

# 间日疟原虫可溶性抗原对树突状细胞成熟的影响

陈新年<sup>1</sup>, 孔评石<sup>2</sup>, 夏 惠<sup>3</sup> (1. 蚌埠医学院第二附属医院检验科, 安徽蚌埠 233040;  
2. 江苏省第二中医院检验科 210017; 3. 蚌埠医学院病原生物学教研室 233030)

**【摘要】 目的** 观察间日疟原虫可溶性抗原(P. vAg)对树突状细胞(DC)成熟分化的影响。**方法** 以间日疟患者感染红细胞获得 P. vAg, 体外刺激人单核来源的未成熟 DC。采用流式细胞术分析不同浓度的 P. vAg(0.1、1.0、10.0  $\mu\text{g/mL}$ )作用下再经脂多糖(LPS)诱导后 DC 成熟相关分子 CD83、CD86、主要组织相容性抗原分子(HLA-DR)的表达变化。**结果** 3 组 P. vAg 刺激的 DC 再经 LPS 诱导后表达 CD83、CD86 和 HLA-DR 阳性的百分率均高于对照组。3 个剂量组 CD83、CD86 表达量均明显升高, 差异有统计学意义( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), P. vAg 10.0  $\mu\text{g/mL}$  组 HLA-DR 表达量明显升高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** P. vAg 能上调 DC 部分成熟性表型的表达, 表明 P. vAg 具有促进 DC 成熟的作用。

**【关键词】** 间日疟原虫; 树突状细胞; 免疫表型

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.12.023 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)12-1458-03

**The influence of soluble antigen of plasmodium vivax on the maturity of dendritic cells** CHEN Xin-nian<sup>1</sup>, KONG Ping-shi<sup>2</sup>, XIA hui<sup>3</sup> (1. The Second Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui 233040, China; 2. The Second Traditional Chinese Medicine, Jiangsu, 210017 China; 3. Pathogen Biology Laboratory of Bengbu Medical College, Anhui, 233030 China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the influence of soluble antigen of plasmodium vivax (P. vAg) on the differentiation and maturity of dendritic cells(DCs). **Methods** P. vAg was got from RBC infected with the parasites of vivax malaria patients. DCs were generated from monocytes of healthy donors. The expressions of CD83, CD86 and HLA-DR on DCs were detected by flow cytometry after incubation with different doses of P. vAg and subsequent induction of lipopolysaccharide (LPS) (1.0  $\mu\text{g/mL}$ ). **Results** The expressions of CD83, CD86, HLA-DR on DCs of the 3 groups were significantly higher than those of the control group. The expressions of CD83 and CD86 of the 3 treated groups were significantly higher than those of the untreated DCs ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). The HLA-DR expressional levels of P. vAg 10.0  $\mu\text{g/mL}$  group were higher than those of the untreated group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** P. vAg could upregulate partial maturation related phenotypes which suggest that the maturity of DCs could be enhanced by P. vAg.

**【Key words】** plasmodium vivax; dendritic cells; phenotype

疟疾是危害人类最严重的寄生虫病, 恶性疟每年造成数亿人感染和近百万患者死亡。我国主要流行的是间日疟, 每年造成数十万人感染, 防疟形式依然严峻<sup>[1]</sup>。疟疾感染的免疫机制研究一直受到普遍关注。近年来疟原虫感染对树突状细胞(DC)功能的影响成为被关注的焦点之一, 但各方的研究结论不一, 且研究的结果均来自于恶性疟原虫和鼠疟原虫, 关于间日疟原虫对 DC 免疫功能影响的研究非常不足。本研究通过采集间日疟患者血样获取间日疟原虫可溶性抗原(P. vAg), 使之与单核细胞来源的 DC 相互作用, 通过流式细胞术检测 DC 表面成熟相关性分子的变化, 从而判断间日疟原虫可溶性抗原对 DC 成熟的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 标本来源** 外周血均取自学生, 年龄 18~22 岁, 平均 20 岁。间日疟患者全血采蚌埠医学院自本院周边县区医院, 经镜检选取较成熟的配子体和裂殖体的血样用于提取 P. vAg。

**1.2 主要试剂与设备** 白细胞滤器(南京生物医学工程研究所), 超声粉碎机(宁波新知公司), SDS、皂素、蛋白酶 K(sigma 公司), Percoll 分离液、Ficoll 分离液、脂多糖(LPS)(合肥志宏公司), IL-4、粒-单集落刺激因子(GM-CSF)(联科生物公司), 荧光抗体抗 CD83 Fitc、抗 CD86 Pe 和抗 HLA-DR Percp(BD

公司), RPMI1640 培养液(GIBCO 公司) 补充 2 mmol/L 谷氨酰胺、1 mmol/L 丙酮酸钠、50 mg/L 庆大霉素和 100 ml/L 新生小牛血清(FCS, 杭州四季青公司) 后为完全 1640 培养液, 相差显微镜(广西梧州), 流式细胞仪 FACSCalibur 为 BD 公司产品。

## 1.3 方法

**1.3.1 P. vAg 的制备** 经显微镜镜检, 将富含成熟阶段虫体的间日疟原虫感染血样用 RPMI 1640 制成 25% 红细胞(RBC)悬液后, 用 Plasmodipur 滤器滤除白细胞, 再用 60% Percoll 经密度梯度离心法浓集分离感染红细胞, 具体方法参见文献[2]。再加入 10 倍于感染血样体积的 0.1% 皂素生理盐水溶液, 轻轻混匀, 室温放置 1 min, 10 000 r/min, 4  $^{\circ}\text{C}$  离心 15 min, 弃上清液, 用 5 倍体积的 1×PBS 混匀, 10 000 r/min, 4  $^{\circ}\text{C}$  离心 15 min, 弃上清液, 按此方法重复洗涤 3~4 次, 直到上清液无色透明为止, 以上操作均在冰面上进行, 所获得的棕黑色沉淀即为纯化的间日疟原虫颗粒抗原。将此颗粒抗原超声粉碎(电压 450 V, 共超声粉碎 15 次, 每次 20 s, 间隔 90 s), 粉碎好的混合物置 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱过夜, 离心, 上清液即为 P. vAg。用 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜(PES 膜)除菌后, 取少量经核酸蛋白分析仪测蛋白质含量, 其余 -80  $^{\circ}\text{C}$  冻存待用。

**1.3.2 外周血单核细胞的分离和 DC 的培养** 抽取健康者外

周血 25 mL 肝素抗凝,以常规方法分离单个核细胞(PBMC)将其用完全 RPMI1640 培养液(含 10% 胎牛血清)调整细胞至  $2 \times 10^7$  /mL,置 6 孔细胞培养板中 37 ℃ 孵育 3 h,使单核细胞黏附于平皿表面。以毛细吸管吸去未黏附的细胞,并用 RP-MI1640 吹洗 6 次以上直至镜下观察无悬浮细胞,附壁的细胞即获得的单核细胞。DC 的培养参见文献[3]。附壁的单核细胞孔中重新加入完全 RPMI1640 培养液,并补充 GM-CSF80 ng/mL、IL-4 50 ng/mL,饱和湿度 5% CO<sub>2</sub> 继续培养;每隔 3 d 半量换液,补充等量细胞因子,同时镜下观察细胞生长形态变化,至培养第 7 天收集并计数。取已收集的未成熟 DC(imDC)转移至 96 孔培养板分孔培养,每孔  $2 \times 10^5$ ,加入 P. vAg 并调整培养体积为 200  $\mu$ L/孔,并使 P. vAg 终浓度梯度分别为 0.1、1.0、10.0  $\mu$ g/mL,刺激 24 h 后再分别加入脂多糖(LPS)(1.0  $\mu$ g/mL)继续培养 48 h。即分组为:P. vAg 0.1  $\mu$ g/mL+CPS. P. rAg 1.0  $\mu$ g/mL+CPS 和 P. vAg 10.0  $\mu$ g/mL+LPS 组。同时设未刺激孔(DC-alone)和 LPS 诱导的阳性对照孔(LPS1.0  $\mu$ g/mL)。

1.3.3 细胞涂片观察和表型检测 至第 10 天培养结束,取各组细胞涂片 GIEMSA 染色做形态学观察,并用抗-CD83 FITC、抗-CD86 PE 和抗-HLA-DR Percp 荧光标记抗体染色,各荧光通道均设同型对照管。流式细胞术检测用 Cellquest 软件收取细胞,选择前向散射光和侧向散射光均高表达区域的细胞,分析各组细胞中阳性细胞百分率。

1.4 统计学方法 采用单因素方差分析对结果进行统计分析,均数间的两两比较采用 SNK 法,用 SPSS11.5 软件完成。

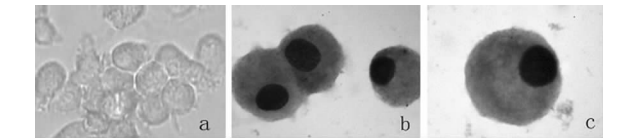
2 结 果

2.1 细胞培养结果 分离的单核细胞经细胞因子诱导后第 7 天能成功地分化为 imDC,细胞体积增大呈悬浮生长,且部分呈团聚状态,细胞周边可见 DC 特征性的毛刺样突起(图 1a),胞浆和胞核较单核细胞有显著增大(图 1b)。再以 P. vAg + LPS 诱导 72 h 的 imDC 胞体进一步增大,胞浆更为丰富(图 1c)。

2.2 LPS 诱导负载 P. vAg 的 DC 表型变化 imDC 经 P. vAg 0.1、1.0、10.0  $\mu$ g/mL 刺激 24 h 继而加入 LPS 继续诱导 48 h,检测各组 DC 表面分子 CD83、CD86、HLA-DR 的百分含量。结果显示:经 P. vAg 作用的 DC 在经 LPS 诱导后其表面分子 CD83、CD86、HLA-DR 阳性百分率与未刺激 DC 比较,各组的表型分子均有不同程度的升高。其中 P. vAg 0.1、1.0、10.0  $\mu$ g/mL 组 CD83 表达明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ),P. vAg 0.1、1.0、10.0  $\mu$ g/mL 组 CD86 表达明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ),P. vAg 10.0  $\mu$ g/mL 组 HLA-DR 明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。并且 P. vAg 0.1  $\mu$ g/mL 和 1.0  $\mu$ g/mL 组 CD86 表达高于单纯的 LPS 诱导组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ )。各组 DC 表型流式检测和统计结果分析见表 1、图 2。

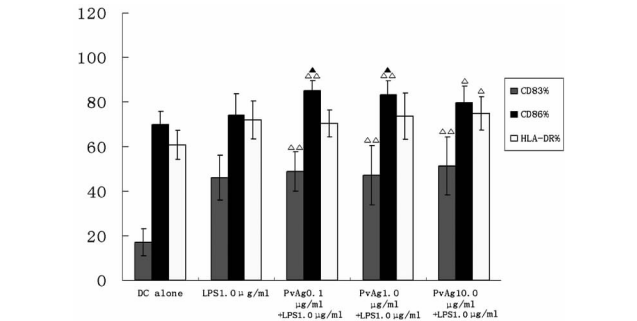
表 1 3 组的 DC 表面分子 CD83、CD86 和 HLA-DR 的阳性比率( $n=6, \bar{x} \pm s, \%$ )

| 组别                                        | 表型                |                   |                   |
|-------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                           | CD83              | CD86              | HLA-DR            |
| DC alone                                  | 17.15 $\pm$ 5.70  | 69.83 $\pm$ 5.17  | 60.73 $\pm$ 5.44  |
| LPS 1 $\mu$ g/mL                          | 46.01 $\pm$ 10.80 | 74.09 $\pm$ 10.03 | 71.85 $\pm$ 8.70  |
| P. vAg 0.1 $\mu$ g/mL+LPS 1.0 $\mu$ g/mL  | 48.92 $\pm$ 8.97  | 85.10 $\pm$ 3.88  | 70.43 $\pm$ 5.18  |
| P. vAg 1.0 $\mu$ g/mL+LPS 1.0 $\mu$ g/mL  | 47.12 $\pm$ 15.53 | 83.12 $\pm$ 5.78  | 73.63 $\pm$ 11.82 |
| P. vAg 10.0 $\mu$ g/mL+LPS 1.0 $\mu$ g/mL | 51.12 $\pm$ 15.32 | 79.53 $\pm$ 6.27  | 74.95 $\pm$ 6.68  |



注:a:未成熟 DC( $\times 400$ );b:未成熟 DC(Giemsa 染色, $\times 1\ 000$ );c:P. vAg+LPS 诱导的 DC(Giemsa 染色, $\times 1\ 000$ )。

图 1 DC 培养至第 7 天和刺激培养至第 10 天的形态学观察



注:实验组与 DC alone 组比较,Δ:  $P < 0.05$ ;ΔΔ:  $P < 0.01$ ;与 LPS1.0  $\mu$ g/mL 组比较,ΔΔΔ:  $P < 0.05$ 。

图 2 对照组、LPS 诱导组和实验组的 DC 再经 LPS 诱导后表型变化的比较

3 讨 论

疟疾是危害严重的寄生虫病,疟疾感染中存在着复杂的抗疟原虫免疫应答及调节机制。目前对疟疾的免疫学认识多数是来源于对恶性疟或动物模型的研究,但是不同的疟原虫-宿主关系中免疫应答特征并不相同,因此直接针对间日疟开展研究可为临床工作提供更可靠的关于间日疟免疫机制的认识。随着近年来研究的深入,DC 在疟疾免疫应答中的作用逐渐成为被关注的焦点。DC 是已知最强力的抗原递呈细胞,并处于连接非特异性免疫和特异性免疫的中心环节,因此其功能状况必然会深刻的影响到机体抗疟免疫应答的性质和病情的转归。

成熟的 DC 是已知功能最强的专职 APCs,能激活静止 T 淋巴细胞从而激发初次免疫应答。DC 的成熟受多种因素影响,如炎性细胞因子 TNF- $\alpha$ 、细菌产物如 LPS 等,还与其微环境中存在的炎性因子相互作用以及与淋巴细胞相互接触所提供的刺激信号密切相关。已有研究证明不同病原体及其产物可通过不同的通路使 DC 成熟[4]。

成熟 DC 表面表达丰富的与抗原递呈有关的 MHC I、II 类分子,并高水平的表达各种共刺激分子如 B7-1 (CD80) 和 B7-2 (CD86)、LFA-3 (CD58)、ICAM-3 (CD50) 及 CD40,这些分子与 DC 的生物学功能密切相关,对 DC 免疫功能的发挥有重要作用。MHC I、II 类分子有利于 DC 递呈抗原, B7/CD28

途径是 T 淋巴细胞活化的主要协同刺激信号。CD83 是成熟 DC 的重要标志, 目前认为只有成熟 DC 可以稳定的表达 CD83 分子<sup>[5]</sup>。根据其成熟状态的不同, DC 具有着迥然相异的功能。未成熟 DC 与免疫抑制和免疫耐受过程密切相关, 其机制是在未成熟期细胞表面虽表达 MHC-II 分子, 但低水平表达共刺激分子 CD80 和 CD86, 使 T 淋巴细胞缺少应答的第 2 信号, 导致 T 淋巴细胞表现为低反应性或无能, 因而诱导了免疫耐受的发生<sup>[6]</sup>。因此在本研究中本文选择了 DC 相对特异性的成熟性标志 CD83 分子和与抗原递呈有关的表型 HLA-DR、CD86 分子的表达水平作为 DC 的成熟指标。

在以往的研究中, 对于疟原虫感染后 DC 的功能是否正常存在诸多观点上的矛盾。有研究认为疟原虫感染后 DC 保持着完整的功能。DC 被疟原虫抗原诱导成熟, 上调 MHCII 和共刺激分子, 分泌 Th1 分化型细胞因子, 表现为功能上的正向应答, 从而决定了随后的整个保护性免疫状态的形成<sup>[7-8]</sup>, 但也有研究显示疟原虫感染后 DC 功能抑制: Urban 等众多研究者都证实了疟疾感染和体外培养中 DC 的 MHC 分子、共刺激分子和分泌 IL-12 功能的缺失<sup>[9]</sup>, 这种成熟缺陷的 DC 不能诱导初始的 T 淋巴细胞和继发的抗原特异性 T 淋巴细胞应答。本实验观察分析了负载 P. vAg 的 DC 在追加成熟诱导物 LPS 后表型的变化, 结果显示 P. vAg 追加 LPS 诱导的各剂量组表型均升高。相对于未刺激组, 除 P. vAg0. 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  + LPS 和 P. vAg 1. 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  + LPS 组的 HLA-DR 之外其他各组的升高均有统计学意义 ( $P < 0. 01$  或  $P < 0. 05$ ); 与 LPS 诱导组比较, P. vAg 0. 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  + LPS 和 P. vAg 1. 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  + LPS 组的 CD86 也显著升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0. 05$ ), 表明特定的剂量范围内 P. vAg 对 LPS 的促成熟作用具有协同的正向效应。

在以往恶性疟和鼠疟的研究中亦发现不同虫种的不同组分对 DC 功能产生不同影响的现象。如 Urban 等在恶性疟研究中发现恶性疟原虫感染的红细胞上膜蛋白成分 PFEMP1 对 DC 具有抑制效应<sup>[10]</sup>, 另有来自其他诸多虫株的证据表明分离得到的膜蛋白并未改变 DC 对 LPS 的响应, 而是表达正常的功能成熟<sup>[11]</sup>; 从鼠疟原虫提取的可溶性蛋白能够有效诱导对疟原虫感染的保护性反应<sup>[12]</sup>。本实验的结果表明间日疟原虫的可溶性蛋白在体外对 DC 并不产生抑制, 证实了不同基因背景的疟疾种株的可溶性蛋白与宿主的相互作用效应是不同的。

## 参考文献

[1] 周水森, 王漪, 房文. 2007 年全国疟疾形势[J]. 中国寄生

(上接第 1457 页)

2000, 1469(2): 79-86.

[26] Wessels JGH. Hydrophobins, unique fungal proteins[J]. Mycologist, 2000, 14(4): 153-159.

[27] Xu PS, Gullotti E, Tong L, et al. Intracellular drug delivery by poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles, revisited [J]. Mol Pharm, 2009, 6(1): 190-201.

[28] Italia JL, Bhatt DK, Bhardwaj V, et al. PLGA nanoparticles for oral delivery of cyclosporine: nephrotoxicity and pharmacokinetic studies in comparison to sandimmune

虫学与寄生虫病杂志, 2008, 26(6): 401-403.

[2] 胡守锋, 陶志勇, 夏惠, 等. 红内期间日疟原虫浓集纯化及免疫反应性研究[J]. 蚌埠医学院学报, 2009, 34(8): 653-654.

[3] 董薇, 张兵, 蔡美英, 等. 脂多糖刺激树突状细胞前后 TLR2、3、4 基因表达的检测[J]. 航天医学与医学工程, 2005, (18): 3, 216-218.

[4] 褚万立. Toll 样受体在免疫应答中的作用[J]. 医学综述, 2006, 12(15): 899-900.

[5] Cao W, Lee SH, Lu J. CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells[J]. Biochem J, 2005, 385(1): 85-93.

[6] 张临友, 杨英男, 杨宝峰. 树突状细胞亚群及其功能[J]. 国外医学免疫学分册, 2004, 27(5): 260-263.

[7] Perry JA, Rush A, Wilson RJ, et al. Dendritic cells from malaria-infected mice are fully functional APC[J]. J Immunol, 2004, 172(5): 475-482.

[8] Seixas E, Cross C, Quin S, et al. Direct activation of dendritic cells by the malaria parasite, Plasmodium chabaudi chabaudi[J]. Eur J Immunol, 2001, 31(4): 2970-2978.

[9] Urban BC, Roberts DJ. Inhibition of T cell functioning during malaria: implications for immunology and vaccinology[J]. J Exp Med, 2003, 197(2): 137-141.

[10] Urban BC, Willcox N, Roberts DJ. A role for CD36 in the regulation of dendritic cell function[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(15): 8750-8755.

[11] Millington OR, Di Lorenzo C, Phillips RS, et al. Suppression of adaptive immunity to heterologous antigens during Plasmodium infection through hemozoin-induced failure of dendritic cell function[J]. J Biol, 2006, 5(2): 5.

[12] Wunderlich F, Brenner HH, Helwig M. Plasmodium chabaudi malaria: protective immunization with surface membranes of infected erythrocytes[J]. Infect Immun, 1988, 56(12): 3326-3328.

(收稿日期: 2011-03-09)

neural[J]. J Control Release, 2007, 119(2): 197-206.

[29] Bailey MM, Berkland C. Nanoparticle formulations in pulmonary drug delivery[J]. Med Res Rev, 2009, 29(1): 196-212.

[30] Beck-Broichsitter M, Gauss J, Packhaeuser CB, et al. Pulmonary drug delivery with aerosolizable nanoparticles in an ex vivo lung model[J]. Int J Pharm, 2009, 367(1-2): 169-178.

(收稿日期: 2011-03-26)