

本文引用:李 漓,何雨晴,吴智煌,杨胜辉,周小江. 巴豆叶乙酸乙酯提取物抗血吸虫活性的初步研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(2): 257-263.

巴豆叶乙酸乙酯提取物抗血吸虫活性的初步研究

李 漓,何雨晴,吴智煌,杨胜辉*,周小江*
湖南中医药大学,湖南 长沙 410208

〔摘要〕 **目的** 研究巴豆叶乙酸乙酯提取物(ethyl acetate extract from the leaves of *Croton tiglium*, EAELCT)体内外抗血吸虫的活性及对血吸虫感染小鼠血清 Th1/Th2 型细胞因子分泌的调节作用。**方法** 体外抗血吸虫试验采用人工脱尾制备的血吸虫童虫,滴加于 6 孔培养板,45 条童虫/孔,分为不同浓度 EAELCT 组、空白对照组、DMSO 组以及吡喹酮组,比较各组童虫的死亡率;体内抗血吸虫试验采用血吸虫尾蚴腹部贴片法感染小鼠,建立血吸虫感染小鼠模型,感染后小鼠随机分为模型组、吡喹酮组、EAELCT 高剂量组(0.3 g/kg)、EAELCT 中剂量组(0.15 g/kg)和 EAELCT 低剂量组(0.075 g/kg)组。体内杀血吸虫童虫和成虫试验分别在感染后第 1 天和感染后第 29 天用不同剂量 EAELCT 连续灌胃 7 d,并分别采集感染前、感染后第 14 天、第 29 天及感染后第 21 天、第 42 天的血液,分别于第 29 天和 42 天处死小鼠,收集肝门静脉和肠系膜静脉内的虫体,计算杀虫率。采用 ELISA 检测小鼠血清中 IFN- γ 、IL-2、IL-5、IL-13 细胞因子的含量。收集左肝进行 HE 染色,镜下观察肝纤维化病变的程度,并通过 Imagine-pro 图像软件测定肝组织中虫卵肉芽肿面积。**结果** 体外试验显示,EAELCT 对血吸虫童虫有明显杀灭效果,培养 48 h 和 72 h 后各浓度 EAELCT 组中血吸虫童虫的死亡率均显著高于空白对照组和吡喹酮组($P<0.05$)。体内试验显示,与模型组相比,EAELCT 各浓度组均显示较好的杀虫效果,每鼠虫荷数显著减少($P<0.05$);EAELCT 各剂量组血清中 Th1 型细胞因子 IFN- γ 、IL-2 的表达水平较模型组明显增加($P<0.05$),Th2 型细胞因子 IL-5、IL-13 表达水平明显下降($P<0.05$);EAELCT 各剂量组与模型组比较,肉眼可见小鼠肝脏的颜色较红润,肝脏表面的虫卵结节数目减少,HE 染色显示肝脏虫卵肉芽肿面积下降明显($P<0.05$)。**结论** EAELCT 体内外具有较好的抗血吸虫活性,可通过上调 Th1 型细胞应答和下调 Th2 型细胞应答,从而有效抑制血吸虫病肝纤维化的病变和程度。

〔关键词〕 巴豆叶;乙酸乙酯提取物;抗血吸虫活性;调节细胞因子;血吸虫病肝纤维化

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.02.012

A preliminary study of the anti-schistosomiasis activity of ethyl acetate extract from the leaves of *Croton tiglium*

LI Li, HE Yuqin, WU Zhihuang, YANG Shenghui*, ZHOU Xiaojiang*

Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

〔Abstract〕 **Objective** To study the in vitro-in vivo antischistosomal activity of ethyl acetate extract from the leaves of *Croton tiglium* (EAELCT) and its regulatory effects on serum Th1/Th2 cytokine secretion in schistosomiasis-infected mice. **Methods** For in vitro anti-schistosomiasis test, schistosomula prepared by artificial tail removal were added dropwise to 6-well culture plates, 45 schistosomula/well, and were then divided into EAELCT groups with different concentrations, blank control group, DMSO group and group. The mortality rates of schistosomula in each group were compared. For in vivo anti-schistosomiasis test, schistosomiasis

〔收稿日期〕 2022-08-31

〔基金项目〕 湖南省自然科学基金项目(2020JJ4067);湖南省教育厅科学研究项目(19A368);湖南中医药大学学科开放基金项目(2018JCYX09)。

〔第一作者〕 李 漓,女,博士研究生,研究方向:中药有效成分研究与品质评价。

〔通信作者〕 * 周小江,男,教授,博士研究生导师,E-mail:gale9888@163.com;杨胜辉,男,教授,硕士研究生导师,E-mail:shenghuiyang@126.com。

infected mouse model was established by schistosoma cercariae abdominal patch method. The infected mice were randomly divided into model group, praziquantel group, high-dose EAELCT group (0.3 g/kg), medium-dose EAELCT group (0.15 g/kg) and low-dose EAELCT group (0.075 g/kg). As to in vivo schistosomulum killing and schistosome killing tests, mice were continuously gavaged with different doses of EAELCT for 7 d on the first day and the 29th day after infection, and blood was collected before infection, 14, 29, 21 and 42 d after infection, and mice were sacrificed on the 29th and 42th day respectively, and worms in the portal vein and mesenteric vein were collected to calculate the insecticidal rate. The content of IFN- γ , IL-2, IL-5 and IL-13 cytokines in mice sera was detected by ELISA. The left liver was collected for HE staining, the degree of liver fibrosis lesions was observed microscopically, and the area of oval granulomas in liver tissue was determined by Image-pro. **Results** In vitro experiments showed significant killing effects of EAELCT on schistosomiasis, and the mortality rates of schistosomulum in the EAELCT group after 48 and 72 h culture were significantly higher than those in the blank control group and praziquantel group ($P<0.05$). In vivo experiments showed: compared with the model group, better insecticidal effects had been identified in EAELCT groups with all concentration, and the insect charge per mouse was significantly reduced ($P<0.05$); compared with the model group, the expression levels of Th1 cytokines IFN- γ and IL-2 in all EAELCT groups were significantly higher ($P<0.05$), and the expression levels of Th2 cytokines IL-5 and IL-13 were significantly lower ($P<0.05$); compared with the model group, the color of the mouse liver was rosier, the number of egg nodules on the surface of the liver was less, and the area of granuloma of liver eggs was reduced significantly in HE staining ($P<0.05$). **Conclusion** EAELCT has good antischistosomal activity both in vitro and in vivo, and can effectively inhibit the lesion and degree of schistosomiasis liver fibrosis by upregulating Th1 cell response and downregulating Th2 cell response.

[**Keywords**] leaves of *Croton tiglium*; ethyl acetate extract; antischistosomal activity; regulation of cytokines; schistosomiasis liver fibrosis

血吸虫病是一种由裂体属(*Schistosoma*)寄生虫引起的、广泛流行于热带及亚热带地区的人畜共患病,严重危害人类健康^[1-2]。血吸虫病影响着全球 70 多个国家或地区,据世界卫生组织统计,全球至少有 2.4 亿人感染血吸虫病,超过 8 亿人居住在易感染风险地区^[1,3],在我国流行危害较大的是日本血吸虫病^[4]。血吸虫病在我国流行历史悠久,并且流行的范围广泛,截至 2020 年底,全国共有 450 个血吸虫病流行县(市、区),共有血吸虫病流行乡(镇)3352 个、流行村 28 376 个,流行村的总人口达 7137.04 万人^[5-6]。

血吸虫在人等终宿主体内存在虫卵、尾蚴、童虫和成虫 4 个阶段^[7]。血吸虫病是一种免疫性疾病,在其感染过程中,尾蚴、童虫、成虫和虫卵均可对人体造成损害,损害的主要原因是不同虫期所释放的抗原均能诱发一系列免疫病理变化,并出现一些并发症^[7]。其中最大的损害是由沉积在肝脏中的虫卵导致肉芽肿及继发性纤维化^[8-9]。

由于中药具有多成分、多途径和多靶点协同调控作用特点,因此,在治疗血吸虫病,尤其是血吸虫病肝纤维化时,具有潜在的优势,能够有效控制肝纤

维化的发展^[10]。巴豆叶收载于《中华本草》,又名双眼龙叶、大叶双眼龙叶,为大戟科植物巴豆 *Croton tiglium* L. 的叶,具有祛风活血、杀虫解毒的功效。同时,巴豆叶是傣族、哈尼族、毛南族和德昂族的习用药^[11-13]。巴豆在我国的西南和南部地区均有分布,尤其是云南、四川、广西等地,其资源很丰富^[12-13]。巴豆叶中含二萜类、降倍半萜类、生物碱、苯丙素类、挥发油等成分^[14-18],其提取物具有抗氧化、抗肿瘤、杀皮肤寄生虫等作用^[19],其所含二萜类成分具有抗肿瘤、抗结核、抗炎等活性^[14,16,20]。本团队前期从巴豆叶乙酸乙酯提取物(ethyl acetate extract from the leaves of *Croton tiglium*, EAELCT)中分离鉴定了 20 个二萜类化合物,其中 12 个为新二萜(含 1 个新骨架)^[14-16]。本文在前期的研究基础上,对 EAELCT 抗血吸虫病的作用进行研究,以期找到“标本同治”的抗血吸虫药物及为开发利用巴豆叶这一可再生资源打下基础。

1 材料

1.1 动物

SPF 级昆明小鼠,雌雄各半,体质量 18~22 g,购于长沙市天勤生物技术有限公司,许可证号:SCXK

(湘)2019-0014,质量合格证:4307262211100423576。小鼠自由摄食及饮水,饲养温度 20~25 ℃,室内通风良好。实验经湖南中医药大学第一附属医院动物实验伦理委员会批准(ZYFY20191115)。

血吸虫感染的阳性钉螺由湖南省血吸虫病防治研究所提供。在室温和光照条件下将钉螺于去氯水中静置 2 h 逸蚴,将水面上的尾蚴收集到 15 mL 的塑料离心管中,加入 4 ℃预冷的洗涤培养基,离心洗涤 2 次,每次 5 min,弃去上清液,收集尾蚴,备用。

1.2 药材与试剂

巴豆叶购于成都荷花池药材市场,经湖南中医药大学周小江教授鉴定为大戟科植物巴豆 *Croton tiglium* L. 的干燥叶;吡喹酮片(沈阳红旗制药有限公司,批号:1706071);HE 染液、Masson 染液(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:ZLI-9613、G1340);IFN- γ 、IL-2、IL-5、IL-10、IL-13 ELISA 试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司,批号:BMS4021、BMS239、BMS603、BMS614、BMS6015)。其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器

高速冷冻离心机(德国 eppendorf 公司,型号:5415R);细胞培养箱(美国 Thermo 公司,型号:HERA-cell 240i);切片机(德国莱卡公司,型号:RMZ135);显微镜(厦门 Motic 公司,型号:BA410E)。

1.4 受试药物

取干燥的巴豆叶 3 kg,剪碎,加 70% 的乙醇回流提取 2 次,每次 1 h,第一次加 10 倍量,第二次加 8 倍量,滤过,合并提取液,减压回收乙醇,加水超声混悬。水混悬液采用石油醚萃取脱脂后,分取水层,再加乙酸乙酯进行多次萃取,直至无色,合并乙酸乙酯萃取液,减压浓缩后蒸干,得乙酸乙酯提取物 136 g,得率为 4.53%。

试验时,取 EAELCT,加少许 DMSO 溶解后,加生长培养基和蒸馏水超声使混悬,分别配制成浓度为 34、17、8.5、4.25 $\mu\text{g/mL}$ 的体外试验培养液和浓度为 0.015 00、0.007 50 和 0.003 75 g/mL 的体内试验供试液。

2 方法

2.1 体外杀血吸虫童虫试验

血吸虫童虫的培养及分组:取血吸虫尾蚴加 5 mL 生长培养基(含 10% 胎牛血清、90% RPMI 1640、

200 U/mL 的青霉素、200 $\mu\text{g/mL}$ 的链霉素、2.5 $\mu\text{g/mL}$ 的两性霉素 B 和 10 mmol/L 的 4-羟乙基哌嗪乙磺酸溶液),重悬,吸入注射器中,来回反复推压尾蚴 20 次左右,使尾蚴脱尾变成童虫,镜检断尾率可达 99% 以上。离心,去除上清的断尾,收集童虫。分为空白对照组、DMSO 组、吡喹酮组和不同浓度的 EAELCT 组。

杀血吸虫童虫:于有童虫的离心管中加入 1 mL 生长培养基,混匀后,滴加于 6 孔板,45 条童虫/每孔。按上述分组,每组加 2 mL 不同浓度(34、17、8.5、4.25 $\mu\text{g/mL}$)含药的生长培养基,空白对照组加入生长培养基。将 6 孔板置于 37 ℃、CO₂ 培养箱中孵育,分别于 24、48、72 h 用显微镜观察虫体变化及生存状况,计算童虫死亡率。

2.2 体内抗血吸虫试验

2.2.1 体内抗血吸虫童虫试验 按照随机数字表,随机选择 10 只小鼠作为空白对照组,再参照文献建立血吸虫童虫感染模型^[2],采用腹部贴片法感染小鼠,40 条尾蚴/小鼠,建模成功后随机分为模型组、吡喹酮对照组(0.2 g/kg)、EAELCT 高剂量组(0.3 g/kg)、中剂量组(0.15 g/kg)和低剂量组(0.075 g/kg)。每组 10 只。感染后于第 1、2、3、4、5、6、7 天连续灌胃不同浓度的 EAELCT,吡喹酮对照组于感染后第 1、第 2 天连续灌胃 2 d,模型组以等量的生理盐水灌胃。感染后第 29 天处死小鼠,收集肝门静脉、肠系膜静脉内血吸虫虫体,计数小鼠体内虫体总数,计算杀虫率,比较各组杀虫率的差异。

2.2.2 体内抗血吸虫成虫试验 按照随机数字表,随机选择 10 只小鼠作为空白对照组,再参照文献建立血吸虫成虫感染模型^[2],采用腹部贴片法感染小鼠,20 条尾蚴/小鼠,感染后小鼠随机分组,分组情况同“2.2.1”,每组 10 只小鼠。感染 29 d 后用 EAELCT 连续灌胃 7 d,吡喹酮对照组于感染 29 d 后连续灌胃 2 d,模型组以等量的生理盐水灌胃。感染后第 42 天处死小鼠,收集肝门静脉及肠系膜静脉内血吸虫成虫,计数虫体总数,计算杀虫率,比较各组杀虫率的差异。

2.2.3 调节小鼠 Th1/Th2 型细胞因子的免疫应答 分组及给药同“2.2.1”和“2.2.2”,其中,杀童虫试验:于感染前、感染后第 14 天、第 29 天分别采集血液;杀

成虫试验:于感染前、感染后第29天、第42天分别采集血液。采用ELISA试剂盒检测血清中IL-2、IL-5、IL-13、IFN- γ 等细胞因子的含量,比较EAELCT对小鼠在发病过程中相关Th1/Th2型细胞因子表达的影响。

2.2.4 对血吸虫病小鼠肝纤维化影响 分组及给药同“2.2.2”,于42 d处死小鼠,分取肝脏。观察小鼠肝脏的外观变化,取肝左叶0.5 g置于4%多聚甲醛中固定,石蜡包埋切片进行HE染色,显微镜下观察肝纤维化的程度,并通过Imagine ProPlus 6.0图像软件测定小鼠肝组织中虫卵肉芽肿面积,每组测量20个虫卵肉芽肿,计算各组的平均肉芽肿面积。

2.3 统计学分析

通过SPSS 20.0软件进行处理,计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,各组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK法,死亡率采用行 $\times$ 列卡方检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 体外杀血吸虫童虫试验结果

与空白对照组对比,各给药组48 h及72 h后对血吸虫童虫均有明显杀灭效果,各浓度EAELCT组中血吸虫童虫的死亡率均显著高于空白对照组($P<0.05$),其中34 $\mu\text{g/mL}$ EAELCT组杀童虫效果最好,虫体死亡率显著高于17.00 $\mu\text{g/mL}$ 、8.50 $\mu\text{g/mL}$ 和4.25 $\mu\text{g/mL}$ EAELCT组($P<0.05$),72 h后童虫死亡率达到100%,EAELCT体外杀童虫呈明显的剂量和时间依赖性。详见表1。

表1 EAELCT体外杀血吸虫童虫的效果($\bar{x}\pm s$)

组别	浓度/ ($\mu\text{g/mL}$)	每孔童 虫数/条	血吸虫童虫死亡率/%		
			24 h	48 h	72 h
空白对照组	—	45	10.94	18.81	31.63
吡喹酮组	30.00	45	17.39	47.30 [*]	56.36 [#]
DMSO组	—	45	9.17	19.75	36.67 ^{&}
EAELCT组	34.00	45	21.98 [#]	71.93 ^{##}	100.00 ^{##}
	17.00	45	15.69	41.33 [*]	88.14 ^{##} *
	8.50	45	11.39	36.21 ^{**}	78.33 ^{##} *
	4.25	45	5.04 ^{***}	31.93 ^{##} *	50.00 ^{**}

注:与空白对照组比较,^{*} $P<0.05$;与吡喹酮组比较,[&] $P<0.05$;与EAELCT (34.00 $\mu\text{g/mL}$)组比较,^{*} $P<0.05$ 。

3.2 体内杀血吸虫试验结果

在体内抗血吸虫童虫试验中,与模型组相比,EAELCT高、中、低剂量组的每鼠虫荷数均显著减少,显示较好的杀虫率($P<0.05$)。与吡喹酮组相比,EAELCT各浓度组的每鼠虫荷数更低($P<0.05$),每鼠杀虫率更高($P<0.05$)。详见表2。

表2 EAELCT对血吸虫童虫杀虫效果($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/(g/kg)	小鼠数/只	每鼠虫荷数/条	每鼠杀虫率/%
模型组	—	10	28.73 $\pm$ 5.08	—
吡喹酮组	0.200	9	22.68 $\pm$ 4.79 [*]	21.06 $\pm$ 1.83
EAELCT组	0.075	9	19.81 $\pm$ 7.14 ^{**}	31.05 $\pm$ 3.74 [#]
	0.150	7	17.51 $\pm$ 7.09 ^{**}	39.05 $\pm$ 4.61 [#]
	0.300	7	16.16 $\pm$ 3.27 ^{**}	43.75 $\pm$ 4.89 [#]

注:与模型组比较,^{*} $P<0.05$;与吡喹酮组比较,[#] $P<0.05$ 。

在体内抗血吸虫成虫试验中,与模型组相比,EAELCT高、中、低剂量组中每鼠虫荷数均显著降低($P<0.05$),提示EAELCT对血吸虫成虫有较好的杀虫效果。与吡喹酮组比较,EAELCT高、中、低剂量组中每鼠虫荷数更高($P<0.05$),每鼠杀虫率更低($P<0.05$)。详见表3。

表3 EAELCT体内对血吸虫成虫杀虫效果($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/(g/kg)	小鼠数/只	每鼠虫荷数/条	每鼠杀虫率/%
模型组	—	10	14.93 $\pm$ 3.21	—
吡喹酮组	0.200	8	4.02 $\pm$ 1.19 [*]	73.07 $\pm$ 7.59
EAELCT组	0.075	7	9.07 $\pm$ 2.58 ^{**}	39.25 $\pm$ 3.65 [#]
	0.150	9	7.84 $\pm$ 4.41 ^{**}	47.49 $\pm$ 4.86 [#]
	0.300	7	6.85 $\pm$ 1.81 ^{**}	54.12 $\pm$ 5.98 [#]

注:与模型组比较,^{*} $P<0.05$;与吡喹酮组比较,[#] $P<0.05$ 。

3.3 调节血吸虫病小鼠Th1/Th2型细胞因子的免疫应答结果

体内抗血吸虫童虫试验中,Th1/Th2型细胞因子的免疫应答结果见图1。感染后期EAELCT高、中、低剂量组的Th1型细胞因子IFN- γ 、IL-2表达水平较模型组明显增加($P<0.05$);而EAELCT高、中、低剂量组的Th2型细胞因子IL-5、IL-13表达水平较模型组明显下降($P<0.05$)。

体内抗血吸虫成虫试验中,Th1/Th2型细胞因子的免疫应答结果见图2。结果表明,感染后期EAELCT高、中、低剂量组的Th1型细胞因子IFN- γ

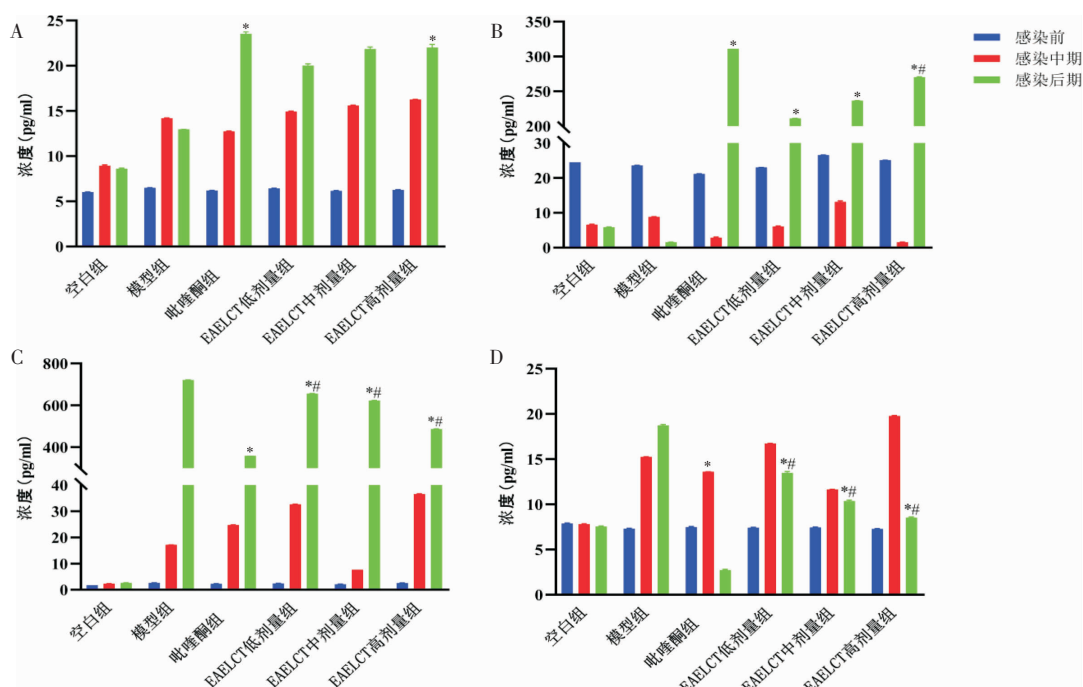


图1 EAELCT对血吸虫童虫小鼠血清中IFN- γ (A)、IL-2(B)、IL-5(C)、IL-13(D)的影响

注:与模型组比较,* $P<0.05$;与吡喹酮组比较,# $P<0.05$

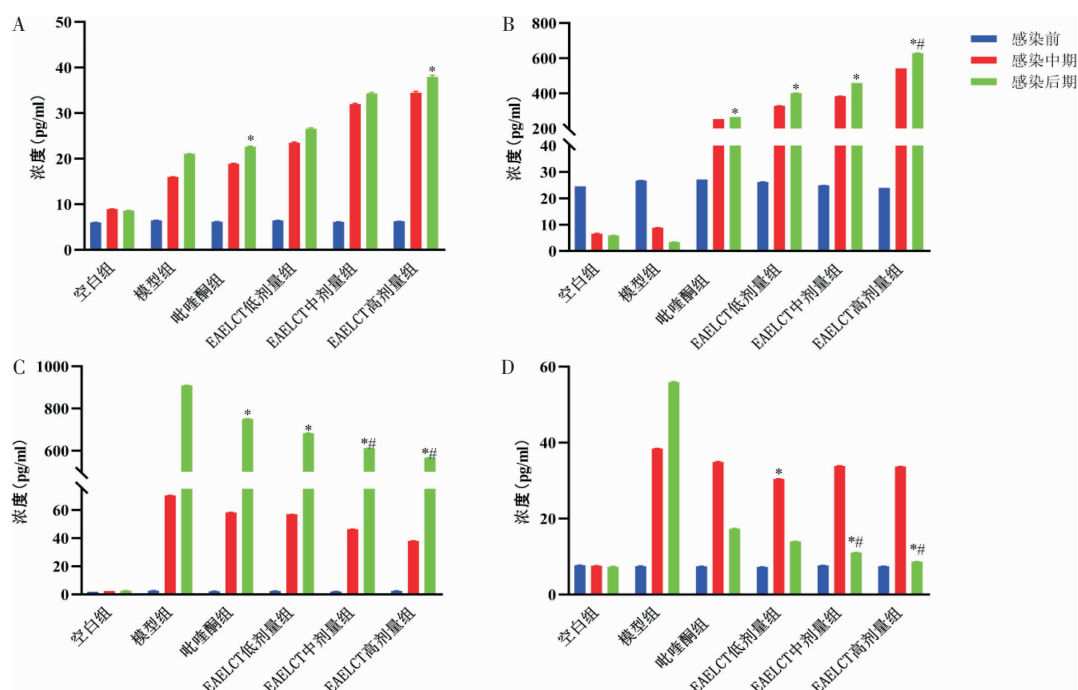


图2 EAELCT对血吸虫成虫小鼠血清中IFN- γ (A)、IL-2(B)、IL-5(C)、IL-13(D)的影响

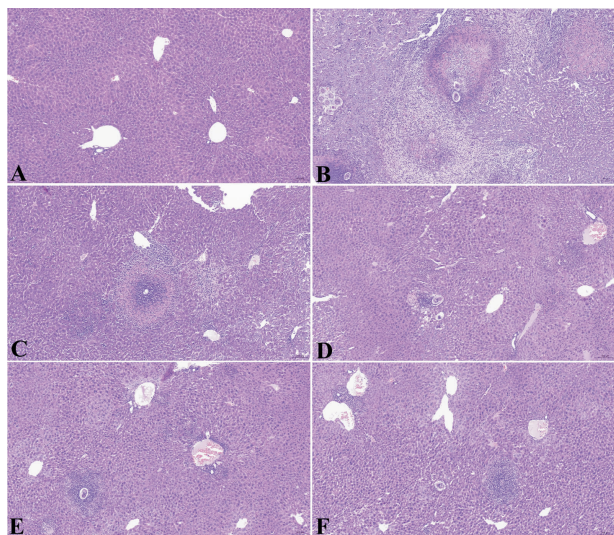
注:与模型组比较,* $P<0.05$;与吡喹酮组比较,# $P<0.05$ 。

和IL-2表达水平较模型组明显增加($P<0.05$);Th2型细胞因子IL-5、IL-13表达水平较模型组均明显下降($P<0.05$)。

3.4 EAELCT抗血吸虫病小鼠肝纤维化结果

肉眼观察显示,模型组小鼠肝脏颜色发暗,分布

有大量的虫卵结节;EAELCT不同浓度组的小鼠肝脏颜色较红润,肝脏表面的虫卵结节数目相对较少。HE染色显示,模型组有大量的虫卵肉芽肿,炎症细胞浸润明显,而EAELCT高、中、低剂量组较模型组的虫卵肉芽肿面积明显减小($P<0.05$)。详见图3、表4。

图3 各组小鼠肝脏 HE 染色比较($\times 100$)

注:A.空白对照组;B.模型组;C.吡嗪酮组;D.EAELCT 低剂量组;E.EAELCT 中剂量组;F.EAELCT 高剂量组。

表4 虫卵肉芽肿面积对比($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g/kg)	测量的虫卵肉芽肿数/个	测量的虫卵肉芽肿面积/ μm^2
模型组	—	20	51 047.85 $\pm$ 3 641.25
吡嗪酮组	0.200	20	26 347.49 $\pm$ 1 926.54*
EAELCT 组	0.075	20	41 567.27 $\pm$ 2 986.76**
	0.150	20	40 648.73 $\pm$ 2 647.12**
	0.300	20	34 964.75 $\pm$ 2 346.45**

注:与模型组比较,* $P < 0.05$;与吡嗪酮组比较,** $P < 0.05$ 。

4 讨论

血吸虫病严重威胁人类健康,晚期可导致肝硬化、腹水和上消化道大出血等多种并发症。血吸虫感染机体后即使体内的血吸虫虫体被杀灭,但沉积在肝脏中的虫卵仍然可能会导致肉芽肿和肝纤维化。因此,血吸虫病肝纤维化是当前的治疗难题。目前,血吸虫病的首选治疗药物为吡嗪酮,但它不能改变肝纤维化进程或逆转肝纤维化,且有产生耐药性的情况^[22-23]。因此,本文特选择具有杀虫解毒功效的多民族用药巴豆叶进行研究。巴豆叶作为傣族、哈尼族、毛南族和德昂族的习用药,在我国分布面广,资源丰富。本研究发现,EAELCT 不仅有较好的杀血吸虫作用,而且能调节 Th1/Th2 型细胞因子的免疫应答和改善肝纤维化,显示了中药多成分、多途径和多靶点协同调控作用的特点。

本研究结果表明,EAELCT 在体外对血吸虫童虫显示出较好的杀虫活性,各浓度 EAELCT 组中血吸虫童虫的死亡率均显著高于空白对照组和吡嗪酮

组;体内抗血吸虫试验进一步证实 EAELCT 对血吸虫童虫具有较好的杀虫效果,但对血吸虫成虫的杀虫效果不及吡嗪酮。多位学者的研究^[24-25]证实,某些中药的提取物中含有杀血吸虫的活性物质。刘晨晨等^[24]发现白头翁提取物中的单体 BTW5 对体外培养日本血吸虫成虫及童虫具有较好的杀灭作用。陈岩勤等^[25]学者证实,白头翁总皂苷(PRS)对体外培养的日本血吸虫童虫和成虫具有显著的杀虫活性,30 $\mu\text{g/mL}$ PRS 作用 4 h 后,日本血吸虫童虫及成虫全部死亡,杀虫率达到 100%。这些研究提示,从传统中草药中探寻具有预防和治疗血吸虫感染的活性成分,有助于为临床开发新型血吸虫病治疗药物提供参考和借鉴。然而,中药抗血吸虫的具体机制目前尚不完全清楚。为进一步探讨 EAELCT 抗血吸虫病肝纤维化的机制,本课题组进一步研究了 EAELCT 对血吸虫感染小鼠血清中 Th1/Th2 型细胞因子分泌的调节作用。血吸虫病肝纤维化过程中,Th2 型细胞及其分泌的细胞因子 IL-4、IL-5、IL-10 和 IL-13 等发挥了重要作用^[26]。在血吸虫感染早期即感染后 6 周内,主要由 Th1 型细胞因子如 IL-2、IFN- γ 等发挥免疫功能,同时抑制 Th2 型细胞应答,实现早期抗寄生虫感染作用;同时,Th2 型细胞因子表达逐渐升高,8~12 周达到最高水平,随后慢慢减少^[26-27]。该过程引起以 IL-4 和 IL-13 介导的 Th2 占主导的免疫反应,趋化嗜酸性粒细胞、肝星状细胞和淋巴细胞等细胞在虫卵周围浸润,形成以虫卵为中心的肉芽肿,最终促进肝纤维化形成^[26-27]。本实验结果表明,体内杀血吸虫童虫过程中,EAELCT 高、中、低剂量组的 Th1 型细胞因子 IFN- γ 、IL-2 表达水平较模型组明显增加;而 EAELCT 高、中、低剂量组的 Th2 型细胞因子 IL-5、IL-13 表达水平较模型组明显下降。EAELCT 刺激 Th1 型细胞因子 IFN- γ 、IL-2 的表达,抑制 Th2 型细胞应答,下调 Th2 型细胞因子 IL-5、IL-13 的表达,在一定程度上抑制和逆转肝纤维化形成。

本研究通过 EAELCT 体内外抗血吸虫的活性研究及对血吸虫感染小鼠血清 Th1/Th2 型细胞因子分泌的调节作用研究,显示 EAELCT 体内外具有一定的抗血吸虫活性,同时具有一定的改善血吸虫病肝纤维化的作用,但其具体机制尚未进行深入研究,有待于进一步探索。本文的研究结果,为 EAELCT 的进一步研究和开发利用提供了实验依据。

参考文献

- [1] CHENG S Y, ZHU B K, LUO F, et al. Comparative transcriptome profiles of *Schistosoma japonicum* larval stages: Implications for parasite biology and host invasion[J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2022, 16(1): e0009889.
- [2] MCMANUS D P, BERGQUIST R, CAI P F, et al. Schistosomiasis—from immunopathology to vaccines[J]. *Seminars in Immunopathology*, 2020, 42(3): 355–371.
- [3] TANG Y X, SHEN Y X, HONG Y, et al. MiR-181a regulates the host immune response against *Schistosoma japonicum* infection through the TLR4 receptor pathway[J]. *Parasites & Vectors*, 2021, 14(1): 548.
- [4] JIZ M, MINGALA C, FU Z Q, et al. High prevalence of *Schistosoma japonicum* by perfusion in naturally exposed water buffalo in a region of the Philippines endemic for human schistosomiasis[J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2021, 15(9): e0009796.
- [5] 杨东见, 李林瀚, 程婉婷, 等. 中医对血吸虫病的认识[J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2019, 31(2): 218–221.
- [6] 张利娟, 徐志敏, 杨帆, 等. 2020年全国血吸虫病疫情通报[J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2021, 33(3): 225–233.
- [7] 诸欣平, 苏川. 人体寄生虫学[M]. 9版. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 109–113.
- [8] NATION C S, DA'DARA A A, MARCHANT J K, et al. Schistosoma migration in the definitive host[J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2020, 14(4): e0007951.
- [9] CHEN S S, GAO Y Q, LIANG G Y, et al. Imbalance of Th1/Th2 and Th17/Treg promoting schistosome egg granuloma formation[J]. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2017, 10(10): 14290–14300.
- [10] 吴忠廉, 何立. 血吸虫病肝纤维化中医药治疗进展[J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2013, 25(4): 422–424.
- [11] 胥筱云, 杨梅, 宋波, 等. 傣医外治法在“拢梅兰申”病中应用特点分析[J]. *中国民族医药杂志*, 2005, 11(5): 20–21.
- [12] 邱碧丽. 巴豆叶及生藤化学成分研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2010.
- [13] 贾敏如, 张艺. 中国民族药辞典[Z]. 北京: 中国医药科技出版社, 2016: 244.
- [14] WANG J F, QIN L, ZHAO B Q, et al. Crotonols A and B, two rare tiglane diterpenoid derivatives against K562 cells from *Croton tiglium* [J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2019, 17(1): 195–202.
- [15] ZHAO B Q, PENG S, HE W J, et al. Antitubercular and cytotoxic tiglane-type diterpenoids from *Croton tiglium* [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2016, 26(20): 4996–4999.
- [16] WANG J F, YANG S H, LIU Y Q, et al. Five new phorbol esters with cytotoxic and selective anti-inflammatory activities from *Croton tiglium* [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2015, 25(9): 1986–1989.
- [17] BU W, SHI Y N, YAN Y M, et al. Norsesquiterpenoids from the leaves of *Croton tiglium* [J]. *Natural Products and Bioprospecting*, 2011, 1(3): 134–137.
- [18] 孙欣, 吴泳樟, 张玉波. 巴豆枝叶的化学成分研究[J]. *中药材*, 2019, 42(8): 1796–1800.
- [19] SIMRAN S, INDHUMATHI P, MEENAKSHI S M. An Overview of the Biological and Chemical Perspectives of *Croton tiglium* [J]. *Der Pharmacia Lettre*, 2016, 8(19): 324–328.
- [20] WANG Y W, TANG C P, YAO S, et al. Discovery of a novel protein kinase C activator from *Croton tiglium* for inhibition of non-small cell lung cancer[J]. *Phytomedicine*, 2019, 65: 153100.
- [21] 李洪军, 梁幼生, 戴建荣, 等. 双氢青蒿素抗日本血吸虫作用的体内实验观察[J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2009, 21(6): 468–472.
- [22] 张伟伟, 朱继峰, 王任, 等. 白藜芦醇调控 Th1 和 Th2 应答抑制小鼠日本血吸虫病肝脏纤维化的研究[J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(8): 1091–1097.
- [23] 梁幼生. 我国血吸虫对吡喹酮抗性研究之概要[J]. *中国热带医学*, 2019, 19(7): 603–607.
- [24] 刘晨晨, 张静, 高思佳, 等. BTW5 对体外培养日本血吸虫成虫及童虫的杀灭效果[J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2012, 24(5): 533–536.
- [25] 陈岩勤, 张庆远, 李笑然, 等. 白头翁总皂苷对体外培养的日本血吸虫幼虫及成虫的作用[J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2013, 25(6): 604–609.
- [26] 姜鹏月, 潘卫庆. 血吸虫病肝纤维化及其致病机制研究进展[J]. *中国热带医学*, 2018, 18(8): 847–852.
- [27] 赵雷, 杨东亮. 血吸虫病肝纤维化发病机制研究[J]. *临床肝胆病杂志*, 2015, 31(3): 342–344.

(本文编辑 苏维)