

学校编码: 10384

分类号__密级__

学号: 20121152428

UDC__

廈門大學

硕士学位论文

FGF 对泡状棘球蚴生长发育的影响及其分子机制的研究

**Effects of FGF on the growth and development of
Echinococcus multilocularis and its molecular mechanism**

王亮

指导教师姓名: 王彦海 副教授

专业名称: 细胞生物学

论文提交日期: 2015 年 月 日

论文答辩时间: 2015 年 月 日

学位授予日期: 2015 年 月 日

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2015 年 月 日

厦门大学学位论文原创性声明

本人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其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ ）课题（组）的研究成果，获得（ ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月

目录

摘要.....	I
Abstract.....	II
第一章 前言	1
1.1 泡状棘球蚴简介	1
1.1.1 多房棘球绦虫简介.....	1
1.1.2 多房棘球蚴病简介.....	3
1.1.3 多房棘球蚴体外培养模型简介.....	6
1.2 生长因子 FGF 及其信号通路简介	7
1.2.1 成纤维细胞生长因子 FGF.....	7
1.2.2 FGF 介导的信号转导机制及其抑制剂.....	9
1.2.3 ERK 信号通路简介.....	11
1.3 FGF 与泡球蚴关系	11
1.4 研究内容和意义	12
第二章 材料与方法	13
2.1 实验材料与试剂	13
2.2 实验仪器与实验耗材	13
2.3 常用溶液配制	14
2.4 实验方法	16
第三章 实验结果与分析	26
3.1 FGF 对泡球蚴囊泡生长发育的影响	26
3.1.1 FGF 对泡球蚴囊泡存活的影响.....	26
3.1.2 FGF 对泡球蚴囊泡生长的影响.....	29
3.1.3 FGF 对泡球蚴原头节发育的影响.....	32
3.2 FGF 通过 ERK 信号通路调控生长发育	34
3.2.1 FGF 激活泡球蚴 ERK 信号通路.....	34
3.2.2 FGFR 抑制剂抑制泡球蚴 ERK 信号通路.....	36

第四章 讨论.....	42
参考文献.....	46
攻读学位期间发表论文.....	53
致谢.....	54

厦门大学博硕士论文摘要库

CONTENTS

Chinese abstract	I
English abstract	II
Chapter1 Introduction	1
1.1 Overview of <i>Echinococcus multilocularis</i>	1
1.1.1 Overview of <i>Echinococcus multilocularis</i>	1
1.1.2 Overview of Alveolar Echinococcosis	3
1.1.3 Overview of <i>Echinococcus multilocularis</i> in vitro cultivation	6
1.2 Overview of FGF and its signaling pathways	7
1.2.1 Fibroblast growth factor FGF.....	7
1.2.2 Fibroblast growth factor receptor FGFR and its inhibitors	9
1.2.3 Overview of ERK signaling pathway	11
1.3 FGF and <i>Echinococcus multilocularis</i>	11
1.4 Purpose and Significance of this study	12
Chapter2 Materials and Methods	13
2.1 Materials and Reagents	13
2.2 Instruments	13
2.3 The preparation of commonly used solution	14
2.4 Methods	16
Chapter3 Results and Discussion	26
3.1 Effects of FGF on growth and development of <i>Echinococcus multilocularis</i> metacestode	26
3.1.1 Effects of FGF on survival of <i>Echinococcus multilocularis</i>	26
3.1.2 Effects of FGF on growth of <i>Echinococcus multilocularis</i>	29
3.1.3 Effects of FGF on development of <i>Echinococcus multilocularis</i>	32
3.2 FGF affected growth and development of <i>Echinococcus multilocularis</i> by ERK Signaling pathway	34

3.2.1 FGF activated ERK signaling pathway.....	34
3.2.2 FGFR inhibitor inhibit ERK signaling pathway	36
Chapter4 Discussion.....	42
Reference.....	46
Publication	53
Acknowledgement.....	54

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

泡状棘球蚴病是由多房棘球绦虫续绦期幼虫引起的一种严重威胁人类生命安全的人兽共患寄生虫病，泡球蚴在宿主体内的生长发育过程受到宿主生长因子的影响。本文在实验室成功构建的泡球蚴体外培养体系的基础上，探讨宿主成纤维生长因子 FGF 与泡球蚴生长发育的相互关系，并初步阐述了 FGF 通过调控泡球蚴体内的 ERK 信号通路影响泡球蚴生长发育的分子机制。本文主要包括以下内容：

(1) FGF 影响体外培养泡球蚴的生长过程。分别从 FGF 影响泡球蚴囊泡的存活率、生长率来阐述 FGF 对于泡球蚴的生长过程的影响。在有血清和无血清培养液中，FGF 均可以延长泡球蚴存活的时间，提高囊泡的存活率，尤其是在 FGF 浓度为 50 ng/ml 时最为明显。在 DMEM 培养液和 Hela 细胞上清液中，FGF 可以提高囊泡的增长率，加快囊泡的生长速度，促进泡球蚴的生长过程。

(2) FGF 影响体外培养泡球蚴的发育过程。在无血清培养液中，FGF 可以促进泡球蚴原头节向囊泡发育的进程，更多的原头节能够发育成囊泡，发育过程也变得更快。

(3) FGF 调控生长发育的信号通路。查阅相关文献已知，ERK 信号通路通常与细胞增殖分化相关，猜测 FGF 在泡球蚴中通过 ERK 信号通路影响泡球蚴的生长发育过程。利用免疫印迹实验，检测 FGF 以及 FGFR 抑制剂 PD173074 作用于泡球蚴后，ERK 磷酸化水平的变化情况。结果提示，FGF 激活了 ERK 的磷酸化水平，而抑制剂 PD173074 能有效的下调 ERK 的磷酸化，提示抑制剂能阻断 ERK 信号途径。

综上所述，本文对 FGF 与泡球蚴之间的关系及其作用机制做了初步的探讨，发现 FGF 对泡球蚴的生长与发育过程有重要影响。FGFR 阻断 FGF 介导的信号通路途径对于影响泡球蚴存活有着重要的作用。此研究旨在更深层次的了解泡球蚴的生长发育过程，以期找到可能性的新药物靶点，为泡球蚴的预防和治疗提供理论依据。

关键词：泡球蚴；FGF；ERK

Abstract

Alveolar echinococcosis, caused by the metacestode larval stage of the cestode *Echinococcus multilocularis*, is one of the parasitic zoonoses which seriously threaten our safety. Understanding the growth and development process of the parasite and the related factors is very important. Based on the in vitro culture system successfully established in our lab, we investigated the effect of fibroblast growth factor FGF on the growth and development of *E. multilocularis*. We demonstrated that, FGF exhibits an effects an effect on the growth and development of *E. multilocularis* through the ERK signaling pathway. The main achievements are concluded as follows:

(1) FGF affected the growth of *E. multilocularis* larvae in vitro culture. We elaborated the effects of FGF on the survival and growth of *E. multilocularis* larva. FGF can promote the survival of *E. multilocularis* in the culture medium with or without serum, especially when the concentration of FGF was 50ng/ml. FGF can improve the growth rate, accelerate the development of microcyst, and promote the growth progress of *E. multilocularis* in DMEM culture medium and supernate of the HeLa cells.

(2) FGF affected the development process of *E. multilocularis*. FGF improved protoscoleces developed into microcyst in the medium without serum. In this process of development, more protoscoleces can develop into microcyst and the process became more quickly.

(3) Signaling pathways involved in the FGF affected growth and development of *E. multilocularis*. Previous studies have shown that, ERK signaling pathways is related to cell proliferation and differentiation. Therefore we speculate that FGF can have effect on *E. multilocularis* through ERK signal pathways. Immunoblotting results showed that FGF could promote the ERK phosphorylation level of *E. multilocularis* larvae significantly, and that FGFR inhibitor PD173074 could effectively reduce the ERK phosphorylation level, indicating that it can inhibit the ERK signaling pathway in *E. multilocularis*.

In summary, this dissertation primarily elaborated the relationship between FGF and the growth and development of *E. multilocularis*. FGFR inhibitors blocking FGF-induced signaling pathways have a significant influence on survival of

E.multilocularis. This research would help in exploring host-parasite interaction and may provide theoretical basis for the development of new interventions and therapeutics for the control of AE.

Key words: *Echinococcus multilocularis*; FGF; ERK

厦门大学博硕士学位论文摘要库

第一章 前言

1.1 泡状棘球蚴简介

1.1.1 多房棘球绦虫简介

多房棘球绦虫 (*Echinococcus multilocularis*) 隶属扁形动物门绦虫纲圆叶目带科棘球属^[1,2]。多房棘球绦虫的生活史分为虫卵、六钩蚴、幼虫期、成虫四个发育阶段。其幼虫期侵入宿主体内感染引起多房棘球蚴病 (Alveolar echinococcosis)。

成虫 多房棘球蚴的成虫^[3]常寄生于狐狸、犬等小肠内，偶尔寄生于猫体内^[4,5]。成虫雌雄同体，可自体受精或异体受精，28-35 天即可发育成熟。成虫虫体大小为1.2-4.5 mm，常有4-5 个节片，顶突、小沟、及吸盘等较小。生殖孔位置位于节片的中线偏前，睾丸数目少，分布在生殖孔的后方；孕节中子宫呈囊状，无侧囊。

虫卵 多房棘球蚴的虫卵^[6]为圆形或近似圆形，大小为30-50 μM \times 29-34 μM 。虫卵发育成熟后，外层呈现成放射纹状的胚膜结构，内含的六钩蚴结构清晰，小沟明显可见。这样的虫卵结构坚实，不易破裂。虫卵的胚膜结构特殊，由大小不等的楔形体相嵌形成，胚膜层内含大量具有双层膜结构的大小不等的囊泡，囊泡相互之间或囊泡与楔形体缝隙之间有管道相通。一般认为，从终末宿主排出的虫卵对适宜的中间宿主具有感染能力。

幼虫期 在中间宿主体内发育的各个阶段都称为幼虫期，又称为中绦期，又被称为泡球蚴。泡球蚴寄生在啮齿类包括麝鼠、田鼠、旅鼠、沙鼠及人^[7-10]的肝脏，也可见肺、脑、肠系膜等部位的寄生。泡球蚴呈卵圆形或球形，角质层、生发层清晰，生发层细胞增殖，多见于育囊或芽生结构，育囊内有数量不等的原头蚴。其前端中央处有凹入的头节孔道，后端的中央基部有一条尾柄或与生发层相连接。外层由角质层包围，角质层内为体壁，体壁细胞由含有浓密颗粒的柔软细胞。体壁内形成囊腔，头节倒缩其中。体壁与头节之间，密布着许多石灰颗粒。泡球蚴不形成大囊泡，而成海绵状，囊泡生长较快。子囊为外生性，原头蚴数目少。质较硬，由无数小囊泡集合而成海绵状，与周围组织分界不清。多房棘球蚴每个囊的大小基本相同，其直径小的仅0.1-1 mm，多数为2-5 mm，囊壁外面的角皮层很薄，常不完整，囊体与周围组织间没有纤维膜形

成的明显界限，囊内含透明囊液和许多原头蚴，囊泡内容物为豆腐渣样幼体碎屑和小泡。显微镜下，在肝组织中散在大小不等的泡球蚴小囊泡，一般见于角皮层。囊泡周围有嗜酸性粒细胞浸润，伴有结核样肉芽组织形成及纤维组织增生。

在多房棘球蚴的生活史^[11-13]（图1）中，需要两种哺乳动物宿主才能完成循环，包括终末宿主和中间宿主。在狐狸、犬、狼、猫等终末宿主中，成虫孕节中的虫卵随粪便排至体外，虫卵对外界因素的抵抗力极强，如在2℃的水中可存活达两年之久，低温对泡球蚴几乎无作用，在-51℃的条件下，短时间内对它的存活是没有影响的。田鼠等啮齿类中间宿主吞食虫卵，虫卵内含有的六沟蚴通过消化道途径在胃内孵出，钻入肠壁，随着肝门静脉血转移到肝脏，在肝脏中迅速发育称为多房棘球蚴。以田鼠为例，六沟蚴侵入后20天，就能产生具有感染力的头节。终末宿主狐狸、犬、狼、猫等吞食中间宿主含泡球蚴的肝脏而受感染，原头节进入小肠隐窝内，发育成为成虫。潜伏期为30-33天，成虫的寿命约为3个月。多房棘球蚴在终末宿主和中间宿主之间反复循环，得以延续生命完成生活史过程。人同样也是中间宿主，但是并非是适宜的中间宿主，患者多数是农牧民，主要因捕猎、饲养狐狸或剥制狐皮而受感染，或者通过饮水等间接方式感染。家庭喂养的猪或者野猪也是非适宜的中间宿主，它主要是由于饮水、环境接触等间接方式而受到感染。

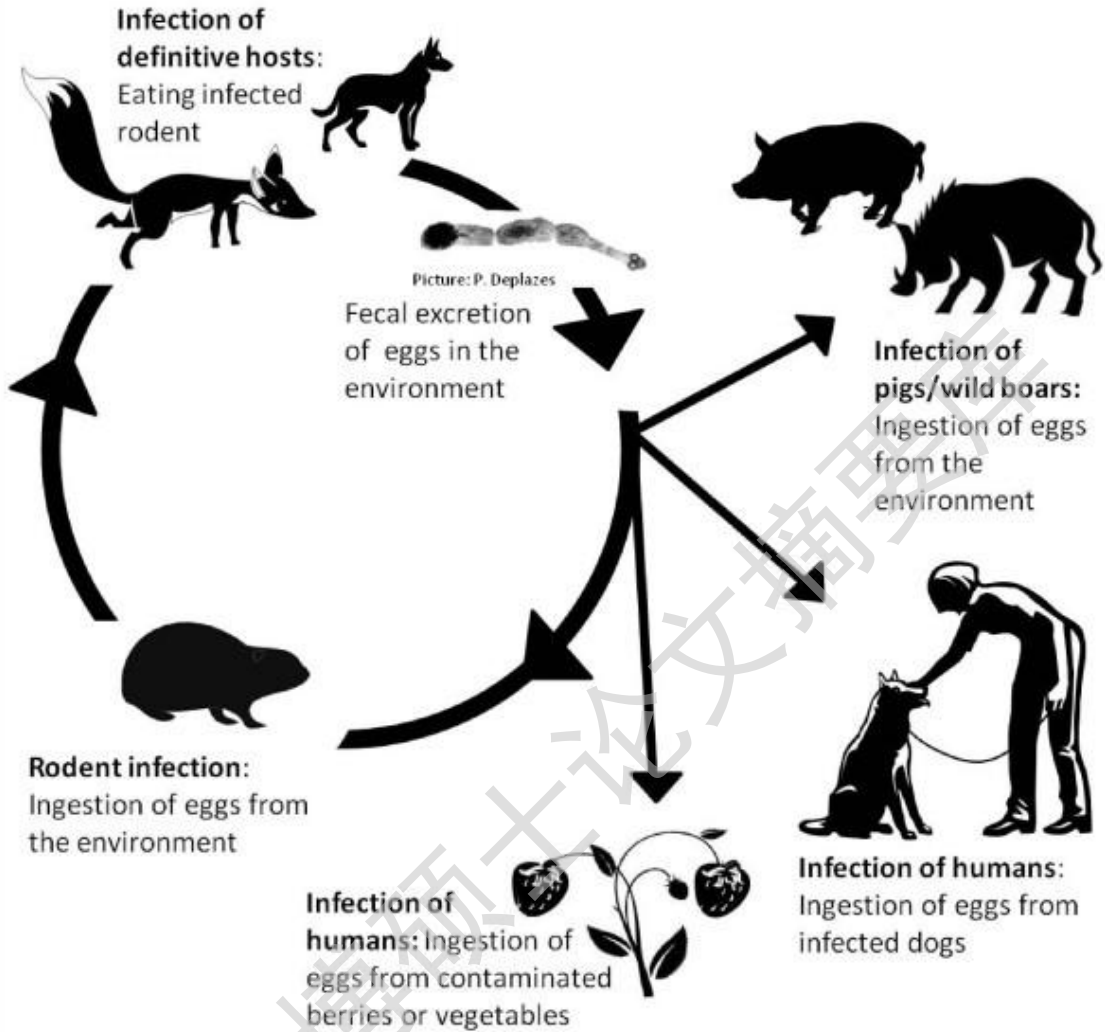


图1 多房棘球绦虫生活史

Fig. 1 Life cycle of *Echinococcus multilocularis*

(From Helene Wahlström et al., 2011)

1.1.2 多房棘球绦虫病简介

多房棘球绦虫病 (Alveolar echinococcosis, A.E) 又称为泡状棘球绦虫病、泡球绦虫病、泡型包虫病或多房型包虫病, 是一种呈世界性分布、致病性极强的人兽共患蠕虫病 (helminthic zoonosis), 对生命威胁很大, 有“虫癌”之称, 被世界卫生组织列为世界十大寄生虫病之一^[14, 15]。是现今已知的四种引起包虫病的病原寄生虫之一, 其他几种分别为: 细粒棘球绦虫 (*Echinococcus granulosus*, E.G) 的幼虫棘球绦 (Hydatid cyst) 所致的囊型包虫病 (*Cystic echinococcosis*, C.E); 福氏棘球绦虫 (*Echinococcus vogeli*, E.V) 幼虫所致的多囊性包虫病

(*Polycystic echinococcosis*) ; 少节棘球绦虫 (*Echinococcus oligarthrus*, E.O) , 目前尚未见确切的人体病例报告^[16-17]。

泡球蚴病临床病例于 19 世纪中叶在德国首次被发现^[18], 往后在各大洲均有感染病例的报道出现, 主要流行于北半球高原和气候寒冷的牧区和半牧区, 从加拿大北部、美国阿拉斯加州, 直至日本北海道、俄罗斯西伯利亚以及中国^[19-22]。该病在我国主要流行于内蒙、西藏、新疆、甘肃、宁夏、青海、陕西和四川南部等广大牧区, 其他地区为偶见病例^[23]。林宇光等 (1991) ^[24]对人体病例进行过统计和报道, 约有 411 病例:包括宁夏 257 例, 新疆 62 例, 青海 40 例, 四川 35 例,甘肃 16 例。

人感染该病的原因是由于误食了被多房棘球绦虫虫卵污染的水和食物, 虫卵经口进入胃, 而后发育成六钩蚴穿过肠壁进入人的血液, 进而转移到肝脏。泡球蚴在肝脏内似癌症样浸润扩散, 进一步侵入肝脏外的器官组织, 尤其是肝门最为常见, 成为手术切除困难的原因之一。泡球蚴在人体内增殖有内殖性芽生和外殖性芽生, 内殖性芽生又称为隔膜样芽生, 通常是母囊泡壁生发膜局部增殖, 向腔内突出并持续延伸直到到达对侧, 形成了隔膜, 从而形成了小囊泡。外殖性芽生是母囊泡壁的一处或者几处向外突出, 产生单个或者多个子囊泡, 此过程称之为一级芽生, 在一级芽生的子囊泡壁上继续形成子囊泡, 称为二级芽生。按照这样的逐级芽生机制, 可以在患者体内像肿瘤样生长形成无数个多级新的囊泡, 致使泡球蚴迅速地浸润扩散。而且由于肝脏的泡球蚴可以发生继发转移, 转移到临近组织、肺部、脑部、小肠等部位, 从而产生对患者更大的危害作用。其转移方式有三种: 浸润扩散、血行扩散、淋巴转移。浸润扩散通过外殖性芽生向肝实质四周组织扩散, 以致形成泡球蚴巨块, 随后扩散至临近的肝外组织; 血行扩散则是通过增殖芽生的泡球蚴组织部分脱落侵入肝门静脉分支, 通过血液途径扩散到身体远处器官, 其中以肺转移或脑转移多见; 淋巴转移则是通过肝门淋巴系统进行转移, 通常转移到小肠或结肠系膜淋巴结处。因其类似肿瘤, 且可以像肿瘤样继发转移和浸润其他组织, 采用手术切除使囊泡内物质散开污染患者体内脏器, 术后复发率高, 难以根治, 对生命造成极大威胁, 因为被称为“二号癌症”。

泡球蚴病潜伏期很长, 从感染至发病一般在 20 年或以上, 且病程长, 具有隐蔽侵袭的特点, 病程进展不一, 有的患者在数月内死亡, 但是通常情况下病

程进展缓慢，最长可达32年。如果没有经过治疗，5年内病死率为70%，10年病死率可达93%，对人的生命安全造成极大威胁。患者一般男性较多，多为20-40岁的青壮年，其原发病灶几乎100%在肝脏。感染早期患者常无明显症状，泡球蚴在肝脏潜伏寄生，缓慢增长，肝脏代偿性增大；中期可触及坚硬如橡皮、无疼痛的肿块，表面平滑或有结节，边界清晰，易误诊为肝癌，甚至手术探查仍可被误认为肝癌；病灶增大侵蚀肝管时则可出现梗阻性黄疸；若液化空腔继发感染可形成肝脓肿；晚期巨大病灶侵蚀大部分肝脏，合并门静脉高压症，肝功能缺失代偿，最终可因肝功能衰竭、胆系感染以及肺、脑转移而导致死亡。

目前的主要诊断方式^[25-29]有以下几种：一、患者来自泡球蚴病流行区域，或者以往曾经在流行区域工作、居住过，与终末宿主狐狸、犬等的皮毛有过接触史。二、临床症状可触及肝部肿块，触之质地坚硬、呈结节感；结合第一、二条，可以考虑疑似肝泡球蚴病。三、免疫学诊断。酶联免疫吸附试验（ELISA）是适于临床诊断以及大规模流行病学调查的主要免疫学方法，操作简单，敏感性高，特异性强。四、影像学检查。发现肝内有占位性病变，X线肝区平片显示肝影增大，活动空间受限，肝区钙化影可观测到不定形的弥散状丛点状、斑点状和小圈状阴影；B超检查可以进行早期诊断、人群普查、术前检查和术后检查等，B超显示肝内异常回声区域，可观察到密集的大小不等的强光点和强光团，单个或者多个边缘不规则的区域，甚至于显示腔壁不平整的液性暗区；CT结果显示，形态不规则、周界不清、密度不均匀的病灶区域，呈现“地图状”，有多少不等的斑片状钙化等等；影像学检查泡球蚴病的特点可归纳为病灶浸润、钙化、液化空洞三种类型，肝泡球蚴病具有各种影像学检查项特异性诊断意义的图像特征中，只要确认其中1项，就可以确诊。

在目前该病的治疗手段^[29-31]中，主要有手术治疗和药物治疗。手术治疗首选外科手术治疗，手术治疗中采用的传统内囊摘除术能有效的保存有功能的肝组织，操作简单、疗效可靠。但是，与此同时，它具有术后复发率高（4.5%-20.2%）、并发症多（8.8%-65.8%）等许多不足之处。凡肝泡球蚴病感染范围限于半肝以内者，原则上应做手术根治，按照病变区域的大小，分别做肝叶、半肝或肝部分切除术。随着器官移植技术的成熟和发展，现在可以做肝脏移植术，根据1990年 Bresson-Hadni 等^[32]报道，1986-1989年期间实施的肝脏移植手

术，术后15个月存活率为70%，较其他肝移植手术存活率较低，所有患者经随访平均19个月，均无不适症状，残存的肝泡球蚴病变生长缓慢。药物治疗其代表药物有甲苯咪唑（mebendazole）^[33]、阿苯咪唑（albendazole）^[34]、吡喹酮（praziquantel）和中医药治疗等，但是迄今为止仍然没有找到完全根治和防治的普效性药物，药物治疗效果因患者个体差异也存在差别。

鉴于泡球蚴的手术治疗和药物治疗都很难达到完全根治的效果，对于该项疾病开展宣传和预防措施^[35-38]显得非常必要。第一，大力开展宣传教育。在泡球蚴流行病区，开展群众性卫生宣传教育，使广大居民真正了解泡球蚴感染途径、对人体的危害程度，以此来提高群众的自觉性和警惕性，尽可能的避免与狗、狐、狼及其皮毛接触，防范饮水等途径误吞虫卵的可能，杜绝病从口入。因虫卵耐寒而怕热，对污染的器具物品可用热力消毒^[39-41]。第二，加强狗、狐、狼等野生动物的处理和管制，野生的狗应该一律杜绝，家养的狗、猫等严加管理，定期驱虫和药物检测，或者定期皮下吡喹酮缓释剂进行杀虫。很多啮齿类动物是多房棘球绦虫的中间宿主，灭鼠可以达到中断寄生虫生活史，阻断传播途径，应集中焚烧，挖坑深埋，防止狗、猫、狐猎食。第三，流行区应对人群进行普查，结合免疫学手段和影像学如X线、B超等手段早期发现病人，争取早发现早治疗。

1.1.3 多房棘球蚴体外培养模型简介

虽然泡球蚴的手术治疗和药物治疗都很难完全康复，但是现阶段泡状棘球蚴病的治疗手段中主要依靠外科手术及药物治疗，虽然可在一定程度上改善病情，但是由于早期症状轻微并且潜伏期较长，患者就诊甚至确诊时通常已经产生了肝浸润和转移，依靠手术治疗等常规方法治疗后的复发率和十年内的病死率（75%-94%）^[42, 43]都很高。因此，泡状棘球蚴与其宿主关系的相互关系研究，泡状棘球蚴的生长发育过程研究，对于我们目前泡状棘球蚴的预防与治疗工作有着极其重要的意义。

多年以来，鉴于泡球蚴营寄生生活的特性，各国学者希望可以得到实验室条件下培养的泡球蚴，以此凭借各种技术手段在体外更为直观地检测和观察泡球蚴的生长发育过程。经过了不懈的尝试和努力，国内外学者相继建立了泡球蚴原发感染动物模型^[44-46]、继发感染动物模型^[47-53]和泡球蚴体外培养模型^[54-58]。与泡球蚴的动物感染模型相比较，泡球蚴的体外培养模型具有生长周期较

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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.