

金丝桃素对小鼠巨噬细胞内刚地弓形虫速殖子的增殖抑制作用

崔洁^{1,2,3},王旗⁴,杨小迪²,孙希萌⁵,汪瑞²,姜辉²,
王守祥²,张敏²,魏明²,夏惠²,陈兴智²,沈继龙¹

摘要:目的 观察金丝桃素(Hypericin, Hy)对小鼠巨噬细胞内弓形虫的增殖抑制作用,为抗弓形虫天然药物的筛选提供线索。**方法** 分离小鼠腹腔巨噬细胞(Macrophage, Mφ),建立体外Mφ感染稳定表达绿色荧光蛋白的弓形虫(RH-green fluorescent protein, RH-GFP)速殖子模型,观察不同剂量Hy的最佳作用效果。实验分4组:①A组(对照组),不加Hy;②B组(Mφ感染RH-GFP+100 μg/mL Hy);③C组(Mφ感染RH-GFP+200 μg/mL Hy);④D组(Mφ感染RH-GFP+400 μg/mL Hy),分别在培养1、2和3 h后利用荧光显微镜和流式细胞术观察计数感染的Mφ和游离速殖子在各药物浓度及各时间点的变化;透射电镜观察虫体超微结构的变化。**结果** 与对照组相比,随着Hy浓度的增加和用药时间的延长,Mφ内速殖子数量明显减少,游离速殖子数量也显著减少,荧光强度逐渐降低;经药物组不同浓度Hy作用后,游离/Mφ内弓形虫的比值逐渐升高,至400 μg/mL剂量作用3 h后开始下降,游离与胞内速殖子比例的差异在同一时间段内均有统计学意义($P<0.05$),但药物作用1 h或2 h各实验组之间无统计学差异($P>0.05$),作用3 h各浓度组之间差异有统计学意义($P<0.05$),各实验组同一药物浓度下在孵育1、2和3 h后效果增强($P<0.05$)。透射电镜观察显示,随Hy作用时间延长,虫体逐渐出现肿胀,胞膜与基质之间空隙明显,空泡形成且增多、变大,胞膜断裂,内部结构溶解溢出。**结论** 体外实验初步显示Hy呈剂量和时间依赖性地增强对Mφ内弓形虫速殖子增殖的抑制作用,可降低宿主细胞感染率,且对胞外速殖子有一定杀伤作用。

关键词:金丝桃素;刚地弓形虫;巨噬细胞;抑制

中图分类号:R382.5

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2018)07-0583-05

Inhibitory effect of hypericin on intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii* in macrophages

CUI Jie^{1,2,3}, WANG Qi⁴, YANG Xiao-di², SUN Xi-meng⁵, WANG Rui², JIANG Hui²,
WANG Shou-xiang², ZHANG Min², WEI Ming², XIA Hui², CHEN Xing-zhi², SHEN Ji-long¹

(1. Department of Parasitology, School of Basic Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032, China;

2. Department of Microbiology and Parasitology, Anhui Key Laboratory of Infection and Immunity,
Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China;

3. Microscopic Morphology Integrated Laboratory, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China;

4. Anhui Provincial Institute of Schistosomiasis Control, Hefei 230061, China;

5. Department of Parasitology, School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

国家自然科学基金(No.81471983)资助;蚌埠医学院自然科学基金面上项目(No.BYKY1653)资助;安徽省大学生创新创业训练计划项目(No.201610367025)资助;安徽省血吸虫病防治研究所科研基金项目(No.1603)资助

通讯作者:沈继龙,Email:shenjilong53@126.com

作者单位:1.安徽医科大学基础医学院病原生物学教研室;病原生物学安徽省重点实验室,安徽省人兽共患病重点实验室(安徽医科大学),合肥 230032;
2.蚌埠医学院病原生物学教研室,安徽省感染与免疫重点实验室,蚌埠 233030;
3.蚌埠医学院显微形态综合实验室,蚌埠 233030;
4.安徽省血吸虫病防治研究所,合肥 230061;
5.首都医科大学基础医学院人体寄生虫学教研室,北京 100069

Abstract: The suppressive effect of hypericin on the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) tachyzoites in mouse peritoneal macrophages was explored in this study. Macrophages were isolated and infected with *T. gondii* tachyzoites (type I, RH strain) expressing green fluorescent protein (GFP). There were four groups: the control group (macrophages infected with RH-GFP without treatment, group A) and the other three groups (macrophages infected with RH-GFP treated with different concentrations of hypericin: group B, with 100 μg/mL; group C, with 200 μg/

mL; and group D with 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Tachyzoites were collected after 1 hour, 2 hours, and 3 hours of treatment. The infected macrophages and the free parasites were observed under different concentrations of hypericin in various time intervals by fluorescence microscopy and flow cytometry. The ultrastructure of tachyzoites was also observed by transmission electron microscopy. Compared with the control group, the number and fluorescence intensity of tachyzoites were gradually decreased in a concentration and time dependent manner under the experimental condition. The ratio of free parasites to those within macrophages increased and reached the peak at the dosage of 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ on 3 hours after treatment. With the extension of treatment duration, it was found that tachyzoites showed swelling and deformed; apparent gap appeared between cell membrane and matrix; more and bigger vacuoles were formed; the cell membrane became dissolved and disrupt, the inner structure overflowed. It's suggested that the inhibition of hypericin on intracellular proliferation of *T. gondii* tachyzoites in macrophages is presented in a concentration and time dependent manner *in vitro*, meanwhile, a remarkable killing effect on free tachyzoites is also found.

Keywords: hypericin; *Toxoplasma gondii*; macrophage; inhibition

Supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81471983), the Project on the Natural Science Foundation of Bengbu Medical College (No. BYKY1653), the University Students' Innovation and Entrepreneurship Training Programs of Anhui Province (No. 201610367025), the Project on the Scientific Research Foundation of Anhui Provincial Institute of Schistosomiasis Control (No. 1603)

Corresponding author: Shen Ji-long, Emial: shenjilong53@126.com

刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)是一种顶复门的机会性致病原虫,呈世界性分布,可感染几乎所有温血动物的有核细胞,引起人兽共患的弓形虫病^[1-2]。在免疫功能正常者,弓形虫感染多呈慢性隐性感染,而在免疫功能缺陷者则可导致严重临床后果,甚至死亡^[3]。胎儿发生先天性感染时可引起死亡,存活者常出现先天性畸形、心脏病、智力发育不全等,对优生优育产生较大影响^[4]。目前临幊上主要的治疗药物包括磺胺嘧啶、乙胺嘧啶、螺旋霉素等^[5],这些药物毒副作用大、疗程长或不易透过胎盘屏障,且难以清除病原体,治疗效果并不理想。因此研发毒副作用小、能有效控制弓形虫感染的新药仍是弓形虫病治疗的研究热点之一^[3]。

金丝桃素(Hypericin, Hy)是一种贯叶连翘植物的提取物,为萘骈二蒽酮化合物,是该植物中最具生物活性的物质。研究显示,Hy具有抗病毒、抗肿瘤和抗抑郁等作用,可提高机体免疫力而且对正常细胞无毒副作用,亦有激活T淋巴细胞、上调免疫功能的作用^[6]。蔡茹等^[7]发现Hy被光诱导后具有显著的体外杀伤日本血吸虫的效应。张克勤等^[8]报道Hy具有显著的抗艾美球虫(与弓形虫同属于顶复门原虫)的效果。本实验室的前期研究证实Hy具有显著的体外抗弓形虫速殖子的效果^[9]。本研究通过建立携带绿色荧光蛋白的弓形虫(RH-green fluorescent protein, RH-GFP)体外感染小鼠腹腔巨噬细胞(Macrophage, M φ)模型,观察Hy对M φ 内弓形虫速殖子的抑制作用,为Hy作为弓形虫病治疗药物提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 药物 Hy 购自上海经科化学有限公司,Giemsa 染液为美国 Sigma 公司产品,RPMI 1640 培养液为 GIBCO 公司产品。

1.1.2 实验动物 用于弓形虫传代保种的 SPF 级昆明小白鼠(6~8 周, 雌性)和用于提取 M φ 的 BALB/c 小鼠(6~8 周, 雌性)均购自安徽医科大学实验动物中心。动物伦理批准文号: AMU26-08061。

1.1.3 虫株 RH-GFP 由中国农业大学动物医学院索勋教授惠赠。

1.2 主要仪器设备 荧光显微镜(CX31)为日本 OLMPUS 公司产品。流式细胞仪(FACSCalibur)为美国 BD 公司产品。CO₂ 细胞培养箱(SERIES 8000 DH)为 Thermo Scientific Napco 公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 M φ 提取 将 BALB/c 小鼠麻醉后脱颈处死,75% 酒精浸泡并消毒腹部皮肤,剪开腹壁暴露腹膜,腹腔注入 RPMI1640 培养液 3 mL,轻柔腹部静置 3 min,夹提腹膜并用吸管吸取腹腔灌洗液。将腹腔液 1 000 r/min 离心 10 min,细胞沉淀用预冷培养液洗涤 2 次。细胞沉淀再加入含抗生素的培养液重悬、计数并接种于培养板中,置于 37 °C,5% CO₂ 培养箱。待 M φ 贴壁后取出培养板,用培养液洗 1~2 次,收获贴壁细胞。

1.3.2 Hy 对 M φ 的毒力检测 提取 BALB/c 小鼠腹腔 M φ 常规进行体外培养,铺 12 孔板,1×10⁶ 个

细胞/孔,加入 Hy 使其终浓度分别为 100、200 和 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$,同时设空白对照组。每组设 3 个复孔。培养板置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ 培养箱中孵育,分别于 1、2 和 3 h 后收集细胞进行 Giemsa 染色。

1.3.3 RH-GFP 速殖子制备 建立小鼠体内急性感染 RH-GFP 模型,分离纯化游离速殖子,用荧光显微镜观察。

1.3.4 体外 M φ 弓形虫速殖子(RH-GFP)感染 在细胞培养板内以虫体与细胞 5:1 比例接种速殖子至小鼠腹腔 M φ ,30 min 后洗去未侵入的速殖子继续培养,12 h 后取样在荧光显微镜下观察。

1.3.5 实验分组 Hy 设 100、200 和 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 3 个药物浓度。按照以下分组:感染 RH-GFP 的 M φ 组(A 组对照)、不同浓度 Hy 组:感染 RH-GFP 的 M φ +100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (B 组)、感染 RH-GFP 的 M φ +200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C 组)和感染 RH-GFP 的 M φ +400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (D 组)。每组设 3 个复孔,每孔定容 1 mL。

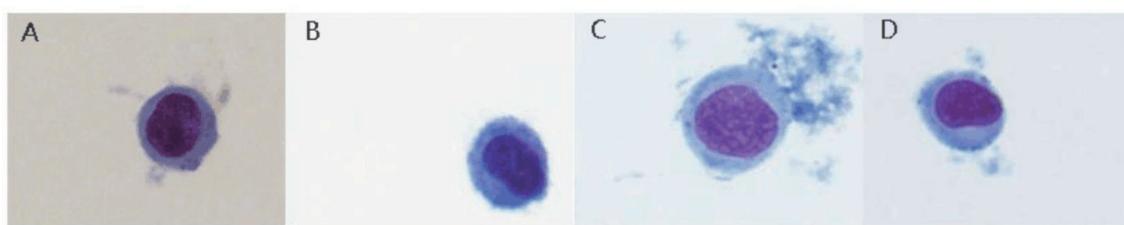
1.3.6 流式细胞仪检测 在培养 1、2 和 3 h 后,每组各孔分别取样,检测游离速殖子和感染细胞在不同时间、不同浓度条件下数量的变化。

1.3.7 透射电镜观察 取 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hy 作用 1、2 和 3 h 后的虫体及生理盐水对照组,2.5% 戊二醛和 1% 四氯化锇依次固定,按照透射电镜常规方法制备样品,JEM-1230 透射电镜下观察并拍照。

1.4 统计学方法 数据统计采用 SPSS 11.5 统计软件处理,各组数据均用($\bar{x} \pm s$)表示,检验各组方差齐同后进行方差分析(两两比较用 *q* 检验),检验水平为 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 Hy 对 M φ 的毒力检测 经 Giemsa 染色在显微镜下观察,不同浓度 Hy 作用 3 h 对 M φ 形态结构、细胞膜和细胞核与对照组比较无显著差别(图 1)。



A: M φ 对照组; B: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hy 组; C: 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hy 组; D: 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hy 组

图 1 Hy 作用 3 h 后各组 M φ 吉姆萨染色($\times 1 000$)

Fig.1 Groups of macrophages with Giemsa staining 3 hours after the treatment of Hy ($\times 1 000$)

2.2 RH-GFP 荧光显微镜观察结果 稳定传代过程中分离提纯的速殖子在存活状态下荧光激发状态正常,荧光显微镜下发绿色荧光(图 2)。

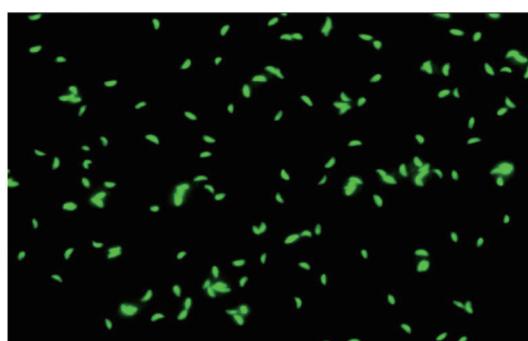


图 2 RH-GFP 荧光显微镜图片($\times 400$)

Fig.2 RH-GFP under the fluorescent microscope ($\times 400$)

2.3 M φ 体外感染 RH-GFP 模型 显微镜下可见弓形虫在 M φ 内的增殖(图 3)。

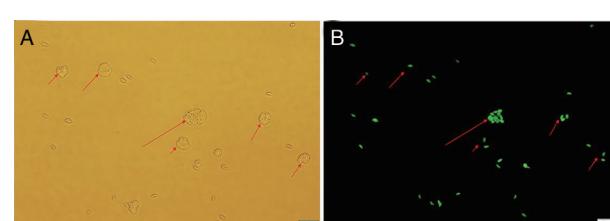


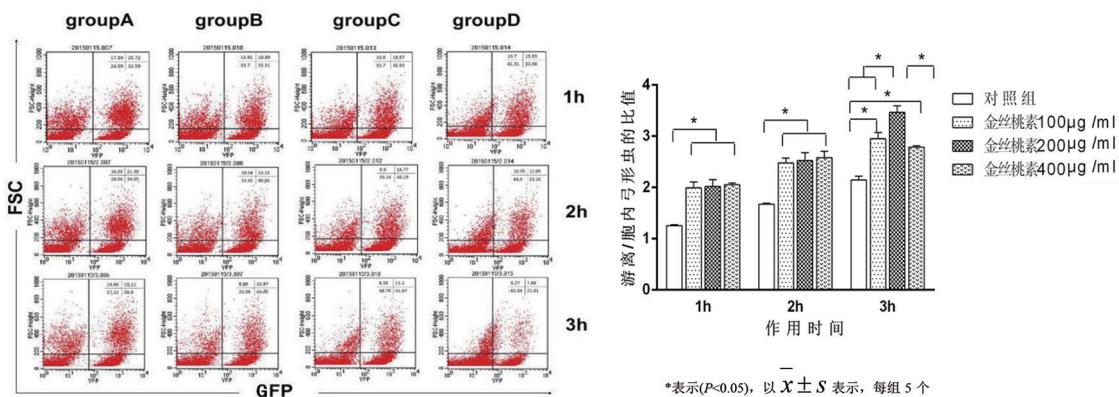
图 3 RH-GFP 感染 M φ (同一视野)在普通光源下(A)、在荧光光源下(B)($\times 400$)

Fig.3 Macrophages infected with RH-GFP (the same view) under normal light (A), under fluorescent light (B) ($\times 400$)

2.4 流式细胞仪检测 Hy 作用后随着时间的延长以及药物浓度的增加,速殖子感染的 M φ 比例逐渐下降;游离与胞内速殖子比值升高,各药物组在同一时间点内与对照组相比,差异均有统计学意义($F=14.95, 24.45, 30.99, P<0.05$)。Hy 作用 1 h 各浓度组之间差异无统计学意义(*q* 值分别为 0.45、0.45、

0.0003, $P > 0.05$), Hy 作用 2 h 各浓度组之间差异无统计学意义(q 值分别 2.48、0.39、2.09, $P > 0.05$), 在第 3 h 内各浓度组之间差异有统计学意义

($q = 3.71, 4.91, P < 0.05$)。各实验组同一药物浓度下在第 1 h、2 h 和 3 h 之间差异有统计学意义($F = 21.30, 37.82, 19.70, P < 0.05$)(图 4)。



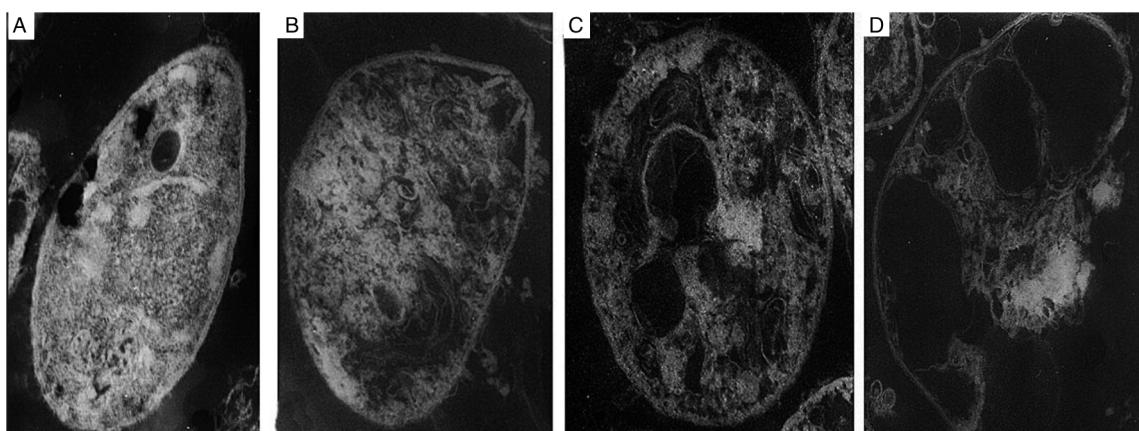
A: $M\varphi + T. gondii$ 对照组; B: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hy 组; C: 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hy 组; D: 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hy 组
流式图右上象限代表感染 RH-GFP 的 $M\varphi$; 右下象限代表游离的 RH-GFP

图 4 各实验组在 Hy 作用 1、2 和 3 h 后游离速殖子和感染细胞比例变化流式代表图(左)及统计图(右)

Fig.4 Change of the ratio of the free RH-GFP and infected macrophages in different concentrations groups after 1, 2 and 3 hours shown in the flow chart(left) and the statistical chart(right)

2.5 透射电镜观察结果 与对照组比较, Hy 作用 1 h 后虫体肿胀, 包膜与基质出现空隙, 外形改变; 作用 2 h 后, 虫体内出现明显的空泡, 细胞核固缩;

作用 3 h 后, 虫体内空泡增多且较大, 电子密度明显降低, 局部包膜破裂, 内容物溢出。(图 5)



A: 生理盐水对照组; B: 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hy 作用 1 h; C: 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hy 作用 2 h; D: 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hy 作用 3 h

图 5 Hy 作用后的速殖子超微结构变化(透射电镜, $\times 12\,000$)

Fig.5 Ultrastructural alterations of *T. gondii* tachyzoites incubated with Hy (transmission electron microscopy, 12 000 \times)

3 讨 论

弓形虫病一直是人类和畜牧业生产重点防控的疾病, 治疗弓形虫病的常用药物以叶酸代谢的抑制剂居多, 如乙胺嘧啶联合磺胺嘧啶, 替代的药物有克林霉素、阿奇霉素或克拉霉素。上述化学药物毒副作用大, 且无法有效对抗弓形虫组织包囊^[10]。植物

源性药物一直被用于治疗人与动物的许多疾病, 包括寄生虫病^[11]。来自植物的天然化合物为寻找新的有效安全的驱虫剂提供了一个独特的机会。近年来, 众多研究显示中草药治疗弓形虫病具有巨大发展前景, 如桦褐孔菌多糖能够减少弓形虫感染引起的睾丸生精细胞病理损伤; 甘草在与磺胺氯吡嗪钠

(SPZ)结合应用时, RH 感染小鼠的存活率达到 50%; 氧化苦参碱和苦参碱可降低速殖子数量(45.2% 和 53.8%), 并使小鼠的存活率提高到 67%^[12-13]。

而 Hy 来自贯叶连翘植物, 具有独特的药理作用, 目前市场上可见商品化成品。近年研究发现, Hy 不仅具有抗病毒、抗肿瘤及抗抑郁的效应, 还能激活单核吞噬细胞从而增强机体抗感染的免疫功能^[14-15]。在寄生虫病防治中, 已有报告证实 Hy 能够杀伤蠕虫类的日本血吸虫和顶复门原虫类的艾美球虫。有研究显示 Hy 可通过调变亚精胺在寄生虫中的氧化还原平衡作用进而诱导利什曼原虫的死亡^[16]。王旗等^[17]发现 Hy 可以调节宿主体内细胞因子水平的变化, 通过抑制 CD8⁺ T 细胞介导的细胞毒作用改善急性弓形虫感染小鼠的细胞免疫功能, 提高小鼠抗感染的能力。

本研究前期实验已经证实 Hy 体外抗弓形虫速殖子效果显著^[9]。在动物实验中, Mφ 是弓形虫偏嗜的主要宿主细胞之一, 也是在感染早期宿主固有免疫发挥抗感染的最重要的免疫细胞, 因此探讨中草药提取物抑制弓形虫速殖子在 Mφ 内以及游离虫体的增殖, 具有重要的潜在临床应用价值。本实验使用稳定表达绿色荧光蛋白的转基因弓形虫虫株, 利用流式细胞术进行检测, 相比以往染色剂染色后依靠肉眼观察计数更加客观可靠。研究结果显示, Hy 能够以剂量和时间依赖性地抑制 Mφ 内和游离的弓形虫速殖子的增殖, 并且实验浓度范围内的 Hy 对 Mφ 无明显形态学影响。体外培养中, 弓形虫约在接种 1 min 即可侵入 Mφ, 约 3 h 后可见弓形虫在细胞内分裂增殖, 4~6 h 开始破坏细胞, 因此实验选取 1、2 和 3 h 3 个时间点进行观察。预试验显示 500 μg/mL 组作用 4 h 抗虫效果即达到平台期, 故选择 100、200、400 μg/mL 3 个浓度梯度。流式检测结果显示, 随着 Hy 作用时间的延长, 游离与胞内速殖子的比值不断升高, 同一时间段内不同浓度 Hy 对胞内速殖子均有抑制作用($P < 0.05$), 3 h 后各浓度组之间差异明显($P < 0.05$), 而 400 μg/mL 组在 3 h 后游离速殖子的比例有所下降。透射电镜结果显示, 400 μg/mL 组虫体在不同时间段形态结构变化明显, 在 Hy 作用 3 h 后速殖子出现虫体破裂, 内容物溢出, 虫体处于死亡状态, 而对照组超微结构清晰完整, 这些也证实了 Hy 在体外有较好的抗弓形虫的作用。

本实验结果初步揭示了 Hy 对 Mφ 内和游离的弓形虫速殖子的增殖抑制作用, 为该药的深入研究提供了线索。Hy 是通过对弓形虫的直接抑制, 或

是通过诱导宿主细胞的抗感染免疫, 有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Denkers EY, Schneider AG, Cohen SB, et al. Phagocyte responses to protozoan infection and how *Toxoplasma gondii* meets the challenge [J]. PLoS Pathog, 2012, 8(8): e1002794.
- [2] Yarovinsky F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection [J]. Nat Rev Immunol, 2014, 14(2): 109-121.
- [3] 王旗, 杨雯, 杨小迪, 等. 抗弓虫药物的研究进展 [J]. 中国病原生物学杂志, 2014, 9(5): 478-481.
- [4] 李允鹤. 寄生虫病免疫学及免疫诊断 [M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1991: 116-117.
- [5] Masoud S, Alireza R, Ahmad A, et al. Randomized trial of intravitreal clindamycin and dexamethasone versus pyrimethamine, sulfadiazine, and prednisolone in treatment of ocular toxoplasmosis [J]. Ophthalmol, 2011, 118(1): 134-141.
- [6] Tamaru S, Kikuchi A, Takagi K, et al. Fetal therapy of severe symptomatic toxoplasmosis using azithromycin [J]. J Obstet Gynaecol Res, 2011, 37(7): 953-957.
- [7] 蔡茹, 余新平, 王瑜, 等. 光诱导金丝桃素体外抗日本血吸虫雄虫作用的观察 [J]. 中国寄生学与寄生虫病杂志, 2014, 32(3): 176-179.
- [8] 张克勤, 蒋丽, 张俊杰, 等. 金丝桃素抗鸡球虫效果观察 [J]. 湖北农业科学, 2012, 51(19): 4316-4320.
- [9] 杨小迪, 孙希萌, 王旗, 等. 金丝桃素体外抗弓形虫速殖子效果的观察 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2016, 34(3): 203-207.
- [10] Silveira C, Muccioli C, Nussenblatt R, et al. The effect of long-term intermittent trimethoprim/sulfamethoxazole treatment on recurrences of toxoplasmic retinochoroiditis: 10 years of follow-up [J]. Ocul Immunol Inflamm, 2015, 23(2): 246-247.
- [11] Kumarasingha R, Preston S, Yeo TC, et al. Anthelmintic activity of selected ethno-medicinal plant extracts on parasitic stages of *Haemonchus contortus* [J]. Parasites Vectors, 2016, 9: 187.
- [12] Zhang X, Jin L, Cui Z, et al. Antiparasitic effects of oxymatrine and matrine against *Toxoplasma gondii* in vitro and in vivo [J]. Exp Parasitol, 2016, 165: 95-102.
- [13] Pan M, Lyu C, Zhao J, et al. Sixty years (1957–2017) of research on toxoplasmosis in China—an overview [J]. Front Microbiol, 2017, 8: 1825.
- [14] Kashef N, Borghei YS, Djavid GE. Photodynamic effect of hypericin on the microorganisms and primary human fibroblasts [J]. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2013, 10(2): 150-155.
- [15] Yi J, Yang X, Zheng L, et al. Photoactivation of hypericin decreases the viability of RINm5F insulinoma cells through reduction in JNK/ERK phosphorylation and elevation of caspase-9/caspase-3 cleavage and Bax-to-Bcl-2 ratio [J]. Biosci Rep, 2015, 35(3): e00195.
- [16] Singh S, Kumari E, Bhardwaj R, et al. Molecular events leading to death of *Leishmania donovani* under spermidine starvation after hypericin treatment [J]. Chem Biol Drug Des, 2017, 90 (5): 962.
- [17] 王旗, 杨小迪, 薛洪宝, 等. 金丝桃素对急性弓形虫感染小鼠脾脏 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞亚群的影响 [J]. 中国病原生物学杂志, 2014, 9(12): 1091-1093.