

DOI:10.13350/j.cjpb.230811

• 论著 •

猪囊尾蚴排泄分泌抗原 LRRC15 蛋白对仔猪 T 细胞免疫应答的影响*

李丽竹, 何威, 周必英**

(遵义医科大学寄生虫学教研室, 贵州遵义 563000)

【摘要】 目的 观察猪囊尾蚴排泄分泌抗原 LRRC15 蛋白对仔猪 T 细胞免疫应答的影响 方法 用 LRRC15 蛋白刺激健康仔猪外周血 PBMC 和脾脏 CD4⁺T 细胞,分析 T 细胞免疫应答水平:①在 PHA 处理下,以 RPMI 1640、ESA、ConA 为对照组,用 LRRC15 蛋白刺激 PBMC,流式检测 CD4⁺、CD8⁺T 淋巴细胞数量比例变化,以及 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺、CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞表达水平;②在有和无 LPS 存在下,用 LRRC15 蛋白刺激 PBMC,ELISA 检测培养上清中 IL-10 含量;③分别于加入 LRRC15 蛋白后 24、48、72 h 检测初始 CD4⁺Th 细胞分化情况。分离仔猪脾脏 CD4⁺T 细胞并与未成熟髓源性 DC 共培养,采用 ELISA 方法检测加入 LRRC15 蛋白 24、48、72 h 培养上清中的 IL-4、IL-5、IL-10、IL-17、IFN- γ 水平。 结果 LRRC15 蛋白刺激 PBMC 后,CD4⁺T 淋巴细胞数量比例显著增加($P < 0.05$),并诱导 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺、CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 表达(均 $P < 0.05$),但不能诱导 IL-10 的分泌。LRRC15 蛋白分别作用于 CD4⁺T 细胞 24、48、72 h,PBMC 细胞 IL-4、IL-17 分泌水平显著降低(均 $P < 0.05$);LRRC15 蛋白诱导 24 与 48 h 相比,PBMC 细胞分泌 IL-5 水平升高($P < 0.05$);诱导 72 h 的 IL-5 水平与 48 h 时比较差异无统计学意义($P > 0.05$);LRRC15 蛋白诱导 IFN- γ 水平升高($P < 0.05$),诱导 24、48、72 h 时的分泌水平差异无统计学意义($P > 0.05$);LRRC15 蛋白于 CD4⁺T 细胞 24、48、72 h 均不能诱导 IL-10 分泌(均 $P > 0.05$)。 结论 LRRC15 蛋白可诱导仔猪 PBMC 中 CD4⁺/CD8⁺T 细胞免疫失衡,诱导 Treg 细胞表达,通过非依赖性 IL-10 途径发挥免疫抑制作用,并诱导早期 Th1 型免疫应答和后期 Th1/Th2 混合型免疫应答。

【关键词】 猪囊尾蚴;排泄分泌抗原;LRRC15 蛋白;T 细胞免疫应答

【中图分类号】 R383.3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)08-0927-07

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Aug;18(8):927-933.]

Effect of cysticercus cellulosae excretory secretory antigen LRRC15 protein on T-cell immune response in piglets

LI Lizhu, HE Wei, ZHOU Biying (Department of Parasitology, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou, China)***

【Abstract】 **Objective** The purpose of this study is to examine the effect of pig cysticercus excretory-secretory antigen LRRC15 protein on the immune response of piglet T cells. **Methods** LRRC15 protein was used to stimulate healthy piglet peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and spleen CD4⁺T cells. The level of T cell immune response was analyzed as follows:① PBMC was stimulated with LRRC15 protein under PHA treatment, with RPMI 1640, ESA, and ConA as control groups. The changes in CD4⁺ and CD8⁺ lymphocyte cell ratio and the expression level of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ and CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg cells were detected by flow cytometry. ② PBMC was stimulated with LRRC15 protein with and without LPS. The IL-10 content in the culture supernatant was detected by ELISA. ③ The initial differentiation of CD4⁺Th cells was detected at 24, 48, and 72 hours after adding LRRC15 protein. CD4⁺T cells from piglet spleen were isolated and co-cultured with immature myeloid dendritic cells (DC), and the levels of IL-4, IL-5, IL-10, IL-17, and IFN- γ in the culture supernatant at 24, 48, and 72 hours after adding LRRC15 protein were detected by ELISA. **Results** After stimulation with the LRRC15 protein, there was a significant increase in the proportion of CD4⁺T lymphocytes ($P < 0.05$), and it also induced the expression of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ and CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺Tregs (both $P < 0.05$). However, it was unable to induce the secretion of IL-10. The LRRC15 protein acted on CD4⁺T cells separately for 24, 48, and 72 hours, and it significantly reduced the secretion levels of IL-4 and IL-17 in PBMC cells (both $P < 0.05$). Compared to LRRC15 induction for 24 and 48 hours, the secretion level of IL-5 in PBMC cells increased significantly ($P <$

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 81960378);贵州省科技厅基础 Research 计划(黔科合基础—ZK[2023]—一般 516)。

** **【通讯作者】** 周必英, E-mail: 1458030871@qq.com

【作者简介】 李丽竹(1991-),女,贵州人,硕士,初级护师,主要研究方向:寄生虫感染与免疫。E-mail: 627454728@qq.com

0.05) while there was no statistical difference in the secretion level of IL-5 induced for 72 hours and 48 hours ($P < 0.05$). The LRRC15 protein induced an increase in IFN- γ level ($P < 0.05$), and there was no statistical difference in the secretion level after 24, 48, and 72 hours of induction ($P > 0.05$). Additionally, the LRRC15 protein could not induce the secretion of IL-10 in CD4⁺ T cells after stimulation for 24, 48, and 72 hours (all $P > 0.05$). **Conclusion** The LRRC15 protein can cause an immune imbalance of CD4⁺/CD8⁺ T cells in the PBMC of piglets, as well as induce the expression of Treg cells. It exerts immunosuppressive effects through a pathway that is not dependent on IL-10 and induces both an early Th1-type immune response and a late Th1/Th2 mixed-type immune response.

【Key words】 *Cysticercus cellulosae*; excretory secretory antigen; LRRC15 protein; T cell immune response

囊尾蚴病(cysticercosis)又称囊虫病,是由猪带绦虫(*Taenia solium*, Ts)幼虫囊尾蚴(*Cysticercus cellulosae*)寄生于人或猪引起的一种严重危害人类健康和畜牧业生产的人兽共患寄生虫病^[1]。囊尾蚴感染宿主后,因寄生部位和阶段不同,可引起不同程度的症状,如脑囊虫引起的癫痫、颅内压升高等中枢神经系统症状,严重的可导致死亡,这依赖于不同强度的宿主细胞免疫反应而影响病情发展^[2-5]。T细胞免疫在寄生虫感染中占主导地位,CD4⁺和CD8⁺T淋巴细胞在感染不同时期的增殖以及Th1、Th2、Th17和Treg细胞的分化,诱导细胞因子或抗体产生^[6-8]发挥免疫作用。有研究表明,寄生虫排泄分泌抗原(Excretory secretory antigen, ESA)其在宿主体内长期寄生的过程中不断分泌和排泄的抗原物质,可调节不同的T细胞亚群变化,引起Th混合免疫反应,诱导免疫抑制细胞及其细胞因子产生,从而抑制宿主免疫系统功能^[9-10]。其中,猪囊尾蚴ESA可诱导CD4⁺/CD8⁺T细胞免疫失衡且刺激Treg免疫抑制细胞及IL-10的产生,以及诱导Th2型免疫应答占主导^[11]。LRRC15蛋白是囊尾蚴ESA中的高表达抗原,故推测LRRC15蛋白可能在囊虫病的发生发展中发挥免疫调节作用。本实验用LRRC15蛋白刺激仔猪外周血PBMC,分析其对T淋巴细胞活化增殖、诱导Treg细胞和IL-10产生以及初始CD4⁺T细胞分化的影响,为该蛋白在囊虫病发生中的作用机制研究奠定基础。

材料与方 法

1 材料

巴马香猪购自湖北奥菲生物科技有限公司。LRRC15蛋白和猪囊尾蚴ESA为本室制备;重组猪IL-4、IL-2、GM-CSF购自英国Abcam公司;流式抗体CD86(APC)、CD80(PE)、Foxp3(FITC)、CD25(Alexa Fluor 647)、MHC II (FITC)及CFSE荧光染料购自美国Thermo公司;流式抗体CD8(AF647)、CD4(PE-Cy7)购自美国BD公司;ELISA试剂盒购自武汉云克隆科技股份有限公司;红细胞裂解液、胎牛血清、磷酸盐缓冲液(PBS)购自北京索莱宝科技有限公司;猪外周血淋巴细胞分离液购自中国天津灏洋生物制品有限

公司;刀豆球蛋白A(ConA)购自美国Sigma公司。

2 方法

2.1 观察LRRC15蛋白刺激对仔猪T细胞亚群分化的影响 无菌条件下采集猪外周静脉血,用猪淋巴细胞分离液(Ficoll分离液)分离猪外周血PBMC(若有红细胞残留,则用红细胞裂解液裂解红细胞);加入含10%胎牛血清(FBS)和抗生素(100 U/mL青霉素, 100 μ g/mL链霉素)的RPMI 1640培养基重悬PBMC后用CFSE标记,加入LRRC15蛋白50 μ g/mL,于标准条件下培养3 h,再加入PHA 2.5 μ g/mL。试验设加入ESA 50 μ g/mL、ConA 10 μ g/mL和RPMI 1640培养基作为对照组。培养48 h后,收集各组培养细胞,根据CD4-PE Cy7和CD8-AF647使用说明书方法染色后流式检测CD4⁺和CD8⁺T比例。

2.2 观察LRRC15蛋白对Treg细胞表达的影响 于培养的PBMC细胞中加入LRRC15蛋白50 μ g/mL,以ESA(50 μ g/mL)、ConA(10 μ g/mL)和1640培养基作为对照组。于标准条件培养48 h后收集细胞,根据抗体CD4-PE Cy7、CD8-AF647、CD25-Alexa Fluor 647使用说明书标记细胞后用流式细胞仪检测CD4、CD8、CD25、Foxp3表达情况(分别以CD4⁺、CD8⁺细胞为基础设门)。

2.3 观察LRRC15蛋白对PBMC中IL-10分泌的影响 收集培养的PBMC细胞,加入LRRC15蛋白50 μ g/mL,以ESA(50 μ g/mL)、LPS(2 μ g/mL)、培养基为对照组。培养24 h后1 500 r/min(离心半径10 cm)离心20 min,收集上清液,根据ELISA试剂盒说明书检测IL-10水平。

2.4 观察LRRC15蛋白对初始Th细胞分化的影响

2.4.1 未成熟DC细胞的分离 健康仔猪麻醉后穿刺髂后上棘,抽取骨髓20 mL,按1:1比例加入无菌PBS(0.01 mol/L, pH 7.2), 2 000 r/min(离心半径10 cm)离心10 min,弃上清。用无菌PBS重悬细胞,然后加5 mL Ficoll液分离进行细胞分离。收集单个核细胞,加入等量预冷PBS混匀,4 $^{\circ}$ C、2 000 r/min离心10 min,弃上清。重复洗涤一次,收集未成熟DC。

2.4.2 磁珠分选CD4⁺T细胞 取仔猪新鲜脾脏,加

入适量 RPMI 1640 培养基,轻轻研磨至无明显组织块,滤出的液体即为脾细胞悬液,加入 10 mL RPMI 1640 培养基洗涤一次,1 500 r/min 离心 10 min,弃上清。取细胞沉淀于 EP 管中,根据磁珠说明书方法用 LS 柱置于 MACS 分选仪上筛选 CD4⁺ T 细胞,加入 4 μL CD4-PE Cy7 抗体,4 °C 避光孵育 30 min,洗涤后流式细胞仪检测其纯度。

2.4.3 DC-CD4⁺ T 细胞共培养体系 LRRC15 蛋白刺激试验 收集 CD4⁺ T 细胞和骨髓源性未成熟 DC,加入 LRRC15 蛋白 50 μg/mL 进行刺激试验,以 ESA (50 μg/mL)、RPMI 1640 培养基和 LPS(100 ng/mL) 为对照组。CD4⁺ T 淋巴细胞与 DC 细胞数比例为 10 : 1,置于 37 °C 共培养 24 h 后 1 500 r/min(离心半径 10 cm)离心 20 min 去除培养基,加入含 10 ng/mL 猪 rIL-2 的 RPMI 1640 完全培养基继续于 37 °C 培养 24、48 和 72 h,收集培养液,15 000 r/min(离心半径 10 cm)离心 20 min 后,取上清,ELISA 检测细胞因子水平。细胞因子标准品溶液按试剂盒说明书配制,在酶标仪 450 nm 波长处测各孔的吸光度(A)值,绘制标准曲线,计算 IL-4、IL-5、IL-10、IL-17、IFN-γ 浓度。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析。实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较采用 LSD(Least-Significant Difference, LSD)-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

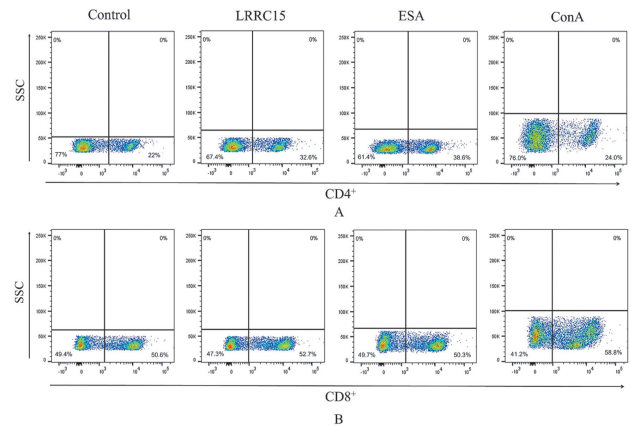
1 LRRC15 蛋白对 T 淋巴细胞亚群数量变化的影响

LRRC15 蛋白刺激 PBMC 后测定 T 淋巴细胞亚群比例变化,结果如图 1 和图 2。与空白对照组相比,LRRC15 组 CD4⁺ T 淋巴细胞比例显著增加($P < 0.05$),CD8⁺ T 淋巴细胞比例无显著变化($P > 0.05$)。ConA 刺激对照组 PBMC 中的 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 淋巴细胞比例显著增加(均 $P < 0.05$)。LRRC15 蛋白刺激组与 ConA 组相比 CD4⁺ T 淋巴细胞比例显著增加($P < 0.05$),CD8⁺ T 淋巴细胞比例无显著变化($P > 0.05$);与 ESA 组相比 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 淋巴细胞比例均无显著变化(均 $P > 0.05$)。

2 LRRC15 蛋白诱导 Treg 细胞表达情况

LRRC15 蛋白刺激健康仔猪 PBMC 诱导 Treg 细胞表达情况见图 3 和图 4。与空白组相比,LRRC15 刺激组 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞和 CD8⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞比例显著增加(均 $P < 0.05$)。ESA 组 CD8⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞比例与 ConA 组相比显著增加($P < 0.05$),CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞比例显著降低,而与 LRRC15 组比

较差无统计学意义($P > 0.05$)。LRRC15 组与 ESA 组相比 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞比例差异无统计学意义($P > 0.05$),CD8⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞比例显著降低($P < 0.05$)。

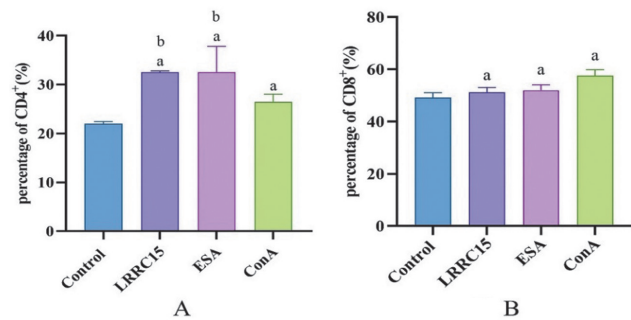


A CD4⁺ T 淋巴细胞比例(%) B CD8⁺ T 淋巴细胞比例(%)。

图 1 流式细胞术检测 T 淋巴细胞亚群比例(%)

A The ratio of CD4⁺ T lymphocytes B The ratio of CD8⁺ T lymphocytes

Fig. 1 The proportion of T lymphocyte subsets was measured by flow cytometry (%)



A CD4⁺ T 淋巴细胞表达量 B CD8⁺ T 淋巴细胞表达量 (a 与 Control 组相比, $P < 0.05$; b 与 ConA 组相比, $P < 0.05$)。

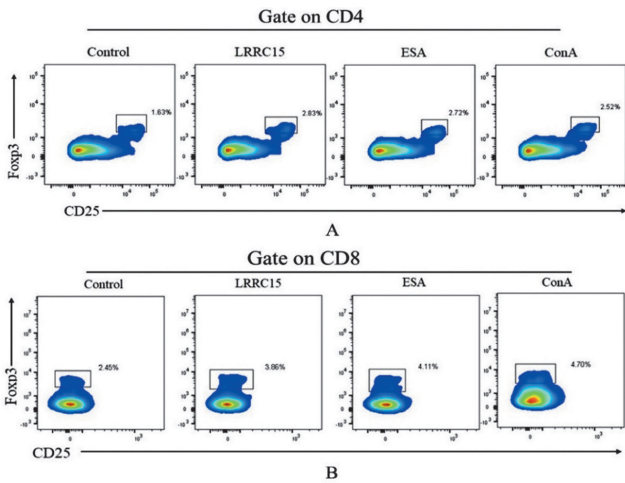
图 2 LRRC15 蛋白刺激 PBMC 中 T 细胞亚群比例变化(%)

A The expression quantity of CD4⁺ T lymphocytes B The expression quantity of CD8⁺ T lymphocytes (a Compared with Control group, $P < 0.05$; b Compared with ConA group, $P < 0.05$).

Fig. 2 The change of the proportion of T cell subsets in PBMC with LRRC15 protein (%)

3 LRRC15 蛋白对 PBMC 中 IL-10 分泌的影响

在有和无 LPS 存在下,用 LRRC15 蛋白刺激 PBMC,收集培养上清,采用 ELISA 检测 IL-10 水平,结果如图 5。无 LPS 存在下,LRRC15 蛋白和囊尾蚴 ESA 组 IL-10 水平与空白对照组比较均显著增加(均 $P < 0.05$);ESA 组与 LRRC15 组相比 IL-10 水平显著降低($P < 0.05$)。LRRC15 和囊尾蚴 ESA 与 LPS 联合刺激时,LRRC15 蛋白抑制 PBMC 中 LPS 诱导的 IL-10 分泌,ESA 促进 PBMC 中 LPS 诱导的 IL-10 分泌(均 $P < 0.05$)。

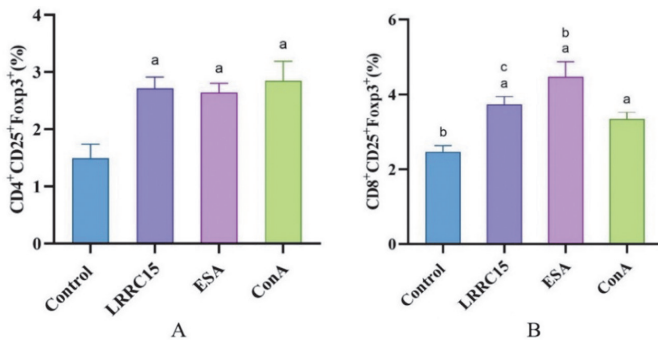


A CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 淋巴细胞比例(%) B CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺T 淋巴细胞比例(%)

图 3 Treg 细胞流式检测

A The ratio of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T lymphocytes (%) B The ratio of CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺T lymphocytes (%)

Fig. 3 The number of Treg cell was detected by flow cytometry



A CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 淋巴细胞表达量 B CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺T 淋巴细胞表达量 (a 与 Control 组相比, $P < 0.05$; b 与 ConA 组相比, $P < 0.05$; c 与 ESA 组相比, $P < 0.05$)

图 4 LRRC15 蛋白诱导 Treg 细胞亚群比例的变化 (%)

A The expression quantity of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T lymphocytes B The expression quantity of CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺T lymphocytes (a Compared with control group, $P < 0.05$; b Compared with ConA group, $P < 0.05$; c Compared with ESA group, $P < 0.05$)

Fig. 4 The change of the proportion of Treg cell subsets induced by LRRC15 protein (%)

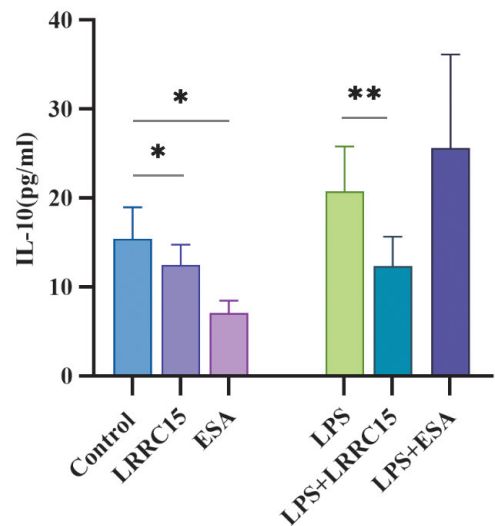
4 LRRC15 蛋白对 Th 分化的影响

4.1 未成熟 DC 细胞形态 扫描电镜观察未成熟 DC 细胞表面褶皱多,毛刺样突起少(图 6)。

4.2 LRRC15 蛋白对初始 CD4⁺T 细胞分化的影响 分选出的仔猪脾脏 CD4⁺T 淋巴细胞纯度在 80% 以上(图 7)。

将 CD4⁺T 细胞与体外诱导的仔猪髓源性未成熟 DC 共培养,分别加入 LRRC15 蛋白刺激,ELISA 检测 24、48、72 h 培养上清 IL-4、IL-5、IL-10、IL-17、IFN- γ 水平,结果如表(1-3),根据吸光度计算出各细胞因子的浓度,由此作出图 8。与空白组相比,LRRC15 蛋白组 24、48、72 h 时的 IL-4、IL-17 水平均显著降低(均 P

< 0.05);LRRC15 蛋白诱导 24 与 48 h 相比,IL-5 水平显著升高($P < 0.05$),IL-5 在 72 与 48 h 的分泌水平无显著变化($P < 0.05$);LRRC15 蛋白组 IFN- γ 水平显著升高($P < 0.05$),24、48、72 h 时的分泌水平无显著变化($P > 0.05$);LRRC15 组在 3 个时间段均不能诱导分泌 IL-10 分泌(均 $P > 0.05$)。LRRC15 蛋白组 24、48、72 h 时 IL-4、IL-5、IL-10、IL-17 及 IFN- γ 分泌水平与 LPS 组相比均显著降低(均 $P < 0.05$),IL-17 水平与 ESA 组相比均显著降低(均 $P < 0.05$),24 h 时的 IL-10 水平显著降低($P < 0.05$);3 个时间段比较 IL-4、IL-5、IFN- γ 水平差异无统计学意义($P > 0.05$),在 48 和 72 h 时的 IL-10 水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。



注: a 与 Control 组相比, $P < 0.05$; b 与 LPS 组相比, $P < 0.05$ 。

图 5 LRRC15 蛋白刺激 PBMC 中 IL-10 分泌水平 (%)

Notes: a Compared with Control group, $P < 0.05$; b Compared with LPS group, $P < 0.05$.

Fig. 5 The secretion level of IL-10 in PBMC stimulated with LRRC15 protein (%)

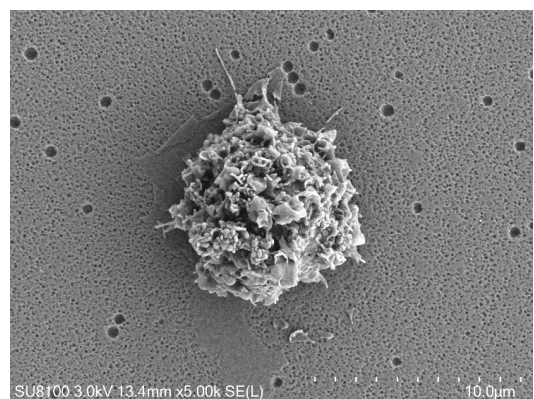


图 6 扫描电镜下未成熟 DC 形态

Fig. 6 The morphological of immature DC in vitro by scanning electron microscope

表 1 DC-CD4⁺T 细胞共培养 24 h 上清中细胞因子分泌水平 (A₄₅₀ 值)
Table 1 The cytokine secretion levels in the co-culture supernatant in 24 h (A₄₅₀ value)

组 Group	IL-4	IL-5	IL-10	IL-17	IFN-γ
Control	0.275±0.146 ^{b,c}	0.296±0.062 ^{b,c}	0.132±0.004 ^{b,c}	0.228±0.005 ^b	0.238±0.007 ^b
LRRC15	0.198±0.125 ^{a,b}	0.336±0.062 ^{a,b}	0.133±0.057 ^{b,c}	0.144±0.007 ^{a,b,c}	0.266±0.006 ^{a,b}
ESA	0.193±0.127 ^{a,b}	0.311±0.007 ^{a,b}	0.150±0.003 ^{a,b,c}	0.222±0.004 ^b	0.50±0.272 ^{a,c}
LPS	0.247±0.014 ^{a,c}	0.423±0.156 ^{a,c}	0.168±0.009 ^{a,c}	0.257±0.110 ^b	0.307±0.156 ^{a,b,c}

注: ^a P<0.05, 与 Control 组相比; ^b P<0.05, 与 LPS 组相比; ^c P<0.05, 与 ESA 组相比。

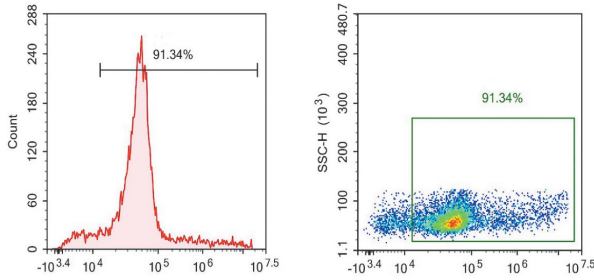


图 7 CD4⁺T 细胞纯度
Fig. 7 The purity of CD4⁺T cell

表 2 共培养 48 h 上清中细胞因子分泌水平 (n=3, A₄₅₀ 值)
Table 2 The cytokine secretion levels in the co-culture supernatant in 48 h (n=3, A₄₅₀ value)

组别 Group	对照 Control	LRRC15	ESA	LPS
IL-4	0.370±0.021 ^{b,c}	0.215±0.135 ^{a,b}	0.238±0.141 ^{a,b}	0.317±0.115 ^{a,c}
IL-5	0.338±0.009 ^{b,c}	0.372±0.006 ^{a,b}	0.358±0.010 ^{a,b}	0.440±0.013 ^{a,c}
IL-10	0.146±0.062 ^b	0.142±0.035 ^b	0.147±0.005 ^b	0.185±0.121 ^{a,c}
IL-17	0.263±0.150 ^{b,c}	0.178±0.008 ^{a,b,c}	0.289±0.009 ^{a,b}	0.668±0.211 ^{a,c}
IFN-γ	0.263±0.010 ^b	0.285±0.09 ^{a,b}	0.274±0.012 ^b	0.307±0.156 ^{a,c}

注: ^a P<0.05, 与 Control 组相比; ^b P<0.05, 与 LPS 组相比; ^c P<0.05, 与 ESA 组相比。

表 3 共培养 72 h 上清中细胞因子分泌水平 (n=3, A₄₅₀ 值)
Table 3 The cytokine secretion levels in the co-culture supernatant in 72 h (n=3, A₄₅₀ value)

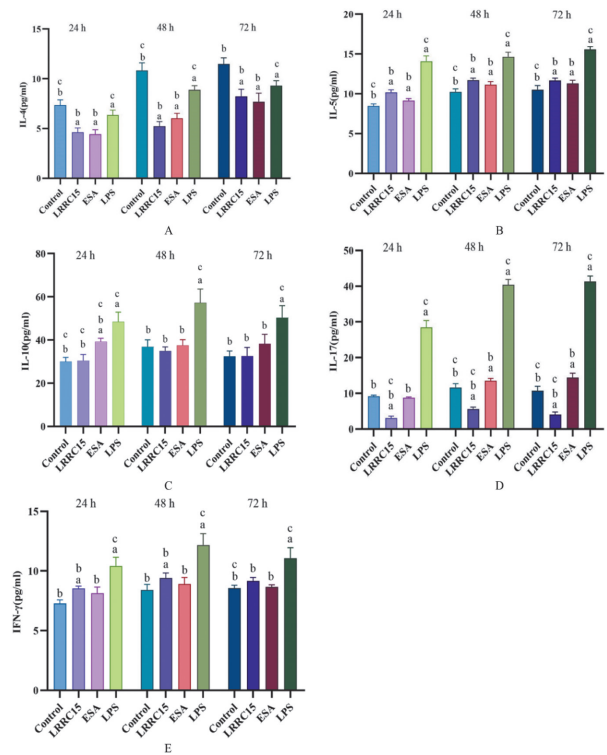
组别 Group	对照 Control	LRRC15	ESA	LPS
IL-4	0.387±0.169 ^b	0.299±0.191 ^{a,b}	0.284±0.241 ^{a,b}	0.328±0.137 ^{a,c}
IL-5	0.344±0.012 ^{b,c}	0.371±0.007 ^{a,b}	0.363±0.009 ^{a,b}	0.461±0.009 ^{a,c}
IL-10	0.137±0.045 ^b	0.138±0.008 ^b	0.148±0.09 ^b	0.172±0.011 ^{a,c}
IL-17	0.250±0.156 ^{b,c}	0.157±0.090 ^{a,b,c}	0.302±0.017 ^{a,b}	0.682±0.021 ^{a,c}
IFN-γ	0.266±0.006 ^{b,c}	0.279±0.063 ^b	0.268±0.004 ^b	0.321±0.019 ^{a,c}

注: ^a P<0.05, 与 Control 组相比; ^b P<0.05, 与 LPS 组相比; ^c P<0.05, 与 ESA 组相比。

讨论

囊虫病对人类和动物的健康均有害,但它是一种可以预防和有可能根除的疾病^[12],然而根除囊虫病感染的困难在于宿主免疫细胞与 ESA 之间的相互作用机制尚不明确,虫体建立持续感染需要长期调节宿主免疫系统,而囊尾蚴 ESA 可通过免疫调节机制,导致宿主感染加剧^[13]。LRRC15 蛋白是 ESA 中发挥作用的主要效应因子,为 LRR 结构域的超家族^[14]成员,该类蛋白具有参与细胞凋亡、粘附、信号转导、固有免疫、激素受体间相互作用及细胞周期调节等多种生物学功

能^[15-18]。



A IL-4 水平 B IL-5 水平 C IL-10 水平 D IL-17 水平 E IFN-γ 水平(^a 与 Control 组相比, P<0.05; ^b 与 LPS 组相比, P<0.05; ^c 与 ESA 组相比, P<0.05)。

图 8 ELISA 检测 DC-CD4⁺T 细胞共培养上清中细胞因子水平

A The secretion level of IL-4 B The secretion level of IL-5 C The secretion level of IL-10 D The secretion level of IL-17 E The secretion level of IFN-γ(^a Compared with control group, P<0.05; ^b Compared with LPS group, P<0.05; ^c Compared with ESA group, P<0.05)。

Fig. 8 The cytokine secretion levels in the co-culture supernatant were detected by ELISA

在囊尾蚴感染阶段, T 淋巴细胞作为介导细胞免疫的重要细胞群,特别是 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞亚群与囊虫病症状有密切关系。研究发现,脑囊虫病癫痫患者外周血中 CD3⁺、CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞均比非癫痫患者低,这可能是引起癫痫发作的原因之一^[19]。另外,在早期囊虫病患者的脑脊液中 CD3⁺、CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞均比外周血中高,说明 T 淋巴细胞亚群的分化随囊尾蚴寄生部位及感染阶段而变化^[20]。在本实验结果中, LRRC15 蛋白可引起 CD4⁺ T 细胞数量增加,而 ESA 诱导的 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 淋巴细胞

数量均无显著变化,说明在不同感染阶段,CD4⁺/CD8⁺比值的动态变化处于动态之中,如在囊虫病的轻度炎症反应阶段,CD4⁺T细胞增多,随着炎症反应加剧,CD8⁺T淋巴细胞增多。LRRC15蛋白与ESA的作用结果不一致,说明LRRC15在ESA中的表达量随时间的变化而变化。

为进一步了解LRRC15蛋白能否介导囊虫病的免疫抑制,本研究检测了Treg细胞的主要标记物CD25和Foxp3。Treg细胞能产生抑制性细胞因子,如IL-10、TGF-β,并且Treg表面高表达CD25(IL-2α)受体竞争结合细胞因子IL-2,诱导T效应细胞死亡,抑制T细胞增殖^[20]。其中,CD4⁺和CD8⁺Treg细胞均为免疫反应的重要调节剂,这些发挥抑制作用的细胞有利于寄生虫在宿主体内的寄生和持续。CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞在体内的胸腺和外周血中均可产生,在增强对自身抗原的耐受性方面起关键作用^[21]。脑囊虫病患者外周血和脑脊液中CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞水平升高,能调节宿主免疫,从而有利于囊尾蚴的生存^[22]。同时,CD8⁺T细胞也可表达CD25和Foxp3分子,该亚群在肿瘤、器官移植和自身免疫性疾病可参与维持自身耐受和免疫抑制作用^[23-25]。LRRC15蛋白可诱导Treg细胞产生,而Treg细胞能分泌具有抑制作用的细胞因子IL-10^[26]。在蠕虫感染的情况下,寄生虫诱导的IL-10分泌可以增强宿主的稳态能力,增加Treg细胞的产生^[27]。此外,IL-10通过下调APC上的MHC和共刺激分子影响IFN-γ和IL-2的产生并抑制T细胞增殖^[28]。犬弓首蛔虫ESA能刺激犬PBMC中IL-10的分泌,CD8⁺Treg细胞通过IL-10依赖的途径发挥作用,IL-10是该细胞群抑制能力所必需的细胞因子^[29]。在鼠多形螺旋线虫感染中,从肠道分离的CD8⁺Treg能够在IL-10的存在下,通过IL-10依赖的方式抑制脾细胞增殖^[30]。

IL-10在曼氏血吸虫感染的初级免疫应答中的免疫抑制作用也被证明会损害记忆T细胞的发展,从而增加再感染的可能性^[31-32]。然而,有研究表明CD4⁺CD25⁺T细胞不表达Foxp3而表达IL-10,同样显示出了免疫调节作用,且证明Treg细胞通过IL-10非依赖途径发挥抑制作用^[33]。为了证明LRRC15刺激后外周血中IL-10的产生是否引起Treg细胞的增加并依赖IL-10发生免疫抑制作用,本研究在有和无LPS存在情况下进行了试验,结果显示在LRRC15蛋白刺激下未检测到PBMC中IL-10分泌。这可能说明Treg细胞的增加是在非依赖IL-10的途径下产生的,其中Treg细胞介导的免疫抑制机制包括IL-10和TGF-β的分泌,推测Treg细胞发挥免疫抑制作用可

能与TGF-β分泌有关。

机体抵抗囊尾蚴感染最重要的方式是适应性免疫反应^[34-36],依赖于全身性淋巴细胞的选择性增殖以及Th1、Th2、Th17和Treg细胞的分化。本研究设置了不同的时间点以观察LRRC15蛋白刺激CD4⁺T细胞诱导Th免疫反应失衡的现象,发现LRRC15蛋白可诱导早期Th1型反应,后期以Th1/Th2型混合免疫反应为主(红色部分已修改)。有研究表明囊虫病早期与Th1型免疫应答相关的TNF-α、IFN-γ、IL-17和IL-23炎症因子增加有关^[20,22],而无症状患者与Th2型抗炎反应的IL-10、IL-4、IL-5和IL-13细胞因子高表达有关,有症状患者以Th1/Th2混合反应为主,与IFN-γ、IL-4、IL-10、IL-13、IL-18水平升高有关^[23]。在不同的时期Th免疫应答随着感染加强而变化,有利于虫体发挥免疫逃避,从而建立长期感染。本实验通过观察不同时间点Th分化的相关因子,推测LRRC15蛋白可能直接诱导Th分化。

本研究表明,LRRC15蛋白可诱导仔猪PBMC中CD4⁺/CD8⁺T细胞免疫失衡,诱导Treg细胞表达,通过非依赖性IL-10途径发挥免疫抑制作用,并诱导早期Th1型免疫应答和后期Th1/Th2混合型免疫应答。这为探讨该蛋白在囊虫病中的致病机制,以及研制疫苗和治疗新靶点提供了新的思路。

【参考文献】

- [1] Ngowi H, Ozbolt I, Millogo A, et al. Development of a health education intervention strategy using an implementation research method to control taeniasis and cysticercosis in Burkina faso[J]. Infect Dis Poverty, 2017, 6(1):95.
- [2] Gonzales I, Rivera JT, Garcia HH, et al. Pathogenesis of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis[J]. Parasite Immunol 2016, 38(3):136-146.
- [3] Sciuotto E, Chavarria A, Fragoso G, et al. The immune response in *Taenia solium* cysticercosis: Protection and injury[J]. Parasite Immunol, 2007, 29(12):621-636.
- [4] Garcia HH, Nash TE, Del Brutto OH. Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis[J]. Lancet Neurol, 2014, 13(12):1202-1215.
- [5] Fogang YF, Savadogo AA, Camara M, et al. Managing neurocysticercosis: Challenges and solutions[J]. Int J Gen Med, 2015, 8:333-344.
- [6] Cardona AE, Restrepo BI, Jaramillo JM, et al. Development of an animal model for neurocysticercosis: Immune response in the central nervous system is characterized by a predominance of gamma delta T cells[J]. J Immunol, 1999, 162(2):995-1002.
- [7] Tuero I, Palma S, Cabeza F, et al. A comparative study of peripheral immune responses to *Taenia solium* in individuals with parenchymal and subarachnoid neurocysticercosis[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2015, 9(10):e0004143.
- [8] Fleury A, Cardenas G, Adalid-Peralta L, et al. Immunopathology in *Taenia solium* neurocysticercosis[J]. Parasite Immunol, 2016,

- 38(3):147-157.
- [9] Junginger J, Raue K, Wolf K, et al. Zoonotic intestinal helminths interact with the canine immune system by modulating T cell responses and preventing dendritic cell maturation[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):10310.
- [10] Della Bella C, Benaglio M, De Gennaro M, et al. T-cell clones in human trichinellosis: Evidence for a mixed Th1/Th2 response[J]. Parasite Immunol, 2017, 39(3):e12412.
- [11] Fan XM, Zhang Y, Ouyang RH, et al. *Cysticercus cellulosae* regulates T-cell responses and interacts with the host immune system by excreting and secreting antigens[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11:728222.
- [12] Braae UC, Devleeschauwer B, Gabriel S, et al. Cystisim - an agent-based model for *Taenia solium* transmission and control[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2016, 10(12):e0005184.
- [13] 范贤敏, 周必英. 绦虫排泄分泌物与宿主免疫效应的相关研究进展[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2020, 38(1):128-133.
- [14] Satoh K, Hata M, Yokota H. A novel member of the leucine-rich repeat superfamily induced in rat astrocytes by beta-amyloid[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 290(2):756-762.
- [15] Dominguez CX, Muller S, Keerthivasan S, et al. Single-cell RNA sequencing reveals stromal evolution into LRRC15+ myofibroblasts as a determinant of patient response to cancer immunotherapy[J]. Cancer Discov, 2020, 10(2):232-253.
- [16] O'prey J, Wilkinson S, Ryan KM. Tumor antigen LRRC15 impedes adenoviral infection: Implications for virus-based cancer therapy[J]. J Virol, 2008, 82(12):5933-5939.
- [17] Tong ZB, Nelson LM, Dean J. Mater encodes a maternal protein in mice with a leucine-rich repeat domain homologous to porcine ribonuclease inhibitor[J]. Mamm Genome, 2000, 11(4):281-287.
- [18] Linhoff MW, Harton JA, Cressman DE, et al. Two distinct domains within ciita mediate self-association: Involvement of the gtp-binding and leucine-rich repeat domains[J]. Mol Cell Biol, 2001, 21(9):3001-3011.
- [19] 刘斌, 朱淮成, 端木建华, 等. 脑囊虫病癫痫发作与外周血淋巴细胞亚群相关性探讨[J]. 中国病原生物学杂志, 2006, 1(3):238-238.
- [20] Perez-Torres A, Ustarroz M, Constantino F, et al. *Taenia solium* cysticercosis: Lymphocytes in the inflammatory reaction in naturally infected pigs[J]. Parasitol Res, 2002, 88(2):150-152.
- [21] Corthay A. How do regulatory T cells work? [J]. Scand J Immunol, 2009, 70(4):326-336.
- [22] Adalid-Peralta L, Fleury A, Garcia-Ibarra TM, et al. Human neurocysticercosis: *In vivo* expansion of peripheral regulatory T cells and their recruitment in the central nervous system[J]. J Parasitol, 2012, 98(1):142-148.
- [23] Tang X, Kumar V. Advances in the study of CD8+ regulatory T cells[J]. Crit Rev Immunol, 2019, 39(6):409-421.
- [24] Sinha S, Itani FR, Karandikar NJ. Immune regulation of multiple sclerosis by CD8+ T cells[J]. Immunol Res, 2014, 59(1-3):254-265.
- [25] Ligoeki AJ, Niederkorn JY. Advances on non-CD4+ Foxp3+ T regulatory cells; CD8+, type 1, and double negative T regulatory cells in organ transplantation[J]. Transplantation, 2015, 99(8):1553-1559.
- [26] Sabat R, Grutz G, Warszawska K, et al. Biology of interleukin-10[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2010, 21(5):331-344.
- [27] Hsu P, Santner-Nanan B, Hu M, et al. IL-10 potentiates differentiation of human induced regulatory T cells via stat3 and foxo1[J]. J Immunol, 2015, 195(8):3665-3674.
- [28] De Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression[J]. J Exp Med, 1991, 174(4):915-924.
- [29] Endharti AT, Rifa IM, Shi Z, et al. Cutting edge: CD8+ CD122+ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8+ T cells[J]. J Immunol, 2005, 175(11):7093-7097.
- [30] Metwali A, Setiawan T, Blum AM, et al. Induction of CD8+ regulatory T cells in the intestine by heligmosomoides polygyrus infection[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006, 291(2):G253-259.
- [31] Nono JK, Pletinckx K, Lutz MB, et al. Excretory/secretory-products of echinococcus multilocularis larvae induce apoptosis and tolerogenic properties in dendritic cells *in vitro* [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2012, 6(2):e1516.
- [32] Redpath SA, Fonseca NM, Perona-Wright G. Protection and pathology during parasite infection: IL-10 strikes the balance[J]. Parasite Immunol, 2014, 36(6):233-252.
- [33] Vieira PL, Christensen JR, Minaee S, et al. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+ CD25+ regulatory T cells[J]. J Immunol, 2004, 172(10):5986-5993.
- [34] Garcia HH, Nash TE, Del Brutto OH. Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis[J]. Lancet Neurol, 2014, 13(12):1202-1215.
- [35] Fogang YF, Savadogo AA, Camara M, et al. Managing neurocysticercosis: Challenges and solutions[J]. Int J Gen Med, 2015, 8:333-344.
- [36] Cardona AE, Restrepo BI, Jaramillo JM, et al. Development of an animal model for neurocysticercosis: Immune response in the central nervous system is characterized by a predominance of gamma delta T cells[J]. J Immunol, 1999, 162(2):995-1002.