

文章编号: 1000-7423(2013)-05-0385-05

【实验研究】

匹多莫德抑制地塞米松诱导的小鼠隐性弓形虫感染的活化

王为为, 霍星星, 孔兰婷, 张倩, 陈鹤, 李敏, 沈继龙*

【摘要】 目的 观察匹多莫德 (PT) 对经地塞米松 (Dem) 诱导小鼠隐性弓形虫感染活化的抑制作用。方法 96 只 BALB/c 小鼠每鼠灌胃感染弓形虫 *Tg*Ctwh6 株包囊 30 个, 感染后 4 周随机均分为 3 组: Dem 组 (A 组) 腹腔注射地塞米松 6 mg/(kg·d), 同时灌胃生理盐水 200 μ l; Dem+PT 组 (B 组) 腹腔注射地塞米松 6 mg/(kg·d), 同时灌胃匹多莫德 100 mg/(kg·d); 对照组 (C 组) 腹腔注射生理盐水 200 μ l, 同时灌胃生理盐水 200 μ l。上述药物使用时均溶于 200 μ l 生理盐水中。3 组小鼠均连续注射和灌胃 5 周。自治疗开始后每周各组随机处死 3 只小鼠, 取小鼠眼窝血、脑组织和脾组织备用。荧光定量 PCR 检测小鼠虫血症出现时间, 以及脑组织虫荷和弓形虫 DNA 拷贝数。流式细胞术 (FCM) 对小鼠脾单个核细胞 Th1、Th2 和调节性 T 细胞 (Treg) 进行检测。使用微量样本多指标流式蛋白定量术试剂盒 (CBA) 检测小鼠血清中 Th1 和 Th2 类细胞因子的表达情况。结果 A 组小鼠在受治第 2 周时, 虫血症再次出现, 5 周内 50% 小鼠出现虫血症, 死亡 17 只。而 B 组小鼠在受治第 3 周时, 虫血症再次出现, 5 周内 25% 小鼠出现虫血症, 死亡 7 只。C 组小鼠未见虫血症出现, 生存状态良好。A 组小鼠连续给予 Dem 21 d 后, 脑组织中弓形虫 DNA 拷贝数为 $(209 \pm 12) \times 10^9$, 而 B 组接受 PT 治疗后弓形虫 DNA 拷贝数为 $(62 \pm 10) \times 10^9$, 前者显著高于后者 ($P < 0.01$); FCM 检测显示, 小鼠给予 Dem 21 d 后, 小鼠脾脏 Th1、Th2 和 Treg 细胞占 CD4⁺ 细胞百分比, A 组的分别为 $(4.0 \pm 1.5)\%$ 、 $(0.6 \pm 0.1)\%$ 和 $(5.0 \pm 0.9)\%$, B 组分别为 $(6.1 \pm 1.0)\%$ 、 $(0.5 \pm 0.2)\%$ 和 $(7.0 \pm 1.2)\%$, A 组和 B 组小鼠 Th1 和 Treg 细胞百分比差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。血清细胞因子检测结果显示, 小鼠血清 Th1 型细胞因子 γ 干扰素 (IFN- γ) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α), A 组的 $[(2.2 \pm 0.7) \text{ pg/ml}$ 、 $(20.1 \pm 5.0) \text{ pg/ml}]$ 均低于 B 组的 $[(3.6 \pm 0.6) \text{ pg/ml}$ 、 $(32.0 \pm 8.0) \text{ pg/ml}]$ ($P < 0.01$)。Th2 型相关细胞因子白细胞介素-4 (IL-4) 和 IL-10, A 组的 $[(2.6 \pm 0.4) \text{ pg/ml}$ 、 $(39.0 \pm 6.0) \text{ pg/ml}]$ 与 B 组的 $[(2.7 \pm 0.7) \text{ pg/ml}$ 、 $(40.0 \pm 8.0) \text{ pg/ml}]$ 相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 匹多莫德能够显著激活地塞米松诱导的免疫抑制, 抑制地塞米松诱导的小鼠弓形虫隐性感染活化, 其免疫调节机制有 Th1 和 Treg 细胞的参与。

【关键词】 弓形虫; 隐性感染; 匹多莫德; 地塞米松

中图分类号: R382.5 文献标识码: A

Pidotimod Inhibits Activation of Latent *Toxoplasma gondii* Infection Induced by Dexamethasone in Mice

WANG Wei-wei, HUO Xing-xing, KONG Lan-ting, ZHANG Qian, CHEN He, LI Min, SHEN Ji-long*

(Department of Microbiology and Parasitology, Anhui Medical University; Anhui Key Laboratory of Pathogen Biology, Hefei 230032, China)

【Abstract】 **Objective** To study the inhibition effect of pidotimod (PT) on dexamethasone (Dem)-induced reactivated toxoplasmosis in mice. **Methods** A total of 96 female BALB/C mice were infected orally with 30 cysts of *Toxoplasma gondii* TgCtwh6 strain (genotype Chinese 1). 4 weeks later the mice were divided into three groups (A, B, and C). Mice of group A (Dem+NS) were given Dem [6 mg/(kg·d)] intraperitoneally and 200 μ l normal saline given orally. Mice of group B (Dem+PT) were orally given pidotimod [100 mg/(kg·d)] and intraperitoneally injected with Dem [6 mg/(kg·d)] simultaneously. Each mouse in group C received 200 μ l normal saline intraperitoneally. The mice were injected and given by gavage for 5 weeks. After treatment, three mice in each group were sacrificed weekly, and the survival time of the mice was recorded in days. Brain parasite burden and *T. gondii* DNA copies in serum were detected by quantitative real-time PCR. T cell subsets, cytokine profiles in each group were analyzed by flow cytometry, and CBA kit, respectively. **Results** On the second

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 项目 (No. 2010CB530001); 国家自然科学基金 (No. 81271864); 安徽高校省级自然科学基金重点项目 (No. KJ2012A145); 安徽省自然科学基金 (No. 1208085MH165)

作者单位: 安徽病原生物学省级实验室, 安徽医科大学病原生物学教研室, 合肥 230032

* 通讯作者, E-mail: shenjilong53@126.com

week after Dem administration, parasitemia appeared in group A; in 5 weeks 50% mice had parasitemia again, and 17 mice died. Comparatively, in group B parasitemia appeared on the third week after PT and Dem administration, in 5 weeks 25% mice had parasitemia again, and 7 mice died. Parasitemia did not appear in Group C. On the 21st day after Dem administration, *T. gondii* DNA copies in brain tissues of group A was $(209 \pm 12) \times 10^9$, significantly higher than $(62 \pm 10) \times 10^9$ in group B treated with PT ($n=3$, $P < 0.01$). Flow cytometry test showed that on the 21st day after Dem administration, the proportions of Th1, Th2 and Treg cells in groups A and B were $(4.0 \pm 1.5)\%$ and $(6.1 \pm 1.0)\%$, $(0.6 \pm 0.1)\%$ and $(0.5 \pm 0.2)\%$, and $(5.0 \pm 0.9)\%$ and $(7.0 \pm 1.2)\%$, respectively. There was significant difference in the percentages of Th1 and Treg between group B and A ($P < 0.01$). The levels of IFN- γ , TNF- α in group A were (2.2 ± 0.7) pg/ml and (20.1 ± 5.0) pg/ml, respectively, lower than that of group B [(3.6 ± 0.6) pg/ml and (32.0 ± 8.0) pg/ml] ($P < 0.01$). No statistical significance was found in the levels of IL-4 and IL-10 between group A [(2.6 ± 0.4) pg/ml, (39.0 ± 6.0) pg/ml] and group B [(2.7 ± 0.7) pg/ml, (40.0 ± 8.0) pg/ml] ($P > 0.05$). **Conclusion** Pidotimod can inhibit activation of latent *Toxoplasma gondii* infection induced by dexamethasone in mice. Th1 and Treg cells may contribute to the pidotimod/dexamethasone-induced immunoregulation.

[Key words] *Toxoplasma gondii*; Reactivated toxoplasmosis; Pidotimod; Dexamethasone

Supported by the National Basic Research Program of China (No. 2010CB530001), the National Natural Science Foundation of China (No. 81271864), the Natural Science Fund of Anhui Province, China (No. 1208085MH165) and the Education Department Research Program of Anhui Province, China (No. KJ2012A145)

* Corresponding author, E-mail: shenjilong53@126.com

弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 是一种呈世界性分布的人兽共患细胞内寄生原虫^[1]。弓形虫的致病与宿主的免疫状态密切相关。人体感染一般呈隐性感染状态, 或仅见淋巴结肿大和脉络膜视网膜炎等。但在长期接受免疫抑制治疗^[2,3]、器官移植和艾滋病患者^[4-7]中, 潜伏感染的活化可导致严重的弓形虫病, 甚至死亡。近年研究发现, 除了TLR信号通路外, 不同基因型的弓形虫诱导宿主产生不同的免疫应答类型。一般认为 I 型和 III 型弓形虫株感染巨噬细胞后, 宿主细胞分化为经典途径活化的巨噬细胞 (M1), 而 II 型虫株则诱导巨噬细胞极化为替代途径活化的巨噬细胞 (M2)^[8,9]。与弓形虫基因型相关的致病机制 (genotype-associated pathogenesis) 成为研究的热点, 对不同基因型弓形虫感染后宿主的免疫机制的研究具有重要的理论和临床意义。

匹多莫德 (pidotimod, PT), (R)-3[(S)-(5-氧-2-吡咯烷基)羰基]-噻唑烷-4-羧酸, 结构类似于二肽, 是一种全新合成的免疫调节剂。近年来的研究表明, 匹多莫德在体内外均能够有效地恢复免疫抑制状态下宿主的免疫功能^[10,11]。本文将自中国分离的 China 1 基因型 *TgCtwh6* 株弓形虫 (成囊型) 感染 BALB/c 小鼠^[12], 建立慢性隐性感染模型, 用地塞米松 (dexamethasone, Dem) 诱导小鼠隐性弓形虫感染的活化。观察小鼠脾脏 T 淋巴细胞亚群在匹多莫德抑制弓形虫隐性感染活化中的作用, 探讨 Th1/Th2 细胞和相关细胞因子的变化规律, 揭示匹多莫德抑制弓形虫隐性感染活化的作用机制。本研究旨在为临床应用免疫增强剂预防弓形虫隐性感染活化提供理论和实验依据。

材料与方 法

1 材 料

1.1 实验动物和虫株 雌性 SPF 级 BALB/c 小鼠 120 只, 体重 18~22 g, 购自北京维通利华实验动物有限公司。弓形虫 Chinese 1 基因型 *TgCtwh6* 成囊株^[12] 由本室自猫体分离并由昆明小鼠传代保种。

1.2 主要试剂和仪器 地塞米松注射液 (批号 1103104) 购自江苏涟水制药有限公司, 匹多莫德 (批号 120402) 购自唐山太阳石药业有限公司, 阿莫西林克拉维酸 (批号 120133) 购自浙江华立南湖制药有限公司, 小鼠细胞因子 CBA 检测试剂盒购自美国 BD 公司, 小鼠少量全血 DNA 提取试剂盒购自北京原平皓生物技术有限公司, 组织 DNA 提取试剂盒购自德国 QIAGEN 公司, 弓形虫 (TOX) 核酸扩增荧光检测试剂盒购自中山大学达安基因股份有限公司, 弓形虫多克隆抗体购自美国 Abcam 公司, 流式细胞术 (FCM) 抗体购自美国 eBioscience 公司, 固定、破膜剂购自美国 Beckman Coulter 公司, 弗波脂 (PMA)、离子霉素 (Ionomycin) 和布雷菲德菌素 A (BFA) 购自美国 Sigma 公司。流式细胞仪 BD Canto II (FACSCalibur) 为美国 BD 公司产品。

2 方 法

2.1 动物分组和处理 BALB/c 小鼠 96 只每鼠灌胃感染弓形虫 *TgCtwh6* 株包囊 30 个, 4 周后随机均分为 3 组, Dem 组 (A 组) 腹腔注射地塞米松 6 mg/(kg·d),

同时灌胃生理盐水 200 μl ；Dem+PT 组 (B 组) 腹腔注射地塞米松 (剂量同 A 组)，同时灌胃匹多莫德 100 mg/(kg·d)；对照组 (C 组) 腹腔注射生理盐水 200 μl ，同时灌胃生理盐水 200 μl 。上述药物使用时均溶于 200 μl 生理盐水中。3 组小鼠均连续注射和灌胃 5 周。实验期间小鼠自由取食和饮水，饮水中加入阿莫西林克拉维酸 (1.0 g/L)^[13]。自处理后每周各组随机处死 3 只小鼠。小鼠处死前乙醚麻醉下眶窦取血，取小鼠脑组织和脾脏备用。

2.2 荧光定量 PCR 检测 用少量全血 DNA 提取试剂盒提取小鼠眼窦血 DNA；取小鼠顶叶和额叶脑组织共 50 mg，剪碎，用 DNA 试剂盒提取小鼠脑组织 DNA，紫外分光光度计测定 DNA 浓度。在荧光定量 PCR 反应管中，分别加入待测 DNA、阴性和阳性对照，以及 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 和 10^6 的标准品 DNA 5 μl ， $100\times g$ 离心 15 s，40 个循环后，利用建立的标准曲线，计算样品 DNA 中弓形虫 DNA 拷贝数^[14]。

2.3 Th1 和 Th2 细胞检测 取小鼠脾组织制备脾细胞悬液^[15]，将脾单个核细胞悬液 100 μl (含 1×10^6 个细胞)，加入弗波脂 (PMA) 30 ng/ml、离子霉素 (Ionomycin) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和阻断剂 BFA 3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 后，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 孵箱中孵育 4~6 h，离心重悬加入异硫氰酸荧光素标记的大鼠抗小鼠 CD4⁺ 单抗 (CD4⁺-FITC)，室温避光孵育 15 min，固定，破膜，再分别加入别藻蓝蛋白标记的大鼠抗小鼠 γ 干扰素 (IFN- γ) 单抗 (IFN- γ -APC)，藻红蛋白标记的大鼠抗小鼠白细胞介素-4 (IL-4) 单抗 (IL-4-PE)，流式细胞术检测 Th1 和 Th2 细胞百分比。

2.4 测定 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞 (Treg) 比例 取脾单个核细胞悬液 100 μl (含 1×10^6 个细胞)；加入膜表面抗体异硫氰酸荧光素标记的大鼠抗小鼠 CD4⁺ 单抗 (CD4⁺-FITC) 和藻红蛋白标记的大鼠抗小鼠 CD25⁺ 单抗 (CD25⁺-PE)，4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min，离心，弃上清，重悬细胞；依次加入固定透化缓冲液工作液和透化缓冲液工作液，离心弃上清，重悬细胞；加入藻红蛋白双重标记的大鼠抗小鼠 Foxp3 单抗 (Foxp3-PE-Cy5)，混匀，4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min，流式细胞术检测 Treg 细胞百分比。

2.5 小鼠细胞因子 CBA 检测 取小鼠眼窦血，静置 30 min，离心取血清按照 CBA 检测试剂盒说明书操作。

3 统计学分析

使用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析，组间差异采用单因素方差分析。检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

结 果

1 小鼠虫血症

小鼠感染弓形虫包囊 3 周后进入慢性隐性感染状态。A 组小鼠在给予地塞米松第 2 周，虫血症再次出现，5 周内 50% 小鼠出现虫血症，小鼠死亡 17 只。而 B 组小鼠在给予地塞米松和匹多莫德第 3 周，虫血症再次出现，5 周内 25% 小鼠出现虫血症，小鼠死亡 7 只 (图 1A)。C 组小鼠未见虫血症出现，小鼠生存状态良好 (图 1B)。

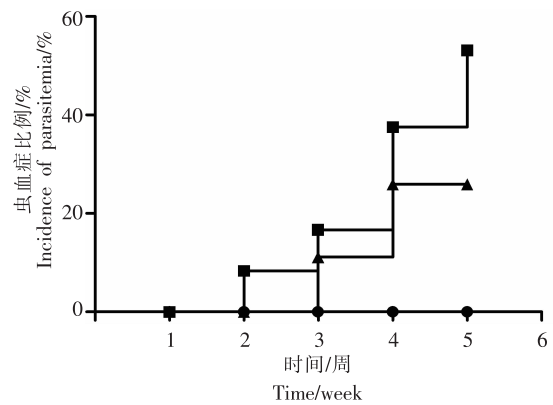


图 1 小鼠虫血症出现时间

Fig. 1 Parasitemia in Dem-induced immunocompromised mice treated with pidotimod

2 脑组织虫荷定量

小鼠在给予地塞米松 3 周后，脑组织中弓形虫 DNA 拷贝数，A 组为 $(209\pm 12)\times 10^9$ ，明显高于 B 组 $(62\pm 10)\times 10^9$ ($P<0.01$)，A 组和 B 组均高于 C 组 $(7\pm 2)\times 10^9$ 。

3 脾脏 Th1、Th2 和 Treg 细胞的比例

治疗 3 周后，小鼠脾脏 Th1、Th2 和 Treg 细胞占 CD4⁺ 细胞百分比，A 组分别为 $(4.0\pm 1.5)\%$ 、 $(0.6\pm 0.1)\%$ 和 $(5.0\pm 0.9)\%$ ；B 组分别为 $(6.1\pm 1.0)\%$ 、 $(0.5\pm 0.2)\%$ 和 $(7.0\pm 1.2)\%$ ；C 组分别为 $(8.2\pm 0.5)\%$ 、 $(0.8\pm 0.1)\%$ 和 $(13.0\pm 0.9)\%$ 。A 组和 B 组的 Th1 和 Treg 细胞百分比差异具有统计学意义 ($P<0.01$)。

4 小鼠血清细胞因子表达

治疗 3 周后，A 组小鼠血清 Th1 型细胞因子 IFN- γ [(2.2 ± 0.7) pg/ml] 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) [(20.1 ± 5.0) pg/ml] 水平均低于 B 组 [(3.6 ± 0.6) pg/ml 和 (32.0 ± 8.0) pg/ml] 和 C 组 [(5.1 ± 0.7) pg/ml 和 (37.1 ± 5.0) pg/ml] ($P<0.01$)。A 组 Th2 型相关细胞因子

IL-4[(2.6±0.4) pg/ml]和IL-10[(39.0±6.0) pg/ml]水平与B组[(2.7±0.7) pg/ml和(40.0±8.0) pg/ml]相比无统计学意义($P>0.05$),但均显著低于C组[(3.6±0.4) pg/ml和(55±6.0) pg/ml]($P<0.01$)。

讨 论

小鼠经口感染弓形虫包囊后,囊内的缓殖子迅速转化为速殖子,侵入肠黏膜进入有核细胞内,经血液循环播散至宿主全身,引起急性期的虫血症。在弓形虫隐性感染活化状态,包囊破裂导致虫血症再次出现^[16,17]。Schluter等^[18-20]报道小鼠感染弓形虫弱毒株4周后,经过短暂的急性期免疫应答进入隐性感染期,此时给予糖皮质激素地塞米松可抑制小鼠的免疫功能。导致虫血症再次出现,包囊的完整性与Th1/M1型应答密切相关;而IFN- γ 的低表达是诱发包囊破裂的主要原因^[21,22]。

体内和体外研究显示,匹多莫德能够有效地激活免疫抑制状态下宿主的免疫功能^[10,11]。匹多莫德本身并不具有抗菌和抗病毒功能,但其可通过促进机体免疫功能来保护机体应对感染性疾病。Giagulli等^[23]、Taramelli等^[24]和Migliorati等^[25,26]的研究表明,匹多莫德的干预能有效提升自然杀伤细胞(NK细胞)的功能,抵抗地塞米松所导致的T细胞凋亡。

本研究表明,匹多莫德能延长小鼠虫血症出现时间,并降低脑组织内的虫荷。小鼠给予地塞米松1周后,Th1细胞和Th2细胞占CD4⁺细胞比例逐渐降低,Treg细胞呈现与Th1细胞的免疫应答相反的变化。给予免疫增强剂匹多莫德虽不能逆转免疫抑制的趋势,但可显著恢复Th1细胞和Treg细胞的比例。越来越多的证据表明,Treg在调节病原体感染免疫中起重要的作用^[27-29]。Treg在一定程度上通过限制感染局部的免疫应答的敏感性来抑制过度的免疫应答,可抑制小鼠的Th1应答避免宿主产生过强的免疫反应^[30]。本文提示,隐性感染小鼠在使用免疫抑制剂地塞米松的同时,给予匹多莫德治疗能够提升脾脏组织中Th1为主的免疫应答,提高IFN- γ 和TNF- α 的水平,适度激活Treg的细胞数,而对Th2型应答(IL-4和IL-10)无明显影响。因此,激活Th1型免疫应答可能是匹多莫德抑制脑组织内虫荷,延迟虫血症的出现,有效降低弓形虫隐性感染活化的主要机制。

本研究为临床大剂量、长疗程使用皮质类固醇激素治疗以及HIV/AIDS患者诱发的弓形虫慢性感染的活化,提供了免疫辅助的药物选择,其临床使用价值有待深入研究。

参 考 文 献

- [1] Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals[J]. Anim Health Res Rev, 2005, 6(1): 41-61.
- [2] Nissapatorn V, Lee CK, Khairul AA. Seroprevalence of toxoplasmosis among AIDS patients in Hospital Kuala Lumpur, 2001[J]. Singapore Med J, 2003, 44(4): 194-196.
- [3] Jones JL, Kruszon-Moran D, Wilson M. *Toxoplasma gondii* infection in the United States, 1999-2000 [J]. Emerg Infect Dis, 2003, 9(11): 1371-1374.
- [4] Lowe D, Hessler R, Lee J, et al. *Toxoplasma colitis* in a patient with acquired immune deficiency syndrome[J]. Gastrointest Endosc, 2006, 63(2): 341-342.
- [5] Lindstrom I, Kaddu-Mulindwa DH, Kironde F, et al. Prevalence of latent and reactivated *Toxoplasma gondii* parasites in HIV-patients from Uganda[J]. Acta Trop, 2006, 100(3): 218-222.
- [6] Roullet E. Opportunistic infections of the central nervous system during HIV-1 infection (emphasis on cytomegalovirus disease) [J]. J Neurol, 1999, 246(4): 237-243.
- [7] Dunn D, Wallon M, Peyron F, et al. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling [J]. Lancet, 1999, 353(9167): 1829-1833.
- [8] Jensen KD, Wang Y, Wojno ED, et al. *Toxoplasma* polymorphic effectors determine macrophage polarization and intestinal inflammation[J]. Cell Host Microbe, 2011, 9(6): 472-483.
- [9] Su C, Zhang X, Dubey JP. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites[J]. Int J Parasitol, 2006, 36(7): 841-848.
- [10] Du XF, Jiang CZ, Wu CF, et al. Synergistic immunostimulating activity of pidotimod and red ginseng acidic polysaccharide against cyclophosphamide-induced immunosuppression [J]. Arch Pharm Res, 2008, 31(9): 1153-1159.
- [11] Di Renzo M, Pasqui AL, Bruni F, et al. The *in vitro* effect of pidotimod on some immune functions in cancer patients [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 1997, 19(1): 37-51.
- [12] Chen ZW, Gao JM, Huo XX, et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from cats in different geographic regions of China [J]. Vet Parasitol, 2011, 183(1-2): 166-170.
- [13] Sumyuen MH, Garin YJ, Derouin F. Effect of immunosuppressive drug regimens on acute and chronic murine toxoplasmosis[J]. Parasitol Res, 1996, 82(8): 681-686.
- [14] Dellacasa-Lindberg I, Hitziger N, Barragan A. Localized recrudescence of *Toxoplasma* infections in the central nervous system of immunocompromised mice assessed by *in vivo* bioluminescence imaging[J]. Microbes Infect, 2007, 9(11): 1291-1298.
- [15] 喻海琼, 刘志刚, 国华, 等. 粉尘螨壳聚糖纳米疫苗舌下含服对哮喘小鼠的治疗作用[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2011, 29(1): 4-9.
- [16] Barragan A, Sibley LD. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence [J]. J Exp Med, 2002, 195(12): 1625-1633.
- [17] Lachenmaier SM, Deli MA, Meissner M, et al. Intracellular transport of *Toxoplasma gondii* through the blood-brain barrier [J]. J Neuroimmunol, 2011, 232(1-2): 119-130.
- [18] Lyons RE, Lyons K, McLeod R, et al. Construction and validation of a polycompetitor construct (SWITCH) for use in competitive RT-PCR to assess tachyzoite-bradyzoite interconversion in *Toxoplasma gondii* [J]. Parasitology, 2001, 123(Pt5): 433-439.
- [19] Kang H, Remington JS, Suzuki Y. Decreased resistance of B cell-deficient mice to infection with *Toxoplasma gondii* despite unimpaired expression of IFN-gamma, TNF-alpha, and inducible nitric oxide synthase[J]. Immunology, 2000, 164(5): 2629-2634.
- [20] Nicoll S, Wright S, Maley SW, et al. A mouse model of recrudescence of *Toxoplasma gondii* infection [J]. Med Microbiol, 1997, 46(3): 263-266.
- [21] Dellacasa-Lindberg I, Hitziger N, Barragan A. Localized recrudescence

- of *Toxoplasma* infections in the central nervous system of immunocompromised mice assessed by *in vivo* bioluminescence imaging[J]. *Microbes Infect*, 2007, 9(11): 1291-1298.
- [22] Silva NM, Vieira JC, Carneiro CM, *et al.* *Toxoplasma gondii*: the role of IFN-gamma, TNFRp55 and iNOS in inflammatory changes during infection[J]. *Exp Parasitol*, 2009, 123(1): 65-72.
- [23] Giagulli C, Noerder M, Avolio M, *et al.* Pidotimod promotes functional maturation of dendritic cells and displays adjuvant properties at the nasal mucosa level [J]. *Int Immunopharmacol*, 2009, 9(12): 1366-1373.
- [24] Taramelli D, Malabarba MG, Basilico N, *et al.* Effects of pidotimod on macrophage functions in methylprednisolone-treated mice[J]. *Arzneimittelforschung*, 1994, 44(12A): 1425-1430.
- [25] Migliorati G, D'Adamio L, Coppi G, *et al.* Pidotimod stimulates natural killer cell activity and inhibits thymocyte cell death[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 1992, 14(4): 737-748.
- [26] Migliorati G, Coppi G, D'Adamio F, *et al.* Immunopharmacology of pidotimod: effect on natural killer cell activity and thymocyte cell death[J]. *Pharmacol Res*, 1992, 26(Suppl 2): 154-155.
- [27] Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells[J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(3): 253-257.
- [28] Nagler-Anderson C, Bhan AK, Podolsky DK, *et al.* Control freaks: immune regulatory cells[J]. *Nat Immunol*, 2004, 5(2): 119-122.
- [29] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases[J]. *J Immunol*, 1995, 155(3): 1151-1164.
- [30] Belkaid Y. The role of CD4 (+)CD25 (+) regulatory T cells in *Leishmania* infection[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2003, 3(6): 875-885.

(收稿日期: 2013-03-02 编辑: 衣凤芸)

(上接第 384 页)

靶细胞坏死或受损时细胞间黏附分子被动脱落, 向血清释放所致; 此外华支睾吸虫病患者血清中TNF- α 、IL-6和內毒素活性增高, 不仅能诱导细胞间黏附分子的表达, 同样也可诱导可溶性细胞间黏附分子的分泌, 介导效应细胞攻击肝细胞, 导致肝功能损伤。

IL-4主要由活化的Th2细胞产生, 是重要的巨噬细胞趋化因子, 可促进体液免疫反应, 减轻组织炎症反应。本研究结果显示, 华支睾吸虫病患者血清IL-4水平明显高于对照组, 但与肝功能参数无相关性。提示宿主感染华支睾吸虫后, IL-4的免疫保护占主导地位。

內毒素是革兰氏阴性菌细胞壁上的细菌脂多糖, 健康人血液中几乎不能检出內毒素。华支睾吸虫病患者, 由于肝细胞和肝巨噬细胞功能受损, 或因门-腔静脉侧枝循环形成, 內毒素进入体循环形成內毒素血症, 肝功能受损越重, 血清內毒素含量越高^[11]。

內毒素与肝细胞表面的特异性受体结合, 抑制ATP合成酶和NADH脱氢酶, 使能量合成受阻, 并因呼吸链电子传递受干扰, 氧分子接受电子, 产生氧自由基, 进而损害生物膜, 导致肝细胞炎症、坏死^[12,13]。

內毒素与可溶性细胞间黏附分子呈正相关性, 前者能介导包括肝细胞在内的单核-巨噬细胞合成、释放促炎症介质TNF- α 和IL-1等, 上调内皮细胞细胞间黏附分子、血管内皮细胞间黏附分子的表达, 进而促进肝细胞的损伤^[5,11,14]。

本研究结果显示, 华支睾吸虫病患者血清中可溶性细胞间黏附分子、內毒素、IL-6和TNF- α 的表达增强, 共同介导了华支睾吸虫病的肝损伤, 而IL-4作为主要的负反馈调节因子, 降低炎症反应, 起到免疫保护作用。可溶性细胞间黏附分子不仅可作为肝炎病毒活跃度的指标, 还可作为华支睾吸虫致肝损伤程度的指标之一。

参 考 文 献

- [1] She A, Yang J, Gu Y, *et al.* Lipopolysaccharide-evoked activation of p38 and JNK leads to an increase in ICAM-1 expression in schwann cells of sciatic nerves [J]. *FEBS J*, 2008, 275(17): 4343-4353.
- [2] El-Shazly AM, Soliman M, El-Kalla MR, *et al.* Study soluble adhesion molecules in some intestinal and tissue helminthes[J]. *J Egypt Soc Parasitol*, 2001, 31(2): 501-509.
- [3] 章幼奕, 秦刚, 姚建国, 等. 慢性病毒性肝炎患者血清sICAM-1与肝组织病理变化的相关性研究 [J]. *实用肝脏病杂志*, 2008, 11(3): 159-162.
- [4] 钱门宝, 周晓农, 方悦怡, 等. 加强中国华支睾吸虫病研究[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2011, 29(3): 211-214.
- [5] 蔡连顺, 陈光, 肖景莹, 等. 华支睾吸虫病患者血管内皮细胞粘附分子水平与肝功能的临床关系[J]. *中国微生态学杂志*, 2010, 22(5): 400-403.
- [6] 蔡连顺, 肖景莹, 辛华, 等. 华支睾吸虫病患者细胞因子水平与肝功能关系的研究[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2004, 22(1): 54-56.
- [7] 杨丽莎, 罗伟生, 覃理灵, 等. HBV感染不同免疫状态患者血清中可溶性细胞间粘附分子-1水平的变化 [J]. *中国免疫学杂志*, 2011, 27(1): 70-72.
- [8] 刘仲满. 血清粘附分子及其相关指标检测对乙型肝炎肝硬化患者诊治的意义[J]. *重庆医科大学学报*, 2009, 34(7): 948-950.
- [9] 周思朗, 陈永乐, 彭心昭, 等. 可溶性细胞间粘附分子-1在原发性肝癌患者血清中的表达及其与肝纤维化的关系 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28(2): 181-182, 185.
- [10] 孙亚欣, 张志超, 贾明库. CD40与ICAM-1在原发性肝细胞癌组织中的表达及临床意义[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2009, 35(2): 348-351.
- [11] 王树清, 蔡连顺, 王艳玲. 华支睾吸虫病患者血清LPS水平与肝功能关系的研究 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2008, 3(4): 303-304.
- [12] Zhang HY, Han DW, Wang XG, *et al.* Experimental study on the role of endotoxin in the development of hepatopulmonary syndrome[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(4): 567-572.
- [13] 吴其恺. 肝衰竭肠源性內毒素血症的研究进展 [J]. *传染病信息*, 2009, 22(5): 316-319.
- [14] Nouri-Aria KT, Koskinas J, Tibbs CJ, *et al.* Serum intercellular adhesion molecule-1 levels in chronic hepatitis C: association with disease activity and response to interferon alpha [J]. *Gut*, 1995, 36(4): 599-603.

(收稿日期: 2013-05-30 编辑: 衣凤芸)