



王佳文, 刘雪薇, 王雪, 周璐, 白雪, 焦晨龙, 侯美如, 兰卓, 邱鸿宇, 王春仁, 高俊峰. 华支睾吸虫感染诱导小鼠肝巨噬细胞极化的动态变化研究[J]. 中国农业大学学报, 2025, 30(02): 115-125.

WANG Jiawen, LIU Xuewei, WANG Xue, ZHOU Lu, BAI Xue, JIAO Chenlong, HOU Meiru, LAN Zhuo, QIU Hongyu, WANG Chunren, GAO Junfeng. Dynamic changes of liver macrophage polarization induced by *Clonorchis sinensis* infection in mice[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2025, 30(02): 115-125.

DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2025.02.11

华支睾吸虫感染诱导小鼠肝巨噬细胞极化的动态变化研究

王佳文 刘雪薇 王雪 周璐 白雪 焦晨龙 侯美如 兰卓 邱鸿宇
王春仁 高俊峰*

(黑龙江八一农垦大学 动物科技学院, 黑龙江 大庆 163319)

摘要 为分析华支睾吸虫感染过程中小鼠肝巨噬细胞极化的动态变化,本研究首先利用HE染色法检测感染后不同阶段肝脏病理与炎性浸润变化,再通过流式细胞术检测感染不同阶段M1/M2型肝巨噬细胞所占比例,随后通过qRT-PCR检测感染不同阶段M1型相关标志物*iNOS*、*CD86*和*IL-1 β* 与M2型相关标志物*Arg1*、*CD206*和*Ym1* mRNA水平,并通过ELISA方法检测巨噬细胞相关促炎因子*TNF- α* 和*IL-1 β* 与抑炎因子*TGF- β 1*和*IL-10*分泌水平。结果表明:1)华支睾吸虫感染后,小鼠肝脏HE染色显示细胞由正常形态逐渐转变为纤维化病变,且炎性浸润在感染1~2周时较为明显,在感染6~10周时下降。2)流式细胞术结果显示,M1型肝巨噬细胞比例在感染1~2周时显著高于M2型肝巨噬细胞($P<0.01$),M2型肝巨噬细胞比例在感染3~10周时显著高于M1型肝巨噬细胞($P<0.01$)。3)qRT-PCR结果显示,M1型标志物*iNOS*、*CD86*和*IL-1 β* mRNA水平在感染1~4周呈升高后降低趋势,在感染6~10周时显著升高($P<0.01$)。M2型标志物*Arg1*、*CD206*和*Ym1* mRNA水平在感染1~10周时逐渐升高。4)ELISA结果显示,促炎细胞因子*TNF- α* 和*IL-1 β* 水平在感染1~4周时呈升高后降低趋势,在感染6~10周时显著升高($P<0.01$)。抑炎细胞因子*TGF- β 1*和*IL-10*水平在感染1~10周时逐渐升高。综上,M1型巨噬细胞在感染早期优先升高并占主导,M2型巨噬细胞在感染中后期升高并占主导,M1和M2型巨噬细胞在卵排放阶段极化比例发生转变。本研究通过分析肝巨噬细胞极化的动态变化,为更好地控制华支睾吸虫病提供见解。

关键词 华支睾吸虫; 肝巨噬细胞; 极化动态分析; 极化标志物; 极化相关细胞因子

中图分类号 S855.9

文章编号 1007-4333(2025)02-0115-11

文献标志码 A

Dynamic changes of liver macrophage polarization induced by *Clonorchis sinensis* infection in mice

WANG Jiawen, LIU Xuewei, WANG Xue, ZHOU Lu, BAI Xue, JIAO Chenlong, HOU Meiru, LAN Zhuo, QIU Hongyu, WANG Chunren, GAO Junfeng*

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract The study was to analyze the dynamic changes of liver macrophage polarization in mice during *Clonorchis sinensis* infection. In this study, HE staining was used to detect the changes of liver pathology and inflammatory infiltration at different stages of infection, and flow cytometry was used to detect the proportion of M1/M2 liver macrophages at different stages of infection. Subsequently, mRNA levels of M1-

收稿日期: 2024-04-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(32172886, 32361133554); 黑龙江省自然科学基金项目(LH2021C071); 黑龙江八一农垦大学三横三纵支持计划(ZRCQC202204)

第一作者: 王佳文(ORCID: 0009-0009-4386-0514), 硕士研究生, E-mail: aa18345481299@163.com

通讯作者: 高俊峰(ORCID: 0000-0001-9298-5625), 副教授, 主要从事分子寄生虫学与动物寄生虫病防治的研究, E-mail: gaojunfeng_2005@163.com

related markers *iNOS*, *CD86* and *IL-1 β* and M2 related markers *Arg1*, *CD206* and *Ym1* were detected by qRT-PCR at different stages of infection. The secretion levels of macrophage-related pro-inflammatory factors *TNF- α* and *IL-1 β* , and anti-inflammatory factors *TGF- β 1* and *IL-10* were detected by ELISA. Finally, to comprehensively analyze the dynamic changes of M1/M2 liver macrophage polarization in mice during *Clonorchis sinensis* infection. The results demonstrated that: 1) Following infection with *Clonorchis sinensis*, the HE staining results of the mice liver exhibited a gradual transformation of cells from a normal morphology to fibrosis. Additionally, the inflammatory infiltration was more pronounced during the initial 1-2 weeks of infection, subsequently declining during the subsequent 6-10 weeks. 2) The results of flow cytometry demonstrated a notable increase in the proportion of M1-type hepatic macrophages relative to M2-type hepatic macrophages during the initial 1-2 week period of infection ($P<0.01$). Conversely, the proportion of M2-type hepatic macrophages exhibited a significant rise in comparison to M1-type hepatic macrophages during the subsequent 3-10 week phase of infection ($P<0.01$). 3) The results of qRT-PCR revealed a notable increase in the levels of M1-type markers, including *iNOS*, *CD86*, and *IL-1 β* mRNA, during the initial 1-4 weeks of infection. This was followed by a decline and subsequent rise in these levels during the subsequent 6-10 weeks ($P<0.01$). In contrast, the levels of M2-type markers, such as *Arg1*, *CD206*, and *Ym1* mRNA, exhibited a gradual increase throughout the 1~10 weeks of infection. 4) ELISA results indicated that the levels of pro-inflammatory cytokines *TNF- α* and *IL-1 β* tended to increase significantly and then decrease at 1-4 weeks of infection, and increased significantly at 6~10 weeks of infection ($P<0.01$). The levels of the anti-inflammatory cytokines *TGF- β 1* and *IL-10* exhibited a gradual increase over the course of 1-10 weeks of infection. In conclusion, M1-type macrophages were found to be elevated and predominant during the early stages of infection, while M2-type macrophages were elevated and predominant during the middle and late stages of infection. Additionally, the polarization ratio of M1-type and M2-type macrophages shifted during the egg-production stage. This study provides insights into the potential for better control of clonorchiasis by analyzing the dynamics of hepatic macrophage polarization.

Keywords *Clonorchis sinensis*; liver macrophage; polarization dynamic analysis; polarization marker; polarization-related cytokines

华支睾吸虫(*Clonorchis sinensis*)隶属于后睾科(Opisthorchiidae)、支睾属(*Clonorchis*),主要寄生在人、猫、猪、犬等动物的肝胆管及胆囊内^[1]。华支睾吸虫病是由华支睾吸虫引起的一种非常重要的食源性人畜共患寄生虫病。目前全世界已有3 500万人感染,其中我国有1 300万人感染,是华支睾吸虫病危害最严重的国家^[2]。华支睾吸虫病主要在东亚地区流行,已对当地人口与水产养殖业造成了较大威胁,且该病已严重阻碍了畜牧产业的经济发展^[3]。华支睾吸虫感染可引起胆管的多种病理改变,包括胆管扩张、胆管周围纤维化和粘膜增生等。慢性和严重感染可引起胆管炎、胰腺炎、肝纤维化和胆管癌^[4-6]。

肝巨噬细胞占全身巨噬细胞量的80%,肝巨噬细胞主要来源有枯否(Kupffer)细胞和单核来源的巨噬细胞,在肝脏感染后激活,通过释放趋化因子、细胞因子、活性氧(ROS)和一氧化氮(NO)等相关

产物来参与调节宿主免疫反应^[7-8],在肝脏先天免疫反应中占主导地位。Faure-Dupuy等^[9]研究表明,经典活化型巨噬细胞(M1型)可通过分泌*IL-1 β* 和*IL-6*来降低乙型肝炎病毒表面抗原水平,进而抑制乙型肝炎的进展。Wan等^[10]描述了肝巨噬细胞可释放*IL-6*、*IL-1 β* 、*CCL2*、*VEGFA*和*TNF*来调节肝细胞癌的免疫应答机制,通过增强肿瘤细胞的增殖来促进肝细胞癌的发展。Ramachandran等^[11]研究表明,在肝纤维化进程中发现了一种单核细胞来源的TREM2⁺CD9⁺巨噬细胞亚群,该亚群可在肝纤维化进程中不断扩大,并表现出促纤维化的相关表型,以此来促进肝纤维化的发生发展。

在蠕虫感染中,交替活化型巨噬细胞(M2型)极化占据着重要地位^[12]。休眠状态巨噬细胞(M0型)在受到外来刺激后可极化为2个主要细胞亚群,即M1型巨噬细胞和M2型巨噬细胞型^[13]。M1型巨噬细胞可在LPS等促炎因子刺激下高表达

iNOS、*TNF- α* 、*CD86*和*CXCL10*等^[14-18],参与炎症过程的起始和维持,并通过产生*TNF- α* 、*IL-12*和*iNOS*等清除寄生虫^[7]。相反,M2型巨噬细胞可在*IL-4*等炎症因子的刺激下高表达*Arg1*、*CD206*、*Ym1*和*CCL2*等^[19-21],参与炎症消退和组织修复,并通过*Arg1*将L-精氨酸代谢为脯氨酸和多胺来促进寄生虫生存^[22]。巨噬细胞在被寄生虫或微生物感染后可分化为不同亚型来调节疾病的发生发展。Zheng等^[23]通过日本血吸虫感染小鼠模型研究发现,浸润的巨噬细胞被虫卵可溶性抗原激活为M2型极化来降低M1型极化,从而导致肝肉芽肿和纤维化。Wang等^[24]研究表明旋毛虫可以通过成虫排泄分泌产物上调*PD-1*的表达和M2型巨噬细胞极化来减轻M1型极化,从而减轻DSS诱导的肠炎症状。Mahajan等^[25]研究表明,结核杆菌感染宿主后可促进巨噬细胞向M2型极化,通过促进*PPAR- γ* 的形成来抑制ROS、NO和吞噬溶酶体的形成,以此来维持细胞内结核杆菌的存活,促进慢性结核病的发展。Cassetta等^[26]研究报道,人类免疫缺陷病毒I型感染人体后,M2型巨噬细胞标志物*CD163*、*CD206*、*CCL18*和*IL-10*的表达下调,M1型巨噬细胞标志物*CCL3*、*CCL4*和*CCL5*表达上调,且巨噬细胞表型的改变造成了病毒DNA片段合成受损、前病毒整合延迟和前病毒转录减少,有效降低了病毒在宿主细胞中的复制,限制了获得性免疫缺陷综合征的发生发展。由此可见,巨噬细胞不同极化表型在寄生虫或微生物感染造成的疾病中具有重要调节作用。但关于华支睾吸虫感染不同时期宿主巨噬细胞极化表型的动态变化还少有报道。

因此,本研究通过分析小鼠原代肝巨噬细胞M1和M2型极化所占比例、相应极化标志物以及细胞因子的产生与变化,以确定华支睾吸虫感染不同周期后小鼠肝脏中巨噬细胞极化的动态变化,将为更好地预防华支睾吸虫病的发生提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2023年7—9月,于黑龙江省大庆市采集麦穗鱼样品。BALB/c小鼠购自哈尔滨医科大学实验动物学部(生产许可证号:SCXK(黑)2019-001),黑龙江八一农垦大学科学技术伦理委员会伦理批准号:DWKJXY2023039。

IV型胶原酶干粉(C5138)购自Merck公司。FcRblock(101319)、AF488 anti-mouse F4/80抗体(123119)、PerCP-Cy5.5 anti-mouse CD11b抗体(101227)、PE anti-mouse CD86抗体(105007)、APC anti-mouse CD206抗体(141707)购自Biolegend公司。*TNF- α* 、*IL-1 β* 、*IL-10*、*TGF- β 1* ELISA试剂盒(48 Tests)购自上海朗顿生物科技有限公司。逆转录试剂盒(R323-01)购自Vazyme公司。

1.2 华支睾吸虫人工感染模型构建与分组

收集到的鱼肉进行压片处理后镜下观察华支睾吸虫囊蚴感染情况,将囊蚴感染的鱼进行鱼糜化处理,通过60 g胃蛋白酶和60 mL盐酸制备成的3 L溶液,37℃ 200 r/min消化4 h后,经60目铜纱网过滤,分离华支睾吸虫囊蚴并4℃保存备用。将试验组分为0周(未感染阶段)、1~2周(早期感染阶段)、3~4周(卵排放阶段)、6~10周(中后期感染阶段),每组10只小鼠。每只BALB/c小鼠口服感染50个华支睾吸虫囊蚴,对照组进行等体积生理盐水的灌服。对感染后的小鼠粪便进行盐酸乙醚法检测^[27],如观察到华支睾吸虫虫卵存在,即表明华支睾吸虫人工感染模型构建成功。

1.3 小鼠原代肝巨噬细胞的分离培养与鉴定

采用胶原酶原位灌注法和密度梯度离心技术对小鼠进行原代肝巨噬细胞的分离^[28],将小鼠麻醉后开腹露出肝门静脉,埋留置针后,经肝门静脉缓慢注入D-Hank's溶液冲净肝脏内血液至土黄色。利用0.05% IV型胶原酶消化液灌注消化肝组织,取下肝脏均质化后37℃消化10 min,100 g/min,4℃水平离心3 min。取上清于50 mL离心管中,400 g/min,4℃水平离心8 min,弃上清,2 mL RPMI-1640培养基重悬细胞。取15 mL离心管,前后加入50%和25% percoll分离液各2 mL,最后加入细胞重悬液2 mL,1 400 g/min,4℃水平离心20 min,吸取percoll分离液交界处细胞层,用红细胞裂解液裂解2 min,500 g/min,4℃水平离心5 min后弃上清。利用D-Hank's重悬细胞,所获得的细胞即为原代肝巨噬细胞。

将原代肝巨噬细胞贴壁培养的细胞爬片固定在4%多聚甲醛中,用0.1% Triton X-100透

化,然后用5% BSA封闭。将细胞爬片与F4/80抗体在4℃下孵育过夜,然后与荧光标记的二抗在室温下孵育1 h。使用DAPI对细胞核染色10 min。荧光显微镜获取图像,并使用Image Pro Plus 6.0软件定量测量正色区域。

1.4 病理组织学检测

取小鼠新鲜肝脏置于4%多聚甲醛组织固定液中固定,切片后分别放入二甲苯中10 min,随后无水乙醇5 min,依次使用酒精浓度为95%、90%、80%和70%脱水5 min,后蒸馏水洗。苏木素染5 min,1%的盐酸酒精分化后流水冲洗,0.6%氨水返蓝后再次流水冲洗。切片放入伊红染液中染色1~3 min。将切片依次放入酒精浓度为95%、无水乙醇中各5 min,二甲苯脱水透明5 min,晾干后中性树胶封片。显微镜镜检,图像采集CaseViewer2.3分析。

1.5 分子生物学检测

1.5.1 酶联免疫吸附试验

各组小鼠经眼球采血分离血清,利用商品化ELISA试剂盒检测TNF- α 、IL-1 β 、IL-10和TGF- β 1的水平。通过华支睾吸虫感染不同时期的小鼠血清细胞因子水平,以评估肝脏巨噬细胞的极化类型。

1.5.2 实时荧光定量逆转录酶链式反应

对不同时期小鼠原代肝脏巨噬细胞进行总RNA的提取,总RNA通过逆转录试剂盒反转录为cDNA,利用M1型极化标志物(*iNOS*、*CD86*、*IL-1 β*)和M2型极化标志物(*Arg1*、*CD206*、*Ym1*)的特异性引物进行荧光定量PCR扩增,以*GAPDH*作为内参进行相对定量分析,通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的相对含量。引物序列如表1。

表1 qRT-PCR引物序列
Table 1 qRT-PCR Primers sequence

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	产物大小/bp Product size	GenBank 登录号 GenBank accession
<i>iNOS</i>	F:CTGCAGCACTTGGATCAGGAACCTG R:GGAGTAGCCTGTGTGCACCTGGAA	310	NM_010927.3
<i>CD86</i>	F:CAGCACGGACTTGAACAACC R:CTCCACGGAAACAGCATCTGA	144	NM_019388.3
<i>IL-1β</i>	F:TCGCAGCCAGCACATCAACAAGAG R:TGCTCATGTCCTCATCCTGGAAGG	118	NM_008361.4
<i>Arg1</i>	F:ACATTGGCTTGCGAGACGTA R:ATCACCTTGCCAATCCCCAG	469	NM_007482.3
<i>CD206</i>	F:CATGAGGCTTCTCCTGCTTCTG R:TTGCCGTCTGAACTGAGATGG	143	NM_008625.2
<i>Ym1</i>	F:GGATGGCTACACTGGAGAAA R:AGAAGGGTCACTCAGGATAA	178	NM_009892.4
<i>GAPDH</i>	F:AAGAAGGTGGTGAAGCAGGC R:TCCACCACCCTGTTGCTGTA	203	NM_017008.4

1.6 流式细胞术检测

利用2 μ L FcRblock对小鼠原代肝巨噬细胞进行封闭10 min,加入2 μ L AF488-F4/80抗体、2 μ L PerCP-Cy5.5-CD11b抗体和5 μ L PE-CD86抗体进行表面染色,4℃孵育30 min,PBS洗涤后加入细胞固定液室温避光固定30 min,150 g/min,4℃离心5 min弃掉固定液。加入100 μ L缓冲液重悬细胞后,加入2.5 μ L APC-CD206抗体,室温避光孵育

30 min。孵育完毕后,利用2 mL缓冲液洗涤细胞2次,加入500 μ L PBS重悬细胞,上机检测,检查结果利用Flowjo_v10.8.1软件分析。

1.7 数据分析

qRT-PCR、ELISA和流式细胞术结果比较分析,采用GraphPad Prism 9.5软件进行One-way ANOVA方法分析并用 $\bar{X}\pm SD$ 表示。*表示 $P<0.05$,**表示 $P<$

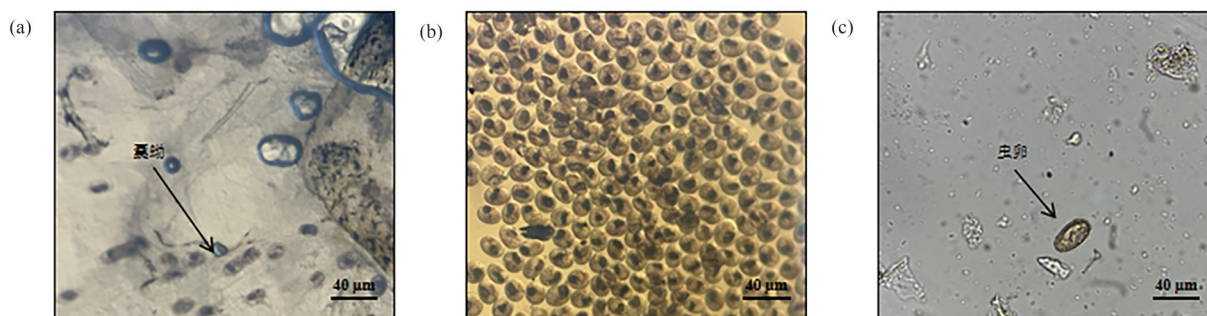
0.01,***及以上表示 $P<0.001$,ns表示无显著性差异。

2 结果与分析

2.1 小鼠华支睾吸虫感染模型的构建

对采集的麦穗鱼进行鱼肉压片镜检(图1(a)),观察鱼肉中是否含有华支睾吸虫囊蚴,将确定感染

的麦穗鱼进行鱼糜化处理,并通过人工消化液处理,过滤后分离得到大量华支睾吸虫囊蚴,除杂并获得纯化的华支睾吸虫囊蚴(图1(b))。对感染华支睾吸虫囊蚴的小鼠粪便进行虫卵检测,最早于第3周检测到华支睾吸虫虫卵(图1(c)),表明华支睾吸虫感染小鼠模型构建成功。



(a) 麦穗鱼鱼肉压片镜检(200×);(b) 分离纯化的囊蚴(200×);(c) 粪便中检测到的虫卵(200×)。

(a) Microscopical examination of the flesh of *Pseudorasbora parva*(200×); (b) Purified cysticercus after washing and precipitation(200×);

(c) Eggs detected by diethyl hydrochloride method(200×).

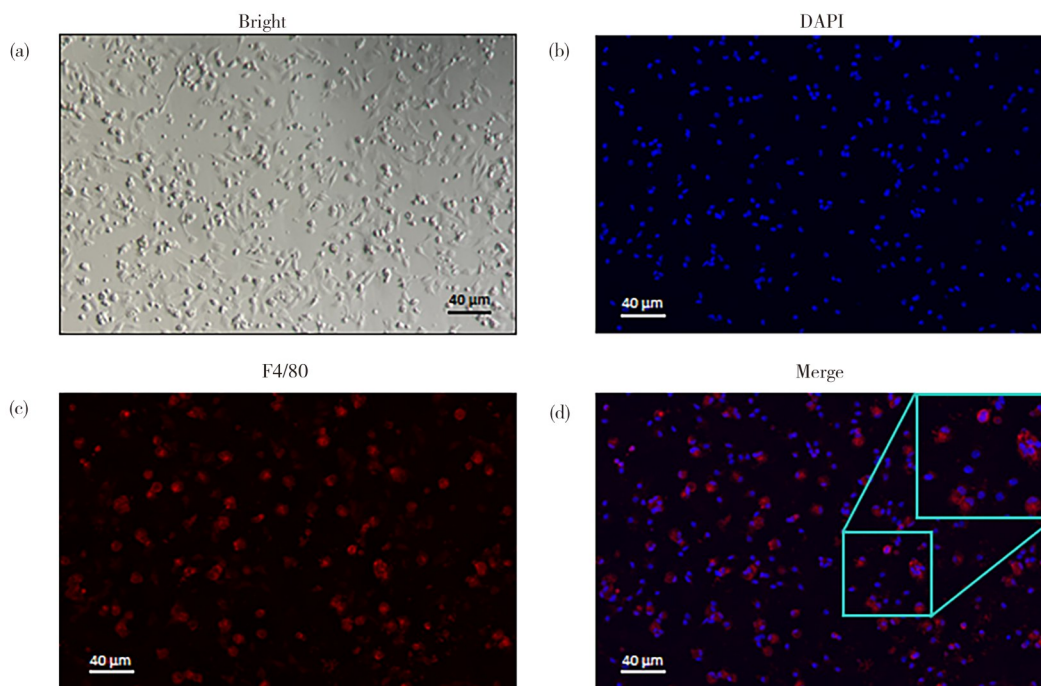
图1 小鼠华支睾吸虫感染模型的构建

Fig. 1 Construction of mice *Clonorchis sinensis* infection model

2.2 原代细胞提取及鉴定

对小鼠进行原代肝巨噬细胞的提取,肝门静脉留针后,通过37℃D-Hank's溶液进行冲洗血液与IV型胶原酶原位灌注,将消化后的肝脏去除胆囊并

进行均质化处理,密度梯度离心法获取原代细胞后,用RPMI-1640完全培养基进行贴壁培养24h(图2(a)),随后通过免疫荧光染色法进行F4/80抗体标定(图2(b)~(d)),结果表明成功分离出原代



(a) 培养24h的贴壁原代细胞(200×);(b) DAPI染色(200×);(c) F4/80染色(200×);(d) 合并后图像(200×)。

(a) Adherent primary cells cultured for 24 hours(200×); (b) DAPI stain(200×); (c) F4/80 stain(200×); (d) Merge(200×).

图2 原代细胞的提取及鉴定

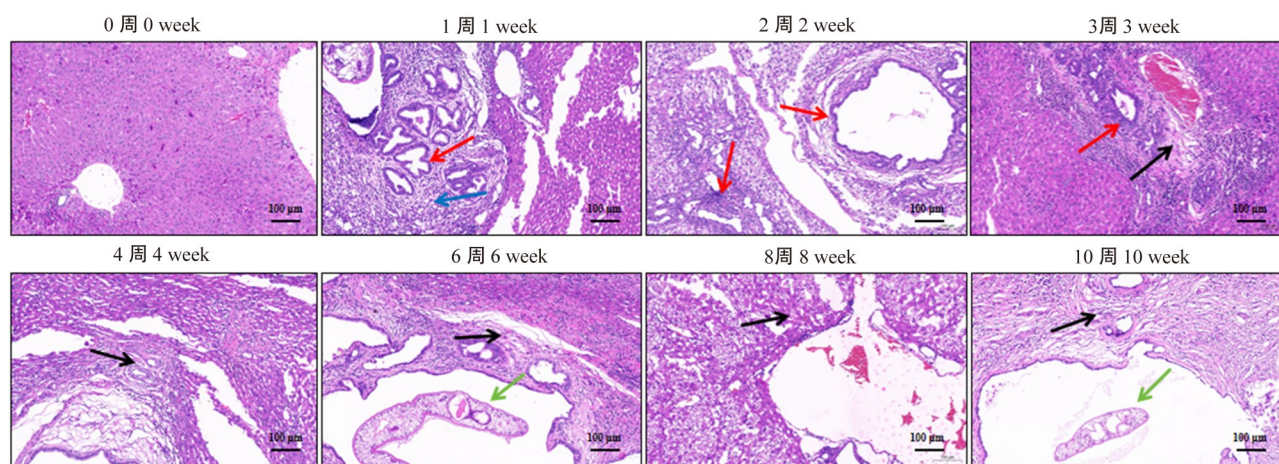
Fig. 2 Extraction and identification of primary cells

肝巨噬细胞。

2.3 华支睾吸虫感染小鼠肝脏的组织病理学变化

华支睾吸虫感染小鼠肝内胆管周围明显有肝脏细胞形态变化和炎症细胞浸润的发生(图3)。早期感染阶段,胆管周围的肝细胞形态不再完整,胆管细胞增生,部分细胞质基质破碎,部分细胞核出现梭形变化,胆管和门脉区周围可见急性炎症细胞浸润。卵排

放阶段,胆管周围肝细胞的细胞核与细胞质部分呈纤维化病变,胆管上皮细胞受到严重破坏。感染中后期阶段,炎性浸润程度逐渐下降,纤维化病变逐渐明显,且胆管中有成虫虫体存在。结果表明,感染后小鼠肝脏在不同阶段出现明显的形态变化,肝细胞由正常形态逐渐转变为纤维化病变,且炎性浸润在感染早期较为明显,在感染中后期有减少趋势。



HE染色不同周期小鼠肝脏切片图。红色箭头表示炎性浸润,蓝色箭头表示碎屑样病变,黑色箭头表示纤维化病变,绿色箭头表示虫体。(10×,标尺=100 μm)

Liver sections of mice in different cycles stained by HE. Red arrows indicate inflammatory infiltration, blue arrows indicate detrital lesions, black arrows indicate fibrotic lesions, and green arrows indicate insect bodies. (10×, scale = 100 μm)

图3 华支睾吸虫感染小鼠肝脏的组织病理学变化

Fig. 3 Histopathological manifestations of liver infected by *Clonorchis sinensis*

2.4 M1/M2型肝巨噬细胞比例的变化

分别对M1型和M2型巨噬细胞表面标志物CD11b/F4/80/CD86和CD11b/F4/80/CD206进行流式细胞术检测(图4(a)),来评估华支睾吸虫感染过程中肝脏M1和M2巨噬细胞极化的动态变化。与未感染的第0周相比,感染第1~2周时,小鼠肝脏内M1型巨噬细胞极化的比例增加,感染第3~4周时,M1型巨噬细胞极化比例逐渐开始下降,随后在第6~10周,M1型巨噬细胞极化比例再次回升。相比之下,M2型巨噬细胞极化比例在第1~3周期间无明显变化,从第4周开始逐渐升高,直至第10周达到峰值。总体来看,感染第1~2周期间,M1型肝巨噬细胞极化比例显著高于M2型肝巨噬细胞($P < 0.01$),感染第3~10周期间,M2型肝巨噬细胞极化比例显著高于M1型肝巨噬细胞($P < 0.01$)(图4(a)~(c))。结果表明,M1型肝巨噬细胞在感染早期升高,自虫体排卵阶段降低,感染中后期又显著回升。M2型肝巨噬细胞自虫体排卵阶段呈显著升高,直至感

染中后期。M1/M2型肝巨噬细胞极化占比的交替节点处于第3~4周虫体卵排放阶段。

2.5 M1/M2型肝巨噬细胞极化标志物的表达

通过对M1型标志物*iNOS*、*CD86*、*IL-1β*和M2型标志物*Arg1*、*CD206*、*Ym1*进行qRT-PCR的检测,以此来判断感染小鼠肝脏巨噬细胞极化标志物的表达情况,进而判断肝巨噬细胞极化程度。如图5所示,M1型标志物*iNOS*、*CD86*和*IL-1β* mRNA表达水平在感染1~4周呈升高后降低趋势,在感染6~10周时显著升高($P < 0.01$)(图5(a)~(c))。M2特异性酶*Arg1*与*CD206*的表达在感染后第1周开始增加,并在感染后第1~10周呈梯度上调。*Ym1*则是在感染后第2周出现增加,第2~4周显著增加($P < 0.001$),但组间变化相对不显著,第6~10周呈梯度增高趋势(图5(d)~(f))。结果表明,*iNOS*、*CD86*和*IL-1β*在早期感染阶段、卵排放阶段及中后期感染阶段呈升高后降低再升高趋势,

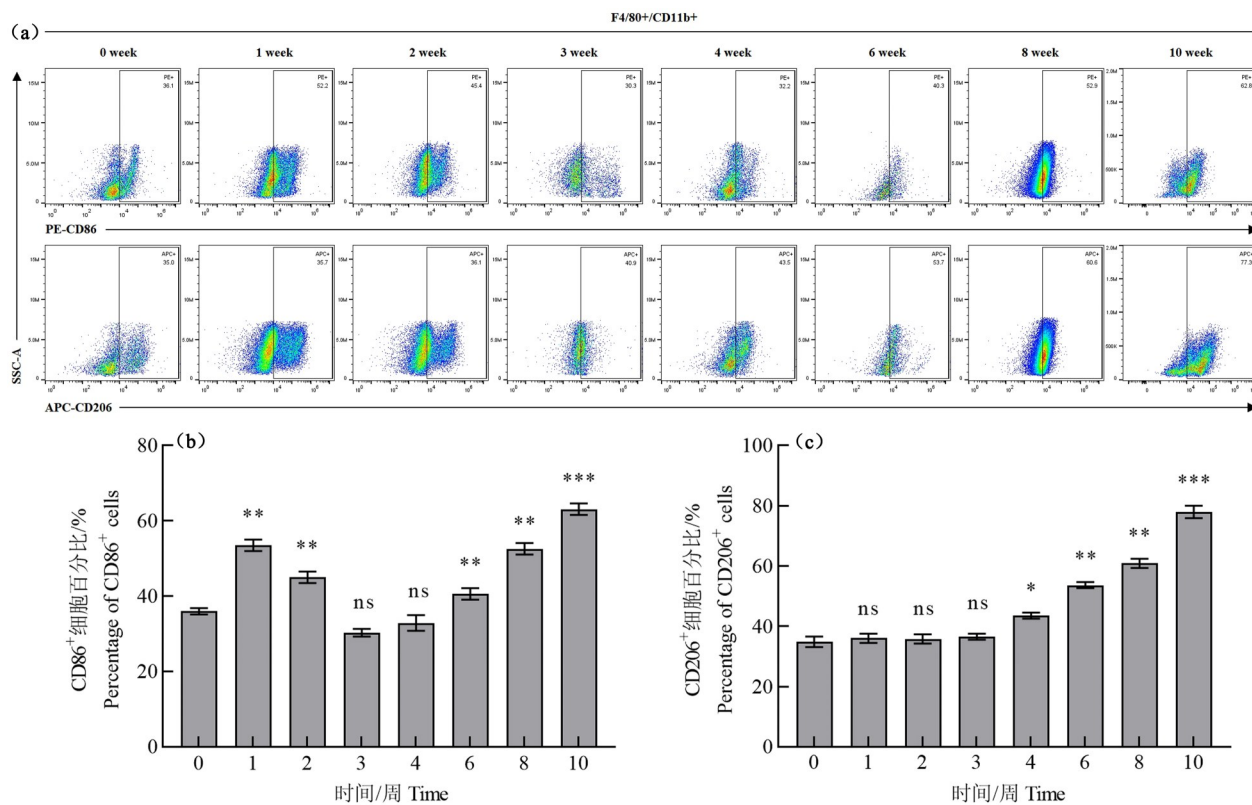


图 4 华支睾吸虫感染期间 M1/M2 肝巨噬细胞百分比的变化

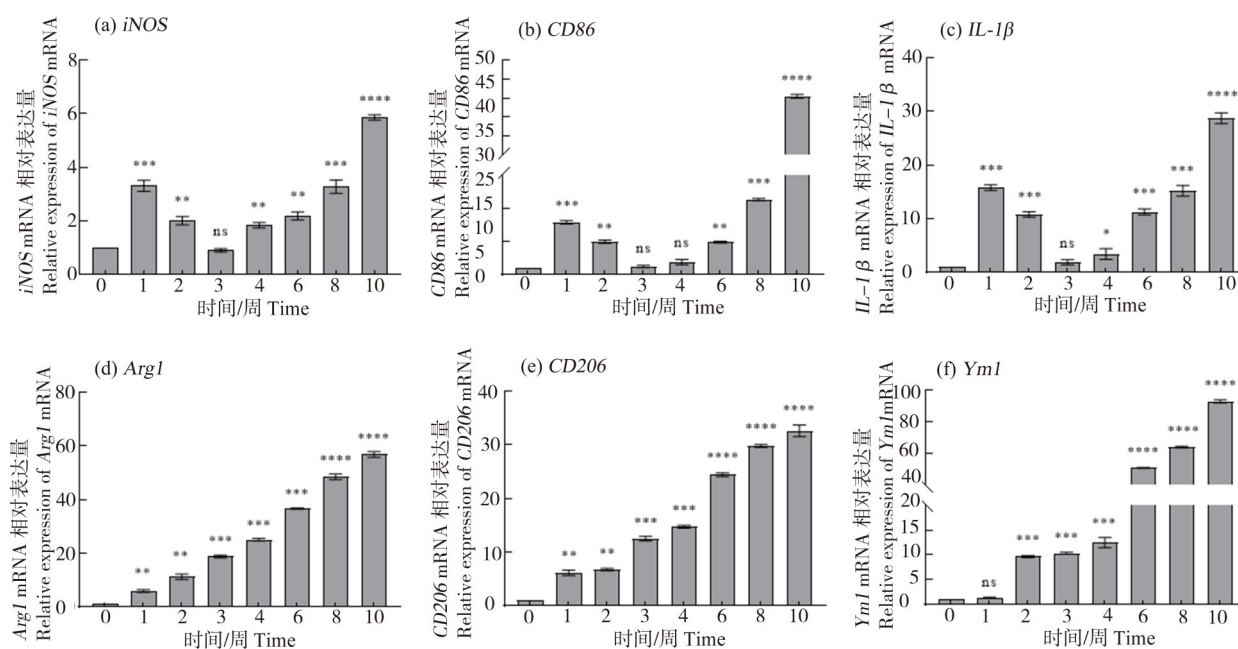
Fig. 4 Changes of M1/M2 liver macrophage percentage during *Clonorchis sinensis* infection

图 5 华支睾吸虫感染过程中 M1/M2 型巨噬细胞极化标志物表达

Fig. 5 Expression of M1/M2 macrophage polarization markers during *Clonorchis sinensis* infection

显示该阶段主要通过M1型肝巨噬细胞促进炎症反应,利于宿主体内华支睾吸虫的清除。*Arg1*、*CD206*和*Ym1*在整个感染阶段呈梯度升高趋势,显示该阶段主要通过M2型肝巨噬细胞拮抗M1型肝巨噬细胞,进而避免炎症反应过度发生,这有利于华支睾吸虫在宿主体内的生存与繁殖。

2.6 M1/M2型肝巨噬细胞相关细胞因子水平

通过对华支睾吸虫感染不同时期小鼠血清中巨噬细胞相关的促炎细胞因子 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 与抑炎因子 $TGF-\beta1$ 、 $IL-10$ 的含量进行ELISA检测,来判断不同时期肝脏巨噬细胞的极化以及炎症程度(图6)。

结果表明,巨噬细胞相关促炎因子 $IL-1\beta$ 含量在感染第1~2周时出现增高,第3~4周时水平降低,第4~10周时细胞因子水平呈现显著升高($P<0.01$)。 $TNF-\alpha$ 含量则是第1~2周显著增高($P<0.01$),第3周降到最低,第4~10周出现呈现显著升高($P<0.01$)(图6(a)~(b))。巨噬细胞相关抑炎因子 $TGF-\beta1$ 和 $IL-10$ 在第1~10周期间出现逐渐升高的趋势(图6(c)~(d))。表明在华支睾吸虫感染早期阶段,肝巨噬细胞优先产生相关促炎因子来促进炎症反应的发生,而在排卵期和感染中后期时,肝巨噬细胞相关抑炎因子水平显著增加,以此来抑制相关炎症的产生。

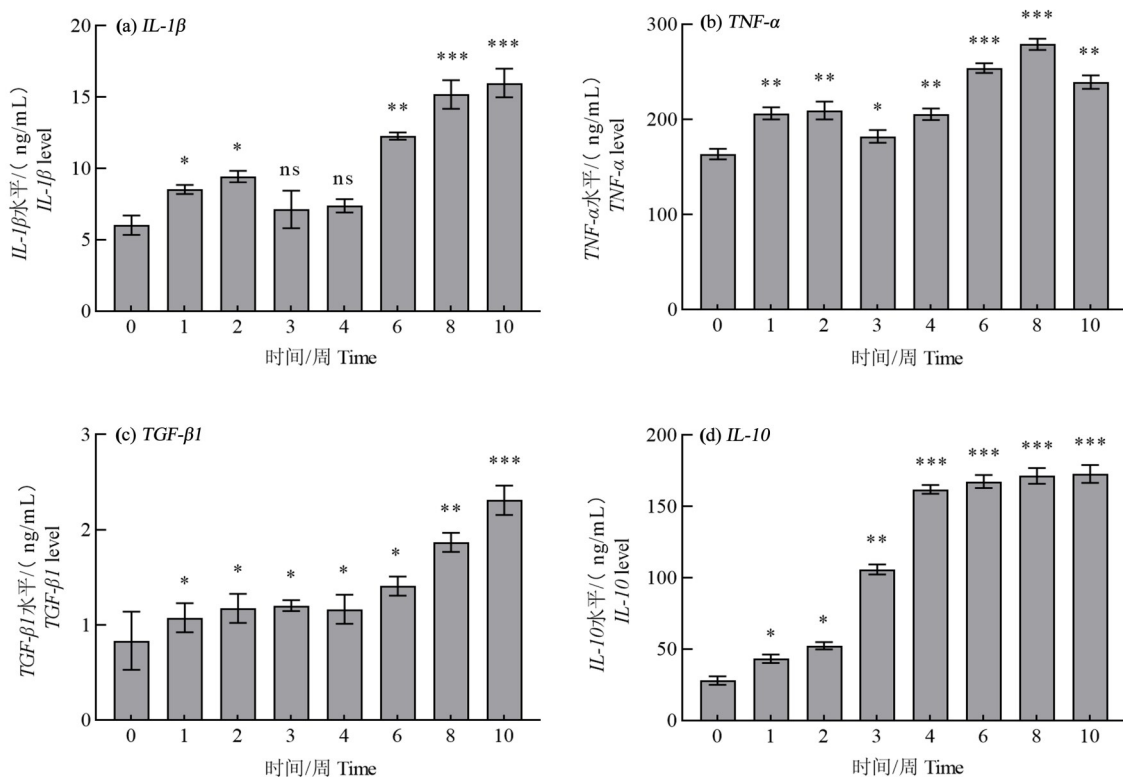


图6 华支睾吸虫感染小鼠肝巨噬细胞的细胞因子水平

Fig. 6 Cytokine levels in liver macrophages of mice infected by *Clonorchis sinensis*

3 讨论

常驻肝巨噬细胞也被称为枯否细胞(Kupffer cell, KCs), 占有巨噬细胞的80%~90%, 是肝脏最主要的免疫细胞亚群^[29]。当华支睾吸虫感染时, 虫体可通过机械性刺激和排泄分泌产物等方式激活宿主肝巨噬细胞, 并通过调节肝巨噬细胞M1/M2表型来参与疾病的发生发展^[30]。由此可见, 肝巨噬细胞在宿主防御蠕虫感染中具有重要作用。

华支睾吸虫感染后主要激活宿主体液免疫和Th2型免疫反应^[4]。本研究描述了华支睾吸虫感染后小鼠肝脏巨噬细胞极化以及巨噬细胞相关细胞因子的动态变化。发现肝巨噬细胞的极化在华支睾吸虫感染的不同阶段发生动态变化, 且相关细胞因子也发生了不同程度的动态变化。在感染早期, 华支睾吸虫诱导小鼠肝脏出现病理学病变, 并伴随着胆管周围炎性细胞浸润的增加, 肝巨噬细胞在功能上极化为M1型。另一方面, 感染中后期阶段小鼠肝

脏炎性浸润程度减少且肝脏病理学病变较为明显, M2型肝巨噬细胞的数量在卵排放阶段增加,并在感染中后期阶段加速增加。华支睾吸虫囊蚴进入终末宿主体内后,可在十二指肠脱囊成为尾蚴,尾蚴具有胆汁趋向性,可随着胆汁进入宿主肝胆管,进而发育为成虫,其中在小鼠粪便中检测到虫卵所需时间约为21 d^[31],处于本研究的3~4周卵排放阶段。在本研究中,处于卵排放阶段的M1型巨噬细胞占比下降,而M2型巨噬细胞占比升高,小鼠肝脏内巨噬细胞由M1型极化转变为M2型极化占主导阶段。表明在卵排放阶段,小鼠肝脏M1/M2型巨噬细胞极化的比例转变与虫卵的排放密切相关,可能通过排泄分泌产物等方式来调控巨噬细胞向M2型方向极化,进而参与免疫逃避与虫卵的排放。

巨噬细胞极化在寄生虫感染与宿主免疫应答中具有重要作用,参与寄生虫与宿主的免疫互作。在不同的免疫应答和疾病过程中,M1、M2两大极化类型巨噬细胞的作用截然不同。M1型巨噬细胞能够参与炎症的起始和维持过程,通过产生*TNF- α* 、*IL-12*和*iNOS*等清除寄生虫^[7],而M2型巨噬细胞可通过*Arg1*来促进寄生虫生存,参与组织修复与炎症的消退^[22]。在本研究中,小鼠早期感染华支睾吸虫后出现了M1型巨噬细胞极化的升高,表明感染后出现了较强的免疫反应,宿主机体通过Th1型免疫反应来杀灭或清除华支睾吸虫。在感染中后期出现了M2型巨噬细胞极化升高,且比例高于M1型巨噬细胞的趋势,这表明该阶段巨噬细胞主要以M2型为主,主要参与肝脏组织修复与其他来源巨噬细胞的募集,由此可看出巨噬细胞具有极强的可塑性。随着对蠕虫感染研究的深入,许多学者发现在感染过程中巨噬细胞极化会随着感染程度表现出动态变化,通常先极化为M1型、再转化为M2型^[32]。Stout等^[33]研究表明巨噬细胞极化方向并不固定,该细胞可从M0型极化为M1型、M2型,无*IL-4/IL-13*刺激时,M2型巨噬细胞可通过*IFN- γ* 反向极化成M1型。由于M2型巨噬细胞与宿主感染病原体所引起的肝硬化及纤维化有关,受病原体刺激后,巨噬细胞会极化为多种亚型并分泌相关细胞因子,间接或直接作用于参与肝纤维化机制的肝星状细胞,导致宿主出现严重的肝纤维化、肝硬化甚至肝癌^[34]。因此抑制M2型极化或使M2型反向极化或许也可以成为一个通过改变巨噬细

胞极化来抑制纤维化的研究方向。

据报道,在早期感染阶段,旋毛虫可诱导M1型巨噬细胞增殖与转移,当幼虫进入肌肉组织中形成囊肿时,M2型巨噬细胞的占比将显著升高^[35]。有研究表明,M1型巨噬细胞能够通过产生NO来杀死日本血吸虫,并且NO在防止纤维化发生发展中发挥了一定的作用^[8]。虽然本研究结果显示,当M1型巨噬细胞占比升高时,可以观察到M1型相关因子的水平也出现相关变化,如*iNOS*、*CD86*、*IL-1 β* 和*TNF- α* ,但本研究无法确定成虫是否被胆管排出宿主机体。寄生虫可以通过诱导巨噬细胞M1型极化产生炎症反应,引起组织损伤。M2型巨噬细胞是正常妊娠时蜕膜巨噬细胞的主要亚群。在感染弓形虫后,M1型蜕膜巨噬细胞将被诱导表达*iNOS*,并通过下调*Arg1*表达来使蜕膜巨噬细胞由M2型转变为M1型,进而导致妊娠异常^[36]。

*Arg1*作为M2型巨噬细胞活化的标志物之一,其活性诱导被认为是寄生虫应对宿主免疫防御的一种拮抗机制。有研究认为,M2型巨噬细胞能够通过*Arg1*的代谢途径来促进日本血吸虫诱导的纤维化^[7-8]。事实上,M2型特异性酶*Arg1*与M2型相关的趋化因子可激活*CCL2-CCR2*轴,通过趋化因子受体与配体轴来进一步调控肝纤维化患者的单核细胞浸润^[29]。在小鼠肠炎模型中,旋毛虫能够诱导腹膜M2型巨噬细胞的分化,从而抑制促炎细胞因子*TNF- α* 与*IL-6*的产生,降低宿主体内炎症反应^[35]。婴儿利什曼原虫能够使表面特异性酶*Arg1*激活,从而导致巨噬细胞鞭毛体分化与增殖,以此来逃避宿主免疫排斥反应^[37]。*Arg1*不仅能够抑制宿主对利什曼原虫的适应性免疫和固有免疫,还具有直接促进巨噬细胞内利什曼原虫生长的功能^[38]。在本研究中观察到M2型巨噬细胞表面标志物*Arg1*的表达在排卵期以及感染中后期出现梯度增高的趋势,表明在感染中后期时,*Arg1*可能参与了华支睾吸虫的免疫逃避机制,使宿主与蠕虫的拮抗反应达到相对平衡。

综上所述,本研究结果表明,华支睾吸虫感染导致的肝巨噬细胞极化与相关细胞因子的动态变化与宿主肝脏病理学变化相对应,且肝脏M1/M2型巨噬细胞极化比例转变的节点与虫卵的排放密切相关。推测这可能是蠕虫免疫逃逸和宿主组织修复的潜在机制。

4 结 论

华支睾吸虫感染后小鼠肝巨噬细胞 M1/M2 型极化呈现动态变化。早期感染阶段以 M1 型巨噬细胞占主导,中后期感染阶段以 M2 型巨噬细胞占主导,在卵排放阶段 M1/M2 型巨噬细胞极化比例发生转变。

参考文献 References

- [1] Qian M B, Utzinger J, Keiser J, Zhou X N. Clonorchiasis[J]. *Lancet*, 2016, 387(10020): 800-810
- [2] Zhang Y, Gong Q L, Lv Q B, Qiu Y Y, Wang Y C, Qiu H Y, Guo X R, Gao J F, Chang Q C, Wang C R. Prevalence of *Clonorchis sinensis* infection in fish in South-East Asia: A systematic review and meta-analysis[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2020, 43(11): 1409-1418
- [3] Keiser J, Utzinger J. Emerging foodborne trematodiasis[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2005, 11(10): 1507-1514
- [4] Yi J, Jeong J H, Won J, Chung S, Pak J H. The crosstalk between cholangiocytes and hepatic stellate cells promotes the progression of epithelial-mesenchymal transition and periductal fibrosis during *Clonorchis sinensis* infection[J]. *Parasites & Vectors*, 2024, 17(1): 151
- [5] Rim H J. Clonorchiasis: An update[J]. *Journal of Helminthology*, 2005, 79(3): 269-281
- [6] Hong S T, Park K H, Seo M, Choi B I, Chai J Y, Lee S H. Correlation of sonographic findings with histopathological changes of the bile ducts in rabbits infected with *Clonorchis sinensis* [J]. *The Korean Journal of Parasitology*, 1994, 32(4): 223-230
- [7] Hesse M, Modolell M, La Flamme A C, Schito M, Fuentes J M, Cheever A W, Pearce E J, Wynn T A. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: Granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism[J]. *Journal of Immunology*, 2001, 167(11): 6533-6544
- [8] Truscott M, Evans D A, Gunn M, Hoffmann K F. *Schistosoma mansoni* hemozoin modulates alternative activation of macrophages via specific suppression of Retnla expression and secretion [J]. *Infection and Immunity*, 2013, 81(1): 133-142
- [9] Faure-Dupuy S, Delphin M, Aillot L, Dimier L, Lebossé F, Fresquet J, Parent R, Matter M S, Rivoire M, Bendriss-Vermare N, Salvetti A, Heide D, Flores L, Klumpp K, Lam A, Zoulim F, Heikenwälder M, Durantel D, Lucifora J. Hepatitis B virus-induced modulation of liver macrophage function promotes hepatocyte infection [J]. *Journal of Hepatology*, 2019, 71(6): 1086-1098
- [10] Wan S S, Kuo N, Kryczek I, Zou W P, Welling T H. Myeloid cells in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2015, 62(4): 1304-1312
- [11] Ramachandran P, Dobie R, Wilson-Kanamori J R, Dora E F, Henderson B E P, Luu N T, Portman J R, Matchett K P, Brice M, Marwick J A, Taylor R S, Efremova M, Vento-Tormo R, Carragher N O, Kendall T J, Fallowfield J A, Harrison E M, Mole D J, Wigmore S J, Newsome P N, Weston C J, Iredale J P, Tacke F, Pollard J W, Ponting C P, Marion J C, Teichmann S A, Henderson N C. Resolving the fibrotic niche of human liver cirrhosis at single-cell level[J]. *Nature*, 2019, 575(7783): 512-518
- [12] Choi Y K, Yoon B I, Won Y S, Lee C H, Hyun B H, Kim H C, Oh G T, Kim D Y. Cytokine responses in mice infected with *Clonorchis sinensis* [J]. *Parasitology Research*, 2003, 91(2): 87-93
- [13] Yao Y L, Xu X H, Jin L P. Macrophage polarization in physiological and pathological pregnancy[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 792
- [14] Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: *in vivo* veritas[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2012, 122(3): 787-795
- [15] Krausgruber T, Blazek K, Smallie T, Alzabin S, Lockstone H, Sahgal N, Hussell T, Feldmann M, Udalova I A. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses [J]. *Nature Immunology*, 2011, 12(3): 231-238
- [16] Mosser D M, Edwards J P. Exploring the full spectrum of macrophage activation[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2008, 8(12): 958-969
- [17] Hayashi N, Matsui K, Tsutsui H, Osada Y, Mohamed R T, Nakano H, Kashiwamura S, Hyodo Y, Takeda K, Akira S, Hada T, Higashino K, Kojima S, Nakanishi K. Kupffer cells from *Schistosoma mansoni*-infected mice participate in the prompt type 2 differentiation of hepatic T cells in response to worm antigens[J]. *Journal of Immunology*, 1999, 163(12): 6702-6711
- [18] Parker G A, Picut C A. Liver immunobiology [J]. *Toxicologic Pathology*, 2005, 33(1): 52-62
- [19] Donnelly S, Stack C M, O'Neill S M, Sayed A A, Williams D L, Dalton J P. Helminth 2-Cys peroxiredoxin drives Th2 responses through a mechanism involving alternatively activated macrophages [J]. *The FASEB Journal*, 2008, 22(11): 4022-4032
- [20] Figueroa-Santiago O, Espino A M. *Fasciola hepatica* fatty acid binding protein induces the alternative activation of human macrophages [J]. *Infection and Immunity*, 2014, 82(12): 5005-5012
- [21] Bilzer M, Roggel F, Gerbes A L. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease[J]. *Liver International*, 2006, 26(10): 1175-1186
- [22] Muraile E, Leo O, Moser M. TH1/TH2 paradigm extended: Macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism[J]. *Frontiers in Immunology*, 2014, 5: 603
- [23] Zheng S P, Zhang P G, Chen Y X, Zheng S J, Zheng L P, Weng Z H. Inhibition of Notch signaling attenuates schistosomiasis hepatic fibrosis via blocking macrophage M2 polarization [J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0166808
- [24] Wang Z X, Hao C Y, Zhuang Q H, Zhan B, Sun X M, Huang J J, Cheng Y L, Zhu X P. Excretory/secretory products from *Trichinella spiralis* adult worms attenuated DSS-induced colitis in mice by driving PD-1-mediated M2 macrophage polarization [J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 563784
- [25] Mahajan S, Dkhar H K, Chandra V, Dave S, Nanduri R, Janmeja A K, Agrewala J N, Gupta P. *Mycobacterium tuberculosis* modulates macrophage lipid-sensing nuclear receptors PPAR γ and TR4 for survival [J]. *Journal of Immunology*, 2012, 188(11): 5593-5603
- [26] Cassetta L, Kajaste-Rudnitski A, Coradin T, Saba E, Della Chiara G, Barbagallo M, Graziano F, Alfano M, Cassol E, Vicenzi E, Poli G. M1 polarization of human monocyte-derived macrophages restricts pre and postintegration steps of HIV-1 replication [J]. *AIDS*, 2013, 27(12): 1847-1856
- [27] 陈颖丹, 诸廷俊, 许隆祺, 郑彬, 熊彦红, 周长海. 《华支睾吸虫病诊断标准》解读[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2017, 29(5): 538-540
- [28] Chen Y D, Zhu T J, Xu L Q, Zheng B, Xiong Y H, Zhou C H. Interpretation of diagnostic criteria for clonorchiasis[J]. *Chinese Journal of Schistosomiasis Control*, 2017, 29(5): 538-540 (in Chinese)
- [29] 南晓慧, 方巧君. 一种小鼠原代肝脏枯否细胞的提取方法: CN113604419A[P]. 2021-11-05

- Nan X H, Fang Q J. A method for extraction of primary mouse liver Kupffer cells: CN113604419A[P]. 2021-11-05 (in Chinese)
- [29] Tsutsui H, Nishiguchi S. Importance of Kupffer cells in the development of acute liver injuries in mice [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(5): 7711-7730
- [30] Quinteros S L, O'Brien B, Donnelly S. Exploring the role of macrophages in determining the pathogenesis of liver fluke infection [J]. *Parasitology*, 2022, 149(10): 1364-1373
- [31] 刘宜升, 陈明, 余新炳. 华支睾吸虫的生物学和华支睾吸虫病防治[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 2012
- Liu Y S, Chen M, Yu X B. *Biology of Clonorchis Sinensis and its Prevention and Treatment*[M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 2012 (in Chinese)
- [32] 郑新, 王红艳. M2型巨噬细胞极化及相关疾病的研究进展[J]. 生命科学, 2017, 29(9): 883-890
- Zheng X, Wang H Y. M2 macrophage polarization and the related diseases [J]. *China Industrial Economics*, 2017, 29(9): 883-890 (in Chinese)
- [33] Stout R D, Jiang C C, Matta B, Tietzel I, Watkins S K, Suttles J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences [J]. *Journal of Immunology*, 2005, 175(1): 342-349
- [34] Cheng D, Chai J, Wang H W, Fu L, Peng S F, Ni X. Hepatic macrophages: Key players in the development and progression of liver fibrosis [J]. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 2021, 41(10): 2279-2294
- [35] Du L L, Wei H Y, Li L Q, Shan H, Yu Y, Wang Y S, Zhang G S. Regulation of recombinant *Trichinella spiralis* 53-kDa protein (rTsP53) on alternatively activated macrophages via STAT6 but not IL-4Ra in vitro [J]. *Cellular Immunology*, 2014, 288(1/2): 1-7
- [36] Li Z D, Zhao M D, Li T, Zheng J, Liu X B, Jiang Y Z, Zhang H X, Hu X M. Decidual macrophage functional polarization during abnormal pregnancy due to *Toxoplasma gondii*: Role for lilrb4 [J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8: 1013
- [37] Gregory D J, Olivier M. Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *leishmania* [J]. *Parasitology*, 2005, 130 (S1): 27-35
- [38] Muxel S M, Aoki J I, Fernandes J C R, Laranjeira-Silva M F, Zampieri R A, Acuña S M, Müller K E, Vanderlinde R H, Floeter-Winter L M. Arginine and polyamines fate in *leishmania* infection [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 8: 2682

责任编辑: 秦梅



第一作者简介: 王佳文, 中共党员, 在读硕士研究生, 主要从事分子寄生虫学与动物寄生虫病防治的研究, 曾参加第十八次全国学术会议暨第九次国际寄生虫学学术研讨会, 获得优秀共青团员, 研究生二等学业奖学金等荣誉, 多次参与社区志愿者活动。



通讯作者简介: 高俊峰, 副教授, 硕士生导师。主要从事分子寄生虫学与动物寄生虫病防治的研究。近年来在 *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*、*Parasitology*、*Animals* 等国际杂志发表 SCI 科研论文 20 余篇, 获得神农中华农业科技奖二等奖 1 项, 黑龙江省科技进步二等奖 1 项, 黑龙江省自然科学三等奖 1 项, 授权国家发明专利 3 项, 主持国家自然科学基金项目、黑龙江省自然科学基金项目等 5 项。