

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

Neuroserpin 對廣東住血線蟲引起嗜伊紅性腦膜炎之小白鼠 血液-中樞神經系統障壁損害之影響 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 98-2320-B-040-003-
執行期間：98年08月01日至99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
計畫參與人員：博士班研究生-兼任助理人員：邱秉松

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 99年09月06日

成果報告書

Neuroserpin 對廣東住血線蟲引起嗜伊紅性腦膜炎之小鼠血腦障壁損害之

影響

Neuroserpin affect blood-central nervous system barrier breakdown with
eosinophilic meningitis of mice caused by *Angiostrongylus cantonensis*

目 錄

中文摘要	2
英文摘要	3
文獻探討	5
研究方法	9
研究結果與分析	14
討論	17
結論與建議	20
參考文獻	21
圖、表	29

中文摘要

關鍵詞：廣東住血線蟲；嗜伊紅性腦膜炎；血纖維蛋白酶原活化因子

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，其有 tissue-type plasminogen activator (tPA)和 urokinase-type plasminogen (uPA)兩種可將血纖維蛋白酶原活化為血纖維蛋白酶，血纖維蛋白酶會分解細胞外質(extracellular matrix)，增加血腦障壁(blood-brain barrier, BBB)的通透性。在細菌、病毒、黴菌及寄生蟲引起的腦膜炎顯示腦脊髓液(cerebrospinal fluid, CSF) PAs 增加。在許多的病理生理的過程中 Neuroserpin 可經由抑制 PAs 的活性達到組織保護的作用。本研究顯示以功能與 Neuroserpin 相似之 PAs 抑制劑處理受廣東住血線蟲感染的鼯鼠可明顯減少腦膜下免疫細胞的浸潤、CSF 與血清中 albumin 溶度的比值及 tPA 及 uPA 的蛋白質量及活性，以 Spearman's 相關性分析結果顯示 PAs 的活性與浸潤的嗜伊紅性白血球(eosinophil)數量及 CSF 與血清中 albumin 溶度的比值有高度的相關性。當廣東住血線蟲感染鼯鼠給予 albendazole 搭配 PAs 抑制劑混合治療時所偵測的指標比單獨給予 albendazole 或 PAs 抑制劑佳。因此，推測廣東住血線蟲感染鼯鼠時導致嗜伊紅性腦膜炎所造的 BBB 損害時使用 NS 或 PAs 抑制劑抑制 PAs 可降低 BBB 的損傷，在治療廣東住血線蟲感染時可使用 albendazole 搭配 PAs 抑制劑混合治療，此模式提供臨床上治療此症新的方針。

英文摘要

Keywords : Angiostrongylus cantonensis; neuroserpin; blood-brain barrier; plasminogen activators

Plasminogen activators (PAs) are serine proteases that convert the zymogen, plasminogen, into the active serine protease, plasmin. There are two types-tissue-type PA (tPA) and urokinase-type PA (uPA). PAs have been identified as a mediator of brain inflammatory reaction. This enzyme play an essential role in the breakdown of the extracellular matrix macromolecules, blood-brain barrier (BBB) damage and induce neuro-inflammatory diseases. The level of PAs is measured in the CSF from patients with various meningitis including bacterial, viral or fungal meningitis. Our previous study showed that PAs were associated with eosinophilic meningitis and that the enzyme may be an useful marker for angiostrongyliasis meningitis. Neuroserpin recently identified inhibitor of PAs and was associated with a reduced BBB-leakage. The results show that the PAs inhibitor significantly decreased ($P<0.05$) CSF/serum albumin ratios, eosinophil counts and these assay indicators related significantly with uPA, tPA by Spearman's ranking correlation test in eosinophilic meningitis BALB/c mice. Furthermore, This study evaluates the curative effects of albendazole-PAs inhibitor co-therapy

significantly decreased ($P < 0.01$) CSF/serum albumin ratios, eosinophil counts, PAs protein levels, and PAs activity on eosinophilic meningitis in BALB/c mice. Therefore, we aimed at determining the mechanisms inhibition of PAs maybe protective BBB breakdown in angiostrongyliasis meningitis and albendazole-PAs inhibitor co-therapy is an effective approach for the treatment of parasitic meningitis.

文獻探討

廣東住血線蟲是一種寄生在大白鼠(Rat)肺動脈的線蟲，屬於人畜共通的寄生蟲(zoonotic parasites)，人類是由於吃蝸牛肉而意外感染(Alicata, 1965)。發育中的廣東住血線蟲幼蟲會侵入人類中樞神經系統(central nervous system)，造成血腦障壁(blood-brain barrier, BBB)破壞，神經細胞脫髓鞘(demyelination) (Hwang et al., 1993)及小腦浦金氏細胞(Purkinje cells)喪失、損傷、有空泡等(Perez et al., 1989; Yoshimura, 1993)。常見的症狀有頭痛、噁心、嘔吐、嗜睡及發燒等，有時會出現頸部強直、視覺障礙及昏迷等神經症狀(Hwang et al., 1993)，對人類性命會造成嚴重威脅。臨床上重要的特徵是引起嗜伊紅性腦膜炎(eosinophilic meningitis)或嗜伊紅性腦膜腦炎(eosinophilic meningoencephalitis)的主要原因(Hsu et al., 1990; Ismail and Arsura, 1993; Gardiner et al., 1990)。

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)，此活化因子可分為組織型血纖維蛋白酶原活化因子(tissue-type plasminogen activator, tPA)和尿激酶型血纖維蛋白酶原活化因子(urokinase-type plasminogen, uPA)兩種 (Vassalii et al., 1991)。在細菌感染時，有些致病性的細菌會影響哺乳動物體內的血纖維蛋白酶系統，經由與血纖維蛋白

酶系統交互作用調控促使細胞外基質分解有利於細菌的擴散及器關的侵入 (Lähteenmäki et al., 2005)。在蠕蟲方面，感染廣東住血線蟲的鼯鼠引發的嗜伊紅性腦膜腦炎的研究中，在感染組的中樞神經系統 PAs 的活性表現較未感染的鼯鼠有明顯增加且與造成血腦障壁的破壞及病理發展過程有關 (Hou et al., 2004; Chen et al., 2006)。在原蟲方面，uPA 與惡性瘧原蟲 (*Plasmodium falciparum*) 由侵入的紅血球中釋放出來有關 (Roggwiller et al., 1997)。

Neuroserpin (NS) 是屬於 serpin superfamily 的一員 (Osterwalder et al., 1996)，蛋白質分子量約 55-56kDa (Schrimpf et al., 1997)，在 cDNA 序列分析可知 NS 的功能為 serine proteinase inhibitor 特別是 tPA，NS 與 tPA 的結合力是 NS 與 uPA 的結合力的 20 倍，NS 在胚胎及成人的神經系統中有大量的表現，在卵巢和睪丸只有少量的表現，在腦部主要由神經細胞及神經膠質細胞 (glial cell) 所分泌 (Hasting et al., 1997; Krueger et al., 1997 Docagne et al., 1999; Osterwalder et al., 1998) 其主要的功能為 neurogenesis 和 plasticity (Osterwalder et al., 1996)，以組織免疫學的分析發現 NS 的表現分部在海馬體 (hippocampal)、皮質 (cortex) 及下視丘 (hypothalamus) 且與細胞外基質蛋白分解有關 (Hastings et al., 1997)。NS 參與許多的神經病變的病理機制如 cerebrovascular disease (Zhang et al., 2002)、癲癇 (epilepsy) (Yepes et al., 2002)、多發性硬化症 (multiple sclerosis) (Gveric et al., 2003) 和精神分

裂症(schizophrenia) (Hakak et al., 2001)，NS 在腦部受損的齧齒動物模型中，在受傷的腦部會有大量的表現，在給予外生性的 NS 可以經由抑制 tPA 的活性，另外可以減少 lamin 的降解及小神經膠質細胞(microglial)活化達到明顯的神經保護作用(Yepes et al., 2000; Cinelli et al., 2001)，當 NS 注射至 cisterna magna，NS 明顯的減少其所誘發 tPA 因而減少 BBB 損害(Zang et al., 2002)，另一方面，增加 NS 的表現可以減少 microglial 的活化及 tPA 和 uPA 的表現(Cinelli et al., 2001)，在許多的研究中發現在受傷的腦部 tPA 會過度表現若增加 NS 的表現使其與 tPA 達成一個平衡狀況下則可減少腦部的傷害(Yepes 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，妨礙蟲體生長發育，對多種線蟲的成蟲和幼蟲有殺滅作用(Venkatesan, 1998)。感染廣東住血線蟲之鼯鼠以驅蟲藥 albendazole 治療能有效殺死幼蟲，也能部份減少因蟲體死亡分解所引起之發炎反應(Lan et al., 2004)。

本研究擬以與 NS 具有相似功能的 PAs 抑制劑處理受廣東住血線蟲感染誘發嗜伊紅性腦膜腦炎的鼯鼠，藉由以組織學技術觀察腦部免疫細胞浸潤的狀況、CSF 中嗜伊紅性白血球數量及 CSF 與血清中 albumin 濃度比值來評估 BBB 損傷的情況，以 zymography 觀察 tPA 及 uPA 的活性，以

western blotting 偵測 tPA 及 uPA 蛋白的表現，以 Spearman's 相關性分析 PAs 的活性與浸潤的嗜伊紅性白血球數量及 CSF 與血清中 albumin 溶度的相關性，以證明 PAs 與 BBB 損傷的關係。另外，更進一步評估 PAs 抑制劑及 albendazole 與 PAs 抑制劑混合治療在廣東住血線蟲感染鼯鼠引起腦膜腦炎造成 BBB 損傷之保護效果，找出廣東住血線蟲感染時導致嗜伊紅性腦膜炎之治療機轉並提供做為治療的使用選擇。

研究方法

一. 廣東住血線蟲第三期幼蟲(AcL3)之收集:

大白鼠感染廣東住血線蟲後，糞便中會含廣東住血線蟲的第一期幼蟲(AcL1)，收集糞便中的 AcL1 感染水螺(*Biomphalaria glabrata*)，待 AcL1 發育至第三期幼蟲(AcL3)時，將水螺外殼碾碎，取其組織，剁碎。用組織均質器絞碎，以 1：30 (組織：消化液)比例加入人工胃蛋白酶消化液(pepsin, Sigma, USA)，以磁性攪拌子於 37°C 之恆溫箱中，均勻攪拌消化 2 小時。以雙層紗布濾去雜質，加入生理食鹽水稀釋並靜置，每隔 30 分鐘倒去約一半的上清液，再加入生理食鹽水稀釋靜置，重複上述步驟至完全清澈為止。以滴管吸取下層之沈澱物，置於玻璃皿中，在解剖顯微鏡下，觀察並吸取 AcL3。每 50 隻 AcL3 為一單位，置於玻璃培養皿中。

二、實驗動物

使用台灣國科會動物實驗中心五週大 BALB/c 品系公鼠，在動物中心老鼠餵食一次水並且養於光照 12 小時，黑夜 12 小時的光周期下。

三、動物感染與動物分組

總共 60 隻鼯鼠隨機分成五組，分別為控制組(control)，感染東住血線蟲組(infection)，感染東住血線蟲給予 albendazole 治療組(ABZ)，感染東住血線蟲給予 PAs 抑制劑處理組(PAI)，感染東住血線蟲給 albendazole 與 PAs 抑制劑混合治療組(ABZ+PAI)。鼯鼠在感染前 12 小時禁止餵食食物及水。除對照組外的鼯鼠分別在感染的第 0 天口服 60 隻廣東住血線蟲幼蟲，同時 PAs 抑制劑處理組開始注射 PAs 抑制劑，而給予 albendazole 治療組在感染後的第 5 天犧牲開始給藥連續治療 14 天。而控制組(control)只餵食水。所有實驗鼯鼠在感染後 25 天犧牲。

四、類腦脊髓液(cerebrospinal-like fluid)及血清(serum)的收集

將鼯鼠犧牲並且將其腦部取出放入直徑 35mm 培養皿中，頭腔及大腦腔室(側腦室，第三腦室，及第四腦室)以 1ml 的 0.15M 磷酸鹽類緩衝液 (phosphate buffered saline, PBS: 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, pH 7.4) 沖洗，因腦脊髓液藉由 PBS 沖洗收集取得稱為類腦脊髓液。將鼯鼠血液以 3000rpm 離心 10 分鐘取其上清液即為血清檢體。

五、在類腦脊髓液所含的嗜伊紅性白血球之數量

將鼯鼠犧牲，並取出他們的腦部放入直徑 35mm 大的盤中，將頭腔及大腦腔室(側腦室，第三及第四腦室)浸泡在 1ml PBS 中，在 400g 下

離心 10 分鐘並收集沖洗液，剩餘的沉澱物取 100 μ l 並加入 2 μ l 醋酸溶解紅血球，放入血球計數器中計算嗜伊紅性白血球的數量(Paul Marienfeld GmbH and Co., Lauda-Koenigshofen, Germany)。

六、總蛋白濃度及白蛋白濃度的測量

蛋白質的定濃度採用Bradford protein assay方法，其原理為蛋白質可與Coomassie brilliant blue G-250 形成藍色複合物，當藍色越深表示蛋白濃度越高。類腦脊髓液及血清中的總蛋白濃度利用蛋白分析套組(Bio-Rad, USA)進行分析以bovine serum albumin作為標準品，以double-distilled H₂O 等比梯度稀釋溶度為 0.5、0.375、0.25、0.125、0 mg/ml，加入蛋白質分析藥劑(Bio-Rad protein assay)在室溫下反應 5 分鐘，以ELISA reader (Dynex) 在波長 595nm測吸光值，經EXCEL (Microsoft)計算出標準曲線公式，將樣品所測得之吸光值依標準曲線公式換算出總蛋白濃度。白蛋白濃度利用自動化Dade Behring分析儀(BN ProSpec, Newark, NJ, USA)做測量。

七、血纖維蛋白酶原活化因子的分析

血纖維蛋白酶原活化因子以zymography方法來分析，依照本實驗室先前的研究成果(Hou et al., 2004)。簡述如下，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，取膠片以密度掃描儀量化分析結果。

八、西方點墨法(Western blotting)

蛋白質的檢測方法依照本實驗室先前的研究成果(Chen et al., 2004)。簡述如下，將鼯鼠腦部組織置於 cell lysis buffer 中進行均質，此均質液在 4°C，12,000 g 離心 10 分鐘，取上清液並進行定量。將萃取出之新鮮蛋白質，填入 SDS 電泳膠片，進行電泳。電泳結束後，將膠片上之蛋白點轉移至 nitrocellulose membrane。利用 primary antibody (tPA、uPA)及 horse radish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody 進行反應，以 enhanced chemiluminescence 檢測蛋白質。

九、組織學技術 (Haematoxylin & Eosin staining)

以組織學技術觀察神經元細胞之構造，鼯鼠腦部組織的處理方法依照本實驗室的研究成果(Lai et al., 2004)。簡述如下，組織以 formol-alcohol (formaline : acetic acid : 70% alcohol = 1 : 1 : 20) 固定 24 小時，以序列酒精 (50%, 70%, 80%, 90%, 100%) 脫水，以二甲苯(xylene)置換酒精，最後以石蠟(paraffin)包埋。切片以 haematoxylin (Muto, Japan) 染色 5 分鐘、1% eosin Y solution (Muto, Japan) 染色 2 分鐘，在染色完成之玻片上滴上 mounting media，在光學顯微鏡下觀察並拍照。

八、統計分析

不同群組之鼯鼠所得的結果，統計以 Kruskal-Wallis 進行分析以 Dunn's 做事後檢測。以平均值±標準差(mean± S.D.)表示，相關性分析利用 Spearman's ranking 進行分析，* $P < 0.05$ 表示具有明顯的相關性。

研究結果與分析

PA_s 抑制劑對廣東住血線蟲所誘發腦部病理變化及 BBB 損傷保護之效果

在腦部組織病理學觀察發炎反應，發現主要是嗜伊紅性白血球、嗜中性白血球、淋巴球及巨噬細胞等發炎細胞滲入鼯鼠的腦部蜘蛛膜下腔。廣東住血線蟲感染鼯鼠的同時給予 PA_s 抑制劑處理將體內 PA_s 活性降低，在組織學的觀察可發現浸潤到蜘蛛膜下腔的免疫細胞較感染組有明顯減少(fig.1)。以 CSF 與血清中 albumin 溶度比值作為 BBB 損傷的指標，在研究的結果以 Spearman's ranking 進行相關性分析發現，tPA ($r=0.89$)及 uPA ($r=0.92$)的活性均與 CSF 與血清中 albumin 溶度比值有高度的相關性(fig. 2)。另一方面，以浸潤至 CSF 中嗜伊紅性白血球數量作為 BBB 損傷的指標，在研究的結果以 Spearman's ranking 進行相關性分析發現，tPA ($r=0.82$)及 uPA ($r=0.95$)的活性均與 CSF 與血清中 albumin 溶度比值有高度的相關性(fig. 3)。因此推測廣東住血線蟲感染鼯鼠誘發 BBB 損傷與 PA_s 的活性有高度的相關性。

治療對腦脊髓液中嗜伊紅性白血球數量的影響

本研究在鼯鼠於犧牲後，計數腦脊髓液中嗜伊紅性白血球數量，結果顯示於感染組腦脊髓液嗜伊紅性白血球數量顯著的增多。在感染後治療

顯示，albendazole 單獨治療($P<0.05$)、PAs 抑制劑($P<0.05$)和 albendazole-PAs 抑制劑混合治療($P<0.01$)的鼯鼠腦脊髓液嗜伊紅性白血球數量明顯減少(fig. 4)。

治療對腦脊髓液與血清中 albumin 比值的影響

本研究在鼯鼠於犧牲後，分別收集血清及腦脊髓液測量其 albumin 的含量並以兩者之比值來進行各組間的比較，結果顯示於感染組血清及腦脊髓液 albumin 的含量的比值顯著的增多。在感染後治療顯示，albendazole 單獨治療($P<0.05$)、PAs 抑制劑($P<0.05$)和 albendazole-PAs 抑制劑混合治療($P<0.01$)的鼯鼠血清及腦脊髓液 albumin 的含量的比值明顯減少(fig. 5)。

治療對腦部 PAs 表現量的影響

廣東住血線蟲感染鼯鼠腦組織 PAs 表現量明顯增加。在治療處理的結果顯示 albendazole 單獨治療($P<0.05$)、PAs 抑制劑($P<0.05$)和 albendazole-PAs 抑制劑混合治療($P<0.01$)腦部 PAs 的表現量有明顯減少(fig. 6)。

治療對腦脊髓液 PAs 表現量的影響

廣東住血線蟲感染鼯鼠腦脊髓液 PAs 表現量明顯增加。在治療處理的結果顯示 albendazole 單獨治療($P<0.05$)、PAs 抑制劑($P<0.05$)和 albendazole-PAs 抑制劑混合治療($P<0.01$) 腦脊髓液 PAs 的表現量有明顯減少(fig. 7)。

治療對 PAs 活性的影響

為了進一步證實 PAs 參與廣東住血線蟲感染引起發炎反應的致病過程，利用鼯鼠腦部萃取液及 CSF 以 casein substrate zymography 來分析蛋白分解酶活性，結果顯示 PAs 活性於感染組表現，比較未感染的對照組呈現有意義的活性增加。在治療處理的結果顯示 albendazole 單獨治療($P<0.05$)、PAs 抑制劑($P<0.05$)和 albendazole-PAs 抑制劑混合治療($P<0.01$) 的鼯鼠腦部及腦脊髓液中 PAs 活性明顯減少 (Fig. 8, 9)。

討論

蜘蛛膜下腔出血的病人是由於纖維蛋白/纖維蛋白原酶分解所產生的，腦脊髓液蛋白及纖維分解酶原以及損害程度，或者神經系統上的缺失都有關係(Vermeulen et al., 1985)，血腦障壁細胞轉變首先受到化學趨向性的影響，接著因蛋白分解作用促進造成轉移，uPA 在整個過程中扮演著重要的角色 (Blasi, 1997)，在細菌性腦膜炎之腦脊髓液中所 uPA 活性的增加與腦脊髓液中白蛋白和血清中 albumin 的比值增加有相關性，因此 uPA 的蛋白分解作用，在破壞血液-中樞神經系統之障壁扮演重要的角色(Winkler et al., 2002)。血液-中樞神經系統障壁損傷在細菌性腦膜炎中是重要的病理現象，引發不同神經毒素因子的分泌，結果導致腦部水腫並伴隨腦內壓增加(Leib and Tauber, 1999)。在腦部受傷的鼯鼠其血液-中樞神經系統障壁損壞中，發現了蛋白外滲到中樞神經系統是 uPA 造成血液-中樞神經系統障壁損壞的結果(Kataoka et al., 2000)。當感染時 PAs 及基質金屬蛋白酶-9 (matrix metalloproteinases-9, MMP-9)的蛋白活性增加會導致血液-中樞神經系統障壁的破壞，使白血球從血液循環系統滲出浸潤至蜘蛛膜下腔及腦部實質組織中移行至感染的區域，許多的研究發現腦脊髓液中若大量出現血漿蛋白則意味者 BBB 的破壞(Goetzl et al., 1996; Romanic and Madri, 1994; Paul et al., 1998; Leppert et al., 2000; Marchi et al., 2003)。在最近的研究發現，腦脊髓液中血漿蛋白及 S-100 的大量增加表現在與血液-中樞神經系

統之障壁損壞的中樞神經系統疾病，可藉以評估血液-中樞神經系統障壁的損壞程度(Marchi et al., 2003; Kapural et al., 2002)。因此，在腦脊髓液中白蛋白的大量增加是大多數與血液-中樞神經系統之障壁損壞有關的中樞神經系統疾病的特徵(Marchi et al., 2003)。在非適當宿主(例如鼯鼠或人類)感染廣東住血線蟲是引起嗜伊紅性腦膜炎與嗜伊紅性腦膜腦炎會伴隨神經系統的傷害，在本研究中發現，當鼯鼠感染廣東住血線蟲時腦脊髓液與血清中白蛋白含量的比質及浸潤到之腦部的嗜伊紅性白血球數量會明顯增加，但鼯鼠感染廣東住血線蟲時給與 PAs 抑制劑處理者則會明顯減少，在相關性分析的結果顯示，tPA 及 uPA 分別與腦脊髓液與血清中白蛋白含量的比質及浸潤到之腦部的嗜伊紅性白血球數量有高度的相關性，因此推測 PAs 在鼯鼠感染廣東住血線蟲是引起嗜伊紅性腦膜炎與嗜伊紅性腦膜腦炎造成 BBB 損傷的過程中 PAs 扮演重要的角色，且 Neuroserpin 或 PAs 抑制劑均有具有保護 BBB 作用。

血液-中樞神經系統障壁的破壞被認為是感染腦膜炎的重要病理及生理現象，它使得免疫細胞可以滲入蛛膜下腔，而 PAs 的蛋白活性及 MMP-9 可以導致血液-中樞神經系統障壁的分解，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。本研究結果顯示，albendazole、PAs 抑制劑及 albendazole-PAs 抑制劑混合治療明顯地減少腦脊髓液與血清中白蛋白含量的比質及浸潤到之腦部的嗜伊紅性白血球數量，然而，如果單獨使用 PAs 抑制劑治療則只有部分減少。這些結果顯示腦脊髓液與血清中 albumin 含量的比值及浸潤到之腦部的嗜伊紅性白血球數量可能在嗜伊紅性腦膜炎中扮演了一個重要的指標。因此，治療可能藉由降低 PAs 的活性減少血液-中樞神經系統障壁的破壞。

結論與建議

由以上研究討論，推測 PAs 在廣東住血線蟲感染誘發嗜伊紅性腦膜炎造成 BBB 的損傷有高度相關性，給予 NS 或 PAs 抑制劑可明顯減低 BBB 的損傷達到保護的效果。以治療 BALB/c 小鼠感染廣東住血線蟲的試驗結果顯示，Albendazole 與 PAs 抑制劑混合治療的小鼠腦脊髓液與血清中 albumin 含量的比值及浸潤到之腦部的嗜伊紅性白血球數量明顯減少 ($P < 0.01$)，且效果較 Albendazole 或 PAs 抑制劑單獨治療佳。這些結果顯示廣東住血線蟲症的治療除給予 Albendazole 治療外，在同樣的 Albendazole 治療劑量在給予 PAs 抑制劑，這種使用 albendazole-PAs 抑制劑混合治療的有效方法可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.
- Blasi, F. 1997. uPA, uPAR, PAI-1: key intersection of proteolytic, adhesive and chemotactic highways ? Review. *Immunol Today*. 18: 415-417.
- 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.
- Cinelli, P., Madani, R., Tsuzuki, N., Vallet, P., Arras, M., Zhao, C. N., Osterwalder, T., Rulicke, T. and Sonderegger, P. 2001. Neuroserpin, a neuroprotective factor in focal ischemic stroke. *Molecular and cellular neurosciences*. 18, 443-457.
- Docagne, F., Nicole, O., Marti, H. H., MacKenzie, E. T., Buisson, A. and Vivien, D. 1999. Transforming growth factor-h1 as a regulator of the serpins/t-PA axis in cerebral ischemia. *The FASEB journal*. 13, 1315-1324.

- Gardiner, C. H., Well, S., Gutter, A. E., Fitzgerald, L., Anderson, D. C., Harris, R. K., and Nichols, D. K. 1990. Eosinophili meningocephalitis due to *Angiostrongylus cantonensis* as the cause of death in captive non-human primates. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 42, 70-74.
- Goetzl E.J., Banda M.J., and Leppert D. 1996. Matrix metalloproteinases in immunity. *J Immunol.* 156: 1-4.
- Gveric, D., Herrera, B., Petzold, A., Lawrence, D. A. and Cuzner, M. L. 2003. Impaired fibrinolysis in multiple sclerosis: a role for tissue plasminogen activator inhibitors. *Brain.* 126, 1590-1598.
- Hakak, Y, Walker, J. R., Li, C., Wong, W. H. , Davis, K. L., Buxbaum J. D., Haroutunian, V. and Fienberg, A. A. 2001. Genome-wide expression analysis reveals dysregulation of myelination-related genes in chronic schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 98, 4746-4751.
- Hastings, G. A., Coleman, T .A., Haudenschild, C. C., Stefansson, S., Smith, E. P., Barthlow, R., Cherry, S., Sandkvist, M. and Lawrence, D. A., 1997. Neuroserpin, a brain-associated inhibitor of tissue plasminogen activator is localized primarily in neurons. Implications for the regulation of motor

learning and neuronal survival. *The Journal of biological chemistry*. 272, 33062-33067.

Hou, R. F., Tu, W. C., Lee, H. H., Chen, K. M., Chou, H. L. and Lai, S. C. 2004. Elevation of plasminogen activators in cerebrospinal fluid of mice with eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *International Journal for Parasitology* 34, 1355-1346.

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, 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.

Kapural, M., Krizanac-Bengez, L. J., Barnett, G., Perl, J., Masaryk, T., Apollo, D., Rasmussen P., Mayberg, M. R. and Janigro, D. 2002. Serum S-100beta as a possible marker of blood-brain barrier disruption. *Brain research*. 940, 102-104.

- Kataoka K., Asai T., Taneda M., Ueshima S., Matsuo O., Kuroda R., Kawabata A. and Carmeliet P. 2000. Roles of urokinase type plasminogen activator in a brain stab wound. *Brain Res.* 887: 187-190.
- Krueger, S. R., Ghisu, G. P., Cinelli, P., Gschwend, T. P., Osterwalder, T., Wolfer, D.P. and Sonderegger, P. 1997. Expression of neuroserpin, an inhibitor of tissue plasminogen activator, in the developing and adult nervous system of the mouse. *The Journal of neuroscience.* 17, 8984-8996.
- Lähteenmäki, K., Edelman, S., Korhonen, T.K. 2005. Bacterial metastasis: the host plasminogen system in bacterial invasion. *Trends Microbiol.* 13, 79-85.
- Lai, S. C., Jiang, S. T., Chen, K. M., Hsu, J. D., Shyu, L. Y., and Lee, H. H. 2005. Efficacy of albendazole–GM6001 co-therapy against *Angiostrongylus cantonensis* induced parasitic meningitis in BALB/c mice. *Acta Tropica* 93: 267-173.
- Lan KP, Wang CJ, Lai SC, Chen KM, Lee SS, Hsu JD, Lee HH: The efficacy of therapy with albendazole in mice with parasitic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *Parasitol Res* 2004; 93: 311-17.
- Leppert D., Leib S.L., Grygar C., Miller K.M., Schaad U.B., and Holländer G.A. 2000. Matrix metalloproteinase (MMP)-8 and MMP-9 in cerebrospinal fluid

during bacterial meningitis: association with blood-brain barrier damage and neurological sequelae. *Clin Infect Dis.* 31: 80-84.

Marchi N., Fazio V., Cucullo L., Kight K., Masaryk T., Barnett G., Vogelbaum M., Kinter M., Rasmussen P., Mayberg M.R., and Janigro D. 2003. Serum transthyretin monomer as a possible marker of blood-to-CSF barrier disruption. *J Neurosci.* 23: 1949-1955.

Osterwalder, T., Cinelli, P., Baici A, Pennella, A., Krueger, S. R., Schimpf, S. P., Meins, M. and Sonderegger, P. 1998. The axonally secreted serine proteinase inhibitor, neuroserpin, inhibits plasminogen activators and plasmin but not thrombin. *The Journal of biological chemistry.* 273, 2312-2321.

Osterwalder, T., Contartese, J., Stoeckli, E. T., Kuhn, T. B. and Sonderegger, P. 1996. Neuroserpin, an axonally secreted serine protease inhibitor. *The EMBO journal.* 15, 2944-2953.

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. *Ann Neurol.* 44: 592-600.

- 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). *Experimental Parasitology* 68, 403-413.
- Romanic A.M, and Madri J.A. 1994. Extracellular matrix-degrading proteinases in the nervous system. *Brain pathology*. 4, 145-156.
- Schrimpf, S. P., Bleiker, A. J., Brecevic, L., Kozlov, S. V., Berger, P., Osterwalder, T., Krueger, S. R., Schinzel, A. and Sonderegger, P. 1997. Human neuroserpin (PI12): cDNA cloning and chromosomal localization to 3q26. *Genomics*. 40, 55-62.
- Vassalli, J. D., Sappino, A. P., and Belin, D. 1991. The plasminogen activator/plasmin system. *The Journal of Clinical Investigation* 88, 1067-1072.
- Venkatesan P: Albendazole. *J Antimicrob Chemother* 1998;41: 145-47.
- Vermeulen M., van Vliet H.H., Lindsay K.W., Hijdra A., and van Gijn J. 1985. Source of fibrin/fibrinogen degradation products in the CSF after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. 63: 573-577.
- Winkler F., Kastenbauer S., Koedel U., and Pfister H.W. 2002. Role of the urokinase plasminogen activator system in patients with bacterial meningitis. *Neurology*. 59: 1350-1355.

- Yepes, M., Sandkvist, M., Coleman, T. A., Moore, E., Wu, J. Y., Mitola, D., Bugge, T. H. and Lawrence, D. A. 2002. Regulation of seizure spreading by neuroserpin and tissue-type plasminogen activator is plasminogen-independent. *The Journal of clinical investigation*. 109, 1571-1578.
- Yepes, M., Sandkvist, M., Wong, M.K., Coleman, T.A., Smith, E., Cohan, S.L. and Lawrence, D.A., 2000. Neuroserpin reduces cerebral infarct volume and protects neurons from ischemia-induced apoptosis. *Blood*. 96, 569-576.
- Yii C.Y. 1976. Clinical observations on eosinophilic meningitis and meningoencephalitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* on Taiwan. *Am J Trop Med Hyg*. 25: 233-249.
- Yoshimura, K. 1993. Mechanism of parasite killing by eosinophils in parasitic infections. *Nippon Rinsho* 51, 657-663.
- Zhang, Z., Zhang, L., Yepes, M., Jiang, Q., Li, Q., Arniago, P., Coleman, T. A., Lawrence, D. A. and Chopp, M., 2002. Adjuvant treatment with neuroserpin increases the therapeutic window for tissue-type plasminogen activator administration in a rat model of embolic stroke. *Circulation*. 106, 740-745.

圖、表

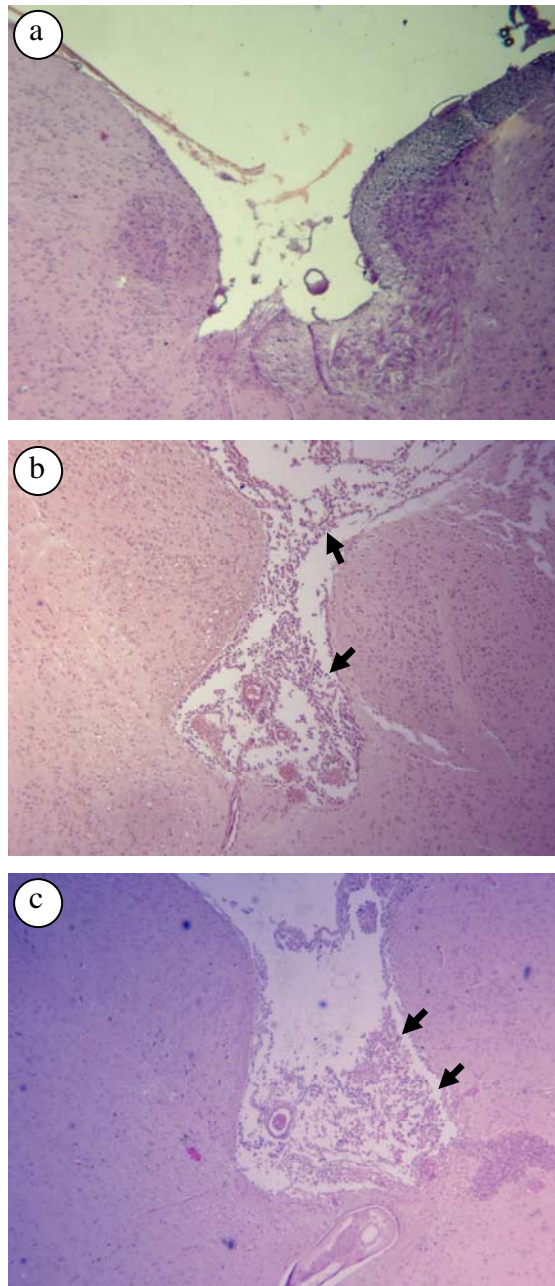
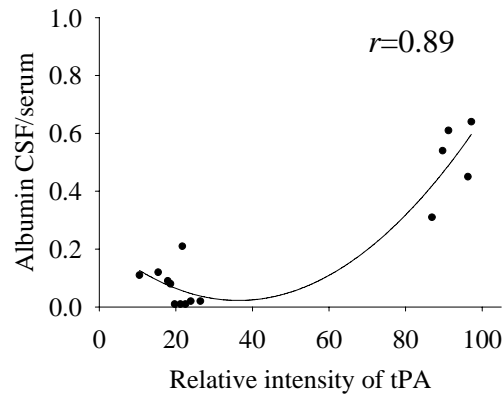


Fig. 1 Haematoxylin-eosin staining of inflammatory cells in the subarachnoid space. (a) The uninfected control has normal meninges and almost no leukocytes in the subarachnoid space. (b) The subarachnoid space of mice infected with *A. cantonensis* showing many leukocytes accumulation (arrow). (c) Treatment with PAI inhibitor significantly decreased the leukocyte numbers (arrow).

(a)



(b)

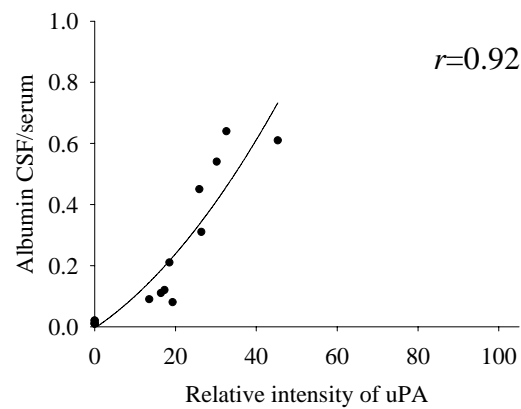


Fig. 2 Correlation of albumin CSF/serum with plasminogen activators (PA) intensity. Albumin correlated significantly ($*P < 0.05$) with the tPA (a) or uPA (b) intensity using the Spearman's ranking correlation test.

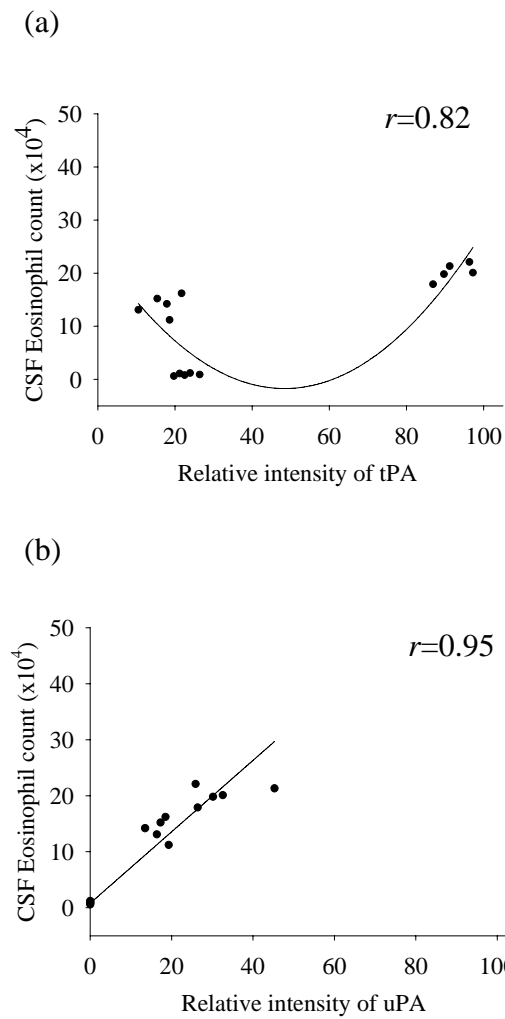


Fig. 3 Correlation of CSF eosinophil count with plasminogen activators (PA) intensity. CSF eosinophil count correlated significantly ($*P < 0.05$) with the tPA (a) or uPA (b) intensity using the Spearman's ranking correlation test.

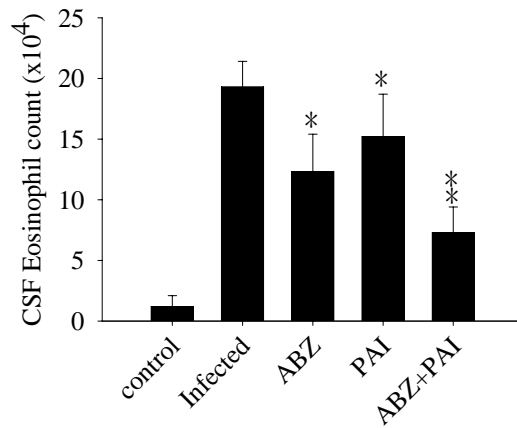


Fig. 5 Changes in the eosinophil counts. Eosinophils were significantly increased (* $P < 0.05$) in the mice infected with *A. cantonensis* (AC) compared to uninfected mice (control). The inflammatory cells were moderately reduced by the individual use of albendazole (ABZ) (* $P < 0.05$), PAs inhibitor (* $P < 0.05$) or co-therapy with albendazole- PAs inhibitor (** $P < 0.01$). In combination the agents showed a marked reduction of the eosinophil cell. The solid columns represent the numbers of eosinophil, the range bars indicate standard error of the mean.

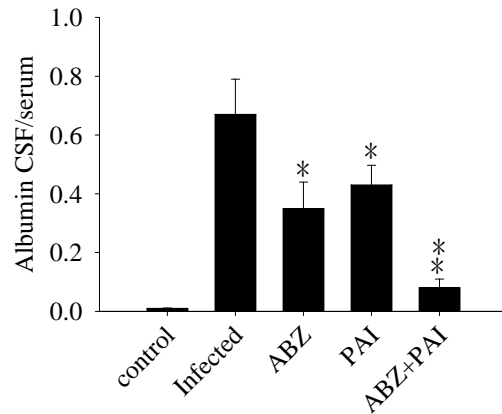


Fig. 4 Changes in the albumin CSF/serum. albumin CSF/serum were significantly increased (*P < 0.05) in the mice infected with *A. cantonensis* (AC) compared to uninfected mice (control). The albumin CSF/serum were moderately reduced by the individual use of albendazole (ABZ) (*P < 0.05), PAs inhibitor (*P < 0.05) or co-therapy with albendazole- PAs inhibitor (**P < 0.01). In combination the agents showed a marked reduction of the albumin CSF/serum. The solid columns represent the albumin CSF/serum, the range bars indicate standard error of the mean.

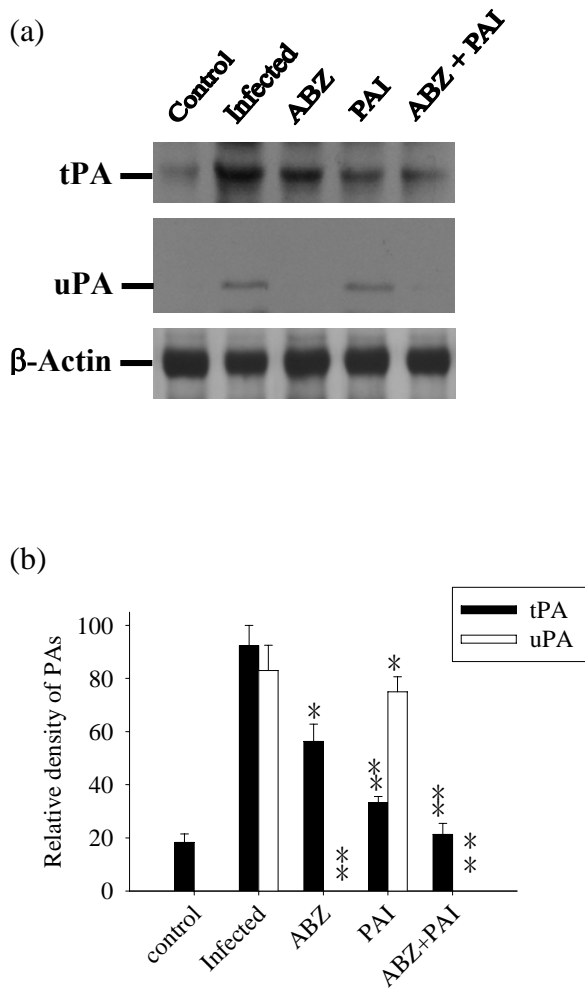


Fig. 6 Influence of treatment on tPA and uPA protein levels in the brain. (a) The protein levels of tPA and uPA in brain. (b) tPA and uPA were significantly increased ($*P < 0.05$) in the CSF of mice infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Infected) compared with uninfected control mice. Albendazole (ABZ) alone ($*P < 0.05$), plasminogen activators inhibitor (PAI) alone ($*P < 0.05$) or albendazole/ plasminogen activators inhibitor (ABZ+PAI) co-therapy ($**P < 0.01$) significantly reduced the protein levels of tPA and uPA. Quantitative analysis of tPA and uPA protein levels were performed using a computer-assisted imaging densitometer system.

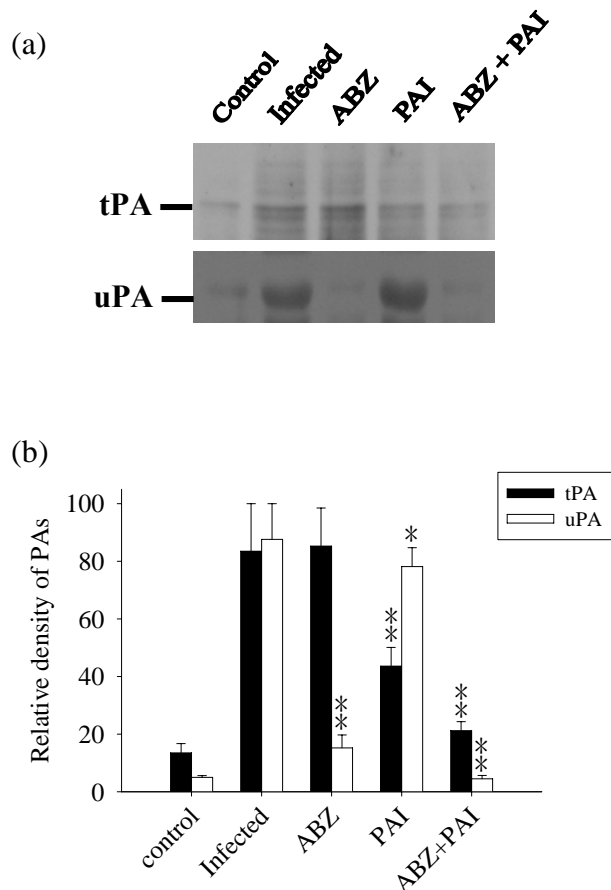


Fig. 7 Influence of treatment on tPA and uPA protein levels in the CSF. (a) The protein levels of tPA and uPA in CSF. (b) tPA and uPA were significantly increased ($*P < 0.05$) in the CSF of mice infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Infected) compared with uninfected control mice. Plasminogen activators inhibitor (PAI) alone ($*P < 0.05$) or albendazole/ plasminogen activators inhibitor (ABZ+PAI) co-therapy ($*P < 0.01$) were significantly reduced the protein levels of tPA, Albendazole (ABZ) alone was no significant effect ($*P > 0.05$). Albendazole (ABZ) alone ($*P < 0.05$), plasminogen activators inhibitor (PAI) alone ($*P < 0.05$) or albendazole/ plasminogen activators inhibitor (ABZ+PAI) co-therapy ($**P < 0.01$) significantly reduced the protein levels of uPA. Quantitative analysis of tPA and uPA protein levels were performed using a computer-assisted imaging densitometer system.

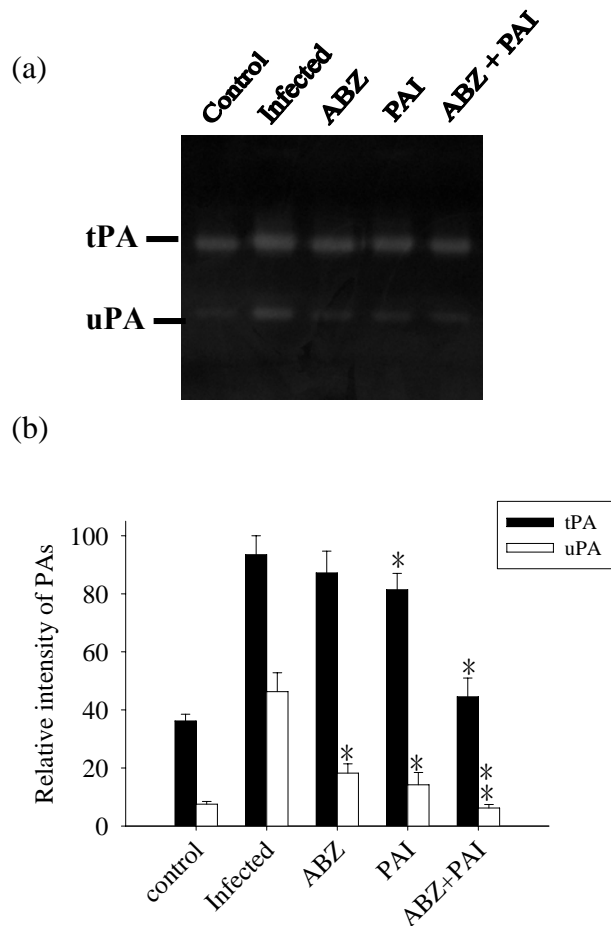


Fig. 8 Influence of treatment on tPA and uPA activity in brain. (a) The activity of tPA and uPA in brain. (b) The activity of tPA and uPA were significantly increased ($*P < 0.05$) in brain of mice infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Infected) compared with uninfected control mice. Plasminogen activators inhibitor (PAI) alone ($*P < 0.05$) or albendazole/ plasminogen activators inhibitor (ABZ+PAI) co-therapy ($*P < 0.05$) were significantly reduced the activirt of tPA, Albendazole (ABZ) alone was no significant effect ($*P > 0.05$). Albendazole (ABZ) alone ($*P < 0.05$), plasminogen activators inhibitor (PAI) alone ($*P < 0.05$) or albendazole/ plasminogen activators inhibitor (ABZ+PAI) co-therapy ($**P < 0.01$) significantly reduced the activity of uPA. Quantitative analysis of tPA and uPA protein levels were performed using a computer-assisted imaging densitometer system.

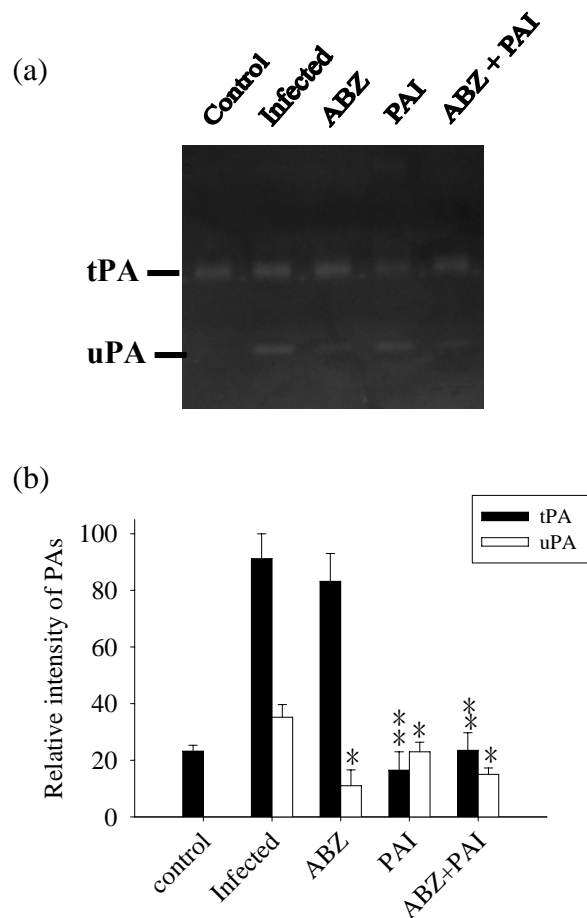


Fig. 9 Influence of treatment on tPA and uPA activity in CSF. (a) The activity of tPA and uPA in CSF. (b) The activity of tPA and uPA were significantly increased ($*P < 0.05$) in brain of mice infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Infected) compared with uninfected control mice. Plasminogen activators inhibitor (PAI) alone ($*P < 0.05$) or albendazole/ plasminogen activators inhibitor (ABZ+PAI) co-therapy ($*P < 0.05$) were significantly reduced the activirt of tPA, Albendazole (ABZ) alone was no significant effect ($*P > 0.05$). Albendazole (ABZ) alone ($*P < 0.05$), plasminogen activators inhibitor (PAI) alone ($*P < 0.05$) or albendazole/ plasminogen activators inhibitor (ABZ+PAI) co-therapy ($**P < 0.01$) significantly reduced the activity of uPA. Quantitative analysis of tPA and uPA protein levels were performed using a computer-assisted imaging densitometer system.

無研發成果推廣資料

98 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：李秀雄		計畫編號：98-2320-B-040-003-					
計畫名稱：Neuroserpin 對廣東住血線蟲引起嗜伊紅性腦膜炎之小白鼠血液-中樞神經系統障壁損害之影響							
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		章/本
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p>無</p>
--	----------

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

Neuroserpin overexpression mice 無法穩定及繁殖，因此轉以與 neuroserpin 具有抑制 plasminogen activator 功能的 PAs 抑制劑進行研究。

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

（一）廣東住血線蟲感染鼯鼠時導致嗜伊紅性腦膜腦炎所造的 BBB 損害時使用 NS 或 PAs 抑制劑抑制 PAs 可降低 BBB 的損傷。

（二）在治療廣東住血線蟲感染時可使用 albendazole 搭配 PAs 抑制劑混合治療，此模式提供臨床上治療此症新的方針。

