

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

評估板藍根及 albendazole 混合治療廣東住血線蟲感染
BALB/c 小白鼠所引發腦膜炎之效果

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2314-B-040-030-

執行期間：93年08月01日至94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 94 年 10 月 19 日

評估板藍根及 albendazole 混合治療廣東住血線蟲感染 BALB/c 小白鼠

所引發腦膜炎之效果

Efficacy of Banlangen–albendazole co-therapy against *Angiostrongylus cantonensis* induced parasitic meningitis in BALB/c mice

計劃編號：NSC 93-2314-B-040-030

執行期限：2004-01-01~2005-07-31

主持人：賴世展

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 和板藍根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) pro-inflammatory cytokine 的 mRNA 表現量，例如：TNF- α 。本研究結果顯示

albendazole 和板藍根混合治療的組別明顯地減少蟲回收數及 eosinophil 數量，但是 TNF- α mRNA 表現量並無明顯影響。這些結果顯示 albendazole 和板藍根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-banlangen co-therapy on eosinophilic meningitis in BALB/c mice. Assay indicators for the therapeutic effect include 1) worm recovery; 2) eosinophil counts; and 3) pro-inflammatory cytokine mRNA expression, such as tumor necrosis factor- α . The results showed that the albendazole- banlangen co-therapy significantly decreased ($P<0.05$) worm recovery and eosinophil counts, whereas TNF- α mRNA levels were not significantly changes . 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)。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病例報告出現，大部分發生於台灣南部(Yii, 1976; Chen, 1979)。此寄生蟲發育中的幼蟲會侵入人類中樞神經系統(CNS)，造成血腦障壁(BBB)破壞，神經細胞脫髓鞘(demyelination)(Hwang et al., 1993)及小腦(cerebellar)浦金氏細胞(purkinje cells)喪失、損傷、有空泡等(Perez et al., 1989; Yoshimura, 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)。引起的病理變化特徵是，腦脊髓液(CSF)及末梢血液的嗜伊紅性白血球(eosinophils)增加，腦部嗜伊紅性白血球及淋巴球浸潤等發炎反應，常見症狀有頭痛、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 and Chen, 1988)。

細胞激素(cytokines)為一群低分子量的調節蛋白，大約只有 6~60 kDa，其生理功能包括參與自然的免疫反應；調節淋巴球生長、分化和細胞活性；參與免疫發炎反應；刺激未成熟白血球的生長和分化(Lucey et al., 1996)。當人類對抗微生物感染，啟動發炎反應以抵抗微生物入侵的過程中，皆需有細胞激素的參與，而這些激素包括第一型干擾素(type I interferon)、腫瘤壞死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、interleukin-1(IL-1)及趨化激素(chemokines)等(Lucey et al., 1996)。腫瘤壞

死因子群 (TNF superfamily) 是具有多方面功能的細胞激素群，藉由和標的細胞(target cell) 上的相對受體結合而傳遞訊息，影響細胞的生物反應，其中主要的是關於免疫系統及發炎反應的調節。腫瘤壞死因子群成員中，除了 TNF- β 以可溶性蛋白的方式存在之外，其餘皆是屬於 N 端在細胞內，C 端向細胞外之第二型穿膜蛋白，它們在細胞外和受體結合的區域約有 150 個氨基酸，具 20-25% 的相似性，然而在細胞內區域，不論是在長度或氨基酸序列上則皆不相同(Beutler and van Huffel, 1994; Nagata, 1997)。TNF- α 為一個具多功能的細胞激素，參與調控許多生理反應，尤其在調節免疫細胞上扮演主要的角色。具生物活性的 TNF- α 為含有 157 個胺基酸，分子量 26 kDa 之可溶性蛋白質，以 trimeric 的方式表現於細胞膜上，含有 233 個胺基酸的 pro-TNF- α ，經由

TNF- α -converting enzyme (TACE)分解而成。許多人類疾病的發生可歸因於一些基因的異常表達，這些基因通過存在的基因開關(gene switch)而過量表現，從而導致疾病的發生，其中一部分基因開關是在核因數- κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)控制下進行的，NF- κ B 可促進前炎症因子 (TNF- α 、IL-1、IL-6)基因的轉錄，而 IL-1，TNF- α 作為細胞外刺激信號又可啟動 NF- κ B，進一步增強炎症反應。目前已知多種因素，包括 TNF- α 、介白素-1 β (IL-1 β)、脂多糖 (LPS)、蛋白激酶 (PKC) 等因素皆可誘導 NF- κ B 的活化(Han et al., 1999)。

板藍根中文名稱板蘭根，中文拼音 Banlangen，拉丁名稱 *Isatidis Radix*，英文名稱 *Isatis Root*，別名北板藍根、藍根、板藍、大靛、山藍、大靛、山藍，土龍根，大蘭根或蘭龍根。板藍根是爵床科植物馬

藍的根莖或十字花科(Cruciferae)植物菘藍 (*Isatis indigotica* Fort.)、歐菘藍 (*Isatis tinctoria* L.) 的根。板藍根為常用中藥，性寒，味苦。板藍根除煎劑外還有沖劑、口服液、注射液、含片等，其中口服液和沖劑最為常見。具清熱解毒、涼血利咽之功能，用於溫毒發斑、舌絳紫暗、疔腮、喉痹、爛喉丹痧、大頭瘟、丹毒、癰腫。在最近的研究報告中指出，板藍根中的 syringic acid 有抑制內毒素 (endotoxin)的作用，降低老鼠及兔子因注射 LPS 所導致的死亡率(Liu et al., 2001; Liu et al., 2003)。在巨噬細胞(macrophage)，板藍根抗內毒素的方式為與 LPS 的接受器結合，抑制 LPS 所誘發的 TNF- α 及 IL-6 (Lin et al., 2002)。在人體試驗中板藍根對慢性肝病也有相當的療效(Fu, 1991)。

板藍根能抑制 TNF- α 的產生，增加 Th2 細胞激素 IL-4 和 IL-5 的釋放，並伴隨抑制

Th1 細胞的活性，抑制白血球及單核球的趨化現象(chemotaxis)，具有抗發炎的作用。此外它可抑制多形核白血球的吞噬作用而不會造成細胞毒性，因此如能減少 TNF- α 應可改善由細胞活素引起的發炎症狀。本試驗將以 RT-PCR 觀察 TNF- α 的表現，評估 albendazole 及板藍根混合治療廣東住血線蟲感染小白鼠引起腦膜炎之效果。因此惟有不斷的試驗以幫助於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。因此本研究期望藉由板藍根抑制 TNF- α 以減輕廣東住血線蟲所誘發之嗜伊紅性腦膜炎及神經發炎反應。

材料與方法

一. 廣東住血線蟲第三期幼蟲(L3)之收集:

由田野撿拾非洲大蝸牛，將非洲大蝸

牛外殼碾碎，取其組織，剝碎。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 L₃ 幼蟲。每 50 隻 L₃ 幼蟲為一單位，置於玻璃培養皿中。

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

板藍根 (Radix Isatidis)，板藍根商品呈圓柱形，稍扭曲，長 10~20 釐米。直徑 0.5~1 釐米。表面淺灰黃色或淡棕黃色，粗糙，有縱皺紋及橫斑痕和支根，根頭部稍膨大，有葉柄殘留。體實，質略軟，斷面皮部黃白色至棕色，木質部黃色。質量以平直、粗壯、堅實、粉性大者為佳。規格分兩個等級。本試驗將以口服液經口餵食小白鼠。

五、治療

將感染的動物隨機分五組，未治療之

對照組包括感染及未感染廣東住血線蟲兩組，實驗組分為三組，分別在感染後第 5 天，以口胃管投與 albendazole、板藍根及混合 albendazole 與板藍根治療，albendazole 劑量為每公斤體重 10 毫克，板藍根劑量為每公斤體重 50 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、病理檢查

動物犧牲時將腦蓋剝開，評估其腦膜出血情形，取出之腦置於培養皿中，將腦膜剝離，以生理食鹽水沖洗，收集此液作為腦脊髓液，分析其中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。

七、RT-PCR (反轉錄聚合酶鏈反應)

1. Total RNA 之抽取

小白鼠小腦total RNA之抽取，將小白鼠小腦置入研磨器，加入TRIZOL reagent (1 ml reagent / 50-100 mg tissue or 4 ml reagent / 15 cm culture dish)研磨均勻。以2.5 ml針筒/3 號針頭來回抽吸至液體之粘度呈水狀，分裝 1 ml 至微量離心管，靜置在室溫 5 分鐘，每 1 ml TRIZOL reagent 加入 0.2 ml choloform，以手劇烈搖晃約 15 秒，靜置在室溫 2-3 分鐘，在 4°C 以 12,000 xg 離心 20 分鐘，transfer up-layer至新的微量離心管，每 1 ml TRIZOL reagent加入 0.5 ml isopropanol (沉澱RNA)，靜置在室溫 10 分鐘，在 4°C 以 12,000 xg 離心 10 分鐘，用 70%冰乙醇清洗沉澱物，在 4°C 以 7500 xg 離心 5 分鐘，風乾(air dry)，加入 50 µl DEPC-H₂O溶解沉澱RNA，以光譜分析儀(Spectrophotometer, Model U-2000, Hitach, Japan)於D_{260/280}測濃度，將

RNA儲存於-70°C 備用。

2. First strand cDNA 合成

依序將 1 µl oligo dT (500 ng/µl) 或 random primers (250~500 ng/µl) 1 ng ~ 5 ng total RNA、1 µl 10 mM dNTP mix 加入微量離心管中，再加入二次離子滅菌水至 12 µl，加熱混合物至 65°C，時間約 5 分鐘，之後立刻置於冰上冷卻，簡短離心後，依序將 4 ul 5X first strand buffer (主要提供 SuperScript Reverse Transcriptase)、2 µl 0.1 M DTT、1 µl RNasin (40 U/µl)加入微量離心管中，溫和的混合管內液體並在 42 °C下靜置約 2 分鐘，加入 1 µl SuperScript II，利用微量吸管上下抽吸數次，靜置在 30°C (for oligo dT) 或 25°C (for random primers) 約 10 分鐘，靜置在 42°C 約 60 分鐘，加熱到 70°C 約 15 分鐘以終止反應 (denaturation)，將得到

的 cDNA 儲存在-20°C。

3. PCR 反應

依序將 10 µl 10X PCR buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl)、3 µl 50 mM MgCl₂、2 µl 10 mM dNTP mix、2 µl amplification primer 1 (10 µM)、2 µl amplification primer 2 (10 µM)、1 µl Taq DNA polymerase (2-5 U/µl)、2 µl cDNA (從 first strand reaction 中取得並經過 RNase H 處理過)、80 µl 滅菌的二次水加入 PCR 反應微量離心管中，最終體積為 100 µl。溫和的混合管內液體並加入兩滴礦物油(約 100 µl)至微量離心管中，其策略是 94 °C(1 分 40 秒)；94°C(40 秒)，50°C(1 分)，72°C(2 分)，30 cycles；72°C(10 分)。

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 與板藍根混合治療的小白鼠腦組織明顯減少($P<0.05$)蟲回收數。而在沒有治療及用板藍根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、板藍根及 albendazole 與板藍根混合治療後則明顯($P<0.05$)減少(Figure 2)。

治療對於 TNF- α mRNA 表現量的影響

腦組織分析結果顯示廣東住血線蟲感染的 TNF- α mRNA 表現量明顯增加，經 albendazole、板藍根及 albendazole 與板藍根混合治療後 TNF- α mRNA 表現量並無

明顯($P>0.05$)影響 (Figure 3)。

討論

腫瘤壞死因子群 (TNF superfamily) 是具有多方面功能的細胞激素群，藉由和標的細胞 (target cell) 上的相對受體結合而傳遞訊息，影響細胞的生物反應，其中主要的是關於免疫系統及發炎反應的調節 (Beutler and van Huffel, 1994; Nagata, 1997)。TNF- α 為一個具多功能的細胞激素，參與調控許多生理反應，尤其在調節免疫細胞上扮演主要的角色。然而，本研究結果顯示 albendazole 和板藍根混合治療對 TNF- α mRNA 表現量並無明顯影響，此結果顯示 albendazole 和板藍根混合治療無法有效抑制此細胞激素的產生。

板藍根為常用中藥，性寒，味苦。板藍根除煎劑外還有沖劑、口服液、注射液、含片等，其中口服液和沖

劑最為常見。具清熱解毒、涼血利咽之功能，用於溫毒發斑、舌絳紫暗、疔腮、喉痹、爛喉丹痧、大頭瘟疫、丹毒、癰腫。

在最近的研究報告中指出，板藍根中的 syringic acid 有抑制內毒素(endotoxin)的作用，降低老鼠及兔子因注射 LPS 所導致的死亡率(Liu et al., 2001; Liu et al., 2003)。本研究結果顯示 albendazole 和板藍根混合治療的組別明顯地減少 eosinophil 數量，此結果顯示板藍根治療可能具有抗發炎效果。

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 和板藍根混合治療罹患嗜伊紅性腦膜炎的 BLAB/c 小白鼠，結果顯示 albendazole 和板藍根混合治療的組別明顯地減少蟲回收數及 eosinophil 數量，但是 TNF- α mRNA 表現量並無明顯影響。

這些結果顯示 albendazole 和板藍根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. In: *Advances in parasitology*. (Dawes, B. et al., Ed.), pp. 223-248. Academic press, London and New York
- Beutler, B., and van Huffel, C. 1994. Unraveling function in the TNF ligand and receptor families (comment). *Science* 264, 667-668.
- Chen, E. R. 1979. Angiostrongyliasis and eosinophilic meningitis on Taiwan: a review. In: *Studies on Angiostrongyliasis in Eastern Asia and Australia*. (Cross, J. H. Ed.), pp. 57-73. Taipei, Taiwan, U.S. Naval Medical Research Unit No. 2, NAMRU-2-SP-44
- Fu XX. 1991. Therapeutic effect of combined treatment with Ara-A dauricine and Chinese herbs in chronic hepatitis B infection. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 30, 498-501.
- Gardiner, C. H., Well, S., Gutter, A. E., Fitzgerald, L., Anderson, D. C., Harris, R. K., and Nichols, D. K. 1990. Eosinophilic meningoencephalitis 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. *J Biol Chem* 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.
- Lin, A. H., Fang, S. X., Fang, J. G., Du, G., Liu, Y. H. 2002. Studies on anti-endotoxin activity of F022 from Radix Isatidis. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 27, 439-442.
- Liu, Y. H., Liu, Y. F., Guo, X. X. 2001. Current studies on anti-endotoxic chemical components of traditional Chinese medicine in China. *Acta Pharmacol Sin* 22, 1071-1077.
- Liu, Y., Fang, J., Lei, T., Wang, W., Lin, A.

2003. Anti-endotoxic effects of syringic acid of Radix Isatidis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 23, 206-208.
- Lucey, D. R., Clerici, M., and Shearer, G. M. 1996. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. 9, 532-562.
- Nagata, S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell*. 88, 355-365.
- 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.
- 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.
- Yoshimura, K. 1993. Mechanism of parasite killing by eosinophils in parasitic infections. *Nippon Rinsho* 51, 657-663.

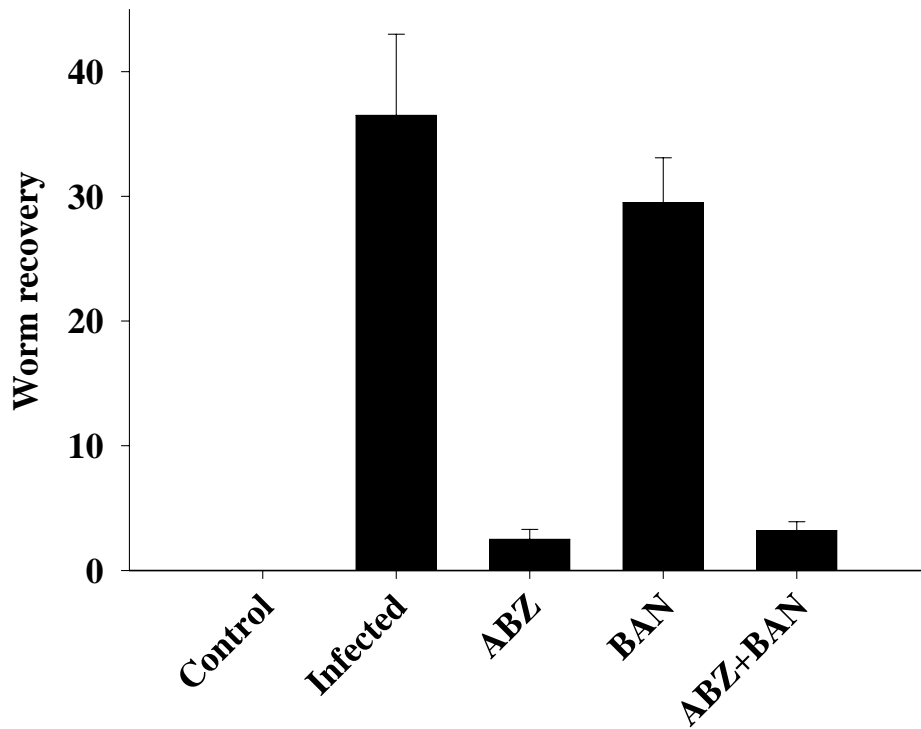


FIG. 1. Influence of treatment on larvae recovery. Following treatment on day 5 PI, the numbers of recovered larvae were significantly decreased ($*P<0.05$) by albendazole (ABZ) alone or by albendazole-banlangen (ABZ+BAN) co-therapy, compared with infected-untreated mice. No significant difference ($P>0.05$) in worm recovery was observed between infected-untreated mice and banlangen (BAN) treated mice. Following treatment on day 15 PI, the numbers of recovered larvae were mildly decreased by albendazole alone or by albendazole-banlangen co-therapy compared with infected-untreated mice. No significant difference ($P>0.05$) in worm recovery was observed between infected-untreated mice and banlangen treated mice.

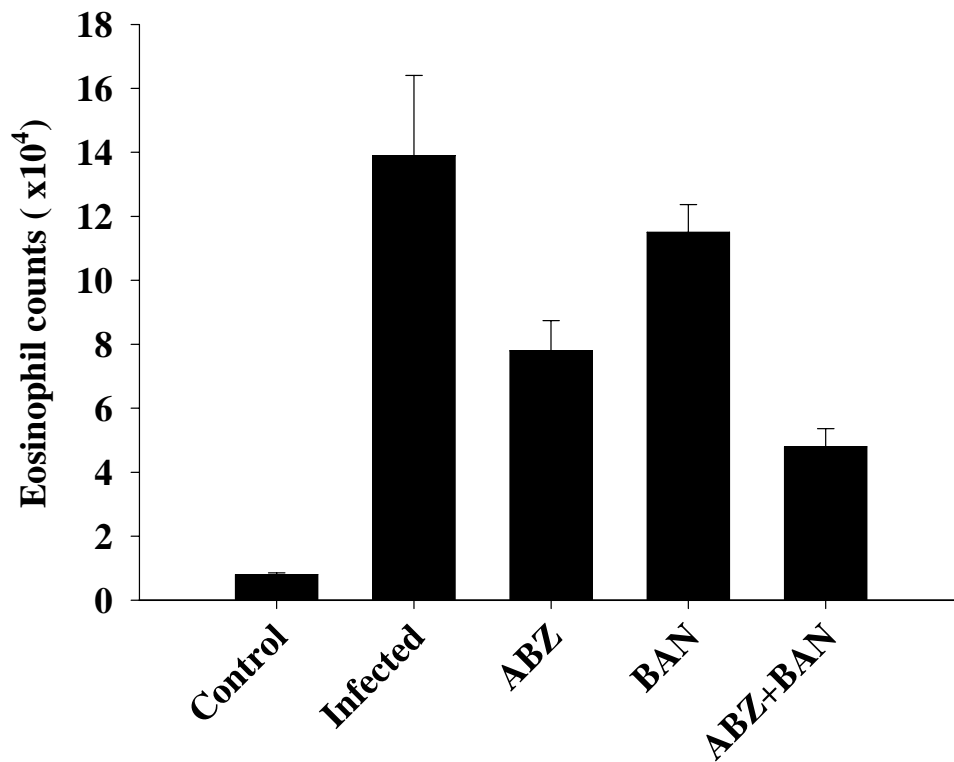


FIG. 2. Influence of treatment on eosinophil counts. The CSF eosinophils were significantly increased in CSF of mice infected with *Angiostrongylus cantonensis* compared with uninfected control. Eosinophils were significantly reduced ($*P<0.05$) by albendazole alone or albendazole-banlangen co-therapy, whereas mild reduction by banlangen alone.

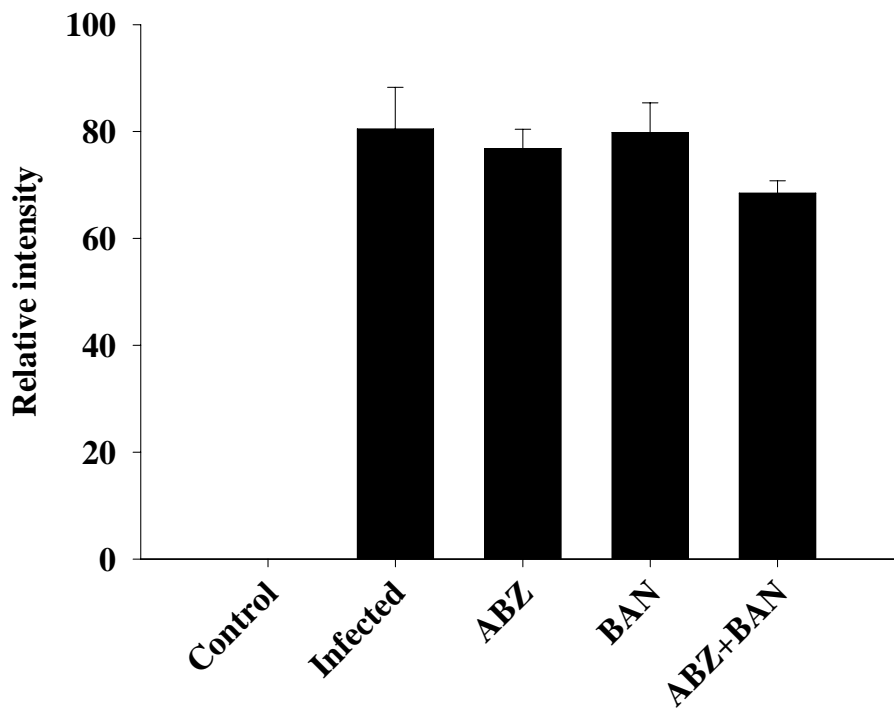


FIG. 3. Influence of treatment on the mRNA levels of TNF- α . *Angiostrongylus cantonensis*-infected mice leads to a significant increase in TNF- α compared with uninfected control. Treatment by albendazole-banlangen (ABZ-BAN) co-therapy was not significantly lowered ($*P < 0.05$) mRNA levels compared with *Angiostrongylus cantonensis*-infected mice. GAPDH was used as a loading control. Densitometric scanning quantification was expressed as the ratio of the signal intensity of TNF- α mRNA to that of GAPDH at each group.