

DOI:10.13350/j.cjpb.220505

• 论著 •

包虫囊液干预下宿主限制性因子 IFITM3 和 Foxp3 之间的关联研究*

杨雨阳^{1,2,3}, 祁晶晶⁴, 吕洁⁵, 齐新伟², 马秀敏^{2,5}, 单骄宇^{1,2,3} **

(1. 新疆医科大学基础医学院人体寄生虫学教研室, 新疆乌鲁木齐 830017; 2. 新疆医科大学第一附属医院省部共建中亚高发病因与防治国家重点实验室; 3. 新疆地方病分子生物学重点实验室; 4. 新疆医科大学第五附属医院检验科; 5. 新疆医科大学第三附属医院检验科)

【摘要】 目的 探究在包虫囊液干预过程中 IFITM3 与 Foxp3 之间的相互影响。方法 小鼠细粒棘球蚴病造模后收集肝脏组织, 通过 HE 染色、免疫组织化学方法检测肝脏组织中 IFITM3 和 Foxp3 的表达状况。采用 Western blot 和荧光定量 PCR (Real-time PCR) 测定未加囊液浓度 (阴性组)、1 : 10、1 : 100 和 1 : 1 000 共 4 组不同囊液浓度比例干预 HEK293T 细胞后 IFITM3 和 Foxp3 的蛋白表达量和 mRNA 相对表达量。用 Spearman 进行 IFITM3 和 Foxp3 相关性分析。结果 HE 染色后, 可见 CE 肝脏组织的病灶; 免疫组化结果显示随着细粒棘球蚴感染时间的延长, IFITM3 在肝脏的表达量逐渐降低, Foxp3 的表达量逐渐升高。在感染第 2 d IFITM3 的表达最高而 Foxp3 的表达量最低, 感染 300 d IFITM3 的表达量最低, Foxp3 的表达量最高。Western blot 显示, 在 4 组囊液浓度比例干预下, IFITM3 的灰度值分别是 (1.421 ± 0.162)、(0.798 ± 0.091)、(0.936 ± 0.118)、(1.269 ± 0.101); Foxp3 的灰度值分别是 (0.614 ± 0.034)、(0.761 ± 0.020)、(0.919 ± 0.019)、(1.115 ± 0.177), 说明 IFITM3 和 Foxp3 随着囊液干预浓度的降低表达量逐渐升高。Real-time PCR 结果显示, 在 4 组囊液浓度比例干预后 IFITM3 mRNA 相对表达水平分别是 (1.00 ± 0.322)、(0.605 ± 0.321)、(0.736 ± 0.113)、(2.384 ± 0.049); Foxp3 mRNA 相对表达水平分别是 (1.000 ± 0.153)、(1.321 ± 0.316)、(1.675 ± 0.376)、(3.848 ± 1.645), 说明随着囊液干预浓度的降低, IFITM3 和 Foxp3 mRNA 的相对表达量逐渐升高。Spearman 相关分析结果显示, 不同浓度囊液干预后, 细胞中的 IFITM3 与 Foxp3 在 mRNA 相对表达和蛋白表达均成正相关。结论 在细粒棘球蚴感染过程中, 低浓度的囊液刺激会使 IFITM3 和 Foxp3 的表达量增高, 并且 IFITM3 与 Foxp3 呈正相关性, 说明宿主限制性因子 IFITM3 通过与核转录因子 Foxp3 存在关联, 从而与获得性免疫发生联系。

【关键词】 细粒棘球蚴感染; 宿主限制性因子; 干扰素诱导的跨膜蛋白 3; 核转录因子 Foxp3

【中图分类号】 R383.33

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)05-0520-06

[Journal of Pathogen Biology. 2022 May;17(5):520-525, 531.]

Association study between the host limiting factor IFITM3 and Foxp3 under the intervention of hydatid cyst fluid

YANG Yu-yang^{1,2,3}, QI Jing-jing⁴, LV Jie⁵, QI Xin-wei², MA Xiu-min^{2,5}, SHAN Jiao-yu^{1,2,3} (1. Department of Human Parasitology, Basic Medicine College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830017, China; 2. Xinjiang Laboratory of Hydatid Functional Medicine, the First Affiliated Hospital; 3. Xinjiang Key Laboratory of Molecular Biology of Endemic Diseases; 4. Inspection of the Fifth Affiliated Hospital; 5. Laboratory Department of the Third Affiliated Hospital) **

【Abstract】 **Objective** To explore the interaction between IFITM3 and Foxp3 under the intervention of hydatid cyst fluid. **Methods** The liver tissues were collected after the model of mouse echinococcosis. The expression of IFITM3 and Foxp3 in liver tissues were detected by HE staining and immunohistochemistry. Western blot (WB) and real time PCR (real time PCR) were used to determine the protein expression and mRNA relative expression of IFITM3 and Foxp3 in HEK293T cells after intervention with different capsule concentration ratios in four groups without capsule concentration (negative group), 1 : 10, 1 : 100 and 1 : 1000. Spearman was used to analyze the correlation between IFITM3 and Foxp3.

Results H&E staining results showed the lesions of CE liver; Immunohistochemical results showed that with the extension of *Echinococcus granulosus* infection time, the expression of IFITM3 in liver gradually decreased and the expression of Foxp3 gradually increased. On the second day of infection, the expression of IFITM3 was the highest and the expression of Foxp3 was the lowest. On the 300 days of infection, the expression of IFITM3 was the lowest and the

* **【基金项目】** 省部共建中亚高发病因与防治国家重点实验室开放课题(No. SKL-HIDCA-2019-10)。

** **【通讯作者】** 单骄宇, E-mail: shanjiaoyu2007@sina.com

【作者简介】 杨雨阳(1997-), 女, 山东青岛人, 硕士研究生, 主要研究方向: 感染免疫。E-mail: 1315677940@qq.com

expression of Foxp3 was the highest. WB data showed that the gray values of IFITM3 were (1.421±0.162), (0.798±0.091), (0.936±0.118), (1.269±0.101) under the intervention of the concentration ratio of capsule fluid in the four groups; The gray values of Foxp3 were (0.614±0.034), (0.761±0.020), (0.919±0.019), (1.115±0.177), indicating that the expression of IFITM3 and Foxp3 increased gradually with the decrease of capsule intervention concentration. Real time PCR showed that the relative expression levels of IFITM3 mRNA were (1.00±0.322), (0.605±0.321), (0.736±0.113), (2.384±0.049) respectively; The relative expression levels of Foxp3 mRNA were (1.000±0.153), (1.321±0.316), (1.675±0.376), (3.848±1.645) respectively, indicating that the relative expression levels of IFITM3 and Foxp3 mRNA gradually increased with the decrease of capsule fluid intervention concentration. Spearman correlation analysis showed that there was a positive correlation between the relative mRNA expression and protein expression of IFITM3 and Foxp3 in cells after different concentrations of cystic fluid intervention. **Conclusion** In the process of hydatid infection, low concentration of cyst fluid stimulation will increase the expression of IFITM3 and Foxp3, and there is a positive correlation between IFITM3 and Foxp3, indicating that the host limiting factor IFITM3 is associated with acquired immunity via nuclear transcription factor Foxp3.

【Key words】 *Echinococcus granulosus*; Host limiting factor; Interferon-induced trans-membrane protein 3; Nucleus transcription factor Foxp3

棘球蚴病又称包虫病,是一种危害严重的人畜共患疾病^[1]。棘球蚴病分囊型棘球蚴病(cystic echinococcosis, CE)和泡型棘球蚴病(alveolar echinococcosis, AE)^[2]。在包虫感染过程中,寄生虫与宿主之间可保持相对动态平衡。寄生虫寄在宿主体内,虫体逐渐进化出多种免疫逃避机制能有效逃避宿主的免疫攻击。在虫体感染宿主和逃避宿主的免疫应答过程中,干扰素参与其中,并在免疫系统发挥重要作用^[3]。

干扰素诱导的跨膜蛋白(interferon-induced trans-membrane protein, IFITM)属于干扰素刺激蛋白(Interferon stimulated genes, ISGs),是涉及病毒感染免疫反应的一种蛋白,并可以抑制病原体的活性^[4],而IFITM3是IFITM家族中较有代表性的,它的抗病毒和抗感染作用力是较为突出的^[5]。

调节性T细胞(regulatory T cells, Treg)在免疫系统中发挥重要作用,Treg的特征基因表达和抑制功能在很大程度上依赖于Treg细胞转录因子Foxp3的稳定表达和活性^[6]。Treg细胞在组织修复和再生、组织稳态中均发挥了重要作用^[7],Treg细胞的诱导及抗炎细胞因子IL-10、TGF-β在免疫耐受中发挥了重要作用,从而延长了寄生虫在宿主体内的生存时间,使得寄生虫可以逃避宿主的免疫攻击^[8],并且Foxp3在包虫病患者体内的表达高于非包虫病患者^[9]。

IFITM3和Foxp3均与寄生虫感染有关,本研究将对感染棘球蚴的小鼠肝脏组织中的IFITM3和Foxp3进行检测并分析相关性,在体外进行囊液干预后进行验证,表明两种蛋白在细粒棘球蚴感染过程中的作用。

材料与方 法

1 材 料

1.1 实验动物 雌性BALB/c小鼠48只。6~8周龄,体质量18~22g,购自新疆医科大学实验动物中心。BALB/c小鼠的实验获得新疆医科大学第一附属医院伦理委员会批准(伦理号为20160218-14)。

1.2 主要试剂及仪器 磷酸盐缓冲液粉末,枸橼酸盐缓冲液粉末,生物素标记通用型二抗试剂盒购自北京中衫生物技术有限公司;TRIZOL试剂购自北京全式金生物技术有限公司;cDNA逆转录试剂盒购自宝生物工程(北京)有限公司;荧光定量PCR试剂盒(TB Green[®]Premix Ex Taq[™]II)购自宝生物工程(北京)有限公司;抗鼠Foxp3抗体购自美国Invitrogen公司;抗兔IFITM3抗体购自Proteintech公司。

2 方 法

2.1 建立动物模型与标本采集 在无菌条件下用注射器从病羊肝脏的包囊中抽取囊液,装入无菌的离心管离心,原头蚴在底部,用含1%双抗的PBS冲洗原头蚴3次,用PBS重悬。用0.5%伊红染料计数原头蚴的数量,确保存活率>95%。将48只BALB/c小鼠随机分为4组,每只小鼠腹腔注射2000个原头蚴。

分别于接种后2、30、90、300d颈椎脱臼处死小鼠,打开腹腔,暴露肝脏,无菌快速剥取小鼠肝脏后放于10%中性甲醛溶液中,固定24h后以用于HE染色和免疫组织化学检测。

2.2 HE染色 将固定好的组织进行脱水、包埋、切片、脱蜡、水化等一系列操作后进行常规HE染色、封片,显微镜下观察病理学变化。

2.3 免疫组织化学染色 将固定好的标本像HE染色一样进行操作后用3% H₂O₂室温孵育30min,EDTA缓冲溶液水浴锅99℃修复30min,室温冷却1h,滴加山羊血清工作液室温湿盒封闭30min,滴加1

: 200 稀释好的 IFITM3 和 Foxp3 一抗, 4 °C 湿盒孵育 12 h, 室温放置 1 h 后滴加生物素标记的通用型二抗(IFITM3 二抗为山羊抗兔, Foxp3 二抗为山羊抗小鼠)室温孵育 1 h, DAB 显色液显色, 苏木素复染后脱水, 用中性树脂封片。在显微镜下观察, 随即观察 3 个视野采图, 用 Image J 软件计算图中阳性表达区域的面积的百分比和标准差。

2.4 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测 IFITM3 和 Foxp3 mRNA 的相对表达水平

2.4.1 引物设计

按照 GenBank 中人的 IFITM3 和 Foxp3 的基因序列设计引物, 以人 GAPDH 作为内参基因。引物由上海生工公司合成, 引物基本信息见表 1。

表 1 引物的基本信息
Table 1 Information of primers

名称 Name	核苷酸序列 Sequence (5'-3')
IFITM3	F: GCA CGC TCA TCT CAG ATC TCC R: TTT TGG CTT CTT CAA TGT CCA G
Foxp3	F: TCC CAG AGT TCC TCC ACA AC R: ATT GAC TGT CCG CTG CTT CT
GAPDH	F: GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT R: GAC AAG CTT CCC GTT CTC AG

2.4.2 标本采集

将 HEK293T 细胞分为 4 组, 分别用 1 : 10、1 : 100、1 : 1000 三种包虫囊液比例和未加囊液(阴性组)的完全培养基干预至一定时间后提取细胞总 RNA。用 TRIZOL 法提取总 RNA, 测量总 RNA 的浓度和 A_{260/280} 值, 使 A_{260/280} 值在 1.8~2.0 之间可用。采用 500 ng 使用反转录试剂盒反转录成 cDNA, 将 cDNA 放入 -20 °C 保存待用。将反转录成的 cDNA 样品取 1 μl 加入荧光定量试剂盒中的 qPCR 体系, 于实时荧光定量 PCR 仪上检测 IFITM3、Foxp3 和 GAPDH 的相对表达量, 采用相对 C_t 法(2^{-ΔΔC_t}) 进行统计分析。

2.5 Western blot 检测 Foxp3 和 IFITM3 蛋白的相对表达量

分别用 1 : 10、1 : 100、1 : 1000 三种囊液比例和未加囊液的完全培养基干预 HEK293T 细胞后用细胞裂解液(RIPA : PMSF=100 : 1)裂解细胞, 冰上裂解 30 min, 4 °C、12 000 g 离心 10 min, 吸取上清, 弃沉淀, 即为总蛋白。用 BCA 蛋白定量试剂盒检测总蛋白的浓度。用 12% SDS-PAGE 进行电泳, 每个点样孔加 20 μg 的总蛋白。80 V 电泳 30 min 再 120 V 电泳 1 h, 后在冰上 120 V 电转 90 min。TBST 缓冲液洗膜(5 min/次, 洗 3 次), 用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, TBST 缓冲液洗膜(5 min/次, 洗 3 次), 加入相对应的一抗(IFITM3 稀释比例为 1 : 1 000; Foxp3 稀释比例为 1 : 2 000), 4 °C 摇床孵育过夜。TBST 缓冲液洗膜(5 min/次, 洗 3 次), 加入二抗(IFITM3 二抗为山羊

抗兔, 按 1 : 5 000 稀释; Foxp3 二抗为山羊抗小鼠, 稀释比例为 1 : 5 000), 室温避光孵育 1 h 后, 用 TBST 缓冲液洗膜(5 min/次, 洗 3 次)。将 ECL 化学发光溶液 A 液和 B 液等体积混合, 将其覆盖在膜上, 置于显色仪中显色。用 Image J 软件对条带进行灰度值扫描并进行分析。

2.6 统计学分析

采用 Graphpad Prism 8 软件进行统计学分析, 采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组数据比较采用 *t* 检验和单因素方差分析(ANOVA), 组间比较采用 LSD 分析检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 小鼠肝脏病变组织 HE 染色、免疫组织化学检测结果

经 HE 染色后镜下可见肝脏组织排列紊乱, 病灶周围有大量炎性细胞浸润(图 1)。免疫组织化学检测结果显示, 肝脏组织中 IFITM3 主要在细胞膜上表达, 且其表达是逐渐减少的(图 2), 相对于感染细粒棘球绦虫 2 d 的小鼠的肝脏, 30 d 的小鼠肝脏组织中 IFITM3 的表达量降低($t=2.866, P<0.05$); 90 d 时 IFITM3 的表达量相比 30 d 的表达量降低($t=3.225, P<0.05$); 300 d 时 IFITM3 的表达量比 90 d 的表达量低且表达量达到最低($t=3.125, P<0.05$)。Foxp3 在细胞核、细胞质中都有表达且表达量逐渐升高(图 3)。相对于感染 2 d 的小鼠肝脏, 30 d 的小鼠肝脏组织中 Foxp3 的表达量增高($t=2.892, P<0.05$); 感染到 90 d 时, Foxp3 的表达量相比 30 d 的表达量增高($t=2.885, P<0.05$), 300 d 时表达量比 90 d 的表达量高, 且达到峰值($t=2.939, P<0.01$, 表 2)。

表 2 不同时期小鼠肝脏组织 Foxp3 和 IFITM3 蛋白表达量的比较
($\bar{x} \pm s$)

感染天数 Days	Foxp3	IFITM3
2	0.180±0.086	0.360±0.030
30	0.312±0.028 [*]	0.277±0.021 [*]
90	0.441±0.030 [#]	0.222±0.210 [#]
300	0.541±0.031 [△]	0.143±0.033 ^{△△}

注: 与感染囊型包虫病 2 d 的小鼠肝脏相比较, * P<0.05; 与感染 30 d 的小鼠肝脏相比较, # P<0.05; 与感染 90 d 的小鼠肝脏相比较, △ P<0.05, △△ P<0.01。

2 不同囊液干预细胞 IFITM3 和 Foxp3 蛋白表达情况

Western blot 分析结果显示, 用 1 : 10、1 : 100、1 : 1000 干预的 HEK293T 细胞和未用囊液干预的 HEK293T 细胞提蛋白后, 随着干预囊液浓度的降低, IFITM3 和 Foxp3 的表达逐渐升高(图 4)。未加囊液

干预的细胞、用浓度比例 1 : 10、1 : 100、1 : 1000 干预细胞后 IFITM3 蛋白的灰度值分别为 1.421 ± 0.162、0.799 ± 0.091、0.936 ± 0.118、1.270 ± 0.102(图 5)。Foxp3 蛋白的灰度值分别为 0.615 ± 0.035、0.762 ± 0.021、0.920 ± 0.019、1.1147 ± 0.177(图 6)。

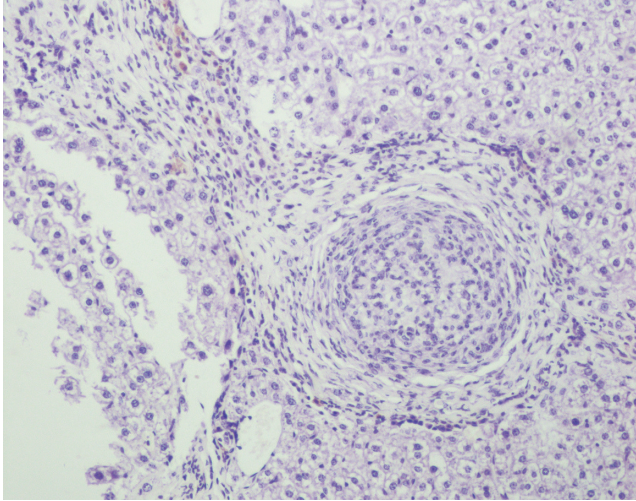
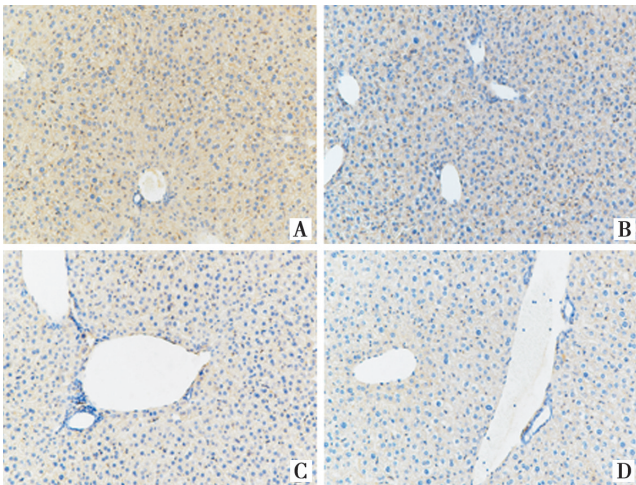


图 1 小鼠肝脏包虫病变组织的 HE 染色(200×)
Fig.1 HE staining of liver hydatid cyst in mouse (200×)



A 感染 2 d 囊型包虫病小鼠肝脏组织 B 感染 30 d 囊型包虫病小鼠肝脏组织 C 感染 90 d 囊型包虫病小鼠肝脏组织 D 感染 300 d 囊型包虫病小鼠肝脏组织

图 2 感染细粒棘球蚴病 2、30、90、300 d 小鼠肝脏病变组织 IFITM3 蛋白的免疫组织化学染色(200×)

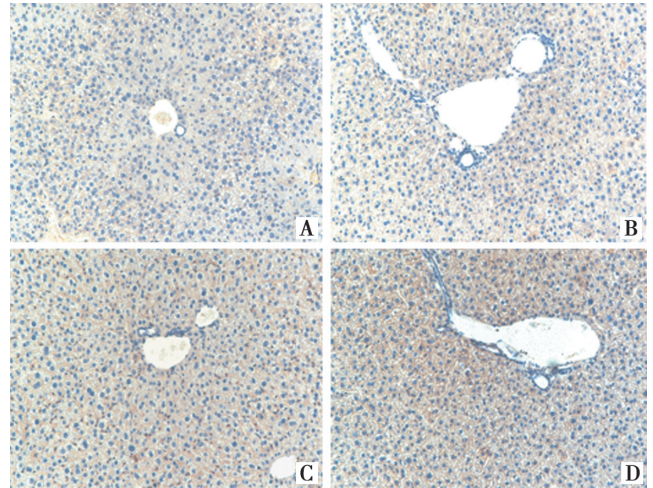
A Liver lesions of mice infected with cystic echinococcosis for 2 days B Liver lesions of mice infected with cystic echinococcosis for 30 days C Liver lesions of mice infected with cystic echinococcosis for 90 days D Liver lesions of mice infected with cystic echinococcosis for 300 days

Fig.2 The immunohistochemical (IHC) analysis of IFITM3 in liver lesions of mice infected with hydatid cyst for 2,30,90 and 300 days

3 不同囊液干预细胞 IFITM3 和 Foxp3 mRNA 表达情况

Real-time PCR 结果显示,未加囊液干预的细胞和用浓度比例 1 : 10、1 : 100、1 : 1000 干预细胞后

Foxp3 mRNA 相对表达水平分别为 1.000 ± 0.153、1.321 ± 0.316、1.676 ± 0.376、3.849 ± 1.645(图 7)。IFITM3 mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.322、0.606 ± 0.322、0.736 ± 0.113、2.384 ± 0.050(图 8)。



A 感染 2 d 囊型包虫病小鼠肝脏组织 B 感染 30 d 囊型包虫病小鼠肝脏组织 C 感染 90 d 囊型包虫病小鼠肝脏组织 D 感染 300 d 囊型包虫病小鼠肝脏组织

图 3 感染细粒棘球蚴病 2、30、90、300 d 小鼠肝脏病变组织 Foxp3 蛋白的免疫组织化学染色(200×)

A Liver lesions of mice infected with cystic echinococcosis for 2 days B Liver lesions of mice infected with cystic echinococcosis for 30 days C Liver lesions of mice infected with cystic echinococcosis for 90 days D Liver lesions of mice infected with cystic echinococcosis for 300 days

Fig.3 The immunohistochemical (IHC) analysis of Foxp3 in liver lesions of mice infected with *E. granulosus* for 2,30,90 and 300 days

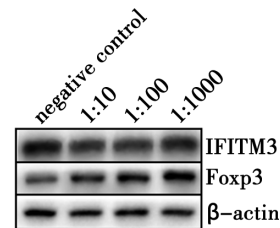


图 4 HEK293T 细胞中 IFITM3 和 Foxp3 蛋白表达水平
Fig.4 The expression of IFITM3 and Foxp3 in HEK293T cells

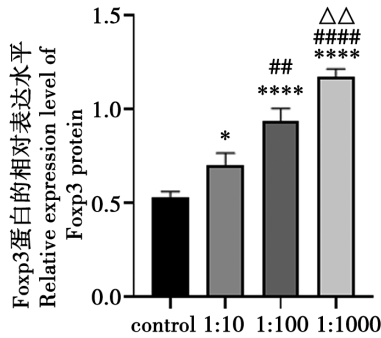
4 Foxp3 与 IFITM3 的相关性分析

对细胞中 Foxp3 和 IFITM3 进行 Spearman 相关性分析,Foxp3 与 IFITM3 在 mRNA 相对表达水平上具有明显的正相关趋势($r=0.849, P<0.01$)(图 9)。Foxp3 与 IFITM3 在蛋白相对表达上也有明显的正相关趋势($r=0.743, P<0.01$)(图 10)。

讨论

近年来包虫病已成为严重危害全世界公共卫生和健康的公共卫生问题之一^[1]。包虫囊液成分复杂,包括虫体分泌的自身物质和虫体代谢物^[10]。囊液中有很强的抗原物质,如特异性抗原 B(AgB),虫体通过分

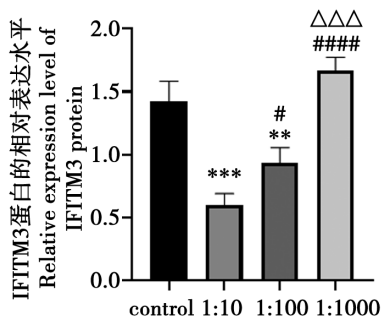
泌的方式调节宿主局部及全身产生免疫反应,有利于虫体逃避宿主的免疫攻击,以保护棘球蚴在宿主体内的生长,因而囊液对虫体的生长发育发挥了重要作用^[11]。在感染棘球蚴病的过程中,随着感染时间的延长,感染的免疫类型由 Th1 型向 Th2 型偏移。在感染早期,宿主主要产生的是以 Th1 型细胞及其产生的 IFN- γ 、IL-2 等有利于清除寄生虫为主的免疫类型,在感染的中后期,囊液中的 AgB 促使 T 细胞受细胞因子的趋化作用,从而使免疫类型向有利于寄生虫生长的 Th2 型偏移。



注:与对照组相比较, * $P < 0.05$, **** $P < 0.01$;与囊液浓度比例 1 : 10 比较, # $P < 0.01$, ##### $P < 0.01$;与囊液浓度比例 1 : 100 比较, $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图 5 Foxp3 分别在未加囊液干预的细胞、用浓度比例 1 : 10、1 : 100、1 : 1000 干预细胞后蛋白的表达量

Fig. 5 The expression of Foxp3 in cells without capsule fluid intervention and with concentration ratio of 1 : 10, 1 : 100 and 1 : 1000



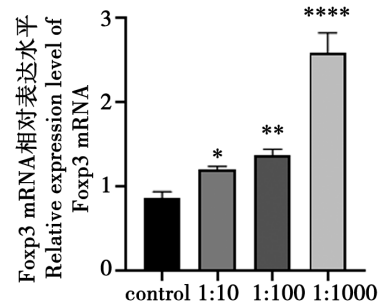
注:与对照组相比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.01$;与囊液浓度比例 1 : 10 比较, # $P < 0.05$, ##### $P < 0.01$;与囊液浓度比例 1 : 100 比较, $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图 6 IFITM3 分别在未加囊液干预的细胞、用浓度比例 1 : 10、1 : 100、1 : 1000 干预细胞后蛋白的表达量

Fig. 6 The expression of IFITM3 in cells without capsule fluid intervention and with concentration ratio of 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000, respectively

包虫病患者体内存在着免疫应答和免疫抑制的双重作用^[2],随着疾病进程的发展,宿主感染时间的延长,死亡性程序 I 受体通路被激活, Treg 发挥作用。CD4⁺CD25⁺T 细胞在介导外周免疫耐受中发挥着主导作用, Treg 细胞需要表达 Foxp3 转录因子来维持其稳定性和有效抑制免疫反应。由于 Treg 细胞被激活以后可以分泌大量有利于虫体生长繁殖的细胞因子

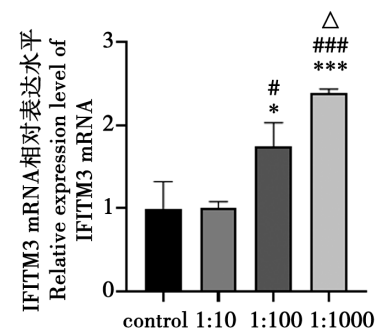
IL-10 和生长转化因子 TGF- β ,在一定程度上 Treg 细胞能够防止虫体被宿主消灭,维持虫体在宿主体内的长期生存,证明了 Treg 细胞参与寄生虫的免疫逃避反应^[12]。



注:与对照组相比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.01$;与囊液浓度比例 1 : 10 比较, ##### $P < 0.01$;与囊液浓度比例 1 : 100 比较, $\Delta\Delta\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图 7 Foxp3 分别在未加囊液干预的细胞、用浓度比例 1 : 10、1 : 100、1 : 1000 干预细胞后 mRNA 的表达量

Fig. 7 The mRNA expression of Foxp3 in cells without capsule fluid intervention and with concentration ratio of 1 : 10, 1 : 100 and 1 : 1000



注:与对照组相比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.01$;与囊液浓度比例 1 : 10 比较, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$;与囊液浓度比例 1 : 100 比较, $\Delta P < 0.05$ 。

图 8 IFITM3 分别在未加囊液干预的细胞、用浓度比例 1 : 10、1 : 100、1 : 1000 干预细胞后 mRNA 的表达量

Fig. 8 The mRNA expression of IFITM3 in cells without capsule fluid intervention and with concentration ratio of 1 : 10, 1 : 100 and 1 : 1000

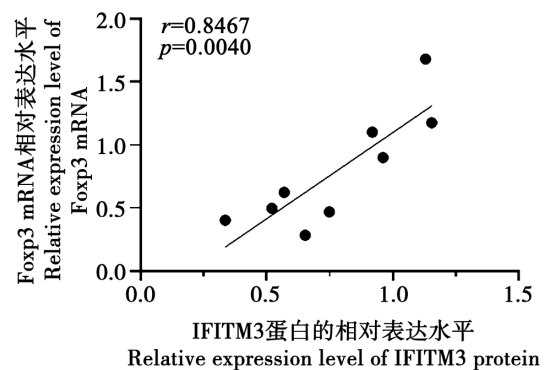


图 9 囊液干预条件下 IFITM3 与 Foxp3 mRNA 相对表达水平的相关性分析

Fig. 9 Correlation analysis of relative expression levels of IFITM3 and Foxp3 mRNA under cystic fluid intervention

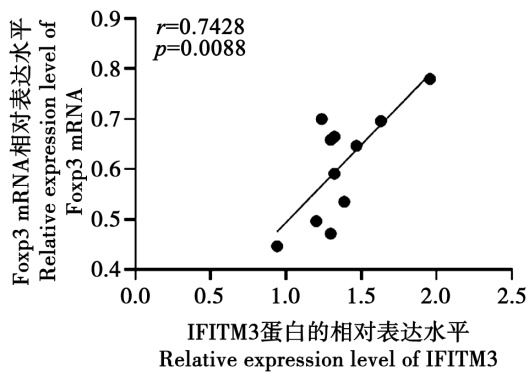


图 10 IFITM3 与 Foxp3 蛋白相对表达水平的相关性分析
Fig. 10 The correlation analysis of relative expression level of IFITM3 and Foxp3

动物通过使用免疫反应来减缓或阻止病毒的复制,这些机制通常是由抗病毒蛋白介导的,但它们受到干扰素的调控。在这些干扰素刺激蛋白中,IFITM1、IFITM2 和 IFITM3 已被证实具有抗病毒能力^[13],其中 IFITM3 是 II 型跨膜蛋白,并且 IFITM3 的抗病毒能力最强^[14]。III 型干扰素通过 RIG-I 样受体或 Toll 样受体对蠕虫的慢性感染产生影响^[15]。与寄生虫病原相关的分子模式与细胞特异性受体结合后,会通过相对应的细胞信号表达 IFN- I,调节多个免疫通路,并且干扰素在宿主抗病原虫感染中起着非常重要的作用^[16-18]。IFN- γ 也可以通过控制 Th1 细胞和 Th2 细胞的平衡,来影响线虫在宿主体内的生长情况^[19]。本研究中 IFITM3 也与 Th 分型的偏移有关,然而对于 IFITM3 和 Foxp3 之间的相关鲜有报道。

随着小鼠感染囊型包虫病时间的延长,IFITM3 的表达是逐渐降低的;而 Foxp3 的表达情况则与 IFITM3 相反,随着感染时间的延长,Foxp3 的表达是升高的。IFITM3 与天然免疫有关,在免疫损伤和炎症感染中发挥作用。在细粒棘球绦虫感染宿主初始阶段,宿主受到抗原刺激,通过 α -IFN 或 β -IFN 的调控,刺激 IFITM3 发挥作用来抑制病原体对宿主的入侵。在感染棘球绦虫过程中 IFITM3 在感染早期发挥作用,Foxp3 引起的免疫耐受在感染中后期发挥作用,因此在感染早期,IFITM3 的表达量会增高以抑制虫体在宿主体内生长繁殖。随着感染时间的延长,在感染中后期,免疫反应主要是与获得性免疫有关,IFITM3 的表达量逐渐降低,使得 IFITM3 的抗病原体能力也有所下降。在感染过程后期,会产生免疫耐受机制,CD4⁺ CD25⁺ Treg 开始发挥作用,Foxp3 作为其发育和发挥功能作用的关键分子,其表达量会升高,加强免疫机制。因此预测 IFITM3 和 Foxp3 之间在细粒棘球绦虫感染的中期阶段开始相互影响。

对 HEK293T 细胞进行囊液干预后,在蛋白印迹和 PCR 实验结果中,发现随着对 HEK293T 细胞干预的囊液浓度降低,IFITM3 和 Foxp3 的表达量逐渐增高,说明包虫囊液在相对较低浓度下具有促进 IFITM3 和 Foxp3 表达的作用;而囊液浓度高时具有下调或者抑制 IFITM3 和 Foxp3 在宿主体内的表达。这使得在感染包虫初始阶段,虫体所分泌的蛋白/抗原有利于激发宿主免疫系统对虫体发起攻击,从而抑制虫体在体内的生长繁殖,因此推测随着虫体的繁殖和分泌抗原量的增多,会使 IFITM3 和 Foxp3 的表达量降低,免疫类型会向免疫抑制偏移,使免疫系统无法正常对虫体产生攻击,产生免疫耐受,对人体产生损伤。

通过囊液干预 HEK293T 细胞,本研究检测了 3 种囊液浓度干预相同时间后 IFITM3 和 Foxp3 的表达量,并对干预后的 HEK293T 细胞中 IFITM3 和 Foxp3 的表达量进行相关性分析,发现一定程度上 IFITM3 和 Foxp3 呈现正相关性,说明两者之间存在相互促进,推测 IFITM3 会增强 Foxp3 的表达,促进发生免疫耐受,从而在细粒棘球绦虫感染后期虫体得以逃避宿主的免疫攻击。

【参考文献】

- [1] Eckert J, Thompson RCA. Historical aspects of echinococcosis [J]. Adv Parasitol, 2017(95): 61-64.
- [2] Wen H, Vuitton L, Tuxun T, et al. Echinococcosis Advances in the 21st Century[J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 32(2): e00075-18.
- [3] Affinass N, Zhang HW, Lohning M, et al. Manipulation of the balance between Th2 and Th2/1 hybrid cells affects parasite nematode fitness in mice [J]. Eur J Immunol, 2018, 48 (12): 1958-1964.
- [4] Garst EH, Lee H, Das T, et al. Site-Specific Lipidation Enhances IFITM3 Membrane Interactions and Antiviral Activity[J]. ACS Chem Biol, 2021, 16(5): 844-856.
- [5] Tan JMJ, Garner ME, Regeimbal JM, et al. Listeria exploits IFITM3 to suppress antibacterial activity in phagocytes[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 4999.
- [6] Ni XH, Kou W, Gu J, et al. TRAF6 directs Foxp3 localization and facilitates regulatory T-cell function through K63-linked ubiquitination. [J]. EMBO J, 2019, 38(9): e99766-e99766.
- [7] Mu oz-Rojas AR, Mathis D. Tissue regulatory T cells: regulatory chameleons[J]. Nat Rev Immunol, 2021, 21(9): 597-611.
- [8] Pan W, Hao WT, Shen YJ, et al. The excretory-secretory products of *Echinococcus granulosus* protoscoleces directly regulate the differentiation of B10, B17 and Th17 cells [J]. Parasit Vectors, 2017, 10(1): 348.
- [9] 单骄宇, 热比亚·努力, 李瑞等. 调节性 T 细胞转录因子 Foxp3 和 IL-8 在棘球绦虫患者肝组织病灶中的表达[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2018, 36(3): 218-223.

(下转 531 页)

- ACLF[J]. Gut, 2022, 71(1):163-175.
- [10] Wang QX, Ma X. Liver: a unique immune organ[J]. Chinese J Hepatol, 2021, 29(6):497-499.
- [11] 王鑫, 张国民, 牛兴杰, 等. 外周血 CD14+CD16+单核细胞亚群在肝衰竭继发感染患者中的检测价值[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(9):1124-1127, 1130.
- [12] 曾丹, 王卫政. Th17 和 Treg 细胞在慢加急性乙型肝炎肝衰竭患者外周血中的表达及临床价值[J]. 肝脏, 2020, 25(4):419-422.
- [13] Hoh A, Heeg M, Ni Y, et al. Hepatitis B virus-infected HepG2hNTCP cells serve as a novel immunological tool to analyze the antiviral efficacy of CD8⁺ T cells *in vitro* [J]. J Virol, 2015, 89(14):7433-7438.
- [14] Sun T, Zhang J. ETV4 mediates the Wnt/ β -catenin pathway through transcriptional activation of ANXA2 to promote hepatitis B virus-associated liver hepatocellular carcinoma progression[J]. J Biochem, 2021, 170(5):663-673.
- [15] 李妍淳, 张宏, 胡志东. 乙型肝炎病毒基因型检测的临床价值探讨[J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(7):844-847.
- [16] Zhang Z, Shi B, Lu W, et al. Quantitative HBcAg and HBcAb versus HBsAg and HBV DNA in predicting liver fibrosis levels of chronic hepatitis B patients [J]. Gastroenterología y Hepatología, 2020, 43(9):526-536.
- [17] 张改君, 龙细雨, 靳露露, 等. Treg/Th7 平衡与脓毒症的关系研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(19):2411-2415.
- [18] 杨勇卫, 陈锡莲, 曲人亮, 等. 慢性 HBV 感染者 Th17/Treg 细胞因子、VEGF、GP73 表达水平差异与临床意义研究[J]. 国际医药卫生导报, 2021, 27(23):3639-3643.
- [19] Liu R, Kong W, Deng M, et al. Association between hepatitis B virus infection and colorectal liver metastasis: a meta-analysis [J]. Bioengineered, 2021, 12(1):736-744.
- [20] 唐建华, 陈富强, 孙晓军, 等. 乙肝患者血清 lncRNA NEAT1 表达与 HBV-DNA 载量、肝功及 T 淋巴细胞亚群的相关性[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(5):582-585, 589.
- [21] Luan YL, Kong XN, Feng Y. Mesenchymal stem cells therapy for acute liver failure: Recent advances and future perspectives [J]. Liver Res, 2021, 5(2):53-61.
- [22] Yuan HX, Su JR, Zhang QY, et al. Characterization of the clinical features in HBV-related acute-on-chronic liver failure[J]. Altern Ther Health Med, 2022, 28(2):65-69.
- [23] Xue R, Zhu Y, Liu H, et al. The clinical parameters for the diagnosis of hepatitis B virus related acute-on-chronic liver failure with sepsis[J]. Sci Rep, 2019, 9(1):2558.

【收稿日期】 2022-01-18 【修回日期】 2022-03-22

(上接 525 页)

- [10] Zhou X, Wang W, Cui F, et al. Extracellular vesicles derived from *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid from patients: isolation, characterization and evaluation of immunomodulatory functions on T cells[J]. Intern J Parasitol, 2019, 49(null):1029-1037.
- [11] 王慧. 棘球蚴囊液蛋白质组学及主要分泌蛋白对宿主免疫调节的影响[D]. 乌鲁木齐:新疆医科大学, 2015.
- [12] Rigano R, Buttari B, Profumo E, et al. *Echinococcus granulosus* antigen B impairs human dendritic cell differentiation and polarizes immature dendritic cell maturation towards a Th2 cell response[J]. Infect Immun, 2007, 75(4):1667-1678.
- [13] Bailey CC, Kondur HR, Huang I, et al. Interferon-induced transmembrane protein 3 is a type II transmembrane protein[J]. J Biol Chem, 2013, 288(45):32184-32193.
- [14] Bailey CC, Zhong G, Huang I, et al. IFITM-Family Proteins: The Cell's First Line of Antiviral Defense[J]. Annu Rev Virol, 2014, 1(1):261-283.
- [15] Rajamanickam A, Munisankar S, Bhootra Y, et al. Elevated systemic and parasite-antigen stimulated levels of type III IFNs in a Chronic helminth infection and reversal following anthelmintic treatment[J]. Front Immunol, 2018, 9(9):2353.
- [16] 马远林, 吕芳丽. I 型干扰素在原虫感染中的作用[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2018, 36(4):399-404.
- [17] Lima TS, Lodoen MB. Mechanisms of human innate immune evasion by *Toxoplasma gondii* [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2019, 9(9):103.
- [18] He X, Xia L, Tumas KC, et al. Type I interferons and malaria: a double-edge sword against a complex parasitic disease[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020(10):594621.
- [19] Affinass N, Zhang HW, Lohning M, et al. Manipulation of the balance between Th2 and Th2/1 hybrid cells affects parasite nematode fitness in mice[J]. Eur J Immunol, 2018, 48(12):1958-1964.

【收稿日期】 2022-01-18 【修回日期】 2022-03-20