

分类号：  
学号：20212014105

密级：公开  
单位代码：10759

# 石河子大学

## 硕士学位论文



### 细粒棘球蚴诱导破骨细胞分化促进骨包虫病骨 破坏的机制研究

学位申请人	孙昊昊
指导教师	史晨辉
申请学位门类级别	医学硕士
学科、专业名称	临床医学
研究方向	骨包虫病及其发病机制
所在学院	医学院

中国·新疆·石河子  
2024年9月

密 级 : 公开

分类号:

学 号 : 20212014105

单位代码: 10759

# 石河子大学

## 硕士学位论文



### 细粒棘球蚴诱导破骨细胞分化促进骨包虫病骨破坏的机制研究

学 位 申 请 人	孙昊昊
指 导 教 师	史晨辉
申请学位门类级别	医学硕士
学 科、专 业 名 称	临床医学
研 究 方 向	骨包虫病及其发病机制
所 在 学 院	医学院

中国·新疆·石河子

2024 年 9 月

**Mechanism of osteoclast differentiation induced by *Echinococcus granulosus* promoting bone destruction in Osseous Echinococcosis**

A Dissertation Submitted to

**Shihezi University**

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

**Doctor of Medicine**

By

**Sun Haohao**

**(Osseous Echinococcosis and Its Pathogenesis)**

Dissertation Supervisor: Prof. Shi Chen-hui

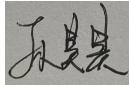
September, 2024

# 石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

## 学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：

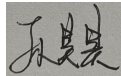


时间： 2024 年 10 月 22 日

## 使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：



时间： 2024 年 10 月 22 日

导师签名：



时间： 2024 年 10 月 22 日

## 摘要

目的：骨包虫病作为一种流行于畜牧地区的人畜共患病，可引起感染骨组织的“溶骨性”改变；但目前骨包虫病所导致病灶区的骨破坏和骨溶解现象的机制尚不清楚。核因子-红细胞衍生因子2相关因子2 (Nrf2) 作为机体内关键的抗氧化因子，在多种疾病中发挥重要的调控作用。本研究旨在验证细粒棘球蚴 (*E. granulosus*) 感染后对破骨细胞主导的骨吸收进程的影响以及 Nrf2 在感染部位骨组织中的调控关系。

### 方法：

第一部分：在体外实验中，建立了细粒棘球蚴原头节(PSC)与骨髓源性单核巨噬细胞(BMMCs)共培养体系；使用 CCK-8 实验检测不同数量 PSC 刺激下，一定时间内 BMMCs 的活性变化；TRAP 染色验证 PSC 对破骨细胞分化形成过程的影响；同时通过 F-actin 环的荧光染色探究 PSC 对破骨细胞骨吸收功能的影响；使用 RT-qPCR 和 Western Blot 检测破骨细胞标志性基因和蛋白的表达变化。在体内实验中，构建脊柱囊性包虫病 (CE) 和股骨 CE 的疾病模型，并对模型进行了分组；在实验组中，分别将含 PSC 的培养基悬液注射在沙鼠棘突旁和股骨骨膜下；对照组中，以同样的方式在相同的部位注射生理盐水作为对照。在正常环境下饲养 6 个月，对脊柱 CE 组进行 MRI 检查，对股骨 CE 组进行 X 线检查。处死模型鼠后取出相应的骨组织进行 Micro-CT 扫描，获得感染部位骨微结构的骨参数并进行分析。TRAP 染色检测 *E. granulosus* 感染后对病灶区域破骨细胞数量的影响；免疫组织化学染色 (IHC) 检测寄生虫感染后对病灶区域破骨细胞相关蛋白 TRAP 和 c-Fos 表达情况。

第二部分：本研究将 Nrf2 锁定为关键因子，在体外实验中，使用 RT-qPCR 检测 PSC 干预后细胞内 Nrf2 的表达以及不同 Nrf2 表达水平下破骨细胞相关基因的变化；通过 Western Blot 检测 PSC 干预后细胞内 Nrf2 蛋白的表达、不同 Nrf2 表达水平下破骨细胞相关蛋白的变化和 MAPK 通路相关蛋白 (p38、ERK 和 JNK) 的磷酸化水平变化；细胞荧光染色技术检验细胞内 ROS 含量和 F-actin 的形成。在体内构建野生型和 Nrf2<sup>-/-</sup>型 C57BL/6 小鼠股骨 CE 的疾病模型，Micro-CT 三维成像显现 *E. granulosus* 对骨组织的侵蚀；IHC 检测感染骨组织内 Nrf2 的表达情况；通过组织切片的 H&E 和 TRAP 染色分别检测了 *E. granulosus* 感染后股骨组织形态学变化和组织内破骨细胞的数量。

### 结果：

第一部分：CCK-8 实验结果发现，共培养后 PSC 对于 BMMCs 的活性具有促进作用。TRAP 染色验证了 PSC 对破骨细胞的分化形成具有促进作用，同时通过 F-actin 环的荧光染色表明了 PSC 可以促进骨吸收。RT-qPCR 结果表明 PSC 可以激活破骨细胞相关基因的表达，Western Blot 结果显示了 PSC 刺激后破骨细胞的标志性蛋白表达同样得到上调。体内疾病模型构建成功后，MRI 和 X 线结果显示，寄生虫感染导致了骨骼的破坏。Micro-CT 的结果显示囊泡的增殖生长可以改变骨

组织的微结构，如骨小梁数量、间距及连续性都被影响；囊泡同样也使破骨细胞在感染部位募集，相较对照组数量明显增多；IHC 的结果显示：当感染细粒棘球蚴后，感染部位骨组织内 TRAP 和 c-Fos 的蛋白表达量显著升高。

第二部分：体外和体内实验验证了当 *E. granulosus* 感染后 Nrf2 的表达水平被抑制；荧光染色结果显示了不同 Nrf2 水平下 F-actin 环和 ROS 含量的变化，说明了 PSC 干预后可以抑制 Nrf2 的表达，导致 ROS 含量增多，促进了破骨细胞的分化；RT-qPCR 和 Western Blot 的结果与上述趋势一致；同时 Western Blot 的结果还表明了 PSC 干预后 MAPK 通路被显著激活。体内疾病模型的结果发现，与野生型小鼠相比，Nrf2 敲除小鼠在受到感染后感染骨组织内破骨细胞数量增多、骨破坏更为显著。

结论：本课题研究探明并验证了 PSC 可以促进破骨细胞分化形成、提高骨吸收能力；在感染部位 PSC 可以募集破骨细胞增多并且使其高表达破骨细胞相关蛋白，发挥骨溶解作用。进一步的结果表明，Nrf2 作为关键调节因子在 *E. granulosus* 感染后起到了重要作用；当 *E. granulosus* 感染后，细胞内 Nrf2 的表达受到了显著抑制，而 ROS 含量上升，进而促进了 MAPK 通路的磷酸化，最终导致了破骨细胞分化增多，感染部位骨侵蚀现象的发生。

**关键词：**骨包虫病；Nrf2；原头节；破骨细胞；骨破坏

## Abstract

Object: Osseous echinococcosis, a zoonotic disease prevalent in animal husbandry areas, can cause "osteolytic" changes in infected bone tissue. However, the bone destruction and osteolysis mechanism caused by osseous echinococcosis is still unclear. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), a key antioxidant factor in the body, plays an important regulatory role in various diseases. This study aimed to investigate the effect of *Echinococcus granulosus* (*E. granulosus*) infection on the osteoclast-led bone resorption process and the regulatory relationship of Nrf2 in infected bone tissues.

### Methods:

Part I: In vitro, the co-culture system of protoscolex (PSC) and bone marrow-derived macrophages (BMMCs) was established. CCK-8 assay was used to detect the changes in the activity of BMMCs in a certain period after stimulation with different numbers of PSC. TRAP staining was used to verify the effect of PSC on the differentiation and formation of osteoclasts. Fluorescence staining of the F-actin ring was used to investigate the effect on bone resorption function of osteoclasts. Changes in the expression of osteoclast marker genes and proteins were detected using RT-qPCR and Western Blot. In the in vivo experiment, the disease models of spinal and femoral cystic echinococcosis were constructed and grouped. In the experimental group, the medium suspension containing PSC were injected next to the spinous process and the femoral subperiosteum of gerbils, respectively. In the control group, saline was injected at the same site in the same way. After 6 months of feeding under normal conditions, MRI examinations were performed on the spinal echinococcosis group and X-ray examinations on the femoral echinococcosis group. After the models were euthanized, the corresponding bone tissue of the model was removed for Micro-CT scanning, and the osseous parameters of the osseous microstructure at the infection site were obtained and analyzed. TRAP staining was used to detect the effect of parasite infection on the number of osteoclasts in the lesion area. Immunohistochemical (IHC) staining was used to detect the expressions of osteoclast-related proteins TRAP and c-Fos in the lesion area after parasite infection.

Part II: Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) was identified as the key factor. In vitro study, RT-qPCR was used to detect the expression of Nrf2 in cells after PSC intervention and the changes of osteoclast-related genes under different Nrf2 expression levels. Western Blot was used to detect the expression of Nrf2 protein in the cells after PSC intervention, the changes of osteoclast-related proteins under different Nrf2 expression levels, and the phosphorylation levels of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway-related proteins (p38, ERK, and JNK). The intracellular ROS content and F-actin

formation were detected by cell fluorescence staining. The disease models of CE in the femur of wild-type (WT) and Nrf2 knockout (Nrf2<sup>-/-</sup>) C57BL/6 mice were established in vivo. Micro-CT three-dimensional imaging showed the erosion of bone tissue by *E. granulosus*. The expression of Nrf2 in infected bone tissue was detected by IHC. The histomorphologic changes and the number of osteoclasts in the femoral bone after *E. granulosus* infection were detected by Hematoxylin and Eosin staining (H&E) and TRAP staining.

#### Results:

Part I: CCK-8 assay showed that PSC could promote the activity of BMMCs after co-culture. TRAP staining verified that PSC promoted the formation of osteoclasts, and fluorescent staining of the F-actin ring showed that PSC also promoted the bone resorption process. The RT-qPCR results show that PSC can activate the expression of osteoclast-related genes, and the Western Blot results show that the expression of the signature protein of osteoclasts is also upregulated after PSC stimulation. After the in vivo disease models were successfully established, the MRI and X-ray results showed that parasite infection led to bone destruction. Micro-CT results showed that the cysts changed the microstructure of bone tissue. Cysts also recruit osteoclasts at the site of infection; The results of immunohistochemical staining showed that the protein expressions of TRAP and c-Fos were significantly increased after *E. granulosus* infection.

Part II: In vitro and in vivo experiments confirmed that Nrf2 expression was inhibited when *E. granulosus* was infected. Fluorescence staining showed changes in the F-actin ring and ROS content under different Nrf2 levels, indicating that PSC intervention can inhibit the expression of Nrf2, resulting in increased ROS content and promoting osteoclast differentiation. The results of RT-qPCR and Western Blot were consistent with the above trends. Western Blot results also showed that the MAPK pathway was significantly activated after PSC intervention. In vivo modeling showed that Nrf2<sup>-/-</sup> mice had a significantly greater number of osteoclasts in the bone tissue at the infected site after infection compared with wild-type mice.

Conclusion: This study demonstrates that PSC can promote osteoclast differentiation and improve bone resorption ability. In the infection site, PSC can recruit osteoclasts and increase their expression of osteoclast-related proteins, which plays an important role in osteolysis. Further results showed that Nrf2 plays an important role as a key regulator after *E. granulosus* infection. When *E. granulosus* is infected, the expression of Nrf2 in cells is significantly inhibited, and the ROS content is increased, which promotes the phosphorylation of the MAPK pathway, and ultimately leads to increased osteoclast differentiation and bone erosion in the infected site.

**Key words:** Osseous Echinococcosis; Nrf2; Protoscolex; Osteoclast differentiation; Bone destruction

# 目录

摘要 .....	I
Abstract .....	III
目录 .....	V
缩略表 .....	VII
第 1 章 前言 .....	1
1.1 细粒棘球蚴病的流行病学现状 .....	1
1.2 骨包虫病的临床特征及其诊疗 .....	1
1.3 破骨细胞及其相关分子 .....	3
1.4 Nrf2 对破骨细胞分化的调控 .....	4
1.5 小结 .....	4
第 2 章 细粒棘球蚴通过促进破骨细胞分化增强骨吸收 .....	6
2.1 研究内容与方法 .....	8
2.1.1 研究对象 .....	8
2.1.2 内容与方法 .....	12
2.1.3 数据统计与分析 .....	25
2.2 实验结果 .....	26
2.2.1 细粒棘球蚴原头节对骨髓源性巨噬细胞活性的影响 .....	26
2.2.2 细粒棘球蚴原头节对破骨细胞分化的影响 .....	26
2.2.3 细粒棘球蚴原头节对破骨细胞相关基因及蛋白表达的影响 .....	27
2.2.4 小鼠骨包虫病疾病模型的构建 .....	28
2.2.5 骨组织 Micro-CT 结果 .....	30
2.2.6 骨组织染色结果 .....	31
2.3 小结 .....	32
第 3 章 细粒棘球蚴通过抑制 Nrf2 促进 MAPK 通路介导的破骨细胞分化 .....	33
3.1 研究内容与方法 .....	35
3.1.1 研究对象 .....	35
3.1.2 内容与方法 .....	36
3.1.3 数据统计与分析 .....	39
3.2 实验结果 .....	40
3.2.1 原头节刺激后 Nrf2 的变化情况 .....	40
3.2.2 Nrf2 表达的改变对破骨细胞分化的影响 .....	41

3.2.3 Nrf2 表达的改变对破骨细胞相关基因及蛋白的影响 .....	42
3.2.4 Nrf2 表达的改变对 MAPK 通路的影响 .....	43
3.2.5 Nrf2 <sup>-/-</sup> 小鼠股骨囊型包虫病疾病模型的构建 .....	44
3.3 小结 .....	46
第 4 章 讨论 .....	47
第 5 章 结论和展望 .....	52
结论: .....	52
展望: .....	52
第 6 章 综述 .....	53
参考文献 .....	57
致谢 .....	65
作者简介 .....	66
导师评阅表 .....	67

## 缩略表

### 中英文缩略对照表

中文全称	英文全称	英文缩写
阿苯达唑	Albendazole	ABZ
泡型包虫病	Alveolar echinococcosis	AE
抗氧化反应元件	Antioxidant response element	ARE
骨髓源性树突状细胞	Bone marrow derived dendritic cells	BMDCs
骨髓源性单核巨噬细胞	Bone marrow-derived macrophage cells	BMMCs
组织蛋白酶 K	Cathepsin K	CathK
计算机断层扫描	Computed tomography	CT
囊型包虫病	Cystic echinococcosis	CE
细粒棘球蚴	<i>Echinococcus granulosus</i>	<i>E. granulosus</i>
多房棘球蚴	<i>Echinococcus multilocularis</i>	<i>E. multilocularis</i>
血红素加氧酶-1	Heme oxygenase-1	HO-1
Kelch 样 ECH 相关蛋白 1	Kelch-like ECH-associated protein 1	Keap1
巨噬细胞集落刺激因子	Macrophage colony stimulating factor	MCSF
磁共振成像	Magnetic resonance imaging	MRI
基质金属蛋白酶-9	Matrix metalloproteinases-9	MMP9
甲苯咪唑	Mebendazole	MBZ
丝裂原活化蛋白激酶	Mitogen-activated protein kinase	MAPK
核因子红系 2 相关因子 2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2	Nrf2
核因子 $\kappa$ B	Nuclear factor kappa-B	NF- $\kappa$ B
活化 T 细胞的核因子 1	Nuclear factor of activated T cell cytoplasmic 1	NFATc1
破骨细胞	Osteoclast	OC

## 中英文缩略对照表

中文全称	英文全称	英文缩写
原头节	Protoscolex	PSC
NF- $\kappa$ B 受体激活剂受体	Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B	RANK
NF- $\kappa$ B 受体激活剂配体	Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand	RANKL
活性氧	Reactive oxygen species	ROS
萝卜硫素	Sulforaphane	SFN
抗酒石酸酸性磷酸酶	Tartrate-resistant acid phosphatase	TRAP

## 第1章 前言

### 1.1 细粒棘球蚴病的流行病学现状

棘球蚴病（包虫病）是一类主要在畜牧业发达地区流行的人畜共患病，最为常见的是细粒棘球蚴病和多房棘球蚴病。细粒棘球蚴病由细粒棘球蚴（*E.granulosus*）引起，又称囊型包虫病（cystic echinococcosis, CE）；多房棘球蚴病由多房棘球蚴（*Echinococcus multilocularis*, *E.multilocularis*）引起，又称泡型包虫病（alveolar echinococcosis, AE），其中囊型包虫病的发病率远高于泡型包虫病<sup>[1]</sup>。人感染囊型包虫病主要是因为误食了含有 *E.granulosus* 虫卵的食物或者水源，虫卵通过消化道到达小肠，在小肠发育成为六钩蚴（oncosphere）后穿透肠壁进入人体的血液系统，可通过血液系统定植在全身多个器官，在器官内发育成为 *E.granulosus* 幼虫（metacestode），最终逐渐发育形成为内含原头节（protoscolex, PSC）的囊泡<sup>[2]</sup>。

*E.granulosus* 感染以肝（70%）和肺（20%）最为常见，其次是腹腔、脑和骨骼等其他器官。当患者感染 *E.granulosus* 后早期不会出现特异性的症状，所以 CE 难以早发现、早治疗。其临床表现与感染部位有关，当寄生在肝脏时以腹痛、黄疸和胆汁淤积为最主要的初始症状<sup>[3]</sup>；肺部受累时则出现如呼吸受限、胸痛、咳血等呼吸系统症状<sup>[4]</sup>；也可寄生在肾脏出现血尿等泌尿系统症状；当寄生于骨骼时则可引发神经压迫或病理性骨折等。

包虫病的分布是呈世界性的，本文主要研究的 CE 则分布于除南极之外的世界各地，特别是地中海盆地、中东、欧亚、中国西南部、俄罗斯以及非洲<sup>[5]</sup>；在我国 CE 的分布多达十一个省区，其中新疆包虫病感染率居全国之首。包虫病影响着全球约 100 万的人口，每年给医疗行业带来 30 亿美元的损失<sup>[6]</sup>；给疫区的人们带来巨大经济负担的同时，也对人类健康构成严重威胁。目前，世卫组织已将包虫病确定为旨在 2050 年消灭的 20 种被忽视的疾病之一<sup>[7]</sup>。

### 1.2 骨包虫病的临床特征及其诊疗

骨包虫病占包虫病总体发病率的 0.5%~4%<sup>[8]</sup>，骨包虫病中最常见的部位是脊柱（45%-50%），其次是长骨（包括股骨、胫骨和肱骨等，25%）、骨盆（20%）、头骨和肋骨等<sup>[9, 10]</sup>。骨 CE 相较肝 CE 或肺 CE 发病率较低，但因其发病隐匿，容易误诊等特

征往往伴随有高复发率、高致残率和高死亡率，其预后与恶性骨肿瘤相似。据报道，骨 CE 在症状出现后 5 年内，病死率超过 50%<sup>[9, 11]</sup>。

在大多数的病例报道中（83%），骨 CE 是单独出现的，并未发现身体其他部位的 *E.granulosus* 感染<sup>[12]</sup>。一旦进入骨骼，*E.granulosus* 会如同肿瘤一般侵犯骨周围的软组织或关节；但因其生长缓慢、隐匿，难以被提前发现<sup>[13]</sup>。脊柱受累时，寄生虫沿着骨小梁浸润及传播，囊泡继续生长可侵及椎弓根和椎板，在病理上呈现出明显的“溶骨性”表现，甚至可引起病理性的椎体压缩性骨折。寄生虫也可侵入周围软组织形成椎旁、椎管内的包虫囊泡<sup>[14]</sup>。因为囊泡组织对骨质的侵蚀较慢，对于神经的刺激和机械压迫多在疾病晚期发生，故大多患者就诊时脊柱的骨性结构已出现广泛的破坏。且患者多以局部疼痛、肢体麻木、肢体皮肤感觉异常、截瘫等神经根性症状就诊<sup>[9, 15]</sup>，这与脊柱结核、蛛网膜囊肿、肿瘤的脊柱转移等疾病极易混淆，这无疑极大的增加了疾病诊治的难度。长骨受累时，其骨干或干骺端可观察到圆形或椭圆形的骨陷窝、骨缺损存在，骨侵蚀现象明显，且囊泡可累及骨周围的软组织甚至突破到关节腔内，影响关节功能<sup>[16, 17]</sup>。*E.granulosus* 也可在骨髓腔内生长，因受到髓腔限制，其呈条带状沿髓腔生长，最终突破骨皮质，导致病理性骨折的发生。在骨盆中，囊泡主要在髌骨形成，可在影像学检查中观察到溶骨现象；囊泡可以延伸至髌关节、髌髌关节以及盆骶周围的软组织内<sup>[18, 19]</sup>。

关于骨 CE 的诊断尚存在一定的难度，仅借助影像学手段难以进行确诊。在临床中，医生往往需要借助患者的生活职业史（是否有畜牧史、生食肉制品等）、影像学检测、血清学检查，甚至进行囊肿的穿刺；而且需要与肿瘤、结核或其他感染性疾病相鉴别<sup>[20]</sup>。X 线作为诊断过程的第一步，只能显像是否存在骨折或占位<sup>[21, 22]</sup>，具有一定的局限性。相较于传统的 X 线，计算机断层扫描（computed tomography, CT）和磁共振成像（magnetic resonance imaging, MRI）则更精确。CT 可以发现更加隐匿的骨侵蚀，也可以显示更多关于囊泡的信息，包括大小、范围、位置等<sup>[23]</sup>。MRI 可以精确地显示囊肿的数量、大小、囊壁的完整性以及与周围软组织的毗邻关系；如在脊柱 CE 中，MRI 可以显现出囊肿对脊髓的压迫程度<sup>[24]</sup>。血清学检查作为一种 CE 的筛查手段，分为针对囊液和 PSC 的抗原检测和针对患者血清的抗体检测。但这两种方法都有一定的局限性，特异性和灵敏度都无法达到理想的结果；如当患者的囊泡出现老化或钙化时则可呈假阴性，或当患者感染其他寄生虫病时可出现假阳性结果<sup>[25]</sup>。

根治性手术是目前彻底治愈骨 CE 的唯一方法<sup>[26]</sup>，术中需要完全切除受累骨骼和侵犯的软组织，但这种方式具有极强的局限性，如囊泡在脊柱或者股骨等部位实行根治术则会导致高致畸率甚至死亡；只有经过严密的术前评估，认为囊泡可通过根治术彻底被清除的同时，对患者不会造成不可逆损伤的情况下才会被慎重选择。在临床实践中，实施以牺牲患者生活质量及肢体完整性为代价的根治性骨切除术的可能性并不高。因此，

在多数情况下会采用基于手术和抗寄生虫药物的联合疗法<sup>[27]</sup>。由于骨骼具有一定的硬度，囊泡无法呈球形生长，同时因为没有纤维囊的限制，囊泡可导致骨破坏并可达到皮质骨，甚至突破到周围的软组织，这也使得手术更加复杂，术中难以彻底清理病灶。在一项包含了 721 例骨 CE 的系统综述中，97% 的患者采取了手术治疗，但只有 16% 的患者被完全治愈<sup>[12]</sup>。就患者而言，复发总比治愈先到来，骨 CE 的复发率高达 48%。骨 CE 的治疗方案类似于恶性骨肿瘤，对于无法耐受手术或错过最佳手术时机的患者只能采取药物及放射治疗等姑息性方法<sup>[28]</sup>。阿苯达唑 (Albendazole, ABZ) 和甲苯咪唑 (Mebendazole, MBZ) 是目前使用广泛的两种抗包虫药物，但因其肠道吸收弱和血液浓度低的缺点，这两种药物的疗效在约 40% 的患者中较差。骨 CE 患者的局部血液 ABZ 和 MBZ 浓度甚至更低，由于寄生部位存在骨屏障，这些药物在骨 CE 患者中的疗效不如在肝脏和肺部 CE 患者<sup>[29-31]</sup>。综上所述，关于骨 CE 的治疗无论是手术治疗还是药物治疗更甚是联合治疗，都达不到理想的疗效。

### 1.3 破骨细胞及其相关分子

破骨细胞主要位于哈佛系统内，是一种由骨髓中单核巨噬细胞相互融合后再进行高度分化所形成的多核巨细胞<sup>[32]</sup>。破骨细胞活化是骨吸收的前提，移行和吸收是破骨细胞进行骨吸收的两种状态，即破骨细胞通过从骨髓向矿化骨表面移行并黏附，然后形成吸收区域开始骨吸收<sup>[33, 34]</sup>。NF- $\kappa$ B 受体激活剂配体 (receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand, RANKL) 来源于肿瘤坏死因子- $\alpha$  家族，其与巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony stimulating factor, MCSF) 共同参与破骨细胞的分化形成<sup>[35, 36]</sup>。C-Fos 是 fos 家族的一员，与原癌基因 v-fos 为同源物；其主要通过两种方式在破骨细胞的分化过程中起到正向调节作用，一方面它可以上调 RANK 的表达<sup>[37, 38]</sup>，使得单核细胞/巨噬细胞谱系向破骨细胞谱系转化；另一方面它可以作为 RANK/RANKL 信号通路的一部分，诱导破骨细胞分化。同时 c-Fos 也可以与 Jun 蛋白结合形成的复合物 AP-1，在破骨细胞形成的初始阶段发挥转录调控作用<sup>[38]</sup>。抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP) 是一种常见于骨骼和免疫系统中的含铁酶，组织染色发现在骨组织的破骨细胞中表达为强阳性，在其他组织中则不表达或者低表达<sup>[39]</sup>。在骨吸收过程中，TRAP 由破骨细胞溶酶体分泌，可发挥骨基质降解和细胞外蛋白的作用<sup>[40]</sup>。组织蛋白酶 K (cathepsin K, CathK) 是一种在破骨细胞内高度表达的半胱氨酸蛋白酶，广泛存在于破骨细胞溶酶体和细胞质中。CathK 可以酸化其所在的微环境，溶解骨内的矿化物质，使其暴露出有机基质，随后 CathK 和其他蛋白酶降解 I 型胶原<sup>[41-43]</sup>。基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinases-9, MMP9) 是属于 MMPs 家族，可以募集破骨细胞并使其向骨吸收

区域迁移，并增强骨吸收进程；同样在胶原酶溶解中发挥重要作用<sup>[44, 45]</sup>。

## 1.4 Nrf2 对破骨细胞分化的调控

核因子红系 2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 源于碱性亮氨酸拉链蛋白家族，该家族由 Nrf1、Nrf2、Nrf3 和 p45 NF-E2 构成；其中普遍表达的为 Nrf1 和 Nrf2，Nrf3 仅在胎盘和肝脏组织中表达，而 p45 NF-E2 则表达于红细胞中<sup>[46]</sup>。Nrf2 近年来被验证存在于如破骨细胞、成骨细胞等多种细胞内，是参与细胞内氧化应激过程的主要调节因子<sup>[47, 48]</sup>。在正常静止状态时，Nrf2 与 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1) 形成二聚体存在于细胞质中。Keap1 作为细胞内外源性刺激和氧化应激的感受器蛋白，当细胞受到刺激或氧化应激活跃时，Keap1 被修饰，Nrf2 从与 Keap1 形成的二聚体中释放，易位至细胞核中。被激活的 Nrf2 进入细胞核后通过自身的亮氨酸拉链域与抗氧化反应元件 (antioxidant response element, ARE) 结合形成一种细胞防御机制<sup>[49, 50]</sup>。

在破骨细胞分化形成过程中，Nrf2 同样发挥着重要的调控作用。当细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 生成增多时，ROS 的高表达使细胞质中的 Nrf2 从 Nrf2/Keap1 二聚体中被释放。被释放的 Nrf2 易位至细胞核中与抗氧化元件结合形成 Nrf2-ARE 异二聚体，促进并激活如血红素加氧酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1) 等抗氧化酶来抑制破骨细胞的分化<sup>[51]</sup>。目前已有大量研究证实 Nrf2 在破骨细胞分化过程中发挥重要的调控作用，且这种调控作用主要集中在对 ROS 和 RANKL 的影响上<sup>[52, 53]</sup>。Nrf2 的缺失则会抑制抗氧化酶的形成，导致细胞内 ROS 含量增高，破骨细胞分化形成增多。同时也有研究报道，敲除 Nrf2 可导致 RANKL 诱导的骨髓源性单核细胞 (bone marrow-derived macrophage cells, BMDCs) 内的活化 T 细胞的核因子 1 (nuclear factor of activated T cell cytoplasmic 1, NFATc1) 和 c-Fos 水平的上调以及破骨细胞分化过程的活跃<sup>[54]</sup>。

## 1.5 小结

通过查阅相关文献，已有研究对于骨 CE 是通过血行播散导致寄生虫直接寄生在骨骼系统还是由其他脏器感染后转移至骨骼系统尚无确切结论。同时，在收集了临床上确诊为骨 CE 的患者的影像学资料发现，寄生虫的感染部位存在骨质破坏和骨溶解现象。但无论是对于骨 CE 的罹患方式还是发生骨侵蚀现象的原因目前都缺乏理论依据。在基础研究方面，*E.granulosus* 造成骨质破坏的机制研究目前近乎空白，具体分子机制尚不明确；破骨细胞作为唯一可以引起骨吸收的细胞，其是否参与 *E.granulosus* 所引起的骨