

DOI:10.13350/j.cjpb.230406

• 论著 •

MCP-1 介导单核细胞浸润在泡型包虫病 肝纤维化中的作用^{*}

闵宏悦^{1,2}, 田凤鸣¹, 张靖仪¹, 齐新伟³, 姜涛⁴, 李佳峻¹, 张雪³, 施宁¹, 刘玉梅^{5**}, 马秀敏^{1,2**}

(1. 新疆医科大学附属肿瘤医院临床检验中心, 省部共建中亚高发病成因与防治国家重点实验室, 新疆乌鲁木齐 830011;
2. 新疆医科大学基础医学院; 3. 新疆医科大学第一附属医院临床医学研究院省部共建中亚高发病成因与防治国家重点实验室;
4. 新疆医科大学动物实验中心; 5. 北京儿童医院新疆医院, 新疆维吾尔自治区儿童医院)

【摘要】 目的 探讨肝泡型包虫病肝组织中单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)表达水平与单核细胞来源巨噬细胞浸润程度、炎症及纤维化的相关性。方法 采用苏木素-伊红(H&E)染色和 Masson 染色评估病理炎症改变和纤维化程度, 采用免疫组织化学方法检测肝组织中 CD68⁺巨噬细胞和 MAC387⁺单核细胞来源的巨噬细胞浸润情况及 MCP-1 表达情况, 采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测肝脏组织中 MCP-1 的基因表达, 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测外周血中 MCP-1 水平, 并分析 MCP-1 与 MAC387⁺单核细胞来源巨噬细胞浸润的相关性, 以及与肝组织炎症和纤维化的关系。结果 H&E 染色显示, 与灶旁肝脏组织相比近端病灶组织肝小叶结构被破坏, 病变周围可见炎症细胞浸润。Masson 染色显示近端病灶组织门静脉区域纤维结缔组织增生, 肝小叶纤维化, 而灶旁肝脏组织未见明显病理改变。免疫组织化学检测显示, 与灶旁肝脏组织相比近端病灶组织中 CD68⁺巨噬细胞和 MAC387⁺单核细胞来源的巨噬细胞均显著增加(均 $P < 0.01$), 灶旁肝脏组织中 MCP-1 表达较少, 而近端病灶组织 MCP-1 高表达($P < 0.01$)。相关性分析显示, 肝脏组织中 MCP-1 的表达与 MAC387⁺单核细胞来源的巨噬细胞表达水平呈显著正相关($R = 0.814, P < 0.01$), 与肝脏炎症的严重程度呈正相关($R = 0.813, P < 0.01$), 与纤维化评分呈正相关($R = 0.719, P < 0.01$)。qRT-PCR 检测显示, 近端病灶组织中 MCP-1 mRNA 表达水平显著高于灶旁肝脏组织($P < 0.05$)。ELISA 检测显示, 与健康体检者相比肝泡型包病患者外周血中 MCP-1 水平显著升高($P < 0.01$)。结论 MCP-1 与肝泡型包虫病导致的肝脏炎症和纤维化程度呈正相关, 与 MAC387⁺单核细胞来源的巨噬细胞数量呈正相关, 提示 MCP-1 可能介导肝组织中单核细胞的浸润。因此推测 MCP-1 在肝泡型包病肝纤维化中具有重要作用。

【关键词】 肝泡型包虫; 巨噬细胞; MCP-1

【中图分类号】 R532.32

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)04-0400-06

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 Apr;18(4):400-405,410.]

Role of monocyte chemotactic protein 1-mediated monocyte infiltration in liver fibrosis of alveolar echinococcosis

MIN Hong-yue^{1,2}, TIAN Feng-ming¹, ZHANG Jing-yi¹, QI Xin-wei³, JIANG Tao⁴, LI Jia-jun¹, ZHANG Xue³, SHI Ning¹, LIU Yu-mei⁵, MA Xiu-min^{1,2} (1. State Key Laboratory of Pathogenesis, Prevention and Treatment of High Incidence Diseases in Central Asia, Clinical Laboratory Center, Tumor Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. School of Basic Medicine, Xinjiang Medical University; 3. State Key Laboratory of Pathogenesis, Prevention and Treatment of High Incidence Diseases in Central Asia, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University; 4. Animal Experiment Center, Xinjiang Medical University; 5. Beijing Children's Hospital Xinjiang Hospital, Xinjiang Uygur Autonomous Region Children's Hospital) **

【Abstract】 **Objective** To investigate the correlation between the expression level of monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) and the degree of monocyte-derived macrophage infiltration, inflammation and fibrosis in liver tissue from patients with hepatic alveolar echinococcosis (hepatic AE) disease. **Methods** In this study, liver tissue and blood samples were collected from 33 patients with hepatic AE at the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University. The liver tissue specimens were divided into proximal focal tissue and parafoveal liver tissue. HE and Masson staining were

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 82060372); 新疆维吾尔自治区科技支疆项目(No. 2020E0277); 省部共建中亚高发病成因与防治国家重点实验室开放课题项目(No. SKL-HIDCA-2020-YG3, SKL-HIDCA-2020-50, SKL-HIDCA-2021-5)。

** **【通讯作者】** 马秀敏, E-mail: maxiumin1210@sohu.com; 刘玉梅, E-mail: 49644958@qq.com

【作者简介】 闵宏悦(1993-), 女, 辽宁人, 在读研究生, 初级检验技师, 主要从事病原生物学研究。E-mail: 2026901621@qq.com

used to evaluate the pathological inflammatory changes and the degree of fibrosis; immunohistochemistry was used to detect the infiltration of CD68⁺ macrophages and MAC387⁺ monocyte-derived macrophages and MCP-1 expression. Total RNA was extracted from liver samples and cDNA was synthesised to detect MCP-1 gene expression by qRT-PCR. In addition, 33 healthy controls' blood samples were collected and MCP-1 levels were measured by ELISA. Spearman correlation was used to analyse the correlation between MCP-1 and MAC387⁺ monocyte-derived macrophage infiltration, as well as the relationship with inflammation and fibrosis in liver tissue. **Results** HE staining showed disruption of the proximal lobular structure and inflammatory cell infiltration around the lesion compared to the parafoveal liver tissue. Masson staining showed hyperplasia of fibrous connective tissue in the portal vein region and fibrosis of the lobules in the proximal lesion, while no significant pathological changes were seen in the parafoveal liver tissue. Immunohistochemistry showed that CD68⁺ macrophages (54.61±30.05) and MAC387⁺ monocyte-derived macrophages (109.94±32.58) were significantly increased in the proximal focal tissue compared to the parafoveal liver tissue (CD68⁺ macrophages (2.79±1.71) and MAC387⁺ monocyte-derived macrophages (3.64±2.83) (all $P<0.01$), and MCP-1 expression (0.48±0.71) was lower in parafoveal liver tissue, whereas MCP-1 was highly expressed in proximal focal tissue (7.48±3.58, $P<0.01$). Correlation analysis showed that MCP-1 expression in liver tissue was significantly and positively correlated with the expression level of MAC387⁺ monocyte-derived macrophages ($R=0.814$, $P<0.01$), with the severity of liver inflammation ($R=0.813$, $P<0.01$) and with fibrosis score ($R=0.719$, $P<0.01$). qRT-PCR showed significantly higher levels of MCP-1 mRNA expression in proximal focal tissue (19.52±24.87) compared to parafoveal liver tissue (2.88±5.59, $P<0.05$). ELISA showed significantly higher levels of MCP-1 in blood of patients with hepatic vesicle encapsulation compared to healthy subjects (39.70±10.53) (95.03±29.32, $P<0.01$). **Conclusion** MCP-1 was positively correlated with the degree of liver inflammation and fibrosis caused by hepatic AE, and with the number of MAC387⁺ monocyte-derived macrophages, suggesting that MCP-1 may mediate monocyte infiltration in liver tissue. Therefore, it is hypothesised that MCP-1 plays an important role in liver fibrosis in hepatic AE.

【Key words】 hepatic alveolar echinococcosis; macrophage; MCP-1

泡型包虫病(alveolar echinococcosis)是由多房棘球绦虫(*E. multilocularis*)幼虫期感染引起的一类人畜共患寄生虫病,以肝脏感染最为常见,其具有恶性程度高,预后差等特征^[1]。数据显示,未经治疗的肝泡型包虫病(HAE)患者10年死亡率可高达90%^[2]。HAE患者在确诊后15年内如果未经过规范治疗,其死亡率可超过90%^[3]。多房棘球绦虫作为一种外源性病原体,可在宿主体内长期存活,容易引发复杂的免疫反应^[4],而巨噬细胞在这一过程中发挥重要作用。

肝脏巨噬细胞包括常驻枯否细胞(Kupffer cell, KCs)和浸润性单核细胞来源的巨噬细胞,是肝纤维化的中枢调控因子。研究表明,在实验动物模型中肝巨噬细胞参与肝损伤和纤维化的进程^[5]。单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)是一种趋化因子,可与外周血^[6]中循环单核细胞膜上的趋化因子受体2(CCR2)结合,导致单核细胞被选择性的招募到肝损伤部位,启动并促进肝纤维化的进程^[5]。

在实验模型中,MCP-1或CCR2缺陷的小鼠肝纤维化程度减轻,抑制MCP-1可显著减少单核细胞向小鼠肝脏组织浸润,继而减轻肝脏炎症及肝纤维化程度^[7]。目前已有研究表明,肝脏组织中单核细胞来源的巨噬细胞在肝纤维化的发生发展中起重要作用。MCP-1是单核细胞浸润的重要细胞因子,但肝泡型包虫病中MCP-1介导的单核细胞浸润在肝纤维化中的

作用仍需进一步研究。

本研究旨在探讨HAE患者肝组织内MCP-1表达水平与单核细胞来源的巨噬细胞浸润的相关性,以及与肝组织炎症和纤维化的关系。

对象与方法

1 研究对象

新疆医科大学第一附属医院2020年6月至2022年3月收治的HAE患者33例,肝脏组织标本及血液标本。年龄19~57岁,平均年龄37岁。其中包括男性17例,女性16例。纳入标准:1)根据病史、临床表现、影像学及实验室检查确诊为HAE患者;2)手术前未接受过放疗及化疗等相关治疗。排除标准:有急性及慢性感染、恶性肿瘤、自身免疫性疾病、风湿性疾病、严重梗阻性黄疸、使用炎症抑制剂、囊型包虫病等寄生虫的患者^[8]。选取年龄匹配的同期健康体检者33例,其中男性17例,女性16例,年龄20~52岁,平均年龄38岁。

本研究经新疆医科大学伦理委员会批准,并获得所有参与者的书面知情同意。

2 标本采集

2.1 组织标本 收集患者术中肝脏组织标本,并将肝脏组织标本分为近端病灶组织(距离病灶中心<2 cm)和灶旁肝脏组织(距离病灶中心>2 cm)^[9]。部分

肝组织用4%甲醛固定,石蜡包埋^[10],连续切片(厚度3 μm)后进行H&E染色、Masson染色和免疫组织化学染色。另一部分肝脏组织在-80℃冰箱冷冻用于qRT-PCR检测。

2.2 血液标本 HAE患者及健康体检者各33例,于凌晨空腹采集静脉血3 ml,肝素钠抗凝,3 000 r/min(离心半径20.5 cm)离心10 min,取血浆保存于-20℃冰箱,用于酶联免疫吸附法(ELISA)检测。

3 肝组织病理学检查

3.1 H&E染色^[11] 将切片进行脱蜡后放入自来水清洗,随后进行苏木素(北京中杉金桥生物技术有限公司,北京,中国)染色3 min,自来水清洗,盐酸乙醇分化,再放入蒸馏水清洗后进行伊红染色1 min,蒸馏水清洗,脱水,透明并晾干,封片后在显微镜(Olympus BX43,日本)下拍照。参考HAE患者肝脏炎症变化的病理评分^[9](表1),由两人对HAE患者肝脏炎症病变严重程度进行评估,采用双盲法进行阅片及评分。

表1 泡型包虫肝组织炎症变化评分标准
Table 1 The scoring criteria of liver tissue inflammatory changes

胆汁淤积 Cholestasis	钙化 calcification	囊泡 个数 Number of vesicles	坏死液化 腔个数 Number of necrotic liquefactive cavities	炎症细胞 浸润情况 Condition of inflammatory cell infiltration	分数 Scores
	可见钙化区	≥ 16	≥ 10	融合病灶浸润	4
	融合性钙化	11~15	7~9	4个以上病灶浸润	3
+	不规则钙化	6~10	4~6	2~4个病灶浸润	2
	点状钙化	1~5	1~3	单病灶浸润	1
-	无明显变化	0	0	无明显变化	0

表2 免疫组化抗体生产厂家及稀释倍数
Table 2 Antibodies used for immunohistochemistry

抗体 Antibody	稀释倍数 Dilution ratio	生产公司 Company
Anti-CD68 Antibody	1:2000	Abcam, Cambridge, UK
MAC387	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
MCP-1	1:1500	Abcam, Cambridge, UK

表3 PCR引物名称及其序列
Table 3 PCR primer sequence

基因类型 Gene type	引物序列 Primer sequence
MCP-1	F:CTCGTCAGCCAGATGCAAT R:TTGGGTTTGCTGTCCAGGT
GAPDH	F:GGCAAATTCATGGCACCCT R:TGGACTCCACGACGTACTCA

3.2 Masson染色 切片脱蜡后滴加Masson复合染色液5 min,蒸馏水清洗;滴加磷钼酸染色液5 min后滴加苯胺蓝,蒸馏水清洗;滴加分化液30 s,用蒸馏水清洗后进行脱水、透明,晾干后封片^[12],在显微镜下观察并拍照(OLYMPUS BX43),然后对切片进行纤维

化评分^[13]。0分:无纤维化;1分:纤维结缔组织仅局限于门静脉区域;2分:纤维化结缔组织不局限于门静脉区域,小部分蔓延到肝小叶;3分:纤维化结缔组织进入肝小叶中央静脉;4分:假小叶形成,病变甚至发展为肝硬化。

4 巨噬细胞浸润情况及MCP-1的表达

取石蜡包埋的组织切片常规脱蜡,蒸馏水冲洗;将切片放入EDTA抗原修复液中,置微波炉中修复15 min^[14];切片覆盖相应一抗,4℃孵育过夜,第2 d复温至室温,用PBS缓冲液清洗;加入相应二抗,37℃孵育45 min,用PBS缓冲液清洗;加入DAB显色进行显色,在显微镜下观察显色程度,分析肝组织中CD68⁺巨噬细胞和MAC387⁺单核细胞来源的巨噬细胞浸润情况及MCP-1表达情况

5 qRT-PCR检测肝脏MCP-1 mRNA表达水平

用Trizol提取冻存的肝脏标本总RNA。使用Primer Script RT试剂盒(Takara Bio大连公司)合成cDNA。GAPDH、MCP-1基因引物由生工生物技术(上海)公司合成,qRT-PCR检测肝脏MCP-1 mRNA表达水平。qRT-PCR在QuantStudio™ 6 Flex系统上运行。反应条件:95℃预变性30 s;95℃变性5 s,60℃退火及延伸34 s,共40个循环。利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对目标基因进行分析^[15]。

6 ELISA检测血清MCP-1水平

使用ELISA试剂盒(美国Bim公司)检测HAE患者及健康体检者血浆中MCP-1表达水平,按照试剂盒说明操作。

7 统计学分析

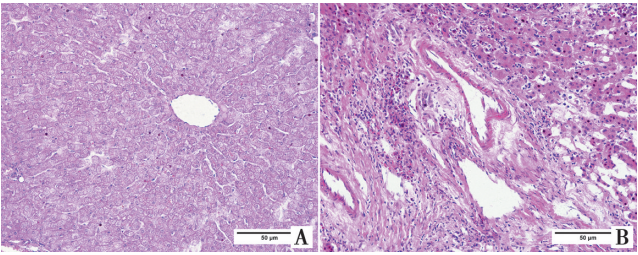
采用SPSS 22.0软件对实验数据进行统计分析。数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用Mann-Whitney U检验。非正态分布的数据采用Spearman相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

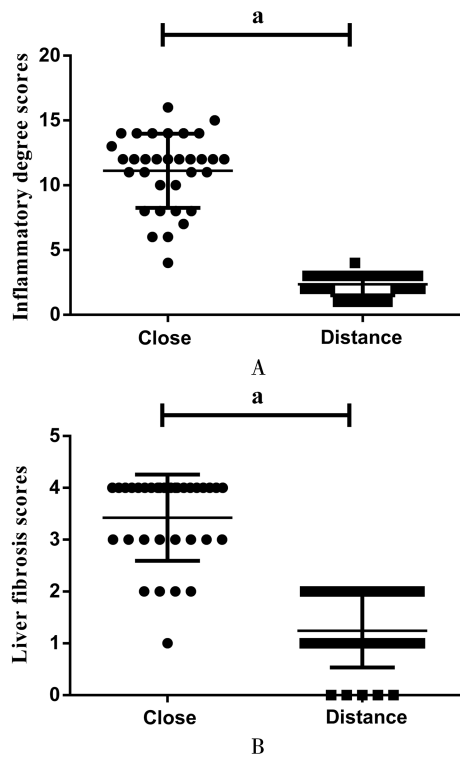
1 HAE患者肝组织病理学变化

H&E染色后观察HAE患者肝脏的病理组织变化,结果显示近端病灶组织肝小叶结构被破坏,细胞中出现水肿,细胞质疏松,肝中央静脉周围有大量炎性细胞浸润(图1B)。灶旁肝脏组织显示肝小叶结构正常,肝细胞围绕在中央静脉周围呈放射状排列,肝窦结构清晰,无病理改变(图1A)。

近端病灶组织炎症病变评分高于灶旁肝脏组织(图2A),提示近端病灶组织损伤程度更为严重,可能与人体感染泡球蚴后破坏和取代肝实质,持续诱导炎性细胞浸润,导致肝脏组织局部病变相关。肝组织炎性病变评分见表1。



A 灶旁肝脏组织 B 近端病灶组织。
图 1 肝 AE 患者肝脏组织 HE 染色结果 (200×)
A HE staining results of Distance B HE staining results of Cloce
Fig. 1 HE staining results of liver tissue in patients with liver AE (200×)



注:Close 为近端病灶组织;Distance 为灶旁肝脏组织(a 组间比较, $P<0.01$)。

图 2 肝组织炎症变化评分(A)与肝组织纤维化分级评分(B)
Notes:Close; proximal focal tissue;Distance; parafoal liver tissue (comparison between groups a, $P<0.01$)

Fig. 2 Scoring of inflammatory changes in hepatic tissue (A) and Liver tissue fibrosis grade score (B)

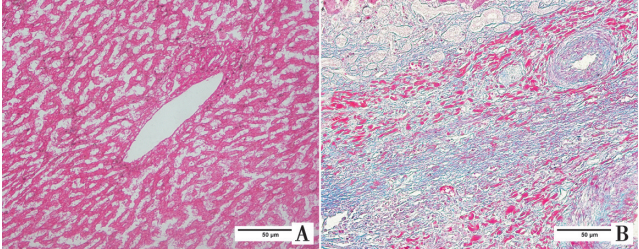
2 HAE 患者肝纤维化程度

Masson 染色观察 HAE 患者肝脏组织纤维化程度,结果显示灶旁肝脏组织很少或无胶原纤维组织,门静脉区域无炎症细胞浸润。而近端病灶组织肝小叶正常结构消失,肝组织大量纤维结缔组织增生形成纤维间隔,增生的纤维间隔分割肝小叶形成假小叶(图 3)。肝纤维化评分见图 2B。

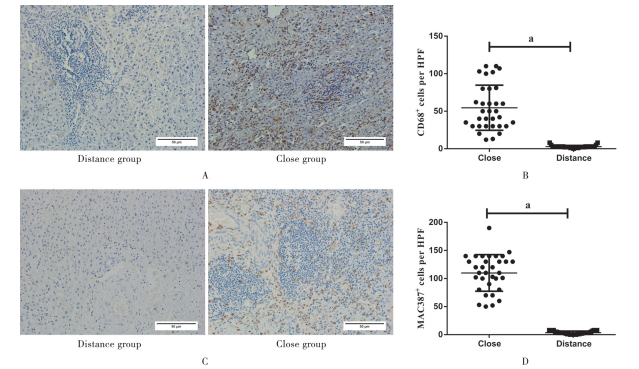
3 HAE 患者肝组织巨噬细胞浸润情况

免疫组织化学检测显示,HAE 患者灶旁肝脏组织内仅有少量的 CD68⁺巨噬细胞表达,而近端病灶组

织汇管区内则有大量 CD68⁺巨噬细胞表达($P<0.01$)(图 4A,B)。在近端病灶组织内可见大量 MAC387⁺单核细胞来源的巨噬细胞表达,而灶旁肝脏组织中 MAC387⁺单核细胞来源的巨噬细胞表达量则明显下降($P<0.01$)(图 4C,D)。



A 灶旁肝脏组织(Distance) B 近端病灶组织(Close)
图 3 Masson 染色检查 AE 患者肝组织纤维化程度 (200×)
A Masson staining results of Distance B Masson staining results of Cloce
Fig. 3 Observation on the degree of liver tissue fibrosis (Masson staining, 200×)



A CD68⁺免疫组化染色 B CD68⁺巨噬细胞在近端病灶组织及灶旁肝脏组织中的表达比较 C MAC387⁺免疫组化染色 D MAC387⁺单核细胞来源的巨噬细胞在近端病灶组织及灶旁肝脏组织中的表达比较(a 组间比较, $P<0.01$)

图 4 免疫组化检查 AE 患者近端病灶组织(Close)和灶旁肝脏组织(Distance)CD68 和 MAC387 的表达 (200×)

A CD68⁺ immunohistochemical staining B Comparison of CD68⁺ macrophage expression in Close and Distance C MAC387⁺ immunohistochemical staining D Comparison of MAC387⁺ monocyte derived macrophages expression in Close and Distance(a $P<0.01$)

Fig. 4 Theexpressions of CD68 and MAC387 in liver tissue were detected by immunohistochemistry(200×)

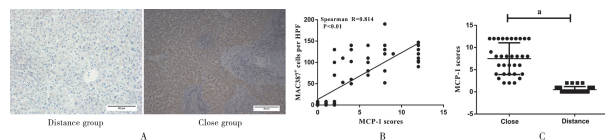
4 MCP-1 的表达及其与 MAC387⁺单核细胞来源巨噬细胞浸润的相关性

MCP-1 在灶旁肝脏组织几乎无表达或可见少量表达,但在近端病灶组织内 MCP-1 表达水平显著高于灶旁肝脏组织,且着色较深($P<0.01$)(图 5A,B)。对 HAE 患者肝组织内 MCP-1 评分与 MAC387⁺单核细胞来源巨噬细胞浸润进行相关性分析,结果如图 5C,两者呈显著正相关($R=0.814,P<0.01$)。

5 MCP-1 表达水平与肝组织炎症及纤维化的关系

对 HAE 患者肝组织内 MCP-1 表达水平与炎症

变化的病理评分和纤维化分期评分进行相关性分析。结果显示, HAE 患者肝组织内 MCP-1 评分与肝脏炎性病变的严重程度呈正相关($R=0.813, P<0.01$) (图 6A), 与纤维化分期评分呈正相关($R=0.719, P<0.01$) (图 6B)。

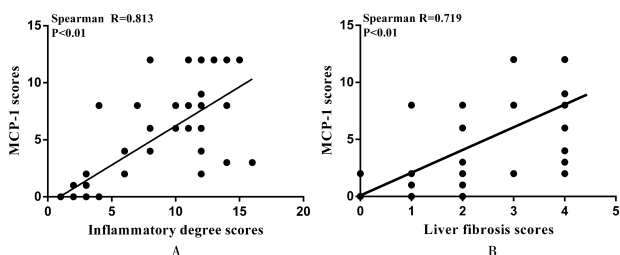


A MCP-1 免疫组化染色 B MCP-1 染色评分(a 组间比较, $P<0.01$) C MAC387⁺ 单核细胞来源的巨噬细胞与 MCP-1 评分的相关性

图 5 免疫组化检查 AE 患者近端病灶组织(Close)和灶旁肝脏组织(Distance) MCP-1 的表达水平(200×)

A MCP-1 immunohistochemistry staining B MCP-1 staining scores(a $P<0.01$) C Correlation between MAC387⁺ monocyte derived macrophages and MCP-1 score

Fig. 5 The expression level of MCP-1 in liver tissue detected by immunohistochemistry (200×)



A MCP-1 表达水平与肝脏炎症的相关性 B MCP-1 表达水平与肝脏纤维化的相关性

图 6 肝组织中 MCP-1 表达水平与肝脏炎症和纤维化的相关性

A Correlation between MCP-1 expression and liver inflammation B Correlation between MCP-1 expression level and hepatic fibrosis

Fig. 6 Correlation between MCP-1 expression in liver tissue and liver inflammation and fibrosis

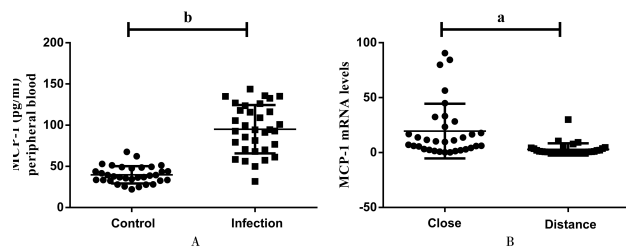
6 HAE 患者肝组织及血浆中 MCP-1 水平的变化

ELISA 检测血浆 MCP-1 水平, 结果如图 7A。HAE 患者血浆 MCP-1 水平与健康体检者相比显著升高($P<0.01$)。应用 qRT-PCR 检测 MCP-1 mRNA 表达水平, 结果如图 7B。近端病灶组织 MCP-1 mRNA 表达水平显著高于灶旁肝脏组织($P<0.05$)。

讨论

泡型包虫病的病理特征为纤维化、坏死^[16]。多房棘球蚴感染引起肝脏局部病理改变, 表现为增生、萎缩、变性、坏死和肝纤维化^[17]。早期肝纤维化可以逆转, 胶原蛋白可以限制蠕虫的扩张, 并修复受损的肝组织。中、晚期的纤维化病情开始恶化, 达到不可逆的水平, 从而进一步发展为肝硬化和肝癌^[9]。目前, 常规手术治疗无法达到根治的目的。因此, 及时给予抗纤维化治疗是延缓疾病进展的重要措施。本研究观察了 HAE 患者肝脏的组织病理学变化, 显示肝脏组织出

现了炎症细胞浸润和坏死等病理特征, 并出现了不同程度的纤维化, 提示多房棘球蚴感染可能导致 HAE 患者的肝脏组织出现病理损伤并伴有不同程度的肝纤维化。



A AE 患者与正常体检者外周血 MCP-1 表达水平的比较 B 近端病灶组织(Close)与灶旁肝脏组织(Distance)中 MCP-1 表达水平的比较(组间比较, ^a $P<0.05$; ^b $P<0.01$)

图 7 AE 患者外周血及肝脏中 MCP-1 表达水平的变化

A Comparison of MCP-1 expression levels in peripheral blood between patients with hepatic AE and normal physical examination patients B Comparison of MCP-1 expression levels in liver between Distance and Close(^a $P<0.05$; ^b $P<0.01$)

Fig. 7 Level changes of MCP-1 expression in peripheral blood and liver

大量关于寄生虫或病毒感染的研究表明, 巨噬细胞参与肝脏炎症和纤维化的进程, 因此在调控肝脏疾病的发病机制中发挥着关键作用^[18-20]。CD68 是一种高特异性的巨噬细胞表面标志物^[21]。本研究检测了 HAE 患者肝脏组织中 CD68⁺ 巨噬细胞浸润情况, 结果显示近端病灶组织内 CD68⁺ 巨噬细胞表达明显增加。提示肝脏组织中的巨噬细胞参与了肝纤维化及肝损伤的进程。正常情况下肝脏组织中的巨噬细胞一部分来自于固有巨噬细胞, 而另一部分则来自于循环来源的单核细胞, 然而在炎症状态下大量单核细胞浸润到肝脏组织, 进而演变为巨噬细胞^[22]。

Triantafyllou 等^[23]报道对乙酰氨基酚诱导的肝损伤小鼠肝脏巨噬细胞的数量显著增加, 这一现象主要是因为大量单核细胞来源的巨噬细胞募集, 而不是驻留的巨噬细胞增殖。Ju 等^[24]报道在 CCL4 诱导的肝纤维化小鼠模型中, 单核细胞的浸润导致肝脏巨噬细胞数量扩张 3-5 倍。这些浸润的单核细胞会演变成巨噬细胞, 参与肝损伤和纤维化的进程。MAC387 是一种胞质内的蛋白质, 通常用作单核细胞源性巨噬细胞的标记物, 在单核细胞源性巨噬细胞分化的早期表达, 能够区分来源于循环的浸润性巨噬细胞与肝组织驻留巨噬细胞^[25]。在本研究中观察到 HAE 患者近端病灶组织内 MAC387⁺ 单核细胞来源的巨噬细胞表达显著增多。提示单核细胞来源的巨噬细胞可能参与肝脏的炎症和纤维化。

有研究显示, 炎症状态下从外周血迁移至肝脏的单核细胞参与了肝纤维化的进程, 而这些炎性浸润的单核细胞向肝脏组织的募集主要受趋化因子(MCP-1)

的调控^[26]。在肝损伤时,肝脏巨噬细胞活化明显增加,分泌大量的 MCP-1^[22],而 MCP-1 可以与外周血中的循环单核细胞表面受体 CCR2 结合^[6],导致单核细胞被选择性地大量募集至肝脏损伤部位,激活 Kupffer 细胞和 HSC,启动并促进纤维化的进程。Schrammen 等^[26]的研究表明,与对照组相比 CCL2 缺陷的小鼠模型中肝脏单核细胞数量减少,肝纤维化的程度亦减轻。因此,抑制 CCL2-CCR2 信号通路,减少单核细胞浸润数量,可能达到抗纤维化作用。提示在肝损伤和肝纤维化过程中 MCP-1 介导单核细胞浸润,进而参与肝损伤和肝纤维化的进程。本研究结果表明 HAE 患者近端病灶组织内 MCP-1 表达水平较灶旁肝脏组织显著增多,且与肝脏炎症和纤维化程度相关。提示, MCP-1 可能参与肝脏的炎症和纤维化。进一步相关性分析发现 HAE 患者 MCP-1 染色评分与 MAC387⁺单核细胞来源的巨噬细胞数量呈显著正相关,表明 MCP-1 可能介导 MAC387⁺单核细胞来源的巨噬细胞浸润到肝脏并参与 HAE 患者肝损伤和纤维化。

在正常情况下,人体血液中的 MCP-1 几乎检测不到,即使能够检测,其含量也极其低微。但是,一旦当机体受到感染,其血液中的含量就会显著升高^[27]。本研究结果表明,与健康体检患者相比 HAE 患者外周血中 MCP-1 表达水平显著增高,且肝脏组织免疫组化染色、qRT-PCR 检测亦显示 HAE 患者肝脏组织 MCP-1 表达水平升高,提示 MCP-1 在肝泡性包虫病肝纤维化中具有重要作用。

综上所述, MCP-1 染色评分与 HAE 导致肝脏的炎症及纤维化程度相关。MCP-1 染色评分与 MAC387⁺单核细胞来源的巨噬细胞数呈显著正相关,提示 MCP-1 可能介导肝组织中单核细胞的浸润,在 HAE 肝纤维化中具有重要作用。

【参考文献】

- [1] Thomas MN, Zwingelberg S, Angele M, et al. Diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis [J]. MMW Fortschr Med, 2017, 159(14):38-42.
- [2] Peters L, Burkert S, Gruner B. Parasites of the liver-epidemiology, diagnosis and clinical management in the European context[J]. J Hepatol, 2021, 75(1):202-218.
- [3] Ma L, Chen DC, Zou SY, et al. Epidemiological characteristics of hepatic echinococcosis, concurrent cerebral echinococcosis, and pulmonary echinococcosis in Ganzi County, Sichuan Province, China[J]. Medicine (Baltimore), 2020, 99(15):e19753.
- [4] Weiss AT, Bauer C, Kohler K. Canine alveolar echinococcosis: morphology and inflammatory response [J]. J Comp Pathol, 2010, 143(4):233-238.
- [5] Huang R, Wu H, Liu Y, et al. Increase of infiltrating monocytes in the livers of patients with chronic liver diseases[J]. Discov Med, 2016, 21(113):25-33.
- [6] Elsegood CL, Chan CW, Degli-Esposti MA, et al. Kupffer cell-monocyte communication is essential for initiating murine liver progenitor cell-mediated liver regeneration [J]. Hepatology, 2015, 62(4):1272-1284.
- [7] Baeck C, Wei X, Bartneck M, et al. Pharmacological inhibition of the chemokine C-C motif chemokine ligand 2 (monocyte chemoattractant protein 1) accelerates liver fibrosis regression by suppressing Ly-6C(+) macrophage infiltration in mice [J]. Hepatology, 2014, 59(3):1060-1072.
- [8] Kern P, Wen H, Sato N, et al. WHO classification of alveolar echinococcosis: principles and application [J]. Parasitol Int, 2006, 55(Suppl):S283-S287.
- [9] Liu Y, Tian F, Shan J, et al. Kupffer Cells: Important participant of hepatic alveolar echinococcosis [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020(10):8.
- [10] Lu X, Xuan W, Li J, et al. AMPK protects against alcohol-induced liver injury through UQCRC2 to up-regulate mitophagy [J]. Autophagy, 2021, 17(11):3622-3643.
- [11] Zhou L, Wang QL, Mao LH, et al. Hepatocyte-specific knock-out of Nfib aggravates hepatocellular tumorigenesis via enhancing urea cycle[J]. Front Mol Biosci, 2022(9):875324.
- [12] Li B, Liu YM, Yan Y, et al. Effect of different types of macrophages on hepatic fibrosis in *Echinococcus granulosus* mice[J]. Biomed Pharmacother, 2019(117):109178.
- [13] Zhang CY, Yuan WG, He P, et al. Liver fibrosis and hepatic stellate cells: Etiology, pathological hallmarks and therapeutic targets[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(48):10512-10522.
- [14] Kerbert AJC, Gupta S, Alabsawy E, et al. Biomarkers of extracellular matrix formation are associated with acute-on-chronic liver failure[J]. JHEP Rep, 2021, 3(6):100355.
- [15] Lin J, Dai Y, Sang C, et al. Multimodule characterization of immune subgroups in intrahepatic cholangiocarcinoma reveals distinct therapeutic vulnerabilities[J]. J Immunother Cancer, 2022, 10(7):e004892.
- [16] Vuitton DA, Gottstein B. *Echinococcus multilocularis* and its intermediate host: a model of parasite-host interplay [J]. J Biomed Biotechnol, 2010(2010):923193.
- [17] Bi X, Yang N, Ke Y, et al. An improved experimental method for simultaneously isolating hepatocytes and hepatic stellate cells in mouse liver infected with *Echinococcus multilocularis* [J]. J Clin Lab Anal, 2021, 35(12):e24084.
- [18] Guillot A, Tacke F. Liver Macrophages: Old dogmas and new insights[J]. Hepatol Commun, 2019, 3(6):730-743.
- [19] Dou L, Shi X, He X, et al. Macrophage phenotype and function in liver disorder[J]. Front Immunol, 2020(10):3112.
- [20] Zhang Y, Mei X, Liang Y, et al. Newly excysted juveniles (NEJs) of *Fasciola gigantica* induce mice liver fibrosis and M2 macrophage-like phenotype in vivo [J]. Microb Pathog, 2020(139):103909.
- [21] Fisher BS, Green RR, Brown RR, et al. Liver macrophage-associated inflammation correlates with SIV burden and is substantially reduced following cART [J]. PLoS Pathog, 2018, 14(2):e1006871.

- Chirurgia(Bucur),2019,114(4):522-527.
- [3] Ocak S, Poyanli A, Gulluoglu M, et al. Dramatic response to albendazole in transplantation candidates with unresectable hepatic alveolar hydatid disease[J]. Clin Case Rep, 2021, 9(8): e04666.
- [4] Wei J, Liu R, Hu X, et al. MAPK signaling pathway-targeted marine compounds in cancer therapy[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2021, 147(1): 3-22.
- [5] Iroegbu JD, Ijomone OK, Femi-Akinlosotu OM, et al. ERK/ MAPK signalling in the developing brain: Perturbations and consequences[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2021(131): 792-805.
- [6] 刘新兰, 厚玉瑾, 吕燕, 等. 甲磺酸阿帕替尼通过 Erk1/2 信号通路抑制乳腺癌细胞增殖机制研究[J]. 临床肿瘤学杂志, 2021, 26(6): 481-487.
- [7] Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(8): 537-549.
- [8] Pua LJW, Mai CW, Chung FF, et al. Functional roles of JNK and p38 MAPK signaling in nasopharyngeal carcinoma[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(3): 1108.
- [9] Lin RY, Wang JH, Lu XM, et al. Components of the mitogen-activated protein kinase cascade are activated in hepatic cells by *Echinococcus multilocularis* metacestode [J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(17): 2116-2124.
- [10] 李朝旺. 细粒棘球蚴囊液对宿主肝细胞 MAPK 信号通路及细胞周期的影响[D]. 新疆医科大学, 2012.
- [11] Zhao Y, Gui W, Niu F, et al. The MAPK signaling pathways as a novel way in regulation and treatment of parasitic diseases[J]. Diseases, 2019, 7(1): 9.
- [12] Yin Z, Feng W, Chen C, et al. Shedding light on autophagy coordinating with cell wall integrity signaling to govern pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*[J]. Autophagy, 2020, 16(5): 900-916.
- [13] Jaenen V, Fraguas S, Bijmens K, et al. Reactive oxygen species rescue regeneration after silencing the MAPK-ERK signaling pathway in *Schmidtea mediterranea*[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 881.
- [14] Zhang C, Li J, Aji T, et al. Identification of functional MKK3/6 and MEK1/2 homologs from *Echinococcus granulosus* and investigation of protoscolecid activity of mitogen-activated protein kinase signaling pathway inhibitors *in vitro* and *in vivo* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2018, 63(1): e01043-18.
- [15] Yu Y, Li J, Wang W, et al. Transcriptome analysis uncovers the key pathways and candidate genes related to the treatment of *Echinococcus granulosus* protoscoleces with the repurposed drug pyronaridine[J]. BMC Genomics, 2021, 22(1): 534.
- [16] 王禅. p38MAPK 抑制剂肝动脉灌注对大鼠肝包虫病的治疗作用[D]. 青海: 青海大学, 2019.
- [17] Lv H, Li S, Zhang J, et al. *In vitro* effects of SB202190 on *Echinococcus granulosus*[J]. Korean J Parasitol, 2013, 51(2): 255-258.
- [18] 颜明智, 李锦田, 刘辉, 等. 细粒棘球绦虫腺苷酸活化蛋白激酶 AMPK α 生物信息学分析[J]. 新疆医科大学学报, 2021, 44(3): 266-273.
- [19] 颜明智, 库尔班尼沙·阿马洪, 周婧, 等. 细粒棘球绦虫腺苷酸活化蛋白激酶 AMPK β 基因克隆及生物信息学分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2022, 17(1): 65-70.
- [20] 张小凡, 巩文词, 曹胜魁, 等. 细粒棘球绦虫感染小鼠肝脏髓源抑制性细胞与调节性 T 细胞比例动态变化[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2019, 31(6): 622-627.
- [21] 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.
- [22] 代国栋, 闫鸿斌, 李立, 等. 人兽共患寄生虫病候选疫苗分子筛选方法研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(6): 2177-2187.

【收稿日期】 2022-11-20 【修回日期】 2023-02-08

(上接 405 页)

- [22] Tacke F, Zimmermann HW. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis[J]. J Hepatol, 2014, 60(5): 1090-1096.
- [23] Triantafyllou E, Woollard KJ, McPhail MJW, et al. The role of monocytes and macrophages in acute and acute-on-chronic liver failure[J]. Front Immunol, 2018(9): 2948.
- [24] Ju C, Tacke F. Hepatic macrophages in homeostasis and liver diseases: from pathogenesis to novel therapeutic strategies[J]. Cell Mol Immunol, 2016, 13(3): 316-327.
- [25] Antoniadou CG, Quaglia A, Taams LS, et al. Source and characterization of hepatic macrophages in acetaminophen-induced acute liver failure in humans[J]. Hepatology, 2012, 56(2): 735-746.
- [26] Schrammen PL, Bartneck M, Mockel D, et al. CCL2-dependent monocyte recruitment contributes to a tumor-promoting microenvironment in a combined fibrosis-HCC model[J]. J Hepatol, 2017, 66(1): S633.
- [27] 周洪, 江峰锦, 徐荣, 等. 血糖控制对高血糖危象患者外周血 MCP-1 水平的影响[J]. 中国老年学杂志, 2014(10): 2663-2665.

【收稿日期】 2022-11-06 【修回日期】 2023-01-19