

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

評估 albendazole 及安宮牛黃丸混合治療廣東住血線蟲感染
BALB/c 小白鼠所引發嗜伊紅性腦膜炎之效果

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2320-B-040-020-

執行期間：94 年 08 月 01 日至 95 年 07 月 31 日

執行單位：中山醫學大學醫學系寄生蟲學科

計畫主持人：李秀雄

共同主持人：賴世展

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 10 月 17 日

**Efficacy of albendazole–Angong Niuhuang Pill co-therapy against
Angiostrongylus cantonensis induced eosinophilic meningitis in BALB/c mice**

**評估 albendazole 及安宮牛黃丸混合治療廣東住血線蟲感染 BALB/c 小白鼠所引
發嗜伊紅性腦膜炎之效果**

計劃編號：NSC 94-2320-B-040-020

執行期限：2005-08-01~2006-07-31

主持人：李秀雄

執行機構及單位名稱：中山醫學大學寄生蟲學科

中文摘要

以 albendazole 治療罹患廣東住血線蟲症之小白鼠雖然可以殺死感染到腦部的廣東住血線蟲幼蟲，但是死亡的幼蟲卻會造成腦部的傷害並引起免疫反應。過去的研究顯示使用非類固醇類的抗發炎藥物也可能減輕腦膜炎的病徵。本研究以 albendazole 和安宮牛黃丸(Angong Niuhuang Pill, ANP)混合治療罹患嗜伊紅性腦膜炎的 BLAB/c 小白鼠，並由下列的治療指標中分析治療的成效：(1)蟲的回收數。(2) eosinophil 的計數。(3) 蛋白分解酵素。本研究結果顯示 albendazole 和安宮牛黃丸混合治療的組別明顯地減少蟲回收

數、eosinophil 數量及蛋白分解酵素。這些

結果顯示 albendazole 和安宮牛黃丸混合治療可能提供治療寄生蟲性腦膜炎的方法。

英文摘要

Although the anthelmintic agent albendazole can kill the *Angiostrongylus cantonensis* larvae that infect the brain, their dead larvae are capable of evoking a severe, brain damaging immune response. Administration of non-steroid anti-inflammatory drugs have been reported to possibly relieve the symptom of meningitis. To observe the curative effects of

albendazole- Angong Niuhuang Pill (ANP) co-therapy on eosinophilic meningitis in BALB/c mice. Assay indicators for the therapeutic effect include 1) worm recovery; 2) eosinophil counts; and 3) proteinases. The results showed that the albendazole- ANP co-therapy significantly decreased ($P<0.05$) worm recovery, eosinophil counts and proteinases. This therapeutic approach of albendazole-banlangen co-therapy may provide for treating parasitic meningitis.

前言

廣東住血線蟲(*Angiostrongylus cantonensis*)是一種寄生在大鼠心臟及肺動脈血管的線蟲，屬於人畜共通的寄生蟲(zoonotic parasites)。主要分佈於東南亞和南太平洋一帶，台灣整個島嶼幾乎都有此寄生蟲的存在，每年都有因飲食不當而感

染廣東住血線蟲的病例報告出現(Yii, 1976; Tsai et al., 2004)。人類的感染主要是由於吃蝸牛肉而意外感染(Alicata, 1965)，此寄生蟲發育中的幼蟲會侵入人類中樞神經系統(central nervous system, CNS)，造成血腦障壁(blood-brain barrier, BBB)破壞，神經細胞脫髓鞘(demyelination) (Hwang et al., 1993)，小腦浦金氏細胞(Purkinje cells)喪失、損傷及空泡化(Perez et al., 1989; Yoshimura, 1993)，嗜伊紅性腦膜炎(eosinophilic meningitis) (Hsu et al., 1990; Ismail and Arsura, 1993)或嗜伊紅性腦膜腦炎(eosinophilic meningoencephalitis) (Gardiner et al., 1990)等病理現象。廣東住血線蟲成蟲寄生在適當宿主(如大白鼠)的肺動脈(Alicata and Jindrak, 1970)；在非適當宿主中(如人類或小白鼠)，未成熟的成蟲(imature adult)侵入中樞神經系統(central nerve system, CNS)中，約在感染後三週，

腦脊髓液(cerebrospinal fluid, CSF)中的嗜伊紅性白血球會達到高峰，並伴隨嗜伊紅性腦膜炎的病徵(Sugaya and Yoshimura, 1988; Sasaki et al., 1993)。

血纖維蛋白酶原活化因子(plasminogen activators, PAs)是絲胺酸(serine)家族的蛋白酶，可將血纖維蛋白酶原(plasminogen)活化成血纖維蛋白酶(plasmin)；而血纖維蛋白酶可活化基質金屬蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)。PAs 可分為 tissue-type plasminogen activator (tPA)和 urokinase-type plasminogen (uPA) (Vassalli et al., 1991)。目前已知 tPA 和 uPA 在纖維溶解中扮演血纖維蛋白酶生成的必需物。tPA 會促進 BBB 的破壞且和細菌性腦膜炎有關(Busch et al., 1997)。uPA 和細胞外基質(extracellular matrix, ECM)的分解有關(Blasi et al., 1987)，進而破壞 BBB 的結構，促使白血

球浸潤至腦部，在病理上扮演重要的角色(Winkler et al., 2002)。MMPs 是一種含鋅的金屬酵素，能分解細胞外基質(extracellular matrix, ECM)，以酵素元型態(proenzyme)產生。MMPs 的不正常表現與許多中樞神經系統疾病有關，例如，多發性硬化症(multiple sclerosis) (Cossins et al., 1997)、阿滋海默症(Alzheimer's disease)、malignant glioma(Yong et al., 1998)、細菌性腦膜炎(Paul et al., 1998)、病毒性腦膜炎(Kolb et al., 1998)及黴菌性腦膜炎(Matsuura et al., 2000)。

Albendazole 具有廣泛、高效、低毒的特點，是目前使用最多的廣泛抗蠕蟲藥之一。它選擇性地使線蟲的體表和腸細胞中的微管消失，抑制蟲體對葡萄糖的攝取，減少 adenosine triphosphate (ATP)生成，阻礙蟲體生長發育，對多種線蟲的成蟲和幼蟲有殺蟲效果(Venkatesan, 1998)。由於

albendazole 口服後吸收迅速，肝、肺等組織中均能達到相當高的濃度，因此，對腸道外寄生蟲病，如包生條蟲病(Hydatid disease)、旋毛蟲病(Trichinosis)、中華肝吸蟲病(Clonorchiiasis)及肺吸蟲病(Paragonimiasis)也有好的療效 (Pene et al., 1982; Maisonneucon et al., 1985)。感染廣東住血線蟲之小白鼠以驅蟲藥 albendazole 單獨治療能有效殺死幼蟲，但卻不能完全抑制因蟲體死亡分解所引起之發炎反應(Lan et al., 2004)。由於安宮牛黃丸(Angong Niu Huang Pill, ANP)在中醫臨床運用上是搶救因流行性腦膜炎、日本腦膜炎、中毒性肺炎、中毒性痢疾、肝昏迷、小兒高熱驚厥等許多伴有高熱昏睡、抽搐等危急病症的急救藥物。且此藥的主要成分麝香、牛黃能降低血管通透性，抑制白血球的移行，調節細胞內外鈣離子流動(Wang et al., 1994)。因此，本試驗將以 zymography 觀

察 tPA、uPA 及 MMP-9 活性，以組織學技術觀察腦部蜘蛛膜下腔的發炎反應，評估 albendazole 及安宮牛黃丸混合治療廣東住血線蟲感染小白鼠引起腦膜炎之效果。惟有不斷的試驗以幫助我們瞭解此藥在各種疾病的作用機轉並做出正確的使用抉擇。此外，建議劑量、將監測標準化、劑量-期間的相關性都需進一步的試驗分析確認。本研究期望未來能藉由安宮牛黃丸抑制 PAs 及 MMPs 酵素系統以減輕廣東住血線蟲所誘發之嗜伊紅性腦膜炎反應。

二、實驗動物

BALB/c 品系小白鼠(mice)，購自國科會動物中心，為五週齡雄性小白鼠。感染前至少飼養於 12 小時亮及 12 小時暗的動物飼養中心一週。

三、動物感染

小白鼠在感染前 12 小時均給予禁水、禁食，每隻小白鼠以口胃管分別灌入 60 隻第三期幼蟲(L₃)，於感染後 12 小時再恢復其供水、供食。

四、藥物

Albendazole (Zentel[®]) 是 benzimidazole 的衍生物，分子式 C₁₂H₁₅N₃O₂S，分子量 265,342。安宮牛黃丸處方主要由牛黃、麝香、黃芩、黃連、枝子、郁金、珍珠粉、雄黃、水牛角濃縮、朱砂、冰生等構成。

五、治療

將 100 隻試驗的動物隨機分為五組，分別是未感染廣東住血線蟲且未治療之對照組、感染廣東住血線蟲未治療之對照組、albendazole 單獨治療、安宮牛黃丸單獨治療及 albendazole-安宮牛黃丸混合治

療。其中實驗組分為三組，分別在感染後第 5 天及 15 天，以口胃管投與 albendazole、安宮牛黃丸及混合 albendazole 與安宮牛黃丸治療，albendazole 劑量為每公斤體重 10 毫克，安宮牛黃丸為每公斤體重 100 毫克，連續投藥 7 天，在第 22 天將動物犧牲。而對照組則灌食生理食鹽水，在犧牲實驗組動物時也同時犧牲對照組動物做比較。

六、血纖維蛋白酶活化因子及基質金屬蛋白酶-9 之分析

將小白鼠腦脊髓液以 gelatin and casein substrate zymography 來分析其中所有的蛋白酶。膠體的配製法(gel preparation) 與 SDS-PAGE 相同，不同的是 separating gel 中加入 0.1 % 的 gelatin 或 0.1% casein (Sigma, USA)。電泳後，取下 gel，加入 100 ml washing buffer (2.5% Triton X-100 in

double-distilled H₂O)清洗gel。在室溫下搖動 30 分鐘，換washing buffer再洗一次。倒掉washing buffer，gel以double-distilled H₂O清洗一次。加入 200 ml reaction buffer (40 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM CaCl₂, 0.01%NaN₃)，在 37°C 作用 18 小時以上。以stain solution (0.25% Coomassie Blue R250, in 50% MeOH, 10% acetic acid) 染gel 1 小時。以destain solution (20% methanol, 10% acetic acid)退去染液，取gel以密度掃描儀量化分析結果。

結果

治療對於蟲回收數的影響

感染第 5 天開始治療顯示 Albendazole 單獨治療和用 Albendazole 與安宮牛黃丸混合治療的小白鼠腦組織明顯減少 ($P<0.05$)蟲回收數。而在沒有治療及用安宮牛黃丸單獨治療下所回收的蟲數則沒有明

顯($P>0.05$)的差異 (Figure 1)。

治療對於 eosinophil 數量的影響

CSF 分析結果顯示廣東住血線蟲感染的 CSF 中之 eosinophil 明顯增加，經 albendazole、安宮牛黃丸及 albendazole 與安宮牛黃丸混合治療後則明顯($P<0.05$)減少(Figure 2)。

治療對 PAs 活性的影響

Casein zymography 技術可以用來分析 tPA 和 uPA 的活性，tPA 在分子量 70 kDa 附近可以檢測到，而在感染廣東住血線蟲的 BLAB/c 小白鼠的 CSF 中有明顯的增加。感染廣東住血線蟲第 5 天開始治療的組別，用 albendazole 單獨治療或 Albendazole 與安宮牛黃丸混合治療後，tPA 及 uPA 的活性明顯地下降($P<0.05$)，在單獨使用安宮牛黃丸則是中度地下降 (Fig.

3)。

治療對 MMP-9 活性的影響

Glutin zymography 技術可以用來分析 gelatinases 的活性，例如 MMP-9 的活化蛋白的酵素活性，MMP-9 在分子量 94 kDa 可以檢測到，此基質金屬蛋白酶在感染廣東住血線蟲的 BALB/c 小白鼠的 CSF 中呈現明顯地 ($P < 0.05$) 增加。感染廣東住血線蟲第 5 天開始治療的組別，用 albendazole 單獨治療或 Albendazole 與安宮牛黃丸混合治療後，MMP-9 的活性明顯的降低 ($P < 0.05$)。在單獨使用安宮牛黃丸治療則顯示中等程度的抑制作用 (Fig. 4)。

討論

本研究結果顯示 albendazole 和安宮牛黃丸混合治療的組別明顯地減少 eosinophil 數量，此結果顯示安宮牛黃丸治

療可能具有抗發炎效果。

Blood-CNS barrier 的破壞被認為是感染腦膜炎的重要病理及生理現象，它使得 leucocytes 可以滲入蜘蛛膜下腔，而 PAs 的蛋白活性及 MMP-9 可以導致 blood-CNS barrier 的分解，而 MMPs 分解酵素可以使 BBB 內皮細胞的 tight junctions 分解，使白血球滲出 (Paul et al., 1998; Leppert et al., 2000)。檢測 CSF 的蛋白濃度的方法是沒有侵入性的可靠檢查方法，可用來觀察血液到 CNS 的障壁。Yii (1976) 的研究報告顯示廣東住血線蟲所引起的嗜伊紅性腦膜炎的病人比一般人的 CSF 蛋白濃度來得高，而 Romanic and Madri (1994) 的研究易顯示 MMPs 可能藉由破壞血管基底膜的方式來破壞 BBB。本研究結果顯示 albendazole 和安宮牛黃丸混合治療明顯地減少 CSF albumin 的濃度，然而，如果單獨使用 thalidomide 治療則只有部分減少。這些結

果顯示 CSF 的蛋白含量可能在嗜伊紅性腦膜炎中扮演了一個重要的指標。因此，治療可能藉由減輕 PAs/MMP-9 的活性及降低 CSF 的蛋白含量，減少 blood-CNS barrier 的破壞。

過去的研究顯示使用非類固醇類的抗發炎藥物也可能減輕腦膜炎的病徵。本研究使用 albendazole 和安宮牛黃丸混合治療罹患嗜伊紅性腦膜炎的 BLAB/c 小白鼠，結果顯示 albendazole 和安宮牛黃丸混合治療的組別明顯地減少蟲回收數及 eosinophil 數量。這些結果顯示 albendazole 和安宮牛黃丸混合治療的新療法可能提供治療寄生蟲性腦膜炎的新方法。

參考文獻

Alicata, J. E. 1965. Biology and distribution of the rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*, and its relationship to

eosinophilic meningoencephalitis and other neurological disorders of man and animals. *Advances in parasitology* 3, 223-248.

Beutler, B., and van Huffel, C. 1994.

Unraveling function in the TNF ligand and receptor families (comment). *Science* 264, 667-668.

Chen, K. M., Lee, H. H., Lu, K. H., Tseng, Y.

K., Hsu, L. S., Chou, H. L., and Lai, S. C.

2004. Association of matrix

metalloproteinase-9 and Purkinje cell

degeneration in mouse cerebellum caused

by *Angiostrongylus cantonensis*.

International Journal for Parasitology 34,

1147-1156.

Cossins, J. A., Clements, J. M., Ford, J.,

Miller, K. M., Pigott, R., Vos, W., Van der

Valk, P., de Groot, C. J. 1997. Enhanced

- expression of MMP-7 and MMP-9 in demyelinating multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathologica* 94, 590-598.
- Gardiner, C. H., Well, S., Gutter, A. E., Fitzgerald, L., Anderson, D. C., Harris, R. K., and Nichols, D. K. 1990. Eosinophilic meningocephalitis due to *Angiostrongylus cantonensis* as the cause of death in captive non-human primates. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 4, 70-74.
- Han, Y., Weiman, S., Boldogh, I. 1999. Tumor necrosis factor-alpha-inducible I kappa proteolysis mediated by cytosolic m-calpain. A mechanism parallel to the ubiquitin-proteasome pathway for nuclear factor-kappa B activation. *Journal of Biological Chemistry* 274, 787-794.
- Hsu, W. T., Chen, J. Y., Chien, C. T., Chi, C. S., and Han, N. T. 1990. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *Pediatric Infectious Disease Journal* 9, 443-445.
- Hwang, T. P., and Chen, E. R. 1988. *Angiostrongyliasis (Angiostrongylus cantonensis): Handbook of Clinical Neurology ; 8: (52): Microbial Disease* (Harris, A. A. Ed.) 545-562. Elsevier Science Publishers B. V.
- Hwang, K. P., Hwang, A. L., Hsieh, H. C., Liu, K. M., and Chen, S. C. 1993. Ultrastructural findings of mice brain infected with *Angiostrongylus cantonensis*. pp. 34-37. *Scientific Program and Abstracts of the 9 Annual Meeting of the Chinese Society of Parasitology*
- Ismail, Y., and Arsura, E. L. 1993.

- Eosinophilic meningitis. *Western Journal of Medicine* 159, 623.
- Kolb, S. A., Lahrtz, F., Paul, R., Leppert, D., Nadal, D., Pfister, H. W. 1998. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in viral meningitis: upregulation of MMP-9 and TIMP-1 in cerebrospinal fluid. *Journal of Neuroimmunology* 84, 143-150.
- Lai, S. C., Twu, J. J., Jiang, S. T., Hsu, J. D., Chen, K. M., Chiaing, H. C., Wang, C. J., and Lee, H. H. 2004. Induction of matrix-metalloproteinase-9 in the pathogenesis of eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *Annals of Tropical and Medicine and Parasitology* 98, 715-724.
- Lan, K. P., Wang, C. J., Lai, S. C. Chen, K. M., Lee, S. S., Hsu, J. D., and Lee, H. H. 2004. The efficacy of therapy with albendazole in mice with parasitic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *Parasitology Research*. 93, 311-317.
- Lucey, D. R., Clerici, M., and Shearer, G. M. 1996. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clinical Microbiology Review* 9, 532-562.
- Maisonneuve, H., Rossignol, J. F., Addo, A., Mojon, M., 1985. Ovicidal effects of albendazole in human ascariasis, ancylostomiasis and trichuriasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 79, 79-82.
- Matsuura, E., Umehara, F., Hashiguchi, T., Fujimoto, N., Okada, Y., and Osame, M. 2000. Marked increase of matrix

- metalloproteinase 9 in cerebrospinal fluid of patients with fungal or tuberculous meningoencephalitis. *Journal of the Neurological Sciences* 173, 45-52.
- Nagata, S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell*. 88, 355-365.
- Paul, R., Lorenzl, S., Koedel, U., Sporer, B., Vogel, U., Frosch, M., and Pfister, H. W. 1998. Matrix metalloproteinases contribute to the blood-brain barrier disruption during bacterial meningitis. *Annals of Neurology* 44, 592-600.
- Pene, P., Mojon, M., Garin, J. P., Coulaud, J. P., and Rossignol, J. F. 1982. Albendazole: a new broad spectrum anthelmintic. Double-blind multicenter clinical trial. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 31, 263-266.
- Perez, O., Capron, M., Lastre, M., Venge, P., Khalife, J., and Capron, A. 1989. *Angiostrongylus cantonensis*: role of eosinophils in the neurotoxic syndrome (Gordon-like phenomenon). 68, 403-413.
- Sasaki, O., Sugaya, H., Ishida, K. and Yoshimura, K. 1993. Ablation of eosinophils with anti-IL-5 antibody enhances the survival of intracranial worms of *Angiostrongylus cantonensis* in the mouse. *Parasite Immunology* 15, 349-354.
- Tsai, H. C., Lee, S. S. J., Huang, C. K., Yen, C. M., Chen, E. R., and Liu, Y. C. 2004. Outbreak of eosinophilic meningitis associated with drinking raw vegetable juice in Southern Taiwan. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 71, 222-226.
- Venkatesan, P., 1998. Albendazole. *Journal*

- of Antimicrobial Chemotherapy* 41, 145-147.
- Wang, X. R., Wu, Y. K., and Miao, H. 1994. Traditional Chinese medicine and Western medicine treatment for severe intractable head injury. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 14, 349-351.
- Yii, C. Y. 1976. Clinical observations on eosinophilic meningitis and meningoencephalitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* on Taiwan. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 25, 233-249.
- Yong, V. W., Krekoski, C. A., Forsyth, P. A., Bell, R., and Edwards, D. R. 1998. Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. *Trends in Neurosciences* 21, 75-80.
- Yoshimura, K. 1993. Mechanism of parasite killing by eosinophils in parasitic infections. *Nippon Rinsho* 51, 657-663.

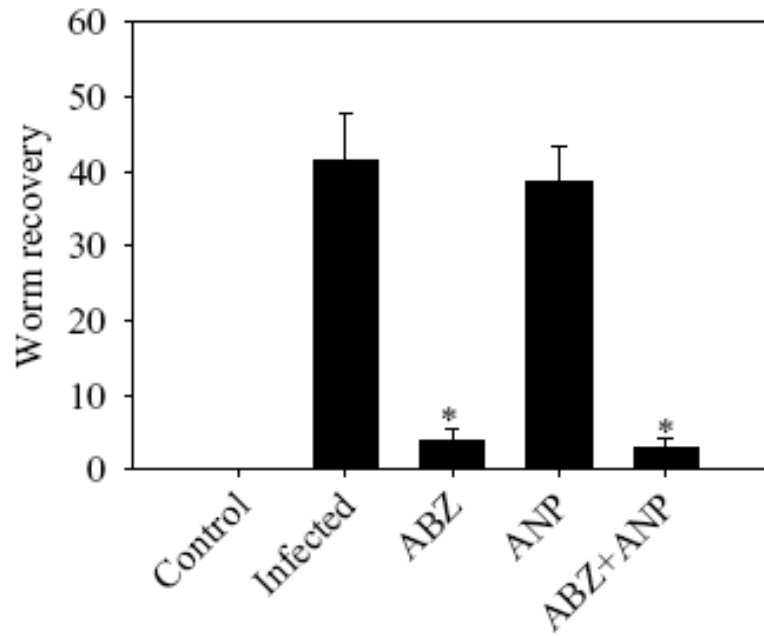


FIG. 1. Influence of treatment on larvae recovery. Following treatment on day 5 PI, the numbers of recovered larvae were significantly decreased ($*P<0.05$) by albendazole (ABZ) alone or by albendazole- Angong Niu Huang Pill (ABZ+ANP) co-therapy, compared with infected-untreated mice. No significant difference ($P>0.05$) in worm recovery was observed between infected-untreated mice and Angong Niu Huang Pill (ANP) treated mice.

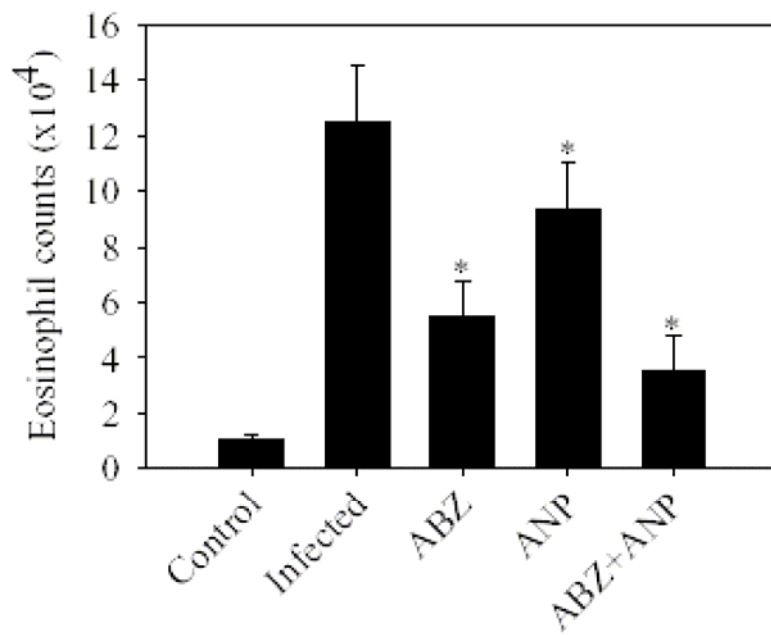


FIG. 2. Influence of treatment on eosinophil counts. The CSF eosinophils were significantly increased in CSF of mice infected with *Angiostrongylus cantonensis* compared with uninfected control. Eosinophils were significantly reduced ($*P < 0.05$) by albendazole alone 、 Angong Niu Huang Pill (ANP) alone or albendazole- Angong Niu Huang Pill (ABZ+ANP) co-therapy.

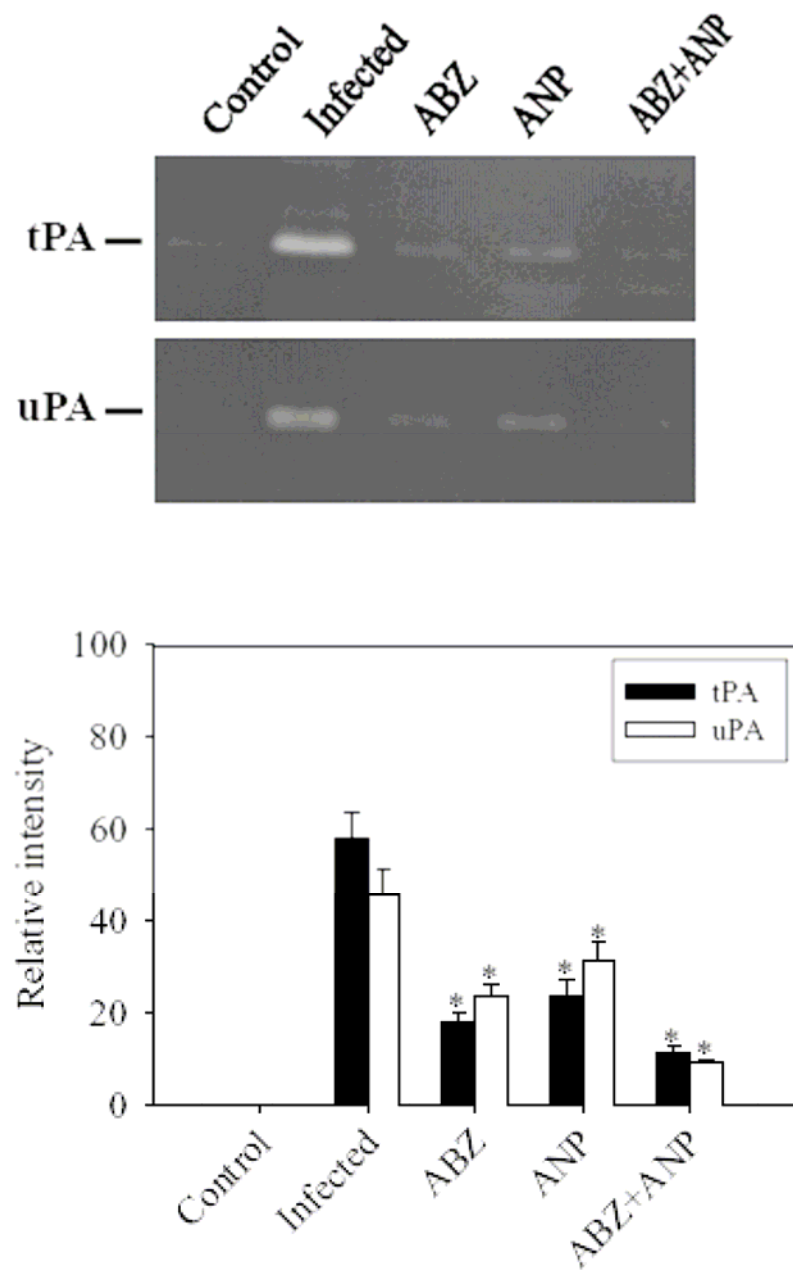


FIG. 3. Influence of treatment on tPA and uPA activity. (a) Treatment on day 5 PI, the activities of tPA and uPA were significantly reduced ($*P < 0.05$) by the individual use of albendazole (ABZ) 、 Angong Niu Huang Pill (ANP) or albendazole- Angong Niu Huang Pill (ABZ+ ANP) co-therapy. Quantitative analysis of the caseinolytic enzyme was performed with a computer-assisted imaging densitometer system.

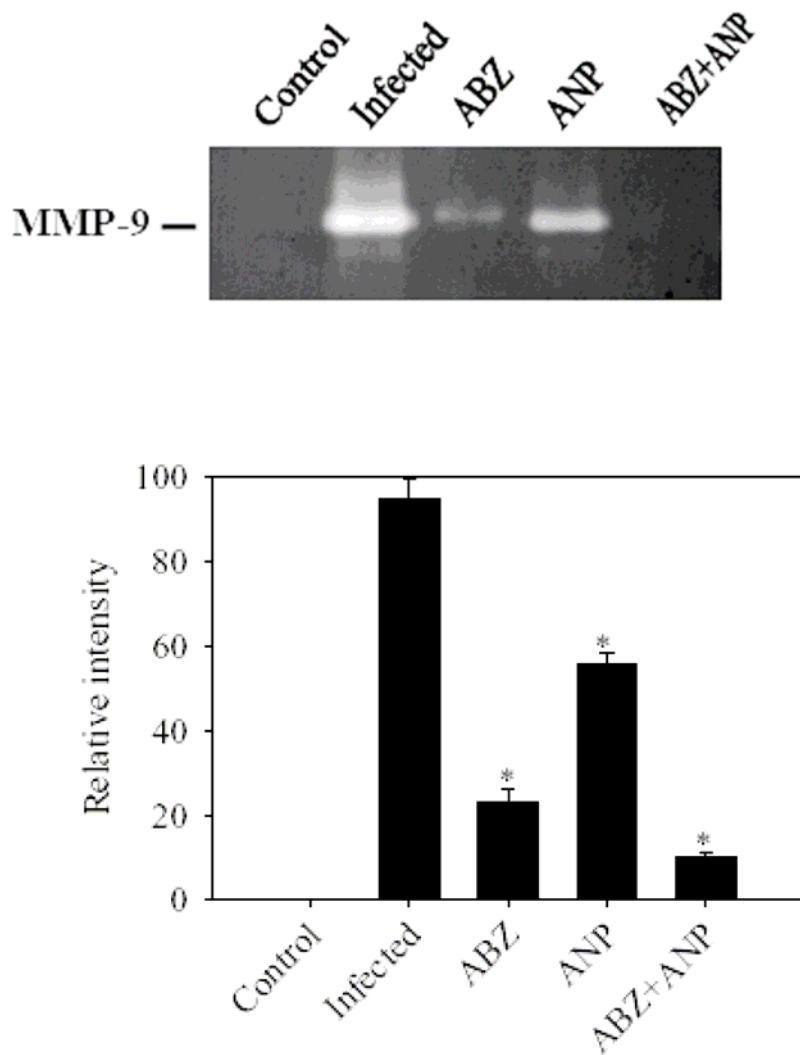


FIG. 4. Influence of treatment on MMP-9 activity. Treatment on day 5 PI, MMP-9 activity was significantly reduced after albendazole (ABZ) treatment alone, Angong Niu Huang Pill (ANP) only or albendazole- Angong Niu Huang Pill (ABZ-ANP) co-therapy. Quantitative analysis of the caseinolytic enzyme was performed with a computer-assisted imaging densitometer system.