

DOI:10.13350/j.cjpb.250211

• 论著 •

# 华支睾吸虫 ESP 刺激胆管上皮细胞产生 IL-17A 促进肝纤维化的机制研究\*

刘桐彤<sup>1</sup>, 朱浩<sup>1</sup>, 王楠<sup>1</sup>, 王新月<sup>1</sup>, 胡凤爱<sup>1</sup>, 曹璋<sup>2</sup>, 高洪莲<sup>1</sup>, 刘乃国<sup>1</sup>, 柏雪莲<sup>1\*\*</sup>

(1. 滨州医学院附属医院医学研究中心, 山东滨州 256603; 2. 滨州医学院附属医院病理科)

**【摘要】** **目的** 探讨华支睾吸虫感染刺激胆管上皮细胞产生 IL-17A 激活 HSC 导致肝纤维化的机制。 **方法** 从流行区获取华支睾吸虫感染的患者血清, ELISA 法检测 IL-17A 的表达。人工消化麦穗鱼, 分离华支睾吸虫囊蚴, 分别灌胃感染新西兰大白兔和 BALB/c 小鼠, 无菌分离小鼠肝脏和血清。ELISA 法、Western blot 和免疫组化法检测小鼠血清和肝脏中 IL-17A 的表达; ESP 刺激人胆管癌细胞 RBE, 分别应用 qRT-PCR 和 Western blot 检测 RBE 细胞 IL-17A 的表达。收集 RBE 细胞培养上清加入 LX-2 细胞培养体系, qRT-PCR 和 Western blot 检测 LX-2 细胞的  $\alpha$ -SMA 和 Collagen-I 的表达。 **结果** 华支睾吸虫感染患者血清 IL-17A 水平显著高于健康体检者 ( $t=6.536, P<0.01$ )。被感染的小鼠血清和肝脏中 IL-17A 的表达水平显著高于正常对照组 ( $t=12.98, P<0.01; t=4.155, P<0.05$ )。免疫组化结果显示, 感染小鼠的肝胆管上皮中 IL-17A 表达量增多 ( $t=10.80, P<0.01$ )。ESP 刺激后, RBE 细胞的 IL-17A 表达水平显著升高 (均  $P<0.01$ )。RBE 细胞培养上清加入 LX-2 细胞培养体系后,  $\alpha$ -SMA 和 Collagen-I 的表达水平显著高于对照组 (均  $P<0.01$ )。 **结论** 华支睾吸虫可以刺激胆管上皮细胞产生 IL-17A, 进一步促进炎症并激活 HSC 产生胶原沉积, 从而促进肝纤维化的进展。

**【关键词】** 华支睾吸虫; 分泌代谢产物; 白介素 17A; 肝纤维化

**【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-5234(2025)02-0190-05

[Journal of Pathogen Biology. 2025 Feb.; 20(02): 190-194, 200.]

## The mechanism of stimulating the secretion of IL-17A from bile duct epithelial cells by *Clonorchis sinensis* to activate hepatic stellate cells to promote hepatic fibrosis

LIU Tongtong<sup>1</sup>, ZHU Hao<sup>1</sup>, WANG Nan<sup>1</sup>, WANG Xinyue<sup>1</sup>, HU Fengai<sup>1</sup>, CAO Zhang<sup>2</sup>, GAO Honglian<sup>1</sup>, LIU Naigu<sup>1</sup>, BAI Xuelian<sup>1</sup> (1. Medical Research Center, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou 256603, Shandong, China; 2. Department of Pathology, Binzhou City People's Hospital)\*\*\*

**【Abstract】** **Objective** To investigate the mechanism of HSC activation through IL-17A production by bile duct epithelial cells stimulated by *Clonorchis sinensis* infection. **Methods** IL-17A expression level in sera of patients infected with *C. sinensis* from endemic areas was detected by ELISA. New Zealand white rabbits and BALB/c mice were infected by gavage with *C. sinensis* metacercariae isolated from freshwater fish. Liver tissue and peripheral blood were collected aseptically. ELISA and western blot were applied to detect the IL-17A expression in mouse sera and liver respectively. Immunohistochemical staining was used to detect the expression of IL-17A in the bile duct epithelium. *C. sinensis* adults were obtained from rabbits' liver and cultured in PBS. The culture supernatant was saved as ESP. After RBE cells were stimulated with ESP, IL-17A level was analyzed by qRT-PCR, western blot, and ELISA respectively. Subsequently, LX-2 cells were cultured by adding the culture supernatant of RBE cells. The expression levels of  $\alpha$ -SMA and Collagen-I were assessed by qRT-PCR and western blot. **Results** The IL-17A levels were significantly elevated in patients serum infected with *C. sinensis* than in healthy individuals ( $t=6.536, P<0.01$ ). The expression of IL-17A in the peripheral blood and liver of infected mice was also significantly increased compared with normal mice ( $t=12.98, P<0.01; t=4.155, P<0.05$ ). Immunohistochemical staining showed that more IL-17A signals were detected in the epithelium of intrahepatic bile ducts of infected mice ( $t=10.80, P<0.01$ ). The IL-17A levels in RBE cells were significantly increased after ESP stimulation ( $P<0.01$ ). The mRNA and protein levels of  $\alpha$ -SMA and Collagen-I in LX-2 cells were significantly increased after cultured with ESP-stimulated RBE cells supernatant ( $P<0.01$ ). **Conclusion** *C. sinensis* may promote the activation of HSC and hepatic fibrosis by stimulating bile duct epithelial cells to produce IL-17A and consequent inflammation.

**【Keywords】** *Clonorchis sinensis*; excretory-secretory products; IL-17A; hepatic fibrosis.

\* **【基金项目】** 山东省自然科学基金项目(No. ZR2022MH141; ZR2016HM19); 烟台市科技计划项目(No. 2015ZH084)。

\*\* **【通讯作者】** 柏雪莲, E-mail: xuelianbai99@163.com

**【作者简介】** 刘桐彤 (2000-), 女, 黑龙江鹤岗人, 在读硕士。研究方向: 病原生物致病机制研究。E-mail: 2583376487@qq.com

华支睾吸虫病是一种重要的食源性寄生虫病,主要流行于亚洲国家,包括中国、韩国、泰国、越南北部和俄罗斯远东地区,全球约1 500万人感染<sup>[1-3]</sup>。哺乳动物和人是华支睾吸虫的终宿主,通过生食或半生食含有囊蚴的淡水鱼虾而感染。囊蚴在十二指肠脱囊后,随着其对胆汁的趋化性迁移到肝内胆管,然后发育为成虫。胆道中的虫体会对胆管壁和肝脏造成严重的损害。虫体的堵塞、机械刺激及迁移活动会造成胆管的病理变化,主要包括胆管扩张、管壁增厚、胆管粘膜增生和胆管周围炎症和纤维化。肝纤维化、肝硬化甚至胆管癌是晚期常见的致命病变。因此,华支睾吸虫被国际癌症研究机构(IARC)列为I类生物致癌物之一,华支睾吸虫病也被世界卫生组织列入热带疾病控制计划<sup>[2,4-5]</sup>。华支睾吸虫的分泌代谢产物(excretory secretory products, ESP)在刺激胆管炎症和周围肝纤维化中发挥关键作用。胆管上皮作为虫体与胆管周围组织之间的屏障,最先受到ESP的刺激。在ESP的作用下,胆管上皮细胞增生并释放多种炎性介质到周围肝组织中,重塑免疫微环境,从而引发胆管上皮及周围肝组织炎症,进一步激活肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC),继而促进肝纤维化发生和进展<sup>[6-8]</sup>。

IL-17A是一种具有多种生物学功能的细胞因子,在细菌感染、炎症、纤维化疾病和自身免疫性疾病中发挥重要作用<sup>[9,10]</sup>。IL-17家族由六个成员组成,IL-17A~F,研究最广泛的是IL-17A,它含量最丰富、也最具生物活性<sup>[11]</sup>。IL-17A主要由Th17细胞分泌,其次是自然杀伤T细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞、Kuffer T细胞和上皮细胞<sup>[12]</sup>。IL-17受体分布在各种细胞中,例如嗜酸性粒细胞、角质形成细胞、上皮细胞、肝星状细胞和成纤维细胞<sup>[13]</sup>。研究显示,IL-17A与肝肉芽肿性炎症的严重程度密切相关<sup>[14]</sup>。IL-17A增强HSC对TGF- $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的反应,导致Collagen I和 $\alpha$ -SMA的分泌增加<sup>[15-17]</sup>。此外,它还能通过增强HSC分泌趋化因子来募集并刺激巨噬细胞分泌促纤维化细胞因子<sup>[18]</sup>。目前IL-17A在华支睾吸虫感染所致肝纤维化中的作用还不清楚。本研究拟通过体内、外试验观察和分析华支睾吸虫ESP刺激胆管上皮细胞产生IL-17A,从而进一步促进肝纤维化的分子机制,为进一步阐明华支睾吸虫感染调节宿主免疫的机制提供依据。

## 材料与方 法

### 1 材料

**1.1 实验动物和细胞株** BALB/c小鼠(雌性,7周龄)购自济南朋悦实验动物繁育有限公司;新西兰大白兔,2.0(2.5 kg,购自济南西岭角实验动物有限公司;

感染华支睾吸虫囊蚴的麦穗鱼购自安徽芜湖水产市场;人肝星形细胞系(LX-2)和人胆管癌细胞系(RBE)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

**1.2 主要试剂及血清** 华支睾吸虫患者血清由桂林医学院彭小红馈赠。正常体检者血清来自滨州医学院附属医院健康体检部。胃蛋白酶购自美国MP Biomeicals公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国Gibico公司;TRIzol试剂、HE和Masson的三色染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。BCA蛋白检测试剂盒、辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)偶联的山羊抗兔IgG和HRP偶联山羊抗小鼠IgG均购自山东思科捷生物技术有限公司;二氨基联苯胺四氯化物(diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB)和兔二步法检测试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;兔抗人 $\beta$ -actin、GAPDH和兔抗小鼠 $\beta$ -actin抗体均购自江苏亲科生物研究中心有限公司;兔抗人IL-17A、 $\alpha$ -SMA、Collagen I抗体及兔抗小鼠IL-17A抗体均购自北京博奥森生物技术有限公司;(cell counting kit-8, CCK8)增强型细胞活力检测试剂盒、小鼠IL-17A及人IL-17A的酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa)试剂盒均购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司。

### 2 方 法

**2.1 华支睾吸虫囊蚴的分离和动物感染** 按照之前的方法分离纯化华支睾吸虫囊蚴<sup>[19]</sup>,分别感染新西兰大白兔和BALB/c小鼠。将10只BALB/c小鼠分为感染组和对照组,每组5只。感染组每只小鼠灌胃感染50个囊蚴,对照组小鼠灌胃等体积的生理盐水。每只新西兰白兔灌胃300个囊蚴,间隔一周后,再次灌胃300个囊蚴。所有小鼠和新西兰白兔均在无病原菌条件下正常饲养。

**2.2 小鼠肝脏纤维化的病理学变化** 感染后第4周处死小鼠,无菌分离小鼠的血清和肝脏。小鼠肝组织经石蜡包埋、切片后进行HE染色和Masson染色,镜下观察并拍照。使用Image J软件分析Masson染色中的胶原纤维面积。

**2.3 小鼠肝胆管上皮IL-17A的表达** 将上述小鼠肝脏切片进行抗原修复并在PBS中洗涤,加入兔抗小鼠IL-17A的抗体(1:5000稀释)4℃孵育过夜。洗涤后,加入HRP标记的山羊抗兔IgG,37℃下孵育20 min。使用DAB作为基质显色,并用苏木精进行复染。最后,将染色的载玻片脱水、透明,并在组织周围用中性胶密封,显微镜下拍摄图像,用ImageJ软件计算IL-17A的阳性表达。

**2.4 人和小鼠血清IL-17A表达检测** 将收集到的全血样品静置30 min,3 000 r/min,离心10 min,分离

血清。按照 ELISA 试剂盒说明书,检测人和小鼠血清中 IL-17A 的表达水平。

**2.5 华支睾吸虫 ESP 的提取和细胞培养及细胞处理** 感染 6 周后,处死大白兔,分离肝脏并获取华支睾吸虫成虫。将完整活的虫体用无菌 PBS 冲洗 3 遍后,置于 PBS 中,37 °C 培养 48 h,收集上清,为 ESP。应用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。因 RBE 细胞来源于肝内胆管上皮,本研究应用 RBE 细胞系代替了原代的胆管上皮细胞。RBE 细胞和 LX-2 细胞分别在 1640 和 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基(DMEM)中培养,均含有 10% 胎牛血清、100 μg/mL 链霉素、100 U/mL 青霉素、5 μg/ml 胰岛素、5.5 μg/mol 肾上腺素、5 μg/mL 转铁蛋白、2.0 (10<sup>-10</sup>-10<sup>-10</sup>-10<sup>-9</sup> M 三碘甲状腺原氨酸、1.8(10<sup>-10</sup>-4 M 腺嘌呤、1.1 μmol/L 氢化可的松和 1.6 μmol/L 表皮生长因子(EGF),37 °C,5%CO<sub>2</sub>。将 RBE 细胞以 2×10<sup>5</sup> 个细胞/孔的密度接种在六孔板中,饥饿 12 h 后,加入 400 ng/mL 的 CsESP,对照组细胞加入等体积的无菌 PBS,继续培养 24 h。收集细胞及其培养上清液。LX-2 细胞以 2×10<sup>5</sup> 个细胞/孔的密度接种在六孔板中,饥饿 12 h 后,在培养基中加入上述收集的 RBE 细胞培养上清,继续培养 24 h,收集细胞。

**2.6 荧光实时定量 PCR(qRT-PCR)检测 IL-17A、α-SMA、Collagen I 的相对转录水平** 使用 TRIzol 试剂提取细胞的总 RNA,用反转录试剂盒合成 cDNA。通过 NCBI 网站设计 PCR 引物,引物均由上海生物工程有限公司合成,使用 GAPDH 作为参考基因进行 qRT-PCR 扩增。各基因引物序列为:GAPDH 上游引物为 5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3',下游引物为 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'; IL-17A 上游引物为 5'-CCTCATTGGTGTCACTGCTACTG-3',下游引物为 5'-TTGTCCTCAGAATTTGGGCATCC-3'; α-SMA 上游引物为 5'-TTACGAGTTGCCTGATGG-3',下游引物为 5'-TGCTGTGTAGGTGGTTTC-3'; Collagen I 上游引物为 5'-GTGCGATGACGTGATCTGTGA-3',下游引物为 5'-CGGTGGTTTCTTGGTCGGT-3'。20 μL 反应体系为:cDNA 模板 2 μL,上、下游引物各 1 μL,2×SYBR qPCR mix 10 μL,补充无 RNA 酶的 H<sub>2</sub>O 至 20 μL。qRT-PCR 的反应过程如下:94 °C,3 min;94 °C,20 s;55 °C,20 s;72 °C,30 s;共 44 个循环,每个样品设置 3 个重复,利用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 计算各组细胞中靶基因的转录水平。

**2.7 Western blot** 将新鲜的小鼠肝组织转移至 1.5 mL EP 管中,加入裂解液,置于冰上,用超声破碎法提取蛋白;细胞样本用 PBS 洗涤后离心,加入裂解液,在

冰上裂解;用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。经 SDS-PAGE 电泳后,转移到 PVDF 膜,随后用质量分数为 5% 的脱脂奶粉溶液室温封闭 2 h;在 4 °C 分别孵免抗小鼠 IL-17A(1:500)、β-actin(1:5000)和兔抗人 IL-17A(1:500)、β-actin(1:5000)、GAPDH(1:5000)、α-SMA(1:1000)、Collagen I(1:1000)过夜。TBST 洗涤 3 次;加入 HRP 偶联的山羊抗兔 IgG(1:10000)在室温下孵育 1 h;TBST 洗涤后,用 ECL 显影液进行显影,用 ImageJ 软件计算条带灰度值,分析蛋白表达含量。

**2.8 CCK-8 试验** 将 RBE 细胞浓度调整为 1×10<sup>5</sup> 个/mL,在 96 孔板中每孔加入 100 μL 的细胞悬液,待细胞贴壁后,用 400 ng/mL 的 CsESP 刺激 RBE 细胞,设置 0、12、24、36、48、72 h 等 6 个时间点,每个时间设置 3 个复孔。在上述 6 个时间点,每孔加入 10 μL 的 CCK-8 溶液,孵育 1 h,后立即用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度(A 值)。比较各组的 A 值,分析 CsESP 对 RBE 细胞增殖的影响。

### 3 统计学分析

所有统计分析均采用 GraphPad prism 8.0 程序进行,计量资料用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组之间的比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 1 华支睾吸虫感染的病人血清中 IL-17A 表达情况

为探索华支睾吸虫感染患者血清 IL-17A 的表达水平,本实验收集了 19 例华支睾吸虫感染患者和 19 例正常体检者的血清样本。结果显示,与正常体检者相比,华支睾吸虫病患者血清中 IL-17A 的表达水平升高,差异具有统计学意义( $t = 6.536, P < 0.01$ ) (图 1)。

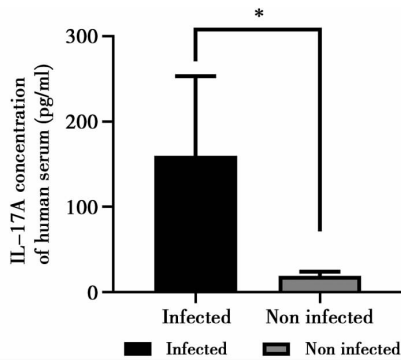
### 2 华支睾吸虫感染小鼠肝损伤与纤维化程度

HE 染色结果显示,感染 4 周后,感染组小鼠肝组织可见炎症细胞增多,胆管周围出现炎症细胞浸润。Masson 染色结果显示,与正常小鼠相比,感染组小鼠的肝胆管周围出现大量胶原纤维沉积,差异具有统计学意义( $t = 16.2, P < 0.01$ ) (图 2)。

### 3 华支睾吸虫感染小鼠的 IL-17A 表达情况

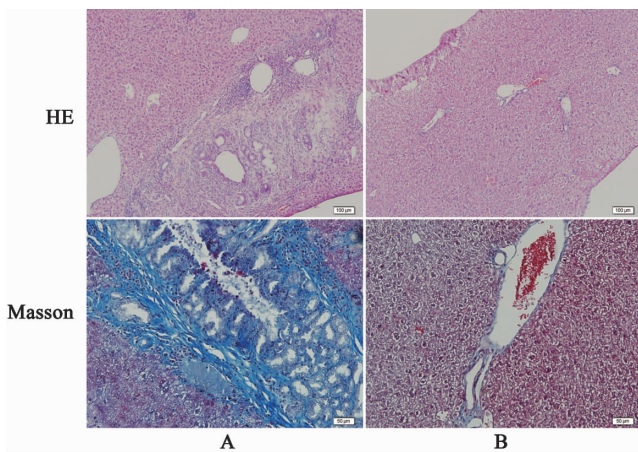
ELISA 和 Western blot 结果显示,与正常小鼠相比,感染组小鼠血清和肝脏中 IL-17A 水平表达均升高,差异均具有统计学意义( $t = 12.98, P < 0.01; t = 4.155, P < 0.05$ ),结果见图 3。免疫组化结果显示,与正常小鼠相比,感染组小鼠的肝胆管上皮中 IL-17A 表达增加,差异具有统计学意义( $t = 10.80, P < 0.01$ ),见图 4。





注: \*  $P < 0.01$ 。

图1 华支睾吸虫病人与正常体检者血清中 IL-17A 的表达水平  
Fig.1 Expression of IL-17A in the serum of patients infected with *C. sinensis* and normal people

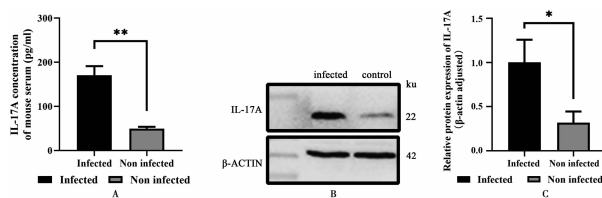


A 感染组小鼠肝组织 B 对照组小鼠肝组织

图2 华支睾吸虫感染后小鼠肝脏组织病理学变化(HE染色)和纤维化程度

A Infected mice liver tissue B Normal mice liver tissue

Fig.2 HE and Masson's trichrome staining of mice livers



A 小鼠血清中 IL-17A 表达水平 B,C 小鼠肝脏中 IL-17A 蛋白表达水平(注: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ )

图3 华支睾吸虫感染小鼠的 IL-17A 表达情况

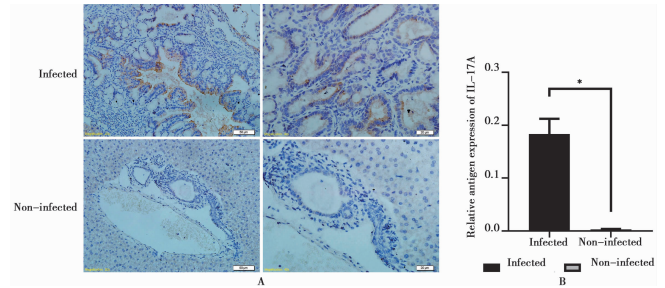
A Expression level of IL-17A in mouse serum B,C Expression level of IL-17A protein in mouse liver

Fig.3 Expression of IL-17A in *C. sinensis* infected mice

#### 4 CsESP 可能通过刺激胆管上皮细胞产生 IL-17A 从而活化 HSC

用 CsESP 刺激 RBE 细胞, CCK8 实验结果显示, 与对照组相比, CsESP 处理组的细胞在 12 h、24 h、36 h 三个时间点增殖活力明显升高, 差异有统计学意义 ( $t = 4.658, P < 0.01; t = 6.703, 16.88, P < 0.01$ ); 而在 48 h、72 h 两个时间点, 两组差异无统计学意义 ( $t$

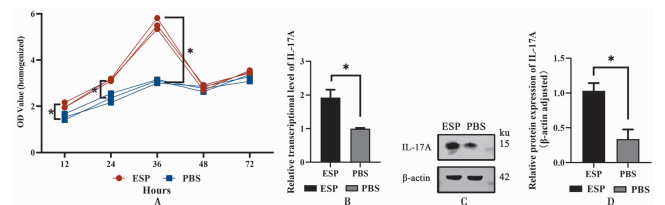
$= 0.586, 2.646, P > 0.05$ )。qRT-PCR 和 Western blot 结果显示, CsESP 处理组细胞 IL-17A 的转录水平和蛋白水平与对照组相比均升高, 差异均有统计学意义 ( $t = 6.786, 7.798, P < 0.01$ ), 结果见图 4。CsESP 处理 RBE 细胞的培养上清添加到 LX-2 的培养基中, 对照组加入等量未经 ESP 处理的 RBE 细胞培养上清, qRT-PCR 和 Western blot 结果显示, 与对照组相比, 实验组细胞  $\alpha$ -SMA、Collagen I 的转录水平和蛋白水平均升高, 差异均有统计学意义 ( $t = 11.28, 8.475, 4.972, 9.956, 均 P < 0.01$ ), 见图 5。



注: \*  $P < 0.01$ 。

图4 华支睾吸虫感染小鼠的胆管上皮中 IL-17A 表达情况 (A 放大倍数 200 $\times$ , 400 $\times$ )

Fig.4 Expression of IL-17A in the bile duct epithelium of *C. sinensis* infected mice

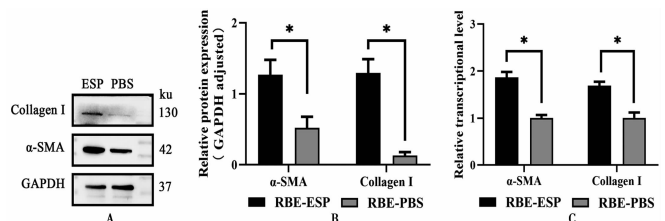


A CCK8 检测 CsESP 对 RBE 细胞的增殖影响 B CsESP 刺激 RBE 细胞的 IL-17A 转录水平 C,D CsESP 刺激 RBE 细胞的 IL-17A 蛋白表达水平(注: \*  $P < 0.01$ )

图5 CsESP 刺激 RBE 细胞产生 IL-17A 情况

A CCK8 detection of the effect of CsESP on the proliferation of RBE cells B CsESP stimulated IL-17A transcript levels in RBE cells C,D CsESP stimulated IL-17A protein expression levels in RBE cells

Fig.5 CsESP stimulates IL-17A production in RBE cells



A,B LX-2 细胞  $\alpha$ -SMA, Collagen I 蛋白表达水平 C LX-2 细胞  $\alpha$ -SMA, Collagen I 转录水平(注:  $P < 0.01$ )

图6 RBE 细胞的培养上清刺激 LX-2 细胞表达  $\alpha$ -SMA、Collagen I 情况

A,B LX-2 cell  $\alpha$ -SMA, Collagen I protein expression level C LX-2 cell  $\alpha$ -SMA, Collagen I transcription level

Fig.6 Culture supernatants from RBE cells stimulated LX-2 cells to express  $\alpha$ -SMA, Collagen I

## 讨 论

华支睾吸虫感染能够引起胆管及其周围肝组织的严重病理变化,如胆管增生和胆管周围肝组织炎症及纤维化,从而引起胆管上皮腺瘤性增生,胆管周围炎症和纤维化以及胆管癌等<sup>[20,21]</sup>。胆管上皮细胞是华支睾吸虫虫体和周围肝组织之间的第一道防线,在 ESP 的刺激下,胆管上皮细胞增生、癌变并产生大量炎症因子,从而引发胆管周围一系列的炎症反应<sup>[22]</sup>。蠕虫活动引起的胆管上皮的机械损伤及 ESP 的化学刺激共同作用,加重了炎症、胆管上皮腺瘤性增生、胆管周围纤维化和肉芽肿的形成<sup>[23]</sup>。

IL-17A 是一种具有多重生物学作用的炎症细胞因子,在调节炎症反应方面发挥重要作用,如 IL-17A 在多种炎症性疾病、肿瘤患者血清及组织中高表达,可作用于监测肿瘤生长、转移以及血管形成等过程。研究发现,IL-17A 在肝纤维化的发展中也发挥重要作用。IL-17A 高表达可以促进 IL-6 等更多炎症因子分泌,与肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、IL-22、CCR6 等多种炎症细胞因子、趋化因子协同扩大炎症效应,造成炎症细胞聚集和严重组织结构破坏<sup>[14,16]</sup>。IL-17A 还可以通过募集促炎性单核细胞,增加 TGF- $\beta$  的产生,增强 TGF- $\beta$  免疫应答,从而激活 HSC,产生大量胶原沉积以及促炎细胞因子,加重纤维化的产生<sup>[16-17]</sup>。本实验结果显示,华支睾吸虫病人血清中 IL-17A 表达水平显著高于正常体检者。华支睾吸虫感染的小鼠血清中 IL-17A 表达量也显著升高。由此可见,IL-17A 在华支睾吸虫感染中发挥重要作用。IL-17A 的分泌由多种细胞调控,以 Th17 细胞为主。研究发现,上皮细胞也可分泌 IL-17A<sup>[24]</sup>,如鼻上皮细胞可以分泌 IL-17A 继而促进更多炎症因子产生,诱导鼻息肉样病变<sup>[25]</sup>。胆管上皮细胞作为阻挡华支睾吸虫 ESP 和周围肝组织的第一屏障,其是否分泌 IL-17A 值得探究。本实验结果显示,在华支睾吸虫感染的小鼠胆管上皮中,IL-17A 表达显著增加。华支睾吸虫 ESP 刺激后,RBE 细胞的 IL-17A 水平显著高于对照组,表明华支睾吸虫 ESP 能够刺激胆管上皮细胞产生 IL-17A,从而可能引发后续的一系列炎症反应。

HSC 的活化是肝纤维化发生的关键,它的激活受多种物质和因素的调节,其中包括 IL-17A。IL-17A 可以通过多种途径活化 HSC,如 IL-17A 可以通过增强 HSC 对 TGF- $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的反应,上调  $\alpha$ -SMA 的表达,产生大量的细胞外基质成分,如 Collagen-I 和纤连蛋白(fibronectin, FN),从而促进肝纤维化<sup>[18,26]</sup>。Yi 等<sup>[22]</sup>的研究发现,胆管上皮细胞和 HSC 之间的相互作用促进了华支睾吸虫感染过程中上皮-间质转化

和胆管周围纤维化。本研究中,华支睾吸虫 ESP 刺激后,RBE 细胞的培养上清能够刺激 LX-2 细胞产生更多的  $\alpha$ -SMA 和 Collagen-I,由此可见,华支睾吸虫感染后,其 ESP 能够通过刺激胆管上皮细胞分泌炎症因子,从而引发胆管周围的炎症及纤维化。前述结果表明 ESP 能够刺激 RBE 细胞表达 IL-17A 增加,而其在肝纤维化中发挥的具体作用,有待于进一步研究。

综上所述,华支睾吸虫感染可能是通过刺激胆管上皮细胞分泌 IL-17A,从而引发胆管周围组织炎症并激活 HSC 促进肝纤维化,可为阐明华支睾吸虫病肝脏纤维化的机制提供新的理论基础。

### 【参考文献】

- [1] Lun ZR, Gasser RB, Lai DH, et al. Clonorchiasis; a key foodborne zoonosis in China[J]. Lancet Infect Dis, 2005, 5(1): 31-41.
- [2] Tang ZL, Huang Y, Yu XB. Current status and perspectives of *Clonorchis sinensis* and clonorchiasis: epidemiology, pathogenesis, omics, prevention and control[J]. Infect Dis Poverty, 2016, 5(1): 71.
- [3] Kruithof R, Erard V. Food-borne trematodiasis[J]. Rev Med Suisse, 2017, 13(578): 1741-1744.
- [4] Bouvard V, Baan R, Straif K, et al. A review of human carcinogens-Part B: biological agents[J]. Lancet Oncol, 2009, 10(4): 321-322.
- [5] Quinteros SL, 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.
- [6] Won J, Cho Y, Lee D, et al. *Clonorchis sinensis* excretory-secretory products increase malignant characteristics of cholangiocarcinoma cells in three-dimensional co-culture with biliary ductal plates[J]. PLoS Pathog, 2019, 15(5): e1007818.
- [7] Pak JH, Lee JY, Jeon BY, et al. Cytokine production in cholangiocarcinoma cells in response to *Clonorchis sinensis* excretory-secretory products and their putative protein components[J]. Korean J Parasitol, 2019, 57(4): 379-387.
- [8] 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- $\beta$ /Smads signaling pathway [J]. Acta Trop, 2020, 205: 105307.
- [9] Huangfu L, Li R, Huang Y, et al. The IL-17 family in diseases: from bench to bedside[J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8(1): 402.
- [10] McGeachy MJ, Cua DJ, Gaffen SL. The IL-17 family of cytokines in health and disease[J]. Immunity, 2019, 50(4): 892-906.
- [11] Kawaguchi M, Adachi M, Oda N, et al. IL-17 cytokine family [J]. J Allergy Clin Immunol, 2004, 114(6): 1265-1274.
- [12] Mills KHG. IL-17 and IL-17-producing cells in protection versus pathology[J]. Nat Rev Immunol, 2023, 23(1): 38-54.
- [13] Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family [J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9(8): 556-567.

(下转 200 页)

指标可以帮助临床医生早期识别高危患者,并采取更为积极的干预措施以改善患者的预后。然而,本研究也存在一些局限性。首先,本研究样本量较小,且为单中心回顾性研究,可能存在选择偏倚。此外,未能纳入患者的长期随访数据,因此无法评估 PCP 患者的长期预后。未来研究应通过多中心、大样本量的前瞻性研究进一步验证这些发现。此外,还应该重点探讨 PCP 患者的影像学特征与临床生物标志物的联合应用,以提高早期诊断和预后评估的准确性。

【参考文献】

[1] 何纳. 中国艾滋病流行病学研究新进展[J]. 中华疾病控制杂志, 2021, 25(12):1365-1368, 1480.

[2] 戴色莺,沈张伟,范引光,等. 我国艾滋病预防控制中流行病学研究进展[J]. 中华疾病控制杂志, 2015, 19(12):1282-1285.

[3] 彭云,邓勇,辛力,等. 艾滋病机会性感染种类及呼吸系统感染危险因素[J]. 中华医院感染学杂志, 2023, 33(1):9-12.

[4] 邹美银,凌勇武,汪美华,等. 艾滋病患者肺孢子菌肺炎相关危险因素分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 25(22):5125-5127, 5168.

[5] 黄述婧,陈铭,代芳芳,等. G 试验对艾滋病合并肺孢子菌肺炎诊断价值的探讨[J]. 首都医科大学学报, 2016, 37(4):504-508.

[6] “十三五”国家科技重大专项艾滋病机会性感染课题组. 艾滋病合并肺孢子菌肺炎临床诊疗的专家共识[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2020, 42(7):49-60.

[7] 曾妍茗,周怡宏,陈耀凯. 艾滋病合并肺孢子菌肺炎治疗研究进展[J]. 中国艾滋病性病, 2019, 25(8):861-864.

[8] 谢正平,戴峰. 艾滋病患者卡氏肺孢子菌肺炎的多排螺旋 CT 表现及鉴别诊断[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(23):5674-5676.

[9] 谢正平,朱斌. 艾滋病合并肺孢子菌肺炎的 CT 表现分型与预后

相关性[J]. 临床放射学杂志, 2018, 37(2):228-232.

[10] 侯文利,吴远慧,黄晓,等. 血清内毒素和淀粉样蛋白及 CD4<sup>+</sup> T 细胞水平与艾滋病患者机会性感染的相关性[J]. 中华医院感染学杂志, 2023, 33(1):1-4.

[11] 张红燕,洪立珠,杨丹丹,等. 艾滋病合并细菌性肺炎病原菌分布及耐药研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2018, 13(4):417-420.

[12] 邱玉英,张英为,陈露露,等. 艾滋病合并肺孢子菌肺炎的临床、影像学及病理学分析[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2016, 15(1):2-6.

[13] 朱解琳,李清,曹秀月. 慢性阻塞性肺疾病患者营养状况与病情的相关性分析[J]. 中华护理杂志, 2006(8):712-714.

[14] 叶宁,李茜茜,朱明利,等. 艾滋病相关肺孢子菌肺炎复合感染状况与 CD4<sup>+</sup> T 细胞数的关系[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(10):2161-2164.

[15] 鲁植艳,徐忠建,卓德强,等. HIV 感染合并肺孢子菌肺炎的影像学表现[J]. 武汉大学学报(医学版), 2008(5):680-682, 686.

[16] 魏莉,徐盈. 慢性阻塞性肺病并发肺间质纤维化患者的肺功能及血清炎症因子的改变[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(24):6110-6112.

[17] 邓莹莹,陆普选. AIDS 并发肺孢子菌肺炎的临床影像学特征[J]. 放射学实践, 2009, 24(10):1069-1071.

[18] 廖芮,孙长峰,肖科,等. 影响获得性免疫缺陷综合征合并肺孢子菌肺炎患者预后的危险因素分析[J]. 中国感染与化疗杂志, 2020, 20(5):470-475.

[19] 孙国磊,李丽娟,张莉,等. 糖皮质激素长期应用宿主合并肺孢子菌肺炎的死亡风险因素分析[J]. 中国实用内科杂志, 2018, 38(10):945-949.

[20] 陈涛,蒋忠胜,李敏基,等. 获得性免疫缺陷综合征合并肺孢子菌肺炎患者预后模型的建立及评价[J]. 中国全科医学, 2021, 24(2):190-195.

[21] 陈涛,蒋忠胜,李敏基,等. 艾滋病合并肺孢子菌肺炎患者近期预后的 COX 回归分析[J]. 中国艾滋病性病, 2021, 27(5):467-471.

【收稿日期】 2024-10-08 【修回日期】 2024-12-29

(上接 194 页)

[14] Kartasheva-Ebertz D, Gaston J, Lair-Mehiri L, et al. IL-17A in human liver; significant source of inflammation and trigger of liver fibrosis initiation[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(17):9773.

[15] Beringer A, Miossec P. IL-17 and TNF- $\alpha$  co-operation contributes to the proinflammatory response of hepatic stellate cells[J]. Clin Exp Immunol, 2019, 198(1):111-120.

[16] Fabre T, Molina MF, Soucy G, et al. Type 3 cytokines IL-17A and IL-22 drive TGF- $\beta$ -dependent liver fibrosis[J]. Sci Immunol, 2018, 3(28):eaar7754.

[17] Fabre T, Kared H, Friedman SL, et al. IL-17A enhances the expression of profibrotic genes through upregulation of the TGF- $\beta$  receptor on hepatic stellate cells in a JNK-dependent manner[J]. J Immunol, 2014, 193(8):3925-3933.

[18] Meng F, Wang K, Aoyama T, et al. Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice[J]. Gastroenterology, 2012, 143(3):765-776. e3.

[19] Chu Y, Shi D, Wang N, et al. *Clonorchis sinensis* legumain promotes migration and invasion of cholangiocarcinoma cells via regulating tumor-related molecules[J]. Parasit Vectors, 2023, 16(1):71.

[20] Kim TS, Pak JH, Kim JB, et al. *Clonorchis sinensis*, an oriental liver fluke, as a human biological agent of cholangiocarcinoma: a

brief review[J]. BMB Rep, 2016, 49(11):590-597.

[21] Na BK, Pak JH, Hong SJ. *Clonorchis sinensis* and clonorchiasis[J]. Acta Trop, 2020, 203:105309.

[22] Yi J, Jeong JH, Won J, et al. The crosstalk between cholangiocytes and hepatic stellate cells promotes the progression of epithelial-mesenchymal transition and periductal fibrosis during *Clonorchis sinensis* infection[J]. Parasit Vectors, 2024, 17(1):151.

[23] Kim JW, Yi J, Park J, et al. Transcriptomic profiling of three-dimensional cholangiocyte spheroids long term exposed to repetitive *Clonorchis sinensis* excretory-secretory products[J]. Parasit Vectors, 2021, 14(1):213.

[24] Xu M, Dong C. IL-25 in allergic inflammation[J]. Immunol Rev, 2017;278(1):185-191.

[25] Jin J, Yoon YH, Kwak SY, et al. Staphylococcal enterotoxin B induced expression of IL-17A in nasal epithelial cells and its association with pathogenesis of nasal polyposis[J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2014, 271(3):525-534.

[26] 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.

【收稿日期】 2024-09-25 【修回日期】 2024-12-09