

文章编号: 1000-7423(2008)-05-0387-03

【研究简报】

## 中药全蝎对体外培养犬钩口线虫钩蚴作用的观察

许正敏<sup>1\*</sup>, 李智山<sup>2</sup>, 温茂兴<sup>1</sup>, 彭荣越<sup>1</sup>, 孙莉<sup>1</sup>, 武小樱<sup>1</sup>, 周乐翔<sup>2</sup>, 陶永平<sup>1</sup>, 杨雷<sup>1</sup>

【摘要】 为了解中药全蝎 (scorpion) 对犬钩口线虫 (*Ancylostoma caninum*) 钩蚴的作用, 取感染钩口线虫犬粪便 (含钩虫卵) 5 g, 均匀平铺于紧贴细菌干粉培养基的滤纸上, 轻压使其紧密接触滤纸, 置平皿中, 盖上平皿盖, 并用湿毛巾保持湿度, 35 °C 培养 24 h。水洗沉淀, 分离钩蚴, 分装 3 瓶 [2 ml/瓶 (低倍镜每个视野 1~3 个钩蚴)]。实验组分别加入中药全蝎 (2 ml)、阿苯达唑 (10 mg), 对照组加 2 ml 生理盐水。同上法继续培养 24 h。显微镜观察钩蚴生长发育情况。结果显示, 中药全蝎组虫体明显缩小, 停止发育, 内部结构模糊不清, 呈粒沙状。阿苯达唑组虫体僵直、萎缩, 体表不光滑、无蛋白质折光性, 内部结构不清, 团块状, 凹凸不一。表明中药全蝎、阿苯达唑对钩蚴发育有明显的抑制作用, 后者更为明显。

【关键词】 犬钩口线虫; 幼虫; 中药全蝎; 药物作用

中图分类号: R532.129 文献标识码: B

## In vitro Effect of Medicinal Scorpion on the Larvae of *Ancylostoma caninum*

XU Zheng-min<sup>1\*</sup>, LI Zhi-shan<sup>2</sup>, WEN Mao-xing<sup>1</sup>, PENG Rong-yue<sup>1</sup>, SUN Li<sup>1</sup>,  
WU Xiao-ying<sup>1</sup>, ZHOU Le-xiang<sup>2</sup>, TAO Yong-ping<sup>1</sup>, YANG Lei<sup>1</sup>

(1 Department of Pathogenic Biology and Immunology, Medical School, Xiangfan Vocational and Technical College, Xiangfan 441021, China; 2 Xiangfan Central Hospital affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Xiangfan 441021, China)

【Abstract】 Five gram stool sample from dog infected with *Ancylostoma caninum* was smeared on filter paper for routine cultivation under 35 °C with moist condition for 24 hours. Hookworm larvae were separated and divided into 3 bottles through precipitation-washing method. Traditional Chinese medicine scorpion (2 ml), albendazole (10 mg) and normal saline (2 ml) (control) were added respectively into the 3 bottles, which were cultured for another 24 hours. The growth and development of the larvae were observed under microscope. In scorpion group, the larva body shrank, development stopped, and with an unclear internal structure. Treated with albendazole, the larvae became rigid and shriveled with rough body surface and vague internal structure. The results indicate that both medicinal scorpion and albendazole have considerable effect in inhibiting the development of hookworm larvae and the effect of albendazole is stronger.

【Key words】 *Ancylostoma caninum*; Larva; Medicinal scorpion; Drug effect

\* Corresponding author, E-mail: xuzhengmin3000@yahoo.com.cn

钩虫病是重要的人兽共患病之一, 寄生人体的钩虫主要为十二指肠钩口线虫和美洲板口线虫。犬钩口线虫 (*Ancylostoma caninum*) 偶尔可寄生人体。阿苯达唑为广谱抗线虫药<sup>[1]</sup>。本研究观察中药全蝎 (scorpion) 及阿苯达唑对体外培养犬钩口线虫钩蚴的杀灭作用。

### 1 材料与方法

1.1 培养基 细菌干粉培养基 (批号为 070809) 为杭州天和

微生物试剂有限公司产品, 配方为: 牛肉膏 3 g、蛋白胨 10 g、NaCl 5 g、琼脂粉 20 g。称取 38 g 置于锥形瓶, 加 1 000 ml 蒸馏水, 溶解, 煮沸 3~5 min, 经 103 430 Pa、15~20 min 高压灭菌, 倾注 5~7 ml 于灭菌圆形平板 (直径 7 cm×厚 4 mm), 置 4 °C 备用。

1.2 药物 取中药全蝎 6 g (襄樊职业技术学院附属医院中药房提供), 加 60 ml 水煎煮 30 min, 滤除药渣, 煎煮药液备用。阿苯达唑 (批号为 20060201) 为三九企业集团鞍山九天制药厂产品, 每片含量为 0.2 g。称取 10 mg, 备用。

1.3 阳性粪便钩虫卵鉴定 从襄樊市竹条镇熊营村购买 2 只家犬, 经实验室粪检, 钩虫卵均为阳性, 且形态、颜色大小、卵壳及内含物均正常。剖杀其中 1 只, 见肠黏膜吸附大量乳白

作者单位: 1 湖北襄樊职业技术学院医学院病原生物学与免疫学教研室, 襄樊 441021; 2 华中科技大学同济医学院附属襄樊医院, 襄樊 441021

\* 通讯作者, E-mail: xuzhengmin3000@yahoo.com.cn

色、长约 1.4 cm 呈“C”型线虫。犬钩口线虫特征性的口囊及交合伞镜下清晰可见。鉴定为自然感染的犬钩口线虫。

**1.4 体外实验分组** 取与培养基等圆的中性滤纸，贴在培养基表面。取犬粪便 5 g (含钩虫卵)，捣碎，均匀平铺于滤纸上，轻压使之与滤纸紧密接触。共接种 3 份，置平皿中，盖上平皿盖，置于上、下均铺垫湿毛巾的方盘中，置 35 °C 培养箱培养 24 h，用水洗沉淀法重复洗涤 3 次，除去粪渣与粪浆<sup>[1,2]</sup>。取水洗涤沉淀物 2 ml (低倍镜每个视野 1~3 个钩虫) 分别倒入 3 个 10 ml 小瓶中，实验组 2 瓶分别加 2 ml 中药全蝎，10 mg 阿苯达唑与 2 ml 生理盐水，对照组加生理盐水 2 ml。同上法继续培养 24 h。显微镜观察钩虫生长发育情况，固定后拍照。

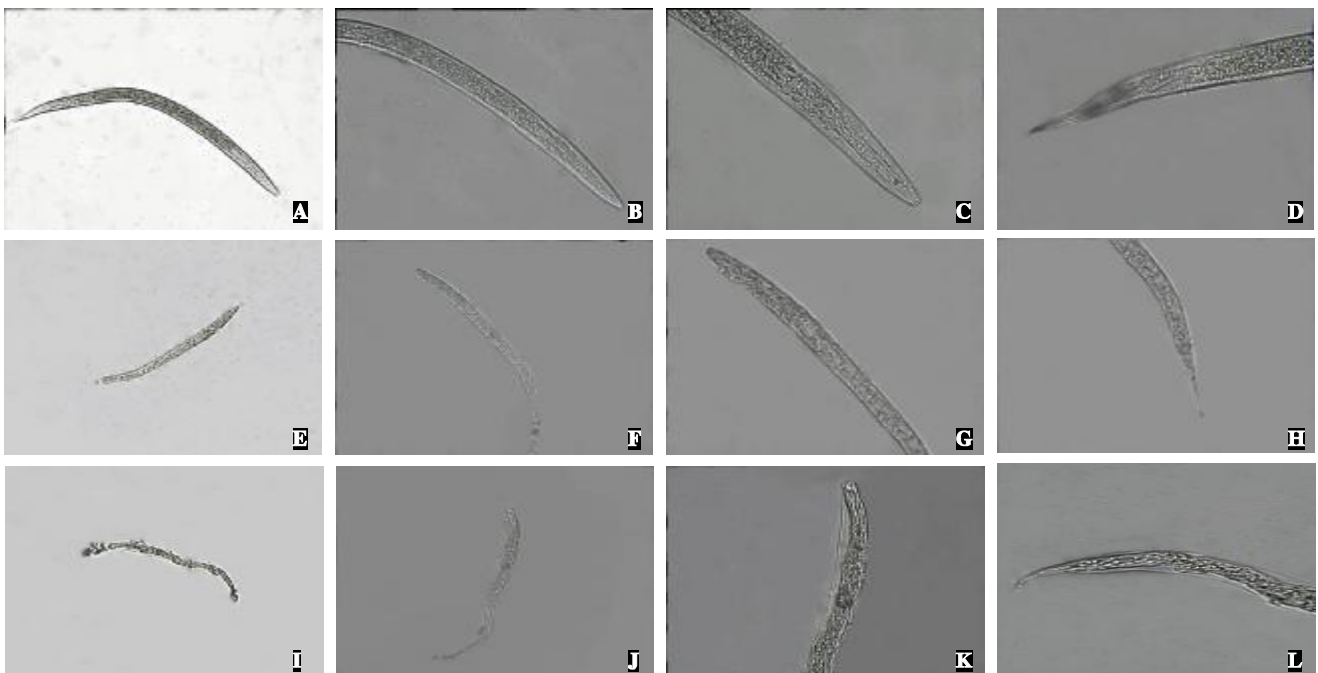
## 2 结果

**2.1 正常虫卵形态** 体外培养之前虫卵，呈椭圆形，卵壳簿，

无色透明，卵细胞与卵壳之间有空隙。为典型的虫卵形态。

**2.2 药物作用** 对照组犬钩虫不停地作蛇行运动，幅度大，范围广。虫体明显长大，体态弯曲自然、透明、轮廓及结构清晰 (图 1 A~D)。中药全蝎组虫体运动迟缓，活动幅度及范围小，虫体明显小于对照组 (图 1 E)，僵直，自然曲线消失，不光滑，无蛋白质折光性；内部结构模糊，呈粒沙状 (图 1 E~H)。阿苯达唑组虫体不动，明显小于对照组 (图 1 I)，虫体僵直，自然曲线消失 (图 1 J)，不光滑，无蛋白质折光性。内部结构不清，团块状，虫体凸凹不一，萎缩 (图 1 I~L)。在虫体上半部一侧损伤变形的虫体与损伤残留的角质层之间出现明显不规则空隙 (图 1 K)。

**2.3 两种药物比较** 中药全蝎及阿苯达唑对虫体发育 (大小) 影响基本相同。阿苯达唑对虫体形态、结构损伤程度强于中药全蝎。



A~D: 对照组钩虫 (A: ×10, B: ×20), C: 虫体前半部 (×40), D: 虫体后半部 (×40), E~H: 中药全蝎作用 24 h (E: ×10, F: ×20), G: 虫体前半部 (×40), H: 虫体后半部 (×40), I~L: 阿苯达唑作用 24 h (I: ×10, J: ×20), K: 虫体前半部 (×40), L: 虫体后半部 (×40)。

图 1 中药全蝎及阿苯达唑对体外培养犬钩口线虫钩虫作用的观察

## 3 讨论

中药全蝎含有多种蝎毒素，蝎毒素为类似蛇毒神经毒的蛋白质<sup>[3]</sup>，临床上用于息风止疼、解毒散结、通络止痛等。近年来与雷丸等中药配伍治疗猪囊尾蚴病具有较好的疗效<sup>[4]</sup>。体外实验表明，中药全蝎能破坏猪囊尾蚴皮层和头颈节而达到杀灭作用<sup>[5]</sup>。本实验结果显示，中药全蝎对钩虫有一定作用，虫体明显小于对照组，已停止发育。形态僵直，内部结构模糊不清呈颗粒状，体表角质层消失，无蛋白质折光性。

阿苯达唑为广谱、高效、低毒的抗蠕虫药，可抑制虫体对

糖原的吸收导致糖原耗竭，抑制延胡索酸还原酶活性阻碍 ATP 产生，致使虫体无法生存繁殖<sup>[6]</sup>。本研究阿苯达唑可使虫体变小、僵直、内部结构模糊，发育受阻。与上述研究结果相符，可用于抗线虫药物疗效实验。

结果显示，中药全蝎、阿苯达唑对钩虫发育有明显的抑制作用，阿苯达唑的抑制作用更为明显。本研究用固体培养基滤纸法，35 °C 培养 1 d 即出结果。操作简便快速，结果准确，适用于钩虫病快速诊断及抗钩虫药物体外筛选。

(下转第 391 页)

3.3.3 cDNA 文库的免疫学筛选结果 通过对 cDNA 文库的免疫学筛选, 得到一个 317 bp 的细胞色素氧化酶第 2 亚基部分 cDNA 序列。将该氨基酸序列与 GenBank 中序列进行同源性比对, 发现与其他物种的细胞色素氧化酶第 2 亚基的同源性为 60%~77%, 是一个与蜱能量代谢相关的基因, 所获得的微小牛蜱细胞色素氧化酶第 2 亚基的 cDNA 序列在 GenBank 登录号为 EU155111。

#### 4 讨论

唾液腺是蜱体内最大的腺体, 在叮咬畜体时可分泌大量活性介质。大多数蜱唾液中的粘合剂将蜱的口器固定于宿主的皮肤, 是获得成功吸血的基础, 唾液中的其他活性介质则具有抵抗宿主的抗凝血功能及其由于免疫应激而激发的免疫逃避功能。唾液腺成分分析表明, 它们有调节宿主的细胞因子应答和降低淋巴细胞对 T 细胞有丝分裂应答的能力。蜱通过唾液腺分泌的麻醉毒素也能引起宿主的疾病甚至死亡。唾液腺也是蜱传病传播的主要器官, 它们提供的唾液活性介质在非毒血症蜱传病毒病的传递中起重要作用<sup>[7-9]</sup>。本试验采用半饱血微小牛蜱的唾液腺作为材料, 此时蜱的唾液腺处于活跃状态, 诱导表达达高丰度的基因, 便于克隆有用的功能基因。为寻找新的微小牛蜱疫苗免疫候选基因奠定平台, 以达到从种群数量上逐渐消灭微小牛蜱的目的, 降低微小牛蜱作为蜱传病媒介对畜牧业造成的经济损失。

本试验对所建文库的库容量、重组率及其插入片段长度进行了检测, 构建文库的库容量为  $2 \times 10^9$  PFU/ml, 且插入的片段长度为 500~2 500 bp, 满足构建文库的要求。通过对文库的免疫学筛选, 得到一个细胞色素氧化酶第 2 亚基部分 cDNA 序列, 证明该表达文库质量高, 具有一定代表性和多样性, 为从文库中高通量地筛选和发现未知微小牛蜱新基因奠定了基础。

#### 参 考 文 献

- [1] Mulenga A, Sugimoto C, Onuma M. Issues in tick vaccine development: identification and characterization of potential candidate vaccine antigens [J]. *Microbes Infect*, 2000, 2(11): 1353-1361.
- [2] Willadsen P, Jongejan F. Immunology of the tick-host interaction and the control of ticks and tick-borne diseases [J]. *Parasitol Today*, 1999, 15(7): 258-262.
- [3] Mulenga A, Sugimoto C, Sako Y, et al. Molecular characterization of a *Haemaphysalis longicornis* tick salivary gland-associated 29-kilodalton protein and its effect as a vaccine against tick infestation in rabbits [J]. *Infect Immun*, 1999, 67(4): 1652-1658.
- [4] Willadsen P, Riding GA, McKenna RV, et al. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus* [J]. *J Immunol*, 1989, 143(4): 1346-1351.
- [5] Montesino R, Cremata J, Rodriguez M, et al. Biochemical characterization of the recombinant *Boophilus microplus* Bm86 antigen expressed by transformed *Pichia pastoris* cells [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 1996, 23(1): 23-28.
- [6] Willadsen P, Smith D, Cobon G, et al. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 alone or in combination with recombinant Bm91 [J]. *Parasit Immunol*, 1996, 18(5): 241-246.
- [7] Bastiani M, Hillebrand S, Horn F, et al. Cattle tick *Boophilus microplus* salivary gland contains a thiol-activated metalloendopeptidase displaying kinase activity [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2002, 32(11): 1439-1446.
- [8] Tanaka AS, Andreotti R, Gome A, et al. A double headed serine proteinase inhibitor--human plasma kallikrein and elastase inhibitor--from *Boophilus microplus* larvae [J]. *Immunopharmacology*, 1999, 45(1-3): 171-177.
- [9] Lee RP, Opdebeeck JP. Isolation of protective antigens from the gut of *Boophilus microplus* using monoclonal antibodies [J]. *Immunology*, 1991, 72(1): 121-126.

(收稿日期: 2007-12-28 编辑: 高石)

(上接第 388 页)

#### 参 考 文 献

- [1] Zhan XM. *Human Parasitology* [M]. 5th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002: 204-309. (in Chinese)  
(詹希美. 人体寄生虫学 [M]. 第 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 204-309.)
- [2] Xu ZM, Li ZS, Sun L, et al. Solid medium-filter paper cultivation of *Ancylostoma caninum* larvae [J]. *Chin J Parasitol Parasit Dis*, 2007, 25(4): 358. (in Chinese)  
(许正敏, 李智山, 孙莉, 等. 犬钩蚴固体培养基滤纸培养法 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2007, 25(4): 358.)
- [3] Wang JH, Chen RS. *Clinical Practical Traditional Chinese Medicine Dictionary* [M]. Beijing: Golden Shield Publishing House, 2003: 437-507. (in Chinese)  
(王锦鸿, 陈仁寿. 临床实用中药辞典 [M]. 北京: 金盾出版社, 2003:

437-507.)

- [4] Li X, Zhang GJ, Yang G, et al. Clinical observation on the treatment of 13 cerebral cysticercosis with traditional Chinese medicine "Lei Gong San" [J]. *J Tradit Chin Med*, 1988, 16(4): 26. (in Chinese) (李侠, 张贵君, 杨戈. 雷公散治疗 13 例囊虫病患者的临床观察 [J]. 中医药学报, 1988, 16(4): 26.)
- [5] Zhang GJ, Zhang LH, Tanaka T. Effect of alcohol extract of scorpion on *Cysticercus cellulosae* in vitro [J]. *Chin J Parasitol Parasit Dis*, 1997, 15(1): 34-37. (in Chinese)  
(张贵君, 张黎化, 田中俊弘. 全蝎乙醇提取物体外对猪囊尾蚴的作用 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1997, 15(1): 34-37.)
- [6] Wang ZM. *Current Structured Drugs* [M]. Beijing: Beijing Science and Technology Press, 1993: 541-543. (in Chinese)  
(王泽民. 当代结构药物全集 [M]. 北京: 北京科学技术出版社, 1993: 541-543.)

(收稿日期: 2008-04-25 编辑: 富秀兰)