

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.17.020

包虫病患者血清中可溶性 Tim3/Galectin9 水平的表达及临床意义

范涛 胡振飞 戴晓雯 胡云 洪毅[△]

(新疆医科大学第一附属医院麻醉科 新疆 乌鲁木齐 830054)

摘要 目的:研究包虫病患者血清中可溶性 T 细胞免疫球蛋白及黏蛋白分子 3(Tim3)/ 半乳糖凝集素 9(Galectin9)水平的表达及临床意义。**方法:**选取 2015 年 2 月至 2016 年 12 月于我院接受治疗的包虫病患者 40 例作为包虫病组,另选取同期于我院接受体检的健康志愿者 40 例作为健康对照组,采用酶联免疫吸附法检测两组人员的血清 Tim3、Galectin9、 γ - 干扰素(IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素-6(IL-6)水平,并分析包虫病患者血清 Tim3、Galectin9 水平与 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-6 之间的相关性。**结果:**包虫病患者血清 Tim3、Galectin9 水平均明显高于健康对照组($P<0.05$)。包虫病患者血清 IFN- γ 、TNF- α 较健康对照组明显更低,而 IL-4、IL-6 水平较健康对照组明显更高($P<0.05$)。经 Pearson 相关性分析可得:包虫病患者血清 Tim3、Galectin9 水平与血清 IFN- γ 、TNF- α 均呈负相关关系,而与 IL-4、IL-6 水平均呈正相关关系($P<0.05$)。**结论:**包虫病患者血清可溶性 Tim3/Galectin9 水平异常升高,其主要作用机制可能与影响细胞因子 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-6 水平变化有关,在包虫病的发生、发展过程中起着重要的作用。

关键词:包虫病;Tim3;Galectin9;Th1/Th2 细胞;相关性

中图分类号:R532.32 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)17-3297-04

Expression of Soluble Tim3/Galectin9 in Serum of Patients with Hydatidosis and its Clinical Significance

FAN Tao, HU Zhen-fei, DAI Xiao-wen, HU Yun, HONG Yi[△]

(Department of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830054, China)

ABSTRACT Objective: To study the expression and clinical significance of soluble T cell immunoglobulin and mucin molecule 3 (Tim3) / galactose lectin 9 (Galectin9) in patients with hydatidosis. **Methods:** 40 patients with hydatid disease who were treated in our hospital from February 2015 to December 2016 were selected as hydatidosis group, another 40 healthy volunteers who underwent physical examination in our hospital were selected as healthy control group in the same period, the serum levels of Tim3, Galectin9, interferon- γ (IFN- γ), tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin -4 (IL-4) and interleukin -6 (IL-6) levels were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in the two groups, and the relationship between Tim3, Galectin9 and IFN- γ , TNF- α , IL-4 and IL-6 level were analyzed. **Results:** The levels of serum Tim3 and Galectin9 in hydatidosis group were significantly higher than those in healthy control group ($P<0.05$). The levels of serum IFN- γ and TNF- α in hydatidosis group were lower than those in healthy control group, but the levels of IL-4 and IL-6 were significantly higher than those in healthy control group ($P<0.05$). Pearson correlation analysis showed that the serum levels of Tim3 and Galectin9 were negatively correlated with serum IFN- γ and TNF- α , but positively correlated with the levels of IL-4 and IL-6 ($P<0.05$). **Conclusion:** Serum soluble Tim3/Galectin9 levels are abnormally elevated in patients with hydatidosis, the main mechanism may be related to the changes of cytokines IFN- γ , TNF- α , IL-4 and IL-6 levels, which play important role in the occurrence and development of echinococcosis.

Key words: Hydatidosis; Tim3; Galectin9; Th1/Th2 cell; Correlation

Chinese Library Classification(CLC): R532.32 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)17-3297-04

前言

包虫病又称之为棘球蚴病,是由细粒棘球绦虫的幼虫寄生在人畜等中间宿主中所引发的一种人畜共患病^[1-3]。有研究报道显示^[4-6],Th1/Th2 细胞失衡在细粒棘球绦虫感染过程中发挥着至关重要的作用,表现为感染初期以 Th1 型介导的细胞免疫为

主,机体对病原体在宿主体内的生长以及致病性会产生一定程度的抑制作用。感染中后期则逐渐转变为 Th2 型介导的体液免疫为主,通过免疫抑制或免疫耐受,从而使得机体无法及时有效地清除病原体,进一步促使病原体于宿主体内长期生存、发育^[7-9]。而 T 细胞免疫球蛋白及黏蛋白分子 3(Tim3)在免疫应答过程中具有抑制性调节作用,可有效调节 T 细胞凋亡以及免疫

作者简介:范涛(1978-),男,硕士,主治医师,从事围术期血液保护、脏器功能保护与调控方面的研究,E-mail:ekxtm4@163.com

[△] 通讯作者:洪毅(1962-),男,硕士,主任医师,从事器官移植的麻醉药代动力学方面的研究,E-mail:iuxtvk@163.com

(收稿日期:2017-11-25 接受日期:2017-12-21)

耐受过程^[10-12]。半乳糖凝集素 9(Galectin9)属于 Tim3 的配体,两者存在密切关系,且其在急性炎症以及慢性炎症等一系列疾病中均发挥着至关重要的作用^[13-15]。为进一步研究包虫病患者血清中可溶性 Tim3/Galectin9 水平的表达及临床意义,笔者进行了对照试验,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2015 年 2 月至 2016 年 12 月于我院接受治疗的包虫病患者 40 例作为包虫病组。纳入标准:(1)所有患者均有棘球蚴接触史,经临床检查、实验室检查以及影像学检查确诊为包虫病,且包虫诊断金标法呈阳性;(2)患者初次接受手术治疗,术后半年内无复发。排除标准:(1)慢性感染性疾病或其他肝胆系统相关疾病者;(2)近期服用过影响免疫功能药物者。其中男 27 例,女 13 例,年龄 22~58 岁,平均年龄(36.53±7.54)岁。另取同期于我院接受体检的健康人员 40 例作为健康对照组。纳入标准:(1)均无酗酒史;(2)近期未服用影响免疫功能药物者。排除标准:(1)由其他病毒或细菌导致的慢性感染性疾病者;(2)患有肝胆系统相关性疾病者。其中男 25 例,女 15 例,年龄 23~59 岁,平均年龄(36.71±7.48)岁。两组人员的性别、年龄比较均无统计学差异($P>0.05$),组间存在可比性。两组人员均签署了知情同意书,且本研究经我院伦理委员会批准。

1.2 方法

分别采集两组人员清晨空腹静脉血 5 mL,均于 37℃ 环境中促凝 30 min,随后以 3500 r/min 离心 10 min,离心半径 6 cm,取上清液保存于 -80℃ 冰箱中待检。应用双抗体夹心酶联免疫吸附法测定血清 Tim3、Galectin9、 γ -干扰素(Interferon- γ 、IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-4(Interleukin-4, IL-4)、白细胞介素-6(Interleukin-6, IL-6)水平,试剂盒(武汉贝茵莱生物科技有限公司提供),严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.3 观察指标

分别比较包虫病组与健康对照组的血清 Tim3、Galectin9、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-6 水平,并分析包虫病患者 Tim3、Galectin9 水平与 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-6 之间的相关性。

1.4 统计学方法

本研究数据均采用 SPSS25.0 软件进行检测分析,临床资料等计数资料以率表示,采用 χ^2 检验,计量资料以均数标准差($\bar{x} \pm s$)表示,实施 t 检验,其中相关性分析采用 Pearson 相关性分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 包虫病组与健康对照组血清 Tim3、Galectin9 水平对比

包虫病组患者血清 Tim3、Galectin9 水平均明显高于健康对照组($P<0.05$)。见表 1。

表 1 包虫病组与健康对照组血清 Tim3、Galectin9 水平对比($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of serum Tim3 and Galectin9 levels between the hydatidosis group and the healthy control group($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	Tim3(pg/ml)	Galectin9(ng/ml)
Hydatidosis group	40	372.54±25.66	4.62±0.38
Healthy control group	40	237.59±36.23	2.14±0.22
t	-	19.224	4.129
P	-	0.000	0.008

2.2 包虫病组与健康对照组血清 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-6 水平对比

包虫病组患者血清 IFN- γ 、TNF- α 水平较健康对照组明显

更低,而 IL-4、IL-6 水平较健康对照组明显更高($P<0.05$)。见表 2。

表 2 包虫病组与健康对照组血清 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-6 水平对比($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

Table 2 Comparison of serum IFN- γ , TNF- α , IL-4 and IL-6 levels between the hydatidosis group and the healthy control group($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

Groups	n	IFN- γ	TNF- α	IL-4	IL-6
Hydatidosis group	40	2.84±0.25	2.12±0.14	4.53±0.14	10.32±3.23
Healthy control group	40	3.95±0.18	5.43±0.22	2.86±0.10	6.14±1.78
t	-	-2.908	-4.738	4.558	6.120
P	-	0.032	0.000	0.000	0.000

2.3 包虫病患者血清 Tim3、Galectin9 与 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-6 相关性分析

经 Pearson 相关性分析可得:包虫病患者血清 Tim3、Galectin9 水平与血清 IFN- γ 、TNF- α 均呈负相关关系,而与 IL-4、IL-6 水平均呈正相关关系($P<0.05$)。见表 3。

3 讨论

包虫病属于人畜共患性疾病之一,在我国牧区具有较高的发病率。该病潜伏期可达 5~30 年,患者发病初期症状无特异性,临床患者均因上腹肿块症状被诊断发现^[16,17]。目前,手术治

表 3 包虫病患者血清 Tim3、Galectin9 水平与血清 IL-4、IL-12、TNF- α 、IFN- γ 水平相关性分析Table 3 Correlation of serum Tim3 and Galectin9 levels with serum IL-4, IL-12, TNF- α , IFN- γ levels in patients with hydatidosis

Indexs	Tim3		Galectin9	
	r	P	r	P
IFN- γ	-0.464	0.028	-0.521	0.008
TNF- α	-0.587	0.000	-0.591	0.000
IL-4	0.603	0.000	0.592	0.000
IL-6	0.543	0.000	0.534	0.000

疗及药物治疗为临床上治疗该病主要方式,两者的弊端表现在手术治疗难度系数大,而药物治疗服药周期长,若不及时给予有效治疗,患者 10 年病死率可高达 94%^[18]。因此,寻找一种治疗包虫病的有效方式,对改善患者预后意义重大。随着近年来相关研究报道的不断深入,国内外不少学者发现^[19-21],Th1/Th2 细胞反应性失衡在包虫病的发生、发展过程中发挥着重要的作用。研究发现,棘球蚴可以通过干扰 Th1/Th2 细胞平衡,产生免疫抑制或免疫耐受,促使病原体于宿主体内长期生存、发育^[13]。Tim3 是 Tim 家族激活诱导的异质性受体,其在免疫应答过程中具有抑制性调节作用;同时其也可通过结合配体 Galectin9,即可提供一种负性的刺激信号给 T 细胞,使 CD4⁺、CD8⁺T 细胞凋亡速度加快,最终在调节免疫动态平衡、炎症反应中发挥至关重要的作用^[22-24]。

本研究通过包虫病患者和健康志愿者血清 Tim3 和 Galectin9 水平对比发现,包虫病患者血清 Tim3、Galectin9 水平均明显高于健康对照组 ($P<0.05$)。提示包虫病患者血清 Tim3、Galectin9 水平明显更高。分析其原因,Tim3 主要是在分化成熟的 Th1 细胞上有所表达,且具有对免疫应答抑制性调节的作用,主要可通过对 T 细胞的活化以及增殖对免疫应答进行调控^[25]。而 Galectin9 广泛存在于多种细胞中,属于可溶性糖蛋白之一,主要黏附于细胞膜上,可诱发胸腺细胞以及外周 CD4⁺、CD8⁺ 细胞的凋亡,并在免疫细胞的动态平衡、炎症反应中发挥作用^[26]。另有研究报道显示^[27-28],Galectin9 可与活化的 Th1 型细胞表面表达的 Tim3 分子的糖基侧链相结合,使 Tim3 阳性 Th1 型细胞的凋亡速度加快。因此,本研究结果提示了血清 Tim3 以及 Galectin9 可能在包虫病的发生、发展过程中起着至关重要的作用。临床工作中可通过对上述指标表达水平进行检测,从而有利于尽早确诊包虫病。从两组血清 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-6 水平比较来看,包虫病患者血清 IFN- γ 、TNF- α 较健康对照组明显更低,而 IL-4、IL-6 水平较健康对照组明显更高($P<0.05$)。推测主要与棘球蚴干扰 Th1/Th2 细胞平衡有关,其中 IFN- γ 、TNF- α 是由 Th1 细胞表达,对 Th1 以及 Th2 细胞生长发育产生了决定性影响,IFN- γ 可诱导 Th0 向 Th1 细胞分化,进一步诱导 Th1 细胞分泌 TNF- α 。而 IL-4、IL-6 主要由 Th2 细胞表达,可诱导 Th0 向 Th2 细胞分化,同时有效抑制 Th1 细胞的增殖分化^[29]。IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-6 影响着 Th1 与 Th2 细胞之间的互相调节,可使机体免疫系统的维持稳定。而当上述指标水平出现异常时,Th1/Th2 细胞的相对平衡遭到破坏,从而使机体局部、全身的免疫以及病理状态产生一定程度的影响^[30]。另外,经 Pearson 相关性分析可得:包虫病患者血清

Tim3、Galectin9 水平与血清 IFN- γ 、TNF- α 均呈负相关关系,而与 IL-4、IL-6 水平均呈正相关关系,提示 Tim3、Galectin9 可能通过调节 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-6 水平参与了包虫病的免疫调控。然而,本文研究缺陷体现在样本量较少,可能导致研究结果产生小幅度的偏倚。因此,在今后的研究中我们可通过扩大样本量来获取更为准确、可信的数据。另外,临床工作中可能通过对可溶性 Tim3/Galectin9 水平进行有效的控制,进一步达到临床治疗包虫病患者目的。这为我们今后的研究提供了方向,且该研究将会更好的展开包虫病的防治工作,具有极其重要的意义。

综上所述,可溶性 Tim3/Galectin9 水平在包虫病的发生、发展过程中起着至关重要的作用,其中主要作用机制可能与影响细胞因子 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-6 水平变化有关,通过促进 Th1/Th2 细胞失衡,进一步达到促进感染持续性发展的作用,而临床上可以通过对可溶性 Tim3/Galectin9 的检测,为包虫病的诊断提供依据。

参考文献(References)

- [1] Peker KD, Gumusoglu AY, Seyit H, et al. Prevention of Postoperative Bile Leak in Partial Cystectomy for Hydatid Liver Disease: Tricks of the Trade [J]. Journal of Gastrointestinal Surgery, 2015, 19 (12): 2228-2234
- [2] Ricken FJ, Nell J, Grüner B, et al. Albendazole increases the inflammatory response and the amount of Em2-positive small particles of Echinococcus multilocularis (spems) in human hepatic alveolar echinococcosis lesions [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2017, 11 (5): e0005636
- [3] Manterola C, Otzen T. Hepatic Echinococcosis with Thoracic Involvement Clinical Characteristics of a Prospective Series of Cases[J]. Ann Hepatol, 2017, 16(4): 599-606
- [4] Basyigit S, Sapmaz F, Bora F, et al. Eosinophilic Peritonitis Caused by Echinococcus granulosus in a Patient Receiving Maintenance Peritoneal Dialysis[J]. Ther Apher Dial, 2016, 20(1): 92-93
- [5] Pan W, Chen DS, Lu YJ, et al. Genetic diversity and phylogenetic analysis of EG95 sequences of Echinococcus granulosus: Implications for EG95 vaccine application[J]. Asian Pac J Trop Med, 2017, 10(5): 524-527
- [6] Talaat RM, Ali NM, Elwakil HS. Impact of Schistosoma mansoni and Echinococcus granulosus experimental coinfection on interleukin 10 and interferon gamma cytokines profile [J]. Exp Parasitol, 2013, 134 (4): 474-481
- [7] 陈晓英,王苏布江·赛提瓦,伊斯拉音·乌斯曼,等.新疆克孜勒苏柯

- 尔克孜自治州细粒棘球蚴病流行病学调查[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2016, 34(5): 409-413
- Chen Xiao-ying, Yusupjan ·Setiwaldi, Yisilayin ·Osman, et al. Epidemiological Studies on Echinococcosis in Kizilsu Kirgiz Autonomous Prefecture of Xinjiang [J]. Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases, 2016, 34(5): 409-413
- [8] Ran B, Shao Y, Guo Y, et al. Surgical treatment of hepatic cystic echinococcosis in patients co-infected with HIV/AIDS [J]. J Helminthol, 2016, 90(1): 125-128
- [9] Sayar S, Olmez S, Avcioglu U, et al. A retrospective analysis of endoscopic treatment outcomes in patients with postoperative bile leakage [J]. Northern Clinics of Istanbul, 2016, 3(2): 104
- [10] Wu J, Lin G, Zhu Y, et al. Low TIM3 expression indicates poor prognosis of metastatic prostate cancer and acts as an independent predictor of castration resistant status[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 8869
- [11] Luo LH, Li DM, Wang YL, et al. Tim3/galectin-9 alleviates the inflammation of TAO patients via suppressing Akt/NF-kB signaling pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 491(4): 966-972
- [12] Patel R, Kim K, Shutinoski B, et al. Culling of APCs by inflammatory cell death pathways restricts TIM3 and PD-1 expression and promotes the survival of primed CD8 T cells [J]. Cell Death Differ, 2017, 24(11): 1900-1911
- [13] Tadokoro T, Morishita A, Sakamoto T, et al. Galectin 9 ameliorates fulminant liver injury[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(1): 36-42
- [14] Meggyes M, Lajko A, Palkovics T, et al. Feto-maternal immune regulation by TIM-3/galectin-9 pathway and PD-1 molecule in mice at day 14.5 of pregnancy[J]. Placenta, 2015, 36(10): 1153-1160
- [15] Nakakita S, Itoh A, Nakakita Y, et al. Cooperative Interactions of Oligosaccharide and Peptide Moieties of a Glycopeptide Derived from IgE with Galectin-9[J]. J Biol Chem, 2016, 291(2): 968-979
- [16] Shalayiadang P, Muzaffar I, YuspYimit, et al. Comparison of post-operative short-term and long-term outcomes between occult and frank biliary rupture of hydatid disease [J]. Hepato-gastroenterology, 2014, 61(130): 431-435
- [17] Huseyin Y, Mustafa S, Ilhan E, et al. A New Approach to the Complicated Liver Hydatid Cyst-Laparoscopic Roux-Y Cystojejunostomy [J]. Prague Medical Report, 2015, 116(3): 233
- [18] Hizem A, M'rad S, Oudni-M'rad M, Mestiri S, et al. Molecular genotyping of Echinococcus granulosus using formalin-fixed paraffin-embedded preparations from human isolates in unusual tissue sites [J]. J Helminthol, 2016, 90(4): 417-421
- [19] Santos GB, Monteiro KM, da Silva ED, et al. Excretory/secretory products in the Echinococcus granulosus metacestode: is the intermediate host complacent with infection caused by the larval form of the parasite[J]. Int J Parasitol, 2016, 46(13-14): 843-856
- [20] 黄士波,米圆圆,刘爱琴,等.肝包虫病的诊断现状及进展[J].现代生物医学进展, 2016, 16(4): 797-800
- Huang Shi-bo, Mi Yuan-yuan, Liu Ai-qin, et al. The Status and Progression in the Diagnosis of Hepatic Echinococcosis [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2016, 16(4): 797-800
- [21] Akkucuk S, Aydogan A, Ugur M, et al. Comparison of surgical procedures and percutaneous drainage in the treatment of liver hydatid cysts:a retrospective study in an endemic area[J]. Int J Clin Exp Med, 2014, 7(8): 2280-2285
- [22] Li YH, Zhou WH, Tao Y, et al. The Galectin-9/Tim-3 pathway is involved in the regulation of NK cell function at the maternal-fetal interface in early pregnancy[J]. Cell Mol Immunol, 2016, 13(1): 73-81
- [23] Rabal O, Pastor F, Villanueva H, et al. In Silico Aptamer Docking Studies: From a Retrospective Validation to a Prospective Case Study-TIM3 Aptamers Binding [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2016, 5(10): e376
- [24] Jayaraman P, Jacques MK, Zhu C, et al. TIM3 Mediates T Cell Exhaustion during Mycobacterium tuberculosis Infection [J]. PLoS Pathog, 2016, 12(3): e1005490
- [25] Bu M, Shen Y, Seeger WL, et al. Ovarian carcinoma-infiltrating regulatory T cells were more potent suppressors of CD8 (+) T cell inflammation than their peripheral counterparts, a function dependent on TIM3 expression[J]. Tumour Biol, 2016, 37(3): 3949-3956
- [26] Madireddi S, Eun SY, Lee SW, et al. Galectin-9 controls the therapeutic activity of 4-1BB-targeting antibodies [J]. J Exp Med, 2014, 211(7): 1433-1448
- [27] Ungerer C, Quade-Lyssy P, Radeke HH, et al. Galectin-9 is a suppressor of T and B cells and predicts the immune modulatory potential of mesenchymal stromal cell preparations [J]. Stem Cells Dev, 2014, 23(7): 755-766
- [28] Ju Y, Shang X, Liu Z, et al. The Tim-3/galectin-9 pathway involves in the homeostasis of hepatic Tregs in a mouse model of concanavalin A-induced hepatitis[J]. Mol Immunol, 2014, 58(1): 85-91
- [29] Liu C, Li M, Cao S, et al. Effects of HV-CRRT on PCT, TNF- α , IL-4, IL-6, IL-8 and IL-10 in patients with pancreatitis complicated by acute renal failure[J]. Exp Ther Med, 2017, 14(4): 3093-3097
- [30] 沈海幸,万亚锋,杨祺俊,等.腹腔镜手术与开腹手术对重症急性胰腺炎患者外周血 T 淋巴细胞亚群及 Th1Th2 的影响比较[J].中国生化药物杂志, 2017, 37(2): 305-307
- Shen Hai-xing, Wan Ya-feng, Yang Qi-jun, et al. Comparison of effects of laparoscopic operation and open operation for the peripheral blood T lymphocyte subsets and Th1 Th2 of patients with severe acute pancreatitis[J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2017, 37(2): 305-307