

DOI:10.13350/j.cjpb.220502

• 论著 •

卡唑氨基醇化合物 H1402 对棘球蚴感染小鼠组织淋巴细胞及其亚群的影响^{*}

武娟¹, 齐文静², 张慧¹, 吴川川¹, 焦红杰³, 黎飞海⁴, 艾柯代·卡得¹, 帕力塔吉·麦提祖农¹,张星星³, 田梦潇¹, 龚巧巧¹, 刘丽英⁴, 吾丽凡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; 4. 新疆医科大学公共卫生学院)

【摘要】 目的 分析卡唑氨基醇化合物 H1402 对棘球蚴感染小鼠的淋巴细胞及其亚群的影响。 **方法** 分别采集细粒棘球绦虫和多房棘球绦虫原头蚴, 经肝门静脉接种建立感染小鼠模型。建模 60 d 后, 分别用低剂量(50 mg/kg)和高剂量(80mg/kg)H1402 每天灌胃干预两种棘球蚴病小鼠 30 d。灌胃结束 4 周后留存肝组织观察病理变化, 分离肝脏、脾脏和血液淋巴细胞, 用流式细胞术检测小鼠组织淋巴细胞。 **结果** H1402 治疗后棘球蚴感染小鼠肝脏病灶大小和数量减少, 病理结果显示炎症反应减弱($P < 0.05$)。多房棘球蚴感染治疗组中, H1402 高剂量组肝 B 细胞比例($24.35 \pm 7.46\%$)明显高于感染模型组($17.74 \pm 4.57\%$)($P < 0.05$); 肝脏 T 细胞($1.15 \pm 1.14\%$), 包括 Treg, CD4⁺T, CD8⁺T 和活化的 T 细胞比例 H1402 高剂量组明显低于低剂量组($36.00 \pm 5.68\%$)($P < 0.05$)。脾脏 T 细胞比例 H1402 高剂量组($22.86 \pm 12.49\%$)显著低于低剂量组($46.29 \pm 7.22\%$)和感染模型组($42.16 \pm 7.44\%$)($P < 0.05$)。在血液中活化的 T 细胞比例, 尤其是 CD8⁺T 细胞比例 H1402 高剂量组($16.62 \pm 5.72\%$)显著低于低剂量组($34.63 \pm 5.06\%$)($P < 0.05$); B 细胞比例尤其是活化的 B 细胞 H1402 低剂量组($0.32 \pm 0.06\%$)显著低于感染模型组($0.74 \pm 0.21\%$)($P < 0.05$)。细粒棘球蚴感染小鼠, 肝脏 T 细胞, 包括 Treg 和 CD8⁺T 细胞均明显高于空白组, CD8⁺T 细胞比例 H1402 高剂量组($40.54 \pm 7.22\%$)显著高于模型组($9.88 \pm 5.93\%$)($P < 0.05$)。脾脏 T 细胞比例尤其是活化的 T 细胞均明显低于空白组($P < 0.05$)。血液淋巴细胞 CD4⁺T 细胞比例 H1402 高剂量组($31.59 \pm 27.94\%$)显著降低($P < 0.05$)。 **结论** H1402 对棘球蚴感染治疗有效, 明显降低多房棘球蚴和细粒棘球蚴感染肝脏和脾脏的 T 细胞比例, 多房棘球蚴感染小鼠药物干预后活化的 CD4⁺T 细胞和活化的 CD8⁺T 细胞比例上升, 可能参与免疫调节, 抑制多房棘球蚴的病理反应。

【关键词】 细粒棘球蚴; 多房棘球蚴; 卡唑氨基醇; 小鼠; 淋巴细胞; 肝脏**【中图分类号】** R383.33**【文献标识码】** A**【文章编号】** 1673-5234(2022)05-0502-07

[Journal of Pathogen Biology. 2022 May;17(5):502-508.]

The impact of carbazole aminoalcohol H1402 on lymphocytes in mice infected with *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis*

WU Juan¹, QI Wen-jing², ZHNAG Hui¹, WU Chuan-chuan¹, JIAO Hong-jie³, LI Fei-hai⁴, KADE Aikedai¹, MAIMAITIZUNONG Palitaji¹, ZHANG Xing-Xing³, TIAN Meng-xiao¹, GONG Qiao-qiao¹, LIU Li-ying⁴, WU Li-fan³, LI Jun², ZHANG Wen-bao^{1,2} (1. Basic Medical College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. State Key Laboratory of Causes and Prevention of High Morbidity in Central Asia, The First Affiliated Hospital/Institute of Clinical Medicine, Xinjiang Medical University; 3. School of Pediatrics, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University; 4. School of Public Health, Xinjiang Medical University) **

【Abstract】 Objective To determine the efficiency of carbazole aminoalcohol H1402 against both cystic echinococcosis and alveolar echinococcosis and the impact of the component on lymphocytes in a mouse model infected with *Echinococcus multilocularis* and *E. granulosus*. **Methods** C57 mice were infected with protoscoleces of *E. multilocularis* and *E. granulosus* via hepatic portal vein. After 60 days of infection, 50mg/kg (low-dose, H1402-L) and 80mg/kg (high-dose, H1402-H) of H1402 were orally given daily respectively for 30 days. The mice were rest for 4 weeks without any intervention before biopsy and the partial liver tissues were fixed for H&E staining. The livers, spleens and blood of the mice were collected for lymphocytes analysis by flow cytometry. **Results** H1402 treatment reduced the size and number of

^{*} **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. U1803282, 81830066, 32072886)。^{**} **【通讯作者】** 张文宝, E-mail: wenbaozhang2013@163.com, 李 军, E-mail: 1742712944@qq.com**【作者简介】** 武 娟(1996-), 女, 陕西延安人, 硕士研究生, 研究方向为包虫病药物治疗与免疫。E-mail: 664659711@qq.com

liver lesions in a dose-dependent pattern. H&E staining showed that H1402 decreased the inflammatory response in both *E. multilocularis* and *E. granulosus* lesions ($P < 0.05$). H1402-H significantly induced a higher percentage of B cells (24.35 ± 7.46)% compared to the cells in the infection control mice (17.74 ± 4.57)% ($P < 0.05$). However, the drug decreased liver T cells (1.15 ± 1.14)%, including Treg, $CD4^+$ T, $CD8^+$ T and activated T cells (36.00 ± 5.68)% ($P < 0.05$). The proportion of spleen T cells including activated T cells in H1402-H group (22.86 ± 12.49)% was significantly lower than that in the low-dose group (46.29 ± 7.22)% and the infection control group (42.16 ± 7.44)% ($P < 0.05$). In blood profile analysis, the proportion of activated T cells, especially $CD8^+$ cells in the H1402-H group (16.62 ± 5.72)% was significantly lower than that in the low-dose group (34.63 ± 5.06)% ($P < 0.05$). B cells ratio, especially the activated B cells H1402-L mice (0.32 ± 0.06)% was significantly lower than the infection model group (0.74 ± 0.21)% ($P < 0.05$). In these mice infected with *E. granulosus*, liver T cells, including Treg and $CD8^+$ T cells were significantly higher than those in the blank group, and the proportion of $CD8^+$ T cells in the H1402-H group (40.54 ± 7.22)% was significantly higher than that in the model group (9.88 ± 5.93)% ($P < 0.05$). The proportion of spleen T cells, especially activated T cells, was significantly lower than that of the blank group ($P < 0.05$). The proportion of $CD4^+$ T cells in blood lymphocytes was significantly reduced in the H1402-H group (31.59 ± 27.94)% ($P < 0.05$). **Conclusion** H1402 is an effective drug for treating both *E. granulosus* and *E. multilocularis* infection in mice. After 30 days of treatment and 4 weeks of rest, T cells were significantly decreased in the liver and spleen of mice infected with *E. multilocularis* and *E. granulosus*. However, H1402 increases activated T cells likely associated with killing the larval parasite or directly function on the cells, which need further identification.

【Key words】 *Echinococcus granulosus*; *E. multilocularis*; carbazole amino alcohol compounds; mice; lymphocytes; liver

棘球蚴病 (echinococcosis) 俗称包虫病, 包括细粒棘球蚴病 (cystic echinococcosis, CE) 和多房棘球蚴病 (alveolar echinococcosis, AE) 两种蠕虫病, 分别由细粒棘球绦虫 (*Echinococcus granulosus*) 和多房棘球绦虫 (*E. multilocularis*) 引起^[1]。棘球蚴病是因为中间宿主吞食了细粒棘球绦虫或多房棘球绦虫的虫卵, 经粪口传播途径而感染。人类可以作为中间宿主, 不参与病原循环^[2]。细粒棘球蚴病主要传染源是犬; 多房棘球蚴病主要传染源是犬、狐和狼。肝脏是细粒棘球蚴病感染的主要脏器大约占据 85.6%^[3]。多房棘球蚴病的原发脏器几乎 100% 是肝脏。细粒棘球蚴病多为占位性病变, 而多房棘球蚴病为类癌样生长^[4], 可使肝丧失功能而致死。目前棘球蚴病的治疗主要依赖手术切除和药物长期干预。世界卫生组织推荐的临床用药为阿苯达唑 (ABZ)。但阿苯达唑仅有抑制寄生虫生长的作用并无杀伤效果^[5-6]。研究表明阿苯达唑在治疗时需长期服用, 对患者造成一定的经济负担, 同时导致严重肝和肠的副作用^[7]。有研究表明阿苯达唑对于 CE 患者治愈率较低不足 15%, 约 40% 的患者使用后疗效不佳^[8], 多房棘球蚴患者同样面临上述问题^[9]。随着诊断技术的提升, 病人数的增加, 寻找新的治疗药物和治疗靶点仍然是棘球蚴病治疗的重大需求^[10]。

Wang 等^[11] 验证唑啉氨基醇类化合物是一种新型抗细粒棘球蚴药物, 通过体外杀伤证明唑啉氨基醇类衍生物 H1402 具有良好的体外杀伤细粒棘球蚴的作用, 该化合物对细粒棘球蚴病灶有较好的杀伤效果。本研究使用不同剂量的化合物 H1402 干预两种棘球

蚴感染小鼠, 以确定 H1402 治疗效果和对淋巴细胞的影响。为确定药物杀死棘球蚴的效果, 本研究在停药后 30 d 解剖小鼠, 观察其对虫体和病灶的影响效果。通过流式细胞数检测肝脏、脾脏和血液中淋巴细胞及其亚群的变化, 初步探寻化合物 H1402 干预后两种棘球蚴感染小鼠的淋巴细胞的变化。

材料与方法

1 材料

1.1 实验动物与棘球蚴来源 SPF 级的 BALB/c 小鼠, 雌性, 6~8 周龄, 体重为 (18 ± 2) g, 购自于河南斯克贝斯生物科技股份有限公司, 饲养于新疆医科大学实验动物中心。

绵羊肝脏源细粒棘球蚴采集于新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市华凌屠宰场; 多房棘球蚴采自新疆医科大学第一附属医院动物室保种传代的长爪沙鼠^[12]。

1.2 主要试剂 羧甲基纤维素钠 (CMCNa)、淋巴细胞分离液 (Percoll) 和牛血清白蛋白 (BSA) 购自美国 Sigma 公司; 红细胞裂解液购自北京索莱宝科技有限公司; 细胞破膜剂, 流式细胞术抗 CD19、CD69、CD3、CD4、CD8、CD25 和 Foxp3 抗体均购自美国 BioLegend 公司; 动物专用异氟烷和麻醉机购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司。

2 方法

2.1 感染模型建立及分组 从患病绵羊肝中获取细粒棘球蚴, 从保种沙鼠体内获取多房棘球蚴, 经组织筛网过滤多余杂质。通过吸入式麻醉小鼠后, 经肝门静脉注射 500 个原头蚴/只, 穿刺后用棉签挤压止血 3

min,缝合手术部位,复苏小鼠,建立两型棘球蚴病小鼠肝感染模型。将18只多房棘球蚴感染小鼠设置相同实验分组。并设假手术组为空白对照($n=6$);将18只细粒棘球蚴感染小鼠随机分为3组,每组6只,为感染模型组、H1402低剂量(50 mg/kg)和H1402高剂量(80 mg/kg)于感染60 d后通过ELISA法检测血清效价及B超抽检验证造模成功率,灌胃给药结束30 d后获取小鼠脏器和血液标本。

2.2 小鼠肝脏 HE 染色 小鼠解剖后,留存肝脏组织,4%多聚甲醛固定72 h,包埋,切片,进行HE染色,显微镜下观察炎症反应情况。病理变化是根据HE染色细胞的炎症反应和病灶的面积分为4个级:0,没有任何因感染造成的病变;1,视野里面的病灶及细胞和炎症带 $<25\%$;视野里面的病灶及细胞和炎症带 $25\% \sim 50\%$;3,视野里面的病灶及细胞和炎症带 $>50\%$ 。

2.3 小鼠肝脏、脾脏和血液淋巴细胞分离 小鼠眼球取血获得抗凝血,离心后收集细胞沉淀,加入红细胞裂解液反复裂解3次,收集细胞沉淀制备淋巴细胞悬液。解剖小鼠游离肝脏和脾脏,研磨组织,经200目组织滤网过滤后收集组织细胞悬液于离心管中;离心后收集细胞沉淀,肝脏标本中加入40% Percoll 3ml后离心收集细胞沉淀,用红细胞裂解液裂解样本中的红细胞。获得的细胞用计数板计数。

2.4 流式细胞术检测淋巴细胞 将收集的肝脏、脾脏和血液的细胞,每个样品分别取 1×10^6 标记T细胞及其亚群, 2×10^6 个细胞标记Treg细胞,经流式抗体(FITC-CD69、PE-CD19、APC-CD4、PE/Cy7-CD8、FITC-CD3、APC/Cy7-CD4、APC-CD25和PE-FOXP3)标记后,重悬细胞用流式细胞仪检测标本中T细胞、B细胞、活化T细胞、活化B细胞,CD4 T细胞、CD8 T细胞、活化CD4 T细胞和活化CD8 T细胞。Flow-Jo分析检测结果。

2.5 统计学分析 使用SPSS 22.0和GraphPad Prism 8进行统计学分析。以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示计量资料,单因素方差分析比较组间差异, t 检验比较两组间差异, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

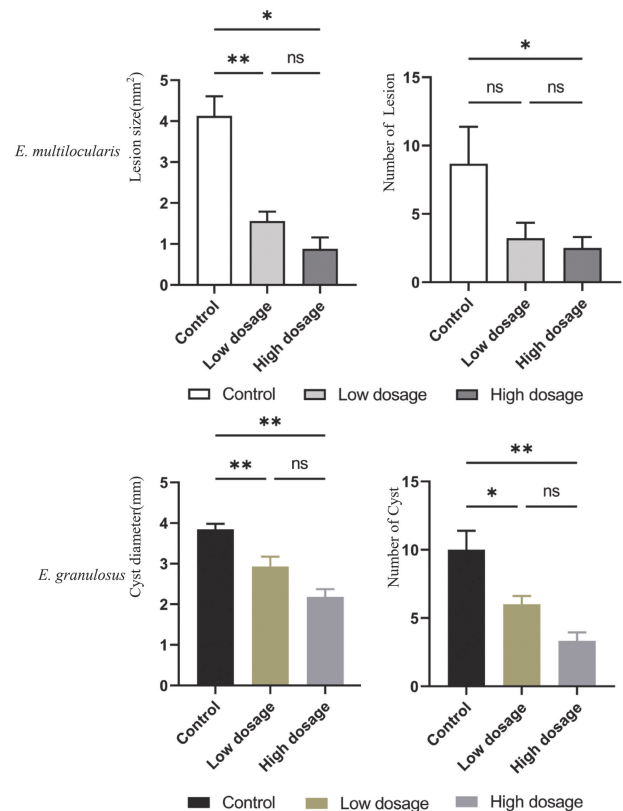
2.6 伦理批准 本研究涉及动物的使用及饲养均获得新疆医科大学第一附属医院伦理委员会批准(批号:IACUC201902-01)。

结 果

1 H1402 治疗显著降低肝棘球蚴数量和大小

解剖后分别统计两种棘球蚴感染小鼠肝脏棘球蚴数量和大小(图1)。多房棘球蚴感染小鼠治疗后,H1402高剂量组棘球蚴/病灶数量(2.5个)显著下降($t=2.537, P < 0.05$);细粒棘球蚴感染小鼠,H1402

治疗后高剂量组棘球蚴/病灶数量(3.8个)和大小(2.35 mm^2)均显著下降($t=3.652$ 和 $5.730, P < 0.05$)。



注: *与感染模型组和低剂量组比较, $P < 0.05$, **与感染模型组和低剂量组比较, $P < 0.01$ 。

图1 不同剂量H1402干预两种棘球蚴感染小鼠肝脏病灶面积和数量
Notes: * Compared with the control group and low dosage group, $P < 0.05$, ** Compared with the control group and low dosage group, $P < 0.01$.

Fig. 1 The lesion size and number of mice infected with *E. multilocularis* and *E. granulosus* and treated with different doses of H1402

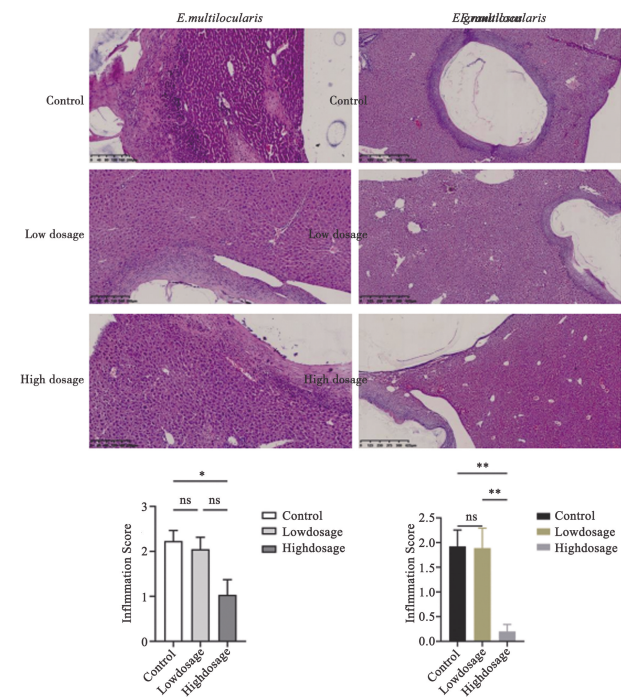
2 H1402 治疗减轻棘球蚴感染引起的肝脏病理

小鼠肝脏组织HE染色显示,多房棘球蚴感染小鼠,H1402高剂量组治疗后肝脏组织的炎症反应明显减弱,且呈现剂量依赖性($t=3.005, P < 0.05$);细粒棘球蚴感染小鼠,其炎症细胞浸润较多房棘球蚴感染少,H1402治疗后也呈现炎症细胞带减弱态势($t=4.310, P < 0.05$) (图2)。

3 棘球蚴感染小鼠肝脏淋巴细胞检测结果

肝脏是棘球蚴(包虫)的主要寄生器官,尤其是多房棘球蚴的原发性感染几乎100%在肝脏。多房棘球蚴感染小鼠,肝脏T细胞($1.15 \pm 1.14\%$),包括活化的T细胞、Treg、CD4和CD8T细胞的比例H1402高剂量组低于低剂量组($36.00 \pm 5.68\%$) ($t=17.01, P < 0.05$)。肝B细胞,H1402高剂量组($24.35 \pm 7.46\%$)高于感染模型组($17.74 \pm 4.57\%$) ($t=2.137, P < 0.05$),其中肝活化的B细胞其比例H1402

低剂量组(0.77 ± 0.24)% 低于感染模型组(1.36 ± 0.88)% ($t=1.817, P<0.05$)。



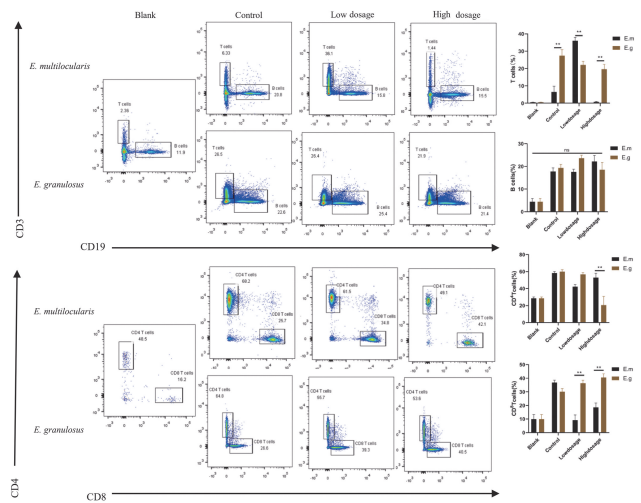
注: * 与感染模型组和低剂量组比较, $P<0.05$, ** 与感染模型组和低剂量组比较, $P<0.01$ 。

图2 不同剂量 H1402 干预两种棘球蚴感染小鼠肝脏组织病理变化 (100×)

Notes: * Compared with the control group and low dosage group, $P<0.05$ ** Compared with the control group and low dosage group, $P<0.01$.

Fig. 2 Liver pathological changes of mice infected with *E. multilocularis* and *E. granulosus* and treated with different doses of H1402 (100×)

细粒棘球蚴感染小鼠用药后肝脏的淋巴细胞与多房棘球蚴感染小鼠类似,包括 H1402 高剂量组肝脏 T 细胞及其亚类 CD4 细胞(4.89 ± 1.00)% 的比例低于低剂量组(56.71 ± 5.40)% ($t=3.472, P<0.05$)。但不同的是多房棘球蚴感染小鼠肝 B 细胞比例 H1402 高剂量组(18.54 ± 8.40)% 也低于感染模型组(19.31 ± 4.71)% ($t=0.233, P<0.05$) (图 3, 表 1)。



注: * 与细粒棘球蚴感染组比较, $P<0.05$, ** 与细粒棘球蚴感染组比较, $P<0.01$ 。

图3 不同剂量 H1402 干预两种棘球蚴感染小鼠肝脏淋巴细胞比例

Notes: * Compared with the *E. granulosus* infection group, $P<0.05$, ** Compared with the *E. granulosus* infection group, $P<0.01$.

Fig. 3 Proportion of liver lymphocytes in the mice infected with *E. multilocularis* and *E. granulosus* and treated with different doses of H1402

表1 不同剂量 H1402 干预两种棘球蚴感染小鼠肝脏淋巴细胞及其亚群检测结果 (%)

Table 1 Percentage changes of lymphocytes in the liver of mice treated with different doses of H1402 for cystic echinococcosis and alveolar echinococcosis

分组 Group	多房棘球蚴感染 <i>E. multilocularis</i>			空白组 Blank	细粒棘球蚴感染 <i>E. granulosus</i>		
	感染模型组 Control	低剂量组 Low dosage	高剂量组 High dosage		感染模型组 Control	低剂量组 Low dosage	高剂量组 High dosage
B	17.74±4.57	17.58±3.33	24.35±7.46 *	4.40±2.54 *	19.33±4.71	23.60±3.51	18.54±8.40
活化的 B	1.36±0.88	0.77±0.24	0.91±0.24	0.14±0.04 *	0.42±0.20	0.98±0.51 **	0.67±0.13
T	6.47±9.35	36.00±5.68 *	1.15±1.14	0.56±0.14	25.97±10.09	22.04±5.50	19.58±7.50
活化的 T	1.14±1.07	12.55±6.10 *	0.45±0.39	0.11±0.07	0.10±0.05	0.36±0.28	1.77±0.69 *
CD4 ⁺ T	52.81±14.92	58.16±5.46	39.38±6.89	28.43±3.10 *	59.94±6.93	56.71±5.40	4.89±1.00 *
活化的 CD4 ⁺ T	23.34±11.77	16.00±9.59	26.59±11.23	5.72±1.89 *	1.50±0.87	0.79±0.43	1.04±0.57
CD8 ⁺ T	18.60±8.96	36.76±4.97 *	7.03±4.06	9.88±5.93	30.00±7.13	36.29±5.85	40.54±7.22 *
活化的 CD8 ⁺ T	21.87±10.73	15.09±9.18	25.48±10.76	2.58±1.59 *	0.42±0.35	0.19±0.11	2.92±1.88 *
Treg	22.46±15.71	49.00±15.05 **	21.30±9.32	31.50±4.81	20.66±9.08	11.53±4.73 *	3.83±2.34 **

注(Notes): * 与感染模型组比较(Compared with the control group), $P<0.05$, ** 与感染模型组比较(Compared with the control group), $P<0.01$ 。

4 棘球蚴感染小鼠脾脏淋巴细胞检测结果

脾脏细胞, H1402 治疗结果类同肝脏, 包括 T 细胞比例尤其是活化的 T 细胞比例 H1402 高剂量组(3.33 ± 1.77)% 低于低剂量组(7.83 ± 1.32)% ($t=6.207, P<0.05$); 但不同的是多房棘球蚴感染小鼠脾脏 Treg 细胞比例 H1402 低剂量组(11.88 ± 0.87)% 高于感染模型组(8.40 ± 1.89)% ($t=5.315, P<$

0.05)。细粒棘球蚴感染小鼠, 脾脏 T 细胞(32.31 ± 3.76)%, 包括活化的 T 细胞、CD8 和活化的 CD8 细胞比例 H1402 高剂量组高于感染模型组(28.64 ± 12.98)% ($t=0.721, P<0.05$); CD4 和活化的 CD4 细胞比例 H1402 高剂量组(23.90 ± 28.70 、 0.39 ± 0.39)% 低于感染模型组(67.80 ± 4.00 、 0.81 ± 0.43)% ($t=4.578$ 、 $2.036, P<0.05$)。(图 4, 表 2)。

表 2 不同剂量 H1402 干预两种棘球蚴感染小鼠脾脏淋巴细胞及其亚群检测结果 (%)

Table 2 Percentage changes of lymphocytes in the spleen of mice treated with different doses of H1402 for cystic echinococcosis and alveolar echinococcosis

分组 Group	多房棘球蚴感染 <i>E. multilocularis</i>			空白组 Blank	细粒棘球蚴感染 <i>E. granulosus</i>		
	感染模型组 Control	低剂量组 Low dosage	高剂量组 High dosage		感染模型组 Control	低剂量组 Low dosage	高剂量组 High dosage
B	40.28±6.01	42.04±7.05	44.66±5.80	45.76±5.58	43.48±13.13	48.07±7.08	51.46±2.98
活化的 B	1.27±0.40	1.46±0.49	1.85±1.47	0.68±0.16	0.03±0.01	0.04±0.02	0.29±0.17*
T	42.16±7.44	46.29±7.22	22.86±12.49**	42.44±6.40	28.64±12.98	36.03±7.92	32.31±3.76
活化的 T	15.86±14.67	7.83±1.32	3.33±1.77	4.45±0.43	0.81±0.45	1.51±0.24	0.83±0.35
CD4 ⁺ T	64.34±4.16	65.84±1.91	69.87±4.64	65.70±2.33	67.80±4.00	68.27±1.47	23.90±28.70*
活化的 CD4 ⁺ T	20.34±16.88	10.00±1.87	10.15±3.32	7.02±1.52	0.81±0.43	1.20±0.40	0.39±0.39
CD8 ⁺ T	27.24±6.21	28.76±1.58	18.27±10.11	29.92±1.79	25.08±3.27	27.40±1.34	27.16±3.11
活化的 CD8 ⁺ T	2.97±0.75	3.82±0.76	3.36±1.12	2.13±0.71	0.20±0.08	0.28±0.05*	0.25±0.08
Treg	8.40±1.89	11.88±0.87**	10.54±1.52	25.38±7.35*	12.26±5.22	15.48±4.20	9.69±5.98

注(Notes): *与感染模型组比较(Compared with the control group), $P<0.05$, **与感染模型组比较(Compared with the control group), $P<0.01$ 。

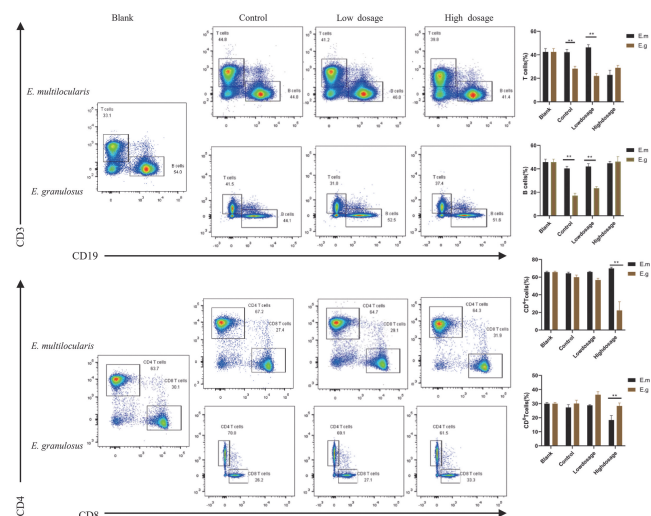
5 棘球蚴感染小鼠血液淋巴细胞检测结果

多房棘球蚴感染小鼠,血液中 T 细胞比例 H1402 高剂量组 (1.85 ± 1.18)% 低于低剂量组 (17.25 ± 4.64)%、感染模型组 (17.19 ± 6.95)% ($t=10.17$, $P<0.05$); CD8T 细胞比例 H1402 低剂量组 (34.63 ± 5.06)% 高于高剂量组 (16.62 ± 5.72)%、感染模型组 (20.28 ± 5.34)% ($t=6.975$, 0.109 , $P<0.05$); B 细胞比例 H1402 尤其活化的 B 细胞比例 H1402 低剂量组 (38.84 ± 3.92)% 低于感染模型组 (45.33 ± 8.33)% ($t=5.865$, $P<0.05$)。细粒棘球蚴感染小鼠,血液淋巴细胞 CD4T 细胞比例 H1402 高剂量组 (31.59 ± 27.94)% 较低剂量组 (73.00 ± 2.75)% 和感染模型组 (76.21 ± 3.79)% 显著降低 ($t=4.530$, 5.050 , $P<0.05$)。(图 5,表 3)。

讨论

细粒棘球蚴可在宿主体内长期寄居生长,由于包囊有外囊,可以在虫体死亡一段时间内保持包囊的重量和形态^[13]。多房棘球蚴是以肉芽肿的形式形成病灶,短期的杀虫后也保持一定的病灶体积和形态^[14]。本研究为观察 H1402 对棘球蚴肝脏寄生的杀伤作用

和持续效果,依据课题组前期实验结果在停药 30 d 后对小鼠进行解剖,以确保化合物可对肝脏寄生的棘球



注: *与细粒棘球蚴感染组比较, $P<0.05$, **与细粒棘球蚴感染组比较, $P<0.01$ 。

图 4 不同剂量 H1402 干预两种棘球蚴感染小鼠脾脏淋巴细胞比例

Notes: * Compared with the *E. granulosus* infection group, $P<0.05$, ** Compared with the *E. granulosus* infection group, $P<0.01$ 。

Fig. 4 Proportion of spleen lymphocytes in the mice infected with *E. multilocularis* and *E. granulosus* and treated with different doses of H1402

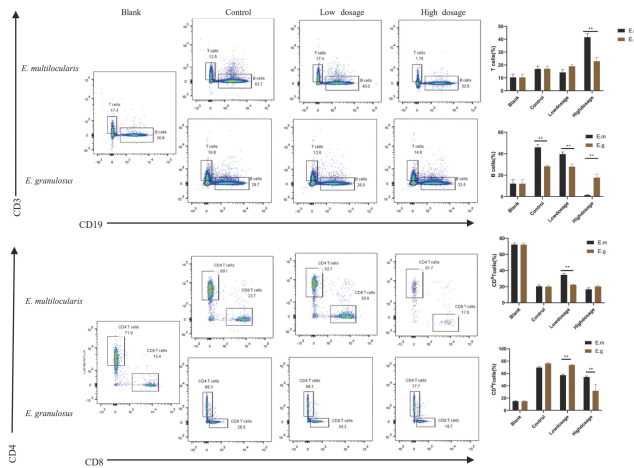
表 3 不同剂量 H1402 干预两种棘球蚴感染小鼠血液淋巴细胞及其亚群检测结果 (%)

Table 3 Percentage changes of lymphocytes in the blood of mice treated with different doses of H1402 for cystic echinococcosis and alveolar echinococcosis

分组 Group	多房棘球蚴感染 <i>E. multilocularis</i>			空白组 Blank	细粒棘球蚴感染 <i>E. granulosus</i>		
	感染模型组 Control	低剂量组 Low dosage	高剂量组 High dosage		感染模型组 Control	低剂量组 Low dosage	高剂量组 High dosage
B	45.33±8.33	38.84±3.92	41.60±7.14	12.05±8.13**	28.46±4.23	29.73±7.36	17.68±9.05
活化的 B	0.74±0.21	0.32±0.06**	0.35±0.12**	0.15±0.11**	0.04±0.02	0.03±0.00	0.20±0.16
T	17.19±6.95	17.25±4.64	1.85±1.18**	10.26±5.69	17.67±6.31	17.37±3.86	22.93±7.89
活化的 T	0.24±0.07	0.23±0.4	0.08±0.08**	0.16±0.07*	0.02±0.01	0.02±0.00	0.48±0.44
CD4 ⁺ T	69.41±5.34	57.05±5.04**	54.10±5.25**	14.92±1.83**	76.21±3.79	73.00±2.75	31.59±27.94**
活化的 CD4 ⁺ T	0.51±0.21	0.70±0.27	1.81±0.65**	0.35±0.15	0.01±0.00	0.01±0.01	1.39±1.68
CD8 ⁺ T	20.28±5.34	34.63±5.06**	16.62±5.72	72.10±4.79**	20.16±3.34	22.36±1.35	23.36±2.85*
活化的 CD8 ⁺ T	0.35±0.18	0.46±0.26	0.95±0.43**	0.24±0.14	0.006±0.00	0.01±0.01	1.69±1.84
Treg	34.08±3.13	27.24±5.29	29.43±16.04	—	1.96±0.67	1.05±0.80	2.80±0.72

注(Notes): *与感染模型组比较(Compared with the control group), $P<0.05$, **与感染模型组比较(Compared with the control group), $P<0.01$ 。

蚋有杀伤效果,即如果药物有杀虫效果,死亡的虫体在停药一段时间,其虫体的大小形态和重量体积有明显的变化,死亡的虫体在宿主体内因为宿主的免疫和消化作用而有明显的消减。



注: * 与细粒棘球蚴感染组比较, $P < 0.05$, ** 与细粒棘球蚴感染组比较, $P < 0.01$ 。

图5 不同剂量 H1402 干预两种棘球蚴感染小鼠血液淋巴细胞比例

Notes: * Compared with the *E. granulosus* infection group, $P < 0.05$, ** Compared with the *E. granulosus* infection group, $P < 0.01$ 。

Fig. 5 Proportion of blood lymphocytes in the mice infected with *E. multilocularis* and *E. granulosus* and treated with different doses of H1402

本研究通过流式细胞术检测小鼠用 H1402 治疗后棘球蚴受累器官肝和系统免疫的脾脏和血液中淋巴细胞的变化,确定药物对组织淋巴细胞的影响。棘球蚴感染后,肝 B 淋巴细胞比例变化明显,尤其是多房棘球蚴感染,给药后肝 B 细胞比例升高,说明多房棘球蚴在虫体杀伤 30 d 后,肝组织仍然有 B 淋巴细胞抗原决定簇抗原的释放,也说明 B 淋巴细胞是一群治疗后不敏感的细胞。药物对 B 淋巴细胞的影响可能是间接的,即在药物杀死虫体后,虫体释放 B 淋巴细胞激活抗原,导致 B 淋巴细胞增殖;但系统免疫中的血液和脾脏的 B 淋巴细胞无明显变化,说明受累器官抗原的释放是 B 淋巴细胞增殖的关键因素。B 淋巴细胞在局部免疫和系统免疫的功能和激活差异尚需进一步研究。H1402 富集于肝脏,在治疗早期可以通过杀死虫体而提高 B 淋巴细胞的迁徙或增殖,与 Wang 等^[11]的研究 H1402 富集于肝脏是一致的。相对于细粒棘球蚴感染,多房棘球蚴的感染引起非常强的 T 淋巴细胞募集于肝脏病灶,药物治疗 30 d 后,肝脏 T 细胞的降低,说明药物杀死了多房棘球蚴虫体,使其丧失了对 T 细胞的募集和激活增殖作用,所以药物治疗后 T 细胞数量降低。多房棘球蚴感染小鼠肝 T 细胞、活化的 T 细胞、CD4T 细胞和 CD8T 细胞比例 H1402 高剂量组较感染模型组均减少,表明 H1402 的干预减弱肝脏

T 淋巴细胞的活跃状态。对比 H1402 高剂量干预组,细粒棘球蚴较多房棘球蚴感染小鼠肝脏 CD8T 细胞和活化的 CD8T 细胞比例增加, T 细胞、活化的 CD4T 细胞比例减少,提示细粒棘球蚴在 H1402 干预后的肝脏局部免疫的 CD8T 细胞在杀伤棘球蚴中发挥一定的作用。结果表明, H1402 干预两种棘球蚴感染小鼠后参与肝脏的局部免疫调节,尤其对淋巴细胞群的调节,包括抑制 CD4⁺ T 细胞的增殖,在减弱棘球蚴引起的肉芽肿增生的病变过程中发挥重要的作用。

脾脏和血液在机体的系统免疫应答中发挥重要作用, T 细胞既参与免疫反应的效应反应,也参与调节作用,在多种疾病的进程中发挥重要作用^[15]。本研究显示,高剂量 H1402 干预后,脾脏和血液 CD4T 细胞及活化的 T 细胞比例在细粒棘球蚴感染小鼠增加,但在多房棘球蚴感染小鼠中呈减弱趋势,血液 CD4T 细胞、CD8T 细胞和活化的 T 细胞比例减少。H1402 治疗两型棘球蚴病表现出的系统免疫的差异可能主要是两型棘球蚴病灶结构的差异,即细粒棘球蚴的包裹储存了大量的囊液抗原,在杀伤的过程中持续的释放,可以刺激系统免疫的 T 淋巴细胞,而使得细粒棘球蚴有更长的 T 细胞活化周期。本研究发现细粒棘球蚴较多房棘球蚴感染其活化的 CD4T 细胞和活化的 CD8T 细胞比例减少,提示多房棘球蚴感染小鼠活化细胞较多的体液应答系统较细粒棘球蚴感染小鼠进一步被激活^[16-17]。结果表明, H1402 干预两种棘球蚴感染小鼠后活化的 T 细胞参与机体免疫调节,多房棘球蚴感染小鼠活化的 CD4T 细胞和活化的 CD8T 细胞相关因子进一步发挥细胞毒性杀伤作用,抑制多房棘球蚴的感染进程^[18]。

唑啉氨基醇 H1402 对两种棘球蚴感染小鼠的治疗可能是通过对 T、B 细胞的抑制作用,其中高剂量组对多房棘球蚴感染小鼠的作用明显高于细粒棘球蚴,说明该化合物对多房棘球蚴的抑制有效。因此推测该化合物对于两种棘球蚴感染小鼠病灶的杀伤作用,与 T、B 细胞等淋巴细胞的募集有一定的相关性。

综上所述,不同剂量的唑啉氨基醇 H1402 干预两种棘球蚴感染小鼠,引起肝脏局部免疫和体液应答机制不同,但都减弱棘球蚴在体内的病变进程。多房棘球蚴感染和治疗后 B 细胞均上升,表明多房棘球蚴在药物作用 30 d 和停药 30 d 后,在病灶部位仍然分泌 B 淋巴细胞激活的抗原。细粒棘球蚴感染后 B 细胞上升与寄生虫感染的特性一致;但在治疗后比例下降与多房棘球蚴感染不同,提示其治疗机制不同可能是包裹储存囊液抗原缓慢释放的结果所致。T、B 淋巴细胞可以成为检测药效灵敏的指标,明确棘球蚴在体内的寄居状态,为进一步的体内试验和深入研究 H1402

的药效、药理和药动相关实验,制备疗效较好的剂型和进入临床试验提供理论基础。

【参考文献】

- [1] Wen H, Vuitton L, Tuxun T, et al. Echinococcosis: advances in the 21st century[J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 32(2): e00075-18.
- [2] Han J, Bao G, Zhang D, et al. A newly discovered epidemic area of *Echinococcus multilocularis* in west gansu province in China[J]. PloS one, 2015, 10(7): e0132731.
- [3] 曹文艳, 师晓莉, 曹明宇, 等. 新疆某三甲级医院包虫病流行病学的现状和特征分析[J]. 新疆医科大学学报, 2014, 37(9): 1204-1207.
- [4] Deplazes P, Rinaldi L, Alvarez Rojas C, et al. Global distribution of alveolar and cystic echinococcosis[J]. Advan Parasitol, 2017(95): 315-493.
- [5] Rufener R, Dick L, D'Ascoli L, et al. Repurposing of an old drug: *In vitro* and *in vivo* efficacies of buparvaquone against *Echinococcus multilocularis*[J]. Int J Parasitol Drug, 2018, 8(3): 440-50.
- [6] Pensel P, Elisondo N, Gambino G, et al. Experimental cystic echinococcosis therapy: *In vitro* and *in vivo* combined 5-fluorouracil/albendazole treatment[J]. Vet Parasitol, 2017(245): 62-70.
- [7] Ke Y, Bi X, Yang N, et al. Serum platelet-derived growth factor-BB levels as a potential biomarker in assessing the metabolic activity of lesions in alveolar echinococcosis patients[J]. Acta Trop, 2021(227): 106290.
- [8] Torgerson P. One world health: socioeconomic burden and parasitic disease control priorities[J]. Vet Parasitol, 2013(195): 223-232.
- [9] Kui Y, Liu B, Wang X, et al. Epidemiological characteristics of

echinococcosis in non-endemic PLADs-China, 2017-2020[J]. China CDC, 2021, 3(51): 1084-1088.

- [10] Lachenmayer A, Gebbers D, Gottstein B, et al. Elevated incidence of alveolar echinococcosis in immunocompromised patients[J]. Food Parasitol, 2019(16): e00060.
- [11] Wang W, Li J, Yao J, et al. *In vitro* and *in vivo* efficacies of novel carbazole aminoalcohols in the treatment of cystic echinococcosis[J]. Antimicrobial Chemoth, 2017, 72(11): 3122-3130.
- [12] Kern P, Menezes da Silva A, Akhan O, et al. The Echinococcoses: Diagnosis, Clinical Management and Burden of Disease[J]. Advanc Parasitol, 2017(96): 259-369.
- [13] 吴向未, 彭心宇, 张示杰, 等. 肝脾棘球蚴周围纤维性囊壁形成机制的差异及临床意义[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2004, 12(1): 3-6.
- [14] Kern P, Bardonnnet K, Renner E, et al. European echinococcosis registry: human alveolar echinococcosis, Europe, 1982-2000[J]. Emerg Infect Dis, 2003, 9(3): 343-349.
- [15] 尚琳琳, 李玲慧, 李静, 等. 细粒棘球蚴感染对小鼠脾脏 NKT 细胞免疫功能的影响[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(8): 902-908.
- [16] Sadreddini S, Baradaran B, Aghebati-Maleki A, et al. Immune checkpoint blockade opens a new way to cancer immunotherapy[J]. Cell Physiol, 2019, 234(6): 8541-8549.
- [17] 齐新伟, 王晓然, 李斌, 等. 不同剂量多房棘球蚴感染小鼠调节性 B 细胞的动态变化及免疫作用研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(8): 917-923.
- [18] Samji T, Khanna KM. Understanding memory CD8(+) T cells[J]. Immunol Lett, 2017(185): 32-39.

【收稿日期】 2022-01-05 【修回日期】 2022-03-16

(上接 501 页)

- [7] Zhao D, Liu R, Zhang X, et al. Replication and virulence in pigs of the first African swine fever virus isolated in China[J]. Emerg Microbes Infect, 2019, 8(1): 438-447.
- [8] Wang N, Zhao D, Wang J, et al. Architecture of African swine fever virus and implications for viral assembly[J]. Science, 2019, 366(6465): 640-644.
- [9] Jia N, Ou Y, Pejsak Z, et al. Roles of African swine fever virus structural proteins in viral infection[J]. J Vet Res, 2017, 61(2): 135-143.
- [10] 贾云飞, 赵福杰, 朱静静, 等. 非洲猪瘟病毒 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 河南农业大学学报, 2020, 54(1): 69-73.
- [11] 任名, 牛婷婷, 于婉琪, 等. 非洲猪瘟病毒 TaqMan 探针法荧光定量 PCR 检测方法建立[J]. 中国动物传染病学报, 2020, 28(3): 42-8.
- [12] 李洪利, 曹金山, 王君玮, 等. 非洲猪瘟病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(6): 37-40.

- [13] Ren M, Mei H, Zhou M, et al. Development of a super-sensitive diagnostic method for African swine fever using CRISPR techniques[J]. Virol Sin, 2021, 36(2): 220-230.
- [14] Luo Y, Atim S A, Shao L, et al. Development of an updated PCR assay for detection of African swine fever virus[J]. Arch Virol, 2017, 162(1): 191-199.
- [15] Wang Y, Xu LZ, Lance N, et al. Development of a real-time PCR assay for detection of African swine fever virus with an endogenous internal control[J]. Transbound Emerg Dis, 2020, 67(6): 2446-2454.
- [16] Liu Q, Ma B, Qian N, et al. Structure of the African swine fever virus major capsid protein p72[J]. Cell Res, 2019, 29(11): 3.
- [17] Wang G, Xie M, Wu W, et al. Structures and functional diversities of ASFV proteins [J]. Viruses, 2021, 13(11): 2124.
- [18] 李艳, 郭怡德, 勾红潮, 等. 非洲猪瘟病毒核酸探针荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2021, 41(4): 208-212.

【收稿日期】 2022-03-24 【修回日期】 2022-05-18