



目的: 在实验动物中鉴定肾脏在不同形式的后睾吸虫病中复制潜能的反应。

材料与amp;方法。 实验对象为60只叙利亚雄性仓鼠。第I组 (n=10) 为对照组, 第II组 (n=25) 为染有*Opisthorchis*

*felineus*后期囊幼虫的动物, 第III组包括 (n=25) 动物, 超侵入型蛲虫模型: 被50只*O. felineus*幼虫感染的动物, 14和25天后再被50只囊蚴感染。通过过量麻醉将仓鼠从实验中取出, 并将其斩首, 实验持续7、15、30天。分离肾脏并进行组织学检查, 包括使用组织化学和免疫组化染色方法。然后显微镜检查, 并对结果进行统计分析。

结果。 揭示了局部干细胞的数量特征、增殖趋势和分化。肾皮质和髓质中检测到CD117、Oct4、CD34和CD31阳性干细胞标记物的表达。这些标记物进一步分化为祖细胞, 形成小管状的上皮结构。肾小球可见血管生成, 血管袢增加。

结论。 具有分泌物的*O.*

*felineus*启动肾小管干细胞和微循环床周细胞的活化。骨盆和输尿管起始部分有明显的移行上皮增生。此外, 在寄生虫分泌组的影响下, 肾小球袢中有明显的干细胞增殖。

关键词: 肾脏; 后睾吸虫病; *O. felineus*; 分泌物; 叙利亚仓鼠

后睾吸虫病、鸡吸虫病是一种由猫后睾吸虫 (*Opisthorchis felineus*) 引起的寄生虫病。该疾病具有全体性特征, 其寄生体为肝、胰腺、胆囊[1, 2]。临床和病理解剖实践表明, 寄生虫引起了它们不寄生的器官和系统的显著变化, 即变化也发生在腹骨的寄主外: 肺、肾等。这些表现在高嗜酸性粒细胞综合征中最为明显, 因为大量早期和晚期的重复侵犯[3, 4]。后睾吸虫病在分泌组中含有一种蛋白质颗粒, 具有显著的增殖作用, 导致大量增殖基因突变[5, 6]。此前有研究表明, 在实验室动物中, 蛲虫侵袭表达了许多基因: c-Kit、APC、K-ras、B-raf、WE6F、VEGFR等, 这可以通过寄生虫向个体提供营养底物—胆管细胞的反应来解释。根据H.

Leduc (1964) 的规则, 局部肝干细胞 (复制潜能) 被诱导增殖和分化为胆管细胞和肝细胞 (HCD) 的分化; 同时 (实验第15天) 观察到血管新生 (neovascularization) 生成的活跃过程: 由于预先存在的毛细血管的内皮和周细胞的动力学过程血小管生成 (vasculogenesis) (由祖细胞形成血管) 以及血管生成 (angiogenesis) (从血管网中形成血管) 的形成[7]。

在临床上, 对后睾吸虫病的肾脏状况研究还不够。慢性后睾吸虫病患者出现蛋白尿、血尿和圆筒状尿; 许多研究人员将这些表现与后睾吸虫的过敏反应联系在一起[8, 9]。还描述了急性后睾吸虫病中伴有肾病综合征的免疫性肾小球肾炎病例, 其表现为明显的肾病[10, 11]。关于血吸虫病中自身肾干细胞的起始和动力学的形态发生研究尚未开展, 肾脏对后睾吸虫病分泌物起始底物 (颗粒蛋白) 的复制潜能的反应仍不清楚, 这在确定该器官部分切除的修复过程中是重要的。

目的是确定在实验室动物中肾脏在各种形式的蛲虫病中复制潜能的反应。

材料与amp;方法。

试验对象为60只叙利亚金仓鼠 (*Syrian golden hamster*), 体重为 95.0 ± 10.0 g。动物被分为3组:

第I组为对照组—10只;

第II组为实验组—25只仓鼠, 用50只仓鼠被*O. felineus*感染;

第III组—超侵入后辜吸虫病形式的建模；被50只*O. felineus*幼虫感染的动物，14和25天后再被50只囊蚴感染。

采用G. A. Glazkov[12]的分离方法，从一个群落生境的圆腹鲦（*Leuciscus idus*）中分离出囊蚴。所有对动物的操作都是根据《关于人道对待动物的赫尔辛基宣言》和2003年6月19日俄罗斯联邦卫生部第267号关于《批准实验室操作规则》的第267号命令的规定进行的。通过过量麻醉将仓鼠从实验中取出，并将其斩首，实验持续7、15、30天。

标准组织学处理后的肾组织切片根据Van Gieson用苏木精和伊红染色。使用Bond Max自动染色剂（Leica Biosystems, 美国）按照标准方案进行脱蜡、抗原去除和免疫组化反应。使用CD34标记物进行免疫组化研究（Lab Vision corporation, 美国；小鼠单克隆抗体—QBEnd/10, Cell Marque），CD31（Novokastra, 美国；鼠单克隆抗体—JC70 Cell Marque），Oct-4（Lab Vision corporation, 美国；鼠单克隆抗体—MRQ-10, Cell Marque），CD117（Lab Vision corporation, 美国；鼠单克隆抗体—YR145, Cell Marque）和Ki-67（RTU, 美国；鼠单克隆抗体—MIB-1, Agilent/Dako）。采用半定量和定量特征评价免疫组化反应结果：反应的强度从0到3个点（0—没有反应，1—弱反应，2—中等反应，3—明显反应），一个视场中阳性颜色细胞的数目（在视野中；放大400倍）。在10个视场以增加400倍计数了阳性细胞的数量，并计算了算术平均数。使用Axio Lab A1显微镜（Carl Zeiss Microscopy, 德国）对玻璃制备进行了研究，并对定量参数进行了进一步的形态学评估。

在Windows 7.0环境下，在IBMPc/AT Pentium-IV上使用Office Excel 2007应用软件包（Microsoft, 美国），采用变分统计方法对结果进行统计处理。结果以分数（%）、中位数（Me）、下位数（Q25）和上位数（Q75）的形式表示。采用非参数Mann-Whitney方法进行比较。差异有统计学意义 $p < 0.05$ 。

研究结果与讨论

实验组感染后第7天，肉眼及组织学检查肾脏变化最小。形态变化与对照组观察到的形态图基本一致。超侵入后辜吸虫病组间质局灶性水肿，皮质物质轻度淋巴样浸润；肾小球未见明显改变。

第II组和第III组动物实验第15天肾脏显微照片与第I组（对照组）有显著差异：肾单位各部分均有不同程度的形态学改变。肾小球体积增大，毛细血管祥中度受压，部分被膜和毛细血管祥局灶性硬化。在皮质物质中注意到回旋小管的一些上皮细胞的细胞质的空泡化。近端肾小管有玻璃滴状营养不良的征象，局部记录有渐进性坏死的征象。脱皮上皮部分脱皮，软化灶的形成，并可见纤维化和硬化灶。在超侵入后辜吸虫病患者中发现了高达28%的肾小球肥大，而在第II组患者中，这种肾小球的改变是在晚期才观察到的。与此同时，高达10%的肾小球处于伴有肾小球硬化早期征象的协同状态，肾小球硬化伴有肾小球毛细血管淤积。

在第二组肾间质和小管壁中（一次被*O. felineus*感染），观察到CD31标记物的增加，在肾小球装置中观察到CD34标记物的中度表达，这表明这些结构中的干细胞被激活（图1：A, B, C）。

此外，肾小球内毛细血管数量增加（第I组— 31.00 ± 12.74 ）。在第三组（超侵入后辜吸虫病）中，在形成的血管和小管上皮结构中显示了明显的干细胞和祖细胞增殖（表1）。

实验第30天，在曲小管腔内观察到粒状圆柱体。肾小球附近可见淋巴细胞浸润。制剂中可见局灶性间质纤维化，且明显高于实验组。观察到肾小球的分割，同时伴有肾小

体毛细血管数量的增加。它们都很肥大，彼此靠近，与实验第二组相比，部分患者患有严重的硬化症（图1,D）。

在肾单位中，记录到肾小球直径和其面积的增加，与主发感染的血吸虫组相比（图2A）。CD31和Oct-4发现明显表达（图2:B,C），骨盆中多层移行上皮明显增生（图2D）。

在实验中，我们发现肾小管壁的再生潜能高于肾小球，因为在这些结构中，CD34、Oct-4和CD117标记物的表达可以在超侵袭性蛲虫病中观察到的。在增殖活性的研究中，Ki-67标记物在这些结构中的表达高于在肾小球装置中的表达。

对死于超侵入后睾吸虫病的高流行病灶的病人进行病理解剖，发现肾脏是导致死亡的主要原因。例外是严重的全身性炎症（脓毒症）和在弥漫性免疫复合物肾小球肾炎背景下发生的慢性肾脏疾病。可以认为，活跃的血管生成，即CD-34阳性（内皮）细胞，可以使肾小球具有额外的功能结构，并增强器官作为一个整体的代偿能力。需要注意的是，超侵入后睾吸虫病形成了血管新生（neovascularization）。血管新生分为血管生成（*angiogenesis*）（从已有的毛细血管或毛细血管后静脉发展而形成新的血管）和血小管生成（*vasculogenesis*）（由干细胞重新成血管）。后一过程在各个器官中都可以观察到，无论寄生虫的营养生长位置如何[2, 7]。

周细胞在肾脏微循环床的组织中起着重要的作用。它们主动表达血管内皮生长因子（VEGF），所以检测CD31标记物的活性达到3点。这证实了足细胞暴露于*O. felinus*分泌物后，在毛细血管周围形成广泛的网络，积极参与血管生成和血管成熟的过程。一般来说，超侵入后睾吸虫病肾小球内袢数量增加24.3%（ 67.4 ± 3.6 ）。此外，当使用组织化学染料时，证实了肾小球装置周围的中度硬化改变是纤维母细胞分化激活的结果。

结论

因此，我们发现*O.*

*felinus*的分泌物启动了肾小管干细胞和微循环床周细胞的活化。骨盆移行上皮和输尿管起始部分有活跃的增生。此外，在寄生虫分泌物的影响下，肾小球袢中有明显的干细胞增殖，这可以在寄生虫宿主有机体的关键条件下起到保护作用。

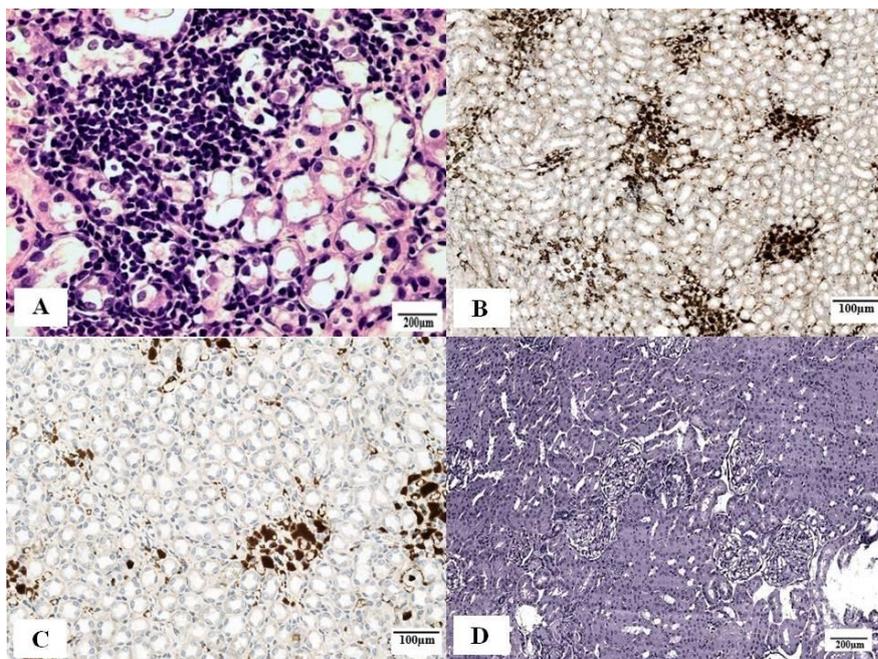


图 1超侵入后睾吸虫病组实验第15天：A—肾小管明显增生。苏木精伊红染色。放大40倍；B—

CD34标记物在肾小管中的膜表达。与CD34免疫组化反应。放大20倍；C—
CD31标记物在肾小球的细胞质表达。与CD31免疫组化反应。放大10倍；D—
中度硬化症肾小球的闭合位置。苏木精伊红染色。放大20倍。

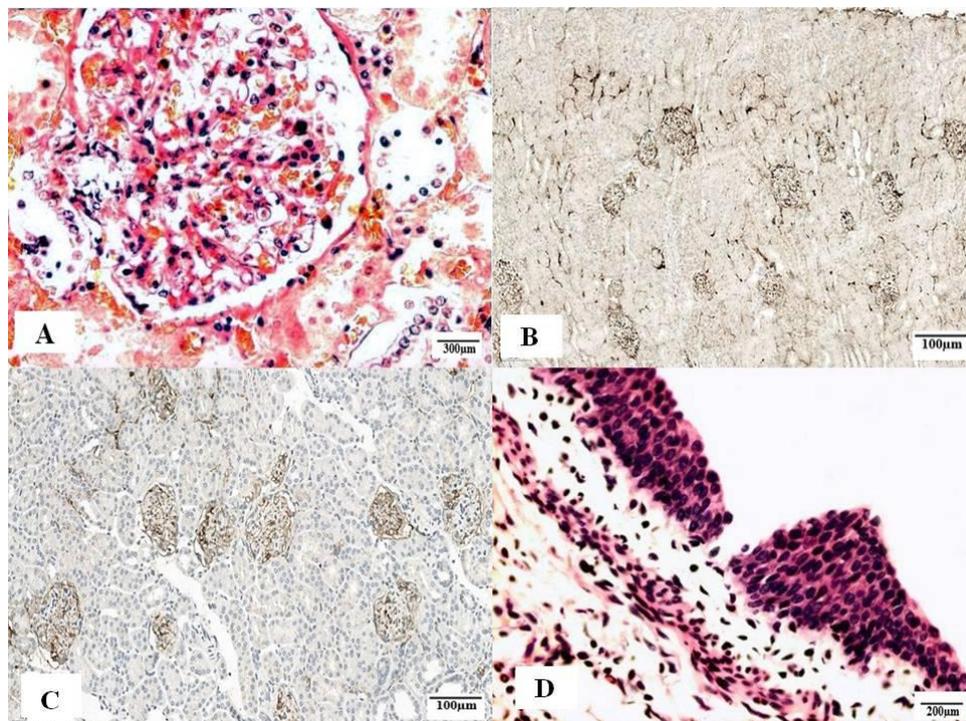


图 2超侵入后辜吸虫病组实验第30天：A—
增加肾小球袢的数量。苏木精伊红染色。放大40倍；B—
CD31标记物在肾小球的膜表达。与CD31免疫组化反应。放大10倍；C—
Oct4标记物在肾小球的核表达。第III组。与Oct4免疫组化反应。放大20倍；D—
骨盆移行上皮的增生。苏木精伊红染色。放大40倍。

表 1观察组实验第15天单克隆抗体表达情况，M e (Q25—Q75)

标志物	基质			实质		
	第I组	第II组	第III组	第I组	第II组	第III组
CD34, c1/mm ²	3,60 ± 1,24 (1,76-4,84)	11,70 ± 2,78** (8,92-14,48)	17,80 ± 5,87** (11,93-23,67)	2,70 ± 1,25 (1,45-3,95)	10,70 ± 0,43** (10,27-11,13)	11,80 ± 0,54* (11,26-12,34)
Oct4, c1/mm ²	4,60 ± 3,85 (0,75-8,45)	12,70 ± 5,41* (7,29-18,11)	39,50 ± 16,19* (23,31-55,69)	0,40 ± 0,20 (0,20-0,60)	1,20 ± 0,09** (1,11-1,29)	1,90 ± 0,95* (0,95-2,85)
CD117, c1/mm ²	1,06 ± 0,78 (0,28-1,84)	7,08 ± 3,48** (3,60-10,56)	19,97 ± 7,93** (12,04-27,90)	1,45 ± 0,68 (0,77-2,13)	2,70 ± 1,10* (1,60-3,80)	3,60 ± 3,50** (0,10-7,10)
CD31, c1/mm ²	2,10 ± 0,74 (1,36-2,84)	8,40 ± 0,68** (7,72-9,08)	14,55 ± 5,65* (8,90-20,20)	4,80 ± 0,80 (4,0-5,6)	8,40 ± 1,08** (7,32-9,48)	10,80 ± 0,45* (10,35-11,25)
Ki-67, %	1,6	3,0**	9,0*	0,8	2,4*	7,6**

注：*—与第I组比较差异有统计学意义，p<0.05，**—
与第I组比较差异有统计学意义，p<0.01。每个标记物在10个视场用x400镜头放大进行分析