网络出版时间:2022-1-2420:48 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220124.0940.019.html

# 棘球蚴通过 mTOR 途径抑制糖酵解的研究

刘颖颖,孟娟娟,常 瑗,蔺 珂,廖 原,许军英,侯 隽,陈雪玲,王 仙

**摘要 目的** 观察棘球蚴感染后,mTOR 途径对 T 细胞糖酵 解的影响。方法 将 Balb/c 小鼠随机分为对照组、感染组 和抑制剂组。感染组和抑制剂组肝被膜下注射原头蚴,对照 组注射等体积的 PBS,抑制剂组从第 2 天起每日腹腔注射雷 帕霉素(1.25 mg/kg)。分别于感染后 15、30 和 70 d,收集外 周血和脾脏,qRT-PCR 检测糖酵解相关转录因子的 mRNA 表达,Western blot 检测 mTOR 途径下游分子的蛋白表达。 结果 与对照组比较,感染组中 mTOR 途径下游分子 HIF-1α、P-p70S6 和 P-4EBP-1 的蛋白表达降低(*P*<0.05),糖酵 解相关转录因子 HK3、PKM2、LDHA 和 MCT4 的 mRNA 表达 降低(*P*<0.05),加入雷帕霉素抑制 mTOR 途径后,糖酵解 相关转录因子 HK3、PKM2、LDHA 和 MCT4 的 mRNA 表达进 一步降低(*P*<0.001)。结论 棘球蚴感染通过 mTOR 途径 抑制了 T 细胞的糖酵解代谢。

关键词 棘球蚴病;mTOR;糖酵解

中图分类号 R 383.3

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2022)03 - 0438 - 05 doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2022.03.019

棘球蚴病(又称囊型包虫病)是细粒棘球绦虫 幼虫寄生而引发的一种人兽共患病<sup>[1]</sup>。感染后,患 者体内T细胞的分化出现偏移,表现出以Treg细胞 为主的免疫抑制,但其机制尚不清楚<sup>[2]</sup>。代谢免疫 学研究<sup>[3]</sup>表明,T细胞的分化与代谢选择有密切关 系,效应T细胞采用有氧糖酵解。调控糖酵解,可 以影响T细胞的分化方向,上调糖酵解可促进Th17 细胞分化,抑制Treg细胞的生成<sup>[4-5]</sup>。mTOR 通路 是调控糖酵解代谢中经典的能量代谢通路<sup>[6]</sup>。该 研究通过构建棘球蚴感染小鼠的疾病模型,初步探 讨mTOR 途径是否参与调控T细胞的糖酵解代谢, 为进一步研究在包虫病中糖酵解对宿主T细胞的 作用奠定基础。

#### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

2021-10-08 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81460246)

作者单位:石河子大学医学院免疫教研室,石河子 832000 作者简介:刘颖颖,女,硕士研究生;

王 仙, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 307835271@qq. com

1.1.1 小鼠与感染棘球蚴的羊肝来源 30 只6~8 周龄,体质量约为20g的Balb/c小鼠,购于新疆医 科大学实验动物中心;感染棘球蚴的羊肝来自新疆 昌吉自治州屠宰场。

**1.1.2** 主要试剂与仪器 RPMI-1640 购自美国 GIBCO公司,胎牛血清购自以色列 BI公司,小鼠脾 脏淋巴细胞分离液、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒购 自北京索莱宝公司,流式抗体、Fixation/Permeabilization Buffer、Brefeldin A(BFA)和逆转录试剂盒均 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司,Western blot 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司,PMA/ Ionomycin 购自中国联科生物有限公司,总 RNA 提 取试剂盒购自美国 Omega Bio-Tek 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 提取原头蚴 清水多次冲洗感染棘球蚴的 羊肝后,用75%乙醇喷洗消毒,以50 ml 注射器抽取 棘球蚴囊液,静置后留取沙粒样沉淀,用含有1%青 -链霉素混合液的 PBS 冲洗10次,以除去残留囊 皮和活性不好的原头蚴。将原头蚴吹打混匀后,吸 取50 μl 混合液滴加于载玻片上,然后加入5 μl 伊 红染液,混匀静置30 s,显微镜下观察计数,原头蚴 活性 >95%。

1.2.2 构建棘球蚴感染小鼠模型 将30只健康 Balb/c小鼠,随机分为对照组、感染组和抑制剂组, 每组10只。感染组和抑制剂组肝被膜下接种5000 个原头蚴,对照组则接种同等体积的PBS。同时,抑 制剂组从第2天起每日腹腔注射雷帕霉素(1.25 mg/kg)。

1.2.3 采集外周血 摘除小鼠眼球收集血液,待血液凝固后,8000 r/min,离心10 min,分装上层血清,-80℃冰箱保存,备用。

1.2.4 制备牌脏淋巴细胞悬液 摘除小鼠脾脏,刮 取脾脏细胞,将淋巴细胞分离液分离得到的细胞,用 含10% 胎牛血清的1640 培养基制备成1×10<sup>7</sup>/ml 的细胞悬液,备用。

1.2.5 Western blot 检测 mTOR 途径的蛋白表达 提取蛋白样本,按照说明书配制一抗和二抗缓冲液, 制备 SDS-PAGE 凝胶,4 ℃过夜,取出制胶梳,按照 分组向孔内加入蛋白 Marker(8 µl)或样本蛋白(20 µl)进行电泳,剪取适当大小的 PVDF 放入甲醇激活 5 min,转膜,5% BSA 封闭2 h,加入一抗缓冲液4 ℃ 慢摇过夜,1 × TBST 洗膜3 次,每次计时 10 min,孵 育二抗1 h,1 × TBST 洗膜3 次,每次计时 10 min,将 ECL 发光试剂盒中的 A 液和 B 液,按照1:1 比例 配制显色液,然后滴加在 PVDF 膜上,使显色液与膜 上蛋白充分结合后,曝光,拍照及初步处理图像,Im-age J 扫描条带蛋白灰度值。

**1.2.6** qRT-PCR 检测糖酵解相关转录因子的 mR-NA 表达 用试剂盒提取各组细胞总 RNA 后采用 Nanodrop 2000 测定浓度,逆转录成 cDNA,按 SYBR Green 两步法操作进行 qRT-PCR 检测糖酵解代谢中 酶以及乳酸转运蛋白:己糖激酶 3 (hexokinase 3, HK3)、丙酮酸激酶 M2 (pyruvate kinase M2, PKM2)、乳酸脱氢酶 A (lactic dehydrogenase A, LDHA)和单羧酸转运蛋白 4 (mnocarboxylate transporter 4, MCT4)的 mRNA 表达。引物序列见表 1, 以 β-actin 为内参,采用 2<sup>-ΔΔCt</sup>法进行数据分析。

引物名称	核苷酸序列(5'-3')
β-actin	F:ATGGAATCCTGTGGCATCCAT
	R:TCCTGCATCCTGTCAGCAATG
НК3	F:GGGACACTCTACAAGCTACATC
	R:CATCTGGGTAAGGCGACA
PKM2	F:TCGCATGCAGCACCTGATT
	R:CCTCGAATAGCTAGTGGTA
LDHA	F:CAAAGTCCAAGATFFCAACCC
	R:AGCACCAACCCCAACAACTGT
MCT4	F: GCCACCTCAACGCCTGCTA
	R:TGTCGGGTACACCCATATCCTTA

表1 相关引物序列

1.2.7 流式细胞术检测 Th17 和 Treg 细胞 每组 取 1×10<sup>6</sup> 个脾脏淋巴细胞至各标记管中,按照标记 分别加入 CD4-PE、CD25-Percpcy 5.5,4 ℃避光孵育 30 min,PBS 洗涤 1次,洗去未结合的抗体,固定、破 膜后 再按照标记分别加入 IL-17A-FITC、FoxP3-FITC,各自4℃避光孵育 30 min 和 40 min 后,破膜 液洗涤 1次,加 500 µl PBS 重悬细胞,上机,Flowjo 10 软件处理数据绘制图。

**1.3** 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行数据 分析, GraphPad Prism 8.0 绘制图表, 计量资料以 $\bar{x}$ ±*s* 表示, 使用 One-way ANOVA 进行两两比较检 验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

#### 2 结果

**2.1 原头蚴活性的测定** 在光学显微镜下可以观察到伊红染色后的原头蚴,着色为深红色的是已经 凋亡的,未着色的为活性好的。见图1。



图1 不同视野下原头蚴伊红染色 ×40

2.2 棘球蚴感染小鼠肝脏的大体形态 感染后,小鼠肝脏在15 d 可见有乳白色囊泡形成,在30 d 可见 乳白色囊泡体积增大并凸起,70 d 可见囊泡不仅体 积增大,也向周围扩散,囊泡的数量增多,囊泡透明 度增加并有囊液的形成。见图 2。



图 2 棘球蚴感染小鼠不同时间的肝脏

2.3 棘球蚴感染后糖酵解变化与 mTOR 途径的蛋 白表达 通过 qRT-PCR 检测 HK3、PKM2、LDHA 和 MCT4 的 mRNA 表达反映糖酵解代谢的变化,如图 3A 所示,与对照组比较,棘球蚴感染后,感染组中糖 酵解相关转录因子的 mRNA 表达水平降低,且均在 感染后 70 d 达到最低,其中 HK3(F = 50.63, P < 0.001)、PKM2(F = 26.52, P < 0.05)、LDHA(F = 22.16, P < 0.05)和 MCT4(F = 18.84, P < 0.05);感 染后 15、30 和 70 d 各组 mTOR 下游分子的蛋白表

达由 Western blot 检测,如图 3B~E 所示,各指标蛋 白相对表达量分别为[HIF-1 $\alpha$  (0.42 ± 0.034)、 (0.11 ± 0.006)、(0.18 ± 0.006) 和 (0.01 ± 0.003), *F* = 196.4, *P* < 0.000 1; P-p7086 (0.57 ± 0.055)、(0.08 ± 0.026)、(0.12 ± 0.025)和(0.06 ± 0.028), *F* = 87.76, *P* < 0.000 1; P-4EBP-1 (0.58 ± 0.071)、(0.19 ± 0.056)、(0.28 ± 0.028)和(0.15 ± 0.058), *F* = 24.73, *P* < 0.01]。与对照组比较,感染 后 HIF-1 $\alpha$ 、P-p7086 和 P-4EBP-1 的蛋白表达降低 (均 *P* < 0.05)。

#### 2.4 抑制 mTOR 途径对糖酵解的影响

2.4.1 雷帕霉素抑制 mTOR 途径 对照组、感染组 和抑制剂组中 mTOR 下游分子的蛋白表达由 Western blot 检测,各指标蛋白相对表达量分别为[HIF-

 $1\alpha$  (0.37 ± 0.035)、(0.15 ± 0.040) 和 (0.06 ± 0.018), F = 59.24, P < 0.05; P-p70S6 (0.86 ± 0.007)、(0.26 ± 0.024)和 (0.18 ± 0.014), F = 649.30, P < 0.01; P-4EBP-1 (0.73 ± 0.020)、(0.31 ± 0.021)和 (0.19 ± 0.008), F = 535.80, P < 0.001]。与对照组比较,感染组和抑制剂组中淋巴 细胞内 mTOR 下游分子的蛋白表达明显降低(均 P < 0.05)。见图 4。

2.4.2 抑制 mTOR 途径对糖酵解代谢变化的影响

qRT-PCR 检测 HK3、PKM2、LDHA 和 MCT4 的 mRNA 表达,与对照组和感染组比较,抑制剂组淋巴 细胞内的糖酵解相关转录因子的 mRNA 表达水平 明显降低,其中 HK3(F = 65.39, P < 0.01)、PKM2 (F = 13.43, P < 0.01)、LDHA(F = 26.81, P < 0.05)



图 3 棘球蚴感染后糖酵解变化与 mTOR 途径的蛋白表达

A:qRT-PCR 检测糖酵解相关转录因子 mRNA 的表达;B:Western bolt 检测 HIF-1α、P-p70S6 和 P-4EBP-1 的蛋白表达;C~E:Image J 分析各 组蛋白灰度值的定量表达,用 β-actin 标准化;1:对照组;2:感染后 15 d;3:感染后 30 d;4:感染后 70 d;与对照组比较:\*P<0.05,\*\*P<0.01, \*\*\*\*P<0.001, \*\*\*\*P<0.001,



图4 雷帕霉素抑制 mTOR 途径

A:Western bolt 检测 HIF-1α以及 p70S6、4EBP-1 磷酸化和非磷酸化的蛋白表达;B~D:Image J软件扫描各组蛋白灰度值的定量表达水平, 用 β-actin 标准化;1:对照组;2:感染组;3:抑制剂组;与对照组比较:\*\*\*P<0.001,\*\*\*\*P<0.0001;与感染组比较:\*P<0.05,\*\*P<0.01, \*\*\*\*P<0.001



图 5 阻断 mTOR 对糖酵解代谢变化的影响

A:qRT-PCR 检测代谢酶的 mRNA 表达水平;B:脾淋巴细胞中 Th17、Treg 细胞百分比;C、D:流式结果对应条形统计图;1:对照组;2:感染 组;3:抑制剂组;与对照组比较:\*P<0.05,\*\*P<0.01,\*\*\*\*P<0.001,\*\*\*\*P<0.0001;与感染组比较:\*P<0.05,<sup>##</sup>P<0.01,<sup>###</sup>P<0.001

和 MCT4(F = 28.44, P < 0.05), 见图 5A。PMA/Inomycin 和 BFA 刺激小鼠脾脏淋巴细胞 5 h 后, 收集 细胞, 流式细胞术检测脾脏淋巴细胞中 Th17 和 Treg 细胞的比例, 在对照组、感染组和抑制剂组中 CD4<sup>+</sup> IL-17A<sup>+</sup>(Th17)细胞的百分比分别是(5.60 ± 0.49)%、(2.78±0.38)%和(1.26±0.06)%(F =67.79, P < 0.01); CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>(Treg)细胞 的百分比分别为(4.98±1.30)%、(10.96± 0.45)%和(14.30±1.07)%(F = 92.12, P <0.001)。与对照组和感染组比较, 抑制剂组 Th17 细胞比例降低, Treg 细胞比例升高(P < 0.05), 见图 5B~D。

#### 3 讨论

犬类作为终宿主排出含有虫卵的粪便,污染土 壤、水流和食物,通过粪 – 口传播进入中间宿主体 内,棘球蚴常寄生于肝脏和肺脏,形成一个囊状体, 并随着寄生时间延长不断长大,压迫和破坏器 官<sup>[7-8]</sup>。研究发现<sup>[9-10]</sup>,棘球蚴感染早期,机体的 免疫应答以Th1和Th17细胞主导的炎症反应,有利

于抗包虫的保护作用:感染晚期,机体的免疫应答向 Th2 细胞方向偏移,甚至出现 Treg 细胞负调控,免疫 应答受到抑制,不利于虫体的清除。据报道[11-12], 有氧糖酵解在T细胞的增殖、分化和应答中有着至 关重要的作用,当初始T细胞在抗原刺激后会广泛 的活化,表现出糖酵解代谢加强,以及葡萄糖和氨基 酸摄取的增加。即使在氧气充足的情况下,仍然是 依靠糖酵解来生成 ATP,从而快速有效地产生更多 生物合成中间体,满足细胞迅速增殖的需求<sup>[13]</sup>。 mTOR 途径在细胞生长和增殖中发挥重要作用<sup>[14]</sup>. mTOR 通过激活下游的 HIF-1α,能够调控多种糖酵 解基因的表达如:GLUT1、PKM2、LDHA 等<sup>[15]</sup>。但 在棘球蚴感染中,糖酵解的作用以及 mTOR 途径和 糖酵解之间的关系尚不清楚。通过本研究发现,棘 球蚴感染后,T细胞内mTOR的下游分子蛋白表达 降低,糖酵解相关转录因子的 mRNA 表达降低,运 用雷帕霉素阻断 mTOR 途径后,观察糖酵解的变 化,结果显示糖酵解代谢明显抑制,提示棘球蚴感染 可能通过 mTOR 途径抑制了 T 细胞内糖酵解代谢。 因此,在棘球蚴感染中棘球蚴对宿主免疫的免疫抑 制,可能与mTOR 途径抑制糖酵解有关。

此外,流式细胞术检测了脾脏组织 CD4<sup>+</sup> T 细胞中 Th17 和 Treg 细胞的比例,发现当阻断 mTOR 引起糖酵解代谢减弱时,Th17/Treg 细胞平衡偏移, 但具体糖酵解在棘球蚴感染中如何影响 T 细胞的 分化,进而影响宿主免疫反应,还需要进一步研究。

#### 参考文献

- [1] Siracusano A, De Lunardo F, Teggi A, et al. Host-parasite relationship in cystic echinococcosis: an evolving story[J]. Clin Dev Immunol, 2012, doi:10.1155/2012/639362.
- [2] Tuxun T, Wang J H, Lin R Y, et al. Th17/Treg imbalance in patients with liver cystic echinococcosis [J]. Parasite Immunol, 2012, 34(11):520-7.
- [3] Soumaya K, Benammar E A, Salem C. Impact of metabolism on Tcell differentiation and function and cross talk with tumor microenvironment[J]. Front in Immunol, 2017, 8:270.
- [4] Shi L Z, Wang R, Huang G, et al. HIF1α-dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of Th17 and Treg cells[J]. J Exp Med, 2011, 208(7):1367-76.
- [5] Ran W, Solt L A. Metabolism of Th17 cells: New insights and therapeutic opportunities[J]. Eur J Immunol, 2016, 46(4):807.
- [6] Wyman B, Perl A. Metabolic pathways mediate pathogenesis and offer targets for treatment in rheumatic diseases [J]. Curr Opin Rheumatol, 2020, 32(2):184-91.

- [7] 魏玉环,胡 媛,曹建平. 细粒棘球绦虫基因多态性的研究进展[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2019,37(4):481-5.
- [8] Tamarozzi F, Deplazes P, Casulli A. Reinventing the wheel of echinococcus granulosus sensu lato transmission to humans [J]. Trends in Parasitol, 2020, 36(5):427-34.
- [9] 曹建平,王 莹,潘 伟,等. 细粒棘球绦虫感染宿主免疫应答 特征简[J]. 中国动物保健, 2017,19(7):26-8.
- [10] 丁剑冰,李玉娇,张峰波.包虫病免疫及疫苗的研究进展[J]. 新疆医科大学学报,2019,42(1):24-8.
- [11] Gerriets V A, Danzaki K, Kishton R J, et al. Leptin directly promotes T-cell glycolytic metabolism to drive effector T-cell differentiation in a mouse model of autoimmunity [J]. Eur J Immunol, 2016,46(8):1970-83.
- [12] Dimeloe S, Burgener A V, Hess C, et al. T-cell metabolism governing activation, proliferation and differentiation: A modular view [J]. Immunology, 2017,150(1): 35-44.
- [13] 傅柳陶,王青元,卫 兵,等. PGAM1 通过激活 Warburg 效应 调控宫颈癌细胞恶性生物学行为的机制研究[J]. 安徽医科 大学学报,2018,53(9):1398-402.
- [14] 陈先国. 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白在前列腺癌中的作用研究 进展[J]. 安徽医科大学学报,2012,47(10):1234-6.

## Echinococcus infection inhibits glycolysis through mTOR pathway

Liu Yingying, Meng Juanjuan, Chang Yuan, Lin Ke, Liao Yuan, Xu Junying, Hou Jun, Chen Xueling, Wang Xian (Dept of Immunology, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832000)

**Abstract** *Objective* To observe the effect of mTOR pathway on glycolysis of T cells after Echinococcus granulosus infection. *Methods* Balb/c mice were randomly divided into control group, infection group and inhibitor group. In the infection group and inhibitor group, protoscolex was injected under the liver capsule, the control group was injected with an equal volume of PBS, and the inhibitor group was intraperitoneally injected with rapamycin (1. 25 mg/kg) daily from the next day. At 15, 30, and 70 days after infection, peripheral blood and spleen were collected, qRT-PCR was used to detect the mRNA expression of metabolic enzymes, and Western blot was used to detect the protein expression of the mTOR signaling pathway. *Results* Compared with the control group, the protein expression of HIF-1 $\alpha$ , P-p70S6 and P-4EBP-1 downstream of the mTOR pathway in the infected group decreased (P < 0.05), and the mRNA expression of glycolysis-related transcription factors HK3, PKM2, LDHA and MCT4 decreased (P < 0.05). After rapamycin inhibited the mTOR pathway, the mRNA expression of glycolysis-related transcription factors HK3, PKM2, LDHA and MCT4 were further reduced (P < 0.001). *Conclusion* Echinococcus infection inhibits glycolytic activity in T cells through the mTOR pathway.

Key words Echinococcsis; mTOR; glycolysis