

肝螺旋杆菌感染对 BALB/c 小鼠免疫应答干扰的初步研究

冯洁^{1,2}, 张泉¹, 谢建云², 魏晓锋², 高诚²

(1. 扬州大学兽医学院, 江苏扬州 225009; 2. 上海实验动物研究中心, 上海 201203)

【摘要】 目的 探讨肝螺旋杆菌(*Helicobacter hepaticus*, *H. hepaticus*)感染对小鼠骨髓源树突状细胞(DC)表面分子形态和机体免疫应答的干扰。**方法** 以 *H. hepaticus* (ATCC 51450)灌饲 SPF 级 BALB/c 雄性小鼠,于末次接种后5个月体外分离培养骨髓 DC,经粒细胞-单核细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白细胞介素-4(IL-4),刺激 DC 增殖、分化,流式细胞仪分析 DC 细胞表面分子 CD11c、CD40、CD80、MHCII 的表达率。此基础上,用新城疫病毒(NDV) ZJ1 株人工接种实验组和对照组小鼠,每周测定 NDV 血清抗体效价,比较抗体产生的差异。**结果** 实验组 MHC II 和 CD40 分子的表达率高于对照组。NDV 抗体水平第1周实验组略低于对照组;第2~5周内实验组小鼠的抗体水平平均高于对照组,差异有显著性;第6周两组小鼠血清抗体均呈下降趋势,差异无显著性。**结论** *H. hepaticus* 感染对小鼠骨髓 DC 成熟有促进作用,能提高 MHC II 和 CD40 表达水平,可促进 BALB/c 小鼠产生抗 NDV 的抗体水平。

【关键词】 肝螺旋杆菌;树突状细胞;新城疫病毒;抗体

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)03-0304-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.017

Preliminary observation on the interference effect of *Helicobacter hepaticus* infection on the immune response in BALB/c mice

FENG Jie^{1,2}, ZHANG Quan¹, XIE Jian-yun², WEI Xiao-feng², GAO Cheng²

(1. School of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2. Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai 201203)

【Abstract】 Objective To determine the interference effect of *H. hepaticus* infection on the functional characteristics of dendritic cell (DC) surface molecules and immune response in mice. **Methods** Male BALB/c mice were inoculated with *H. hepaticus* (ATCC 51450). Murine bone marrow-derived dendritic cells (DC) were isolated and co-cultured which were stimulated by GM-CSF and IL-4 at the fifth month after the last inoculation. Then the DCs were subjected to FACS analysis for surface markers (CD11c, CD40, CD80 and MHCII) detection. On this basis, virus suspension of Newcastle disease virus(NDV) ZJ1 strain was inoculated into the mice. Serum was collected for detection of the NDV antibody titer in serum weekly to explore the difference of antibody titer between the two groups. **Results** The expression rates of CD40 and MHCII on the mouse DCs in experimental group were higher than that in the control group. The NDV antibody titer of experimental group was slightly lower than that in the control group in the first week. During the 2nd to 5th weeks, the titer was higher than that in the control group, with a very significant difference. In the 6th week, the titer of both the two groups tended to fall. **Conclusions** *H. hepaticus* infection can promote bone marrow DC maturation in mice, stimulate the expression rates of MHC II and CD40, and enhance the NDV antibody levels.

【Key words】 *Helicobacter hepaticus*; Dendritic cells; Newcastle disease virus, NDV; Antibody; Immune response; Mice

Corresponding author: GAO Cheng, E-mail: gaochengdgb@126.com

【基金项目】上海市科技创新行动计划(14140900600,11140901000);上海市科委研发平台专项(15DZ2292400)。

【作者简介】冯洁(1981-),女,副研究员,E-mail: moyifj@163.com

【通讯作者】高诚,研究员,E-mail: gaochengdgb@126.com

肝螺旋杆菌(*Helicobacter hepaticus*, *H. hepaticus*)属于革兰阴性菌,呈螺杆菌或弯曲状,生长要求苛刻,最早发现于发生肝细胞癌和慢性活动性肝炎的 A/J Cr 小鼠肝脏(Fox 等,1992)^[1]。*H. hepaticus* 可长期定植于啮齿类动物的肝脏和盲肠,引起慢性肝炎、肝癌、结肠炎和盲肠炎,病变的严重程度与动物的品系、年龄、性别等因素有关^[2-4],使用携带 *H. hepaticus* 的实验动物进行科学研究时,可能会干扰实验结果。

树突状细胞(dendritic cell, DC)是重要的抗原提呈细胞(APC),成熟 DC 具有强大的抗原呈递功能并刺激 T 细胞活化,介导机体免疫应答^[5]。本研究通过对 BALB/c 小鼠人工感染 *H. hepaticus*,分离骨髓源 DC 细胞,经诱导后以流式细胞术检测其表面分子的表达水平。在此基础上,用新城疫病毒(NDV)ZJ1 株接种小鼠,测定血清中 NDV 抗体效价水平,从而探讨 *H. hepaticus* 感染对于小鼠骨髓源 DC 表面分子形态的影响以及对小鼠免疫功能的干扰。

1 材料与方法

1.1 菌株

H. hepaticus 标准菌株(ATCC51450),购自美国国家标准菌种保藏中心。标准菌株接种于哥伦比亚选择性血琼脂培养基,立即置于放有微需氧产气袋的密闭厌氧罐中,37℃ 培养至第 7 天,收集细菌。

1.2 病毒

灭活禽新城疫病毒(NDV)ZJ1 株,由扬州大学畜禽传染病教研室惠赠。

1.3 实验动物

SPF 级 BALB/c 小鼠 50 只,4~6 周龄,雄性,体重 22~24 g,由扬州大学比较医学中心提供【SCXK(苏)2012-0004】。所有动物均在扬州大学比较医学中心动物房进行饲养【SYXK(苏)2012-0029】。

1.4 仪器和试剂

哥伦比亚血琼脂基础培养基、脑心浸液、脱纤维裂解马血 SR48、选择性抗生素 SR147 和微需氧产气袋(英国 Oxoid 公司),RPMI 1640(美国 Hyclone 公司),胎牛血清(美国 Gibco 公司),青链霉素(山东鲁抗医药股份有限公司),小鼠重组 GM-CSF、IL-4(美国 Peprotech 公司),CD11c、CD40、CD80、MHCII 单抗(美国 eBiosciences 公司),其他相关试剂均为国产分析纯。

Mini Spin 离心机(德国 Eppendorf 公司),超净工作台(江苏苏州净化设备厂),细胞培养 6 孔板

(美国 Corning 公司),CO₂ 恒温培养箱(德国 Heraeus 公司),流式细胞仪 FACS Aria(美国 Becton-Dickinson 公司)。

1.5 方法

1.5.1 模型建立

SPF 级雄性 BALB/c 小鼠 50 只,经 *H. hepaticus* 特异性 16S rRNA 基因扩增证实无 *H. hepaticus* 感染。随机分为实验组和对照组,每组各 25 只,分别饲养于隔离器。禁食 12 h 后,实验组灌饲 *H. hepaticus* 菌液 0.2 mL (1×10^8 CFU/mL),对照组灌饲等量 PBS,连续三次,每次间隔 48 h。

1.5.2 小鼠骨髓 DC 的诱导培养

实验组小鼠感染 *H. hepaticus* 后第 5 个月,根据文献^[6-8],每组各取 8 只小鼠脱颈处死,无菌取股骨和胫骨,用 RPMI 1640 培养基冲出骨髓细胞,400 目滤网过滤两次后收集细胞悬液,离心弃上清,加入 0.8% Tris-NH₄Cl 破解红细胞,离心、洗涤,以每孔 2×10^6 个细胞接种于 6 孔板,每孔加入终浓度为 50 ng/mL 小鼠重组 IL-4 和 GM-CSF 置 37℃、5% CO₂ 培养箱诱导培养。48 h 后半量换液,加入新的含 20 ng/mL 小鼠重组 IL-4 和 50 ng/mL 小鼠重组 GM-CSF 的 10% FCS RPMI 1640,继续培养,每培养 48 h 半量换液,至第 10 天弃悬浮细胞,收集半贴壁的树突状细胞(所有溶液均用无热原水配置)。对照组作同等处理。

1.5.3 DC 表面分子的流式细胞术分析

收集的细胞 1000 r/min 离心 8 min 弃上清, PBS 洗一遍后将细胞悬浮于 100 μ L PBS 中,两组细胞分别加入大鼠抗小鼠 CD11c、CD40、CD80 和 MHCII 类分子荧光标记抗体,置 4℃ 避光标记 30 min,1000 r/min 离心 8 min,弃上清,再用 PBS 洗两次将细胞悬浮于 100 μ L PBS 中,流式细胞仪检测 DC 细胞表面分子的表达率。

1.5.4 小鼠人工接种

感染 *H. hepaticus* 后第 5 个月每组选取 15 只小鼠进行腹腔注射,每只注射 0.2 mL 灭活 NDV。分别于接种 NDV 后第 1、2、3、4、5、6 周经颌下静脉丛采血分离血清,以血凝抑制法(HI)检测血清中抗 NDV 的抗体效价。

2 结果

2.1 DC 的诱导培养

培养基中加入小鼠重组 GM-CSF、IL-4,光学显

显微镜下观察,培养 24 h 内树突状细胞悬浮生长,24 h 后可见许多小而圆的半贴壁细胞,培养 2~3 d 后培养孔底部观察到细胞集落,且细胞集落随着培养时间的延长变多。培养至第 7 天,细胞呈悬浮生长且集落增多,高倍镜下可见细胞集落增多,细胞周围呈树突状突起(图 1)。

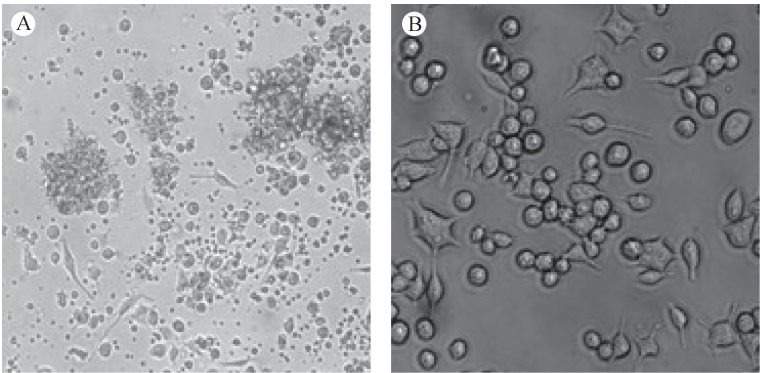
2.2 DC 表面分子表达分析

流式细胞仪检测细胞表面分子表达率如图 2 所示,实验组和对照组 CD11c 表面分子的表达率分别为:87.8%、85.6%;CD40 表面分子实验组和对照组表达率分别为 57.6%、38.8%;CD80 表面分子实验组和对照组表达率分别为 89.8%、88.7%;MHCII

表面分子实验组和对照组表达率分别为 3.6%、0.2%。可见肝螺杆菌感染能够促进 DC 表面分子 CD40 和 MHCII 类分子表达。

2.3 BALB/c 小鼠接种 NDV 后的抗体水平检测

由表 1 和图 3 可知,实验组接种 NDV 后第 1 到第 5 周内血清抗体效价均逐渐升高,第 6 周时呈下降趋势;对照组接种 NDV 后第 1、2 周血清抗体水平持平,未出现上升,2 到 5 周逐渐上升,第 6 周呈下降趋势。除第 1 周实验组小鼠抗体水平略低于对照组外,2 至 6 周内实验组抗体水平均高于对照组。可见肝螺杆菌感染能够提高 BALB/c 小鼠对 NDV 的抗体水平。



注:A. 分离培养 3 d(×200);B. 分离培养 5 d(×400)。

图 1 树突状细胞形态

Note. A. 3 days after isolation(×200); B. 5 days after isolation(×400).

Fig.1 Morphological observation of the murine dendritic cells

表 1 接种 NDV 后不同时间内小鼠的血清抗体效价(n=15)

Tab.1 Serum antibody titer of the mice after inoculation with NDV at different times

接种 NDV 时间 Inoculate times	血清平均效价 Average serum titer(log2)		P 值
	实验组 Experimental group	对照组 Control group	
第 1 周 1st week	5.40±0.63	5.53±0.52	0.53
第 2 周 2nd week	6.93±1.27	5.47±1.19	0.003
第 3 周 3rd week	7.08±1.04	6.47±0.52	0.049
第 4 周 4th week	7.65±0.42	6.87±0.52	0.02
第 5 周 5th week	8.62±0.65	8.00±0.53	0.01
第 6 周 6th week	6.54±0.52	6.33±0.49	0.29

3 讨论

啮齿动物螺杆菌在全球范围内普遍流行,已被公认为是啮齿类实验动物重要的致病菌,发达国家或国际知名实验动物供应商已将其纳入实验大小鼠病原体监测列表,而 *H. hepaticus* 尚未列入我国实验动物国家标准,国内实验室使用啮齿动物进行实验时通常不对该菌进行检测,使得感染难以被发现。对于机体免疫正常的小鼠 *H. hepaticus* 多为隐性感

染,通常无明显的病理变化,*H. hepaticus* 可引起机体细胞免疫和体液免疫,引起迅速而有力的 I 型免疫应答,产生 IgG 和 IgM 抗体,伴随抗 *H. hepaticus* 抗体产生、胆酸浓度改变、血清谷丙转氨酶水平升高,并引起多种细胞因子浓度升高^[9]。使用携带 *H. hepaticus* 的实验动物进行药理学、免疫学等科学研究时,可能会对实验产生干扰,从而混淆实验结果。

DC 是一种专职抗原提呈细胞,能够激活 T、B 细胞(特别是 T 细胞)的特异性免疫反应及免疫耐

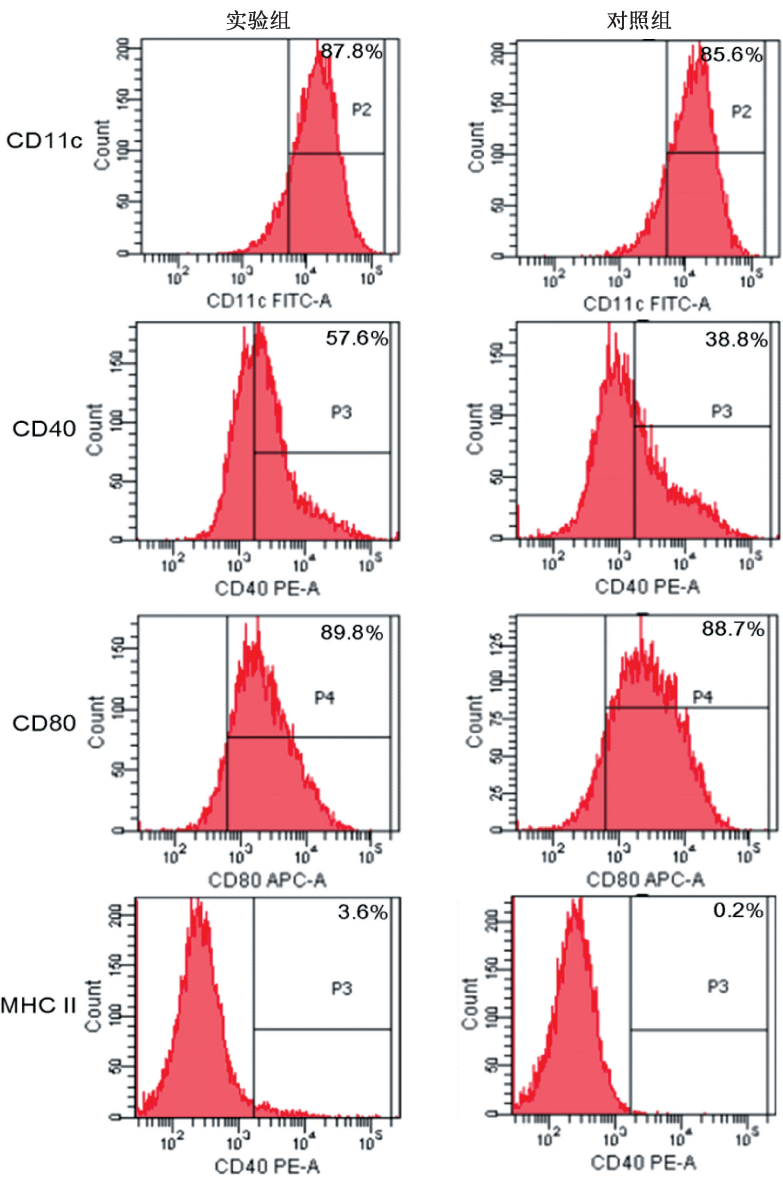


图 2 实验组与对照组小鼠 DC 表面分子表达率

Fig. 2 Expression rate of DC cell surface molecules in the experimental and control groups of mice

受。DC 的分化发育主要经历四个阶段:造血干细胞→DC 前体细胞→未成熟的 DC 细胞→成熟的 DC 细胞^[5]。在外来抗原的刺激下,成熟 DC 表面的 MHCII 分子与 T 细胞受体结合,传导抗原特异性刺激信号,同时,共刺激分子刺激 T 细胞活化,在机体特异性免疫应答调节中起着重要的作用^[10]。我们从感染 *H. hepaticus* 5 个月的 BALB/c 小鼠和未感染 *H. hepaticu* 的对照组小鼠骨髓中分出 DC 细胞进行体外诱导培养,可在 10 d 左右扩增出大量 DC 细胞。采用流式细胞术对两组细胞 DC 表面的共刺激分子 (CD11c、CD40、CD80 和 MHCII) 的表面分子的表达率进行检测,结果表明,MHCII 和 CD40 分子在实验组的表达率要高于对照组的表达率。由此推测,*H.*

hepaticus 感染可能会对小鼠骨髓中 DC 的成熟起促进作用,且能提高 MHC II 和 CD40 分子的表达水平,提示或许对抗体的产生水平有一定的促进作用。

有研究表明^[11],用单纯疱疹病毒 I 型 (HSV-1) 分别接种感染 *H. hepaticus* 1 个月和未感染 *H. hepaticus* 的 C57BL/6 小鼠,1 周后感染 *H. hepaticus* 小鼠的 DC 表面分子 CD40、CD80、CD86 和 MHCII 分子水平较对照组显著降低,说明 *H. hepaticus* 感染抑制了 DC 表型成熟,这与本文结果有一定的差异。我们分析可能的原因在于本文仅单纯性研究感染 *H. hepaticus* 对 BALB/c 小鼠骨髓来源 DC 表面分子表达率的影响,而文献报道的结果则可能是 *H. hepaticus* 和 HSV-1 共同作用导致。另外也可能与动物品

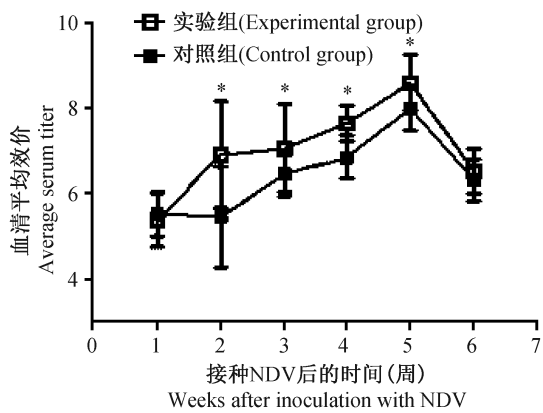


图 3 接种 NDV 抗原后不同时间小鼠的血清抗体水平的比较

Fig.3 Comparison of antibody titer of the mice after inoculation with NDV antigenat at different times

系、DC 细胞来源及感染的时间等因素有关,还有待进一步深入研究。

此外,本实验还用 NDV ZJ1 株分别接种已感染 *H. hepaticus* 和未感染 *H. hepaticus* 的 BALB/c 小鼠,结果显示,在不同时间段,*H. hepaticus* 感染可以促进 BALB/c 小鼠产生抗 NDV 的抗体水平,这可能与 *H. hepaticus* 感染可刺激 DC 细胞表面 CD40 和 MHC II 类分子表达水平有一定的关系。

综上所述,*H. hepaticus* 感染会对免疫学实验产生干扰而影响实验数据的准确性。因此在进行动物实验尤其是免疫学相关实验时,应尽量选择不携带 *H. hepaticus* 的动物,以排除其对实验的干扰。

参 考 文 献

[1] Fox JG, Dewhirst FE, Tully JG, et al. *Helicobacter hepaticus* sp. nov. , a microaerophilic bacterium isolated from livers and intestinal mucosal scrapings from mice [J]. Clin Microbiol, 1994, 32: 1238 – 1245.

[2] Ward JM, Fox JG, Anver MR, et al. Chronic active *hepatitis* and associated liver tumors in mice caused by a persistent bacterial infection with a novel *Helicobacter* species[J]. J Natl Cancer Inst. 1994, 86(16):1222 – 1227.

[3] Cahill RJ, Foltz CJ, Fox JG, et al. Inflammatory bowel disease: an immunity-mediated condition triggered by bacterial infection with *Helicobacter hepaticus*[J]. Infect Immun. 1997, 65: 3126 – 3131.

[4] Hailey JR, Haseman JK, Bucher JR, et al. Impact of *Helicobacter hepaticus* infection in B6C3F1 mice from 12 National Toxicology Program 2-year carcinogenesis studies [J]. Toxicol Pathol. 1998, 26: 602 – 611.

[5] Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, et al. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cell with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells[J]. J Exp Med, 2000, 192 (9): 1213 – 1222.

[6] Inba K, Inaba M, Romanin N, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone-marrow culture supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor [J]. J Exp Med, 1992, 176: 1693 – 1702.

[7] Cao X, Zhang W, He L, et al. Lymphotactin gene-modified bone marrow dendritic cells act as more potent adjuvants for peptide delivery to induce specific antitumor immunity[J]. J Immunol, 1998, 161: 6238 – 6244.

[8] Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow [J]. Immunol Methods, 1999, 223(1): 77 – 92.

[9] Chahnavi A, Rabkin S, Todo T, et al. Effect of prior exposure to herpes simplex virus 1 on viral vector mediated tumor therapy in immunocompetent mice [J]. Gene Ther, 1999, 6:1751 – 1758.

[10] Smaroula D, Julius MC, Robert L. Function of CD80 and CD86 on monocyte and stem cell derived dendritic cells [J]. Exp Mol Pathol, 2003, 75: 217.

[11] Gulani J, Norbury CC, Bonneau RH, et al. The effect of *Helicobacter hepaticus* infection on immune responses specific to herpes simplex virus type 1 and characteristics of dendritic cells[J]. Comp Med. 2009, 59 (6): 534 – 544.

[收稿日期] 2016-02-22