文章编号:1000-5404(2012)03-0219-04

论著

# C5a/C5aR通路在硕大利什曼原虫易感小鼠免疫病理发生中的作用及其机制

江伟凡[1,2*],杨 菲[2*],董世访[1,2],曹朝晖[1,2],陈 戬[2],李桂清[2],蒋 涛[1],许桂莲[2] (421001 湖南 衡阳,南华大学药学与生命科学学院生物化学与分子生物学教研室[1];400038 重庆,第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所[2])

[摘要] **目的** 研究C5a/C5aR通路在对硕大利什曼原虫(*Leishmania major*, *L. major*)易感的BALB/c小鼠免疫病理发生中的作用及机制探讨。**方法** 以C5aR KO小鼠(BALB/c背景)为模型,观察比较了WT和C5aR KO的BALB/c小鼠在*L. major*感染后的病变情况,有限稀释法检测了各组感染小鼠体内寄生虫的负荷,并进一步通过FACS检测了相关细胞因子如IL-17和IL-4的产生,来探讨C5a/C5aR通路在*L. major*易感型BALB/c小鼠免疫病理发生中的作用机制。**结果** 相比WT小鼠,C5aRKO小鼠感染*L. major*后的病变程度明显减轻($P<0.05$),体内寄生虫负荷也显著降低($6.952\pm0.398$ *vs* $4.340\pm0.434$, $P<0.01$);同时,FACS胞内染色结果表明$CD4^+$ $IL\text{-}4^+$ T细胞亚群百分比显著降低($0.960\,0\pm0.148\,3$ *vs* $0.314\,0\pm0.042\,6$, $P<0.01$),但$CD3^+IL\text{-}17^+$ T细胞亚群的百分比在两组之间无显著差异($0.792\,0\pm0.051\,3$ *vs* $0.858\,0\pm0.084\,5$, $P=0.522\,3$)。**结论** C5a/C5aR通路通过调节Th2细胞关键细胞因子IL-4的产生,在*L. major*易感小鼠的免疫病理发生中发挥作用。

[关键词] C5a/C5aR;硕大利什曼原虫;白细胞介素4;免疫病理
[中图法分类号] R383.22; R392.11; R392.3 [文献标志码] A

# Role of C5a/C5aR pathway in immunopathogenesis of mice susceptible to *L. major* infection and its mechanism

Jiang Weifan[1,2*], Yang Fei[2*], Dong Shifang[1,2], Cao Zhaohui[1,2], Chen Jian[2], Li Guiqing[2], Jiang Tao[1], Xu Guilian[2] ([1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Pharmacy and Life Sciences University of South China, Hengyang, Hunan Province, 421001; [2]Department of Immunology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the role of C5a/C5aR pathway in immunopathogenesis of mice susceptible to *Leishmania major* (*L. major*) infection, and to investigate its mechanism. **Methods** C5aR knock out (KO) BALB/c mice were used as animal models, and wild type (WT) BALB/c mice were used as controls. Development and progress of footpad lesion was monitored weekly by measuring the lesion size after infection. Parasites proliferation *in vivo* was quantified by limiting dilution analysis. Levels of Th2 cells subpopulation related cytokine IL-4 and proinflammatory cytokine IL-17 were measured by FACS. **Results** Compared with WT mice, C5aR KO mice became highly resistant to *L. major* infection as their lesion degree ($P<0.05$) and parasites load were both significantly reduced ($6.952\pm0.398$ *vs* $4.340\pm0.434$, $P<0.01$). The percentage of $CD4^+$ $IL\text{-}4^+$ T cell subset in the C5aR KO mice was significantly lower than that in the WT mice ($0.960\,0\pm0.148\,3$ *vs* $0.314\,0\pm0.042\,6$, $P<0.01$), but there was no significant difference between the percentages of $CD3^+$ $IL\text{-}17^+$ T cell subset in C5aR KO mice and WT mice ($0.792\,0\pm0.051\,3$ *vs* $0.858\,0\pm0.084\,5$, $P=0.5223$). **Conclusion** C5a/C5aR pathway plays a critical role in regulation of mice susceptible to *L. major* infection *via* promoting IL-4 production.

[**Key words**] C5a/C5aR; *Leishmania major*; IL-4; immunopathogenesis

Supported by the General Program of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC 2008BB5021) and the Starting Funds for the Returned Overseas Scholars of Education Ministry (2009). Jiang Weifan and Yang Fei are first authors who contributed equally to the article. Corresponding author: Jiang Tao, Tel: 86-734-8281372, E-mail: tjiang99@126.com; Xu Guilian, Tel: 86-23-68771927, E-mail: xuguilian@yahoo.com

[基金项目] 重庆市自然科学基金面上项目(CSTC2008BB5021);教育部归国人员启动基金(2009)
* 同等贡献者
[通信作者] 蒋 涛,电话:(0734)8281372,E-mail:tjiang99@126.com
许桂莲,电话:(023)68771927 E-mail:xuguilian@yahoo.com

利什曼原虫(*Leishmania*)是自然界中经白蛉叮咬传播的一类原生寄生虫,它主要感染并寄生于宿主巨噬细胞(Macrophage,Mφ)中。利什曼原虫感染小鼠模型常被用来研究胞内病原体免疫学机制,其中硕大利什曼原虫(*Leishmania. major*, *L. major*)感染小鼠模型是最广泛应用于研究胞内病原体的细胞免疫应答与调节的经典模型[1]。

L. major 感染小鼠模型中表现遗传抗性还是遗传易感性取决于其诱导的 $CD4^+$ T 细胞亚群的发育及其细胞因子的分泌[2]。抗性小鼠(如 C57BL/6,C3H 等品系小鼠)感染 *L. major* 后其治愈与分泌 IFN-γ 和 IL-12 的 Th1 细胞的发展密切相关,因为 IFN-γ 可激活 Mφ, 活化的 Mφ 产生一氧化氮(nitric oxide, NO),后者可杀伤寄生在胞内的利什曼原虫。相反,易感小鼠(如 BALB/c 品系小鼠)则在感染后产生 IL-4,促进分泌 IL-4 和 IL-10 的 Th2 细胞的发育和增殖,抑制 Mφ 对胞内菌的杀伤,从而导致疾病的发生[2]。研究发现,利什曼原虫感染 BALB/c 小鼠后,会抑制宿主巨噬细胞中 IL-12 的表达,Th1 免疫应答减弱及 IFN-γ 的产生下降,同时另一方面会诱导产生大量的 IL-4,促进 Th2 免疫应答反应,从而使 BALB/c 小鼠对 *L. major* 产生易感性[2-4]。另有研究发现,IL-17 是除 Th2 细胞因子以外在 *L. major* 感染中的关键分子,它通过募集嗜中性白细胞募集至感染部位,促进易感小鼠(BALB/c 小鼠)皮肤利什曼病病理的发生与发展[5]。

具有传染性的 *L. major* 前鞭毛体侵入宿主机体后会激发补体和巨噬细胞的活化,导致 *L. major* 的杀伤。已有的研究发现 *L. major* 感染 BALB/c 小鼠后,可通过与补体中间产物 C3b 的调理作用感染巨噬细胞,逃逸补体终末产物 MAC 的裂解[6-7],并通过一系列的免疫逃逸机制逃避巨噬细胞对其的破坏[8]。C5a 是补体 C3 的下游分子,是 C5 补体活化过程中产生的具有强大的促炎及趋化效应的过敏毒素,C5a 与 C5aR 相互作用在抗感染防御机制中为天然免疫和获得性免疫功能提供了一重要的桥梁。研究发现 C5a 的异常表达常与脓毒症,急性肺损伤等炎症疾病的病理发生发展有关[9],表明 C5a/C5aR 通路在一些感染性、自身免疫性及过敏性疾病等引起的炎症应答中起着重要作用,但 C5a 在 *L. major* 病理发生中的作用及机制并不清楚。本文以 BALB/c 背景的 C5aR KO 小鼠为研究模型,探讨了 C5a/C5aR 信号通路在 *L. major* 野生型 BALB/c 小鼠免疫病理发生中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

C5aR KO 种鼠(BALB/c 背景)购买于 Jackson Laboratory,于第三军医大学全军免疫研究所 SPF 级动物房繁殖;6 ~ 8 周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠购自北京动物研究所华埠康生物有限公司。

### 1.2 试剂

Grace 昆虫培养基(Invitrogen 公司);RPMI1640 培养基(Hyclone 公司);小牛血清,胎牛血清(天津 TBD 公司);青霉素,链霉素(华北制药公司);纯化的抗小鼠 CD3mAb,纯化的抗小鼠 CD28mAb,FITC 标记的抗小鼠 CD3mAb,PE 标记的抗小鼠 CD4mAb,PerCP 标记的抗小鼠 IL-17,APC 标记的抗小鼠 IL-4 单抗以及相应的同型阴性对照均购自 Biolegend 公司。钙离子载体(Ionomycin)、佛波酯(PHORBOL 12-MYRISTATE 13-ACETATE,PMA)和 BFA(BREFELDIN A)均购自 Sigma 公司。

### 1.3 寄生虫感染,病损及寄生虫载量的检测

*L. major*(MHOM/IL/80/Friedlin)为加拿大 Uzonna 博士获赠。*L. major* 培养于添加 20% FBS,2 mmol/L 谷氨酰胺,100 U/ml P/S(青霉素,链霉素)的 Grace 昆虫完全培养基。*L. major* 前鞭毛体传代培养 7 d 至稳定期,以 $5 \times 10^6$/只(高剂量)或 $1 \times 10^6$/只(常规剂量)分别经皮下注入各受试组小鼠右脚掌进行感染(50 μl/只)。感染后第 2 周开始,每周监测受感染脚掌病损程度;根据机构实验动物管理政策,当受感染脚掌病损达到 3.5 mm 或者开始发生溃疡时,受试小鼠应当被处死。小鼠体内寄生虫载量利用有限稀释法进行测定[10]。

### 1.4 胞内细胞因子 IL-4 和 IL-17 的测定

拔眼球取血处死 *L. major* 感染小鼠,分离出引流淋巴结,制备单细胞悬液,计数后调整细胞浓度为 $2 \times 10^6$/ml,接种于 48 孔细胞培养板(500 μl/孔),各受试孔分别加入可溶性利什曼抗原(soluble leishmanial Ag,SLA;50 μg/ml)刺激,置于 37 ℃ $CO_2$ 孵箱中培养 72 h。其中阳性对照组加入 1 μg/ml 抗小鼠 CD3mAb 和 1 μg/ml 抗小鼠 CD28mAb 替代 SLA 刺激。在培养的最后 4 ~ 6 h,加入 500 ng/ml Inomycin、50 ng/ml PMA 和 10 μg/ml BFA。收集细胞至流式管中,各管加入抗小鼠 CD16/CD32 mAb 于冰上封闭 15 min 后,按 FACS 染色步骤加入荧光素标记的抗小鼠 CD3mAb、CD4mAb,并设置相应的同型为阴性对照。4 ℃孵育 30 min;PBS(0.01 mol/L,pH7.4)洗涤细胞 2 遍后,加入 4% 多聚甲醛,置于 4 ℃固定细胞 20 min;离心弃去固定液后再加入含 0.5% 皂素的通透液于 4 ℃孵育 15 min;离心除上清,加入荧光素标记的抗小鼠 IL-17mAb、IL-4 mAb。4 ℃ 孵育 30 min;用 PBS 洗涤 2 遍后,再用 0.5 ml PBS 重悬细胞,FACS 测定细胞胞内 IL-17 和 IL-4 阳性细胞的百分率。

### 1.5 统计学分析

采用 Prizm 4.0 统计分析软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 $t$ 检验。

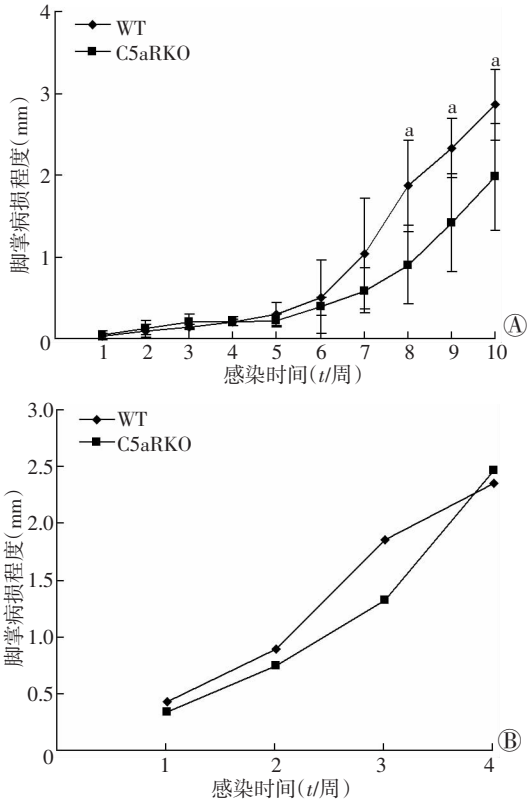
## 2 结果

### 2.1 C5a/C5aR 信号通路对野生型 BALB/c 小鼠 *L. major* 敏感性的影响

为探讨 C5a/C5aR 途径在野生型 BALB/c 小鼠对 *L. major* 敏感性的影响,我们比较了 WT 和 C5aR KO 小鼠在感染

*L. major* 后病损程度的变化。结果发现,常规剂量 *L. major*($1\times10^6$/只)感染后,C5aR KO 小鼠感染部位的病损程度相对于 WT 小鼠显著减轻(图 1A)。引流淋巴结(draining lymphonode, dLN)也明显小于 WT 组,并且其淋巴细胞数($4.34\pm0.98$)$\times10^7$与 WT 组($6.95\pm0.89$)$\times10^7$相比显著减少。

考虑到不同剂量的影响不同,我们进一步探讨了 C5a/C5aR 途径在高剂量 *L. major*($5\times10^6$/只)感染中的作用。结果发现,在感染后第 3 周时两组小鼠的感染部位即出现了明显的病变,5 周后部分小鼠的感染脚掌出现了溃疡。相对于 WT 小鼠,尽管 C5aR KO 小鼠感染部位的病变程度有所减轻,但两者无显著差异(图 1B)。这些结果表明,C5a/C5aR 信号通路在一定 *L. major* 感染剂量范围内,可调节 BALB/c 小鼠对 *L. major* 的敏感性,但当 *L. major* 毒力过高时,其调节作用是有限的。



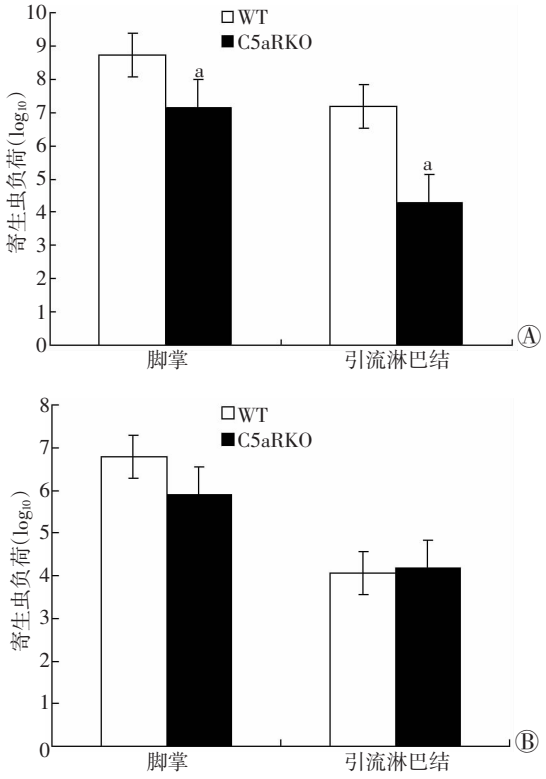

a: $P<0.05$,与 WT 组比较

A: 常规剂量 *L. major*($1\times10^6$/只)感染小鼠后脚掌病损程度; B:高剂量 *L. major*($5\times10^6$/只)感染小鼠后脚掌病损程度

**图 1　C5a/C5aR 途径对 BALB/c 小鼠 *L. major* 敏感性的调节作用**

## 2.2　C5a/C5aR 信号途径对 *L. major* 感染小鼠体内寄生虫增殖的影响

为探讨 C5a/C5aR 信号通路对 BALB/c 小鼠对 *L. major* 敏感性的调节机制,我们检测了 *L. major* 感染的 WT 与 C5aR KO 小鼠体内的寄生虫负荷。结果发现,在常规剂量 *L. major*($1\times10^6$/只)感染条件下,C5aR KO 小鼠体内(如脚掌或引流淋巴结)寄生虫数量显著低于 WT 小鼠(图 2A);与上述形态学指标一致的是,在高剂量 *L. major*($5\times10^6$/只)感染的情况下,两组小鼠体内寄生虫的负荷无明显差异(图 2B)。




a: $P<0.01$,与 WT 组比较

A:常规剂量 *L. major*($1\times10^6$/只)感染;B:高剂量 *L. major*($5\times10^6$/只)感染

**图 2　C5a/C5aR 途径对 *L. major* 感染小鼠体内寄生虫增殖的影响**

## 2.3　C5a/C5aR 通路对 *L. major* 感染小鼠 Th2 细胞应答的调节作用

已有的研究表明,*L. major* 感染小鼠表现为抵抗还是敏感取决于其诱导的 $CD4^+$ T 细胞亚群的发育及其细胞因子的分泌。*L. major* 野生型 BALB/c 小鼠则在感染后产生 IL-4,促进 Th2 细胞的发育和增殖,抑制 Mφ 对胞内菌的杀伤[2]。基于此,我们进一步检测了 WT 与 C5aRKO 小鼠 $CD4^+$ T 细胞亚群 IL-4 产生的变化,结果表明 C5aR KO 小鼠 $CD4^+$T 细胞分泌的 IL-4 显著降低(图 3)。相反,FACS 胞内染色结果表明关键炎症因子 IL-17 阳性细胞亚群的百分率在两组小鼠之间无显著差异(图 4)。

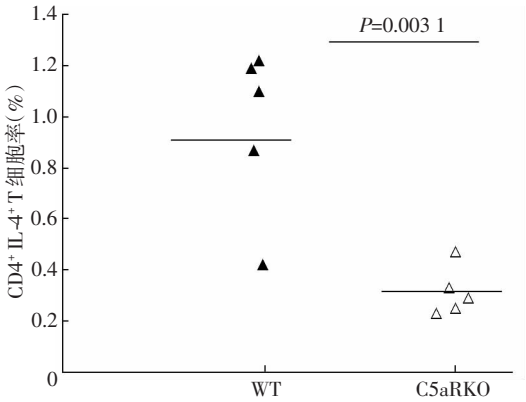



**图 3　C5a/C5aR 途径对 Th2 相关细胞因子 IL-4 的调节作用**

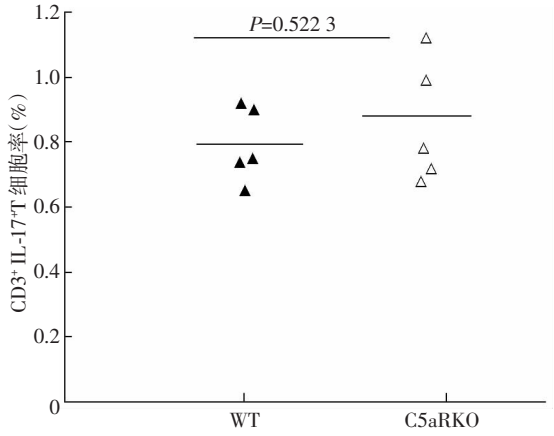



**图4 C5a/C5aR途径对 *L. major* 感染小鼠 $CD3^+$ IL-$17^+$ T细胞亚群的调节作用**

## 3 讨论

补体系统是机体天然免疫防御的重要组成部分，也是沟通机体固有及适应性免疫应答之间的桥梁，在抗微生物入侵、病原体感染等方面发挥着重要作用。C5a作为补体活化过程中产生的具有强大生物学活性的小分子片段，它除了已知的可诱导局部炎症反应外，近几年研究发现C5a/C5aR信号通路对T细胞免疫应答起着重要的调节作用[11-13]。

本研究利用C5aR KO小鼠为研究对象，发现C5a/C5aR信号通路缺陷的BALB/c小鼠在常规剂量的 *L. major*($1\times10^6$)感染时，其局部病损程度相对WT小鼠显著减轻，并且体内寄生虫载量相对WT小鼠也显著降低，Th2细胞关键细胞因子IL-4的产生显著下降，可见C5a/C5aR信号途径通过调节Th2细胞因子IL-4在控制 *L. major* 等细胞免疫介导的疾病发生中有着重要的作用。这种调节作用与C5a/C5aR信号通路在流感A型病毒等病毒性感染模型中引起的Th2的上调作用一致[14]。

IL-17(又称IL-17A)是一类新发现的促炎细胞因子，来源于不同的细胞，包括 $CD4^+$ Th17细胞、$CD8^+$ T细胞、中性白细胞及NK细胞等[15]。在CLP诱导的脓毒症研究模型中发现，C5a缺陷会引起小鼠存活率升高及IL-17水平下调[16]。但本实验利用 *L. major* 感染的BALB/c小鼠模型发现，C5aR KO小鼠感染部位引流淋巴结T细胞产生的IL-17相对WT组并无明显差异，表明C5a/C5aR通路在 *L. major* 感染所引发的病理发生中对炎症因子IL-17的作用并不明显。

综上，本研究发现C5a/C5aR信号通路在 *L. major* 感染的BALB/c小鼠中可能通过调节Th2细胞因子IL-4的产生，进而诱导Th2免疫应答的分化，加剧 *L. major* 感染小鼠的病理发生。越来越多的研究利用C5aR拮抗剂或利用C5aRKO小鼠阻断C5a/C5aR通路来研究该途径在各种疾病病理发生中的作用与机制[17]。本结果有助于进一步揭示补体在利什曼病发生中的免疫调节作用，而且可为发展有效针对利什曼病的免疫治疗方案提供理论指导。

## 参考文献：

[1] Mougneau E, Bihl F, Glaichenhaus N. Cell biology and immunology of Leishmania[J]. Immunol Rev, 2011, 240(1): 286 - 296.
[2] Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice[J]. Nat Rev Immunol, 2002, 2(11): 845 - 858.
[3] Jayakumar A, Widenmaier R, Ma X, *et al*. Transcriptional inhibition of interleukin-12 promoter activity in Leishmania spp. -infected macrophages[J]. J Parasitol, 2008, 94(1): 84 - 93.
[4] Ray M, Gam A A, Boykins R A, *et al*. Inhibition of interferon-gamma signaling by Leishmania donovani[J]. J Infect Dis, 2000, 181(3): 1121 - 1128.
[5] Lopez-Kostka S, Dinges S, Griewank K, *et al*. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice[J]. J Immunol, 2009, 182(5): 3039 - 3046.
[6] Mosser D M, Brittingham A. Leishmania, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation[J]. Parasitology, 1997, 115 Suppl: S9 - S23.
[7] Carter C R, Whitcomb J P, Campbell J A, *et al*. Complement receptor 3 deficiency influences lesion progression during Leishmania major infection in BALB/c mice[J]. Infect Immun, 2009, 77(12): 5668 - 5675.
[8] Olivier M, Gregory D J, Forget G. Subversion mechanisms by which Leishmania parasites can escape the host immune response: a signaling point of view[J]. Clin Microbiol Rev, 2005, 18(2): 293 - 305.
[9] Guo R F, Ward P A. Role of C5a in inflammatory responses[J]. Annu Rev Immunol, 2005, 23: 821 - 852.
[10] Xu G, Liu D, Okwor I, *et al*. LIGHT is critical for IL-12 production by dendritic cells, optimal CD4 + Th1 cell response, and resistance to Leishmania major[J]. J Immunol, 2007, 179(10): 6901 - 6909.
[11] Nataf S, Davoust N, Ames R S, *et al*. Human T cells express the C5a receptor and are chemoattracted to C5a[J]. J Immunol, 1999, 162(7): 4018 - 4023.
[12] Strainic M G, Liu J, Huang D, *et al*. Locally produced complement fragments C5a and C3a provide both costimulatory and survival signals to naive CD4 + T cells[J]. Immunity, 2008, 28(3): 425 - 435.
[13] Peng Q, Li K, Wang N, *et al*. Dendritic cell function in allostimulation is modulated by C5aR signaling[J]. J Immunol, 2009, 183(10): 6058 - 6068.
[14] Kim A H, Dimitriou I D, Holland M C, *et al*. Complement C5a receptor is essential for the optimal generation of antiviral CD8 + T cell responses[J]. J Immunol, 2004, 173(4): 2524 - 2529.
[15] Bettelli E, Oukka M, Kuchroo V K. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity[J]. Nat Immunol, 2007, 8(4): 345 - 350.
[16] Xu R, Wang R, Han G, *et al*. Complement C5a regulates IL-17 by affecting the crosstalk between DC and gammadelta T cells in CLP-induced sepsis[J]. Eur J Immunol, 2010, 40(4): 1079 - 1088.
[17] 李兰，赵天智，夏永智，等. C5a受体拮抗剂对小鼠脊髓损伤后后肢功能的影响及作用机制[J]. 第三军医大学学报，2010，32(8)：763 - 766.

（**收稿**：2011-09-21；**修回**：2011-10-22）
（编辑 汪勤俭）