

文章编号:1000-7423(2012)-01-0032-04

【论著】

泡球蚴感染小鼠肝脏中 IL-10 和 TGF-β1 的动态变化

赵慧¹, 白雪², 聂晓涵², 王江涛², 王西宪², 庞楠楠¹, 李玉娇¹, 马秀敏³, 温浩¹, 丁剑冰^{3*}

【摘要】 目的 观察泡球蚴感染小鼠肝脏中白细胞介素-10 (IL-10) 和转化生长因子-β (TGF-β1) 的动态变化。方法 将 60 只雌性 BALB/c 小鼠随机均分为实验组和对照组, 实验组腹腔注射活原头节悬液 0.2 ml (约含 400 个原头节), 对照组腹腔注射等量生理盐水, 分别于接种后 2、8、30、90、180 和 360 d 各处死 5 只小鼠, 取肝组织进行病理学检查, 并用免疫组织化学法检测肝组织中 IL-10 和 TGF-β1 的表达情况。结果 实验组小鼠, 腹腔和肝小叶出现多处直径不等的小囊泡, 随感染时间的延长逐渐增多增大, 与周围肝组织分界不明显。HE 染色显示, 实验组小鼠肝脏出现炎症细胞浸润, 泡球蚴纤维囊壁与肝细胞和囊壁之间炎症反应带的形成等不同程度的病理改变; 对照组小鼠肝小叶结构完整, 偶见少量炎症细胞浸润, 肝细胞胞浆疏松化和脂肪变性。实验组小鼠肝组织表达水平随着泡球蚴感染时间的延长而逐渐上升, 感染后 90 d, 实验组小鼠肝组织中 IL-10 和 TGF-β1 的表达水平均达高峰, 细胞阳性率分别为 (16.39±1.73)% 和 (23.69±2.29)%, 与对照组比较 [(1.09±0.10)% 和 (0.98±0.09)%] 差异均有统计学意义 ($P<0.01$), 而且之后均维持在较高水平。结论 小鼠泡球蚴感染中晚期, IL-10 和 TGF-β1 表达水平均提高, 其免疫抑制作用不利于清除和控制肝脏中泡球蚴。

【关键词】 泡球蚴; CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞; 细胞因子

中图分类号: R383.33

文献标识码: A

Dynamic Change of IL-10 and TGF-β1 in the Liver of *Echinococcus multilocularis*-Infected Mice

ZHAO Hui¹, BAI Xue², NIE Xiao-han², WANG Jiang-tao², WANG Xi-xian²,
PANG Nan-nan¹, LI Yu-jiao¹, MA Xiu-min³, WEN Hao¹, DING Jian-bing^{3*}

(1 Medical Research Center and Xinjiang Key Lab of Echinococcosis, Urumqi 830011, China; 2 College of Clinical Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 3 College of Preclinical Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

【Abstract】 **Objective** To observe the dynamic expression and function of IL-10 and TGF-β1 in liver of BALB/c mice infected with *Echinococcus multilocularis* (*Em*). **Methods** Sixty female BALB/c mice were randomly divided into experiment group and control group. Mice in the experiment group were each injected with 0.2 ml *Em* protoscoleces suspension (containing about 400 protoscoleces), while those in control group received same volume of normal saline. At 2, 8, 30, 90, 180, and 360 d after infection, 5 mice from each group were sacrificed and liver specimens were collected for pathological examination and immunohistochemical detection for IL-10 and TGF-β1. **Results** In mice of the experiment group, *Em* cysts in different sizes were found in the abdominal cavity and the liver tissue, which gradually enlarged with the time. HE staining showed infiltration of lymphocytes in liver tissue, pathological change between the cyst wall and hepatic cells. In the control, the liver lobules showed integrity and inflammatory cells were seen occasionally. The level of IL-10 expression in liver tissue of the infected mice increased with the time, and reached a peak [(16.39±1.73) %] at 90 d post-infection and maintained a high level thereafter. The expression of TGF-β1 also reached the highest level [(23.69±2.29) %]. Both were significantly higher than the control ($P<0.01$), though a low level expression was found in the control at 90d post-injection. **Conclusion** The expressions of IL-10 and TGF-β1 both increase in the middle and late

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30860263, 81060135); 新疆医科大学研究生创新基金(No. MC2010-10); 新疆医科大学大学生创新基金(No. CX2010018)

作者单位: 1 新疆医科大学第一附属医院新疆包虫病基础医学重点实验室, 乌鲁木齐 830011; 2 新疆医科大学 2008 级临床班, 乌鲁木齐 830011; 3 新疆医科大学基础学院, 乌鲁木齐 830011

* 通讯作者, E-mail: djbing002@163.com

stages of the infection. Besides, their inhibited functions do not be helpful for clearing and controlling *Echinococcus multilocularis* infection in livers.

[Key words] *Echinococcus multilocularis*; CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells; Cytokine

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30860263, 81060135), the Post-graduate and Graduate Students Innovation Fund of Xinjiang Medical University(No. MC2010-10, No. CX2010018)

* Corresponding author, E-mail: djbing002@163.com

泡型棘球蚴病(alveolar echinococcosis, AE)是由多房棘球绦虫(*Echinococcus multilocularis*)的幼虫泡球蚴寄生于人体而引起的一种病死率高、危害严重的感染性疾病,有寄生虫癌症之称^[1,2]。有研究发现,泡球蚴能在具有免疫能力的宿主体内大量繁殖并长期存活,免疫抑制机制可能是其逃避致死性免疫攻击的机制之一。CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞(Tregs)是不同于 Th1、Th2 和 Th17 细胞的一类具有广泛免疫抑制性的细胞亚群。在病毒或血吸虫等感染中,CD4⁺CD25⁺Tregs 一方面是调节机体免受过度免疫病理损伤的重要细胞类群^[3],另一方面 CD4⁺CD25⁺Tregs 的存在不利于病原体的清除。该类抑制性 T 细胞群主要通过细胞与细胞接触及分泌抑制性细胞因子[白细胞介素-10(IL-10)和转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)]发挥作用^[4]。

本研究通过检测泡球蚴感染小鼠肝组织中 CD4⁺CD25⁺Tregs 相关细胞因子 IL-10 和 TGF-β1 的动态变化,探讨其在肝脏中对泡球蚴感染的免疫抑制作用,为临床治疗研究提供新的理论依据。

材料与方法

1 材料

1.1 实验动物来源 60 只 6~8 周龄,体重 18~22 g 的雌性 BALB/c 小鼠和 1 只保种灰仓鼠均由新疆医科大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂和仪器 IL-10 多克隆兔抗鼠抗体购自武汉博士德公司, TGF-β1 多克隆兔抗鼠抗体购自美国 Santa Cruz 公司。枸橼酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲溶液(PBS)、生物素标记的通用型二抗和四盐酸二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒均购自北京中杉生物试剂公司。切片机(RM2135)、展片机(HI1210)和显微镜(LM3000)为美国 Leica 公司产品,恒温培养箱(SLI-700)为日本 EYELA 公司产品。

2 方法

2.1 动物模型的建立 将感染泡球蚴的保种灰仓鼠处死,取病灶组织,制成原头节混悬液。将 60 只雌性 BALB/c 小鼠随机均分为实验组和对照组,消毒下

腹部皮肤,实验组每鼠腹腔注入 0.2 ml 原头节混悬液(约含 400 个原头节),对照组注射等量生理盐水,分别于接种后 2、8、30、90、180 和 360 d 分批处死实验组和对照组小鼠各 5 只,取小鼠肝组织于 10%中性甲醛液固定。将肝组织采用常规石蜡包埋,4 μm 厚连续切片,HE 染色,光镜观察小鼠肝脏组织病理学变化。

2.2 免疫组织化学法检测 TGF-β1 和 IL-10 表达水平 参照文献 [5] 用 SP 二步法检测,小鼠肝脏经脱蜡、水化和枸橼酸盐缓冲液微波修复抗原后,3% H₂O₂ 室温孵育 12 min 阻断内源性过氧化酶,加兔抗小鼠 IL-10 抗体(1:120),或兔抗小鼠 TGF-β1 抗体(1:250),4℃孵育过夜;加入生物素标记通用型二抗,37℃孵育 20 min;DAB 室温显色,苏木素复染。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。镜下观察,随机选取 5 个视野,免疫组化染色见细胞胞浆内棕黄色颗粒为阳性细胞,然后根据每个视野中阳性细胞数占细胞总数的百分比计算阳性率,每组 5 只小鼠分别计算阳性率。

3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计学分析。计量资料间比较运用 *t* 检验。

结 果

1 大体观察

实验组小鼠感染后 2 d 和 8 d 腹腔和肝脏均未见异常变化。感染后 30 d 可见肠壁出现泡球蚴囊泡,肝脏表面有直径约 1 mm 小囊泡,接种部位有块状囊泡。感染后 90 d 腹腔泡球蚴囊泡增多增大,呈半透明,成簇聚集,肝小叶出现多处直径不等的小囊泡。感染后 180 d 可见腹腔内黏连,泡球蚴囊泡数量急剧增多,体积增大,直径约 5~20 mm;肝脏部位可见直径约 20 mm 泡球蚴囊泡,肝脏体积变小,被泡球蚴侵蚀颜色暗红;囊泡中心出现钙化、坏死,不易与周围组织剥离。感染后 360 d 可见肝脏几乎被泡球蚴囊泡侵蚀,与周围肝组织分界不明显。对照组小鼠腹腔、肝脏中均未见泡球蚴囊泡组织,肝脏色鲜红。

2 病理学变化

实验组小鼠泡球蚴感染后 2 d 和 8 d 与对照组相比未见明显异常改变。感染后 30 d 出现炎症细胞浸润。感染后 90 d 炎症细胞浸润加重, 出现胆管增生, 肝库否细胞增生, 泡球蚴囊壁形成。感染后 180 d 肝小叶结构破坏, 肝细胞灶状坏死, 肝细胞与泡球蚴囊壁间形成明显的炎症细胞反应带, 有时还可见肉芽肿结节。感染后 360 d 肝脏汇管区周围发生弥漫性纤维增生、纤维化; 肝组织可见大量坏死和泡球蚴囊壁形成 (图 1A)。对照组小鼠肝组织中肝小叶结构完整, 偶可见少量炎症细胞浸润, 肝细胞胞浆疏松化和脂肪变性 (图 1B)。

3 免疫组织化学法检测结果

实验组小鼠肝组织 IL-10 表达水平随着泡球蚴感染时间的延长而逐渐上升。与对照组相比, 实验组

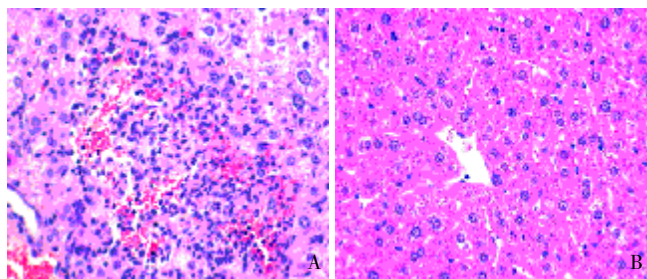
小鼠感染后 2 d 和 8 d IL-10 未表达; 感染后 30 d 表达显著升高 [(4.04±0.30)%]($P<0.01$); 感染后 90 d 表达水平达高峰[(16.39±1.73)%]($P<0.01$), 之后维持较高水平; 此时小鼠肝脏泡球蚴生长迅速, 感染后 360 d IL-10 表达略有下降 [(14.87±2.35)%], 但仍具有统计学意义($P<0.05$); 对照组小鼠肝组织中 IL-10 于注射后 90 d 出现低水平表达(表 1)。

实验组小鼠肝组织中 TGF-β1 的表达水平在感染期间显著增高。与对照组相比, 实验组小鼠感染后 2 d 和 8 d TGF-β1 未表达; 感染后 30 d 表达显著升高 [(5.04±0.17)%]($P<0.05$); 感染后 90 d 表达水平升高达最高峰[(23.69±2.29)%]($P<0.01$), 之后呈现下降趋势; 对照组小鼠肝组织中 TGF-β1 于注射后 90 d 出现低水平表达(表 2)。

讨 论

泡球蚴主要寄生于宿主的肝脏, 通过分泌毒素、机械性压迫和侵蚀等方式对肝脏进行破坏, 最终引起肝功能障碍。

IL-10 可由多种细胞分泌, 虽以 Th2 细胞、巨噬细胞和 CD8⁺ T 细胞分泌为主, CD4⁺CD25⁺ Tregs 在抗原刺激后也可分泌 IL-10。IL-10 具有抑制 Th1 细胞作用, 并有抗炎和诱导免疫耐受的作用。泡球蚴感染初期, 小鼠肝脏中 IL-10 不表达或低水平表达。魏晓丽等^[6]研究发现泡球蚴感染早期以 Th1 细胞介导的细胞免疫应答为主, 通过分泌大量的 IFN-γ 等细胞因子, 产生严重的炎症反应, 对宿主造成免疫损害。在感染



A: 感染后 90 d; B: 对照组。

A: At 90 d post infection; B: Control group.

图 1 小鼠肝组织病理形态学(HE 染色, ×400)

Fig. 1 Tissue pathomorphism of mouse liver (HE staining, ×400)

表 1 泡球蚴感染不同时期小鼠肝脏组织 IL-10 的表达水平
Table 1 IL-10 expression in liver of *E. multilocularis*-infected mice

分组 Group	数量 n	不同感染时间 IL-10 的表达水平/% IL-10 expression in different time/%					
		2 d	8 d	30 d	90 d	180 d	360 d
对照组 Control group	30	0	0	0	1.09±0.10	0.78±0.14	0.65±0.16
实验组 Experiment group	30	0	0	4.04±0.30**	16.39±1.73**	15.97±1.14**	14.87±2.35*

注: 与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。 Note: Compared with control, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

表 2 泡球蚴感染不同时期小鼠肝脏组织 TGF-β1 的表达水平
Table 2 TGF-β1 expression in liver of *E. multilocularis*-infected mice

分组 Group	数量 n	不同感染时间 TGF-β1 的表达水平/% TGF-β1 expression in different time/%					
		2 d	8 d	30 d	90 d	180 d	360 d
对照组 Control group	30	0	0	0	0.98±0.09	0.34±0.09	0.35±0.08
实验组 Experiment group	30	0	0	5.04±0.17*	23.69±2.29**	12.95±1.82*	15.04±1.23*

注: 与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。 Note: Compared with control, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

中后期,随着虫荷逐渐增加,转变为以 Th2 细胞为主的体液免疫,有利于泡球蚴在体内的生长。许多蠕虫感染过程中,宿主体内 CD4⁺CD25⁺ Tregs 的增殖与宿主免疫应答的下调或易于向 Th2 应答方向偏移有关。小鼠感染曼氏血吸虫卵后可诱导 CD4⁺CD25⁺ Tregs 分泌 IL-10,抑制树突状细胞分泌 IL-12,有利于 Th2 应答的产生^[7]。因此,感染后期小鼠肝脏中 IL-10 表达水平显著升高,可能与 Th2 细胞和 CD4⁺CD25⁺ Tregs 有关。IL-10 可抑制 Th1 分泌 γ 干扰素 (IFN- γ),促进 Th1 型细胞免疫向 Th2 型体液免疫偏移,因此,提示泡球蚴在小鼠体内及肝脏部位的迅速繁殖可能与 IL-10 表达水平的显著升高相关,IL-10 在感染中后期发挥抗炎作用的同时也促进了泡球蚴组织在体内迅速生长。

TGF- β 是调节细胞增殖生长、分化以及细胞外基质合成和沉淀的多功能细胞因子,具有抗炎作用,可通过阻止 Th1 和 Th2 细胞的分化及细胞因子的产生而发挥抑制作用^[8,9]。另外,其在 CD4⁺CD25⁺ Tregs 的分化、发育和抑制功能的发挥中也起重要作用^[10]。与对照组相比,随着泡球蚴感染时间的延长,尤以感染中期,实验组小鼠肝脏中 TGF- β 1 的表达水平显著升高。一方面 TGF- β 1 的形成伴随嗜酸粒细胞、中性粒细胞和纤维细胞的炎症浸润,促进了炎症的发展和肝纤维化的发生,引起宿主病灶组织一系列的病理损伤。除此以外,肝脏大量分泌 TGF- β 1 促进肝脏纤维化后包裹虫体以达到保护机体免受寄生虫侵害的作用,但同时也有助于泡球蚴逃避宿主的攻击。TGF- β 1 可促进 CD4⁺CD25⁺ Tregs 的产生^[11],故 TGF- β 1 的增加可能会促进感染肝脏中 IL-10 的分泌,使机体处于免疫抑制状态。IL-10 也会通过下调 Th1 细胞相关细胞因子 IFN- γ 促进 TGF- β 1 的产生^[12]。

CD4⁺CD25⁺ Tregs 与宿主体内多种免疫效应相互作用,机制复杂。因此,与 CD4⁺CD25⁺ Tregs 相关的细胞因子 IL-10 和 TGF- β 1 途径能够更好的解释其在寄生虫感染中产生的免疫抑制作用。本研究中与 CD4⁺CD25⁺ Tregs 相关的细胞因子 IL-10 和 TGF- β 1 的过度表达不利于控制泡球蚴宿主肝脏中的繁殖,并对泡球蚴感染所致宿主肝损伤及慢性感染的形成起重要

作用。若在感染中晚期单独或联合抑制 IL-10 或 TGF- β 1 的表达,可能会有效控制泡球蚴慢性感染的发展,为今后临床治疗提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] Wen H, Xu MQ. Practical Science of Echinococcosis [M]. Beijing: Science Press, 2007: 15-19. (in Chinese) (温浩,徐明谦.实用包虫病学[M].北京:科学出版社,2007: 15-19.)
- [2] Eckert J, Deplazes P. Biological, epidemiological and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern [J]. Clin Microbiol Rev, 2004, 17(1): 107-135.
- [3] Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self [J]. Nat Immunol, 2005, 6(4): 345-352.
- [4] Beiting DP, Gagliardo LF, Hesse M, et al. Coordinated control of immunity to muscle stage *Trichinella spiralis* by IL-10, regulatory T cells, and TGF- β [J]. J Immunol, 2007, 178(2): 1039-1047.
- [5] An JY, Yao GL, Zhou GP, et al. Application of microwave immunohistochemistry streptavidin peroxidase conjugated method on morphologic study of *Borrelia burgdorferi* in *Haemaphysalis longicornis* [J]. Chin J Vect Biol Control, 2003, 14(2): 122-123. (in Chinese) (安京媛,姚桂玲,周国萍,等.微波免疫组化 SP 法在长角血蜱体内伯氏疏螺旋体形态研究中的应用[J].中国媒介生物学及控制杂志,2003,14(2): 122-123.)
- [6] 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): 361-364. (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): 361-364.)
- [7] Mckee AS, Pearce EJ. CD25⁺CD4⁺ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development [J]. J Immunol, 2004, 173(2): 1224-1231.
- [8] Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta in T-cell biology [J]. Nat Rev Immunol, 2002, 2(1): 46-53.
- [9] Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, et al. TGF-beta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells [J]. Immunity, 2006, 24(2): 179-189.
- [10] Wing K, Ekmark A, Karlsson H, et al. Characterization of human CD25⁺CD4⁺ T cells in thymus, cord and adult blood [J]. Immunology, 2002, 106(2): 190-199.
- [11] Worthington JJ, Czajkowska BI, Melton AC, et al. Intestinal dendritic cells activate transforming growth factor- β and induce Foxp3⁺ T regulatory cells via integrin $\alpha\beta$ 8 [J]. Gastroenterology, 2011, 141(5): 1802-1812.
- [12] Fuss IJ, Boirivant M, Lacy B, et al. The interrelated roles of TGF-beta and IL-10 in the regulation of experimental colitis [J]. J Immunol, 2002, 168(19): 900-908.

(收稿日期: 2011-06-27 编辑: 衣凤芸)