段(起始或维持)参与免疫应答并发挥不同作用,对 T、B 淋巴细胞行使不同功能[8]。此外,CD28 和 CTLA-4 的表达动力学也不同,CD28 在 T 细胞表面为组成性表达,而 CTLA-4 在 T 细胞活化之后才发生表达上调。B7.2 同 CTLA-4 的结合能力比 B7.1 弱 13 倍,而同 CD28 的有效结合能力要比 B7.1 强 2~3 倍。CTLA-4 同 B7.1/B7.2 的亲和力比 CD28 强 10~100 倍。尽管如此,B7.1 和 B7.2 之间的差异可否用于解释这些分子在 T 淋巴细胞协同刺激活化中的功能差异仍存有争议。

机体免疫调控的机制十分复杂,共刺激分子与其配体提供的协同刺激信号在 T、B 细胞活化、辅助 T 细胞分化、信号转导及效应细胞的细胞因子分泌过程中起重要作用。本实验为进一步研究疟原虫与宿主间的相互关系,探讨宿主感染疟原虫的免疫反应以及疟原虫在宿主体内免疫逃避等调控机制奠定了理论基础。

参考文献:

[1] 宋 蓓,张锡林,陈继德. 疟原虫感染的免疫应答及效应分子的研究进展[J]. 国外医学:寄生虫病分册, 2005, 32(3): 114-119.

[2] LAU A O, SACCI J B, Jr, AZAD A F. Detection of Plasmodium yoelii stage mRNA in BALB/c mice [J]. J Parasitol, 2001, 87(1): 19-23.

[3] 宋 蓓, 吕 杨, 张锡林. 共刺激分子——B7 家族及其在胞内寄生虫感染中的作用[J]. 热带医学, 2006,6(8): 961-964.

[4] GREENWALD R J, FREEMAN G J, SHARPE A H. The B7 family revisited[J]. Annu Rev Immunol, 2005, 23(1): 515-548.

[5] 金顺子, 刘树铮. X 射线对小鼠腹腔巨噬细胞表达 B7-1 和 B7-2 的影响[J]. 白求恩医科大学学报, 2001, 27(2): 111-113.

[6] LI Q, CARR A, ITO F, *et al*. Polarization effects of 4-1BB during CD28 costimulation in generating tumor-reactive T cells for cancer immunotherapy [J]. Cancer Res, 2003, 63(10): 2546-2552.

[7] TAYLOR-ROBINSON A W, SMITH E C. Modulation of experimental blood stage malaria through blockade of the B7/CD28 T-cell costimulatory pathway[J]. Immunology, 1999, 96(3): 498-504.

[8] BHATIA S, EDIDIN M, ALMO S C, *et al*. B7-1 and B7-2: similar costimulatory ligands with different biochemical, oligomeric and signaling properties[J]. Immunol Lett, 2006, 104(1-2): 70-75.

(编辑 龙 亮)