

DOI:10.13350/j.cjpb.220711

• 论著 •

单性日本血吸虫成虫感染性小鼠肝纤维化研究^{*}

汤宪时, 曲国立, 戴建荣, 季文翔, 周永华, 许永良, 全德胜^{**}, 梁幼生^{**}

(国家卫生健康委员会寄生虫病预防与控制技术重点实验室, 江苏省寄生虫与媒介控制技术重点实验室, 江苏省血吸虫病防治研究所, 江苏无锡 214064)

【摘要】 **目的** 观察和评估单性日本血吸虫成虫感染小鼠出现肝纤维化病变风险。 **方法** 将40只小鼠随机分为双性感染组、单性雄虫组、单性雌虫组和未感染组, 每组10只, 分别经腹壁皮肤接触感染雌雄尾蚴、雄性尾蚴、雌性尾蚴和不含尾蚴的去氯水, 感染尾蚴数为(40±1)条/只。双性感染组小鼠感染周期为6周, 其余3组为36周。取小鼠肝脏, 观察肝脏大体形态; 经HE和Masson染色镜下观察小鼠肝脏病理变化和胶原纤维增生情况; 测定肝脏胶原纤维特有的羟脯氨酸含量; 应用荧光定量PCR和Western blot检测肝组织α-SMA、TGF-β1、Col1、Col3 mRNA和蛋白表达水平。 **结果** 与无感染组比较, 单性雄虫组小鼠肝脏颜色发黑, 肝组织内有大量色素沉积, 周围有炎性细胞浸润, 色素沉积处有胶原纤维; 单性雌虫组小鼠肝脏大体形态与无感染组相似, 病理变化和胶原纤维增生明显轻于单性雄虫组。单性雄虫组、单性雌虫组、双性感染组和未感染组小鼠的肝脏羟脯氨酸含量分别为(0.209±0.033)、(0.187±0.034)、(0.194±0.04)和(0.122±0.016)μg/mg, 单性雄虫组、单性雌虫组均显著高于未感染组(*P*均<0.05), 与双性感染组均无明显差异。单性雄虫组小鼠肝脏Col1(2.4±0.91)和α-SMA(0.22±0.1)mRNA表达都明显高于未感染组[Col1(1.05±0.29)、α-SMA(0.08±0.01)](*P*均<0.05), Col1(2.4±0.91)(*P*<0.01)和TGF-β1(4.28±2.58)(*P*<0.05)mRNA表达均显著高于双性感染组; 单性雌虫组各基因mRNA表达水平与未感染组相比均无显著差异, Col1(1.34±0.18)和TGF-β1(3.55±1.34)mRNA表达水平也显著高于双性感染组[Col1(0.84±0.14)、TGF-β1(0.31±0.11)、α-SMA(0.36±0.11)、Col3(2.15±0.61)](*P*均<0.01), α-SMA(0.17±0.11)(*P*<0.05)和Col3(0.51±0.23)(*P*<0.01)mRNA表达则显著降低。单性雄虫组小鼠肝脏各基因蛋白表达水平与未感染组比较均无明显差异; 单性雌虫组TGF-β1(1.03±0.39)蛋白表达量显著低于未感染组TGF-β1(1.78±0.29)(*P*<0.05)。 **结论** 单性血吸虫成虫会导致小鼠肝脏炎症细胞浸润, 胶原纤维增生, 羟脯氨酸增加、部分肝纤维化分子指标mRNA表达上调等肝纤维化特征和向肝纤维化演变趋势, 并且单性雄虫比单性雌虫更易引发小鼠肝脏病变。

【关键词】 日本血吸虫; 单性血吸虫; 肝纤维化

【中图分类号】 R383.24

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)07-0796-06

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Jul.;17(7):796-801.]

The study on mice hepatic fibrosis caused by adult unisexual *Schistosoma japonicum* infection

TANG Xian-shi, QU Guo-li, DAI Jian-rong, JI Wen-xiang, ZHOU Yong-hua, XU Yong-liang, TONG De-sheng, LIANG You-sheng (Key Laboratory of National Health and Family Planning Commission on Parasitic Disease Control and Prevention, Jiangsu Provincial Key Laboratory on Parasite and Vector Control Technology, Jiangsu Institute of Parasitic Diseases, Wuxi 214064, Jiangsu, China)^{***}

【Abstract】 **Objective** To observe and evaluate the risks of liver fibrosis in mice infected with adult single-sex *Schistosoma japonicum*. **Methods** Forty mice were randomly divided into 4 groups: bisexual infection group, unisexual male group, unisexual female group and uninfected group, with 10 mice in each group. The 4 groups were respectively infected via abdominal skin contact with cercariae of both sexes, exclusively male cercariae, exclusively female cercariae and dechlorinated water without cercariae, with cercariae number being (40±1) per mouse. Mice in the bisexual infection group were sacrificed 6 weeks post-infection, whereas mice in the other 3 groups were sacrificed 36 weeks post-infection. The mice livers were sampled and observed for all the 4 groups; the pathological changes and collagen expression of liver specimens were detected using hematoxylin & eosin (HE) and Masson staining; the liver hydroxyproline content was determined; the mRNA and protein expression levels of α-SMA, TGF-β1, Col1 and Col3 in liver tissues of each group were detected by fluorescence quantitative PCR and Western blot. **Results** Compared with the uninfected group, the liver color

* **【基金项目】** 无锡市科学技术局医疗与公众健康技术创新应用项目(No. WX0302B010507190087PB)。

** **【通讯作者】** 梁幼生, E-mail: liangys58@163.com; 全德胜, E-mail: tds419@163.com

【作者简介】 汤宪时(1984-), 男, 辽宁人, 硕士, 助理研究员。研究方向: 寄生虫分子生物学。E-mail: txsvik@163.com。
汤宪时和曲国立为共同第一作者。

of the unisexual male group was darkened, there was marked pigment deposition in the liver tissue, surrounded by inflammatory cells infiltration and collagen fibers hyperplasia; the pathological changes and collagen fiber hyperplasia were much less prominent in the unisexual female group than in the unisexual male group. The liver hydroxyproline content of both unisexual male group (0.209 ± 0.033) $\mu\text{g}/\text{mg}$ and unisexual female group (0.187 ± 0.034) $\mu\text{g}/\text{mg}$ was significantly higher than that of the uninfected group (0.122 ± 0.016) $\mu\text{g}/\text{mg}$ (both P values < 0.05), as high as that of the bisexual group (0.194 ± 0.04) $\mu\text{g}/\text{mg}$. The mRNA expressions of Col1 (2.4 ± 0.91) and α -SMA (0.22 ± 0.1) in the liver of the unisexual male group were significantly higher than those of the uninfected group (Col1 (1.05 ± 0.29) and α -SMA (0.08 ± 0.01), both P values < 0.05), and the mRNA expressions of liver Col1 (2.4 ± 0.91) ($P < 0.01$) and TGF- β 1 (4.28 ± 2.58) ($P < 0.05$) of the unisexual male group were significantly higher than those of the bisexual infection group; There was no significant difference in mRNA expression levels of all 4 genes between the unisexual female group and the uninfected group, whereas the Col1 (1.34 ± 0.18) and TGF- β 1 (3.55 ± 1.34) mRNA expression levels of the unisexual female group were significantly higher than those of bisexual infection group (Col1 (0.84 ± 0.14), TGF- β 1 (0.31 ± 0.11), α -SMA (0.36 ± 0.11), Col3 (2.15 ± 0.61) (both P values < 0.01), with α -SMA (0.17 ± 0.11) ($P < 0.05$) and Col3 (0.51 ± 0.23) ($P < 0.01$) mRNA expressions significantly decreased. There was no significant difference in the protein expression levels of all 4 liver genes in the unisexual male group compared with the uninfected group, and the protein expression of TGF- β 1 (1.03 ± 0.39) in unisexual female group was significantly lower than TGF- β 1 (1.78 ± 0.29) expression in the uninfected group ($P < 0.05$). **Conclusion** Adult single-sex *Schistosoma japonicum* causes liver pathological changes in mice including inflammatory cells infiltration, collagen fiber hyperplasia, increased hydroxyproline content, up-regulated mRNA expression level of genes related to hepatic fibrosis, indicating progression tendency to liver fibrosis, and the male schistosoma infection results in more severe damages to the mouse liver than the female schistosoma.

【Key words】 *Schistosoma japonicum*; unisexual *Schistosoma*; hepatic fibrosis

血吸虫病是一种严重危害人类健康的人兽共患寄生虫病,主要流行于东南亚、南美、非洲和中东等国家和地区,是世界范围内重要的公共卫生问题之一^[1-4]。日本血吸虫病流行于我国长江流域及其以南的省份,建国初期血吸虫病病人超过1 100余万例^[5-6],经过近70年的努力,全国血吸虫病已呈低度流行水平。截至2020年底,全国450个流行县(市、区)中,337个(74.89%)达到血吸虫病消除标准,98个(21.78%)达到传播阻断标准、仅15个(3.33%)仍处于传播控制阶段^[7]。

雌雄虫配对产卵为典型特征的双性血吸虫感染是日本血吸虫常见的感染形式,单性日本血吸虫感染在自然条件下普遍存在,未配对的雄虫或雌虫可单独长期存在于宿主体内^[8]。在2010年湖北长江沿线哨鼠检测中,哨鼠日本血吸虫感染率为5.5%(22/400),哨鼠单性血吸虫感染率为4%(16/400),单性感染中主要为雄性血吸虫感染(14/16)^[9]。同样,在单性血吸虫感染实验中,已观察到雌性日本血吸虫可在小鼠体内存活31周^[10],在家兔体内存活至少一年之久^[11]。但是由于单性血吸虫所在的宿主症状不明显^[8],以虫卵为基础的寄生虫学检测不适用,血清学检测不特异^[12],以及未配对的雌虫虫体发育不全不易辨认^[10]等原因,单性血吸虫感染易被忽视。

由于单行血吸虫(尤其雄虫)在宿主体内不产卵,无虫卵在肝内沉积,未出现引起虫卵导致的肉芽肿和继发的肝纤维化,因而单性血吸虫具有与宿主长期共

存、改变宿主免疫系统状态、调节包括糖尿病^[13]在内宿主慢性疾病症状等应用潜力。本研究探究C57BL/6J小鼠感染单性血吸虫9个月后肝脏是否出现纤维化或类似纤维化病变,为评估单性血吸虫应用前景和探讨血吸虫引发肝纤维化机制提供依据和基础。

材料与方法

1 材料

1.1 实验动物及钉螺 SPF级C57BL/6J小鼠(6周龄)购自扬州大学比较医学中心。动物均饲养于江苏省血吸虫病防治研究所实验动物中心,实验过程中对动物的饲养及取材均遵守《江苏省寄生虫病研究所实验动物的护理和使用指南》。感染性及未感染性钉螺均由江苏省血吸虫病防治研究所提供。

1.2 主要仪器及试剂 PCR仪购于德国Eppendorf公司;LightCycler480荧光定量PCR仪购于美国BD公司;SpectraMax i3x多功能酶标仪购于美国Molecular Devices公司)电泳仪和转膜仪购于美国Bio-Rad公司;凝胶成像仪购于美国Bio-Rad公司)。RT-PCR引物购于上海生工生物工程股份有限公司;BCA试剂盒购于碧云天生物科技有限公司;TGF- β 一抗购于英国Abcam公司; α -SMA一抗购于英国Abcam公司;Collagen I一抗购于美国Affinity Biosciences公司;Collagen III一抗购于武汉三鹰生物技术有限公司;GAPDH一抗购于武汉爱博泰克生物科技有限公司;HRP羊抗兔二抗购于碧云天生物科技有限公司;

HRP 羊抗鼠二抗购于碧云天生物科技有限公司。

2 方法

2.1 日本血吸虫单性尾蚴制备 取有日本血吸虫虫卵沉积的小鼠肝脏,打碎匀浆,收集虫卵,室温白炽灯光照下,于去氯水中孵育毛蚴。用移液器挑选单个毛蚴,于96孔板中与单个未感染性钉螺共孵育3h,覆以筛网防止钉螺爬出。钉螺一旦被单个毛蚴感染,该钉螺逸出尾蚴均来自同一毛蚴,具有同一性别。感染60d后,每个钉螺单独逸尾蚴,经腹壁皮肤感染小鼠,标记相应小鼠和钉螺号码,35d后解剖小鼠,收集虫体,根据虫体性别,确定钉螺逸出尾蚴性别,并于4℃条件下保存钉螺。

2.2 动物分组及模型建立 C57BL/6J小鼠40只,雄性,6周龄,体重(20±0.5)g。小鼠饲养1周后,随机分为4组,每组10只。双性感染组:小鼠经腹壁皮肤接触感染雌雄尾蚴40条/只;单性雄虫组:小鼠经腹壁皮肤接触感染雄性尾蚴40条/只;单性雌虫组:小鼠经腹壁皮肤接触感染雌性尾蚴40条/只;未感染组:以不含尾蚴的去氯水处理。各组小鼠于空调温控动物室饲养,室温20~25℃,相对湿度约60%,光照每12h明暗交替,小鼠自由饮食。双性感染组小鼠感染周期为6周,其余3组为36周。各组小鼠麻醉后采血处死,无菌留取肝组织,提取小鼠肝脏的总RNA和蛋白质及羟脯氨酸检测;置于4%多聚甲醛固定,用于HE和Masson染色检测。

2.3 HE和Masson染色 肝组织于4%多聚甲醛固定液中4℃固定1周,脱水、石蜡切片,分别按照HE和Masson染色试剂盒说明书中步骤进行组织染色处理,中性树脂封片。光学显微镜下拍照观察各组小鼠肝组织病理学变化和胶原增生情况,Masson染色以蓝染部分表示胶原纤维。

2.4 小鼠肝脏羟脯氨酸含量测定 取各只小鼠肝组织,称量约100mg,记录湿重。按照羟脯氨酸测定试剂盒说明书完成试剂配置、样本水解和PH调节,使用紫外分光光度计测各管上清液的吸光度值(A),并按下列公式计算小鼠肝脏羟脯氨酸含量,羟脯氨酸含量(μg/mg湿重)=[(A_{测定管}-A_{空白管})/(A_{标准管}-A_{空白管})]×标准管含量(5μg/mL)×水解液总体积(10mL)/肝脏湿重(mg)。

2.5 肝组织α-SMA、TGF-β1、Col1、Col3 mRNA表达检测 取100mg小鼠肝组织,液氮研磨后加入1mL Trizol裂解液裂解,提取肝脏总RNA,紫外分光光度法定量RNA浓度。按试剂说明书步骤去除其中基因组DNA,进行逆转录反应。逆转录成cDNA后通过管家基因β-actin相对定量目标基因Collagen I(Col1)、Collagen III(Col3)、TGF-β和α-SMA的mR-

NA表达。运用Oligo6软件进行引物设计(表1)。荧光定量PCR的反应条件为:95℃预变性5min;95℃变性10s,60℃退火30s,72℃延伸1min,共40个循环;72℃延伸10min。以β-actin为基准值,使用ΔΔCT方法进行各基因相对量的计算和结果分析。

2.6 肝组织α-SMA、TGF-β1、Col1、Col3蛋白表达检测 取20~40mg小鼠肝脏组织,于RIPA裂解液中研磨,4℃裂解2h,离心提取可溶性肝脏总蛋白,以BCA法测定蛋白浓度。进行蛋白变性、SDS-PAGE电泳、转膜、封闭、一抗和二抗孵育、化学发光,使用凝胶成像系统进行曝光拍照。使用Image J软件计算各蛋白条带灰度值,标示小鼠肝脏中目标基因Collagen I、Collagen III、TGF-β和α-SMA的蛋白表达量。以管家基因GAPDH的蛋白表达量为基准,比较各组小鼠肝脏各目标基因的相对蛋白表达。

表1 基因表达检测引物序列
Table 1 Primer sequences for qPCR assay for determination of TGF-β, α-SMA, Col 1 and Col 3 gene expression

基因 Gene	引物序列 Primer sequence
TGF-β	F:ATGTGCAGGATAATTGCTGCC R:TGGTGTGTACAGGCTGAGG
α-SMA	F:CTATGCTCTGCCTCATGCCA R:CTCACGCTCAGCAGTAGTCA
Col 1	F:ACTGGCAACCTCAAGAAGTCCC R:AAGTTCCGGTGTGACTCGTGC
Col 3	F:ACGCAAGGCATGAGACTCC R:GCAAACAGGGCCAATGTCCA
β-Actin	F:GTCCCTCACCTCCCAAAAAG R:GCTGCCTCAACACCTCAACCC

2.7 统计学处理 采用Excel 2017建立数据库,应用SPSS 21.0软件进行统计学分析。对数据进行正态性检验,计量资料呈正态分布或近似正态分布,以均数、标准差等进行描述性统计。两组计量资料间比较采用独立样本t检验。P<0.05为差异有统计学意义。

结 果

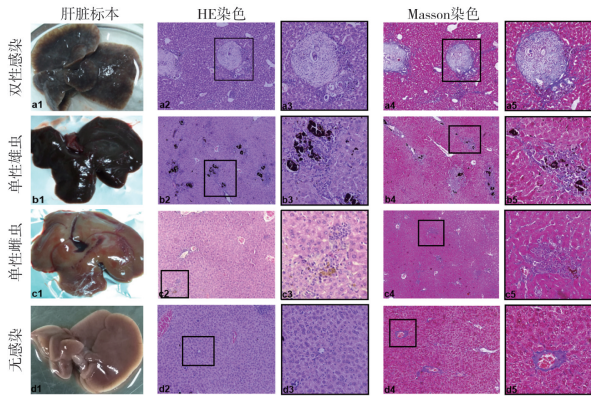
1 小鼠肝脏大体形态

小鼠肝脏解剖标本显示双性感染组小鼠肝脏色暗,不均一,质软,表面不光滑,有颗粒状物质(图1a1);单性雄虫组小鼠肝脏色黑,均一,质软,表面光滑(图1b1);单性雌虫组(图1c1)小鼠肝脏与无感染组(图1d1)小鼠肝脏类似,色浅,均一,质软,表面光滑。

2 小鼠肝组织病理学变化

HE染色显示,双性感染组小鼠肝组织中有大量虫卵沉积,虫卵周围被大量炎症细胞包裹,形成虫卵肉芽肿结构,附近肝细胞变性坏死,肝窦明显扩张,扭曲变形(图1a2和a3);单性雄虫组小鼠肝组织中有大量

色素沉积,色素周围有大量炎性细胞浸润,肝索结构局部发生轻微紊乱,肝窦间毛细血管扩张充血(图 1b2 和 b3);单性雌虫组小鼠肝组织中有少量色素沉积,色素周围有炎性细胞浸润,肝组织结构基本完整,轮廓较清晰,肝窦间毛细血管扩张充血(图 1c2 和 c3);无感染组小鼠肝小叶结构正常,肝细胞呈放射状排列,形态正常,肝组织内无色素沉积(图 1d2 和 d3)。



注:a2、a4、b2、b4、c2、c4、d2、d4, 100×; a3、a5、d3、d5, 200×; b3、b5、c3、c5, 400×。

图 1 各组小鼠肝脏大体形态、组织病理学改变(HE 染色)和胶原增生情况(Masson 染色)

Fig. 1 The liver gross morphology, pathological changes (HE staining) and collagen proliferation (Masson staining) of liver tissues in mice of each group

3 小鼠肝组织胶原增生情况

Masson 胶原染色显示,双性感染组小鼠肝组织中肝纤维化明显,主要在虫卵肉芽肿周围出现胶原纤维沉积,并向肝小叶内延伸(图 1a4 和 a5);单性雄虫组(图 1b4 和 b5)和单性雌虫组(图 1c4 和 c5)小鼠肝组织内色素沉积处有胶原纤维,单性雄虫组胶原纤维沉积更明显;无感染组小鼠肝组织汇管区和中央静脉管壁有少许胶原纤维(图 1d4 和 d5)。

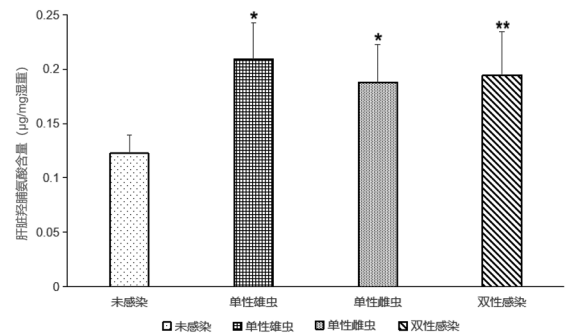
4 小鼠肝脏羟脯氨酸含量检测

检测结果显示,与未感染组(0.12 ± 0.01) $\mu\text{g}/\text{mg}$ 相比,双性感染组($t=5.85, P<0.01$)、单性雄虫组($t=4.19, P<0.05$)和单性雌虫组($t=3.99, P<0.05$)小鼠肝脏羟脯氨酸含量均显著升高。双性感染组(0.19 ± 0.04) $\mu\text{g}/\text{mg}$ 、单性雄虫组(0.21 ± 0.03) $\mu\text{g}/\text{mg}$ 和单性雌虫组(0.18 ± 0.03) $\mu\text{g}/\text{mg}$ 无显著差异(图 2)。

5 小鼠肝组织 α -SMA、TGF- β 1、Col1、Col3 基因 mRNA 表达水平

荧光定量 PCR 结果显示,与未感染组(Col3(0.37 ± 0.21)、 α -SMA(0.08 ± 0.01)、TGF- β 1(2.5 ± 0.77)、Col1(1.05 ± 0.29))比较,双性感染组小鼠肝脏 Col3 (2.15 ± 0.61)和 α -SMA(0.36 ± 0.11)mRNA 水平均显著升高($t=6.44$ 和 $4.29, P$ 均 <0.01), TGF- β 1

(0.31 ± 0.11)mRNA 显著降低($t=-38, P<0.01$), Col1(0.84 ± 0.14)mRNA 表达无显著差别;单性雄虫组小鼠肝脏 Col1(2.4 ± 0.91)和 α -SMA(0.22 ± 0.1) mRNA 表达都明显高于未感染组($t=2.57$ 和 $2.42, P$ 均 <0.05), TGF- β 1(4.28 ± 2.58)和 Col3(1.28 ± 0.75)mRNA 表达量与未感染组无显著差别;单性雌虫组各基因(Col1(1.34 ± 0.18)、 α -SMA(0.17 ± 0.11)、TGF- β 1(3.55 ± 1.34)、Col3(0.51 ± 0.23)) mRNA 表达水平与未感染组相比均无显著差异。与单性雌虫组比较,单性雄虫组小鼠肝脏 Col1 mRNA 表达明显增高($t=2.01, P<0.05$), α -SMA、TGF- β 1 和 Col3 mRNA 表达无显著差异;双性感染组 Col1 和 TGF- β 1 mRNA 表达水平与单性雌虫组比较显著降低($t=-5.33$ 和 $-4.8, P$ 均 <0.01), α -SMA($t=3.24, P<0.05$)和 Col3($t=13.8, P<0.01$)mRNA 表达显著升高。单性雄虫组 Col1($t=2.95, P<0.01$)和 TGF- β 1($t=2.66, P<0.05$)mRNA 表达均显著高于双性感染组,两组 α -SMA 和 Col3 mRNA 表达无显著差异(图 3)。

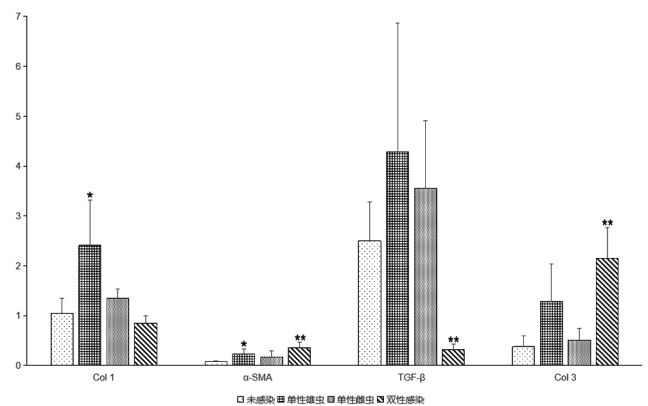


注:与未感染组比较,* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 2 各组小鼠肝脏羟脯氨酸含量

Note: compared with the uninfected group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Fig. 2 Hydroxyproline content of mice livers from each group



注:与未感染组比较,* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 3 各组小鼠肝组织 α -SMA、TGF- β 1、Col1、Col3 基因 mRNA 表达水平

Note: compared with the uninfected group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Fig. 3 mRNA expression levels of α -SMA, TGF- β 1, Col1 and Col3 in liver tissues of each group

6 小鼠肝组织 α -SMA、TGF- β 1、Col1、Col3 基因蛋白表达水平

Western blot 结果显示,单性雄虫组(Col3(0.92 \pm 0.18)、 α -SMA(1.63 \pm 1.08)、TGF- β 1(2.34 \pm 0.56)、Col1(0.88 \pm 0.29))小鼠肝脏各基因蛋白表达水平与未感染组(Col3(0.65 \pm 0.15)、 α -SMA(0.72 \pm 0.23)、TGF- β 1(1.78 \pm 0.29)、Col1(0.98 \pm 0.18))比较均无明显差异;单性雌虫组 TGF- β 1(1.03 \pm 0.39)蛋白表达量显著低于未感染组($t = -3.3, P < 0.05$), Col1(0.8 \pm 0.39)、Col3(0.48 \pm 0.22)和 α -SMA(0.48 \pm 0.13)蛋白表达无显著差异。与单性雌虫组比较,单性雄虫组小鼠肝脏 TGF- β 1 和 Col3 蛋白表达量明显升高($t = 4$ 和 $4.55, P$ 均 < 0.05), Col1 和 α -SMA 蛋白表达水平无显著差异(图 4 和图 5)。

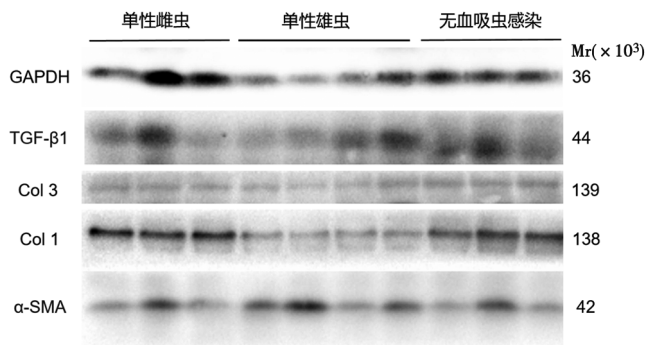
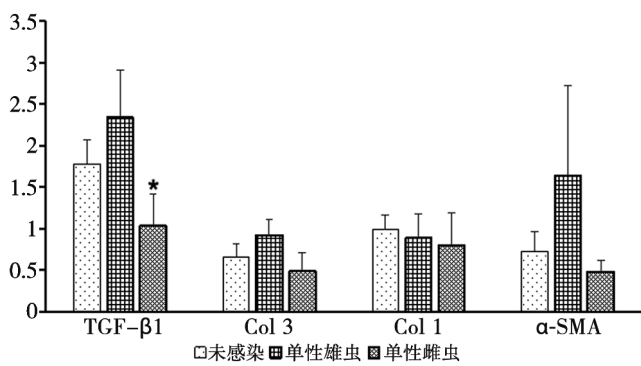


图 4 各组小鼠肝组织 α -SMA、TGF- β 1、Col1、Col3 蛋白 Western blot 图

Fig. 4 Western Blot detection of α -SMA, TGF- β 1, Col1 and Col3 protein levels in liver tissues of each group



注:与未感染组比较, * $P < 0.05$ 。

图 5 各组小鼠肝组织 α -SMA、TGF- β 1、Col1、Col3 蛋白表达水平

Note: compared with the uninfected group, * $P < 0.05$.

Fig. 5 Protein expression levels of α -SMA, TGF- β 1, Col1 and Col3 in liver tissues of each group

讨论

双性血吸虫感染引发宿主肝脏虫卵肉芽肿和肝纤维化的机制是被门脉血流带入肝脏的血吸虫虫卵成熟,持续释放可溶性虫卵抗原(Soluble Egg Antigen, SEA),募集活化大量中性粒细胞、单核细胞与淋巴细胞,产生多种细胞因子,导致持续性炎症发生,进而引

起肝星状细胞活化增殖,转化为成纤维细胞,大量合成以 I、III 型胶原为主的细胞外基质(ECM),导致 ECM 在肝内的过度沉积,造成肝纤维化。晚期形成门静脉高压、腹水、脾肿大等类似肝硬化的临床表现^[14-16]。

本研究使用形态学和分子生物学方法探讨单性日本血吸虫成虫是否也会导致宿主发生肝纤维化样病变。结果显示,与正常小鼠比较,感染雄性血吸虫的小鼠肝脏出现较明显的色素沉积、炎症反应等病理变化和胶原纤维增生情况,肝脏羟脯氨酸含量明显上升,与感染双性血吸虫的小鼠肝脏羟脯氨酸含量无明显差异,虽然肝脏 Col1 和 α -SMA mRNA 表达上调,但是与肝纤维化相关的各分子指标蛋白表达水平未明显升高。而与正常小鼠比较,感染雌性血吸虫小鼠肝脏病理变化和胶原纤维增生不明显,但肝脏羟脯氨酸含量升至与感染双性血吸虫小鼠肝脏羟脯氨酸含量持平,与肝纤维化相关的各分子指标 mRNA 和蛋白表达水平均未上调。

单性血吸虫成虫引发宿主肝内病变的机制目前尚不清楚。由于单性血吸虫,尤其雄性血吸虫,在宿主体内不产卵,因而宿主肝脏发生病变原因与虫体来源的物质密不可分^[17]。血吸虫成虫从成熟伊始就会从栖身的肠系膜静脉和门静脉释放大量的物质进入血循环,这些物质包括以外泌体形式分泌和外排的多种细胞特异性蛋白、脂类、mRNA 和非编码 RNA^[18-20],以及部分虫体降解物质和排泄物^[17],这些物质通过血流进入肝脏,极有可能是引起感染单性血吸虫小鼠肝内病变的直接原因。由于血吸虫源性色素来自人体血红蛋白,原本在血吸虫消化道沉着,后从血吸虫口中排出,因此不会引起肝脏炎症和纤维化^[21-22],但本研究观察到单性血吸虫寄生导致的肝内色素沉积部位与肝内炎症浸润及胶原纤维染色位置高度重合,色素量与肝内病变程度呈正比,因而不能排除单性血吸虫源性色素沉积作为致病原因之一的可能性。本研究发现单性血吸虫感染引起的小鼠肝内色素沉积非常明显,而感染双性血吸虫小鼠肝内色素沉积光镜下几乎不可见,这可能与各组小鼠血吸虫感染时长不同有关,单性血吸虫寄生长达 9 个月,而双性血吸虫感染仅有 6 周,但不能排除未经雌雄合抱的单性血吸虫吸收和储存色素能力下降。

本研究发现,除了肝内羟脯氨酸升高程度相似外,单性雄虫寄生引起的小鼠肝内病理变化和胶原纤维增生明显比单性雌虫寄生严重,同时,在分子水平上,单性雄虫寄生的小鼠肝脏部分与肝纤维化相关指标的 mRNA(Col1)和蛋白(TGF- β 1 和 Col3)表达明显高于单性雌虫寄生的小鼠。原因主要为由于未经雌雄合抱,单独存在的雌虫发育不完全,进而单性雌虫分泌和

排出的虫源性色素和致病物质都相应地明显减少。但是单性雌虫感染未导致与单性雄虫感染不同的肝内病变,证明两者引发宿主肝内病变的机制相似,只在程度上存在差异,未出现虫卵引发肝纤维化的致病过程。虽然单性血吸虫与宿主共存长达9个月,并且光镜下可以观察到肝内炎症和胶原纤维出现,Western blot结果显示单性血吸虫感染没有使小鼠肝内I、III型胶原蛋白显著增高,证明单性血吸虫寄生引发的肝内炎症,虽然持久存在,但仍不足以有效激活肝星状细胞,进而导致肝纤维化。本研究Western blot检测未包括双性感染组小鼠肝脏样本,主要由于小鼠感染双性血吸虫仅6周,尚不足以形成明显肝纤维化。荧光定量PCR结果中双性感染组TGF- β 1 mRNA表达不升反降,可能与该组小鼠肝组织cDNA长期储存出现降解有关。

本研究证明单性血吸虫成虫感染可导致小鼠肝脏出现病变,病变具有炎症细胞浸润,胶原纤维增生,羟脯氨酸增加、部分肝纤维化分子指标mRNA表达上调等肝纤维化特征,单性雄虫比单性雌虫更容易引发小鼠肝脏向肝纤维化演变。本研究虫卵可溶性抗原是日本血吸虫性肝纤维化的致病原因,单一性别血吸虫成虫所分泌的抗原物质因素之一。但单性血吸虫分泌的致病物质尚不清楚,各物质作用靶点、产生效应方式和对炎症或纤维化的作用,以及药物治疗等方面尚需进一步研究。

【参考文献】

- [1] LoVerde PT. Schistosomiasis[J]. Adv Exp Med Biol, 2019 (1154):45-70.
- [2] Curtis J, Minchella DJ. Schistosome population genetic structure: when clumping worms is not just splitting hairs[J]. Parasitol Today, 2000, 16(2):68-71.
- [3] Steinmann P, Keiser J, Bos R, et al. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk[J]. Lancet Infect Dis, 2006, 6(7):411-425.
- [4] Collins C, Xu J, Tang S. Schistosomiasis control and the health system in P. R. China[J]. Infect Dis Poverty, 2012, 1(1):8-8.
- [5] Ross AG, Sleigh AC, Li Y, et al. Schistosomiasis in the People's Republic of China: prospects and challenges for the 21st century[J]. Clin Microbiol Rev, 2001, 14(2):270-295.
- [6] Zhou XN, Wang LY, Chen MG, et al. The public health significance and control of schistosomiasis in China-then and now[J]. Acta Trop, 2005, 96(2-3):97-105.
- [7] 张利娟,徐志敏,杨帆,等. 2020年全国血吸虫病疫情通报[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2021, 33(3):225-233.
- [8] Lu DB, Deng Y, Ding H, Liang YS, Webster JP. Single-sex schistosome infections of definitive hosts: Implications for epidemiology and disease control in a changing world[J]. PLoS Pathog, 2018, 14(3):e1006817.
- [9] 涂祖武,蔡顺祥,黄希宝,等. 2010年湖北省重点水域血吸虫感染性监测[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2012, 24(2):193-195, 199.
- [10] Li PT. The development of *Schistosoma japonicum* in unisexual and bisexual infections[J]. Acta Zoologica Sinica, 1959, 11(4):499-506.
- [11] 裘丽姝,张永红,陈伟,等. 日本血吸虫性别与循环抗原检出的关系[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1994(3):65-66.
- [12] Zhou YB, Yang MX, Wang QZ, et al. Field comparison of immunodiagnostic and parasitological techniques for the detection of *Schistosomiasis japonica* in the People's Republic of China[J]. Am J Trop Med Hyg, 2007, 76(6):1138-1143.
- [13] 汤宪时,曲国立,戴建荣,等. 单性日本血吸虫感染对高脂饮食诱导小鼠2型糖尿病的预防作用研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(9):1014-1019.
- [14] 钟昊然,金亚美. 日本血吸虫病肝纤维化的研究进展[J/OL]. 中国动物传染病学报; 1-7[2021-12-04]. <https://doi.org/10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20211103.011>.
- [15] 程明亮,杨长青. 肝纤维化的基础研究与临床[M]. 人民卫生出版社, 2002.
- [16] Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis[J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2011, 25(2):195-206.
- [17] Baki CA, Grimaud JA. Unisexual murine schistosomiasis: portal hepatitis in subacute infections[J]. Experientia, 1985, 41(11):1423-1426.
- [18] Maji S, Matsuda A, Yan IK et al. Extracellular vesicles in liver diseases[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2017, 312(3):G194-G200.
- [19] Wang L, Li Z, Shen J, et al. Exosome-like vesicles derived by *Schistosoma japonicum* adult worms mediates M1 type immune-activity of macrophage[J]. Parasitol Res, 2015, 114(5):1865-1873.
- [20] Zhu L, Liu J, Dao J, et al. Molecular characterization of *S. japonicum* exosome-like vesicles reveals their regulatory roles in parasite-host interactions[J]. Sci Rep, 2016(6):25885.
- [21] Kloetzel K, Lewert RM. Pigment formation in *Schistosoma mansoni* infections in the white mouse[J]. Am J Trop Med Hyg, 1966, 15(1):28-31.
- [22] Grimaud JA, Borojevic R, Araujo Dos Santos H. Schistosomal pigment in human and murine infections with *Schistosoma mansoni*[J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1976, 70(1):73-77.

【收稿日期】 2022-02-06 【修回日期】 2022-05-10