

文章编号: 1000-7423(2005)-06-0441-03

【实验报道】

小鼠感染日本血吸虫后肝组织 Bcl-2、Bax 的表达及己酮可可碱对它的作用

魏屏, 罗端德, 熊莉娟, 曾令兰

【摘要】 目的 观察凋亡相关基因 Bcl-2、Bax 在小鼠感染血吸虫后肝组织中的表达情况及己酮可可碱(pentoxifylline, PTX)对其作用。方法 将 40 只小鼠随机分为 4 组, 其中 3 组每只小鼠人工感染日本血吸虫尾蚴 25 条, 1 组感染后继续喂养 10 周, 不作治疗, 作为感染对照组; 2 组分别于感染后 2 周用 PTX 360 mg/(kg·d)和 180 mg/(kg·d)灌胃治疗 8 周; 另 1 组不感染、也不接受药物治疗, 与上述 3 组同步喂养 10 周, 作为正常对照组。10 周后将上述 4 组小鼠分别剖杀取肝组织, 光镜观察肝组织病变; 用免疫组化染色方法检测小鼠肝组织中 Bcl-2、Bax 的水平。结果 感染对照组中 Bcl-2 和 Bax 的表达水平较正常对照组明显增加($P < 0.05$)。高剂量 PTX 治疗组 Bcl-2 水平明显高于低剂量 PTX 治疗组和感染对照组($P < 0.05$)。而 Bax 的表达水平在感染对照组、低剂量 PTX 治疗组、高剂量 PTX 治疗组等 3 组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。同时高剂量 PTX 治疗组肝组织变性坏死及纤维化程度较低剂量 PTX 治疗组和感染对照组轻。结论 高剂量 PTX 可能通过促进 Bcl-2 表达, 减少肝细胞的变性坏死, 阻断血吸虫肝纤维化的发生。

【关键词】 日本血吸虫; Bcl-2; Bax; 己酮可可碱

中图分类号: R532.21

文献标识码: A

Expression of Hepatic Bcl-2 and Bax Proteins in Schistosoma-Infected Mice and the Role of Pentoxifylline

WEI Ping, LUO Duan-de, XIONG Li-juan, ZENG Ling-lan

(Department of Infectious Diseases, Union Hospital, Tong Ji Medical College, Hua Zhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

【Abstract】 Objective To study the expression of hepatic Bcl-2 and Bax proteins in mice infected with *Schistosoma japonicum* and the role of pentoxifylline (PTX) in the expression. Methods Forty mice were randomly divided into 4 groups: one normal control group, mice in the other three groups were all infected each with 25 cercariae, the infected control group was fed for 10 weeks after infection, and 2 weeks after infection, the high dose PTX group was given PTX 360 mg/(kg·d) for 8 weeks and the low dose PTX group was given PTX 180 mg/(kg·d) also for 8 weeks. At the end of 10 weeks all the mice were killed. Bcl-2 and Bax proteins expression was detected by immunohistochemistry. Results Compared with the normal control group, the expression of Bcl-2 and Bax was significantly higher in the infected control group ($P < 0.05$). Bcl-2 was significantly higher in high dose PTX group than in the infected control group and in low dose PTX group ($P < 0.05$). However there was no significant difference in the expression of Bax among the groups ($P > 0.05$). Conclusion PTX treatment can significantly increase the expression of Bcl-2 in liver tissue of schistosoma-infected mice in a dose-dependent manner, and may play a role against liver inflammation and schistosomiasis-related liver fibrosis.

【Key words】 *Schistosoma japonicum*; Bcl-2; Bax; Pentoxifylline (PTX)

Supported by the Science Research Fund of the Health Department of Hubei Province (No. 200019)

各种肝病的肝组织可有不同程度的细胞凋亡, 其强弱与病情的轻重呈明显相关性。为探讨细胞凋亡在

血吸虫病炎症期及肝纤维化形成过程中的作用及寻求有效的抗血吸虫病肝纤维化药物, 作者等建立了小鼠血吸虫病感染模型, 给予己酮可可碱(pentoxifylline, PTX)治疗, 并观察肝组织 Bcl-2、Bax 的表达及己酮可可碱对其的作用。

基金项目: 湖北省卫生厅科学研究资金资助项目 (No.200019)

作者单位: 华中科技大学同济医学院附属协和医院传染科, 武汉 430022

材料与方法

1 实验动物

40 只 (16~20 g) 4~6 周龄雌性小鼠购自同济医学院动物实验中心。日本血吸虫尾蚴购自武汉市血吸虫病防治研究所。己酮可可碱 (pentoxifylline, PTX, 商品名为舒安灵, 片剂) 石家庄制药集团有限公司第一制药厂生产。将小鼠随机分为 4 组, 每组 10 只, 其中 3 组每只小鼠人工感染日本血吸虫尾蚴 25 条: ①感染对照组: 感染后继续喂养 10 周, 不作治疗; ②高剂量治疗组: 感染 2 周后用 PTX 360 mg/(kg·d) 灌胃治疗 8 周; ③低剂量治疗组: 感染 2 周后用低剂量 PTX 180 mg/(kg·d) 灌胃治疗 8 周; ④正常对照组: 不感染、不给药, 与上述 3 组同步喂养 10 周。最后分别剖杀各组小鼠, 取肝组织。常规固定, 石蜡包埋, 用于病理学检查。

2 病理学检查

肝组织分别用苏木精-伊红 (HE) 染色和 Masson 法胶原纤维染色, 光镜观察肝组织病变。根据文献^[1]进行肝纤维化程度分级。

3 检测小鼠肝组织中 Bcl-2、Bax 水平

用免疫组织化学染色、链菌素亲生物素-过氧化酶连接 (SP) 法检测 Bcl-2、Bax 在肝组织的水平和分布, 试剂购自北京中山生物技术有限公司。一抗为鼠抗人抗体, 二抗为羊抗鼠抗体, Bcl-2 和 Bax 的工作浓度均为 1:80, 每次实验均设空白对照 (PBS 缓冲液) 和正常兔血清取代一抗为阴性对照, 光镜观察 Bcl-2 和 Bax 的分布。免疫组织化学染色以细胞浆膜或间质有棕黄色或深棕黄色颗粒为阳性, 采用 HPIAS-1000 型高清晰度彩色病理图文报告分析系统 (中国华海电子有限公司产品) 定量 Bcl-2、Bax 水平, 计算平均积分光度。

4 统计学分析

采用 SPSS 10.0 统计软件, 计量资料用 $\bar{X} \pm s$ 表示, 组间均数比较用 t 检验。各组小鼠纤维增生程度的比较用秩和检验。

结 果

1 病理学检查

感染对照组小鼠部分肝细胞变性, 有的呈灶性坏死。汇管区见较多的虫卵肉芽肿, 其周围有嗜酸粒细胞, 中性粒细胞和巨噬细胞浸润, 或有纤维组织增

生, 有的纤维组织增生明显并向肝小叶周围伸延成线型分布。PTX 低剂量组的病理变化与感染对照组相似, PTX 高剂量组的肝细胞变性坏死的程度明显减轻, 汇管区可见少量的虫卵肉芽肿和纤维增生, 肝小叶结构正常。Masson 法胶原纤维染色, 高剂量 PTX 组的肝纤维化程度较低剂量组和感染对照组轻 ($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 小鼠血吸虫肝纤维化程度的比较
Table 1 Degree of liver fibrosis in each group of mice

分组 Group	鼠数 No. mice	肝纤维化分级 Degree of liver fibrosis				
		S0	S1	S2	S3	S4
正常对照组 Normal control	10	10	0	0	0	0
感染对照组* Infected control	10	0	1	2	5	2
PTX 低剂量组* Low dose PTX	10	0	1	2	6	1
PTX 高剂量组 High dose PTX	10	0	7	2	1	0

注: * 与 PTX 高剂量组比较, $P < 0.05$ 。

Note: * Compared with high dose PTX group, $P < 0.05$.

2 各组小鼠肝组织中 Bcl-2、Bax 的水平

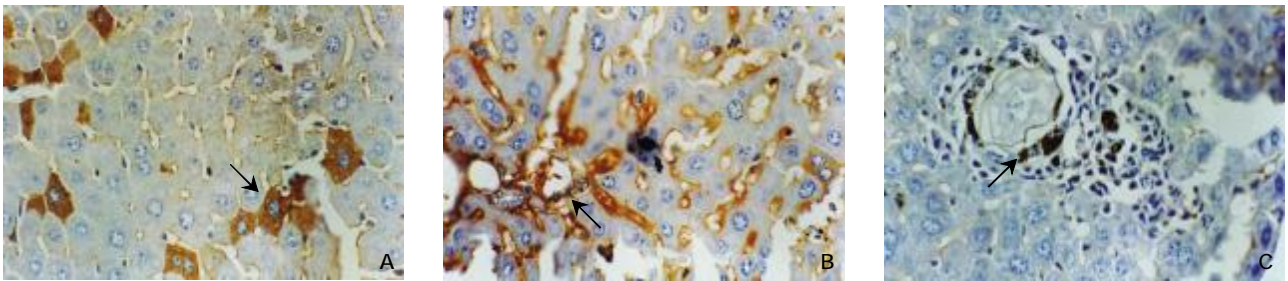
Bcl-2 和 Bax 蛋白免疫组化染色呈棕黄色或深棕黄色。在小鼠肝组织中分布广泛。Bcl-2 主要表达在肝细胞浆, 其次在肝细胞膜、肝窦等处, 偶有汇管区表达。Bax 主要表达在肝细胞膜、肝窦, 呈线形, 其次在肝细胞浆表达, 偶有汇管区及虫卵结节中表达 (图 1)。Bcl-2 和 Bax 在正常对照组均呈低水平表达, 而感染对照组 Bcl-2、Bax 的表达水平明显增加 ($P < 0.05$)。PTX 高剂量组 Bcl-2 的表达水平较低剂量组和感染对照组明显增加 ($P < 0.05$)。PTX 高、低剂量组、感染对照组 3 组间 Bax 表达水平的差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 2)。

表 2 各组肝组织中 Bcl-2、Bax 的表达水平 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Expression level of Bcl-2 and Bax in each group of mice ($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	鼠数 No. mice	Bcl-2	Bax
正常对照组 Normal control	10	1.421±0.288	1.474±0.349
感染对照组 Infected control	10	3.427±0.350*	4.120±0.887*
PTX 低剂量组 Low dose PTX	10	4.271±0.660**	4.562±1.102**
PTX 高剂量组 High dose PTX	10	8.832±1.520***	3.114±0.633**

注: 与正常对照组比较, $*P < 0.05$; 与感染对照组比较, $**P > 0.05$, $***P < 0.05$ 。

Note: Compared with normal control group, $*P < 0.05$; Compared with infected control group, $**P > 0.05$, $***P < 0.05$.



A: Bcl-2 在肝细胞浆中的表达 (↑), B: Bax 在肝细胞膜、肝窦中的表达 (↑), C: Bax 在虫卵结节中表达 (↑)。
 A: Expression of Bcl-2 in the plasma of liver cell (↑), B: Expression of Bax in the hepatocyte membrane and hepatic sinus (↑), C: Expression of Bax in the schistosome egg-induced granuloma (↑).

图 1 Bcl-2、Bax 在肝细胞中的表达 (SP 法, DAB 显色×400)
 Fig.1 Expression of Bcl-2, Bax in liver cell (SP method, DAB coloration ×400)

讨 论

Bcl-2 是细胞凋亡控制因子, Bax 是细胞凋亡促进因子。Bax 为 Bcl-2 的相关蛋白, 可与 Bcl-2 蛋白形成异二聚体并使之失活, 加强表达 Bax 形成同二聚体, 能加速细胞凋亡。有报道, 乙肝患者肝组织中, Bcl-2 和 Bax 蛋白较正常对照组均有不同程度的增强, 且 Bcl-2 在增生区的表达显著高于各坏死区的表达。各类坏死区及周围, Bax 表达的阳性程度明显高于 Bcl-2 蛋白的表达^[2]。还有报道肝纤维化大鼠肝组织 Bcl-2 和 Bax 表达增强^[3]。本实验结果表明: 感染对照组的 Bcl-2 和 Bax 的表达水平均高于正常对照组。结果提示在血吸虫感染过程中可能通过促进 Bax 表达来诱导小鼠肝细胞凋亡, 但机体并非被动的接受细胞凋亡, 而是通过加强表达抗凋亡蛋白 Bcl-2 等来对抗凋亡。

PTX 是甲基黄嘌呤 (theobromine) 的衍生物, 用于治疗脑血管和外周血管疾病, 近年来, 国内外研究显示, PTX 具有显著的抗肝纤维化作用^[4-8]。本实验结果表明, 用高剂量 PTX 防治小鼠血吸虫病肝纤维化, 能明显减轻肝脏的炎症病变, 改善肝纤维化程度, 且影响着 Bcl-2 的表达水平, 其表达水平明显高于感染对照组和低剂量 PTX 组。但对 Bax 的表达水平无明显影响, 高剂量 PTX 组、低剂量 PTX 组、感染对照组等 3 组的 Bax 表达水平无显著性差异。提示高剂量 PTX 可能通过促进 Bcl-2 表达, 减少肝细胞的变性坏死, 阻断血吸虫肝纤维化的发生。本研究在分子水平上为 PTX 抗血吸虫肝纤维化作用提供了理论依据。PTX 抗血吸虫肝纤维化作用可能是多方面的, 有实验证实 PTX 可显著降低血吸虫病肝纤维化小鼠肝脏 TGF-β1 和 I、III 型胶原的含量^[9]。肝纤维化时 Bcl-2 在纤维间隔区表达高于其他区域^[3,10]。因此, PTX

对纤维间隔区 Bcl-2 和 Bax 的作用与整个肝组织是否不同、对纤维间隔区中的肌样成纤维细胞(MFB)凋亡有无促进作用等还有待进一步研究。目前认为肝纤维化发生的中心环节为肝脏的炎症病变和肝星状细胞的激活^[11], 因此, 抑制肝星状细胞的激活以及促进肝星状细胞的凋亡是防治肝纤维化的关键。

总之, 在血吸虫病炎症期和肝纤维化的形成过程中与凋亡相关基因 Bcl-2, Bax 起到了一定的作用, 而 PTX 能改善肝脏的炎症病变, 有良好的抗肝纤维化效果及其极低的副作用, 也许能成为临床预防和治疗血吸虫病肝纤维化的有效药物。

参 考 文 献

- [1] 中华医学会传染病与寄生虫分会、肝病学会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝脏病学杂志, 2000,8:324-327.
- [2] 张斌, 张定风, 马英, 等. 乙型肝炎患者肝组织中 Bcl-2、Bax、Bak 的表达及意义[J]. 中华肝脏病杂志, 1999,7:74-76.
- [3] 陶君, 蔡卫民, 卢良威, 等. 实验性肝纤维化 Bcl-2、Bax 的表达及 γ-干扰素对其的作用[J]. 中华肝脏病杂志, 2003,11:669-672.
- [4] 伍严安, 高春芳, 万伟东, 等. 己酮可可碱对人 α1(I)前胶原基因启动子活性的影响[J]. 中华肝脏病杂志, 2001,9:70-72.
- [5] Schuppan D, Porov Y. Hepatic fibrosis: from bench to bedside[J]. Gastroenterol Hepatol, 2002, 17 (Suppl 3):S300-S305.
- [6] Aihara K, Azuma H, Ikeda Y, et al. Successful combination therapy flunarizine, pentoxifylline, and cholestyramine for spur cell anemia[J]. Hematology, 2001,73:351-355.
- [7] Schuppan D, Koda M, Bauer M, et al. Fibrosis of liver, pancreas and intestine: common mechanisms and clear targets [J]. Cta Gastroenterol Belg, 2000,63:366-370.
- [8] Wu J, Zern MA. Hepatic stellate cells: a target for the treatment of liver fibrosis[J]. J Gastroenterol, 2000,35:665-672.
- [9] Xiong LJ, Zhu JF, Luo DD, et al. Effects of pentoxifylline on the hepatic content of TGF-beta1 and collagen in schistosomiasis japonica mice with liver fibrosis[J]. World J Gastroenterol, 2003, 9:152-154.
- [10] 卢良威, 陈群伟, 蔡卫民, 等. 肝纤维化大鼠 Bcl-2、Bax 的表达及活血渗湿方对其的作用[J]. 浙江中医学院学报, 2003,27:51-53.
- [11] Canbay A, Friedman S, Gores GJ. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis[J]. Hepatology, 2004,39:273-278.

(收稿日期:2004-11-27 编辑:盛慧锋)