

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 免疫注射與隨後以弓蟲攻擊對細胞反應及細胞素表現之影響

### Effects of Immunization and Subsequent Challenge with *Toxoplasma gondii* on Cellular Responses and Cytokine Expression

計畫編號：NSC 87-2313-B-002-086

執行期限：86年8月1日至87年7月31日

主持人：林大盛 執行機構及單位名稱：臺大獸醫系

#### 一、中文摘要

在弓蟲抵抗力方面，細胞免疫 (CMI, cell mediated immunity) 比抗體重要。CMI 之作用，主要藉 T cells 分泌各種 cytokines 進行。一為 Th1-cytokines 如 IL-2 及 IFN- $\gamma$ ；一為 Th2-cytokines 如 IL-4, IL-6, 及 IL-10，二者互相拮抗。一般而言，Th1-cytokines 有抑制弓蟲效果，而 Th2-cytokines 卻促使疾病嚴重化。IFN- $\gamma$  可活化 macrophages 以消滅弓蟲。另外，IL-6 有助於細胞內弓蟲繁殖。而 IL-10 可抑制被 IFN- $\gamma$  活化之 macrophages。然而最近發現，Th1- 與 Th2-cytokines 的關係並非兩極化。如 IL-4 在感染初期，因抑制 proinflammatory cytokines 產生，反而減低小鼠感染弓蟲之死亡率。IL-10 亦發現可抑制因 proinflammatory cytokines 造成之弓蟲性腦部病變。另外，雖然常同時表現兩型的 cytokines，但仍以其中一型為主。故茲欲以弓蟲強毒株 RH，探討小鼠免疫注射與隨後弓蟲攻擊，來自不同性別之細胞對弓蟲抗原及 mitogen 之反應，與其 cytokines 分泌的變化，藉以了解各種 cytokines 扮演的角色與相互關係。

**關鍵詞：**T 細胞，細胞素，細胞免疫，弓蟲

#### Abstract

It is evident that cell-mediated immunity (CMI) is more important than antibody in protective immunity against *Toxoplasma gondii*. The effect of CMI is mediated by

cytokines released mainly by T cells. Th1-cytokines include IL-2 and IFN- $\gamma$ ; and Th2-cytokines include IL-4, IL-6, and IL-10. They are antagonists. In general, Th1-cytokines inhibit *T. gondii* proliferation and Th2-cytokines promote severity of the disease. IFN- $\gamma$  activates macrophages that kill *T. gondii*. In addition, IL-6 assists intracellular proliferation of *T. gondii*, and IL-10 can inhibit the activity of IFN- $\gamma$ -activated macrophages. However, recent findings indicate that the relations between Th1- and Th2-cytokines may be more complicated. In the early stage of infection, due to the inhibition of proinflammatory cytokines by IL-4, the mortality of infected mice is reduced. Similarly, IL-10 can restrain toxoplasmic pathology in brain caused by proinflammatory cytokines. Although both types of cytokines may be released, one type will be dominant. In the present study, virulent strain RH will be used to study antigenic and mitogenic responses of cells from different sex, and the changes of cytokine production in mice after immunization and subsequent challenge with *T. gondii*, in order to realize the roles played by various cytokines.

**Keywords:** T cell, cytokine, cell-mediated immunity, *Toxoplasma gondii*

#### 二、緣由與目的

弓蟲為一細胞內寄生之原蟲。在抵抗力方面，細胞免疫 (CMI, cell mediated immunity) 比抗體重要 (Gazzinelli et al. 1991)。因抗體只能對付細胞外游離之病原，且抗體要有足夠的力價及和病原作用時間。事實上，CMI 之作用，常藉細胞分泌各種 cytokines 進行。T-cell cytokines 有兩大類，一為 Th1-cytokines 如 IL-2, TNF- $\alpha$  及 IFN- $\gamma$ ，一為 Th2-cytokines 如 IL-4, IL-5, IL-6, 及 IL-10, 二者互相拮抗。一般而言，Th1-cytokines 有抑制弓蟲感染效果，而 Th2-cytokines 卻促使疾病嚴重化 (Modulin & Nutman 1993)。

CD4<sup>+</sup> Th1 cells 被抗原呈獻細胞以 MHC II 呈獻的弓蟲抗原活化，加上弓蟲抗原刺激 macrophages 產生的 IL-12 (Bala et al. 1995) 之影響，會釋放出 IL-2 及 IFN- $\gamma$  (Suzuki et al. 1989; Saavedra & Herion 1991) 等 Th1-cytokines。IL-2 亦可活化對弓蟲抗原有特異性之 CD8<sup>+</sup> CTL，使直接破壞弓蟲感染細胞 (Purner et al. 1996)，或分泌 IFN- $\gamma$  (Denkers et al. 1993)。TNF- $\alpha$  有助於控制弓蟲性腦膜炎及眼球弓蟲症 (Gazzinelli et al. 1993, 1994)。IFN- $\gamma$  也會誘發細胞產生 indoleamine 2,3-dioxygenase，此酵素可催化細胞內 tryptophan 之消耗，導至弓蟲因缺乏 tryptophan 而喪失活力 (Pfefferkorn 1984)。

在 Th2-cytokines 方面，弓蟲抗原可刺激 CD4<sup>+</sup> Th2 cells 產生 IL-4, IL-5, IL-6 及 IL-10 (Prigione et al. 1995)，促使 macrophages 釋出 IL-6 (Bala et al. 1995)。IL-4, IL-6, IL-10 之產生被發現和弓蟲性腦炎嚴重程度有關 (Hunter et al. 1992, 1994; Suzuki et al. 1994)；另外，IL-6 有助於細胞內弓蟲繁殖 (Beaman et al. 1994)。而 IL-10 可抑制被 IFN- $\gamma$  活化之 macrophages (Gazzinelli et al. 1992)。

然而最近發現，Th1- 與 Th2-cytokines 的關係並非兩極化。鼠之 IFN- $\gamma$  無法抑制弓蟲在鼠之 fibroblasts 繁殖 (Schwartzman et al. 1990)。IL-4 在感染初期，因抑制 proinflammatory cytokines (屬 Th1 型) 產

生，反而減低小鼠感染弓蟲之死亡率 (Roberts et al. 1996)。IL-10 亦發現可抑制因 proinflammatory cytokines 造成之弓蟲性腦部病變 (Burke et al. 1994)。

實驗證實，雖然常同時表現兩型的 cytokines，但仍以其中一型為主。由於在弓蟲感染過程，不同的時間可能會產生不同型別之 cytokines。另外，性別差異對弓蟲抵抗力之不同和 cytokines 有關 (Roberts et al. 1995)。所以，本研究欲以弓蟲強毒株 RH，探討小鼠免疫注射與隨後弓蟲攻擊，對弓蟲抗原及 mitogen 之反應，與其 cytokines 分泌的連續變化，藉以了解各種 cytokines 扮演的角色與其相互關係。

### 三、結果與討論

小鼠依照接受不同物質免疫可分兩組：一為弓蟲抗原免疫組，一為 PBS 對照組。於弓蟲攻擊 (day 0) 前第二週 (-wk 2) 及前第六週 (-wk 6)，小鼠接受佐劑加上弓蟲抗原或 PBS 注射。於 -wk 7、-wk 6、-wk 5、-wk 4、-wk 3、-wk 2、-wk 1、day 0、day 1、day 2、day 3、day 4、day 5、day 6、及 day 7，各組皆犧牲三隻小鼠，取脾臟做成單一細胞懸浮液，供對 mitogen 及弓蟲抗原之測試，及各種 cytokine assay。最後，並比較雌、雄小鼠之反應。

利用 MTT 法，結果顯示細胞對 Concanavalin A (ConA) 這種 mitogen 的反應是沒刺激對照組之十倍 (OD value 0.728 v.s. 0.078)。弓蟲抗原注射並沒顯著影響其反應，但在弓蟲攻擊兩天後，其反應始下降。對弓蟲抗原反應出現在弓蟲抗原注射後一週，逐漸上升，於弓蟲攻擊前第二週 (-wk 2)，達到最高，但其值僅約沒刺激對照組之五倍。同樣在弓蟲攻擊兩天後，其反應始下降。原因可能是弓蟲在培養的細胞繁殖，進而破壞細胞；或分泌某種物質，抑制細胞反應。雌、雄小鼠對 ConA 及弓蟲抗原之反應並沒差別。脾臟細胞以 calcium ionophore/PMA 刺激，6 小時後收集上清液，供各種 cytokines 之測定。以 ELISA 測試結果發現 IL-2 及 IFN- $\gamma$  於弓蟲抗原注射後約二週達到最高量，之後乃逐

漸下降。在第二次抗原注射後亦有類似情形，但是下降較快，可能是隨後弓蟲攻擊的關係。雌小鼠之 IFN- $\gamma$  產生較雄小鼠慢約一週。以 ELISA 偵測到 IL-4 及 IL-10 的量較低。IL-4 出現的時間約略似 IL-2，其最高量出現的時間大約在第二週，但並不很明顯。IL-10 較 IL-4 慢約一週出現，其高峰大約在第三週，亦不明顯。雌、雄小鼠在 IL-4 及 IL-10 的分泌並沒顯著差別。利用 enzyme-linked immunospot (ELISPOT) 測各種 cytokines 在其最高量出現時之情形，發現 IFN- $\gamma$  分泌細胞佔約 45%，IL-2 分泌細胞佔約 40%，IL-4 分泌細胞佔約 10%，IL-10 分泌細胞佔約 8%。

本研究指出 Th1-及 Th2-cytokines 皆可被弓蟲抗原誘發，然而仍以 Th1-cytokines 分泌較多。此說明了弓蟲抗原本質，以及為何 Th1-cytokines 在弓蟲感染之重要性。由於使用強毒 RH 株，小鼠感染後，弓蟲大量繁殖，導致大量細胞死亡，因而對 mitogen 或抗原的反應急速下降；各種 cytokines 之分泌也大量減少。若使用弱毒株，免疫過的小鼠應可對弓蟲攻擊有抵抗力，其反應也應比本研究好。類似其他發表，雌小鼠之 IFN- $\gamma$  產生較雄小鼠慢，此可說明為何雌小鼠對弓蟲感受性較高。

#### 四、計畫結果自評

由於使用強毒 RH 株，小鼠感染後，弓蟲大量繁殖，導致大量細胞死亡，因而對 mitogen 或抗原的反應急速下降；各種 cytokines 之分泌也大量減少。若使用弱毒株，免疫過的小鼠應可對弓蟲攻擊有抵抗力，其反應也應比本研究好。

#### 五、參考文獻

Bala S, G Englund, J Kovacs, L Wahl, M Martin, A Sher & RT Gazzinelli. 1995. Toxoplasma gondii soluble products induce cytokine secretion by macrophages and potentiate in vitro replication of a monotropic strain of HIV. J. Euk. Microbiol. 41:7S.

Beaman MH, CA Hunter & JS Remington. 1994. Enhancement of intracellular

replication of Toxoplasma gondii by IL-6. J. Immunol. 153:4583-4587.

- Burke JM, CW Roberts, CA Hunter, M Murray & J Alexander. 1994. Temporal differences in the expression of mRNA for IL-10 and IFN- $\gamma$  in the brains and spleens of C57BL10 mice infected with Toxoplasma gondii. Parasite immunol. 16:305-314.
- Czerkinsky CC, LA Nilsson, H Nygren, O Ouchterlony & A Tarkowski. 1983. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. J. Immunol. Meth. 65:109-121.
- Denkers EY, A Sher & RT Gazzinelli. 1993. CD8+ T-cell interactions with Toxoplasma gondii: implications for processing of antigen for class-I-restricted recognition. Res. Immunol. 144:51-57.
- Dubey JP. 1990. Status of toxoplasmosis in pigs in the United States. JAVMA 196:270-274.
- Gazzinelli RT, A Brezin, Q Li, RB Nussenblatt & CC Chan. 1994. Toxoplasma gondii: acquired ocular toxoplasmosis in the murine model, protective role of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ . Exp. Parasitol. 78:217-229.
- Gazzinelli RT, I Eltoun, TA Wynn & A Sher. 1993. Acute cerebral toxoplasmosis is induced by in vivo neutralization of TNF- $\alpha$  and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. J. Immunol. 151:36772-3681.
- Gazzinelli RT, FT Hakim, S Hieny, GM Shearer & A Sher. 1991. Synergistic role of CD4 and CD8 T lymphocytes in IFN- $\gamma$  production and protective immunity induced by an attenuated Toxoplasma gondii vaccine. J. Immunol. 146:286-292.
- Gazzinelli RT, IP Oswald, SL James & A Sher. 1992. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN- $\gamma$ -activated macrophages. J. Immunol. 148:1792-1796.

- Hoft DF, PL Farrar, K Kratz-Owens & D Shaffer. 1996. Gastric invasion by Trypanosoma cruzi and induction of protective mucosal immune responses. *Infect. Immun.* 64:3800-3810.
- Hunter CA, MJ Litton, JS Remington & JS Abrams. 1994. Immunocytochemical detection of cytokines in the lymph nodes and brains of mice resistant or susceptible to toxoplasmic encephalitis. *J. Infect. Dis.* 170:939-945.
- Hunter CA, CW Roberts & J Alexander. 1992. Kinetics of cytokine mRNA production in the brains of mice with progressive toxoplasmic encephalitis. *Eur. J. Immunol.* 22:2317-2322.
- Miyahira Y, K Murata, D Rodriguez, JR Rodriguez, M Esteban, MM Rodrigues & F Zavala. 1995. Quantification of antigen specific CD8+ T cells using an ELISPOT assay. *J. Immunol. Meth.* 181:45-54.
- Modulin RL & TB Nutman. 1993. Type 2 cytokines and negative immune regulation in human infections. *Curr. opin. Immunol.* 3:511-517.
- Pfefferkorn ER. 1984. Interferon- $\gamma$  blocks the growth of Toxoplasma gondii in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:908-912.
- Prigione I, P Facchetti, F Ghiotto, P Tasso & V Pistoia. 1995. Toxoplasma gondii-specific CD4+ T cell clones from healthy, latently infected humans display a TH0 profile of cytokine secretion. *Eur. J. Immunol.* 25:1298-1305.
- Purner MB, RL Berens, PB Nash, A Van Linden, E Ross, C Kruse, EC Krug & TJ Curiel. 1996. CD4-mediated and CD8-mediated cytotoxic and proliferative immune responses to Toxoplasma gondii in seropositive humans. *Infect. Immun.* 64:4330-4338.
- Roberts CW, JM Brewer & J Alexander. 1995. Sex determined resistance to Toxoplasma gondii is associated with temporal differences in cytokine production. *Infect. Immun.* 63:2549-2555.
- Roberts CW, DJP Ferguson, H Jebbari, A Satoskar, H Bluethmann & J Alexander. 1996. Different roles for interleukin-4 during the course of Toxoplasma gondii infection. *Infect. Immun.* 64:897-904.
- Saavedra R & P Herion. 1991. Human T-cell clones against Toxoplasma gondii: production of interferon- $\gamma$ , interleukin-2, and strain cross-reactivity. *Parasitol. Res.* 77:379-385.
- Schwartzman JD, SL Gonias & ER Pfefferkorn. 1990. Murine gamma interferon fails to inhibit Toxoplasma gondii growth in murine fibroblasts. *Infect. Immun.* 58:833-834.
- Sedgwick JD & PG Holt. 1983. A solid-phase immunoenzymatic technique for the enumeration of specific antibody-secreting cells. *J. Immunol. Meth.* 57:301-309.
- Suzuki Y, MA Orellana, RD Schreiber & JS Remington. 1989. Interferon- $\gamma$ : the major mediator of resistance against Toxoplasma gondii. *Science* 240:516-518.
- Suzuki Y, Q Yang, FK Conley, JS Abrams & JS Remington. 1994. Antibody against interleukin-6 reduces inflammation and numbers of cysts in brains of mice with toxoplasmic encephalitis. *Infect. Immun.* 62:2773-2778.