

# 人细粒棘球蚴囊液对大鼠肝硬化、肝癌发生发展影响初探

荆仁一<sup>1,2</sup>, 林芷伊<sup>1</sup>, 伍希雅<sup>1,2</sup>, 崔杰<sup>1,2</sup>, 蔡克丰<sup>1,2</sup>, 张宏伟<sup>1,2,3\*</sup>

(1 石河子大学第一附属医院, 新疆 石河子 832000; 2 石河子大学医学院, 新疆 石河子 832000; 3 国家卫生健康委中亚高发病防治重点实验室新疆, 新疆 石河子 832000)

**摘要:**目的 探讨细粒棘球蚴囊液对大鼠肝硬化及肝癌发展的影响并对其机制进行初步探讨。方法 将 SD 大鼠随机分为空白对照组、囊液组、囊液诱癌组和诱癌组, 通过腹腔注射人细粒棘球蚴囊液进行囊液免疫建模, 自由饮用二乙基亚硝胺水溶液进行肝硬化及肝癌建模。通过定期观察肝脏外观, 并以苏木素-伊红(HE)染色、MASSON 染色以及免疫组织化学法对大鼠肝纤维化、肝硬化以及肝癌发生发展程度进行组织学评估; 并以酶联免疫吸附试验(ELISA)法对相关免疫细胞因子进行检测, 对其机制进行初步探索。结果 肝脏外观及 HE 染色显示囊液组及空白对照组大鼠在第 12 周及第 16 周均未发生肝癌; 然而在 12 周时, 诱癌组肝癌发生率为 60%(6/10), 囊液诱癌组肝癌发生率为 30%(3/10), 二者无统计学差异( $P>0.05$ ); 16 周时, 诱癌组肝癌发生率为 100%(10/10), 明显高于囊液诱癌组的肝癌发生率 50%(5/10) ( $P<0.05$ )。免疫组织化学结果显示: 第 12 周及第 16 周囊液诱癌组转化生长因子- $\beta 1$ (Transforming Growth Factor- $\beta 1$ , TGF- $\beta 1$ ) 表达水平高于空白对照组 ( $P<0.05$ )、诱癌组表达水平高于囊液诱癌组 ( $P<0.01$  或  $P<0.001$ ); 第 12 周及第 16 周诱癌组 AFP 表达水平高于囊液诱癌组 ( $P<0.0001$ )。结论 细粒棘球蚴病与肝细胞癌的发生发展过程中存在部分免疫交叉, 细粒棘球蚴囊液可能通过这部分免疫交叉抑制二乙基亚硝胺诱导的大鼠肝纤维化、肝硬化及肝癌的发生发展, 调节性 T 细胞(Regulatory T cells, Treg 细胞)和辅助性 T 淋巴细胞 17(T helper 17 cell, Th17 细胞)在其中可能起到重要作用。

**关键词:** 细粒棘球蚴病; 肝硬化; 肝细胞癌; 肝纤维化; 二乙基亚硝胺; 免疫交叉作用

中图分类号: R735.7

文献标志码: A

## Preliminary study on the effects of *Echinococcus granulosus* cysticercus on the development and progression of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma in rats

JING Renyi<sup>1,2</sup>, LIN Zhiyi<sup>1</sup>, WU Xiya<sup>1,2</sup>, CUI Jie<sup>1,2</sup>, CAI Kefeng<sup>1,2</sup>, ZHANG Hongwei<sup>1,2,3\*</sup>

(1 First Affiliated Hospital, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000, China; 2 School of Medicine, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000, China; 3 NHC Key Laboratory of Prevention and Treatment of Central Asia High Incidence Diseases, Shihezi, Xinjiang 832000, China)

**Abstract: Objective** To preliminarily explore the effects of cystic fluid of human *Echinococcus granulosus* on the development of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma and its mechanisms. **Methods** SD rats were randomly divided into a blank control group, a cyst fluid immunization group, an immunocarcinoma-induced group and a cancer-induced group. Cirrhosis and hepatocellular carcinoma were modeled by intraperitoneal injection of the cyst fluid of *Echinococcus granulosus*, and cirrhosis and hepatocellular carcinoma were modeled by free consumption of diethylnitrosamine in aqueous solution. The appearance of the liver was observed regularly, and the degree of liver fibrosis, cirrhosis and hepatocarcinogenesis was evaluated histologically by HE staining, MASSON staining and immunohistochemistry; and the related immune cytokines were detected by ELISA for the preliminary exploration of their mechanisms. **Results** Gross examination and HE staining revealed that neither the cyst fluid group nor the blank control group developed liver cancer at weeks 12 and 16. However, at week 12, the incidence of liver cancer was 60% (6/10) in the carcinogen-induced group and 30% (3/10) in the cyst fluid-induced carcinogen group, with no statistical difference between the two ( $P>0.05$ ). At week 16, the incidence of liver cancer in the carcinogen-induced group rose to 100% (10/10), significantly higher than the 50% (5/10) incidence in the cyst fluid-induced carcinogen

收稿日期: 2025-03-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(81860363); 新疆生产建设兵团南疆重点项目(2022DB028)

作者简介: 荆仁一(1996—), 男, 硕士研究生, 专业方向为外科学。

\* 通信作者: 张宏伟(1983—), 男, 教授, 从事肝胆外科良恶性疾病的相关临床与基础研究, e-mail: zhw0108@163.com。

group ( $P < 0.05$ ). Immunohistochemistry results indicated that the expression level of TGF- $\beta 1$  was higher in the cyst fluid-induced carcinogen group compared to the blank control group at both weeks 12 and 16 ( $P < 0.05$ ), and the expression level in the carcinogen-induced group was higher than that in the cyst fluid-induced carcinogen group ( $P < 0.01$  or  $P < 0.001$ ). Additionally, the expression level of AFP was higher in the carcinogen-induced group compared to the cyst fluid-induced carcinogen group at both weeks 12 and 16 ( $P < 0.0001$ ).

**Conclusion** There exists a partial immunological overlap between the development of echinococcosis and hepatocellular carcinoma. The cyst fluid of *Echinococcus granulosus* may suppress the occurrence and progression of diethylnitrosamine-induced liver fibrosis, cirrhosis, and liver cancer in rats through this immunological overlap. Treg cells and Th17 cells may play a significant role in this process.

**Key words:** *Echinococcus granulosus*; cirrhosis; hepatocellular carcinoma; liver fibrosis; diethylnitrosamine; immune interaction

原发性肝癌在恶性肿瘤中发病率排名第七,也是因癌症导致死亡的第二大原因,每年约有80万人因此而死亡<sup>[1-2]</sup>。肝硬化患者已被公认最主要的死亡原因即是肝细胞癌,并且干细胞癌的发病率在预计的未来还会不断上升。细粒棘球蚴病是由细粒棘球蚴的幼虫感染所导致的一种人兽共患病,也同样多发于肝脏。

在临床工作过程当中我们发现肝包虫病合并肝炎、肝硬化的发生率非常低,显著低于肝炎本身的发生率,并在合并感染的患者中未发现合并原发性肝癌的患者<sup>[3]</sup>,在文献检索过程中见肝包虫-肝癌共感染均为个案报道,似乎包虫病影响了肝炎-肝硬化-肝癌“三部曲”,抑制了肝癌的发生,但这一设想需要进一步研究支持。

原发性肝癌的发生和发展过程是一个涉及多种因素即多个阶段的复杂过程,并且涉及大量免疫细胞、相关细胞因子及其相关信号通路。Treg细胞及CD8+效应T细胞(effector CD8+ T cells, Teff细胞)的平衡在对肿瘤免疫应答的有效性中起到关键作用<sup>[4-5]</sup>,而在这一过程中,多种促炎细胞因子,如肿瘤坏死因子 $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ),白细胞介素-1(Interleukin-1, IL1),  $\gamma$ 干扰素(Interferon gamma, IFN- $\gamma$ )的影响是不可忽视的<sup>[6]</sup>。同时辅助性T淋巴细胞1(T helper 1 cell, Th1细胞)、辅助性T淋巴细胞2(T helper 2 cell, Th2细胞)以及Th17细胞同样在肿瘤的发生发展中起到促进或抑制作用<sup>[7-8]</sup>。肝细粒棘球蚴病作为一种人兽共患寄生虫病,也涉及较为复杂的免疫机制。Treg/Th17细胞的平衡、Th1/Th2细胞的免疫偏移以及多种细胞因子,如:IFN- $\gamma$ ,白细胞介素-2(Interleukin-2, IL-2),白细胞介素-15(Interleukin-15, IL-15),白细胞介素-4(Interleukin-4, IL-4),白细胞介素-5(Interleukin-5, IL-5),白细胞介素-6(Interleukin-6, IL-6),白细胞介素-10(Interleukin-10, IL-10),白细胞介素-13(Interleukin-13, IL-13)在细粒棘球蚴病的免疫病理和疾病进展中起到重要作用<sup>[9-13]</sup>。如

今肝细粒棘球蚴的囊液已被证实其中含有32种蛋白质类物质,并且其内所包含的抗原B具有强抗原性<sup>[14-15]</sup>。由此可见肝癌的免疫机制与细粒棘球蚴病的免疫机制并不完全相同,但也有部分交集。

本研究通过粒棘球蚴囊液腹腔注射的方法诱导大鼠产生相应的免疫反应,并利用二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DEN)进行肝细胞癌的诱导建模,通过大体观察及相关免疫因子的检测来探索细粒棘球蚴囊液对于大鼠肝硬化和肝细胞癌发展的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF级6周龄雄性SD大鼠100只购自石河子大学医学院转化医学实验动物中心。分笼饲养于石河子大学转化医学实验动物中心SPF级动物房。石河子大学第一附属医院伦理委员会批准,编号:A2023-342-01。采用标准化饲养,动物房温度保持22~26℃,相对湿度为40%~60%,12h交替照明。所有动物喂养国家标准大鼠饲料,自由活动、摄食及饮水,定期更换垫料。

### 1.2 细粒棘球蚴囊液的获取和制备

细粒棘球蚴囊液采集自石河子大学第一附属医院肝胆外科,CE1单囊型包虫病患者经检查无胆漏等并发症,签署知情同意后,经外科手术取出患者肝脏内包囊,在无菌环境下抽取包囊中无感染、无胆瘘、无色透明、非冻状的细粒棘球蚴囊液,4℃下300 r·min<sup>-1</sup>离心10 min(离心半径15 cm),并使用0.45  $\mu$ m过滤器过滤后分装于50 mL无菌离心管中,标记好病人信息、收集日期等,于-80℃保存。

### 1.3 动物分组

雄性SD大鼠96只购于石河子大学医学院转化医学实验动物中心,适应性饲养后,将大鼠随机分为空白对照组、囊液组、囊液诱癌组、诱癌组4组,按照时间点分为2个亚组,共8组,12只·组<sup>-1</sup>。

## 1.4 动物模型建立

**囊液组:**将囊液复温至 37 ℃,固定大鼠,充分暴露大鼠腹部,右下腹备皮、消毒,以无菌注射器经 SD 大鼠右下腹匀速注射囊液,0.1 mL·次<sup>-1</sup>,2 次·周<sup>-1</sup>。

**空白对照组:**固定大鼠,充分暴露大鼠腹部,右下腹备皮、消毒,以无菌注射器经 SD 大鼠右下腹匀速注射无菌生理盐水 0.1 mL·次<sup>-1</sup>,2 次·周<sup>-1</sup>。

**囊液诱癌组:**将囊液复温至 37 ℃,固定大鼠,充分暴露大鼠腹部,右下腹备皮、消毒,以无菌注射器经 SD 大鼠右下腹匀速注射囊液,0.1 mL·次<sup>-1</sup>,2 次·周<sup>-1</sup>;同时给予 0.01% DEN 溶液(美国 Sigma-Aldrich 公司)自由饮用。

**诱癌组:**固定大鼠,充分暴露大鼠腹部,右下腹备皮、消毒,以无菌注射器经 SD 大鼠右下腹匀速注射无菌生理盐水 0.1 mL·次<sup>-1</sup>,2 次·周<sup>-1</sup>;同时给予 0.01% 二乙基亚硝胺溶液(美国 Sigma-Aldrich 公司)自由饮用。

于第 12 周、第 16 周随机选取大鼠 10 只,取肝、脾组织标本进行免疫学及病理学检测。

## 1.5 检测指标

### 1.5.1 大鼠一般状况

在大鼠建模及饲养过程中,观察大鼠营养状态、精神状态、姿态及步态等。

### 1.5.2 大鼠肝脏外观变化

按照试验计划时间点随机选取大鼠,进行麻醉后,取腹正中切口,取大鼠肝脏,观察大鼠肝脏外观,观察指标包括肝脏表面光滑程度、边缘锐利程度、颜色、弹性、是否存在结节坏死等。

### 1.5.3 肝组织病理学特征

HE 染色,观察肝组织病理形态学特征。

根据 MASSON 染色结果对大鼠肝纤维化程度进行观察,采用 IMAGE J(v 1.8.0)对各组大鼠肝组织纤维化程度进行量化。

### 1.5.4 肝组织内免疫细胞因子检测

以免疫组织化学法检测大鼠肝组织中 AFP、TGF-β1、IL-2、IL-10、IL-17A 的表达水平。

### 1.5.5 血清免疫细胞因子及生化指标检测

取大鼠外周血,离心分离血清,以 ELISA 法(中国 Thermo Fisher 公司)检测大鼠外周血中 AFP、TGF-β1、IL-2、IL-4、IL-10、IL-17A 的表达水平。

## 1.6 统计学分析

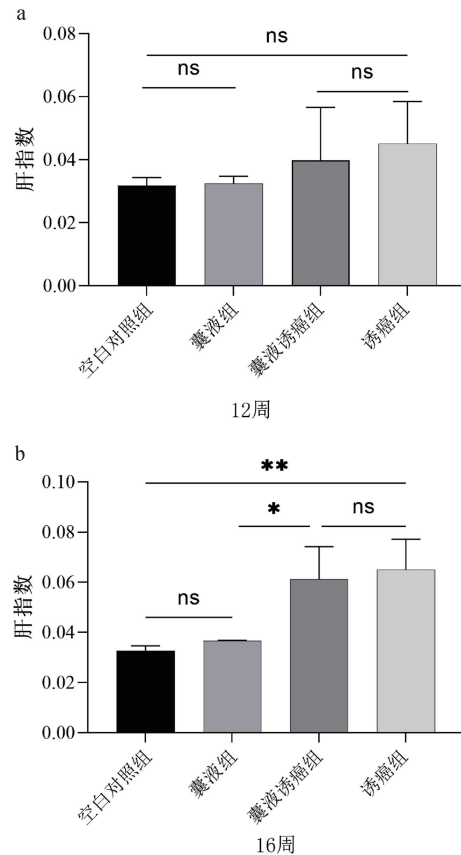
采用 SPSS 26.0 统计软件分析数据,计量资料采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素

方差分析或重复测量的方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 检验;计数资料采用百分率(%)表示,组间比较采用 $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组 SD 大鼠一般状况

在 DEN 与包虫囊液的干预下,各组大鼠的一般健康状况发生了不同程度的变化。在试验进行至 12 周时,空白对照组和单纯免疫组的大鼠,其营养和精神状态均良好,没有发生死亡现象;而囊液诱癌组的大鼠虽然营养状态良好,但其精神状态表现一般,此组也未发生大鼠死亡;诱癌组的大鼠死亡率为 20%,与空白对照组相比并无显著差异( $P = 0.224$ )。当试验进行至 16 周时,空白对照组和单纯免疫组的大鼠仍然保持良好的营养和精神状态,没有出现死亡现象;囊液诱癌组的大鼠死亡率达到 13.3%,而诱癌组的大鼠死亡率高达 53.3%,这两组之间的死亡率没有统计学差异( $P = 0.05$ )(图 1)。



a:12 周大鼠肝指数情况;b:16 周大鼠肝指数情况;ns 表示  $P > 0.05$ , \* 表示  $P < 0.05$ , \*\* 表示  $P < 0.01$ (数据来自  $n > 3$  的小鼠的平均值±标准差)。

图 1 大鼠肝指数

Figure 1 Liver index of rats

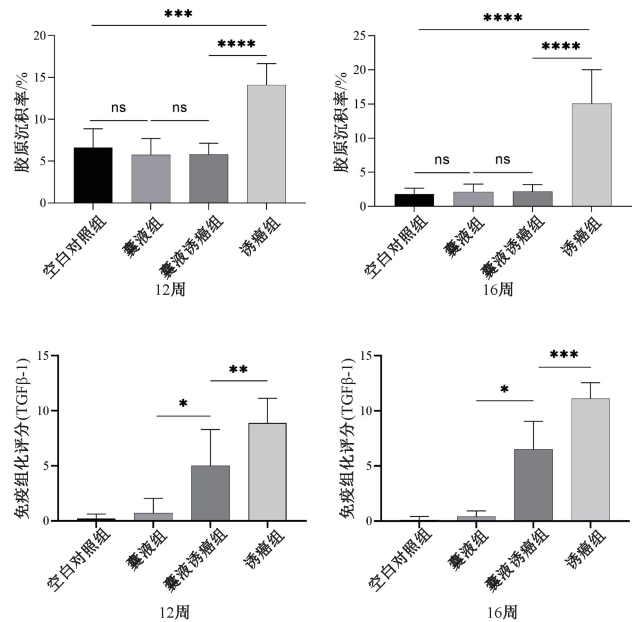
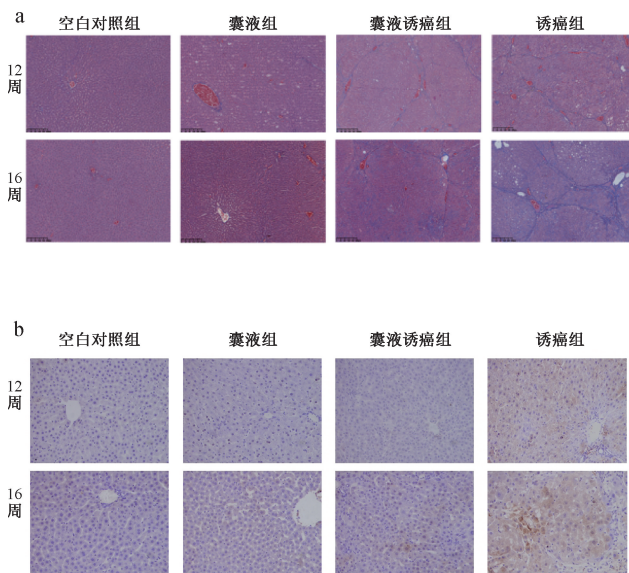
进一步计算了肝指数,以评估 DEN 和包虫囊液干预对大鼠肝脏的影响。结果显示,在 12 周时,各组的肝指数并无显著差异(图 1a)。然而在 16 周时,囊液组与空白对照组的肝指数无显著差异,但囊液诱癌组的肝指数明显高于囊液组( $P<0.05$ ),与诱癌组相比并无显著差异,诱癌组的肝指数则明显高于空白对照组( $P<0.01$ )(图 1b)。

## 2.2 诱癌 SD 大鼠经过包虫囊液免疫肝硬化程度明显减轻

为了评估 DEN 对各组大鼠肝硬化程度的影响以及包虫囊液在此过程中的作用,我们对各组大鼠的肝脏组织进行了 MASSON 染色。结果显示,当试验进行至 12 周时,诱癌组的肝纤维化程度明显高于囊液诱癌组( $P<0.0001$ ),而空白对照组、囊液组和

囊液诱癌组之间的肝纤维化程度并无显著差异;当试验进行至 16 周时,诱癌组的肝纤维化程度依然显著高于囊液诱癌组,而空白对照组、囊液组和囊液诱癌组之间的肝纤维化程度仍然没有显著差异(图 2a)。

TGF- $\beta$ 1 是一种参与多种生理病理过程调控的细胞因子,它是导致慢性肝损伤的主要因素,可以参与多种诱因引发的肝损伤和纤维化的发生。我们对四组大鼠的肝脏组织进行了免疫组织化学分析,以测定 TGF- $\beta$ 1 的表达。结果显示,在试验进行至 12 周时,囊液诱癌组的 TGF- $\beta$ 1 表达水平高于囊液组( $P<0.05$ ),但低于诱癌组( $P<0.05$ );到了 16 周时,囊液诱癌组的 TGF- $\beta$ 1 表达水平仍然高于囊液组( $P<0.05$ ),但低于诱癌组( $P<0.05$ )(图 2b)。



a:大鼠第 12 周及 16 周肝脏 MASSON 染色(100 $\times$ );b:大鼠第 12 周及 16 周肝脏 TGF- $\beta$ 1 表达水平(200 $\times$ ); ns 表示  $P>0.05$ , \* 表示  $P<0.05$ , \*\* 表示  $P<0.01$ , \*\*\* 表示  $P<0.001$ , \*\*\*\* 表示  $P<0.0001$ (数据来自  $n>3$  的小鼠的平均值 $\pm$ 标准差)。

图 2 各组大鼠肝硬化程度及相关因子表达情况

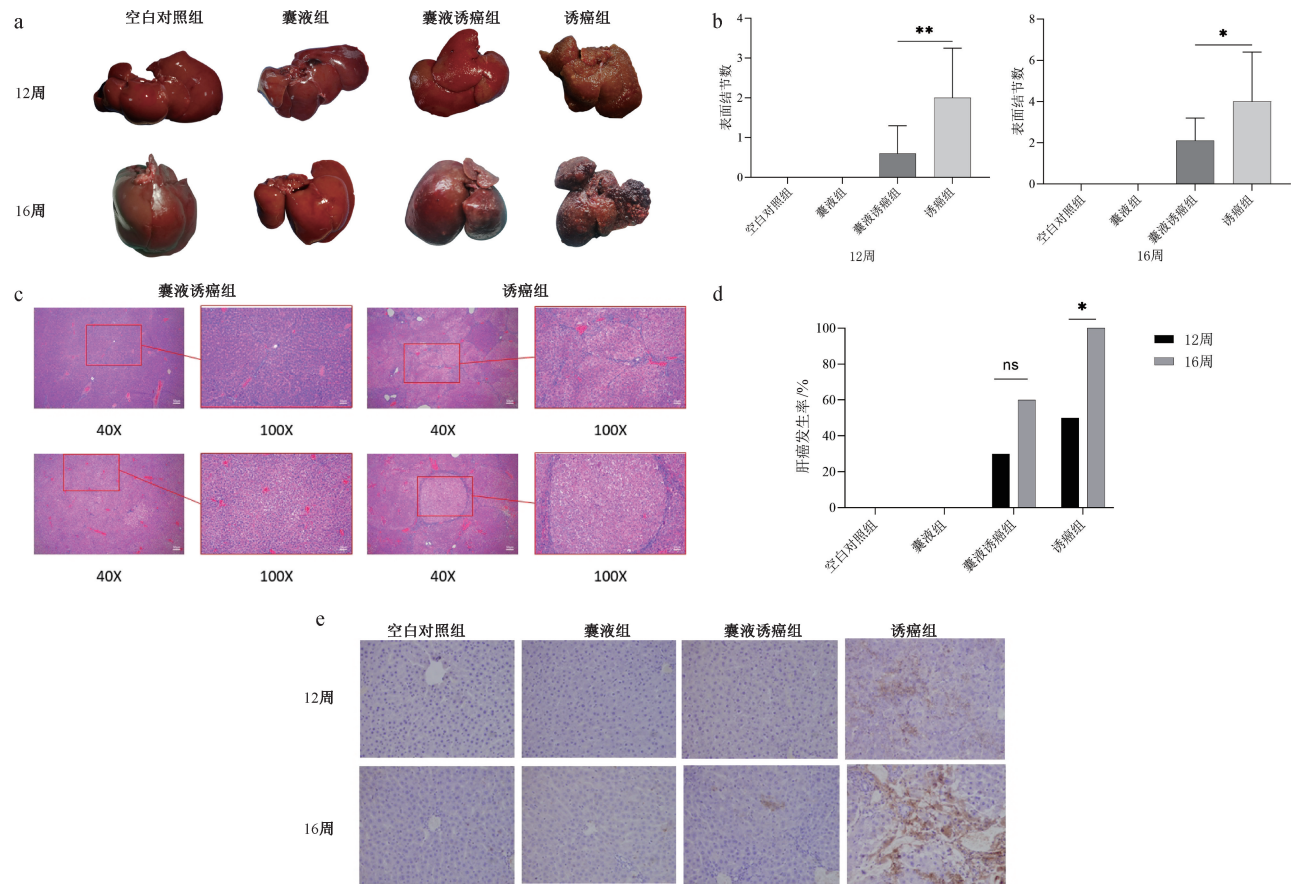
Figure 2 Degree of liver cirrhosis and expression of related factors in each group of rats

## 2.3 诱癌 SD 大鼠经包虫囊液免疫肝癌发生率明显降低

为了评估 DEN 对肝癌诱导的影响以及包虫囊液在此过程中的作用,首先对大鼠肝脏外观进行了观察。当试验进行至 12 周时,诱癌组的肝脏表面平均可观察到 2 个癌结节,明显高于囊液诱癌组;而在囊液组和空白对照组的大鼠肝脏表面,并未观察到明显的癌结节。到了 16 周时,诱癌组的肝脏表面平均可观察到 4 个癌结节,依然高于囊液诱癌组;而在囊液组和空白对照组的大鼠肝脏表面,仍然未见到

明显的癌结节(图 3a、图 3b)。

为评估各组大鼠肝癌的发生率,我们对 4 组大鼠的肝脏组织进行了 HE 染色并进行了统计学分析。结果显示,空白对照组和囊液组在 12 周和 16 周均未出现肝癌。在试验进行至 12 周时,诱癌组的肝癌发生率为 60%(6/10),高于囊液诱癌组的 30%(3/10),但二者之间并无统计学差异( $P>0.05$ )。到了 16 周时,诱癌组的肝癌发生率达到了 100%(10/10),显著高于囊液诱癌组的 50%(5/10)( $P<0.05$ )(图 3c、图 3d)。



a:大鼠在 12 周及 16 周肝脏外观;b:大鼠在 12 周及 16 周表面结节数;c:大鼠在 12 周及 16 周肝脏 HE 染色(100×);d:各组大鼠在 12 周及 16 周肝癌发生率;e:大鼠第 12 周及 16 周肝脏 AFP 表达水平(200×);ns 表示  $P>0.05$ , \* 表示  $P<0.05$ , \*\* 表示  $P<0.01$  (数据来自  $n>3$  的小鼠的平均值±标准差)。

图 3 各组大鼠肝癌发生情况

Figure 3 Incidence of hepatocellular carcinoma in each group of rats

AFP 是原发性肝癌的标志物。为了更进一步评估各组大鼠肝癌的发生情况,我们对四组大鼠的肝脏组织进行了 AFP 的免疫组织化学检测。结果显示,在试验进行至 12 周时,囊液诱导组的 AFP 表达水平显著低于诱导组。当试验进行至 16 周时,囊液诱导组的 AFP 表达水平仍然显著低于诱导组(图 3e)。

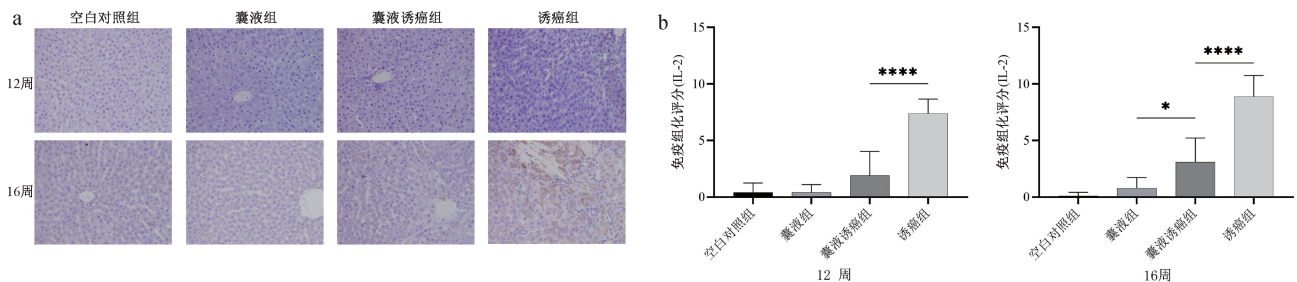
## 2.4 各组大鼠炎症因子表达水平

### 2.4.1 大鼠肝组织炎症相关细胞因子表达水平

肝癌的发生可引起大鼠免疫环境发生一系列的变化,同时,注射包虫囊液也可能导致大鼠炎症因子表达水平显著改变。为了评估这两个因素单独或同

时发生时对大鼠机体免疫水平的影响,我们取各组大鼠的肝组织,对各类炎症因子进行了免疫组织化学分析。

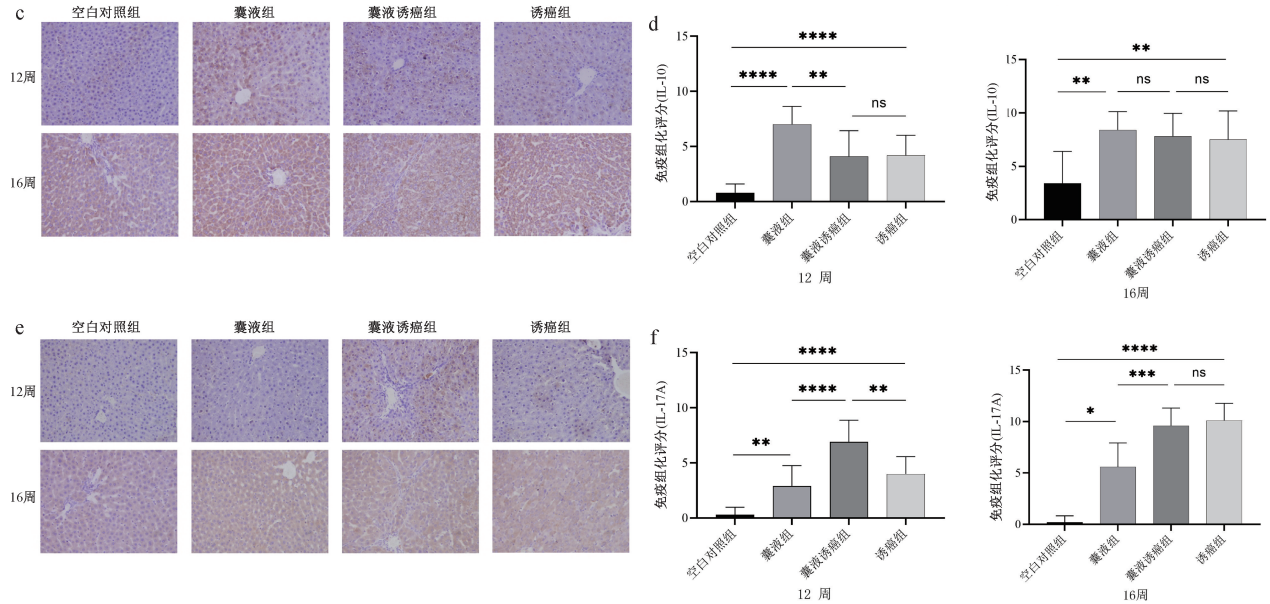
结果显示,当试验进行至 12 周时,诱导组的 IL-2 表达水平明显高于囊液诱导组( $P<0.0001$ )(图 4a)。同时,囊液组的 IL-10 表达水平明显高于空白对照组和囊液诱导组,而诱导组的 IL-10 表达水平则明显高于空白对照组,但与囊液诱导组相比并无差异(图 4b)。囊液诱导组的 IL-17A 表达水平明显高于囊液组和诱导组,而囊液组和诱导组的 IL-17A 表达水平则明显高于空白对照组(图 4c)。



a:大鼠在 12 周及 16 周肝组织 IL-2 免疫组织化学染色;b:各组大鼠在 12 周及 16 周肝组织 IL-2 免疫组织化学评分;ns 表示  $P>0.05$ , \* 表示  $P<0.05$ , \*\*\*\* 表示  $P<0.0001$  (数据来自  $n>3$  的小鼠的平均值±标准差)。

图 4 各组大鼠肝组织炎症因子表达水平

Figure 4 Expression level of inflammatory factors in each group of rats



a,b:大鼠第 12 周及 16 周肝脏 IL-2 表达水平(200×);c,d:大鼠第 12 周及 16 周肝脏 IL-10 表达水平(200×);e,f:大鼠第 12 周及 16 周肝脏 IL-17A 表达水平(200×);ns 表示  $P>0.05$ , \* 表示  $P<0.05$ , \*\* 表示  $P<0.01$ , \*\*\* 表示  $P<0.001$ , \*\*\*\* 表示  $P<0.0001$  (数据来自  $n>3$  的小鼠的平均值±标准差)。

图 4 大鼠肝组织炎症相关细胞因子表达水平

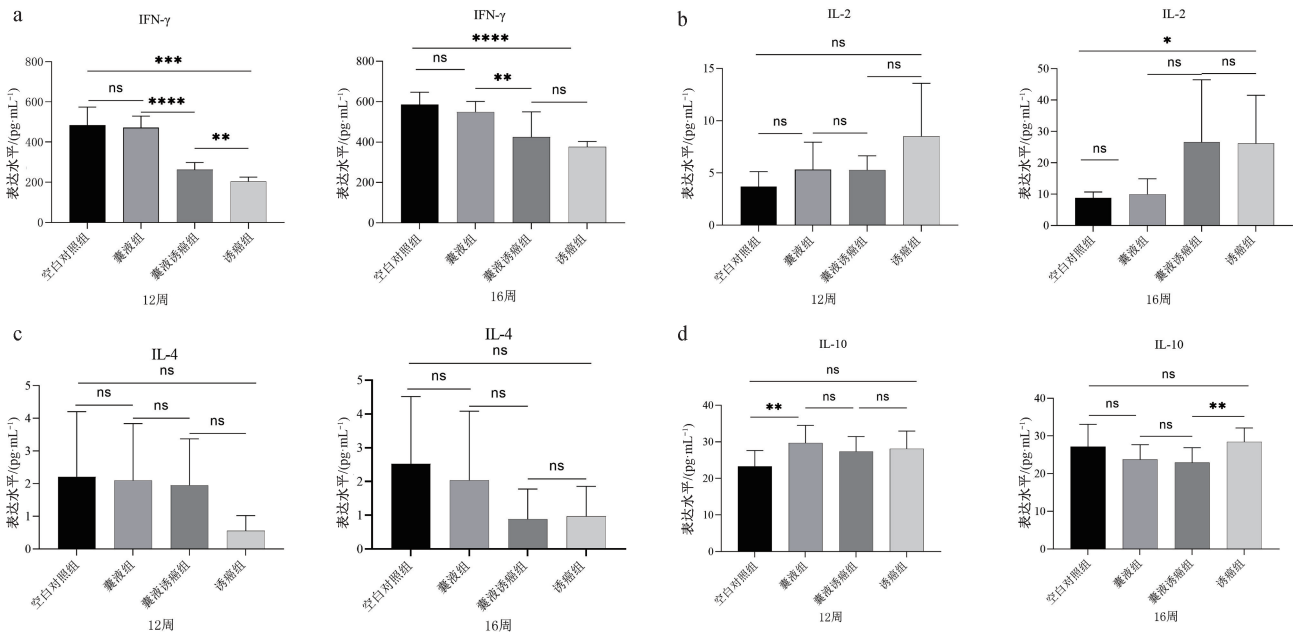
Figure 4 Expression levels of inflammatory cytokines in rat liver tissue

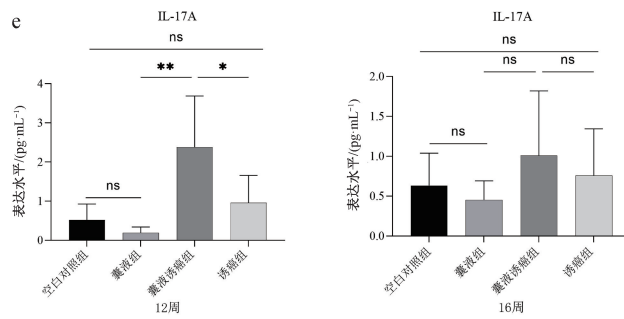
在试验进行至 16 周时,诱癌组的 IL-2 表达水平依然明显高于囊液诱癌组,而囊液诱癌组的 IL-2 表达水平则明显高于囊液组(图 4a)。此时,囊液组和诱癌组的 IL-10 表达水平都显著高于空白对照组,而囊液诱癌组的 IL-10 表达水平则与囊液组和诱癌组相比,并无明显差异(图 4b)。在此阶段,囊液组和诱癌组的 IL-17A 表达水平都高于空白对照组,而囊液诱癌组的 IL-17A 表达水平则高于囊液组,但与诱癌组相比并无明显差异(图 4c)。

#### 2.4.2 大鼠外周血免疫相关细胞因子表达水平

为了更深入地探究 DEN 和包虫囊液对大鼠免疫水平的影响,我们取得了各组大鼠的外周血样本,并利用 ELISA 测定了其中免疫因子的表达水平。

结果显示,当试验进行到 12 周时,囊液组与空白对照组在 IFN- $\gamma$  表达水平上并无显著差异。囊液诱癌组的 IFN- $\gamma$  表达水平则低于囊液组,但高于诱癌组,而诱癌组的 IFN- $\gamma$  表达水平则显著低于空白对照组(图 5a)。在此时期,各组在 IL-2 和 IL-4 的表达水平上并无显著差异(图 5b、图 5c)。然而,





a:大鼠第 12 周及 16 周外周血 IFN- $\gamma$  表达水平;b:大鼠第 12 周及 16 周外周血 IL-2 表达水平;c:大鼠第 12 周及 16 周外周血 IL-4 表达水平;d:大鼠第 12 周及 16 周外周血 IL-10 表达水平;e:大鼠第 12 周及 16 周外周血 IL-17A 表达水平;ns 表示  $P>0.05$ ,

\* 表示  $P<0.05$ , \*\* 表示  $P<0.01$ , \*\*\* 表示  $P<0.001$ , \*\*\*\* 表示  $P<0.0001$  (数据来自  $n>3$  的小鼠的平均值 $\pm$ 标准差)。

图 5 大鼠外周血免疫相关细胞因子的表达

Figure 5 Expression of immune-related cytokines in rat peripheral blood

囊液组的 IL-10 表达水平显著高于空白对照组,而囊液诱癌组与囊液组和诱癌组在 IL-10 表达水平上无显著差异,同时,诱癌组与空白对照组在 IL-10 表达水平上也无显著差异(图 5d)。囊液诱癌组的 IL-17A 表达水平明显高于囊液组和诱癌组,而囊液组和诱癌组的 IL-17A 表达水平与空白对照组无显著差异(图 5e)。

在试验进行至 16 周时,囊液组与空白对照组在 IFN- $\gamma$  表达水平上仍无显著差异,而囊液诱癌组的 IFN- $\gamma$  表达水平则低于囊液组,但与诱癌组相比无显著差异,此时,诱癌组的 IFN- $\gamma$  表达水平仍低于空白对照组(图 5a)。在此阶段,诱癌组的 IL-2 表达水平显著高于空白对照组,而囊液诱癌组的 IL-2 表达水平则与囊液组和诱癌组无显著差异(图 5b)。在此期间,各组间 IL-4 表达水平仍无显著差异(图 5c)。囊液组和诱癌组的 IL-10 表达水平与空白对照组无显著差异,而囊液诱癌组的 IL-10 表达水平则低于囊液组,但高于诱癌组(图 5d)。在此阶段,各组的 IL-17A 表达水平无显著差异(图 5e)。

### 3 讨论

肝细粒棘球蚴病与肝细胞癌可能存在的免疫交叉。肝细粒棘球蚴病与肝细胞癌都发生在肝内,且都涉及较为复杂的免疫机制,如前文提到的,我们在临床工作中发现二者共患病率较低且二者病程中可能通过某种方式存在相互影响的情况<sup>[3]</sup>。在文献检索过程当中有一些免疫细胞例如 Th17 细胞、Treg 细胞、Th1 细胞、Th2 细胞,及其相关免疫因子例如 IL-2、IL-10、IL17A、TGF- $\beta$ 1 等在二者的疾病发生发展中都产生了重要作用,我们视之为二者的免疫交叉并对其进行验证<sup>[16-17]</sup>。

细粒棘球蚴感染宿主之后,可激活宿主的免疫

应答,单寄生虫通过一系列手段逃避宿主的免疫系统攻击实现长期寄生<sup>[18-19]</sup>。在以往的研究中发现 DC 细胞以及 T 细胞亚群(Th 细胞、Treg 细胞、CD8+T 细胞)在人体对细粒棘球蚴的免疫及细粒棘球蚴的免疫逃逸过程中发挥关键作用<sup>[20-21]</sup>。肝癌的发生及发展同样与免疫系统密切相关。现有的研究表明 Th17 细胞主要通过激活单核细胞、促肿瘤血管生成及抑制 CD8+T 细胞等发挥促癌作用<sup>[22]</sup>,IL-17A 可以通过 JAK/STAT3 通路促进肝硬化、肝癌的发展<sup>[23-24]</sup>。与此同时,一些免疫细胞(如:NKT 细胞、Th1 细胞、CD8+T 细胞)也广泛参与了肝癌的免疫抑制<sup>[25-29]</sup>。此外,IL-2 在抗肿瘤、抗感染、抗自身免疫性疾病及器官移植存活等均有重要的意义<sup>[30]</sup>。且目前也已证明,TGF- $\beta$ 1 的持续激活是肝纤维化发生过程中最重要的因素和肝癌形成的关键因素。

Treg/Th17 细胞及相关免疫因子对肿瘤发生发展产生了抑制作用。既往研究显示 Treg 细胞具有免疫抑制功能,在炎症发生过程当中主要起抗炎作用<sup>[31]</sup>,并且在肿瘤的发生发展中起到了促进作用<sup>[32]</sup>。在临床实践中,肝包虫囊破裂所致的囊液外溢可能导致患者非常严重的过敏反应,于晓东等的研究发现细粒棘球蚴的过敏反应会导致机体免疫系统通过下调 Treg 细胞的数量,降低 IL-10 和 TGF- $\beta$ 1 的方式来促进机体对过敏反应的应答<sup>[33]</sup>。并且有研究认为 Treg 细胞通过自身表达量增加以及分泌 IL-10 和 TGF- $\beta$ 1 帮助细粒棘球蚴逃避机体的免疫杀伤<sup>[33]</sup>。在本研究中囊液组小鼠肝组织中 IL-10 表达明显上调,与该研究的结果相符,而囊液诱癌组及诱癌组的 IL-10 表达水平较低,此结果提示 DEN 的参与会使得 IL-10 的表达降低。也有研究指出 IL-10 的过表达有利于寄生虫的免疫逃逸,且 IL-10 也被认为可以抑制肿瘤患者的免疫能力。在

本研究中,大鼠在第12周囊液诱癌组大鼠的IL-10表达水平较低,但在16周时则呈高表达,与诱癌组和单纯免疫组表达无差异,此结果则提示在肝癌发生早期,或在肝硬化阶段,机体可以通过下调IL-10的表达来对抗肿瘤的发生。

已有的研究证实IL-17主要由Th17细胞分泌,并且通过作用于多种靶细胞,触发炎症递质释放介导炎症的发生和发展,是人体抗肿瘤与寄生虫感染的重要免疫过程<sup>[34-35]</sup>。在本研究中,囊液诱癌组大鼠肝组织中IL-17A表达明显高于诱癌组及单纯免疫组,单纯免疫组及诱癌组大鼠IL-17A表达量则明显高于空白对照组,此结果提示机体在接触DEN及细粒棘球蚴囊液时都会上调Th17细胞的数量及IL-17A的表达,且在机体同时接触两种因素时,这两种因素在体内有着协同作用,使得Th17细胞数量进一步增加,从而促进炎症反应,以增加机体对于寄生虫或肿瘤细胞的杀伤作用。但由于该过程中缺少了TGF- $\beta$ 1等关键细胞因子,会使得肝纤维化及肝硬化的进展被延缓。此外,在本研究中,囊液的主动干预可使IL-2的表达下调;IL-17A在囊液干预后随着时间的进展,在肝癌组明显降低;TGF- $\beta$ 1在囊液主动干预后表达下调。(建议补充补充TGF- $\beta$ 信号通路在Treg分化中的核心作用,以解释为何TGF- $\beta$ 1下调会同时影响寄生虫免疫逃逸和肿瘤发生。)据该结果推测,机体可能在产生了对细粒棘球蚴的免疫后,下调Treg细胞数量、降低IL-10及TGF- $\beta$ 1的表达,从而促进机体对于细粒棘球蚴的免疫应答,在这一过程中,TGF- $\beta$ 1的下调,可能抑制了肝纤维化及肝硬化的发生发展,且由于Treg细胞的数量减少,不利于肿瘤的免疫逃逸,机体对于肿瘤细胞的免疫更加敏感,从而抑制了肿瘤的发生与发展。

Th1/Th2平衡及相关免疫因子的影响并不明确。IL-2主要由Th1细胞分泌,也可由DC细胞分泌,此因子可以启动Th1型细胞介导的免疫应答,使得Th1/Th2向Th1型“漂移”,这种“免疫漂移”有利于机体对抗寄生虫感染,并具有抗肿瘤作用。相反如果向Th2型“漂移”则可能对寄生虫或肿瘤细胞的免疫逃逸起到促进作用。本研究的诱癌组大鼠肝组织中的IL-2表达远高于其他三组,其他三组大鼠肝组织中IL-2表达无差异。说明机体在细粒棘球蚴囊液及DEN的共同作用下,Th1/Th2细胞仍处于一种平衡状态,并未观察到“免疫漂移”现象。在这过程中DC细胞及Th1细胞数量如何变化尚不

明确。

本研究结果表明,细粒棘球蚴囊液可以引起大鼠产生相应的免疫应答,该过程并不会导致大鼠产生严重的过敏反应或肝硬化等不良反应。且细粒棘球蚴免疫可以抑制DEN诱导的大鼠肝硬化及肝癌的发生及发展。对相关的免疫细胞及相关免疫因子的筛查表明,SD大鼠在接受细粒棘球蚴囊液免疫后,一方面可能通过下调Treg细胞数量及IL-10、TGF- $\beta$ 1的表达,从而在肝癌发生早期或肝硬化阶段抑制了肝硬化及肝癌的发生及发展;另一方面通过增加Th17细胞数量和IL-17A的表达来增加机体免疫系统对于肿瘤细胞的杀伤,从而抑制肿瘤的发生和发展,而DC细胞、Th1/Th2细胞平衡及IL-2在此过程中起到何种作用尚不明确。

细粒棘球蚴囊液能够抑制肝硬化及肝癌发生发展的作用是明确的,但其中的关键抗原性物质尚不明确,本文研究证明了,Treg细胞和Th17细胞在其中可能起到重要作用,但是其机制尚不明确,仍需进一步的调查研究。细粒棘球蚴囊液拥有临床制剂应用的潜力,本研究为肝硬化及肝癌的防治提供了一个新的思路。

## 参考文献(References)

- [1] SMYTH M J, WALLACE M E, NUTT S L, et al. Sequential activation of NKT cells and NK cells provides effective innate immunotherapy of cancer[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2005, 201(12): 73-85.
- [2] FORNER A, BRUIX J. Hepatocellular carcinoma-Authors' reply[J]. *The Lancet*, 2012, 380(9840): 470-471.
- [3] 满洋,林芷伊,苗章,等.肝细粒棘球蚴病与肝炎病毒感染、肝硬化、肝细胞癌共患病的临床观察[J]. *临床肝胆病杂志*, 2022, 38(3): 601-605.  
MAN Y, LIN Z Y, MIAO Z, et al. Comorbidity of hepatic cystic echinococcosis with HBV/HCV infection, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma[J]. *Journal of Clinical Hepatology*, 2022, 38(3): 601-605.
- [4] TANAKA A, SAKAGUCHI S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy [J]. *Cell Research*, 2017, 27(1): 109-118.
- [5] FRIDMAN W H, PAGES F, SAUTES-FRIDMAN C, et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2012, 12(4): 298-306.
- [6] BALKWILL F. Tumour necrosis factor and cancer[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2009, 9(5): 361-371.

- [ 7 ] CHANG C P, YANG M C, LEI H Y. Concanavalin A/IFN-gamma triggers autophagy-related necrotic hepatocyte death through IRGM1-mediated lysosomal membrane disruption [J]. *PLoS One*, 2011, 6 ( 12 ): e28323.
- [ 8 ] WANG W W, WANG Z M, LIU Y Y, et al. Increased level of Th17 cells in peripheral blood correlates with the development of hepatocellular carcinoma [J]. *Chinese Journal of Oncology*, 2010, 32(10): 757-761.
- [ 9 ] ROGAN M T, BODELL A J, CRAIG P S. Post-encystment/established immunity in cystic echinococcosis: Is it really that simple? [J]. *Parasite Immunology*, 2015, 37(1): 1-9.
- [ 10 ] GOTTSTEIN B, SOBOSLAY P, ORTONA E, et al. Immunology of alveolar and cystic echinococcosis (AE and CE) [M]//Advances in parasitology. San Diego: Academic Press, 2017(96): 1-54.
- [ 11 ] RIGANO R, PROFUMO E, IOPPOLO S, et al. Serum cytokine detection in the clinical follow up of patients with cystic echinococcosis [J]. *Clinical and Experimental Immunology*, 1999, 115(3): 503.
- [ 12 ] TUXUN T, WANG J H, LIN R Y, et al. Th17/Treg imbalance in patients with liver cystic echinococcosis [J]. *Parasite Immunology*, 2012, 34(11): 520-527.
- [ 13 ] DEMATTEIS S, BAZ A, ROTTENBERG M, et al. Antibody and Th1/Th2-type responses in BALB/c mice inoculated with live or dead *Echinococcus granulosus* protoscoleces [J]. *Parasite Immunology*, 1999, 21(1): 19-26.
- [ 14 ] 张倩, 李居怡, 赵嘉庆, 等. 细粒棘球蚴囊液蛋白质组学的分析研究 [J]. *解放军医药杂志*, 2013, 25(12): 48-51.  
ZHANG Q, LI J Y, ZHAO J Q, et al. Proteomics study on hydatid cyst fluid of *Echinococcus granulosus* [J]. *Medical & Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army*, 2013, 25(12): 48-51.
- [ 15 ] 闫鸿斌. 四种绦虫蛋白酶及其抑制剂的系统挖掘与功能分析 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.
- [ 16 ] KIM H J, KANG S A, YONG T S, et al. Therapeutic effects of *Echinococcus granulosus* cystic fluid on allergic airway inflammation [J]. *Experimental Parasitology*, 2019(198): 63-70.
- [ 17 ] 中国医师协会外科医师分会包虫病外科专业委员会. 肝两型包虫病诊断与治疗专家共识 (2019 版) [J]. *中华消化外科杂志*, 2019, 18(8): 711-721.  
Chinese Doctor Association, Chinese College of Surgeons (CCS), Chinese Committee for Hadytidology (CCH). Expert consensus on diagnosis and treatment of hepatic cystic and alveolar echinococcosis (2019 edition) [J]. *Chinese Journal of Digestive Surgery*, 2019, 18 ( 8 ): 711-721.
- [ 18 ] 潘伟, 张玉梅, 孙芬芬, 等. 细粒棘球蚴感染小鼠腹腔巨噬细胞表型及吞噬功能的变化 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2016, 34(4): 315-318.  
PAN W, ZHANG Y, SUN F, et al. Changes of phenotype and phagocytosis of peritoneal macrophages in mice infected with the larval-stage of *Echinococcus granulosus* [J]. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 2016, 34(4): 315-318.
- [ 19 ] LIU H D, WANG H B, FAN H N, et al. Alveolar echinococcosis and immune evasion [J]. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 2018, 36 ( 6 ): 655-660.
- [ 20 ] MOURGLIA-ETTLIN G, MARQUES J M, CHABALGOITY J A, et al. Early peritoneal immune response during *Echinococcus granulosus* establishment displays a biphasic behavior [J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2011, 5(8): e1293.
- [ 21 ] GOTTSTEIN B, SOBOSLAY P, ORTONA E, et al. Immunology of alveolar and cystic echinococcosis (AE and CE) [J]. *Advances in Parasitology*, 2017(96): 1-54.
- [ 22 ] 陈博, 缪辉来, 钟巨贤, 等. 肿瘤浸润淋巴细胞的生物学功能及其在肝细胞癌中的意义 [J]. *临床医学研究与实践*, 2022, 7(4): 188-192.  
CHEN B, MIAO H L, ZHONG J X, et al. Biological function of tumor infiltrating lymphocytes and its significance in hepatocellular carcinoma [J]. *Clinical Research and Practice*, 2022, 7(4): 188-192.
- [ 23 ] 顾方明. IL-17 对原发性肝癌生物学特性的影响及临床意义研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2011.
- [ 24 ] 伍希雅, 崔杰, 林芷伊, 等. 细粒棘球蚴囊液外泌体通过 JAK2/STAT3 信号通路调控小鼠肝癌细胞 Hepa1-6 增殖与凋亡 [J]. *石河子大学学报(自然科学版)*, 2024, 42(6): 742-749.  
WU X Y, CUI J, LIN Z Y, et al. Exosomes from *Echinococcus granulosus* cyst fluid regulate the proliferation and apoptosis of Hepa1-6 mouse hepatocellular carcinoma cells through JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *Journal of Shihezi University (Natural Science)*, 2024, 42(6): 742-749.
- [ 25 ] 丁梦梦, 高沿航. IL-17 信号通路在酒精相关性肝癌发生、发展中的作用 [J]. *肝脏*, 2020, 25(6): 562-564.  
DING M M, GAO Y H. Role of IL-17 signaling pathway in the development and progression of alcohol-related

- hepatocellular carcinoma [J]. *Chinese Hepatology*, 2020, 25(6): 562-564.
- [26] SANTINI D, ADDEO R, VINCENZI B, et al. Exploring the efficacy and safety of single-agent sorafenib in a cohort of Italian patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 2012, 12(10): 1283-1288.
- [27] CHANG C P, YANG M C, LEI H Y. Concanavalin A/IFN-gamma triggers autophagy-related necrotic hepatocyte death through IRGM1-mediated lysosomal membrane disruption [J]. *Plos One*, 2011, 6(12): e28323.
- [28] SMYTH M J, CROWE N Y, HAYAKAWA Y, et al. NKT cells — conductors of tumor immunity [J]. *Current Opinion in Immunology*, 2002, 14(2): 165-171.
- [29] SMYTH M J, WALLACE M E, NUTT S L, et al. Sequential activation of NKT cells and NK cells provides effective innate immunotherapy of cancer [J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2005, 201(12): 1973-1985.
- [30] 隋明昊, 王敏, 李崇辉, 等. 靶向乙型肝炎表面抗原嵌合抗原受体 T 细胞对肝细胞癌杀伤作用的研究 [J]. *中华肝胆外科杂志*, 2022, 28(1): 51-55.
- SUI M H, WANG Y, LI C H, et al. Study on killing effect of HBsAg specific CAR-T cells on hepatocellular carcinoma [J]. *Chinese Journal of Hepatobiliary Surgery*, 2022, 28(1): 51-55.
- [31] HUI-WEN X U, CAO J P, ZHENG K Y, et al. Advances on the infection of parasites in treating inflammatory bowel diseases [J]. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 2017, 35(2): 173-179.
- [32] TANAKA A, SAKAGUCHI S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy [J]. *Cell Research*, 2017, 27(1): 109-118.
- [33] 于晓东, 亚力·亚森, 王佳玲, 等. BALB/c 小鼠感染细粒棘球蚴致敏模型的建立和相关免疫细胞变化的研究 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2020, 38(4): 412-416.
- YU X D, YALI Y, WANG J, et al. Establishment of BALB/c mouse model of *Echinococcus granulosus*-induced sensitization and changes of related immune cells [J]. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 2020, 38(4): 412-416.
- [34] KORN T, BETTELLI E, OUKKA M, et al. IL-17 and Th17 Cells [J]. *Annual Review of Immunology*, 2009 (27): 485-517.
- [35] 蔡克丰, 伍希雅, 崔杰, 等. 细粒棘球蚴原头蚴在体内外对小鼠肝癌影响的初步研究 [J]. *石河子大学学报(自然科学版)*, 2025, 43(4): 414-422.
- CAI K F, WU X Y, CUI J, et al. Preliminary study on the effects of *Echinococcus granulosus* protoscolex on mouse liver cancer in vitro and in vivo [J]. *Journal of Shihezi University (Natural Science)*, 2025, 43(4): 414-422.

(责任编辑:唐慧)