

文章编号: 1000-7423(2006)-02-0148-02

## 槲皮素抑制小鼠血吸虫病肝组织 即早基因和基质金属蛋白酶组织抑制因子 1 的表达

徐标, 何生松, 韩春荣

**【摘要】** 分别运用槲皮素及吡喹酮治疗小鼠日本血吸虫肝纤维化。槲皮素治疗后小鼠肝纤维化程度减轻, 肝组织中即早基因 c-fos 与 c-jun 及基质金属蛋白酶组织抑制因子 1(TIMP1)和 I、III 型胶原含量均明显低于感染对照组; 与吡喹酮组相比, c-jun mRNA、I、III 型胶原含量明显降低, 而 c-fos mRNA、TIMP1 含量无显著改变, 提示其远期抗血吸虫肝纤维化效果优于吡喹酮。

**【关键词】** 槲皮素; 日本血吸虫; 肝纤维化; 即早基因; 基质金属蛋白酶组织抑制因子 1

中图分类号: R532.21

文献标识码: B

## Inhibition of Quercetin on Liver Fibrosis due to *Schistosoma japonicum* Infection and on the Expression of Immediate Early Gene and Metalloproteinase 1 Inhibitor in Liver Tissue of Mice

XU Biao, HE Sheng-song, HAN Chun-rong

(Division of Infection, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

**【Abstract】** Quercetin and praziquantel were used to treat mice with hepatic fibrosis due to *Schistosoma japonicum* infection. Quercetin treatment obviously relieved the degree of hepatic fibrosis, significantly reduced the expression of immediate early gene, tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP 1), types I and III collagen compared to the control. The expression of c-jun mRNA, type I and type III collagen were reduced significantly compared to the group treated with praziquantel, whereas no difference in the expression of c-fos mRNA and TIMP1 between the two groups, indicating that quercetin may have better effect on schistosomal liver fibrosis than praziquantel in the long term.

**【Key words】** Quercetin; *Schistosoma japonicum*; Liver fibrosis; Immediate early gene; TIMP1

肝纤维化是血吸虫病最严重的并发症和主要死亡原因之一。目前研究发现槲皮素有保护肝损伤及抗纤维化作用<sup>[1]</sup>。本文即研究槲皮素对血吸虫病肝纤维化小鼠肝组织中即早基因 c-fos、c-jun mRNA、基质金属蛋白酶组织抑制因子 1(TIMP1) 和 I、III 型胶原含量表达的影响, 观察肝组织病理变化, 并与传统杀虫药吡喹酮的作用对比, 以评估和探讨槲皮素抗日本血吸虫病肝纤维化的作用及其机制。

### 1 材料与方 法

1.1 实验药物 槲皮素为 99%纯度的原料药, 由成都超人植化开发有限公司提供; 吡喹酮粉末由同济医学院寄生虫教研室提供。

1.2 小鼠血吸虫病肝纤维化模型的建立及动物分组 体重 20~25 g 4~6 周龄雌性昆明小鼠 80 只(购自同济医学院动物实验中心), 随机均分 4 组(每组 20 只): ①感染组, 每只小鼠人工感染日本血吸虫尾蚴(购自武汉市血吸虫病防治研究所,

下同)25 条, 感染 8 周后以生理盐水灌胃 8 周, 每只 1 ml/d; ②吡喹酮组, 感染尾蚴 8 周后用吡喹酮灌胃治疗 2 d, 剂量为 500 mg/(kg·d)(溶于生理盐水)每只 1 ml/d; ③槲皮素组, 感染尾蚴 8 周后用槲皮素灌胃治疗 8 周, 剂量为 30 mg/(kg·d)(溶于生理盐水)1 ml/d; ④正常组, 未感染血吸虫尾蚴, 常规饲养 16 周。第 16 周末分别取各组小鼠肝组织作病理学检测、RT-PCR 检测和免疫组化分析。

### 1.3 检测项目、试剂及方法

1.3.1 肝组织切片 HE 染色光镜检查 常规石蜡切片经 HE 染色后光镜下观察肝组织的病理变化。

1.3.2 主要试剂及仪器 c-fos 引物: 上游 5'-GGCTCTCCTGT-CAACACACA-3'; 下游 5'-CCGCTTGGAGTGATCTGTC-3'。c-jun 引物: 上游 5'-CAGTCTGAAGCCGCACCTCC-3'; 下游 5'-GTTGCTGAGGTTGGCGTAGACC-3'。β-肌动蛋白引物: 上游 5'-GTGGCCGGTGTAGGCACCA-3'; 下游 5'-GGTTGGCCTTAGGG-TTCAGG-3'。以上引物均购自日本 TaKaRa 公司。Trizol 试剂购于美国 Gibco 公司, DNA 酶购自美国 Promega 公司, 琼脂糖购自北京华美生物工程公司。兔抗小鼠 TIMP1、I 型及 III 型胶

原抗体购自武汉博士德生物工程有限公司。

**1.3.3 RNA 抽提及 RT-PCR 分析** 各组随机抽取 10 份样品, 抽提肝组织总 RNA, 在分光光度计下测吸光度( $A_{260}/A_{280}$ )值, 按逆转录试剂盒说明书的操作步骤逆转录成 cDNA。PCR 产物结果经分析仪扫描成像。单位肝组织的 c-fos 及 c-jun mRNA 相对含量用 c-fos 及 c-jun 条带 A 值与  $\beta$ -actin 条带 A 值比表示。

**1.3.4 免疫组化染色** 以链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物法(SABC)进行免疫组化染色。采用多媒体彩色病理图文分析系统, 计算平均积分光密度。

**1.4 统计学分析** RT-PCR 与免疫组化结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示。使用 SAS8.0 软件行方差分析, 两两比较采用  $q$  检验。

## 2 结果

**2.1 肝组织普通病理变化** 正常组小鼠肝组织未见任何病变。感染组、吡喹酮组及槲皮素组与正常组相比, 肝组织病理学观察发现众多慢性虫卵肉芽肿, 其虫卵周围围绕梭形细胞和胶原纤维, 亦可少见部分急性虫卵肉芽肿, 汇管区有大量炎性细胞浸润; 肉芽肿和小静脉周围的胶原纤维束向肝小叶周围延伸。但在病变程度和病变范围上, 吡喹酮组比感染组明显减轻

( $P < 0.01$ ); 槲皮素组比吡喹酮组亦明显减轻( $P < 0.05$ )。

**2.2 肝组织中 c-fos, c-jun mRNA 的表达** 槲皮素组小鼠与感染对照组相比, c-fos、c-jun mRNA 表达下降非常显著( $P < 0.01$ ); 其与吡喹酮组相比, c-fos mRNA 虽有所下降, 但无显著性差异( $P > 0.05$ ), 而 c-jun mRNA 表达下降显著( $P < 0.05$ ); 但两者含量仍比正常组高。吡喹酮组肝组织中 c-fos, c-jun mRNA 表达比感染组有显著下降( $P < 0.05$ ), 但其含量仍比正常组高(表 1)。

**2.3 肝组织中 TIMP1、I、III 型胶原含量的变化** 正常组肝内未见明显 TIMP1 及胶原阳性着色。吡喹酮组、感染组肝内 TIMP1 呈棕黄色, 表达于窦周、汇管区、虫卵肉芽肿纤维组织内。槲皮素组肝内 TIMP1 分布区域同上, 但着色少而浅。吡喹酮组、感染组肝内 I、III 型胶原呈棕黄色, 密集片状, 主要分布在虫卵肉芽肿内及汇管区。槲皮素组肝内虫卵肉芽肿普遍较小, 胶原分布较少。槲皮素组小鼠与实验对照组相比, TIMP1、I、III 型胶原含量下降非常显著( $P < 0.05$ ); 与吡喹酮组相比, TIMP1 含量虽有下降, 但无显著差异。I、III 型胶原含量下降显著; 但三者含量仍比正常组高。吡喹酮组肝组织中 TIMP1、I、III 型胶原含量比感染组有显著下降, 但其含量仍比正常组高。

表 1 各组小鼠肝组织中 c-fos、c-jun mRNA、TIMP1 和 I、III 型胶原表达变化(RT-PCR) ( $\bar{x} \pm s$ )

组别(n=10)	c-fos mRNA	c-jun mRNA	TIMP1	I型胶原	III型胶原
正常组	0.190 1 $\pm$ 0.040 2	0.180 2 $\pm$ 0.050 1	0.076 1 $\pm$ 0.012 5	0.090 2 $\pm$ 0.003 1	0.075 8 $\pm$ 0.016 3
槲皮素组	0.651 1 $\pm$ 0.055 1 <sup>a</sup> <sup>c</sup>	0.680 3 $\pm$ 0.031 2 <sup>a</sup> <sup>c</sup>	0.194 4 $\pm$ 0.030 4 <sup>c</sup>	0.168 3 $\pm$ 0.023 6 <sup>c</sup>	0.142 4 $\pm$ 0.022 4 <sup>a</sup> <sup>c</sup>
吡喹酮组	0.721 3 $\pm$ 0.084 1 <sup>b</sup> <sup>c</sup> <sup>d</sup>	0.740 2 $\pm$ 0.080 2 <sup>b</sup> <sup>c</sup> <sup>e</sup>	0.228 5 $\pm$ 0.042 1 <sup>b</sup> <sup>c</sup> <sup>d</sup>	0.190 2 $\pm$ 0.020 1 <sup>b</sup> <sup>c</sup> <sup>e</sup>	0.163 2 $\pm$ 0.021 5 <sup>b</sup> <sup>c</sup> <sup>e</sup>
感染组	0.814 0 $\pm$ 0.090 1	0.832 1 0 $\pm$ 0.091 1	0.264 8 $\pm$ 0.036 1	0.214 0 $\pm$ 0.027 1	0.186 2 $\pm$ 0.021 7

注: 与感染组比较, a  $P < 0.01$ , b  $P < 0.05$ ; 与正常组比较, c  $P < 0.01$ ; 与吡喹酮组比较, d  $P > 0.05$ , e  $P < 0.05$ 。

## 3 讨论

研究表明, 槲皮素能抑制血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)促 HSCT6 细胞增殖和转化生长因子  $\beta 1$ (transforming growth factor  $\beta 1$ , TGF  $\beta 1$ )刺激的胶原合成及 I 型原胶原 mRNA 的表达, 提示其抑制 PDGF 和 TGF  $\beta 1$  对肝星状细胞(HSC)的作用可能对肝纤维化有抑制作用<sup>[2]</sup>。

在血吸虫可溶性虫卵抗原刺激下, 虫卵肉芽肿巨噬细胞与淋巴细胞产生 PDGF、TGF $\beta 1$  等各种细胞因子刺激 HSC 活化、增殖、转化成肌成纤维细胞, 并大量合成以 I、III 型胶原为主细胞外基质。肝纤维化 TIMP1 表达增加, 通过抑制间质胶原酶活性, 减少 I、III 型胶原的降解, 从而促进肝纤维化的形成与发展。肝纤维化过程中过度表达的即早基因 c-fos 与 c-jun 产物可形成同/异二聚体的核转录因子(AP-1), 其 DNA 结合活性能促进包括 TIMP1 在内的多种促肝纤维化炎性细胞因子的基因转录<sup>[3]</sup>。各种炎性细胞因子、脂质过氧化物等均能通过细胞内信号传导途径激活早期反应基因 c-fos 和 c-jun, 其表达产物形成同源或异源二聚体的转录激活蛋白(AP-1), 而 TIMP1 基因启动子必须与 AP-1 结合后才能充分活化, 启动 TIMP1 基因转录、翻译出大量 TIMP1 蛋白<sup>[4]</sup>。本研究显示, 感染组小鼠肝组织 c-fos 与 c-jun mRNA、TIMP1 表达明显增强, 槲皮素、

吡喹酮治疗后 c-fos 与 c-jun mRNA、TIMP1 表达明显下降。由于槲皮素具有抗炎、抗氧化、抑制 TIMP1 刺激的胶原合成作用, 因而推测其可通过调节 c-fos 与 c-jun 的表达与 AP-1DNA 结合活性而抑制 TIMP1 过度表达及其促进 HSC 表达 TIMP1 的作用而产生抗肝纤维化作用。吡喹酮则可因杀死血吸虫成虫后, 减少了由其毒性代谢产物而诱导的各种炎性细胞因子的产生, 从而减轻对 c-fos、c-jun 基因的激活效应, 由此减少 TIMP1 表达而发挥抗肝纤维化作用。

## 参 考 文 献

- [1] Lee ES, Lee HE, Shin JY, *et al.* The flavonoid quercetin inhibits dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats[J]. J Pharm Pharmacol, 2003, 55: 1169-1174.
- [2] Kang LP, Qi LH, Zhang JP, *et al.* Effect of genistein and quercetin on proliferation, collagen synthesis, and type I procollagen mRNA levels of rat hepatic stellate cells[J]. Acta Pharmacol Sin, 2001, 22: 793-796.
- [3] Wu Z, Zhou Q, Lan Y, *et al.* AP-1 complexes mediate oxidized LDL-induced overproduction of TGF-beta(1) in rat mesangial cells [J]. Cell Biochem Funct, 2004, 22: 237-247.
- [4] Mann DA, Smart DE. Transcriptional regulation of hepatic stellate cell activation[J]. Gut, 2002, 50: 891-896.

(收稿日期:2005-04-12 编辑:伯韦)