

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

驅蟲藥 albendazole 和薑黃素合併治療感染廣東住血線蟲  
小鼠之療效

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2314-B-040-028-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：中山醫學大學寄生蟲學科

計畫主持人：李秀雄

計畫參與人員：徐玲玉

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 11 月 2 日

# 行政院國家科學委員會專題研究計劃報告

驅蟲藥 albendazole 和薑黃素合併治療感染廣東住血線蟲  
小鼠之療效

The efficacy of albendazole and curcumin against *Angiostrongylus  
cantonensis* infection in mice

計劃編號：NSC 92-2314-B-040-028

執行期限：92/8/01-93/7/31

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

## 壹、中文摘要

間質蛋白分解酵素-9 之活性與調控血腦障壁的開啟及免疫細胞的轉移進入中樞神經系統扮演重要之角色，先前的研究已發現在感染廣東住血線蟲的 ICR 小鼠腦部組織會有 Matrix metalloproteinases 家族中間質蛋白分解酵素-9 之表現，因此，間質蛋白分解酵素-9 被認為參與廣東住血線蟲感染造成的腦膜炎，雖然目前已有一些驅蟲藥可用於治療此寄生蟲病，但卻無法完全控制死亡蟲體引起免疫反應造成腦部之損傷。薑黃素是一種天然物，具有抗發炎、抗氧化和抗癌之特性，薑黃素可以抑制間質蛋白分解酵素-9 分泌以達到抗癌效果。因此，本研究主要探討以驅蟲藥 albendazole 配合薑黃素合併治療感染廣東住血線蟲之小鼠，我們期望合併藥物之治療能改善因感染廣東住血線蟲引發所造成的腦部傷害及神經病變。

結果發現，薑黃素可以減少血液和腦脊髓液嗜酸性白血球和蟲體的回收數以及稍微減少間質蛋白分解酵素-9 之表現，合併驅蟲藥 albendazole 和薑黃素可以完全治癒感染廣東住血線蟲之小鼠；因此，我們的結論是天然物薑黃素能有效抑制嗜酸性白血球和間質蛋白分解酵素-9 之表現，若合併驅蟲藥 albendazole 和薑黃素更能達到最佳效果。

關鍵詞：廣東住血線蟲；寄生線蟲；嗜伊紅性腦膜炎；間質蛋白分解酵素；薑黃素；Albendazole

## Abstract :

The matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) plays an important role in controlling the opening of the blood

brain barrier, and the transfer and entry of the immune cells into the CNS. Previous studies have already discovered the presence of MMP-9 in the brain of infected ICR mice and MMP-9 is related to meningitis caused by infection of *Angiostrongylus cantonensis*. Although some chemotherapy agents used for treating this parasite disease, can't control the immune response completely. A nature product, curcumin, which has the effects of anti-inflammation, and anti-carcinogenesis, can inhibit MMP-9 secretion to achieve anti-carcinogenesis. The study is designed to the therapy of combination of albendazole and curcumin to treat the mice infected by *Angiostrongylus cantonensis*. The implication of insect repellent albendazole and anti-inflamed drug curcumin can inhibit the secretion of MMP-9 in order to achieve the improvement of brain damage and nerve disorders caused by *Angiostrongylus cantonensis* infection. The result of our study shows that curcumin may reduce the number of eosinophils in blood and CSF, the MMP-9 expression in the brain and worm recovery of mice infected by *Angiostrongylus cantonensis*. The infected mice were cured after treatment of albendazole in combined of curcumin. In conclusion, curcumin can inhibit the expression of MMP-9 and eosinophil, the better effect had been found if combined with albendazole in treatment.

Keywords: *Angiostrongylus cantonensis*; parasitic nematode; eosinophilic

meningitis; matrix metalloproteinase -9 ;  
curcumin; Albendazole.

## 貳、緣由與目的

廣東住血線蟲為台灣本土性的寄生蟲，自從 1944 年發現第一個感染廣東住血線蟲的人體死亡病例後，這種對太平洋許多島嶼及東南亞國家居民引起嗜伊紅性腦膜炎之寄生蟲病受到很大的重視，在台灣，每年都有病例發生，為台灣非常重要之人畜共通寄生蟲病之一。廣東住血線蟲主要侵犯人類中樞神經系統(CNS)，是引起嗜酸性腦膜炎(eosinophilic meningitis)或嗜酸性腦膜腦炎(eosinophilic meningoencephalitis)的主要原因，對人類性命造成嚴重威脅。病理變化特徵是，(1)腦脊髓液(CSF)及末梢血液的嗜酸性白血球(Eosinophils)增加，(2)腦部嗜酸性白血球(Eosinophils)、及淋巴球浸潤等發炎反應，(3)血腦障壁(BBB)破壞，(4)神經細胞脫髓鞘(demyelination)及小腦(cerebellar)浦金氏細胞(purkinje cells)損傷、出現空泡等。常見症狀有頭痛、痙攣、四肢無力、噁心、嘔吐、顏面麻痺及發燒等，有時會出現頸部僵直、視覺障礙及昏迷等神經症狀。

廣東住血線蟲造成的腦膜炎致病機轉尚不十分清楚，蟲體移行造成的機械傷害及嗜伊紅性白血球所釋放的神經毒素皆被認為與其致病機轉有關，但詳細機制仍不清楚。在我們之前的實驗中發現於廣東住血線蟲感染的鼠腦組織中出現大量的間質蛋白分解酵素 9 (MMP-9)，此酵素在正常鼠腦中並不出現，且此酵素主要位於血管的基底膜以及浸潤於腦中的巨噬細胞。而目前已知在組織發炎及修復的過程中，間質蛋白分解酵素扮演極重要的角色，包括分解血管基底膜及間質結締組織，而近年來也發現在許多神經退化性疾病，如多發性硬化症(multiple sclerosis)及阿滋海默症(Alzheimer's disease)的致病機轉中，間質蛋白分解酵素也扮演極重要的角色，與神經細胞的死亡有關。因此我們認為間質蛋白分解酵素-9 參與廣東住血線蟲感染造成的腦損傷。

薑黃素(curcumin)來自於薑黃(curcuma)，是一種源自古印度的神秘植物，數千年來被用來當作藥引，具有多種神奇的功効研究，計有千餘篇的研究報告。薑黃素(curcumin 化學名 diferuloyl methane)屬於 polyphenol，即是鬱金粉中之主要活性及黃色色素成份。被廣泛使用於創傷、寄生蟲

感染和皮膚疾病等方面。許多研究顯示薑黃素具有抗炎特性，能夠抑制白血球的致炎作用與自由基的生成，另外，薑黃素亦具有很強的抗氧化作用和清除自由基的能力；薑黃素也被研究出可以抑制代謝活化作用及促進致癌物質的去毒作用。而薑黃素與 MMPs 之相關性在 1998 年 Lin 等發現薑黃素抑制癌細胞轉移之機轉，是由於抑制癌細胞 MMP-9 之分泌；1999 年 Rajakrishnanc 和 2001 年 Giselle 也分別提出薑黃素可保護酒精所造成的腦部傷害，及減少阿滋海默症對腦部的傷害。2000 年 Mohan 等人也證明薑黃素在血管生成活性之抑制可經由抑制 MMP-9 之表現；2002 年，Mukhopadhyay 等，提出薑黃素抑制癌細胞之新機轉，他們的實驗證明了薑黃素與細胞週期之關係；2003 年 Shishodia 等人也提出薑黃素可經由抑制 COX-2, MMP-9 和 cyclin D1 的表現來降低吸煙所引起 NF- $\kappa$ B 的活性；整體的結果顯示 curcumin 具有抗發炎、抗氧化和抗癌之特性，且不具有一般發炎藥物之副作用。

在 90 年的國科會計劃(The role of matrix-metalloproteinase in pathogenesis of parasitic meningitis)中，在感染廣東住血線蟲之小鼠腦部均質液以 gelatin zymography，及 Western blotting 分析發現有間質蛋白酵素-9 的活性，以 immunohistochemistry 偵測發現間質蛋白酵素-9 在浸潤於腦膜下的巨噬細胞及外腦膜血管壁上堆積了許多間質蛋白酵素-9。

本計劃將以驅蟲藥 albendazole 治療蟲體之療效配合薑黃素在抗發炎、抗氧化和抗癌之特性合併治療；期望能改善因感染廣東住血線蟲所引發之腦膜炎造成的腦部病變和神經傷害。

## 材料與方法

### 一、廣東住血線蟲第三期幼蟲之收集

1. 由實驗室感染廣東住血線蟲之保種大白鼠，收集糞便中第一期幼蟲。

2. 直接將第一期幼蟲感染實驗室飼養之大型扁捲螺。

將感染廣東住血線蟲之大型扁捲螺直接搗碎

以 1:30 比例加入人工胃蛋白酶消化液。

以磁性攪拌子於 37 之恆溫箱 均勻攪拌消化 2 小時。

以雙紗布濾去雜質，加入生理食鹽水稀釋並靜置。

每隔 30 分鐘到去約一半的上清液。

再加入生理食鹽水稀釋靜置，重複至完全清澈為止。

以滴管吸取下層之沈澱物，置於玻璃皿中。

置於解剖顯微鏡下，觀察並吸收取 L3 幼蟲。

每 30 隻 L3 幼蟲為一單位，置於玻璃皿中。

## 二、動物感染：

自國科會國家實驗動物繁殖及研究中心購買四週齡雄性小白鼠 (BALB/c strain)。感染前飼養於動物中心一週，並維持在 12 小時亮及 12 小時暗的動物飼養中心。在感染前 12 小時均給予禁水、禁食，每隻小白鼠以口餵管分別灌入 40 隻第三期幼蟲 (L3)，於感染後 12 小時再恢復其供水、供食。

## 藥物治療：

感染前三天將實驗動物分五組，每組五隻小白鼠。

(1). 對照組：不感染、不治療，餵予一般飼料。

(2). 感染組：感染 40 隻第三期幼蟲，不治療。

(3). Albendazole 治療：在感染第五天，以口餵管給予 albendazole 每天每公斤 10 毫克之劑量治療十四天。

(4). Curcumin 治療：感染當天，分別開始餵食含有 20mM 薑黃素之飼料至感染後二十天。

(5). 20mM 薑黃素合併 albendazole 治療：感染當天，開始餵食含有 20mM 薑黃素之飼料至感染後二十天。另外在感染第五天，以口餵管給予 albendazole 每天每公斤 10 毫克之劑量治療十四天。

## 三、血球計數及蟲體回收數：

動物犧牲時，收集全血，計算白血球及嗜伊紅性白血球數目，接著將腦蓋剝開，取出腦置於培養皿中，將腦膜剝離，以 1ml PBS 沖洗，收集此液作為腦脊髓液，計算白血球和嗜伊紅性白血球數目，接著以解剖顯微鏡將蟲體挑出，計算其數目。

## 四、收集腦脊髓液及均質腦部組織分析 MMP-9 之活性

### Gelatin zymography

1、膠體的配製法(Gel Preparation)  
同 SDS-PAGE，不同的是 Separating Gel 加入 0.1% 的 Gelatin。

2、0.1%Gelatin SDS-PAGE 電泳後 gel 之處理：

取下 gel，加入 100ml Washing buffer 再洗一次。

在室溫下搖動 30 分鐘，換

Washing buffer 再洗一次。

倒掉 Washing buffer, gel 以 dH<sub>2</sub>O washing。

加入 200ml Reaction buffer (40mM Tris-HCL, pH8.0, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 0.01%NaN<sub>3</sub>)。

Incubation at 37 °C，搖動 12 小時以上。

stain gel with Staining solution (0.25% Coomassie Blue R250, in 50%MeOH, 10%Acetic acid), for 1 hr。

Destain gel with Destaining solution (20%Methanol 10%Acetic acid)。

取膠片以密度掃描儀量化結果。

## 參、結果

Gelatin zymography 分析結果顯示感染廣東住血線蟲的腦組織其間質蛋白酵素-9 表現量明顯增加，經合併 albendazole 及薑黃素治療的腦組織並沒有 MMP-9 表現，單獨 Albendazole 治療可完全抑制間質蛋白酵素-9 之表現，只給予薑黃素治療有稍微抑制間質蛋白酵素-9 之分泌(Fig1)。血球計數結果發現廣東住血線蟲感染的小鼠週邊血液和腦脊髓液白血球和嗜伊紅性白血球明顯增加，以 albendazole 合併薑黃素治療可完全降低白血球和嗜伊紅性白血球的數目，單獨 albendazole 或薑黃素治療也會減少週邊血液和腦脊髓液白血球和嗜伊紅性白血球，其中薑黃素的效果比驅蟲藥 albendazole 為佳(Fig2-5)。此結果顯示經治療後可減少發炎細胞的數目。腦部蟲體回收結果以 albendazole 合併薑黃素治療可以有完全之驅蟲效果，單獨以 albendazole 治療驅蟲效果也可達到 98%，單獨以薑黃素治療驅蟲效果雖然沒有顯著差異，但是蟲體回收數有減少現象(Fig 6)。

## 肆、討論

間質蛋白分解酵素-9 確實與廣東住血線蟲造成的嗜伊紅性腦膜炎有密切的相關性。過去的研究發現薑黃素抑制癌細胞轉移之機轉，是由於抑制癌細胞 MMP-9 之分泌；在血管生成活性之抑制可經由抑制 MMP-9 之表現；薑黃素可經由抑制 COX-2, MMP-9 和 cyclin D1 的表現來降低吸煙所引起 NF- $\kappa$ B 的活性；其也可保護因酒精所造成的腦部傷害，及減少阿滋海默症對腦部的傷害。整體的結果顯示薑黃素具有抗發炎、抗氧化和抗癌之特

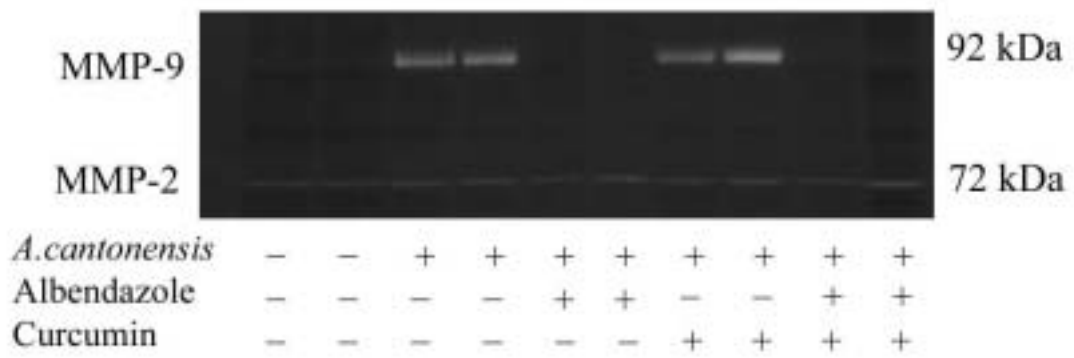
性，且不具有一般發炎藥物之副作用。本研究以具有抑制間質蛋白酵素-9 效果之抗發炎藥物薑黃素治療廣東住血線蟲感染小鼠所引起之腦膜炎，結果顯示可以明顯減少腦脊髓液白血球和嗜伊紅性白血球，使症狀減輕。對於廣東住血線蟲感染的病人，蔡等人(2001)的研究建議以 albendazole 及類固醇混合來治療，然而類固醇雖然可以控制廣東住血線蟲感染造成的腦膜炎及蟲體被殺死後引起的發炎反應，但是類固醇的使用仍然備受爭議。本研究以天然物薑黃素取代類固醇，避免一般發炎藥物的副作用；本研究的結果顯示 albendazole 可以殺死蟲體，而薑黃素可以減輕發炎反應，因此以 albendazole 合併薑黃素治療廣東住血線蟲的感染是可得最佳治療效益。

#### 伍、參考文獻

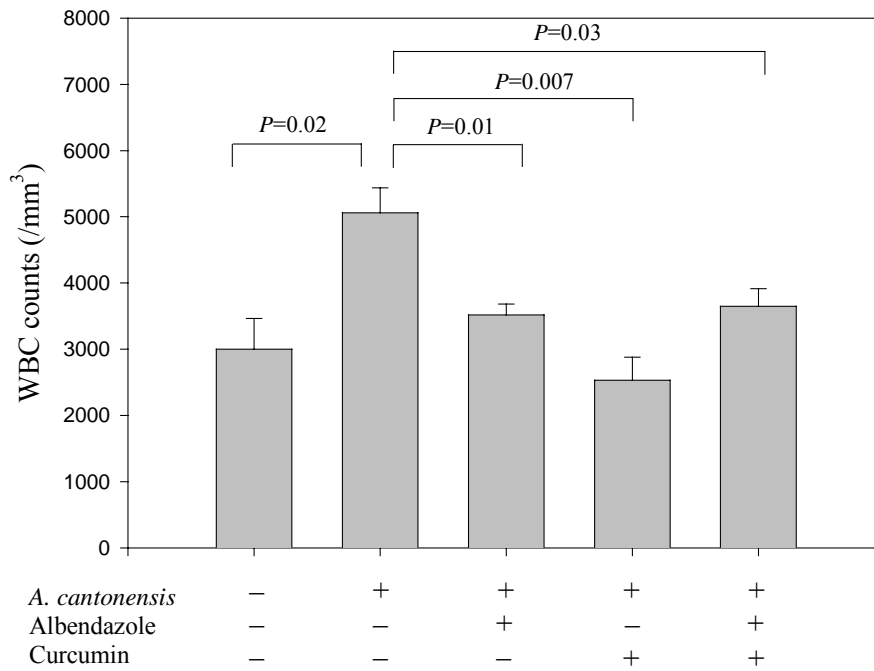
1. Alicata JE.(1965)Biology and distribution of the rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis* and its relationship to eosinophilic meningoencephalitis and other neurological disorders of man and animals. In: Advances in parasitology. (Dawes, B. etal), Academic press, London and New york,223-248.
2. Chen ER.(1979) Angiostrongyliasis and eosinophilic meningitis on Taiwan: a review. In: Cross JH. (Ed.), Studies on Angiostrongyliasis in Eastern Asia and Australia. Taipei, Taiwan, U.S. Naval Medical Research Unit No.2, NAMRU-2-SP-44,57-73.
3. Wittonpanich R, Chuahirun S, Soranasaporn S,and Rojanasunan P, (1991) Eosinophilic myelomeningoencephalitis cause by *Angiostrongylus cantonensis* a report of three cause. Southeast Asian J.Trop.Med.& Pub.Heal.,22:262-267.
4. Hwang KP, Chen ER, and Chen TS, (1994) Eosinophilic meningitis and meningoencephalitis in children. Acta Paediatrica Scandinavica ,35:124-135.
5. Hwang KP, Hwang AL, Hsieh HC, Liu KM, and Chen SC, (1993) Urtastructural findings of mice brain infected with *Angiostrongylus cantonensis*. Scientific Program and Abstracts of the 9 Annual Meeting of the Chinese Society of Parasitology, December 3-4:37.
6. Hung TP, and Chen ER, (1988) Angiostrongyliasis (*Angiostrongylus cantonensis*); Handbook of Clinical Neurology; 8:52): microbial Disease,545-562.
7. Aldape K, Huizinga H, BOuvier J, and Mckerrow J. (1994) Naegleria fowleri: characterization of a secreted histolytic cysteine protease. Experimental Parasitology, 78:230-41.
8. Matrisian LM, (1990) Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. Trends Genet., 6:(4):121-125
9. Blood CH, and Zetter BR. (1990) Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. Biochim. Biophys. Acta., 1032(1): 89-118.
10. Paul R, Lorenzl S, Koedel U, Sporer B, Vogel U, Frosch M, Pfister HW. (1998) Matrix metalloproteinases contribute to the blood-brain barrier disruption during bacterial meningitis. Ann. Neurol.,44(4):592-600.
11. Mun-Bryce S, Rosenberg GA. (1998)Gelatinase B modulates selective opening of the blood-brain barrier during inflammation. Am. J. Physiol., 274(5 Pt 2): R1203-R1211.
12. Leppert D, Ford J, Stabler G, Grygar C, Lienert C, Huber S, Miller KM, Hauser SL, Kappos L,(1998) Matrix metalloproteinases-9 (gelatinase B) is selectively elevated in CSF during relapses and stable phases of multiple sclerosis. Brain,121(pt 12 ):2327-2334.
13. Kieseier BC, Clements JM, Pischel HB, Wells GM, Miller K, Gearing AJ, Hartung HP.(1998) Matrix metalloproteinases MMP-9 and MMP-7 are expressed in experimental autoimmune neuritis and Guillain-Barre syndrome. Ann.Neurol.,43(4):427-434.
14. Siebert H, Dippel N, Mader M, Weber F, Bruck W.(2001) Matrix metalloproteinases expression and

- inhibition after sciatic nerve axotomy. *J. Neuropathol. Exp. Neuro.* 1, 60(1):85-93.
15. Fayyazi A, Schweyer S, Eichmeyer B, Herms J, Hemmerlein B, Radzun HJ, Berger H. (2000) Expression of IFN $\gamma$ , coexpression of TNF $\alpha$  and matrix metalloproteinases and apoptosis of T lymphocytes and macrophages in granuloma annulare. *Arch. Dermatol. Res.*, 292(8):384-90.
  16. Mun-Bryce S, Rosenberg GA. (1998) Gelatinase B modulates selective opening of the blood-brain barrier during inflammation. *Am J Physiol: May*; 274(5 Pt 2):R1203-11.
  17. William Allen Banks. (2001) Anorectic effects of circulating cytokines: role of the vascular blood-brain barrier. *Nutrition*: 17:434-437.
  18. Srivastava R. (1989) Inhibition of neutrophil response by curcumin. *Agent and action*, 28:298-303.
  19. Lin LI, Ke YF, Ko YC, LIN JK. (1998) Curcumin inhibits SK-Hep-1 hepatocellular carcinoma cell invasion in vitro and suppresses matrix metalloproteinase-9 secretion. *Oncology*, 55(4):349-53.
  20. Mohan R, Sivak J, Ashton P, Russo LA, Pham BQ, Kasahara N, Raizman MB, Fini ME. (2000) Curcuminoids inhibit the angiogenic response stimulated by fibroblast growth factor-2, including expression of matrix metalloproteinase gelatinase B. *J. Biol. Chem.*, 275(14) 10405-12
  21. Mukhopadhyay A, Banerjee S, Stafford LJ, Xia C, Liu M and Aggarwal BB. (2002). Curcumin-induced suppression of cell proliferation correlates with down-regulation of cyclin D1 expression and CDK4-mediated retinoblastoma protein phosphorylation. *Oncogene*, 21:8852-8861.
  22. Tsai TH, Liu YC, Wann SR, Lin WR, Lee SSJ, Lin HH, Chen YS, Yen MY, and Yen CM. (2001) An outbreak of meningitis caused by

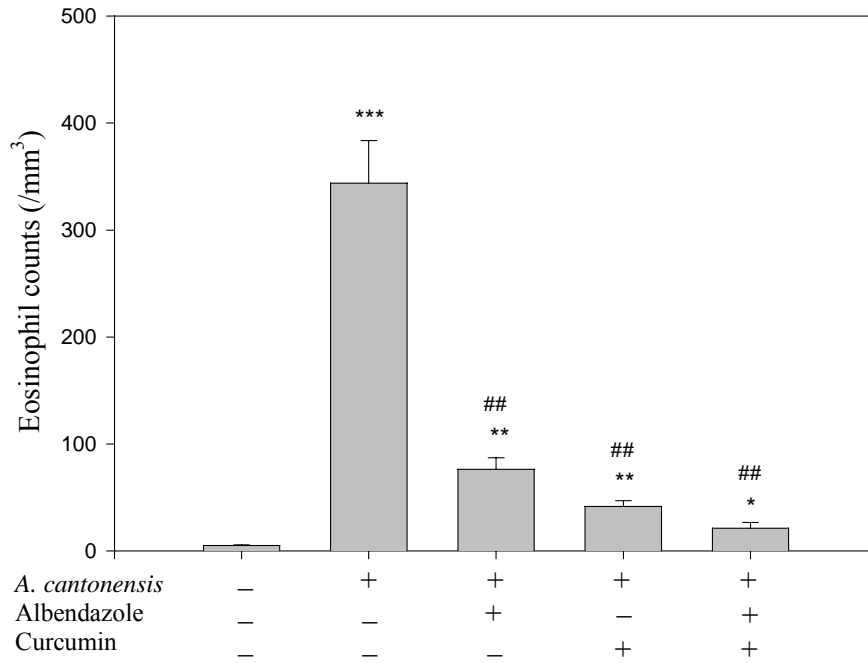
*Angiostrongylus cantonensis* in Kaohsiung. *Journal of Microbiology Immunology Infection*. 34: 50-56.



**Fig. 1 Gelatin zymography analysis of MMP**

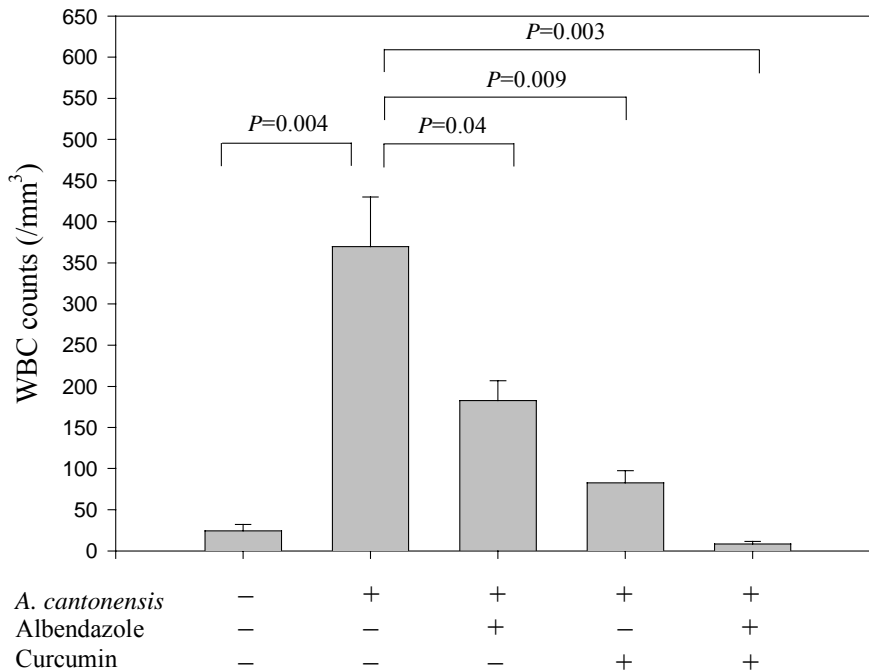


**Fig. 2 The number of white blood cells in blood**



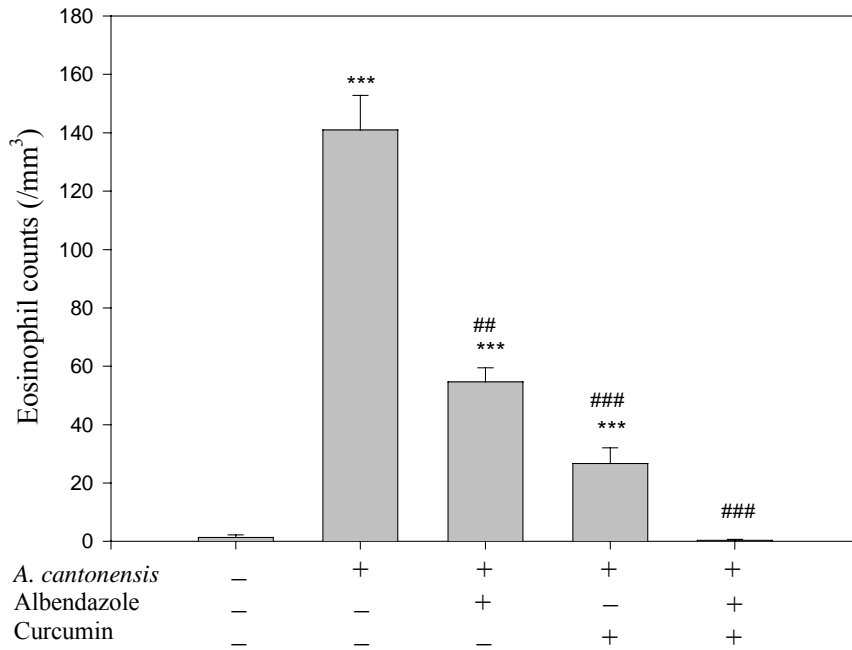
**Fig. 3 The number of eosinophils in blood**

\*\*\*Refers to a significant difference while compared to that of control subjects ( $p < 0.001$ ). #### Refers to a significant difference while compared to that of mice infected by *Angiostrongylus cantonensis* ( $p < 0.001$ )



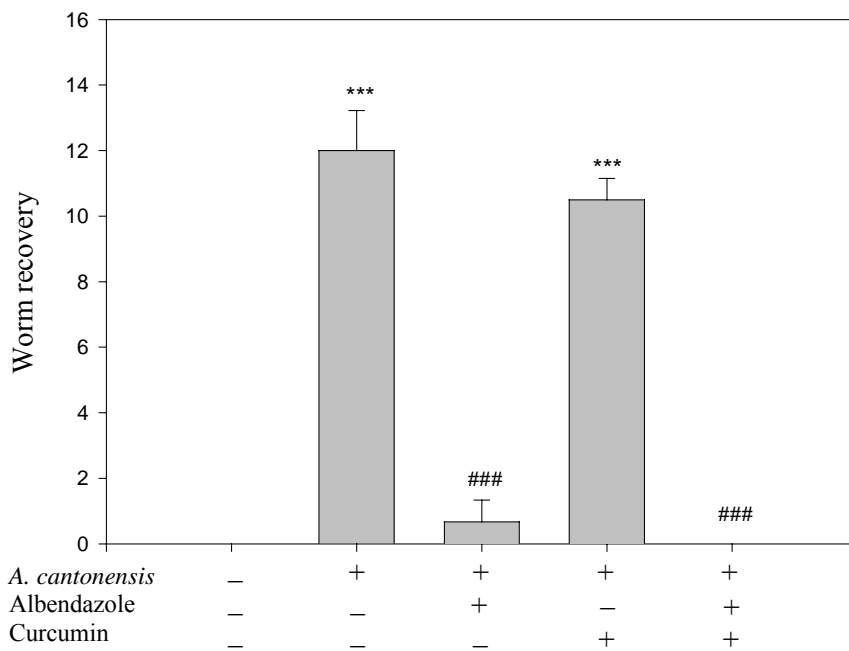
**Fig. 4 The number of white blood cells in CSF**





**Fig. 5 The number of eosinophils in CSF**

\*\*\*Refers to a significant difference while compared to that of control subjects ( $p < 0.001$ ). ### Refers to a significant difference while compared to that of mice infected by *Angiostrongylus cantonensis* ( $p < 0.001$ )



**Fig. 6 Recovery of *A. cantonensis* worm in the brain of mice**

\*\*\*Refers to a significant difference while compared to that of control subjects ( $p < 0.001$ ). ### Refers to a significant difference while compared to that of mice infected by *Angiostrongylus cantonensis* ( $p < 0.001$ )