

文章编号: 1000-7423(2012)-04-0286-05

【论著】

抗骨桥蛋白 (OPN) 抗体对沙鼠肝多房棘球蚴组织 IL-2 和 IL-5 表达的影响

高亮亮¹, 张示杰^{1*}, 吴向未¹, 张永国¹, 张龙¹, 彭心宇¹, 曹玉文², 孙红¹

【摘要】 目的 观察兔抗鼠骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 抗体对长爪沙鼠体内多房棘球蚴 (俗称泡球蚴) 组织中白细胞介素 2 (IL-2) 和 IL-5 因子表达的影响。方法 180 只长爪沙鼠随机均分为 3 组, 即抗 OPN 抗体干预实验组 (A 组)、兔血清干预对照组 (B 组) 和模型对照组 (C 组)。3 组均采用开腹肝脏穿刺接种泡球蚴组织混悬液 (0.1 ml/只, 约含原头节 400 个), 感染当天前两组分别注射兔抗兔 OPN 抗体 (效价 1:32) 和兔血清, 均 0.15 ml/次, 1 次/2 d×7 次, 以后改为每周 1 次直到处死。模型对照组不作任何处理。分别于处理后 20、60、100、140、180 和 220 d 各组均剖杀 10 只沙鼠, 取肝泡球蚴组织, 采用苏木素-伊红 (HE) 染色法和免疫组织化学 SP 法观察沙鼠肝泡球蚴组织中 IL-2 和 IL-5 的表达情况。结果 感染泡球蚴长爪沙鼠的腹腔和肝脏中见大小不等的团块状囊泡。A、B 和 C 组各时段泡球蚴组织中 IL-2 阳性细胞表达率的差异无统计学意义 ($P>0.05$)。在感染 140 d 和 180 d 时, A 组泡球蚴组织中 IL-5 阳性细胞表达率分别为 40% 和 20%, 显著低于 B 组 (100% 和 90%) 和 C 组 (90% 和 80%) ($P<0.05$)。结论 感染泡球蚴沙鼠进行抗 OPN 抗体干预后, Th2 型 IL-5 细胞因子反应减弱, 机体的免疫力有所增强。

【关键词】 多房棘球蚴; 骨桥蛋白; 白细胞介素 2 (IL-2); 白细胞介素 5 (IL-5)

中图分类号: R383.22 文献标识码: A

Effect of Anti-osteopontin Antibody on Expression of IL-2 and IL-5 in Hepatic Alveolar Hydatid Tissue of Gerbil

GAO Liang-liang¹, ZHANG Shi-jie^{1*}, WU Xiang-wei¹, ZHANG Yong-guo¹,
ZHANG Long¹, PENG Xin-yu¹, CAO Yu-wen², SUN Hong¹

(1 Department of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital, Medical College of Shihezi University, Shihezi 832008, China; 2 Department of Pathology, Medical College of Shihezi University, Shihezi 832008, China)

【Abstract】 **Objective** To observe the effect of anti-osteopontin antibody on the level of IL-2 and IL-5 in the liver of gerbil infected with *Echinococcus multilocularis* (Em). **Methods** 180 gerbils were infected with echinococcus protoscoleces (approximately 400 for each gerbil) by abdominal opening inoculation in liver. The gerbils were randomly divided into three groups with 60 each: experiment group (group A, with anti-osteopontin antibody interference), control group (group B, with normal rabbit serum injection) and model group (group C, with no interference). Ten gerbils from each group were sacrificed at 20, 60, 100, 140, 180, and 220 days post-infection respectively. The liver tissue with hydatid cysts was collected and the expression of IL-2 and IL-5 was observed after immunohistochemistry staining (SP method). **Results** *E. multilocularis* hydatid tissue spreaded over the liver and abdominal cavity. The positive expression rate of IL-2 in the tissue showed no statistical difference among the three groups ($P>0.05$). On the days 140 and 180, however, the positive expression rate of IL-5 in group A was 40% and 20% respectively, considerably lower than that in group B (100% and 90%) and group C (90% and 80% respectively). **Conclusion** The anti-osteopontin antibody can reduce Th2 type cytokine response in the Em-infected gerbils, which may strengthen the immunity of the host.

【Key words】 *Echinococcus multilocularis*; Osteopontin; IL-2; IL-5

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30860274)

* Corresponding author, E-mail: zsj-sh@tom.com

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30860274)

作者单位: 1 石河子大学医学院第一附属医院, 石河子 832008; 2 石河子大学医学院病理教研室, 石河子 832008

* 通讯作者, E-mail: zsj-sh@tom.com

多房棘球蚴病又称泡球蚴病,是由多房棘球绦虫(*Echinococcus multilocularis*)的幼虫寄生于人体引起的人兽共患寄生虫病,该病的影像学和病理学表现与肿瘤极为相似^[1],几乎均原发于肝脏,呈癌样浸润生长。如果患者未经有效治疗,10年死亡率可达93%以上^[2]。

Rigano 等^[3]研究发现, Th1 型细胞因子与抑制泡球蚴在宿主体内的缓慢生长有关, Th2 型细胞因子同泡球蚴在宿主体内快速生长和病情进展有关。本研究拟观察经兔抗鼠 OPN 抗体干预后沙鼠肝泡球蚴组织中细胞因子的改变,以了解该抗体在机体的免疫状况和其在病程转归中的意义。

材料与方 法

1 实验动物等来源

泡球蚴种鼠,即人工腹腔感染泡球蚴 18 周的长爪沙鼠(*Meriones unguiculatus*,以下简称沙鼠)由新疆医科大学动物实验中心提供。180 只雌性 6 周龄沙鼠,体重为(30±5)g,购自新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心。

2 主要试剂和仪器

兔抗鼠 OPN 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 生物科技公司,即用型免疫组化染色试剂盒(含山羊抗小鼠 IgG)和二氨基联苯胺(DAB)显色剂购自北京中杉生物有限公司。健康兔血清为本室自制。显微镜(CX31RBSF)产自日本 Olympus 公司,石蜡切片机(莱卡 Leica2135 型)产自德国 Leica 公司,图像采集系统(sonyExwaveHAD)产自日本 sony 公司,自动组织包埋机(LeicaEG1160)产自德国 Leica 公司。

3 实验方法

3.1 泡球蚴原头节混悬液制备 将人工腹腔感染泡球蚴 18 周的长爪沙鼠经乙醚麻醉处死,无菌剖腹,选择光滑、透亮、成簇游离于腹腔或附着在腹壁、肠系膜和肝表面的泡球蚴,用生理盐水反复冲洗后,剪碎,过筛,用生理盐水漂洗 3 次,经 0.5%伊红染色,可见原头节(1~3 个/视野),结构清晰,着色率<15%,加庆大霉素和青霉素注射液各 250 U/ml,制备成 20%的原头节混悬液,用于以下动物接种。

3.2 实验动物分组 180 只沙鼠随机均分为 3 组,即抗 OPN 抗体干预实验组(A 组)、兔血清干预对照组(B 组)和模型对照组(C 组),分别将 3 组沙鼠麻醉、消毒后,采用开腹直视下进行肝内穿刺接种,每鼠注射原头节混悬液 0.1 ml(约含原头节 400 个)。A 和 B

组于接种当天,分别经尾静脉注射抗 OPN 抗体(效价为 1:32)和兔血清,均为 0.15 ml/只,1 次/2 d×7 次,以后改为每周 1 次,直到处死。C 组不作任何处理。各组均给予普通饮食饲养。

分别于 20、60、100、140、180 和 220 d 各组取 10 只沙鼠剖杀,剖腹取泡球蚴组织,进行实验观察。

3.3 实验内容和方 法

3.3.1 组织切片 各组沙鼠中取出的肝泡球蚴组织用 10%甲醛溶液固定,石蜡包埋,切片,HE 染色,镜下观察。

根据泡球蚴角质层和生发层病理形态改变,以及育囊和原头蚴发育情况分为 3 级,① 0 级(基本正常):泡球蚴组织结构基本正常,角质层和生发层清晰可见,多数见育囊或芽生结构,育囊内有数量不等的原头蚴,钙颗粒形态正常。② I 级(变性改变为主):泡球蚴组织结构存在,角质层和生发层可辨认,部分可见断裂和塌陷,很少见育囊及原头蚴。③ II 级(坏死改变为主):泡球蚴组织结构失常,角质层和生发层普遍变性、分离、断裂和脱落,生发层细胞核固缩、溶解或消失;育囊及原头蚴少见;偶见钙颗粒,形态模糊;重者角质层、生发层难以辨认或呈现大泡状坏死,以及纤维组织增生和炎性细胞浸润。

3.3.2 免疫组织化学染色分析 采用免疫组织化学链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(SP 法)检测沙鼠肝泡球蚴组织中 IL-2 和 IL-5 的表达水平。将方法 3.3.1 制备的石蜡切片,常规脱蜡、梯度酒精水化和枸橼酸盐缓冲液微波修复抗原,进行免疫组化染色。按说明书操作,具体步骤如下:将切片放入 3% H₂O₂ 溶液中,室温孵育 10 min,自来水浸洗 3 次,共计 15 s;再放入盛有 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)的器皿中。微波炉(92~98℃)加热 15 min,自然冷却至室温,PBS 冲洗 3 次,每隔 5 min 冲洗 1 次。加入 50 μl 健康山羊血清(10%)封闭,37℃孵育 10 min。加入 50 μl 兔抗鼠 OPN 单克隆抗体(一抗,1:200),4℃孵育过夜,PBS 冲洗 3 次。加入生物素标记的山羊抗小鼠 IgG(1:100),37℃孵育 30 min,PBS 冲洗 3 次,滴加 50 μl 辣根过氧化物酶(HRP)标记的链霉菌卵白素(1:100),37℃孵育 30 min,PBS 冲洗 3 次。DAB 显色,自来水充分冲洗后苏木素复染。常规脱水、透明,中性树胶封片。同时以 PBS 代替一抗作为阴性对照。在光学显微镜下观察结果。

参照文献[4]制定判断标准,IL-2 和 IL-5 主要表达于细胞浆,阳性染色均为胞浆内出现黄色、棕黄色或棕褐色颗粒。依据胞浆染色程度和染色细胞百分率进行评分,①着色深浅:不显色或着色不清的为 0 分,

浅黄色为 1 分，棕黄色为 2 分，深褐色为 3 分；② 阳性细胞数：未见阳性细胞的为 0 分，阳性细胞数占视野 1%~25% 为 1 分，25%~50% 为 2 分，>50% 为 3 分。①+② 为 3~6 分为免疫组织化学染色阳性。实验结果以阳性细胞的百分率（评分为 3~6 分的切片数/10）来表示。读片过程采用双盲法，由两位病理科医师独立观察后一起做出判断。

4 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析。所有实验结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，3 组之间的比较用单因素方差分析，组间两两比较用 q 检验，计数资料采用 χ^2 检验， $\alpha=0.05$ 为检验水准。

结 果

1 病理组织学观察

肝组织内现大小不等的泡球蚴囊腔，囊壁与肝组织由肉芽组织构成的纤维囊分隔，囊壁外侧为角质层，内侧为生发层，囊腔内充满无色液体，液体内有子囊和有头节的生发囊。囊泡内容物为豆腐渣样蚴体碎屑和小泡。囊泡周围有嗜酸粒细胞浸润，伴有结核性肉芽组织形成和纤维组织增生。HE 染色结果显示，3 组间泡球蚴囊壁病理改变无显著性差异。

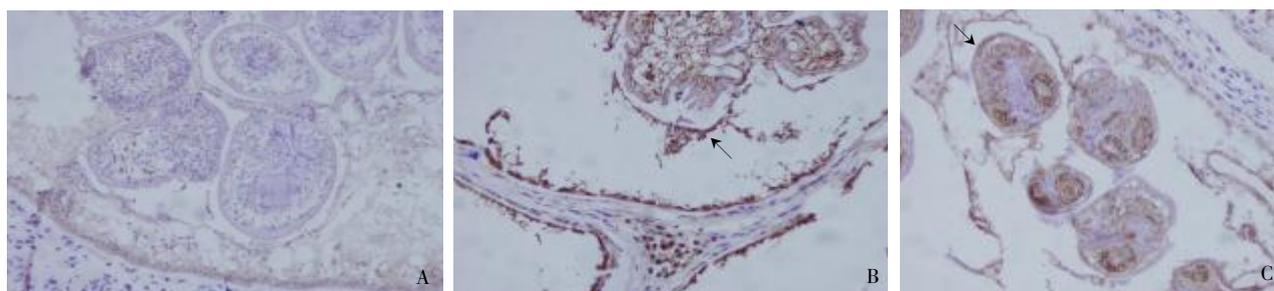
2 免疫组织化学染色分析

经免疫组织化学染色后，3 组肝泡球蚴组织中均可见有 IL-2 和 IL-5 表达，主要分布在上皮细胞浆。在泡球蚴的生发层、子囊和生发囊的上皮细胞浆内，可见呈黄色、棕黄色或棕褐色等阳性颗粒。A 组与 B 组和 C 组不同时间段的泡球蚴组织中 IL-2 的阳性细胞表达率的差异无统计学意义 ($P>0.05$) (表 1)；A 组泡球蚴组织中 IL-5 的阳性细胞表达率，140 d 和 180 d 的分别为 40% 和 20%，B 组的均为 90%，C 组的分别为 100% 和 90%，A 组与 B 组和 C 组的比较，差异有统计学意义 ($P<0.05$) (图 1，表 1)。

表 1 各组不同时间段 IL-2 和 IL-5 的阳性细胞表达率 (n=10)
Table 1 IL-2 and IL-5 positive expression rate in each group at different timepoints (n=10)

组别 Groups	不同时间段阳性细胞表达率/% Positive expression rate at different timepoints/%					
	20 d	60 d	100 d	140 d	180 d	220 d
IL-2 A组 Group A	40	60	70	70	70	70
B组 Group B	50	60	80	80	70	70
C组 Group C	40	70	80	80	60	60
IL-5 A组 Group A	40	50	70	40	20	30
B组 Group B	50	60	80	90*	90*	40
C组 Group C	40	70	90	100*	90*	40

注：与 A 组比较，* $P<0.05$ 。 Note: vs. group A, * $P<0.05$.



A: 抗 OPN 抗体干预实验组 (A 组); B: 兔血清干预对照组 (B 组), 阳性细胞 (↑); C: 模型对照组 (C 组), 阳性细胞 (↑)。
A: Anti-osteopontin antibody experiment group (group A); B: Rabbit serum injection group (group B), positive expression (↑); C: Model group (group C), positive expression (↑).

图 1 肝泡球蚴 IL-5 免疫组化染色 (SP, ×200)
Fig. 1 IL-5 expression in hepatic echinococcus cyst (SP, ×200)

讨 论

近年来在寄生虫免疫研究中发现，Th1 和 Th2 细胞产生的细胞因子在疾病变化中起拮抗作用。Th1 细胞产生高水平的 γ 干扰素 (IFN- γ)、IL-2 和 α 肿瘤坏死因子 (TNF- α)，它们作用于巨噬细胞使之激活，且与细胞毒性 T 细胞 (Tc) 的活化增殖等有关；Th2 细胞以产生 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10 等为特征，主要促进 B 细胞的分化和成熟。骨桥蛋白(OPN)是一富含精氨

酸、甘氨酸和天冬氨酸序列的磷酸化糖蛋白，广泛分布于人体组织中，具有多种功能。它与骨组织的矿化与重建、动脉硬化、抗感染免疫调节、缺血再灌注和损伤信号转导等过程中发挥重要作用^[5]。本课题组曾研究发现，骨桥蛋白主要分布在泡球蚴纤维囊壁和炎症细胞，可能促进泡球蚴的转移；抗 OPN 抗体可使感染沙鼠血清 IL-10 的表达降低，机体的保护性免疫应答有所恢复^[6,7]。

IL-2 在体内主要是由 Th1 细胞分泌的一种可溶性

的糖蛋白,其具有增强宿主免疫力和抑制棘球蚴生长的作用。抗 OPN 抗体干预后,沙鼠肝泡球蚴组织中 IL-2 阳性细胞表达率与对照组比较无显著性变化 ($P>0.05$)。张睿等^[8]和魏晓丽等^[9]研究发现,泡球蚴感染中后期,IL-2 水平明显下降,其引发的 Th1 向 Th2 漂移,可能使小鼠机体呈现出 Th1 向 Th2 转化的趋势。研究证实,自然杀伤 T 细胞(NK)能分泌 OPN,OPN 能放大 NK 细胞的激活作用^[10],该细胞不但是产生 IL-4 的主要细胞,而且可强力产生 IFN- γ ,同时参与 Th1/Th2 分化的抑制,引起 Th1/Th2 失衡。本研究利用抗 OPN 抗体封闭骨桥蛋白的功能,逆转由 Th1 向 Th2 漂移时可能造成的免疫抑制状态,可能使 IL-2 的水平升高。在泡球蚴组织中,阻断 OPN 的信号传递,也可能使 IL-2 的水平升高。有关抗 OPN 抗体干预泡球蚴生长的最佳效价和最佳干预方式未见有文献报道,如何以最佳剂量和时间干预使 IL-2 表达有显著性差异,有待进一步探讨。

IL-5 主要通过 Th2 产生,并且有实验表明,小鼠感染泡球蚴后 IL-4 和 IL-5 具有协同参与体液免疫的作用^[9]。Sturm 等^[11]研究发现,多数泡球蚴病患者有 IL-5 增高现象。本研究结果显示,经抗 OPN 抗体干预沙鼠的泡球蚴组织中,IL-5 阳性细胞表达率在感染 140 d 和 180 d 时均显著低于兔血清对照组和模型对照组。在慢性寄生虫感染(尤其是蠕虫感染)中,细胞免疫功能低下时,常伴有 IgE 升高。李富荣等^[12]研究发现,泡球蚴病患者血清 IgE 水平明显高于健康对照组,经阿苯达唑治疗后血清中 IgE 水平明显下降。IL-4 可增强 IgE 的产生,IL-5 对 IL-4 诱导合成 IgE 有显著的协同效应。本实验研究表明,抗 OPN 抗体干预后,泡球蚴组织中 IL-5 阳性细胞率表达降低,与李富荣等^[12]报道经阿苯达唑治疗的泡球蚴病患者血清中 IL-5 的变化结果相一致。这说明经抗 OPN 抗体干预后,Th2 反应为主的免疫抑制状态有所改变,Th1 反应有所增强。这可能是因抗 OPN 抗体通过结合体内的 OPN,阻碍了 OPN 的功能,从而抑制泡球蚴的生长,使宿主与寄生虫的相互关系发生改变,机体的保护性免疫有所恢复。

本实验初步证实,抗 OPN 抗体对沙鼠泡球蚴病的进一步发展有一定的抑制作用,该抗体可能通过某种途径调控 Th1 和 Th2 细胞分化状态的转换,有效改善沙鼠的免疫状况,使泡球蚴感染所造成的 Th1/Th2 平衡失调有所逆转。OPN 可能成为泡球蚴药物治疗中

的一个靶点,但机制尚须进一步研究。抗 OPN 抗体作为泡球蚴的治疗新途径,具有潜在的临床应用价值。

参 考 文 献

- [1] Zhang WB, Li J, McManus DP, *et al.* Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease[J]. Clin Microbiol Review, 2003, 16(1): 18-36.
- [2] Guo YZ, Ding MLT, Zhu MB, *et al.* Hepatic alveolar hydatid disease complicated with lung and brain metastasis[J]. Chin J Hepatobil Surg, 2005, 11(7): 493-494. (in Chinese)
(郭永忠,丁木拉提,朱马拜,等.肝泡状棘球蚴病合并肺、脑转移[J].中华肝胆外科杂志,2005,11(7):493-494.)
- [3] Rigano R, Profumo E, Loppolo S, *et al.* Serum cytokine detection in the clinical follow up of patients with cystic echinococcosis[J]. Clin Exp Immunol, 1999, 115(3): 503-507.
- [4] Zhang JH, Wen H, Liu ZS, *et al.* Establishment of animal primary *Echinococcus multilocularis* infection [J]. Chin J Regional Anat Operat Surg, 2000, 9(1): 11-13. (in Chinese)
(张金辉,温浩,刘章锁,等.原发性肝泡球蚴动物模型的建立[J].中国解剖学杂志,2000,9(1):11-13.)
- [5] Wai PY, Kuo PC. The role of *Osteopontin* in tumor metastasis[J]. J Surg Res, 2004, 121(2): 228-241.
- [6] Zhang L, Zhang SJ, Cao YW, *et al.* The correlation between osteopontin and metastasis of hepatic *Echinococcus multilocularis* infection[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2011, 29(1): 33-36. (in Chinese)
(张龙,张示杰,曹玉文,等. α 骨桥蛋白与肝泡型棘球蚴转移的相关性研究[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2011,29(1):33-36.)
- [7] Zhang YG, Zhang SJ, Zhao JQ, *et al.* Effect of anti-osteopontin antibody on expression of cytokines in hepatic alveolar hydatid tissue of gerbil[J]. Chin J Zoonoses, 2011, 27(10): 48-51. (in Chinese)
(张永国,张示杰,赵江桥,等.抗 OPN 抗体对沙鼠肝泡球蚴组织细胞因子表达的影响[J].中国人兽共患病学报,2011,27(10):48-51.)
- [8] Zhang R, Jing T, Fu XY, *et al.* Effect of matrine and albendazole on *Echinococcus multilocularis* infection in mice [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2006, 24(5): 366-369. (in Chinese)
(张睿,景涛,傅宣英,等.苦参碱和阿苯达唑联合治疗小鼠泡球蚴病的机制探讨[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2006,24(5):366-369.)
- [9] Wei XL, Ding JB, Xu Y, *et al.* Change of cytokines in mice with *Echinococcus multilocularis* infection [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2004, 22(6): 361-362. (in Chinese)
(魏晓丽,丁剑冰,许晏,等.小鼠感染泡球蚴后细胞因子水平的变化[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2004,22(6):361-362.)
- [10] Diao HY, Kon SCYK, Iwabuchi KZY, *et al.* Osteopontin as a mediator of NKT cell function in T cell-mediated liver diseases [J]. Immunity, 2004, 21(4): 539-550.
- [11] Starrn D, Menzel J, Gosttein B, *et al.* IL-5 is the predominant cytokine produced by PBMC in alveolar echinococcosis [J]. Infect Immunol, 1995, 63(5): 1688-1697.
- [12] Li FR, Shi YE, Shi DZ, *et al.* Immunological marker indicating the curative effects of treatment in AE patients with albendazole [J]. Chin J Zoonoses, 2003, 12(9): 71-73. (in Chinese)
(李富荣,石佑恩,史大中,等.阿苯达唑治疗泡球蚴病患者 Th1/Th2 型细胞因子的变化及临床意义 [J]. 中国人兽共患病杂志,2003,12(9):71-73.)

(收稿日期:2012-03-15 编辑:衣凤芸,盛慧锋)