

亚洲日月蛤多糖的分子检测及其干预小鼠 日本血吸虫肝纤维化的初步研究

吕业超¹, 唐小牛^{1,2*}, 胡伟¹, 姜玉新^{1,2}, 湛孝东¹, 郭伟¹, 孙启山¹, 王国栋², 周书林¹

[摘要] **目的** 检测亚洲日月蛤多糖的分子特性,探讨其在干预小鼠日本血吸虫肝纤维化中的作用。**方法** 提取并纯化亚洲日月蛤多糖,采用凝胶排阻法对其分子量进行测定,应用PMP柱前衍生法对其单糖组成进行检测。取50只雌性BALB/c小鼠,随机分成5组,每组10只小鼠。A组给予生理盐水灌胃,B、C、D、E组小鼠分别经腹部皮肤攻击感染血吸虫尾蚴(30±2)条/只;饲养第8周末,C、D、E组小鼠分别给予多糖、吡喹酮及多糖+吡喹酮治疗,B组小鼠给予生理盐水;第16周末,收集小鼠肝脏及血清,通过HE染色观察小鼠肝脏虫卵肉芽肿病变及肝纤维化情况,采用ELISA法检测血清IFN-γ、IL-13水平。**结果** 亚洲日月蛤多糖相对分子量为11.7 kDa,其多糖主要由葡萄糖组成。C、D组和E组小鼠血清IFN-γ浓度显著高于对照组($F = 63.525, P < 0.01$),C、D组和E组小鼠血清IL-13浓度显著低于B组($F = 99.788, P < 0.01$)。HE染色显示,B、C、D、E组小鼠肝组织均见不同程度虫卵结节和纤维化改变,A组小鼠肝脏正常,E组虫卵结节较B组少($\chi^2 = 7.875, P < 0.05$)。**结论** 亚洲日月蛤多糖具有明显的抗日本血吸虫肝纤维化作用,与吡喹酮联用效果更好。

[关键词] 亚洲日月蛤;多糖;日本血吸虫;肝纤维化;吡喹酮;小鼠

[中图分类号] R383.24 **[文献标识码]** A

Preliminary study on molecular detection of polysaccharide from *Amusium pleuronectes* and its intervention to hepatic fibrosis in rats infected with *Schistosoma japonicum*

LÜ Ye-chao¹, TANG Xiao-niu^{1,2*}, HU Wei¹, JIANG Yu-xin^{1,2}, ZHAN Xiao-dong¹, GUO Wei¹, SUN Qi-shan¹, WANG Guo-dong², ZHOU Shu-lin¹

1 Department of Medical Parasitology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China; 2 Anhui Provincial Engineering Research Center for Polysaccharide Drugs, China

* Corresponding author

[Abstract] **Objective** To detect the molecular characterization of polysaccharide purified from *Amusium pleuronectes*, so as to investigate its role of intervention to the formation of hepatic fibrosis caused by *Schistosoma japonicum* infection. **Methods** The crude polysaccharide from *A. pleuronectes* was extracted and further purified, and the molecular weight and monosaccharide composition were determined by the high pressure size exclusion chromatography and PMP pre-column derivatization method, respectively. A total of 50 female BALB/c mice were randomly divided into five groups: A (normal group), B (experimental group), C (polysaccharide group), D (praziquantel), and E (polysaccharide + praziquantel group). The mice in B, C, D, or E groups were attacked on the abdominal skin by using the cercariae of *S. japonicum* (30±2 for each mouse) respectively. After 8 weeks, the mice in C, D, and E groups were administrated by polysaccharide and/or praziquantel, and the mice in B group were instead of saline. All the livers and sera were collected after 16 weeks. HE staining was employed for the livers, and serum IFN-γ and IL-13 were measured by using ELISA kits. **Results** The molecular weight of purified polysaccharide from *A. pleuronectes* was 11.7 kDa. Compared with A and B groups, the serum levels of IFN-γ in C, D, and E groups were significantly increased ($F = 63.525, P < 0.01$). However, the serum levels of IL-13 in C, D, and E groups were significantly decreased ($F =$

[基金项目] 安徽省高校自然科学重点基金(KJ2018A0263);国家自然科学基金(81172790、81671586);皖南医学院第二批学术与技术带头人资助项目(010202041703)

[作者单位] 1皖南医学院医学寄生虫学教研室(芜湖241002);2安徽省多糖药物工程技术研究中心

[作者简介] 吕业超,男,硕士研究生。研究方向:天然产物与抗感染免疫

* 通信作者 E-mail:txniu@163.com

[数字出版日期] 2018-11-07 16:54

[数字出版网址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1374.R.20181106.1051.001.html>

99.788, $P < 0.01$) compared with that in B group. HE staining showed that the egg nodules and hepatic fibrosis were observed in B, C, D, and E groups. The number of egg nodules and fibrosis degree in E group were milder than those in B group ($\chi^2 = 7.875$, $P < 0.05$). **Conclusions** The polysaccharide from *A. pleuronectes* has an obvious effect in preventing hepatic fibrosis process induced by *S. japonicum* infection, particularly combining with the administration of praziquantel.

[Key words] *Amusium pleuronectes*; Polysaccharide; *Schistosoma japonicum*; Liver fibrosis; Praziquantel; Mouse

亚洲日月蛤(*Amusium pleuronectes*)是一种生长在海洋里的甲壳类软体动物,其体内多糖具有重要的生物学价值。既往研究显示,多糖不仅具有抗炎、抗病毒、抗氧化等药理活性,且在抗肿瘤、抗纤维化等免疫调节方面亦具有重要的生物学作用^[1-4]。本研究拟从海洋生物亚洲日月蛤中提取多糖并纯化,分析其分子量及其单糖组成,并作用于日本血吸虫感染小鼠,探讨其在干预血吸虫肝纤维化形成中的生物学功能。

材料与方法

1 实验材料

1.1 试剂 亚洲日月蛤购自上海批发市场;丙酮、无水乙醇、三氯甲烷、正丁醇、活性炭均购自南京化学试剂股份有限公司;牛血清白蛋白购自 Solarbio 公司;D-甘露糖、D-(+)-葡萄糖、D-葡萄糖醛酸、氨基葡萄糖、乙腈均购自格里斯医药化学技术有限公司;氧化氙为上海国药集团化学试剂有限公司产品;Dextran 分子量标准品为上海子起生物科技有限公司产品;DEAE Sepharose Fast Flow、Sephacryl S-400 HR 为美国 GE Healthcare Life Science 公司产品;小鼠 γ -干扰素(IFN- γ)、白细胞介素-13(IL-13)酶联免疫检测试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 主要仪器 SiGMA® 3-18KS 高速冷冻离心机(德国赛多利斯公司)、冻干机(上海泰事达机电设备有限公司)、TSK-Gel GMPW_{XL} 色谱柱(日本东曹株式会社)、UltiMate 3000 高效液相色谱仪(美国 Thermo 公司)、多功能酶标仪(瑞士 TECAN 公司)。

1.3 实验动物 50 只雌性 BALB/c 小鼠购自安徽医科大学实验动物中心。

1.4 血吸虫虫株 日本血吸虫感染阳性钉螺购自南京市疾病预防控制中心,按常规方法逸出尾蚴,取新鲜逸出的尾蚴用于小鼠感染实验。

2 实验方法

2.1 粗多糖提取 按照文献[5]中的方法提取亚洲日月蛤多糖。

2.2 粗多糖纯化 粗多糖分离和纯化参照文献[6]步骤进行,采用 DEAE 层析柱对其进行初步分离,再使用 Sephacryl S-400 HR 使其进一步纯化,收集、浓

缩、冷冻干燥备用。

2.3 多糖分子量检测 先将不同分子量的葡萄糖标准品经液相色谱检测^[7],绘制标准曲线,再通过液相色谱仪检测纯化后的亚洲日月蛤粗多糖参数,根据标准曲线计算亚洲日月蛤粗多糖分子量。

2.4 多糖组成检测 亚洲日月蛤多糖组成检测采用 PMP 柱前衍生法进行^[8]。

2.5 肝纤维化小鼠模型的建立 取 50 只雌性 BALB/c 小鼠,随机分成 5 组,每组 10 只。A 组为对照组,未经血吸虫感染,用等量(1 mL)生理盐水灌胃,连续 8 周。其余 4 组小鼠经腹部皮肤攻击感染血吸虫尾蚴[(30 ± 2)条/只]^[9]。饲养 8 周末,B 组小鼠给予等量(1 mL)生理盐水灌胃,连续 8 周;C 组为多糖组,小鼠每日给予 200 mg/kg 亚洲日月蛤多糖灌胃,连续 8 周;D 组为吡啶酮组,小鼠每日给予 500 mg/kg 吡啶酮灌胃,连续 2 d;E 组为吡啶酮+多糖组,小鼠每日给予 500 mg/kg 吡啶酮灌胃,连续 2 d,再给予 200 mg/kg 亚洲日月蛤多糖灌胃,连续 8 周。

2.6 小鼠肝脏及血清采集 第 16 周末,小鼠眼静脉取血,收集血清,之后全部颈椎脱臼处死小鼠,收集肝脏,-20 °C 冰箱保存备用。

2.7 小鼠血清中 IFN- γ 、IL-13 浓度检测 采用 ELISA 法检测各组小鼠血清样本中 IFN- γ 、IL-13 浓度,操作按照试剂盒说明书进行。

2.8 小鼠肝组织 HE 染色 将各组小鼠肝脏经 HE 染色,显微镜下观察各组小鼠肝脏病理变化,可分为 4 级:“-”为肝脏未见虫卵结节;“+”为有少量虫卵结节;“++”为虫卵结节数量较多;“+++”为虫卵结节数量多,肝纤维化明显^[10]。

2.9 统计学分析 采用 SPSS 软件进行统计分析。多组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK 法(q 检验),率间差异的统计学比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

结 果

1 亚洲日月蛤粗多糖初步分离

经初步分离后,亚洲日月蛤多糖主要含有两种组分,即中性多糖(APS1)和酸性多糖(APS2)。中性多

糖吸光度值(A值)明显大于酸性多糖(图1),因此,收集中性多糖进行进一步研究。

2 中性多糖纯化

收集的中性多糖(APS1)经浓缩、干燥后,经Sep-hacryl S-400 HR柱层析进一步纯化后结果见图2。从图中可以看出,只有一个明显的波峰,说明已经纯化。

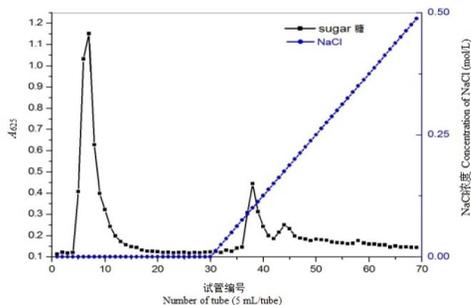


图1 亚洲日月蛤多糖离子交换层析图

Fig. 1 Ion-exchange column chromatogram of polysaccharide from *Amusium pleuronectes*

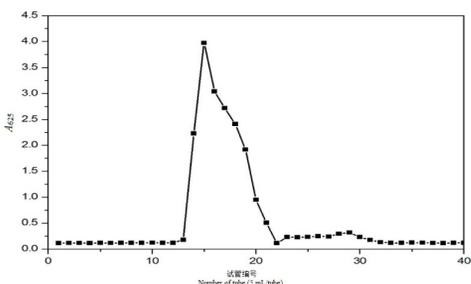
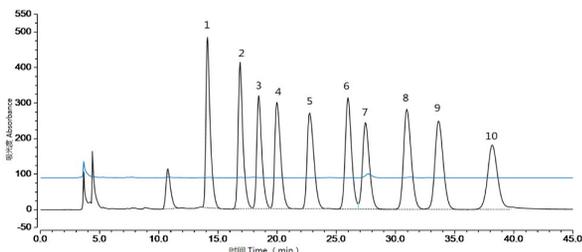


图2 中性多糖柱层析图

Fig. 2 Column chromatogram of APS1

3 中性多糖单糖组成

经PMP柱前衍生法检测中性多糖的单糖组分见图3、4。中性多糖主要是葡萄糖,还含有少量甘露糖、氨基葡萄糖、半乳糖等。



注:1甘露糖;2氨基葡萄糖;3 L-鼠李糖;4葡萄糖醛酸;5半乳糖醛酸;6半乳糖胺;7葡萄糖;8半乳糖;9阿拉伯糖;10岩藻糖
Note: 1 Man; 2 GlcN; 3 Rha; 4 GlcA; 5 GalA; 6 GalN; 7 Glc; 8 Gal; 9 Ara; 10 Fuc

图3 中性多糖单糖组成

Fig. 3 Monosaccharide composition of APS1

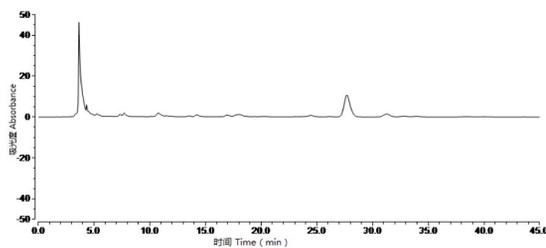


图4 中性多糖的单糖组成分析

Fig. 4 Analysis of monosaccharide composition from APS1

4 中性多糖分子量测定

经凝胶排阻法对中性多糖分子量进行检测,结果见图5。中性多糖仅一个较明显的峰,在其峰后有一小峰则是流动相Na₂SO₄的出峰位置。将中性多糖出峰时间带入绘制的标准曲线,得到其相对分子量约11.7 kDa。

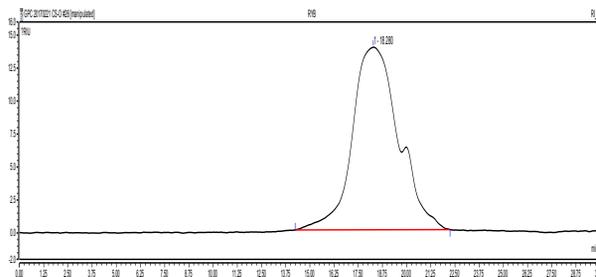


图5 中性多糖的相对分子量HPLC图

Fig. 5 Relative molecular mass of HPLC chromatogram from APS1

5 小鼠血清细胞因子IFN-γ和IL-13浓度

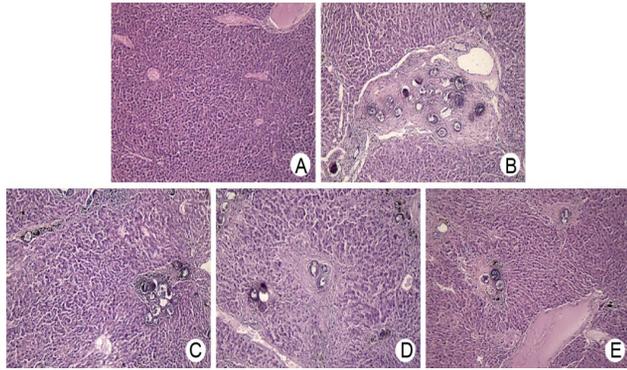
第16周末,各组小鼠IFN-γ和IL-13浓度见表1。与A组相比,C、D、E组IFN-γ水平均显著升高($F = 63.525, P < 0.01; q = -16.462, -14.786, -18.300, P$ 均 < 0.01),但IL-13水平均显著降低($F = 99.788, P < 0.01; q = -15.735, -20.814, -13.216, P$ 均 < 0.01)。与E组相比,D组IFN-γ水平显著升高($q = 7.208, P < 0.01$),C组与D组IFN-γ和IL-13浓度差异均无统计学意义($F = 0.878, 2.491, P$ 均 > 0.05)。

表1 IFN-γ和IL-13水平
Table 1 Levels of IFN-γ and IL-13

组别 Group	小鼠数量 (只) No. of mice	IFN-γ (pg/mL)	IL-13 (pg/mL)
A	10	8.28 ± 3.41	20.57 ± 4.11
B	6	21.87 ± 7.48	94.27 ± 9.76
C	8	60.40 ± 11.45	61.88 ± 5.47
D	8	55.08 ± 11.21	75.22 ± 8.73
E	8	66.21 ± 11.57	55.27 ± 10.51

6 小鼠肝组织HE染色结果

HE染色结果显示:A组小鼠肝组织正常;B组有大量的虫卵结节;C组、D组均有一定数目的虫卵结节;E组只有很少的虫卵结节。D组症状较A组为轻,差异有统计学意义($\chi^2 = 7.875, P < 0.05$, 检验水准经校正后为0.005);C、D组与B组相比,差异均无统计学意义($\chi^2 = 5.104, 5.444, P$ 均 > 0.05),但病变有一定程度减轻(图6,表2)。



注:A无虫卵结节;B有大量的虫卵结节;C有少量的虫卵结节;D有少量的虫卵结节;E仅有很少量的虫卵结节

Note: A No egg nodule; B Lots of egg nodules; C A small number of egg nodules; D A small number of egg nodules; E Only a few egg nodules

图6 小鼠肝脏HE染色($\times 100$)

Fig. 6 HE staining of liver tissue from mice ($\times 100$)

表2 小鼠肝脏病理变化分级

Table 2 Classification of hepatic pathological change of mice

组别 Group	小鼠数 (只) No. of mice	肝脏病理变化分级 Classification of hepatic pathological changes			
		-	+	++	+++
A	10	10	0	0	0
B	6	0	0	3	6
C	8	0	3	2	1
D	8	0	3	2	1
E	8	0	2	1	0

讨论

血吸虫感染引起的肝纤维化是一种严重的慢性感染性疾病。虽然我国血吸虫病防治工作取得了巨大成效,但仍存在一定数量的慢性及晚期血吸虫病患者。因此,研究预防及治疗慢性及晚期血吸虫病的药物尤为重要。

研究证实,从动植物中提取的天然多糖具有重要的生物活性,如免疫调节、抗炎、抗氧化、降血糖及抗肿瘤等,其发挥作用的效果取决于很多因素,如多糖分子量、多糖组分、空间结构及其剂量的大小等。多

糖分子量太大,因很难被吸收而难以发挥效应^[11-12]。

多糖在机体内发挥效应的机制是通过刺激机体的免疫细胞,释放出相应的细胞因子而发挥其生物活性^[13]。既往研究表明,血吸虫感染者是由血吸虫抗原刺激机体内CD4⁺T细胞,使Th1/Th2平衡发生偏移而引起相应病变^[14-15]。而生物多糖的药理活性就是抑制Th2免疫反应,从而抑制肝组织纤维化。李风华等^[16]研究显示虫草多糖具有逆转DMN诱导的大鼠肝纤维化的作用。闻慧琴^[17]发现芍药苷具有抑制血吸虫感染小鼠肝纤维化的活性。黄进等^[18]研究表明,黄芪多糖对肝纤维化大鼠TGF- β 1/Smads信号通路的影响可抑制肝纤维化的发展。

本研究从海洋生物亚洲日月蛤中提取多糖并进行组分、分子量等检测,同时探讨其对血吸虫肝纤维化形成的影响。研究结果显示,亚洲日月蛤多糖主要是中性多糖,其主要单糖成分是葡萄糖,分子量约11.7 kDa。肝组织HE染色显示,多糖联合吡喹酮组小鼠肝细胞形态结构较完整,虫卵和肉芽肿数减少。细胞因子检测显示,多糖组、吡喹酮组及联合用药组与对照组相比,IFN- γ 含量均升高,IL-13含量均减少;其中,联合用药组相比多糖组及吡喹酮组效果尤为明显,主要原因可能是Th1/Th2平衡从Th2偏向于Th1,减少了细胞外基质形成,从而抑制了小鼠肝组织纤维化的发展。综上,单独使用亚洲日月蛤多糖或吡喹酮均具有一定的抗血吸虫肝纤维化作用,而多糖和吡喹酮联用效果更优。

【参考文献】

- [1] Inobaya MT, Olveda RM, Tallo V, et al. Schistosomiasis mass drug administration in the Philippines: lessons learnt and the global implications [J]. *Microbes Infect*, 2015, 17(1): 6-15.
- [2] 张利娟,徐志敏,钱颖骏,等. 2015年全国血吸虫病疫情通报[J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2016, 28(6): 611-617.
- [3] Wang XQ, Wang FP, Chen W, et al. Non-equilibrium plasma prevention of *Schistosoma japonicum* transmission [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 35353.
- [4] 胡晶,胡悦君,郭润正,等. 吡喹酮治疗血吸虫病的不良反应及处理[J]. *中国现代医药杂志*, 2013, 15(10): 111-112.
- [5] 胡伟,唐小牛. 超声辅助法在亚洲日月蛤多糖提取工艺优化中的应用[J]. *皖南医学院学报*, 2016, 35(6): 515-518.
- [6] 陈骏洪. 缢蛭多糖提取纯化及其活性研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2009.
- [7] 中华人民共和国药典委员会. 生物大分子聚合物分子量与分子量分布的测定法[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 117-119.
- [8] 付海宁,赵峡,于广利,等. 盐藻多糖单糖组成分析的几种色谱方法比较[J]. *中国海洋药物*, 2008, 27(4): 30-34.

强相关的研究工作^[8-9];四是开展药物化疗实施平台的研究,发现最佳药物投递平台,既能保障高覆盖率,又能保障安全性。如本调查发现某县通过乡(镇)卫生院开展华支睾吸虫病高危人群化疗,这样具有更高的覆盖率以及安全性;同时因为既往生食淡水鱼者可以直接领药,又具有成本效益高的特点,该模式具有可推广性价值。同时为了提高覆盖率,可以尝试通过培训村医来开展相关的药物驱虫工作。只有加强上述应用性研究,制定相关药物治疗指南,才能实现《全国包虫病等重点寄生虫病防治规划(2016-2020年)》中要求的华支睾吸虫病控制目标^[10]。

志谢 感谢参与本次调查的10个省级和20个县级寄生虫病防治机构提供的支持和帮助

【参考文献】

- [1] Qian MB, Utzinger J, Keiser J, et al. Clonorchiasis [J]. Lancet, 2016, 387(10020): 800-810.
- [2] Qian MB, Chen YD, Fang YY, et al. Disability weight of *Clonorchis sinensis* infection: captured from community study and model simulation [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2011, 5(12): e1377.
- [3] Qian MB, Chen YD, Liang S, et al. The global epidemiology of clonorchiasis and its relation with cholangiocarcinoma [J]. Infect Dis Poverty, 2012, 1(1): 4.
- [4] World Health Organization. Foodborne trematode infections—Clo-

norchiasis [EB/OL]. [2018-05-05]. <http://www.who.int/foodborne-trematode-infections/clonorchiasis/en/>.

- [5] Centers for Disease Control and Prevention. Clonorchiasis [EB/OL]. (2018-03-01) [2018-05-05]. https://www.cdc.gov/parasites/clonorchis/health_professionals/index.html.
- [6] 中华人民共和国卫生部. 卫生部关于印发《2006-2015年全国重点寄生虫病防治规划》的通知[EB/OL]. (2006-06-07) [2018-05-05]. <http://www.moh.gov.cn/mohbgt/pw10604/200804/27592.shtml>.
- [7] World Health Organization. Accelerating work to overcome the global impact of neglected tropical diseases: a roadmap for implementation [EB/OL]. [2018-05-05]. http://www.who.int/neglected_diseases/resources/WHO_HTM_NTD_2012.1/en/.
- [8] Qian MB, Yap P, Yang YC, et al. Efficacy and safety of tribendimidine against *Clonorchis sinensis* [J]. Clin Infect Dis, 2013, 56(7): e76-e82.
- [9] Xu LL, Jiang B, Duan JH, et al. Efficacy and safety of praziquantel, tribendimidine and mebendazole in patients with co-infection of *Clonorchis sinensis* and other helminths [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2014, 8(8): e3046.
- [10] 中华人民共和国卫生计生委疾病预防控制局. 关于印发全国包虫病等重点寄生虫病防治规划(2016-2020年)的通知[EB/OL]. (2017-02-08) [2018-05-05]. <http://www.nhpc.gov.cn/jkj/s5873/201702/dda5ffe3f50941a29fb0aba6233bb497.shtml>.

【收稿日期】 2018-05-07 【编辑】 朱宏儒

(上接第503页)

- [9] 许丹,周巍,于洪刚,等. 芦荟大黄素对血吸虫病性肝纤维化小鼠的影响[J]. 中西医结合肝病杂志, 2012, 22(2): 107-109.
- [10] 陈艳,肖政. 白藜芦醇及其伍用吡啶酮对小鼠日本血吸虫肝纤维化的治疗作用[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2013, 31(5): 337-341.
- [11] 陈春娟,朱振元,陈璐. 低分子量蛹虫草多糖降血糖活性研究[J]. 现代食品科学, 2017, 33(4): 1-7.
- [12] Carlucci MJ, Pujol CA, Ciancia M, et al. Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity [J]. Int J Biol Macromol, 1997, 20(2): 97-105.
- [13] Im SA, Kim K, Lee CK. Immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Salicornia herbacea* [J]. Int Immunopharmacol, 2006, 6(9): 1451-1458.
- [14] 杨晓玮,张萃,董潇潇,等. 日本血吸虫可溶性成虫抗原及虫卵抗原对CD4⁺T细胞分化的影响[J]. 中国血吸虫病防治杂志,

2013, 25(2): 151-156.

- [15] 王瑜,夏超明. 日本血吸虫感染可诱导共刺激分子配体基因敲除小鼠CD154和CD40动态变化及对Th1/Th2偏移的影响[J]. 北京大学学报:医学版, 2015, 47(6): 898-904.
- [16] 李风华,刘平,熊卫国,等. 虫草多糖逆转DMN诱导大鼠肝纤维化的作用及机制研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23): 1968-1971.
- [17] 闻慧琴. 芍药苷对血吸虫感染小鼠肝纤维化的影响及TNF- α 在肝纤维化信号通路中的作用[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2010.
- [18] 黄进,张晨,詹菲. 黄芪多糖对肝纤维化大鼠TGF- β 1/Smads信号通路的影响[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(6): 2184-2186.

【收稿日期】 2018-01-22 【编辑】 朱宏儒