

DOI:10.13350/j.cjpb.240305

• 论著 •

泡球蚴蛋白通过 Wnt/ β -Catenin 信号通路调控小鼠 肝星状细胞二肽基肽酶-4 的表达研究^{*}

木克西娜·木拉提¹, 努尔拜提·库苏曼², 毕晓娟³, 杨宁³, 楚璠³, 刘辉³, 房彬彬³,

孙立³, 何小龙¹, 高瑾⁴, 林仁勇^{1,3,*}

(1. 新疆医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室, 新疆乌鲁木齐 830011; 2. 省部共建中亚高发病因与防治国家重点实验室, 新疆医科大学; 3. 新疆医科大学第一附属医院临床医学研究院; 4. 新疆农业大学动物医学学院)

【摘要】 目的 探讨泡球蚴蛋白对肝星状细胞中纤维化关键基因二肽基肽酶-4(Dipeptidyl Peptidase 4, DPP4)表达的调控机制。 **方法** 免疫组织化学法检测二肽基肽酶-4在泡型棘球蚴病患者肝脏病灶近端与远端的表达情况。体外培养小鼠肝星状细胞系 JS1, 以 60 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的泡球蚴蛋白(*Echinococcus multilocularis* Protein, EmP)刺激 JS1 细胞, 检测细胞活化及 Wnt 通路的激活情况, Wnt 通路抑制剂(IWP-2)和激动剂(LY2090314)靶向干预检测肝星状细胞活化标志物 COL1A1、 α -SMA 与 PPAR γ , Wnt 通路关键分子 Wnt5a、 β -catenin、GSK3 β 以及 DPP4 的表达水平。 **结果** 免疫组织化检测结果显示泡型棘球蚴病患者肝脏病灶近端 DPP4 的表达(5927 ± 987.1)显著高于病灶远端(2478 ± 696.9), 差异有统计学意义($t=9.026, P<0.05$); EmP 可显著促进 JS1 细胞活化并促进 DPP4 的表达, 差异有统计学意义($F_{\text{DPP4}}=10.65, P<0.05$); 与对照组相比, EmP 刺激组 Wnt 通路激活, Wnt5a、 β -catenin、p-GSK3 β 的表达水平上升, 差异有统计学意义(WB: $F_{\text{Wnt5a}}=18.28, F_{\beta\text{-catenin}}=14.98, F_{\text{p-GSK3}\beta}=28.52$; RT-qPCR: $F_{\text{Wnt5a}}=27.29, F_{\text{CTNNB1}}=21.24, F_{\text{GSK3}\beta}=7.974, P<0.05$); Wnt 通路抑制剂 IWP-2 干预可抑制 EmP 蛋白对 α -SMA、DPP4 的表达的促进作用, 上调 PPAR γ 的表达, 差异有统计学意义(WB: $F_{\text{DPP4}}=26.27, F_{\alpha\text{-SMA}}=126.4, F_{\text{PPAR}\gamma}=8.187$; RT-qPCR: $F_{\text{DPP4}}=41.23, F_{\text{ACTA2}}=185.2, F_{\text{PPARG}}=136.2, P<0.05$); 与 EmP 刺激组相比, Wnt 通路激动剂可促进 JS1 细胞的活化及 DPP4 的表达, 差异有统计学意义(WB: $F_{\text{DPP4}}=151.0$; RT-qPCR: $F_{\text{DPP4}}=29.71, P<0.05$)。 **结论** EmP 蛋白可通过激活 Wnt/ β -Catenin 通路促进纤维化关键基因 DPP4 的表达。

【关键词】 泡球蚴; 肝纤维化; 二肽基肽酶-4; Wnt/ β -Catenin 通路

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2024)03-0275-05

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Mar.; 19(3): 275-279, 284.]

Regulation of Dipeptidyl Peptidase 4 expression in mouse hepatic stellate cells by *Echinococcus multilocularis* protein via Wnt/ β -Catenin signaling pathway

Mukexina Mulati¹, Nuerbaiti Kusuman², BI Xiaojuan³, YANG Ning³, CHU Jin³, LIU Hui³, FANG Bingbing³, SUN Li³, HE Xiaolong¹, GAO Jin⁴, LIN Renyong^{1,3} (1. Department of Biochemistry and Molecular Biology College of Basic Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. China State Key Laboratory of Pathogenesis, Prevention and Treatment of High Incidence Diseases in Central Asia, Xinjiang Medical University; 3. Clinical Medical Research Institute, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University; 4. College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University)***

【Abstract】 Objective To determine the regulatory mechanism of *Echinococcus multilocularis* protein on the expression of Dipeptidyl Peptidase 4 (DPP4), a key gene for fibrosis in hepatic stellate cells. **Methods** Mouse hepatic stellate cell line JS1 was cultured *in vitro*, and JS1 cells were stimulated with *E. multilocularis* protein (EmP) concentration of 60 $\mu\text{g/mL}$ to detect cell activation and activation of Wnt pathway, the expression of Dipeptidyl Peptidase4 in the closed and distant liver lesions of alveolar echinococcosis patients was detected by immunohistochemistry. Wnt pathway was targeted by Wnt pathway inhibitor (IWP-2) and agonist (LY2090314), and the expression levels of hepatic stellate cell activation markers COL1A1, α -SMA and PPAR γ , Wnt pathway key molecules Wnt5a, β -catenin, GSK3 β and DPP4 were detected

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目 (No. 81860361, 82060371, 32060223); 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目 (No. 2022D01D59, 2022D01E67); 新疆维吾尔自治区“天山英才”培养计划 (No. 2022TSYCLJ0032); 新疆维吾尔自治区重点实验室开放课题项目 (No. 2020D04028); 省部共建中亚高发病因与防治国家重点实验室开放课题 (No. SKL-HIDCA-2021-31)。

** **【通讯作者】** 林仁勇, E-mail: renronglin@xjmu.edu.cn

【作者简介】 木克西娜·木拉提 (1999-), 女, 新疆塔城人, 在读硕士, 研究方向: 肝脏损伤的分子机制研究。E-mail: 1147215839@qq.com

Results EmP could significantly promote the activation of JS1 cells and the expression of DPP4, with statistical significance ($F_{DPP4} = 10.65, P < 0.05$). The expression of DPP4 in the closer to the liver lesions (5927 ± 987.1) in alveolar echinococcosis patients was significantly higher than that in the distal end of liver lesions, with statistical significance (2478 ± 696.9), ($t = 9.026, P < 0.05$). Compared with the control group, the Wnt pathway was activated in EmP stimulation group, and the expression levels of Wnt5a, β -catenin and P-GSK3 β were increased, with statistical significance (WB: $F_{Wnt5a} = 18.28, F_{\beta\text{-catenin}} = 14.98, F_{P\text{-GSK3}\beta} = 28.52$; RT-qPCR: $F_{Wnt5a} = 27.29, F_{CTNNB1} = 21.24, F_{GSK3\beta} = 7.974, P < 0.05$). Wnt pathway inhibitor IWP-2 could inhibit the promoting effect of EmP protein on the expression of α -SMA and DPP4, and up-regulate the expression of PPAR γ , with statistical significance (WB: $F_{DPP4} = 26.27, F_{\alpha\text{-SMA}} = 126.4, F_{PPAR\gamma} = 8.187$; RT-qPCR: $F_{DPP4} = 41.23, F_{ACTA2} = 185.2, F_{PPARG} = 136.2, P < 0.05$). Compared with EmP stimulation group, Wnt pathway agonists could further promote JS1 cell activation and DPP4 expression, and the difference was statistically significant (WB: $F_{DPP4} = 151.0$; RT-qPCR: $F_{DPP4} = 29.71, P < 0.05$).

Conclusion EmP can promote the expression of DPP4, a key gene for fibrosis, by activating the Wnt/ β -Catenin pathway.

【Key words】 *Echinococcus multilocularis*; liver fibrosis; Dipeptidyl peptidase-4; Wnt/ β -Catenin pathway

泡型棘球蚴病 (Alveolar echinococcosis, AE) 是分布于北半球的一种寄生虫性人畜共患疾病,是由多房棘球蚴 (*Echinococcus multilocularis*) 幼虫期 (原头蚴) 感染所致^[1],纤维化是 AE 的典型病理特征之一^[2],纤维化的发展可抑制抗包虫药物对病灶区域的有效渗透,并阻碍了免疫细胞对病灶内部的浸润及杀伤,抗纤维化治疗有助于减轻肝脏损伤并提高机体或药物对 *E. multilocularis* 的清除效果^[3],肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSCs) 作为肝脏纤维化中关键的效应细胞,是肝损伤时细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的主要来源^[4],逆转肝星状细胞的活化是泡型棘球蚴病新的治疗途径。

二肽基肽酶 4 (DPP4) 是一种外肽酶,在多种器官中以跨膜蛋白形式存在,部分也以循环可溶性形式表达^[5]。DPP4 表达于小鼠成纤维细胞,与纤维化过程中 ECM 分泌增加有关^[6],参与多种器官中慢性纤维化疾病的发生发展,如肝纤维化、肾纤维化和肺纤维化^[7-9],DPP4 抑制剂可抑制 ECM 的沉积,进而减轻纤维化^[10-11]。本课题组前期研究发现,在泡球蚴感染小鼠模型中,DPP4 高表达于病灶周围,且 EmP 刺激可上调 HSCs 中 DPP4 的表达,提示 DPP4 可能作为纤维化关键基因参与了泡球蚴感染所致肝纤维化的发展^[12]。然而,HSCs 中 DPP4 表达调控机制尚不清楚,本文将从体外水平研究 EmP 对肝星状细胞中纤维化关键基因 DPP4 表达的调控机制。

对象与方法

1 研究对象

1.1 临床病例 以 2019 年 5 月-2021 年 2 月在新疆医科大学第一附属医院确诊的 10 例肝多房棘球蚴病患者作为研究对象,多房棘球蚴病患者诊断均经血清学和病理学检测证实,且符合《包虫病诊断标准》(WS257-2006)^[13]。留取手术切除组织标本 (病人接

受根治性肝部分切除术及离体肝切除+自体肝移植术),根据手术取材包括病灶近旁肝组织 (CLT) 10 例及对应病灶远端肝组织 (DLT) 10 例 (包括 CLT 和 DLT 成对标本 10 例),同时收集患者临床病理资料。

病例排除标准:1) 合并囊型包虫病患者;2) 合并肿瘤及严重感染者;3) 合并病毒性肝炎。10 例肝多房棘球蚴病患者,其中男性 6 例、女性 4 例,年龄 15~64 岁。

涉及本研究的参与对象均通过新疆医科大学第一附属医院伦理委员会批准 (编号:20140411-05),且所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 试剂与仪器 DMEM 4.5 g/L 高糖培养基、胎牛血清、HEPES、胰酶、青链霉素均购自美国 Gibco 公司;通路抑制剂/激动剂 IWP-2 和 LY2090314 均购自美国 Selleckchem 公司;PrimeScript RT 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;RT-qPCR 试剂盒购自德国 QIAGEN 公司;PVDF 膜购自美国 Millipore 公司;脱脂奶粉购自美国 BD 公司;StepOneTM 荧光定量 PCR 仪购自美国 Thermo Fisher Scientific;化学发光仪购自美国 BIO-RAD 公司。

1.3 细胞 小鼠肝星状细胞系 JS1 购自华拓生物公司。

2 方法

2.1 细胞培养 JS1 于 5% CO₂ 的 37 °C 恒温培养箱,采用 DMEM 4.5 g/L 高糖培养基 (10% 胎牛血清、1% HEPES、0.25% 胰酶,1% 链霉素和青霉素) 培养;细胞实验分为空白对照组、EmP 刺激组、IWP-2 干预组、LY2090314 干预组 4 组。

2.2 EmP 提取 分离保种于沙鼠体内的多房棘球蚴原头蚴 (PSCs),将泡球蚴原头蚴置于液氮研磨后加入 PBS,摇床震荡过夜。4 °C 13 500 r/min 离心 15 min,取上清,BCA 法定量,EmP 刺激组采用 60 μ g/mL 浓度进行干预。

2.3 免疫组织化学 取4%多聚甲醛固定肝脏组织,浸蜡连续切片,切片放60℃烤箱烘烤2h,二甲苯脱蜡,梯度酒精水化,3% H₂O₂ 浸润15min,EDTA抗原修复液热修复15min,自然冷却至室温,山羊血清室温封闭40min;加入二肽激肽酶-4(DPP4)抗体(ab187048,abcam),4℃孵育过夜,复温1h;加入二抗室温孵育2h,加入DAB显色,苏木精复染,盐酸乙醇分化,PBS返蓝,梯度酒精脱水,二甲苯透明、中性树胶封片后镜检,使用Image-Pro Plus Version 6.01软件进行图像分析。

2.4 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR) 用Trizol法提取JS1细胞总RNA,测RNA浓度,使用将RNA逆转录为cDNA,利用实时荧光定量PCR系统检测目的基因mRNA的表达量。以GAPDH作为内对照基因,采用2^{-ΔΔCT}方法进行结果计算,所需引物均购自于上海生工生物有限公司,序列信息见表1。

2.5 蛋白免疫印迹 细胞处理后用RIPA裂解混合液(RIPA裂解液:磷酸酶抑制剂:PMSF=100:1:1)提取各组总蛋白,采用BCA法进行蛋白定量,蛋白变性后取20μg蛋白样本经10% SDS PAGE电泳后,将蛋白转至0.45μm孔径PVDF膜,5%脱脂奶粉室温封闭1h,TBST洗膜,加入一抗(表2),4℃孵育过夜,TBST洗膜,室温孵育标记带HRP标记二抗2h,TBST洗膜,用ECL显色液于凝胶成像仪中拍照,Image J软件扫描分析蛋白条带灰度值。

表1 引物列表
Table 1 Primer list

基因 Gene	上游引物序列(5'-3') Forward Primer Sequence	下游引物序列(5'-3') Reverse Primer Sequence
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
ACTA2	GTCCAGACATCAGGGAGTAA	TCGGATACTTCAGCGTCAGGA
COL1A1	GCTCCTCTTAGGGCCACT	ATTGGGACCCCTTAGGCCAT
TIMP1	GCAACTCGGACCTGGTCATAA	CGGCCGTGATGAGAACT
MMP2	CAAGGATGGACTCCTGGACAT	TACTCGCCATCAGCGTTCCCAT
PPARG	GCCAAGGTGCTCAGAAGATGAC	GTGAAGGCTCATGCTGCTCTGTGTC
DPP4	ACTACAGTGGCTCAGGAGATTGAG	TCAACATGCTGCTGCTCGGATG
WNT5A	GCGGCTGCGGAGACAATC	CTGTCTACGGCTGCTTCATTG
CTNNB1	TGCCGTTGCTTCTTATGAGAC	TGGGCAAAGGCAAGGTTTCG
GSK3B	CCAAATGGGCGAGACACCTG	CTGAGGCTGCTGTGGCGTTG

表2 抗体列表
Table 2 List of Antibody

抗体名称 Antibody	品牌 Brand	货号 Cat. NO	浓度 Concentration
Anti-alpha smooth muscle Actin	abcam,美国	ab124964	1:5000
Anti-PPAR gamma	abcam,美国	ab209350	1:500
Anti-DPP4	abcam,美国	ab187048	1:1000
Anti-Wnt5a antibody	abcam,美国	ab229200	1:200
β-Catenin Rabbit mAb	CST,美国	8480S	1:1000
Phospho-GSK-3β Rabbit mAb	CST,美国	5558S	1:1000
GSK-3β Rabbit mAb	CST,美国	12456S	1:1000
重组 Anti-GAPDH	abcam,美国	ab181602	1:10000

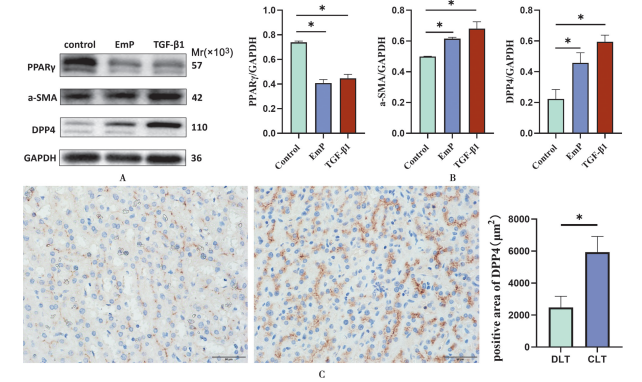
3 统计学分析

采用GraphPad8.0软件进行数据处理和分析。计量资料均采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用独立样本t检验估计两组间的统计学意义、单因素方差分析进行三组或更多组之间的比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 EmP刺激可促进肝星状细胞活化及DPP4的表达

Western blot结果显示,与对照组相比,EmP和TGF-β1处理组的α-SMA的表达水平显著升高、PPARγ显著减少。经EmP处理的JS1细胞与对照组相比,DPP4的表达在蛋白水平显著上调,差异有统计学意义($F_{PPAR\gamma} = 52.76, F_{\alpha-SMA} = 12.7, F_{DPP4} = 10.65, P < 0.05$), (图1A-B)。泡型棘球蚴病患者肝脏病灶近端DPP4的表达(5927 ± 987.1)显著高于病灶远端(2478 ± 696.9),差异有统计学意义($t = 9.026, P < 0.05$), (图1C)。



A EmP刺激肝星状细胞PPAR-γ、α-SMA、DPP4蛋白水平的变化 B Western Blot灰度计测结果分析柱状图(* P<0.05) C 泡型棘球蚴病患者肝脏病灶近、远端DPP4表达情况

图1 EmP促进肝星状细胞的激活及DPP4表达水平的变化

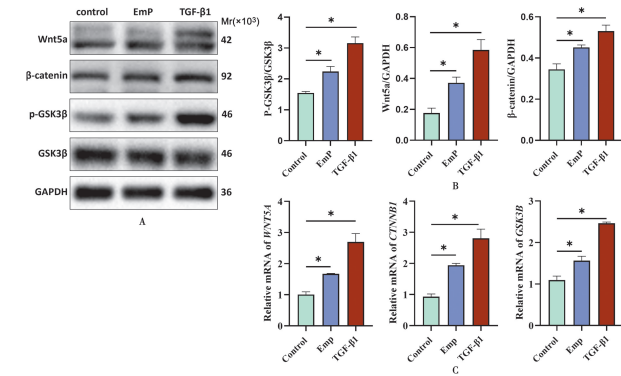
A EmP stimulated the changes of PPAR-γ, α-SMA and DPP4 protein levels in hepatic stellate cells B Analysis of gray meter measurement results(* P<0.05) C Expression of DPP4 in close and distal liver lesions of alveolar echinococcosis patients

Fig. 1 EmP promotes the activation of hepatic stellate cells and changes the expression level of DPP4

2 Wnt/β-Catenin信号通路在EmP刺激的肝星状细胞中被激活

Western blot结果显示,与对照组相比,经EmP刺激后的JS1细胞Wnt5a、β-Catenin、P-GSK3β的蛋白水平显著增加差异均有统计学意义($F_{Wnt5a} = 18.28, F_{\beta-Catenin} = 14.98, F_{P-GSK3\beta} = 28.52, P < 0.05$), (图2A-B)。RT-qPCR结果显示,与对照组相比,经EmP刺激后的JS1细胞WNT5A、CTNNB1、GSK3B的mRNA水平显著增加,差异均有统计学意义($F_{WNT5A} = 27.29, F_{CTNNB1} = 21.24, F_{GSK3\beta} = 7.974, P < 0.05$),

(图 C)。



A EmP 刺激小鼠肝星状细胞 Wnt/β-Catenin 信号通路蛋白表达情况 B Western Blot 灰度计测量结果分析柱状图 (* $P < 0.05$) C EmP 刺激小鼠肝星状细胞 Wnt/β-Catenin 信号通路 mRNA 表达情况

图 2 EmP 刺激肝星状细胞后 Wnt/β-Catenin 信号通路变化情况

A Expression of Wnt/β-Catenin signaling pathway protein in mouse hepatic stellate cells stimulated by EmP B Analysis of gray meter measurement results (* $P < 0.05$) C Expression of Wnt/β-Catenin signaling pathway mRNA in mouse hepatic stellate cells stimulated by EmP

Fig. 2 Changes of Wnt/β-Catenin signaling pathway after stimulation of hepatic stellate cells by EmP

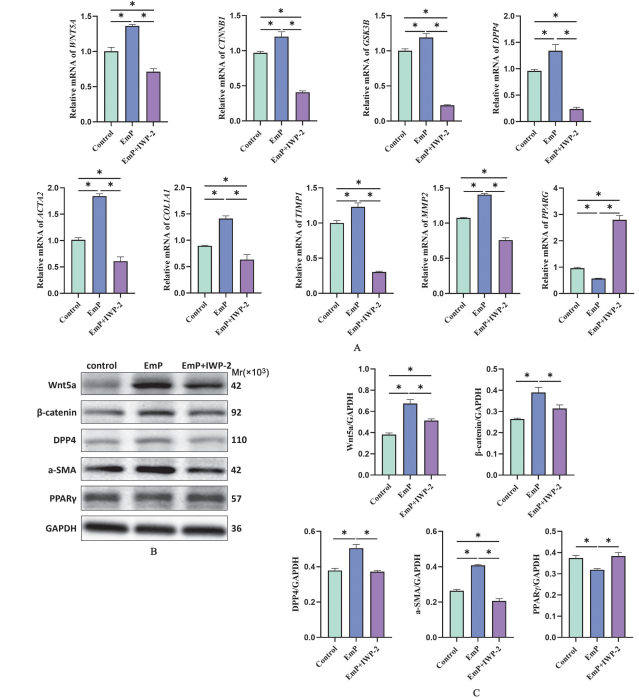
3 Wnt 通路抑制剂干预 EmP 刺激的肝星状细胞抑制 DPP4 的表达

IWP-2 刺激经 EmP 处理的 JS1 后,在 mRNA 水平上,GSK3B 表达受到抑制,CTNNB1、DPP4、ACTA2、COL1A1、TIMP1、MMP2 表达减少、PPARG 的表达增多,差异具有统计学意义 ($F_{GSK-3\beta} = 215.4$, $F_{WNT5A} = 60.66$, $F_{CTNNB1} = 87.31$, $F_{DPP4} = 41.23$, $F_{ACTA2} = 185.2$, $F_{COL1A1} = 26.22$, $F_{TIMP1} = 156.6$, $F_{MMP2} = 148.6$, $F_{PPARG} = 136.2$, $P < 0.05$), (图 3A)。Western blot 结果显示,IWP-2 干预后抑制 Wnt5a、β-catenin 和 p-GSK3β 的表达,同时下调 EmP 激活的小鼠肝星状细胞中 DPP4 的表达水平,随后肝星状细胞激活态标志物 α-SMA 减少、静息态标志物 PPAR-γ 增多,差异具有统计学意义 ($F_{WNT5A} = 33.59$, $F_{\beta-catenin} = 13.25$, $F_{DPP4} = 26.27$, $F_{\alpha-SMA} = 126.4$, $F_{PPAR-\gamma} = 8.187$, $P < 0.05$), (图 3B-C)。

4 Wnt 通路激动剂干预 EmP 刺激的 JS1 细胞促进 DPP4 的表达

LY2090314 刺激经 EmP 处理的 JS1 后,在 mRNA 水平上,GSK3B 表达受到抑制,CTNNB1 表达无升高,WNT5A、DPP4、ACTA2、COL1A1、TIMP1、MMP2 表达增加、PPARG 的表达减少,差异有统计学意义, ($F_{GSK-3\beta} = 101.1$, $F_{WNT5A} = 92.86$, $F_{CTNNB1} = 76.12$, $F_{DPP4} = 29.71$, $F_{ACTA2} = 58.87$, $F_{COL1A1} = 240.1$, $F_{TIMP1} = 43.69$, $F_{MMP2} = 183.7$, $F_{PPARG} = 55.94$, $P < 0.05$), (图 4A)。Western blot 结果显示,LY2090314 抑制 p-GSK3β 促进了 β-catenin

的稳定、Wnt5a 上调,促进了 DPP4 的表达,相对应的 HSCs 活化标志物 α-SMA 上调,同时限制了肝星状细胞静息态标志物 PPARγ 的表达,差异具有统计学意义 ($F_{p-GSK3\beta} = 131.9$, $F_{\beta-catenin} = 32.29$, $F_{Wnt5a} = 168.3$, $F_{DPP4} = 151.0$, $F_{\alpha-SMA} = 48.62$, $F_{PPAR\gamma} = 117.0$, $P < 0.05$), (图 4B-C)。



A IWP-2 干预 EmP 刺激的 JS1 细胞, mRNA 水平变化 B IWP-2 干预 EmP 刺激的 JS1 细胞, 蛋白水平变化 C Western Blot 灰度计测量结果分析柱状图 (* $P < 0.05$)

图 3 IWP-2 干预 EmP 刺激的 JS1 中 Wnt/β-Catenin 信号通路后变化

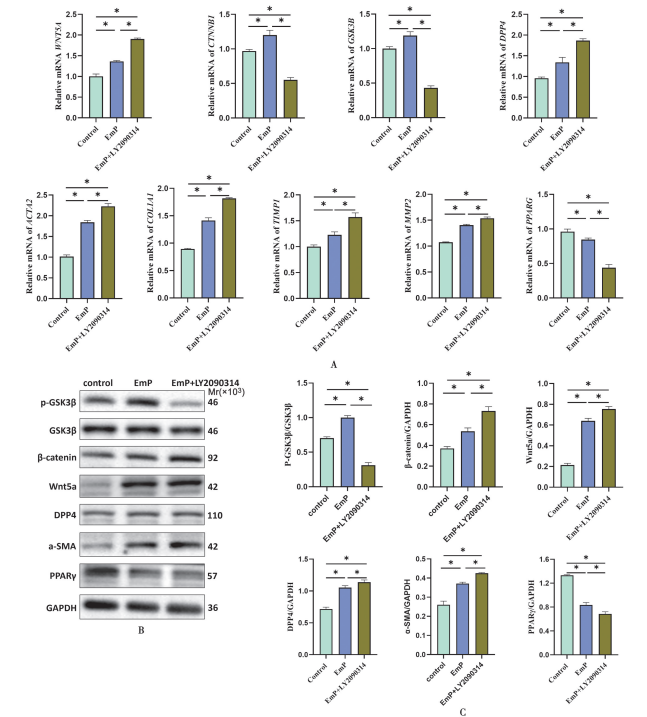
A The mRNA level changes of intervention with IWP-2 in EMP-stimulated hepatic stellate cells B The protein level changes of intervention with IWP-2 in EMP-stimulated hepatic stellate cells C Analysis of gray meter measurement results (* $P < 0.05$)

Fig. 3 Wnt/β-Catenin signaling pathway changes of intervention with IWP-2 in EMP-stimulated hepatic stellate cells

讨论

泡型棘球蚴病致死率高,其病理特征是病变周围各种免疫细胞浸润增加,产生“免疫抑制”微环境,有利于其持续感染,促进肝纤维化的发生发展^[14-16]。纤维化的发展抑制了抗包虫药物对病灶区域的有效渗透^[3]。肝纤维化的效应细胞为肝星状细胞,其受到外界刺激活化后形成肌成纤维细胞,并表达 α-SMA 等活化标志物^[4]。本研究发现,EmP 刺激可激活小鼠肝星状细胞,肝星状细胞活化是泡球蚴感染所致肝纤维化发生发展的核心环节。

DPP4 是一种蛋白水解酶,表达 DPP4 的成纤维细胞亚群的过度增殖是真皮瘢痕中结缔组织沉积的主要原因^[17],已有研究表明在伤口愈合的小鼠模型中抑制 DPP4 的表达可减少瘢痕的形成,DPP4 抑制剂可



A LY2090314 干预 EmP 刺激的 JS1 细胞, mRNA 水平变化 B LY2090314 干预 EmP 刺激的 JS1 细胞, 蛋白水平变化 C Western Blot 灰度计测结果分析柱状图 (* $P < 0.05$)

图 4 LY2090314 干预 EmP 刺激的 JS1 中 Wnt/β-Catenin 信号通路后变化

A The mRNA level changes of intervention with LY2090314 in EMP-stimulated hepatic stellate cells B The protein level changes of intervention with LY2090314 in EMP-stimulated hepatic stellate cells C Analysis of gray meter measurement results (* $P < 0.05$)

Fig. 4 Wnt/β-Catenin signaling pathway changes of intervention with LY2090314 in EMP-stimulated hepatic stellate cells

以治疗博莱霉素诱导的皮肤纤维化^[18], 还可以通过抑制肝星状细胞的活化缓解肝纤维化^[19]。与上述结果相一致, 本研究发现 EmP 刺激可显著诱导 HSCs 中的 DPP4 表达, 同时发现泡型棘球蚴患者肝脏病灶近端 DPP4 的表达显著高于远端, 提示 DPP4 同样参与了泡球蚴感染所致肝纤维化的发生发展。

Wnt/β-Catenin 通路参与包括肺、骨、肝脏等不同器官相关疾病发生发展的过程^[20]。已有研究表明, 在肝纤维化中, 间充质干细胞来源的 IGFBP-3、DKK-3 和 DKK-1 通过阻断小鼠 Wnt/β-Catenin 信号通路来抑制肝星状细胞活化, 从而减轻肝纤维化^[21]。研究表明 CD37 通过 Wnt/β-Catenin 信号通路调节肝星状细胞的活化^[22]。与上述结果相一致, 本研究发现 EmP 刺激可激活肝星状细胞中的 Wnt/β-Catenin 信号通路, 使用 IWP-2 抑制 Wnt/β-Catenin 信号通路活化后, DPP4 的表达显著降低。反之, 使用 LY2090314 激活 Wnt/β-Catenin 信号通路可显著促进纤维化关键因子 DPP4 的表达。提示 DPP4 的表达受 Wnt/β-Catenin 信号通路调控。

综上所述, EmP 刺激可显著促进肝星状细胞的活

化并上调 DPP4 的表达, 同时激活 Wnt/β-Catenin 通路, 干预 Wnt/β-Catenin 可影响 EmP 刺激后 DPP4 的表达, 进而调控肝星状细胞的活化, 靶向 Wnt/β-Catenin 通路可能作为治疗泡球蚴感染所致肝纤维化的新途径, 具有一定的转化价值。

【参考文献】

- [1] Casulli A, Barth TFE, Tamarozzi F. *Echinococcus multilocularis* [J]. Trends Parasitol, 2019, 35(9): 738-739.
- [2] Zhang C, Wang H, Li J, et al. Involvement of tigit in natural killer cell exhaustion and immune escape in patients and mouse model with liver *Echinococcus multilocularis* infection [J]. Hepatology, 2021, 74(6): 3376-3393.
- [3] Wen H, Vuitton L, Tuxun T, et al. Echinococcosis: Advances in the 21st century [J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 32(2): e00075-18.
- [4] Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017, 14(7): 397-411.
- [5] Ohm B, Moneke I, Jungraithmayr W. Targeting cluster of differentiation 26 / dipeptidyl peptidase 4 (cd26/dpp4) in organ fibrosis [J]. Br J Pharmacol, 2023, 180(22): 2846-2861.
- [6] Marques AP, Cunha-Santos J, Leal H, et al. Dipeptidyl peptidase iv (dpp-iv) inhibition prevents fibrosis in adipose tissue of obese mice [J]. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2018, 1862(3): 403-413.
- [7] Williams KH, Vieira De Ribeiro AJ, Prakoso E, et al. Circulating dipeptidyl peptidase-4 activity correlates with measures of hepatocyte apoptosis and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes mellitus and obesity: A dual cohort cross-sectional study [J]. J Diabetes, 2015, 7(6): 809-819.
- [8] Sharkovska Y, Reichetzeder C, Alter M, et al. Blood pressure and glucose independent renoprotective effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibition in a mouse model of type-2 diabetic nephropathy [J]. J Hypertens, 2014, 32(11): 2211-2223.
- [9] Jungraithmayr W, Yamada Y, Haberecker M, et al. Cd26 as a target against fibrous formation in chronic airway rejection lesions [J]. Life Sci, 2021, 278: 119496.
- [10] Kabat AM, Hackl A, Sanin DE, et al. Resident t(h)2 cells orchestrate adipose tissue remodeling at a site adjacent to infection [J]. Sci Immunol, 2022, 7(76): eadd3263.
- [11] Sokar SS, El-Sayad ME, Ghoneim ME, et al. Combination of sitagliptin and silymarin ameliorates liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 89: 98-107.
- [12] 努尔拜提·库苏曼, 木克西娜·木拉提, 毕晓娟, 等. 二肽基肽酶-4 在泡球蚴感染致肝纤维化中的作用研究 [J]. 中国病原生物学杂志, 2023, 18(1): 47-51.
- [13] 中华人民共和国卫生健康委员会. 《包虫病诊断标准》(WS257-2006) [S]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 1-5.
- [14] 马洋洋, 毕晓娟, 李亮, 等. 泡球蚴感染 c57bl/6 小鼠不同阶段 III 型胶原的表达及意义 [J]. 中国病原生物学杂志, 2018, 13(4): 382-386.

(下转 284 页)

巴细胞对细粒棘球蚴原头蚴的杀伤, IL-4 和 IL-10 水平的变化可反映包虫病人疾病进展情况, 也与治疗的成败相关^[11]。本研究结果显示 IBD 对照组小鼠 IL-4、IL-10 水平很低, 这与 IBD 引发的 1 型炎症反应相关, 而实验组小鼠血清中 IL-4、IL-10 水平则相对升高, 说明 Th2 的高水平状态削弱了 DSS 引发的 Th1 反应, 结合症状表明 IL-4、IL-10 可能参与对炎症性肠病的保护。

“卫生假设”提出宿主受到微生物或微生物产物刺激后, 免疫系统调控能力增强, 可防止炎症性疾病的发展^[12]。也有研究显示寄生虫感染可使小鼠 Treg 细胞活性增强并减少过敏性疾病的发生^[13-14]。炎症性肠病以肠道局部免疫系统过度反应为特点, 表现为 型免疫导致的炎症反应^[15]。寄生虫感染可改变宿主的免疫状态, 如能减轻炎症性肠病的症状^[16]。慢性寄生虫感染的必然结果是 T 细胞低反应性, 寄生虫尤其是蠕虫可降低抗原特异性 T 细胞的增殖反应, 并减少细胞因子产生, 因此可能减轻肠炎引起的炎性细胞浸润等表现。

【参考文献】

- [1] Wlodarska M, Kostic AD, Xavier RJ. An integrative view of microbiome-host interactions in inflammatory bowel diseases[J]. Cell Host Microbe, 2015, 17(5): 577-591.
- [2] Russo E, Yin K, Sheng X, et al. Editorial: The mechanism of immune cells in the development of inflammatory bowel disease (IBD) and colitis-associated colorectal cancer (CAC)[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1218958.
- [3] 赵祥运, 陈尼维. 炎症性肠病的流行病学研究进展[J]. 国际消化病杂志, 2011, 31(6): 342-344.
- [4] Rescigno M. The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity[J]. Trends Immunol, 2011, 32(6): 256-264.
- [5] Ryan S, Ruscher R, Johnston W, et al. Novel antiinflammatory biologies shaped by parasite-host coevolution[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2022, 119(36): e2202795119.
- [6] Craig PS, Hegglin D, Lightowlers MW, et al. Echinococcosis: Control and prevention[J]. Adv Parasitol, 2017, 96: 55-58.
- [7] Eichele DD, Kharbanda KK. Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(33): 6016-6029.
- [8] Soufli I, Toumi R, Rafa H, et al. Crude extract of hydatid laminated layer from *Echinococcus granulosus* cyst attenuates mucosal intestinal damage and inflammatory responses in Dextran Sulfate Sodium induced colitis in mice[J]. J Inflammation, 2015, 12(1): 19.
- [9] Gottstein B, Soboslay P, Ortona E, et al. Immunology of alveolar and cystic *Echinococcosis* (AE and CE)[J]. Adv Parasitol, 2017, 96: 1-54.
- [10] Rigano R, Profumo E, Di Felice G, et al. *In vitro* production of cytokines by peripheral blood mononuclear cells from hydatid patients[J]. Clin Exp Immunol, 1995, 99(3): 433-439.
- [11] Amri M, Mezioug D, Touil-Boukoffa C. Involvement of IL-10 and IL-4 in evasion strategies of *Echinococcus granulosus* to host immune response[J]. Eur Cytokine Network, 2009, 20(2): 63-68.
- [12] Bach J. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases[J]. N Engl J Med, 2002, 347(12): 911-920.
- [13] Shan W, Zhang W, Xue F, et al. *Schistosoma japonicum* peptide SJMHE1 inhibits acute and chronic colitis induced by dextran sulfate sodium in mice[J]. Parasites Vectors, 2021, 14(1): 455.
- [14] 张琳, 魏凯艳, 刘益娟. 普拉梭菌对溃疡性结肠炎不典型增生患者 Treg 细胞水平及 IL-23/IL-17 轴的影响[J]. 中国病原生物学杂志, 2022, 17(2): 224-228.
- [15] Zhou W, Zhang H, Huang L, et al. Disulfiram with Cu²⁺ alleviates dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice[J]. Theranostics, 2023, 13(9): 2879-2895.
- [16] Smith KA, Filbey KJ, Reynolds LA, et al. Low-level regulatory T-cell activity is essential for functional type-2 effector immunity to expel gastrointestinal helminths[J]. Mucosal Immunol, 2015, 9(2): 428-443.
- [17] 谭雅超, 李亮, 李智德, 等. 泡球蚴感染小鼠肝脏 α -sma 和 i 型胶原的表达及其意义[J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(11): 1324-1327.
- [18] Wang H, Zhang C S, Fang B B, et al. Dual role of hepatic macrophages in the establishment of the *Echinococcus multilocularis* metacestode in mice[J]. Front Immunol, 2020, 11: 600635.
- [19] Thul PJ, Akesson L, Wiking M, et al. A subcellular map of the human proteome[J]. Science, 2017, 356(6340).
- [20] Soare A, Gyorfi HA, Matei AE, et al. Dipeptidylpeptidase 4 as a marker of activated fibroblasts and a potential target for the treatment of fibrosis in systemic sclerosis[J]. Arthritis Rheumatol, 2020, 72(1): 137-149.
- [21] Zhang H, Sun D, Wang G, et al. Alogliptin alleviates liver fibrosis via suppression of activated hepatic stellate cell[J]. Biochem Bio-

phys Res Commun, 2019, 511(2): 387-393.

- [22] Liu J, Xiao Q, Xiao J, et al. Wnt/ β -catenin signalling: Function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities[J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 3.
- [23] Liu QW, Ying YM, Zhou JX, et al. Human amniotic mesenchymal stem cells-derived igfbp-3, dkk-3, and dkk-1 attenuate liver fibrosis through inhibiting hepatic stellate cell activation by blocking wnt/ β -catenin signaling pathway in mice[J]. Stem Cell Res Ther, 2022, 13(1): 224.
- [24] Jia WQ, Zhou TC, Dai JW, et al. Cd73 regulates hepatic stellate cells activation and proliferation through wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2021, 890: 173667.

【收稿日期】 2023-09-10 【修回日期】 2023-11-21

(上接 279 页)

【收稿日期】 2023-10-21 【修回日期】 2024-01-06