

• 基础实验研究论著 •

日本血吸虫可溶性成虫抗原和可溶性虫卵抗原对小鼠 1 型糖尿病的拮抗作用研究*

谭 潇¹, 肖建华²

(1. 邵阳医学高等专科学校, 湖南邵阳 422000; 2. 南华大学病原生物学研究所, 湖南衡阳 421001)

摘要:目的 探讨日本血吸虫可溶性成虫抗原(SWA)和可溶性虫卵抗原(SEA)对小鼠 1 型糖尿病的拮抗作用。方法 把 24 只成功建模的 1 型糖尿病小鼠随机分 3 组(A、B、C 组), 每组 8 只小鼠。同时制备日本血吸虫 SWA 和 SEA。A 组模型鼠经腹部皮下多点注射日本血吸虫 SWA 进行免疫; B 组模型鼠经腹部皮下多点注射日本血吸虫 SEA 进行免疫; C 组模型鼠用 PBS 代替抗原腹部皮下免疫, 1 周免疫 1 次, 共 4 次, 4 周后, 颈椎脱臼处死各组小鼠, 留取血清, 采用 ELISA 双抗夹心法测定各组小鼠血清中 IL-4 和 IFN- γ 的水平, 并取胰腺观察病理改变。结果 免疫 4 周后, B 组小鼠血清 IL-4 水平[(23.87 \pm 4.85)pg/mL]高于 C 组[(4.39 \pm 0.56)pg/mL], 差异有统计学意义($P < 0.01$), 而 IFN- γ 水平[(271.85 \pm 26.04)pg/mL]低于 C 组[(362.79 \pm 32.50)pg/mL], 差异也具有统计学意义($P < 0.01$)。但是 A 组小鼠 IL-4 水平[(5.09 \pm 0.37)pg/mL]和 IFN- γ 水平[(379.56 \pm 34.47)pg/mL], 与 C 组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。B 组小鼠的胰岛结构虽没有保持完整, 但淋巴细胞浸润较 C 组少, 胰岛内部也未见大量淋巴细胞浸润。与 C 组小鼠胰腺相比, A 组小鼠胰腺未见明显变化, 胰岛仍可见大量淋巴细胞浸润, 残余胰岛细胞数量减少, 并可见少数胰岛结构被破坏。结论 日本血吸虫 SEA 对糖尿病 1 型小鼠具有一定拮抗作用, 其作用机制可能是通过使 IL-4 升高和 IFN- γ 下降, 调节 Th1/Th2 免疫偏移, 导致 Th1 反应下调, Th2 反应增强。

关键词:糖尿病, 1 型; 日本血吸虫; 成虫抗原; 虫卵抗原

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.11.002

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)11-1379-03

Study of antagonistic effect of SWA and SEA of *Schistosoma japonicum* in mice with type 1 diabetes*Tan Xiao¹, Xiao Jianhua²

(1. Shaoyang Medical College, Shaoyang, Hunan 422000, China; 2. Nanhua University Pathogenic Biology Research Institute, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To explore the antagonistic effect of *Schistosoma japonicum* soluble adult worm antigen (SWA) and soluble egg antigen (SEA) in the mice with type 1 diabetes. **Methods** The 24 successful modeling type 1 diabetes mice were randomly divided into three groups (A, B, C group, $n=8$). SWA and SEA of *Schistosoma japonicum* were prepared. Mice in A group were immunized by abdominal subcutaneous multi-point injection SWA. Mice in B group were immunized by abdominal subcutaneous multi-point injection SEA. And mice models of C group were immunized by PBS instead of antigen through abdominal subcutaneous injection. The mice got immunization once a week, a total of four times. 4 weeks later, the mice were sacrificed, and serum specimens were collected for the determination of serum levels of IL-4 and IFN- γ by double-antibody sandwich ELISA, while pancreas tissues were collected and the pathological changes were observed. **Results** The serum IL-4 level of B group [(23.87 \pm 4.85)pg/mL] was higher than C group [(4.39 \pm 0.56)pg/mL], with significant differences ($P < 0.01$), while the serum IFN- γ level [(271.85 \pm 26.04)pg/mL] was lower than C group [(362.79 \pm 32.50)pg/mL], also with significant differences ($P < 0.01$). The serum IL-4 and IFN- γ of A group were (5.09 \pm 0.37)pg/mL and (379.56 \pm 34.47)pg/mL, which had no difference with C group ($P > 0.05$). The islet structure of mice in B group was not intact, however, the lymphocytic infiltration in B group was less than C group, and there was no lymphocytic infiltration in pancreatic islets in B group. Compared with C group, the pancreas of mice in A group did not have significant changes, lymphocytes infiltration was still visible in islets. The number of residual islet cells decreased, and visible minority islet structure was destroyed. **Conclusion** SEA of *Schistosoma japonicum* has certain antagonism effect on type 1 diabetes in experimental mice. Its mechanism may be the reduction of Th1 response and the enhancement of Th2 response through increasing IL-4 level and decreasing IFN- γ level.

Key words: diabetes mellitus, type 1; *Schistosoma japonicum*; adult worm antigen; egg antigen

糖尿病是近年来患病率增加最快的慢性疾病, 目前全世界糖尿病患者已超过 1.2 亿人, 中国的糖尿病患者人数位居全世界第二^[1], 糖尿病分 1 型糖尿病、2 型糖尿病、妊娠糖尿病及其他特殊类型的糖尿病。其中 1 型糖尿病又称为胰岛素依赖型糖尿病, 是一种由 T 细胞介导的, 多种免疫机制共同参与的自身免疫性疾病。国外一些研究显示, 曼氏血吸虫感染及相关虫卵抗原在自身免疫性疾病的治疗中具有重要的价值^[2]。如

2003 年, Sewell 等^[3]把曼氏血吸虫虫卵直接通过腹腔注射, 免疫实验性变应性脑脊髓炎动物模型, 结果明显降低了实验动物的临床评分, 其中中枢神经系统的炎性细胞浸润也减少了。同时 Zaccone 等^[4]也发现, 用曼氏血吸虫可溶性虫卵抗原(SEA)处理小鼠的脾细胞有减弱糖尿病发展成非肥胖型糖尿病严重联合免疫缺陷病的能力。中国只有日本血吸虫的感染, 日本血吸虫和曼氏血吸虫具有许多相似点, 因此本课题通过探讨日本血

* 基金项目: 湖南省教育厅科学研究项目(12C1217)。 作者简介: 谭潇, 女, 讲师, 主要从事抗感染免疫研究。

吸虫相关抗原对自身免疫性疾病——1 型糖尿病是否具有拮抗作用,旨在为开发自身免疫性疾病的治疗药物提供新的策略。

1 材料与与方法

1.1 材料 SPF 级、健康 BALB/c 雄性小鼠 24 只(体质量 18~22 g),购自南华大学实验动物中心;链脲佐菌素(STZ)购自 Sigma 公司;感染性钉螺购自湖南省血吸虫病防治研究所;小鼠 IL-4、IFN- γ ELISA 检测试剂盒购自北京欣博盛生物科技有限公司;全自动酶标检测仪购自芬兰雷勃 Multiskan MK-3。

1.2 方法

1.2.1 1 型糖尿病模型的构建 24 只雄性 BALB/c 小鼠(体质量 18~22 g),常规适应性饲养 1 周后构建 1 型糖尿病小鼠模型,模型的诱导采用多次小剂量 STZ 给药法。连续 5 d 腹腔注射 STZ 溶液(60 mg/kg),每天注射前禁食 8 h,但不禁水。将 STZ 溶于 0.1 mol/L 枸橼酸缓冲液(pH4.4),配制过程在冰上操作,且避光,配制好后在 30 min 内完成造模小鼠的注射。

1.2.2 日本血吸虫成虫抗原和虫卵抗原的制备 (1)日本血吸虫可溶性成虫抗原(SWA)制备:取健康家兔,经腹部皮肤贴片感染 1 000~1 500 条日本血吸虫尾蚴 45 d 左右,颈椎脱臼法处死家兔,门静脉灌注法收集好成虫,放入大 EP 管中,加入适量无菌生理盐水,匀浆器匀浆 15 min,超声粉碎仪粉碎 15 min(每超声 5 s,间隔 5 s),置-20℃冰箱反复冻融 3 次,于 4℃ 14 000 r/min 离心 30 min,取其上清液即为日本血吸虫 SWA。(2)日本血吸虫可溶性虫卵抗原(SEA)制备:将家兔解剖,取其肝脏,洗净后将其置研钵中捣碎,8 000 r/min 离心 3 min后,将匀浆依次用 80 目、120 目尼龙筛网过滤,留取滤液,再用 300 目尼龙筛网过滤,收集筛网内容物放入盆中,加 1.2% NaCl 溶液 100 mL,室温下静置 10~15 min,倒掉上清液,将沉淀物以 8 000 r/min 离心 1 min。小心吸掉沉淀物上层白色的肝脏组织,再反复离心 3 次,直至离心管中的沉淀物底部为黄色。然后在沉淀物中加入 0.25% 胃蛋白酶溶液 5 mL,轻轻震荡,涂片显微镜下观察虫卵,直至虫卵周围的肝脏组织完全消化干净后终止消化,再用 1.2% NaCl 溶液洗涤沉淀物直到混合液中无纤维蛋白,收集纯净的血吸虫虫卵(整个过程水温控制在 8℃ 以下,以防止虫卵孵化)。最后将收集到的虫卵用超声粉碎仪粉碎 15 min(每超声 5 s,间隔 5 s),置-20℃冰箱反复冻融 3 次,于 4℃ 14 000 r/min 离心 30 min,其上清液即为日本血吸虫 SEA。

1.2.3 实验动物分组 将 1 型糖尿病模型造模成功的 24 只小鼠随机分为 3 组,每组 8 只:A 组为日本血吸虫 SWA 免疫组;B 组为日本血吸虫 SEA 免疫组;C 组为糖尿病模型对照组。

1.2.4 日本血吸虫 SWA 和 SEA 免疫 1 型糖尿病小鼠 A 组和 B 组 1 型糖尿病小鼠分别用已制备好的日本血吸虫 SWA 和 SEA 于腹部皮下多点注射免疫,每只注射剂量为 50 μ g,每周免疫 1 次,共免疫 4 次。C 组糖尿病模型组为对照组,用 PBS 代替抗原进行免疫。

1.2.5 小鼠血清中细胞因子水平检测 实验小鼠眼眶静脉丛采血,分离血清,采用 ELISA 双抗夹心法测定各组小鼠血清中 IL-4 和 IFN- γ 的表达水平,根据标准曲线判断待测样品中特定细胞因子的水平。

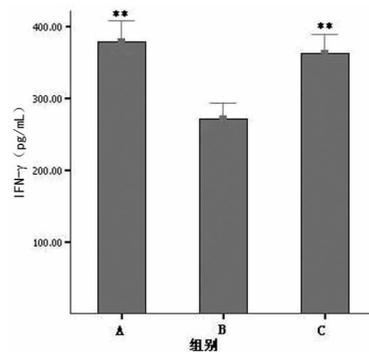
1.2.6 各组小鼠胰腺组织病理学观察 颈椎脱臼处死各组实验小鼠,取胰腺,10% 甲醛固定 48 h,双蒸水浸泡 3 次,每次 15 min,梯度乙醇脱水,石蜡包埋、切片,HE 染色,镜下观察小

鼠胰腺组织的病理改变。

1.3 统计学处理 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS13.0 统计软件对资料进行多个独立样本 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 表示有统计学差异。

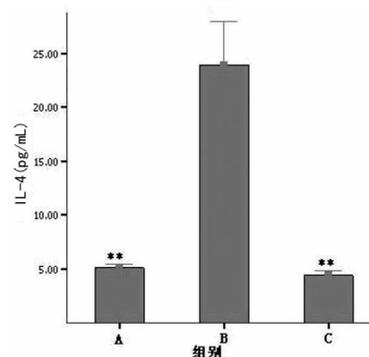
2 结果

2.1 小鼠血清中 IFN- γ 和 IL-4 水平 末次血糖测定后,采用 ELISA 双抗夹心法测定各组小鼠血清中 IFN- γ 和 IL-4 的表达水平,根据标准曲线判断待测样品中细胞因子的水平。实验结果显示:日本血吸虫 SEA 免疫的 B 组小鼠血清中 IFN- γ 水平为(271.85 \pm 26.04) pg/mL,明显低于日本血吸虫 SWA 免疫的 A 组[(379.56 \pm 34.47) pg/mL]和 C 组小鼠的 IFN- γ 水平[(362.79 \pm 32.50) pg/mL],且差异均有统计学意义($P < 0.01$)。日本血吸虫 SEA 免疫的模型小鼠(B 组)血清中 IL-4 水平为(23.87 \pm 4.85) pg/mL,明显高于日本血吸虫 SWA 免疫的糖尿病模型小鼠(A 组)血清中 IL-4 水平[(5.09 \pm 0.37) pg/mL]和 C 组小鼠 IL-4 水平[(4.39 \pm 0.56) pg/mL],且差异均有统计学意义($P < 0.01$)。但是日本血吸虫 SWA 免疫的模型鼠(A 组)和 C 组小鼠血清中 IL-4 和 IFN- γ 的表达水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1~2。



** : $P < 0.01$, 与 B 组比较。

图 1 各组小鼠血清中 IFN- γ 水平



** : $P < 0.01$, 与 B 组比较。

图 2 各组小鼠血清中 IL-4 水平

2.2 小鼠胰腺组织病理变化 各组小鼠胰腺组织经切片及 HE 染色,镜下观察其病理变化。结果显示:C 组小鼠胰腺组织均有不同程度的胰岛萎缩、数量减少、分布稀疏、胰岛细胞数减少、胰岛 β 细胞空泡变性,胰岛呈空虚状态,并有不同程度淋巴细胞浸润及胰岛炎性病变。日本血吸虫 SWA 免疫的 A 组模型小鼠胰腺组织少数胰岛结构被破坏,有不同程度的萎缩、分布稀疏、胰岛 β 细胞空泡变性,并有不同程度淋巴细胞浸润及胰岛炎性病变,与糖尿病模型组无明显区别。但是日本血吸虫 SEA 免疫 B 组模型小鼠胰岛结构大部分保持完整,无明显的萎缩,胰岛淋巴细胞浸润较另外两组明显减少,淋巴细胞浸

润只见于周边部和导管区。见图 3。

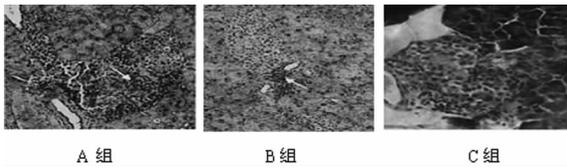


图 3 各组小鼠胰岛的病理变化(HE 染色, 10×10)

3 讨 论

1 型糖尿病是一种自身免疫性疾病, 导致 1 型糖尿病自身免疫反应是由 CD4⁺ T 细胞介导的。CD4⁺ T 细胞分为 2 种亚型, 即 Th1 和 Th2。Th1 亚型可以促进 IL-2 及 IFN- γ 等细胞因子分泌, 增强免疫应答, 而这种免疫反应是针对自身组织就导致致病性免疫作用或炎性损伤作用; 相反, Th2 亚型可以促进 IL-4、IL-10 等细胞因子分泌, 而抑制 Th1 型细胞的作用。在正常情况下, 这 2 种亚型细胞互相制约, 从而达到免疫平衡。但是当平衡被打破, Th1 亚型的作用超过 Th2 亚型, CD4⁺ T 细胞调节功能的失衡, 就会引起一系列的炎性反应, 导致自身免疫性疾病的发生, 例如可以进一步引起胰岛 β 细胞破坏而导致 1 型糖尿病的发生^[5]。

研究表明日本血吸虫 SEA 具有较强的抗原性, 诱导机体发生明显的 Th2 免疫反应^[6], 实验结果也显示 IL-4 水平明显升高, 说明 SEA 具有使免疫反应向 Th2 转化的作用。已有报道: 曼氏血吸虫的虫卵抗原因为其内在特点, 可以活化 Th2 免疫反应的细胞转导信号, 同时又可以抑制 Th1 免疫反应的细胞信号转导, 导致树突状细胞诱导免疫反应向 Th2 转化, 抑制 Th1 应答引起的免疫病理损伤, 从而减轻炎性反应的发生^[7-8], 使糖尿病症状缓解。本次研究也证明了日本血吸虫 SEA 可以使 IL-4 水平显著升高, 使 IFN- γ 水平下降, 导致机体免疫反应向 Th2 型偏移。日本血吸虫的 SWA 免疫糖尿病模型小鼠后, IL-4 水平无明显变化, 与糖尿病模型组相似, 不能对 T 细胞免疫应答类型进行调节, 对糖尿病无拮抗作用。

以往人们普遍认为, 日本血吸虫对人体是有害无益的, 但从目前的流行病学调查和一些研究机构显示, 日本血吸虫除了对机体造成一定的损伤, 也能降低一些自身免疫性疾病的发病

率。但是日本血吸虫对 1 型糖尿病等自身免疫性疾病的拮抗作用仍处于研究的初级阶段, Th1 向 Th2 反应偏移或 Th1 反应下调只是其中的可能机制, 还有许多其他未知机制的参与, 有待今后进一步研究。

参考文献

- [1] 王智峰, 朱峰, 李秋梅. 我国 2 型糖尿病的发病现状、原因及防治探讨[J]. 亚太传统医药, 2010, 6(9): 151-152.
- [2] Araújo MI, Hoppe BS, Medeiros M Jr, et al. Schistosoma mansoni infection modulates the immune response against allergic and auto-immune diseases[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2004, 99(5 Suppl 1): S27-32.
- [3] Sewell D, Qing Z, Reinke E, et al. Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by helminth ova immunization[J]. Int Immunol, 2003, 15(1): 59-69.
- [4] Zaccane P, Fehervari Z, Jones FM, et al. Schistosoma mansoni antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes[J]. Eur J Immunol, 2003, 33(5): 1439-1449.
- [5] Tzifi F, Kanariou M, Tzanoudaki M, et al. Flow cytometric analysis of the CD4⁺ TCR V β repertoire in the peripheral blood of children with type 1 diabetes mellitus, systemic lupus erythematosus and age-matched healthy controls[J]. BMC Immunol, 2013, 14(1): 1-12.
- [6] 许馨予, 苏川, 张兆松, 等. 抗原活化诱导的辅助性 T 细胞凋亡参与血吸虫感染不同阶段 Th1/Th2 免疫应答极化的研究[D]. 南京: 南京医科大学, 2008.
- [7] Zaccane P, Burton O, Miller N, et al. Schistosoma mansoni egg antigens induce Treg that participate in diabetes prevention in NOD mice[J]. Eur J Immunol, 2009, 39(4): 1098-1107.
- [8] El-Wakil HS, Aboushousha TS, El Haddad O, et al. Effect of schistosoma mansoni egg deposition on multiple low doses streptozotocin induced insulin dependent diabetes[J]. J Egypt Soc Parasitol, 2002, 32(3): 987-1002.

(收稿日期: 2014-01-08)

(上接第 1378 页)

程中的早期事件, 可以作为宫颈癌早期诊断的一个指标。

本研究发现 p16 基因的过表达与 HR-HPV 感染有关。有研究表明 p16 基因几乎全部在 HR-HPV 感染过的宫颈癌和癌前病变中过表达^[8], 表明 HR-HPV 感染可能是通过其病毒癌基因的作用参与了 p16 基因的高表达, 从而导致了宫颈癌变的发生。从宫颈上皮不典型增生到原位癌再到宫颈癌, 宫颈癌的发生和发展是一个非常复杂的病变过程, 并且根据宫颈上皮不典型增生的程度和范围的不同, CIN 又可分为 CIN I、II、III 级。所以对于宫颈癌的早期诊断依靠三阶梯筛查还是远远不够, 需要找出三阶梯筛查以外的肿瘤标志物对其进行早期诊断。根据本课题组目前的研究表明, p16 基因在宫颈癌的发生和发展中起到非常重要的作用, 可以作为宫颈癌前病变和宫颈癌早期诊断的分子标记物。

参考文献

- [1] Deligeorgiou E, Christopoulos P, Aravantinos L, et al. Human papilloma virus molecular profile and mechanisms of cancerogenesis: a review[J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2009, 30(2): 128-132.

- [2] 郭玉凤, 张志伟, 贺修胜, 等. 组织芯片检测 p16 蛋白在不同胃癌组织中的表达意义[J]. 肿瘤学杂志, 2012, 18(10): 746-749.
- [3] 杨春梅, 陈卫刚, 郑义, 等. 新疆哈萨克族食管鳞癌中 p16 蛋白的表达及其意义[J]. 肿瘤防治研究, 2012, 39(3): 289-291.
- [4] 杨洋, 郑荣生. Chk1 和 p16 在三阴乳腺癌中的表达及其相关性分析[J]. 临床肿瘤学杂志, 2012, 17(2): 126-130.
- [5] 张玉阳, 郑飞龙, 赵云琴, 等. 人乳头状瘤病毒感染与 p16 蛋白表达在宫颈鳞癌中的意义[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(14): 2965-2967.
- [6] 田琦, 孟刚. p16、Ki-67 在宫颈鳞癌及宫颈上皮内瘤变组织中的表达及临床意义[J]. 中国老年学杂志, 2011, 9(31): 3378-3379.
- [7] Salit IE, Tinmouth J, Chong S, et al. Screening for HIV-associated anal cancer: correlation of HPV genotypes, P16 and E6 transcripts with anal pathology[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009, 18(7): 1886-1892.
- [8] Abraham MT, Kuriakose MA, Sacks PG, et al. Motility related proteins as markers for head and neck squamous cell cancer[J]. Laryngoscope, 2001, 111(7): 1285-1289.

(收稿日期: 2014-01-08)