doi:10.11659/jjssx.08E025055

·基础研究·

吲哚胺2,3-双加氧酶1上调促进骨包虫组织浸润和免疫逃逸的机制研究

吴秀凯,杜彩梅,麻俊超,何佳奇,谢增如 (新疆医科大学第一附属医院创伤骨科,新疆 乌鲁木齐 830054)

[摘 要] **目的** 探讨吲哚胺2,3-双加氧酶1(IDO1)上调促进骨包虫病(BHD)组织浸润和免疫逃逸的分子机制。**方法** 免疫荧光染色检测手术切除的BHD囊肿组织和膝关节骨关节炎(OA)组织中M2表型巨噬细胞表面标志物CD206和CD163的表达以及IDO1的表达。*Pearson*相关系数法分析BHD组织中每视野下$CD206^+CD163^+$巨噬细胞和$IDO1^+$细胞数量的相关性。体外培养人单核细胞白血病细胞系THP1,诱导THP1细胞向M2表型极化,并在诱导处理中添加包虫抗原B(EgB)。细胞分组1:Control组、EgB处理组,CCK-8法测定各组细胞增殖能力。细胞分组2:M0诱导-Control组、M1诱导-Control组、M2诱导-Control组、M0诱导-EgB处理组、M1诱导-EgB处理组、M2诱导-EgB处理组,使用RT-qPCR法测定CD68、F4/80、转化生长因子β1(TGF-β1)、CD86和CD163 mRNA的表达水平;Western blot检测M2诱导-Control组、M2诱导-EgB处理组细胞中IDO1和TGF-β1蛋白表达。细胞分组3:M2诱导-Control组、M2诱导-EgB处理组、M2诱导-EgB+shRNA-IDO1组、M2诱导-EgB+shRNA-NT组、M2诱导-EgB+OE-IDO1组、M2诱导-EgB+vector组,RT-qPCR法测定细胞中CD68和CD163 mRNA的表达水平,Western blot检测细胞中IDO1、TGF-β1、细胞程序性死亡蛋白-1(PD-1)、磷酸肌醇3-激酶(PI3K)、p-PI3K、蛋白激酶B(Akt)、p-Akt、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)和p-mTOR表达。**结果** 与OA组织相比,BHD组织中每视野下$IDO1^+$细胞数、$CD206^+CD163^+$巨噬细胞数显著增加($P<0.05$)。*Pearson*相关系数法分析结果显示,每视野下$IDO1^+$细胞数与该视野下$CD206^+CD163^+$巨噬细胞数呈正相关($r=0.933\ 1$,$P<0.01$)。与Control组相比,EgB处理组THP1细胞增殖能力增强($P<0.01$)。与M0诱导-Control组相比,M0诱导-EgB处理组M0表型极化标志物CD68和F4/80 mRNA表达水平升高($P<0.01$);与M2诱导-Control组相比,M2诱导-EgB处理组M2表型极化标志物CD68和CD163 mRNA表达水平升高($P<0.01$);M1诱导-Control组和M1诱导-EgB处理组TNF-α和CD86 mRNA表达水平无统计差异($P>0.05$)。与M2诱导-Control组相比,M2诱导-EgB处理组IDO1、TGF-β1、PD-1蛋白表达水平,p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR水平均升高($P<0.05$)。与M2诱导-EgB处理组相比,M2诱导-EgB+shRNA-IDO1组CD68和CD163 mRNA表达水平,IDO1、TGF-β1、PD-1蛋白表达水平,p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR水平均降低($P<0.05$);M2诱导-EgB+OE-IDO1组CD68和CD163 mRNA表达水平,IDO1、TGF-β1、PD-1蛋白表达水平,p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR水平均升高($P<0.05$)。**结论** EgB能够增强IDO1的表达,刺激巨噬细胞向M2表型极化并激活TGF-β1、PD-1、PI3K/Akt/mTOR等信号通路,介导形成骨包虫感染时的免疫抑制微环境。

[关键词] 骨包虫病;M2表型巨噬细胞;吲哚胺2,3-双加氧酶1;免疫逃逸;包虫抗原B

[中图分类号] R532.32 [文献标志码] A [收稿日期] 2025-08-12

Mechanism of upregulated indoleamine 2,3-dioxygenase 1 in promoting tissue infiltration and immune evasion of bone hydatid disease

WU Xiu-kai, DU Cai-mei, MA Jun-chao, HE Jia-qi, XIE Zeng-ru (Department of Traumatic Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi Xinjiang 830054, China)

Abstract: Objective To explore the molecular mechanisms of upregulated indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) in promoting tissue infiltration and immune evasion of bone hydatid disease (BHD). **Methods** Immunofluorescence staining was used to detect the expression of surface markers CD206 and CD163 on M2 phenotype macrophages, as well as IDO1 expression in the surgically resected BHD cyst tissues and knee osteoarthritis (OA) tissues. *Pearson* correlation analysis was conducted to analyze the correlation between the number of $CD206^+CD163^+$ macrophages and $IDO1^+$ cells per visual field in BHD tissues. The human monocyte leukemia cell line THP1 was cultured in vitro. THP1 cells were induced to polarize towards the M2 phenotype, and the hydatid cyst fluid native antigen B (EgB) was added during the induction process. For cell experiment Group 1, cells were divided into the Control group, the EgB-treated group. CCK-8 assay was used to detect the cell proliferation ability. For cell experiment Group 2, cells were divided into the M0-induced-Control group, the M1-induced-Control group, the M2-induced-Control group, the M0-induced-EgB-treated group, the M1-induced-EgB-treated group, and the M2-induced-EgB-treated group. RT-qPCR was used to detect the mRNA expression levels of CD68, F4/80, transforming growth factor-β1 (TGF-β1), CD86, and CD163. Western blot was used to detect the protein expression levels of IDO1 and TGF-β1 in the M2-induced-

[基金项目] 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2021D01D19)

[通信作者] 谢增如,E-mail:5677457@163.com

Control group and the M2-induced-EgB-treated group. For cell experiment Group 3, cells were divided into the M2-induced-Control group, the M2-induced-EgB-treated group, the M2-induced-EgB+shRNA-IDO1 group, the M2-induced-EgB+shRNA-NT group, the M2-induced-EgB+OE-IDO1 group, and the M2-induced-EgB+vector group. RT-qPCR was used to detect the mRNA expression levels of CD68 and CD163 in cells. Western blot was used to detect the expression levels of IDO1, TGF-β1, programmed cell death protein 1 (PD-1), phosphoinositol 3-kinase (PI3K), p-PI3K, protein kinase B(Akt), p-Akt, mammalian target of rapamycin(mTOR) and p-mTORin cells. **Results** Compared with OA tissues, the numbers of $IDO1^+$ cells and $CD206^+CD163^+$ macrophages per visual field in BHD tissues were significantly increased ($P<0.05$). *Pearson* correlation analysis results showed that the number of $IDO1^+$ cells per visual field was positively correlated with the number of $CD206^+CD163^+$ macrophages per visual field ($r=0.933\ 1$, $P<0.01$). Compared with the Control group, the proliferation ability of THP1 cells in the EgB-treated group was enhanced ($P<0.01$). Compared with the M0-induced-Control group, the mRNA expression levels of M0 phenotype polarization markers CD68 and F4/80 in the M0-induced-EgB-treated group were increased ($P<0.01$). Compared with the M2-induced-Control group, the mRNA expression levels of M2 phenotype polarization markers CD68 and CD163 in the M2-induced-EgB-treated group were increased ($P<0.01$). There was no statistically significant difference in the mRNA expression levels of TNF-α and CD86 between the M1-induced-Control group and the M1-induced-EgB-treated group ($P>0.05$). Compared with the M2-induced-Control group, the protein expression levels of IDO1, TGF-β1, and PD-1, as well as the ratios of p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, and p-mTOR/mTOR in the M2-induced-EgB-treated group were increased ($P<0.05$). Compared with the M2-induced-EgB-treated group, the mRNA expression levels of CD68 and CD163, the protein expression levels of IDO1, TGF-β1, and PD-1, and the ratios of p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, and p-mTOR/mTOR in the M2-induced-EgB+shRNA-IDO1 group were all decreased ($P<0.05$); while the mRNA expression levels of CD68 and CD163, the protein expression levels of IDO1, TGF-β1, and PD-1, and the ratios of p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, and p-mTOR/mTOR in the M2-induced-EgB+OE-IDO1 group were all increased ($P<0.05$). **Conclusion** EgB can enhance the expression of IDO1 to stimulate the polarization of macrophages toward the M2 phenotype, and activate the TGF-β1, PD-1, PI3K/Akt/mTOR signaling pathways, thereby mediating the formation of immunosuppressive microenvironment during bone echinococcosis infection.

Keywords: bone hydatid disease; M2 phenotype macrophage; indoleamine 2,3-dioxygenase 1; immune evasion; hydatid cyst fluid native antigen B

囊性棘球绦虫病(cystic echinococcosis,CE)感染骨骼可引发骨包虫病(bone hydatid disease,BHD),其患病率占所有CE的0.5%~4.0%[1],好发于脊柱、骨盆、股骨、胫骨等部位[2]。BHD感染多起于侵袭阻力较小的松质骨和长管骨的干垢端,在松质骨骨道形成多个囊肿,CT影像可见“虫蛀状”“鼠洞状”改变[3-4],其组织病理学特征类似癌变增生,且不伴有新骨形成[5]。骨包虫囊肿在松质骨中的逐步浸润及其免疫逃逸机制是目前该领域的研究重点。巨噬细胞是一种异质性的先天性髓样细胞群体,具有高度的可塑性,能够极化为炎症性M1表型或抗炎性M2表型巨噬细胞[6]。其中M2表型巨噬细胞可参与免疫抑制[7]。吲哚胺2,3-双加氧酶1(indoleamine 2,3-dioxygenase 1,IDO1)可刺激淋巴细胞上调细胞程序性死亡蛋白-1(programmed cell death protein 1,PD-1)的表达,进而形成免疫抑制性微环境[8]。本研究拟联合分析手术切除的骨包虫囊肿组织和体外细胞实验,深入探讨包虫抗原B(hydatid cyst fluid native antigen B,EgB)和IDO1促进巨噬细胞向M2表型极化的作用以及二者在包虫向骨侵袭过程中参与介导免疫抑制微环境的相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人单核细胞白血病细胞系THP1购自武汉普诺赛生命科技有限公司。抗IDO1(批号:12-72378-11)、CD68(批号:35-24758-09)、CD163(批号:14-28356-17)一抗,FITC-标记山羊抗小鼠IgG二抗(批号:24-13825-39)、Alexa Fluor 594-标记山羊抗小鼠IgG二抗(批号:43-27639-32);转化生长因子β1(transforming growth factor-β1,TGF-β1;批号:34-48362-71)、PD-1(批号:52-35821-31)、磷酸肌醇3-激酶(phosphoinositol 3-kinase,PI3K;批号:18-336443-72)、p-PI3K(批号:44-494762-28)、蛋白激酶B(protein kinase B,Akt;批号:33-483853-65)、p-Akt(批号:57-15624-43)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin,mTOR;批号:29-241967-34)、p-mTOR(批号:19-426718-26)、GAPDH(批号:83-416373-55)一抗,HRP-标记山羊抗小鼠IgG二抗(批号:31-70339-52)购自赛默飞世尔科技(上海)有限公司。EgB(批号:K31428-01)购自上海科梦达生物科技有限公司。脂多糖(lipopolysaccharide,LPS;批号:258-33-926)、人白细胞介素-4(interleukin-4,IL-4;批号:362-77-594)、佛波酯(phorbol myristate

acetate,PMA;批号269-73-548)购自默克化工技术(上海)有限公司。CCK-8检测试剂盒(批号:001-CK-7954)购自北京兰博利德商贸有限公司。

1.2 临床样本

收集我院病理科2016年至2024年经手术治疗的16例BHD患者的骨包虫囊肿组织(BHD组织),经福尔马林固定、石蜡包埋。BHD患者中男10例,女6例;年龄(47.6±12.3)岁;感染部位:肩胛骨(2例),股骨(7例),骶骨(2例),髂骨(1例),脊椎骨(4例);病程(4.1±1.2)年;骨包虫囊肿组织包虫抗体检测:Anti EgCF-Ab阳性细胞数21.26个,Anti EgP-Ab阳性细胞数20.17个,Anti EgB-Ab阳性细胞数23.31个,Anti Em2-Ab阳性细胞数26.43个。同时选取我院行手术治疗的16例膝关节骨关节炎(osteoarthritis,OA)患者的膝关节组织样本(OA组织)。本研究经我院伦理委员会审核批准(批准号:K201509-18)。

1.3 免疫荧光染色

OA组织和BHD组织石蜡切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化处理后,在EDTA修复液中煮沸10 min进行抗原修复。切片自然冷却,滴加10%山羊血清,室温封闭30 min;滴加0.1% Triton X-100室温处理10 min。随后向切片滴加IDO1(1∶400)、CD68(1∶400)、CD163(1∶400)一抗,4 ℃避光孵育过夜;次日,滴加FITC-标记抗小鼠IgG二抗(1∶600)、Alexa Fluor 594-标记抗小鼠IgG二抗(1∶600),室温孵育1 h。DAPI染色液染细胞核,中性树胶封片。倒置荧光显微镜下观察和拍照,并计数每视野下IDO1$^+$细胞数和该视野下CD206$^+$CD163$^+$巨噬细胞数。

1.4 细胞培养、分组和处理

THP1细胞培养于含10%胎牛血清和10 U/mL青-链霉素的完全RPMI 1640培养液中,置于5% CO_2、37 ℃恒温湿润的细胞孵育箱中培养。

细胞分组1:Control组(细胞不做任何处理)、EgB处理组(细胞培养物中滴加EgB抗原50 ng/mL处理48 h)。

细胞分组2:M0诱导-Control组、M1诱导-Control组、M2诱导-Control组,细胞分别进行M0、M1或M2表型极化诱导;M0诱导-EgB处理组、M1诱导-EgB处理组、M2诱导-EgB处理组,细胞分别进行M0、M1或M2表型极化诱导,并滴加EgB抗原(50 ng/mL)联合处理48 h。

细胞分组3:M2诱导-Control组、M2诱导-EgB处理组、M2诱导-EgB+shRNA-IDO1组(M2表型极化诱导并滴加EgB抗原50 ng/mL后,转染shRNA-IDO1慢病毒)、M2诱导-EgB+shRNA-NT组(M2表型极化诱导并滴加EgB抗原50 ng/mL后,转染shRNA-NT慢病毒)、M2诱导-EgB+OE-IDO1组(M2表型极化诱导并滴加EgB抗原50 ng/mL后,转染OE-IDO1慢病毒)、M2诱导-EgB+vector组(M2表型极化诱导并滴加EgB抗原50 ng/mL后,转染空载慢病毒)。

THP1细胞向不同表型巨噬细胞极化的诱导:于细胞培养物中加入100 ng/mL PMA诱导处理48 h,诱导THP1细胞向M0表型巨噬细胞极化。于细胞培养物中加入100 ng/mL PMA和100 ng/mL LPS诱导处理48 h,诱导THP1细胞向M1表型巨噬细胞极化。于细胞培养物中加入100 ng/mL PMA和20 ng/mL IL-4诱导处理48 h[8],诱导THP1细胞向M2表型巨噬细胞极化。

细胞转染:采用慢病毒载体pSLenti-CMV-EGFP-3xFLAG-WPRE介导IDO1的过表达(OE-IDO1),空载体慢病毒为vector。IDO1的开放阅读框扩增引物正向5′-GAGGAGCAGACTACAAGAATG-3′,反向5′-TAGTCCCAGCTACTCGGGAG-3′。采用慢病毒载体pCLenti-U6-shRNA-CMV-EGFP-WPRE介导IDO1的敲低表达(shRNA-IDO1)。shRNA-IDO1序列5′-GGCAAAGGTCATGGAGATGTC-3′,shRNA-IDO1的对照(shRNA-NT)序列5′-GCGTCACAATGCTATTGAAGC-3′。慢病毒颗粒的包装实验委托和元生物技术(上海)股份有限公司完成,慢病毒颗粒的感染滴度为9.98×10^9 TU/mL。

1.5 RT-qPCR

对细胞分组2和细胞分组3的细胞进行检测。每皿6孔板细胞培养物中加入1 mL TRIzol裂解液裂解细胞。使用RNA Easy Fast动物组织/细胞总RNA提取试剂盒提取总RNA。使用FastKing cDNA第一链合成试剂盒(去基因组)反转录合成cDNA,并用FastFire快速荧光定量PCR预混试剂(SYBR Green)进行RT-qPCR反应。M0表型巨噬细胞标志物为CD68和F4/80;M1表型巨噬细胞标志物为肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor α,TNF-α)和CD86;M2表型巨噬细胞标志物为CD68和CD163[11]。RT-qPCR扩增引物序列见表1。

表1 RT-qPCR引物序列

引物		引物序列(5′-3′)
CD68	正向	CATGGAAATGCCACGGTTC
	反向	CTAGCCCAACCTCCAAGGAGA
F4/80	正向	CCGTAACCTTGCACTGTGAG
	反向	TACAGGTGCCAGAGAGGTCTC
TNF-α	正向	GGGGGCCCCAGGGCTCCAGGC
	反向	GTTCCCCAGGGACCTCTCTC
CD86	正向	TTCTATGGAAATGGAAGAAG
	反向	GCGTGTTTTTAAAAGTTCG
CD163	正向	GAGTCAGCTCTTTGGGATTG
	反向	CGCGTGGAGGGAATATGTG
GAPDH	正向	CTTTTAACTCTGGTAAAGTGG
	反向	CATGGCACCGTCAAGGCTGAG

1.6 CCK-8法

采用CCK-8检测试剂盒,按照说明书的操作测定450 nm波长处吸光值(A 450 nm),以评估细胞的增殖能力。

1.7 Western blot

取细胞分组2、3中的细胞,每皿6孔板细胞培养物中加入1 mL RIPA裂解液裂解细胞。提取总蛋白,常规进行SDS-PAGE凝胶电泳,采用半干电转印法转至PVDF膜上。采用5%脱脂奶粉封闭膜室温下封闭1 h。膜上滴加一抗工作液,4 ℃避光孵育过夜;次日,滴加二抗工作液,室温孵育1 h。采用ECL化学发光底物对目的条带进行显影。抗体工作液稀释度如下:IDO1(1∶1 500)、TGF-β1(1∶1 500)、PD-1(1∶1 500)、p-PI3K(1∶1 500)、PI3K(1∶2 000)、p-Akt(1∶1 500)、Akt(1∶2 000)、p-mTOR(1∶1 500)、mTOR(1∶2 000)、GAPDH(1∶1 500)一抗;HRP-标记IgG二抗(1∶6 000)。

1.8 统计学方法

采用GraphPad v10软件进行统计学处理。计量数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,2组间比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差分析(*one way ANOVA*),组间两两比较采用事后*Turkey's*检验。*Pearson*相关系数法分析IDO1$^+$细胞数与CD206$^+$CD163$^+$巨噬细胞数的相关性。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BHD组织中IDO1$^+$细胞数和CD206$^+$CD163$^+$巨噬细胞数呈正相关

免疫荧光染色结果显示,与OA组织相比,BHD组织中每视野下IDO1$^+$细胞数显著增加(P<0.05);与OA组织相比,BHD组织中每视野下CD206$^+$CD163$^+$巨噬细胞数显著增加(P<0.05),且在IDO1$^+$细胞数量较多的视野中CD206$^+$CD163$^+$巨噬细胞数量也较多(P<0.05),见图1a、b。*Pearson*相关性分析结果显示,每视野下IDO1$^+$细胞数与该视野下CD206$^+$CD163$^+$巨噬细胞数呈正相关(r=0.933 1,P<0.01),见图1c。这提示BHD组织中IDO1$^+$细胞和CD206$^+$CD163$^+$巨噬细胞存在共定位情况,IDO1$^+$细胞可能招募了CD206$^+$CD163$^+$巨噬细胞在周围组织大量浸润。

2.2 EgB处理后巨噬细胞向M2表型极化

CCK-8法结果显示,与Control组相比,EgB处理组THP1细胞增殖能力增强(P<0.05),见图2a。RT-qPCR法结果显示,与M0诱导-Control组相比,M0诱导-EgB处理组M0表型极化标志物CD68和F4/80 mRNA表达水平升高(P<0.05);与M2诱导-Control组相比,M2诱导-EgB处理组M2表型极化标志物CD68和CD163 mRNA表达水平升高(P<0.05);M1诱导-Control组和M1诱导-EgB处理组TNF-α和CD86 mRNA表达水平无统计差异(P>0.05),见图2b~d。

2.3 EgB处理后巨噬细胞中IDO1、TGF-β1表达上调

Western blot检测结果显示,与M2诱导-Control组相比,M2诱导-EgB处理组IDO1和TGF-β1蛋白表达水平升高(P<0.05),见图3。

2.4 敲低/过表达IDO1对EgB处理后对M2表型巨噬细胞极化的影响

Western blot结果显示,与M2诱导-Control组相比,M2诱导-EgB处理组IDO1的表达水平升高(P<0.05);与M2诱导-EgB+shRNA-NT组相比,M2诱导-EgB+shRNA-IDO1组IDO1的表达水平降低(P<0.05);与M2诱导-EgB+vector组相比,M2诱导-EgB+OE-IDO1组IDO1的表达水平升高(P<0.05),见图4a。

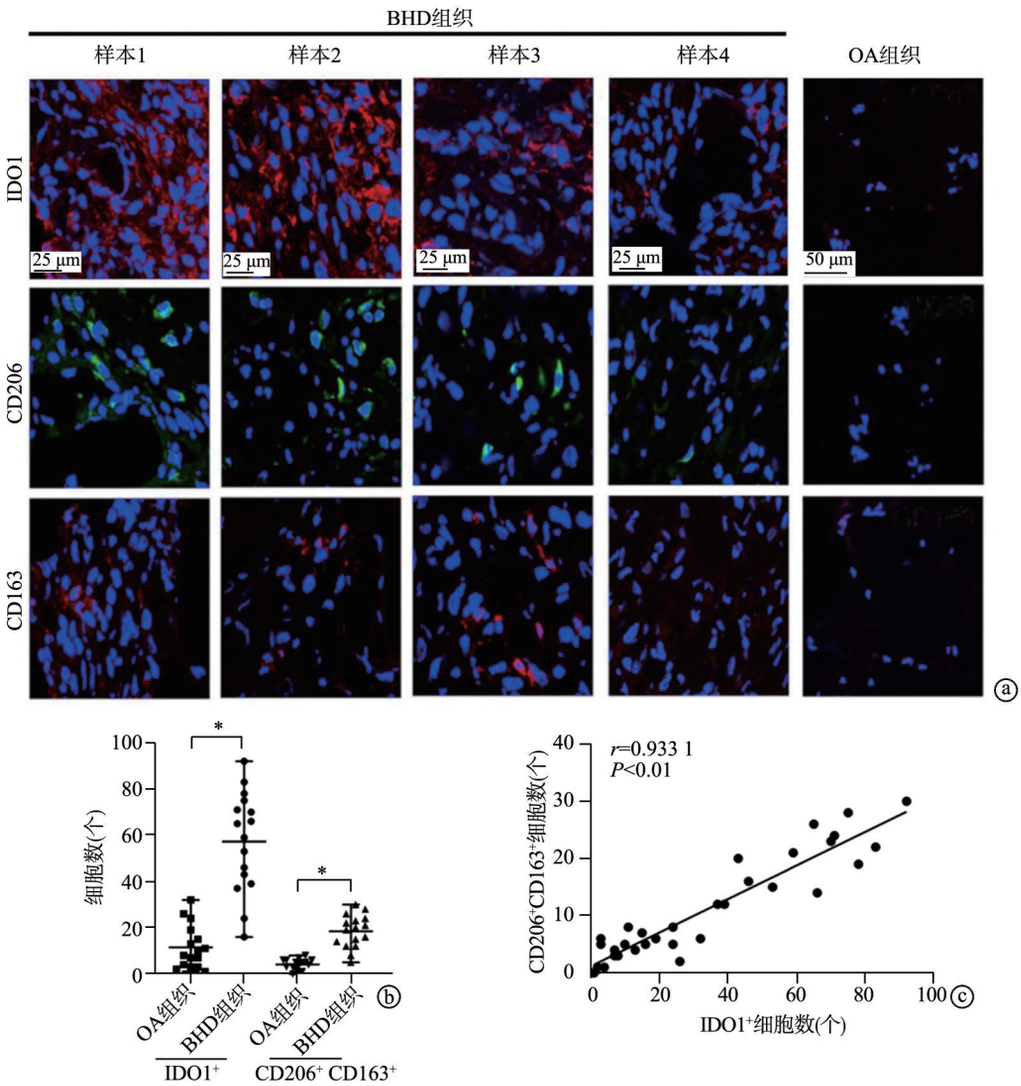
RT-qPCR检测结果显示,与M2诱导-Control组相比,M2诱导-EgB处理组CD68和CD163 mRNA表达水平升高(P<0.05);与M2诱导-EgB处理组相比,M2诱导-EgB+shRNA-IDO1组CD68和CD163 mRNA表达水平降低(P<0.05),M2诱导-EgB+OE-IDO1组CD68和CD163 mRNA表达水平升高(P<0.05),见图4b、c。

2.5 敲低/过表达IDO1对EgB处理后M2表型巨噬细胞中PI3K/Akt/mTOR和TGF-β1/PD-1的影响

Western blot检测结果显示,与M2诱导-Control组相比,M2诱导-EgB处理组TGF-β1、PD-1蛋白表达水平,p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR水平上调(P<0.05);与M2诱导-EgB处理组相比,M2诱导-EgB+shRNA-IDO1组TGF-β1、PD-1蛋白表达水平,p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR水平下调(P<0.05),M2诱导-EgB+OE-IDO1组TGF-β1、PD-1蛋白表达水平,p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR水平上调(P<0.05),见图5。

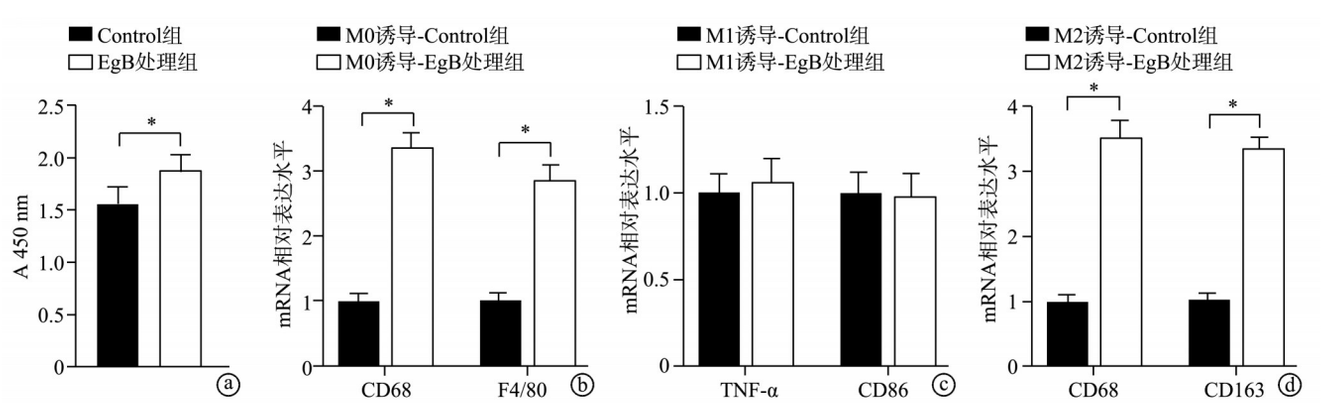
3 讨论

在包虫感染骨组织,特别是松质骨的过程中,骨包虫囊肿有外生性,并且具有通过IL-9激活周围破骨细胞进行骨侵蚀的行为[4]。EgB是包虫囊肿液原生抗原,可直接刺激增强破骨细胞分化[9]。BHD囊肿的CT扫描特征显示其具有侵袭周围骨组织的行为并逃避宿主的免疫杀伤,提示其可能通过某些分子机制,形成免疫耐受、免疫抑制的微环境[10]。



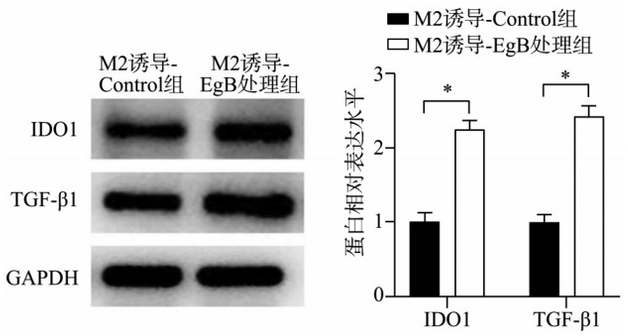
a:免疫荧光染色;b:BHD组织和OA组织中每视野下IDO1$^+$细胞数和每视野下CD206$^+$CD163$^+$巨噬细胞数散点图;c:*Pearson*相关性分析散点图 *:$P<0.05$

图1 BHD组织和OA组织中IDO1$^+$和CD206$^+$CD163$^+$免疫荧光染色结果



a:CCK-8法测定细胞增殖能力;b:M0表型极化标志物mRNA表达水平测定结果;c:M1表型极化标志物mRNA表达水平测定结果;d:M2表型极化标志物mRNA表达水平测定结果 *:$P<0.05$

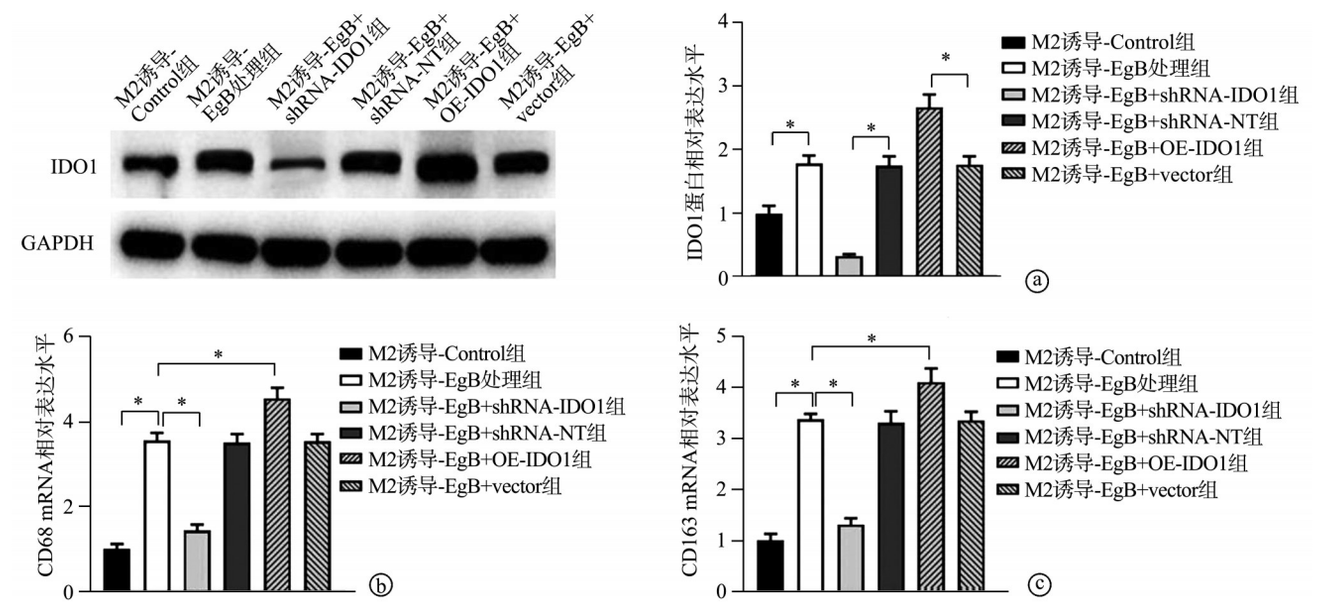
图2 THP1细胞增殖能力和向不同表型巨噬细胞极化标志物水平测定结果



*:P<0.05

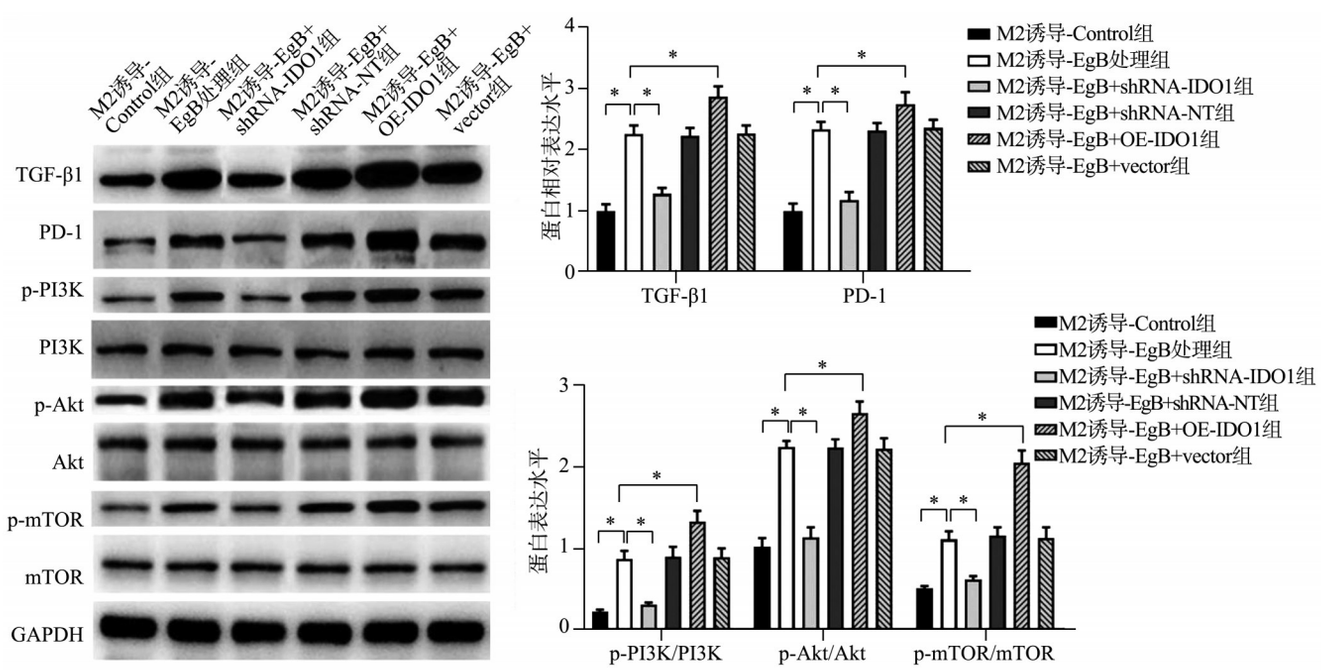
图3 Western blot检测细胞中IDO1、TGF-β1蛋白表达水平

M2表型巨噬细胞通过分泌包括TGF-β、IL-10、PD-1等在内的免疫抑制因子来抑制适应性和先天性免疫反应,介导免疫抑制微环境[11-12]。巨噬细胞内PI3K/Akt信号通路激活后,可介导其向M2表型极化[13]。M2表型巨噬细胞上调胞内PI3K/Akt/mTOR信号通路,可介导免疫抑制微环境和癌细胞免疫逃逸[14]。本研究结果显示,与OA组织相比,BHD组织中每视野下$CD206^{+}CD163^{+}$巨噬细胞数显著增加,提示M2表型巨噬细胞增多。



a:Western blot测定细胞中IDO1的表达水平;b、c:RT-qPCR测定细胞中CD68和CD163 mRNA的表达水平 *:P<0.05

图4 THP1细胞不同处理组细胞中IDO1的表达水平和细胞向不同表型巨噬细胞极化标志物水平测定结果



*:P<0.05

图5 THP1细胞不同处理组细胞中免疫抑制相关因子表达水平

本研究*Pearson*相关性分析结果显示,每视野下IDO1$^+$细胞数与该视野下CD206$^+$CD163$^+$巨噬细胞数呈正相关,提示BHD组织中IDO1$^+$细胞可能招募了CD206$^+$CD163$^+$巨噬细胞在周围组织大量浸润。本研究体外细胞实验结果显示,与M2诱导-Control组相比,M2诱导-EgB处理组M2表型极化标志物CD68和CD163 mRNA表达水平升高,提示EgB处理促进了巨噬细胞向M2表型极化。与M2诱导-EgB处理组相比,M2诱导-EgB+shRNA-IDO1组CD68和CD163 mRNA表达水平降低,M2诱导-EgB+OE-IDO1组CD68和CD163 mRNA表达水平升高,提示敲低/过表达IDO1分别能够抑制/促进巨噬细胞向M2表型极化。研究显示,IDO1和包括PD-L1等在内的数种免疫检查点分子协同上调表达,可介导癌组织微环境免疫耐受和免疫逃逸[15]。IDO1抑制剂能够增敏抗PD-1抗体的抗癌疗效[16]。因此,可以推断BHD囊肿组织可能通过上调周围组织中IDO1表达并介导激活巨噬细胞向M2表型极化,形成免疫抑制微环境。TGF-β1、PD-1、PI3K/Akt/mTOR信号通路与M2表型巨噬细胞共同参与介导免疫抑制微环境。本研究体外实验结果显示,EgB能够通过上调IDO1的表达,激活TGF-β1、PD-1、PI3K/Akt/mTOR等信号通路,介导免疫抑制微环境;分别敲低/过表达IDO1将阻遏/增强上述信号通路的活化水平,抑制/促进巨噬细胞向M2表型极化,介导抑制/促进免疫抑制微环境的形成。

综上,EgB能够上调IDO1的表达,刺激巨噬细胞向M2表型极化并激活TGF-β1、PD-1、PI3K/Akt/mTOR等信号通路,介导免疫抑制微环境。未来需通过动物实验模型验证BHD囊肿组织逃避免疫监视是否通过上调IDO1的表达激活M2表型巨噬细胞实现。

[参考文献]

[1] Monge-Maillo B, Lopez-Velez R. Cystic echinococcosis of the bone[J]. Curr Opin Infect Dis, 2023, 36(5): 341-347. doi: 10.1097/QCO.0000000000000951.

[2] Ammar A, Riahi H, Chaabouni M, et al. The multifaceted musculoskeletal hydatid disease[J]. Skeletal Radiol, 2024, 53(10): 2181-2194. doi: 10.1007/s00256-024-04644-0.

[3] 常玉山,杨来红,何 雄,等. 骨包虫病的影像学表现[J]. 中国CT和MRI杂志, 2023, 21(12): 172-174. doi: 10.3969/j.issn.1672-5131.2023.12.053.

[4] 吾路汗·马汗,谢增如. 白细胞介素-9诱导破骨细胞分化在包虫病骨侵蚀中的机制研究[J]. 局解手术学杂志,2025,34(6):489-493. doi: 10.11659/jjssx.03E024159.

[5] Sun Y, Yan C, Tian D, et al. Imaging manifestations and misdiagnosis analysis of six cases of bone hydatid disease[J]. Korean J Parasitol, 2022, 60(6): 413-417. doi: 10.3347/kjp.2022.60.6.413.

[6] Zhao Y, Zhang B, Zhang Q, et al. Tumor-associated macrophages in osteosarcoma[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2021, 22(11): 885-892. doi: 10.1631/jzus.B2100029.

[7] Toda Y, Kohashi K, Yamada Y, et al. PD-L1 and IDO1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes in osteosarcoma patients: comparative study of primary and metastatic lesions[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2020, 146(10): 2607-2620. doi: 10.1007/s00432-020-03242-6.

[8] Cai Z, Li W, Hager S, et al. Targeting PHGDH reverses the immunosuppressive phenotype of tumor-associated macrophages through α-ketoglutarate and mTORC1 signaling[J]. Cell Mol Immunol, 2024, 21(5): 448-465. doi: 10.1038/s41423-024-01134-0.

[9] 吾路汗·马汗,谢增如. 包虫抗原B通过抑制TAZ促进RANKL/NF-κB/TAK1介导的破骨细胞发生[J]. 医学分子生物学杂志, 2025, 22(1): 8-15. doi: 10.3870/j.issn.1672-8009.2025.01.002.

[10] Meng Y, Ren Q, Xiao J, et al. Progress of research on the diagnosis and treatment of bone cystic echinococcosis[J]. Front Microbiol, 2023, 14: 1273870. doi: 10.3389/fmicb.2023.1273870.

[11] Liu W, Li L, Bai X, et al. Osteosarcoma cell-derived migrasomes promote macrophage M2 polarization to aggravate osteosarcoma proliferation and metastasis[J]. Adv Sci (Weinh), 2025, 12(17): e2409870. doi: 10.1002/advs.202409870.

[12] 陈华敏,何志军,涂 伟,等. M2型肿瘤相关巨噬细胞参与胃癌细胞转移及免疫逃逸的机制研究[J]. 局解手术学杂志, 2023, 32(9): 771-777. doi: 10.11659/jjssx.07E022106.

[13] Wang L, Li S, Luo H, et al. PCSK9 promotes the progression and metastasis of colon cancer cells through regulation of EMT and PI3K/AKT signaling in tumor cells and phenotypic polarization of macrophages[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2022, 41(1): 303. doi: 10.1186/s13046-022-02477-0.

[14] Su P, Jiang L, Zhang Y, et al. Crosstalk between tumor-associated macrophages and tumor cells promotes chemoresistance via CXCL5/PI3K/AKT/mTOR pathway in gastric cancer[J]. Cancer Cell Int, 2022, 22(1): 290. doi: 10.1186/s12935-022-02717-5.

[15] Xie L, Chen C, Liang X, et al. Expression and clinical significance of various checkpoint molecules in advanced osteosarcoma: possibilities for novel immunotherapy[J]. Orthop Surg, 2023, 15(3): 829-838. doi: 10.1111/os.13620.

[16] Liang X, Gao H, Xiao J, et al. Abrine, an IDO1 inhibitor, suppresses the immune escape and enhances the immunotherapy of anti-PD-1 antibody in hepatocellular carcinoma[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1185985. doi: 10.3389/fimmu.2023.1185985.

(编辑:贺绍梅)