



张朝莹,文兆海,张玥,等. 旋毛虫钙网蛋白对小鼠巨噬细胞和大鼠 PBMC 免疫功能的影响[J]. 南京农业大学学报,2024,47(1):1-8.
ZHANG Zhaoying, WEN Zhaohai, ZHANG Yue, et al. Effect of *Trichinella spiralis* calreticulin on immune function of mouse macrophages and rat PBMC[J].
Journal of Nanjing Agricultural University, 2024, 47(1): 1-8.

旋毛虫钙网蛋白对小鼠巨噬细胞和大鼠 PBMC 免疫功能的影响

张朝莹,文兆海,张玥,李嫻,徐立新,陆明敏,宋小凯,李祥瑞,严若峰*

(南京农业大学动物医学院,江苏 南京 210095)

摘要:[目的]本文旨在研究旋毛虫钙网蛋白(TsCRT)对宿主免疫系统的影响。[方法]将原核表达纯化的重组旋毛虫钙网蛋白(rTsCRT)进行 Western Blot 验证;将 rTsCRT 与小鼠巨噬细胞共孵育,检测该蛋白对小鼠巨噬细胞增殖、NO 释放和凋亡的影响;将 rTsCRT 与大鼠外周血单核细胞(PBMC)共孵育,检测该蛋白对大鼠 PBMC 转录因子和细胞因子的影响。[结果]Western blot 结果显示,rTsCRT 可以被感染旋毛虫的大鼠血清所识别;rTsCRT 可促进小鼠巨噬细胞的增殖和 NO 的分泌,抑制小鼠巨噬细胞的凋亡;rTsCRT 下调大鼠 PBMC 转录因子 *T-bet*、*Gata-3* 和 *PU.1* 的转录水平,上调 *Foxp3*、*Ahr*、*ROR γ t* 和 *Bcl-6* 的转录水平;rTsCRT 上调大鼠 PBMC 细胞因子 *IFN- γ* 、*IL-17*、*IL-10*、*TGF- β* 、*IL-9* 和 *IL-22* 的转录水平,下调 *IL-4* 和 *IL-21* 的转录水平。[结论]旋毛虫钙网蛋白可刺激宿主产生 Th1、Th17、Treg、Th9 和 Th22 等多种类型的免疫反应,抑制 Th2 和 Th1 免疫,对宿主免疫调节作用复杂。

关键词:旋毛虫;钙网蛋白;巨噬细胞;PBMC;免疫调节

中图分类号:S855.9+1

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)01-0001-08

Effect of *Trichinella spiralis* calreticulin on immune function of mouse macrophages and rat PBMC

ZHANG Zhaoying, WEN Zhaohai, ZHANG Yue, LI Yuan, XU Lixin,
LU Mingmin, SONG Xiaokai, LI Xiangrui, YAN Ruofeng*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract:[Objectives] This paper was to study the effect of *Trichinella spiralis* calreticulin (TsCRT) on host immune system. [Methods] The recombinant calreticulin of *T. spiralis* (rTsCRT) was expressed by prokaryotic expression and purified, which was analysed by Western blot. Cells proliferation, apoptosis and NO releasing were detected after rTsCRT co-incubating with mouse macrophage. The transcription factors and cytokines were detected after rTsCRT co-incubating with rat peripheral blood mononuclear cells (PBMC). [Results] Western blot showed that rTsCRT could be recognized by the sera of rat infected with *T. spiralis*. Cell proliferation and NO secretion of mouse macrophage were promoted. Mouse macrophage apoptosis was inhibited by rTsCRT. The mRNA levels of *T-bet*, *Gata-3* and *PU.1* were down-regulated in rat PBMC. *Foxp3*, *Ahr*, *ROR γ t* and *Bcl-6* mRNA levels were up-regulated. The mRNA levels of *IFN- γ* , *IL-17*, *IL-10*, *TGF- β* , *IL-9* and *IL-22* mRNA levels were up-regulated in rat PBMC. *IL-4* and *IL-21* were down-regulated. [Conclusions] Th1, Th17, Treg, Th9 and Th22 immune responses of host were produced. Th2 and Th1 immunity were inhibited by *T. spiralis* calreticulin. rTsCRT had a complex effect on host immune regulation.

Keywords: *Trichinella spiralis*; calreticulin; macrophages; PBMC; immunomodulation

旋毛虫病(Trichinosis)是由旋毛形线虫(*Trichinella spiralis*)引起的一种食源性人兽共患病,呈全球性分布。主要临床症状是创伤性和免疫学的改变,包括眼睑水肿、发热综合征、腹泻、肌肉疼痛和嗜酸性粒细胞增多等^[1]。旋毛虫病重症患者的特征是心血管、肺和中枢神经系统损伤,最终可导致宿主死亡,给动物生产和人类公共卫生安全构成了严重威胁。旋毛虫可感染多种哺乳动物、鸟类和爬行动物等,其中鼠是旋毛虫病的一种重要的传染源^[2]。当旋毛虫与宿主建立寄生关系时,会产生各种免疫逃避机制,从而让其能够成功寄生^[3],因此其逃避宿主免疫系统的机制引起了广泛关注。尽管现在针对旋毛虫病有相对安全

收稿日期:2023-02-14

基金项目:江苏省社会发展项目(BE2022848)

*通信作者:严若峰,教授,博导,研究方向为兽医寄生虫与免疫学,E-mail:yanruofeng@njau.edu.cn。

的药物,如阿苯达唑等^[4],但其耐药问题已日趋严重。故此,研究旋毛虫与宿主间相互作用、筛选出新的疫苗候选抗原对预防该病具有重要意义^[5]。

钙网蛋白(calreticulin,CRT)是内质网中高度保守的Ca²⁺结合蛋白^[6],在某些情况下其可以从细胞内转运出来,出现在胞质、胞膜表面、血清、颗粒物等中,或者以可溶性的形式被分泌到体外^[7-8]。钙网蛋白是一种钙结合伴侣,参与一系列细胞过程,在免疫反应中具有多种功能。在内质网中,钙网蛋白促进主要组织相容性复合体(MHC)I类分子及其组装因子的折叠,从而影响向细胞毒性T细胞的抗原呈递^[9]。研究表明钙网蛋白也可在细胞表面表达^[10],并与细胞的吞噬摄取和免疫原性相关。然而,研究rTs-CRT对宿主免疫细胞功能的影响却少有报道。

本研究团队前期从旋毛虫外泌体蛋白质谱分析结果中鉴定到钙网蛋白,但其对宿主免疫功能的影响尚不清楚。本文根据NCBI上发布的钙网蛋白核苷酸序列进行了克隆表达,并对重组蛋白的免疫调节功能开展了初步研究,以期深入了解虫体与宿主间的相互作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物与虫体 旋毛虫为中国河南猪分离株,国际编号ISS534,由本研究团队传代并保存。健康6周龄SPF级雄性SD大鼠(约200g)购自北京维通利华实验动物公司。

1.1.2 主要试剂与材料 大肠杆菌DH5 α 、BL21菌种,pET-28a(+)载体,小鼠巨噬细胞系(RAW264.7)均由本实验室保存;大鼠淋巴细胞分离液、抗凝真空采血管为天津灏洋公司产品;DNA回收试剂盒为Omega公司产品;PrimeSTAR Max DNA Polymerase、限制性内切酶(*EcoR* I、*Xho* I)、Ligation mix为TaKaRa公司产品;ToxinEraserTM内毒素去除试剂盒为金斯瑞公司产品;RPMI-1640培养基、内毒素去除柱、青链霉素双抗、HRP标记抗大鼠IgG、胎牛血清(FBS)、RIPA裂解液为Thermo Fisher公司产品;总NO检测试剂盒、CCK-8检测试剂盒和细胞凋亡检测试剂盒为碧云天公司产品;RNA isolater、HiScript III反转录试剂、qPCR试剂盒为南京诺唯赞公司产品;DAB显色试剂盒为天根生物公司产品;引物由通用生物公司合成。

1.2 *TsCRT* 基因的克隆与表达

1.2.1 引物设计与合成 根据NCBI中*TsCRT*的CDS序列(XM_003379455.1)设计引物,选择酶切位点*EcoR* I和*Xho* I,引物如下所示,下划线部分的序列表示酶切位点。CRT F/R:5'-CGGAATTCGAGGTTTAA-TTTGAAAGAAACGTTTC-3'/5'-CCCTCGAGTTAAAGTTCGTCGTCAGCATG-3'。

1.2.2 目的基因的扩增与原核表达质粒的构建 根据TRIzol试剂说明书提取旋毛虫肌肉幼虫虫体总RNA,将其反转录为cDNA,再通过PCR扩增目的基因。按照凝胶回收试剂盒(OMEGA)说明书回收PCR产物,用*EcoR* I和*Xho* I将回收产物与pET-28a(+)质粒分别进行双酶切,并在25℃水浴条件下连接酶切产物,时间为30 min。将连接产物转化至大肠杆菌DH5 α 中,置于37℃摇床中培养12~16 h,收集重组菌,进行双酶切与测序鉴定。阳性质粒命名为pET-28a-*TsCRT*。

1.2.3 重组旋毛虫钙网蛋白(rTsCRT)的表达及纯化 将pET-28a-*TsCRT*转化至大肠杆菌BL21,挑取单菌落37℃、180 r·min⁻¹振荡培养约3 h,加入IPTG至其终浓度为1 mmol·L⁻¹,继续振荡培养5 h,用120 g·L⁻¹十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析蛋白分布情况。用镍柱纯化重组蛋白,再用PEG20000浓缩蛋白,并使用试剂盒去除内毒素。

1.2.4 旋毛虫感染血清的制备 用7 000条旋毛虫肌幼虫经口感染SD大鼠,35 d后经腹主动脉采血并分离得到纯化的抗重组CRT蛋白(rTsCRT)血清,分装后保存于-20℃备用。

1.2.5 rTsCRT的Western blot分析 SDS-PAGE电泳后将重组蛋白转印PVDF,在37℃条件下用50 g·L⁻¹脱脂奶粉封闭1 h,再使用50 g·L⁻¹脱脂奶粉按1:100(体积比)稀释一抗(感染旋毛虫的大鼠血清与未感染的大鼠血清),4℃孵育过夜;加入50 g·L⁻¹脱脂奶粉按1:5 000(体积比)稀释的山羊抗大鼠IgG,37℃避光孵育1 h。将ECL滴加于PVDF膜上,使用全自动化学发光图像分析系统曝光成像。

1.3 rTsCRT对小鼠巨噬细胞功能的影响

1.3.1 rTsCRT对小鼠巨噬细胞增殖的影响 将传代培养的小鼠巨噬细胞浓度调整为5×10⁵ mL⁻¹,以每孔100 μ L加入96孔细胞培养板,分别向每孔加入不同浓度的rTsCRT(0、5、10、20、40、80 μ g·mL⁻¹),另设空培养基的空白孔。置于37℃、5% CO₂细胞培养箱中培养48 h,根据CCK-8检测液说明书检测增殖结果。

1.3.2 rTsCRT 对小鼠巨噬细胞分泌 NO 的影响 将传代培养的小鼠巨噬细胞浓度调整为 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$, 将细胞加入 24 孔细胞板, 每孔 1 mL。用不同浓度的 rTsCRT (5、10、20、40、80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 处理巨噬细胞; 同时设置 PBS 空白组。每组设 3 个重复。置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中培养 48 h。收集细胞, $2\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 收集上清液, 按照总 NO 检测试剂盒的步骤检测每组的 NO 分泌水平。

1.3.3 rTsCRT 对小鼠巨噬细胞凋亡的影响 将传代培养的小鼠巨噬细胞浓度调整为 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$, 将细胞加入 24 孔细胞板, 每孔 1 mL。用不同浓度的 rTsCRT (5、10、20、40、80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 处理巨噬细胞, 同时设 PBS 空白组。置于培养箱内培养 24 h, 每组至少 3 个重复。根据凋亡试剂盒说明书检测凋亡结果, 试验独立重复 3 次。

1.4 rTsCRT 对大鼠 PBMC 转录因子和细胞因子转录水平的影响

1.4.1 rTsCRT 对大鼠 PBMC 不同类型 Th 细胞关键转录因子转录水平的影响 将新鲜分离的大鼠 PBMC 培养在含 1% 青 (链) 霉素双抗和 10% FBS 的 RPMI-1640 中, 浓度调整为 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$, 然后将细胞铺于 12 孔细胞培养板, 每孔 2 mL, 分别加入不同浓度 (10、20、40 和 80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 rTsCRT 和 PBS, 每组设 3 个重复。置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中培养 24 h。24 h 后使用 TRIzol 法分别提取各孔细胞总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 再进行实时荧光定量 PCR (qPCR), 最后试验结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算, 分析各组转录因子 mRNA 的水平变化。qPCR 反应体系: cDNA 模板 1 μL , 上、下游引物各 0.2 μL , ROX Reference Dye II 0.2 μL , 2 \times GS AntiQ qPCR SYBR Master Mix 5 μL , ddH₂O 3.4 μL , 总反应体积为 10 μL 。反应程序: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 20 s, $65 \text{ }^\circ\text{C}$ 20 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, 40 个循环; 溶解曲线程序: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 60 s, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s。qPCR 引物序列见表 1。

表 1 本试验中 qPCR 所用引物

Table 1 The primers for qPCR in this test

基因 Gene	引物序列 Sequence of primers(5'→3')	基因 Gene	引物序列 Primers of sequence(5'→3')
<i>β-actin</i>	CGTTGACATCCGTAAAGACCTC/ TAGGAGCCAGGGCAGTAATCT	<i>IFN-γ</i>	GGCAAAAGGACGGTAAACACG/ GTGCTGGATCTGTGGGTTGT
<i>T-bet</i>	TCCACCCAGACTCCCCAACA/ GGCTCACCGTCATTCACCTCCA	<i>IL-4</i>	CAGGGTGTCTCGCAAATTTTAC/ CACCGAGAACCCAGACTTG
<i>Gata-3</i>	TTCCTGTGCGAACTGTCAGACCA/ CCTTTTTGCACTTTTTGATTTGCTA	<i>IL-17</i>	CCATGTGCCTGATGCTGTTG/ AGTTATTGGCCTCGGGCTTT
<i>RORγt</i>	CTTTTGCCACAGAGCCTTTT/ AATCTTGAGCCTGGGGCCAT	<i>TGF-β</i>	CACTCCCGTGGCTTCTAGTG/ GGACTGGCGAGCCTTAGTTT
<i>Foxp3</i>	GCCCACACCTCCTCTTCTTC/ CTGTCTCGGAGAAGTGCTG	<i>IL-10</i>	GCCAAGCCTTGTGAGAAATGA/ TCCCAGGGAATTCAAATGCT
<i>Bcl-6</i>	GGAGATGGGAGAGACCCAGT/ TGCCTTTGTAGCGGAAGGAG	<i>IL-21</i>	TGCCTGCTAAGAGGACAGGAA/ GGAGCCATTTTGTCTTTCAAGGA
<i>PU.1</i>	TGGAGAAGCTGATGGCTTG/ CCTTGTGCTTGGACGAGAA	<i>IL-9</i>	GACGACCCATCATCAAAATGC/ CTGTGACATTCCTCCTGGAA
<i>Ahr</i>	CTGGCAATGAATTTCCAAGGGAGG/ CTTTCTCCAGTCTTAATCATGCC	<i>IL-22</i>	TTCTCCTCCAGTTATCAGTTGT/ GGTGGGTTGACGATGTAT

注: *β -actin*: β -肌动蛋白基因 *β -actin* gene; *T-bet*: T 盒子转录因子基因 T-boxtranscription factor bet gene; *Gata-3*: GATA 结合蛋白 3 基因 GATA binding protein 3 gene; *ROR γ t*: 转录因子维甲酸相关孤独核受体 γ t 基因 Orphan nuclear receptor gamma t gene; *Foxp3*: 叉头框蛋白 P3 基因 Forkhead box P3 gene; *Bcl-6*: B 细胞淋巴瘤因子 6 基因 B-cell lymphoma factor 6 gene; *PU.1*: 转录因子 PU.1 基因 Transcription factor PU.1 gene; *Ahr*: 芳香烃受体基因 Aryl hydrocarbon receptor gene; *IFN- γ* : 伽马干扰素基因 Interferon gamma gene; *IL-4*: 白细胞介素 4 基因 Interleukin 4 gene; *IL-17*: 白细胞介素 17 基因 Interleukin 17 gene; *TGF- β* : 转化生长因子 β 基因 Transforming growth factor- β gene; *IL-10*: 白细胞介素 10 基因 Interleukin 10 gene; *IL-21*: 白细胞介素 21 基因 Interleukin 21 gene; *IL-9*: 白细胞介素 9 基因 Interleukin 9 gene; *IL-22*: 白细胞介素 22 基因 Interleukin 22 gene. 下同 The same as follows.

1.4.2 rTsCRT 对大鼠 PBMC 细胞因子转录水平的影响 具体步骤同 1.4.1 节。实时荧光定量 PCR 引物序列见表 1。

1.5 数据的处理与分析

使用 SPSS 22.0 统计软件分析数据, 采用 One-way ANOVA 法对数据进行方差分析和差异显著性检验 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$), 采用 GraphPad Prism 8.0 绘图。

2 结果与分析

2.1 CRT 基因的克隆与表达

琼脂糖凝胶电泳验证扩增产物, 结果显示在 1 152 bp 处有单一条带 (图 1-A); 双酶切鉴定重组质粒

pET-28a-CRT, 在相应位置分别观察到载体与目的基因条带(图 1-B); 重组蛋白主要分布于上清液(图 1-C), 蛋白纯化效果良好, 相对分子质量约为 46×10^3 (图 1-D)。

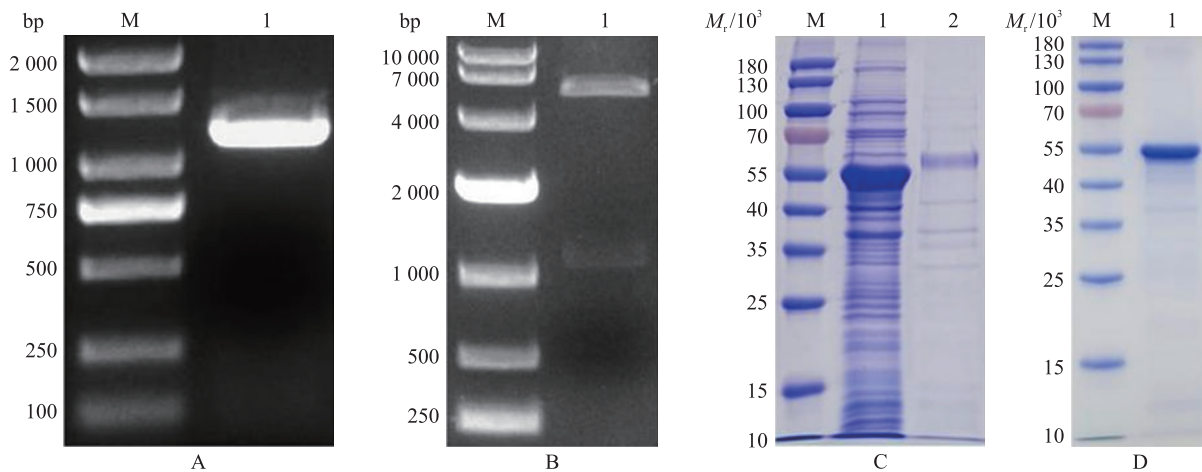


图 1 CRT 基因的克隆表达及蛋白的表达和纯化

Fig. 1 CRT gene cloning and expression and protein purification

A. CRT 基因 PCR 扩增 (M. DNA 标准 DL2000; 1. PCR 产物); B. pET-28a-CRT 的双酶切鉴定 (M. DNA 标准 DL10000; 1. 重组质粒经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切); C. 重组 CRT 蛋白的分布情况 (M. 蛋白标准; 1. CRT 在上清液的分布; 2. CRT 在包涵体的分布); D. 重组蛋白 CRT 的纯化 (M. 蛋白标准; 1. CRT 的纯化结果)。

A. PCR amplification of CRT gene (M. DNA Marker DL2000; 1. PCR product); B. Identification of pET-28a-CRT digested by restriction endonuclease (M. DNA marker DL10000; 1. The recombinant plasmid was digested by *EcoR* I and *Xho* I); C. Distribution of recombinant protein CRT (M. Protein marker; 1. Distribution of CRT in supernatant; 2. Distribution of CRT in inclusion bodies); D. Purification of recombinant proteins CRT (M. Protein marker; 1. Purification results of CRT).

2.2 rTsCRT 的 Western blot 分析

Western blot 结果显示, 在相对分子质量为 46×10^3 左右有一特异性条带, 而阴性对照无条带(图 2), 说明该重组蛋白具有良好的反应原性, 能够被感染旋毛虫大鼠阳性血清识别。

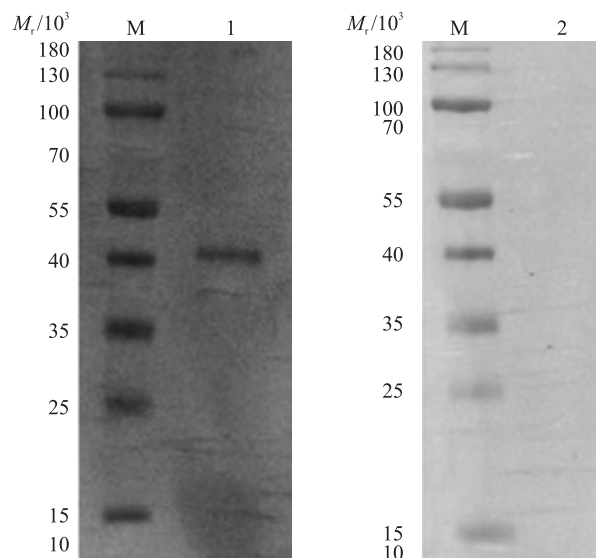


图 2 重组蛋白 CRT (rTsCRT) 的 Western blot 分析

Fig. 2 Western blot analysis of recombinant proteins CRT

M. 蛋白标准品; 1. rTsCRT 与大鼠阳性血清; 2. rTsCRT 与大鼠阴性血清。

M. Protein marker; 1. Recombinant proteins CRT with rat positive serum; 2. Recombinant proteins CRT with rat negative serum.

2.3 rTsCRT 对小鼠巨噬细胞增殖的影响

细胞增殖指数 (试验组吸光值/对照组吸光值) 如图 3 所示; 与空白对照组相比, 5、10、20、40、80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 rTsCRT 均能够促进小鼠巨噬细胞的增殖。

2.4 rTsCRT 对小鼠巨噬细胞分泌 NO 的影响

从图 4 结果可知:与空白对照组相比,5、10、20、40、80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 rTsCRT 均能够促进小鼠巨噬细胞细胞分泌 NO,且在重组蛋白浓度为 10 和 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,刺激效果最显著。

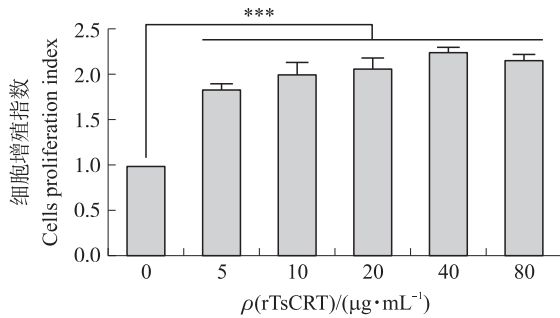


图 3 rTsCRT 对 RAW264.7 细胞增殖的影响
Fig. 3 The impacts of rTsCRT on RAW264.7 cells proliferation

*** $P < 0.001$. The same below.

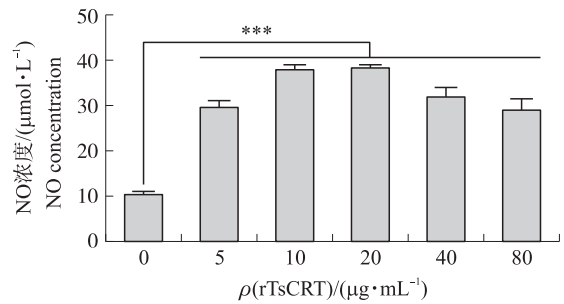


图 4 rTsCRT 对 RAW264.7 细胞 NO 分泌的影响
Fig. 4 The impacts of rTsCRT on RAW264.7 cells NO production

2.5 rTsCRT 对小鼠巨噬细胞凋亡的影响

使用流式细胞仪对 Annexin V-FITC 和碘化丙啶(PI)双染后的细胞进行检测。结果如图 5 所示,与空白对照组相比,不同浓度的 rTsCRT 均能够抑制小鼠巨噬细胞的凋亡,且在重组蛋白浓度为 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,抑制程度最显著。

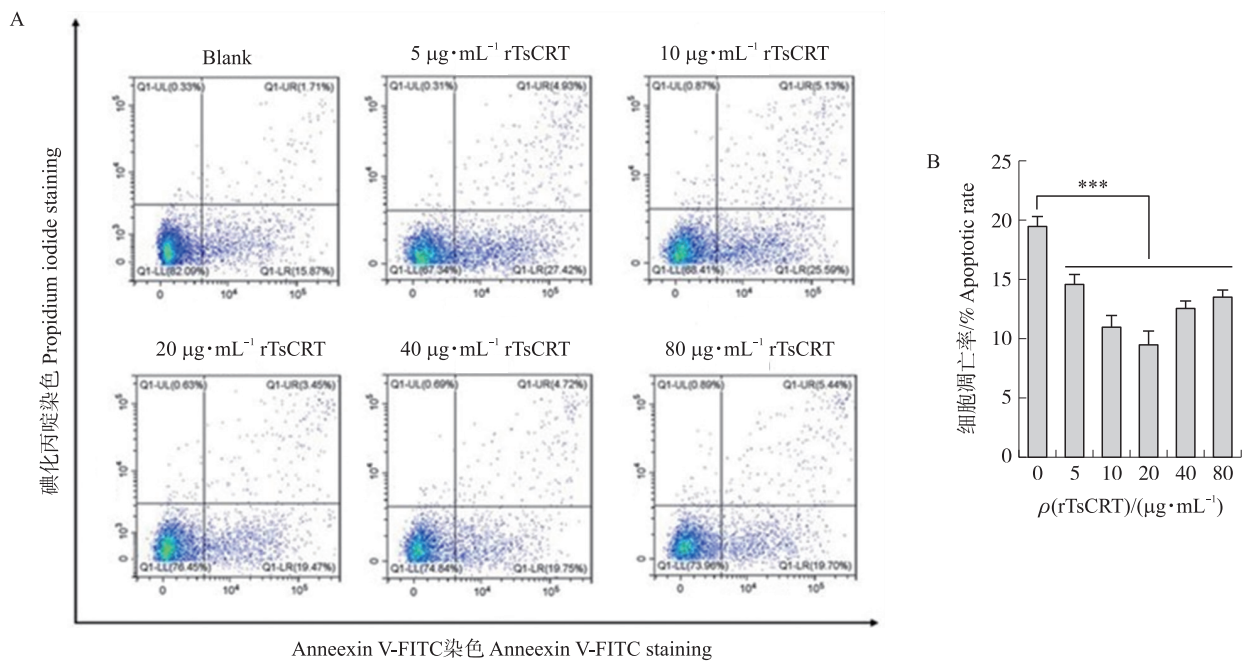


图 5 rTsCRT 对 RAW264.7 细胞凋亡影响的流式细胞检测 (A) 和凋亡率统计 (B)

Fig. 5 Flow cytometry detection(A) and apoptosis rate statistics(B) of the impacts of rTsCRT on RAW264.7 cells apoptosis

2.6 不同浓度 rTsCRT 对大鼠 PBMC 不同类型 Th 细胞关键转录因子转录水平的影响

结果如图 6 所示:与阴性对照组相比,rTsCRT 对 *T-bet*、*Gata-3*、*PU.1* 都具有显著抑制作用($P < 0.05$),其中重组蛋白浓度在 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时对 *T-bet* 和 *Gata-3* 的抑制效果最明显。该蛋白能够显著刺激 *Foxp3* 和 *Ahr* ($P < 0.05$) 的表达,其中对 *Ahr* 的刺激效果最为明显。重组蛋白在 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时能显著刺激 *ROR γ t* 和 *Bcl-6* ($P < 0.05$) 的转录,而在浓度 20、40 和 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时与阴性对照组相比无显著差异。

2.7 不同浓度 rTsCRT 对大鼠 PBMC 细胞因子转录水平的影响

结果如图 7 所示:与阴性对照组相比,rTsCRT 对 *IFN- γ* 、*IL-17*、*IL-10*、*IL-9* 和 *IL-22* 的表达都具有显著刺激作用($P < 0.05$),其中对 *IL-17* 和 *IL-22* 的刺激效果最明显。重组蛋白浓度在 20 和 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时能显

著刺激 $TGF-\beta$ ($P < 0.05$) 的表达。该蛋白能够显著抑制 $IL-21$ 的转录水平 ($P < 0.05$), 且对 $IL-21$ 的抑制作用随蛋白浓度的升高而减弱。同时该蛋白在 10 和 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 能显著抑制 $IL-4$ 的转录 ($P < 0.05$), 但浓度为 80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时能显著刺激其转录。

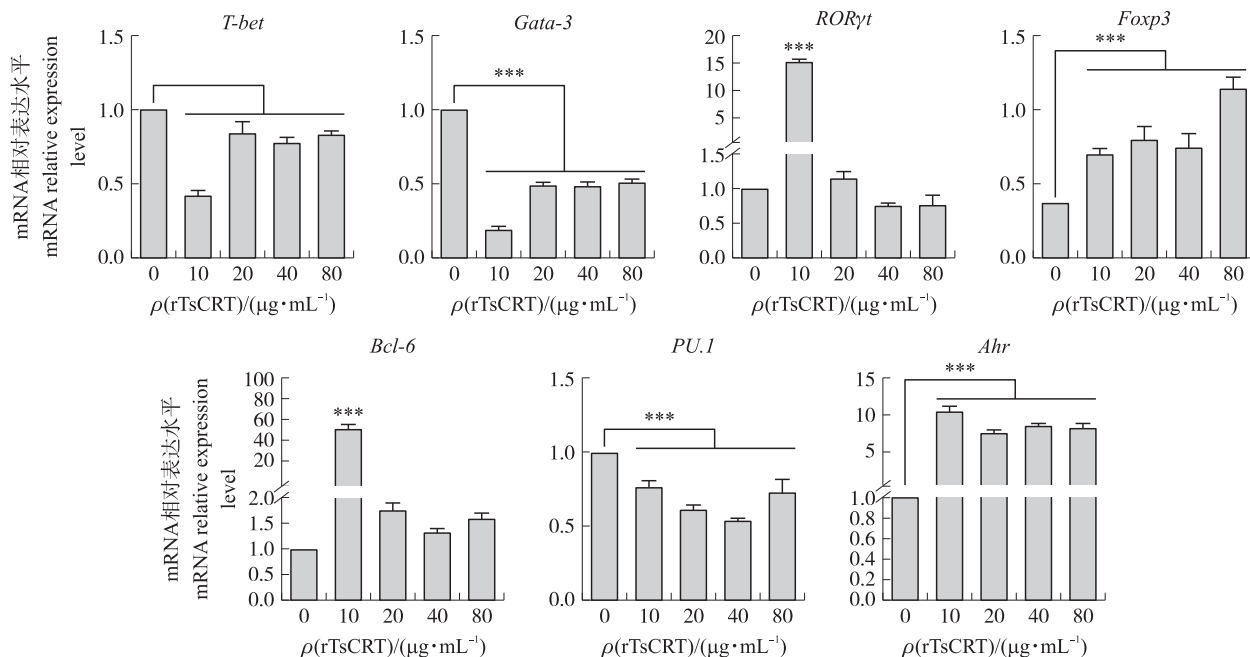


图 6 rTsCRT 对大鼠 PBMC 转录因子转录水平的影响

Fig. 6 Effects of rTsCRT on the transcription factor transcription levels in rat PBMC

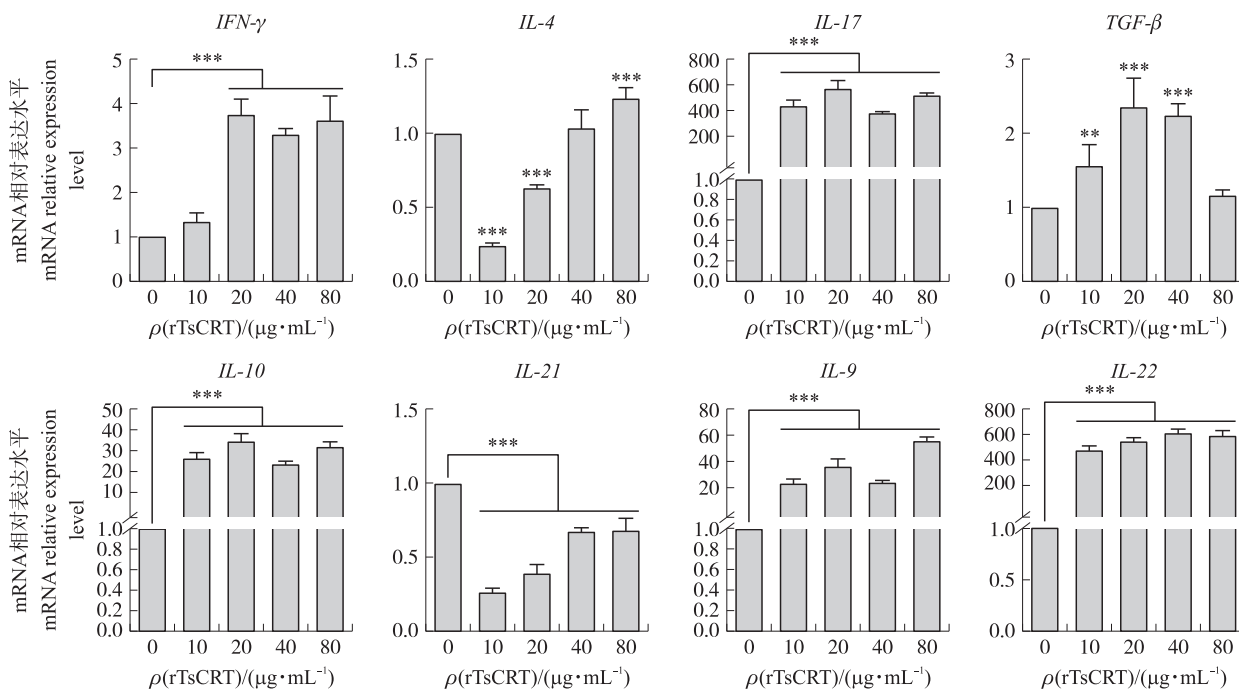


图 7 rTsCRT 对大鼠 PBMCs 细胞因子转录水平的影响

Fig. 7 Effects of rTsCRT on the cytokines transcription levels in rat PBMC

3 讨论与结论

巨噬细胞是机体免疫反应中的一种重要免疫细胞, 参与大部分先天性免疫和获得性免疫反应, 在炎症和宿主防御中起着重要作用^[11]。病原体感染宿主, 巨噬细胞能够通过吞噬作用及分泌不同的细胞因子和释放 NO 等发挥免疫功能。因此, 本试验通过测定小鼠巨噬细胞增殖、凋亡和 NO 分泌这些免疫指标, 从而明确 rTsCRT 与宿主免疫细胞之间的作用关系。细胞增殖对机体免疫反应非常重要, 能够帮助细胞参与

宿主防御病原体的入侵过程。细胞凋亡通常在发育和衰老过程中发生,以维持组织中细胞群的稳^[12]。本研究结果显示,rTsCRT 在与小鼠巨噬细胞共孵育后能够极显著促进其增殖功能及 NO 的释放,并抑制其凋亡功能。这表明该蛋白能够通过多种机制调节宿主免疫细胞发挥功能,有利于机体排出或杀死旋毛虫。

外周血单个核细胞(PBMC)是一类包含淋巴细胞、单核细胞和树突状细胞在内的混合细胞,在免疫系统中起重要作用^[2]。PBMC 收集与分离方法较为成熟,被广泛运用于多种试验研究中^[13]。本试验前期结果已初步表明 CRT 对小鼠巨噬细胞具有一定的影响,而旋毛虫入侵宿主过程复杂,且多种免疫细胞均参与其中,因此选用大鼠 PBMC 继续探究 CRT 对其的影响能够更好地模拟旋毛虫在感染宿主过程中对宿主免疫系统产生的影响。

幼稚 CD4⁺T 细胞分化为不同的 Th 细胞亚群取决于诸多因素,特定的刺激条件能够影响转录因子的表达,决定 T 细胞将遵循的分化程序,从而影响细胞因子的生产。Th1 亚群需要 IL-12 的刺激而进行分化,产生 IFN- γ 作为其标志性细胞因子,受转录因子 *T-bet* 调节,对细胞内病原体的免疫很重要;Th2 亚群需要 IL-4 的刺激而进行分化,受转录因子 *Gata-3* 调节,介导针对细胞外病原体的免疫应答;Th17 亚群需要 IL-21 进行分化,产生 IL-17 作为其标志性细胞因子,受转录因子 *ROR γ t* 调节;调节性 T 细胞亚群需要 TGF- β 的刺激而进行分化,受转录因子 *Foxp3* 调节,对于维持自我耐受和调节免疫至关重要。研究表明,缺乏 *T-bet* 和 *GATA3* 表达的 Treg 细胞能够上调 *ROR γ t* 表达并获得产生 IL-17 的能力;且 *T-bet* 和 *Gata-3* 的动态表达以及 *T-bet*、*Gata-3*、*ROR γ t* 和 *Foxp3* 之间的交叉调节对于维持 Treg 功能非常重要^[14]。本研究中,与 PBS 组相比,rTsCRT 能够显著下调 *T-bet* 和 *GATA-3* 表达,同时产生更高水平的转录因子 *Foxp3* 和 *ROR γ t*,与先前报道^[14]结果类似。

细胞因子的表达模式表征了单 Th 细胞亚群,并决定了它们在宿主防御中的功能^[15]。当寄生虫感染发生时,细胞介导的免疫对于阻止寄生虫的寄生有着很重要的作用^[16]。旋毛虫在感染早期,可诱导宿主中 Th1/Th2 免疫应答^[17]。IFN- γ 是 Th1 细胞和 CD8⁺T 细胞的关键细胞因子^[18]。它可以激活巨噬细胞和树突状细胞,刺激 MHC-肽复合物的表达增加,并防御细胞内感染^[19]。IL-4 以自分泌的方式促进 Th2 细胞分化,其转录水平可反映 Th2 型免疫应答。先前研究发现旋毛虫感染期间 *Th17* 和 Treg 反应的相互发展对于免疫保护和免疫病理学的平衡很重要,增加的 TGF- β 可能有助于 *Th17* 的早期增加^[20],而由此产生的 IL-17 通过介导空肠肌肉的收缩,帮助蠕虫排出^[21]。本研究中,与 PBS 组相比,rTsCRT 在与大鼠 PBMC 共孵育后,能产生更高水平的 Th1 类细胞因子(IFN- γ)、Th17 类细胞因子(IL-17)、Treg 类细胞因子(IL-10 和 TGF- β)、Th9 类细胞因子(IL-9)以及 Th22 类细胞因子(IL-22),表明 rTsCRT 能够刺激大鼠产生 Th1、Th17、Treg、Th9、Th22 等多种类型的免疫反应。rTsCRT 能显著抑制 Tfh 类细胞因子(IL-21)的表达,且在蛋白浓度为 10 和 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,显著抑制了 Th2 类细胞因子(IL-4)的表达。这表明 rTsCRT 可以抑制 Th2 和 Tfh 免疫反应。除此之外,PBMC 细胞因子转录水平变化情况还显示,IL-17 一直处于较高的转录水平,且 TGF- β 的转录水平也上调,这表明 rTsCRT 在宿主体内可能会通过引起宿主空肠肌肉的收缩来达到排除虫体的效果。

综上所述,本研究证实旋毛虫钙网蛋白(TsCRT)主要通过刺激巨噬细胞活化、增殖,抑制其凋亡来发挥免疫作用;rTsCRT 可显著促进大鼠 IFN- γ 、IL-17、IL-10、TGF- β 、IL-9、IL-22 等细胞因子的表达,抑制 IL-4、IL-21 等表达,结果说明 TsCRT 可刺激宿主产生 Th1、Th17、Treg、Th9、Th22 等多种类型的免疫反应,抑制 Th2 和 Tfh 免疫,对宿主免疫调节作用复杂。

参考文献 References:

- [1] Diaz J H, Warren R J, Oster M J. The disease ecology, epidemiology, clinical manifestations, and management of trichinellosis linked to consumption of wild animal meat[J]. *Wilderness & Environmental Medicine*, 2020, 31(2): 235-244.
- [2] 廖书漪,储稳,徐立新,等. 旋毛虫重组二肽基肽酶 1 在体外对大鼠外周血单个核细胞增殖、吞噬、凋亡等的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2020, 51(6): 1362-1370.
Liao S Y, Chu W, Xu L X, et al. Effect of *Trichinella spiralis* recombinant dipeptidyl-peptidase 1 on proliferation, phagocytosis, and apoptosis of rat PBMCs *in vitro*[J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2020, 51(6): 1362-1370 (in Chinese with English abstract).
- [3] Xu J Y, Yu P C, Wu L J, et al. Regulatory effect of two *Trichinella spiralis* serine protease inhibitors on the host's immune system[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 17045.
- [4] Kocięcka W. Trichinellosis: human disease, diagnosis and treatment[J]. *Veterinary Parasitology*, 2000, 93(3/4): 365-383.

- [5] Fang L, Sun L, Yang J, et al. Heat shock protein 70 from *Trichinella spiralis* induces protective immunity in BALB/c mice by activating dendritic cells[J]. *Vaccine*, 2014, 32(35):4412-4419.
- [6] Ferreira V, Molina M C, Valck C, et al. Role of calreticulin from parasites in its interaction with vertebrate hosts[J]. *Molecular Immunology*, 2004, 40(17):1279-1291.
- [7] Eggleton P, Bremer E, Dudek E, et al. Calreticulin, a therapeutic target? [J]. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2016, 20(9):1137-1147.
- [8] Zhang M L, Xiao J, Liu J R, et al. Calreticulin as a marker and therapeutic target for cancer[J]. *Clinical and Experimental Medicine*, 2023, 23(5):1393-1404.
- [9] Raghavan M, Wijeyesakere S J, Peters L R, et al. Calreticulin in the immune system: ins and outs[J]. *Trends in Immunology*, 2013, 34(1):13-21.
- [10] Ramírez G, Valck C, Aguilar L, et al. Roles of *Trypanosoma cruzi* calreticulin in parasite-host interactions and in tumor growth[J]. *Molecular Immunology*, 2012, 52(3/4):133-140.
- [11] Varol C, Mildner A, Jung S. Macrophages: development and tissue specialization[J]. *Annual Review of Immunology*, 2015, 33:643-675.
- [12] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death[J]. *Toxicologic Pathology*, 2007, 35(4):495-516.
- [13] 牟大超, 吴沙沙, 周轶. 不同外周血单个核细胞分离方法对流式细胞术分析结果的影响[J]. *新乡医学院学报*, 2022, 39(5):470-473.
Mou D C, Wu S S, Zhou Y. Effect of different separation method of peripheral blood mononuclear cells on the results of flow cytometry[J]. *Journal of Xinxiang Medical University*, 2022, 39(5):470-473 (in Chinese with English abstract).
- [14] Oakley M S, Sahu B R, Lotspeich-Cole L, et al. The transcription factor T-bet regulates parasitemia and promotes pathogenesis during *Plasmodium berghei* ANKA murine malaria[J]. *The Journal of Immunology*, 2013, 191(9):4699-4708.
- [15] Zhu J F. T helper cell differentiation, heterogeneity, and plasticity[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2018, 10(10):a030338.
- [16] Gao X, Yang Y, Liu X L, et al. Extracellular vesicles from *Trichinella spiralis*: proteomic analysis and protective immunity[J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2022, 16(6):e0010528.
- [17] Song Y N, Xu J, Wang X L, et al. Regulation of host immune cells and cytokine production induced by *Trichinella spiralis* infection[J]. *Parasite*, 2019, 26:74.
- [18] Xu D X, Tang B, Wang Y, et al. The immune protection induced by a serine protease from the *Trichinella spiralis* adult administered as DNA and protein vaccine[J]. *Acta Tropica*, 2020, 211:105622.
- [19] 王晶, 刘晓盼, 刘明江, 等. 白术多糖介孔二氧化硅的制备及其对小鼠巨噬细胞吞噬能力的影响[J]. *畜牧与兽医*, 2022, 54(4):107-112.
Wang J, Liu X P, Liu M J, et al. Preparation of atracylodes macrocephala polysaccharide mesoporous silica and its effect on the phagocytosis of macrophages from mice[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2022, 54(4):107-112 (in Chinese with English abstract).
- [20] Sun, Guo, Hao, et al. *Trichinella spiralis* excretory-secretory products stimulate host regulatory T cell differentiation through activating dendritic cells[J]. *Cells*, 2019, 8(11):1404.
- [21] Steel N, Faniyi A A, Rahman S, et al. TGFβ-activation by dendritic cells drives Th17 induction and intestinal contractility and augments the expulsion of the parasite *Trichinella spiralis* in mice[J]. *Plos Pathogens*, 2019, 15(4):e1007657.

责任编辑:周广礼