

文章编号: 1000-7423(2014)-03-0176-04

【论著】

# 光诱导金丝桃素体外抗日本血吸虫雄虫作用的观察

蔡茹<sup>1</sup>, 余新平<sup>1</sup>, 王瑜<sup>1</sup>, 龚唯<sup>2</sup>, 张惠琴<sup>2</sup>, 夏超明<sup>2\*</sup>

**【摘要】** 目的 观察光诱导后的金丝桃素对日本血吸虫雄虫的体外杀伤作用。方法 80 只昆明小鼠经腹部皮肤感染由单只阳性钉螺逸出的日本血吸虫尾蚴 60~80 条, 6 周后剖检, 收集雄虫置入含有 3 ml DMEM 培养液的平皿内 (10 条/皿)。每批次实验均分为: 金丝桃素提取物或金丝桃素纯品 (以下简称金丝桃素) 不同浓度 (0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 和 2.5  $\mu\text{mol/L}$ ) 光照组以及不同浓度非光照组, 二甲基亚砷 (DMSO) 对照组和空白对照组。各实验均重复 2~5 次。将金丝桃素提取物或金丝桃素纯品及 DMSO 液分别加入含有血吸虫的培养皿中, 恒温避光共孵育 6 h, 再分别照射 30、60、90 和 120 min 后, 37  $^{\circ}\text{C}$  避光培养过夜 (16 h)。次晨, 洗涤、更换无药物新鲜培养液, 继续避光培养 48 h, 观察光诱导后的金丝桃素对血吸虫的杀伤作用。选取 1.0、2.5 和 5.0  $\mu\text{mol/L}$  金丝桃素光照 60 min 组虫体在解剖镜下观察并摄像; 2.0  $\mu\text{mol/L}$  金丝桃素光照 60 min 组虫体进行扫描电镜观察。结果 各浓度金丝桃素纯品光照组的虫体均有不同程度的死亡, 0.1  $\mu\text{mol/L}$  金丝桃素纯品光照 30 min 组, 虫体死亡率为 20%; 2  $\mu\text{mol/L}$  金丝桃素纯品光照 90 min 组和 2.5  $\mu\text{mol/L}$  金丝桃素纯品光照 60 min 组, 虫体均 100% 死亡。相应的金丝桃素纯品各浓度无光照组、DMSO 对照组和空白对照组, 虫体均 100% 存活。解剖镜下观察, 1.0、2.5 和 5.0  $\mu\text{mol/L}$  金丝桃素纯品光照 60 min 组虫体均出现显著的痉挛性麻痹现象, 表现为不同程度的缩短卷曲、体态僵硬和活动终止等改变; 扫描电镜观察, 2.0  $\mu\text{mol/L}$  金丝桃素纯品光照 60 min 组虫体皮层出现肿胀、空泡形成、破裂、糜烂、剥落和感觉乳突丢失等损害, 甚至皮层正常结构完全消失。金丝桃素纯品各浓度光照组的虫体死亡率和形态结构的损伤改变与金丝桃素浓度和光照时间有关。结论 金丝桃素经光诱导后, 具有显著的体外抗日本血吸虫雄虫作用。

**【关键词】** 金丝桃素; 日本血吸虫; 抗血吸虫作用

中图分类号: R383.24

文献标识码: A

## *In Vitro* Effect of Photoactivated Hypericin on Anti-*Schistosoma japonicum* Adult Male Worms

CAI Ru<sup>1</sup>, SHE Xin-ping<sup>1</sup>, WANG Yu<sup>1</sup>, GONG Wei<sup>2</sup>, ZHANG Hui-qin<sup>2</sup>, XIA Chao-ming<sup>2\*</sup>

(1 Department of Microbiology and Parasitology, School of Medicine, Anhui University of Science and Technology, Huainan 232001, China; 2 Department of Parasitology, School of Medicine, Soochow University, Suzhou 215123, China)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the *in vitro* effect of photoactivated hypericin on anti-*Schistosoma japonicum* adult male worms. **Methods** Kunming mice were infected with 60~80 *Schistosoma japonicum* single-sex cercariae. At 6 weeks post-infection, the mice were sacrificed and adult male worms of *S. japonicum* were collected. The worms were incubated in DMEM medium containing different concentrations of hypericin (0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, and 2.5  $\mu\text{mol/L}$ ) in the presence or absence of light. In photoactivated hypericin groups, after 6 h of dark incubation the worms were exposed to LED light irradiation (590 nm) for 30, 60, 90, and 120 min, respectively, and then cultured overnight in darkness (16 h). In the next morning, the parasites were washed, resuspended in drug-free medium, and incubated in the dark for 48 h. These worms were observed with stereomicroscopy and scanning electron microscopy (SEM). **Results** Photoactivated hypericin showed the ability to kill *Schistosoma japonicum in vitro*. The death rate was 20% in 0.1  $\mu\text{mol/L}$  photoactivated hypericin group under 30 min irradiation, and 100% in 2  $\mu\text{mol/L}$  under 90 min irradiation and 2.5  $\mu\text{mol/L}$  under 60 min irradiation, respectively. In blank control group, DMSO control group, and hypericin groups without light irradiation, worms were alive. After 60 min irradiation, the worms in 1.0, 2.5, 5.0  $\mu\text{mol/L}$  photoactivated hypericin groups showed spastic paralysis characterized by reduced body length, pronounced tight curl, body stiffness, and complete

**基金项目:** 卫生部寄生虫病预防与控制技术重点实验室开放课题 (No. WK008-001); 国家自然科学基金 (No. 30772027); 安徽理工大学博士基金 (No. 11083); 安徽理工大学国家级大学生创新创业训练计划 (No. 201210361114)

**作者单位:** 1 安徽理工大学医学院病原生物学教研室, 淮南 232001; 2 苏州大学医学院寄生虫学教研室, 苏州 215123

\* 通讯作者, E-mail: xia-chaoming@163.com

cessation of movement. Surface tegumental damages of adult worms in 2.0  $\mu\text{mol/L}$  photoactivated hypericin group for 60 min irradiation were observed under SEM, such as vacuole formation, erosion and peeling of the tegument, collapse of the sensory papillae, and even the normal structure disappeared completely. Both death rate and morphological damage of the worms treated by photoactivated hypericin were positively correlated with hypericin dose and light irradiation time.

**Conclusion** Photoactivated hypericin has anti-*Schistosoma japonicum* adult male worms effect *in vitro*.

**【Key words】** Hypericin; *Schistosoma japonicum*; Antischistosomal activity

Supported by a project of the Key Laboratory on Technology for Parasitic Disease Prevention and Control, Ministry of Health (No. WK008-001), the National Natural Science Foundation of China (No. 30772027) and the Doctoral Fund of Anhui University for Science & Technology (No. 11083), National Undergraduate Training Programs for Innovation and Entrepreneurship of Anhui University for Science & Technology (No. 201210361114)

\* Corresponding author, E-mail: xia-chaoming@163.com

血吸虫病是位居全球第二的寄生虫病，严重危害人类健康，流行于74个国家和地区，有2.07亿人受感染，6亿人受威胁<sup>[1]</sup>。中国流行的是日本血吸虫病 (*Schistosomiasis japonica*)，截至2012年底，全国共有血吸虫病流行县(市、区)452个，估计患者24.06万人<sup>[2]</sup>。然而，目前尚无可用于预防的疫苗<sup>[3]</sup>，长期以来，临床治疗血吸虫病主要依赖化学药物干预疗法，尤其是吡喹酮 (praziquantel) 的应用<sup>[4]</sup>。本课题组研究发现吡喹酮抗血吸虫的药物靶点与虫体钙通道具有一定相关性<sup>[5]</sup>，进一步对蛋白激酶C (PKC) 抑制剂金丝桃素 (hypericin) 是否具有干预钙通道而调控血吸虫胞内  $\text{Ca}^{2+}$  水平的相关性进行研究<sup>[6]</sup>，发现金丝桃素与日本血吸虫避光共孵育后，无明显的体外抗虫效应，也无拮抗或协同吡喹酮的抗血吸虫效应；但在普通室内光线的激发下，金丝桃素具有明显的体外抗虫效应，故推测这种效应与金丝桃素的光动力疗法 (photodynamic therapy, PDT) 具有相关性<sup>[7,8]</sup>。

金丝桃素是人们所瞩目的天然光敏色素，作为二代光敏剂，金丝桃素的研究已经涉及抗肿瘤、抗细菌和抗病毒等多个领域<sup>[8-10]</sup>，有关金丝桃素的抗血吸虫作用未见报道，本文通过光诱导金丝桃素观察其对体外培养日本血吸虫雄虫的抗虫作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 阳性湖北钉螺 (*Oncomelania hu-pensis*) 购自江苏省血吸虫病防治研究所。昆明小鼠，80只，18~20 g，由苏州大学实验动物中心提供。

1.1.2 药物与试剂 金丝桃素纯品 (金丝桃素含量大于99.0%) 购自美国Fluka公司，金丝桃素提取物 (金丝桃素含量为93.8%) 购自北京显通时代医药科技发展有限公司。培养基DMEM粉和谷氨酰胺 (L-glutamine) 均购自美国Gibco公司。小牛血清购自杭州四季青生物公司。其他试剂均为国产分析纯。金丝桃素

纯品和金丝桃素提取物均在二甲基亚砜 (DMSO) 原液中配成2 mmol/L和0.2 mmol/L工作液， $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存。DMEM培养液为DMEM 10 g，庆大霉素100 U/ml、青霉素100 U/ml、L-glutamine 6 ml溶于三蒸水中配制成1 000 ml溶液，微孔滤膜除菌， $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。使用前加入20%新生小牛血清。

### 1.2 方法

1.2.1 血吸虫成虫收集与体外培养 每鼠经腹部皮肤感染日本血吸虫单性尾蚴 (单只阳性钉螺逸出) 60~80条，6周后采用肝门静脉灌注无菌枸橼酸钠生理盐水收集雄虫。挑选活力正常的雄虫放入含3 ml DMEM培养液的平皿内 (10条/皿)，置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$ 恒温箱内培养。

1.2.2 金丝桃素对体外培养雄虫的作用 参照文献<sup>[11]</sup>将金丝桃素纯品和金丝桃素提取物 (以下简称金丝桃素) 配制成0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0和2.5  $\mu\text{mol/L}$ 等7个浓度。每批次实验随机分为：金丝桃素不同浓度 (0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0和2.5  $\mu\text{mol/L}$ ) 光照组以及非光照组，二甲基亚砜 (DMSO) 对照组和空白对照组。将金丝桃素和DMSO分别加入含有血吸虫的培养皿中，恒温避光共孵育6 h后 (细胞内的金丝桃素含量在给药6 h后趋于饱和<sup>[12]</sup>)，将黄色发光二极管 (LED) 光源 (主波长590 nm，深圳佳进光电技术有限公司产品) 置于培养皿正上方约10 cm处，分别照射30、60、90和120 min后， $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光培养过夜 (16 h)。次晨，弃培养液，无菌生理盐水洗涤虫体3次，于无药物培养液中继续恒温避光培养48 h后，置解剖镜 (SZX12，日本奥林巴斯公司) 下观察虫体活力变化，包括虫体运动、体色透明度和体态柔顺度等状况<sup>[13]</sup>。若镜下观察2 min未见虫体的吸盘和身体有任何活动即判定为死亡，计算各组虫体死亡率。DMSO对照组中培养液所含DMSO溶剂的终浓度为金丝桃素浓度组中所含最高DMSO溶剂的浓度 (DMSO最高浓度 $\leq 0.7\%$ )，各实验均重复2~5次。选取1.0、2.5和

5.0 μmol/L等3个金丝桃素浓度梯度光照60 min组虫体在解剖镜下摄像。

1.2.3 扫描电镜观察 收集2.0 μmol/L金丝桃素光照60 min组和DMSO对照组虫体各2条。经生理盐水洗涤后,置于4%戊二醛中4℃固定过夜。0.1 mol/L磷酸缓冲液漂洗3次,每次15 min,1%锇酸固定染色1 h,0.1 mol/L磷酸缓冲液漂洗2次,每次15 min,30%、50%、70%、80%和90%叔丁醇-酒精系列脱水(10 min/次)、100%叔丁醇脱水3次(10 min/次),最后用真空离子镀膜仪(1B-5,日本EIKO公司)将虫体真空干燥并喷金后,扫描电镜(S570,日本HITACH公司)观察并摄像。

## 2 结果

2.1 金丝桃素的体外抗血吸虫雄虫作用 金丝桃素纯品不同浓度(0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0和2.5 μmol/L)光照组,虫体均出现不同程度的死亡现象。最低浓度0.1 μmol/L金丝桃素纯品组给予最短时间(30 min)光照后,虫体活力即明显降低,培养48 h后,虫体死亡率达20%。2.0 μmol/L金丝桃素纯品光照90 min组和

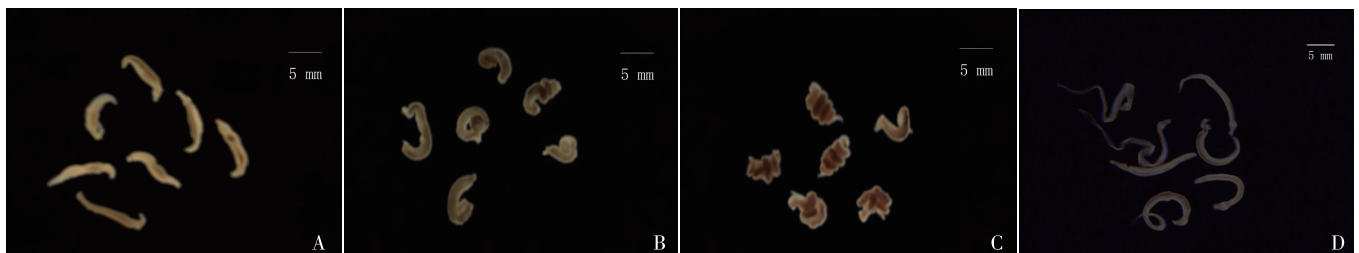
最高浓度2.5 μmol/L金丝桃素纯品光照60 min组,虫体活力降低更为明显,连续培养48 h后的虫体最终均100%死亡。随着金丝桃素浓度的增高和光照时间的延长,虫体死亡率逐渐增高。当光照时间从60 min延长到90 min时,各组虫体的死亡率增幅不明显。不同浓度的金丝桃素纯品无光照组、DMSO对照组和空白对照组,虫体活力无异常变化,均100%存活(表1)。

2.2 金丝桃素对血吸虫雄虫形态与活力的影响 1.0、2.5和5.0 μmol/L金丝桃素纯品60 min光照组虫体均出现体态僵硬、缩短变粗、透明度降低和活动完全终止等形态与活力改变,变化程度与金丝桃素浓度有关(图1A-C)。1.0 μmol/L金丝桃素纯品光照组,虫体缩短僵硬如香蕉状(图1A);2.5 μmol/L 金丝桃素纯品光照组,虫体缩短僵硬卷曲明显(图1B);5.0 μmol/L 金丝桃素纯品光照组,虫体高度卷曲如螺旋状(图1C)。DMSO对照组虫体运动活跃、体态柔和、体色透明(图1D)。

2.3 金丝桃素对日本血吸虫雄虫超微结构的影响 扫描电镜观察,2.0 μmol/L金丝桃素纯品光照60 min组虫体体壁表面损害严重,海绵状结构完全消失,皮层褶

表1 金丝桃素体外抗日本血吸虫雄虫作用  
Table 1 *In vitro* effect of hypericin on anti-Schistosoma japonicum adult male worms

组别 Group	光照时间/min Light activation period/min														
	无光照 In Darkness			30			60			90			120		
	总虫数 No. total worms	死亡 虫数 No. dead worms	死亡率 /% Proportion of death worms/%	总虫数 No. total worms	死亡 虫数 No. dead worms	死亡率 /% Proportion of death worms/%	总虫数 No. total worms	死亡 虫数 No. dead worms	死亡率 /% Proportion of death worms/%	总虫数 No. total worms	死亡 虫数 No. dead worms	死亡率 /% Proportion of death worms/%	总虫数 No. total worms	死亡 虫数 No. dead worms	死亡率 /% Proportion of death worms/%
DMSO 对照组 DMSO control	30	0	0	20	0	0	20	0	0	20	0	0	120	0	0
空白对照组 Negative control	20	0	0	20	0	0	20	0	0	20	0	0	30	0	0
0.1 μmol/L	20	0	0	20	4	20.0	30	10	33.3	30	11	36.7	20	8	40.0
0.2 μmol/L	20	0	0	20	7	35.0	40	23	57.5	20	12	60.0	20	13	65.0
0.5 μmol/L	20	0	0	30	14	46.7	40	32	80.0	30	25	83.3	20	17	85.0
1.0 μmol/L	20	0	0	30	18	60.0	40	35	87.5	30	26	86.7	20	18	90.0
1.5 μmol/L	20	0	0	50	39	78.0	70	64	91.4	60	55	91.7	30	28	93.3
2.0 μmol/L	20	0	0	40	33	82.5	50	49	98.0	30	30	100	20	20	100
2.5 μmol/L	20	0	0	30	29	96.7	30	30	100	20	20	100	20	20	100



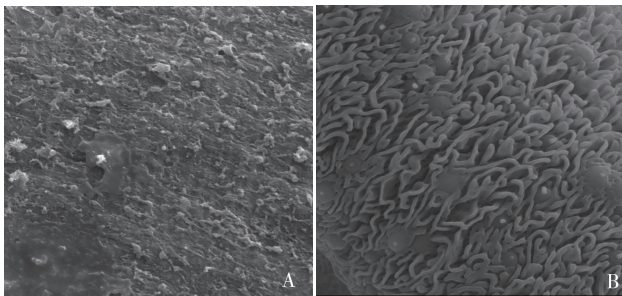
A: 1.0 μmol/L 金丝桃素光照组; B: 2.5 μmol/L 金丝桃素光照组; C: 5.0 μmol/L 金丝桃素光照组; D: DMSO对照组。

A: 1.0 μmol/L photoactivated hypericin group; B: 2.5 μmol/L photoactivated hypericin group; C: 5.0 μmol/L photoactivated hypericin group; D: DMSO control group.

图1 金丝桃素对日本血吸虫雄性成虫形态和活力的影响

Fig.1 Effect of photoactivated hypericin on the morphology and vitality of Schistosoma japonicum adult male worms

嵴肿胀、卷曲、糜烂、剥落, 暴露皮层下组织, 褶嵴因融合所形成的大小不等的泡状物多数已破裂, 感觉乳突丢失等 (图2A)。DMSO对照组的虫体体壁表面呈均匀海绵状, 其皮层褶嵴、凹窝和感觉乳突等清晰可见 (图2B)。



A: 2.0  $\mu\text{mol/L}$  金丝桃素光照组; B: DMSO对照组。

A: 2.0  $\mu\text{mol/L}$  photoactivated hypericin group; B: DMSO control group.

图2 日本血吸虫雄虫中段体壁 ( $\times 3000$ )

Fig. 2 Middle portion of body wall of *Schistosoma japonicum* adult male worm ( $\times 3000$ )

### 3 讨论

金丝桃素是中药贯叶连翘 (*Hypericum perforatum*) 中提取的最具生物活性的物质, 系萜二萜酮化合物, 也是一种安全有效的天然光敏活性药物。无光激活条件下, 金丝桃素对细胞基本无损害作用。光照下, 金丝桃素吸收光子与靶组织中的分子氧相互作用产生具有细胞毒作用的活性氧物质 (reactive oxygen species, ROS), 如单态氧、自由基等。单态氧进而破坏细胞膜, 干扰蛋白质和核酸引起细胞坏死和凋亡, 以及间接刺激产生的炎性介质, 可直接或间接导致组织细胞的损伤, 即为金丝桃素的PDT效应<sup>[7,8]</sup>。国际上, 利用金丝桃素的PDT效应进行抗肿瘤、抗病毒方面的研究报道较多<sup>[8-10]</sup>, 金丝桃素尚可直接添加在动物饲料和饮用水中, 防治呼吸道病毒<sup>[10]</sup>。

本实验对金丝桃素纯品和金丝桃素提取物分别进行了实验, 两者的各项检测结果相似, 故结果中未进行分别描述。本实验发现, 高浓度 (2.5  $\mu\text{mol/L}$ ) 金丝桃素与日本血吸虫避光共孵育后, 不表现杀虫效应, 虫体100%存活。光照30 min后, 低浓度 (0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) 金丝桃素即对血吸虫产生明显的杀虫效应, 虫体死亡率达20%; 2.0  $\mu\text{mol/L}$  金丝桃素光照90 min组和2.5  $\mu\text{mol/L}$  金丝桃素光照60 min组, 虫体均100%死亡, 表明金丝桃素对血吸虫的杀伤效应, 与金丝桃素浓度及光照时间有关。金丝桃素对虫体的形态和活力变化 (缩短、僵硬和活动终止等) 以及皮层的显著性破坏均显示金丝桃素的PDT效应也具有体外抗日本血吸虫雄虫的作用。

贯叶连翘属多年生温带植物, 生于山坡路旁或杂草丛中, 分布范围广, 易采集和培植, 全草含有金丝桃素, 以花瓣的含量最高。日本血吸虫尾蚴由钉螺逸出后, 主要集中于水面, 在即使只有点滴露水的草地或潮湿的泥土上, 钉螺也能逸出尾蚴。如果在血吸虫病流行区<sup>[14]</sup>, 适量栽培贯叶连翘植物, 经日光照射, 散落的金丝桃素成分, 其PDT效应若能杀灭钉螺逸出的血吸虫尾蚴, 有可能不同程度地预防血吸虫病的传播。金丝桃素是一种天然产物, 无残留, 若其杀虫效果理想, 将为血吸虫病防治领域<sup>[15,16]</sup>提供一条新的研究思路, 并为拓展药物资源应用、研发抗日本血吸虫新药提供良好基础, 值得深入探讨。

### 参 考 文 献

- [1] WHO. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases [R]. Geneva: World Health Organization, 2010: 129-134.
- [2] 李石柱, 郑浩, 高婧, 等. 2012年全国血吸虫病疫情通报 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2013, 25(6): 557-563.
- [3] 汪世平, 陈秀春, 高冬梅. 我国血吸虫疫苗研究进展及应用前景 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2009, 7(5): 402-411.
- [4] 肖树华. 近年来发展抗血吸虫新药的进展 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2010, 28(3): 218-225.
- [5] 蔡茹, 杨巧林, 张惠琴, 等. 细胞松弛素D与钙通道阻滞剂拮抗吡喹酮作用对血吸虫超微结构的影响 [J]. 中国人兽共患病学报, 2010, 26(4): 315-319.
- [6] Sauviat MP, Colas A, Chauveau MJ, et al. Hypericin activates L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in cardiac myocytes [J]. J Nat Prod, 2007, 70(4): 510-514.
- [7] Krammer B, Verwanger T. Molecular response to hypericin-induced photodamage [J]. Curr Med Chem, 2012, 19(6): 793-798.
- [8] Wang X, Guo Y, Yang S, et al. Cellular and molecular mechanisms of photodynamic hypericin therapy for nasopharyngeal carcinoma cells [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2010, 334 (3): 847-853.
- [9] Kashef N, Borghei YS, Djavid GE. Photodynamic effect of hypericin on the microorganisms and primary human fibroblasts [J]. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2013, 10(2): 150-155.
- [10] Pu XY, Liang JP, Shang RF, et al. Influence of *Hypericum perforatum* extract on piglet infected with porcine respiratory and reproductive syndrome virus [J]. Agric Sci Chin, 2009, 8(6): 730-739.
- [11] Guo L, Tang X, Chu X, et al. Role of protein kinase C in 15-HEETE-induced hypoxic pulmonary vasoconstriction [J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2009, 80(2): 115-123.
- [12] 王晓利, 王彩虹, 郭懿, 等. 光诱导金丝桃素对人鼻咽癌细胞CNE-2的毒作用和凋亡研究 [J]. 中成药, 2010, 32 (8): 1296-1300.
- [13] 蔡茹, 李欣, 张惠琴, 等. 钙通道阻滞剂与肌动蛋白解聚/稳定剂对吡喹酮体外杀日本血吸虫作用的效应影响 [J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(12): 1186-1191.
- [14] 周晓农, 李石柱, 刘琴, 等. 钉螺遗传学及其生物学特性的研究进展 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2009, 27 (5): 412-418.
- [15] 曾庆仁, 杨胜辉, 何永康. 日本血吸虫病防治技术的探索与思考 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2009, 27(5): 432-435.
- [16] 郑江. 我国血吸虫病防治的成就及面临的问题 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2009, 27(5): 398-401.

(收稿日期: 2014-02-25 编辑: 衣凤芸)