

文章编号: 1000-7423(2014)-03-0172-04

【论著】

Toll 样受体 7 敲除对日本血吸虫感染早期免疫应答的影响

姜岩岩¹, 徐徐信¹, 袁忠英¹, 沈玉娟¹, 吴纓¹, 刘海鹏², 胡媛¹, 曹建平^{1*}

【摘要】 目的 探讨 Toll 样受体 7 (TLR7) 敲除对日本血吸虫感染小鼠免疫应答的影响。方法 野生型 C57BL/6 小鼠 (WT, $n=9$) 和 TLR7^{-/-} 敲除小鼠 (TLR7^{-/-}, $n=9$) 以腹部贴片法感染日本血吸虫尾蚴 (20 条)。感染后 42 d 处死小鼠, 以胸主动脉灌注法收集虫体 ($n=6$), 并取肝脏进行虫卵计数; 分别取 WT、TLR7^{-/-} 未感染小鼠, WT、TLR7^{-/-} 感染小鼠的脾脏 ($n=3$), 制备脾细胞悬液; 加入日本血吸虫虫卵 (250 个/ml) 刺激 72 h, ELISA 法检测 γ 干扰素 (IFN- γ)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 4 (IL-4) 和 IL-10 水平。结果 感染后 42 d, WT 组平均虫荷数为 (10.5 \pm 3.3) 条, 每克肝卵数为 (38 251.9 \pm 4 891.5) 个; TLR7^{-/-} 组平均虫荷数为 (9.8 \pm 5.2) 条, 每克肝卵数为 (38 160.9 \pm 3 341.0) 个, 两组间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。在未感染的情况下, TLR7^{-/-} 小鼠脾细胞上清液中的 IL-10 [(1702.6 \pm 572.3) pg/ml] 和 IL-4 [(59.5 \pm 10.1) pg/ml] 水平远高于 WT 组小鼠 [(595.2 \pm 386.3) 和 (8.3 \pm 0.9) pg/ml] ($P<0.05$, $P<0.01$)。感染后 42 d, TLR7^{-/-} 组小鼠脾细胞上清液中的 TNF- α [(43.7 \pm 9.8) pg/ml] 和 IFN- γ [(215.2 \pm 35.4) pg/ml] 水平低于 WT 组 [(63.4 \pm 22.9) 和 (383.5 \pm 253.3) pg/ml], 而 IL-4 [(63.9 \pm 33.9) pg/ml] 水平高于 WT 组小鼠 [(23.3 \pm 11.5) pg/ml], 但 TLR7^{-/-} 组与 WT 组间的差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结论 TLR7^{-/-} 小鼠在未感染的状态下偏向 Th2 反应, 不影响感染日本血吸虫 6 周后的免疫应答。

【关键词】 TLR7 敲除; 日本血吸虫; 免疫应答

中图分类号: R532.21

文献标识码: A

Effect of Toll-like Receptor (TLR) 7 Deficiencies on the *In Vivo* Immune Response against *Schistosoma japonicum*

JIANG Yan-yan¹, XU Yu-xin¹, YUAN Zhong-ying¹, SHEN Yu-juan¹, WU Ying¹, LIU Hai-peng², HU Yuan¹, CAO Jian-ping^{1*}

(1 National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention; Key Laboratory of Parasite and Vector Biology, Ministry of Health; WHO Collaborating Center for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China; 2 Clinical Translational Research Center, Shanghai Pulmonary Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200433, China)

【Abstract】 **Objective** To explore the toll-like receptor 7 knocked out (TLR7^{-/-}) mice immune response against *Schistosoma japonicum*. **Methods** C57BL/6 mice (WT) and TLR7^{-/-} mice (TLR7^{-/-}) were infected with 20 *S. japonicum* cercariae via shaved abdomen. There were nine mice in each group. At 6 weeks post-infection, mice were sacrificed. Adult worms were harvested by perfusion of the portal venous system, and the number of adult worms was determined. At the time of perfusion, livers were collected, weighed, and digested overnight with 5% potassium hydroxide, and eggs were counted. In addition, spleens were aseptically harvested when WT and TLR7^{-/-} mice were sacrificed at day zero and 6 weeks after *S. japonicum* infection. After 72 hours of the co-culture with or without *S. japonicum* eggs, the culture supernatants were collected for cytokine assays by ELISA assay. **Results** At 6 weeks after infection, there was no significant difference in number of worms [(10.5 \pm 3.3) vs (9.8 \pm 5.2)] and eggs per gram of liver tissue [(38 251.9 \pm 4 891.5) vs (38 160.9 \pm 3 341.0)] between WT and TLR7^{-/-} mice. As for Th1/Th2 cytokine secretion from spleen cells, the levels of TNF- α [(43.7 \pm 9.8) pg/ml] and INF- γ [(215.2 \pm 35.4) pg/ml] from TLR7^{-/-} infected mice were lower than those of WT infected mice [(63.4 \pm 22.9) pg/ml, (383.5 \pm 253.3) pg/ml]. For Th2 cytokines detection, the production of IL-10 [(1 702.6 \pm 572.3) pg/ml] and IL-4 [(59.5 \pm 10.1) pg/ml] from TLR7^{-/-} mice were higher than those of WT mice [(595.2 \pm 386.3) pg/ml,

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 81201314, 81371841)

作者单位: 1 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 上海 200025; 2 上海市肺科医院临床转化中心, 上海 200433

* 通讯作者, E-mail: caojp@yahoo.com

(8.3 ± 0.9) pg/ml] ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while IL-4 level [(63.9 ± 33.9) pg/ml] from TLR7^{-/-} infected mice was higher than those of WT infected mice [(23.3 ± 11.5) pg/ml]. **Conclusion** TLR7^{-/-} mice has a dominant Th2 response under the normal state. The absence of TLR7 does not influence the immune response against *S. japonicum* infection at 6 weeks post-infection.

[Key words] TLR7^{-/-}; *Schistosoma japonicum*; Immune response

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81201314, 81371841)

* Corresponding author, E-mail: caojp@yahoo.com

血吸虫感染宿主时, 宿主可通过Toll样受体 (toll-like receptor, TLR) 感知, 调节TLR表达与功能, 以适度启动固有免疫并协调适应性免疫。该家族现有的11个成员中, 血吸虫虫源性产物可激活宿主的TLR2、TLR3、TLR4和TLR9等^[1,2]。TLR2和/或TLR3可识别曼氏血吸虫的脂类片段, 刺激树突状细胞产生促炎症因子^[3]。曼氏血吸虫虫卵上的双链RNA可激活TLR3^[4]。曼氏血吸虫可溶性抗原作用TLR3、TLR4和TLR9后可抑制其配体诱导IL-12p40的产生^[1]。上述研究表明寄生虫虫源性产物诱导免疫应答反应的TLR是不同的。TLR7属于TLR9的亚家族^[5], 主要识别病毒和细菌胞核成分, 如CpG-DNA、病毒^[6]或寄生虫^[7]的单链RNA, 通过髓样分化因子88 (MyD88) 依赖的信号通路活化免疫细胞, 可影响一些原虫感染的免疫应答^[8-10], 但在血吸虫感染后的免疫应答中的作用了解尚少。因此, 本研究通过TLR-7基因敲除小鼠研究血吸虫感染的免疫应答, 有助于进一步揭示血吸虫感染免疫的分子机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物和日本血吸虫尾蚴 TLR7^{-/-}敲除小鼠 (TLR7^{-/-}) 购自美国Jackson实验室 (B6.129S1-Tlr7^{tm1Flv}/J), 采用lacZ-loxP系统直接敲除TLR7的外显子3, 为纯合子小鼠, 无TLR7转录, 在上海肺科医院临床转化中心SPF级动物房饲养。雌性6~8周C57BL/6小鼠, 作为野生型 (wide type, WT) 同背景的对照小鼠, 18~20 g, 购自上海斯莱克实验动物有限公司, 在中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所 (以下简称本所) SPF级动物房饲养。日本血吸虫尾蚴由本所媒介室提供。日本血吸虫虫卵为本课题组徐徐信副主管技师提供。动物实验符合中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所的伦理委员会要求, 并获得批准 (IPD2012-1)。

1.1.2 主要试剂和仪器 小牛血清和RPMI 1640培养基购自美国GIBCO公司, 细胞因子检测试剂盒购自美国eBioscience公司。酶标仪 (iMark™ Microplate Reader) 为美国Bio-Rad公司产品, CO₂恒温细胞培养

箱 (HEPA Class100) 为德国Thermo公司产品。

1.2 小鼠早期感染模型 WT小鼠和TLR7^{-/-}小鼠各6只, 经腹部感染20条尾蚴。感染后42 d, 剖杀小鼠, 分别进行门静脉灌注法收集虫体, 计算虫荷率; 取小鼠肝脏, 称重, 加5% KOH 20 ml, 37 °C消化4 h, 取0.1 ml计数虫卵, 计算每克肝卵数。

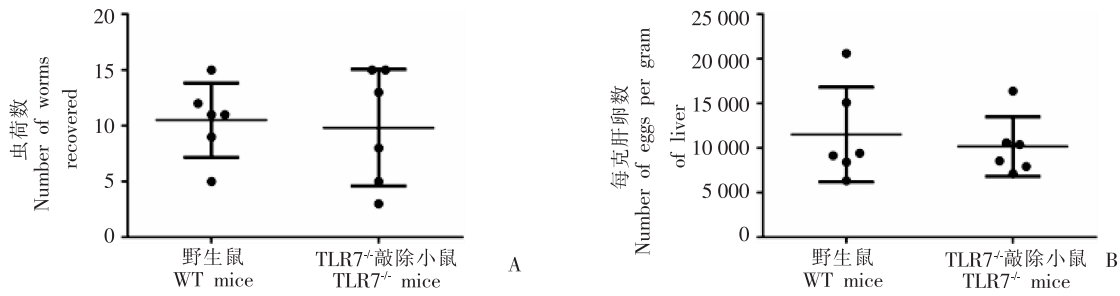
1.3 ELISA检测细胞因子 感染后42 d, 分别无菌取WT、TLR7^{-/-}未感染小鼠, WT、TLR7^{-/-}感染小鼠的脾脏 ($n=3$), 在RPMI 1640培养基中均匀研磨, 200目筛网过滤, 获得每鼠的脾单细胞悬液。200×g离心10 min, 弃上清, 沉淀中加入0.83% NH₄Cl的红细胞裂解液, 破除红细胞, 洗涤离心重悬后计数。在含10%小牛血清的完全培养基中重悬, 细胞浓度为 3×10^6 /ml, 接种于48孔板, 每孔加入虫卵 (250个/ml) 进行刺激^[11], 同时设对照组, 37 °C、5% CO₂孵育箱中培养72 h, 离心取上清, -80 °C保存。按试剂盒说明检测上清液中的γ干扰素 (IFN-γ)、肿瘤坏死因子α (TNF-α)、白细胞介素4 (IL-4) 和IL-10水平。

1.4 统计学分析 采用Prism (GraphPad) 软件分析数据, 统计方法为One-Way ANOVA和t检验。

2 结 果

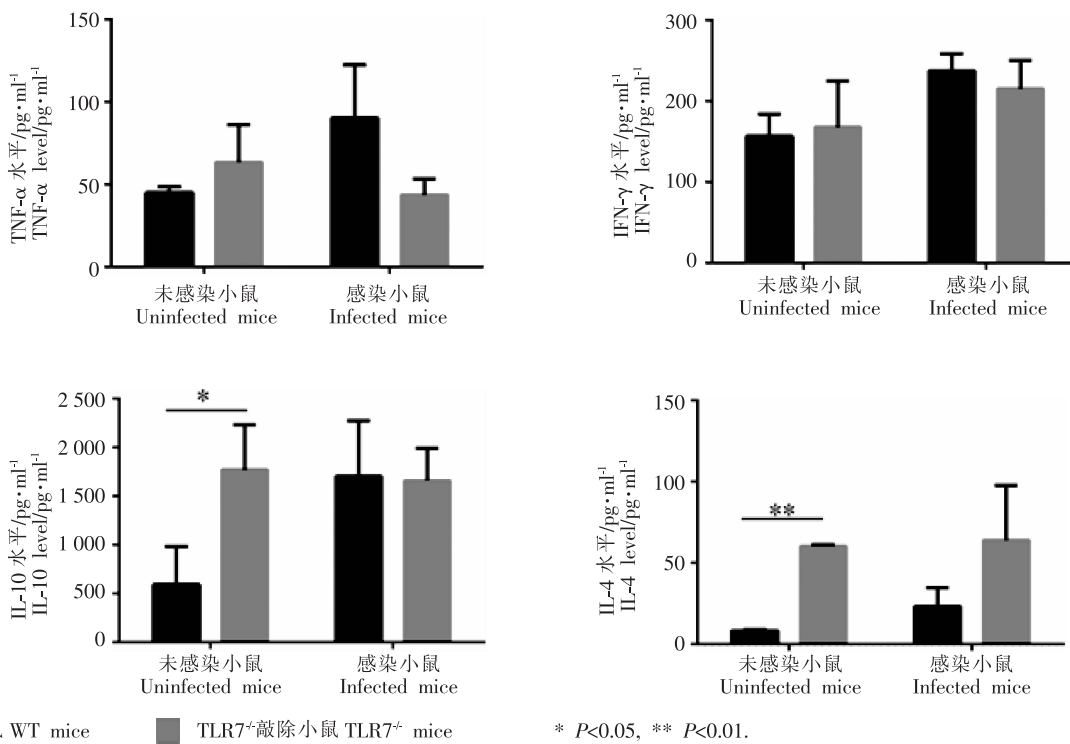
2.1 TLR7^{-/-}小鼠感染日本血吸虫后的虫荷数和产卵数 感染后42 d剖杀小鼠, WT组平均虫荷数为 (10.5 ± 3.3) 条, 每克肝卵数为 ($38\ 251.9 \pm 4\ 891.5$) 个。TLR7^{-/-}组平均虫荷数为 (9.8 ± 5.2) 条, 每克肝卵数为 ($38\ 160.9 \pm 3\ 341.0$) 个, 两组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图1)。

2.2 TLR7^{-/-}小鼠感染日本血吸虫后早期Th1/Th2 在未感染情况下, TLR7^{-/-}小鼠脾细胞上清液中IL-10 [($1\ 702.6 \pm 572.3$) pg/ml] 和IL-4 [(59.5 ± 10.1) pg/ml] 水平远高于WT小鼠 [(595.2 ± 386.3) pg/ml, (8.3 ± 0.9) pg/ml] ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。感染后42 d, TLR7^{-/-}组小鼠脾细胞上清液中TNF-α [(43.7 ± 9.8) pg/ml] 和IFN-γ [(215.2 ± 35.4) pg/ml] 水平低于WT小鼠 [(63.4 ± 22.9) pg/ml, (383.5 ± 253.3) pg/ml], 而IL-4 [(63.9 ± 33.9) pg/ml] 高于WT感染小鼠 [(23.3 ± 11.5) pg/ml],



A: 虫荷数 Number of worms recovered; B: 每克肝卵数 Number of eggs per gram of liver.

图1 WT和TLR7^{-/-}小鼠感染日本血吸虫后42 d的虫荷数和每克肝卵数
Fig.1 Number of worms recovered and that of eggs per gram of liver in TLR7^{-/-} mice and wild-type mice infected by *Schistosoma japonicum* at 42 days post-infection



■ 野生鼠 WT mice ■ TLR7^{-/-}敲除小鼠 TLR7^{-/-} mice * P<0.05, ** P<0.01.

图2 TLR7^{-/-}小鼠在未感染和感染日本血吸虫6周后脾细胞上清液中细胞因子水平
Fig.2 Cytokine levels in splenocytes of uninfected TLR7^{-/-} mice and TLR7^{-/-} mice infected with *Schistosoma japonicum* for 6 weeks

但差异无统计学意义 (P>0.05)。

3 讨论

在寄生虫感染过程中,一方面Toll样受体作为重要的模式识别受体,可识别多种病原体,并通过信号转导途径激活靶基因,引起相应的细胞因子释放,在机体防御方面发挥作用;另一方面宿主Toll样受体表达改变可导致无法识别某些虫体成分,或通过改变Toll样受体通路上的相关分子,调节细胞因子的合成,以利于发生免疫逃逸,引起寄生虫的慢性感染。

在血吸虫感染中,不同虫源成分可引起不同Toll样受体信号通路的变化,从而分泌不同的细胞因子引起

Th1/Th2共存的混合型免疫应答^[1,2,4,12-16]。研究表明,TLR7介导TNF-α的产生可激发锯多板虱 (*Polyplax serata*) 的固有免疫^[17]。采用TLR7配体imiquimod^[18]可活化抗原提呈细胞IL-1受体相关激酶、核因子κB和丝裂原活化蛋白激酶等^[19],诱导促炎症因子的产生,显著增强抗体和T细胞反应,清除胞内病原体,增强胞外抗原的抗体反应^[10]。在慢性淋巴丝虫病患者中可显著增加促炎症因子的产生^[20]。感染夏氏疟原虫后1 d,与WT小鼠相比,TLR7^{-/-}小鼠TNF-α和IFN-γ水平较低^[7],该缺陷小鼠更容易感染克氏锥虫 (*Trypanosoma cruzi*)^[8]。以上研究均表明,TLR7在促进炎症反应,在激活固有免疫、启动T细胞反应和宿主抗病等方面发挥重要作用。

本研究观察日本血吸虫感染后6周TLR7^{-/-}小鼠的免疫应答,发现TLR7^{-/-}受体缺陷不影响日本血吸虫在体内生存的虫荷数和产卵数。由于调节性T细胞的增加有助于日本血吸虫感染^[21],因此,推测缺乏TLR7信号可能导致调节性T细胞增加,而不影响体内血吸虫发育。细胞因子检测发现未感染日本血吸虫的TLR7^{-/-}小鼠产生偏向Th2反应的细胞因子(IL-10和IL-4),而在感染情况下采用虫卵进行Th1反应刺激后^[22],与WT小鼠相比,代表Th1反应的细胞因子仍较少(TNF- α 和IFN- γ),而IL-4分泌较多。尽管本研究结果显示差异无统计学意义,但在趋势上与TLR7缺陷小鼠感染疟原虫后的早期结果一致^[7],Th1型细胞因子减少,同时IL-4增高^[23]。这可能由于TLR9和TLR7同属一个家族,在感染的不同时期发挥不同的优势作用,导致在虫卵刺激后与感染后再次经过虫卵刺激引起不同优势的Toll样受体发挥作用。

使用Toll样受体成员的敲除小鼠进行实验,有助于深入认识其在病原体入侵机体后对免疫功能的影响,将为Toll样受体信号如何激发适应性免疫应答提供新视角。目前应用一些核酸疫苗进行日本血吸虫免疫保护实验,证实Toll样受体在该过程中发挥了免疫应答作用^[24-26]。尽管本研究尚未从机制上说明TLR7不影响日本血吸虫感染的原因,但采用日本血吸虫尾蚴感染TLR7敲除小鼠,发现在感染后6周,TLR7缺失并不影响虫荷数和产卵数,而是使感染小鼠更偏向于Th2免疫反应,该结果有助于设计感染性炎症疾病的治疗策略,如靶向阻滞特异的信号传导蛋白或调控其激活,炎症反应的调控、控制炎症性损伤等。

参 考 文 献

- [1] Kane CM, Cervi L, Sun J, *et al.* Helminth antigens modulate TLR-initiated dendritic cell activation [J]. *J Immunol*, 2004, 173(12): 7454-7461.
- [2] Zhang M, Gao Y, Du X, *et al.* Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 deficiencies exert differential *in vivo* effects against *Schistosoma japonicum* [J]. *Parasite Immunol*, 2011, 33(4): 199-209.
- [3] Vanhoutte F, Breuill L, Fontaine J, *et al.* Toll-like receptor(TLR)2 and TLR3 sensing is required for dendritic cell activation, but dispensable to control *Schistosoma mansoni* infection and pathology [J]. *Microbes Infect*, 2007, 9(14-15): 1606-1613.
- [4] Aksoy E, Zouain CS, Vanhoutte F, *et al.* Double-stranded RNAs from the helminth parasite *Schistosoma* activate TLR3 in dendritic cells [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(1): 277-283.
- [5] Lima MT, Lenzi HL, Gattass CR. Negative tissue parasitism in mice injected with a noninfective clone of *Trypanosoma cruzi* [J]. *Parasitol Res*, 1995, 81(1): 6-12.
- [6] Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, *et al.* Recognition of single-stranded RNA viruses by toll-like receptor 7 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(15): 5598-5603.
- [7] Baccarella A, Fontana MF, Chen EC, *et al.* Toll-like receptor 7 mediates early innate immune responses to malaria [J]. *Infect Immun*, 2013, 81(12): 4431-4442.
- [8] Caetano BC, Carmo BB, Melo MB, *et al.* Requirement of UNC93B1 reveals a critical role for TLR7 in host resistance to primary infection with *Trypanosoma cruzi* [J]. *J Immunol*, 2011, 187(4): 1903-1911.
- [9] Melo MB, Kasperkovitz P, Cerny A, *et al.* UNC93B1 mediates host resistance to infection with *Toxoplasma gondii* [J]. *PLoS Pathog*, 2010, 6(8): e1001071.
- [10] Othoro C, Johnston D, Lee R, *et al.* Enhanced immunogenicity of *Plasmodium falciparum* peptide vaccines using a topical adjuvant containing a potent synthetic Toll-like receptor 7 agonist, imiquimod [J]. *Infect Immun*, 2009, 77(2): 739-748.
- [11] 王艳娟, 徐徐信, 胡媛, 等. 日本血吸虫卵破坏小鼠脾脏结构的作用 [J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2011, 23(3): 285-287.
- [12] Wang X, Dong L, Ni H, *et al.* Combined TLR7/8 and TLR9 ligands potentiate the activity of a *Schistosoma japonicum* DNA vaccine [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2013, 7(4): e2164.
- [13] Donnelly S, O'Neill SM, Stack CM, *et al.* Helminth cysteine proteases inhibit TRIF-dependent activation of macrophages via degradation of TLR3 [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(5): 3383-3392.
- [14] Venugopal PG, Nutman TB, Semmani RT. Activation and regulation of toll-like receptors (TLRs) by helminth parasites [J]. *Immunol Res*, 2009, 43(1-3): 252-263.
- [15] van Riet E, Everts B, Retra K, *et al.* Combined TLR2 and TLR4 ligation in the context of bacterial or helminth extracts in human monocyte derived dendritic cells: molecular correlates for Th1/Th2 polarization [J]. *BMC Immunol*, 2009, 10: 9.
- [16] Brannstrom K, Sellin ME, Holmfeldt P, *et al.* The *Schistosoma mansoni* protein Sm16/SmSLP/SmSPO-1 assembles into a nine-subunit oligomer with potential to inhibit toll-like receptor signaling [J]. *Infect Immun*, 2009, 77(3): 1144-1154.
- [17] Jackson JA, Friberg IM, Bolch L, *et al.* Immunomodulatory parasites and toll-like receptor-mediated tumour necrosis factor alpha responsiveness in wild mammals [J]. *BMC Biol*, 2009, 7: 16.
- [18] Bekeredian-Ding IB, Wagner M, Hornung V, *et al.* Plasmacytoid dendritic cells control TLR7 sensitivity of naive B cells via type I IFN [J]. *J Immunol*, 2005, 174(7): 4043-4050.
- [19] Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, *et al.* Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway [J]. *Nat Immunol*, 2002, 3(2): 196-200.
- [20] Babu S, Anuradha R, Kumar NP, *et al.* Filarial lymphatic pathology reflects augmented toll-like receptor-mediated, mitogen-activated protein kinase-mediated proinflammatory cytokine production [J]. *Infect Immun*, 2011, 79(11): 4600-4608.
- [21] Wen X, He L, Chi Y, *et al.* Dynamics of Th17 cells and their role in *Schistosoma japonicum* infection in C57BL/6 mice [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2011, 5(11): e1399.
- [22] Trottein F, Pavelka N, Vizzardelli C, *et al.* A type I IFN-dependent pathway induced by *Schistosoma mansoni* eggs in mouse myeloid dendritic cells generates an inflammatory signature [J]. *J Immunol*, 2004, 172(5): 3011-3017.
- [23] Sriram U, Xu J, Chain RW, *et al.* IL-4 suppresses the responses to TLR7 and TLR9 stimulation and increases the permissiveness to retroviral infection of murine conventional dendritic cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e87668.
- [24] 郝知友, 黄复深, 袁鑫, 等. 日本血吸虫SjIR3 DNA疫苗诱导的抗攻击感染保护力 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2006, 24(6): 445-448.
- [25] 赵松, 朱荫昌, Harn DA, 等. 免疫刺激序列增强日本血吸虫DNA疫苗的免疫保护作用 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2005, 23(1): 1-5.
- [26] 陈家旭, 刘述先, 曹建平, 等. 日本血吸虫副肌球蛋白全基因核酸疫苗对小鼠的抗病免疫效应 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2006, 24(2): 81-85.

(收稿日期: 2014-03-04 编辑: 杨频)