

磁小体对小鼠免疫应答的影响

孟晨¹, 田杰生^{1*}, 李颖¹, 郑世军^{2*}

(¹ 中国农业大学生命科学学院, 农业与生物技术国家重点实验室, 北京 100193)

(² 中国农业大学动物医学院免疫生物学实验室, 北京 100193)

摘要:【目的】研究细菌磁小体对小鼠免疫应答的影响, 为磁小体的体内应用提供参考依据。【方法】以卵清白蛋白(OVA)作为抗原分别与弗氏完全佐剂(阳性对照)、磁小体(BMP)悬液、PBS缓冲液(阴性对照)混合免疫小鼠。两周后检测血清中抗OVA特异性抗体及亚型、细胞因子表达水平以及淋巴细胞增殖能力。【结果】与阴性对照(PBS组)相比, BMP组在IL-2、IFN- γ 和IL-4、IL-10的表达水平、淋巴细胞增殖能力、特异性抗体的产生没有明显差异。【结论】磁小体对小鼠免疫应答无显著的影响。

关键词: 磁小体; 免疫应答; 细胞因子; MTT

中图分类号: R37 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 06-0817-05

磁小体(magnetosome particles)也称细菌磁颗粒(Bacterial magnetic particles, BMPs), 是趋磁细菌(magnetotactic bacteria)在其细胞内合成的磁性颗粒^[1], 其主要构成成分包括 Fe_3O_4 、FeS、 Fe_3S_4 或 FeS_2 ^[2], 直径在35-120 nm之间^[3]。磁小体的纳米尺度使其具有很大的比表面积, 可以固定较多的生物活性物质, 使细菌方便地利用外加磁场进行导航。磁小体由稳定的脂膜包被, 这种膜主要由混有蛋白质的磷脂双分子层组成, 表面带有大量的活性基团可以用作生物活性物质的天然固定位点^[4]。

目前, 细菌磁小体已在固定化酶载体^[5]、制备磁性细胞^[6]、基因转移^[7]、DNA和RNA的分离与标记^[8-9]、免疫检测^[10-11]、污水处理^[12]、肿瘤治疗^[13]等方面得到了应用。其中, 磁小体作为一种磁性纳米药物载体进行肿瘤治疗得到了广泛关注。与药物偶联的磁小体在生物体内通过外加磁场的作用, 在病变部位聚集, 减轻药物对正常组织的影响, 降低毒副作用, 提高药物疗效。动物试验表明将阿霉素与

磁小体偶联用于肿瘤的治疗, 使肿瘤的生长受到抑制并使药物对心脏和组织的毒性显著降低^[13], 该研究结果说明磁小体作为磁性纳米药物载体具有靶向治疗肿瘤的潜力。

然而, 作为一种新型的纳米磁性载体材料, 磁小体对机体免疫应答具有怎样的影响目前还不清楚。该项研究是将磁小体与抗原混合免疫小鼠, 研究其对小鼠免疫应答的影响, 为磁小体的临床应用与进一步研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物: 6-8周龄的BALB/c雄性清洁级小鼠, 购自中国医学科学院实验动物研究所。

1.1.2 主要试剂 IL-2、IL-4、IL-10及IFN- γ 的ELISA检测试剂盒购自BD公司; 羊抗小鼠IgG-HRP酶标二抗、马抗山羊IgG-HRP酶标二抗购自北京鼎国生物技术有限责任公司; MTT购自北京索莱宝科

基金项目: 国家“863计划”(2007AA021805)

* 通信作者。田杰生, Tel: +86-10-62731440; E-mail: tianhome@cau.edu.cn; 郑世军, Tel: +86-10-62734681; E-mail: sjzheng@cau.edu.cn

作者简介: 孟晨(1982-), 女, 山东烟台人, 硕士研究生; 研究方向: 微生物与免疫学。E-mail: mengchen2884@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-12-08; 修回日期: 2010-03-13

技术有限公司;卵清白蛋白(OVA)、弗氏佐剂、小鼠抗体亚型鉴别试剂均购自SIGMA公司。

1.2 纯化磁小体

将本实验室发酵培养的格瑞菲斯瓦尔德磁螺菌(*Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1)菌株离心后用PBS缓冲液制成菌悬液。磁小体纯化和清洁程度的验证方法参照文献进行^[14],方法大致如下:先用超声波细胞粉碎机裂解菌体(功率200 W,工作3 s,间隔5 s,100个循环),然后用超声波分散与磁铁吸附相结合反复洗涤法进行磁小体提纯:取完全破碎的细胞液用磁铁充分吸附,吸附下来的沉淀用PBS重悬后超声分散(功率40 W,工作3 s,间隔5 s,50个循环),再磁铁吸附,如此反复操作。处理过的磁小体悬液用磁铁吸附后,取上清用紫外分光光度计测 OD_{260} 和 OD_{280} ,用公式:蛋白含量(g/L) = $1.45 \times OD_{280} - 0.74 \times OD_{260}$ 测定上清中的蛋白含量,以检测磁小体上是否还附着蛋白,并用电镜铜网吸附后进行电镜观察来进行验证。

1.3 磁小体的定量与灭菌

纯化所得磁小体用蒸馏水洗涤、冻干后称重定量,将定量的磁小体加入适量生理盐水配成一定浓度的悬液,用15 kGy的 Co_{60} γ-射线照射灭菌^[14]。灭菌处理后的磁小体悬液于4℃保存。

1.4 免疫动物

将18只小鼠分为3组,每组6只—弗氏完全佐剂(CFA)组、磁小体(BMP)组和阴性对照(PBS)组,分别与OVA抗原混合作为免疫原。CFA组:0.9 mL浓度为133 ng/L的OVA与等体积的弗氏完全佐剂乳化;BMP组:0.9 mL浓度为133 ng/L的OVA与等体积含120 μg磁小体的PBS缓冲液充分混合;PBS组:0.9 mL浓度为133 ng/L的OVA与等体积的PBS缓冲液充分混合。分别于颈背部皮内、皮下多点注射,免疫剂量为每只小鼠300 μL。

1.5 脾细胞培养

脾细胞培养方法参照文献进行^[15],大致如下:于初次免疫后两周(即免疫后第14天)处死小鼠,眼眶采血并分离血清。将从同组6只小鼠脾脏中取得的细胞混合,3组细胞分别经红细胞裂解液处理后用RPMI-1640重悬得到脾细胞悬液,经细胞计数后,调整细胞浓度,于一块96孔细胞培养板接种细胞 1.5×10^6 个/孔,待测细胞因子(见下文1.3.6)。另取一块96孔细胞培养板接种细胞 0.5×10^6 个/孔,待测细胞增殖能力(见下文1.3.7),两块培养板的细胞悬液量均为150 μL/孔。于37℃、5% CO₂条

件下培养2 h,将这3个不同免疫组的脾细胞各分为4组,即RPMI-1640阴性对照组、10 ng/L OVA、100 ng/L OVA、2.5 ng/L伴刀豆球蛋白(ConA)。4组分别加入50 μL/孔RPMI-1640培养液、50 μL/孔OVA至终浓度10 ng/L、50 μL/孔OVA至终浓度100 ng/L、50 μL/孔ConA至终浓度2.5 ng/L,细胞继续培养48 h。

1.6 血清中抗OVA特异性抗体的检测

采用夹心ELISA方法测定每只小鼠的血清抗体效价。检测方法参照文献进行^[16],大致如下:使用标准96孔酶标板,2 ng/L OVA进行包被,4℃过夜封闭后加入从1:2³倍开始系列稀释的小鼠血清,并设阴性对照。IgG效价的测定方法为,一抗孵育后,加入羊抗小鼠IgG-HRP酶标二抗孵育;IgG1和IgG2a效价的测定按照说明书进行,即分别加入IgG1、IgG2a亚型鉴别试剂孵育后,再加入马抗山羊IgG-HRP酶标二抗孵育,显色、终止后用酶标仪测定在450 nm处的吸光值。以公式:临界值 = 阴性平均值 + 2.56 阴性SD值进行计算,高于临界值的最大稀释倍数为抗体效价。

1.7 细胞因子的检测

选取IL-2、IFN-γ和IL-4、IL-10两组有代表性的Th1型和Th2型细胞因子作为检测对象。取培养48 h后的细胞培养上清,用ELISA检测试剂盒测上清中IL-2、IL-4、IL-10和IFN-γ表达水平。检测方法按照试剂盒说明书进行。

1.8 淋巴细胞增殖能力的检测

采用四氮唑蓝比色法(MTT法)检测淋巴细胞增殖能力,检测方法参照文献进行^[16],大致如下:取培养72 h后的细胞,吸出培养液,加入100 μL RPMI-1640培养液,再加入5 g/L的MTT,每孔20 μL,继续培养4 h。1000 r/min离心5 min,弃净孔内液体,每孔加入150 μL DMSO,震荡10 min充分溶解结晶,用酶标仪测定在560 nm处的吸光值。

1.9 统计学分析

采用PRISM 4.0软件处理数据,ANOVA检验法进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 磁小体的纯度检测结果

2.1.1 上清中的蛋白含量 测得 OD_{260} 为0.0016, OD_{280} 为0.0002。根据公式蛋白含量(g/L) = $1.45 \times OD_{280} - 0.74 \times OD_{260}$ 计算得到上清中的蛋白

含量为 0.068 ng/L。蛋白含量很低,说明磁小体清洗得较为干净。

2.1.2 电镜观察

如图 1 所示,清洗后的磁小体完整无损,且图中背景干净,无杂质,表明磁小体纯净。

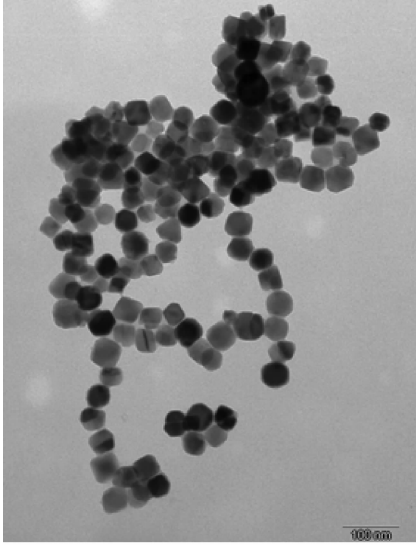


图 1 纯化后磁小体电镜检测照片(150000 ×)

Fig.1 The TEM micrographs of purified magnetosomes.

2.2 抗体效价结果

经 PBS、BMP 和 CFA 分别联合 OVA 免疫小鼠两周后,采血并分离血清,用 ELSIA 方法进行特异性抗 OVA 抗体的检测,如图 2 所示,BMP 组与阴性对照(PBS 组)的特异性的抗 OVA 抗体效价无统计学差异。为了进一步研究磁小体对体液免疫和细胞免疫的影响,进行了抗体亚型 IgG2a 和 IgG1 效价的测定,测定结果显示:BMP 组与阴性对照(PBS 组)的 IgG2a 和 IgG1 效价没有统计学差异。以上结果从抗体水平上反映了,磁小体对小鼠细胞免疫和体液免疫没有显著的影响。

2.3 淋巴细胞增殖能力检测结果

在体外用刺激物刺激脾细胞后继续培养 72 h 后,用 MTT 法检测淋巴细胞存活和增殖能力。结果如图 3 所示,在各自刺激物的作用下,各组之间的 OD_{560} 值基本接近。说明各组细胞活性相似。

2.4 细胞因子的表达量

初次免疫两周后处死小鼠,取其脾细胞,用 RPMI-1640、10 ng/L OVA、100 ng/L OVA、2.5 ng/L ConA 作为刺激物在体外刺激脾细胞,48 h 后用试剂盒检测细胞培养上清中的 Th1 型(IL-2、IFN- γ)和 Th2 型(IL-4、IL-10)细胞因子。如图 4 所示,经 ANOVA 检验法进行统计学分析得出,BMP 组与阴

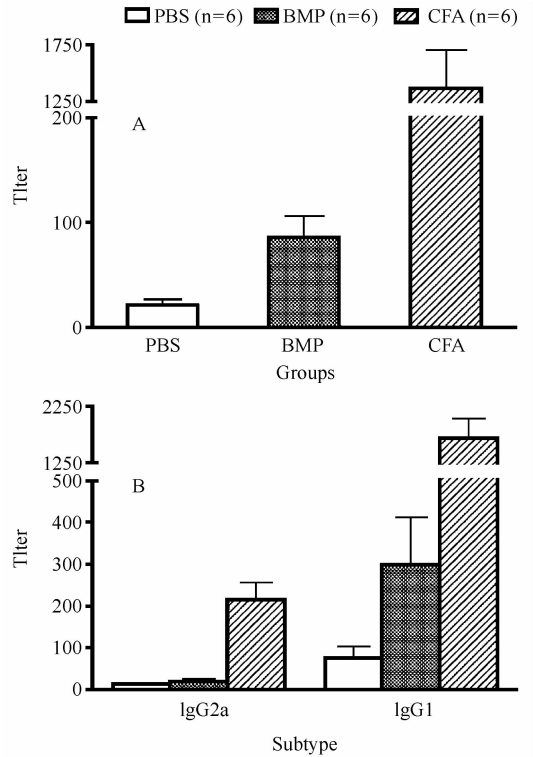


图 2 特异性 IgG 抗体及其亚型的表达水平

Fig.2 Levels of specific IgG antibody and its antibody subtype. A: Antibody Titer; B: Antibody Subtype.

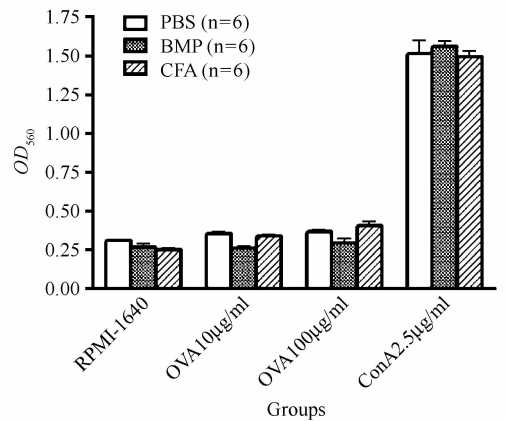


图 3 MTT 法检测淋巴细胞增殖能力

Fig.3 Lymphocytic proliferation examined by MTT.

性对照(PBS 组)在以上 4 种细胞因子的表达中均无明显差异。说明磁小体对小鼠的细胞免疫和体液免疫均无显著影响,与抗体水平得到的结果相符合。

3 讨论

磁小体作为一种优良载体的特性已经在很多实验中得到了证实,可作为固定化酶^[5]、抗体^[10-11]、核酸^[7-9]等的载体,具有比表面积大、偶联效率高等特点。也有将磁小体作为药物载体进行肿瘤靶向治疗的研究报道^[13],但磁小体分离自细菌细胞内,其

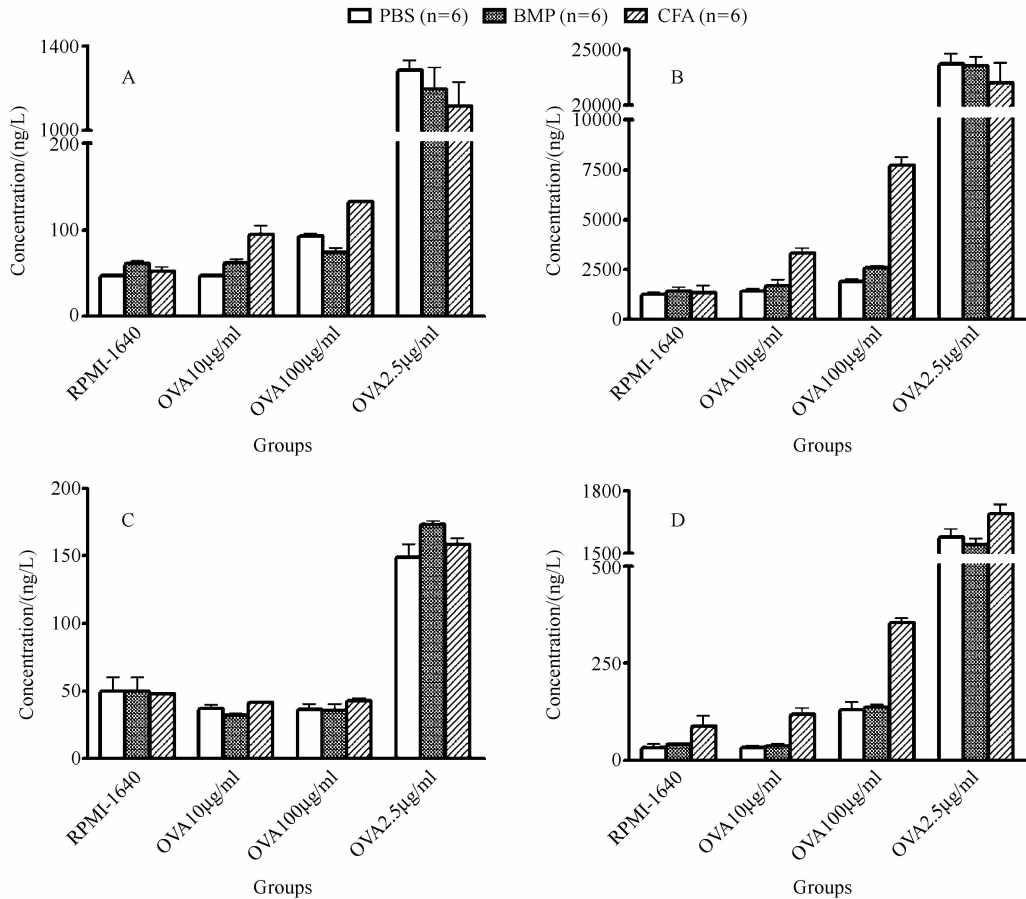


图 4 试剂盒检测细胞因子表达水平

Fig. 4 Levels of cytokines examined by ELISA Kit. A: IL-2; B: IFN- γ ; C: IL-4; D: IL-10.

外膜上有蛋白^[17-18], 纯化所得磁小体是否携带有对人体不利的抗原和热源性物质还不清楚。如果以磁小体作为载体用于体内, 那么研究其对机体免疫应答具有怎样的影响就显得十分重要。

本实验以 OVA 作为抗原分别与弗氏完全佐剂、磁小体悬液、PBS 缓冲液联合免疫小鼠。两周后从抗 OVA 特异性抗体效价、细胞因子表达水平、淋巴细胞转化能力几个方面研究磁小体对小鼠免疫应答的影响。我们从体液水平上检测了抗体的表达量, 结果显示 BMP 组与阴性对照 (PBS 组) 的抗 OVA 特异性抗体的效价没有显著差异, 说明磁小体对小鼠 B 淋巴细胞的增殖和抗体表达没有显著影响。我们又进一步检测了血清中的 IgG2a 和 IgG1 的含量, 发现 BMP 组与阴性对照组的抗体亚型的表达量也没有明显差异, 说明磁小体对小鼠的细胞免疫和体液免疫均没有显著的影响。然后, 我们又检测了脾细胞培养上清中的 Th1 型 (IL-2、IFN- γ) 和 Th2 型 (IL-4、IL-10) 细胞因子, 结果显示, 磁小体对 Th1 型和 Th2 型细胞因子的表达均无显著影响。已有研究表明 Th1 和 Th2 型效应细胞亦可辅助 B 淋巴细胞产

生不同亚型的抗体, 在小鼠体内, 前者辅助产生 IgG2a 亚型的抗体, 而后者则辅助产生 IgG1 亚型的抗体^[19]。我们得到的结果显示磁小体对 IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-10 四种细胞因子均无显著影响, 这与从抗体水平得到的磁小体对 IgG2a 和 IgG1 的表达量没有显著影响的结果一致。

本实验初步证明从 MSR-1 菌株中得到的磁小体对小鼠免疫应答无显著影响, 为磁小体作为靶向载体应用于体内提供了参考依据, 但在磁小体进入临床应用之前, 还需要进行更深入的研究。

参考文献

- [1] Blakemore RP. Magnetotactic bacteria. *Science*, 1975, 190:377-379.
- [2] Mann S, Sparks NHC, Frankel RB. Biomineralization of ferrimagnetic greigite (Fe₃S₄) and iron pyrite (FeS₂) in a magnetotactic bacterium. *Nature*, 1990, 343: 258-260.
- [3] Moskowitz BM. Biomineralization of magnetic minerals. *Reviews of Geophysics.*, 1995, 33: 123-128.
- [4] Bazyliński DA, Frankel RB. Biologically controlled mineralization of magnetic iron minerals by magnetotactic bacteria. In: Lovely PR. *Environmental Microbe - Metal*

- Interactions* (Chapter 5), 2000: 109-143.
- [5] Matsunaga T, Kamiya S. Use of magnetic particles isolated from magnetotactic bacteria for enzyme immobilization. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, 26: 328-332.
- [6] Matsunaga T, Hashimoto K, Nakamura N. Phagocytosis of bacterial magnetite by leucocytes. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 3: 401-405.
- [7] Takeyama H, Yamazawa A, Nakamura C. Application of bacterial magnetic particles as novel DNA carriers for ballistic transformation of a marine cyanobacterium. *Biotechnology Techniques*, 1995, 9(5): 355-360.
- [8] Yoza B, Matsumoto M, Matsunaga T. DNA extraction using bacterial magnetic particles in the presence of amino silane compound. *Journal of biotechnology*, 2002, 94: 217-224.
- [9] Ota H, Takeyama H, Nakayama H. SNP detection in transforming growth factor-1 gene using bacterial magnetic particles. *Biosensors and bioelectronics*, 2003, 18: 683-687.
- [10] Lang C, Schuler D, Faivre D. Synthesis of magnetite nanoparticles for bio- and nanotechnology: genetic engineering and biomimetics of bacterial magnetosomes. *Macromolecular Bioscience*, 2007, 7: 144-151.
- [11] Wacker R, Ceyhan B, Alhorn P. Magneto immuno-PCR: A novel immunoassay based on biogenic magnetosome nanoparticles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 357: 391-396.
- [12] Bahaj AS, CrouDce IW, Janes PAB. Continuous radionuclide recovery from waste water using Magnetotactic bacteria. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 1998, 184: 241-244.
- [13] JB Sun, JH Duan, SL Dai. In Vitro and in Vivo Antitumor effects of doxorubicin loaded with bacterial magnetosomes (DBMs) on H22 cells; the magnetic bio-nanoparticles as drug carriers. *Cancer Letters*, 2007, 258: 109-117.
- [14] JB Sun, JH Duan, SL Dai. Preparation and anti-tumor efficiency evaluation of doxorubicin-loaded bacterial magnetosomes; magnetic nanoparticles as drug carriers isolated from *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 101: 1313-1320.
- [15] Salah-Eddine Lamhamedi-Cherradi, Shijun Zheng. Critical Roles of Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis- Inducing Ligand in Type 1 Diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, 2004, 113: 58-64.
- [16] 郭鑫主编. 动物免疫学实验教程. 第一版. 北京: 中国农业大学出版社, 2007.
- [17] Arakaki A, Webb J, Matsunaga T. A novel protein tightly bound to bacterial magnetic particles in *Magnetospirillum magneticum* strain AMB-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278: 8745-8750.
- [18] Grünberg K, Muller EC, Otto A. Biochemical and proteomic analysis of the magnetosome membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(2): 1040-1050.
- [19] 洪建. Th1, Th2 细胞的分类、分化、功能和在某些疾病中的意义. 上海免疫学杂志 (*Shanghai Journal of Immunology*), 1994, 14(4): 243-244.

Influence of native bacterial magnetic particles on mouse immune response

Chen Meng¹, Jiesheng Tian^{1*}, Ying Li¹, Shijun Zheng^{2*}

(¹ State Key Laboratory for Agro-Biotechnology, Department of Microbiology and Immunology, College of Biological Science, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

(² Laboratory for immunobiology, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: [**Objective**] To study the influence of native bacterial magnetic particles on mouse immune response. [**Methods**] Ovalbumin was used as an antigen, mixed with complete Freund's adjuvant, bacterial magnetic particles (BMP) and phosphate buffer solution, to immunize BALB/C mouse. After 14 days later, we detected the titers of the anti-ovalbumin (IgG) and subtype (IgG1, IgG2a), the proliferation ability of T lymphocyte, and the expression of IL-2, IL-4, IL-10 and IFN- γ . [**Results**] Compared to the negative control group, the BMP group had the similar level in the titer of specific antibody, the proliferation ability of T lymphocyte and the expression of cytokines (IL-2, IL-4, IL-10 and IFN- γ). [**Conclusion**] Native BMPs has no significantly influence on mouse immune response.

Keywords: bacterial magnetic particles; immune response; cytokines; MTT

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Chinese High Technology Research and Development Program (2007AA021805)

* Corresponding authors. Jiesheng Tian, Tel: +86-10-62731440; E-mail: tianhome@cau.edu.cn; Shijun Zheng, Tel: +86-10-62734681; E-mail: sjzheng@cau.edu.cn

Received: 8 December 2009 / Revised: 13 March 2010