

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 20120051403117

UDC_____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

我国内蒙古东北部三种泡状棘球绦虫感染引
起宿主体内基因差异表达的研究

Differential Host Gene Expression during the Infection with
Three Alveolar Echinococcus from Northeast
Inner Mongolia, China

程 喆

指导教师姓名: 唐 崇 惕 教授

专业 名 称: 动 物 学

论文提交日期: 2008 年 9 月

论文答辩时间: 2008 年 10 月

学位授予日期: 2008 年 月

答辩委员会主席: 陈信忠 研究员

评 阅 人: _____

2008 年 10 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

中文摘要.....	1
英文摘要.....	3
前言.....	5
1. 泡状棘球蚴病及多房棘球绦虫.....	5
2. 棘球绦虫的分类.....	6
3. 棘球绦虫分子分类学研究.....	9
4. 基因芯片技术和蛋白质组学技术在寄生虫病研究中的运用.....	10
5. Th1/Th2 细胞免疫及其在棘球蚴病研究中的意义.....	13
6. 本论文研究的内容和意义.....	16
第一部分 三种泡状棘球绦虫棘球蚴核糖体基因 (rDNA) ITS (Internal Transcribed Spacer, 内转录间隔区) 序列比较分析.....	17
1. 材料与方法.....	17
2. 实验结果与分析.....	22
3. 讨论.....	33
第二部分 泡状棘球蚴感染引起宿主体内基因差异表达的研究.....	34
第一章 三种泡状棘球蚴引起宿主体内基因差异表达的研究 (共性部分)	34
1. 材料与方法.....	34
2. 实验结果与分析.....	38
3. 讨论.....	60
第二章 三种泡状棘球蚴引起宿主体内基因差异表达的研究 (个性部分)	64
1. 材料与方法.....	64

2. 实验结果与分析.....	65
3. 讨论.....	85
第三部分 感染三种泡状棘球蚴的小鼠体内细胞因子动态变化的研究.....	91
1. 材料与方法.....	91
2. 实验结果与分析.....	93
3. 讨论.....	101
总结.....	104
参考文献.....	105
附录.....	120
致谢.....	133

Contents

Abstracts in Chinese.....	1
Abstracts in English.....	3
Introduction.....	5
1. Alveolar Echinococcosis and <i>Echinococcus multilocularis</i>	5
2. Taxonomy of <i>Echinococcus multilocularis</i>	6
3. Molecular Taxonomy of <i>Echinococcus</i>	9
4. Microarray and Proteomic Technology in the Research on Parasite Infection.....	10
5. Th1/Th2 Immune Response and its Significance in Echinococcus Infection.....	13
6. Aims and Significances of this Dissertation.....	16
Part 1 The Comparative Analysis of ITS Sequences from Three Alveolar Echinococcus.....	17
1. Materials and Methods.....	17
2. Results.....	22
3. Discussion.....	33
Part 2 Study on the Differential Host Gene Expression during the Infection with Three Alveolar Echinococcus.....	34
Chapter 1 The Study on the Differential Gene Expression Induced by Three Alveolar Echinococcus(Common Part).....	34
1. Materials and Methods.....	34
2. Results.....	38
3. Discussion.....	60
Chapter 2 The Study on the Differential Gene Expression Induced by	

Three Alveolar Echinococcus (Specific Part)	65
1. Materials and Methods.....	65
2. Results.....	65
3. Discussion.....	86
Part 3 The Study on the Developmental Changes in Cytokine	
Expression of Mice Infected with Three Alveolar	
Echinococcus.....	91
1. Materials and Methods.....	91
2. Results.....	93
3. Discussion.....	101
Conclusion.....	104
References.....	105
Appendix.....	120
Acknowledgement.....	133

中文摘要

唐崇惕等对我国内蒙古东北部呼伦贝尔草原泡状棘球蚴的病原情况进行调查时, 在沙狐 (*Vulpes corsac*) 体内发现多房棘球绦虫的成虫, 在布氏田鼠 (*Microtus brandti*) 体内发现了泡状棘球蚴。随后的研究发现, 流行于此地区的泡状棘球蚴病原应包含独立的三种, 分别为: 欧洲的多房棘球绦虫 (*Echinococcus multilocularis*), 西伯利亚棘球绦虫 (*Echinococcus sibiricensis*) 以及苏俄棘球绦虫 (*Echinococcus russicensis*)。

本论文主要对这三种泡状棘球绦虫引起的宿主体内基因差异表达变化进行研究, 包括以下三个部分:

1. 三种泡状棘球绦虫棘球蚴核糖体基因 (rDNA) ITS (Internal Transcribed Spacer, 内转录间隔区) 序列比较分析:

通过 DNA 聚合酶链式反应对三种泡状棘球绦虫棘球蚴核糖体内转录间隔序列 (ITS 序列) 进行扩增, 将扩增产物进行克隆测序, 所得序列结果进行比对和聚类分析。发现同种泡状棘球蚴的 ITS 序列有至少两种不同序列, 序列复杂多变, 尤其体现在 ITS2 序列部分。然而西伯利亚泡状棘球蚴的序列明显与另 2 虫种不同, 尤其体现在 ITS1 序列部分。聚类分析显示来源于同种泡状棘球蚴的不同克隆序列大多能类聚在一起, 表明这三种泡状棘球绦虫 ITS 序列间存在差异。

2. 三种泡状棘球蚴引起宿主体内基因差异表达的研究:

本部分内容主要是运用基因芯片技术和蛋白质组学技术, 结合生物信息学分析, 对三种泡状棘球蚴感染的小鼠肝脏内基因表达的变化予以研究。按照结果分析的侧重点不同, 共分为两章:

第一章主要分析与讨论在三种泡状棘球蚴感染的宿主体内均有差异表达的基因 (共性部分): 通过基因芯片试验结果我们发现, 在三种泡状棘球蚴感染的小鼠肝脏内表达变化均有显著差异的基因一共有 64 个, 进一步的 GO 功能分析结果显示它们与几个功能组相关, 其中包括了防御反应和免疫功能, 氧化还原酶活性功能和细胞代谢功能类别。而蛋白质组学实验结果显示表达变化差异显著的 73 个蛋白也多与这几大功能类别相关, 更为重要的是防御反应和免疫功能

相关的蛋白表达值都升高，而具氧化还原酶活性功能以及和细胞代谢功能相关的蛋白表达值都降低，支持了基因芯片的实验结果。

第二章进一步比较与分析感染不同种泡状棘球蚴的各个实验组间基因表达情况的差异（个性部分）：发现有278个基因仅在感染了西伯利亚和苏俄泡状棘球蚴的感染组A和B中表达差异显著，而在感染欧洲泡状棘球蚴的感染组C中表达变化不明显。在这278个基因当中，205个上调的基因与多个生物学过程相关，包括防御与免疫应答反应，细胞凋亡，细胞分化，细胞周期，细胞分裂，DNA复制等。同时我们还发现在感染苏俄泡状棘球蚴的小鼠体内与细胞分裂、细胞骨架构建与生成、DNA损伤应答的基因表达值升高的幅度明显高于另两种泡状棘球蚴感染的小鼠，而且后两个GO功能类别未在感染组A或C中被显著富集。表明宿主适应性程度、宿主免疫应答反应差异会造成这三种泡状棘球蚴感染的小鼠体内基因表达变化的不同。

3. 感染三种泡状棘球蚴的小鼠体内细胞因子动态变化的研究：

对不同感染组小鼠血清中的 Th1/2 型细胞因子动态表达变化差异进行研究。结果发现 Th1 型细胞因子 TNF- α 和 IFN- γ 在三种泡状棘球蚴感染感染的小鼠血清中的表达值均在感染初期就略有升高，接种后 80 到 100 天时，升高幅度达到峰值；而 Th2 型细胞因子 IL-4 在感染初期变化并不显著，在感染约 100 天之后表达值才显著提高。此外，IL-10 也是在感染后期的小鼠血清中被检测到有表达。

同时，三种泡状棘球蚴感染的小鼠血清中这几种细胞因子动态变化存在差异。西伯利亚泡状棘球蚴感染的 TNF- α 和 IFN- γ 表达在接种 80-100 天后达到峰值，之后仍相对维持在较高水平，而感染苏俄泡状棘球蚴和欧洲泡状棘球蚴小鼠血清中这两种细胞因子含量达到峰值后迅速下降，而且幅度更为显著。提示在西伯利亚泡状棘球蚴感染的小鼠体内，TNF- α 和 IFN- γ 高表达的时间更长些，作用也更为持久。此外，从整体上来看，感染欧洲泡状棘球蚴的小鼠体内这两种细胞因子的表达水平均比另两个感染组要低。

关键词：泡状棘球蚴；序列比对；基因芯片；蛋白质组学；细胞因子

Abstract

At the end of last century, Tang Chongti et al found there were three types of alveolar echinococcus in the Northeast Inner Mongolia, China. Subsequent studies indicated that they should be regarded as independent species: *Echinococcus multilocularis*, *Echinococcus sibiricensis* and *Echinococcus russicensis*.

In this dissertation, the differential host gene expression during the infection with three alveolar echinococcus was explored.

There are three parts in the paper.

1. The comparative analysis of ITS sequences from three alveolar echinococcus:

By using PCR technology, we amplified ITS sequences from three alveolar echinococcus. The results showed that there were at least 2 different kinds of sequences from the same type of alveolar echinococcus, especially in the ITS2 part. However, the ITS1 sequences of *Echinococcus sibiricensis* were quite different from those of *Echinococcus russicensis* and *Echinococcus multilocularis*. As such, the clustering result showed that most of the clone sequences from the same type of alveolar echinococcus can be distinguished from another one, implying the genomic differences in these types of alveolar echinococcus.

2. The study on the differential host gene expression during the infection with three alveolar echinococcus:

In this part, microarray, proteomic and bioinformatic technology were used to explore the differential gene (protein) expression induced by three alveolar echinococcus. The results and discussion part are shown as in two chapters:

Chapter 1: A total of 64 genes were common to infection in the liver of all three alveolar echinococcus with 73 common proteins found. GO analysis of the microarray data showed that up-regulated genes included those involved in immune response and the depressed genes were related to oxidoreductase activity and energy metabolism, which was strongly supported by the proteomic data.

Chapter 2: Furthermore, analysis of the gene expression data indicated 278 genes were significantly changed in the mice infected with *Echinococcus sibiricensis*

and *Echinococcus russicensis*, but not in those infected with *Echinococcus multilocularis*. In the 278 genes, 205 were induced including those related to immune response, apoptosis, cell differentiation, cell cycle, cell division and DNA amplification, etc. Moreover, a number of genes were only significantly up-regulated in the mice infected with *Echinococcus russicensis*, including those related to cell division, cytoskeleton organization and biogenesis, and DNA damage response. These genes in this infected group have a much higher expression ratio than those in the other two groups as well as the GO functional categories “cytoskeleton organization and biogenesis” and “DNA damage response” were only enriched in *Echinococcus russicensis* infected group.

3. Developmental changes in the serum Th1/2 cytokine expression of mice infected with three alveolar echinococcus:

Th1/2 cytokine expressions were examined in the serum of mice infected with three alveolar echinococcus. The results showed that TNF- α and IFN- γ were slightly induced at early stage of the infection and then remarkably up-regulated at later stage (80-100 day post infection) in all of the infected groups. Contrarily, IL-4 and IL-10 were induced only at the later stage (100 days post infection).

The expression of TNF- α and IFN- γ in the mice infected with *Echinococcus sibiricensis* reached at the maximum at 80-100 days post infection and then remained at a relatively high level, however, it significantly reduced in the other two groups. It implied that the Th1 type cytokines TNF- α and IFN- γ functioned in the *Echinococcus sibiricensis*-induced infection with a stronger activity. As such, the expression levels of TNF- α and IFN- γ were lower in the mice infected with *Echinococcus multilocularis*.

Key words: sequence alignment; alveolar echinococcus; microarray; proteomics; cytokine

前言

一 泡状棘球蚴病及多房棘球绦虫

泡状棘球蚴病 (Alveolar Echinococcosis, AE) 又称多房棘球蚴病, 是一种呈世界性分布、致病性极强的人兽共患蠕虫病 (helminthic zoonosis), 被世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 列为世界十大寄生虫病之一^[1, 2]。泡状棘球蚴病主要流行于北半球高原和气候寒冷的牧区与半牧区, 包括欧洲中西部的德国、法国, 北美的阿拉斯加, 中亚地区, 日本以及中国^[3-6]。该病在我国主要存在于内蒙、西藏、新疆、甘肃、宁夏、青海、陕西和四川西部等广大牧区, 在其它地区也偶有病例发生^[6]。泡状棘球蚴病是我国目前主要防治的寄生虫病之一, 但因缺乏有效的预防和治疗药物仍没有得到有力控制。而随着近些年退耕还林以及牧区生态环境的改善, 其流行范围有逐步扩大的趋势^[7, 8], 严重威胁牧区人畜健康并造成极大的经济损失, 成为我国实施西部大开发战略的隐患。

造成泡状棘球蚴病的根本原因是多房棘球绦虫 (*Echinococcus multilocularis* Leuckart, 1863) 等的续绦期幼虫 (metacestode) 在宿主体内肝脏、肺脏等器官寄生和发育。野生自然环境中多房棘球绦虫成虫主要寄生于食肉目犬科动物肠道内, 包括红狐 (*Vulpes vulpes*)、极地狐 (*Alopex lagopus*)、沙狐 (*Vulpes corsac*) 和狼 (*Canis lupus*) 等, 幼虫主要寄生在小型哺乳类动物 (主要为啮齿类动物) 体内肝脏等器官 (其生活史见图 1)。流行区家养的食肉动物如狗、猫等可因捕食被多房棘球绦虫幼虫感染的中间宿主而成为终宿主, 排泻虫卵, 造成与之接触的人的感染^[5]。与细粒棘球绦虫的囊状棘球蚴病 (Cystic echinococcosis, CE) 相比, 泡状棘球蚴病因其病原多房棘球绦虫等的续绦期幼虫可在患者体内像肿瘤样生长发育和浸润迁移, 在移行过程受到宿主结缔组织的包围不断形成大小不等的雏囊 (brood capsules), 最终破坏内脏实质组织、胆管以及血管, 从而对肝脏等脏器损害更为严重, 并且由于其囊泡呈多囊状, 手术切除使泡囊内物质散开污染患者体内脏器, 术后复发率高, 难以根治, 对生命威胁更大, 因而被称为“二号癌症”。

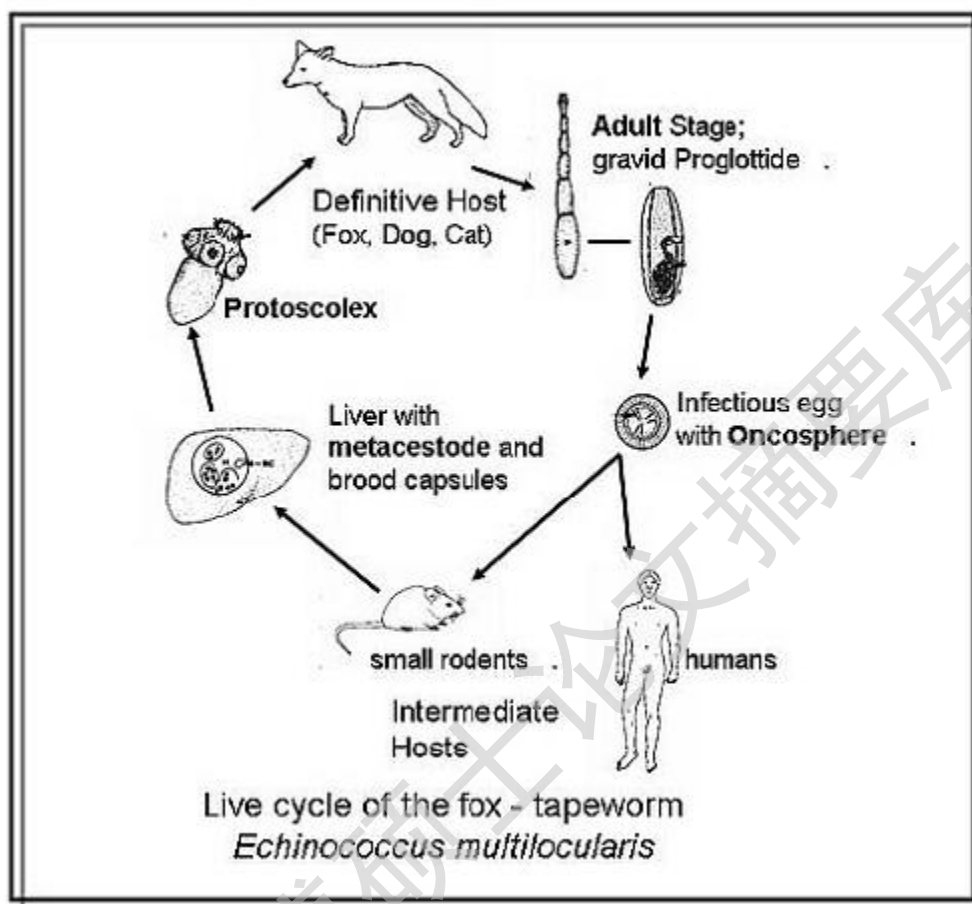


图 1 多房棘球绦虫生活史（图片来源：www.hygiene.uni-wuerzburg.de）

Fig.1 Life cycle of *Echinococcus multilocularis*

二 棘球绦虫的分类

具泡状棘球蚴的棘球绦虫隶属于带虫科（Taeniidae）棘球绦虫属（*Echinococcus*）。一向棘球属绦虫被认可的有 4 个独立种（Rausch, 1972; Kumaratilake et al, 1982）^[9, 10]，即：细粒棘球绦虫（*Echinococcus granulosus* Batsch, 1786），幼虫期为囊状棘球蚴（cystic echinococcus）；多房棘球绦虫（*Echinococcus multilocularis* Leuckart, 1863），幼虫期为泡状棘球蚴（alveolar echinococcus）；少节棘球绦虫（*Echinococcus oligarthrus* Diesing, 1863）和福氏棘球绦虫（*Echinococcus vogeli* Rausch et Bernstein, 1972），后两种的幼虫期为多囊棘球蚴（polycystic echinococcus）。普遍认为在我国主要存在前 2 种棘球绦虫，前者引起囊状棘球蚴病（Cystic Echinococcosis, CE），又叫细粒棘球蚴病；

后者引起泡状棘球蚴病 (Alveolar Echinococcosis, AE), 又叫多房棘球蚴病, 这两种病原在我国分布很广, 主要分布于西部地区, 包括西北各省、自治区, 藏川西北部地区以及内蒙古东北部等地。然而唐崇惕等于 2003 年在我国内蒙古的长爪沙鼠 (*Meriones unguiculatu*) 体内也发现了多囊蚴 (内蒙古多囊蚴, *Polycystia neimonguensis* Tang et al, 2003) 的存在^[11]。此外还有一些学者在我国青藏高原四川西部的石渠县发现的泡状蚴病病原从形态、宿主特异性、分子遗传和地理分布等诸多方面与多房棘球绦虫存在差异, 遂命名为石渠棘球绦虫 (*Echinococcus shiqucus* Xiao et al, 2005)^[12]。

从多房棘球绦虫 (*Echinococcus multilocularis* Leuckart, 1863) 发现之初, 有关囊状棘球蚴病 (Cystic Echinococcosis) 和泡状棘球蚴病 (Alveolar Echinococcosis) 的病原是否为同一种的争论就一直不断。直到 Rausch (1953, 1954) 和 Vogel (1957) 等阐明多房棘球绦虫的中间宿主是鼠类、幼虫期为泡状棘球蚴, 而细粒棘球绦虫的中间宿主多为牛羊类、幼虫期为囊状棘球蚴, 证明两种绦虫的生活史不同, 多房棘球绦虫种的独立性才得到了确认^[13-15]。

半个世纪以来, 对多房棘球绦虫种内不同虫株的分类界定学术界也存在不同看法。Rausch 等于 1954 年^[16]在美国阿拉斯加圣劳伦斯岛查到一种棘球绦虫, 根据形态观察和比较, 定名为西伯利亚棘球绦虫新种 (*Echinococcus sibiricensis*), 其幼虫期是泡状棘球蚴, 寄生于鼠类体内, 成虫可存在于北极狐和雪撬狗体内。而德国学者 Vogel 等则认为^[15]西伯利亚棘球绦虫是欧洲多房棘球绦虫 (*Echinococcus multilocularis* Leuckart, 1863) 的亚种或它的一个地理株。之后的近半个世纪以来, 大部分书籍和文献都按 Vogel (1957) 的意见定名这两种虫种为多房棘球绦虫指名亚种 (*E. m. multilocularis* (Leuckart, 1863) Vogel, 1957) 和多房棘球绦虫西伯利亚亚种 (*E. m. sibiricensis* (Rausch and Schiller, 1954) Vogel, 1957)。此外, 前苏联著名蠕虫学家斯克里亚平院士曾详细的记述了一种在苏俄广泛分布的多房棘球绦虫的形态, 最显著的特点是位于成虫节片顶端的圆球状子宫, 以及牛羊食草动物可作为幼虫期中间宿主。他将多房棘球绦虫 (*Echinococcus multilocularis* Leuckart, 1863) 的 *Echinococcus* (棘球) 属称改为 *Alveococcus* (泡状), 称其为多房泡状绦虫 (*Alveococcus multilocularis* (Leuckart, 1863) Abuladse, 1960), 并把在苏俄广泛分布的此种棘球绦虫称作多房泡状绦虫

哈萨克亚种 (*Alveococcus multilocularis kazakhensis*) (= *Echinococcus m. kazakhensis*), 但斯克里亚平院士等也对这种泡状棘球蚴 (*Alveolar echinococcus*) 能在牛羊体内发育的说法抱怀疑态度, 认为尚应详细研究 (Skrjabin and Abuladze, 1964), 许多国际学者对此也不给予认可。还有我国和日本的一些学者认为, 存在于我国青藏高原四川西部的石渠县的一种泡状蚴病原与上述几种多房棘球绦虫均不同, 并从病原形态、宿主特异性、分子遗传和地理分布等诸多方面进行了较为细致的研究, 基于这些差异, 他们认为这是一种新的棘球蚴病原, 并命名为石渠棘球绦虫 (*Echinococcus shiqucus* Xiao et al, 2005)^[12]。有关肝包虫病原棘球绦虫问题在世界各地多年都有许多工作者在进行调查研究, 以及有关多房棘球绦虫所谓各虫种的分类问题也都在研究探讨之中。

1988—2002年, 唐崇惕等对我国内蒙古东北部呼伦贝尔草原泡状棘球蚴的病原情况进行调查, 在沙狐 (*Vulpes corsac*) 的体内发现多房棘球绦虫的成虫, 在布氏田鼠 (*Microtus brandti*) 的体内发现了泡状棘球蚴^[17-19]。经过形态学、组织学观察以及对长爪沙鼠 (*Meriones unguiculatus*) 与昆明株小白鼠的人工感染实验, 唐崇惕等^[20-23]认为流行于内蒙古呼伦贝尔草原、幼虫期为泡状蚴的棘球绦虫应包含3种。2006至2007年, 唐崇惕等对这三种泡状棘球蚴病原分别进行了更为详细的报道^[24-26]。这三种棘球蚴病原幼虫期均为泡状棘球蚴, 然而其成虫的子宫形态和所在位置却有很大区别: 欧洲的多房棘球绦虫 (*E. m. multilocularis* (Leuckert, 1863) Vogel, 1957) 的子宫呈具颈部的瓶子状, 西伯利亚多房棘球绦虫 (*E. m. sibiricensis* (Rausch and Schiller, 1954) Vogel, 1957) 的子宫呈梨状, 它们的子宫均占据孕节中央全部, 而似苏俄的多房棘球绦虫 (*Echinococcus* sp.) 的子宫呈球状, 位置在节片顶端 (图2)。通过多次人工感染实验鼠观察不同感染时间后的小白鼠体内病灶组织切片, 证实这三种泡状棘球蚴在宿主体内的发育历程、发育形式和致病性有较大区别, 结合成虫子宫形态间的差异以及这三种病原同时存在于一个流行区, 认为内蒙古呼伦贝尔草原的这几种棘球绦虫病原不应为多房棘球绦虫的不同虫株或亚种, 而应该为各自独立的不同的虫种。另外, 为了进一步证实在我国内蒙古呼伦贝尔草原发现的似苏俄的多房棘球绦虫是否就是多房泡状绦虫哈萨克亚种 (*Echinococcus m. kazakhensis*), 唐崇惕等^[26]用其泡状蚴腹腔注射感染4只羊羔共15个部位, 结

果在鼠类能正常发育的此类病原，在全部羊羔体内均不能发育，说明流行于内蒙古的本虫种不同于所谓幼虫期可以在牛羊发育的“哈萨克亚种”，所以给予定名为苏俄棘球绦虫新种(*Echinococcus rusicensis*)。至此，从病原成虫结构、幼虫期发育规律的不同，唐崇惕等^[24-26]认为流行于内蒙古呼伦贝尔草原、幼虫期为泡状蚴的棘球绦虫应为独立的 3 种，分别为欧洲的多房棘球绦虫 (*Echinococcus multilocularis* Leuckert, 1863)，西伯利亚棘球绦虫 (*Echinococcus sibiricensis* Rausch and Schiller, 1954) 以及苏俄棘球绦虫 (*Echinococcus rusicensis* Tang et al, 2007)。

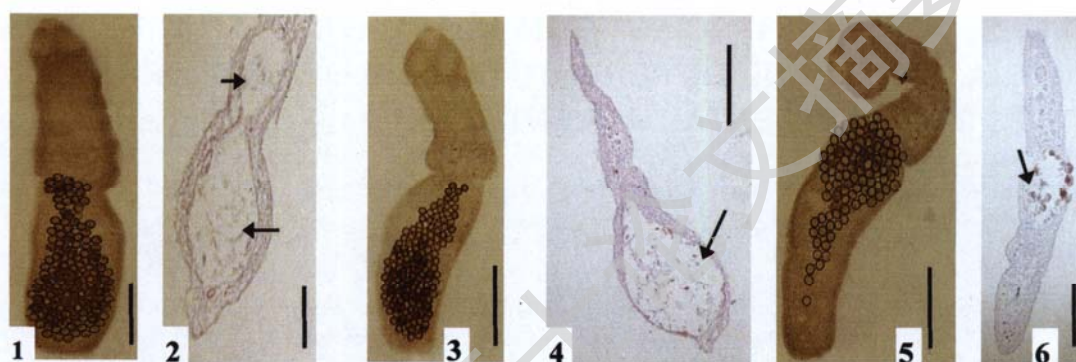


图 2 三种泡状棘球绦虫成虫子宫形态 (引自唐崇惕等, 2006^[23])

Fig. 2 Uterus of three Alveolar Echinococcus

注: 1-2 多房棘球绦虫; 3-4 西伯利亚棘球绦虫; 5-6 苏俄棘球绦虫.

三 棘球绦虫分子分类学研究

在对棘球绦虫虫种进行分类时，除了从形态、发育特点、致病性和宿主特异性等方面进行研究外，一些分子生物学技术的应用无疑为传统分类学提供了有力的支持。PCR 限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 是最早运用于棘球绦虫虫种分类的分子生物学手段，运用这一方法，研究人员可以较快速得鉴别出棘球绦虫属绦虫的种和株^[27, 28]；国内任敏等 (1995)^[29]用该方法对我国四川和宁夏两地区多房棘球绦虫的酶切图谱差异进行了比较，发现两地区的多房棘球绦虫与细粒棘球绦虫的带型存在属间同源性。此外，随机扩增多态性 DNA (RAPD) 和单链构象多态性 (SSCP) 技术也被国内外学者运用到棘球绦虫不同种和虫株间的差异鉴定^[30, 31]。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库