

不同药物对小鼠肝细粒棘球蚴术后感染的抑制作用

彭心宇, 吕海龙, 张示杰, 阿杜瓦一, 杨宏强, 孙红, 杨军, 李炳军, 刘远坤

彭心宇, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝脏外科中心 湖北省武汉市 430030

彭心宇, 吕海龙, 张示杰, 阿杜瓦一, 杨宏强, 孙红, 杨军, 李炳军, 刘远坤, 石河子大学医学院第一附属医院普外科 新疆维吾尔自治区石河子市 832008

彭心宇, 1989年武汉同济医科大学硕士, 主任医师, 教授, 主要从事肝脏外科研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30760244

通讯作者: 彭心宇, 832008, 新疆维吾尔自治区石河子市, 石河子大学医学院第一附属医院普外科. pengxy2000@yahoo.com

电话: 0993-28589449

收稿日期: 2008-02-19 修回日期: 2008-04-18

接受日期: 2008-04-28 在线出版日期: 2008-09-08

Inhibitory effects of different drugs on the post-operative infection of hepatic echinococcus granulosus in mice

Xin-Yu Peng, Hai-Long Lv, Shi-Jie Zhang, Du-Wayi A, Hong-Qiang Yang, Hong Sun, Jun Yang, Bing-Jun Li, Yuan-Kun Liu

Xin-Yu Peng, Center of Liver Surgery, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Xin-Yu Peng, Hai-Long Lv, Shi-Jie Zhang, Du-Wayi A, Hong-Qiang Yang, Hong Sun, Jun Yang, Bing-Jun Li, Yuan-Kun Liu, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Medical College of Shihezi University, Shihezi 832008, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30760244

Correspondence to: Xin-Yu Peng, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Medical College of Shihezi University, Shihezi 832008, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. pengxy2000@yahoo.com

Received: 2008-02-19 Revised: 2008-04-18

Accepted: 2008-04-28 Published online: 2008-09-08

Abstract

AIM: To explore the inhibition of different drugs on the hepatic echinococcus granulosus infection in mice, and to investigate the influence on the infection after enhancing the host immune function.

METHODS: After immunization with echinococcus granulosus cyst fluid for 3 wk, mice with positive IgG seroresponses were divided into drug-treated group and model control group.

One week before infection and one month after infection with prostoscolex, the mice in the former were treated with single liposomal albendazole (L-Alb), single huaier extract, and huaier extract with L-Alb, respectively. The prostoscolex was dealt with 750 mL/L alcohol, 200 g/L hypertonic saline, L-Alb and balanced solution when the mice were inoculated. After infection for 90 d, the pathological changes, spleen index, the levels of IgG and IgE in peripheral blood were observed; meanwhile, the levels of CD4⁺ and CD8⁺ cells were determined by flow cytometry.

RESULTS: Pathological examination showed that the germinal layer and corneous layer of echinococcus granulosus were severely damaged in the mice with combined treatment. There were significant differences in the spleen index and the levels of serum IgE between the drug-treated groups and the model control group (3.84 ± 0.86 , 3.95 ± 1.01 , 3.27 ± 0.52 vs 5.46 ± 0.52 ; 0.06 ± 0.08 $\mu\text{g/L}$, 0.07 ± 0.08 $\mu\text{g/L}$, 0.03 ± 0.03 $\mu\text{g/L}$ vs 0.20 ± 0.02 $\mu\text{g/L}$; all $P < 0.01$); the difference was the most significant between the combined treatment group and the model control group. The level of IgG had no marked difference between the drug-treated groups and the model control group. The level of CD8⁺ cells was significantly lower (16.60 ± 3.89 , 18.18 ± 3.90 , 15.38 ± 2.63 vs 32.90 ± 4.71 ; all $P < 0.01$), but the level of CD4⁺/CD8⁺ cells was higher (3.21 ± 0.70 , 3.05 ± 0.66 , 3.53 ± 0.57 vs 1.57 ± 0.26 ; all $P < 0.01$) in the drug-treated groups than that in the model control group; the most significant change was observed in the mice with combined treatment.

CONCLUSION: L-Alb combined with huaier extract may obviously enhance immune function, inhibit the growth of echinococcus granulosus, and reduce the post-operative infection of echinococcus granulosus in mice.

Key Words: Hepatic echinococcus granulosus; Post-operative infection; Liposomal albendazole; Huaier extract

Peng XY, Lv HL, Zhang SJ, A DWy, Yang HQ, Sun H, Yang J, Li BJ, Liu YK. Inhibitory effects of different drugs

■背景资料

肝细粒棘球蚴病是一种在我国西北部牧区广泛流行的人畜共患寄生虫病。由于目前尚无特效药物。外科治疗仍为首选。彭心宇在外科实践中发现肝包虫周围纤维性囊壁的病理组织结构与传统理论不符。外囊可分为内层和外层。两层之间有可分离间隙存在,沿此间隙可完整摘除包虫。首创了“闭合式肝包虫外膜内完整摘除术”,并根据手术操作的差异衍生出“开放式肝包虫外膜内完整摘除术”、“开放式肝包虫外膜内部分摘除术”,尽可能作到完整摘除,尽可能减少外囊在肝内的残留,达到降低复发、减少残腔并发症,提高术后生命质量的目的。

■同行评议者

王怡, 主任医师, 天津市传染病医院天津市肝病研究所肝病一科

■ 研发前沿

由于细粒棘球蚴抗原成分较多,且在生活史的不同阶段表达特定的抗原,产生不同的特异性免疫应答,因此免疫应答机制较为复杂,宿主体内包虫囊的形成有赖于宿主免疫应答。

on the post-operative infection of hepatic echinococcus granulosus in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(25): 2797-2803

摘要

目的: 探讨不同药物对小鼠肝细粒棘球蚴感染的抑制作用,了解增强宿主免疫功能对小鼠肝细粒棘球蚴感染的影响。

方法: 取包虫囊液成功免疫小鼠,分为药物治疗组和模型对照组。肝脏接种原头蚴前1 wk及接种后1 mo,药物治疗组分别用阿苯达唑脂质体、槐耳浸膏及阿苯达唑脂质体联合槐耳浸膏治疗,接种头节时各药物治疗组再分为4组,每组头节分别使用750 mL/L乙醇、200 g/L高渗盐水、阿苯达唑脂质体及平衡液处理后接种,模型对照组头节用平衡液处理后直接接种,接种后3 mo观察小鼠肝细粒棘球蚴大体和病理变化,检测小鼠脾脏指数、外周血IgG和IgE水平,并用流式细胞仪检测小鼠外周血CD4⁺和CD8⁺淋巴细胞的百分率。

结果: 联合治疗组中小鼠肝细粒棘球蚴生发层和角质层破坏较严重。各药物治疗组小鼠脾脏指数、IgE水平明显低于模型对照组(3.84 ± 0.86, 3.95 ± 1.01, 3.27 ± 0.52 vs 5.46 ± 0.52; 0.06 ± 0.08 μg/L, 0.07 ± 0.08 μg/L, 0.03 ± 0.03 μg/L vs 0.20 ± 0.02 μg/L, 均P < 0.01), 其中联合药物治疗组降低最为明显; 药物治疗组IgG水平与模型对照组相比无显著性差异。药物治疗组CD8⁺水平明显低于模型对照组(16.60 ± 3.89, 18.18 ± 3.90, 15.38 ± 2.63 vs 32.90 ± 4.71, 均P < 0.01), CD4⁺/CD8⁺明显高于模型对照组(3.21 ± 0.70, 3.05 ± 0.66, 3.53 ± 0.57 vs 1.57 ± 0.26, 均P < 0.01), 其中联合治疗组变化最为明显。

结论: 阿苯达唑脂质体与槐耳浸膏联合用药可以明显增强小鼠免疫功能,抑制细粒棘球蚴的生长,使小鼠肝细粒棘球蚴病术后感染率降低。

关键词: 肝细粒棘球蚴; 术后感染; 阿苯达唑脂质体; 槐耳浸膏

彭心宇, 吕海龙, 张示杰, 阿杜瓦一, 杨宏强, 孙红, 杨军, 李炳军, 刘远坤. 不同药物对小鼠肝细粒棘球蚴术后感染的抑制作用. *世界华人消化杂志* 2008; 16(25): 2797-2803
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2797.asp>

0 引言

肝细粒棘球蚴病又称囊型肝包虫病,是畜牧地

区常见的地方性疾病,目前尚无有效药物治疗,确诊后需手术治疗^[1]。在细粒棘球蚴感染高发区,人和羊对其感染均具有一定的抵抗力^[2],包虫幼虫侵入宿主组织后生长缓慢,往往数年后才出现症状,但是小儿感染包虫囊肿生长较快,多发,免疫血清测定的阳性率较成人低^[3]。宿主在感染细粒棘球蚴3-5 d即可出现巨噬细胞和中性粒细胞的浸润,随后主要是嗜酸性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞水平升高;在人工动物感染包虫实验中,宿主各抗体水平升高,仅有不到5%的虫卵可逐渐在宿主体内存活并形成包囊^[4],国外也有学者报道了包虫患者自愈的病例^[5]。由此可见,细粒棘球蚴在体内感染与宿主的免疫能力相关,宿主体内包虫囊的形成有赖于宿主免疫应答。

彭心宇1999年发现,在肝包虫外囊与邻近肝脏组织之间存在一层纤维膜,沿此间隙即可完整剥离包虫外囊,从根本上解决了包虫复发和残腔并发症^[6]。当包虫体积较大或临近重要管道时,术中需选择开放式肝包虫外膜内外囊完整或部分摘除术,如果溢出或残留原头节,则会增加术后复发的风险。包虫外囊屏障在包虫免疫逃避中起着重要作用^[7],肝包虫外膜内外囊完整摘除术后复发率降低,可能与外囊切除后,残留的头节直接暴露肝脏创面,宿主通过免疫应答杀灭寄生虫有关。如果我们在术前及术后加强宿主免疫功能,抑制原头蚴的生长,可能会进一步降低手术后复发率。因此,我们采用动物模型,模拟开放式肝包虫外膜内外囊完整摘除术的手术处理过程,先对小鼠进行抗原免疫产生抗体,然后在小鼠肝脏直接接种细粒棘球蚴,接种时头节分别使用不同药物处理,术前及术后运用不同药物进行治疗,了解提高宿主免疫功能对肝包虫外膜内外囊完整摘除术后复发的影响,为临床治疗肝包虫术后复发提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 从自然感染的绵羊肝棘球蚴囊中,无菌抽取含原头节的囊液,离心后弃上清,沉淀的原头节用0.15 mol/L的灭菌磷酸缓冲液(PBS, pH7.2)清洗3遍。取0.1 mL在显微镜下观察原头节活动情况并计数,用染料排斥实验检查原头节活力在85%以上,制成每毫升含有20 000个原头节的混悬液,即可作动物体内接种。♀昆明种小鼠200只,体质量18-20 g,购自石河子大学医学院实验动物中心。阿苯达唑脂质体10 g/L,购自新疆医科

表 1 不同药物治疗小鼠感染细粒棘球蚴后脾脏指数、IgG及IgE变化 (mean ± SD)

分组	n	脾脏指数	IgG(g/L)	IgE(μg/L)
阿苯达唑组	35	3.84 ± 0.86 ^b	2.43 ± 0.10	0.06 ± 0.08 ^b
槐耳浸膏组	33	3.95 ± 1.01 ^b	2.44 ± 0.12	0.07 ± 0.08 ^b
联合治疗组	35	3.27 ± 0.52 ^b	2.42 ± 0.11	0.03 ± 0.03 ^b
模型对照组	8	5.46 ± 0.52	2.52 ± 0.19	0.20 ± 0.02
空白对照组	8	3.34 ± 0.26	2.25 ± 0.07	0.02 ± 0.07

^bP<0.01 vs 模型对照组.

大学; 槐耳清膏呈褐色糊状, 溶于水, 由南京中医药大学药用菌研究室提供, 每毫升含槐耳菌质0.8 g 提取清膏.

1.2 方法 取我院已制备好的人肝包虫囊液抗原, 小鼠ip免疫原制剂3次, 每次注射0.1 mL, 2 wk后重复ip免疫原制剂. 末次注射1 wk后取鼠血做ELISA, 检测小鼠IgG抗体, 模拟人感染肝包虫体内产生抗体. 外周血IgG抗体为阳性小鼠, 分为药物治疗组(3组, 每组40只)和模型对照组(1组, 10只), 药物治疗组分别用阿苯达唑脂质体75 mg/kg(10 g/L, 稀释成5 g/L, 按20 g小鼠1次用量1.5 mg配制, 每次0.3 mL), 免疫增强剂槐耳浸膏0.4 mL, 槐耳浸膏0.4 mL联合阿苯达唑脂质体75 mg/kg, 灌胃口服治疗, 用药3次/wk. 另设1组(8只)正常小鼠空白对照.

治疗1 wk后, 各药物治疗组再分为4组(每组10只), 进行肝脏注射接种原头节0.3 mL, 模拟术中原头节脱落或残留, 各组原头节分别用750 mL/L乙醇、200 g/L高渗盐水、阿苯达唑脂质体和平衡液进行处理20 min后接种. 然后继续用上述3种药物治疗1 mo, 模型对照组(10只)灌服同体积蒸馏水, 模型对照组头节行平衡液处理后直接接种. 接种3 mo后解剖. 空白对照组不作任何处理. 随机抽取各组棘球蚴囊, 用50 g/L甲醛溶液固定, 石蜡包埋, HE染色及切片, 观察棘球蚴囊壁组织病理形态改变. 小鼠治疗3 mo后, 取脾脏称重并计算脾脏指数. 脾脏指数的计算: 脾脏指数 = 脾脏质量(g)/体质量(g) × 1000. 摘眼球取血, 离心取血清, 应用免疫比浊法测IgG的含量, 酶联免疫吸附试验测定血清中IgE的含量. 另取小鼠血液100 μL, 分别加入抗小鼠PE-CD4, PE-CD8, FCM检测T淋巴细胞亚群的比例.

统计学处理 应用SPSS13.0 for Windows统计软件, 对实验数据进行方差分析.

2 结果

2.1 肝棘球蚴大体观察 阿苯达唑脂质体、槐耳

■创新亮点

本研究采用动物模型, 模拟开放式肝包虫外膜内外囊完整摘除术的手术处理过程, 在小鼠肝脏直接接种细粒棘球蚴, 接种时头节分别使用不同药物处理, 术前及术后运用不同药物进行治疗, 了解提高宿主免疫功能对小鼠肝细粒棘球蚴感染的影响.

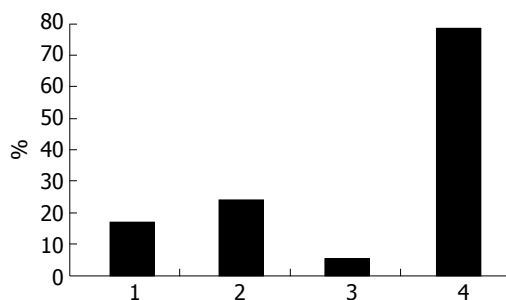


图 1 不同药物治疗后小鼠肝脏细粒棘球蚴感染率. 1: L-ABZ组; 2: 槐耳浸膏组; 3: 联合用药组; 4: 模型组.

浸膏、及联合用药组小鼠肝细粒棘球蚴复发率分别是17.1%、24.2%和5.7%(图1). 阿苯达唑治疗组棘球蚴的生长为单发, 体积较小, 色泽浑浊, 多数呈半透明状或结节状(图2A); 槐耳浸膏治疗组棘球蚴的生长为单发或多发, 可见多个相互融合, 体积相对较大, 包囊光滑透明, 部分呈结节状(图2B); 联合治疗组中, 感染棘球蚴均为单发, 色泽发白, 体积较小, 呈结节状(图2C), 对照组棘球蚴生长相对良好, 包囊光滑透明, 体积较大, 数量单发或多发, 个别包囊组织浑浊灰暗(图2D).

2.2 病理观察 在3个治疗组中, 小鼠肝细粒棘球蚴囊均受到不同程度的损害, 阿苯达唑脂质体组中囊壁生发层和角质层出现断裂、脱落甚至缺损, 角质层变薄, 结构模糊甚至消失, 大量空泡形成, 生发层细胞肿胀且数量减少, 部分出现细胞变性(图3A). 槐耳浸膏组中囊壁角质层结构均匀、清晰, 呈板层状排列, 部分结构模糊空泡形成, 生发层细胞可见(图3B). 联合治疗组棘球蚴的病理组织学变化相对较严重, 角质层变薄, 出现断裂、缺损, 结构模糊消失, 囊壁与周围肝组织分离, 生发层细胞肿胀, 消失, 结构断裂, 卷曲, 残存细胞发生变性, 还有的囊内内囊塌陷, 卷曲, 在囊泡内可见急性出血现象(图3C). 光镜下可见模型对照组肝棘球蚴组织基本正常, 多数囊生发层和角质层生长良好, 生发层细胞清

应用要点

棘球蚴的免疫逃逸作用是引起肝包虫病后复发的主要原因,因此在棘球蚴形成之前进行有效地药物干预,恢复和增加宿主的免疫功能,对于残留原头蚴的生长可能会起到一定的抑制作用,以减少术后的复发。

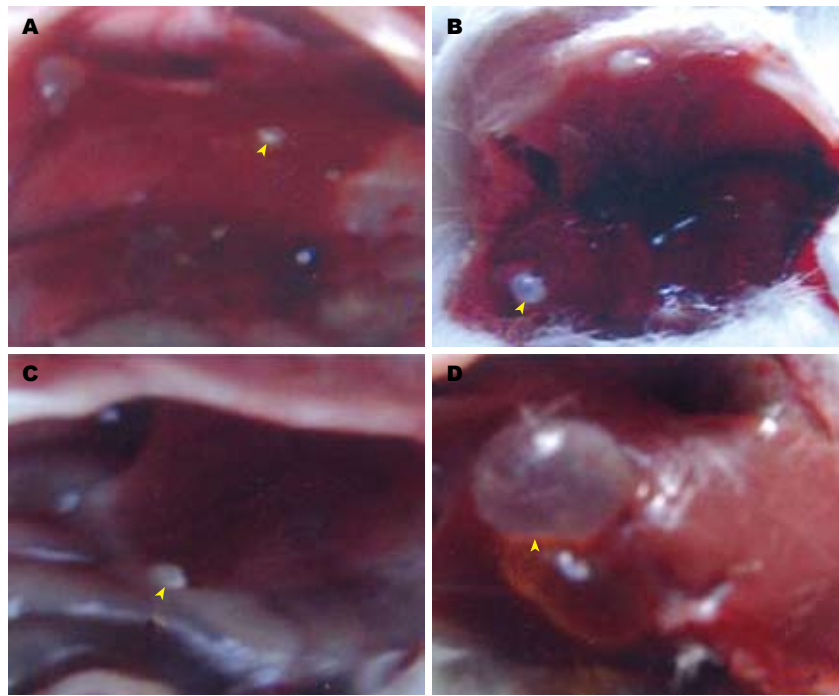


图 2 棘球蚴肉眼观。A: 阿苯达唑组; B: 槐耳浸膏组; C: 联合治疗组; D: 模型组。

表 2 不同药物治疗小鼠感染细粒棘球蚴后T淋巴细胞亚群检测 (mean ± SD)

分组	n	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
阿苯达唑组	35	67.98 ± 9.05	50.85 ± 7.87	16.60 ± 3.89 ^b	3.21 ± 0.70 ^b
槐耳浸膏组	33	71.60 ± 8.34	53.18 ± 6.14	18.18 ± 3.90 ^b	3.05 ± 0.66 ^b
联合治疗组	35	70.62 ± 7.88	54.22 ± 6.33	15.38 ± 2.63 ^b	3.53 ± 0.57 ^b
模型对照组	8	86.33 ± 7.30	50.92 ± 4.90	32.90 ± 4.71	1.57 ± 0.26
空白对照组	8	61.09 ± 8.22	45.59 ± 7.03	14.73 ± 2.15	3.16 ± 0.60

^b $P < 0.01$ vs 模型对照组。

晰可见,角质层板层结构均匀(图3D)。

2.3 脾脏指数、IgG和IgE水平 IgG阳性抗体组小鼠与空白对照组比较,脾脏指数、IgG和IgE水平值均有意义($P < 0.05$)。各药物组治疗后小鼠脾脏指数、IgE水平明显低于模型对照组($P < 0.01$, 表1),但联合治疗组降低最为明显,IgG水平经药物治疗后与模型对照组变化不大($P > 0.05$)。在药物治疗组中,进行两因素 2×2 析因分析结果,两种药物阿苯达唑脂质体和槐耳浸膏,在降低脾脏指数和IgE水平上具有明显交互作用($P < 0.05$, 图4A)。

2.4 T淋巴细胞亚群分类 IgG阳性抗体组小鼠与空白对照组比较,T淋巴细胞亚群和CD4⁺/CD8⁺水平值均有意义($P < 0.05$)。各组小鼠T细胞CD4⁺值在各用药组变化不大($P > 0.05$, 表2),药物治疗组CD8⁺水平明显低于模型对照组($P < 0.01$, 表2),CD4⁺/CD8⁺明显高于模型对照组($P < 0.01$, 表2);在阿苯达唑脂质体和槐耳浸膏药物治

疗组中,CD4⁺、CD8⁺和CD4⁺/CD8⁺水平变化不大($P > 0.05$);但联合治疗组中CD8⁺降低、CD4⁺/CD8⁺水平升高变化最为明显。在对药物治疗组中进行两种药物完全随机两因素 2×2 析因分析,结果显示两种药物在降低CD8⁺水平和提高CD4⁺/CD8⁺水平上同样具有明显交互作用($P < 0.05$, 图4B)。

3 讨论

机体感染细粒棘球蚴后,免疫反应在抗感染过程中发挥重要作用。细粒棘球蚴在未成熟阶段即开始释放抗原刺激机体产生抗体,通过检测抗体可早期诊断包虫病。不同组织器官寄生的包虫,诱导宿主所产生的抗体类型和抗体水平存在着差异,特异性IgG按检出率的高低,依次为肝脏和肺脏。在包虫抗原刺激下,机体感染初期先产生IgM抗体,随着IgG抗体产生,其替代IgM并成为抗包虫特异性免疫球蛋白的主要组

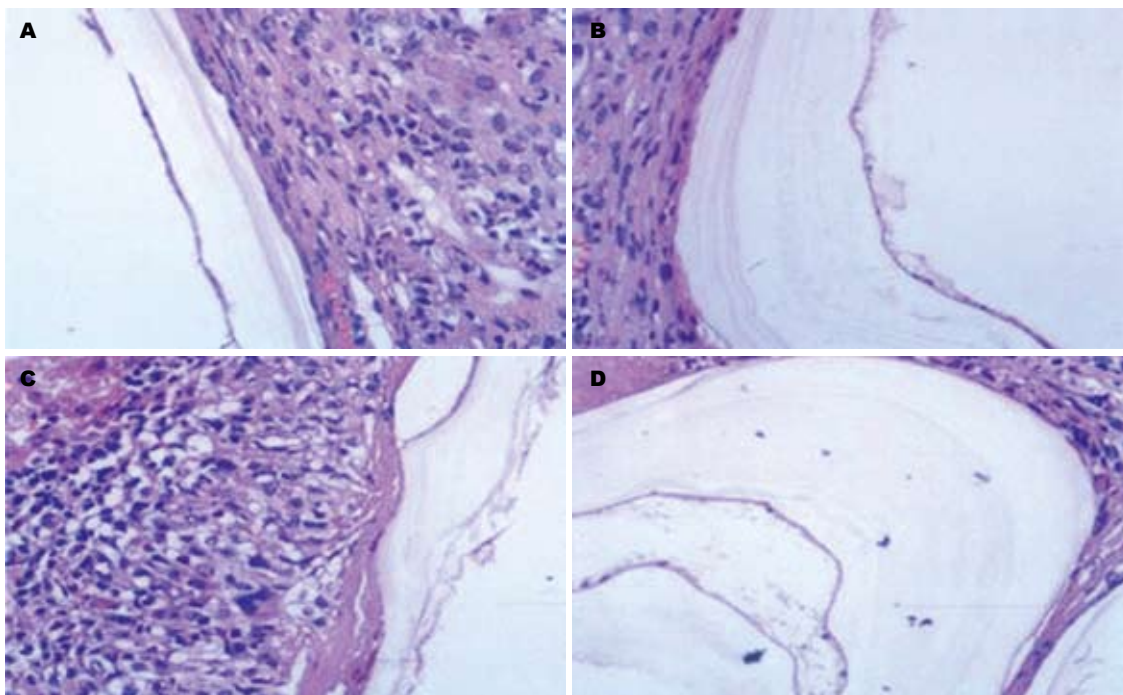


图 3 棘球蚴的病理观(HE × 400). A: 阿苯达唑组; B: 槐耳浸膏组; C: 联合用药组; D: 模型对照组.

■名词解释
肝包虫病: 属于自然疫源性疾病, 人类作为中间宿主而受感染, 绝大多数细粒棘球绦虫的幼虫致病, 以形成寄生虫性肝包虫囊为特征. 传统术式由于包重外囊的残留复发率及并发症较多, 目前已被纳入国家免费救治的疾病之一.

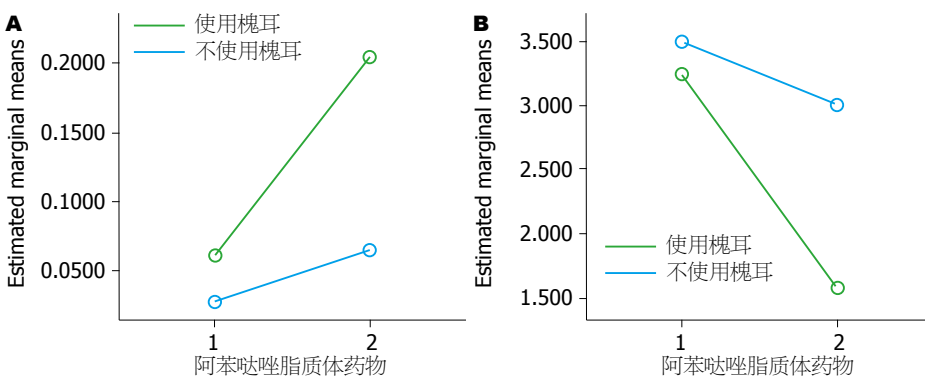


图 4 两种药物治疗过程中的交互作用. A: IgE; B: CD4⁺/CD8⁺. 1: 使用L-ABZ; 2: 不使用L-ABZ.

分. 绵羊和小鼠分别感染棘球蚴后1 wk和2 wk, 即可测出囊液抗原的IgG抗体反应^[8]. 我们通过制作动物模型, 用肝包虫囊液粗抗原免疫小鼠, 使其产生一定的IgG抗体, 从而模拟人类感染肝包虫后机体抗体的产生. IgG阳性者作为实验对象进行分组, 分组时选用临床治疗包虫常用药物阿苯达唑以及增强机体免疫力药物, 了解通过围手术期药物治疗和增强小鼠的免疫能力前提下, 小鼠肝细粒棘球蚴的感染情况. 实验小鼠感染时选择小鼠肝脏直接接种头节, 使宿主免疫应答直接作用于虫体, 模拟“肝包虫外膜下外囊完整摘除术”术中头节脱落或残留头节, 手术前1 wk和术后1 mo分别选用分组药物阿苯达唑脂质体、免疫增强剂槐耳浸膏以及联合阿苯达唑脂质体和槐耳浸膏用药进行治疗, 观察增强小鼠免疫功能对细粒棘球蚴生长的抑制作

用, 以及免疫增强剂与阿苯达唑脂质体的协同作用效果, 为临床实践中治疗肝包虫术后复发筛选有效治疗药物.

阿苯达唑被认为是治疗棘球蚴病最有效的药物之一, 他通过抑制虫体摄取葡萄糖, 致使虫体生发层细胞糖原耗竭、内质网小体和线粒体变性, 溶酶体增加, 最终导致虫体死亡^[9], 脂质体可作为抗寄生虫药物的载体, 进入体内后可迅速被网状内皮细胞摄取, 而包虫病多发于网状内皮细胞丰富的组织和器官, 如肝脏和肺部. 阿苯达唑被脂质体包封后集中于网状内皮系统, 在心脏、肾脏中的累积量比游离药物低得多, 因此可降低药物对心脏、肾脏的毒性作用; 脂质体作为异物被肝、肺、脾等网状内皮系统吞噬, 对这些脏器具有明显的靶向性, 并可增加药物在靶组织滞留时间和滞留量, 延长药物有效

■同行评价

本研究选材较好, 分组明确, 条理清晰, 目的性强, 用图与表说明问题, 有理有据, 具有较好的理论指导意义。

作用时间^[10]。阿苯达唑脂质体可使靶细胞周围的药物浓度高于其他部位, 改变阿苯达唑亚枫在小鼠肝脏的代谢作用, 从而提高治疗效果^[11], 在术前及术后运用阿苯达唑进行治疗, 可以明显减少育囊和术后复发^[12]。槐耳是我国民间重要药用真菌, 槐耳菌质所提取的清膏及进一步提取的多糖是一种良好的生物反应调节剂, 对小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能有非常明显的促进作用, 是一种有效的免疫增强剂^[13]。本实验表明阿苯达唑脂质体、槐耳浸膏对细粒棘球蚴生长具有明显的抑制作用, 阿苯达唑脂质体与槐耳浸膏联用抑制效果更好。用药组各组小鼠感染肝细粒棘球蚴体积明显小于模型对照组, 多数呈现结节状, 在同一生长周期中说明各用药组均对肝细粒棘球蚴的生长起到不同程度的抑制作用。我们首次使用槐耳浸膏治疗小鼠肝细粒棘球蚴, 感染率为24.2%, 这可能与槐耳浸膏改善因棘球蚴寄生造成的免疫抑制, 增强机体免疫功能有关。阿苯达唑脂质体组小鼠肝细粒棘球蚴感染率为17.1%, 显示阿苯达唑脂质体确有抑制小鼠肝细粒棘球蚴生长作用。通过与模型组对比同一生长周期内包虫囊的大小, 各用药组均可以抑制肝细粒棘球蚴的生长。观察本实验包虫感染的病理变化, 在各药物治疗组中, 均可以看见生发层细胞减少, 角质层紊乱, 并出现空泡结构, 其中阿苯达唑脂质体联合槐耳浸膏组对包虫囊壁破坏效果明显强于单独使用槐耳浸膏或阿苯达唑脂质体, 感染率为5.7%, 说明槐耳浸膏通过增强机体免疫能力, 可以抑制小鼠肝细粒棘球蚴生长作用, 但作用效果不能完全替代阿苯达唑脂质体。联合用药可以增强阿苯达唑脂质体对虫体囊壁的破坏作用。

细粒棘球蚴病同其他寄生虫病一样, 在CD4⁺两种细胞类型Th1和Th2产生的独特型细胞因子的调控下刺激体液免疫和细胞免疫反应。在大多数寄生虫感染过程中, Th1细胞活化与保护性免疫有关, Th2细胞活化与疾病的易感有关。IgE介导的局部速发型变态反应在宿主抗寄生虫中起着有益的作用, 但高强度的全身性速发型过敏反应, 会对宿主会产生免疫病理损伤^[14]。同时脾脏是重要的免疫器官, 脾脏指数变化影响体液免疫的状况。本实验中, 模型对照组中小鼠与空白对照组相比, 小鼠脾脏指数及IgE水平明显增高, 反映棘球蚴病Th1/Th2细胞失衡, 体液免疫功能亢进, 从而造成IgE合成增加, 由此引起的超敏反应导致发生的免疫病理损伤, Th2细胞占

优势, 有利于包虫的生长, 小鼠感染率较高。经药物治疗后, 各用药组脾脏指数和IgE均降低, 证明超敏反应被抑制, 免疫状况有所改善, 各组感染率均降低, 尤以联合用药组最为明显。联合用药组与阿苯达唑脂质体组、槐耳浸膏组相比较, 脾脏指数和IgE水平降低, 两种药物有明显的交互作用, 说明联合用药可以加强和进一步调节宿主的免疫功能, 降低包虫引起的超敏反应和体液免疫亢进, 减小对组织的免疫损伤。本实验中各组之间IgG水平变化不大, 可能是由于在包虫感染宿主的血清中, 其中主要的特异性抗包虫免疫球蛋白为IgG类, 而肝脏包囊主要产生的是IgG抗体, 接种前1 mo包虫囊液抗原皮下接种和头节接种刺激机体产生保护性抗体, IgG水平逐渐升高。但在感染包虫小鼠体内, 在IgG免疫球蛋白中, 仅IgG3和IgG4与治疗有相关性^[15]。IgG4抗体应答与囊肿的发展、生长和疾病的进展有关, 而IgG1, IgG2和IgG3应答主要发生在囊肿被宿主浸润或破坏^[16], 且IgG浓度在体内升高所持续的时间较长, 亚类的变化对于血清总IgG水平可能影响不大。血清中IgG3和IgG4的比例较低, 其浓度的变化可能不致影响血清总IgG水平。

T淋巴细胞按其功能可分为CD4(TH/TDTH)和CD8(TS/TC)等细胞亚群。CD4⁺ T细胞具有辅助和诱导功能, CD8⁺ T细胞具有抑制和细胞毒性功能, 各功能亚群之间是相互联系、相互促进、相互制约的。CD4⁺/CD8⁺比值的动态平衡反映了机体免疫调控状态和免疫水平, CD4⁺/CD8⁺比值降低标志着机体免疫功能抑制。Riganò *et al*^[17]发现抗原B可使外周血单个核细胞产生Th1/Th2细胞因子比值改变, 倾向与病理免疫相关的Th2, CD8⁺数量明显上升, 机体免疫功能受到抑制。我们利用FCM对细粒棘球蚴感染小鼠外周血淋巴细胞中CD4⁺和CD8⁺细胞亚群进行动态观察, 在模型组与空白组相比, CD8⁺明显增高, CD4⁺/CD8⁺比值下降, 机体免疫功能受到抑制, Th2细胞免疫应答增强, 免疫逃避机制形成, 小鼠肝包虫囊肿得以生长, 肝细粒棘球蚴感染率较高。阿苯达唑脂质体在治疗包虫患者中, 不仅能够提高药物(代谢)动力学和生物利用度, 而且能够刺激Th1型IFN- γ 细胞因子的表达和巨噬细胞功能的效应器, 恢复T淋巴细胞和B淋巴细胞增殖反映^[18]。本实验结果显示, 阿苯达唑脂质体组、槐耳浸膏组CD8⁺值、CD4⁺/CD8⁺比值变化不大, 与模型组相比CD8⁺值降低, CD4⁺/CD8⁺比值升高, 说明两种药物均可以恢复宿主的机体免疫功能,

恢复T淋巴细胞增殖反应, 从而起到抑制棘球蚴生长作用, 降低小鼠肝细粒棘球蚴感染率, 两种药物对于宿主免疫功能恢复作用相近, 但是感染率有所不同, 这可能与阿苯达唑脂质体本身药理作用有关; 联合用药组中CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺比值明显不同于模型对照组, 与阿苯达唑组及槐耳浸膏组相比, 虽然CD4⁺值变化不大, CD8⁺值降低, CD4⁺/CD8⁺比值升高, 两种药物交互作用明显, 本实验证实联合用药能够明显增强小鼠免疫功能恢复, 治疗效果较单独用药更加明显。

本实验表明, 阿苯达唑脂质体与槐耳浸膏联合用药可以提高小鼠免疫功能, 抑制细粒棘球蚴生长, 使小鼠肝包虫感染率降低。免疫增强剂槐耳浸膏可以协同阿苯达唑脂质体增加小鼠免疫功能, 进一步证明了宿主免疫功能与棘球蚴生长密切相关, 宿主免疫的增强可以抑制包虫的生长。“肝包虫外膜下外囊完整切除术”术后复发率低, 可能与外囊切除后, 包虫头节直接脱落于肝脏裸露的创面, 机体通过免疫应答作用直接将其杀死有关。因此在棘球蚴形成之前通过药物干预, 恢复和增加宿主的免疫功能, 对于术中残留原头蚴的生长可能会起到抑制作用, 以减少或避免肝包虫手术后的复发。

致谢: 感谢石河子大学医学院寄生虫教研室刘振忠、李永祥老师及石河子大学医学院一附院病理科给予的支持与帮助。

4 参考文献

- 徐明谦. 包虫病手术治疗的进展(附21560例分析). 中华普通外科杂志 1994; 9: 50-52
- Gemmell MA, Lawson JR, Roberts MG. Population dynamics in echinococcosis and cysticercosis: evaluation of the biological parameters of *Taenia hydatigena* and *T. ovis* and comparison with those of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 1987; 94: 161-180
- 栾梅香, 温浩, 张新峰. 小儿肝囊型包虫病552例的诊断和外科治疗. 中华普通外科杂志 1998; 13: 329-331
- 郑宏, 徐志新. 宿主感染细粒棘球蚴免疫反应的研究进展. 中国寄生虫病防治杂志 2002; 15: 55-58
- Romig T, Zeyhle E, Macpherson CN, Rees PH, Were JB. Cyst growth and spontaneous cure in hydatid disease. *Lancet* 1986; 1: 861
- 彭心宇, 张示杰, 牛建华, 吴向未, 阿不都, 潘惠忠, 莫拉提, 杨宏强. 肝包虫病外科治疗术式选择的新观点(附684例报道). 腹部外科 2003; 16: 19-21
- 潘卫庆, 汤林华. 分子寄生虫学. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 354-359
- Yong WK, Heath DD, Van Knapen F. Comparison of cestode antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena* and *T. ovis* infections in sheep. *Res Vet Sci* 1984; 36: 24-31
- Franchi C, Di Vico B, Teggi A. Long-term evaluation of patients with hydatidosis treated with benzimidazole carbamates. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 304-309
- 魏农衣, 温浩, 陆彬. 阿苯达唑脂质体在小鼠体内的分布及其药物动力学研究. 华西药理学杂志 2002; 17: 95-97
- Wen H, New RR, Muhmut M, Wang JH, Wang YH, Zhang JH, Shao YM, Craig PS. Pharmacology and efficacy of liposome-entrapped albendazole in experimental secondary alveolar echinococcosis and effect of co-administration with cimetidine. *Parasitology* 1996; 113 (Pt 2): 111-121
- Bildik N, Cevik A, Altıntaş M, Ekinci H, Canberk M, Gülmen M. Efficacy of preoperative albendazole use according to months in hydatid cyst of the liver. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41: 312-316
- 陈慎宝, 丁如宁. 槐耳菌质成分对小鼠免疫功能的影响. 食用菌学报 1995; 2: 21-25
- Dzhuraev MN, Saidov RKh, Pallaev MG. [Immunoglobulin E (IgE) in the blood and the diagnosis of hepatic echinococcosis] *Med Parazitol (Mosk)* 2006: 13-15
- Riganò R, Profumo E, Teggi A, Siracusano A. Production of IL-5 and IL-6 by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with *Echinococcus granulosus* infection. *Clin Exp Immunol* 1996; 105: 456-459
- Zhang W, Li J, McManus DP. Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 18-36
- Riganò R, Profumo E, Bruschi F, Carulli G, Azzarà A, Ioppolo S, Buttari B, Ortona E, Margutti P, Teggi A, Siracusano A. Modulation of human immune response by *Echinococcus granulosus* antigen B and its possible role in evading host defenses. *Infect Immun* 2001; 69: 288-296
- Dvornáková E, Hrcková G, Borosková Z, Velebný S, Dubinský P. Effect of treatment with free and liposomized albendazole on selected immunological parameters and cyst growth in mice infected with *Echinococcus multilocularis*. *Parasitol Int* 2004; 53: 315-325

编辑 潘伯荣 电编 何基才