

DOI:10.13350/j.cjpb.240706

• 论著 •

包虫囊液对干扰素信号 TRIF/IFITM3 通路的影响^{*}

屈晴^{1,2}, 袁振^{1,2}, 地达尔·叶尔革命^{1,2}, 蒙克嘎勒^{2,3}, 齐新伟⁴, 单骄宇^{1,2,4**}

(1. 新疆医科大学基础医学院人体寄生虫学教研室, 乌鲁木齐 830017; 2. 新疆地方病分子生物学重点实验室;
3. 新疆医科大学基础医学院生理学教研室; 4. 新疆医科大学第一附属医院中亚高发疾病发病机制与防治国家重点实验室)

【摘要】 目的 探索包虫囊液干预人源肝细胞(L02)过程中 TRIF/IFITM3 通路相关蛋白的变化。 **方法** 从感染细粒棘球蚴病的羊肝中获取囊液,用不同比例囊液浓度(1:10、1:100和1:1000)干预肝细胞并设置阴性对照组(未加囊液干预)。采用囊液浓度(1:1000)干预肝细胞后分别在0、24、48和72 h收集细胞。实时荧光定量PCR检测TRIF/IFITM3通路相关mRNA的表达,Western blot检测TRIF、IRF3、IFITM3、Foxp3的蛋白表达变化。免疫荧光检测IFITM3、Foxp3的表达和定位。Spearman分析TRIF、IFITM3及Foxp3的相关性。 **结果** Western blot显示囊液浓度(1:1000)促进TRIF、IRF3、IFITM3蛋白表达,TRIF的相对表达量分别是(0.45±0.09)、(0.54±0.05)、(1.08±0.24)、(1.75±0.31);IFITM3的相对表达量分别是(1.02±0.41)、(1.00±0.16)、(1.24±0.12)、(1.84±0.20)。囊液浓度(1:1000)刺激肝细胞0、24、48和72 h后,Western blot显示TRIF、IRF3、IFITM3蛋白表达量逐渐下降,而Foxp3表达量增高。TRIF的相对表达量分别是(1.00±0.31)、(1.08±0.19)、(0.90±0.13)、(0.57±0.05);IFITM3的相对表达量分别是(0.80±0.26)、(0.94±0.09)、(0.82±0.19)、(0.54±0.18)。Foxp3的相对表达量分别是(0.70±0.11)、(0.80±0.02)、(0.83±0.03)、(1.08±0.04)。免疫荧光显示,在泡球蚴感染60 d时,小鼠肝脏IFITM3和Foxp3发生共定位。Spearman分析TRIF与IFITM3存在正相关性($r=0.704, P<0.01$),TRIF与Foxp3存在负相关性($r=-0.859, P<0.01$),IFITM3与Foxp3存在负相关性($r=-0.686, P<0.01$)。 **结论** 较低浓度的包虫囊液刺激TRIF/IFITM3通路相关分子表达,进而激活天然免疫的抗病原体功能;随着囊液干预时间增加TRIF/IFITM3受抑制,而Foxp3高表达,促进包虫在宿主体内慢性寄生。

【关键词】 细粒棘球蚴感染;Toll样受体衔接蛋白;干扰素诱导的跨膜蛋白3;核转录因子Foxp3

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2024)07-0773-06

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Jul.;19(7):773-778,783.]

The impact of hydatid cyst fluid on the interferon signaling TRIF/IFITM3 pathway

QU Qing^{1,2}, YUAN Zhen^{1,2}, DIDAER Yeergeming^{1,2}, Mengkegale^{2,3}, QI Xinwei⁴, SHAN Jiaoyu^{1,2,4}

(1. Department of Human Parasitology, Basic Medicine College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830017, China; 2. Xinjiang Key Laboratory of Molecular Biology of Endemic Diseases; 3. Department of Physiology, Basic Medicine College, Xinjiang Medical University; 4. Xinjiang Laboratory of Hydatid Functional Medicine, the First Affiliated Hospital) ***

【Abstract】 Objective This study investigates the modulation of TRIF/IFITM3 pathway-associated proteins in human liver cells (L02) following exposure to hydatid cyst fluid. **Methods** Hydatid cyst fluid was harvested from the livers of sheep infected by *Echinococcus granulosus*. L02 cells were treated with varying concentrations of this fluid (1:10, 1:100, 1:1000) alongside a negative control group that did not receive cyst fluid. Samples were collected at 0, 24, 48, and 72 hours post-treatment for the 1:1000 dilution. The expression levels of mRNAs related to the TRIF/IFITM3 pathway were quantified using real-time fluorescence quantitative PCR, while protein expression changes in TRIF, IRF3, IFITM3, and Foxp3 were analyzed through Western blot. Immunofluorescence was employed to examine the localization and expression of IFITM3 and Foxp3 proteins. Spearman's rank correlation coefficient was calculated to evaluate the relationships among TRIF, IFITM3, and Foxp3 expressions. **Results** Western blot showed that hydatid cyst fluid (1:1000) promoted TRIF, IRF3, and IFITM3 protein expression, and the expression of TRIF were (0.45±0.09), (0.54±0.05), (1.08±0.24), (1.75±0.31); the expression of IFITM3 were (1.02±0.41), (1.00±0.16), (1.24±0.12), (1.84±0.20). The hydatid cyst fluid (1:1000) stimulated the hepatocytes for 0, 24, 48 and 72 h, Western blot showed a gradual decrease in the protein expression of TRIF, IRF3, IFITM3 and an increase in the expression of Foxp3. The

* **【基金项目】** 新疆维吾尔自治区自然科学基金重点项目(No. 2022D01D12)。

** **【通讯作者】** 单骄宇, E-mail: shanjiaoyu2007@sina.com

【作者简介】 屈晴(1998-),女,新疆人,硕士研究生,主要研究方向为感染免疫。E-mail: 2577837152@qq.com

expression of TRIF were (1.00 ± 0.31) , (1.08 ± 0.19) , (0.90 ± 0.13) , (0.57 ± 0.05) ; the expression of IFITM3 were (0.80 ± 0.26) , (0.94 ± 0.09) , (0.82 ± 0.19) , (0.54 ± 0.18) ; the expression of Foxp3 were (0.70 ± 0.11) , (0.80 ± 0.02) , (0.83 ± 0.03) , (1.08 ± 0.04) . Immunofluorescence confirmed the co-localization of IFITM3 and Foxp3 in liver cells at 60 days post-infection. Spearman correlation analysis indicated a strong positive correlation between TRIF and IFITM3 expressions ($r=0.704, P<0.01$), a strong negative correlation between TRIF and Foxp3 ($r=-0.859, P<0.01$), and a negative correlation between IFITM3 and Foxp3 ($r=-0.686, P<0.01$). **Conclusion** Low concentrations of hydatid cyst fluid elicit an upregulation of TRIF/IFITM3 pathway-related molecules, thereby activating the host's innate immune response against the pathogen. Over time, this response is suppressed, coinciding with an increase in Foxp3 expression, which may facilitate the chronic parasitism of hydatid cysts within the host.

【Keywords】 *Echinococcus granulosus*; Toll-like receptor adaptor protein; Interferon-induced transmembrane protein 3 (IFITM3); Nucleus transcription factor Foxp3

包虫病又称棘球蚴病,分为细粒棘球绦虫的幼虫引起的囊型包虫病(Cystic echinococcosis, CE)和多房棘球绦虫的幼虫引起的泡型包虫病(Alveolar echinococcosis, AE)^[1],是一种严重危害世界各国人民健康和社会经济发展的人畜共患寄生虫病,多在医疗水平相对落后的牧区流行,如中亚、南美洲和东非^[2]。我国政府已大力加强了对包虫病的防控力度,但细粒棘球蚴病在儿童的感染率仍为2.2%,家犬感染成虫的感染率达到1.6%^[3],因此包虫病的防控依然非常重要。

包虫囊液是引起宿主超敏反应的重要致病原因。囊液是一种复杂的混合物,含有许多虫体分泌蛋白,可以刺激机体产生相应的免疫应答,如诱导中性粒细胞和巨噬细胞的浸润并伴有白细胞增多^[4]。Toll样受体作为宿主的第一道防线,在包虫感染早期诊断中起着至关重要的作用。此外CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T细胞的上调则是包虫抗宿主反应的重要机制之一^[5]。有研究发现在犬新孢子虫感染中,Toll样受体衔接蛋白敲除(TRIF^{-/-})小鼠表现出更高的寄生虫负担,炎症病变增加,γ干扰素减少^[6],但TRIF/IFITM3通路在包虫感染中研究鲜有报道。

课题组的前期研究中发现,两型包虫患者的肝脏内均有叉状头转录因子Foxp3和干扰素诱导的跨膜蛋白3(IFITM3)的表达^[7]。IFITM1、IFITM3、Foxp3蛋白表达量和mRNA的相对表达量高于肝血管瘤患者肝脏组织中的表达量,IFITM3受干扰素通路调控^[8]。因此基于此基础,本课题组将继续探讨包虫囊液干预下对I型干扰素信号通路的影响,以进一步探究包虫致宿主免疫逃避的机制。

材料与方法

1 材料

1.1 主要试剂及仪器 人源肝细胞系L02购于武汉普诺赛生命科技有限公司;Trizol试剂购于北京全式金生物技术股份有限公司;cDNA逆转录试剂盒和荧

光定量PCR试剂盒购于北京全式金生物技术有限公司;BCA蛋白定量试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司;引物由上海生工生物工程技术有限公司合成;IRF3、IFITM3和TRIF抗体购于Affinity Biosciences(北京)公司;Foxp3抗体购于美国Invitrogen公司;QuantStudio TM 1 Plus实时荧光定量PCR仪购于中国赛默飞世尔科技有限公司。

1.2 实验动物 C57BL/6J雌性小鼠36只,体重18~22 g,购于江苏集萃药康生物科技股份有限公司。C57BL/6J小鼠实验获得新疆医科大学第一附属医院伦理委员会批准(伦理号:IACUC-20230217-53)。

2 方法

2.1 包虫囊液获取及处理 收集感染细粒棘球蚴的病畜肝脏(新疆乌鲁木齐市米东区深发康畜禽屠宰场),流动水冲洗病畜肝脏至表面无血渍,75%酒精消毒肝脏表面后用无菌注射器抽取囊液后4℃6 000 r/min(离心半径15 cm)离心30 min并过滤,收集上清分装,-80℃冰箱保存待用。

2.2 引物设计 按照GenBank中人的TRIF、TBK1、IRF3、IFITM3、Foxp3和GAPDH基因序列设计引物,以人的GAPDH作为内参基因,全部引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,具体引物序列信息见表1。

2.3 细胞培养及干预 将L02细胞置于37℃、5%CO₂培养箱中培养至第三代,细胞呈对数生长期时将进行细胞铺板,16 h待细胞完全贴壁后,将细胞分为4组(高浓度组、中浓度组、低浓度组 and 对照组(未加囊液干预)),分别加入1:10、1:100、1:1000浓度比例的包虫囊液及不加囊液的细胞培养基进行干预,24 h后收集细胞并提取RNA和蛋白质。低囊液浓度组(1:1000)干预细胞0、24、48和72 h后收集细胞并提取RNA和蛋白质。

2.4 Western blot检测细胞 TRIF、IRF3、IFITM3、Foxp3蛋白表达 收集囊液干预后的细胞,用细胞裂解液(RIPA:PMSF=100:1)冰上裂解30 min后,离

心收集细胞蛋白并测定蛋白浓度。12% SDS-PAGE 电泳,胶孔加入 20 μ g 蛋白后进行电泳(80 V、30 min; 110 V、55 min)及电转(冰上操作,120 V、100 min)。电转结束后 1 $\times$ TBST 缓冲液洗膜 3 次,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,缓冲液洗膜 3 次,将 PVDF 膜置于不同的抗体孵育液中进行孵育并 4 $^{\circ}$ C 过夜,具体抗体为 IFITM3(1 : 1000;属性:兔来源)、IRF3(1 : 1000;属性:兔来源)、Foxp3(1 : 2000;属性:鼠来源)、TRIF(1 : 500;属性:兔来源)及 β -actin(1 : 5000;属性:兔来源)。24 h 缓冲液洗膜后进行二抗孵育 1.5 h,洗膜 3 次。二抗使用 5% 的脱脂奶粉稀释(1 : 5000),IFITM3、TRIF、IRF3 和 β -actin 用山羊抗兔,Foxp3 用山羊抗鼠。ECL 发光溶液显色曝光。采用 Image J 软件分析条带灰度值。

表 1 引物的基本信息
Table 1 The essential information of primers

引物名称 Primer name	核苷酸序列 Sequence (5'-3')	长度 Length	产物长度 Product length
TRIF	F:CCATGTGGAGGAAGGAACAGGAC	23	114
	R:TCTGGAGGTAGGCTGAGTAGGC	22	
TBK1	F:AGCCTTCTGGTCAATATCTGGAG	24	102
	R:CCTGAAGACCCGAGAAAGACTG	23	
IRF3	F:GCTCGTGATGGACAAGGTTGTG	22	121
	R:GAGTGACTGGCTGTTGGAATG	22	
IFITM3	F:CCCACGTACTCCAACCTCCA	20	119
	R:AGCACCAGAAACAGTGCCT	21	
Foxp3	F:TCCAGAGTTCCTCCACAAC	20	122
	R:ATTGACTGTCCGTCGCTCT	20	
GAPDH	F:GAGTCAACGGAATTGGTCGT	20	131
	R:GACAAGCTTCCCGTTCTCAG	20	

2.5 实时荧光定量 PCR 检测细胞 TRIF、TBK1、IRF3、IFITM3、Foxp3mRNA 的相对表达 收集干预后的细胞进行 RNA 提取,采用 Trizol 法抽提 RNA 并采用反转录试剂盒合成 cDNA(可放置 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用)。将待测基因的引物溶解并稀释,根据荧光定量 PCR 试剂盒配置反应体系,冰上操作。采用 qPCR 两步法,反应条件:94 $^{\circ}$ C 30 s;94 $^{\circ}$ C 5 s;60 $^{\circ}$ C 30 s,94 $^{\circ}$ C 5 s 到 60 $^{\circ}$ C 30 s,共 40 个循环;退火温度 60 $^{\circ}$ C。

2.6 免疫荧光染色 将甲醛固定好的肝组织进行脱水、透明、浸蜡、包埋、切片等操作后进行免疫荧光染色。IFITM3 一抗稀释比例 1 : 100,Foxp3 一抗稀释比例 1 : 100,IFITM3 二抗为 IFITC,Foxp3 二抗用 DyLight。保持切片湿润,荧光显微镜下观察采集图像。

3 统计分析

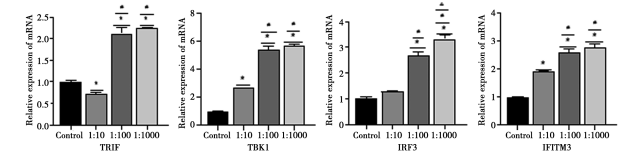
采用 Graphpad Prism 8 软件和 SPSS22.0 版本进行统计学分析,用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。多组数据比较采用 t 检验和单

因素方差分析(ANOVA),组内不同时间点比较采用重复测量方差分析,相关性分析采用 *Spearman* 分析法。

结 果

1 不同比例的囊液干预肝细胞后 TRIF/IFITM3 通路相关分子 mRNA 表达量

包虫囊液(1 : 10、1 : 100、1 : 1000)和未用囊液干预的阴性对照组,干预肝细胞 24 h 后,干扰素信号通路 TRIF、TBK1、IRF3 和 IFITM3 转录水平表达量随着囊液浓度的降低,表达量逐渐升高。TRIF 受到较低囊液(1 : 1000)刺激并对下游基因 TBK1、IRF3、IFITM3 上调,启动 TRIF/IFITM3 通路。TRIFmRNA 相对表达水平分别为 1.00 $\pm$ 0.05、0.73 $\pm$ 0.05、2.12 $\pm$ 0.24、2.24 $\pm$ 0.01;TBK1mRNA 相对表达水平分别为 1.00 $\pm$ 0.04、2.66 $\pm$ 0.02、5.40 $\pm$ 0.45、5.65 $\pm$ 0.18;IRF3mRNA 相对表达水平分别为 1.00 $\pm$ 0.11、1.28 $\pm$ 0.02、2.67 $\pm$ 0.28、3.33 $\pm$ 0.25;IFITM3mRNA 相对表达水平分别为 1.00 $\pm$ 0.03、1.91 $\pm$ 0.01、2.59 $\pm$ 0.18、2.76 $\pm$ 0.19(图 1)。



注:与阴性对照组比较,* $P<0.05$;与囊液浓度(1 : 10)比较,# $P<0.05$;与囊液浓度(1 : 100)比较, $\Delta P<0.05$ 。

图 1 不同浓度囊液干预 L02 细胞后 TRIF、TBK1、IRF3、IFITM3mRNA 表达量

Note: Compared with the negative control group,* $P<0.05$; compared with the cyst fluid concentration (1 : 10),# $P<0.05$; compared with the cyst fluid concentration (1 : 100), $\Delta P<0.05$

Fig. 1 The expression of TRIF,TBK1,IRF3,IFITM3mRNA in L02 cells after intervention with different concentrations of cyst fluid

2 囊液浓度(1 : 1000)干预肝细胞不同时间段 TRIF/IFITM3 通路和 Foxp3mRNA 表达量

较低的囊液干预肝细胞可激活 TRIF/IFITM3 通路,选用 1 : 1000 囊液浓度在不同时间点进行相应刺激。结果发现随着时间增加 TRIF、TBK1、IRF3 和 IFITM3mRNA 的表达量降低,但 Foxp3 表达量增高。在包虫晚期感染,TRIF/IFITM3 通路受到抑制,而 Foxp3 高表达,抑制性转录因子可能协助包虫进行慢性寄生。TRIFmRNA 相对表达水平分别为 1.00 $\pm$ 0.08、2.48 $\pm$ 0.38、1.38 $\pm$ 0.07、1.11 $\pm$ 0.03;IFITM3mRNA 相对表达水平分别为 1.00 $\pm$ 0.03、1.93 $\pm$ 0.02、1.62 $\pm$ 0.08、1.27 $\pm$ 0.06;Foxp3mRNA 相对表达水平分别为 1.00 $\pm$ 0.02、1.15 $\pm$ 0.02、1.96 $\pm$ 0.06、2.58 $\pm$ 0.11(图 2)。

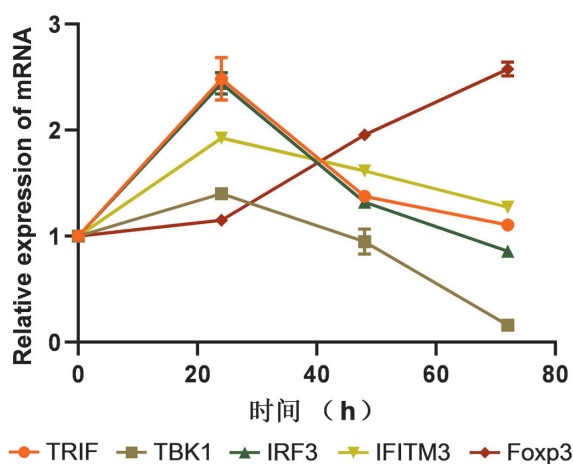


图2 囊液浓度(1:1000)干预 L02 细胞不同时间段后 TRIF、TBK1、IRF3、IFITM3 和 Foxp3 mRNA 的相对表达量趋势图

Fig. 2 The expression of TRIF, TBK1, IRF3, IFITM3 and Foxp3 in L02 cells treated with cyst fluid concentration (1:1000) for different time periods

3 不同浓度囊液干预下肝细胞 TRIF/IFITM3 通路相关分子蛋白表达量

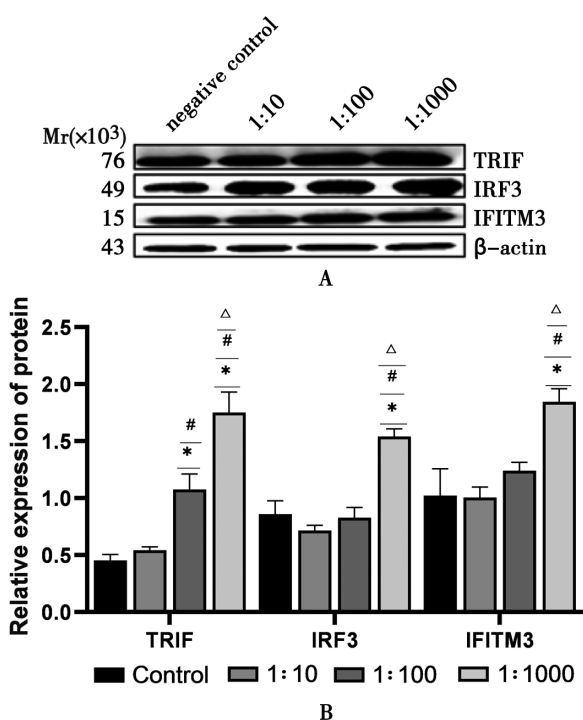
包虫囊液干预肝细胞 24 h 后, TRIF、IRF3 和 IFITM3 蛋白表达量随着囊液浓度降低表达量逐渐升高。TRIF 的相对表达量分别是 0.45 ± 0.09 、 0.54 ± 0.05 、 1.08 ± 0.24 、 1.75 ± 0.31 ; IRF3 的相对表达量分别是 0.86 ± 0.20 、 0.76 ± 0.08 、 0.83 ± 0.16 、 1.54 ± 0.12 ; IFITM3 的相对表达量分别是 1.02 ± 0.41 、 1.00 ± 0.16 、 1.24 ± 0.12 、 1.84 ± 0.20 (图 3)。

4 囊液浓度(1:1000)干预肝细胞 TRIF、IRF3、IFITM3 和 Foxp3 蛋白表达量

在蛋白表达水平上, 同样发现 TRIF、IRF3 和 IFITM3 表达量随着时间增加表达量降低, 而 Foxp3 表达量随着时间增加表达量增加。TRIF 的相对表达量分别是 1.00 ± 0.31 、 1.08 ± 0.19 、 0.90 ± 0.13 、 0.57 ± 0.05 ; IFITM3 的相对表达量分别是 0.80 ± 0.26 、 0.94 ± 0.09 、 0.82 ± 0.19 、 0.54 ± 0.18 ; Foxp3 的相对表达量分别是 0.70 ± 0.11 、 0.80 ± 0.02 、 0.83 ± 0.03 、 1.08 ± 0.04 (图 4)。此时 Foxp3 抑制机体发出的免疫应答, TRIF/IFITM3 通路发挥免疫应答作用减弱。

5 小鼠肝脏组织 IFITM3 与 Foxp3 表达与定位

免疫荧光观察 IFITM3 和 Foxp3 在包虫感染小鼠肝脏组织中的定位(图 5)。IFITM3 在细胞膜上表达, 其荧光强度在 60 d 时最强, 随着感染时间的增加, IFITM3 在 180 d 荧光强度减弱, 表明其表达量下降。包虫感染早期细胞核可见 Foxp3 表达, 但在感染中后期, 发现 Foxp3 表达量逐渐增加。在包虫感染 60 d 时, IFITM3 和 Foxp3 发生共定位。IFITM3 和 Foxp3 相互作用发生在细胞质中。



注:(A—B:囊液刺激后肝细胞 TRIF、IRF3 和 IFITM3 蛋白表达水平)与阴性对照组比较,* $P < 0.05$;与囊液浓度(1:10)比较,# $P < 0.05$;与囊液浓度(1:100)比较, Δ $P < 0.05$ 。

图3 不同浓度囊液干预 L02 细胞后 TRIF、IRF3、IFITM3 蛋白表达量

Note:(A—B:TRIF,IRF3 and IFITM3 protein expression levels in hepatocytes after cystic fluid stimulation) Compared with the negative control group,* $P < 0.05$;compared with the cyst fluid concentration (1:10),# $P < 0.05$;compared with the cyst fluid concentration (1:100), Δ $P < 0.05$.

Fig. 3 The expression of TRIF,IRF3,IFITM3 protein in L02 cells treated with different concentrations of cyst fluid

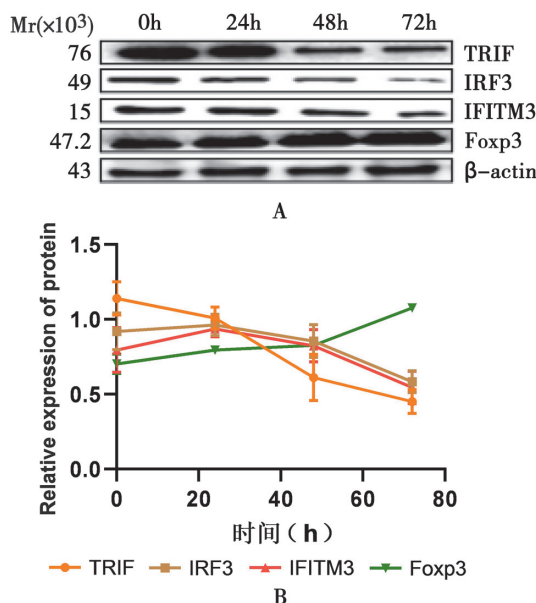


图4 囊液浓度(1:1000)干预 L02 细胞不同时间段后 TRIF、IRF3、IFITM3 和 Foxp3 的蛋白表达量

Fig. 4 The expression levels of TRIF,IRF3,IFITM3 and Foxp3 proteins in L02 cells treated with cyst fluid concentration (1:1000) for different time periods

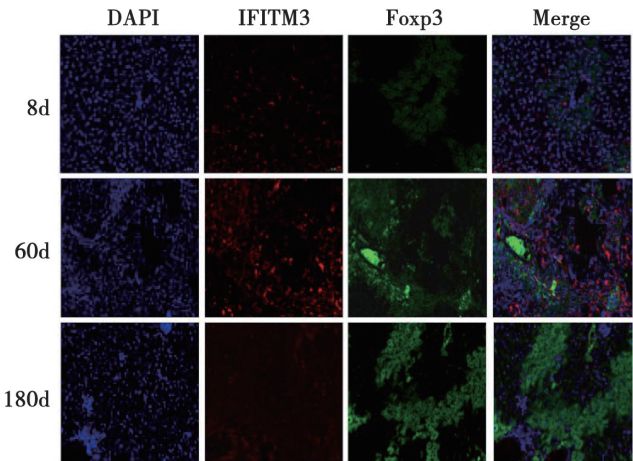


图5 免疫荧光观察包虫感染小鼠8、60和180 d的IFITM3和Fcpx3的表达和定位(200×)
Fig. 5 Immunofluorescence observation of IFITM3 and Fcpx3 expression and localization in hydatid infected mice at 8, 60 and 180 days (200×)

6 TRIF与IFITM3和Fcpx3的相关性分析

对肝细胞中TRIF与IFITM3和Fcpx3进行Spearman分析,在蛋白质水平上,随着囊液干预时间增加,TRIF与IFITM3存在正相关性($r=0.704, P<0.01$)(图6),TRIF与Fcpx3存在负相关性($r=-0.859, P<0.01$)(图7),IFITM3与Fcpx3存在负相关性($r=-0.686, P<0.01$)(图8)。

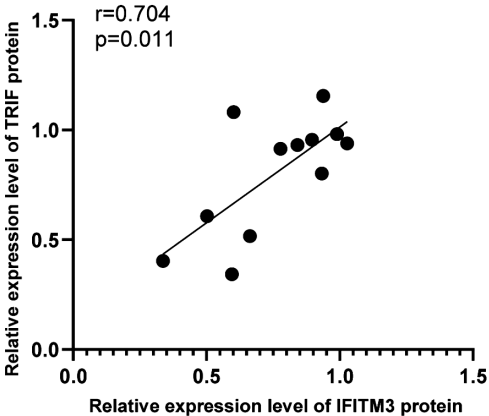


图6 囊液浓度(1:1000)干预不同时间段下IFITM3与TRIF蛋白相对表达水平的相关性分析
Fig. 6 Correlation analysis between IFITM3 and TRIF protein relative expression levels under the intervention of cyst fluid at different time periods (1:1000)

讨论

包虫病是一种人畜共患寄生虫病,主要在牧区流行,具有重要的医学和兽医学意义^[8-9]。棘球蚴虫体分泌的抗原刺激机体启动天然免疫反应清除或杀伤病原体,但虫体分泌的蛋白也会诱导肝脏形成免疫抑制的环境以帮助寄生虫有效地逃避宿主的免疫攻击^[10],因此,了解抗寄生虫的天然免疫信号通路在包虫病感染

中的作用是非常必要的。在衣原体感染中TRIF缺失的巨噬细胞表现出干扰素(IFN)表达受损^[11]。干扰素诱导的跨膜蛋白IFITM3直接限制体内呼吸道合胞病毒感染,IFITM3敲除导致小鼠疾病加重^[12]。有研究报道T细胞耐受是包虫感染发病机制的关键因素^[13],然而天然免疫反应在这一过程中的作用尚未被揭示。

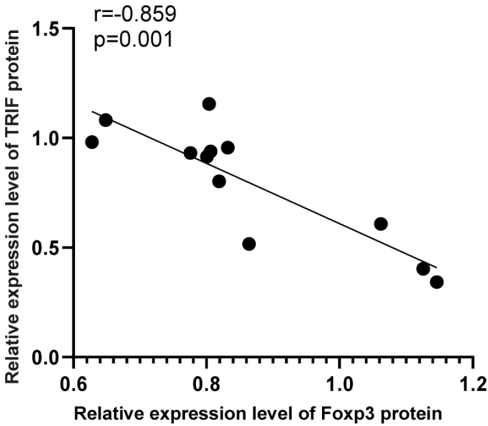


图7 囊液浓度(1:1000)干预不同时间段TRIF与Fcpx3蛋白相对表达水平的相关性分析
Fig. 7 Correlation analysis between TRIF and Fcpx3 protein relative expression levels under the intervention of cyst fluid at different time periods (1:1000)

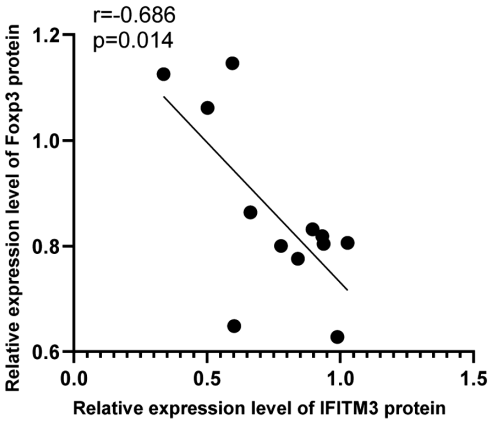


图8 囊液浓度(1:1000)干预不同时间段IFITM3与Fcpx3蛋白相对表达水平的相关性分析
Fig. 8 Correlation analysis between IFITM3 and Fcpx3 protein relative expression levels under the intervention of cyst fluid at different time periods (1:1000)

本研究主要探讨包虫对干扰素信号通路TRIF、IRF3、IFITM3的作用影响。课题组采用不同浓度(1:10、1:100、1:1000)的包虫囊液干预肝细胞,以模拟包虫感染的不同阶段,实验发现囊液浓度(1:1000)刺激下,干扰素信号通路TRIF、IRF3、IFITM3高表达。较低的囊液浓度相当于包虫感染早期,虫体蛋白能够激活干扰素信号通路,进而诱导机体产生强烈的免疫应答。TLRs是先天免疫中最强大的武器之一,可以感知蠕虫来源的抗原并对其做出反应^[14]。

TRIF、IRF3 和 IFITM3 是干扰素信号通路中的关键分子,这些分子的高表达可能有助于机体迅速识别和清除病原体,从而限制感染的发展。然而,囊液浓度(1 : 1000)干预肝细胞不同时间段后,TRIF、IRF3 和 IFITM3 表达量下降,而转录因子 Foxp3 的表达量逐渐升高,作为 Treg 细胞相对特异性分子,Foxp3 在肝细胞中也有表达。在包虫感染过程中,虫体慢性释放抗原,慢慢启动干扰素信号通路及抗炎因子发挥抗病原体作用,但随着感染时间增加,Foxp3 占主导位置。

病毒、细菌和寄生虫感染过程中,I 型干扰素($\text{IFN}\alpha/\beta$)对先天免疫细胞和获得性免疫细胞有不同的作用。人体内几乎所有的细胞都能产生 $\text{IFN}\alpha/\beta$,通常是在病原微生物产物刺激病原体识别受体(PRR)的刺激下产生的,这些受体位于细胞表面、胞浆或内体隔膜中^[15]。干扰素诱导的跨膜蛋白(IFITMs)是抵御病毒的第一道防线,其在炎症感染中发挥的作用属于先天免疫^[16],而 Foxp3 与适应性免疫有关。TRIF 的激活导致干扰素 α/β 产生。在细胞表面的 TLRs 中,识别细菌内毒素(LPS)的 TLR4 是最有效的 I 型干扰素诱导剂,它主要通过含有 TLR 结构域的接头蛋白 TRIF 诱导干扰素来传递信号。TBK1 结合适配分子 TRIF,导致 IRF3 激活^[17]。IRF3 和 IRF7 是诱导干扰素必须的干扰素调节因子,诱导干扰素 α/β 的核心原理依赖于 IRF3 的转录,IRF3 会促使干扰素诱导的跨膜蛋白 IFITM3 表达^[18]。在抵御病毒和寄生虫感染期间,这些细胞因子的表达保护宿主免受病毒和寄生虫攻击。

疟原虫在感染肝脏阶段诱导 I 型干扰素信号通路反应对宿主保护至关重要,TRIF 信号转导通路促进炎症因子分泌,确保天然免疫系统对病原体发挥免疫攻击^[19-20]。囊液浓度(1 : 10)抑制 TRIF、TBK1、IRF3 和 IFITM3 的表达,推测在棘球蚴感染期间,较高的囊液浓度可能阻断干扰素信号通路发挥保护宿主的作用。有研究报道,I 型干扰素也抑制宿主保护性细胞因子的产生,这可能与 Treg 细胞有关^[21]。通过免疫荧光实验发现,小鼠感染包虫早期,IFITM3 高表达,但在感染晚期,IFITM3 表达量下降,而 Foxp3 在感染晚期高表达。IFITM3 与 Foxp3 在小鼠感染包虫 60 d 发生共定位,推测 IFITM3 与 Foxp3 存在相互作用,在包虫感染晚期,Foxp3 具有表达优势,其可能反向影响 IFITM3 表达,进而干扰 IFITM3 发挥抗病原体作用。通过 Spearman 相关性分析发现,IFITM3 与 Foxp3 存在负相关性。

综上所述,在棘球蚴感染的早期,TRIF/IFITM3 通路发挥抗病原体作用,但随着虫体蛋白长期刺激机体,TRIF/IFITM3 通路表达下调,干扰天然免疫的抗

病原体功能,进而抑制宿主发挥抗病原体的作用。

【参考文献】

- [1] 黄嫣,伍卫平,韩帅,等. 2018-2019 年全国棘球蚴病监测分析[J]. 中国病原生物学杂志,2021,16(9):1025-1029.
- [2] 周璇,侯秋莲,李斌,等. 细粒棘球蚴虫微囊对小鼠腹腔巨噬细胞活化及炎症因子水平的影响[J]. 中国病原生物学杂志,2021,16(4):411-418.
- [3] 孟庆玲,乔军. 新疆包虫病流行病学及防控策略[J]. 动物医学进展,2023,44(11):112-116.
- [4] Brehm K. The role of evolutionarily conserved signalling systems in *Echinococcus multilocularis* development and host-parasite interaction[J]. Med Microbiol Immunol,2010,199(3):247-259.
- [5] Wang Y, Zhou H, Shen Y, et al. Impairment of dendritic cell function and induction of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells by excretory-secretory products: a potential mechanism of immune evasion adopted by *Echinococcus granulosus*[J]. BMC Immunol, 2015,16:44.
- [6] Miranda VDS, Fran a FBF, da Costa MS, et al. Toll-like receptor 3-TRIF pathway activation by *Neospora caninum* RNA enhances infection control in mice[J]. Infect Immun,2019,87(4):e00739-18.
- [7] 单骄宇,热比亚·努力,李瑞,等. 调节性 T 细胞转录因子 Foxp3 和 IL-8 在棘球蚴病患者肝组织病灶中的表达[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2018,36(3):218-223.
- [8] 杨雨阳. 细粒棘球蚴感染过程中宿主限制性因子 IFITM3 与 Foxp3 的关联研究[D]. 乌鲁木齐:新疆医科大学,2022.
- [9] 闵宏悦,田凤鸣,张靖仪,等. MCP-1 介导单核细胞浸润在泡型包虫病肝纤维化中的作用[J]. 中国病原生物学杂志,2023,18(4):400-405,410.
- [10] 徐小丹,王二强,刘坪,等. 细粒棘球蚴感染小鼠 M-MDSC 对 Treg 和 Th17 细胞增殖的调控[J]. 中国免疫学杂志,2020,36(23):2832-2836.
- [11] Aubry C, Corr S C, Wienerroither S, et al. Both TLR2 and TRIF contribute to interferon- β production during *Listeria* infection[J]. PLoS One,2012,7(3):e33299.
- [12] Everitt A R, Clare S, Pertel T, et al. IFITM3 restricts the morbidity and mortality associated with influenza[J]. Nature, 2012,484(7395):519-523.
- [13] Zhang C, Shao Y, Yang S, et al. T-cell tolerance and exhaustion in the clearance of *Echinococcus multilocularis*: role of inoculum size in a quantitative hepatic experimental model[J]. Sci Rep, 2017,7(1):11153.
- [14] Huang Q, Kryger P, Le Conte Y, et al. Survival and immune response of drones of a Nosemosis tolerant honey bee strain towards *Neospora ceranae* infections[J]. J Invertebr Pathol, 2012,109(3):297-302.
- [15] Liu L, Xu TC, Zhao ZA, et al. Toll-like receptor 4 signaling in neurons mediates cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. Mol Neurobiol,2023,60(2):864-874.
- [16] Tan JMJ, Garner ME, Regeimbal JM, et al. *Listeria* exploits IFITM3 to suppress antibacterial activity in phagocytes[J]. Nat Commun,2021,12(1):4999.

(下转 783 页)

- (2):424-429.
- [3] Smith ES, Moon AS, Ohanlon R, et al. Radical trachelectomy for the treatment of early-stage cervical cancer: a systematic review [J]. *Obstet Gynecol*, 2020, 136(3):533-542.
- [4] Nitecki R, Ramirez PT, Frumovitz M, et al. Survival after minimally invasive vs open radical hysterectomy for early-stage cervical cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *JAMA Oncol*, 2020, 6(7):1019-1027.
- [5] 宋蓉蓉, 倪观太, 陈琨, 等. miRNA199、miR-127 在 HPV 感染宫颈癌组织中的表达及意义 [J]. *中国妇产科临床杂志*, 2021, 22(5):512-513.
- [6] 曹位平, 郭建淑, 冯文静, 等. 橄榄苦苷对缺血再灌注大鼠心肌急性炎症损伤的保护作用 [J]. *中国免疫学杂志*, 2022, 38(16):1940-1945.
- [7] Lu HY, Zhu JS, Xie J, et al. Hydroxytyrosol and oleuropein inhibit migration and invasion via induction of autophagy in ER-positive breast cancer cell lines (MCF7 and T47D) [J]. *Nutr Cancer*, 2021, 73(2):350-360.
- [8] Lu HY, Zhu JS, Zhang Z, et al. Hydroxytyrosol and oleuropein inhibit migration and invasion of MDA-MB-231 triple negative breast cancer cell via induction of autophagy [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2019, 19(16):1983-1990.
- [9] 李铖, 孙红玲, 顾超. 橄榄苦苷通过 circMBOAT2/miR-106a-5p 信号通路调控口腔鳞癌细胞 CAL27 增殖和凋亡的机制 [J]. *西部医学*, 2022, 34(11):1588-1594.
- [10] Katoh M, Katoh M. Precision medicine for human cancers with Notch signaling dysregulation (Review) [J]. *Int J Mol Med*, 2020, 45(2):279-297.
- [11] 张赛, 宋正阳, 王淑远, 等. 三七总皂苷通过 Notch3/Hes-1/p27Kip1 信号通路抑制低氧性肺动脉高压大鼠肺血管重构 [J]. *中国病理生理杂志*, 2022, 38(2):209-214.
- [12] Shen Q, Reedijk M. Notch signaling and the breast cancer micro environment [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2021, 1287(30):183-200.
- [13] Xing C, Xu L, Yao Y. Beneficial role of oleuropein in sepsis-induced myocardial injury. Possible Involvement of GSK-3 β /NF- κ B pathway [J]. *Acta Cir Bras*, 2021, 36(1):1-10.
- [14] Luo Y, Yu X, Zhao P, et al. Effects of resveratrol on tight junction proteins and the Notch1 Pathway in an HT-29 cell model of inflammation induced by lipopolysaccharide [J]. *Inflammation*, 2022, 45(6):2449-2464.
- [15] 杨一, 陈雪梅, 朱争艳. HPV 阳性宫颈癌组织中 miR-34b 的表达水平及其临床意义 [J]. *现代肿瘤医学*, 2021, 29(19):3448-3452.
- [16] 李丹萍, 李宗民, 张丽峡, 等. 血清 miR-18a, miR-485-5p 对 HPV 阳性宫颈癌的诊断价值 [J]. *中华全科医学*, 2023, 21(2):263-266.
- [17] Zheng SJ, Huang KL, Tong T. Efficacy and mechanisms of oleuropein in mitigating diabetes and diabetes complications [J]. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(22):6145-6155.
- [18] Nediani C, Ruzzolini J, Romani A, et al. Oleuropein, a bioactive compound from oleaeuropaea l, as a potential preventive and therapeutic agent in non-communicable diseases [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2019, 8(12):578-579.
- [19] 黄德旭, 包义明. 橄榄苦苷通过下调 miR-720 抑制卵巢癌细胞增殖并诱导其凋亡的研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 38(15):1778-1881.
- [20] 连婧汝, 杨建梅, 徐玮, 等. 橄榄苦苷调控 Wnt/ β -catenin 信号通路对裸鼠子宫颈癌移植瘤生长的作用 [J]. *宁夏医科大学学报*, 2020, 42(9):18-22.
- [21] Zhang S, Cui Z. MicroRNA-34b-5p inhibits proliferation, stemness, migration and invasion of retinoblastoma cells via Notch signaling [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(3):255-256.
- [22] Reichrath J, Reichrath S. Notch signaling in prevention and therapy: fighting cancer with a two-sided sword [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2021, 1287(25):1-7.
- [23] Cheng JW, Duan LX, Yu Y, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells promote prostate cancer cell stemness via cell-cell contact to activate the Jagged1/Notch1 pathway [J]. *Cell Biosci*, 2021, 11(1):87-88.
- [24] Lian H, Hui Y, Xiao PT, et al. Baicalein suppresses the proliferation of human cervical cancer cells via Notch 1/Hes signaling pathway [J]. *J Cancer Res Ther*, 2019, 15(6):1216-1220.

【收稿日期】 2024-01-29 【修回日期】 2024-04-10

(上接 778 页)

- [17] Xu J, Wang P, Li Z, et al. IRF3-binding lncRNA-ISIR strengthens interferon production in viral infection and autoinflammation [J]. *Cell Rep*, 2021, 37(5):109926.
- [18] Meischel T, Fritzl S, Villalon-Letelier F, et al. IFITM proteins that restrict the early stages of respiratory virus infection do not influence late-stage replication [J]. *J Virol*, 2021, 95(20):e0083721.
- [19] Buccini DF, Roriz BC, Rodrigues JM, et al. Antimicrobial peptides could antagonize uncontrolled inflammation via Toll-like 4 receptor [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10:1037147.
- [20] Guan W, Xu DW, Yang SG, et al. Observation of intestinal flora diversity with the parasites infection process in a nonlethal malaria model of BALB/c mice induced by *Plasmodium yoelii* 17XNL strain [J]. *Decod Infect Transm*, 2023, 1:100004.
- [21] Zhou X, Wang W, Cui F, et al. Extracellular vesicles derived from *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid from patients: isolation, characterization and evaluation of immunomodulatory functions on T cells [J]. *Int J Parasitol*, 2019, 49(13-14):1029-1037.

【收稿日期】 2024-02-04 【修回日期】 2024-04-26