

安徽医科大学学报

Acta Universitatis Medicinalis Anhui

ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目： 肿瘤坏死因子- α 在利什曼原虫脾脏感染中的作用
作者： 甄二娜，吴余玲，胡姗姗
网络首发日期： 2025-11-13
引用格式： 甄二娜，吴余玲，胡姗姗. 肿瘤坏死因子- α 在利什曼原虫脾脏感染中的作用 [J/OL]. 安徽医科大学学报.
<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20251113.0906.006>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

肿瘤坏死因子- α 在利什曼原虫脾脏感染中的作用

甄二娜¹, 吴余玲¹, 胡姗姗^{1,2}

(¹安徽医科大学临床药理研究所、抗炎免疫药物教育部重点实验室, 合肥 230032; ²中国科学技术大学附属第一医院检验科, 合肥 230036)

摘要 **目的** 探究肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 在小鼠利什曼原虫脾脏感染中的作用。**方法** 在小鼠的右侧后足皮下注射利什曼原虫的前鞭毛体建立感染模型。测量小鼠足垫厚度和体质量监测感染; 通过 HE 染色观察感染后脾脏病理学变化; 流式细胞术检测脾脏内淋巴细胞和巨噬细胞的改变; 间接免疫荧光法检测脾脏内精氨酸酶 1 (Arg-1) 和诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 的表达水平; 体外调控 TNF- α 观察对巨噬细胞感染利什曼原虫的影响。**结果** 与 B6.WT 小鼠相比, B6.TNF- α 小鼠感染后 42 d 脾脏明显肿大, 结构紊乱, 各种细胞浸润并分散在整个脾脏中。流式结果显示, 感染利什曼原虫后, 小鼠脾脏中 T 细胞和 B 细胞比例未发生明显改变, 而 CD11b 单核细胞明显增加; 免疫荧光结果显示, M2 型单核/巨噬细胞的标志物 Arg-1 在 B6.TNF- α 小鼠脾脏中高表达 ($P < 0.05$); B6.WT 小鼠的脾脏中 iNOS 表达相对较强 ($P < 0.05$); 体外研究发现, TNF- α 缺失或抑制 TNF- α 后, 腹腔巨噬细胞感染利什曼原虫明显增加 ($P < 0.01$), 而加入 TNF- α 后显著抑制了该细胞的感染 ($P < 0.01$)。**结论** B6.TNF- α 小鼠后足垫皮下接种利什曼原虫后发生脾脏感染, 可能与 TNF- α 的缺失导致巨噬细胞发生 M2 型分化和一氧化氮产生减少有关。

关键词 利什曼原虫; 肿瘤坏死因子; 脾脏; 巨噬细胞; 流式分析; 免疫反应

中图分类号 R 531.6

The role of tumor necrosis factor in spleen infection caused by *Leishmania*

Zhen Erna¹, Wu Yuling¹, Hu Shanshan^{1,2}

(¹Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Anti-Inflammatory and Immune Medicine, Hefei 230032; ²Dept of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China, Hefei 230036)

Abstract **Objective** To explore the role of tumour necrosis factor(TNF) in splenic infection of mice by *Leishmania major*. **Methods** To establish an infection model, promastigotes of *Leishmania* were injected

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81703524)

作者简介: 甄二娜, 女, 硕士研究生;

胡姗姗, 女, 讲师, 硕士生导师, 通信作者, Email: shanshanhu@ustc.edu.cn

intradermally into the right hind foot of mice. The thickness of the footpad and body weight were measured to monitor the infection. Histological changes in the spleen after infection were observed by HE staining. Changes in lymphocytes and monocytes in the spleen were detected by flow cytometry. The expression level of Arginase-1(Arg-1) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the spleen was determined by indirect immunofluorescence. The effect of TNF- α on macrophage infection with *Leishmania* was evaluated *in vitro*.

Results Compared to B6.WT mice, the spleens of B6.TNF^{-/-} mice showed significant enlargement 42 days post-infection, with structural disruption. Various cells infiltrated and were dispersed throughout the entire spleen. Flow cytometry results indicated that after infection with *Leishmania*, there was no significant change in the proportions of T cells and B cells in the spleens of the mice, while CD11b monocytic cells significantly increased. Immunofluorescence results revealed that the M2 macrophage/monocyte marker Arg-1 was highly expressed in the spleens of B6.TNF^{-/-} mice ($P < 0.05$). The expression of iNOS in the spleens of B6.WT mice was relatively strong ($P < 0.05$). *In vitro* studies found that the absence or inhibition of TNF- α significantly increased the infection of *Leishmania* by peritoneal macrophages ($P < 0.01$), while the addition of TNF- α markedly inhibited this infection ($P < 0.01$).

Conclusion The splenic infection in B6.TNF^{-/-} mice following subcutaneous inoculation of *L. major* in the hind footpad may be associated with the absence of TNF- α , which leads to M2-type differentiation of macrophages and reduced nitric oxide (NO) production.

Key words *Leishmania*; tumor necrosis factor; spleen; macrophages; flow cytometry analysis; immune response

Fund program National Natural Science Foundation of China (No. 81703524)

Corresponding author Hu Shanshan, E-mail: shanshanhu@ustc.edu.cn

利什曼病是由利什曼原动物寄生虫引起的重大全球健康问题，每年影响全球约 100 万人。利什曼感染的临床表现包含可自愈的皮肤病以及致命性的内脏感染（脾脏、肝脏和骨髓）^[1]。在实验室环境中，C57BL（B6.WT）或 BALB/c 小鼠感染巨大利什曼原虫（*Leishmania*, *L. major*）是 1 个用于研究感染反应中细胞因子的作用以及辅助性 T 细胞（Th1/Th2）反应遗传二象性的经典动物模型^[2]。*L. major* 抵抗型 B6.WT 小鼠在感染后可通过产生干扰素- γ （interferon- γ , IFN- γ ）以及一氧化氮（nitric oxide, NO）实现自愈。而易感的 BALB/c 小鼠在感染后主要产生 Th2 型细胞因子，无法清除寄生虫最终死于感染^[3-4]。

肿瘤坏死因子- α （tumor necrosis factor- α , TNF- α ）是一种多效性细胞因子，主要由巨噬细胞、树突状细胞和 T 淋巴细胞等免疫细胞产生。既往研究^[5]表明，TNF- α 缺失后导致 *L. major* 抵抗型小鼠皮肤感染弥散，淋巴结肿大，甚至出现致命的内脏感染。在 *L. major* 感染中，TNF- α 的缺失导致肝脏中浸润的髓系单核细胞优先向 M2 型巨噬细胞分化，NO 产生减少，*L. major* 不能被清除^[5]。脾脏中是否也存在和肝脏中类似的

感染机制呢？因此，该研究基于 TNF- α 基因敲除小鼠以及 *L. major* 感染模型，观察小鼠脾脏变化，阐明 TNF- α 在抗感染中的作用机制，为临床抗 TNF- α 治疗所致机会性感染和复发风险增加提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 来源于 B6.WT 和 B6.TNF^{-/-}小鼠的腹腔巨噬细胞。

1.1.2 利什曼原虫和实验动物 利什曼原虫是由德国埃尔兰根微生物学研究所赠送；实验采用维持寄生虫感染性的 BALB/c 小鼠，以及作为对照的 B6.WT 小鼠和 B6.TNF^{-/-}小鼠，所有小鼠均为体质量（20 \pm 2）g 的雄性，鼠龄均为 6~12 周，饲养于澳大利亚孟席斯医学研究所 SPF 环境中。所有动物实验程序均获得塔斯马尼亚大学动物伦理委员会的批准（动物伦理编号：A13934 & A13935）。

1.1.3 主要试剂与仪器 CD11b、CCR2、CD19、CD4、CD8 α 流式抗体（货号：ab133357、ab273050、ab254170、ab183685、ab217344，美国 Abcam 公司）；TNF- α （货号：315-01A-1MG，纯度>98%，规格：50 μ g，美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；依那西普（Enbrel）（货号：P7113F，纯度>95%，规格：50 μ g，美国 AB Biosciences 公司）；精氨酸酶 1（arginase-1, Arg-1）、诱导型一氧化氮合酶（inducible nitric oxide synthase, iNOS）抗体（货号：16001-1-AP, 18985-1-AP，武汉三鹰生物技术有限公司）；II 型胶原酶（货号：C2-28-100MG，美国 Sigma 公司）；NO 检测试剂盒（Greiss Reagent I 和 II）、脱氧核糖核酸酶 I（货号：S0021S, D7073，上海碧云天生物技术研究）；青-链霉素、Hank's 平衡盐溶液、RPMI 1640 培养基（货号：PB180120, PB180323, PM150110B，武汉普诺赛生物科技有限公司）；胎牛血清（货号：085-060，维森特生物技术有限公司）；HE 染色试剂盒（货号：G1120，北京索莱宝科技有限公司）。激光共聚焦显微镜（型号：徕卡 TCS SP8，德国徕卡公司）；流式细胞仪（型号：BD FACSCanto II，美国 BD 公司）；波扫仪器（型号：Pannoramic MIDI II，匈牙利 3D HISTECH 公司）。

1.2 方法

1.2.1 利什曼原虫的培养 为了保持寄生虫的感染性，*L. major* 通过易感的 BALB/c 小鼠进行组织传代。感染前，寄生虫在含有 10% 兔全血、青-链霉素、非必需氨基酸和 10 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸的 RPMI 1640 培养基中重悬，并在 Novy-MacNeal-Nicolle 血琼脂斜面上进行接种前培养，培养至 2~3 代，以保证 *L. major* 的病原活性和感染能力。

1.2.2 分组与体内感染 本研究将小鼠分为 B6.WT 组和 B6.TNF^{-/-}组。将 3×10^6 个处于静止期的前鞭毛体（感染阶段）悬浮于 0.9% 氯化钠溶液中，总体积为 50 μ L，通过皮下注射的方式接种到小鼠的后足垫中，建立 *L. major* 感染模型。

1.2.3 利什曼原虫的体外分组与感染 *L. major* 在易感的 BALB/c 小鼠中进行组织传代，从感染小鼠的病变

组织中提取 *L. major* 在体外培养至 2~3 代。将体外培养的腹腔巨噬细胞设置 B6.WT 对照组、B6.WT TNF- α 预处理组 (50 ng/mL)、B6.WT Enbrel 预处理组 (20 ng/mL) 以及 B6. TNF^{-/-}对照组, 在 *L. major* 感染前, 腹腔巨噬细胞与 TNF- α 、Enbrel 分别孵育 2 h, 再感染 *L. major* 48 h。

1.2.4 小鼠脾脏的收集及 HE 染色 选择感染 6 周后的小鼠, 取出脾脏并放入磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS) 中清洗。再将脾脏置于 4% 多聚甲醛溶液中固定, 石蜡包埋, 切片后进行 HE 染色, 脱蜡水化后用苏木精染色 5~10 min; 流水冲洗分色, 再用伊红染色 1~2 min, 最后脱水、透明化并用中性树胶封片。通过显微镜观察脾脏组织结构变化及炎症细胞浸润等情况。

1.2.5 脾脏单个核细胞的分离 从感染 *L. major* 6 周的小鼠中取出脾脏并切成小块。再在含有胶原酶 II 和脱氧核糖核酸酶 I 的 Hank's 平衡盐溶液中消化 30 min; 消化完成后, 将消化液通过 100 μ m 筛网过滤, 以去除主要的组织碎片; 4 $^{\circ}$ C、1 400 r/min 离心 5 min, 使用红细胞裂解缓冲液以去除红细胞, 加入 PBS 至 15 mL 以终止反应。细胞在 4 $^{\circ}$ C 条件下离心 5 min 进行收集, 重复洗涤步骤 2 次。最后, 将细胞重悬在 1 mL PBS 中, 以便进行后续实验。

1.2.6 流式细胞术检测细胞变化 将脾脏的细胞悬液调整浓度为 $(1\sim2)\times10^6$ 个细胞/mL, 进行多色流式细胞染色。每管中入加含有流式抗体的 FACS Buffer 溶液 50 μ L: CD4 PerCP-Cy5.5 (1: 200)、CD8 α Pacific Blue (1: 200)、CD19 FITC (1: 300), 重悬, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min; 孵育结束后, 加入 1 mL FACS Buffer 重悬。离心 5 min, 弃上清液, 最后在每个流式管中加入 300 μ L FACS Buffer 重悬, 过滤后上机检测。

1.2.7 间接免疫荧光法检测 Arg-1、iNOS 的表达 脾脏组织样本经处理后, 石蜡包埋切片, 然后用免疫染色通透液 (Triton X-100) 进行通透处理。5% 的 BSA 室温封闭 1 h, 加入 Arg-1 (1: 200) 或 iNOS (1: 200) 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 次日, 室温下加入荧光标记二抗 (1: 500) 避光孵育 2 h, PBS 洗涤 3 次, DAPI 染色 5 min 后滴入抗荧光淬灭剂, 指甲油封片; 最后, 在荧光显微镜下观察并拍摄图像。

1.2.8 腹腔巨噬细胞的分离与培养 将 B6.WT 小鼠进行安乐死处理, 置于 75% 乙醇中浸泡 5 min 后转入超净台, 向小鼠腹腔内注射预冷的无菌 PBS 缓冲液 5 mL, 轻揉腹部约 1 min, 在下缘处用无菌注射器抽取腹腔液, 将抽取的液体收集至 15 mL 离心管中, 离心 10 min 后弃上清液, 用预冷的 RPMI 1640 全培养基重悬细胞沉淀, 将重悬后的细胞接种于培养瓶中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的细胞恒温培养箱中培养 2 h。结束后, 用 PBS 溶液洗去悬浮细胞, 余下的贴壁细胞即为小鼠原代腹腔巨噬细胞, 再用 RPMI 1640 培养基继续培养。保存时, 用含 10% DMSO 的冻存液重悬细胞, 分装至冻存管, 先置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中过夜, 然后转移至液氮罐中长期保存。

1.2.9 Griess 法检测 NO 含量 取出试剂 Griess Reagent I 和 II, 恢复室温, 用细胞培养液稀释标准品, 按每孔 50 μ L 在 96 孔板中加入标准品及样品, 再加入室温的 Griess Reagent I 和 Griess Reagent II, 50 μ L/孔, 室温下孵育 30 min, 使用分光光度计在 546 nm 波长下测定吸光度。通过标准曲线计算亚硝酸盐浓度, 进而推

算 NO 含量。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism V9.0 软件进行统计学处理，所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示，组间差异比较采用单因素方差分析和 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TNF- α 缺失导致小鼠在感染 *L. major* 后出现脾肿大 在感染前，两组小鼠的脾脏外观和重量无差异。在感染后第 42 天，B6.TNF^{-/-} 小鼠会出现严重的脾肿大，且脾脏颜色较暗；从感染后第 28 天开始，B6.TNF^{-/-} 小鼠的脾脏重量持续大于 B6.WT 小鼠，在第 42 天处死时脾脏重量超过 300 mg ($P < 0.05$)。相比之下，B6.WT 小鼠的脾脏重量则在感染 28 d 后恢复到感染前水平。见图 1。

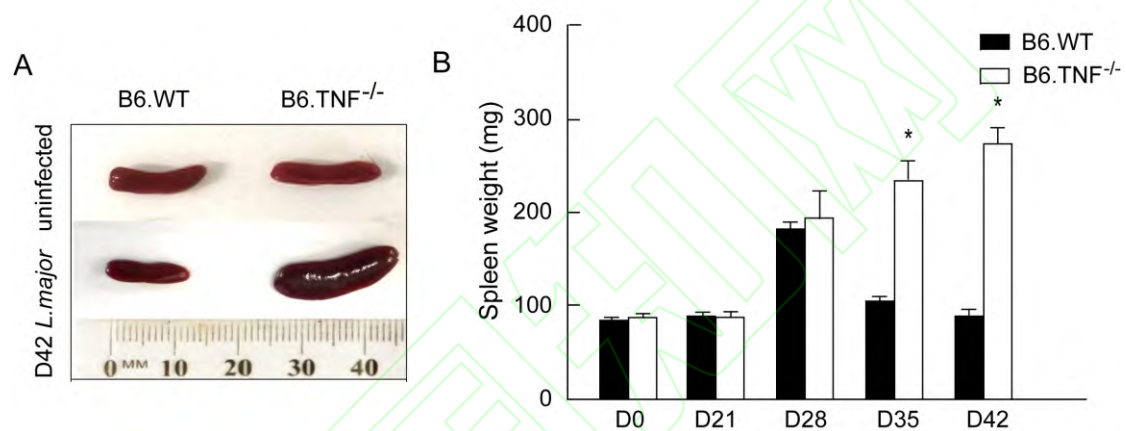


图 1 B6.WT 和 B6.TNF^{-/-} 小鼠脾脏感染情况 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 1 The infection of spleen in B6.WT and B6.TNF^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

A: The appearance of the spleens from uninfected and *L. major*-infected B6.WT and B6.TNF^{-/-} mice; B: The weight of the mouse spleens at different time points after infection; * $P < 0.05$ vs B6.WT.

2.2 小鼠脾脏组织的病理学变化 HE 染色结果显示，B6.TNF^{-/-} 的小鼠脾脏组织病理学发生了显著改变。在未感染的 B6.WT 和 B6.TNF^{-/-} 的小鼠中，脾脏结构完整，红髓和白髓界限清晰。但是在感染 42 d 后，与 B6.WT 小鼠相比，B6.TNF^{-/-} 小鼠脾脏结构紊乱，白髓界限模糊不清，甚至消失，各种炎性细胞浸润并分散于整个脾脏中。见图 2。

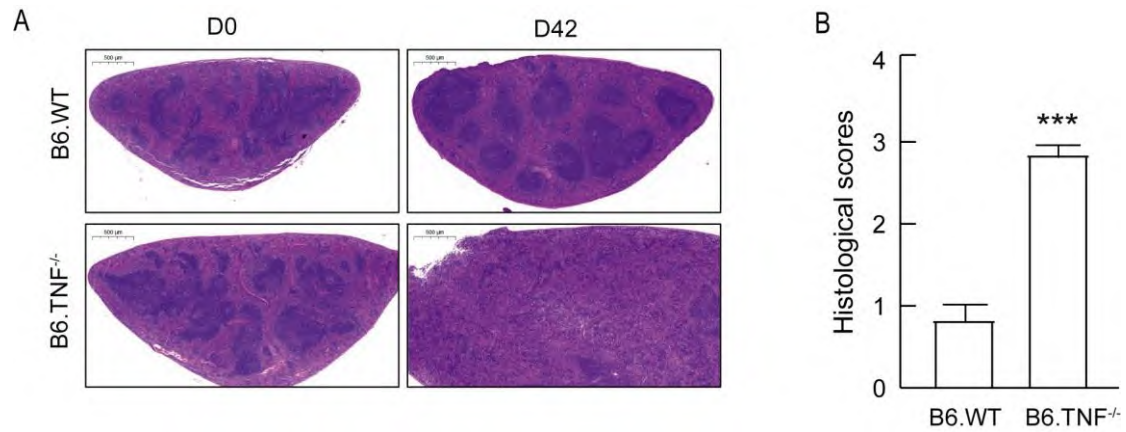


图 2 B6.WT 和 B6.TNF^{-/-}小鼠脾脏组织病理 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig.2 Histopathology of the spleen in B6.WT and B6.TNF^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

A: Representative pathological images of spleen tissue $\times 5$; B: Pathological change score of corresponding spleen tissue injury in mice; *** $P < 0.001$ vs B6.WT.

2.3 TNF- α 缺失后对感染 *L.major* 小鼠脾脏中淋巴细胞的影响 流式结果显示, 在 *L. major* 感染 42 d 后, T 细胞 (包括 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞) 和 B 细胞的比例在两组小鼠之间差异无统计学意义, 提示 TNF- α 的缺失对脾脏中 T 细胞和 B 细胞的比例无显著影响。见图 3。

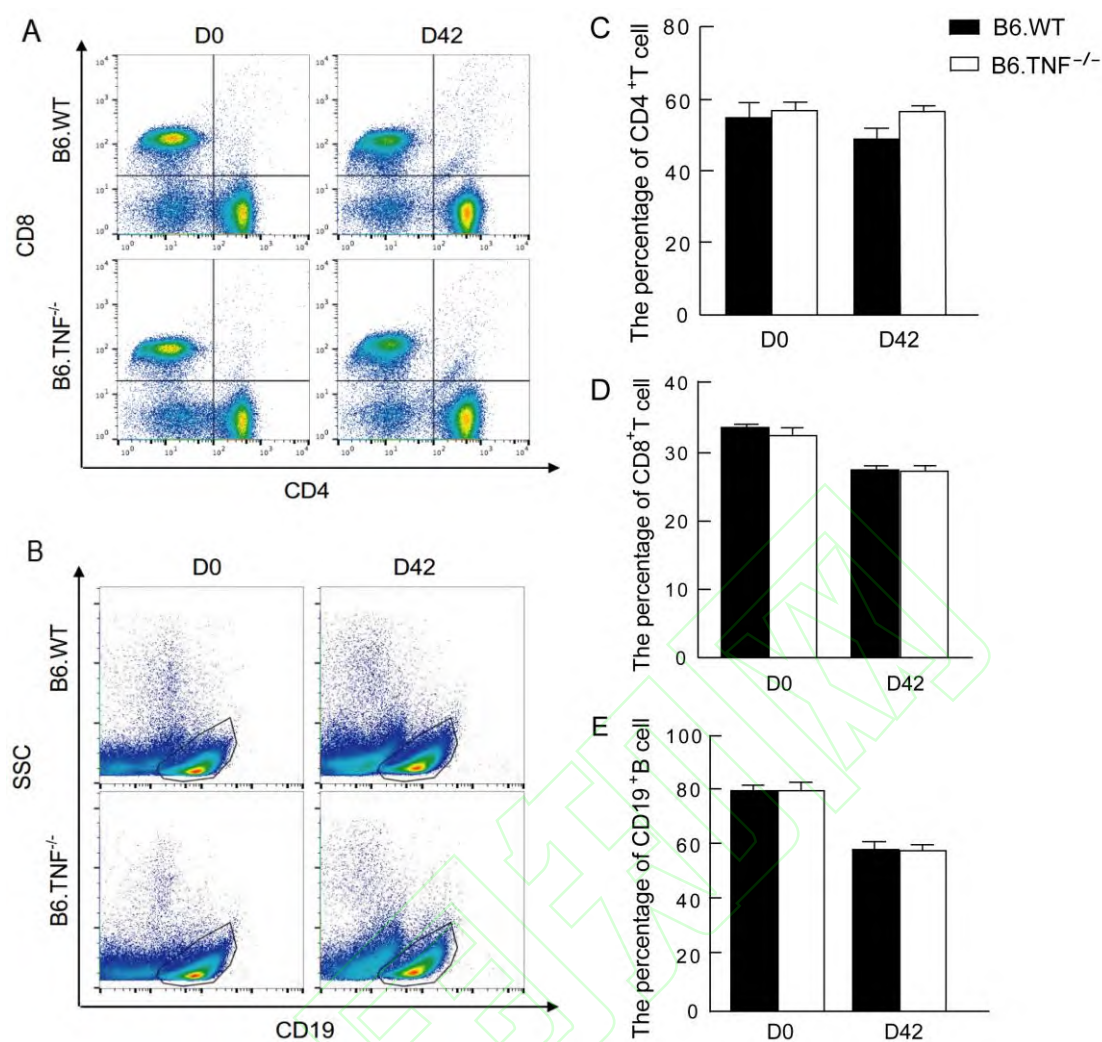


图 3 *L. major* 感染对小鼠脾脏 T 细胞和 B 细胞的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig.3 The impact of *L. major* infection on T cells and B cells in mouse spleen ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

A-C: Flow cytometric analysis of CD4⁺, CD8⁺T cells, and CD19⁺ B cell populations in B6.WT and B6.TNF^{-/-}; C-E: Corresponding statistical analysis of the flow cytometry data.

2.4 TNF- α 缺失的小鼠脾脏中巨噬细胞的变化 流式结果表明, 在感染利什曼原虫 42 d 后, 与 B6.WT 小鼠相比, B6.TNF^{-/-}小鼠脾脏组织中 CD11b 高表达, 提示小鼠感染 *L. major* 后, B6.TNF^{-/-}小鼠脾脏中单核细胞浸润增加 ($P < 0.001$)。免疫荧光染色发现, B6.TNF^{-/-}小鼠脾脏组织中 Arg-1 高表达, 提示 CD11b⁺ 细胞群可能为表达 Arg-1 的 M2 型巨噬细胞。同时, B6.WT 小鼠的脾脏中 iNOS 表达相对较强, B6.TNF^{-/-}小鼠的 iNOS 表达较弱且分散。这些结果提示, 在缺乏 TNF- α 的情况下, *L. major* 感染后 M2 型巨噬细胞产生少量的 NO。见图 4。

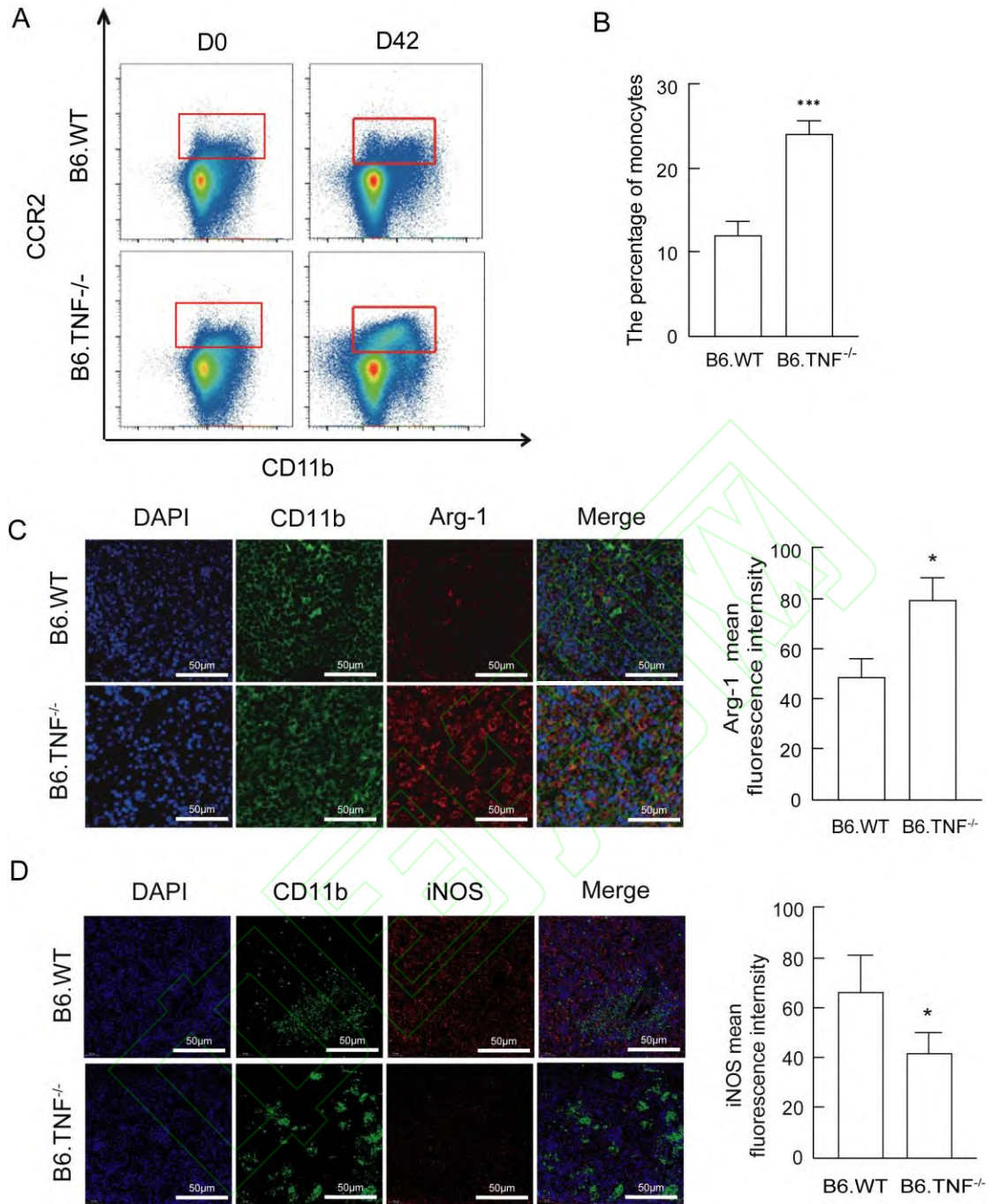


图 4 TNF- α 的缺失对感染利什曼原虫小鼠脾脏中巨噬细胞的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig .4 The impact of TNF- α deficiency on splenic macrophages in mice infected with *Leishmania*

($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

A, B: Flow cytometric analysis of splenic monocytes in B6.WT and B6.TNF^{-/-} mice and the corresponding statistical results; C: The detection of Arg-1 expression and MFI quantitative analysis $\times 200$; D: The detection of iNOS expression and MFI quantitative analysis $\times 200$; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs B6.WT.

2.5 TNF- α 对 *L. major* 感染腹腔巨噬细胞的影响 从 B6.WT 和 B6.TNF^{-/-} 小鼠中提取腹腔巨噬细胞，在 *L. major* 感染前分别加入外源性 TNF- α 和 TNF- α 抑制剂 Enbrel。通过对巨噬细胞内感染 *L. major* 的比例进行计数，结果表明，与对照组相比，TNF- α 抑制剂 Enbrel 处理后，巨噬细胞感染 *L. major* 比例明显上升，与来自 B6.TNF^{-/-} 小鼠的腹腔巨噬细胞感染相似，而且巨噬细胞胞内 *L. major* 虫体明显增多，巨噬细胞体积相对增大。相反，外源性 TNF- α 显著抑制了巨噬细胞感染，巨噬细胞感染比例降低，细胞内虫体数量减少 ($P < 0.01$)。NO 是参与对利什曼原虫免疫反应的关键分子，它由宿主细胞（特别是巨噬细胞）产生，NO 的产生可以通过测量其稳定代谢物，亚硝酸盐来评估。通过 Griess 试剂测定亚硝酸盐的结果表明，TNF- α 抑制剂 Enbrel 处理后，巨噬细胞产生 NO 的能力明显降低，而外源性 TNF- α 则可以促进 NO 的产生 ($P < 0.01$)。提示 TNF- α 对 NO 的影响可能是影响巨噬细胞感染的重要因素。见图 5。

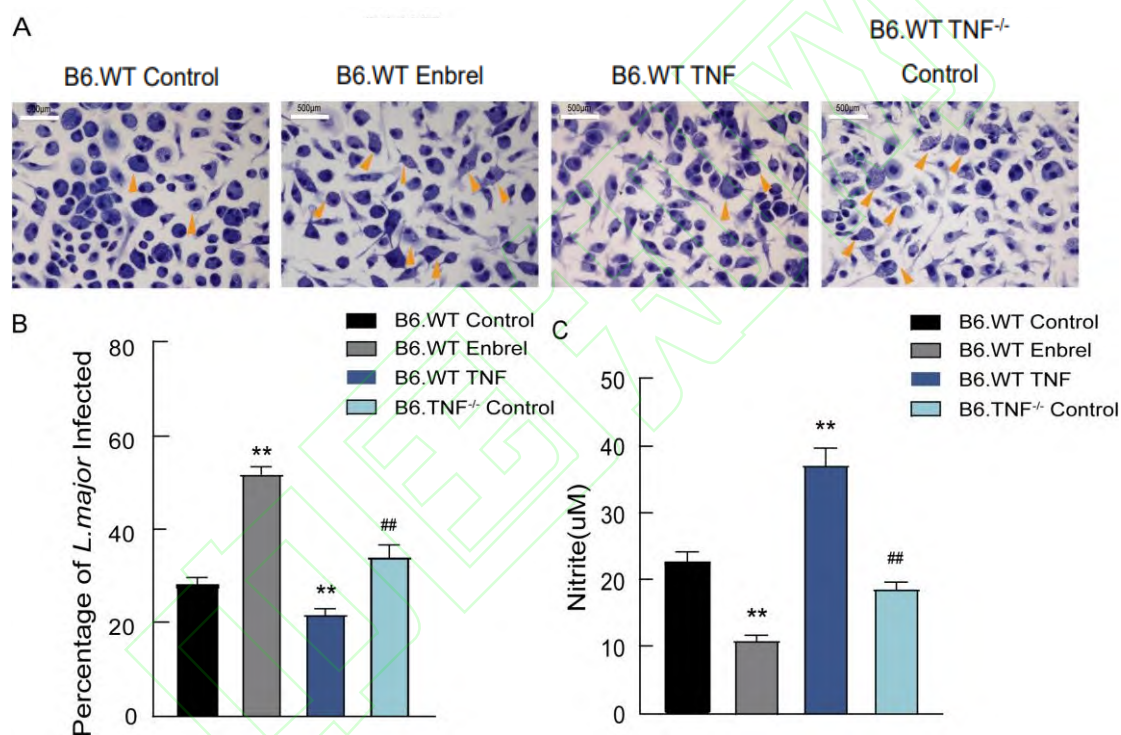


图 5 TNF- α 对 *L. major* 感染巨噬细胞的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig.5 The impact of TNF- α on macrophages infected by *L. major* ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

A: B6.WT and B6.TNF^{-/-} mouse peritoneal macrophages treated with Enbrel or TNF followed by *L. major* infection (arrows indicate *L. major*-infected macrophages) $\times 400$; B: Statistics of *L. major* infection in peritoneal macrophages; C: Detection of NO in peritoneal macrophages infected with *L. major* after the treatment with Enbrel or TNF- α using the griess reagent. ** $P < 0.01$ vs B6.WT Control, ## $P < 0.01$ vs B6.WT TNF.

3 讨论

利什曼病是一种由利什曼原虫感染引起的慢性传染病，TNF- α 在调控 Th1 免疫反应以及巨噬细胞的极化中发挥着不可或缺的作用。课题组前期研究^[6]发现，TNF- α 缺失后会导致皮肤利什曼原虫抵抗型小鼠皮肤感染弥散，淋巴结肿大，甚至出现致命的肝脏感染。然而，目前对 TNF- α 的缺失促进 *L. major* 传播的机制以及脾脏是否也会产生类似的影响尚不明确。因此，本研究重点探讨了 TNF- α 在巨大 *L. major* 感染中的作用及其机制。

巨噬细胞是 TNF- α 的主要来源之一，它们在受到病原体或炎症刺激时，能够分泌大量 TNF- α 。巨噬细胞在 *L. major* 感染中扮演着双重角色：一方面，它们作为寄生虫的主要宿主细胞，*L. major* 可以通过抑制溶酶体酸化及活性氧的生成等机制逃避巨噬细胞的杀伤作用，从而实现胞内增殖。另一方面，巨噬细胞可以通过吞噬和消化病原体，分泌细胞因子如 TNF- α 和 IL-12，激活 T 细胞并促进 Th1 型免疫反应，从而增强宿主对感染的抵抗力^[7]。巨噬细胞的活化一般可分为经典活化（M1）和替代性活化（M2）两种不同的类型。经典活化的巨噬细胞（M1 型巨噬细胞）由 Th1 细胞因子如 IFN- γ 诱导产生^[8]，释放促炎细胞因子和细胞毒性介质如 iNOS，有利于产生杀死 *L. major* 的活性物质 NO^[9]。而 Th2 型细胞因子（如 IL-4、IL-10 和 IL-13）导致了巨噬细胞的替代性激活（M2 型巨噬细胞），产生少量的 NO，有利于 *L. major* 生存^[10]。有研究^[11-12]表明，TNF- α 还可通过与其受体结合，激活 NF- κ B 信号通路，进而诱导 TIPE 家族蛋白 TIPE2 的表达，TIPE2 可以通过激活 PI3K/Akt 信号通路促进 M2 巨噬细胞分化，负调节免疫应答，抑制炎症反应。另外，PI3K/Akt 活性在寄生虫感染期间持续存在，并且能够激活 NF- κ B 转录抑制同源二聚体（p50/p50）、促进 M1 型巨噬细胞 iNOS 下调。

本研究发现 B6.TNF- α 小鼠在感染后第 42 天出现了脾脏肿大和重量增加，同时脾脏结构被破坏，白髓和红髓界限模糊不易检测，大量的免疫细胞分散在整个脾脏组织中。这表明 TNF- α 在维持和调节脾脏淋巴组织精细结构中具有重要作用。细胞介导的免疫反应在杀灭细胞内寄生虫方面发挥着重要作用，尤其是 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞。在 *L. major* 感染中，特异性 CD4⁺ T 细胞通过释放 IFN- γ ，能够有效抑制寄生虫在内脏利什曼病中的复制^[13]。研究^[14]表明，缺乏 TNF- α 基因的小鼠并未表现出 Th1 反应受损，反而显示出更强的 Th1 反应，如 T-box 转录因子 21 和 IFN- γ 水平增加。本研究也发现 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞比例无任何变化，因此，本研究重点关注固有免疫细胞，它们能够激活并驱动效应 Th1 反应，在寄生虫感染中的作用至关重要。本研究根据 CCR2 和 CD11b 标记发现 B6.TNF- α 小鼠在感染 *L. major* 后脾脏中的巨噬细胞表现出 M2 型巨噬细胞，这些细胞表达 Arg-1，它可以将精氨酸转化为鸟氨酸和尿素，这一过程与 iNOS 产生 NO 的过程竞争同一底物精氨酸^[15]，抑制了 NO 的合成。并通过体外实验发现 TNF- α 抑制剂 Enbrel 增强了巨噬细胞感染 *L. major* 的比例，同时减少了 NO 的产生，这会导致接受 TNF- α 抑制剂治疗的患者发生机会性感染和复发风险增加，因此，Enbrel 等 TNF- α 抑制剂的使用需要谨慎，特别是在利什曼原虫流行的地区。

综上所述，TNF- α 的缺失导致小鼠在感染利什曼原虫后发生不可控的脾脏感染，脾脏结构紊乱，各种

炎性单核细胞浸润。同时，增加的单核细胞表现为 M2 型巨噬细胞，产生少量的 NO，导致利什曼原虫的存在和疾病进展。这些结果表明，TNF- α 在调节巨噬细胞极化和功能中起着关键作用，可能为利什曼原虫病的治疗提供新的靶点。

参考文献

- [1] Veras P S T, de Santana M B R, Brodskyn C I, et al. Elucidating the role played by bone marrow in visceral leishmaniasis[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2023, 13: 1261074. doi: 10.3389/fcimb.2023.1261074.
- [2] Mor B, Gormez A, Demirci B. The role of complement system in a gerbil model of cutaneous leishmaniasis[J]. Mol Biochem Parasitol, 2025, 262: 111678. doi: 10.1016/j.molbiopara.2025.111678.
- [3] Elmahallawy E K, Alkhaldi A A M, Saleh A A. Host immune response against leishmaniasis and parasite persistence strategies: a review and assessment of recent research[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 139: 111671. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111671.
- [4] Kupani M, Pandey R K, Mehrotra S. Neutrophils and Visceral Leishmaniasis: impact on innate immune response and cross-talks with macrophages and dendritic cells[J]. J Cell Physiol, 2021, 236(4): 2255-67. doi: 10.1002/jcp.30029.
- [5] Li X, Chen C, Zhang L, et al. Absence of TNF leads to alternative activation in peritoneal macrophages in experimental *Listeria Monocytogenes* infection[J]. Immunol Investig, 2022, 51(4): 1005-22. doi: 10.1080/08820139.2021.1902346.
- [6] Hu S, Marshall C, Darby J, et al. Absence of tumor necrosis factor supports alternative activation of macrophages in the liver after infection with *leishmania major*[J]. Front Immunol, 2018,9:1. doi: 10.3389/fimmu.2018.00001.
- [7] Jang D I, Lee A H, Shin H Y, et al. The role of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in autoimmune disease and current TNF- α inhibitors in therapeutics[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(5): 2719. doi: 10.3390/ijms22052719.
- [8] Mohanty A, Vekariya V, Yadav S, et al. Natural phytochemicals reverting M2 to M1 macrophages: a novel alternative leishmaniasis therapy[J]. Microb Pathog, 2025, 200: 107311. doi: 10.1016/j.micpath.2025.107311.
- [9] Shirazian M, Taghipour N, Ahmad Akhavan A, et al. Expression pattern of ARG1 and iNOS genes in macrophages of *Rhombomys opimus*, BALB/c and C57BL/6 mice exposed to *Leishmania major* and salivary gland homogenates of *Phlebotomus papatasi*[J]. Exp Parasitol, 2024, 267: 108863. doi: 10.1016/j.exppara.2024.108863.
- [10] Volpedo G, Pacheco-Fernandez T, Bhattacharya P, et al. Determinants of innate immunity in visceral

leishmaniasis and their implication in vaccine development[J]. Front Immunol, 2021, 12: 748325. doi: 10.3389/fimmu.2021.748325.

[11] Roy S, Gupta A K, Banerjee M, et al. PD-1 negatively tunes macrophage immune activation by turning off JNK and STAT1 signaling: exploited by *Leishmania* for its intra-macrophage survival[J]. Cell Immunol, 2023, 391-392: 104758. doi: 10.1016/j.cellimm.2023.104758.

[12] Sethi J K, Hotamisligil G S. Metabolic Messengers: tumour necrosis factor[J]. Nat Metab, 2021, 3(10): 1302-12. doi: 10.1038/s42255-021-00470-z.

[13] McManus C M, Maizels R M. Regulatory T cells in parasite infections: susceptibility, specificity and specialisation[J]. Trends Parasitol, 2023, 39(7): 547-62. doi: 10.1016/j.pt.2023.04.002.

[14] Pesce B, Ribeiro C H, Larrondo M, et al. TNF- α affects signature cytokines of Th1 and Th17 T cell subsets through differential actions on TNFR1 and TNFR2[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(16): 9306. doi: 10.3390/ijms23169306.

[15] da Silva Bortoleti B T, Camargo P G, Gonçalves M D, et al. Effect of a thiohydantoin salt derived from l-Arginine on *Leishmania amazonensis* and infected cells: insights from biological effects to molecular docking interactions[J]. Chem Biol Interact, 2024, 403: 111216. doi: 10.1016/j.cbi.2024.111216.