

DOI:10.13350/j.cjpb.230107

• 论著 •

致小鼠脾脏 T 细胞凋亡日本血吸虫虫卵抗原蛋白的筛选*

王燕娟^{1,2*}, 曹建平¹

(1. 上海城建职业学院, 上海 201415; 2. 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)

【摘要】 目的 观察日本血吸虫虫卵致小鼠脾脏淋巴细胞凋亡情况, 筛选 SEA 中致脾脏 T 细胞凋亡的蛋白组分。

方法 采用 TUNEL(Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP nick end labeling, TdT 介导的 dUTP 缺口末端标记法)检测日本血吸虫感染鼠脾脏虫卵肉芽肿细胞凋亡情况。制备日本血吸虫可溶性虫卵抗原(soluble egg antigen, SEA)并免疫小鼠。将小鼠处死, 取脾, 制备脾细胞悬液, 分别以 15、30、60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SEA 刺激脾脏细胞, 流式观察脾脏淋巴细胞凋亡情况。用层析柱及超滤管按分子质量将 SEA 初步分离为 4 个分子区段, 蛋白分别富集于 Fr1, >55 ku; Fr2, 30~70 ku; Fr3, 5~30 ku; Fr4, <5 ku。体外分离培养免疫小鼠脾脏细胞, 分别加入 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的不同 SEA 区段分子, 培养 48 h 后以 Annexin V 标记进行流式检测, 采用 DNA ladder 法和 RT-PCR 检测 T 细胞中 Fas, FasL mRNA 水平。将致凋亡作用显著的 SEA 区段进行 SDS-PAGE, 电泳洗脱富集不同亚区段蛋白, 再与 T 细胞共同培养, 观察 T 细胞凋亡比例, 进一步缩小蛋白范围区间。 **结果** TUNEL 法检测日本血吸虫感染后 8 周小鼠脾脏虫卵肉芽肿虫卵周围有细胞凋亡, 免疫小鼠 T 淋巴细胞在 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度下调亡比例显著高于其他浓度组, 流式检测、DNA ladder 法及定量 PCR 结果均表明 Fr1 蛋白组分致 T 细胞凋亡作用最强。将 SDS-PAGE 电泳后的 Fr1 分子进行电泳洗脱, 富集不同亚区段蛋白(Fr1-1, Fr1-2, Fr1-3), 以 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度刺激 T 细胞 48 h, Annexin V 法显示 Fr1-2(55~72 ku 亚蛋白区段)致 T 细胞凋亡率达 57.04%, 致凋亡效果最为显著($P < 0.01$)。 **结论** 虫卵周围高浓度 SEA 有致小鼠脾脏 T 细胞凋亡作用, 以 55~72 ku 蛋白区段致凋亡作用最强, 可进一步从中筛选疫苗靶蛋白。

【关键词】 日本血吸虫; 虫卵可溶性抗原; T 淋巴细胞; 凋亡

【中图分类号】 R383.24

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)01-0037-05

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Jan;18(1):37-41.]

Study on the screening of molecule(s) performing apoptotic effect on T lymphocytes from schistosoma japonicum egg antigen

WANG Yan-juan^{1,2}, CAO Jian-ping¹ (1. Shanghai Urban Construction Vocational College, Shanghai 201415, China; 2. 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) **

【Abstract】 Objective To observe the apoptosis of spleen lymphocytes in mice caused by eggs, and assess the pro-apoptotic activity effect of soluble egg antigen (SEA) from *Schistosoma japonicum* to T lymphocytes. **Methods** Apoptotic cells around the eggs in the splenic granulomas were measured by TUNEL staining *in situ*, SEA was prepared and used for immunization. Mice were sacrificed and the splenocytes suspension was prepared then stimulated with 15, 30, 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SEA, respectively. Apoptosis of lymphocytes from spleens of immunized mice cultured in different SEA concentrations were detected by flowcytometry. Proteins in the SEA were initially size-separated into 4 different fractions by superdex 200 gel filtration and 5 ku hyperfiltration tube, proteins were respectively enriched in Fr1, >55 ku; Fr2, 30-70 ku; Fr3, 5-30 ku; Fr4, <5 ku. Each fraction (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was then cultured with lymphocytes from spleens of immunized mice, tested for the presence of pro-apoptotic activity through annexin V and propidium iodide staining, DNA fragmentation and RT-PCR that aimed to determine the mRNA expression level of Fas, FasL. These studies would narrowed the activity to a specific fraction and then divided it into sub-fractions and electroeluted from the gel slices by electroelution tube, pooled fractions were concentrated and used for next stimulation (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$), the pro-apoptotic activity of the sub-fractions was tested again. **Results** Cells around the eggs in the splenic granulomas were apoptotic when measured by TUNEL staining, a significant increase of Annexin V positive T cells were revealed in splenic T cells when cultured with 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SEA, the results of DNA fragmentation, annexin V/propidium iodide staining, and RT-PCR all

* **【基金项目】** 国家自然科学基金面上项目(No. 81772225)。

** **【通讯作者(简介)]** 王燕娟(1982-), 女, 河南巩义人, 博士, 副研究员, 主要研究方向为免疫学。E-mail: multibac@126.com

showed significant pro-apoptotic activity associated with fraction 1 (>55 ku). Fraction 1 was then divided into sub-fractions by molecule mass (Fr1-1, Fr1-2, Fr1-3), then cultured with lymphocytes from spleens of immunized mice in 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 48 h, annexin V /propidium iodide staining cells were detected by flowcytometry, result showed that the pro-apoptotic activity was correlated with Fr1-2, molecules between 55 to 72 ku, it induced 57.04% apoptosis in T cells *in vitro*, with the most significant apoptotic effect ($P < 0.01$). **Conclusion** High concentration of SEA around the eggs can cause significant apoptosis of spleen T cells, The fraction of SEA molecules between 55 to 72 ku caused more apoptosis in T cells *in vitro*, further study of identify the precise protein will provide candidate molecules for vaccine research.

【Key words】 *Schistosoma japonicum*; Soluble egg antigen; T lymphocytes; apoptosis

血吸虫病患者的临床症状差异很大,有无症状的肠道型,还有肝肠型及肝脾型。脾型患者主要表现为肝脾肿大。血吸虫对脾脏的损害包括由于门脉高压、网状内皮系统增生或者脾细胞增多,尤其是单核细胞增多引起的脾肿大^[1],以及纤维化变性等。研究表明,随着日本血吸虫感染小鼠进入晚期,脾脏形态及功能均发生显著变化,脾脏正常的骨髓结构消失,T/B细胞分区模糊^[2-3]。由于脾脏是机体最大也是最重要的免疫器官,导致晚期感染小鼠免疫抑制及低应答状态^[4]。在血吸虫感染小鼠,脾脏虫卵沉积非常普遍,不仅影响脾脏淋巴滤泡的结构变化,还改变脾脏局部的微免疫环境^[5]。而脾脏淋巴细胞的大量凋亡极有可能是导致脾脏淋巴滤泡结构破坏的途径之一,而且脾脏T淋巴细胞在体外高浓度日本血吸虫虫卵抗原刺激下相较于B细胞更易于凋亡。

细胞凋亡是正常细胞受基因调控的主动有序的死亡过程。整个细胞最终均裂解为凋亡小体,被邻近的组织细胞吞噬,形成吞噬溶酶体,在溶酶体中被消化降解,不引起周围组织炎症与损伤^[6]。这个过程中细胞膜外翻、核酸断裂、表面死亡受体表达增高,这些变化都易于被检测到。本研究拟检测小鼠脾脏淋巴细胞在SEA作用下的凋亡情况,并将日本血吸虫虫卵抗原分区段同T细胞共培养,观察其凋亡情况,以期筛选导致脾脏T淋巴细胞凋亡的分子及分子群,为阐明日本血吸虫导致宿主免疫抑制的机制及未来疫苗候选分子研究提供理论基础。

材料与方 法

1 材 料

1.1 实验动物 8周龄SPF级C₅₇BL/6雄性小鼠,体重20±2g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。

1.2 主要试剂、材料 TUNEL试剂盒(货号QIA39)和透析-电洗脱管(货号71511-3)购自德国Calbiochem公司;T细胞尼龙毛细胞分离柱(货号143-07041)购自日本Wako公司;超滤浓缩离心管购自美国Millipore公司;APC-anti B220, PE-anti CD3

购自美国Biolegend公司;FITC-Annexin V及propidium iodide(PI)双染试剂盒(货号556547)购自美国BD PharMingen公司;反转录cDNA合成试剂盒(货号fsq-301)购自日本Toyobo公司;MEM,1640培养基及Hank's溶液均购自美国Gibco公司;胎牛血清(货号SH30084)购自美国Hyclone公司。

2 方 法

2.1 动物感染及脾脏T细胞分离 取8周龄SPF级C₅₇BL/6雄性小鼠,每鼠感染(20±1)条日本血吸虫尾蚴。分别于感染后5、8周剖杀,按文献[7]的方法制备SEA,超滤去除内毒素后与弗氏佐剂1:1混合,皮下注射免疫小鼠,每鼠50 μg 。免疫后10d剖杀小鼠,取脾脏,分离T细胞备用。

2.2 TUNEL法检测细胞凋亡 按照Calbiochem试剂盒说明操作。感染后8周剖杀小鼠,取部分脾脏用4%甲醛固定后石蜡包埋、切片,常规脱蜡至水,TBS中保持湿润;蛋白酶K用10 mmol/L Tris-HCl作1:100稀释,取100 μl 覆盖整个标本,室温孵育20 min,TBS洗1次(3 min);TdT平衡缓冲液以1:5稀释,取100 μl 覆盖整个标本,室温孵育30 min;每57 μl FITC标记的核苷酸反应液中加入3 μl TdT酶,混合后吸取60 μl 覆盖整个标本,37℃孵育1 h,TBS中洗3次,每次3 min;封片,荧光显微镜下镜检。

2.3 流式法检测不同浓度SEA刺激下小鼠脾细胞凋亡情况 制备免疫组小鼠脾脏单个淋巴细胞悬液,调整细胞浓度为10⁶个/ml,加入SEA使SEA终浓度分别为15、30、60 $\mu\text{g}/\text{ml}$,对照组加等量生理盐水,培养48 h;每个样品分别加入1 μl APC-anti B220 mAb或PE-anti CD3 mAb,混匀,4℃避光孵育15 min,用1 ml 0.01 mol/L PBS洗涤;加入1×Annexin V buffer 60 μl ,FITC-Annexin V mAb 5 μl ,混匀,4℃避光孵育15 min后上机检测,用未标记淋巴细胞作为阴性对照。

2.4 致小鼠脾脏T细胞凋亡的SEA分子区段筛选

2.4.1 尼龙毛柱分离脾脏T淋巴细胞 对尼龙毛T细胞分离柱进行去气泡及平衡处理。取小鼠脾脏,制备淋巴细胞悬液,调节体积至2 ml加入分离柱中,加

入 1 ml MEM(含 5%胎牛血清)覆盖于柱上方,37 °C 孵育 30 min,收集柱中流出细胞悬液;将收集的细胞用含 5%胎血清的 RPMI 1640 培养基洗涤一次,加入 RPMI 1640 培养基(含青霉素和链霉素各 100 U/ml,含 10%胎牛血清),调整细胞浓度为 10^6 个/ml,在 5% CO_2 培养箱中 37 °C 培养 48 h。

2.4.2 SEA 分子质量区段分离及体外刺激 T 细胞凋亡试验 取 SEA 用 16-60 Superdex 200 层析柱按分子质量进行初步分离,按照蛋白峰将分离液收集为 3 个区段,通过 SDS-PAGE 电泳判断区段 1 富集蛋白相对分子质量约为 55×10^3 以上,区段 2 富集蛋白相对分子质量为 $(30 \sim 70) \times 10^3$,区段 3 富集蛋白相对分子质量约为 30×10^3 以下,使用 5×10^3 截留量超滤管浓缩分离液,滤膜下方 5×10^3 以下小分子物质以冷冻干燥方法浓缩作为区段 4,以生理盐水作对照。测定 4 个区段的蛋白浓度,不冻融即刻用 $60 \mu\text{g/ml}$ 的浓度与 T 细胞共培养,筛选出致凋亡作用明显的区段后再进行 SDS-PAGE 电泳,割胶,用电洗脱管洗脱浓缩,得到的亚区段分子以 $60 \mu\text{g/ml}$ 的浓度与 T 细胞共培养继续缩小筛选范围。

2.4.3 流式法检测 T 细胞凋亡 收集尼龙毛柱分离培养的小鼠脾脏 T 淋巴细胞,加入 SEA 分离所得亚区段分子使其终含量为 $60 \mu\text{g/ml}$ 培养 48 h,用 1 ml 0.01 mol/L PBS 洗涤;每管加入 $1 \times$ Annexin V buffer $5 \mu\text{l}$,FITC-Annexin V mAb $5 \mu\text{l}$,混匀,4 °C 避光孵育 15 min 后上机检测,用未标记 T 淋巴细胞作为阴性对照。

2.4.4 DNA ladder 法检测细胞凋亡 收集培养后的 T 细胞 2×10^6 个,裂解、洗涤后加入 10% SDS 使其终浓度为 1%;加入 RnaseA(终浓度 $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$),37 °C 2 h;加入蛋白酶 K(终浓度 $2.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$),56 °C 2 h;加入 2.5 倍体积的预冷的无水乙醇沉淀,充分混匀,-20 °C 放置 40 min,4 °C、12 000 r/min 离心 15 min,吸出上清,于室温使残留的乙醇充分挥发净,加入 $30 \mu\text{l}$ TE 缓冲液溶解沉淀,取 $5 \mu\text{l}$ 与 $1 \mu\text{l}$ 上样缓冲液混匀后进行 2% 琼脂糖凝胶电泳分析。

2.4.5 RT-PCR 检测 T 细胞 Fas、FasL mRNA 水平 每个样品收集等量 T 细胞 5×10^5 个,Trizol 法提取 RNA,使用 Toyobo 反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA,测定浓度后进行 PCR 扩增,以 β -actin 为对照。PCR 引物 Fas: 5'-ATGCTGTGGATCTGGGCTGT-CCT-3'; 5'-GCATAATGGTTCTTGTCATG-3'; FasL: 5'-ATGGTTCTGGCTCTGGT-3'; 5'-GTTT-AGGGGCTGGTTGTTGC-3'; β -actin: 5'-TGTTAC-CAACTGGGAGGACA-3'; 5'-TCTCAGCTGTGGT-GGTGAAG-3'。

2.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 TUNEL 法检测小鼠脾脏肉芽肿细胞凋亡情况

TUNEL 法检测血吸虫感染后 8 周的小鼠脾脏虫卵肉芽肿虫卵周围有细胞凋亡(图 1),提示肉芽肿内虫卵抗原可致淋巴细胞凋亡。

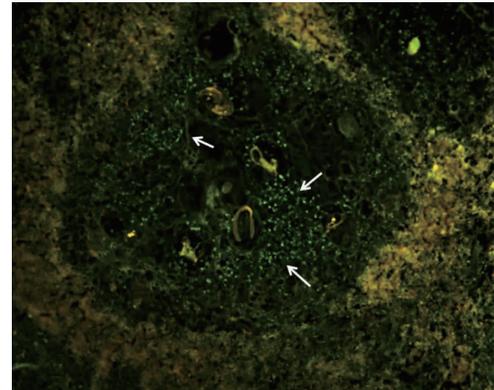


图 1 TUNEL 检测血吸虫感染 8 周小鼠脾脏肉芽肿细胞凋亡情况 (白色箭头示细胞凋亡,200×)

Fig. 1 TUNEL staining for apoptotic cells in the spleen of mice infected with *S. japonicum* for 8 weeks (white arrows 200×)

2 流式法检测小鼠脾脏淋巴细胞在不同浓度 SEA 刺激下的凋亡比例

如表 1 和图 2 所示,免疫小鼠 T 淋巴细胞在 SEA $60 \mu\text{g/ml}$ 浓度下调亡比例显著高于其他浓度组(均 $P < 0.01$),表明高浓度 SEA 致脾脏 T 淋巴细胞凋亡作用更显著。不同浓度 SEA 刺激组 B 淋巴细胞凋亡比例差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

表 1 流式法检测免疫小鼠脾脏淋巴细胞在不同 SEA 浓度下调亡比例
Table 1 Apoptosis ratio of lymphocytes from spleens of immunized mice cultured in different SEA concentrations by flowcytometry

SEA 浓度 Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)	标本数 No. samples	凋亡细胞比例($\bar{x} \pm s, \%$) Apoptosis ratio	
		T 细胞 T cell	B 细胞 B cel
0	4	11.61 \pm 1.94	11.78 \pm 1.58
15	4	10.03 \pm 0.91	8.71 \pm 1.14
30	4	23.79 \pm 4.11	19.36 \pm 1.72
60	4	42.82 \pm 5.72 ^{a,b}	22.63 \pm 5.13

注:a 与 $15 \mu\text{g/ml}$ SEA 比较, $F=53.001, P < 0.01$; b 与 $30 \mu\text{g/ml}$ SEA 比较, $F=46.989, P < 0.01$ 。

Notes: a stand for comparing with $15 \mu\text{g/ml}$ SEA, $F=53.001, P < 0.01$; b stand for comparing with $30 \mu\text{g/ml}$ SEA, $F=46.989, P < 0.01$.

3 SEA 蛋白按分子质量区段分离情况

SEA 用 16-60 Superdex 200 层析柱经蛋白纯化仪分离,将分离液按照分子质量峰值先后分布收集浓

缩,将SEA初步分离为4个分子区段。如图3所示,由于SEA蛋白成分复杂,蛋白凝胶上可以看出并不是绝对的按照分子质量分离的,而是蛋白分别富集于Fr1, >55 ku; Fr2, 30~70 ku; Fr3, 5~30 ku; Fr4, <5 ku。尤其是区段1(Fr1)和区段2(Fr2),在富集范围外也有其他低浓度蛋白条带出现。但由于实验结果表明日本血吸虫抗原引起的T细胞凋亡具有浓度依赖性,低于60μg/ml不能引起T细胞显著凋亡,所以对后续实验的使用及判断影响较小。取区段1(Fr1)再次进行SDS-PAGE电泳,分段切割,电洗脱后浓缩为Fr1-1、Fr1-2、Fr1-3。

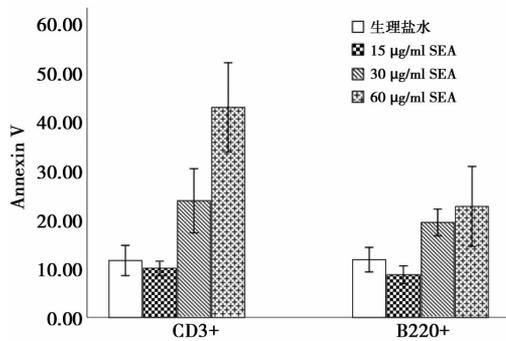


图2 流式法检测免疫小鼠脾脏淋巴细胞在不同SEA浓度下的凋亡比例

Fig. 2 Apoptosis ratio of lymphocytes from spleens of immunized mice cultured in different SEA concentrations

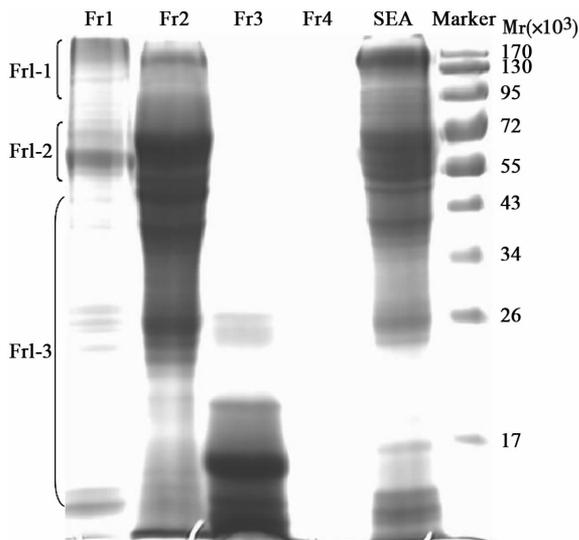


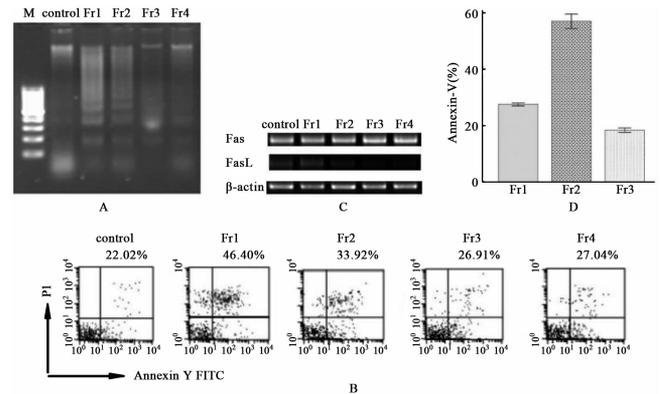
图3 柱层析纯化的日本血吸虫SEA SDS-PAGE电泳分析

Fig. 3 Observation on superdex 200 gel filtration fractionated SEA of *S. japonicum* through SDS-PAGE

4 SEA蛋白不同区段致小鼠脾脏T淋巴细胞凋亡作用比较

免疫小鼠脾脏T细胞悬液中分别加入SEA的4个区段进行培养,经Annexin V标记流式检测,DNA ladder法检测,T细胞中Fas,FasL mRNA RT-PCR法检测水平等方法检测各组细胞抗原刺激下的凋亡水

平,得出区段1蛋白组分致T细胞凋亡作用最为显著(图4A、4B、4C)。SEA区段1经SDS-PAGE电泳后按分子质量大小电洗脱富集不同亚区段蛋白(Fr1-1, Fr1-2, Fr1-3)(图3),以60μg/ml的浓度刺激T细胞48 h,以Annexin V标记流式法检测细胞凋亡比例,其中Fr1-1刺激组为(27.552±0.544)%,Fr1-2组为(57.040±2.548)%,Fr1-3组为(18.395±0.786)%,以Fr1-2(55~72 ku)亚蛋白区段致T细胞凋亡作用最为显著(P<0.01)(图4D)。



A DNA ladder法检测 B Annexin V标记流式检测 C RT-PCR法检测T细胞中Fas,FasL mRNA水平 D Fr1-1,Fr1-2,Fr1-3致T细胞凋亡作用比较

图4 致小鼠脾脏T细胞凋亡的SEA分子区段筛选

A Metured by evaluating DNA fragmentation B Detected by flowcytometry staining with Annexin V and propidium iodide staining C mRNA expression level of Fas,FasL detected by RT-PCR D The ability to induce apoptosis of sub-fractions (Fr1-1,Fr1-2,Fr1-3) detected by flowcytometry

Fig. 4 Pro-apoptotic activity of separated SEA fractions molecule to splenic T cells

讨论

脾脏作为最大的外周免疫器官,其结构的完整性是发挥免疫功能的基础,而多种感染性疾病都伴随着脾脏淋巴滤泡结构的破坏。研究表明,无论是原虫或蠕虫感染过程中都能通过致使宿主细胞,尤其是免疫细胞凋亡的方式来达到自身存活或扩大繁殖的目的^[8-9]。宿主感染日本血吸虫8周后进入慢性感染阶段,抗体产生水平逐渐下降,其感染对小鼠脾脏的破坏极有可能同日本血吸虫感染过程中的免疫下调相关,而找出造成宿主脾脏结构破坏的分子对阐明日本血吸虫同宿主免疫之间的关系,以及针对日本血吸虫的疫苗分子研究均有帮助。

本研究在脾脏血吸虫虫卵肉芽肿中检测到细胞凋亡,肝脏肉芽肿细胞凋亡明显强于外周血及脾脏细胞已得到认同^[10-11],相关研究表明脾内SEA浓度低,淋巴细胞活化后最终会迁移到SEA浓度高的肝脏虫卵肉芽肿区域得以最终被激活,而高度激活的状态更易于凋亡。本研究通过对SEA免疫小鼠脾脏细胞体外

再刺激筛选 SEA 中致凋亡作用分子,由于脾脏中也普遍存在虫卵沉积,脾脏虫卵肉芽肿中的淋巴细胞同样处于高浓度的 SEA 环境中,因此推测脾脏内部同时存在抗原引起的增殖的和凋亡,二者平衡以保证脾脏在正常增殖的同时不会引起过度肿大。而凋亡的位置集中在虫卵引起的脾脏细胞反应介导的肉芽肿处,该处细胞的凋亡集中清除了抗原反应性脾脏淋巴细胞,为之后发生的宿主整体免疫下调及局部虫卵肉芽肿的负调控提供了一个合理的解释。体外以不同浓度 SEA (15、30、60 $\mu\text{g}/\text{ml}$)刺激脾脏 T 淋巴细胞,结果显示以 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SEA 致凋亡作用更显著,而脾脏 B 细胞凋亡率无显著不同,所以本实验将 SEA 按分子质量分段后用免疫小鼠脾脏 T 细胞作进一步筛选。低浓度 SEA 致凋亡作用不明显,可能受到细胞增殖的影响,所以筛选均用 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SEA。

SEA 是由上百种蛋白及糖结合物组成的复杂混合物,包括毛蚴胚胎结构组分及毛蚴分泌物^[12]。Carneiro 等^[13]报道体外条件下 SEA 能使有肠道症状的血吸虫患者的脾脏 T 细胞凋亡,而 SWA 并无该效果。此外,SEA 除了被证明在高浓度下导致脾脏淋巴细胞凋亡,还可导致体外红细胞凋亡^[14]。提示 SEA 中存在使脾脏 T 细胞直接或间接凋亡的成分,如 Chen 等^[15]采用层析分离法从曼氏血吸虫尾蚴抗原分子中筛选到分子质量约为 24 ku 的致皮肤细胞凋亡蛋白。本实验从虫卵抗原中筛选到 55~72ku 的具有显著致凋亡作用的蛋白区段,为 SEA 的致凋亡研究及疫苗候选蛋白的筛选打下了基础。

【参考文献】

- [1] Juraschek SP, Bankova L, Falade O, et al. An uncommon cause of portal hypertension; schistosomiasis [J]. *Am J Med*, 2011, 124 (2): e7-8.
- [2] 王燕娟, 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.
- [3] 王燕娟, 沈玉娟, 徐徐信, 等. 免疫组化法观察日本血吸虫感染破坏小鼠脾脏巴滤泡结构 [J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2017, 29 (4): 468-470.
- [4] Ji F, Liu Z, Cao J, et al. B cell response is required for granuloma formation in the early infection of *Schistosoma japonicum* [J]. *PLoS One*, 2008, 3(3): e1724.
- [5] Wang Y, Zhang J, Yin J, et al. The formation of egg granulomas in the spleens of mice with late *Schistosoma japonicum* infection alters splenic morphology [J]. *Parasit Vectors*, 2015, 16(8): 375.
- [6] Alison MR, Sarraf CE. Apoptosis; a gene-directed programme of cell death [J]. *J R Coll Physicians Lond*, 1992, 26(1): 25-35.
- [7] Boros DL, Warren KS. Delayed hypersensitivity-type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs [J]. *J Exp Med*, 1970, 132 (3): 488-507.
- [8] Chow SC, Brown A, Pritchard D. The human hookworm pathogen *Necator americanus* induces apoptosis in T lymphocytes [J]. *Parasite Immunol*, 2000, 22(1): 21-29.
- [9] Duan YN, Gu XJ, Zhu DD, et al. *Schistosoma japonicum* soluble egg antigens induce apoptosis and inhibit activation of hepatic stellate cells; a possible molecular mechanism [J]. *Int J Parasitol*, 2014, 44(3-4): 217-224.
- [10] Rumbley CA, Zekavat SA, Sugaya H, et al. The schistosome granuloma: characterization of lymphocyte migration, activation, and cytokine production [J]. *J Immunol*, 1998, 161 (8): 4129-4137.
- [11] King CL, Xianli J, Stavitsky AB. Murine *Schistosomiasis mansoni*: coordinate cytokine regulation and differences in cellular immune responses of granuloma cells and splenocytes to endogenous and exogenous schistosome egg antigens [J]. *Parasite Immunol*, 2001, 23(11): 607-615.
- [12] Zaccane P, Burton O, Miller N, et al. *Schistosoma mansoni* egg antigens induce Treg that participate in diabetes prevention in NOD mice [J]. *Eur J Immunol*, 2009, 39(4): 1098-1107.
- [13] Carneiro-Santos P, Martins-Filho O, Alves-Oliveira LF, et al. Apoptosis; a mechanism of immunoregulation during human *Schistosomiasis mansoni* [J]. *Parasite Immunol*, 2000, 22(6): 267-277.
- [14] Kasinathan RS, Greenberg RM. *Schistosoma mansoni* soluble egg antigens trigger erythrocyte cell death [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2010, 26 (4-5): 767-774.
- [15] Chen L, Rao KV, He YX, et al. Skin-stage schistosomula of *Schistosoma mansoni* produce an apoptosis-inducing factor that can cause apoptosis of T cells [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(37): 34329-34335.

【收稿日期】 2022-08-24 【修回日期】 2022-11-10