

DOI:10.13350/j.cjpb.221010

• 论著 •

华支睾吸虫感染 BALB/c 小鼠肝胆管纤维化模型的建立^{*}赵磊¹, 莫刚¹, 李佳¹, 罗嘉俊¹, 彭小红^{1,2,*}

(1. 桂林医学院寄生虫学教研室, 广西桂林 541004; 2. 桂林医学院附属医院广西肝脏损伤与修复分子医学重点实验室)

【摘要】 目的 建立华支睾吸虫感染 BALB/c 小鼠肝胆管纤维化模型。 **方法** 将 BALB/c 小鼠随机分为 4 组, 分别以 50 个、100 个和 150 个囊蚴采用胃饲感染, 同时设胃饲生理盐水组为对照。感染后 20 d 开始采用加藤卡茨法检测小鼠粪便; 感染后 8 周, 取小鼠肝脏右外叶组织进行 HE 和 Masson 染色, 取小鼠肝脏左叶组织进行总蛋白提取, 分析肝脏 α -SMA 的表达情况。 **结果** 感染后 31 d 小鼠粪便开始检测到华支睾吸虫卵, 39 d 所有感染组小鼠均检测到感染。HE 及 Masson 结果显示, 与对照组相比, 感染组小鼠汇管区出现明显的纤维化改变, 且随着胃饲囊蚴数量的增加纤维化越明显, 差异具有统计学意义 ($F=86, P<0.01$)。蛋白质免疫印迹试验发现感染小鼠肝脏 α -SMA 蛋白表达明显高于对照组, 且随着胃饲囊蚴数量增加而递增, 差异有统计学意义 ($F=86.5, P<0.05$)。 **结论** 成功建立了华支睾吸虫感染 BALB/c 小鼠肝胆管纤维化模型, 为后续研究华支睾吸虫致肝胆管纤维化机制奠定了基础。

【关键词】 华支睾吸虫; 胆管纤维化; BALB/c 小鼠

【中图分类号】 R383.22

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)10-1160-04

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Oct.; 17(10): 1160–1163.]

Establishment of a model of hepatic bile duct fibrosis in BALB/c mice infected with *Clonorchis sinensis*

ZHAO Lei¹, MO Gang¹, LI Jia¹, LUO Jia-jun¹, PENG Xiao-hong^{1,2} (1. Department of Parasitology, Guilin Medical College, Guilin 541004, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Molecular Medicine in Liver Injury and Repair, the Affiliated Hospital of Guilin Medical University)

【Abstract】 Objective To establish a model of hepatic bile duct fibrosis in BALB/c mice infected with *Clonorchis sinensis*. **Methods** Twenty-four BALB/c mice were randomly divided into 4 groups. Then, 50, 100 or 150 metacercariae were infected by gastric feeding, and the NS group was set as control. Twenty days after infection, Kato Katz method was used to detect infection; eight weeks after infection, the right lateral lobe tissue of mouse liver was taken for HE and Masson staining, and the left lobe tissue of mouse liver was taken for total protein extraction and liver α -SMA expression detection. **Results** *C. sinensis* eggs were detected in mouse feces at 31 days after infection, and infection was detected in all infected groups at 39 days. The results of HE and Masson showed that compared with the control group, the mice in all infected groups had obvious fibrotic changes in the portal area, and the fibrosis became more obvious with the increase of the number of gastric cysts, and the difference was statistically significant ($F=86, P<0.01$). Western blotting test showed that the expression of α -SMA protein in the liver of infected mice was significantly higher than that of the control group, and it increased with the increase of the number of gastric larvae, and the difference was statistically significant ($F=86.5, P<0.05$). **Conclusion** The BALB/c mouse model of hepatic bile duct fibrosis was successfully established. It lays a foundation for the follow-up study on the mechanism of hepatobiliary fibrosis caused by *C. sinensis*.

【Key words】 *Clonorchis sinensis*; bile duct fibrosis; BALB/c mice

^{***} 华支睾吸虫又称肝吸虫, 是一种食源性寄生虫, 主要流行于亚洲国家和地区^[1-2]。华支睾吸虫的感染主要是因为患者食入华支睾吸虫囊蚴, 囊蚴在胃酸的作用下脱囊形成尾蚴后通过十二指肠壶腹进入胆管发育为成虫^[3-4]。成虫在胆管内长期寄生会破坏胆管结构, 诱发大量炎症细胞浸润, 最终导致胆管扩张、胆管上皮增生、肝纤维化甚至胆管癌^[5-7]。

华支睾吸虫致肝胆管纤维化及其模型感染囊蚴数量多在 15~50 个, 感染剂量少导致纤维化发生所需时间较长。因此, 本研究拟通过具体化感染方法及步骤, 建立不同剂量华支睾吸虫囊蚴感染小鼠模型, 观察小

鼠肝胆管纤维化的变化, 以期为后续华支睾吸虫所致肝胆管纤维化的相关研究提供模型。

材料与方法

^{*} **【基金项目】** 国家自然科学基金项目 (No. 82060376); 广西壮族自治区大学生创新创业项目 (No. S202110601116)。

^{**} **【通讯作者】** 彭小红, E-mail: pxh815@163.com

【作者简介】 赵磊 (1995-), 男, 贵州遵义人, 在读硕士研究生。研究方向: 寄生虫与宿主免疫。
E-mail: 1017164812@qq.com

1 材料

兔抗鼠抗体 α -SMA、GAPDH 购自中国 AFFITY 公司;彩虹蛋白 marker、山羊抗兔二抗购自美国赛默飞公司;BCA 蛋白定量试剂盒、PVDF 膜、RIPA 裂解液、PAGE 凝胶快速制备试剂盒购自雅酶公司;胃蛋白酶(1 : 10000)、HE、Masson 染色试剂盒购自中国索莱宝公司;电泳及转膜仪、ChemiDoc XRS⁺ 凝胶成像仪购自美国伯乐公司;BX53 生物显微镜购自日本奥林巴斯公司;INFINITE M PLEX 酶标仪购自上海帝肯(Tecan)公司;雌性 BALB/c 小鼠购自长沙市天勤生物技术公司;感染囊蚴的鱼来源于广西横县。

2 方法

2.1 华支睾吸虫感染模型建立 将感染囊蚴的鱼冲洗干净,去除鱼骨鱼刺后用绞肉机搅碎为肉泥。将搅拌好的肉泥移入 1 L 烧杯中,倒入已配好的消化液于 37 °C 恒温摇床慢摇消化 2 h,随后以 60 目滤网(0.3 mm)过滤去渣,滤液滤入玻璃三角量杯后加入 0.85% 生理盐水水洗沉淀,反复清洗 3~5 次直至上层清澈。倒掉上清液,将沉淀移入 50 ml 离心管后加入生理盐水离心(800 r/min,离心 3 min)清洗 2~3 次,最后吸取沉淀于显微镜下计数,镜下分离所需囊蚴加入 200 μ l 0.85% 生理盐水重悬。

2.2 实验小鼠分组 健康雌性 BALB/c 小鼠,6~8 周龄,体重 18~22 g,SPF 环境喂养。将小鼠随机分成 4 组,其中 1 组胃饲 200 μ l 生理盐水,另外 3 组分别胃饲 50、100、150 个囊蚴,每组小鼠 6 只。本研究经桂林医学院伦理审查委员会同意。

2.3 粪便虫卵检测 于感染 20 d 时每天收集粪便检测虫卵,采用加藤卡茨法检测,每份粪便样本做 3 张涂片。

2.4 HE、Masson 染色 感染 8 周时将感染组与对照组小鼠眼球取血后处死,无菌条件下取小鼠肝脏右外叶组织于 10% 组织固定液固定 48 h,随后脱水、透明处理后进行石蜡包埋、切片。切片厚度为 4 μ m,进行 HE、Masson 染色,显微镜下观察及拍照,Image J 分析 Masson 染色中的胶原纤维面积。

2.5 肝脏总蛋白提取 取肝脏左叶组织加入 500 μ l 裂解液于玻璃研磨器中在冰上研磨捣碎组织,随后冰上裂解 30 min。再 12 000 g 离心 5 min,取上清液移入新的 1.5 ml EP 管中进行 BCA 蛋白定量,BCA 蛋白定量操作步骤见试剂说明书。

2.6 Western blot 分析 通过 10% PAGE 电泳分离蛋白样品,随后进行转膜后封闭 3 h,TBST 洗涤 5 次,每次 6 min,将膜泡在一抗中于 4 °C 孵育过夜,次日将膜取出洗涤后再放入二抗中于室温下孵育 1 h,洗涤后进行发光,通过 GAPDH 标准化样品中蛋白质的表

达,Image J 分析蛋白面积。

2.7 统计学处理 采用 SPSS26.0 进行统计分析,Graphpad Prism9.2 绘图,组间比较采用 One-way ANOVA 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结果

1 小鼠一般体格检测

感染组小鼠的体重增长速度在早期较对照组快,随后较对照组减慢;且随着感染时间延长感染组小鼠有出现毛发竖立现象,活力降低。

2 粪便虫卵检测

小鼠感染后 20 d 时开始收集粪便进行虫卵检测,于 31 d 在感染 150 囊蚴小鼠粪便中首先检测到虫卵,感染 39 d 时感染组小鼠均检测到虫卵。随后对不同时间点进行虫卵检测发现,感染 150 囊蚴组小鼠每克粪便的虫卵检出数量随着感染时间延长逐渐增多,50 囊蚴和 100 囊蚴组在感染后 56 d 前未见虫卵有明显增加,感染 90 d 时 3 组小鼠粪便中虫卵数量基本相同(图 1)。

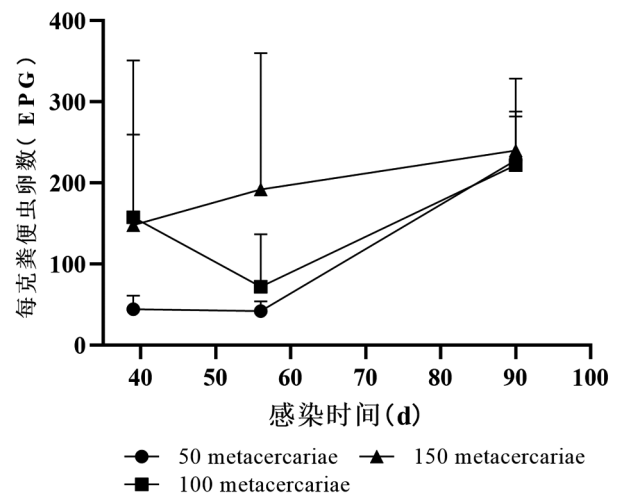


图 1 BALB/c 小鼠感染不同数量华支睾吸虫囊蚴后不同时间粪便虫卵检出量

Fig. 1 The amount of fecal eggs detected in BALB/c mice after infection with different numbers of *C. sinensis* metacercariae at different times

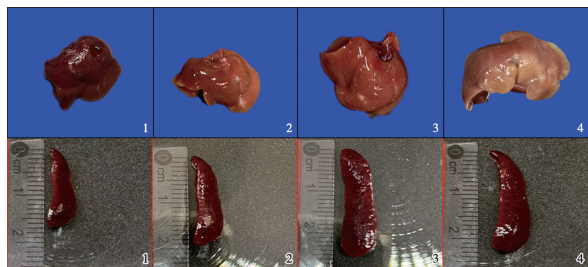
3 小鼠肝脏脾脏变化

与对照组相比,感染组小鼠肝脏脾脏都出现不同程度肿大,胆管内可见成虫,胆汁大量淤积于胆管内;其中胃饲 150 囊蚴组小鼠肝脏脾脏肿大尤为明显,且肝脏病变区域出现白色炎症样病变,病变多累积于肝右叶(图 2)。

4 感染后小鼠肝脏汇管区出现纤维化病变

HE 染色可见 8 周时对照组小鼠肝小叶、门管区结构完整,无纤维结缔组织增生及炎症细胞浸润,胆管亦无扩张;感染组小鼠可见肝脏胆管周围出现大量的炎症细胞浸润及胆管上皮增生。胆管扩张,肝脏结构

受到严重破坏,且随着虫荷增加肝胆管纤维化沉积表现出严重的趋势。Masson 染色发现对照组小鼠肝脏结构完整,较少见胶原纤维;而感染组小鼠肝胆管周围胶原纤维沉积严重,且随着胃饲囊蚴数量的增加肝胆管纤维化越明显,差异具有统计学意义($F=86, P<0.01$)(图 3)。

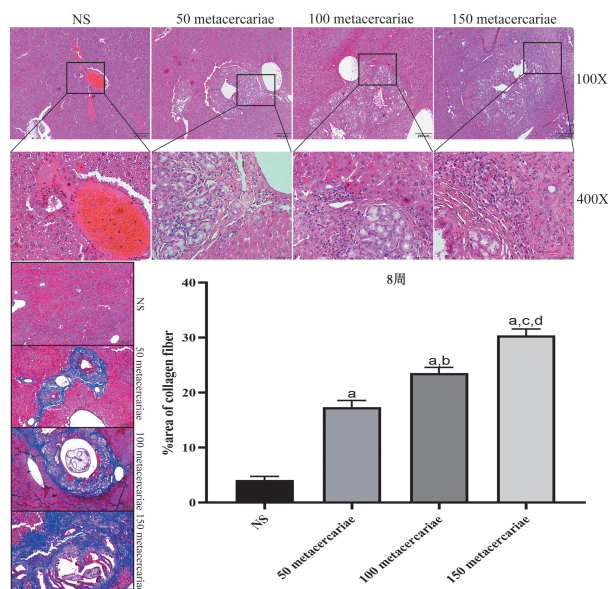


注:1)胃饲 NS 小鼠的肝脾脏;2)胃饲 50 个囊蚴小鼠的肝脾脏;3)胃饲 100 个囊蚴小鼠的肝脾脏;4)胃饲 150 个囊蚴小鼠的肝脾脏。

图 2 小鼠肝脾脏形态

Notes:1) Liver and spleen of gastric-fed NS mice;2) Liver and spleen of gastric-fed 50 metacercariae mice;3) Liver and spleen of gastric-fed 100 metacercariae mice;4) Liver and spleen of gastric-fed 150 metacercariae mice.

Fig. 2 Morphology of mouse liver and spleen



注:1)与 NS 组比较,^a $P<0.01$;2)与 50 囊蚴组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$;3)与 100 囊蚴组比较,^d $P<0.05$ 。

图 3 华支睾吸虫感染小鼠后 HE、Masson 染色结果(100×)

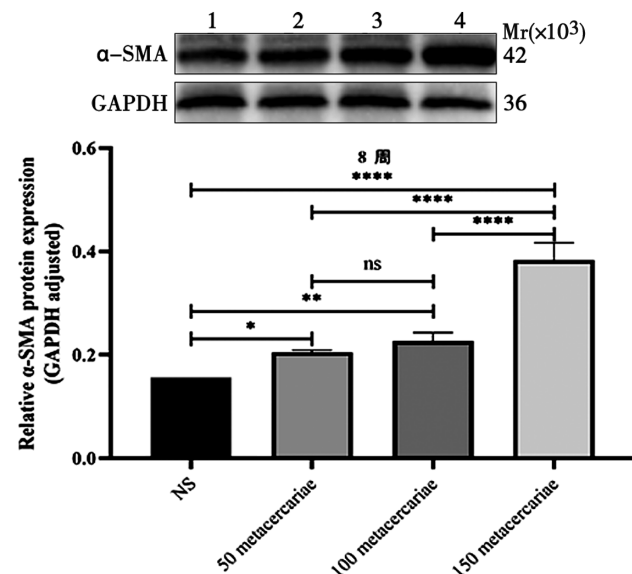
Notes:1) Compared with NS group, ^a $P<0.01$;2) Compared with 50 metacercariae group, ^b $P<0.05$, ^c $P<0.01$;3) Compared with 100 metacercariae group, ^d $P<0.05$.

Fig. 3 HE, Masson staining results of mice infected with *C. sinensis*

5 感染小鼠肝脏 α -SMA 蛋白表达增高

Western blot 发现在 8 周时感染组小鼠肝脏 α -SMA 蛋白表达明显高于对照组,且随着虫荷增多, α -SMA 蛋白表达递增,差异具有统计学意义($F=86.5, P<0.05$);其中胃饲 150 囊蚴小鼠肝脏 α -SMA 蛋白表达增高明显,差异具有统计学意义($P<0.01$)

(图 4)。



注:1)胃饲 NS 小鼠肝脏 α -SMA 蛋白表达情况;2)胃饲 50 个囊蚴小鼠肝脏 α -SMA 蛋白表达情况;3)胃饲 100 个囊蚴小鼠肝脏 α -SMA 蛋白表达情况;4)胃饲 150 个囊蚴小鼠肝脏 α -SMA 蛋白表达情况。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$

图 4 华支睾吸虫感染小鼠肝脏 WB 结果

Notes:1) α -SMA protein expression in liver of gastric-fed NS mice;2) α -SMA protein expression in liver of gastric-fed 50 metacercariae mice;3) α -SMA protein expression in liver of gastric-fed 100 metacercariae mice;4) α -SMA protein expression in liver of gastric-fed 150 metacercariae mice.

Fig. 4 WB results of the liver of *C. sinensis*-infected mice

讨论

华支睾吸虫是一种食源性寄生虫,主要寄生于肝胆管导致胆管上皮增生,胆管纤维化等一系列肝胆疾病,也可寄生于肠道,因摄取肠道营养而导致患者体重减轻并伴随腹痛等症状^[8]。

华支睾吸虫病的药物治疗主要是服用吡喹酮^[9],但由于其感染症状主要处于亚临床状态,因而在早期较难发现。同时,因其感染主要有地域性习惯生食鱼生等原因,导致患者经治疗痊愈后常发生再感染等情况,因而在部分地区虽然环境及其卫生医疗得到改善,但其患病率却在增高^[10]。例如在广西横县,2016 调查发现其华支睾吸虫感染率高达 48.6%且有呈现上升的趋势^[11]。除了区域性研究,蒋智华等^[12]在感染率高的区域进行了不同职业间感染华支睾吸虫情况进行调查,结果发现医务工作者华支睾吸虫感染率显著高于其他职业。

华支睾吸虫所致肝胆纤维化、胆管癌等实验在当下已被广泛研究,因研究目的不同而选用不同实验动物及不同剂量囊蚴。如 Woon 等^[13]灌胃不同数量囊蚴感染小鼠、大鼠、兔等不同实验动物,Choi 等^[14]采用 15 个囊蚴感染小鼠,付琳琳等^[15]分别灌胃 10、20、30 个囊蚴感染小鼠,Zhang 等^[16-17]分别灌胃 45~50 个囊

蚴感染小鼠,最后均成功建立华支睾吸虫模型,表明华支睾吸虫囊蚴具有较强的感染力。

本研究旨在细化造模过程,通过胃饲不同剂量的囊蚴后观察小鼠一般体格和肝胆管纤维化的变化。研究结果显示,小鼠感染华支睾吸虫后肝脏破坏严重,肝脏出现不同程度肿大且可见明显病变,尤其在肝右下叶有出现肝硬化现象。在胆管周围组织发现胆管明显扩张,胆管内可见数条成虫,胆汁在胆道中大量淤积,胆管内可见大量黑色杂质沉积。通过 HE、Masson 组织染色发现肝胆管纤维化随着胃饲囊蚴个数的增多而递增,尤其是胃饲 150 个囊蚴后组织切片发现纤维化明显累计到胆管周围大片组织;感染组小鼠肝脏 α -SMA 蛋白表达增高,其中 150 囊蚴组差异较对照组增高。此外,通过感染小鼠粪便虫卵数量检查发现,感染后 56 d 前 150 个囊蚴组小鼠粪便中虫卵数量比感染 50 个囊蚴和 100 个囊蚴高,而在感染后 90 d 时 3 组粪便中虫卵数量基本一致。表明 150 囊蚴感染组可能因更早出现纤维化,导致局部虫体死亡或者虫卵无法排出。同时,在整个实验期间感染 150 囊蚴小鼠未出现因剂量过大而出现死亡的现象。结果表明华支睾吸虫感染后小鼠肝胆管纤维化随着感染虫荷增多而增加,以 150 个华支睾吸虫囊蚴胃饲 BALB/c 小鼠能够更快速的建立华支睾吸虫所致肝胆管纤维化模型,为后续研究华支睾吸虫感染所致肝胆管纤维化的机制奠定了基础。

综上,本研究建立不同剂量华支睾吸虫囊蚴感染小鼠模型,随后从组织学及蛋白表达水平观察了小鼠肝胆管纤维化的变化,建立了一种高剂量华支睾吸虫囊蚴感染小鼠模型,能够快速出现肝胆管纤维化,为研究华支睾吸虫感染所致肝胆管纤维化的机制提供理论基础。

【参考文献】

- [1] Tang ZL, Huang Y, Yu XB. Current status and perspectives of *Clonorchis sinensis* and clonorchiasis: epidemiology, pathogenesis, omics, prevention and control [J]. Infect Dis Poverty, 2016, 5(1): 71.
- [2] Na BK, Pak JH, Hong SJ. *Clonorchis sinensis* and clonorchiasis [J]. Acta Trop, 2020(203): 105309.
- [3] Kim TI, Yoo WG, Kwak BK, et al. Tracing of the Bile-chemotactic migration of juvenile *Clonorchis sinensis* in rabbits by PET-CT [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2011, 5(12): e1414.
- [4] Kim TS, Pak JH, Kim JB, et al. *Clonorchis sinensis*, an oriental liver fluke, as a human biological agent of cholangiocarcinoma: a brief review [J]. BMB Rep, 2016, 49(11): 590-597.
- [5] Qian MB, Utzinger J, Keiser J, et al. Clonorchiasis [J]. Lancet, 2016, 387(10020): 800-810.
- [6] Zheng SH, Zhu Y, Zhao ZJ, et al. Liver fluke infection and cholangiocarcinoma: a review [J]. Parasitol Res, 2017, 116(1): 11-19.
- [7] Koda S, Zhu XQ, Zheng KY, et al. Molecular mechanisms of host interactions and implications for vaccine development [J]. Front Cell Dev Biol, 2021(9): 781768.
- [8] Kim DH, Won EJ, Kim HS. *Clonorchis sinensis* infection detected by capsule endoscopy: A rare cause of body weight loss [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2021, 19(11): e107-e8.
- [9] Wei YF, Liu XR, Xue J, et al. Metabolome alterations in *Clonorchis sinensis* after treatment with tribendimidine and praziquantel *in vivo* [J]. Acta Trop, 2022(230): 106330.
- [10] Lun ZR, Gasser RB, Lai DH, et al. Clonorchiasis: a key food-borne zoonosis in China [J]. Lancet Infect Dis, 2005, 5(1): 31-41.
- [11] Xin HL, Yang YC, Jiang ZH, et al. An investigation of prevalence in an endemic county in Guangxi Zhuang Autonomous Region, China, 2016 [J]. Food Waterborne Parasitol, 2021(22): e00109.
- [12] Jiang ZH, Wan XL, Lv GL, et al. High prevalence of *Clonorchis sinensis* infection in Guangxi, Southern China [J]. Trop Med Health, 2021, 49(1): 6.
- [13] Woon MS. Susceptibility of experimental animals to reinfection with *Clonorchis sinensis* [J]. Korean J Parasitol, 2006, 44(2): 163-166.
- [14] Choi YK, Yoon BI, Won YS, et al. Cytokine responses in mice infected with *Clonorchis sinensis* [J]. Parasitol Res, 2003, 91(2): 87-93.
- [15] 付琳琳, 李妍, 刘宜升, 等. 华支睾吸虫感染小鼠模型的建立及比较 [J]. 中国病原生物学杂志, 2008(1): 46-48, 85.
- [16] Zhang BB, Yan C, Fang F, et al. Increased hepatic Th2 and Treg subsets are associated with biliary fibrosis in different strains of mice caused by *Clonorchis sinensis* [J]. PLoS One, 2017, 12(2): e0171005.
- [17] Bai XL, Wang N, Zhou J, et al. DX5 NKT cells' increase was correlated with liver damage in FVB mice not in BALB/c mice infected by *Clonorchis sinensis* [J]. Parasite Immunol, 2021, 43(1): e12796.

【收稿日期】 2022-04-29 【修回日期】 2022-07-06