

# 细粒棘球绦虫 Eg10 诱导树突状细胞产生 Th2 免疫反应

王娅娜<sup>1,2,3</sup>, 王 婵<sup>1</sup>, 王 双<sup>1</sup>

**摘要:** 目的 研究细粒棘球绦虫蛋白 10(antigen 10 of *Echinococcus granulosus* Eg10)对小鼠感染细粒棘球绦虫免疫机制的影响。方法 通过体外培养骨髓来源的小鼠树突状细胞(Bone marrow dendritic cell, BMDC),用不同的抗原包囊液(hydatid fluid HF)、Eg10、脂多糖(lipopolysaccharide LPS)单独或联合作用 DC,共 6 组。通过扫描电镜和透射电镜观察各组 DC 形态学的变化;通过流式细胞仪检测 DC 的吞噬能力、迁移能力的变化、刺激 T 细胞增殖能力的变化及 DC 表面分子的表达情况;利用 ELISA 检测 DC 分泌各种细胞因子的变化。结果 Eg10 抑制 DC 向成熟状态发展,与囊液对照组相比,DC 表面仅增多了褶皱,两者均可提高 DC 吞噬能力;刺激 T 细胞的增殖能力很弱,但是能够提高 Treg 细胞的含量;同时发现 Eg10 组 DC 表面分子 MHCII 和 CD86 的表达量高于空白组,分泌高含量的 IL-10, IL-6。通过给予 LPS 联合刺激 DC 形态趋于半成熟状态,细胞表面树突增加,表面分子 MHCII、CD80、CD40 的表达增高,CD86 的表达量降低;IL-10 和 IL-6 的含量也相应的下降。结论 Eg10 诱导 DC 产生 Th2 反应。

**关键词:** 树突状细胞; Eg10; 免疫应答; 细粒棘球绦虫

中图分类号:R378.5

文献标识码:A

文章编号:1004-2694(2020)06-0439-09

## Antigen 10 of *Echinococcus granulosus* (Eg10) induce DC production Th2 response

WANG Ya-na<sup>1,2,3</sup>, WANG Chan<sup>1</sup>, WANG Shuang<sup>1</sup>

(1. Department of Medical Genetic and Cell biology of academic institute  
in Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China;

2. Key laboratory of hydatid disease of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China;

3. Center of Scientific Technology of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

**Abstract:** To explore the immune mechanism of the mice immunized with Eg10 were infected with *Echinococcus granulosus* more severe than control group. The bone marrow dendritic cell (BMDC) of mice were obtained and cultured with different antigens including Eg10, hydatid fluid (HF) and lipopolysaccharide(LPS). The morphology of DCs in different groups were observed by electronic microscope, the capacity of up-taking, migrating, surface molecular and T cell proliferation capability were detected with flow cytometry. cytokines (IL-10, IL-6, IL-12p70 and TNF- $\alpha$ ) in DCs supernatant were detected by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Results showed that Eg10 like HF inhibited the DCs maturation, and the folds on superficial DCs of the two groups became more than control group and had very weak capability induce T cell proliferation, but T regulation cells increased. Eg10 group's DCs had higher up-taking ability and expressed lower surface molecular of DCs, only MHCII and CD86 were higher than control group significantly ( $P < 0.05$ ); and secreted cytokines Interleukin-10 (IL-10) and IL-6 higher level than other groups. However, after added LPS DCs became semi-mature status and more dendrites grow on surface, and surface molecular MHCII, CD80, CD40 expressed higher than other groups except for LPS group, but CD86 level were decreased. Meanwhile, the level of IL-10 and IL-6 were also decreased. So, these data indicated that Eg10 inhibited DC maturation and induced DCs produce Th2 immune response.

国家自然科学基金(No.81160203),宁夏医科大学校级项目(No. XM2019003)

第一作者:王娅娜,Email: wang-alice03@163.com;

ORCID:0000-0003-1541-492X

作者单位:1. 宁夏医科大学基础学院医学遗传学与细胞生物学教研室,银川 750004;

2. 宁夏医科大学包虫病重点实验室,银川 750004;

3. 宁夏医科大学科学技术研究中心,银川 750004

**Keywords:** dendritic cell; Eg10; immune response; *Echinococcus granulosus*

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81160203), Foundation of Ningxia Medical University (No.XM2019003)

细粒棘球绦虫病又称包虫病,是一种人兽共患寄生虫病,在我国的中西部畜牧业地区流行较广<sup>[1]</sup>。2017年在四川成都市召开了全国包虫病防控技术研讨会,互相交流包虫病的防控经验,希望尽快找出对包虫病有效的防控措施。人们一直对疫苗防控包虫病给予厚望<sup>[2-3]</sup>,虽然已经发现一些包虫疫苗候选分子,但是目前尚无一种疫苗推广应用。主要原因是由于包虫虫体发育阶段多(包括六钩蚴、细粒棘球蚴、成虫、虫卵),虫体体积大,成分复杂,以及人们对包虫疫苗诱导机体的免疫感染机制不明确所致。前期研究发现抗原Eg10能够诱导小鼠产生特异性抗体<sup>[4]</sup>,但在免疫小鼠后进行攻击感染的实验中,小鼠体内包囊数目及体积均高于对照组<sup>[5]</sup>。为了探究原因,通过体外培养DC,模拟疫苗进入机体,对抗原提呈细胞捕获抗原这一过程进行研究。

## 1 材料与方法

1.1 材料 6~8周C57BL/6雄鼠购自宁夏医科大学实验动物中心。包虫囊液(hydatid fluid HF)取自宁夏医科大学附属医院外科手术的包虫病患者,术中无菌从包囊中抽取,分装、冻存于-20℃。重组表达菌株Eg10/pET28a/BL21由宁夏医科大学科学技术研究中心包虫病实验室提供。

1.2 主要试剂 Triton114及红细胞裂解液购自Solarbio;RPMI1640、1%的青霉素和链霉素购自美国Gibco公司;胎牛血清、PBS购自美国Hyclone公司;LPS(*Escherichia coli* strain 0111:B4)、FITC-dextran、蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(PMSF)购自美国Sigma公司;丝裂霉素C购自德国Merk公司;荧光染料羧基荧光素双乙酸盐,琥珀酰亚胺酯(CFSE)购自美国Introvgen公司;IPTG、甲叉双丙烯酰胺、丙烯酰胺购自Promega公司;蛋白、酵母提取物购自OXOID公司;考马斯亮兰购自BIOMOL公司;L-谷氨酰胺、β-巯基乙醇、咪唑购自Amersco公司;蛋白纯化树脂购自Roche公司;Mouse IL-6、Mouse IL-10、Mouse IFN-γ、Mouse IL-12p70ELISA检测试剂盒购自杭州联科生物;anti-mouse CD11c-PE、anti-mouse CD80-FITC、anti-mouse CD40-PE-Cyanin5、anti-mouse MHCII-PE-cyanin5、anti-mouse CD86-FITC、IL-4、巨噬细胞粒细胞集落刺激因子(GM-CSF)、Treg细胞检测试剂盒购自eBioscience;CD4<sup>+</sup>T-FITC磁珠提取试

剂盒购自Miltenyi公司;内毒素检测试剂盒Toxin-SensorTM Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit购自Genescript公司;细胞培养板12孔、24孔、96孔购自Corning公司;其它化学试剂为国产分析纯。

### 1.3 方法

1.3.1 抗原的纯化 按照罗氏亲和层析法说明书,Ni<sup>2+</sup>亲和层析纯化Eg10。因细胞培养中加入的蛋白为无菌的可溶性蛋白,因此对Eg10和HF进行0.45 μm过滤除菌、BSA定量及内毒素检测。

1.3.2 小鼠BMDC的获取及培养 C57BL/6 6~8 w 2只雄鼠采用颈椎脱臼处死,无菌获取股、胫骨的骨髓细胞。红细胞裂解4~7 min,离心1 000 r/min,弃上清,计数。用含10%胎牛血清(fetal bovine serum FBS),50 μmol/L β-巯基乙醇,2 mmol/L 谷氨酰胺,5 ng/mL IL-4,10 ng/mL GM-CSF培养基调整细胞浓度,按2×10<sup>6</sup>/mL接种到12孔细胞培养板中,37℃,5%CO<sub>2</sub>培养,于3 d、5 d进行半量换,补充IL-4及GM-CSF的量。培养至第7 d,收集BMDC。

1.3.3 Eg10致敏DC的浓度及时间的优化 收集第7 d的BMDC,用不含GM-CSF、IL-4的10%FBS培养液稀释至1×10<sup>6</sup>/mL,接种24孔细胞培养板中,分别用Eg10 0.1 μg、1 μg、10 μg的浓度致敏DC,同时观察不同浓度下致敏DC在6 h、20 h、48 h表面分子表达情况,从而筛选出最佳浓度及最佳时间。

1.3.4 BMDC的分组 收集第7 d的BMDC,用不含GM-CSF、IL-4的10%FBS培养液稀释至1×10<sup>6</sup>/mL,接种24孔细胞培养板中,分6组。HF组为阴性对照组(加入HF 30 μg/mL)、Eg10组(加入抗原Eg10 1 μg/mL)、LPS阳性对照组(加入LPS 100 ng/mL)、RPMI 1640为control组,37℃,5%CO<sub>2</sub>培养20 h;联合组Eg10+LPS组(加入抗原Eg10 1 μg/mL和LPS 100 ng/mL)和HF+LPS组(加入HF 30 μg/mL和LPS 100 ng/mL),先加入Eg10或HF 37℃,5%CO<sub>2</sub>培养20 h后,再加入LPS培养20 h。

1.3.5 BMDC细胞表面分子的检测 收集第7 d的各组DC,分别加各组表面分子抗体anti-mouse MHC II-PE-Cy5、anti-mouse CD80-FITC、anti-mouse CD11c-PE、anti-CD40-PE-cy5、anti-mouse CD86-FITC,加入含2%PFA500 μL,设立空白对

照,4℃,避光,30 min,Guava流式细胞仪检测BM-DC表面分子表达。每个样本检测细胞不少于 $1\times10^4$ 。

### 1.3.6 形态学观察

**1.3.6.1 扫描电镜的观察** DC的表面形态培养第7 d,收集各组DC,取 $1\times10^5$ 的DC制备爬片,37℃培养20 h,2.5%戊二醛固定1 h,1%锇酸再固定0.5 h,30%~100%乙醇梯度脱水,加入叔丁醇,真空泵干燥处理,真空离子喷镀铂金膜,扫描电镜日立S-3400N观察各组DCs的表面形态。各组随机视野选100个DC,统计细胞表面有突起的细胞和无突起的细胞数量进行比较(突起<3记为无突起)。再从各组DC表面含有突起细胞中随机选20个,对突起的数目计数。

**1.3.6.2 透射电镜观察BMDC的超微结构** 培养第7 d,各组收集DC $3\times10^6$ ,离心1 000 r/min,10 min,弃上清,迅速加入2.5%戊二醛固定2 h,PBS洗涤3次,每次10 min,用1%锇酸后固定1 h,PBS洗涤2次,每次10 min,30%~100%乙醇梯度脱水,每次10 min,再用环氧丙烷置换2次,每次0.5 h,最后用环氧树脂618包埋,Leica UC7型超薄切片机切片,醋酸铀-枸橼酸铅染色,透射电镜日立H-7650B观察DC的超微结构。

**1.3.7 吞噬能力测定** 培养第7 d,收集各组DC,加入右旋多糖FITC-dextran(40 kDa 1 mg/mL),37℃孵育1 h,1 000 r/min离心,加入2%PFA 500 μL,流式细胞仪检测各组DCs吞噬FITC-dextran的含量。结果重复3次,每个样本检测细胞不少于 $1\times10^4$ 。吞噬能力的强弱通过FITC荧光强度来反应。

### 1.3.8 T细胞增殖能力测定

**1.3.8.1 CD4<sup>+</sup> T细胞的获取及标记** C57 BL/6小鼠6~8 w脱颈处死,无菌条件取脾脏,制备脾细胞悬液,裂解红细胞,按照CD4<sup>+</sup>磁珠说明书,获取CD4<sup>+</sup> T细胞, $1\times10^7$ 细胞加入CFSE(2.5~5 μmol/L),37℃避光,15 min,终止反应用预冷的FBS,10% FBS洗2次。

**1.3.8.2 同种异体混合淋巴细胞培养** DC作为刺激细胞 $2\times10^5$ 加入丝裂霉素C(25 μg/mL)37℃,处理30 min,CD4<sup>+</sup> T细胞为效应细胞,DC:CD4<sup>+</sup>T(按1:10、1:20、1:50不同比例)培养,每孔终体积达200 μL,每样本设复孔,在37℃,5%CO<sub>2</sub>培养5 d,流式细胞仪检测,以出现在背景荧光之前区域的荧光强度反应T细胞的增殖能力,实验重复3次。

**1.3.8.3 Treg细胞的含量** 按DC与CD4<sup>+</sup> T 1:10进行培养5 d,通过Treg细胞检测试剂盒,流式细

胞仪检测不同组中Treg细胞的含量(方法按照Mouse Regulatory T Cell Staining Kit #3)

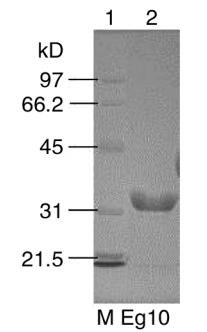
**1.3.9 各组DC迁移能力的检测** 培养第7 d,收集各组DC,RPMI 1640洗2次,除去血清白蛋白,按比例加入CFSE(终浓度为2.5~5 μmol/L),混匀,37℃避光15 min,每5 min振荡1次,然后用预冷的FBS终止反应,37℃,5 min,1 200 r/min,10 min,用含10% FBS洗2次,细胞计数 $2\times10^5$ ,注射小鼠足垫,48 h后,通过Cri Maestro小动物活体成像系统观察DC的迁移能力,对不同组小鼠选取相同的感兴趣区域ROI(Region Of Interest),进行荧光平均强度的比较。实验重复4次,结果取平均值。

**1.3.10 细胞因子的检测** 培养第7 d,收集各组DCs的培养上清液,按照小鼠细胞因子IL-12p70,TNF-α,IL-6,IL-10试剂盒说明书,通过酶联免疫吸附实验检测上清液中各因子的含量,每个样本设立3个复孔,通过双波长570 nm和630 nm进行检测。

**1.3.11 统计方法** 采用SPSS 17.0统计软件和GraphPad Prism 6.0软件对实验结果的数据进行分析,所有的数据均采用均数标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,采用t检验分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 经过Ni<sup>+</sup>亲和层析柱可以纯化出1条约31 kD的蛋白条带(图1)。**



1:protein marker; 2:Eg10

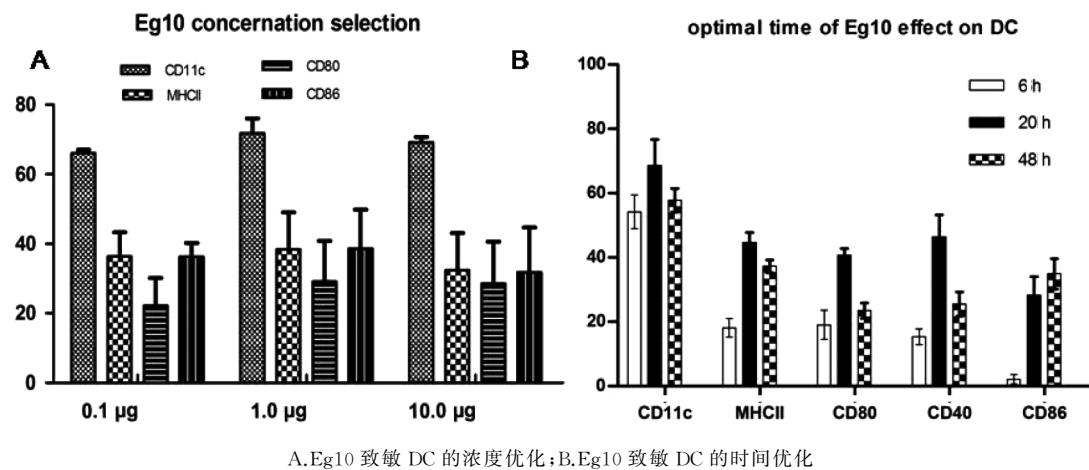
图1 Eg10

Fig.1 Eg10 protein

**2.2 Eg10对DC致敏条件优化** 实验中发现Eg10在浓度为1 μg/mL时致敏DC,DC表面分子MH-CII,CD80,CD86的表达均与0.1 μg和10 μg两个浓度相比轻微上提,无统计学差异( $t=0.80,1.72,0.92,1.93,0.53,1.83,P\text{均}>0.05$ ),见图2A,对于Eg10作用DC不同时间点比较发现,20 h组DC各表面分子均高于6 h和48 h组( $t=4.09,7.48,6.12$ ,

8.76、7.37、3.08、2.09、4.87、5.9、1.88,  $P$  均 $<0.05$ )图

2B,之后实验都采用 Eg10 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  致敏 DC 20 h。



A. Eg10 致敏 DC 的浓度优化;B.Eg10 致敏 DC 的时间优化  
图 2 Eg10 致敏 DC 调节的优化

Fig.2 Optimizing the conditions of DCs stimulated with Eg10

2.3 DC 表面分子表达 显示 HF 组和 Eg10 组的表面分子 CD80 和 CD40 均与 control 组相比,无统计学差异( $t=1.34、1.53、1.10、1.93, P$  均 $>0.05$ )。但是 Eg10 的 CD86 的表达量高于其它组。各组 DC

先受到 Eg10 或 HF 的作用后,又加入 LPS 联合刺激,显示 Eg10+ LPS 和 HF+LPS 的 DC 表面分子表达量均不同程度的变化,尤以 Eg10 组显著,MH-CII 和 CD40 提高,CD86 的表达却降低(表 1)。

表 1 各组 DC 表面分子表达%

Tab.1 Fluorescence intensities for expression of surface molecular of DC stimulated with different antigens/%

分组	CD80	MHCII	CD86	CD40
Control	16.88±2.11	50.116±7.007	15.95±3.195 <sup>③</sup>	10.85±1.1
HF	17.24±3.71 <sup>③</sup>	48.22±6.6 <sup>③</sup>	16.203±2.095	10.96±3.1
Eg10	18.71±3.36	56.67±2.41 <sup>①②</sup>	27.73±3.57 <sup>①②</sup>	13.63±3.82
LPS	23.6133±3.85 <sup>①②</sup>	61.53±5.59 <sup>①</sup>	22.1266±2.917 <sup>①</sup>	17.32±4.79 <sup>①②</sup>
HF+LPS	19.005±4.24	49.575±1.888 <sup>③</sup>	16.42±1.004	19.34±3.90 <sup>①</sup>
Eg10+LPS	20.74±1.92	61.67±5.33 <sup>①</sup>	20.96±1.625	18.123±3.90 <sup>①</sup>

注:①为  $P<0.05$ , vs. control group;②为  $P<0.05$ , vs. HF group;③为  $P<0.05$ , vs. LPS group

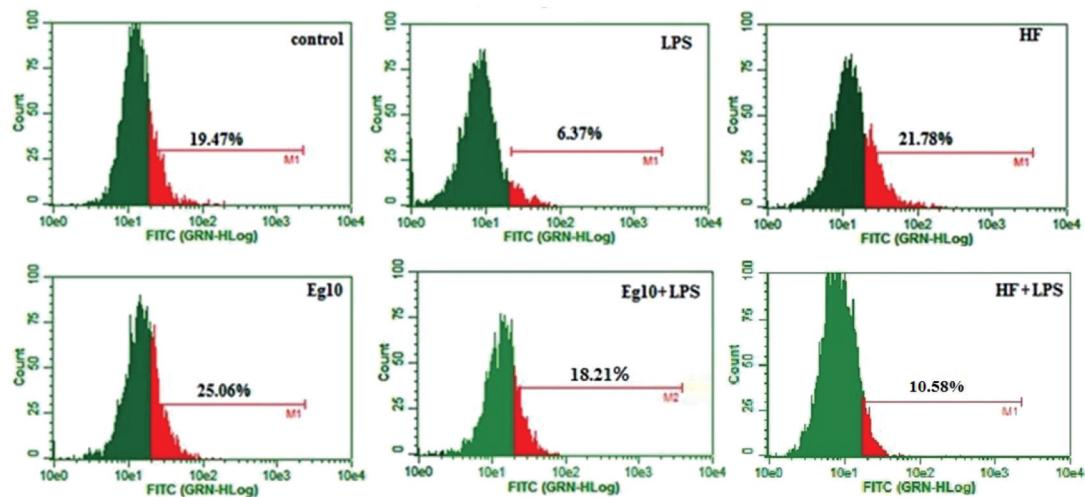
2.4 DC 吞噬能力测定 发现 Eg10 组的吞噬 FITC-dextran 的能力高于其它各组,除 HF 组均有统计学差异( $t=3.16、10.56、3.87、8.18, P$  均 $<0.05$ ),联合组中由于 LPS 加入,将 Eg10 的吞噬能力从 25.06% 降到 18.21%,而对 HF 的影响更为明显从 21.785 降到 10.58%(图 3)。

2.5 DC 形态学变化 扫描电镜观察各组 DC 发现 Eg10 和 HF 组 DC 与 control 组相比,体积稍微增大,细胞表面褶皱增多,但是未见明显的表面突起。说明 Eg10 和 HF 这两种抗原均不能有效刺激 DC 成熟,LPS 组 DC 呈现出成熟形态,表面褶皱明显增多,突起清晰可见。在联合组中通过 LPS 的加入

DC 表面呈现出不同的形态,体积拉长为梭形,Eg10+LPS 组尤为明显,并且可以观察到细胞表面有突起产生(图 4-A)。各组随机观察 100 个细胞,并对细胞是否有表面突起进行计数,结果 LPS 阳性组表面突起数目占细胞百分比达到 90%,HF、Eg10 与 control 组之间无统计学差异( $t=1.29、1.76, P$  均 $>0.05$ )。LPS 的加入 Eg10 和 HF 组可以促进 DC 表面突起显著增多,从 18% 和 21% 上提至 61% 和 73%(表 2)。同时对各组中含有突起的细胞的突起计数。结果与之前描述一致。LPS 的加入不仅能够促进更多的 DC 表面产生突起,还可以促进突起数目和长度的增加(表 3)。进一步通过透射电镜对

各组 DC 的超微结构进行观察,发现 Eg10 组细胞内的囊泡(vacuoles V)增多,线粒体 mitochondria M)体积增大,略肿胀,电子致密度变浅,同时与 LPS 组相比,粗面内质网(rough endoplasmic reticulum

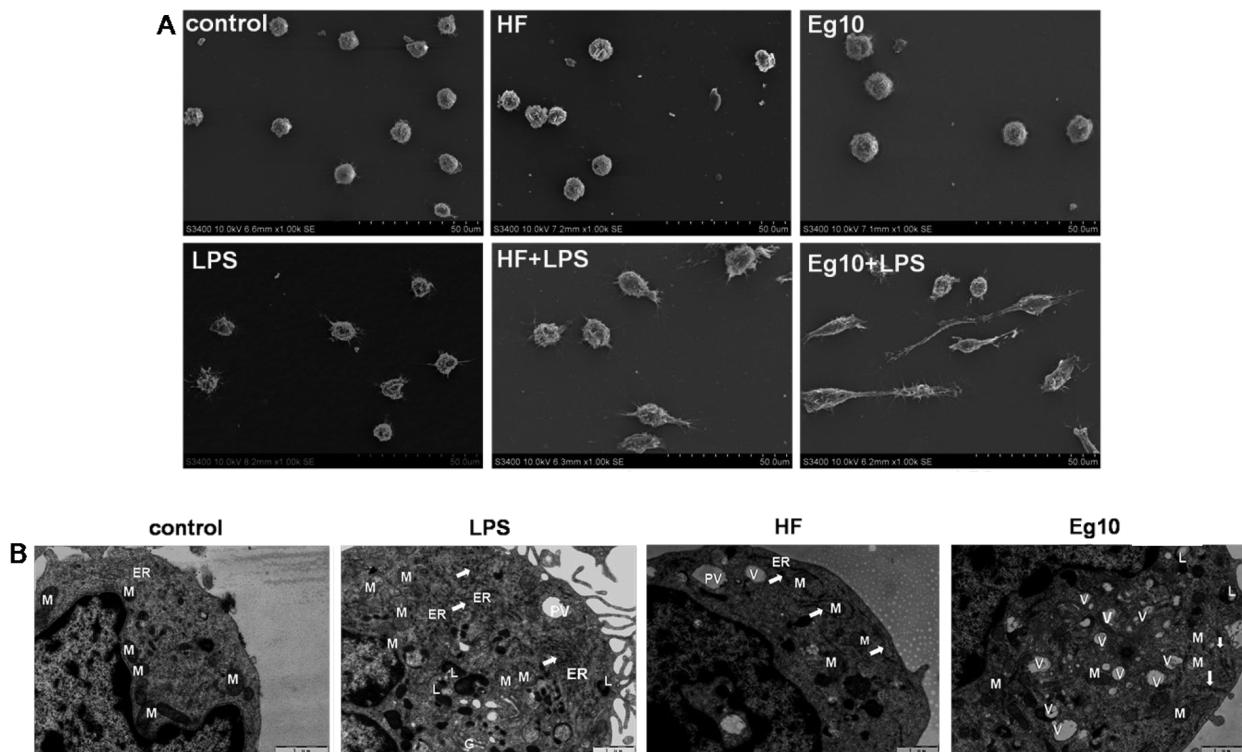
RER)的含量明显减少,而且排列无规则。LPS 组可以观察到 RER 数目非常多,靠近细胞膜成排排列(图 4-B)。



注:红色反应的是吞噬 FITC 右旋多糖的能力,绿色反应的是背景荧光

图 3 各组 DC 吞噬能力的测定

Fig.3 Phagocytability in different DCs group



A. 扫描电镜观察不同组 DC 的形态 B.透射电镜观察不同组 DC 的超微结构

图 4 电子显微镜观察不同组 DC 的形态

Fig.4 Morphology of different groups of DCs observed by electronic microscope

表 2 不同组含有树突的 DC 与不含树突的 DC 数目的比较(每组随机选 100 个 DC)

Tab.2 Number of DCs with dendrite and the number of DCs without dendrite of different group comparative (random selection 100 DCs in each group)

Group	the number of DCs with dendrites	the number of DCs without dendrite
control	22	78
HF	21	79
Eg10	18	82
LPS	90	10
Eg10+LPS	61	39
HF+LPS	73	27

表 3 各组含树突的 DC 平均所含毛刺的数目比较(每组选取 20 个 DC)

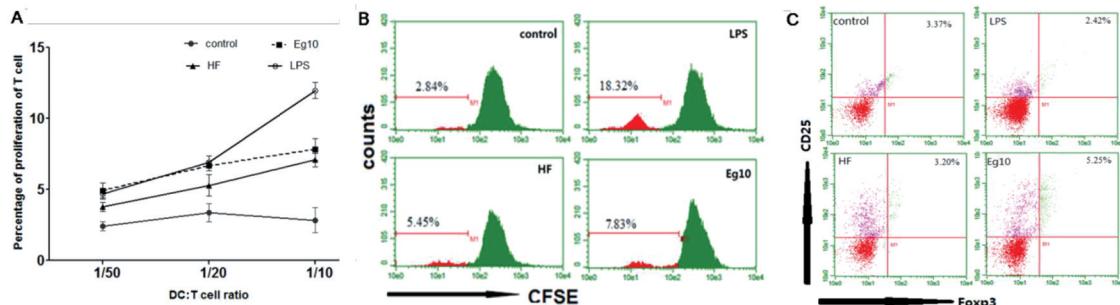
Tab.3 DC with dendrites of different groups comparative each other (selection 20 DC with dendrites in each group)

Group	n	dendrites
control	20	8.15±0.85
HF	20	7.5±0.854
Eg10	20	8.1±1.542
LPS	20	37.95±2.142 <sup>①②③</sup>
Eg10+LPS	20	20.08±1.006 <sup>①②</sup>
HF+LPS	20	23.30±1.847 <sup>①②</sup>

注:①为  $P<0.001$ , vs. control group; ②为  $P<0.001$ , vs. HF group; ③为  $P<0.001$ , vs. HF+LPS group

2.5 T 细胞增殖能力的测定 各组 DC 与 T 细胞均在 1:10 的比例下能促进 T 细胞增殖。HF 与 Eg10 组无统计学差异, 刺激 T 细胞增殖能力较弱, 显著低于 LPS 组, 高于 control 组(图 5-A B)。通过

流式检测 T 细胞中 Treg 的含量发现, Eg10 组的 Treg 的数目增加, HF 组与 control 组无差异。LPS 组略低于 control 组, 也无统计学差异(图 5-C)。



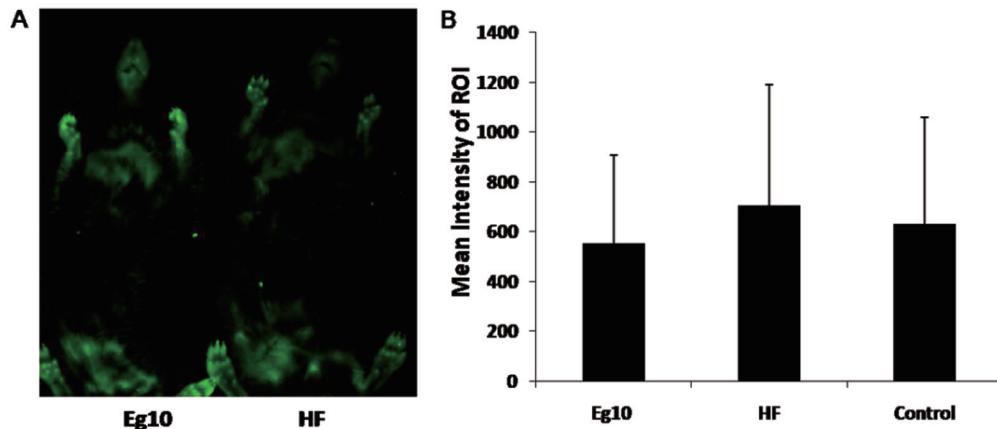
A. DC 与 T 细胞不同比例下,各组 T 细胞的增殖情况 B. 在 1:10 的比例下各组 T 细胞的增殖能力 C. Treg 在 CD4<sup>+</sup> T 细胞中所占比例

图 5 各组 DC 对 T 细胞增殖能力的检测及 Treg 细胞的含量检测

Fig.5 Effect of differentiated DCs on T-cell proliferation and Treg cell

2.6 各组 DC 细胞在体内的迁移发现 HF 组和 Eg10 组并未见到体内有特异性荧光区域, 只有注射了荧光标记细胞的脚垫上存在。除脚垫外的绿色荧

光均为皮毛产生的非特异性荧光(图 6-A)。与对照组的 ROI 的荧光强度无差异(图 6-B)。



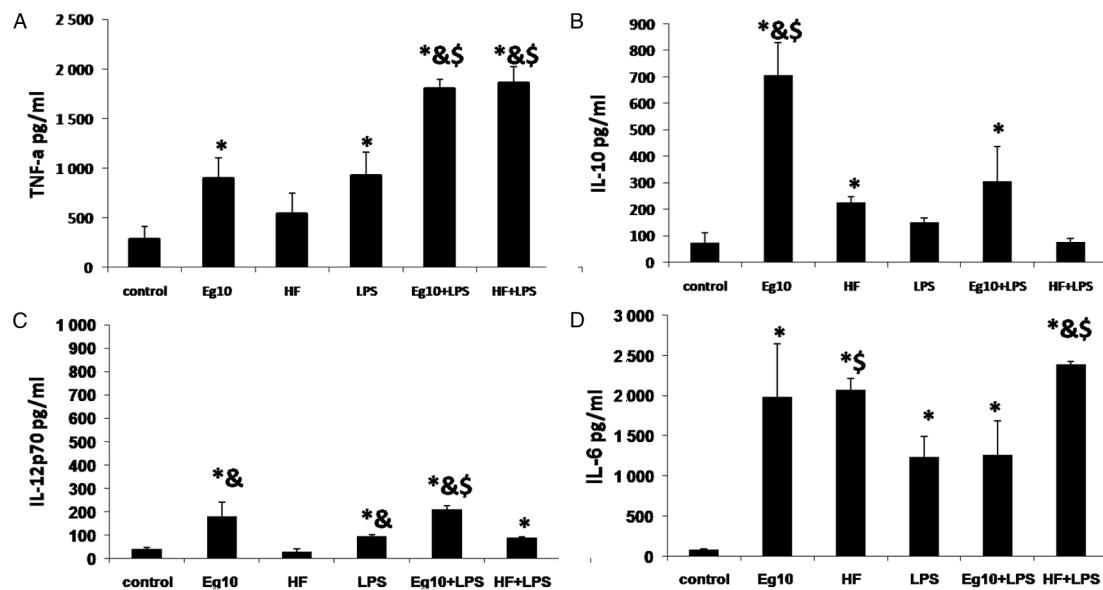
A. 不同组小鼠 DC 迁移能力的检测; B. 感兴趣区域的平均荧光强度的比较

图 6 DC 的迁移

Fig.6 Migration of DC stimulated with different antigen

2.7 各组 DC 上清中细胞因子含量的测定 HF 组分泌大量 IL-6 和少量的 IL-10; 不分泌 IL-12p70; 与 LPS 联合刺激, IL-6、IL-12p70 和 TNF- $\alpha$  的表达量均有提高, IL-10 的表达量则下降。Eg10 组分泌的 IL-10 的表达量高于其它各组 ( $t = 12.32, 10.83, 9.26, 7.80, 12.26, P$  均  $< 0.05$ ); IL-6 的表达量与

HF 组之间无差异 ( $t = 2.035, P > 0.05$ ); IL-12p70 与 TNF- $\alpha$  的分泌量高于 control 组 ( $t = 3.93, 3.19, 3.14, 3.42, P$  均  $< 0.05$ ) 和 HF 组; 加入 LPS 联合刺激, IL-6 及 IL-10 的表达量均下降, 与之相反 TNF- $\alpha$  的表达量则显著增高与 HF+LPS 组无差异, 而 IL-12 p70 的分泌量变化不明显(图 7)。

A. The level of TNF- $\alpha$  in supernatants of DCs B. The level of IL-10 in supernatants of DCs C. The level of 12p70 in supernatants of DCs D. The level of IL-6 in supernatants of DCs

\*  $P < 0.05$ , vs. control group; \* & \*  $P < 0.05$ , vs. HF group; \* \$  $P < 0.05$  vs. LPS group;

图 7 各组培养 DC 的上清中细胞因子的含量

Fig.7 Expression of cytokines in DCs stimulated with different antigens

### 3 讨论

当寄生虫或寄生虫疫苗进入机体, 最先捕获它们的是 DC。DC 是目前所知的功能最强大的抗原

提呈细胞, 在白细胞中所占比例很小。它是连接机体固有免疫和获得性免疫的桥梁, 能很好的平衡免疫耐受和炎症反应<sup>[6-7]</sup>。研究发现无论宿主是鼠还

是人,寄生虫或寄生虫的标志性分子均能直接诱导 DC 产生免疫反应<sup>[8]</sup>。本研究就采用了细粒棘球绦虫虫体自身抗原 Eg10 和囊液混合抗原 HF, 观察他们诱导 DC 产生的免疫应答反应。

Eg10 是由 559 个氨基酸残基组成,位于原头节表面的一种亲水性蛋白,与多房棘球绦虫 10 具有 98.6% 的高度同源性<sup>[9]</sup>,并且与参与真核细胞骨架的质膜连接 ERM 蛋白家族有高同源性,推测其可能与虫体的生长代谢有关<sup>[10]</sup>。

HF 在实验中作为阴性对照的抗原,通过以往的研究发现 HF 主要以抑制 DC 分泌 IL-12p70, 阻止 Th0 向 Th1 型细胞分化,而向 Th2 型细胞分化, 参与寄生虫逃避<sup>[11-12]</sup>。

对于优化 Eg10 抗原致敏 DC 的时间过程中, 我们发现该组 DC 20 h 的表面分子表达量明显高于 6 h 和 48 h 的 DC。推其原因: 抗原作用 DC 6 h, 时间太短,不能很好的致敏 DC, 所以表达量较低, 然而作用 48 h, 表达量反而下降, 考虑是由于 DC 不能耐受 Eg10 的长时间作用,否则会导致死亡, 数目减少, 表面分子表达量下降。在实际观察过程中我们已证实这个推测, 抗原作用 DC 48 h 的时候, 培养孔中出现大量的细胞碎片, 高倍镜下可见活细胞中有大量空泡存在, 可能是由于细胞内很多结构被破坏, 同时透射电镜结果也显示, Eg10 组 DC 细胞中囊泡增多, 线粒体肿胀等现象。

在用扫描电镜观察不同组的 DC 形态中, 我们观察到了 DC 的不成熟, 半成熟及成熟形态<sup>[13-14]</sup>。DC 形态的不同即反应不同的成熟程度, Diaz A 发现不同成熟度的 DC 会导致其抗原提呈能力及诱导 T 细胞增殖能力的不同, 并诱导不同的免疫反应<sup>[15-16]</sup>。在我们的实验中发现了一致的结果, Eg10 和 HF 诱导 DC 成熟的能力非常弱, 与 HF 阴性对照组相比, 仅仅是增加了细胞表面的褶皱, 而对增加细胞表面突起无作用, 细胞表面的突起是 T 与 DC 之间的传输通路, 突起的数目与 DC 激活 T 细胞的增殖能力成正相关<sup>[17]</sup>。因此它们对 T 细胞增殖能力无显著提高, 进一步检测 T 细胞中 Treg 的含量, 发现 Treg 所占比例增高。Treg 细胞主要作用抑制固有免疫和获得性免疫, 并可分泌大量的抑制性炎性因子 IL-10<sup>[18]</sup>。同时通过检测 DC 上清中细胞因子发现 Eg10 组可诱导大量的 IL-6, IL-10 的产生。尤以 IL-10 的显著,甚至高于 HF 组。它为寄生虫生长、繁殖、存活提供了很好的环境,诱导机体产生免疫耐受反应<sup>[19]</sup>。当加入 LPS 进行联合刺激发现 DC 的形态从不成熟状态转为细胞两极为梭形或蝌蚪状的半成熟形态。细胞表面突起增加, 表面分子 MHCII、CD80、CD40 上调, CD86 下调。CD40 作为是 TNF 受体家族中的一员, 对 DC 成熟有促进作用<sup>[20]</sup>, CD86 增高则激活 Th2 型反应<sup>[21]</sup>, 反则亦之。同时 IL-10 和 IL-6 的表达量降低, TNF- $\alpha$  含量的上提, 均显示 DC 的成熟度有所提高。

综上所述, Eg10 不能诱导 DC 成熟, 可产生大量的 Th2 型细胞因子, 提高 T 细胞中 Treg 细胞的含量, 诱导机体产生 Th2 型免疫应答。

#### 利益冲突: 无

**引用本文格式:** 王娅娜, 王婵, 王双. 细粒棘球绦虫 Eg10 诱导树突状细胞产生免疫 Th2 反应[J]. 中国人兽共患病学报, 2020, 36(6): 439-447. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2020.00.069

#### 参考文献:

- [1] Wen H, Vuitton L, Tuxun, et al. Echinococcosis: Advances in the 21st Century[J]. Clinical microbiology, 2019, 32(2): 1-39. DOI:10.1128/cmr.00075-18
- [2] Zhang W, Zhang Z, Shi B, et al. Vaccination of dogs against *Echinococcus granulosus*, the cause of cystic hydatid disease in humans[J]. J Infect Dis, 2006, 194: 966-74. DOI: 10.1086/506622
- [3] Pourseif MM, Moghaddam G, Saeedi N, et al. Current status and future prospective of vaccine development against *Echinococcus granulosus* [J]. Biologicals, 2018, 51: 1-11. DOI: 10.1016/j.biologicals.2017.10.003
- [4] 杜娟, 张炜, 王娅娜, 等. 细粒棘球蚴 Eg10 基因的克隆、表达及免疫特性研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2010, 5: 339-342.
- [5] 王强, 王娅娜, 王程铖, 等. 细粒棘球蚴重组蛋白 14-3-3 和 Eg10 免疫差异的初步研究[J]. 四川大学学报, 2014, (3): 592-596. DOI:103969/j.issn.0490-6756.2014.03.33
- [6] Varol C, Vallon-Eberhard A, Elinav E, et al. Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions [J]. Immunity, 2009, 31: 502-512. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.06.025
- [7] Jankovic D, Kullberg MC, Hieny S, et al. In the absence of IL-12, CD4 $^{+}$  T cell responses to intracellular pathogens fail to default to a Th2 pattern and are host protective in an IL-10(-/-) setting[J]. Immunity, 2002, 16: 429-439. DOI:10.1016/S1074-7613(02)00278-9
- [8] Colonna M, Pulendran B, Iwasaki A, Dendritic cells at the host-pathogen interface[J]. Nat Immunol, 2006, 7: 117-120. DOI:10.1038/ni0206-117
- [9] Frosch PM, Mühlischlegel FW, Sygulla L, et al. Identification of a cDNA clone from the larval stage of *Echinococcus granulosus* with homologies to the *E. multilocularis* antigen Em10-expressing cDNA clone[J]. Parasitol Res, 1994, 80(8): 703-705. DOI: 10.1007/bf00932958

- [10] Hubert K, Cordero E, Frosch M, et al. Activities of the EM10 protein from *Echinococcus multilocularis* in cultured mammalian cells demonstrate functional relationships to ERM family members[J]. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1999, 42(3): 178-88. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0169(1999)42:3
- [11] Rigano R, Buttari B, Profumo E, et al. *Echinococcus granulosus* antigen B impairs human dendritic cell differentiation and polarizes immature dendritic cell maturation towards a Th2 cell response[J]. *Infect Immun*, 2007, 75(4): 1667-78. DOI: 10.1128/IAI.01156-06
- [12] 王娅娜,王强,王婵,等.细粒棘球绦虫重组抗原铁蛋白诱导小鼠骨髓树突状细胞免疫应答的机制研究[J].四川大学学报(医学版),2017,(06): 834-839.
- [13] Ferret-Bernard S, Curwen RS, Mountford AP. Proteomic profiling reveals that Th2-inducing dendritic cells stimulated with helminth antigens have a 'limited maturation' phenotype[J]. *Proteomics*, 2008, 8(5): 980-93. DOI: 10.1002/pmic.200700538
- [14] Naik SH. Demystifying the development of dendritic cell subtypes, a little [J]. *Immunol Cell Biol*, 2008, 86: 439-452. DOI: 10.1038/icb.2008.28
- [15] Diaz A, Casaravilla C, Barrios AA. parasite molecules and host responses in cystic echinococcosis[J]. *Parasite Immunol*, 2016, 38 (3): 193-205. DOI: 10.1111/pim.12282
- [16] Thomson AW, Robbins PD. Tolerogenic dendritic cells for autoimmune disease and transplantation [J]. *Annals Rheum Dis*, 2008, 67 (Suppl 3): iii90-96. DOI: 10.1136/ard.2008.099176
- [17] Wang Y, Wang Q, Lv S, et al. Different protein of *Echinococcus granulosus* stimulates dendriticinduced immune response [J]. *Parasitol*, 2015, 142 (7): 879-89. DOI: 10.1017/S0031182014002005
- [18] Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, et al. FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the human immune system[J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10: 490-500. DOI: 10.1038/nri2785
- [19] Jin Y, Wi HJ, Choi MH, et al. Regulation of anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF-β in mouse dendritic cells through treatment with *Clonorchis sinensis* crude antigen[J]. *Exp Mol Med*, 2014, 1(31): 46-e74. DOI: 10.1038/emm.2013.144
- [20] Vonderheide RH, Glennie MJ. Agonistic CD40 antibodies and cancer therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19 (5): 1035-43. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2064
- [21] Dilioglou S1, Cruse JM, Lewis RE. Function of CD80 and CD86 on monocyte- and stem cell-derived dendritic cells[J]. *Exp Mol Pathol*, 2003, 75 (3): 217-27. DOI: 10.1016/S0014-4800(03)00072-8

收稿日期:2019-06-05 编辑:王晓欢

### (上接第 438 页)

- [10] Segade P, García N, García Estévez JM, et al. Encystment/excystment response and serotypic variation in the gastropod parasite *Tetrahymena rostrata* (*Ciliophora, Tetrahymenidae*) [J]. *Parasitol Res*, 2016, 115 (2): 771-777. DOI: 10.1007/s00436-015-4802-7
- [11] 张作人, 庞延斌, 顾福康, 等. 棘尾虫 *Styloynchia mytilus* 包囊形成和解脱过程的研究[J]. 华东师范大学学报(自然科学版), 1981(2): 117-123.
- [12] Calvo P, Torres A, Perez-Silva J, et al. Ultrastructural and cytochemical study of the encystment in the hypotrichous ciliate *Histricalus similis*[J]. *Archiv für Protistenkunde*, 1986, 132 (3): 211. DOI: 10.1016/s0003-9365(86)80035-5
- [13] 顾福康, 张作人. 纤毛虫形成包囊和脱包囊的研究及其意义 [J]. 动物学杂志, 1992, 35(5): 48-53.
- [14] Wang T, Dou G, Yan W, et al. Population characterization of *Balantiooides coli* from pigs using ITS1-5.8S rRNA-ITS2 sequence[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(6): 828-834. DOI: 10.1007/s10008-010-1224-4
- [15] 杨月中, 曾丽, 李治滢, 等. 结肠小袋纤毛虫动物感染的实验研究[J]. 中国人兽共患病学报, 1997, 13(02): 39-40.
- [16] 王天奇, 董发明, 杨光忠, 等. 洛阳地区规模化猪场结肠小袋纤毛虫感染情况调查及分析[J]. 中国动物检疫, 2007, 24(8): 34-35. DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2007.08.020

- [17] Nilles-Bije, Ma Lourdes, Rivera Windell L, et al. Ultrastructural and molecular characterization of *Balantiooides coli* isolated in the Philippines. [J]. *Parasitology Research*, 2010, 106 (2): 1-8. DOI: 10.1007/s00436-009-1673-9
- [18] 徐润林, 李靖, 白庆笙, 等. 原生动物包囊的研究进展[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2007, 46(5): 64-69. DOI: 10.3321/j.issn:0529-6579.2007.05.016
- [19] 沈韫芬. 原生动物学[M]. 北京:科学出版社, 1999. DOI: ir.ibb.ac.cn/handle/342005/10554
- [20] Ruthmann A, Kuck A. Formation of the Cyst Wall of the Ciliate *Colpoda steinii*[J]. *J Eukaryot Microbiol*, 1985, 32(4): 6. DOI: 10.1111/j.1550-7408.1985.tb03101.x
- [21] Fouque E, Yefimova M, Marieécile T, et al. Morphological study of the encystment and excystment of *Vermamoeba vermiciformis* revealed original traits[J]. *J Eukaryot Microbiol*, 2014, 62(3): 327-337.
- [22] Fouque E, Trouilhé, Marie-Cécile, Thomas V, et al. Encystment of *Vermamoeba (Hartmannella) vermiciformis*: Effects of environmental conditions and cell concentration[J]. *Exp Parasitol*, 2014, 145: 62-68.
- [23] 王天奇, 宋宏晓, 闫文朝, 等. 结肠小袋虫研究进展[J]. 动物医学进展, 2013, 34(3): 91-95. DOI: 10.3969/j.issn.1007-5038.2013.03.021

收稿日期:2019-09-19 编辑:王晓欢