

文章编号: 1000-7423(2006)-02-0125-04

【实验报道】

# 重组小鼠干扰素- $\gamma$ 对感染弓形虫孕鼠 T 细胞亚群自然杀伤细胞的影响

骆方军

**【摘要】目的** 探讨重组小鼠  $\gamma$ -干扰素(rmu-IFN- $\gamma$ )对妊娠期感染弓形虫的小鼠脾脏 T 细胞亚群和自然杀伤细胞(NK 细胞)水平的影响。**方法** 20 只 BALB/c 孕鼠随机分为空白对照、感染对照及 rmu-IFN- $\gamma$  治疗组。妊娠第 7~9 天孕鼠急性感染弓形虫, rmu-IFN- $\gamma$  分为 2 个剂量组(按小鼠体重 1 U/g 和 10 U/g)腹腔注射给药, 3 d 后每组随机处死 5 只, 取脾细胞, 流式细胞术检测 T 细胞亚群和 NK 细胞水平。**结果** 两种剂量 rmu-IFN- $\gamma$  治疗组 CD4<sup>+</sup> T 细胞水平在妊娠第 10、12、14 天高于感染对照组, CD8<sup>+</sup> T 细胞水平在妊娠第 10、14 天低于感染对照组, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T 细胞比值在妊娠第 10、12、14 天高于感染对照组 ( $P < 0.05$ ), 孕鼠存活时间长于感染对照组。**结论** 注射适量 rmu-IFN- $\gamma$  可改善 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T 细胞比值, 促进 NK 细胞增殖, 提高宿主免疫水平。

**【关键词】** 弓形虫; 重组小鼠干扰素- $\gamma$ ; 妊娠; 小鼠; T 细胞亚群; 自然杀伤细胞

中图分类号: R531.8

文献标识码: A

## Effect of rmu-IFN- $\gamma$ on the Splenic T Cell Subsets and NK Cells of Pregnant Mice Infected with *Toxoplasma gondii*

LUO Fang-jun

(Department of Clinical Laboratory, Zhuji People's Hospital, Zhuji 311800, China)

**【Abstract】 Objective** To explore the effect of rmu-IFN- $\gamma$  on the change of T cell subsets and natural killer cells of pregnant mice infected with *T. gondii*. **Methods** Early pregnant mice infected with *T. gondii* were administered with different doses(1 U/g or 10 U/g) of rmu-IFN- $\gamma$  for three days before euthanasia. The numbers of splenic CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells and natural killer cells were detected by flow cytometry. **Results** Compared with the infected mice that were not treated, the level of splenic CD4<sup>+</sup> T cells in mice administered with two doses of rmu-IFN- $\gamma$  increased on the day 10, 12, 14 of gestation, while the level of CD8<sup>+</sup> T cells decreased on the day 10, 14 of gestation. The ratio of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T cells increased significantly on the day 10, 12, 14 of gestation. Survival days of the two administered groups were longer than those of the infected group. **Conclusion** A proper dose of rmu-IFN- $\gamma$  can reverse the decline of the ratio of T cell subsets, improve the proliferation of NK cells, and so increase the level of peripheral cellular immunity of pregnant mice.

**【Key words】** *Toxoplasma gondii*; rmu-IFN- $\gamma$ ; Mouse; Pregnancy; T cell subsets; Natural killer cell

弓形虫是一种机会性的专性细胞内寄生原虫。人群感染率世界各地报道不一。我国弓形虫病血清阳性率为 7.88%<sup>[1]</sup>。孕期感染不但易致流产、早产等不良妊娠结局, 还可通过胎儿-胎盘血液循环垂直传播诱发新生儿先天性弓形虫病。因此, 对于孕期弓形虫病的有效治疗甚为重要。重组小鼠  $\gamma$ -干扰素(rmu-IFN- $\gamma$ )可以提高机体的免疫水平, 对妊娠期弓形虫感染具有一定的保护作用<sup>[2]</sup>, 其作用机制尚不十分清楚。本文用流式细胞术检测 rmu-IFN- $\gamma$  治疗感染弓形虫孕鼠后 T 细胞亚群及自然杀伤细胞(natural killer cell, NK 细

胞)水平的变化, 研究 rmu-IFN- $\gamma$  对孕鼠外周免疫的影响。

### 材料与方法

#### 1 材料

8~10 周龄 BALB/c 小鼠, 购自上海斯莱克动物中心。弓形虫 RH 株, 由江苏省寄生虫病防治研究所提供。四色 EPICS-XL 流式细胞仪为美国 Coulter 公司产品。rmu-IFN- $\gamma$ (英国 Pepro Tech 公司) 20  $\mu$ g, 效价  $\geq 1 \times 10^7$  U/mg, 用超纯水稀释成 200 U/ml、2 000 U/ml 两种浓度。大鼠抗小鼠异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的 CD4、CD8 及 R-藻红蛋白

(R-phycoerythrin, R-PE)标记大鼠抗小鼠泛自然杀伤细胞(pan-NK)单克隆抗体,由上海晶美生物制品有限公司提供。

## 2 方法

2.1 弓形虫速殖子收集与纯化 弓形虫速殖子悬液 0.2 ml( $1 \times 10^7$ /ml)腹腔注射小鼠,3 d后脱臼处死取腹水,胰酶消化法<sup>[3]</sup>纯化速殖子,所得弓形虫悬液调至 $1 \times 10^7$ /ml,液氮冻存备用。

2.2 分组及处理 按雌:雄=2:1合笼4 d,每天清晨检查阴栓,发现阴栓之日作为妊娠第0天<sup>[4]</sup>,共得孕鼠80只,随机分为4组,每组20只。感染对照组与两个实验治疗组,于妊娠第8天腹腔接种弓形虫速殖子400个/只,空白对照组注射0.2 ml生理盐水。妊娠第7、8、9天(即感染的-1、0、1 d)两实验治疗组孕鼠分别于腹腔注射rmu-IFN- $\gamma$ ,按小鼠体重计算,低剂量组为1 U/g(浓度:200 U/ml),高剂量组为10 U/g(浓度:2 000 U/ml)。感染对照组注射同体积生理盐水。于妊娠第10、12、14和16天,每组处死5只,取脾备用。

2.3 脾细胞悬液的制备 按文献<sup>[5]</sup>方法将脾细胞浓度调节至 $2 \times 10^6$ 个/ml,备用。

2.4 T细胞亚群及NK细胞的检测 取4支试管,加入浓度为 $2 \times 10^6$ /ml的脾细胞悬液各100  $\mu$ l,分别加入20  $\mu$ l

FITC标记的大鼠抗小鼠CD4、CD8,8  $\mu$ l R-PE 标记的大鼠抗小鼠pan-NK单克隆抗体,第4管为PBS对照。混匀,室温避光孵育20 min后用PBS洗,1 288  $\times$  g 离心5 min  $\times$  2次。流式细胞术检测T细胞亚群和NK细胞。

## 3 统计分析

用SPSS11.5软件,单因素方差分析最小平方差(LSD)法比较各组的T细胞及NK细胞水平。

## 结 果

### 1 孕鼠脾T细胞亚群水平

1.1 CD4<sup>+</sup> T细胞水平 妊娠各期感染对照组脾CD4<sup>+</sup> T细胞的水平均低于空白对照组( $P < 0.05$ ); rmu-IFN- $\gamma$ 低剂量组在妊娠第14天、高剂量组在妊娠第10、12、14天,CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>及CD8<sup>+</sup> T细胞水平显著高于感染对照组( $P < 0.01$ )(表1)。

1.2 CD8<sup>+</sup> T细胞水平 感染组在妊娠第10、12和14天CD8<sup>+</sup> T细胞水平高于空白对照组;与感染对照组相比,rmu-IFN- $\gamma$ 低剂量组在妊娠第14天、高剂量组在妊娠第10、14天,CD8<sup>+</sup> T细胞水平明显降低( $P < 0.01$ );妊娠第16天,各组的CD8<sup>+</sup> T细胞水平接近(表2)。

1.3 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T细胞亚群比值 与空白对照组相比,在妊娠第10、12和14天感染对照组的CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>

表1 不同妊娠期小鼠脾 CD4<sup>+</sup> T 细胞水平( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Level of splenic CD4<sup>+</sup> T lymphocytes of pregnant mice in different stages of gestation ( $\bar{x} \pm s$ )

组别 Group	小鼠数 No. mice	妊娠 10 d 10 d pregnancy	妊娠 12 d 12 d pregnancy	妊娠 14 d 14 d pregnancy	妊娠 16 d 16 d pregnancy
空白对照组 Control	20	30.11 $\pm$ 8.69*	31.47 $\pm$ 5.55*	33.71 $\pm$ 7.42*	38.96 $\pm$ 2.16*
感染对照组 Infected Control	20	45.33 $\pm$ 1.35	45.51 $\pm$ 5.43	43.19 $\pm$ 8.11	47.28 $\pm$ 1.87
治疗组 Treatment					
rmu-IFN- $\gamma$ 1 U/g	20	33.10 $\pm$ 7.38	35.98 $\pm$ 4.62	38.87 $\pm$ 8.02#	37.77 $\pm$ 2.06
rmu-IFN- $\gamma$ 10 U/g	20	40.68 $\pm$ 9.78#	41.31 $\pm$ 9.44#	40.98 $\pm$ 10.88#	39.84 $\pm$ 4.68

注: \* 低于空白对照组,  $P < 0.05$ ; # 显著高于感染对照组,  $P < 0.01$ 。

Note: \* Significantly lower than control,  $P < 0.05$ ; # Significantly higher than infected control,  $P < 0.01$ .

表2 不同妊娠期小鼠脾 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>及 CD8<sup>+</sup> T 细胞水平( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Level of splenic CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T lymphocytes of pregnant mice in different stages of gestation( $\bar{x} \pm s$ )

组别 Group	小鼠数 No. mice	妊娠 10 d 10 d pregnancy	妊娠 12 d 12 d pregnancy	妊娠 14 d 14 d pregnancy	妊娠 16 d 16 d pregnancy
空白对照组 Control	20	31.54 $\pm$ 6.21	39.87 $\pm$ 5.56	33.56 $\pm$ 4.46	36.96 $\pm$ 6.18
感染对照组 Infected Control	20	41.38 $\pm$ 8.98*	40.88 $\pm$ 6.28*	43.33 $\pm$ 8.14*	36.56 $\pm$ 4.86
治疗组 Treatment					
rmu-IFN- $\gamma$ 1 U/g	20	35.63 $\pm$ 1.26	40.91 $\pm$ 9.68	32.36 $\pm$ 3.88#	37.66 $\pm$ 6.12
rmu-IFN- $\gamma$ 10 U/g	20	28.37 $\pm$ 7.84#	36.48 $\pm$ 4.86	31.98 $\pm$ 5.56#	36.26 $\pm$ 5.06

注: \* 高于空白对照组,  $P < 0.05$ ; # 显著低于感染对照组,  $P < 0.01$ 。

Note: \* Significantly higher than control,  $P < 0.05$ ; # Significantly lower than infected control,  $P < 0.01$ .

比值明显倒置 ( $P < 0.01$ )。rmu-IFN- $\gamma$  低剂量组在妊娠第 14 天、高剂量组在妊娠第 10、12、14 天, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值显著高于感染对照组 ( $P < 0.01$ ) (表 3)。

## 2 孕鼠脾脏 NK 细胞水平

妊娠各期感染组的 NK 细胞水平均显著低于空白

对照组 ( $P < 0.01$ )。rmu-IFN- $\gamma$  高剂量组 NK 细胞水平在妊娠第 12 天明显上升形成高峰, 妊娠第 14、16 天有所下降, 但均明显高于感染对照组 ( $P < 0.01$ ); rmu-IFN- $\gamma$  低剂量组在妊娠第 14、16 天 NK 细胞水平高于感染对照组 ( $P < 0.01$ ) (表 4)。

表 3 不同妊娠期小鼠脾 CD4<sup>+</sup>与 CD8<sup>+</sup> T 细胞比值( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Ratio of splenic CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T cells of pregnant mice in different stages of gestation( $\bar{x} \pm s$ )

组别 Group	小鼠数 No. mice	妊娠 10 d 10 d pregnancy	妊娠 12 d 12 d pregnancy	妊娠 14 d 14 d pregnancy	妊娠 16 d 16 d pregnancy	
空白对照组 Control	20	1.47±0.22	1.14±0.98	1.29±0.53	1.30±0.30	
感染对照组 Infected Control	20	0.73±0.97*	0.77±0.88*	0.78±0.91*	1.07±0.44	
治疗组 Treatment	rmu-IFN- $\gamma$ 1 U/g	20	0.93±0.68	0.88±0.49	1.20±0.88#	1.00±0.81
	rmu-IFN- $\gamma$ 10 U/g	20	1.43±0.94#	1.13±0.67#	1.28±0.89#	1.10±0.79

注: \* 显著低于空白对照组,  $P < 0.01$ ; # 显著高于感染对照组,  $P < 0.01$ 。

Note: \* Significantly lower than control,  $P < 0.01$ ; # Significantly higher than infected control,  $P < 0.01$ .

表 4 不同妊娠期小鼠脾 NK 细胞水平( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Level of splenic NK cells of pregnant mice in different stages of gestation( $\bar{x} \pm s$ )

组别 Group	小鼠数 No. mice	妊娠 10 d 10 d pregnancy	妊娠 12 d 12 d pregnancy	妊娠 14 d 14 d pregnancy	妊娠 16 d 16 d pregnancy	
空白对照组 Control	20	13.26±1.42	10.24±2.50	11.38±1.05	13.07±1.53	
感染对照组 Infected Control	20	9.64±2.60*	8.91±3.24*	9.38±5.56*	9.53±3.26*	
治疗组 Treatment	rmu-IFN- $\gamma$ 1 U/g	20	10.23±2.90	13.04±3.39#	2.25±1.55#	10.95±1.39
	rmu-IFN- $\gamma$ 10 U/g	20	10.32±2.59	18.64±5.30#	15.15±5.58#	15.69±1.02#

注: \* 显著低于空白对照组,  $P < 0.01$ ; # 显著高于感染对照组,  $P < 0.01$ 。

Note: \* Significantly lower than control,  $P < 0.01$ ; # Significantly higher than infected control,  $P < 0.01$ .

## 3 小鼠感染弓形虫后状况

小鼠感染弓形虫后出现食欲减退、嗜睡、精神萎靡、体重下降和毛逆立等, 3 d 后腹部开始膨大, 出现腹水, 并有阴道流血, 流产征兆。分别于感染后第 4 天(妊娠第 12 天)和第 6 天, 感染对照组各有 1 只死亡, 而 rmu-IFN- $\gamma$  治疗组则无死亡。

## 讨 论

治疗孕期弓形虫感染的理想药物, 应是渗透性能好、胎盘部位药物浓度高、可透过胎盘杀灭各期弓形虫, 可渗入包囊、对胎儿无毒副作用和致畸作用的药物, 目前尚无一种药物符合上述标准。

机体的正常免疫功能处于 Th1/Th2 动态平衡中, 妊娠期母体的免疫状态以 Th2 细胞分化为优势。弓形虫感染后诱导的是以分泌 Th1 细胞因子为特征的细胞免疫反应, Th1 细胞因子 IFN- $\gamma$ 、IL-2、TNF- $\alpha$  活跃,

则机体处于抵抗状态, 反之则处于易感状态。IFN- $\gamma$  是在抗弓形虫免疫中起主导作用的细胞因子, 能调节免疫细胞活性, 杀灭弓形虫。抗弓形虫保护性免疫很大程度上依赖于 IFN- $\gamma$  的表达。Suzuki 等<sup>[6]</sup>在给 T 细胞功能缺陷的裸鼠感染弓形虫前 24 h 开始隔天注射 rmu-IFN- $\gamma$ , 发现小鼠腹腔巨噬细胞的杀虫活性明显增强, 各器官组织的虫体数较对照组明显减少。从而提出 IFN- $\gamma$  用于弓形虫感染的治疗, 可能有应用前景。Shirihata 等<sup>[7]</sup>研究发现, 小鼠妊娠期对弓形虫易感性提高与孕期 IFN- $\gamma$  的产生受抑制有关。本研究表明, 在妊娠各期感染组的脾脏 CD4<sup>+</sup>T 细胞水平均低于空白对照组, 而 CD8<sup>+</sup>T 细胞水平(妊娠第 10、12、14 天)呈持续较高状态, 提示母体毒性 T 细胞的功能占主导。在妊娠各期感染对照组的 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T 细胞比值明显倒置, 表明感染弓形虫孕鼠的 T 细胞亚群比例失衡并处于免疫抑制状态, 可能是造成弓形虫垂直传播的重

要原因。经rmu-IFN- $\gamma$ 治疗后,可使感染弓形虫的孕鼠CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T细胞比值倒置逆转。其原因可能是其促进Th细胞增殖和抑制CD8<sup>+</sup> T细胞表达。

Luft等<sup>[8]</sup>研究表明,小鼠妊娠使得被弓形虫激活的NK细胞活性受到抑制。NK细胞活性下降并非由于NK细胞枯竭或稀释,而是由于单个细胞功能受损所致,且与IFN- $\gamma$ 的产生受到抑制有关。Nigro等<sup>[9]</sup>研究证实,低水平的NK细胞与弓形虫的垂直传播相关。本研究结果表明,感染小鼠不同妊娠期的NK细胞水平均低于空白对照组,表明妊娠期感染弓形虫可使NK细胞的增殖受到抑制,与Nigro等<sup>[9]</sup>的结论相一致。而经rmu-IFN- $\gamma$ 治疗后,弓形虫感染孕鼠脾NK细胞的水平升高,表明rmu-IFN- $\gamma$ 能促进NK细胞的增殖。

本研究结果证明,rmu-IFN- $\gamma$ 能有效诱导机体的免疫应答,在一定程度上激发机体系统免疫应答,有效抵抗弓形虫感染,提高小鼠的存活率。作为Th1细胞因子,IFN- $\gamma$ 在正常妊娠中过高表达,会抑制滋养细胞增殖,造成胚胎的自然流产,但是少量的IFN- $\gamma$ 对于妊娠具有营养作用<sup>[10]</sup>。陈炳兰等<sup>[11]</sup>发现低剂量的rmu-IFN- $\gamma$ (1 U/g)在抑制弓形虫增殖、保护孕鼠、降低垂直传播的同时,并没有增高孕鼠的流产率,说明在小鼠孕晚期使用是安全的。晋柏等<sup>[12]</sup>也发现妊娠早期小鼠感染弓形虫后,使用rmu-IFN- $\gamma$  (1~10 U/g)均能抑制弓形虫增殖、保护孕鼠、降低垂直传播,而流产率并没有增高,从而认为是有效而安全的。在本实验中,由于样本量不够大,观察时间有限及实验分组尚少,因而对其应用后的长期效果未能作进一步的观察。因此,rmu-IFN- $\gamma$ 在小鼠孕期应用的安全有效剂量和应用时间有待进一步的研究。

### 参 考 文 献

[1] Coordinating Office of the National Survey on the Important Human Parasitic Diseases. National survey on current status of the important parasitic diseases in human population[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2005, 23: 332-340. (in Chinese)  
(全国人体重要寄生虫病现状调查办公室. 全国人体重要寄生虫病现状调查报告[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23:

332-340.)  
 [2] Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Toxoplasma gondii*. Principles and practice of infectious diseases[M]. Fifth Edition. Beijing: Science Press, 2001. 2858-2887.  
 [3] Yu NX, Chen JW, Jin BX, et al. Purification of *Toxoplasma gondii* tachyzoite for indirect hemagglutination test[J]. Acat Microbiol Sinica, 1983, 10: 161. (in Chinese)  
(俞乃勋, 陈金伟, 金柏新, 等. 制备间接血凝试验抗原用弓形虫速殖子的净化[J]. 微生物学报, 1983, 10: 161.)  
 [4] Yin GR, Zheng JP, Hou YY, et al. Influence of pregnant C57BL/6J mouse infected with *Toxoplasma gondii* in different stage on embryonic development and child mouse studying ability[J]. China Pub Hlth, 2001, 17: 811. (in Chinese)  
(殷国荣, 郑金平, 侯玉英, 等. 不同孕期弓形虫感染对 C57BL/6J 小鼠胚胎发育和子鼠学习能力的影响[J]. 中国公共卫生, 2001, 17: 811.)  
 [5] Yin GR, Shan LZ, Yang YB, et al. Effects of rhuIL-2 on the splenic T cell subsets and NK cells of pregnant mice infected with *Toxoplasma gondii*[J]. Chin J Zoonoses, 2003, 19(5): 58-61. (in Chinese)  
(殷国荣, 单联喆, 杨亚波, 等. 重组人 IL-2 对感染弓形虫孕鼠 T 细胞亚群及 NK 细胞的影响[J]. 中国人兽共患病杂志, 2003, 19(5): 58-61.)  
 [6] Suzuki Y, Joh K, Kobayashi A. Tumor necrosis factor-independent protective of recombinant IFN- $\gamma$  against acute toxoplasmosis in T cell deficient mice[J]. J Immunol, 1991, 147: 2728-2733.  
 [7] Shirihata T, Muroya N, Ohta C. Correlation between increased susceptibility to primary toxoplasmosis gondii infection and depressed production of gamma interferon in pregnant mice[J]. Microbiol Immunol, 1992, 36: 81-91.  
 [8] Luft BJ, Remington JS. Effect of pregnancy on augmentation of natural killer cell activity by *Corynebacterium parvum* and *Toxoplasma gondii*[J]. J Immunol, 1984, 132: 2375.  
 [9] Nigro G. Low levels of nature killer cells in pregnant women transmitting *Toxoplasma gondii*[J]. Pregn Diagn, 1999, 19(5): 401.  
 [10] Luo LL. Reproductive Immunology[M]. Wuhan: Hubei Science & Technology Publishing House, 1988. 157-160. (in Chinese)  
(罗罗兰. 生殖免疫学[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998. 157-160.)  
 [11] Chen BL, Wang HQ, Wang L, et al. Studies on the effect of IFN- $\gamma$  on *Toxoplasma gondii* infected pregnancy mice in ultra structure of uterus and placenta[J]. Jianshu Pharm Clin Res, 2003, 11(3): 3-6. (in Chinese)  
(陈炳兰, 王海琦, 王玲, 等. IFN- $\gamma$  抗孕鼠弓形虫感染子宫及胎盘超微结构研究[J]. 江苏药学与临床研究, 2003, 11(3): 3-6.)  
 [12] Jin B, Chen WW, Chen BL, et al. Effects of rmu-IFN- $\gamma$  on the embryos of mouse infected by *Toxoplasma gondii* in early pregnancy[J]. Jiangsu Med J, 2005, 31: 206-208. (in Chinese)  
(晋柏, 陈文玮, 陈炳兰, 等. 重组小鼠 $\gamma$ -干扰素对弓形虫感染妊娠早期孕鼠及鼠胚的影响[J]. 江苏药学, 2005, 31: 206-208.)

(收稿日期:2005-09-29 编辑:富秀兰)