

文章编号: 1000-7423(2008)-01-0067-03

【研究简报】

补骨脂与双氢青蒿素合剂治疗小鼠隐孢子虫病的实验研究

陈玉凤¹, 秦元华¹, 郑莉莉¹, 戴晓冬¹, 任一鑫¹, 聂大平², 崔昱^{1*}

【摘要】用补骨脂和双氢青蒿素合剂治疗经地塞米松诱导的隐孢子虫病小鼠, 剂量为补骨脂 3.4 g/kg, 双氢青蒿素 60 mg/(kg·d), 灌胃, 连用 7 d。结果粪检隐孢子虫卵囊数、全血 CD4⁺、CD3⁺T 细胞比例、血清 γ 干扰素 (IFN- γ) 浓度, 以及小肠组织匀浆一氧化氮 (NO) 浓度均高于感染对照组 (P 值均 <0.01)。小肠组织病变程度均轻于感染对照组。表明补骨脂和双氢青蒿素合剂可通过调节血清 IFN- γ 、全血 CD4⁺、CD3⁺T 细胞比例, 以及提高肠组织 NO 浓度, 参与宿主免疫应答和炎症反应过程, 抑杀虫体、治疗小鼠隐孢子虫病。

【关键词】补骨脂; 双氢青蒿素; 隐孢子虫病; γ 干扰素; T 细胞; 一氧化氮

中图分类号: R531.5

文献标识码: B

Experimental Treatment Using Combined *Fructus psoraleae* and Dihydroartemisinin in Mouse Cryptosporidiosis

CHEN Yu-feng¹, QIN Yuan-hua¹, ZHENG Li-li¹, DAI Xiao-dong¹,
REN Yi-xin¹, NIE Da-ping², CUI Yu^{1**}

(1 Department of Parasitology, Dalian Medical University, Dalian 116027, China; 2 Clinical Laboratory, The 2nd Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116023, China)

【Abstract】 A combination of *Fructus psoraleae* (3.4 g/kg) and dihydroartemisinin (60mg/(kg·d)) was used for 7 d in mice infected with *Cryptosporidium parvum* infection induced by oral administration of dexamethasone. The results indicated that number of *Cryptosporidium parvum* oocysts in feces, proportion of CD4⁺, CD3⁺T lymphocytes in blood, serum IFN- γ , and nitric oxide (NO) content in intestinal tissue were all higher than those of infected control group ($P < 0.01$). The pathogenic change in intestine of treated mice was lighter than that of infected control. It indicates that the combination of *Fructus psoraleae* and dihydroartemisinin is effective to mice cryptosporidiosis probably through up-regulating serum IFN- γ , proportion of CD4⁺ and CD3⁺T cells and NO concentration in intestine.

【Key words】 *Fructus psoraleae*; Dihydroartemisinin; *Cryptosporidium parvum*; IFN- γ ; T lymphocyte; Nitric oxide

Supported by a Research Fund, Department of Education of Liaoning Province (No. 2004D103)

* Corresponding author, E-mail: dlciyu@dlmedu.edu.cn

近年来, 关于隐孢子虫病免疫学及药物防治等的研究较少涉及中药对提高宿主免疫力及抑杀隐孢子虫问题。本研究针对隐孢子虫病发病特点, 探讨关于中药补骨脂和青蒿素合剂提高感染隐孢子虫小鼠免疫力及其疗效问题。

1 材料与方法

1.1 动物、主要试剂及仪器 健康雄性昆明小鼠 90 只, 体重 30~35 g, 由大连医科大学实验动物中心提供。醋酸地塞米松片(批号为 06034, 0.75 mg/片, 天津天药业股份有限公司), 补骨脂(市售中草药, 自制水煎剂 20 g/100 ml), 双氢青蒿素片(批号为 050813, 20 mg/片, 北京万辉双鹤药业有限责任公司)。 γ 干

扰素(IFN- γ) (深圳晶美生物工程有限公司北京分公司), CD4⁺T 细胞试剂盒(CD4 FITC/CD3 PE 流式抗体, 美国 Serotec 公司), 一氧化氮(NO)试剂盒(硝酸还原酶法) (南京建成生物工程研究所), 考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒(南京建成生物工程研究所), 超速低温离心机(TGL-16G, 上海), 酶标仪(MULTISCAN ASCENT 354, 芬兰), 分光光度计(721, 上海), 流式细胞仪(BD FAC-SCalibur, 美国)。

1.2 动物模型及分组 造模方法, 在小鼠自由饮用水中加入醋酸地塞米松 (11.25 g/L) 和葡萄糖 (15 g/L), 诱导隐孢子虫病。收集粪便, 离心, 沉淀, 制作涂片, 进行改良抗酸染色^[1], 显微镜观察。第 5 天查见隐孢子虫卵囊, 造模成功。将小鼠随机分为 3 组: ① 正常对照组 10 只, 饲以普通自来水; ② 感染对照组 40 只, 饲以含有地塞米松的自来水, 造模成功后即处死, 测定各项指标; ③ 治疗组 40 只, 饲以含有地塞米松的自来水。造模成功后灌胃补骨脂与双氢青蒿素合剂(补骨脂 3.4 g/kg+双氢青

基金项目: 辽宁省教育厅科学研究计划资助项目(No. 2004D103)

作者单位: 1 大连医科大学寄生虫学教研室, 大连, 116044;

2 大连医科大学附属二院检验科, 大连, 116023

* 通讯作者, E-mail: dlciyu@dlmedu.edu.cn

蒿素 60 mg/(kg·d), 连续 7 d), 治疗结束后处死, 测定各项指标。

1.3 观察指标 包括淋巴细胞亚群(CD4⁺、CD3⁺T 淋巴细胞)比例, IFN- γ 浓度, 隐孢子虫卵囊计数及小肠组织匀浆 NO 浓度。感染对照组于造模结束后摘眼球取血。治疗结束, 正常对照组和治疗组摘眼球取血。用流式细胞仪测定全血淋巴细胞亚群, 用酶标仪采用 ELISA 法测定血清中 IFN- γ 浓度。处死小鼠前取粪便, 涂片, 染色, 镜检卵囊。按公式计算卵囊减少率(%)。

$$\text{卵囊减少率}(\%) = \frac{\text{感染对照组卵囊数} - \text{治疗组卵囊数}}{\text{感染对照组卵囊数}} \times 100\%$$

取小肠组织, 用 4℃生理盐水制备 20%匀浆(取 0.5 g 小肠组织加 2.5 ml 生理盐水), 用分光光度计按硝酸还原酶法测定吸光度(A₅₅₀值), 计算 NO 含量。所有测定参照试剂盒说明书进行。取回肠末端 1 cm, 制作组织切片, 苏木素-伊红(HE)染色, 镜检。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 14.0 统计软件进行数据分析。结果以($\bar{x} \pm s$)表示, 各组间进行单因素方差分析, 用 P 表示。

2 结果

2.1 一般状况 正常对照组小鼠毛色光泽较好, 进食、饮水情况稳定, 大便正常。感染对照组小鼠毛色光泽较差, 进食饮水减少。4~5 d 后, 出现腹泻及少量便血等症状。治疗组小鼠毛色、进食及饮水情况均好转, 腹泻陆续停止。

2.2 粪便隐孢子虫卵囊检测 感染对照组查见隐孢子虫卵囊(图 1), 每高倍视野平均虫荷为 (5.7±1.4)只。治疗组给药 7 d 后每高倍视野平均虫荷约为 (2.4±0.5) 只, 与感染对照组比较, 卵囊减少率约为 57.9%(表 1)。

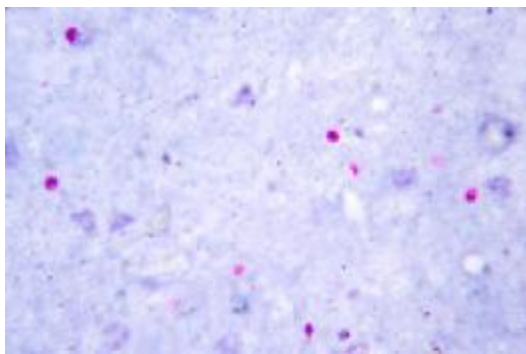


图 1 隐孢子虫卵囊 (×1 000)

表 1 补骨脂与双氢青蒿素合剂治疗隐孢子虫病小鼠效果观察

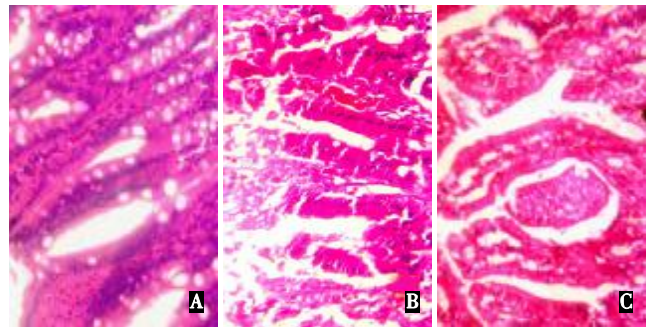
组别	IFN- γ 水平 (pg/ml)	CD4 ⁺ T 细胞比例 (%)	CD3 ⁺ T 细胞比例 (%)	小肠组织匀浆 NO 浓度 ($\mu\text{mol/gpr}$)	粪检卵囊计数 (个/HP)
正常对照组	28.32±5.46	47.67±7.21	60.04±8.79	2.21±0.74	0
感染对照组	22.81±1.25**	24.44±5.59*	37.42±9.80*	3.95±0.61**	5.7±1.4
治疗组	30.95±1.87 Δ	38.36±6.05** Δ	65.94±15.36 Δ	6.42±0.59 Δ	2.4±0.5

注: 与正常对照组比较, * P<0.01, ** P<0.05;

Δ 与感染对照组比较, P<0.01。

2.3 淋巴细胞亚群、IFN- γ 及肠组织 NO 检测 感染对照组 CD4⁺与 CD3⁺T 淋巴细胞比例, 血清 IFN- γ 浓度与正常对照组差异均具有统计学意义(P 值均<0.01)。治疗组与感染对照组比较, 上述指标均明显回升(P 值均<0.01)。感染对照组肠组织 NO 水平明显高于正常对照组(P<0.05)。治疗组 NO 水平明显高于感染对照组及正常对照组(P<0.01) (表 1)。

2.4 组织病理学观察 健康组小鼠, 回肠绒毛结构正常, 上皮细胞完好, 无明显淋巴细胞浸润及红细胞渗出(图 2A)。感染对照组回肠组织病理损害严重, 大量的上皮细胞坏死, 部分区域小肠绒毛正常结构消失(图 2B), 伴淋巴细胞浸润及红细胞渗出。治疗组部分肠黏膜上皮细胞轻微水肿, 绒毛结构逐渐修复(图 2C)。



A 正常对照组, B: 感染对照组, C: 治疗组。

图 2 隐孢子虫病小鼠回肠组织病理学观察 (×400)

3 讨论

隐孢子虫病是一种机会致病性寄生虫病, 虫体寄生在小肠上皮细胞, 可使小肠绒毛萎缩, 导致宿主吸收不良、电解质失调及腹泻等严重病症, 迄今仍无特效药物。刘锦华等^[2]用中药大蒜素治疗隐孢子虫病, 疗效不理想。

补骨脂是豆科植物补骨脂的干燥成熟果实, 具有温肾助阳、纳气、止泻等功效^[3], 是临床常用药。姜宪辉等^[4, 5]认为补骨脂可提高小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能, 以及机体非特异性免疫力及应激态小鼠体液免疫。崔昱等^[6, 7]用补骨脂与鸦胆子合剂治疗大鼠卡氏肺孢子虫肺炎, 结果表明补骨脂可明显提高宿主免疫力, 有较强的抵抗氧自由基作用。青蒿素为菊科黄花蒿植物的提取物, 能杀灭疟原虫, 治疗疟疾, 还可治疗弓形虫病、血吸虫病、卡氏肺孢子虫肺炎等^[8-11]。双氢青蒿素能调节机体免疫功能^[12]。

文献报道, 隐孢子虫侵入宿主小肠上皮细胞后可不断增殖, 分泌磷脂酶及蛋白酶等引起宿主肠黏膜损坏而发病^[13]。病情发展变化与虫体寄居密切相关, 与宿主免疫功能被破坏或被抑制有关, 尤其与 CD4⁺T 细胞比例、IFN- γ 细胞免疫功能降低关系密切^[14]。张剑勇等^[15]报道青蒿琥酯可提高 CD4⁺与 CD3⁺T 细胞比例。IFN- γ 是具有免疫调节功能的重要细胞因子, 可活化巨噬细胞参与宿主炎症反应过程^[16]。IFN- γ 主要是由 CD4⁺T 细胞和 NK 细胞产生, CD4⁺T 细胞比例升高, IFN- γ 也升高。活化的巨噬细胞可高水平表达诱导型一氧化氮合酶(iNOS), 酶促 L-精氨酸氧化反应生成大量 NO^[17], NO 与超氧阴离子(O₂⁻) 反应生成氧化能力极强的自由基—过氧化氮(NO₂⁻), 使蛋白质和 DNA 等变性, 对细胞内寄生的病原体产生明显的杀伤作用^[18]。NO 由多

种细胞产生,是参与血管活性调节的重要因子,可使血管舒张,局部微血管通透性增加,参与炎症及损伤修复过程。

本研究结果与上述文献报道基本相符。感染对照组小鼠感染隐孢子虫 5~7 d 后,粪便检出大量隐孢子虫卵囊,肠黏膜上皮细胞出现片状炎症坏死区,局部病变处发生炎性细胞浸润,绒毛水肿、结构破坏或萎缩消失等病理改变。治疗组,隐孢子虫卵囊逐渐减少到消失,肠黏膜组织炎症减轻,肠绒毛结构修复。感染对照组全血 CD4⁺与 CD3⁺T 淋巴细胞比例和血清 IFN- γ 浓度明显降低。治疗组小鼠体质明显好转,粪检卵囊数量明显减少,血清 IFN- γ 水平,全血 CD4⁺与 CD3⁺T 淋巴细胞比例明显升高,表明补骨脂和双氢青蒿素合剂可提高隐孢子虫病小鼠免疫功能,尤其是通过提高 CD4⁺T 细胞水平,刺激 IFN- γ 增多,以有效参与机体免疫防御反应,抑杀虫体,修复炎症。感染对照组 NO 浓度升高,而治疗组更高,表明由于隐孢子虫感染的刺激,引发 NO 参与小鼠炎症反应,经补骨脂和双氢青蒿素合剂治疗后更有效地激发产生大量的 NO,以清除病原体,修复肠黏膜损伤。本研究治疗组肠黏膜细胞水肿消失,上皮细胞表面绒毛结构恢复,病变减轻,结果与文献报道一致。

综上所述,补骨脂和双氢青蒿素合剂能抑杀隐孢子虫,并通过调节血清 IFN- γ 浓度、全血 CD4⁺与 CD3⁺T 细胞比例,以及提高肠组织 NO 浓度,参与宿主免疫应答和炎症反应过程,最终修复炎症反应。其抑杀虫体和参与免疫防御反应的机制,有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Henriksen SA, Pohlenz JF. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique[J]. Acta Vet Scand, 1981, 22(3-4): 594-596.
- [2] Liu JH, Chen XC, Zhou SC. Effect of allitridin on macrophage function in mice [J]. J Shandong University (Health Sciences), 2002, 40: 286. (in Chinese)
(刘锦华, 陈秀春, 周世昌. 大蒜素对小鼠巨噬细胞功能的影响[J]. 山东大学学报(医学版), 2002, 40: 286.)
- [3] Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia, The First Part[M]. Beijing: Chemical Industry Publishing House, 2005. 129. (in Chinese)
(国家药典委员会. 中国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.129.)
- [4] Jiang XH, Zhang J, Liu H. Study on the humoral immunity of mice in excited state influenced by *Psoralea corylifolia* [J]. J Liaoning Coll Tradit Chin Med, 2004, 6: 116-117. (in Chinese)
(姜宪辉, 张健, 刘辉. 补骨脂对激发态小鼠的体液免疫影响的实验研究[J]. 辽宁中医学院学报, 2004, 6: 116-117.)
- [5] Wang SL, Li SL, Dong CT. Experimental study on the effect of *Fructus lycii* and 7 other Chinese medicines on *in vitro* cultured cells and macrophages in abdominal cavity of mice [J]. J Jilin Univer Med Edit, 1990, 16: 325. (in Chinese)
(王淑兰, 李淑莲, 董崇田. 枸杞子等八位中药提取液对体外培养细胞和小鼠腹腔巨噬细胞影响的实验研究[J]. 吉林大学学报(医学版), 1990, 16: 325.)
- [6] Qin YH, Cui Y, Ren YX, et al. Immunological regulation and treatment of *Brucea javanica* and *Fructus psoraleae* on rats with *Pneumocystis carinii* pneumonia [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2006, 24: 59-62. (in Chinese)
(秦元华, 崔昱, 任一鑫, 等. 中药鸦胆子与补骨脂素对卡氏肺孢子虫病大鼠免疫调节的影响 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2006, 24: 59-62.)
- [7] Cui Y, Qin YH, Chen H. Relationship between oxidizing damage and pathogenesis of mice with *Pneumocystis carinii* pneumonia[J]. Chin Pub Hlth, 2005, 21: 56-58. (in Chinese)
(崔昱, 秦元华, 陈红. 卡氏肺孢子虫病鼠发病与氧自由基的关系 [J]. 中国公共卫生, 2005, 21: 56-58.)
- [8] Ru WW, Liang YS. Progress of research on artemisinin against parasitic diseases[J]. Chin J Schisto Control, 2006, 18: 78-80. (in Chinese)
(茹炜炜, 梁幼生. 青蒿素类药物抗寄生虫作用研究进展[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2006, 18: 78-80.)
- [9] Yan L, Qin ZQ, Gan SB, et al. Further evaluation on the effect of dihydroartemisinin on the treatment of acute toxoplasma infection in mice[J]. Acta Parasitol Med Entomol Sinica, 2000, 7: 70-75. (in Chinese)
(严笠, 齐志群, 甘绍伯, 等. 双氢青蒿素治疗急性弓形虫感染小鼠疗效的进一步观察[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2000, 7: 70-75.)
- [10] Shen GJ. The effect of artemisinin and its derivatives against schistosome[J]. Chin J Parasit Dis Control, 1997, 10: 145-147. (in Chinese)
(沈光金. 青蒿素及其衍生物的抗血吸虫作用[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1997, 10: 145-147.)
- [11] Ye B, Chen YT, Liu CW. The therapeutic effect of dihydroartemisinin and sodium artesunate on *Pneumocystis carinii* pneumonia in rats[J]. Chin J Zoonoses, 2001, 17(4): 43-45, 48. (in Chinese)
(叶彬, 陈雅棠, 刘成伟. 双氢青蒿素、青蒿琥酯治疗大鼠肺孢子虫肺炎的疗效研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 2001, 17(4): 43-45, 48.)
- [12] Yi JF, Wang Y, Lin SQ. General introduction of immune regulation effect of artemisinin and its derivatives [J]. J Jiangxi Tradit Chin Med Univer, 2006, 18: 69-71. (in Chinese)
(易剑峰, 王钰, 林色奇. 青蒿素及其衍生物免疫调节研究概况[J]. 江西中医学院学报, 2006, 18: 69-71.)
- [13] Pan WQ, Tang LH. Molecular Parasitology[M]. Shanghai Science and Technology Publishing House, 2004. 176-197. (in Chinese)
(潘卫庆, 汤林华. 分子寄生虫学[M]. 上海科学技术出版社, 2004. 176-197.)
- [14] Song E, Ouyang N, Hörbelt M, et al. Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts[J]. Cell Immunol, 2000, 204: 19-28.
- [15] Zhang JY, Zhong JX, Shi ZY, et al. Effect of lingdan pian and artesunate on T lymphocyte subset of SLE patients[J]. Chin J Integr Tradit Western Med, 2002, 22: 489. (in Chinese)
(张剑勇, 钟嘉熙, 史志云, 等. 苓丹片与青蒿琥酯对系统性红斑狼疮患者 T 细胞亚群的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22: 489.)
- [16] Chen S, Lu HM, Gao Q, et al. A role of NO in IL-12-induced immune protection against blood-stage *Plasmodium berghei* infection[J]. Chin J Parasit Dis Control, 2004, 17: 151-154. (in Chinese)
(陈姝, 陆惠民, 高琪, 等. NO 在 IL-12 诱导抗伯氏疟原虫感染免疫效应中的作用[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2004, 17: 151-154.)
- [17] Zhou T, Wu XT, Luo T, et al. Recombinant human growth hormone down-regulates the NO level and the expression of iNOS mRNA in celiac macrophage of SD rats challenged with lipopolysaccharide[J]. West Chin Med J, 2006, 21: 535-537. (in Chinese)
(周彤, 伍晓汀, 罗婷, 等. 生长激素对脂多糖刺激大鼠腹腔巨噬细胞 NO 产生及 iNOS mRNA 表达的影响及意义 [J]. 华西医学, 2006, 21: 535-537.)
- [18] Green SJ, Scheller LF, Marletta MA, et al. Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens[J]. Immunol Lett, 1994, 43(1-2): 87-94.

(收稿日期: 2007-08-13 编辑: 富秀兰)