

◇ 药学研究 ◇

没食子鞣酸对日本血吸虫感染小鼠模型肝病理改变的影响及作用机制研究

李尤玲^{1a}, 杨靖^{1b,2}, 李健^{1b,2}, 李刚^{1b}

(1. 湖北医药学院附属人民医院 a. 中西医结合科, b. 感染性疾病科, 湖北 十堰 442000;

2. 湖北医药学院基础医学院病原学实验室, 湖北 十堰 442000)

摘要:目的 在建立血吸虫肝纤维化小鼠模型基础上, 研究没食子鞣酸对血吸虫感染所致肝纤维化的影响及作用机制。方法 利用日本血吸虫尾蚴感染 BALB/c 小鼠建立感染模型, 将 50 只小鼠随机分为没食子鞣酸高、中、低浓度组、正常对照组和模型组等 5 组, 每组 10 只。血吸虫感染 4 周后, 各组分别给予相应的药物干预, 模型组、正常对照组仅给予生理盐水, 不予药物干预。没食子鞣酸连续灌胃 4 周后, 观察小鼠的生活状况并记录小鼠体质量。实验开始 8 周后处死小鼠取标本做免疫组化检测结缔组织生长因子 (CTGF) 的表达; HE 染色、Masson 染色观察小鼠肝脏病理学变化。结果 与造模组小鼠相比, 3 个没食子鞣酸干预组肝肉芽肿面积较小, 纤维化程度较轻, 肝组织 CTGF 蛋白表达水平较低, 均差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 没食子鞣酸可明显减轻日本血吸虫对小鼠感染模型肝病理学损伤, 缓解肝肉芽肿所致肝纤维化程度。

关键词: 没食子鞣酸; 日本血吸虫; BALB/c 小鼠; 肝脏; 组织病理学

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2017.04.007

Anti-fibrotic effect and mechanism of Gallic tannin on the hepatic fibrosis mouse model infected with *Schistosoma japonicum*

LI Youling^{1a}, YANG Jing^{1b,2}, LI Jian^{1b,2}, LI Gang^{1b}

(1a. Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine; 1b. Department of Infectious Disease, Renmin Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China; 2. Pathogenic Laboratory of Basic Medical Sciences, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China)

Abstract: Objective To investigate the anti-fibrotic effect of Gallic tannin in a schistosomiasis-induced hepatic fibrosis mouse model. **Methods** Fifty BALB/c mice were randomly assigned into Gallic tannin high concentration group, middle concentration group, low concentration group, model group and normal group. The first four groups were infected by *Schistosoma japonicum* cercaria. After 4 weeks infection, the groups were given appropriate medication, control group received saline. Meanwhile, each group had intragastric administration one time every day for 4 weeks. Then we observed living conditions, and recorded the mice body weight. Specimens were detected by immunohistochemistry the expression of CTGF, HE staining, MASSON staining pathological changes in the liver of mice. **Results** The degree of fibrosis, the expression of CTGF protein in the three Gallic tannin groups were less than model group, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusions** Gallic tannic can significantly reduce the liver pathology injury induced by *Schistosoma japonicum* cercaria, and relieve the degree of liver fibrosis.

Key words: Gallic tannin; *Schistosoma japonicum*; BALB/c mice; Liver; Pathology

血吸虫肝纤维化病发生的主要原因是沉积于肝组织内的大量成熟血吸虫对机体的刺激作用, 以及宿主对血吸虫活毛蚴分泌的可溶性抗原 (Soluble Egg Antigen, SEA) 产生的病理性免疫应答协同所导

致的肝慢性免疫性疾病, 病程中病情逐渐加重形成肝肉芽肿和继发性肝纤维化^[1]。当前临床治疗血吸虫病的公认有效药物是吡喹酮^[2], 但该药治疗后肝组织中的血吸虫等仍然可以继续释放 SEA^[3], 激活一系列信号通路, 致使肝肉芽肿出现并继续诱导肝纤维化^[4]。没食子鞣酸来源于五倍子等药用植物, 具有护肝、抗炎、抗氧化、抗单纯疱疹病毒 1 型 (Herpes Simplex Virus 1, HSV-1) 诱导的病毒性脑炎等作用^[5-9]。本研究旨在探讨血吸虫肝纤维化发展

基金项目: 湖北省卫生计生生血防专项 (WJ2015XB032); 十堰市科技局市级科学技术研究与开发专项基金项目 (16K70); 湖北医药学院研究生启动金资助计划项目 (2015QDJZR08)

通信作者: 李刚, 男, 副教授, 研究方向: 感染性疾病的治疗, E-mail: Hr168@163.com

早期,没食子鞣酸对血吸虫感染肝纤维化小鼠模型肝组织病理学的影响,进而探讨产生具体作用机制,为临床治疗血吸虫肝纤维化病提供新的治疗方法和机制研究参考。

1 材料与方法

1.1 实验试剂与钉螺 没食子鞣酸(纯度 80%)购自成都植标化纯生物技术有限公司。兔抗小鼠结缔组织生长因子(Connective Tissue Growth Factor, CTGF)抗体购自美国 CST 公司。Masson 染色试剂盒购自珠海贝索生物科技有限公司。SABC 免疫组化试剂盒、苏木精染色液、伊红染色液、生素标记并结合亲和素-辣根过氧化物酶(HRP)的羊抗兔 IgG 购自武汉博士德生物工程有限公司。感染日本血吸虫钉螺由南京市血防站提供。

1.2 实验动物 雄性 BABL/c 小鼠,体质量 18 ~ 22 g,购自湖北省疾病预防控制中心动物中心。实验室温度(25 ± 2) °C,相对湿度(50 ± 15) %,正常昼夜节律(即 12 h 光照/12 h 黑暗交替),所有小鼠分盒饲养,5 只/盒,自由饮水、采食。适应性喂养 1 周后开始实验。研究方案参照国际公认实验动物伦理原则,符合华中科技大学实验室动物使用原则。

1.3 模型建立和动物分组 50 只小鼠采用随机数字表法分 5 组,即没食子鞣酸高、中、低浓度组,模型组和正常对照组,每组 10 只。没食子鞣酸用生理盐水分别制成 8、4、2 g · L⁻¹ 的悬浮液,给药剂量 80、40、20 mg · kg⁻¹,给药体积 10 mL · kg⁻¹。造模前,各组分别给予高浓度没食子鞣酸(80 mg · kg⁻¹ · d⁻¹),中浓度没食子鞣酸(40 mg · kg⁻¹ · d⁻¹),低浓度没食子鞣酸(20 mg · kg⁻¹ · d⁻¹),模型组和正常对照组给予等量生理盐水,作用 5 d。在第 6 天除正常对照组所有组小鼠造模,腹部贴片造模,每只小鼠感染(25 ± 5) 条血吸虫尾蚴。感染 4 周后,各组小鼠给予相应的药物。给药 4 周后,处死小鼠采标本。整个实验过程详细记录小鼠生活状况。

1.4 肝脏组织病理学检测 肝组织常规石蜡包埋后 4 μm 连续切片做 HE 染色和 Masson 染色,光镜观察并用目镜测微器测量每张切片肝肉芽肿大小,求平均值。肝肉芽肿面积 = 最大横径 × 最大纵径,目镜测微器每格为 0.10 mm,肉芽肿平均面积 = 每张切片总的肉芽肿面积之和 ÷ 每张切片总的肉芽肿数。Masson 染色切片计算胶原纤维面积,通过肝纤维化程度评分^[10]判断肝纤维化程度(分 0 ~ 6 分 7 个判断标准)。

1.5 肝组织 CTGF 免疫组化分析 免疫组化染色

操作按抗体使用说明书及试剂盒说明书进行。每张切片随机摄取 5 个高倍视野照片,采用 Image-Pro Plus 5.0.1 软件对图像进行半定量分析,计算平均光密度值(MOD)表示蛋白相对表达量。实验均用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照,用已知阳性切片作阳性对照。

1.6 统计学方法 所有数据用 SPSS 19.0 进行统计学分析处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较为单因素方差分析,两两比较则进行 LSD-*t* 检验,等级资料采用 Kruskal-Wallis H 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠生存状况 正常对照组小鼠毛发润泽整齐、尿液清亮、肝标本表面光滑红润。模型组小鼠活动减少、明显厌食、毛发杂乱、尿液深黄、肝标本表面晦暗并有少许结节显得色泽不均衡、部分肠道扩张甚至伴鼓胀。没食子鞣酸高浓度组小鼠食欲良好、尿液清亮、肝标本表面红润光滑、较少出现肠道扩张。随着没食子鞣酸浓度的降低,小鼠生存状态变差。实验开始 8 周后,正常对照组、没食子鞣酸高浓度组小鼠无死亡;模型组死亡 2 只,没食子鞣酸中浓度组死亡 1 只,没食子鞣酸低浓度组死亡 2 只。

造模前各组小鼠的体质量差异无统计学意义,造模前与治疗后各组小鼠体质量统计结果见表 1。

表 1 造模前与给药后各组小鼠体质量变化/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数/只	平均体质量/g	
		造模前	给药后
正常对照组	10	20.61 ± 1.31	24.22 ± 0.58
模型组	10	19.70 ± 0.17	20.42 ± 0.96 ^a
低浓度组	10	19.50 ± 0.13	21.31 ± 1.14 ^a
中浓度组	10	20.20 ± 0.11	21.13 ± 1.16 ^a
高浓度组	10	19.42 ± 0.17	23.94 ± 1.78 ^b
F 值		6.944	19.468
P 值		0.000	0.000

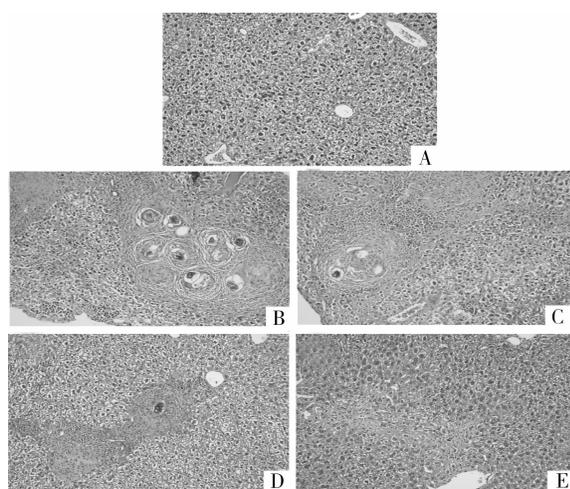
注:与正常对照组相比,^a $P < 0.05$;与模型组相比,^b $P < 0.05$ 。

2.2 小鼠肝纤维化分级 HE 染色结果可见正常对照组小鼠肝标本表面红润光滑,显微镜镜下观察小叶结构完整、中央静脉清晰、肝细胞索呈整齐的放射状(图 1A)。模型组可见大量慢性血吸虫性结节,结节周围包绕着梭形的成纤维细胞和胶原,部分慢性血吸虫性结节、中心坏死、出现纤维团块聚集成块、被吸收(图 1B)。没食子鞣酸组肝结节面积,条索状纤维明显较少,并随药物浓度增加而改

善(图 1C~E)。各组小鼠肝脏纤维化评分正常对照组无纤维化,模型组和低浓度组得分多为 4~5 分,中浓度组得分多为 3~4 分,高浓度组得分多为 2~3 分。各组肝纤维化程度评分均差异有统计学意义($H_c = 30.85, P = 0.000 < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组小鼠肝脏组织纤维化评分情况/只

组别	鼠数	0分	1分	2分	3分	4分	5分	6分
正常对照组	10	10	0	0	0	0	0	0
模型组	8	0	0	0	1	2	4	1
低浓度组	8	0	0	0	1	3	3	1
中浓度组	9	0	0	1	3	4	1	0
高浓度组	10	0	0	3	4	2	1	0



注:A.正常对照组;B.模型组;C.低浓度组;D.中浓度组;E.高浓度组。

图 1 小鼠肝组织 HE 染色($\times 200$)

2.3 小鼠肉芽肿面积 小鼠感染 8 周后处死,模型组 Masson 染色中可见增生的小静脉周围纤维、汇管区有大量炎性细胞浸润可见结节、小静脉和肉芽肿周围的胶原纤维向肝小叶周围延伸且部分延伸向肝小叶间、甚至可见纤维条索连接成网状分割肝小叶。正常对照组、模型组、没食子鞣酸高、中、低浓度组 5 个组小鼠平均肉芽肿面积见表 3。没食子鞣酸高、中、低浓度组分别与模型组相比,病变程度和范围上明显减轻,均差异有统计学意义。

2.4 小鼠肝组织中 CTGF 蛋白表达 正常对照组小鼠肝内均未见明显 CTGF 阳性着色,模型组阳性着色细胞主要位于中央小叶、窦周细胞的细胞质及肉芽肿中,此外还见于肝星状细胞(HSC)、炎性细胞、门静脉周围纤维带及纤维间隔中,呈深棕黄色,肝细胞不着色。没食子鞣酸高、中、低浓度组小鼠肝脏 CTGF 阳性细胞分布区域同上,着色较造模组

均浅($P < 0.05$),没食子鞣酸低浓度组 CTGF 含量低于模型组($P < 0.05$),但仍高于正常对照组($P < 0.05$),见表 3。

表 3 各组小鼠肝脏组织内肉芽肿面积及 CTGF 蛋白表达量/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数/只	肉芽肿面积/ μm^2	CTGF 蛋白表达量 (MOD/Area)
正常组	10	0	0.128 \pm 0.025
模型组	8	32 621.86 \pm 3 766.13 ^a	0.423 \pm 0.046 ^a
低浓度组	8	29 766.45 \pm 2 348.64 ^a	0.284 \pm 0.015 ^{a b}
中浓度组	9	19 762.52 \pm 1 565.31 ^{a b}	0.237 \pm 0.069 ^{a b}
高浓度组	10	11 203.91 \pm 313.15 ^{a b}	0.195 \pm 0.053 ^b
F 值		414.485	49.901
P 值		0.000	0.000

注:多重比较的显著性标记,与正常对照组相比,^a $P < 0.05$;与模型组相比,^b $P < 0.05$ 。

3 讨论

目前虽对血吸虫病大面积采用有效廉价药物吡喹酮治疗,但全世界仍至少有 8 亿人受威胁,还有超过 70 个国家中约 2.3 亿人被感染,每年因血吸虫病死亡的人数在 20 万左右^[1]。我国的日本血吸虫病主要分布在长江流域,血吸虫病人约 36 万,仍是对我国公众威胁最大的 4 个主要传染性疾病之一,现每年花费防控资金高达 7 亿人民币^[11]。当前尚无预防血吸虫感染的疫苗,主要有效药物吡喹酮杀伤童虫效果不理想,吡喹酮治疗后组织中血吸虫可持续释放 SEA 产生肉芽肿进一步诱导肝纤维化^[2]。吡喹酮有效治疗后,大部分早、中期病例的肝纤维化能停止或逆转,但部分病例仍能继续发展,因此发现有效且毒副作用小的药物用于血吸虫病肝纤维化治疗的新型药物迫在眉睫。已发现血管紧张素 II 受体拮抗剂替米沙坦可安全有效用于晚期血吸虫肝硬化门静脉高压的治疗^[12],中西医结合治疗血吸虫病肝纤维化是目前的重要研究方向。

CTGF 可介导对细胞外信号及微环境变化的反应,刺激成纤维细胞增殖,直接诱导或易化、转化生长因子- β (TGF- β)、肾素-血管紧张素系统(RAS)、血小板源性生长因子(PDGF)等,其过度表达与增生性或纤维化疾病发生发展密切相关,可能是环境因素与肝纤维化表型转化之间联系的桥梁^[13]。

本研究发现没食子鞣酸对血吸虫肝纤维化小鼠的肝脏病理学组织有明显改善作用,且没食子鞣酸可抑制血吸虫肝纤维化小鼠肝脏内 CTGF 的表达,因此可以推论出没食子鞣酸可能是通过下调 CTGF 的表达而发挥出抗血吸虫肝纤维化的作用。