

DOI:10.13350/j.cjpb.231011

• 论著 •

两型棘球蚴感染早期对肝组织自噬和肝巨噬细胞极化的影响*

艾柯代·卡得¹, 齐文静¹, 田梦潇¹, 吴川川¹, 张耀², 武娟¹, 张星星³, 李军^{2**}, 张文宝^{1,2**}

(1. 新疆医科大学基础医学院, 新疆乌鲁木齐 830011; 2. 中亚高发病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. 新疆医科大学第一附属医院儿科学院)

【摘要】 目的 明确细粒棘球蚴和多房棘球蚴感染早期对小鼠肝脏自噬相关蛋白及巨噬细胞极化的影响。方法 购雌性 BALB/C 小鼠 18 只, 随机分为实验组与对照组。实验组分别接种细粒棘球蚴和多房棘球蚴原头蚴, 感染 30 d 后解剖小鼠, 取肝脏, 切片, 通过 HE 染色观察两型棘球蚴感染后小鼠肝脏病理学变化, 利用免疫组化法和 Western blot 检测小鼠肝脏中自噬相关蛋白的表达, 采用流式细胞术检测肝脏 M1 和 M2 巨噬细胞比例。结果 感染细粒棘球蚴和多房棘球蚴 30 d 小鼠肝脏病灶面积和病灶数量存在差异, 免疫组化检测细粒棘球蚴和多房棘球蚴感染小鼠肝脏自噬相关蛋白 LC3、P62 相对表达量分别为 $(7.34 \pm 2.33)\%$ 、 $(15.19 \pm 8.37)\%$ 和 $(16.09 \pm 6.43)\%$ 、 $(11.46 \pm 3.81)\%$, 与对照组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。Western blot 检测显示多房棘球蚴感染组 LC3 蛋白表达量 $(1.08 \pm 0.20)\%$ 显著高于细粒棘球蚴感染组的 $(0.53 \pm 0.29)\%$ ($P < 0.05$)。细粒棘球蚴组和多房棘球蚴组的肝脏巨噬细胞比例分别为 $(29.20 \pm 8.05)\%$ 、 $(26.47 \pm 4.58)\%$, M1 型巨噬细胞比例分别为 $(42.93 \pm 20.76)\%$ 和 $(43.93 \pm 14.16)\%$, 均显著高于对照组。M2 型巨噬细胞比例分别为 $(9.45 \pm 2.61)\%$ 和 $(6.09 \pm 0.09)\%$, 显著低于对照组 ($P < 0.05$)。结论 细粒棘球蚴和多房棘球蚴早期感染均促进小鼠肝脏自噬相关蛋白的表达, 使巨噬细胞向 M1 型极化, 同时抑制 M2 型极化。自噬可能在早期参与减轻炎症反应, 帮助机体清除病原体。

【关键词】 细粒棘球蚴; 多房棘球蚴; 肝脏感染模型; 自噬相关蛋白; 巨噬细胞极化

【中图分类号】 R383.33

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)10-1169-06

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Oct;18(10):1169-1174.]

Effects of early infection with *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis* on autophagy and Macrophage cell polarization in liver

AIKEDAI Kade¹, Qi Wenjing¹, TIAN Mengxiao¹, WU Chuanchuan¹, ZHANG Yao², WU Juan¹, ZHANG Xingxing³, LI Jun², ZHANG Wenbao^{1,2} (1. Basic Medical College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. State Key Laboratory of Causes and Prevebtion of High Morbidity in Cebral Asia, The Frist Affiliated Hospital/Institute of Clinical Medicine, Xinjiang Medical University; 3. School of Pediatrics, The Frist Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University)***

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of early infection of *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis* on autophagy related proteins and macrophage polarization in mouse liver. **Methods** 18 female BALB/C mice were purchased and randomly divided into an experimental group and a control group. The experimental group was inoculated with protoscoleces of *E. granulosus* and *E. multilocularis* respectively. After 30 days of infection, mice were dissected, and their livers were sectioned. HE staining was used to observe the pathological changes; immunohistochemistry and Western blot were used to detect the expression of autophagy related proteins (LC3 and P62), and flow cytometry was used to detect the proportion of M1 and M2 macrophages in the liver of mice infected with two echinococcoses. **Results**

The results showed that there were differences in the pathological responses and number of liver lesions between mice infected with *E. granulosus* and *E. multilocularis* at 30 days of post-infection. Immunohistochemical detection revealed that LC3 was $(7.34 \pm 2.33)\%$ and $(15.19 \pm 8.37)\%$, P62 was $(16.09 \pm 6.43)\%$ and $(11.46 \pm 3.81)\%$ in the liver of mice infected with *E. granulosus* and *E. multilocularis*, respectively, which are statistical significance compared to the control group ($P < 0.05$). Western blot analysis showed that LC3 in *E. multilocularis* infected mice $(1.08 \pm 0.20)\%$ was significantly higher than that in mice infected with *E. granulosus* $(0.53 \pm 0.29)\%$ ($P < 0.05$). The proportion of

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目 (No. 81830066, 32072886, U1803282)。

** **【通讯作者】** 张文宝, E-mail: wenbaozhang2013@163.com; 李军, E-mail: 1742712944@qq.com

【作者简介】 艾柯代·卡得 (1995-), 女, 新疆阿图什人, 硕士研究生。研究方向: 棘球蚴病免疫与分子生物学。E-mail: 949693200@qq.com

liver macrophages was $(29.20 \pm 8.05)\%$ and $(26.47 \pm 4.58)\%$, and the proportion of M1 macrophages was $(42.93 \pm 20.76)\%$ and $(43.93 \pm 14.16)\%$, respectively in *E. granulosus* and *E. multilocularis* infected mice, which were significantly higher than that the control group ($P < 0.05$); The proportion of M2 macrophages was $(9.45 \pm 2.61)\%$ and $(6.09 \pm 0.09)\%$, respectively *E. granulosus* and *E. multilocularis* infected mice, which were significantly lower than that of the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Early infection with *E. granulosus* and *E. multilocularis* promotes the expression of autophagy related proteins in mouse livers, inducing M1 polarized macrophages which likely inhibit M2 macrophages. This mechanism may be involved in alleviating inflammatory reactions in the liver lesions and helping hosts to clean pathogens in the early stages.

【Key words】 *Echinococcus granulosus*; *Echinococcus multilocularis*; liver infection model; autophagy-related protein; macrophage polarization

棘球蚴病俗称包虫病,是棘球绦虫幼虫感染导致的人畜共患寄生虫病。该病在全世界范围流行,主要分布在以养羊和养牛为主的畜牧业地区^[1]。在我国有两种棘球蚴病,分别为由细粒棘球绦虫(*Echinococcus granulosus sensu stricto*, Eg)幼虫引起的细粒棘球蚴病(CE)和多房棘球绦虫(*Echinococcus multilocularis*, Em)幼虫引起的多房棘球蚴病(AE)^[2]。人感染细粒棘球蚴后,幼虫为单室包囊,囊内含有囊液(hydatid cyst fluid, HCF),生发囊和原头蚴。生发囊和原头蚴由囊壁内侧的生发层(germinal layer, GL)生成,其外围为无细胞结构的角质层(laminated layer, LL),与宿主组织有明显的界限^[3-4]。AE病灶周围没有明显的界限,其病灶为连续的炎症反应带,致使宿主肝坏死,坏死病灶可达到15~20 cm^[5]。感染的后期,CE病灶周围产生相对弱的病理反应。而AE成泡,病灶对宿主组织产生很强的病理反应,包含大量浸润的免疫细胞形成肉芽肿^[6]。

在炎症环境中,自噬(autophagy)可影响巨噬细胞的功能和状态,调控巨噬细胞的极化,参与调控炎症反应和免疫应答^[7]。自噬是真核细胞内清除细胞垃圾的过程,通过将待降解的分子转运至溶酶体或液泡内,使其被水解酶降解^[8]。自噬在真核生物进化中是一个相对保守的过程并维持着胞内环境的稳态,是细胞重要的免疫防御机制,在抗胞内寄生病原体免疫应答中发挥重要功能^[9]。本研究通过检测棘球蚴感染小鼠肝脏后自噬相关蛋白的表达及巨噬细胞极化情况,探讨棘球蚴感染组织中自噬蛋白的变化和对巨噬细胞极化的影响,为了解棘球蚴感染后对组织的影响机制,揭示寄生与宿主组织交互作用奠定基础。

材料与方法

1 材料

1.1 实验动物与棘球蚴标本来源 6周龄雌性BALB/c小鼠18只,体重为18~22 g,购于新疆医科大学实验动物中心。感染Eg原头蚴的新鲜绵羊肝脏采自乌鲁木齐屠宰场,Em来源于本实验保种传代的

长爪沙鼠。

1.2 主要试剂 LC3A/B多克隆兔抗鼠抗体和P62多克隆兔抗鼠抗体购自日本MBL公司;生物素标记的通用型二抗试剂盒购自北京中衫生物技术有限公司;凝胶试剂盒购自中国索莱宝公司;ECL试剂盒德泰生物科技有限公司;APC/cy7 Anti-Mouse CD45抗体,PE/CY-7 Rat Anti-Mouse CD11c抗体,Percp/cy5.5 Rat Anti-Mouse CD11b抗体,PE Rat Anti-Mouse F4/80抗体及APC Rat IgG2a CD206抗体购自美国Bio-legend公司。

2 方法

2.1 棘球蚴感染模型的建立与分组 取感染Eg原头蚴的新鲜绵羊肝脏,用流动清水冲洗干净,75%乙醇消毒表面,用注射器从包囊中抽取源头蚴,无菌纱布过滤去除杂质,然后用无菌PBS漂洗5~6遍至液体澄清,用Hanks液配制的1%胃蛋白酶(pH 2.0)37℃分消化15 min,用PBS以1 500 r/min(离心半径10 cm)离心洗涤沉淀3次,5 min/次。将感染多房棘球蚴的保种沙鼠用CO₂窒息处死,浸入75%乙醇中进行体表灭菌。将多房棘球蚴组织取出,用生理盐水冲洗。然后用剪刀将多房棘球蚴组织剪碎,放入研钵中研磨,过滤后自然沉淀,沉淀用70目的尼龙网过滤至50 mL离心管中再自然沉淀。将收集的PSCs合并,加入终浓度为1%的胃蛋白酶中,37℃消化30 min,消化结束后用生理盐水再洗3~5次,以去除角质层碎片和未成熟或活力不好的PSCs^[10]。加入生理盐水重悬,取10 μL滴于载玻片,计数原头蚴,活力超过95%的原头蚴备用。将18只雌性BALB/c小鼠随机分成对照组(6只),Eg组(6只)和Em组(6只)。Eg组小鼠每只经肝门静脉注射细粒棘球绦虫原头蚴2 000只(100 μL),Em组小鼠每只经肝门静脉注射多房棘球绦虫源头蚴2 000只(100 μL)。对照组小鼠每只注射等体积的生理盐水。

2.2 标本采集 接种30 d后麻醉小鼠,剖腹,游离暴露肝门静脉和下腔静脉,取出肝脏组织,一部分放入4%多聚甲醛溶液中固定,剩余肝叶放入含DEME培

养皿中备用。

2.3 肝脏组织病理学检查 取多聚甲醛固定的小鼠肝组织进行修剪脱水、石蜡包埋、切片、烤片、脱蜡至水、苏木素-伊红染色、封片,显微镜下观察肝脏组织病理学变化^[10]。根据炎症反应和病灶面积分为4级:0,无任何感染病变;1,视野中的病灶及细胞炎症带<25%;2,视野中的病灶及细胞炎症带在25%~50%之间;3,视野中的病灶及细胞炎症带>50%。

2.4 免疫组化法检测肝脏组织自噬相关蛋白 LC3、P62 的表达 肝组织经烤片、脱蜡至水后于柠檬酸盐缓冲液中 95 °C 微波修复 15 min,3% H₂O₂ 室温孵育 15 min,用山羊血清工作液封闭 20 min。去掉血清,分别滴加 LC3、P62 多克隆抗体为一抗,4 °C 孵育过夜,室温复温 1 h,二抗室温孵育 1.5 h,PBS 洗涤,DAB 室温显色,苏木素复染,于 100 倍光镜下每片随机选取 5 个不同视野,分别采集图像,使用 ImageJ 软件分析阳性表达面积百分比,计算 LC3、P62 蛋白相对表达量。

2.5 Western blot 检测肝脏组织自噬相关蛋白 LC3、P62 的表达 提取小鼠肝组织蛋白,采用 BCA 蛋白定量法检测蛋白浓度,以保证各组样品上样量相同。待测蛋白与 5× 上样缓冲液按 4:1 混合,100 °C 变性 10 min。每组取相同体积蛋白进行 SDS-PAGE 分离,然后电转移至 PVDF 膜上,再用含 5% 脱脂奶粉在摇床上室温封闭 1 h,TBST 缓冲液漂洗。分别加入 LC3-II、P62 和 GAPDH 抗体为一抗(1:1 000)4 °C 孵育过夜,TBST 漂洗 PVDF 膜 4 次,每次 10 min。加入封闭液稀释的相应 II 抗(1:2 000),常温下孵育 1 h,TBST 漂洗 PVDF 膜 3 次,每次 10 min。加入 ECL 发光试剂在曝光仪中进行曝光,采用 Image Station 2000R 图像工作站采集图像进行灰度分析。试验以 GAPDH 为内参照并重复 3 次。

2.6 流式细胞术检测肝脏巨噬细胞 M1、M2 表达情况 将小鼠肝脏放在 200 目钢丝网上自边缘开始研磨,研磨液转至 15 mL 离心管中(200 目尼龙网过滤),1 500 r/min 离心 5 min,弃上清,如果杂质较多可重复洗一次。用 8 mL 40% percoll 溶液重悬沉淀,(2 000 r/min,离心 20 min,4 °C),弃去上清。用 2 mL 红细胞裂解液重悬沉淀,4 °C 冰箱裂解 10 min 后加入 1× PBS,2 000 r/min 离心 5 min,收集细胞(若沉淀中仍有大量红细胞须再重复裂解)。用 2 mL 1× PBS 重悬细胞,过滤至新的 15 mL 离心管中。吸取 10 μL 细胞悬液,按照 1:1 的比例与台盼蓝混合后计数。取约 1×10⁶ cells 至 1.5 mL EP 管中,6 000 r/min 离心 2 min,收集细胞,用 30 μL CD16/32(0.3 μL CD16/32 30 μL PBS)进行封闭,4 度避光孵育 15~20 min。加

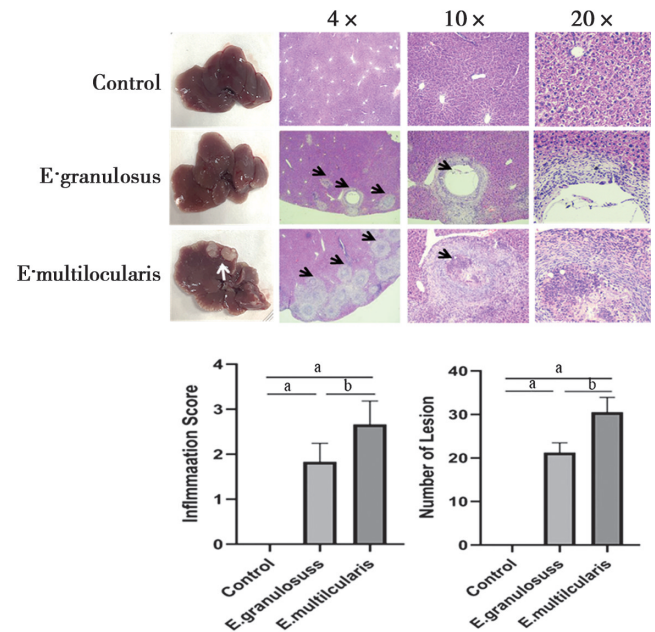
入稀释的荧光标记抗体 30 μL,4 度避光孵育 15~20 min。留少许液体重悬细胞,加入用 1× perm buffer (30 μL)配制的内标抗体,室温孵育 45 min。加入 1× PBS,室温 2 000 r/min 离心 5 min 然后 9 500 r/min 离心 2 min,吸去上清,加入适当体积的 1× PBS 重悬,过滤后转管上机检测,采用 Flow-Jo 分析检测结果。

2.7 统计学分析 使用 SPSS 22.0 和 GraphPad Prism8 进行统计学分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两组间差异比较采用 *t* 检验, $P<0.05$ 差异有统计学意义

结果

1 两型棘球蚴感染小鼠肝脏组织病理学特征

两型棘球蚴感染 30 d 后的小鼠肝脏表面均可见不透明黄灰色点状病灶,整个肝脏充满不透明黄灰色点状病灶,直径大小约 1 mm,且 Em 感染小鼠点状病灶数量较 Eg 感染小鼠多。部分 Em 感染小鼠肝脏可见直径 1~3 mm 的小囊泡(图 1)。对照组小鼠肝脏无任何明显病灶。



注:a 表示与对照组比较, $P<0.05$,b 表示模型组之间比较, $P<0.05$ 。

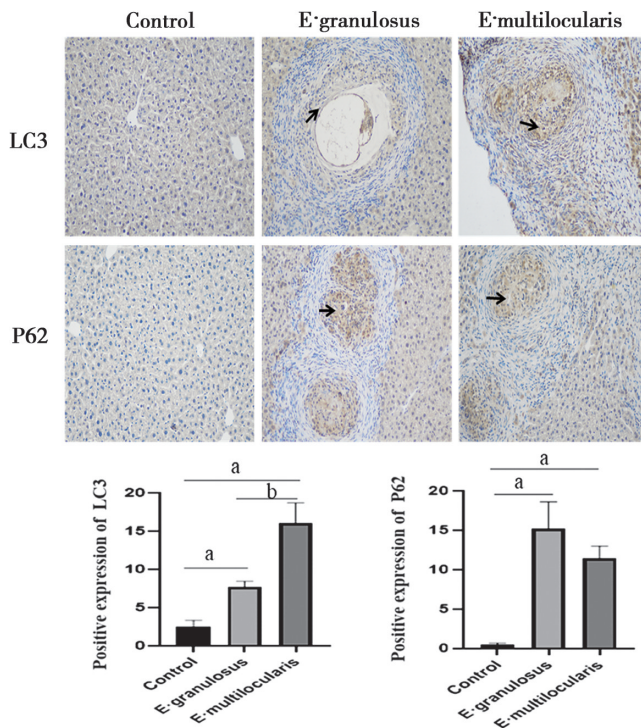
图 1 Eg 和 Em 感染 30 d 小鼠肝脏病理变化 (H&E 染色,4×,10×,200×)

Notes:a indicates comparison with control group, $P<0.05$,b indicates comparison between model group, $P<0.05$.

Fig. 1 pathological changes (h & E staining) of the liver at 30 days after infection with Eg and Em

肝组织切片 HE 染色后于显微镜下观察组织病理学变化,结果如图 2。感染后 30 d,Eg 感染小鼠肝脏病灶周围产生很弱的病理反应,病灶与宿主组织间有明显的界限,且病灶基本无突出的组织损伤,炎症细胞种类及数量都较少,无明显组织损伤。Em 感染小鼠

的肝脏局部坏死,肝小叶结构紊乱,汇管区有炎性细胞浸润,有纤维化反应伴有炎性细胞浸润,周围有大量的炎性细胞浸润;肝脏急性炎症反应增强,肝细胞肿大,汇管区有大量炎性细胞浸润,包括淋巴细胞、巨噬细胞、浆细胞和嗜酸性粒细胞。周围炎性细胞浸润进一步加重,纤维组织大量增生,可见多个空泡状结构,呈多蜂窝状空腔,周围存在大量的慢性炎症细胞浸润,以淋巴细胞、巨噬细胞和粒细胞等为主;在炎症带周围有大量的肝细胞部分发生坏死,与宿主组织无明显界限。对照组小鼠肝小叶结构完整,肝细胞边界清晰,排列整齐,偶见肝细胞质疏松化和炎性细胞聚集。



注:a表示与对照组比较, $P < 0.05$,b表示模型组之间比较, $P < 0.05$ 。

图2 免疫组化检测Eg和Em感染30d小鼠肝脏自噬相关蛋白LC3、P62的表达

Notes:a indicates comparison with control group, $P < 0.05$,b indicates comparison between model group, $P < 0.05$.

Fig. 2 Expression levels of autophagy-related proteins LC3 and P62 in the liver of Eg and Em infected for 30 days.

分别统计Eg和Em感染小鼠30d后肝脏中的病灶数量,结果显示Em感染小鼠肝脏病灶多于Eg感染小鼠($P < 0.05$)。Em感染小鼠肝脏组织的炎症反应面积也大于Eg感染小鼠($P < 0.05$)。

2 棘球蚴感染小鼠肝脏组织自噬相关蛋白表达情况

免疫组化检测显示对照组小鼠肝脏中较少表达或基本不表达LC3、P62蛋白。Eg和Em感染小鼠肝脏自噬相关蛋白LC3、P62蛋白表达量分别为(7.34 ± 2.33)%、(15.19 ± 8.37)%和(16.09 ± 6.43)%、(11.46 ± 3.81)% ,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。且Em感染组LC3表达量高于Eg感染组(P

< 0.05)。观察免疫组化切片,LC3与P62在Em感染病灶中的表达多在炎症带中表达,可能是病灶中的棘球蚴自噬能力较强,而周围炎症带炎性细胞受损坏死,所以自噬活性较低(图2,表1)。

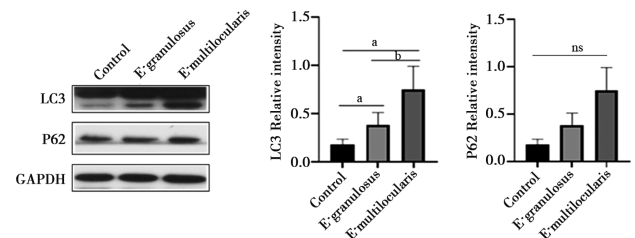
表1 免疫组化法检测两型棘球蚴感染小鼠肝脏组织自噬相关蛋白的相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 comparison of the relative expression levels of autophagy-related proteins in mouse liver tissues

组别 Group	小鼠只数 No. of mice	LC3(%)	P62(%)
对照组	6	0.58 ± 0.32	0.49 ± 0.47
Eg感染组	6	7.34 ± 2.33	15.19 ± 8.37
Em感染组	6	16.09 ± 6.43	11.46 ± 3.81

3 棘球蚴感染小鼠肝脏组织自噬相关蛋白表达情况

采用Western blot检测棘球蚴感染小鼠肝组织中LC3和P62蛋白质表达水平的变化,结果如图3。Eg和Em感染小鼠30d后,肝脏组织中LC3和P62蛋白表达水平均较对照组显著升高(均 $P < 0.05$),且Em感染组高于Eg感染组($P < 0.05$)。LC3增加说明自噬小体增多。同时,较高的P62蛋白表达水平表明Eg相较于Em有更强的自噬诱导能力(图3,表2)。



注:a表示与对照组比较, $P < 0.05$,b表示模型组之间比较, $P < 0.05$ 。ns表示差异无统计学意义。

图3 Western blot检测Eg和Em感染30d小鼠肝脏自噬相关蛋白LC3、P62的表达

Note:a indicates comparison with control group, $P < 0.05$,b indicates comparison between model group, $P < 0.05$,ns showed no significant difference.

Fig. 3 Western blotting was used to detect the expression of autophagy-related proteins LC3 and P62 in the liver of Eg and Em infected for 30 days

表2 Western blot检测两型棘球蚴感染小鼠肝脏组织自噬相关蛋白LC3、P62蛋白的表达量($\bar{x} \pm s$)

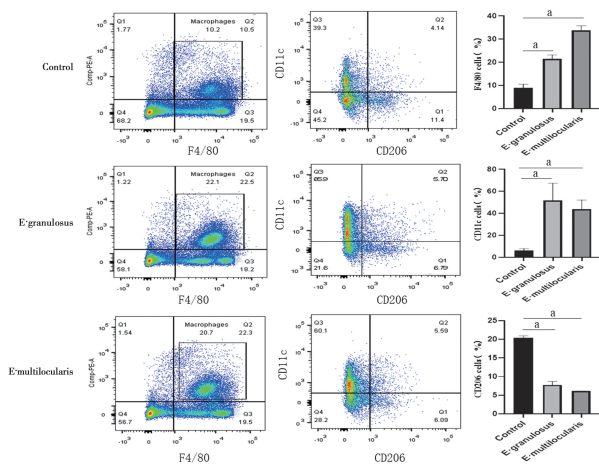
Table 2 expression of autophagy-related proteins LC3 and P62 in mouse liver

组别 Group	小鼠只数 No. of mice	LC3(%)	P62(%)
对照组	6	0.22 ± 0.05	0.63 ± 0.35
Eg感染组	6	0.53 ± 0.29	0.60 ± 0.33
Em感染组	6	1.08 ± 0.20	0.56 ± 0.32

4 棘球蚴感染小鼠肝脏巨噬细胞M1、M2表达情况

肝脏是棘球蚴寄生的主要器官,尤其是多房棘球蚴的原发性感染几乎100%在肝脏。流式细胞检测显示,Eg和Em感染小鼠肝脏巨噬细胞以及M1、M2比

例分别为(21.47±3.00)%、(51.77±27.08)%、(7.78±1.54)%和(33.87±3.33)%、(43.93±14.16)、(6.09±0.09)%，与对照组比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$) (图4, 表3)。



注: a 表示与对照组比较, $P < 0.05$, b 表示模型组之间比较, $P < 0.05$ 。ns 表示差异无统计学意义。

图4 Eg 和 Em 感染 30 d 小鼠肝脏巨噬细胞流式检测

Note: a indicates comparison with control group, $P < 0.05$, b indicates comparison between model group, $P < 0.05$.

Fig. 4 The number of hepatic macrophages 30 days after infection with Eg and Em

表3 流式细胞术检测两型棘球蚴感染小鼠肝脏巨噬细胞以及 M1、M2 比例(±s)

Table 3 Expression of M1 and M2 in mouse liver macrophages

组别 Group	小鼠只数 No. of mice	巨噬细胞 (%) Macrophages	M1 型巨噬细胞 (%) M1 macrophages	M2 型巨噬细胞 (%) M2 macrophages
对照组	6	9.62±1.55	8.84±5.50	18.53±2.39
Eg 感染组	6	26.47±4.58	42.93±20.76	9.45±2.61
Em 感染组	6	29.20±8.05	43.93±14.16	6.09±0.09

讨论

包虫病是棘球蚴幼虫感染所导致的危害严重的人畜共患寄生虫病。寄生虫是除细菌、病毒之外的一类重要病原体,棘球蚴作为外源性病原体,可长期寄生在宿主体内,刺激宿主细胞,诱发机体复杂的免疫反应^[11],而棘球蚴是如何逃避宿主的正常免疫杀伤作用得以存活并引起病理损伤的问题成为近年来包虫病研究的热点之一。宿主细胞在感染和消除感染之间保持一种平衡,巨噬细胞作为机体免疫应答中重要的组成部分发挥重要作用^[10]。棘球蚴感染宿主后,机体的正常免疫系统会杀伤病原体而起到免疫防御作用,而巨噬细胞具有吞噬、抗原提呈和分泌多种细胞因子的功能,是机体抗寄生虫感染的主要效应细胞^[12-13]。

本研究通过流式细胞术检测两型棘球蚴感染早期小鼠肝脏巨噬细胞 M1、M2 变化情况,结果显示棘球蚴感染后肝脏巨噬细胞数量增多,尤其是多房棘球蚴

感染小鼠肝脏巨噬细胞比细粒棘球蚴感染小鼠肝脏巨噬细胞多,说明当寄生虫进入宿主体内后,在形成的 AE 病灶周围募集大量的炎症细胞如巨噬细胞,淋巴细胞,中性粒细胞和嗜酸性粒细胞等。从细胞水平来讲,AE 募集免疫细胞的能力远高于 CE,从而导致多房棘球蚴感染小鼠肝脏巨噬细胞比细粒棘球蚴感染小鼠肝脏巨噬细胞多。M1 型巨噬细胞数量在细粒棘球蚴和多房棘球蚴感染中都是增多的趋势,而 M2 型巨噬细胞数量相较于对照组呈降低的趋势,Zhu 等^[14]在研究感染血吸虫的小鼠时发现,不同感染阶段 M1/M2 巨噬细胞的百分比发生了改变,提示血吸虫感染过程存在巨噬细胞的表型转换^[15]。病原体入侵机体时,巨噬细胞被准确极化成 M1 型,产生大量炎症因子,杀死入侵的生物体并激活适应性免疫^[16]。

自噬也是巨噬细胞吞噬和杀伤入侵生物体的重要调控机制之一。巨噬细胞可通过对入侵细胞的内吞作用形成自噬体结构,再与溶酶体结合形成吞噬溶酶体,从而杀伤清除细菌等外来病原体^[17]。自噬是一个动态的过程,自噬体不断地形成和消失。目前认为,在哺乳动物细胞中 LC3B 在自噬体和自噬小体的形成中起重要作用,LC3B 的量与自噬小体数量密切相关,是反应自噬活性的关键指标,P62 是一种泛素化底物,作为一种调节因子参与自噬体的形成,在自噬的中晚期被降解,LC3B 增加说明自噬小体增加,如果同时伴有 P62 的减少说明自噬活性增强,如果 P62 也增加则提示下游自噬溶酶体的形成被抑制,导致巨噬细胞向 M1 方向极化^[18]。除此之外,自噬还可通过调控巨噬细胞的极化参与调控炎症反应和免疫应答。Sahu 等^[19]报道在抗结核分枝杆菌感染的免疫过程中,自噬活性增强与巨噬细胞 M1 极化有关,而自噬活性减弱与巨噬细胞的 M2 极化有关。本研究通过免疫组化和 Western blot 检测自噬相关蛋白 LC3 和 P62,结果显示与正常对照组相比棘球蚴感染 30 d 后肝组织自噬相关蛋白 LC3、P62 的表达量均增高,表明此时自噬被激活,同时巨噬细胞向 M1 方向极化,这可能是机体在通过激活自噬来抑制或消除病原体,保护机体免受病原体的侵害。而多房棘球蚴感染组的 LC3 蛋白表达量高于细粒棘球蚴感染组,可能与多房棘球蚴感染组小鼠肝脏病灶周围募集大量的炎症细胞和在肝脏中形成的聚集性囊泡有关。囊泡不断向周围正常组织呈现浸润型增殖生长,囊泡内也会源源不断的产生大量囊液,持续分泌的囊液会渗漏到肝脏组织内部,引起剧烈的病理学反应,宿主通过激活自噬的方式来保护机体免受病原体的危害。引起这一差异的原因也有可能是宿主的胃肠道内含有大量高浓度的蛋白酶,这些蛋白酶会对棘球蚴感染造成一定影响。根据课题组前期蛋

白组学的研究我们猜测丝氨酸蛋白酶抑制剂(Serpin, SPN)可能在包虫-宿主界面的炎症反应中发挥了重要作用。结合细粒棘球蚴、多房棘球蚴两种病理学表型可以看出 Eg 在病灶周围募集免疫细胞的能力明显不及 Em。Em 的病灶周围募集了大量的炎症细胞,推测 SPN 的差异化表达可能与两型包虫病不同的宿主界面的炎症反应有关,可能是由于 Eg SPN 的低表达,病灶周围补体少,募集趋化的炎症细胞少,肉芽肿病变组织少。Em SPN 高表达,抑制了丝氨酸蛋白酶(Serine Protease, SP)的活性,病灶组织周围补体多,故而炎症反应强烈,导致 EM 自噬表达增高,巨噬细胞向 M1 方向极化。免疫组化检测显示自噬相关蛋白在病灶中央的表达多于炎症带中的表达,这是否说明病灶及病灶中的囊蚴存在自噬,而病灶周围的炎症带可能不存在自噬或者很少发生自噬,推测可能是在棘球蚴绦虫侵袭组织的应激环境中细胞通过降解自身的非必需成分来提供能量和营养,病灶周围的炎症带由于遭到寄生虫的破坏,相关蛋白可能已损伤变性而无法被标记,导致炎症带中自噬蛋白的表达降低。

综上所述,小鼠感染棘球蚴后一方面通过上调 M1 型巨噬细胞的表达释放大量的促炎因子发挥促炎作用以帮助机体清除病原体,另一方面通过上调自噬相关蛋白的表达激活自噬从而帮助抑制或消除病原体,保护机体免受病原体的侵害。关于两型棘球蚴致病机制的差异化有待进一步研究。

【参考文献】

- [1] Yang Y, Wen Yj, Cai YN, et al. Serine proteases of parasitic helminths[J]. Kor J Parasitol, 2015, 53(1): 1-11.
- [2] 魏玲,程小艳,李宝明,等. 丝氨酸蛋白酶抑制剂在肿瘤细胞迁移中的作用[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(12): 1518-1523.
- [3] Boros E, Sebak F, Heja D, et al. Directed evolution of canonical loops and their swapping between unrelated serine proteinase inhibitors disprove the interscaffolding additivity model[J]. Mol Biol, 2019, 431(3): 557-575.
- [4] 盖文燕,王君玮,付宝权. 寄生性蠕虫丝氨酸蛋白酶抑制剂研究进展[J]. 中国动物检疫, 2015, 32(3): 57-61.
- [5] Gottstein B, Wang J, Boubaker G, et al. Susceptibility versus resistance in alveolar echinococcosis (larval infection with *Echinococcus multilocularis*) [J]. Vet Parasitol, 2015, 213(3-4): 103-109.
- [6] Bakhtiar NM, Spotin A, Mahami M, et al. Recent advances on innate immune pathways related to host-parasite cross-talk in cystic and alveolar echinococcosis[J]. Parasit Vectors, 2020, 13(1): 232.
- [7] Wu Y, Cui J. Selective Autophagy regulates innate immunity through cargo receptor network[J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1209: 145-166.
- [8] Rockel JS, Kapoor M. Autophagy: controlling cell fate in rheumatic diseases[J]. Nat Rev Rheumatol, 2016, 12(9): 517-531.
- [9] Kroemer G. Autophagy: a druggable process that is deregulated in aging and human disease[J]. Clin Invest, 2015, 125(1): 1-4.
- [9] Yuk JM, Yoshimori T, Jo EK. Autophagy and bacterial infectious diseases[J]. Exp Mol Med, 2012, 44(2): 99-108.
- [10] Liu Y, Tian F, Shan J, et al. Kupffer cells: Important Participant of hepatic alveolar echinococcosis[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 10: 8.
- [11] Weiss AT, Bauer C, Kohler K. Canine alveolar echinococcosis: morphology and inflammatory response[J]. Comp Pathol, 2010, 143(4): 233-238.
- [12] 王鸿,李文桂. 泡型包虫病免疫发病机制研究进展[J]. 地方病通报, 2006(01): 98-100.
- [13] Geissmann F, Manz MG, Jung S, et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells[J]. Science, 2010, 327(5966): 656-661.
- [14] Zhu J, Xu Z, Chen X, et al. Parasitic antigens alter macrophage polarization during *Schistosoma japonicum* infection in mice[J]. Parasit Vectors, 2014, 7: 122.
- [15] Xu J, Zhang H, Chen L, et al. *Schistosoma japonicum* infection induces macrophage polarization[J]. Biomed Res, 2014, 28(4): 299-308.
- [16] 阮静瑶,陈必成,张喜乐,等. 巨噬细胞 M1/M2 极化的信号通路研究进展[J]. 免疫学杂志, 2015, 31(10): 911-917.
- [17] Siqueira MDS, Ribeiro RM, Travassos LH. Autophagy and its interaction with intracellular bacterial pathogens[J]. Front Immunol, 2018, 9: 935.
- [18] 魏砚明,任晋宏,栾智华. 多种细胞自噬调节剂对自噬标记物 LC3 II 及 p62 表达的影响[J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(3): 341-347.
- [19] Sahu SK, Kumar M, Chakraborty S, et al. MicroRNA 26a (miR-26a)/KLF4 and CREB-C/EBP β regulate innate immune signaling, the polarization of macrophages and the trafficking of *Mycobacterium tuberculosis* to lysosomes during infection[J]. PLoS Pathog, 2017, 13(5): e1006410.

【收稿日期】 2023-05-23 【修回日期】 2023-07-15