

华支睾吸虫成虫粗抗原及 ESP 促肝星状细胞活化效果比较

李佳, 蓝阳秋, 彭小红

(桂林医学院基础医学院, 桂林 541199)

摘要 **目的** 研究华支睾吸虫分泌排泄产物 (Cs.ESP) 及虫体粗抗原 (Cs.CA) 对小鼠原代肝星状细胞活化的影响。**方法** 分离小鼠原代肝星状细胞, 鉴定后进行体外培养。实验分组为 Cs.ESP 刺激组和 Cs.CA 刺激组, 同时设立空白对照组; 采用 RT-PCR 检测肝星状细胞活化指标 I 型胶原蛋白 (Collagen I)、 α -平滑肌肌动蛋白 (SMA) 的 mRNA 转录水平, 采用 Western blot 检测 Collagen I、 α -SMA 蛋白表达情况。**结果** Cs.ESP 刺激组较 Cs.CA 刺激组和空白对照组的 Collagen I、 α -SMA 的 mRNA 转录水平及蛋白表达水平均上调, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 Cs.CA 刺激组与空白对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** Cs.ESP 可促进体外培养的肝星状细胞活化, 而 Cs.CA 对其活化无明显作用, 为后续华支睾吸虫致肝纤维化的细胞分子机制研究提供参考。

关键词: 华支睾吸虫; 排泄分泌产物; 虫体粗抗原; 肝星状细胞

中图分类号: R383.2

文献标志码: A

文章编号: 1008-2409(2024)03-0063-06

Comparison of effects between adult crude antigen and ESP on hepatic stellate cells activation

LI Jia, LAN Yangqiu, PENG Xiaohong

(College of Basic Medicine, Guilin Medical University, Guilin 541199, China)

Abstract **Objective** To study the effect of excretory products of *Clonorchis sinensis* (Cs.ESP) and crude antigen of crude-antigen of *Clonorchis sinensis* (Cs.CA) on the activation of primary cultured hepatic stellate cells (HSCs) from mice. **Methods** The primary HSCs from mice were separated, identified and cultured *in vitro*. HSCs were divided into the Cs.ESP stimulation group, Cs.CA stimulation group, and a blank control group. The mRNA levels of Collagen I and α -smooth muscle actin (α -SMA), the activation indicators of HSCs were detected by RT-PCR, and the protein expressions of Collagen I and α -SMA were detected by Western blot. **Results** The mRNA and protein expression levels of Collagen I and α -SMA in

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82060376); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (202210601001)。

第一作者: 李佳, 硕士研究生, 研究方向为寄生虫感染与免疫。

通信作者: 彭小红, pxh815@163.com。

the Cs.ESP stimulation group were up-regulated compared with those in the Cs.CA stimulation group and blank control group, showing a statistically significant difference ($P < 0.05$). There was no significant difference in the mRNA and protein expression levels of Collagen I and α -SMA between Cs.CA stimulation group and blank control group ($P > 0.05$). **Conclusion** Cs.ESP promotes the activation of HSCs *in vitro*, while Cs.CA has no obvious effect on the activation of HSCs. This study provides a reference for further research on the cellular and molecular mechanisms of liver fibrosis induced by Cs.ESP.

Keywords: *Clonorchis sinensis*; excrete secretory products; crude-antigen of *Clonorchis sinensis*; hepatic stellate cells

华支睾吸虫病是由华支睾吸虫 (*Clonorchis sinensis*, *C. sinensis*) 寄生在人或动物的肝胆管中引起的一种食源性人兽共患寄生虫病, 主要流行于东亚和东南亚地区。据统计, 全球共有超过 1 500 万人感染, 而我国约有 1 300 万人^[1]。华支睾吸虫成虫主要寄生在宿主的肝胆管内, 长期慢性感染会导致胆管炎、胆汁淤积和进行性肝胆管纤维化, 最终可能导致肝硬化、肝癌和胆管癌^[2-3]。肝纤维化发生的主要原因是肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSC) 活化, 正常条件下静止 HSC 储存含有维生素 A 的脂滴并表达特定蛋白标记物, 如结蛋白和卵磷脂视黄醇酰基转移酶^[4]。当肝脏受到刺激损伤时, HSC 会被激活, 激活的 HSC 将逐渐分化为肌成纤维细胞, 这一过程中纤维化标志蛋白 (如 α -SMA、Collagen I、Collagen III 等) 表达上调^[5]。同时, HSC 会分泌大量细胞外基质 (extracellular matrix, ECM), 当肝脏组织中 ECM 过度沉积时便会形成肝纤维化^[6-7]。目前, 关于华支睾吸虫不同种类的抗原对 HSC 激活作用的研究大多是基于已建立的人 (包括 LX-2 和 TWNT-4)、小鼠 (包括 JS-1、GRX 和 Col-GFP)、大鼠 (包括 HSC-T6 和 CFSC) 的 HSC 永生细胞系^[8-10], 而对于原代细胞研究较少。细胞系在连续培养及多次传代后可能会导致基因型与表型发生变化, 从小鼠体内提取的原代细胞可更多地保留原始生物学特征, 而且在塑料培养皿上培养会自发活化, 可更好地模拟华支睾吸虫寄生肝胆管中对肝脏的影响。通过改良传统细胞提取方法可获得更多的细胞, 如使用链霉菌蛋白酶选择性地消化肝细胞, 并选用 Nycodenz 细胞分离液防止细胞成团。目前, 实验中用于刺激 HSC 活化的抗原大部分来源于生物信息学分析筛选后生物合成的

重组蛋白, 如华支睾吸虫 T2 核糖核酸酶^[11]、重组蛋白 CsHscB^[12]、溶血磷脂酶^[13]等, 而本研究刺激抗原是成虫新陈代谢过程中的分泌排泄产物, 这更加贴近宿主肝胆管中成分复杂的分泌排泄产物。该实验旨在为华支睾吸虫对 HSC 激活方面的机制研究提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

雌性 Balb/c 小鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司; DMEM 高糖培养基与胎牛血清均购自 Gibco 公司; 链霉菌蛋白酶、胶原酶 IV 均购自 Biosharp 公司; RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂均购自 merck 公司; GAPDH 单克隆兔抗、Collagen I 多克隆兔抗、 α -SMA 单克隆兔抗、山羊抗兔辣根过氧化物酶 (HRP) 标记二抗均购自 abclonal 公司。

1.2 方法

1.2.1 HSC 分离与培养 小鼠脱颈处死, 浸泡于酒精后, 打开腹腔暴露肝门静脉, 于肝门静脉入针灌注 EGTA 缓冲液, 待下腔静脉膨大后, 剪一小口作为流出道。随后, 灌注链霉菌蛋白酶溶液, 此灌注过程可观察到肝脏表面呈龟背样变化, 最后灌注胶原酶溶液。原位消化结束后, 将肝脏游离于玻璃皿中并撕碎置于装有消化液的离心管中, 振荡消化 20 min, 加入 GBSS/B 终止消化, 采用 70 μ m 细胞过滤器过滤收集滤液。将细胞滤液混合 Nycodenz 分离液后, 以 1 700 r/min 的速度离心 10 min。离心结束后, 吸取白膜层, 并采用含 20% 胎牛血清的培养基重悬该层细胞, 采用台盼蓝染色计数并计算细胞成活率。将

细胞接种于六孔板中,第 2 天换液成含 10%胎牛血清的培养基,之后隔天换液。

1.2.2 油红 O 染色 细胞弃去培养基后,采用 PBS 洗 2 次,加入 4%的多聚甲醛,固定 30 min 后,吸去上清液、水洗,采用 60%的异丙醇浸洗后,吸去上清液。加入油红 O 工作液于室温孵育 10 min,Mayer 苏木精染核 1 min,充分洗涤后,在显微镜下观察拍照。

1.2.3 结蛋白免疫荧光染色 采用 4%的多聚甲醛室温固定后,加入 0.5%的 Triton-X100 进行通透处理,随后采用 10%山羊血清室温封闭 1 h。结合一抗 4℃孵育过夜,PBS 冲洗后添加二抗 37℃避光孵育 1 h。DAPI 染色后,避光孵育 8 min,滴加抗荧光衰减封片剂后进行荧光检测。

1.3 制备华支睾吸虫分泌排泄产物和虫体粗抗原

①实验动物。收集感染华支睾吸虫 1 年的 SD 大鼠。②分泌排泄产物的制备。从 SD 大鼠胆管中获取成虫,使用含 1%青链霉素 PBS 洗涤后,置于 37℃恒温的 5% CO₂培养箱中 24 h。将培养液收集离心后,取上清液再次离心,采用 0.22 μm 无菌过滤器过滤上清液,测量蛋白浓度后,将 ESP 储存于 -80℃冰箱备用。③虫体粗抗原的制备。收集的成虫用含 1%青链霉素 PBS 洗涤后,超声裂解,离心后,取上清液再次离心,采用 0.22 μm 无菌过滤器过滤上清液,测量蛋白浓度后,将 CA 储存于 -80℃冰箱备用。

1.4 HSC 培养

将分离的 HSC 以 2.0×10⁵个/mL 接种于六孔培养板,置于 37℃恒温的 5% CO₂培养箱中。采用含 10%胎牛血清、1%双抗(100 U/mL 青霉素/链霉素)的 DMEM 高糖培养液培养。①分组干预方法:空白对照组(正常培养的 HSC)、ESP 组(加入 50 μg/mL ESP)、CA 组(加入 50 μg/mL CA)。②处理时间点:HSC 培养 36 h 后,采用不含血清的 DMEM 高糖培养液培养 12 h 后,吸去培养液,加入含终浓度为 50 μg/mL 刺激物的完全培养基,培养 48 h。

1.5 Western blot 检测

将收集的细胞做好标记,用 RIPA 裂解液充分裂

解后,提取总蛋白,用二辛可宁酸法测浓度后定量,于 100℃金属浴变性 10 min。蛋白上样后,进行 SDS-PAGE 电泳实验,待电泳实验结束后,用转膜仪将蛋白从胶转移至 PVDF 膜。使用 5%脱脂奶粉封闭液,于 37℃封闭 2 h 后,进行 TBST 洗涤。孵育小盒中分别加入已稀释的一抗(分别为 Collagen I、α-SMA、GAPDH),4℃孵育过夜。TBST 洗涤 3 次,HRP 标记的二抗(1:5 000)于室温孵育 1 h。TBST 洗涤 3 次后,使用发光液显影后曝光。采用 Image J 分析蛋白条带的灰度值,以目的灰度值/内参灰度值表示蛋白相对表达量。

1.6 RT-PCR 检测

细胞加入 trizol 试剂反复吹打,将裂解液转移到离心管中加入三氯甲烷。振荡静置后,在 4℃条件下,以 7 500 r/min 的速度离心 15 min,取上层水相以等比例加入异丙醇。室温静置 10 min 后,在 4℃条件下,以 7 500 r/min 的速度离心 10 min,加入 75%乙醇沉淀干燥后,加入无酶水。按照 merck 试剂盒逆转录说明书将 mRNA 逆转录为 cDNA,使用两步法进行 RT-PCR 检测 HSC Collagen I、α-SMA 的 mRNA 表达水平。以 β-actin 为内参,采用 2^{-ΔΔCt}法分析目的基因相对表达量。3 种基因的引物序列如表 1 所示。

表 1 3 种基因的引物序列

基因	引物序列
GAPDH	5'-GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3'
	5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'
Collagen I	5'-AGAGCCTGAGTCAGCAGATTG-3'
	5'-AGTAGACCTTGATGGCGTCC-3'
α-SMA	5'-TGCTGGACTCTGGAGATGGT-3'
	5'-ATCTCAGCTCGGCAGTAGT-3'

1.7 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0 进行统计分析与绘图,计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用单因素方差分析(ANOVA)检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

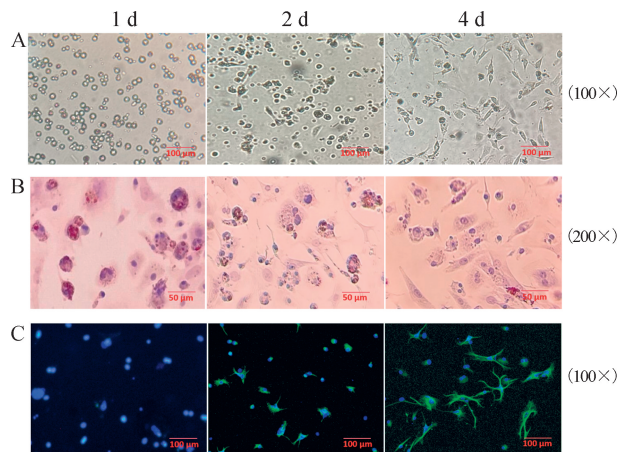
2 结果

2.1 HSC 细胞形态与染色情况

如图1A所示,分离的HSC成活率达95%,每只小鼠肝脏组织获得活细胞约为 2.4×10^6 个。分离的HSC呈圆形于4~5 h后贴壁;培养1 d后,细胞形状向扁圆形方向改变;培养2 d后,少量细胞开始伸展并伸出伪足,细胞体积增大;培养4 d后,大多数细胞呈现星形或梭形。

如图1B所示,经油红O染色后,可见细胞质中的脂滴呈橙红色,细胞核复染后呈蓝色。培养1 d时,可在大部分细胞胞浆中看到明显的串珠状橙红色颗粒,说明胞质脂滴含量丰富。随着培养时间延长,脂滴逐渐消失。

如图1C所示,经结蛋白免疫荧光染色后,可见细胞浆呈现绿色荧光,细胞核经DAPI复染后,呈现蓝色荧光。结蛋白主要表达于肝窦内活化的HSC的细胞浆内,培养4 d后,细胞完全表达结蛋白。



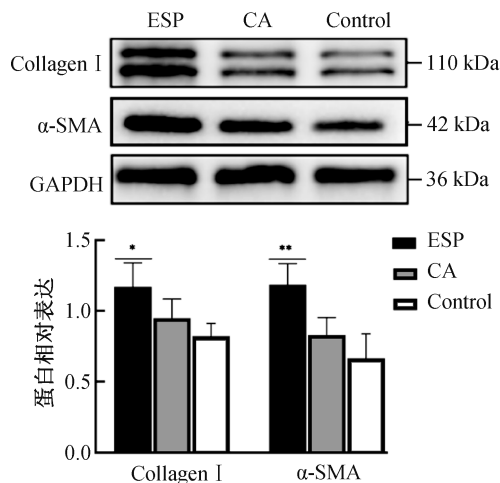
注:A.体外培养形态学观察;B.油红O染色;C.结蛋白免疫荧光染色。

图1 原代HSC形态与染色情况

2.2 Cs.ESP 加快HSC活化进程,提高相关纤维蛋白表达水平

HSC的激活是肝纤维化的主要诱因,为探讨Cs.ESP、Cs.CA对HSC活化进程的影响,本研究建立了体外共培养实验体系。Cs.ESP刺激后,HSC中

Collagen I、 α -SMA的蛋白表达水平升高,结果如图2所示。

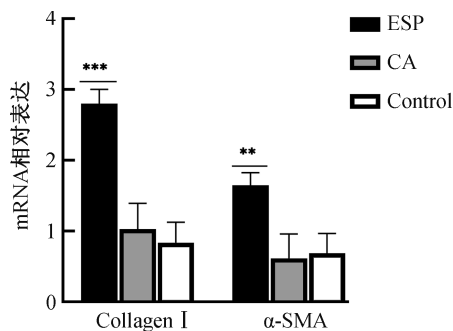


注:*表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$ 。

图2 Cs.ESP、Cs.CA对HSC中Collagen I、 α -SMA蛋白表达的影响

2.3 Cs.ESP 加快HSC活化进程,相关纤维蛋白mRNA转录水平升高

HSC中Collagen I、 α -SMA mRNA转录水平显著升高,结果如图3所示。此结果表明,Cs.ESP可以加快HSC活化进程,Cs.CA对HSC无明显激活作用。



注:**表示 $P < 0.01$,***表示 $P < 0.001$ 。

图3 Cs.ESP、Cs.CA对HSC中Collagen I、 α -SMA mRNA转录水平的影响

3 讨论

提取HSC的传统方法为下腔静脉固定留置针进行灌注,而本实验采取以肝门静脉为灌注入口、下腔静脉为出口的方式,并采用链霉蛋白酶以选择性消化HSC,可同步提高消化酶浓度,控制消化时

间。目前,实验常用的密度梯度介质有 Optiprep、Percoll 及 Nycodenz,其中 Percoll 易出现白色絮状物使细胞黏成团致细胞成活率不高。参考以往研究^[14],本实验选用 Nycodenz 作为密度梯度分离液,其具有黏滞度低、细胞损伤小、易于配置及保存的优点。因此,本实验改良了提取小鼠原代 HSC 的方法,所提取细胞具有获得率高、易存活的特点。

ESP 是由华支睾吸虫腺体分泌物、消化道排泄物等组成,主要成分包括与华支睾吸虫自身代谢相关的酶、蛋白等,存在于宿主肝胆管及整个血液循环系统中。ESP 会直接诱导机体免疫细胞分泌大量炎症因子,从而影响 Th1 和 Th2 免疫应答的相对平衡^[15]。过度的 Th2 细胞反应在循环促进组织修复的过程中也会促进纤维组织的重塑、胶原沉积,最终导致纤维化的形成^[16]。CA 是新鲜虫体用漩涡混合器打匀离心后收集到的上清液,其成分复杂,主要包括一些大分子的虫体表面蛋白和被膜蛋白等。CA 与 ESP 的差异在于蛋白分子质量的大小以及结合抗原提呈细胞膜表面受体的特异性不同^[17]。利用 ESP 和 CA 进行 ELISA 血清学试验在华支睾吸虫病的诊断中被广泛应用。有研究^[18]结果表明,采用 ESP 型抗原诊断的敏感性高于用 CA 检测的敏感性。也有研究^[19]结果表明,与 CA 相比,ESP 触发机体免疫的敏感性和特异性相对较高。有研究^[20-21]结果表明,分别用 ESP 和 CA 与人肝星状细胞共培养时,ESP 能激活 HSC 自噬能力,进而促进肝纤维化相关基因表达,证明 ESP 在华支睾吸虫感染致肝纤维化的发生中起重要作用。在 ESP 的作用下,胆管癌细胞会向体外构建的三维胆管板进行迁移,将胆管癌细胞与 HSC 共培养可增强癌细胞增殖和侵袭迁移的能力^[22]。在华支睾吸虫性肝纤维化的研究中发现,华支睾吸虫感染能够引起胆管增生、胆管炎及管周纤维化,严重时可导致肝硬化甚至胆管癌,而增生的胆管是通过分泌转化生长因子 $\beta 1$ 、血小板衍生因子 B、结缔组织生长因子、单核细胞趋化蛋白 1 等细胞因子趋化和激活 HSC,进而促进肝纤维化的发展^[23]。HSC 被激活后分化为肌成纤维细胞,在肝纤维化的发展过程中会产生大量的细胞外基质沉积和 I 型、III 型胶原蛋白的积累^[24-25]。本研究中,ESP 组

Collagen I 的蛋白和基因表达水平较 CA 组及对照组均增加,因新鲜分离的原代 HSC 在离体状态于塑料培养皿上培养时会自发活化,故对照组也有 Collagen I 的表达,此结果提示华支睾吸虫排泄分泌产物对 HSC 的活化有一定影响。

α -SMA 上调是活化 HSC 的分子标记^[26], α -SMA 在 HSC 静止期表达低,激活后会表达升高。本实验中,ESP 组 α -SMA 的蛋白表达水平较对照组高,而 CA 与对照组比较,差异无统计学意义。

4 结论

本研究证实了华支睾吸虫 ESP 会诱导原代 HSC 活化,进而导致由华支睾吸虫感染所致的肝纤维化,这一发现将为治疗华支睾吸虫感染所致肝纤维化提供新的依据。

参考文献

- [1] NA B K, PAK J H, HONG S J. *Clonorchis sinensis* and clonorchiasis[J]. Acta Trop, 2020,203:105309.
- [2] QIAN M B, ZHOU X N. *Clonorchis sinensis* [J]. Trends Parasitol, 2021,37(11):1014-1015.
- [3] KODA S, ZHU X Q, ZHENG K Y, et al. Molecular mechanisms of *Clonorchis sinensis*-host interactions and implications for vaccine development[J]. Front Cell Dev Biol, 2021,9:781768.
- [4] YANG W, HE H, WANG T T, et al. Single-cell transcriptomic analysis reveals a hepatic stellate cell-activation roadmap and myofibroblast origin during liver fibrosis in mice[J]. Hepatology, 2021,74(5):2774-2790.
- [5] LI B, YAN C, WU J, et al. *Clonorchis sinensis* ESPs enhance the activation of hepatic stellate cells by a cross-talk of TLR4 and TGF- β /Smads signaling pathway[J]. Acta Trop, 2020,205:105307.
- [6] ZHAO L, SHI M C, ZHOU L N, et al. *Clonorchis sinensis* adult-derived proteins elicit Th2 immune responses by regulating dendritic cells via mannose receptor[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2018,12(3):e0006251.
- [7] HIGASHI T, FRIEDMAN S L, HOSHIDA Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2017,121:27-42.
- [8] FAUSTHER M, GOREE J R, LAVOIE É G, et al. Estab-

- lishment and characterization of rat portal myofibroblast cell lines[J]. PLoS One, 2015,10(3):e0121161.
- [9] XU L, HUI A Y, ALBANIS E, et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis[J]. Gut, 2005, 54(1):142-151.
- [10] CHEN T J, YU J Y, TANG Z L, et al. Advanced enzymology, expression profile and immune response of *Clonorchis sinensis* hexokinase show its application potential for prevention and control of clonorchiasis[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2015,9(3):e0003641.
- [11] XU Y Q, LIN J S, BIAN M, et al. CsRNASET2 is an important component of *Clonorchis sinensis* responsible for eliciting Th2 immune response[J]. Parasitol Res, 2015, 114(6):2371-2379.
- [12] YAN C, FANG F, ZHANG Y Z, et al. Recombinant CsHscB of carcinogenic liver fluke *Clonorchis sinensis* induces IL-10 production by binding with TLR2[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2020,14(10):e0008643.
- [13] 侯珠秀,黄艳,余新炳.华支睾吸虫溶血磷脂酶对肝星状细胞体外作用的研究[J].热带医学杂志,2019,19(6):674-677,694.
- [14] SCHÖNENBERGER M J, KOVACS W J. Isolation of peroxisomes from mouse brain using a continuous nycodenz gradient:a comparison to the isolation of liver and kidney peroxisomes[J]. Methods Mol Biol, 2017,1595:13-26.
- [15] MCMANUS C M, MAIZELS R M. Regulatory T cells in parasite infections: susceptibility, specificity and specialisation[J]. Trends Parasitol, 2023,39(7):547-562.
- [16] CHUNG E, KIM Y J, LEE M R, et al. A 21.6 kDa tegumental protein of *Clonorchis sinensis* induces a Th1/Th2 mixed immune response in mice[J]. Immun Inflamm Dis, 2018,6(4):435-447.
- [17] ZHAO L, LI J, MO G, et al. Recombinant protein EBI₃ attenuates *Clonorchis sinensis*-induced liver fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation in mice[J]. Parasit Vectors, 2023,16(1):246.
- [18] CHOI M H, PARK I C, LI S Y, et al. Excretory-secretory antigen is better than crude antigen for the serodiagnosis of clonorchiasis by ELISA[J]. Korean J Parasitol, 2003, 41(1):35-39.
- [19] JU J W, JOO H N, LEE M R, et al. Identification of a serodiagnostic antigen, legumain, by immunoproteomic analysis of excretory-secretory products of *Clonorchis sinensis* adult worms[J]. Proteomics, 2009,9(11):3066-3078.
- [20] ZHENG B, GAO Z Y, LIANG L M, et al. Autophagy of hepatic stellate cell induced by *Clonorchis sinensis*[J]. Mol Biol Rep, 2022,49(3):1895-1902.
- [21] 陈文君,罗辉,尚梅.华支睾吸虫分泌排泄蛋白诱导宿主细胞自噬参与致病的分子机制[J].热带医学杂志, 2023,23(2):164-168.
- [22] MA X X, QIU Y Y, CHANG Z G, et al. Identification of myoferlin, a potential serodiagnostic antigen of clonorchiasis, via immunoproteomic analysis of sera from different infection periods and excretory-secretory products of *Clonorchis sinensis*[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11:779259.
- [23] 尤文铮,任万雷,宣世英,等.肝内胆管改变与肝纤维化的关系[J].临床肝胆病杂志,2022,38(1):187-190.
- [24] PUCHE J E, SAIMAN Y, FRIEDMAN S L. Hepatic stellate cells and liver fibrosis[J]. Compr Physiol, 2013, 3(4):1473-1492.
- [25] XIANG D J, ZOU J, ZHU X Y, et al. Physalin D attenuates hepatic stellate cell activation and liver fibrosis by blocking TGF- β /Smad and YAP signaling[J]. Phytomedicine, 2020,78:153294.
- [26] WANG J X, PENG W X, FENG J R, et al. Recombinant T2 RNase protein of *Schistosoma japonicum* inhibits expression of α -SMA in LX-2 cells[J]. Parasitol Res, 2016, 115(10):4055-4060.
- [收稿日期:2023-11-16]
- [责任编辑:郭海婷 英文编辑:李佳睿]