

文章编号: 1000-7423(2015)-02-0096-05

【论著】

## 华支睾吸虫排泄-分泌产物对小鼠巨噬细胞一氧化氮产生和核转录因子 $\kappa$ B 活化的影响

杨庆利<sup>1,2</sup>, 蒋智华<sup>2</sup>, 申继清<sup>3</sup>, 陈颖丹<sup>1</sup>, 周晓农<sup>1\*</sup>

**【摘要】** 目的 研究华支睾吸虫 (*Clonorchis sinensis*) 排泄-分泌产物 (ESPs) 对小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 一氧化氮 (NO) 产生与核转录因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 活化的影响。方法 用 20  $\mu$ g/ml 华支睾吸虫 ESPs 水溶性浓缩物及其有机溶剂提取物 (ESPs-ex) 和 0.1  $\mu$ g/ml 明尼苏达沙门氏杆菌脂多糖 (LPS-SM) 分别刺激 RAW264.7 细胞, 未刺激对照组加入等量 Hank's 平衡盐缓冲液 (HBSS)。实验同时用 0.3 mmol/L 诱导型一氧化氮合成酶 (iNOS) 抑制剂 SMT 作为干预。细胞培养 18 h 后, 用 Griess 法检测各组细胞培养上清液  $\text{NO}_2^-$  浓度。将 pNiFty2-SEAP 质粒转染至 4 组刺激后 RAW264.7 细胞, 培养 18 h 后, 检测培养上清液中可溶性胚胎碱性磷酸酶 (SEAP) 的吸光度 ( $A_{620}$  值), 倒置显微镜观察细胞内 SEAP 催化显色情况。结果 经 ESPs-ex 和 LPS-SM 刺激后, 细胞培养上清液中  $\text{NO}_2^-$  浓度分别为  $(14.30 \pm 1.62)$  和  $(14.10 \pm 1.17)$   $\mu\text{mol/L}$ , 均较未刺激对照组  $[(7.70 \pm 0.95) \mu\text{mol/L}]$  显著增加 ( $P < 0.05$ ); 加入 SMT 后, 两组  $\text{NO}_2^-$  浓度显著下降, 分别为  $(8.97 \pm 0.81)$  和  $(4.96 \pm 1.36)$   $\mu\text{mol/L}$  (均  $P < 0.05$ )。经 ESPs 刺激后, 上清液中  $\text{NO}_2^-$  浓度为  $(4.06 \pm 0.62) \mu\text{mol/L}$ , 较未刺激对照组显著降低 ( $P < 0.05$ ); 加入 SMT 后,  $\text{NO}_2^-$  浓度为  $(3.99 \pm 0.87) \mu\text{mol/L}$ , 无明显变化 ( $P > 0.05$ )。ESPs 刺激后, 上清液 SEAP 的  $A_{620}$  值为  $0.836 \pm 0.005$ , 显著高于未刺激对照组 ( $0.097 \pm 0.009$ ) ( $P < 0.05$ ); 镜下可见细胞内出现广泛、强烈的蓝色显色反应。ESPs-ex 和 LPS 刺激后, 上清液 SEAP 的  $A_{620}$  值分别为  $0.112 \pm 0.004$  和  $0.116 \pm 0.009$ , 略高于未刺激对照组 ( $P > 0.05$ ); 镜下见部分细胞内出现蓝色显色反应。结论 华支睾吸虫 ESPs 能够促进 RAW264.7 细胞活化 NF- $\kappa$ B, 其水溶性浓缩物可抑制 NO 产生, ESPs-ex 和 LPS-SM 可促进 NO 产生。

**【关键词】** 华支睾吸虫; 排泄-分泌产物; 病原相关分子模式; 一氧化氮; 核转录因子  $\kappa$ B

中图分类号: R383.22 文献标识码: A

### Effect of Excretory-secretory Products of *Clonorchis sinensis* on Nitric Oxide Production and NF- $\kappa$ B Activation in RAW264.7 Mouse Macrophages

YANG Qing-li<sup>1,2</sup>, JIANG Zhi-hua<sup>2</sup>, SHEN Ji-qing<sup>3</sup>, CHEN Ying-dan<sup>1</sup>, ZHOU Xiao-nong<sup>1\*</sup>

(1 National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention; Key Laboratory of Parasite and Vector Biology, MOH; WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China; 2 Center for Disease Control and Prevention of Guangxi Zhuang Autonomous Region; Guangxi Key Laboratory for the Prevention and Control of Viral Hepatitis Infection, Nanning 530028, China; 3 Department of Parasitology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

**【Abstract】 Objective** To study the role of excretory-secretory products (ESPs) from *Clonorchis sinensis* in the production of nitric oxide (NO) and the activation of nuclear transcription factor kappa B (NF- $\kappa$ B) in the macrophages of RAW264.7 mouse. **Methods** 20  $\mu$ g/ml of *C. sinensis* EPSs, the organic solvent extracts of EPSs (ESP-ex), and 0.1  $\mu$ g/ml of lipopolysaccharide from *Salmonella minnesota* (LPS-SM) were used as stimulators in co-culture with RAW264.7 mouse macrophages as experimental groups. The Hank's balanced salt solution (HBSS) served as control. At the same time the RAW264.7 macrophages were stimulated with EPSs, ESP-ex, and LPS-SM, and then added 0.3 mmol/L of SMT, a specific inhibitor of iNOS as the interference groups. After co-culture for 18 days, the concentrations of  $\text{NO}_2^-$  in the culture supernatants were detected with Griess reagents, and the activation of NF- $\kappa$ B was determined by transfection with a NF- $\kappa$ B-inducible reporter plasmid, pNiFty2-SEAP. The activities of secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP) in

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 31260221)

作者单位: 1 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 上海 200025; 2 广西壮族自治区疾病预防控制中心, 广西病毒性肝炎防制研究重点实验室, 南宁 530028; 3 广西医科大学寄生虫学教研室, 南宁 530021

\* 通讯作者, E-mail: ipdzhoun@sh163.net

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

culture supernatants were quantified by using HEK-Blue™ detection medium and expressed as the value of optical density at 620 nm ( $A_{620}$  value). The intercellular activities of SEAP were determined by microscopic observation. **Results** After stimulation with both ESPs-ex and LPS-SM, the concentrations of  $\text{NO}_2^-$  in culture supernatants were  $(14.30 \pm 1.62)$  and  $(14.10 \pm 2.17) \mu\text{mol/L}$ , respectively, which were significantly higher than that of the control  $[(7.70 \pm 0.95) \mu\text{mol/L}]$  ( $P < 0.05$ ), and significantly decreased to  $(8.97 \pm 0.81)$  and  $(4.96 \pm 1.36) \mu\text{mol/L}$  after adding SMT, respectively ( $P < 0.05$ ). However, the concentration of  $\text{NO}_2^-$  in ESPs stimulation group  $[(4.06 \pm 0.62) \mu\text{mol/L}]$  was lower than that of the control ( $P < 0.05$ ), and almost unchanged  $[(3.99 \pm 0.87) \mu\text{mol/L}]$  after adding SMT ( $P > 0.05$ ). SEAP activity in ESP group  $(0.836 \pm 0.005)$  was significantly higher than that of the control  $[(0.097 \pm 0.009) \mu\text{mol/L}]$  ( $P < 0.05$ ). A strong blue color reaction was observed in cells of ESP group. SEAP activity of ESPs-ex and LPS groups  $[(0.112 \pm 0.004), (0.116 \pm 0.009) \mu\text{mol/L}]$  was slightly higher than that of the control ( $P > 0.05$ ), and blue color reaction was observed in some cells. **Conclusion** ESPs from *C. sinensis* can stimulate NF- $\kappa$ B activation in RAW264.7 cells. The water-soluble components of ESPs can inhibit the NO production, while ESPs-ex and LPS-SM can promote the NO production.

**【Key words】** *Clonorchis sinensis*; Excretory-secretory product; Pathogen-associated molecular pattern; NO; NF- $\kappa$ B

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31260221)

\* Corresponding author, E-mail: ipdzhouxn@sh163.net

华支睾吸虫 (*Clonorchis sinensis*) 是华支睾吸虫病的病原体。华支睾吸虫病报道至今已有 140 余年, 对华支睾吸虫的致病作用和机制的认识逐渐明确和深入<sup>[1,2]</sup>。宿主感染华支睾吸虫后可引起肝胆管组织的严重病理改变, 甚至胆管癌 (cholangiocarcinoma, CCA) 的发生<sup>[3,4]</sup>。最近研究发现, 华支睾吸虫的排泄-分泌产物 (excretory-secretory products, ESPs) 与华支睾吸虫感染后病变发生和发展过程密切相关。ESPs 可作用于人胆管癌细胞并通过活化还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 氧化酶、黄嘌呤氧化酶和诱导型一氧化氮合成酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 触发自由基以及活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的大量产生, 并诱导相关促炎症反应细胞因子表达<sup>[5,6]</sup>。病理情况下 iNOS 的表达可通过催化 L-精氨酸反应, 促使一氧化氮 (NO) 持续、大量产生。NO 是一种重要的细胞信息分子, 与抗微生物、抗肿瘤和免疫病理损伤等的发生密切相关<sup>[7]</sup>。高浓度的 NO 可与超氧化物自由基 ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) 反应, 形成过氧化亚硝基 ( $\text{ONO}_2^-$ )。ONO<sub>2</sub><sup>-</sup> 具有强氧化和硝化作用, 可直接或通过自由基作用对包括 DNA 在内的大量细胞分子造成损伤, 引起严重的基因遗传毒性效应<sup>[8]</sup>。iNOS/NO 的表达与特定细胞因子表达和核转录因子 kappa B (NF- $\kappa$ B) 活化密切相关<sup>[9,10]</sup>。

近年研究发现, 华支睾吸虫的 ESPs 中包含复杂的极性差异组分<sup>[11]</sup>。本次实验将用其中极性差异的水溶性组分作为刺激物, 观察其对敏感靶细胞 NO 产生和 NF- $\kappa$ B 活化的影响。研究结果将有助于深入认识华支睾吸虫 ESPs 中极性差异生物大分子生物活性, 以及为探索华支睾吸虫病原相关分子模式 (pathogen-asso-

ciated molecular patterns, PAMPs) 提供线索和基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 刺激物 实验刺激物为华支睾吸虫排泄-分泌产物的水溶性浓缩物 (ESPs) 及其氯仿-甲醇-水 (11:9:2) 提取物 (ESPs-ex)。两者均按照文献 [11] 中方法获得。实验前将两者分别溶于水中, 并用液相内毒素清除剂按照推荐程序处理 2 次, 去除内毒素。刺激物对照选择明尼苏达沙门氏杆菌脂多糖 (LPS-SM), 用无菌无内毒素水溶解。

1.1.2 细胞株及培养 小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 购自上海美轩生物科技有限公司。

1.1.3 主要试剂和仪器 液相内毒素清除剂购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司, Lipofectamine™ 2000 脂质体、DMEM 培养基、Hank's 平衡盐缓冲液 (HBSS) 和胎牛血清 (FBS) 购自美国 Invitrogen 公司, LPS-SM、无菌无内毒素水、pNiFty2-SEAP 质粒、HEK-Blue™ 检测培养液购自美国 InvivoGen 公司, iNOS 抑制剂硫酸甲基异硫脲 (SMT)、NO 前体 L-精氨酸 (L-arginine)、10 mmol/L  $\text{KNO}_2$  标准品等购自上海碧云天生物技术有限公司, NO 检测用对氨基苯磺酰胺和盐酸萘乙二胺购自英国 Sigma-Aldrich 公司。洁净工作台为上海百艾贸易有限公司产品, CO<sub>2</sub> 培养箱 (HERACELL 150i) 为美国 Thermo 公司产品, 倒置显微镜 (ECLIPSE Ti) 为日本 Nikon 公司产品, 酶标仪 (Synergy 2) 为美国 BioTek 公司产品。NO 检测用 Griess 试剂使用前将 3% 氨基苯磺酰胺-7.5% 磷酸溶液和 0.3% 盐酸萘乙二胺水溶液按 2:1 均匀混合即可。

## 1.2 方法

**1.2.1 NO 检测** 生长良好的 RAW264.7 细胞接种 24 孔细胞培养板, 用含 10% FBS、100 U/ml 青霉素/链霉素的 DMEM 细胞培养液, 于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 环境下培养 3 d 至细胞 90% 以上成单层。细胞单层用 HBSS 轻柔洗涤 2 次, 更换新鲜的 HBSS, 加入 1 mmol/L L-精氨酸。分别用 20 μg/ml ESPs、ESPs-ex 和 0.1 μg/ml LPS-SM 刺激; 同时设置无刺激物对照组, 加入等量 HBSS。实验同时用 0.3 mmol/L iNOS 抑制剂 SMT 加入至上述刺激系统中作为干预。

于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养 18 h 后, 用 Griess 法分别检测培养上清液 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 浓度<sup>[12]</sup>。取 KNO<sub>2</sub> 标准品分别配置制成 3.125、6.25、12.5、25.0 和 50.0 μmol/L 的标准溶液。取 50 μl 新鲜配制的 Griess 试剂加入 96 孔平底聚苯乙烯反应板, 分别加入系列浓度的 KNO<sub>2</sub> 标准溶液 50 μl 并均匀混合, 室温避光反应 10 min 后, 在 540 nm 波长下检测吸光度 ( $A_{540}$  值)。每个标准品浓度重复 6 孔, 计算  $A_{540}$  均值。以  $A_{540}$  均值为横坐标, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 浓度 (μmol/L) 为纵坐标绘制标准曲线, 并计算标准回归方程。收集无色的细胞培养上清液, 立即按照上述方法检测 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 浓度。根据标准曲线和标准回归方程计算样品的 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 浓度来代表 NO 含量。

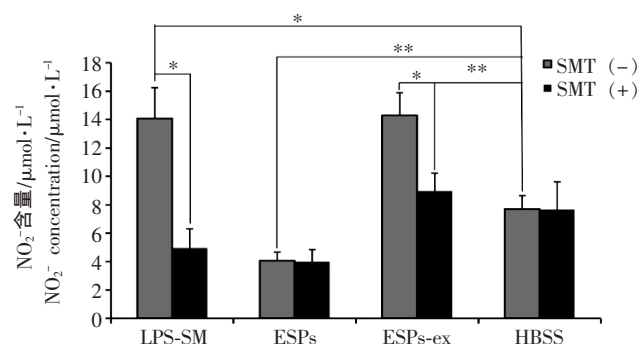
**1.2.2 NF-κB 活性检测** 80% 以上成单层的 RAW264.7 细胞用 HBSS 洗 2 次, 更换含有方法 1.2.1 中刺激物的 HEK-Blue™ 检测培养液, 每孔 500 μl; 同时设立无刺激物的空白对照。然后将 500 ng pNiFty2-SEAP 质粒用 Lipofectamine™ 2000 转染入 RAW264.7 细胞, 轻柔混匀。于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 下培养 18 h。通过直接观察并检测 HEK-Blue™ 检测培养液的颜色变化反映可溶性胚胎碱性磷酸酶 (SEAP) 的表达强弱, 结果用  $A_{620}$  值表示, 其数值反应细胞内 NF-κB 活化的程度。同时于倒置显微镜观察细胞内 SEAP 催化显色情况, 进一步分析 NF-κB 的活化情况。

**1.3 统计学分析** 实验数据用均数±标准差表示。用 SPSS 11.5 软件的配对样本 *t* 检验法进行差异的显著性分析。检验水平为  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 华支睾吸虫 ESPs 对 RAW264.7 细胞 NO 产生的影响** 检测结果显示, LPS 和 ESPs-ex 刺激后细胞培养上清液中 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量分别为 (14.10±2.17) 和 (14.30±1.62) μmol/L, 而未刺激对照组为 (8.97±0.81) μmol/L, 两者均显著高于对照组的水平 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。ESPs 刺激后细胞培养上清液中 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量为 (4.06±0.62) μmol/L, 明显低于未刺激对照组

( $P<0.01$ )。加入 SMT 后, LPS 和 ESPs-ex 刺激组培养上清液中 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量分别为 (4.96±1.36) 和 (8.97±0.81) μmol/L, 均较抑制前显著降低 ( $P<0.05$ ); 而 ESPs 刺激组 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量为 (3.99±0.87) μmol/L, 无显著变化 ( $P>0.05$ ); 未刺激对照组上清液中 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量 [(7.66±1.56) μmol/L] 也较抑制前无变化 ( $P>0.05$ ) (图 1)。



LPS-SM: 明尼苏达沙门氏杆菌脂多糖; ESPs: 华支睾吸虫排泄-分泌物水溶性浓缩物; ESPs-ex: 华支睾吸虫排泄-分泌物有机溶剂提取物; HBSS: Hank's 平衡盐缓冲液。注: \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ 。

LPS-SM: Lipopolysaccharide from *Salmonella minnesota*; ESPs: Excretory-secretory products; ESPs-ex: Organic solvent extracts of ESPs; HBSS: Hank's balanced salt solution.

图 1 RAW264.7 细胞培养上清液中 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量

Fig. 1 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> concentration in the culture supernatants of RAW264.7 cells

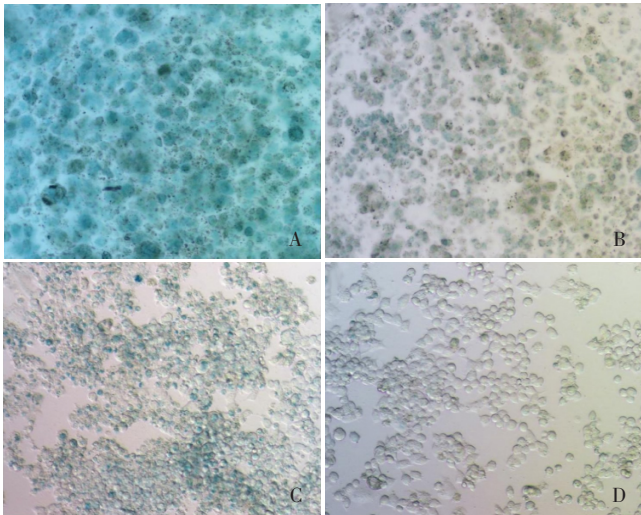
**2.2 NF-κB 活性检测结果** 结果显示, 华支睾吸虫 ESPs 刺激 RAW264.7 细胞 18 h 后, 培养液中 SEAP 活性显著增加, 液体由粉红色变为蓝色,  $A_{620}$  值为 0.836±0.005, 显著高于未刺激对照组 (0.097±0.009) ( $P<0.01$ )。用 LPS 和 ESPs-ex 刺激后培养液 SEAP 的  $A_{620}$  值分别为 0.112±0.004 和 0.116±0.009, 略高于未刺激对照组, 但差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

镜下观察细胞内 SEAP 活性发现, ESPs 刺激后, 所有细胞内出现强烈的蓝色显色反应, 说明 NF-κB 明显活化 (图 2A); ESPs-ex 和 LPS 刺激后, 部分细胞内也出现蓝色显色反应, 说明 NF-κB 也有一定程度的活化 (图 2B、2C)。对照组细胞生长良好, 基本上未检测到细胞内 SEAP 活性 (图 2D)。

## 3 讨论

本实验用华支睾吸虫排泄-分泌物中相对分子质量大于 2 000 的浓缩物 (ESPs) 及其有机溶剂提取物 (ESPs-ex) 分别刺激小鼠巨噬细胞系 RAW264.7, 结果发现, ESPs-ex 能够显著促进细胞 NO 的产生, 而 ESPs 则抑制 NO 的产生; ESPs 和 ESPs-ex 均能活化 NF-κB。然而, 与 ESPs-ex 相比, ESPs 活化 NF-κB 的效应更明显。





A: 华支睾吸虫排泄-分泌产物水溶性浓缩物刺激; B: 华支睾吸虫排泄-分泌产物的有机溶剂提取物刺激; C: 明尼苏达沙门氏杆菌脂多糖刺激; D: 未刺激对照。

A: Stimulated with water soluble excretory-secretory products (ESPs) of *Clonorchis sinensis*; B: Stimulated with organic solvent extracts of ESPs of *Clonorchis sinensis*; C: Stimulated with lipopolysaccharide from *Salmonella Minnesota*; D: Normal cells.

图2 RAW264.7 细胞内 SEAP 活性 (×100)

Fig. 2 The SEAP activity in RAW264.7 cells (×100)

研究发现, 华支睾吸虫的 ESPs 可作用于人胆管癌细胞, 通过调控转录后翻译环节影响包括环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 在内的众多蛋白质的表达, 并能抵抗欧苣菊 (parthenolide) 诱导的细胞凋亡<sup>[5,13]</sup>。本研究结果发现, 华支睾吸虫 ESPs 中包含促进 NF- $\kappa$ B 活化的成分, 这可能与诱导靶细胞相关基因表达的作用有关。事实上, 促使 NF- $\kappa$ B 活化的因素很多, 包括 LPS、ROS 和肿瘤坏死因子 (TNF- $\alpha$ ) 等细胞因子<sup>[14-17]</sup>。细胞内众多基因的表达均依赖于 NF- $\kappa$ B 的活化, 包括与 T 细胞发育、成熟和增殖相关的基因<sup>[18]</sup>, 与肿瘤发生发展相关的基因<sup>[19]</sup>以及炎症反应发生有关的基因<sup>[20]</sup>等。研究发现, 与 NO 产生直接相关的 iNOS 等基因的表达也依赖于 NF- $\kappa$ B 的活化<sup>[9,10]</sup>。本实验结果发现, 华支睾吸虫 ESPs 在诱导活化 NF- $\kappa$ B 的同时, 对 RAW264.7 细胞 NO 的产生却产生了抑制作用。其原因可能由于 ESPs 中可能同时存在对 iNOS/NO 表达具有负向调节作用的活性成分, 其过程可能不依赖于 NF- $\kappa$ B 的活化。

目前研究还发现, 华支睾吸虫能够诱导抗炎反应的出现。华支睾吸虫粗抗原 (CA) 能刺激 RAW264.7 和骨髓来源的巨噬细胞 (BMDMs), 并通过 ERK 途径产生抗炎反应细胞因子白细胞介素 10 (IL-10) 和转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ )<sup>[21]</sup>。此外, 研究发现, 卫氏并殖吸虫 (*Paragonimus westermani*) 抗原也能刺激树突状细胞 (DC) 2.4 产生 IL-10 和 TGF- $\beta$ <sup>[22]</sup>。

IL-10 是重要的免疫调控因子, 它通过 JAK-STAT 信号途径调节促炎症反应和抗炎反应的平衡, 影响病原生物体的感染过程<sup>[23]</sup>。本研究结果发现, ESPs-ex 在活化 NF- $\kappa$ B 的同时, 促进 RAW264.7 细胞 NO 的大量产生。此效应是否参与华支睾吸虫感染后免疫反应的调控过程还有待深入研究。

另外, 病原生物生长不同时期表达的基因产物具有迥异的免疫调控功能。例如结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 感染后第 1 天的基因表达产物能活化 DCs, 而第 5 天的基因表达产物则抑制 DCs 的活化; 且只有第 1 天的基因产物能抑制 iNOS 的表达<sup>[24]</sup>。旋毛虫 (*Trichinella spiralis*) 的 ESPs 也具有免疫调控功能, 并且与虫体发育时期有关。旋毛虫发育各时期的 ESPs 均能够作用于 J774A.1 巨噬细胞系, 抑制由 LPS 诱导的促炎症反应细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-12 的表达; 只有 3 日龄和 5 日龄成虫以及新生幼虫能够显著抑制 LPS 诱导的 iNOS 表达<sup>[25]</sup>。目前, 有研究者对华支睾吸虫在动物体内的发育过程进行了观察<sup>[26]</sup>。因此, 有必要对华支睾吸虫不同发育时期的 ESPs 活化 NF- $\kappa$ B、影响 iNOS/NO 产生的作用进行分别研究。

研究认为, PAMPs 通过与包括 Toll 样受体 (TLR) 在内的模式识别受体 (PRRs) 结合, 活化 NF- $\kappa$ B, 导致基因表达的改变<sup>[27]</sup>。本实验结果发现, 华支睾吸虫 ESPs 具有活化 NF- $\kappa$ B 的效应, 这为深入分析其中 PAMPs 提供了重要线索。同时, 本实验结果也发现了 ESPs 抑制 NO 产生的现象。说明 ESPs 中各组分联合作用的复杂性, 其中包含具有促进和抑制 iNOS/NO 产生双重作用的活性成分。由于弱极性的 ESPs-ex 无抑制 NO 产生的效应, 因此推测, 这些免疫反应抑制性组分很可能存在于 ESPs 的强极性部分。ESPs-ex 所诱导产生的 NO 产生也依赖于 NF- $\kappa$ B 的活化, 但 NO 的产生可能对 NF- $\kappa$ B 的活性产生了负面影响。本次实验仅检测到实验结束 18 h 时的 NF- $\kappa$ B 相对活性水平。关于 NF- $\kappa$ B 活化的动态过程还需要进一步研究。

综合分析认为, 华支睾吸虫 ESPs 中很可能包含具有 PAMPs 性质的生物大分子, 通过刺激敏感靶细胞活化 NF- $\kappa$ B。同时, 其中也包含具有抑制 iNOS/NO 活性的成分, 它们与 PAMPs 共同参与华支睾吸虫感染后的免疫病理和耐受过程。

## 参 考 文 献

- [1] Hong ST, Fang Y. *Clonorchis sinensis* and clonorchiasis, an update[J]. Parasitol Int, 2012, 61(1): 17-24.
- [2] 钱门宝, 陈颖丹, 周晓农. 从认识到实践——纪念华支睾吸虫发

- 现 140 周年 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2014, 32(4): 247-252.
- [3] 刘国兴, 吴秀萍, 王子见, 等. 三种吸虫感染与胆管癌发病关系的研究进展 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2010, 28(4): 301-305.
- [4] Qian MB, Chen YD, Liang S, *et al.* The global epidemiology of clonorchiasis and its relation with cholangiocarcinoma [J]. Infect Dis Poverty, 2012, 1(1): 4.
- [5] Pak JH, Moon JH, Hwang SJ, *et al.* Proteomic analysis of differentially expressed proteins in human cholangiocarcinoma cells treated with *Clonorchis sinensis* excretory-secretory products [J]. J Cell Biochem, 2009, 108(6): 1376-1388.
- [6] Nam JH, Moon JH, Kim IK, *et al.* Free radicals enzymatically triggered by *Clonorchis sinensis* excretory-secretory products cause NF- $\kappa$ B-mediated inflammation in human cholangiocarcinoma cells [J]. Int J Parasitol, 2012, 42(1): 103-113.
- [7] Stuehr DJ. Mammalian nitric oxide synthases [J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1411(2-3): 217-230.
- [8] Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics [J]. Nat Rev Drug Discov, 2007, 6(8): 662-680.
- [9] Pei Z, Wang J. Propofol attenuates LPS-induced tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-6 and nitric oxide expression in canine peripheral blood mononuclear cells possibly through down-regulation of nuclear factor(NF)- $\kappa$ B activation [J]. J Vet Med Sci, 2015, 77(2): 139-145.
- [10] Tsutsuki H, Yahiro K, Suzuki K, *et al.* Subtilase cytotoxin enhances *Escherichia coli* survival in macrophages by suppression of nitric oxide production through the inhibition of NF- $\kappa$ B action [J]. Infect Immun, 2012, 80(11): 3939-3951.
- [11] 杨庆利, 申继清, 蒋智华, 等. 华支睾吸虫来源极性差异化合物的高效薄层色谱免疫分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2014, 9(9): 816-819.
- [12] 余立凯. NO 的生物代谢及检测方法 [J]. 国外医学. 生理. 病理科学与临床分册, 1998, 18(3): 264-266.
- [13] Kim YJ, Choi MH, Hong ST, *et al.* Resistance of cholangiocarcinoma cells to parthenolide-induced apoptosis by the excretory-secretory products of *Clonorchis sinensis* [J]. Parasitol Res, 2009, 104(5): 1011-1016.
- [14] Chandel NS, Trzyna WC, McClintock DS, *et al.* Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin [J]. J Immunol, 2000, 165(2): 1013-1021.
- [15] Fitzgerald DC, Meade KG, McEvoy AN, *et al.* Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases nuclear factor kappaB (NF kappaB) activity in and interleukin-8(IL-8) released from bovine mammary epithelial cells [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2007, 116(1-2): 59-68.
- [16] Renard P, Zachary MD, Bougelet C, *et al.* Effects of antioxidant enzyme modulations on interleukin-1-induced nuclear factor kappa B activation [J]. Biochem Pharmacol, 1997, 53(2): 149-160.
- [17] Qin H, Wilson CA, Lee SJ, *et al.* LPS induces CD40 gene expression through the activation of NF-kappaB and STAT-1alpha in macrophages and microglia [J]. Blood, 2005, 106(9): 3114-3122.
- [18] Livolsi A, Busuttill V, Imbert V, *et al.* Tyrosine phosphorylation-dependent activation of NF- $\kappa$ B. Requirement for p56 LCK and ZAP-70 protein tyrosine kinases [J]. Eur J Biochem, 2001, 268(5): 1508-1515.
- [19] Escúrcega RO, Fuentes-Alexandro S, García-Carrasco M, *et al.* The transcription factor nuclear factor- $\kappa$ B and cancer [J]. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2007, 19(2): 154-161.
- [20] Monaco C, Andreaskos E, Kiriakidis S, *et al.* Canonical pathway of nuclear factor kappa B activation selectively regulates proinflammatory and prothrombotic responses in human atherosclerosis [J]. Proc Natl Acad Sci, 2004, 101(15): 5634-5639.
- [21] Wi HJ, Jin Y, Choi MH, *et al.* Predominance of IL-10 and TGF- $\beta$  production from the mouse macrophage cell line, RAW264.7, in response to crude antigens from *Clonorchis sinensis* [J]. Cytokine, 2012, 59(2): 237-244.
- [22] Jin Y, Wi HJ, Choi MH, *et al.* Regulation of anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- $\beta$  in mouse dendritic cells through treatment with *Clonorchis sinensis* crude antigen [J]. Exp Mol Med, 2014, 46: e74.
- [23] Carey AJ, Tan CK, Ulett GC. Infection-induced IL-10 and JAK-STAT: A review of the molecular circuitry controlling immune hyperactivity in response to pathogenic microbes [J]. JAK STAT, 2012, 1(3): 159-167.
- [24] Gupta D, Sharma S, Singhal J, *et al.* Suppression of TLR2-induced IL-12, reactive oxygen species, and inducible nitric oxide synthase expression by *Mycobacterium tuberculosis* antigens expressed inside macrophages during the course of infection [J]. J Immunol, 2010, 184(10): 5444-5455.
- [25] Bai X, Wu X, Wang X, *et al.* Regulation of cytokine expression in murine macrophages stimulated by excretory/secretory products from *Trichinella spiralis* in vitro [J]. Mol Cell Biochem, 2012, 360(1-2): 79-88.
- [26] 刘继鑫, 孙艳宏, 郭家, 等. 华支睾吸虫在小鼠体内的发育观察 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2014, 32(5): 406, 封三.
- [27] 杨庆利, 申继清. 寄生虫的病原相关分子模式研究进展 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2013, 31(3): 238-241.

(收稿日期: 2014-12-25 编辑: 张争艳, 杨频)

感谢寄生虫病科研、防治、教育工作者  
多年来对本刊的大力支持！欢迎继续投稿！