

DOI:10.13350/j.cjpb.230912

• 论著 •

棘球蚴感染极化巨噬细胞调控免疫性血小板减少症(ITP)的机制研究*

张星星¹, 张文宝^{2,3}, 焦红杰¹, 艾柯代·卡得³, 齐文静², 武娟³, 宋传龙¹, 李军², 严媚^{1**}

(1. 新疆医科大学第一附属医院, 新疆乌鲁木齐 830054; 2. 中亚高发成因与防治国家重点实验室, 临床医学研究院, 新疆医科大学第一附属医院; 3. 新疆医科大学基础医学院)

【摘要】 目的 探讨细粒棘球蚴感染早期和晚期巨噬细胞极化对免疫性血小板减少症(ITP)的调节作用。方法 将BALB/c小鼠分为ITP组和空白对照组。ITP组经肝门静脉注射细粒棘球蚴建立BALB/c小鼠早期和晚期感染模型,并根据感染剂量和时间分为低剂量感染4周/ITP组(Eg-L-4w/ITP),高剂量感染4周/ITP组(Eg-H-4w/ITP),高剂量感染4周/con组(Eg-H-4w/con)和高剂量感染12周/ITP组(Eg-H-12w/ITP)。分别于感染第4周和12周腹腔注射Anti-CD41抗体,对照组腹腔注射PBS。同时尾静脉连续采血5d。将小鼠处死,取肝组织,HE染色后观察病理变化;通过流式细胞术检测小鼠脾脏、外周血F4/80⁺CD11c⁺M1和F4/80⁺CD206⁺M2型巨噬细胞以及T、B淋巴细胞及其亚型细胞比例。结果 感染组小鼠肝组织出现棘球蚴感染寄生灶,感染灶周围炎症细胞浸润。ITP组小鼠注射致病抗体后血小板数显著减少,ITP模型建立成功。血常规结果显示,细粒棘球蚴感染小鼠4周ITP模型小鼠外周血小板未明显增多,感染12周ITP模型小鼠血小板数增多。提示细粒棘球蚴感染小鼠晚期状态对ITP小鼠模型具有调节保护作用。流式细胞术检测低、高剂量感染4周组小鼠脾脏和外周血F4/80⁺CD11c⁺M1型巨噬细胞比例分别为(11.12±1.24)%、(12.54±1.73)%和(6.11±0.66)%、(6.34±0.79)%,与ITP组、对照组的(6.90±1.48)%、(7.30±1.20)%和(4.40±0.49)%、(2.78±0.56)%比较差异均有统计学意义(均P<0.05)。低、高剂量感染4周组脾脏和外周血F4/80⁺CD206⁺M2型巨噬细胞以及B、T淋巴细胞比例均高于ITP组和对照组(均P<0.05)。结论 细粒棘球蚴感染早期的F4/80⁺CD11c⁺M1型巨噬细胞和感染晚期的F4/80⁺CD206⁺M2型巨噬细胞均对免疫性血小板减少症(ITP)有调节作用。

【关键词】 ITP; 细粒棘球蚴感染; 巨噬细胞极化; 小鼠模型

【中图分类号】 R383.33

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)09-1058-07

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Sep;18(9):1058-1064.]

Study on the Mechanism of *Echinococcus* infection regulating immune Thrombocytopenia (ITP) through polarized macrophages

ZHANG Xingxing¹, ZHANG Wenbao^{2,3}, JIAO Hongjie¹, AIKEDAI Kade³, QI Wenjing², WU Juan³, SONG Chuanlong¹, LI Jun², YAN Mei¹ (1. First affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. State key Laboratory of causes and Prevention of High incidence in Central Asia, Research Institute of Clinical Medicine, first affiliated Hospital of Xinjiang Medical University; 3. Basic Medical College of Xinjiang Medical University)***

【Abstract】 **Objective** to investigate the regulatory effect of macrophage polarization in early and late stage of *Echinococcus granulosus* infection on immune thrombocytopenia (ITP). **Methods** BALB/c mice were divided into ITP group and blank control group. The early and late infection models of BALB/c mice were established by intrahepatic portal vein injection of *E. granulosus* in ITP group. According to the infection dose and time, the mice were divided into low dose infection 4 weeks/ITP group (Eg-L-4w/ITP), high dose infection 4 weeks/ITP group (Eg-H-4w/ITP), high dose infection 4 weeks/con group (Eg-H-4w/con) and high dose infection 12 weeks/ITP group (Eg-H-12w/ITP). Anti-CD41 antibody was injected intraperitoneally at 4 and 12 weeks after infection, while PBS was injected intraperitoneally in the control group. At the same time, blood samples were collected from caudal vein for 5 days. The mice were killed, the liver tissue was taken, and the pathological changes were observed after HE staining, and the proportion of F4/80⁺CD11c⁺M1, F4/80⁺CD206⁺M2 macrophages and T, B lymphocytes and their subtypes in spleen and peripheral blood of mice were detected.

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 82160031)。

** **【通讯作者】** 严媚, E-mail: yan10mei25@163.com

【作者简介】 张星星, (1995-), 女, 河南安阳人, 硕士研究生。研究方向: 儿童血液肿瘤学。E-mail: 2698308571@qq.com

ted by flow cytometry. **Results** the parasitic focus of *Echinococcus* infection was found in the liver tissue of mice in the infected group, and the inflammatory cells infiltrated around the infected focus. In ITP group, the platelet count decreased significantly after injection of pathogenic antibody, and the ITP model was established successfully. The results of blood routine test showed that there was no significant increase in peripheral blood platelet in ITP model mice infected with *E. granulosus* for 4 weeks, but platelet count in ITP model mice increased at 12 weeks after infection. It is suggested that the late state of *E. granulosus* infection can regulate and protect the ITP mouse model. The percentages of F4/80⁺ CD11c⁺ M1 macrophages in spleen and peripheral blood of low and high dose infected mice were (11.12 ± 1.24)%, (12.54 ± 1.73)% and (6.11 ± 0.66)%, (6.34 ± 0.79)%, respectively. There were significant differences between ITP group and control group (7.30 ± 1.20)% and (4.40 ± 0.49)%, (2.78 ± 0.56)%. The proportion of F4/80⁺ CD206⁺ M2 macrophages and B and T lymphocytes in spleen and peripheral blood in low and high dose infection groups were higher than those in ITP group and control group. **Conclusion** F4/80⁺ CD11c⁺ M1 macrophages in the early stage of *E. granulosus* infection and F4/80⁺ CD206⁺ M2 macrophages in the late stage of infection can regulate immune thrombocytopenia (ITP).

【Key words】 ITP; *Echinococcus granulosus* infection; macrophage polarization; mouse model

免疫性血小板减少症 (immune thrombocytopenia, ITP) 是一种获得性自身免疫性出血性疾病, 其特征是免疫介导的血小板破坏增加和血小板生成减少^[1]。ITP 的发病机制复杂, 涉及体液免疫和细胞免疫的改变^[2]。ITP 发病机制至今尚未完全明确^[3]。巨噬细胞作为一种具有可塑性和多能性的细胞群体, 根据其活化状态及所发挥功能不同为经典活化的 M1 型巨噬细胞和替代性活化的 M2 型巨噬细胞^[4]。ITP 的最佳一线治疗仍然是使用皮质类固醇, 二线治疗包括脾切除术或使用利妥昔单抗。许多患者在传统的一线和二线治疗后获得缓解, 但慢性和难治性病例仍需要新的治疗方案^[5]。

棘球蚴病 (echinococcosis) 又称包虫病, 其中常见的囊型包虫病是由细粒棘球绦虫 (*Echinococcus granulosus*, Eg) 的幼虫引起的囊型棘球蚴病 (cystic echinococcosis, CE), 是一种人畜共患疾病, 呈世界性分布, 在我国主要分布在西北地区, 如新疆、甘肃、宁夏、青海、内蒙等^[6]。M1 巨噬细胞 (经典激活的巨噬细胞) 是一种促炎细胞, 在宿主防御感染中起核心作用^[7]。囊型包虫病的一个显著特征是细粒棘球蚴幼虫包囊能够在中间宿主中存活很长时间 (在人类可达 53 年), 而不会对包囊周围的宿主组织造成明显的病理损伤, 表明该寄生虫可以调节宿主的免疫反应, 使其处于慢性状态。本研究拟建立细粒棘球蚴感染早期和晚期小鼠模型以及 ITP 小鼠模型, 采用流式细胞术检测脾脏和外周血的 F4/80⁺ CD11c⁺ M1 和 F4/80⁺ CD206⁺ M2 型巨噬细胞以及 T、B 淋巴细胞及其亚型细胞比例变化, 探讨宿主细粒棘球蚴早期和晚期感染巨噬细胞的动态极化过程, 为进一步研究 ITP 的免疫学机制提供新思路。

材料与方法

1 材料

1.1 实验动物 BALB/c 雌性小鼠 54 只, 6~8 周龄, 体重 (18 ± 2) g, 由新疆医科大学实验动物中心提供。动物试验通过新疆医科大学第一附属医院伦理委员会审批, 伦理批准号为 IACUC-20210301-11。感染细粒棘球蚴的绵羊肝脏采自新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市某屠宰场。

1.2 主要试剂及仪器 Anti-CD41 抗体 (MWRReg30) 购于美国 abcam 公司; EDTA-2K 抗凝溶液和红细胞裂解液购自北京索莱宝科技有限公司; 流式细胞抗体 CD19、CD3、CD4、CD8、CD11c、CD206、F4/80、CD25 和 Foxp3 购于美国 BioLegend 公司。全自动五分类动物血液分析仪 (型号: URIT-5160Vet) 购于桂林优利特医疗电子有限公司。

2 方法

2.1 动物分组 实验分为空白对照组 (简称对照组), 未感染 ITP 对照组 (简称 ITP 组), 低剂量感染 4 周/ITP 组 (Eg-L-4w/ITP, 500 个原头蚴), 高剂量感染 4 周/ITP 组 (Eg-H-4w/ITP, 1 000 个原头蚴), 高剂量感染 4 周/con 组 (Eg-H-4w/con, 1 000 个原头蚴), 高剂量感染 12 周/ITP 组 (Eg-H-12w/ITP, 1000 个原头蚴)。每组小鼠 9 只。

2.2 细粒棘球蚴感染小鼠模型的建立 取感染细粒棘球蚴的绵羊肝脏, 分离细粒棘球蚴, 用磷酸缓冲盐溶液 (含 1 000 U/mL 青霉素和 1 000 U/mL 链霉素) 洗 3~5 次。将小鼠通过动物麻醉机异氟烷吸入式麻醉后打开腹腔暴露肝脏, 经肝门静脉穿刺注入设计剂量的原头蚴悬液, 棉签按压穿刺点约 3 min 止血, 缝合并消毒切口, 复苏小鼠并分笼。4 周为感染早期, 12 周为感染晚期。

2.3 ITP 小鼠模型建立 按照实验分组, 建立 4 组 ITP 模型。每天小鼠尾静脉采血检测血小板数, 每次采血后向小鼠腹腔注射大鼠抗小鼠抗 CD41 单克隆抗体 MWRReg30 2 μg (2 μg/200 μL PBS), 连续注射抗

体 5 d。对照组小鼠每天每次腹腔注射 200 μ L PBS 溶液。于注射后 0、24、48、72、96 和 120 h 取小鼠尾静脉血 20~30 μ L,用全自动五分类动物血细胞分析仪进行血小板计数,当血小板水平下降到正常造模前水平的 50%以下时^[8],确认建模成功。实验小鼠血小板正常值范围为 $(400\sim 1600)\times 10^9/L$ 。末次注射抗体后的第 2 d 解剖小鼠,经眼球取血(抗凝),并留取小鼠脾脏、肝脏备检。

2.4 小鼠肝脏组织病理学检查 取小鼠肝脏组织用 4%多聚甲醛固定 24 h,石蜡包埋后切片,HE 染色,中性树胶封片,显微镜下观察组织病理学变化。

2.5 流式细胞术检测小鼠巨噬细胞和淋巴细胞及其亚型

2.5.1 小鼠脾脏及外周血淋巴细胞和巨噬细胞的分离 取小鼠抗凝血,离心后留取血细胞沉淀,加入红细胞裂解液重复裂解 3 次,PBS 重悬细胞,过 200 目尼龙网过滤。游离脾脏用无菌载玻片粗糙面研磨,通过 200 目尼龙网过滤至离心管,离心收集细胞。细胞悬液按照 1:1 的比例与台盼蓝混匀后计数。

2.5.2 流式细胞检测 取分离的脾脏及外周血淋巴细胞和巨噬细胞,每管 1×10^6 ,用 CD16/32 抗体封闭,分别加入相应外标抗体标记染色,细胞内因子进行破膜后加入相应内标抗体标记染色,PBS 洗涤,经 200 目尼龙网过滤。加入 280 μ L PBS(1%BSA)重悬细胞后转至流式管,用流式细胞仪检测。采用 Flow Jo 软件进行数据分析。

2.6 统计学分析 使用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析,使用 Graph Pad Prism 8.0 软件进行作图。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 血小板计数

对各组小鼠尾静脉连续采血 5 d,采用全自动五分类血液分析仪检测血小板水平,结果如图 1,图 2 和表 1。与对照组相比,ITP 组小鼠在腹腔注射抗 CD41 单克隆抗体 24 h 血小板数显著减少,为 $(292.44\pm 61.50)\times 10^9$,且在 48、72、96、120 h 抗体持续干预下维持在较低水平,小鼠 ITP 模型造模成功。低、高剂量细粒棘球蚴感染 4 周组在注射致病抗体作用下血小板水平与 ITP 组相同呈下降趋势(均 $P>0.05$)。高剂量细粒棘球蚴感染 12 周组小鼠注射致病抗体 24 h 血小板降为 $(219.33\pm 68.14)\times 10^9$,但在 48 h 逐渐回升为 $(420.67\pm 57.37)\times 10^9$,与同时间点 ITP 组血小板数 $(239.88\pm 188.80)\times 10^9$ 比较差异具有统计学意义($F=167.66, P<0.05$),且在 72、96、120 h 平稳回

升至正常范围参考值区间内。表明细粒棘球蚴感染小鼠 4 周的早期状态对 ITP 模型小鼠血小板无回升作用,但在细粒棘球蚴感染小鼠 12 周的晚期状态对 ITP 模型小鼠血小板具有一定的回升作用。

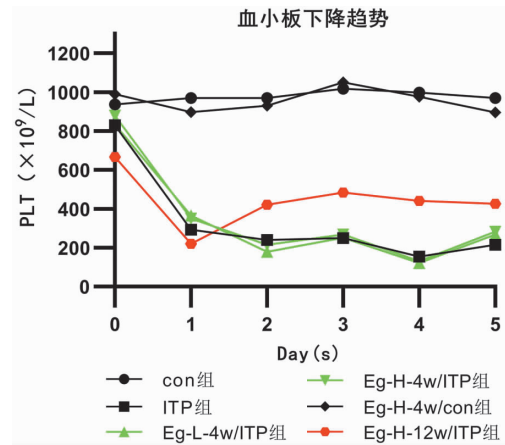
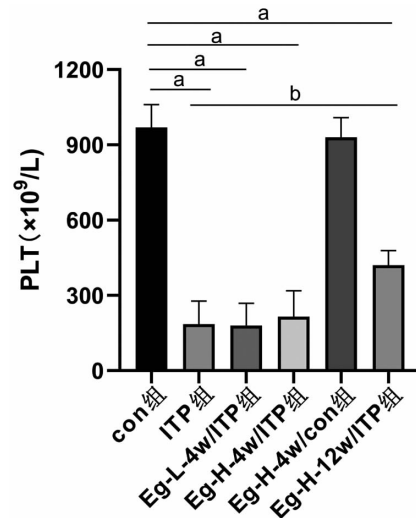


图 1 各组小鼠血小板数变化趋势
Fig. 1 Trend graph of platelet values in each group



注:a 与对照组比较, $P<0.01$; b 与 ITP 组比较, $P<0.01$ 。

图 2 抗 CD41 单克隆抗体干预 48 h 小鼠血小板水平差异分析

Notes: a Compared with the control group, $P<0.01$; b Compared with the ITP group, $P<0.01$.

Fig. 2 Difference of platelet value among groups treated with anti-CD41 monoclonal antibody for 48 hours

2 肝脏组织病理学变化

小鼠肝脏切片经 HE 染色后在显微镜下观察组织病理学变化,结果如图 3。对照组小鼠肝组织结构正常,肝小叶结构完整,肝细胞边界清晰排列整齐,肝细胞以中央静脉为中心向周围放射状排列,无炎性细胞浸润。ITP 组小鼠肝组织结构正常,肝细胞大小形态规则,偶见炎性细胞,肝小叶及肝静脉排列正常。低、高剂量细粒棘球蚴感染 4 周组小鼠肝组织出现较多明显感染寄生灶,感染灶多分布于肝脏远端,感染灶周围炎症细胞浸润,中央静脉轻微扩张,肝索排列较紊乱,有部分胆管增生。

表 1 小鼠血小板计数($n=9$)
Table 1 Platelet count in each group

组别	血小板数值($\bar{x} \pm s, \times 10^9/L$)					
	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
Con组	936.56 ± 111.37	969.56 ± 81.84	969.89 ± 90.20	1017.00 ± 59.09	998.11 ± 79.18	970.33 ± 89.36
ITP组	829.00 ± 92.91	292.44 ± 61.50	239.88 ± 188.80	249.11 ± 210.99	153.67 ± 112.09	215.11 ± 176.79
Eg-L-4w/ITP组	832.11 ± 83.56	364.56 ± 182.64	179.11 ± 89.09	251.89 ± 110.01	121.44 ± 63.95	267.11 ± 73.24
Eg-H-4w/ITP组	879.11 ± 82.30	350.11 ± 167.74	215.00 ± 103.28	268.33 ± 148.72	130.89 ± 78.97	282.22 ± 113.02
Eg-H-4w/con组	989.00 ± 121.51	896.54 ± 56.79	930.11 ± 78.80	1050.11 ± 123.53	975.67 ± 193.06	896.11 ± 66.25
Eg-H-12w/IT组	667.11 ± 91.47	219.33 ± 68.14	420.67 ± 57.37	483.56 ± 68.76	440.67 ± 76.50	425.89 ± 49.91

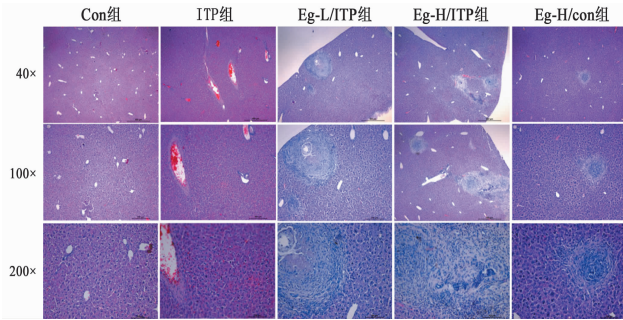
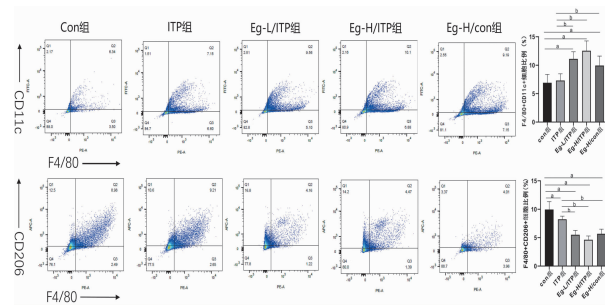


图 3 小鼠肝脏组织病理学变化(HE染色, 40×100×200×)
Fig. 3 Histopathological changes of liver(HE staining, 40×100×200×)

3 小鼠脾脏和外周血巨噬细胞流式检测

流式检测低、高剂量细粒棘球蚴感染 4 周继发 ITP 组小鼠脾脏 $F4/80^+ CD11c^+$ M1 型巨噬细胞比例分别为(11.12 ± 1.24)%和(12.54 ± 1.73)%，与对照组(6.90 ± 1.48)%和 ITP 组(7.30 ± 1.20)%比较差异有统计学意义($F = 24.35, P < 0.05$)；脾脏 $F4/80^+ CD206^+$ M2 型巨噬细胞比例分别为(5.50 ± 0.78)%和(4.63 ± 0.66)%，与对照组(9.96 ± 1.39)%和 ITP 组(8.23 ± 0.55)%比较差异有统计学意义($F = 56.33, P < 0.05$) (图 4, 表 2)。



注：a 与对照组比较, $P < 0.01$; b 与 ITP 组比较, $P < 0.01$ 。

图 4 小鼠脾脏 $F4/80^+ CD11c^+$ M1 型和 $F4/80^+ CD206^+$ M2 型巨噬细胞比例变化

Notes: a Compared with the control group, $P < 0.01$; b Compared with the ITP group, $P < 0.01$.

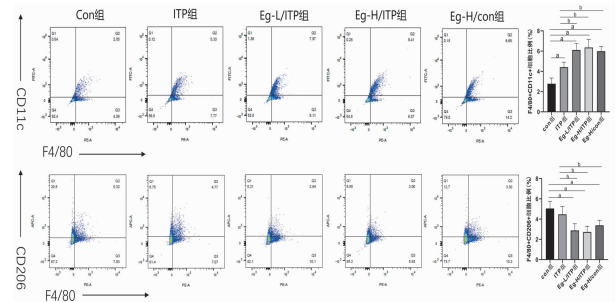
Fig. 4 Changes of $F4/80^+ CD11c^+$ M1 and $F4/80^+ CD206^+$ M2 macrophages subsets in spleen of mice

低、高剂量细粒棘球蚴感染 4 周继发 ITP 组小鼠外周血 $F4/80^+ CD11c^+$ M1 型巨噬细胞比例分别为(6.11 ± 0.66)%和(6.34 ± 0.79)%，与对照组(2.78 ±

0.56)%和 ITP 组(4.40 ± 0.49)%比较差异有统计学意义($F = 31.61, P < 0.05$)；外周血 $F4/80^+ CD206^+$ M2 型巨噬细胞比例分别为(2.88 ± 0.67)%和(2.72 ± 0.57)%，与对照组(5.05 ± 0.71)%和 ITP 组(4.47 ± 0.78)%比较差异有统计学意义($F = 12.17, P < 0.05$) (图 5, 表 2)。

表 2 小鼠脾脏及外周血 M1、M2 型巨噬细胞比例($\bar{x} \pm s, \%$)
Table 2 Proportion of M1 and M2 macrophages in spleen and peripheral blood of mice

细胞 Cell	Con组	ITP组	Eg-L/ITP组	Eg-H/ITP组	Eg-H/con组
脾脏 M1	6.90 ± 1.48	7.30 ± 1.20	11.12 ± 1.24	12.54 ± 1.73	9.95 ± 1.66
脾脏 M2	9.96 ± 1.39	8.23 ± 0.55	5.50 ± 0.78	4.63 ± 0.66	5.68 ± 0.81
外周血 M1	2.78 ± 0.56	4.40 ± 0.49	6.11 ± 0.66	6.34 ± 0.79	6.00 ± 0.47
外周血 M2	5.05 ± 0.71	4.47 ± 0.78	2.88 ± 0.67	2.72 ± 0.57	3.38 ± 0.50



注：a 与对照组比较, $P < 0.01$; b 与 ITP 组比较, $P < 0.01$ 。

图 5 小鼠外周血 $F4/80^+ CD11c^+$ M1 型和 $F4/80^+ CD206^+$ M2 型巨噬细胞比例变化

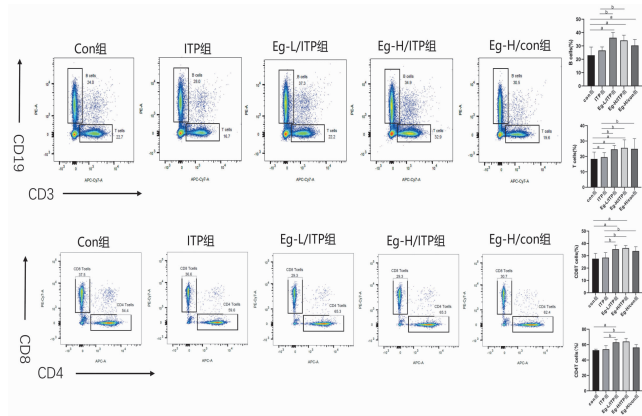
Notes: a Compared with the control group, $P < 0.01$; b Compared with the ITP group, $P < 0.01$.

Fig. 5 Changes of $F4/80^+ CD11c^+$ M1 and $F4/80^+ CD206^+$ M2 macrophages subsets in Peripheral blood of mice

4 小鼠脾脏淋巴细胞流式检测

流式检测低、高剂量细粒棘球蚴感染 4 周继发 ITP 组小鼠脾脏 T 细胞比例分别为(36.11 ± 3.99)%和(34.13 ± 3.88)%，与对照组(22.99 ± 6.16)%和 ITP 组(26.60 ± 2.63)%比较差异有统计学意义($F = 13.58, P < 0.05$)；B 细胞比例分别为(24.62 ± 2.45)%和(25.53 ± 5.24)%，与对照组(18.38 ± 4.46)%和 ITP 组(19.50 ± 2.94)%比较差异有统计学意义($F = 4.85, P < 0.05$)； $CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ T 细胞比例分别为(62.93 ± 3.89)%、(64.04 ± 4.14)%和(34.19 ± 3.82)%、(36.17 ± 2.10)%，与对照组

(52.79±1.31)%、(27.61±4.33)%和 ITP 组(53.94±4.59)%、(28.49±4.08)%比较差异均有统计学意义(F 值分别为 17.43 和 9.69, 均 $P<0.05$) (图 6, 表 3)。



注: a 与对照组比较, $P<0.01$; b 与 ITP 组比较, $P<0.01$ 。

图 6 小鼠脾脏组织 T、B 淋巴细胞及亚型细胞比例变化

Notes: a Compared with the control group, $P<0.01$; b Compared with the ITP group, $P<0.01$.

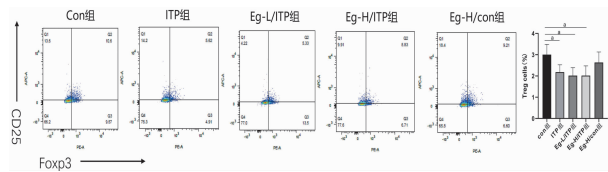
Fig. 6 Changes of T, B lymphocytes and subtype cells in spleen of mice

表 3 小鼠脾脏淋巴细胞及其亚群比例($\bar{x}\pm s, \%$)

Table 3 Proportion of spleen lymphocytes and their subsets in mice

细胞 Cell	Con 组	ITP 组	Eg-L/ITP 组	Eg-H/ITP 组	Eg-H/con 组
T	22.99±6.16	26.60±2.63	36.11±3.99	34.13±3.88	30.36±4.44
B	18.38±4.46	19.50±2.94	24.62±2.45	25.53±5.24	24.92±6.61
CD4 ⁺ T	52.79±1.31	53.94±4.59	62.93±3.89	64.04±4.14	56.29±3.77
CD8 ⁺ T	27.61±4.33	28.49±4.08	34.19±3.82	36.17±2.10	33.82±3.45
Treg	3.00±0.48	2.18±0.34	2.02±0.37	2.02±0.46	2.63±0.49

低、高剂量细粒棘球蚴感染 4 周继发 ITP 组和 ITP 组小鼠脾脏 Treg 细胞比例分别为 (2.02±0.37)%、(2.02±0.46)% 和 (2.18±0.34)%，与对照组 (3.00±0.48)% 比较差异有统计学意义 ($F=9.10$, $P<0.05$) (图 7, 表 3)。



注: 与对照组比较, a $P<0.05$ 。

图 7 小鼠脾脏组织 Treg 细胞比例变化

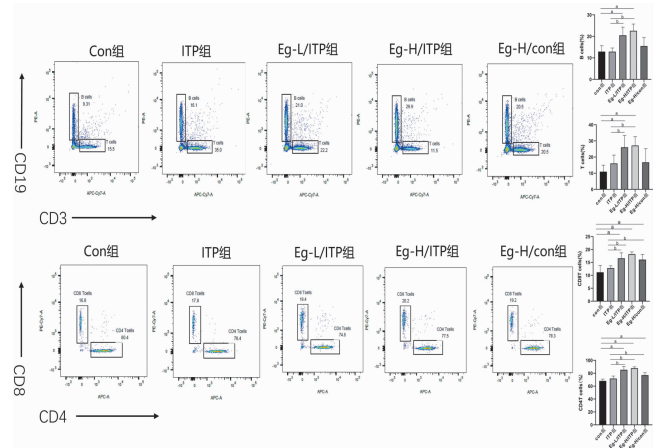
Notes: Compared with the control group, a $P<0.05$.

Fig. 7 Changes in the proportion of Treg cells in spleen of mice

5 小鼠外周血淋巴细胞流式检测

流式检测低、高剂量细粒棘球蚴感染 4 周继发 ITP 组小鼠外周血 T 细胞比例分别为 (20.46±3.83)% 和 (22.60±5.75)%，与对照组 (12.93±7.34)% 和 ITP 组 (12.88±1.71)% 比较差异有统计学意义 ($F=3.28$, $P<0.05$)；外周血 B 细胞比例分别为 (26.05±7.32)% 和 (27.17±5.49)%，与对照组

(10.95±4.03)% 和 ITP 组 (16.05±5.15)% 比较差异有统计学意义 ($F=4.91$, $P<0.05$)；外周血 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞比例分别为 (85.25±5.24)%、(87.72±2.14)% 和 (16.60±2.10)%、(18.20±0.86)%，与对照组 (68.22±2.69)%、(11.20±2.61)% 和 ITP 组 (71.80±3.80)%、(12.80±0.88)% 比较差异均有统计学意义 (F 值分别为 21.03 和 9.92, 均 $P<0.05$) (图 8, 表 4)。



注: a 与对照组比较, $P<0.01$; b 与 ITP 组比较, $P<0.01$ 。

图 8 小鼠外周血 T、B 淋巴细胞及亚型细胞比例变化

Notes: a Compared with the control group, $P<0.01$; b Compared with the ITP group, $P<0.01$.

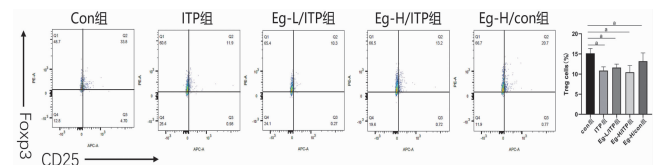
Fig. 8 Changes of T, B lymphocytes and subtype cells in peripheral blood of mice

表 4 小鼠外周血淋巴细胞及其亚群比例($\bar{x}\pm s, \%$)

Table 4 Proportion of peripheral blood lymphocytes and their subsets in mice

细胞 Cell	Con 组	ITP 组	Eg-L/ITP 组	Eg-H/ITP 组	Eg-H/con 组
T	12.93±7.34	12.88±1.71	20.46±3.83	22.60±5.75	15.48±4.03
B	10.95±4.03	16.05±5.15	26.05±7.32	27.17±5.49	16.76±8.45
CD4 ⁺ T	68.22±2.69	71.80±3.80	85.25±5.24	87.72±2.14	77.02±3.66
CD8 ⁺ T	11.20±2.61	12.80±0.88	16.60±2.10	18.20±0.86	16.10±2.00
Treg	15.15±1.19	10.88±0.93	11.60±0.84	10.45±1.69	13.20±2.05

低、高剂量细粒棘球蚴感染 4 周继发 ITP 组和 ITP 组外周血 Treg 细胞比例分别为 (11.60±0.84)%、(10.45±1.69)% 和 (10.88±0.93)%，与对照组 (15.15±1.19)% 比较差异有统计学意义 ($F=7.36$, $P<0.05$) (图 9, 表 4)。



注: 与对照组比较, a $P<0.05$ 。

图 9 小鼠外周血 Treg 细胞比例变化

Notes: Compared with the control group, a $P<0.05$.

Fig. 9 Changes in the proportion of Treg cells in peripheral blood of mice

讨 论

ITP经典的发病机制是自身抗体介导的血小板破坏增多,自身抗体结合于血小板膜糖蛋白产生标记,导致脾脏和血液中巨噬细胞表面的Fc γ 受体对标记后的血小板进行清除或破坏。本研究通过小鼠腹腔恒量注射大鼠抗小鼠CD41单克隆抗体建立被动ITP小鼠模型,通过外周血血小板计数确定该模型建立成功。为明确细粒棘球绦感染后体内巨噬细胞极化状态与ITP模型中吞噬血小板的巨噬细胞之间的关系,通过肝门静脉注射原头绦悬液的方式建立早期和晚期感染小鼠模型,肝脏病理切片观察细粒棘球绦感染组小鼠肝脏有寄生虫感染灶,感染灶周围炎症细胞浸润明显。外周血血小板计数显示细粒棘球绦感染小鼠4周的早期状态对ITP小鼠血小板无回升作用,但细粒棘球绦感染小鼠12周的晚期状态对ITP模型小鼠血小板具有一定的回升作用。提示细粒棘球绦晚期感染小鼠对ITP小鼠的血小板具有保护调节作用。通过流式细胞术检测各组小鼠脾脏和外周血中F4/80⁺CD11c⁺M1和F4/80⁺CD206⁺M2型巨噬细胞以及T、B淋巴细胞及其亚型细胞比例,结果显示细粒棘球绦早期感染小鼠脾脏和外周血中F4/80⁺CD11c⁺M1巨噬细胞比例升高,且F4/80⁺CD206⁺M2型巨噬细胞比例低于对照组和ITP组。表明M2型巨噬细胞在ITP小鼠模型中具有减轻致敏血小板的被吞噬作用,从而缓解ITP因血小板下降对机体产生的危害。

脾脏和外周血是机体发生免疫反应的重要场所,脾脏和外周血中含有大量淋巴细胞和巨噬细胞,在受到内外界刺激时会导致机体细胞免疫和体液免疫异常^[9]。T、B细胞是适应性免疫应答的重要免疫细胞。B细胞不仅能通过产生抗体发挥特异性体液免疫功能,也是重要的抗原提呈细胞。T细胞具有高度异质性,可分为不同的亚群,各亚群之间相互调节,共同发挥免疫功能。巨噬细胞作为机体抵御外界病原微生物感染的第一道防线,在宿主与寄生虫相互作用中发挥重要的调控作用^[10]。巨噬细胞作为重要的固有免疫细胞和抗原提呈细胞,在抗感染免疫中发挥关键的免疫激活和免疫效应作用^[11]。巨噬细胞根据环境刺激的不同可分化为M1和M2两个不同的方向。M1型巨噬细胞称为经典活化的巨噬细胞,M2型巨噬细胞称为替代活化的巨噬细胞。M1巨噬细胞的特征是能够产生大量的促炎细胞因子,协同刺激分子的表达增加,以及抗原提呈效率的提高。M2巨噬细胞通过产生抗炎细胞因子和更高水平的清道夫甘露糖受体来介导免疫调节功能^[12]。

ITP作为一种自身免疫性疾病,其Th1/Th2比例

比正常人高^[13]。机体免疫系统CD4⁺T细胞在人体多种自身免疫性疾病,如ITP的病理过程中发挥重要作用^[14]。Treg细胞是由固有的CD4⁺T细胞在多种细胞因子与信号转导作用下分化而成,Treg细胞的膜表面可过度表达CD25,胞内可特异性高表达Foxp3。因此可以CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺作为标记鉴别Treg细胞。Treg细胞具有免疫抑制活性,能够抑制细胞免疫应答和体液免疫应答,Treg细胞比例下降被证实与免疫性血小板减少症ITP的发生有关^[15]。T细胞介导的反应在包虫病的免疫学中发挥关键作用,T淋巴细胞以及CD4⁺T细胞是宿主对包虫病包虫包囊反应的主要炎症细胞^[16]。在细粒棘球绦感染的早期,中性粒细胞和巨噬细胞已被渗透,经典激活的M1巨噬细胞通过促进一氧化氮合酶的合成来有效杀灭病原体^[17]。小鼠棘球绦感染早期肝脏募集大量的M1型巨噬细胞介导对虫体的杀伤或清除,感染中晚期逐渐转变为M2型巨噬细胞,诱导宿主持续免疫耐受,促进寄生虫的慢性感染和长期寄生。细粒棘球绦感染晚期宿主界面分泌蛋白或排泄抗原,能够抑制M1型巨噬细胞的极化,转为M2型巨噬细胞,从而减弱巨噬细胞的吞噬功能和抗原提呈功能。对巨噬细胞表型和功能的转化进行干预,可为ITP发病机制中巨噬细胞的吞噬功能提供调节作用,寄生虫感染状态中巨噬细胞极化的调节为ITP的发病机制研究及治疗提供了新的思路。

【参考文献】

- [1] Wen R, Wang Y, Hong Y, et al. Cellular immune dysregulation in the pathogenesis of immune thrombocytopenia[J]. Blood Coagul Fibrinolysis, 2020, 31(2): 113-120.
- [2] Kistangari G, McCrae KR. Immune thrombocytopenia[J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2013, 27(3): 495-520.
- [3] 张爱军, 刘芹芹, 浦婷. 儿童免疫性血小板减少症的规范治疗与管理[J]. 临床儿科杂志, 2022, 40(2): 81-86.
- [4] 刘漫漫, 刘方媛, 刘禄社, 等. 原发免疫性血小板减少症患者骨髓组织中T细胞和巨噬细胞表达水平及临床意义[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2019, 33(2): 117-119.
- [5] Samson M, Fraser W, Lebowitz D. Treatments for primary immune thrombocytopenia: A review[J]. Cureus, 2019, 11(10): e5849.
- [6] Woolsey ID, Miller AL. *Echinococcus granulosus sensu lato* and *Echinococcus multilocularis*: A review[J]. Res Vet Sci, 2021, 135: 517-522.
- [7] Liu Y C, Zou XB, Chai YF, et al. Macrophage polarization in inflammatory diseases[J]. Int J Biol Sci, 2014, 10(5): 520-529.
- [8] Neschadim A, Branch DR. Mouse models for immune-mediated platelet destruction or immune thrombocytopenia (ITP)[J]. Curr Protoc Immunol, 2016, 113: 15.
- [9] 武娟, 齐文静, 张慧, 等. 咪唑氨基醇化合物H1402对棘球绦感染小鼠组织淋巴细胞及其亚群的影响[J]. 中国病原生物学杂志, 2022, 17(5): 502-508.

- [10] 侯娇,温浩,王明坤,等. 多房棘球蚴感染小鼠脾脏巨噬细胞亚群及其极化表型的变化[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2021,39(6):771-778.
- [11] Mosser DM,Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation[J]. Nat Rev Immunol,2008,8(12):958-969.
- [12] Murray PJ,Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets[J]. Nat Rev Immunol,2011,11(11):723-737.
- [13] Johnsen J. Pathogenesis in immune thrombocytopenia: New insights[J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program,2012,2012:306-312.
- [14] Roelvelde DM,Koenders MI. The role of the Th17 cytokines IL-17 and IL-22 in rheumatoid arthritis pathogenesis and developments in cytokine immunotherapy[J]. Cytokine,2015,74(1):101-107.
- [15] 焦汇楠. 免疫性血小板减少症患者外周血 CD4 + CD25 + CD127lowTreg 细胞与炎症因子、趋化因子的相关性研究[J]. 数理医药学杂志,2022,35(4):481-483.
- [16] Hou X,Shi Y,Kang X,et al. *Echinococcus granulosus*: The establishment of the metacestode in the liver is associated with control of the CD4(+) T-cell-mediated immune response in patients with cystic echinococcosis and a mouse model[J]. Front Cell Infect Microbiol,2022,12:983119.
- [17] Li B,Liu YM,Yan Y,et al. Effect of different types of macrophages on hepatic fibrosis in *Echinococcus granulosus* mice[J]. Biomed Pharmacother,2019,117:109178.
- 【收稿日期】 2023-04-23 【修回日期】 2023-07-13
-
- (上接 1057 页)
- [2] Gorski A,Midzybrodzki R,Wgrzyn G,et al. Phage therapy: Current status and perspectives[J]. Med Res Rev,2020,40(1):459-463.
- [3] 舒飞鸿,王达利,黄广涛. 不同给药途径在噬菌体治疗中的研究进展[J]. 重庆医学,2022,51(21):3743-3749.
- [4] 陈小慧. 杀死耐药细菌用上天然武器[N]. 深圳商报,2023-01-18(A03).
- [5] 岳昌武. 抗生素开发现状及策略[J]. 延安大学学报:医学科学版,2021,19(1):7.
- [6] Zhu Y,Huang WE,Yang Q. Clinical perspective of antimicrobial resistance in bacteria[J]. Infect Drug Res,2022,15:735-746.
- [7] 刘成程,胡小芳,冯友军. 细菌耐药:生化机制与应对策略[J]. 生物技术通报,2022,38(9):13.
- [8] 金凤. 噬菌体疗法:精准打击土传病原菌[N]. 科技日报,2023-02-09(006).
- [9] 梁冰纯,赵文鹏,韩博,等. 噬菌体治疗动物细菌感染性疾病的研究进展[J]. 中国兽医杂志,2023,59(1):107-110.
- [10] Ling H,Lou X,Luo Q,et al. Recent advances in bacteriophage-based therapeutics: Insight into the post-antibiotic era[J]. Acta Pharmaceutica Sinica B,2022,12(12):4348-4364.
- [11] Gordillo Altamirano FL,Barr JJ. Phage therapy in the postantibiotic era[J]. Clin Microbiol Rev,2019,32(2):e00066-18.
- [12] Hatfull GF,Dedrick RM,Schooley RT. Phage therapy for antibiotic-resistant bacterial infections[J]. Ann Rev Med,2022,73:197-211.
- [13] Lan M,Yap,Michael G,et al. Structure and function of bacteriophage T4[J]. Fut Microbiol. 2014;9(12):1319-1327.
- [14] Leiman PG,Arisaka F,van Raaij MJ,et al. Morphogenesis of the T4 tail and tail fibers[J]. Virol J,2010,7(1):355.
- [15] Miller ES,Elizabeth K,Gisela M,et al. Bacteriophage T4 genome [J]. Microbiol Mol Biol Rev,2003,67(1):199-201.
- [16] King J. Using T4 genetics and Laemmli's development of high-resolution SDS gel electrophoresis to reveal structural protein interactions controlling protein folding and phage self-assembly[J]. J Biol Chem,2022,298(10):102463.
- [17] Bartual SG,Otero JM,Garcia-Doval C,et al. Structure of the bacteriophage T4 long tail fiber receptor-binding tip[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2010,107(47):20287-20292.
- [18] Zhang K,Li X,Wang Z,et al. Systemic expression, purification, and initial structural characterization of bacteriophage T4 proteins without known structure homologs[J]. Front Microbiol,2021,12:674415.
- [19] Rakhuba DV,Kolomiets EI,Dey ES,et al. Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell[J]. Polish J Microbiol,2010,59(3):145-155.
- [20] Suga A,Kawaguchi M,Yonesaki T,et al. Manipulating interactions between T4 phage long tail fibers and *Escherichia coli* receptors[J]. Appl Environ Microbiol,2021,87(13):e0042321.
- [21] Hyman P,van Raaij M. Bacteriophage T4 long tail fiber domains [J]. Biophysical Rev,2018,10(2):463-471.
- [22] 李凡,于振兴,张明,等. 噬菌体受体结合蛋白及其宿主谱扩展的相关研究进展[J/OL]. 食品科学:1-14[2023-02-21].
- [23] 叶玲玲,钟佑宏,王鹏,等. 肌尾噬菌体科 T4 类噬菌体的研究进展[J]. 中国病原生物学杂志,2019,14(5):606-609.
- [24] Jin J,Li ZJ,Wang SW,et al. Isolation and characterization of ZZ1, a novel lytic phage that infects *Acinetobacter baumannii* clinical isolates[J]. BMC Microbiol,2012,12(1):1-8.
- [25] Jing J,Li ZJ,Wang SW,et al. Genome organisation of the *Acinetobacter* lytic phage ZZ1 and comparison with other T4-like *Acinetobacter* phages[J]. BMC Genomics,2014,15(1):1-14.
- 【收稿日期】 2023-03-15 【修回日期】 2023-06-02