

青蒿琥酯治疗对斯氏狸殖吸虫感染大鼠血清 IL-2 和 IL-4 含量的影响

李鹏华¹ 畅灵丽¹ 黄玉清² 余俊萍¹ 张金平¹ 王光西^{1*}

【摘要】 目的 对比观察青蒿琥酯 (Art) 和吡喹酮治疗斯氏狸殖吸虫感染大鼠后,大鼠免疫转归情况,了解青蒿琥酯是否有提高斯氏狸殖吸虫感染大鼠免疫力的作用。**方法** 将 36 只清洁级雄性 Wistar 大鼠随机分成 6 组,正常对照组 (A 组),感染未治疗组 (B 组),青蒿琥酯小剂量组 (C 组)、中剂量组 (D 组)、大剂量组 (E 组),吡喹酮组 (F 组)。感染鼠每只腹腔注射 25 个斯氏狸殖吸虫囊蚴,感染后 30 d 开始用药治疗。C、D、E 分别给予 Art 50 mg/(kg·d) × 7 d, 100 mg/(kg·d) × 7 d, 150 mg/(kg·d) × 7 d 口服;F 组给予吡喹酮 150 mg/kg,隔日给药一次,共 3 次;B 组给予同体积生理盐水。于用药后 30 d,摘取大鼠眼球取血,分离血清,取脾称重,计算脾脏指数。用 ELISA 测定大鼠血清中的细胞因子白细胞介素-2 (IL-2) 和白细胞介素-4 (IL-4) 的含量。**结果** A 组大鼠脾脏指数、IL-2、IL-4 含量依次为 2.7333 ± 0.16330、(28.3333 ± 1.05409) pg/ml、(4.1190 ± 0.44537) pg/ml;B 组大鼠脾脏指数、IL-2、IL-4 含量依次为 3.8333 ± 0.25033、(19.5000 ± 0.76376) pg/ml、(41.9293 ± 0.80702) pg/ml,与 A 组相比,有统计学意义差异 ($t = 9.20, 16.62, 100.48, P$ 均 < 0.01)。C、D、F 组与 B 组比较,脾脏指数、IL-2、IL-4 有统计学意义差异 ($t = 6.00, 7.50, 8.63, 10.70, 18.54, 11.51, 112.54, 113.21, 111.39, P$ 均 < 0.01),E 组脾脏指数、IL-2 与 B 组比较,无统计学意义差异 ($t = 1.75, 0.54, P$ 均 > 0.05)。**结论** 中、小剂量的青蒿琥酯有提高斯氏狸殖吸虫感染大鼠免疫力的作用。

【关键词】 大鼠;斯氏狸殖吸虫;青蒿琥酯;白细胞介素-2;白细胞介素-4

Effects of artesunate on IL-2 and IL-4 in the sera of rats infected with *Pagumogonimus skrjabini* LI Peng-hua¹, CHANG Ling-li¹, HUANG Yu-qing², SHE Jun-ping¹, ZHANG Jin-ping¹, WANG Guang-xi^{1*}.

¹Department of Pathogenic biology, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China ²Department of Health, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China

* Corresponding author: WANG Guang-xi, Email: wangguanxi@163.com

Supported by Research Foundation of Sichuan Health Department (100232)

【Abstract】 Objective To observe the effects of artesunate (Art) on IL-2 and IL-4 in the sera of rats infected with *Pagumogonimus skrjabini*. **Methods** 36 male Wistar rats were selected for experiment. 30 wistar rats were intra-abdominally injected with 25 metacercariae and randomly divided into 5 groups (group B as untreated infective group). 6 normal Wistar rats were randomly selected as control group (A group). 30 days after infection, the rats in group C, D, E were intragastrically administrated with Art with the dose of 50 mg/(kg·d), 100 mg/(kg·d) and 150 mg/(kg·d) for consecutive 7 days, the rats in group F were intragastrically administration with praziquantel 150 mg/kg, qod, 3 times. The rats in group B were administered with equal volume of normal saline. Orbital blood was collected for qualification of IL-2 and IL-4 which were detected in serum by ELISA. The spleen were weighed for calculation of spleen index. **Results** The spleen index, IL-2, IL-4 of the rats of group A were 2.7333 ± 0.16330, (28.3333 ± 1.05409) pg/ml and (4.1190 ± 0.44537) pg/ml. The spleen index, IL-2 and IL-4 of the rats of group B were 3.8333 ± 0.25033, (19.5000 ± 0.76376) pg/ml and (41.9293 ± 0.80702) pg/ml. There were significant difference between group A and group B ($t = 9.20, 16.62, 100.48$ respectively, $P < 0.01$). Comparing with group B, the spleen index, IL-2 and IL-4 of the rats of group C, D and F were significantly different ($t = 6.00, 7.50, 8.63, 10.70, 18.54, 11.51, 112.54, 113.21, 111.39$ respectively, $P < 0.01$). There were no significant difference between group B and E ($t = 1.75, 0.54, P > 0.05$) about the spleen index and IL-2. **Conclusion** Low and

middle doses Art exhibit the effect of enhancing the immunity of the rats infected with *P. skrjabini*.

【Key words】 Rat; *Pagumogonimus skrjabini*; Artesunate; IL-2; IL-4

斯氏狸殖吸虫为我国独有虫种,分布于四川、云南、贵州、重庆、湖南、湖北、广西、广东等 14 个省(市、自治区)。其终末宿主是果子狸、犬、猫。人是斯氏狸殖吸虫的非正常宿主,因生食、半生食溪蟹感染。该虫在人体内处于童虫状态,到处游窜,造成某些器官或全身损害,出现幼虫移行症。该虫引起的幼虫移行症可分为两种类型:皮肤型与内脏型。皮肤型幼虫移行症主要表现为游走性皮下包块或结节;内脏型幼虫移行症则因侵犯器官不同而出现不同损害及表现,如侵犯肝,则出现肝区疼痛、肝大、转氨酶升高、白/球蛋白比例倒置、球蛋白升高等表现,侵犯胸腔、腹腔、心包致多浆膜腔积液,侵入脑致并殖吸虫脑病^[1]。寄生虫感染一般有宿主特异性,多数引起慢性感染。在慢性感染过程中,免疫反应的类型也会发生变化,且受循环抗原和局部持续性抗原的刺激及形成的不同免疫复合物的沉积等因素的影响,常常存在免疫抑制及免疫病理反应。因此,宿主抗寄生虫的免疫防御具有多种效应机制,T 细胞是抗寄生虫免疫机制的基础^[2]。近年来国内外学者研究发现青蒿琥酯具有抗多种病原微生物的作用,免疫药理证实青蒿琥酯是一种细胞免疫增强剂和体液免疫抑制剂,其免疫抑制作用主要通过增强效应阶段 Ts 的活性、抑制郎格罕细胞、抑制 NK 细胞的活性、降低血清溶菌酶水平、降低血清 IgG 含量等多种途径实现^[3]。有研究表明青蒿琥酯对感染大鼠体内的卫氏并殖吸虫和斯氏狸殖吸虫均有一定的杀灭效果^[4-5]。本研究报道青蒿琥酯治疗对受斯氏狸殖吸虫感染的大鼠血清中 IL-2 和 IL-4 含量的影响以及脾脏重量变化,探讨青蒿琥酯治疗对斯氏狸殖吸虫感染大鼠免疫转归情况的影响,为临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选择雄性 Wistar 大鼠 36 只,体重 200 ~ 250 g,由泸州医学院实验动物中心提供。动物感染前连续检查粪便 3 d,并殖吸虫卵阴性及健康状况良好者为合格实验动物。

1.2 主要实验试剂

青蒿琥酯片由桂林南药股份有限公司生产,批

号 070602;吡喹酮片由南京制药有限公司生产,批号 20061206;IL-2 ELISA 试剂盒、IL-4 ELISA 试剂盒由上海西唐生物科技有限公司生产。

1.3 斯氏狸殖吸虫感染大鼠实验模型的建立

1.3.1 斯氏狸殖吸虫囊蚴的分离

溪蟹从四川省宜宾市兴文县仙峰镇采集,将溪蟹逐只捣碎,取捣碎物放入锥形量杯中,反复水洗自然沉淀至上清液清亮为止,收集沉淀,在解剖镜下分离斯氏狸殖吸虫囊蚴。

1.3.2 实验动物分组

将大鼠随机分为 6 组,每组 6 只,分别为正常对照组(A 组)、感染未治疗组(B 组)、青蒿琥酯小剂量 50 mg/(kg·d)组(C 组)、中剂量 100 mg/(kg·d)组(D 组)、大剂量 150 mg/(kg·d)组(E 组)、吡喹酮 150 mg/kg 组(F 组)。

1.3.3 动物感染

感染大鼠以斯氏狸殖吸虫囊蚴 25 个/只经腹腔注射感染,正常对照组大鼠不感染。

1.4 治疗与观察指标

1.4.1 治疗

大鼠感染后 30 d 开始用药治疗。A 组不做任何处理,C、D、E 组分别灌服青蒿琥酯 50 mg/(kg·d)、100 mg/(kg·d)、150 mg/(kg·d),连续给药 7 d;F 组灌服吡喹酮 150 mg/kg,隔日给药一次,共 3 次;B 组给予同体积生理盐水。青蒿琥酯和吡喹酮均用 5% 的 NaHCO₃ 稀释,再用生理盐水配成所需浓度溶液。

1.4.2 动物解剖

于用药 30 d 后,摘眼球取血(1 ~ 2 ml),离心取血清,-20 °C 保存备用,称取大鼠重量,剖检所有大鼠,取脾脏称重并计算脾脏指数。

1.4.3 观察指标

(1)脾脏指数的计算:脾脏指数 = 脾脏重(g)/体重(g) × 1 000。

(2)大鼠血清中 IL-2、IL-4 的测定:采用酶联免

疫吸附试验法检测,均按操作说明书进行测定,于 450 nm 波长读取吸光值(A),所测数据减去实验本底后,根据预先做好的标准曲线计算标本中 IL-2、IL-4 的浓度。

1.5 统计学处理

所有数据用 SPSS11.5 统计分析,实验数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义差异。

2 结果

2.1 大鼠脾脏指数的变化

A、B 组大鼠脾脏指数为 2.7333 ± 0.16330 、 3.8333 ± 0.25033 ,有统计学意义差异($t = 9.02, P < 0.05$)。治疗后 C、D、F 组大鼠脾脏指数分别为 2.8000 ± 0.34059 、 2.7667 ± 0.24221 、 2.6000 ± 0.24495 ,与 A 组无统计学意义差异($P > 0.05$)。E 组大鼠脾脏指数为 3.4333 ± 0.50067 ,与 A 组有统计学意义差异($t = 3.26, P < 0.01$)。C、D、F 组较 B 组有统计学意义降低($t = 6.0、7.5、8.63,$

$P < 0.01$),E 组与 B 组则无统计学意义差异($P > 0.05$)(表 1)。

2.2 大鼠血清 IL-2 和 IL-4 含量

B 组大鼠 IL-2 含量为 (19.5000 ± 0.76376) pg/ml,与 A 组相比,有统计学意义差异($t = 16.62, P < 0.01$);C、D、F 组大鼠 IL-2 与 B 组比较,有统计学意义差异($t = 10.7、18.54、11.51, P < 0.01$);C 组大鼠 IL-2 与 A 组比较,有统计学意义差异($t = 2.27, P < 0.05$);D、F 组大鼠 IL-2 与 A 组比较,无统计学意义差异($P > 0.05$);E 组 IL-2 含量与 B 组比较,无统计学意义差异($P > 0.05$)(表 2)。

B 组大鼠 IL-4 含量为 (41.9293 ± 0.80702) pg/ml,与 A 组相比,有统计学意义差异($t = 100.48, P < 0.01$);C、D、E、F 组大鼠 IL-4 与 B 组比较,统计学意义差异($t = 112.54、113.21、6.06、111.39, P < 0.01$);C、D、F 与 A 组比较,无统计学意义差异($P > 0.05$);E 组 IL-2 含量与 A 组比较,有统计学意义差异($t = 115.14, P < 0.01$)(表 3)。

表 1 青蒿琥酯(Art)治疗后斯氏狸殖吸虫感染大鼠脾脏指数变化

Table 1 Changes of spleen index in rats infected with *Pagumogonimus skrijabini* after treatment with Art

组别 Group	样本数 n	脾指数($\bar{x} \pm s$) Spleen index($\bar{x} \pm s$)	t 值 ^a t value ^a	P 值 ^a P value ^a	t 值 ^b t value ^b	P 值 ^b P value ^b
A	6	2.7333 ± 0.16330			9.20	<0.01
B	6	3.8333 ± 0.25033	9.20	<0.01		
C	6	2.8000 ± 0.34059	0.14	>0.05	6.00	<0.01
D	6	2.7667 ± 0.24221	0.30	>0.05	7.50	<0.01
E	6	3.4333 ± 0.50067	3.26	<0.01	1.75	>0.05
F	6	2.6000 ± 0.24495	1.11	>0.05	8.63	<0.01

a: 与 A 组比较, b: 与 B 组比较 a: Compared with group A, b: Compared with group B

表 2 青蒿琥酯治疗对斯氏狸殖吸虫感染大鼠血清中 IL-2 含量的影响

Table 2 The level of IL-2 in sera of rats infected with *Pagumogonimus skrijabini* after treatment with Art

组别 Group	样本数 n	IL-2 含量(pg/ml) Concentration of IL-2 (pg/ml)	t 值 ^a t value ^a	P 值 ^a P value ^a	t 值 ^b t value ^b	P 值 ^b P value ^b
A	6	28.3333 ± 1.05409			16.62	<0.01
B	6	19.5000 ± 0.76376	16.62	<0.01		
C	6	26.6667 ± 1.45297	2.27	<0.05	10.70	<0.01
D	6	28.3333 ± 0.88192	0.00	>0.05	18.54	<0.01
E	6	19.1667 ± 1.30171	13.41	<0.01	0.54	>0.05
F	6	27.0000 ± 1.41421	1.85	>0.05	11.51	<0.01

a: 与 A 组比较, b: 与 B 组比较 a: Compared with group A, b: Compared with group B

表 3 青蒿琥酯治疗对斯氏狸殖吸虫感染大鼠血清中 IL-4 含量的影响

Table 3 The level of IL-4 in sera of rats infected with *Pagumogonimus skrjabini* after treatment with Art

组别 Group	样本数 n	IL-4 含量 (pg/ml) Concentration of (pg/ml)	t 值 ^a t Value ^a	P 值 ^a P Value ^a	t 值 ^b t Value ^b	P 值 ^b P Value ^b
A	6	4.1190 ± 0.44537			100.48	<0.01
B	6	41.9293 ± 0.80702	100.48	<0.01		
C	6	4.2357 ± 0.14779	0.61	>0.05	112.54	<0.01
D	6	3.9133 ± 0.15912	1.07	>0.05	113.21	<0.01
E	6	39.4325 ± 0.60501	115.14	<0.01	6.06	<0.01
F	6	4.2785 ± 0.18568	0.81	>0.05	111.39	<0.01

a: 与 A 组比较, b: 与 B 组比较 a: Compared with group A, b: Compared with group B

3 讨论

脾脏是机体重要的免疫器官, 它的退化、萎缩或充血、增大都将影响免疫功能, 尤其是体液免疫功能。在本研究中, 感染未治疗组与正常对照组相比, 脾脏指数明显升高, 提示感染未治疗组大鼠体液免疫亢进, 从而造成以 IgG、IgE 合成增加, 引起以超敏反应为核心的免疫病理损伤。本研究观察到青蒿琥酯 50 mg 治疗组、青蒿琥酯 100 mg 治疗组、吡喹酮 150 mg 治疗组大鼠脾指数降低, 与正常对照无统计学意义差异, 提示超敏反应被抑制, 免疫状态有所改善。

IL-2 是由抗原诱导活化的 CD4⁺ Th1 细胞分泌, 能诱导活化 T、B 淋巴细胞增殖分化, 产生细胞因子, 增强 T_C、NK 细胞、单核吞噬细胞杀伤活性的作用。本实验中, 感染未治疗组血清 IL-2 含量较正常对照组显著降低 ($P < 0.01$)。青蒿琥酯 50 mg 治疗组、100 mg 治疗组、吡喹酮治疗组大鼠血清中 IL-2 含量与感染未治疗组大鼠血清 IL-2 相比, 明显升高, 提示青蒿琥酯、吡喹酮治疗后, 机体免疫状态有所改善, 也验证 Th1 细胞主要促进细胞免疫的结论^[6]。青蒿琥酯 150 mg 治疗组大鼠血清中 IL-2 含量, 与感染未治疗组大鼠血清 IL-2 相比, 无统计学意义差异, 说明大剂量青蒿琥酯有抑制 IL-2 产生, 从而抑制免疫状态的作用, 这与周平等的观察结果一致, 该学者观察到青蒿琥酯能减轻正常小鼠胸腺重量, 降低血清溶菌酶水平, 增加红细胞 C3b 受体花环率及抑制 ConA 诱导的脾细胞 IL-2 产生^[7]。

Th2 细胞分泌的 IL-4 可促进 T、B 细胞增殖分化, 诱导 B 细胞发生免疫球蛋白类别转换产生 IgE, 引起以超敏反应为核心的免疫损伤。本研究中, 感染未治疗组大鼠血清 IL-4 比正常对照组大鼠显著升高, 青蒿琥酯 50 mg 治疗组、100 mg 治疗组、吡喹酮治疗组大鼠血清中 IL-4 含量明显降低, 与正常对

照组大鼠血清 IL-4 相比, 无统计学意义差异, 表明体液免疫亢进引起的机体损伤得到减轻, 同时也表明大鼠的体液免疫功能得到恢复。通过以上药物对大鼠斯氏狸殖吸虫病治疗后细胞因子的变化提示, 大鼠治疗前是以 Th2 为主的免疫抑制状态, 随着青蒿琥酯对斯氏狸殖吸虫的杀伤和抑制作用, 使宿主 Th2 为主的免疫反应减弱, Th1 反应有所增强, 机体的保护性免疫有所恢复。青蒿是清热中药, 性味苦寒, 用过量伤正气。青蒿琥酯是从青蒿中提纯的有效化合物青蒿素的衍生物之一, 本研究观察到中、小剂量的青蒿琥酯能提高斯氏狸殖吸虫感染大鼠的免疫功能, 而大剂量青蒿琥酯抑制免疫功能现象, 其具体机制有待深入研究。

参 考 文 献

- [1] Liu Q, Wei F, Liu WS, et al. Paragonimiasis: an important food-borne zoonosis in China [J]. Trends Parasitol, 2008, 10 (7): 318-323.
- [2] 蒲秀英, 傅宣英, 王琪, 等. 青蒿琥酯治疗小鼠继发性棘球蚴病后机体免疫转归及肝脏中部分酶活性的变化 [J]. 地方病通报, 2006, 21 (1): 12-15.
- [3] 杜志峰, 李振彬, 孙春霞, 等. 青蒿琥酯对佐剂性关节炎大鼠血清 TNF- α 及 IL-1 β 含量的影响 [J]. 广东医学, 2010, 31 (13): 1637-1640.
- [4] 邢文鸾, 方周溪, 陈旭丹, 等. 青蒿琥酯对卫氏并殖吸虫童虫体内杀虫效果观察 [J]. 热带病与寄生虫学, 2007, 5 (3): 157-158.
- [5] 畅灵丽, 李鹏华, 王光西, 等. 青蒿琥酯治疗大鼠斯氏狸殖吸虫感染 [J]. 寄生虫病与感染性疾病, 2010, 8 (1): 14-16.
- [6] 王松. 继发性细粒棘球蚴病小鼠的细胞因子动态研究 [J]. 地方病通报, 2002, 17 (4): 8-11.
- [7] 周平, 高平祥. 青蒿琥酯对小鼠免疫功能的影响 [J]. 蚌埠医学院学报, 1996, 21 (1): 5-7.

(收稿日期: 2012-03-09)

(本文编辑: 卢延鑫, 陈勤)