

# Sorafenib联合吡喹酮对日本血吸虫病小鼠肝纤维化病理学的作用

刘霞<sup>1</sup>, 熊勇<sup>1</sup>, 马智勇<sup>1</sup>, 王立霞<sup>2</sup>, 夏东<sup>3</sup> (1.武汉大学中南医院 感染科, 武汉 430071; 2.湖北省预防医学科学院, 武汉 430079; 3.武汉大学第二临床学院 基础医学院, 武汉 430071)

**摘要:** 目的 观察Sorafenib在吡喹酮杀虫基础上对小鼠日本血吸虫病肝纤维化病理形态学的作用。方法 65只小鼠经腹壁感染日本血吸虫尾蚴, 8周后形成血吸虫病肝纤维化模型, 随机分为感染组(10只)、Sorafenib组(15只)、吡喹酮组(20只)和吡喹酮联合Sorafenib组(20只), 另设正常对照组(5只)并分组给药。吡喹酮组: 150 mg/(kg·d), 连续治疗2天后给予等量生理盐水灌服2周; Sorafenib组: 2天生理盐水灌服(剂量同吡喹酮组)后给予Sorafenib 2 mg/(kg·d), 每日1次, 灌服2周; 吡喹酮联合Sorafenib组: 吡喹酮150 mg/(kg·d), 治疗2天后给予Sorafenib 2 mg/(kg·d), 每日1次, 灌服2周。正常组及感染对照组自给药开始每日1次灌服等量生理盐水至实验结束。处死小鼠后取肝脏, 观察肝脏形态并取部分肝组织作病理学检查。应用HE染色观察小鼠肝脏的病理改变, Masson染色观察肝组织胶原纤维沉积范围, 并采用IPP 6.0图文分析软件定量计算胶原纤维相对面积以反映纤维化程度。结果 吡喹酮联合Sorafenib组小鼠肝脏病理损害明显减轻, 纤维范围显著减少, 该组胶原纤维相对面积( $1.86 \pm 0.87$ )与感染组( $5.97 \pm 1.77$ )和吡喹酮组( $3.78 \pm 1.08$ )比较差异有统计学意义( $P < 0.0001$ ), 单用Sorafenib组胶原纤维相对面积( $5.51 \pm 1.11$ )与感染组比较差异无统计学意义( $P = 0.42$ )。结论 Sorafenib在吡喹酮杀虫基础上能减轻日本血吸虫病肝脏病理损伤, 二者联合有显著的增效作用。

**关键词:** Sorafenib; 日本血吸虫病; 肝纤维化; 病理学

## Effects of Sorafenib combined with Praziquantel on hepatic fibrosis pathology of mice with schistosomiasis japonica

LIU Xia<sup>1</sup>, XIONG Yong<sup>1</sup>, MA Zhi-yong<sup>1</sup>, WANG Li-xia<sup>2</sup>, XIA Dong<sup>3</sup> (1.Department of Infectious Diseases, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China; 2.Hubei Provincial Academy of Preventive Medicine, Wuhan 430079, China; 3.Basic Medicine College, The Second Clinical College of Wuhan University, Wuhan 430071, China)

**Abstract: Objective** To evaluate the effects of Sorafenib combined with Praziquantel on hepatic fibrosis pathology of mice with schistosomiasis japonicum. **Methods** After infected with schistosoma japonicum cercaria percutaneously through the abdomen for 8 weeks, total of 65 mice formed schistosomiasis liver fibrosis model, and were randomly divided into infected group (10 cases), Sorafenib group (15 cases), Praziquantel group (20 cases) and Sorafenib combined with Praziquantel group (20 cases). Five normal mice were taken as the control group. Drug treatment was given immediately. Praziquantel group was treated with Praziquantel 150 mg/(kg·d) for 2 days and continued to be given equivalent normal saline solution once a day for 2 weeks. Sorafenib group was treated with equivalent normal saline solution once a day for 2 days and continued to be treated with Sorafenib 2 mg/(kg·d) once a day for 2 weeks. Sorafenib combined with Praziquantel group was treated with Praziquantel at the same dose for 2 days followed by treatment with Sorafenib 2 mg/(kg·d) for 2 weeks. The control group and infected group were treated with equivalent normal saline solution from the beginning of drug delivery to the end of the experiment. After the mice in each group were sacrificed, the fresh liver tissues were observed, while parts of the liver were used for HE staining and Masson staining to observe the pathological changes and fibrosis extent. Image-Pro Plus 6.0 software was applied to calculate collagen fiber relative area quantitatively which showed fibrosis extent. **Results** In Sorafenib combined with Praziquantel group, pathological damage of mice liver reduced significantly and fibrosis extent relieved obviously. There was significant difference when collagen area in Sorafenib combined with Praziquantel group ( $1.86 \pm 0.87$ ) was compared with that in Praziquantel group ( $3.78 \pm 1.08$ ) and infected group ( $5.97 \pm 1.77$ ) ( $P < 0.0001$ ). But the difference was not statistically significant between infected group and Sorafenib group ( $5.51 \pm 1.11$ ) ( $P = 0.42$ ). **Conclusion** On the basis of Praziquantel insecticide, Sorafenib can reduce liver pathological damage in mice with Schistosoma japonicum, and the effect of Sorafenib combined with Praziquantel on anti-fibrosis is reinforced cooperatively.

**Key words:** Sorafenib; Schistosomiasis japonica; Liver fibrosis; Pathomorphology

血吸虫病作为一种地方流行性疾病,在世界多个国家和地区广泛流行<sup>[1-3]</sup>,我国主要以日本血吸虫感染为主,血吸虫肝病的主要病理改变为虫卵肉芽肿形成和纤维化<sup>[4,5]</sup>。血吸虫肝纤维化导致的门静脉高压及其并发症、肝损伤甚至肝功能衰竭是晚期血吸虫病患者的主要死因,因此,抗肝纤维化甚至逆转肝纤维化受到临床医生和药物研发者的关注,但目前临床上暂无疗效确切的抗纤维化药物<sup>[6]</sup>。Sorafenib是多种酪氨酸激酶受体抑制剂,作为无法手术切除的晚期癌症如肝癌及肾癌的一线补救化学治疗药物已在临床上得到广泛应用<sup>[7-9]</sup>。有研究用门静脉部分结扎、胆总管结扎和二甲基亚硝酸等诱发的肝硬化大鼠肝内纤维化模型证实了Sorafenib具有良好的抗肝纤维化作用<sup>[10,11]</sup>。为进一步研究Sorafenib对日本血吸虫病肝纤维化是否有效,本研究用日本血吸虫尾蚴感染小鼠并构建肝纤维化模型进行实验研究。

## 1 材料与方法

1.1 实验材料 健康雌性昆明鼠6~8周龄70只,体重18~20 g,由武汉大学实验动物中心提供;阳性钉螺由武汉大学第二临床学院寄生虫教研室提供;吡喹酮片由湖北省血防所赠送;Sorafenib购于美国Gene Operation(货号IMA1044-0010MG)。

1.2 实验方法 复制动物模型及分组给药参照相关文献进行<sup>[12]</sup>。小鼠随机分成5组:A组为正常组(5只),B组为感染组(10只),C组为Sorafenib组(15只),D组为吡喹酮组(20只),E组为吡喹酮联合Sorafenib组(20只),分笼饲养。除正常组外,各组小鼠采用贴片法经腹部人工感染日本血吸虫尾蚴( $20 \pm 1$ )条/只,感染后5组小鼠均给予正常饮食。在感染第8周时,除正常组外其余各组中随机挑选1只小鼠处死,肝组织病理切片HE染色观察造模是否成功及虫卵肉芽肿沉积状况,并随即开始给药。吡喹酮组:150 mg/(kg·d),连续治疗2天后给予等量生理盐水灌服2周;Sorafenib

组:灌服生理盐水(剂量同吡喹酮组)2天后给予Sorafenib 2 mg/(kg·d),每日1次,灌服2周;吡喹酮联合Sorafenib组:吡喹酮150 mg/(kg·d),连续治疗2天后,次日给予Sorafenib 2 mg/(kg·d),每日1次,灌服2周。正常组及感染对照组每日1次灌服等量生理盐水至实验结束。实验结束时处死小鼠,取出肝脏,观察肝脏形态并取肝组织制成石蜡切片。

1.3 观察指标 肉眼观察新鲜肝脏大体形态,取部分肝组织,4%甲醛固定,石蜡包埋,HE染色观察肝组织学改变。Masson染色观察肝组织纤维化程度,参照文献<sup>[7]</sup>每张切片在光学显微镜10倍物镜下选择阳性区域随机采集3~4个视野,采用IPP 6.0图文分析软件,在相同的背底条件下,定量计算胶原纤维沉积相对面积(即染色阳性的胶原纤维占整屏视野的百分比)以反映纤维化程度,取其均值进行统计分析。

1.4 统计学处理 应用SPSS 19.0软件进行统计分析,计量资料以均数±标准差表示,组间比较采用 $t$ 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 肝组织HE染色 正常组小鼠肝组织肝细胞排列整齐,小叶结构完整,中央静脉居中,无炎性细胞浸润和纤维病灶。感染8周末进行杀虫及抗肝纤维化治疗的小鼠肝细胞变性、坏死明显,小叶结构遭破坏,中央静脉偏移或消失,汇管区内大量虫卵沉积,周围伴大量炎性细胞浸润和纤维组织增生,虫卵肉芽肿形成,见图1。

2.2 肝脏形态学观察 正常组小鼠肝脏红润,表面光滑,包膜完整,边缘整齐,无肝纤维化病理改变;感染组小鼠肝脏呈暗褐色,肝脏表面布满粟粒样大小虫卵结节,呈米白色;肝脏体积变大,表面凹凸不平,边缘不齐,质脆,包膜紧张;经吡喹酮杀虫治疗后肝脏表面米白色虫卵结节有所减少,表面较感染组光滑,体积回复缩小,颜色深红,以上组织学改善在吡喹酮杀虫后联合Sorafenib治疗组最明

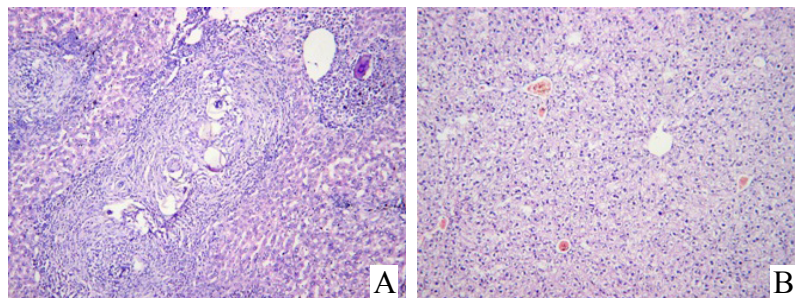


图1 正常组和感染后8周小鼠肝组织(HE染色,  $\times 100$ )

注: A为正常组, B为感染后8周(未治疗)



显，见图2。

**2.3 肝组织纤维化程度** Masson染色后胶原纤维呈蓝色，正常组基本无显色；感染组和Sorafenib组虫卵及汇管区可见大量蓝色纤维沉积；吡喹酮治疗组小鼠肝脏汇管区及肉芽肿内纤维组织沉积较感染组减少（ $P < 0.05$ ），但仍较明显；吡喹酮联合Sorafenib治疗组，纤维组织增生明显减轻，与吡喹酮组比较差异显著（ $P < 0.0001$ ）；单用Sorafenib组与感染组胶原纤维沉积无明显减少（ $P > 0.05$ ），见图3、图4。

### 3 讨论

采用盖玻片法经腹部感染小鼠诱导肝纤维化是目前建立的比较成熟的肝纤维化动物模型，其病理过程与人感染日本血吸虫后病程进展相似，因此应用广泛<sup>[13]</sup>。虫卵在血吸虫病的发病学中具有相当重要的意义<sup>[14-16]</sup>。大量虫卵沉积于肝脏门脉系统引起窦前性门脉高压和肝纤维化。实验小鼠感染后肝内出现各期虫卵，毛蚴成熟期为40天左右，在毛蚴成熟期伴有大量炎性细胞浸润，形成了以虫卵为中心的肉芽肿，在虫卵肉芽肿的基础上宿主产生免疫应

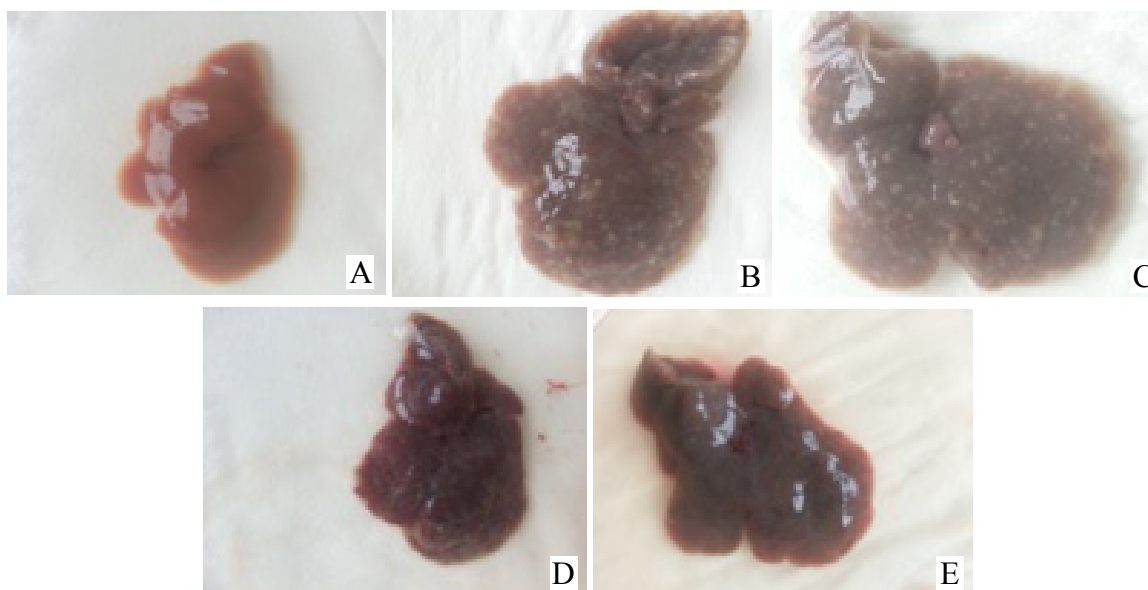


图2 各组小鼠肝脏形态

注：A 为正常组；B 为感染组；C 为 sorafenib 组；D 为吡喹酮组；E 为吡喹酮联合 sorafenib 组

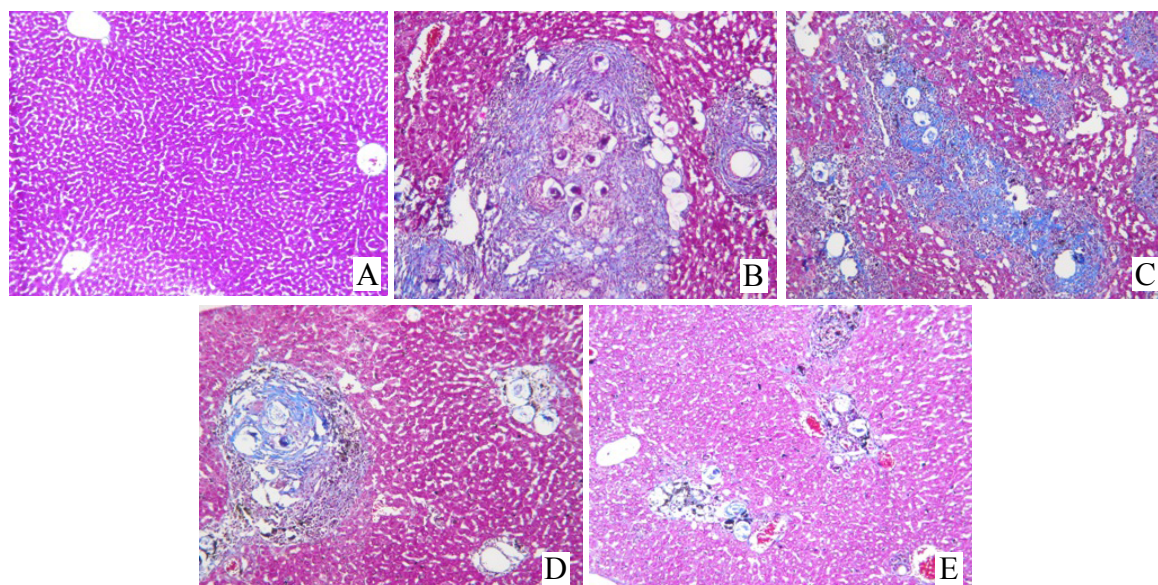


图3 各组小鼠肝组织 Masson 染色（×100）

注：A 为正常组；B 为感染组；C 为 sorafenib 组；D 为吡喹酮组；E 为吡喹酮联合 sorafenib 组

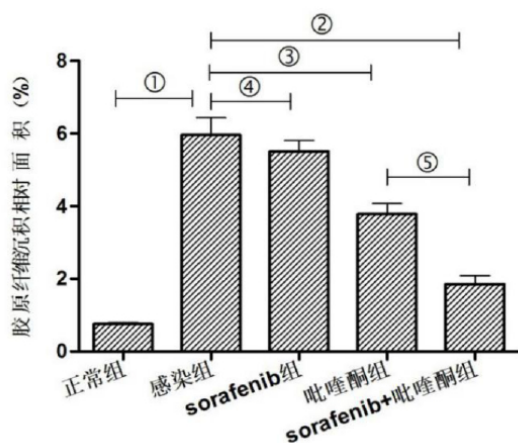


图4 各组小鼠肝脏胶原纤维沉积相对面积百分比

注: 各种小鼠肝脏病胶原显微沉积相对面积分别为: 正常组: (0.76 ± 0.14) %、感染组: (5.97 ± 1.77) %、Sorafenib组: (5.51 ± 1.11) %、吡喹酮组: (3.78 ± 1.08) %、吡喹酮 + Sorafenib组 (1.86 ± 0.87) %

①: 正常组与感染组比较  $t = -10.97$ ,  $P < 0.001$ ; ②: 感染组与吡喹酮 + Sorafenib组比较  $t = 7.79$ ,  $P < 0.001$ ; ③: 感染组与吡喹酮组比较  $t = 3.94$ ,  $P = 0.001$ ; ④: 感染组与Sorafenib组比较  $t = 0.81$ ,  $P = 0.42$ ; ⑤: 吡喹酮组与吡喹酮 + Sorafenib组比较  $t = 5.19$ ,  $P < 0.001$

答是随后形成纤维化的主要原因, 故尾蚴感染后6~8周肝脏形成肉芽肿和纤维化<sup>[17]</sup>。本实验也证实, 在感染后8周处死的小鼠肝组织HE染色显示有明显的肝细胞破坏、炎症细胞浸润、虫卵肉芽肿和纤维沉积, 符合血吸虫病肝纤维化的自然发展史, 造模成功, 随后予以药物治疗。

实验中单用吡喹酮治疗组肉眼观察肝脏形态较感染后未治疗组有所改善, 同时Masson染色提示纤维沉积减少, 与感染组相比有统计学差异, 证明吡喹酮在杀虫的同时有一定抗肝纤维化的作用。Morcos等<sup>[18]</sup>研究提示早期和足疗程使用吡喹酮可有效逆转肝纤维化。大量的临床和实验资料证明, 吡喹酮可以通过多种途径杀灭血吸虫成虫, 阻止或减少血吸虫虫卵沉积及肉芽肿的形成, 从而减轻肉芽肿导致的免疫病理损伤和肝纤维化形成, 因此强调血吸虫病肝纤维化病因治疗仍十分必要<sup>[19-21]</sup>。Liang等<sup>[22]</sup>通过对血吸虫感染和CCl<sub>4</sub>诱导的小鼠肝纤维化模型的研究也发现吡喹酮有良好的抗肝纤维化作用, 其机制是吡喹酮可抑制活化的HSC表达TGF-β、TIMP1等促纤维生成基因。临床上观察到早中期肝纤维化病例经有效杀虫治疗后, 大多数患者肝纤维化能够停止或逆转, 但蔡卫民<sup>[23]</sup>通过肝脏活组织检查证实晚期血吸虫病在经过彻底杀虫后肝纤维化仍可继续发展, 这部分病例除了杀虫治疗外, 尚需抗纤维化治疗。本实验吡喹酮联合

Sorafenib组在吡喹酮灌胃治疗后予以Sorafenib抗肝纤维化治疗, 实验结果显示二者联合用药可使肝脏外观形态改善, Masson染色可见蓝色胶原沉积较其他组明显减少, 可显著改善肝脏的病理损伤。

Sorafenib是一种有效的抗癌药物, 主要通过抑制Raf/MEK/ERK信号转导和与新生血管生成有关的几种酪氨酸激酶受体的活性, 包括: 血管内皮生长因子受体-2 (vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR-2)、VEGFR-3及血小板衍生长因子受体-b (platelet derived growth factor receptor-b, PDGFR-b) 等起到抗肿瘤的作用<sup>[24-26]</sup>。Mejias等<sup>[10]</sup>通过对大鼠门静脉部分结扎和胆总管结扎成功制造大鼠门脉高压肝硬化模型, 以喂食Sorafenib的大鼠为实验组, 饲以0.9%氯化钠溶液的大鼠为对照组, 结果证明Sorafenib能有效抑制VEGFR、PDGFR-b和Raf信号转导通路, 产生减少门体侧支循环、内脏和肝内血管生成, 显著降低门静脉压以及改善肝内炎症和纤维化等多种有益效应, 且在实验过程中未发现治疗剂量的Sorafenib引起不良反应而导致大鼠死亡, 治疗剂量Sorafenib的安全性和有效性得到证实。Wang等<sup>[11]</sup>研究显示Sorafenib能显著降低胆总管结扎和二甲基亚硝酸诱发的肝硬化大鼠肝内纤维化程度, 其机制为Sorafenib可直接抑制调控HSC活化增殖的信号转导通路Raf/ERK和Akt/p70S6K, 减少HSC增殖, 促进HSC凋亡。本实验观察到Sorafenib在驱虫治疗的基础上能有效抑制日本血吸虫病肝纤维化, 但其机制需进一步阐述。

本实验并未观察到单用Sorafenib治疗可使小鼠肝脏病理得到改善。Sorafenib和Thalidomide同属于血管生成抑制剂, Lima等<sup>[27]</sup>观察单用Thalidomide对曼氏血吸虫病小鼠肝纤维化的作用, 结果提示Thalidomide无明显抑制肝纤维化的作用。Sorafenib和Thalidomide应用于相同的动物模型 (血吸虫病肝纤维化模型) 单独用药抗肝纤维化作用并不理想, 而Sorafenib单用于门静脉部分结扎、胆总管结扎及二甲基亚硝酸诱导的肝纤维化模型中在病因持续存在的前提下仍可改善肝纤维化, 因此推测可能对于血吸虫病所致的肝纤维化病因治疗极为重要, 需在有效杀虫的前提下Sorafenib抗纤维化的作用才显现出来, 其机制有待进一步研究。本实验结果提示, Sorafenib在吡喹酮杀虫基础上能减轻日本血吸虫病肝脏的病理损伤, 二者联合使用有显著的增效作

用,为探讨抗血吸虫病肝纤维化的新方法提供了一定的理论基础。

#### 参考文献

- [1] Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, et al. Human schistosomiasis[J]. *Lancet*,2014,383(9936):2253-2264.
- [2] Lewis FA, Tucker MS. Schistosomiasis[J]. *Adv Exp Med Biol*,2014,766:47-75.
- [3] WHO. Schistosomiasis fact sheet[R]. Geneva, Switzerland: World Health Organization,2014.
- [4] Shaker Y, Samy N, Ashour E. Hepatobiliary Schistosomiasis[J]. *J Clin Transl Hepatol*,2014,2(3):212-216.
- [5] Elbaz T, Esmat G. Hepatic and intestinal schistosomiasis: review[J]. *J Adv Res*,2013,4(5):445-452.
- [6] 孙洁. 肝纤维化中西医治疗进展[C]. 南京: 2014年中华中医药学会分会暨中医、中西医结合防治肝病、肝癌高峰论坛,2014.
- [7] Tejeda-Maldonado J, García-Juárez I, Aguirre-Valadez J, et al. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma: an update[J]. *World J Hepatol*,2015,7(3):362-376.
- [8] Germano D, Daniele B. Systemic therapy of hepatocellular carcinoma: current status and future perspectives[J]. *World J Gastroenterol*,2014,20(12):3087-3099.
- [9] GAO JJ, SHI ZY, XIA JF, et al. Sorafenib-based combined molecule targeting in treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*,2015,21(42):12059-12070.
- [10] Mejias M, Garcia-Pras E, Tian C, et al. Beneficial Effects of Sorafenib on Splanchnic, Intrahepatic, and Portocollateral Circulations in Portal Hypertensive and Cirrhotic Rats[J]. *Hepatology*,2009,49(4):1245-1256.
- [11] Wang Y, Gao J, Zhang D, et al. New insights into the antifibrotic effects of sorafenib on hepatic stellate cell and liver fibrosis[J]. *J Hepatol*,2010,53(1):132-144.
- [12] 王密. NADPH氧化酶对大麻素受体1(CB1)的调节机制及CB1在血吸虫性肝纤维化形成中的作用研究[D]. 华中科技大学,2014.
- [13] Abdul-Ghani RA, Hassan AA. Murine schistosomiasis as a model for human schistosomiasis mansoni: similarities and discrepancies[J]. *Parasitol Res*,2010,107(1):1-8.
- [14] Chuah C, Jones MK, Burke ML, et al. Spatial and temporal transcriptomics of *Schistosoma japonicum*-induced hepatic granuloma formation reveals novel roles for neutrophils[J]. *J Leukoc Biol*,2013,94(2):353-365.
- [15] Pearce EJ, Huang SC. The metabolic control of schistosome egg production[J]. *Cell Microbiol*,2015,17(6):796-801.
- [16] Weerakoon KG, Gobert GN, Cai P, et al. Advances in the diagnosis of human schistosomiasis[J]. *Clin Microbiol Rev*,2015,28(4):939-967.
- [17] 任光辉. 临床血吸虫病学[M]. 北京:人民卫生出版社,2009:150-151.
- [18] Morcos SH, Khayyal MT, Mansour MM, et al. Reversal of hepatic fibrosis after praziquantel therapy of murine schistosomiasis[J]. *Am J Trop Med Hyg*,1985,34(2):314-321.
- [19] Cupit PM, Cunningham C. What is the mechanism of action of praziquantel and how might resistance strike?[J]. *Future Med Chem*,2015,7(6):701-705.
- [20] Chai JY. Praziquantel treatment in trematode and cestode infections: an update[J]. *Infect Chemother*,2013,45(1):32-43.
- [21] LIU Y, WU W, Liang Y, et al. New uses for old drugs: the tale of artemisinin derivatives in the elimination of schistosomiasis japonica in China[J]. *Molecules*,2014,19(9):15058-15074.
- [22] LIANG YJ, LUO J, YUAN Q, et al. New insight into the antifibrotic effects of praziquantel on mice in infection with *Schistosoma japonicum*[J]. *PLoS One*,2011,6(5):e20247.
- [23] 蔡卫民. 认识肝纤维化与晚期血吸虫病的过去与未来[J]. *中国血吸虫病防治杂志*,2008,20(3):235-238.
- [24] Minguet J, Smith KH, Bramlage CP, et al. Targeted therapies for treatment of renal cell carcinoma: recent advances and future perspectives[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*,2015,76(2):219-233.
- [25] Sampat KR, O'Neil B. Antiangiogenic therapies for advanced hepatocellular carcinoma[J]. *Oncologist*,2013,18(4):430-438.
- [26] Taketomi A. Clinical trials of antiangiogenic therapy for hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Clin Oncol*,2016,21(2):213-218.
- [27] Lima CB, Iglesias KB, Andrade ZA. Thalidomide failed to inhibit angiogenesis and fibrosis in hepatic schistosomiasis of the mouse[J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*,2007,102(7):883-885.

收稿日期: 2016-01-26

刘霞,熊勇,马智勇,等. Sorafenib联合吡嗪酮对日本血吸虫病小鼠肝纤维化病理学的作用[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版),2016,8(3):59-63.