

# IL-25 在旋毛虫 ES 抗原刺激小鼠小肠中的影响

何 灵<sup>1</sup>, 那皮沙·居热提<sup>1</sup>, 刘祥冉<sup>1</sup>, 白 杰<sup>2</sup>

**摘要:**目的 观察 IL-25 在旋毛虫 ES 抗原刺激小鼠小肠中的影响。方法 30 只 BALB/c 小鼠随机分为 3 组:空白对照组、旋毛虫排泄-分泌(ES)抗原刺激组与 IL-25 阻断组。空白对照组小鼠腹腔注射 PBS;ES 抗原刺激组小鼠腹腔注射旋毛虫 ES 抗原,每天 1 次,连续 7 d;IL-25 阻断组小鼠腹腔注射抗鼠的 IL-25 单克隆抗体 3 d 后,给予腹腔注射旋毛虫 ES 抗原。采用酶联免疫吸附法试验检测小鼠小肠组织匀浆 IL-25、IL-13、IL-4、IL-5 及 IL-33 水平变化,HE 染色镜下观察小肠病理变化以及用阿尔新蓝-核固红染色观察小肠杯状细胞数量变化情况。结果 与空白对照组比较,ES 抗原刺激组小鼠小肠组织匀浆 IL-25( $t=4.675, P<0.05$ )、IL-13( $t=5.392, P<0.05$ )、IL-4( $t=4.275, P<0.05$ )、IL-5( $t=4.675, P<0.05$ )、IL-33( $t=4.644, P<0.05$ )含量有升高,差异均有统计学意义。与 ES 抗原刺激组比较,IL-25 阻断组小鼠小肠组织 IL-25( $t=2.821, P<0.05$ )、IL-13( $t=2.344, P<0.05$ )、IL-4( $t=2.647, P<0.05$ )、IL-5( $t=3.268, P<0.05$ )、IL-33( $t=2.780, P<0.05$ )含量降低,差异均有统计学意义。**结论** 旋毛虫 ES 抗原刺激小鼠小肠黏膜可能经 IL-25/ILC2 途径产生免疫作用。

**关键词:** IL-25; 旋毛虫 ES 抗原; HE 染色

中图分类号:R383.1

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2022)03-0247-05

## Effects of IL-25 in the small intestine in mice stimulated with *Trichinella spiralis* ES antigen

HE Ling<sup>1</sup>, NA Pisha · jureti<sup>1</sup>, LIU Xiang-ran<sup>1</sup>, BAI Jie<sup>2</sup>

(1. College of Graduate, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China;

2. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

**Abstract:** This study aimed to observe the effects of IL-25 in the small intestine in mice stimulated with *Trichinella spiralis* ES antigen. A total of 30 BALB/c mice were randomly divided into three groups: control group, ES antigen stimulation group and IL-25 blocking group. The mice in the control group were injected intraperitoneally with PBS; the mice in the ES antigen stimulation group were injected intraperitoneally with ES antigen once per day for 7 consecutive days; and the mice in the IL-25 blocking group were injected intraperitoneally first with anti-mouse IL-25 monoclonal antibody and 3 days later with ES antigen. Enzyme-linked immunosorbent assays were used to detect the changes in the levels of IL-25, IL-13, IL-4, IL-5 and IL-33 in the mouse small intestine tissue homogenate. The pathological changes of the small intestine were observed with HE staining under a microscope; in addition, Alcian Blue-Nuclear fast red staining was used to observe the expression of small intestinal goblet cells. Compared with those in control group, the levels of IL-25 ( $t=4.675, P<0.05$ ), IL-13 ( $t=5.392, P<0.05$ ), IL-4 ( $t=4.275, P<0.05$ ), IL-5 ( $t=4.675, P<0.05$ ) and IL-33 ( $t=4.644, P<0.05$ ) in the small intestinal tissue homogenate of mice in the ES antigen stimulation group were higher. Compared with those in ES antigen stimulation group, the level of IL-25 ( $t=2.821, P<0.05$ ), IL-13 ( $t=2.344, P<0.05$ ), IL-4 ( $t=2.647, P<0.05$ ), IL-5 ( $t=3.268, P<0.05$ ) and IL-33 ( $t=2.780, P<0.05$ ) in the small intestine of mice in IL-25 blocking group were lower. *Trichinella spiralis* ES antigen stimulates the mucosa of the small intestine of mice to produce immune effects through the IL-25/ILC2 pathway.

**Keywords:** Interleukin-25; *Trichinella* ES antigen; HE staining

自治区区域协同创新专项-上海合作组织科技伙伴计划及国际科技合作计划(No.2020E01057)

通讯作者:白 杰,Email: 2250018725@qq.com;

ORCID:0000-0002-8973-2966

作者单位:1.新疆医科大学研究生院,乌鲁木齐 830011;

2.新疆医科大学药学院药理教研室,乌鲁木齐 830011

Supported by the Autonomous Region Regional Collaborative Innovation Project-Shanghai Cooperation Organization Science and Technology Partnership Program and International Science and Technology Cooperation Program(No.2020E01057)  
Corresponding author: Bai Jie, Email: 2250018725@qq.com

旋毛虫是一种可引起人兽共患病的组织线虫,是最大的细胞内寄生线虫<sup>[1]</sup>。旋毛虫病的临床症状复杂多样,表现为:恶心、呕吐、发热、腹泻等,病原诊断比较困难。宿主被感染的过程中虫体可产生各类抗原,其中排泄分泌(Excretory-secretory, ES)抗原,直接暴露于宿主免疫系统,是诱导宿主产生免疫应答反应的主要靶抗原<sup>[2]</sup>。而簇细胞作为一种占比较小的肠上皮细胞,在识别和响应寄生虫感染的过程中起着重要作用<sup>[3]</sup>。研究表明簇细胞能接收寄生虫感染信号,并释放细胞因子IL-25触发II型天然免疫反应,最终促进寄生虫驱逐出体内,将不利于寄生虫感染。

本实验通过旋毛虫肌幼虫ES抗原作用于健康小鼠小肠,观察IL-25对旋毛虫ES抗原刺激小鼠小肠一些相关细胞因子的表达情况。应用HE染色观察小鼠小肠病理变化,阿尔新蓝-核固红染色观察小鼠小肠杯状细胞表达情况以及用酶联免疫吸附试验检测小肠组织匀浆中IL-25、IL-13、IL-4、IL-5及IL-33的含量变化。探究旋毛虫与宿主天然免疫系统相互作用的机制,为临床旋毛虫病的防治和了解旋毛虫对宿主的感染机制提供新的思路。

## 1 材料与方法

**1.1 虫种** 本研究中所用的旋毛虫从黑龙江省动物源性人兽共患病重点实验室所获得<sup>[4]</sup>,保种在昆明小鼠体内。

**1.2 实验动物** SPF级6~8周龄雌性BALB/c小鼠,体重为18~22 g,共30只。均由新疆医科大学动物实验中心提供,生产许可证号:SCXK(新)2016-0003,使用许可证:SYXK(新)2016-0002。

**1.3 主要试剂和仪器** 小鼠IL-25、IL-13、IL-4、IL-5及IL-33检测试剂盒均购自上海将来实业股份有限公司,二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒购自索莱宝公司。切片机(德国徕卡公司),包埋机(常州中威电子仪器有限公司),组织脱水机(武汉天之瑞医疗科技有限公司),摊片烤片机(上海精密仪器仪表有限公司)。

**1.4 旋毛虫ES抗原的制备<sup>[5]</sup>** 取本实验室保种的旋毛虫小鼠,经口感染400条肌幼虫的昆明小鼠,45 d后剖杀,经人工胃液消化法获得旋毛虫肌幼虫,贝尔曼氏装置收集肌幼虫。收集的虫体用含双抗的灭菌生理盐水清洗5次,加入到1640培养基中,密度为5 000条/mL,37 °C 5% CO<sub>2</sub>培养48 h。收集培养液离心后将上清液装入透析袋中透析,然后用PEG 20000浓缩,所得ES抗原经0.22 μm滤器过

滤后应用SDS-PAGE进行检测,并测定蛋白含量,保存于-20 °C备用。

**1.5 动物实验分组<sup>[6]</sup>及取材** 30只BALB/c小鼠随机分为3组:空白对照组、旋毛虫排泄-分泌(ES)抗原刺激组与IL-25阻断组。空白对照组小鼠腹腔注射PBS;ES抗原刺激组小鼠腹腔注射旋毛虫ES抗原;IL-25阻断组小鼠腹腔注射抗鼠的IL-25单克隆抗体,3 d后,给予腹腔注射旋毛虫ES抗原,每天1次,连续7 d。各组小鼠于末次注射后禁食12 h(自由饮水)后处死小鼠,沿腹中线切开,暴露小鼠小肠,取小肠清洗,一部分用4%多聚甲醛固定,另一部分冻存于-80 °C。

**1.6 HE染色及阿尔新蓝-核固红染色<sup>[7]</sup>观察** 分离小肠,采集标本,取约2 cm的小肠组织,4%多聚甲醛固定、常规脱水,包埋切片后,分别进行HE染色和阿尔新蓝-核固红染色,在显微镜下观察小肠组织变化情况。

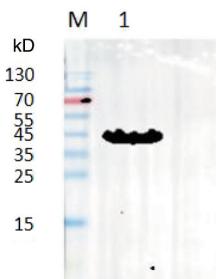
**1.7 ES抗原对小鼠小肠组织匀浆细胞因子的影响**

取小鼠小肠冻存组织1 g左右,用液氮研磨,再低温3 000 r/min、10 min离心,取上清分装冻存于-20 °C冰箱。按试剂盒要求检测小肠组织中IL-25、IL-13、IL-4、IL-5及IL-33含量。

**1.8 统计学处理** 数据分析采用SPSS22.0软件,计量资料用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。多组间样本比较采用单因素方差分析(ANOVA),方差齐时采用LSD法进行两两比较,以P<0.05表示差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 旋毛虫ES抗原的制备** 将收集的肌幼虫在1640培养基中培养,获取旋毛虫ES抗原,所得培养液经透析、浓缩、过滤并测定蛋白含量后,应用SDS-PAGE检测ES抗原的制备和收集情况,结果显示目的蛋白条带主要位于35~53 kD(图1),表明制备的ES抗原质量较好。



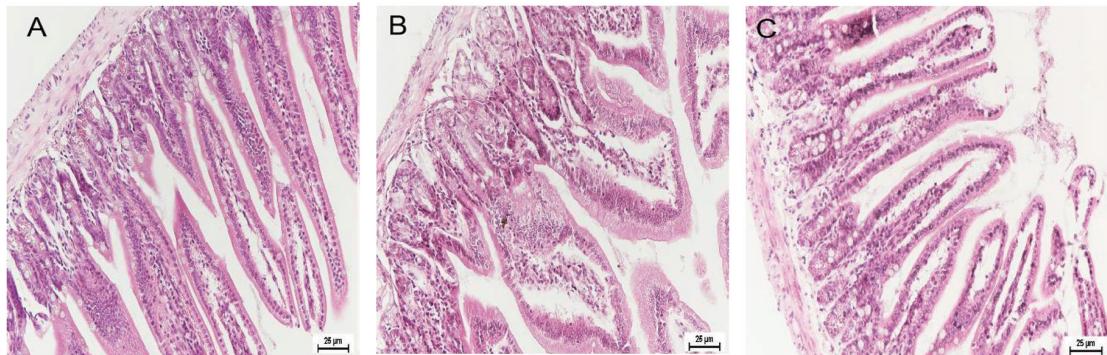
注:M为蛋白分子质量标准;1为ES抗原。

图1 旋毛虫ES抗原的SDS-PAGE分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of ES antigen

**2.2 小鼠小肠组织病理学观察结果** 显微镜下观察,对照组小鼠小肠组织结构清晰正常,小肠绒毛无肿胀排列整齐;与空白对照组相比,ES 抗原刺激组

小肠绒毛出现明显水肿现象,固有层水肿较轻;与空白对照组比较,IL-25 阻断组小肠绒毛有轻微的水肿现象,排列较整齐(图 2)。



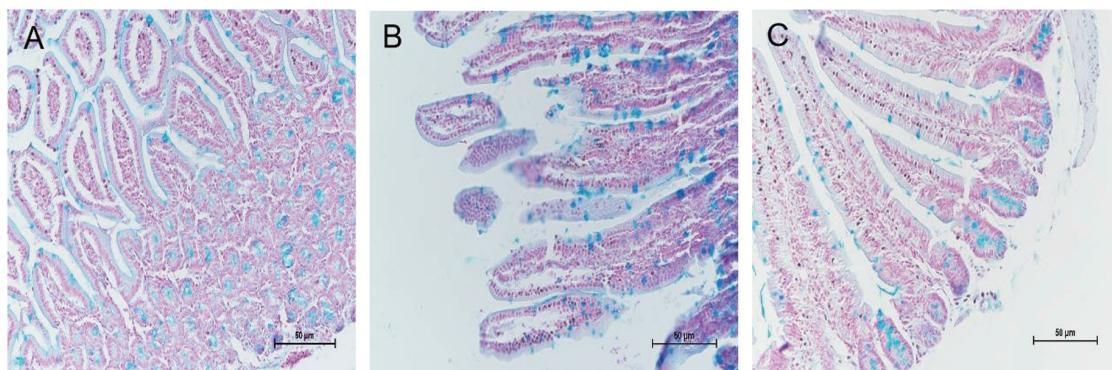
注:A 为空白对照组;B 为 ES 抗原刺激组;C 为 IL-25 阻断组。

图 2 小鼠小肠 HE 染色(HE,  $\times 200$ )

Fig.2 HE staining of mouse small intestine (HE,  $\times 200$ )

**2.3 旋毛虫 ES 抗原刺激小肠杯状细胞的变化** 小鼠小肠经阿尔新蓝染色显微镜下观察,与空白对照组相比,ES 抗原刺激组中酸性粘液较多,杯状细胞

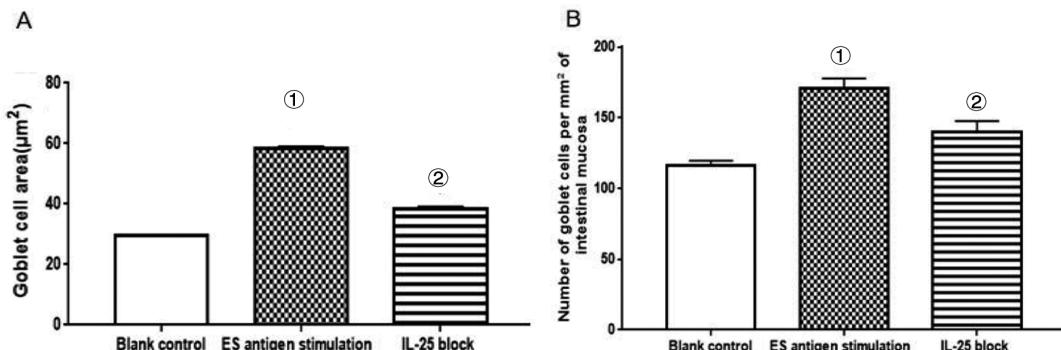
数量增多,且细胞体积变大;与 ES 抗原刺激组相比,IL-25 阻断组中酸性粘液较少,杯状细胞数量减少,且细胞体积相对变小(图 3、图 4)。



注:A 为空白对照组;B 为 ES 抗原刺激组;C 为 IL-25 阻断组。

图 3 小鼠小肠阿尔新蓝-核固红染色,小肠杯状细胞呈蓝色( $\times 400$ )

Fig.3 Mouse small intestine Alcian blue-nuclear fast red staining; small intestinal goblet cells are blue ( $\times 400$ )

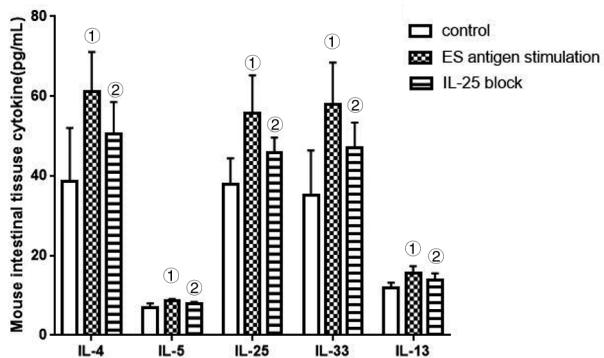


注:A 为各组小鼠小肠杯状细胞数量的对比;B 为各组小鼠小肠杯状细胞肥大的量化。①与空白对照组比较,  $P < 0.05$ ;②与 ES 抗原刺激组相比,  $P < 0.05$ 。

图 4 各组小鼠小肠杯状细胞表达情况

Fig.4 Expression of goblet cells in the small intestine in mice in each group

**2.4 ES 抗原对小鼠小肠组织细胞因子水平的影响**  
与空白对照组比较,ES 抗原刺激组小鼠小肠组织匀浆 IL-25( $t=4.675, P<0.05$ )、IL-13( $t=5.392, P<0.05$ )、IL-4( $t=4.275, P<0.05$ )、IL-5( $t=4.675, P<0.05$ )、IL-33( $t=4.644, P<0.05$ )含量升高,差异均有统计学意义。与 ES 抗原刺激组比较,IL-25 阻断组小鼠小肠组织 IL-25( $t=2.821, P<0.05$ )、IL-13( $t=2.344, P<0.05$ )、IL-4( $t=2.647, P<0.05$ )、IL-5( $t=3.268, P<0.05$ )、IL-33( $t=2.780, P<0.05$ )含量降低,差异均有统计学意义,见图 5 和表 1。



注:①与空白对照组比较, $P<0.05$ ;②与 ES 抗原刺激组相比, $P<0.05$ 。

图 5 各组小鼠小肠组织细胞因子含量表达情况

Fig.5 Expression of cytokines in the small intestine tissue in each group of mice

表 1 ES 抗原对小鼠小肠组织细胞因子的影响

Tab.1 Effects of ES antigen on cytokines in mouse small intestine tissue

单位: pg/mL

组别	IL-4	IL-5	IL-25	IL-33	IL-13
空白对照组	38.73±13.29	6.94±1.04	37.91±6.53	35.14±11.28	11.92±1.30
ES 抗原刺激组	61.17±9.95 <sup>①</sup>	8.64±0.49 <sup>①</sup>	55.42±9.88 <sup>①</sup>	57.84±10.57 <sup>①</sup>	15.62±1.74 <sup>①</sup>
IL-25 阻断组	50.47±8.03 <sup>②</sup>	7.93±0.48 <sup>②</sup>	45.99±3.74 <sup>②</sup>	46.96±6.45 <sup>②</sup>	13.76±1.80 <sup>②</sup>

注:①与空白组比较, $P<0.05$ ;②与 ES 抗原刺激组比较, $P<0.05$ 。

### 3 讨 论

旋毛虫在宿主体内的不同发育时期,均可以通过 ES 抗原与宿主免疫系统相互作用<sup>[8]</sup>。由于肌幼虫期是旋毛虫主要的致病时期,并且肌幼虫排泄分泌抗原较易制备,因此本实验选择旋毛虫肌幼虫 ES 抗原来探究 IL-25 对旋毛虫 ES 抗原刺激宿主小肠的影响。

2 型固有淋巴细胞(group 2 innate lymphoid cell, ILC2s)是一类不表达普通谱系标记物的表面标记物并分泌 2 型细胞因子(包括 IL-4, IL-5 和 IL-13)的天然淋巴细胞<sup>[9]</sup>。本实验用酶联免疫吸附实验检测小鼠小肠组织匀浆中的 IL-4、IL-5 和 IL-13,发现与对照组相比,用旋毛虫 ES 抗原刺激组中 IL-4、IL-5 和 IL-13 含量升高,说明在旋毛虫 ES 抗原刺激小鼠小肠中可能激活了部分 ILC2。其实 ILC2 作为固有免疫细胞的一员,激活后在肠道免疫中发挥着至关重要的作用,通过表达 IL-5 来调节其他免疫效应细胞发挥功能,如嗜酸性粒细胞、巨噬细胞等<sup>[10]</sup>,还可产生 IL-13 来刺激杯状细胞分泌粘液,有助于宿主肠道排出寄生虫,防止肠道被寄生虫感染。

ILC2s 作为 2 型淋巴反应的重要参与细胞,其与簇细胞之间的信号通路调节在寄生虫肠道感染中备受关注。例如,Christoph 等人发现巴西日圆线虫和螺旋线虫感染后均能触发肠道中 II 型天然免疫反应:簇细胞被寄生虫信号激活,释放 IL-25,作用到 ILC2 上,使得 ILC2 细胞数量增加并且释放 IL-13,IL-13 作用于干细胞,促使其分化成更多的簇细胞和杯状细胞,从而使免疫反应逐级增强,最终达到清除寄生虫的目的<sup>[11]</sup>。本实验用旋毛虫 ES 抗原刺激小鼠小肠,发现模型组小鼠小肠中 IL-25 和 IL-13 的含量升高,提示旋毛虫 ES 抗原可能激活簇状细胞上旋毛虫的信号源,从而使其释放 IL-25 和 IL-13。而且,我们用阿尔新蓝-核固红染色观察到经旋毛虫 ES 抗原刺激的小鼠小肠切片,酸性粘液较多,杯状细胞数量增加,细胞体积变大;当 IL-25 阻断组的小鼠小肠杯状细胞无明显变化,说明抑制 IL-25 可能会抑制 ILC2,导致 IL-25 和 IL-13 的含量相对较低。

IL-33 是一种组织来源的核细胞因子,在过敏和蠕虫感染时可促进 2 型免疫反应。暴露于迁徙的寄生线虫或鼻腔内应用甲壳素(寄生虫表皮的主要

物质),会触发肠道中 IL-33 的转录或释放<sup>[12]</sup>。研究表明,缺乏 IL-33 或 IL-33 受体 ST2 的小鼠在松材线虫(*Strongyloides venezuelensis*)、巴西日圆线虫(*Nippostrongylus brasiliensis*)和多形螺旋线虫(*Heligmosomoides polygyrus*)中表现出更高的肠道寄生虫负荷,从而确立了 IL-33 在宿主防御中的中心作用。在任何扰动情况下,ILC2 的激活都会响应从环境组织中释放的特定细胞因子,ILC2 对细胞因子 IL-25 和 IL-33 作出反应<sup>[13]</sup>。有研究表明 IL-33 诱导 ILC2 中的 GATA3 受体,再表达 IL-5 和 IL-13 刺激 Th2 的相关免疫。本实验研究的旋毛虫 ES 抗原刺激的小鼠小肠组织中 IL-33 表达含量较高,说明旋毛虫 ES 抗原刺激小鼠小肠可能会作用于 ILC2 中,从而诱导相关细胞因子和酸性粘液增加,使旋毛虫排出宿主肠道组织。本实验中 ES 抗原刺激组、IL-25 阻断组数据显示,IL-25 可影响小肠组织中 IL-25、IL-13、IL-4、IL-5 及 IL-33 含量,提示旋毛虫 ES 抗原可能激活簇状细胞,从而释放 IL-25 作用到 ILC2 细胞,分泌 IL-13 和酸性粘液及杯状细胞,产生免疫反应达到寄生虫排除宿主体内的目的。

综上,本实验结果证实旋毛虫 ES 抗原刺激小鼠小肠黏膜可能经 IL-25/ILC2 途径产生免疫作用,从而促使旋毛虫排出宿主体内。这可能与小肠组织中 IL-25、IL-13、IL-4、IL-5 及 IL-33 含量升高和小肠杯状细胞的增加有关。

#### 利益冲突:无

引用本文格式:何灵,那皮沙·居热提,刘祥冉,等. IL-25 在旋毛虫 ES 抗原刺激小鼠小肠中的影响[J]. 中国人兽共患病学报,2022,38(3):247-251. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2022.00.014

#### 参考文献:

- [1] Cui J, Han Y, Yue X, et al. Vaccination of mice with a recombinant novel cathepsin B inhibits *Trichinella spiralis* development, reduces the fecundity and worm burden[J]. Parasites Vector, 2019, 12(1): 1-12. DOI:10.1186/s13071-019-3833-9
- [2] 李晓云,韩彩霞,阴玥,等.旋毛虫 ES 抗原对小鼠腹腔巨噬细胞 NOD1 受体通路影响的研究[J].中国预防兽医学报,2019,41(1):80-84.
- [3] Grunddal KV, Tonack S, Egerod KL, et al. Adhesion receptor ADGRG2/GPR64 is in the GI-tract selectively expressed in mature intestinal tuft cells[J]. Mol Metab, 2021, 51:101231. DOI:10.1016/j.molmet.2021.101231
- [4] 于鹏成.应用 dsRNA 对旋毛虫 Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制剂基因功能的初步研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2020.
- [5] 袁圆,王黎源,梅娟,等.旋毛虫成虫排泄-分泌蛋白对卵清蛋白诱导的小鼠变应性鼻炎的保护作用[J].中国血吸虫病防治杂志,2019,31(5):504-509. DOI:10.16250/j.32.1374.2019069
- [6] 由涌. IL-33 诱导的 ILC2 能够通过促进 M2 巨噬细胞极化进而改善 Rag1 敲除小鼠的急性炎症性肠病[D].沈阳:中国医科大学,2020.
- [7] 罗晓翠.旋毛虫感染激活肠道簇细胞中苦味受体介导的信号通路[D].杭州:浙江大学,2020.
- [8] Ding J, Tang B, Liu X, et al. Excretory-secretory product of *Trichinella spiralis* inhibits tumor cell growth by regulating the immune response and inducing apoptosis [J]. Acta Trop, 2022, 225:106172. DOI:10.1016/j.actatropica.2021.106172
- [9] Boberg E, Johansson K, Malmhäll C, et al. Interplay between the IL-33/ST2 axis and bone marrow ILC2s in protease allergen-induced IL-5-dependent eosinophilia[J]. Front Immunol, 2020, 11:1058. DOI:10.3389/fimmu.2020.01058
- [10] Ochel A, Tiegs G, Neumann K. Type 2 Innate lymphoid cells in liver and gut: from current knowledge to future perspectives [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20 (8): 1896. DOI: 10.3390/ijms20081896
- [11] Christoph S, O'Leary CE, Jakob VM, et al. A Metabolite-triggered tuft cell-ILC2 circuit drives small intestinal remodeling[J]. Cell, 2018, 174(2): 271-284.e14. DOI:10.1016/j.cell.2018.05.014
- [12] Meiners J, Reitz M, Nikolas Rüdiger, et al. IL-33 facilitates rapid expulsion of the parasitic nematode *Strongyloides ratti* from the intestine via ILC2- and IL-9-driven mast cell activation[J]. PLoS Pathog, 2020, 16 (12): e1009121. DOI: 10.1371/journal.ppat.1009121
- [13] Osbourn M, Soares DC, Vacca F, et al. HpARI protein secreted by a helminth parasite suppresses interleukin-33[J]. Immunity, 2017, 47(4):739-751.e5. DOI:10.1016/j.immuni.2017.09.015

收稿日期:2021-11-30 编辑:张智芳