

己酮可可碱对血吸虫病肝纤维化小鼠肝组织 Bcl-2, Bax 表达的影响

魏屏, 罗端德, 熊莉娟, 曾令兰

魏屏, 罗端德, 熊莉娟, 曾令兰, 华中科技大学同济医学院附属协和医院传染科 湖北省武汉市 430022
魏屏, 女, 1958-12-28 生, 湖北省武汉市人, 汉族. 1982 年武汉医学院本科毕业, 学士, 副教授. 主要从事传染病及热带病的临床与研究.
湖北省卫生厅科学研究基金资助项目, No. 200019
项目负责人: 罗端德, 430022, 湖北省武汉市解放大道 1277 号, 华中科技大学同济医学院附属协和医院传染科. luoduande@hotmail.com
电话: 027-85726417 传真: 027-85727707
收稿日期: 2004-06-16 接受日期: 2004-08-20

Effects of pentoxifylline on expressions of hepatic Bcl-2 and Bax protein in schistosomiasis mice with liver fibrosis

Ping Wei, Duan-De Luo, Li-Juan Xiong, Ling-Lan Zeng

Ping Wei, Duan-De Luo, Li-Juan Xiong, Ling-Lan Zeng, Department of Infectious Diseases, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Supported by the Science Research Foundation of Health Department of Hubei Province, No. 200019
Correspondence to: Dr Duan-De Luo, Department of Infectious Diseases, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1277 Jiefang Road, Wuhan 430022, Hubei Province, China. luoduande@hotmail.com
Received: 2004-06-16 Accepted: 2004-07-15

Abstract

AIM: To study the effects of pentoxifylline (PTX) on the expressions of hepatic Bcl-2 and Bax proteins in schistosomiasis mice with liver fibrosis

METHODS: The model of schistosomiasis liver fibrosis in mice was established. The mice were divided into 4 groups: control group, high dose PTX group (360 g/kg Per day, $\times 8$ wk), low dose PTX group (180 g/kg Per day, $\times 8$ wk) and praziquantel treatment group (500 g/kg Per day, $\times 2$ d). Bcl-2 and Bax protein expressions were detected by immunohistochemistry. The pathological changes of liver were observed under microscope.

RESULTS: The levels of Bcl-2 expression in control group, high dose PTX group, low dose PTX group and praziquantel treatment group were $(0.574 \pm 0.488\%)$, $(1.681 \pm 0.963\%)$, $(0.768 \pm 0.188\%)$ and $(1.116 \pm 0.964\%)$ respectively. The level of Bcl-2 expression in liver tissues of schistosomiasis mice with liver fibrosis in high dose group was significantly higher than that in low dose group ($P < 0.05$) and controls ($P < 0.05$). The level of Bax expression showed significant difference among the four groups.

CONCLUSION: High doses of PTX could significantly increase expression of Bcl-2 in liver tissues of schistosomiasis mice with liver fibrosis by promoting Bcl-2 expression.

Wei P, Luo DD, Xiong LJ, Zeng LL. Effects of pentoxifylline on expressions of hepatic Bcl-2 and Bax protein in schistosomiasis mice with liver fibrosis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(10):2338-2340

摘要

目的: 观察己酮可可碱(pentoxifylline, PTX)对血吸虫病肝纤维化小鼠肝组织中凋亡相关基因Bcl-2, Bax表达的影响。

方法: 建立小鼠血吸虫肝纤维化模型, 将小鼠随机分为 4 组: (1)感染对照组, (2)高剂量PTX治疗组(360 g/kg/d), (3)低剂量PTX治疗组(180 g/kg/d), (4)吡喹酮治疗组(500 g/kg/d)。观察 4 组小鼠治疗 8 wk 后肝组织中 Bcl-2, Bax 的表达水平, 同时观察肝组织的病理学变化。

结果: 高剂量PTX治疗组和吡喹酮治疗组肝组织变性坏死及纤维化程度均较感染对照组和低剂量PTX治疗组轻。感染对照组、低剂量PTX治疗组、吡喹酮治疗组、高剂量PTX治疗组 Bcl-2 水平分别为 $(0.574 \pm 0.488\%)$, $(0.768 \pm 0.188\%)$, $(1.116 \pm 0.964\%)$, $(1.681 \pm 0.963\%)$ 。高剂量PTX治疗组 Bcl-2 水平明显高于感染对照组和低剂量PTX治疗组($P < 0.05$), 与吡喹酮组的表达水平相近($P > 0.05$)。Bax 水平分别为 $(0.372 \pm 0.291\%)$, $(0.351 \pm 0.249\%)$, $(0.465 \pm 0.356\%)$, $(0.79 \pm 0.642\%)$ 。4 组间 Bax 的表达水平无显著差异($P > 0.05$)。

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。

魏屏, 罗端德, 熊莉娟, 曾令兰. 己酮可可碱对血吸虫病肝纤维化小鼠肝组织 Bcl-2, Bax 表达的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2338-2340
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2338.asp>

0 引言

己酮可可碱(pentoxifylline PTX)具有抗肝纤维化的作用^[1-5], 但其对血吸虫肝纤维化的防治少有报道. 而在我国近几年日本血吸虫病的发病率呈上升趋势, 特别是血吸虫病肝纤维化严重危害疫区人民的身体健康. 为探讨 PTX 抗血吸虫病肝纤维化的作用机制, 我们建立了小鼠血吸虫肝纤维化模型, 给予 PTX 治疗, 并观察治疗前后凋亡相关基因 Bcl-2, Bax 在血吸虫肝纤维化小鼠肝组织中的表达情况, 旨在了解 PTX 对血吸虫肝纤维化肝组织凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂, Wistar 小鼠, 4-6 周龄, 40 只, 体重 16-20 g, 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. PTX 采用石家庄制药集团有限公司第一制药厂生产的舒安灵片剂. Bcl-2, Bax 试剂购自北京中山生物技术有限公司. 彩色病理图文报告分析系统, 型号 HPIAS-1000 为中国华海电子有限公司产品. 显微镜系日本 Olympus (VANOX).

1.2 方法 将小鼠随机分为 4 组, 每组 10 只. (1)感染对照组: 每只小鼠人工感染日本血吸虫尾蚴 25 条, 感染后继续喂养 10 wk, 不作治疗. (2)高剂量 PTX 治疗组: 感染后 2 wk 用高剂量 PTX (舒安灵 360 g/kg 每日灌胃) 治疗 8 wk. (3)低剂量 PTX 治疗组: 感染 2 wk 后用低剂量 PTX (舒安灵 180 g/kg 每日灌胃) 治疗 8 wk. (4)吡喹酮治疗组: 感染 2 wk 后用吡喹酮 (500 g/kg 每日灌胃) 治疗 2 d. 最后杀鼠取肝组织, 常规固定, 石蜡切片, 分别用 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[6]进行肝纤维化程度分期. 用免疫组化法测定肝组织 Bcl-2 和 Bax 的表达, 免疫组织化学 SP 法染色. 一抗为鼠抗人抗体, 二抗为羊抗鼠抗体, Bcl-2 和 Bax 的工作滴度均为 1:80, 每次实验均设磷酸盐缓冲液 (空白对照) 和正常兔血清取代一抗 (阴性对照), 光镜观察 Bcl-2 和 Bax 的分布, 以细胞质膜或间质有棕黄色或深棕黄色颗粒为阳性. Bcl-2 和 Bax 定量采用 HPIAS-1000 型高清晰度彩色病理图文报告分析系统在低倍镜下计算他们在整个肝组织中的阳性面积 [阳性目标总面积 / 统计场总面积 (面密度)], 每张切片选取 5 个视野, 求平均值.

统计学处理 用 SPSS 10.0 软件统计, 计量资料用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 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.

2 结果

2.1 肝组织病理学变化 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, 其周围有嗜酸性粒细胞, 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干线型分布. 低剂量 PTX 组的病理变化与感染对照组相似. 高剂量 PTX 组和吡喹酮组的肝细胞变性坏死的程度及肝纤维化程度较前者明显减轻 ($P < 0.05$), 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 (表 1).

2.2 Bcl-2 和 Bax 的表达 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 主要表达在肝细胞质, 其次在肝细胞膜、肝窦等表达, 偶有汇管区表达 (图 1). Bax 主要表达在肝细胞膜、肝窦, 呈线形 (图 2), 其次在肝细胞质表达, 偶有汇管区、虫卵结节中表达 (图 3). Bcl-2 检测结果: 与感染对照组比较, 高剂量 PTX 组及吡喹酮组的表达水平明

显增加 ($P < 0.05$), 低剂量 PTX 组差异不显著 ($P > 0.05$); 与吡喹酮组比较, 高剂量 PTX 组无显著差异 ($P > 0.05$), 低剂量组的表达水平明显下降 ($P < 0.05$); 高剂量 PTX 组与低剂量 PTX 组比较, 表达水平明显升高 ($P < 0.05$) (表 2). Bax 检测结果: 4 组之间的表达水平无显著性差异 ($P > 0.05$).

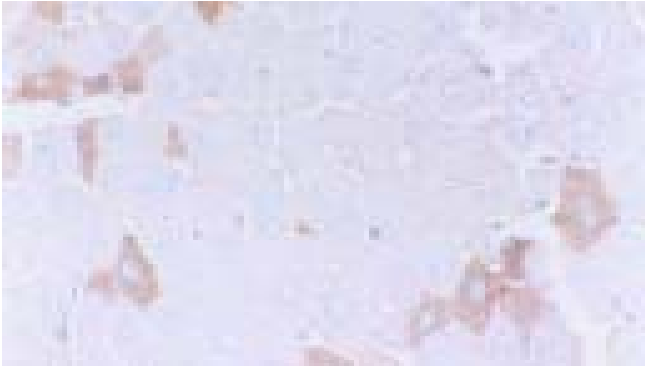


图 1 Bcl-2 在肝细胞质中的表达 (SP 法, DAB 显色 $\times 400$).

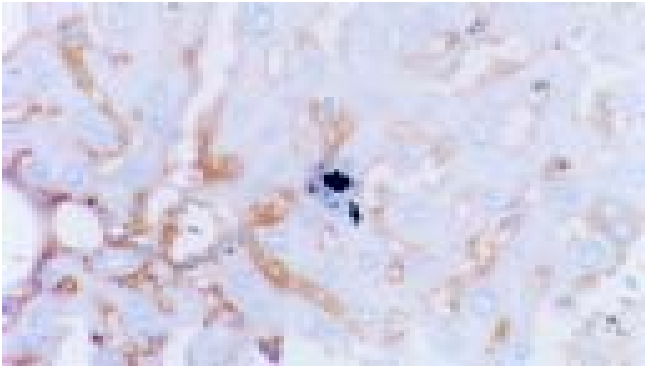


图 2 Bax 在肝细胞膜、肝窦中的表达 (SP 法, DAB 显色 $\times 400$).

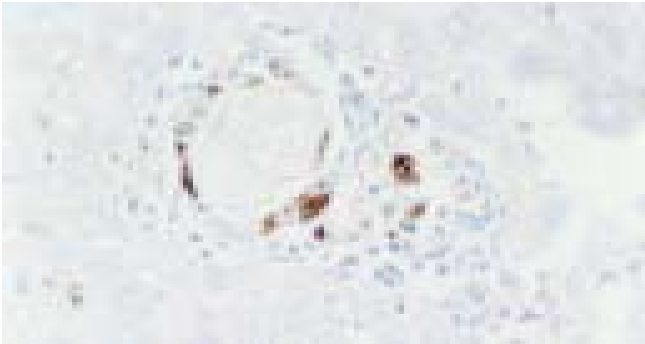


图 3 Bax 在虫卵结节中表达 (SP 法, DAB 显色 $\times 400$).

表 1 小鼠血吸虫肝纤维化程度的比较

分组	n	肝纤维化分级				
		S0	S1	S2	S3	S4
感染对照组	10	0	1	2	5	2
高剂量 PTX 组 ^a	10	0	7	2	1	0
低剂量 PTX 组	10	0	1	2	6	1
吡喹酮组 ^a	10	0	6	3	1	0

^a $P < 0.05$ vs 感染对照组.

表2 小鼠血吸虫肝纤维化肝组织 Bcl-2, Bax 的表达(mean±SD%, n=10)

分组	Bcl-2	Bax
感染对照组	0.574 ± 0.488	0.372 ± 0.291
高剂量 PTX 组	1.681 ± 0.963 ^{ac}	0.790 ± 0.642
低剂量 PTX 组	0.768 ± 0.188 ^c	0.351 ± 0.249
吡喹酮组	1.116 ± 0.964 ^a	0.465 ± 0.356

^aP<0.05 vs 感染对照组; ^cP<0.05 vs 吡喹酮组; ^eP<0.05 vs 低剂量 PTX 组。

3 讨论

各种肝病肝组织中可有不同程度的肝细胞凋亡, 其强弱与病情的轻重有明显的相关性。Bcl-2 是凋亡控制因子, Bax 是凋亡促进因子。Bax 为 Bcl-2 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。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^[7]。肝纤维化时大鼠肝组织 Bcl-2 和 Bax 表达加强^[8]。PTX 是甲基黄嘌呤 theobromine 的衍生物, 具有显著的抗肝纤维化作用^[9], 其机制有控制肝星状细胞(HSC)转化为激活的肌样成纤维细胞(MFB); 控制 HSC 和 MFB 增生; 减少胶原合成和分泌, 并可能促进其降解; 保护肝细胞等。为探讨 PTX 抗血吸虫病肝纤维化的作用机制, 我们建立了小鼠血吸虫肝纤维化模型, 给予 PTX 治疗, 并观察治疗前后凋亡相关基因 Bcl-2, Bax 在血吸虫肝纤维化小鼠肝组织中的表达情况, 本结果表明, 用高剂量 PTX 防治小鼠血吸虫病肝纤维化, 能明显改善肝脏的病理变化, 减轻肝纤维化程度, 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, 与吡喹酮组的表达水平相近。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、吡喹酮组等 4 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一理论依据。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^[10]。肝纤维化时 Bcl-2 在纤维间隔区表达高于其他区域^[8, 11], PTX 对纤维间隔 Bcl-2 和 Bax 的作用与整个肝组织是否不同、对纤维间隔中的 MFB 凋亡有无促进作用等还有待于进一步研究。目前认为肝纤维化发生的中心环节为肝星状细胞的激活, 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 PTX 有良好的抗肝纤维化效果及其极低的副作用, PTX 也将可能成为临床预防和治疗血吸虫病肝纤维化的有用药物。

4 参考文献

- 1 伍严安, 高春芳, 万伟东, 仲人前, 孔宪涛. 己酮可可碱对人 α1(I) 前胶原基因启动子活性的影响. 中华肝脏病杂志 2001;9:70-72
- 2 Schuppan D, Porov Y. Hepatic fibrosis: From bench to bedside. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17(Suppl 3):S300-S305
- 3 Aihara K, Azuma H, Ikeda Y, Akaike M, Abe M, Sugihara T, Matsumoto T. Successful combination therapy-flunarizine, pentoxifylline, and cholestyramine-for spur cell anemia. *Int J Hematol* 2001;73:351-355
- 4 Schuppan D, Koda M, Bauer M, Hahn EG. Fibrosis of liver, pancreas and intestine: common mechanisms and clear targets? *Acta Gastroenterol Belg* 2000;63:366-370
- 5 Wu J, Zern MA. Hepatic stellate cells: a target for the treatment of liver fibrosis. *J Gastroenterol* 2000;35:665-672
- 6 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. 中华肝脏病杂志 2000;8:324-327
- 7 张斌, 张定风, 马英, 任红, 秦波. 乙型肝炎患者肝组织中 Bcl-2、Bax、Bak 的表达及意义. 中华肝脏病杂志 1999;7:74-76
- 8 陶君, 蔡卫民, 卢良威, 陈群伟, 翁红雷, 张永生. 实验性肝纤维化 Bcl-2、Bax 的表达及干扰素-γ 对其的作用. 中华肝脏病杂志 2003;11:669-672
- 9 伍严安, 孔宪涛. 己酮可可碱的抗肝纤维化作用. 世界华人消化杂志 1999;7:265-266
- 10 Xiong LJ, Zhu JF, Luo DD, Zen LL, Cai SQ. Effects of pentoxifylline on the hepatic content of TGF-beta1 and collagen in Schistosomiasis japonica mice with liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:152-154
- 11 卢良威, 陈群伟, 蔡卫民, 陶君, 张永生, 刘清君, 包剑锋. 肝纤维化大鼠 Bcl-2、Bax 的表达及活血渗湿方对其的作用. 浙江中医学院学报 2003;27:51-53