

計畫編號：DOH102-DC-2406

衛生福利部疾病管制署一百零二年度科技研究發展計畫

痢疾阿米巴致病性及抗藥性研究

*The study of pathogenicity and drug tolerance of Entamoeba histolytica*

研究報告

執行機構：疾病管制署研究檢驗中心

計畫主持人：嵇達德

研究人員：劉浩毓、江政剛、許世芬

執行期間：102 年 1 月 1 日至 102 年 12 月 31 日

\*本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對媒體發布研究成果應事先徵求本署同意\*

## 目錄

	頁碼
封面	
目錄	(2)
摘要	(3)
前言	(5)
材料與方法	(10)
結果	(13)
討論	(18)
結論與建議	(21)
計畫重要研究成果及具體建議	(22)
參考文獻	(23)
圖表	(25)
	共 (37)頁

## 中文摘要

痢疾阿米巴廣泛於世界各地，可引起嚴重痢疾或侵入性的疾病，全球每年約有 10 萬個病患死於痢疾阿米巴。研究蟲株間的變異，可以了解其毒力因子的遺傳學關聯性，及在人類族群間的傳播模式。本研究已從兩位無症狀帶原的印尼籍勞工檢體分離培養出 2 株不同基因型別之蟲株，並命名為 TCDC-1198 與 TCDC-1446，將用以探討蟲株藥物耐受性與致病性機轉，以協助後續疫病防治。其中臨床株 TCDC-1198 具有 *AIG1* 基因型，而 *AIG1* 基因已被許多學者認為是重要的致病因子。在 Paromomycin 低劑量長時間處理測試中，發現痢疾阿米巴臨床蟲株之藥物耐受性較標準蟲株高。比較四種不同胺基醣甘類藥物 (Gentamicin、G418、Paromomycin 與 Neomycin)，發現藥物環烷團基之 6' 羥基化與其抗蟲活性有相關性。Paromomycin 的抗蟲機轉可能為誘導痢疾阿米巴走細胞壞死途徑，而致細胞破損死亡。

關鍵詞：痢疾阿米巴，致病性，藥物耐受性，AIG1，胺基醣甘類藥物

## 英文摘要

Amoebiasis still is a very important parasitic disease, which results in severe and invasive disease all over the world and causes about 100 thousand deaths each year. Study of the *Entamoeba histolytica* strain variations can help to investigate the virulent factors from the genetic information. Two of *E. histolytica* clinical strains TCDC-1198 and TCDC-1446 had been isolated from two asymptomatic foreign labors belonged to different 6 tRNA-STR genotypes and had been used to investigate the drug tolerance and pathogenic factors. Only strain TCDC-1198 has *AIG1* gene that had been indicated to be an important pathogenic factor for *E. histolytica*. We had tested the paromomycin tolerance on *E. histolytica* clinical and standard strain. This result suggested that clinical strains were more tolerant than standard strain. Four different aminoglycoside drugs, gentamicin, G418, paromomycin and neomycin, were used to study the relationship between drug chemical structure and parasitocidal activity. These results showed that G418 and paromomycin have significantly parasitocidal activities which may relate to 6' hydroxyl group on their aromatic ring groups. The parasitocidal mechanisms of the G418 and paromomycin were different. The paromomycin may induce necrosis in *E. histolytica*, whereas G418 induces apoptosis. Study of the pathogenicity and drug tolerance of *E. histolytica* may help the development of anti-amebic drugs for future amoebiasis treatment and control.

Keyword: *Entamoeba histolytica*, pathogenicity, drug tolerance, AIG1, aminoglycoside drug.

## 前言

阿米巴痢疾 (amoebiasis) 是一種由單細胞原蟲痢疾阿米巴 (*Entamoeba histolytica*) 所引起的疾病，人類受到感染時主要寄生於腸道，偶爾會伺機穿過腸道黏膜侵入身體其他器官；主要會引發下痢腸炎，嚴重者可產生肝膿瘍。痢疾阿米巴生活史分囊體 (cyst) 及活動體 (trophozoite) 兩種階段，其傳染途徑為糞口傳染。全球每年估計有五億人曾經感染過阿米巴痢疾，約可導致十萬人死亡，故世界衛生組織將之列為極重要之熱帶腸道寄生蟲傳染病 [1,2]。

人類首例阿米巴痢疾感染症發表於 1875 年，1903 年將此原蟲命名為痢疾阿米巴原蟲，之後於臨床上陸續發現無症狀的感染病人 (asymptomatic carries) 體內亦帶有蟲株，直至 1925 年 Emile Brumpt 將此類引發無症狀感染的原蟲重新命名為 *Entamoeba dispar*；由於鏡檢下無法區分 *E. histolytica* 與 *E. dispar*，到 1978 年後，才根據生化反應、免疫學反應以及基因序列的不同 [11, 12]，將其分為兩個型態相同，但前者有致病力而後者無致病力的兩種 species [3,4]。然在臨床上也有些感染 *E. histolytica* 的人在檢驗時無明顯症狀，但之後 *E. histolytica* 仍可能侵入黏膜，造成潰瘍或膿瘍；而感染 *E. dispar* 的帶原者則不會致病，因此是否需對所有的 amoebiasis 逕行投藥治療的策略，應再加檢討 [3,4]。

## 阿米巴痢疾的流行病學

阿米巴感染症為世界性分佈，全球每年高達五億人感染，一般在熱帶及亞熱帶地區發生率較高，嚴重病例及併發症也多發生於此地區，包括墨西哥、中南美洲、西非、南非、南亞及東南亞，但其中 90%的病人通常沒有症狀 [5]。台灣近年來自東南亞引進大量外籍勞工，而東南亞亦為各種寄生蟲疾病流行地區，因此可能引入新的寄生蟲病。其中阿米巴痢疾屬第二類法定傳染病，於發現疑似或確定病例時需於 24小時內通報。此外，在台灣痢疾阿米巴感染的高危險群還有精智障教養機構院生、疫區返國者及男同性戀/HIV患者。民國 76年至 79年間衛生署預防醫學研究所曾對全省 12所精神病療養機構共 4,803人之阿米巴痢疾進行血清學（IHA）檢查，發現平均陽性率近 30%，其中以東部某精神醫院之 45.39%最高。83年再針對該院進行調查，發現痢疾阿米巴鏡檢陽性率為 10.9% [6]。其他在啟智教養院的調查亦顯示，血清學陽性率約為 13.1%到 44.1%，EIA陽性率為 3.4%，鏡檢陽性率則為 0.001%到 15.2% [7-9]。由台大洪建清醫師等人的研究發現男同性戀/HIV患者亦為痢疾阿米巴的高危險群 [10]，但造成流行的阿米巴菌株是由國外傳入或本土流行還需釐清。

## 阿米巴痢疾的致病性與親源分析

至今有關 *E. histolytica* 菌株變異及其在疾病的重要性的資訊仍非

常缺乏，需要發展更有效及可靠的基因分型技術來檢測的 *E. histolytica* 變異性 [13]。利用目前國際常用的 6 個 tRNA 相關多形性標記 (six tRNA-linked STRs polymorphic markers) [14,15]，發展親緣演化分析防法，可評估患者之間的關係、國籍及症狀與蟲株之間相關性後，發現臨床症狀與病患帶蟲數無相關性，但與蟲株型別較相關。我們發現目前臺灣感染痢疾阿米巴的人口有年輕化的趨勢，並從親緣演化的關係分析，發現在台灣高風險族群如 HIV 有特定型別的蟲株流行，且與日本的蟲株型別較接近，可能已有相互傳播的發生，需加以釐清。為能了解 *E. histolytica* 蟲株與致病性的關係，須進一步分離培養相關蟲株，分析親緣演化的關係，並以基因體學及蛋白質體學等方法來找尋可能造成疾病的毒力因子，做為後續防治的目標。

### 阿米巴痢疾的治療與評估

為避免抗阿米巴藥物抗藥性的發生，致病性的 *E. histolytica* 需診斷確認後才加以治療，非致病性的 *E. dispar* 則不需治療。目前治療痢疾阿米巴的藥物可分成腸道、組織及混合型抗阿米巴藥物三類。其中 Metronidazole 是組織感染最主要的首選藥物和其他 nitroimidazole 衍生藥物如 Tinidazole, Secnidazole 及 Ornidazole 一樣，可殺死組織中的阿米巴活動體，但是對 cyst 無效； Diloxanide furoate, Iodoquinon 及 Paromomycin 則

主要用於殺死腸道中的阿米巴蟲。已有研究指出 *E. histolytica* HM1:IMSS 在試管中經突變劑 Ethylmethanesulphonate 誘發後可對 Metronidazole 產生高抗藥性，並發現抗藥株的 Superoxide dismutase (fe-SOD) and Peroxiredoxin 表現量增加 3-5 倍，而 Ferredoxin 及 Flavin reductase 則有表現量減少的現象 [16]。然而人為誘發之抗藥性其機轉仍有可能與自然環境或病人體內所產生的機轉不同，須再加探討。痢疾阿米巴的基因組亦發現 6 個與哺乳動物癌症細胞多重抗藥性基因 (MDR), (Pgp, 170 kDa protein) 序列相似的基因，可能與抗阿米巴藥物的代謝有關。目前臨床上，雖然尚未發現痢疾阿米巴發生 Metronidazole 抗藥性的報告；但在其他寄生蟲的臨床分離株，如 *Giardia lamblia*、*Trichomonas vaginalis*，已有 Metronidazole 抗藥性的發生 [17]。近來許多研究也發現 Metronidazole 具有致癌的風險 [18-20]，並已被美國國家衛生研究院 (NIH) 的國家毒理學計畫 (National Toxicology Program) 列為致癌物質，只能有限度的使用 [21]。在阿米巴及其它原蟲疾病的治療上已面臨無新藥開發，現有藥物抗蟲機轉不甚明瞭，長期使用將出現抗藥性的隱憂。因此，開發替代藥物與了解藥物抗蟲機轉與安全效益即為現今重要的課題 [24,27,28]。

## 胺基醣甘類藥物 (Aminoglycoside drug)

胺基醣甘類藥物是一類具有胺基修飾醣的重要抗生素。台灣現行的痢疾阿米巴治療藥物中，除 Metronidazole 外，尚有 Iodoquinon 及 Paromomycin。其中 Paromomycin 為胺基醣甘類藥物，可以有效對抗革蘭氏陽性與陰性菌，及一些原蟲和條蟲 [22]。具有抗阿米巴活性的胺基醣甘類藥物，除了 Paromomycin 外，還有 G418 (Geneticin) [23]。根據 Villalba *et al.*於 2007 年的報告，G418 會誘導痢疾阿米巴進行細胞凋亡 [23]。然而，目前國際間對於胺基醣甘類藥物結構與抗蟲活性之關係尚未釐清，並且對 Paromomycin 的抗蟲機轉與阿米巴的抗藥機制也還未有相關報告。若是後續有 Paromomycin 抗藥性發生，將影響我國藥物的使用與選擇，需加以研究其抗蟲機轉與監測抗藥性的發生。故本研究的目的是針對痢疾阿米巴蟲株致病性及現行台灣所使用治療藥物之抗蟲機轉和阿米巴抗藥機制進行研究，探討胺基醣甘類藥物結構與抗蟲活性之相關性，建立各表現型蟲株之基因表達差異的資料庫，以期釐清蟲體致病力與藥物耐受力機制。

## 材料與方法

### 檢體來源

台灣地區本土精神病院 (北、中、南、東部地區) 收集之新鮮糞便檢體、國內阿米巴病例通報檢體 (包括台灣國人及外籍勞工或外籍新娘) 以及國內合作之愛滋病人檢體。

### 檢體處理及保存

檢體處理與處理依據 Nollau 等提出之方法加以修改而得。取 0.5g 新鮮糞便含 1% 之 6M guanidine thiocyanate 混合震盪均勻，室溫下 10 分鐘後，進行 DNA 萃取或保存於 -20°C。萃取 DNA 的方法為將檢體以 14000 rpm 離心 5 分鐘後取其上清液，以 phenol/chloroform/isoamyl alcohol 分離 DNA。取得 DNA 之後，繼續進行 PCR 反應。

### 單一菌種共同培養法

從 cysts 開始，將新鮮糞便加入十倍的無菌水混合，再以 BD filter (40 m funnel) 過濾至離心管中，以 275 g，3 分鐘離心取沉澱物，反覆以無菌水清洗沉澱物三次。再以 50% sucrose 進行層析，取出中央分層物至細胞培養管中，並以無菌水清洗分層物三次 (275g, 3 分鐘)。離心後 (275g, 3 分鐘)

取沉澱物加入 1% HCl 並放置室溫 12 分鐘，再以無菌水清洗沉澱物三次 (275g, 3 分鐘)。最後以新鮮的 YIMDHA-S medium (9 ml) 培養，其中包含有：15% bovine serum, polymyxin B sulfate (130 unit/ml), antibiotic solution (100 U/ml penicillin G, 10 U/ml streptomycin and 25 ng/ml Amphotericin B)。並加入 1 ml 的 *Crithidia fasciculata* 培養液 cultured by LIT medium。培養管以水平方式放置 37°C 培養 overnight。小心移除上清液，再加入 9 ml the LYI-S-2 medium 並加入 1 ml 的 *Crithidia fasciculata* 培養液 cultured by LIT medium。*Crithidia fasciculata* 需儲存於 4°C，且可在存活狀態培養約一個月。培養管以水平方式放置 37°C 培養約三天，觀察 amoeba 的生活狀況並隨時監測其污染程度。若細胞數量穩定上升至飽和，換上 1-4 ml 新鮮的 LYI-S-2 medium，置於冰上 5 分鐘後再行分管培養。

### PCR 產物之選殖及定序

分析核酸序列時，則利用 Platinum<sup>®</sup> Pfx DNA polymerase 進行 PCR 反應：5 µl template DNA，0.3 µM primer mix，及 1X Pfx Amplification buffer，1.0 µM MgSO<sub>4</sub>，0.3 mM dNTP mixture 及 1.25 U Pfx DNA polymerase，最終體積為 50 µl，94°C 加熱 3 分鐘後，進行 35 個循環，每個循環為 denature 94°C，15 秒；annealing 60°C，15 秒以及 extension 68°C，2 分鐘。利用 TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit 來篩選正確 PCR 產物，並將產物基因序列與

GeneBank 資料庫比對，而加以分型。

### **Trypan blue 染色法進行細胞計數**

將含有痢疾阿米巴之培養管放置於冰上 5 至 10 分鐘，搖晃約 20 次後，取 1 毫升至微量離心管中。利用 Vortex 使細胞均勻分布於微量離心管內，取 10 $\mu$ l 含有細胞的培養液與 10 $\mu$ l Trypan blue 於 96 孔培養盤中均勻混合，之後取 10 $\mu$ l 加入細胞計數盤中計算細胞個數。

### **Annexin V 螢光染色檢測技術**

取正常培養和利用 Metronidazole (80  $\mu$ M)誘導凋亡的懸浮細胞 (0.5~1 $\times$ 10<sup>6</sup>) 用 PBS潤洗兩次，加入 20  $\mu$ l Annexin-V-Alexa 568和 1 ml緩衝溶液 (Incubation buffer: 10 mM HEPES/NaOH pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>)混合的混合液 50  $\mu$ l/tube。在避光和室溫的條件下，充分混合 15分鐘。接著利用 PBS潤洗兩次，洗去多餘的染劑。並加入 20  $\mu$ l/tube PBS懸浮細胞，取至玻璃玻片後，蓋上蓋玻片，用螢光顯微鏡觀察並照相。

## 結果

本研究首要工作為建立臨床檢體的阿米巴蟲株分離技術，以取得並保存特有病徵及表現之臨床蟲株，以針對各致病力與藥物耐受性強弱不同的蟲株分別建立基因表達資料庫。本實驗室將進一步自此資料庫進行分析比對，期望能自其中找出影響蟲體致病機轉及藥物作用機制之蟲體基因，將可確立是否有較強毒力株存在，並幫助了解痢疾阿米巴蟲株在國內傳播模式，引起肝膿瘍或嚴重腹瀉症狀等的特殊基因表達信號。並且將針對藥物對蟲體作用之抗蟲機制進行研究，嘗試找出造成蟲體死亡之變化及其抵抗藥物之作用機制，提供未來用藥治療工作之參考。

### 痢疾阿米巴臨床分離株之基因型別與特性分析

目前已分別從不同的印尼籍勞工檢體分離培養出 2 株不同之蟲株，並命名為 TCDC-1198 與 TCDC-1446，臨床分離株形態如圖一 A，這兩名外籍勞工皆為定期檢查，無明顯病徵之帶原者。

根據 Gilchrist *et al.* 與 Biller *et al.* 的報告指出痢疾阿米巴之致病性可能與 *AIG1* 基因是否存在與表現量有關 [25,26]。因此，我們也進行 PCR 分析這兩株臨床蟲株是否具有 *AIG1* 基因，從結果顯示 TCDC-1198 株具有 *AIG1* 基因，而 TCDC-1446 株則無 (圖一 B)。將這兩株臨床蟲株與

標準株 HM1: HM1:IMSS 一起以 6 個 tRNA 相關多形性標記進行基因型別分析，發現三者型別互不相同（如圖二），TCDC-1446 株在 LYI-*Crithidia fasciculata* monoxenic 培養基中生長較 TCDC-1198 株趨緩，但貼附性較好。然而蟲株分離培養非常耗人力與時間，蟲株常因酵母菌或細菌污染無法去除而失敗，成功率低於 1/10。同時因經費與人力不足，microarray 或全基因表達的定序及蛋白質體學分析工作，進展緩慢。

### 痢疾阿米巴臨床分離株之抗藥性分析

近來常發現外勞或 HIV 病患治療後仍為陽性的個案，是否因為阿米巴產生抗藥性，需進一步獲得臨床蟲株進行藥物之敏感度分析，此外病患遺傳免疫差異，重複感染亦是治療未癒的可能原因。目前正由一名治療後仍為陽性的 HIV 病患的檢體分離培養疑似抗藥株中，未來若有治療未癒的病患的檢體亦將分離培養疑似抗藥株，以進行後續抗藥性研究。

另一方面，我們也以臨床分離株 TCDC-1198 與 TCDC-1446 進行藥物敏感試驗，並與標準蟲株 HM1 比較 Paromomycin 感受性的差異。以 20  $\mu$ M Paromomycin 進行 24 hr 處理後，以明視野顯微鏡觀察與拍攝，顯示標準蟲株 HM1 在處理後，細胞型態大多呈現圓形漂浮或破損之 CPE 現象；而兩株臨床分離株則皆不受影響，可觀察到爬行中之活動體，有明顯的偽足產生（圖三、圖四）。

## 痢疾阿米巴對胺基糖甘類藥物濃度之敏感試驗

進行痢疾阿米巴對胺基糖甘類藥物濃度之敏感試驗，以分析藥物結構與抗蟲活性之關係，並了解藥物濃度對於阿米巴之影響。 Villalba *et al.* 2007 年的報告已發現另一種胺基糖甘類藥物 G418 會誘導痢疾阿米巴進行細胞凋亡 [23]，於是我們除了分析 Paromomycin 之外，亦依照藥物結構之相似性，分別選擇與 G418 相似的 Gentamicin 及與 Paromomycin 相似的 Neomycin (圖五、圖六)一起進行比較。

Villalba *et al.* 等人發現 G418 造成痢疾阿米巴細胞凋亡的濃度約為 15  $\mu\text{M}$ ，於是我們以較高的 20  $\mu\text{M}$  為起始點進行試驗 [23]。 Gentamicin 則是使用較高的濃度 (65  $\mu\text{M}$ ) 為起始點。與對照組相比，結果發現 G418 在 20  $\mu\text{M}$  處理 16 小時後，剩餘蟲量為 28.4%；但若將藥物濃度提高至 240  $\mu\text{M}$  則剩餘蟲量為 14.8%，殺蟲效果僅增加約 13.6% (圖七)。 Gentamicin 起始濃度則設為較殺細菌的標準濃度略高的 65  $\mu\text{M}$ ，在處理 16 小時後，相較於對照組，剩餘蟲量仍有 80.2%；若把藥物濃度提高至 390  $\mu\text{M}$ ，則剩餘蟲量為 58%，是增加 22.2% 的殺蟲效果 (圖七)。

Paromomycin 則是以 20  $\mu\text{M}$  作為試驗起始濃度；結構相似之 Neomycin 則是以較殺細菌的標準濃度略高的 80  $\mu\text{M}$  作為起始濃度。結果發現 Paromomycin 有劑量效應之現象發生；在相同的藥物作用時間下 (16

小時)，剩餘蟲量會隨著藥物濃度提高而減少（圖八）。然而，在結構相似且起始藥物濃度較高的 Neomycin 卻明顯沒有抗蟲活性，即使藥物濃度提高至 320  $\mu\text{M}$  也沒有顯著差異（圖八）。

### 胺基糖苷類藥物對痢疾阿米巴細胞毒性之時序試驗 (Time course)

為探討胺基糖苷類藥物對痢疾阿米巴細胞毒性與藥物處理時效，我們選用 130  $\mu\text{M}$  Gentamicin、80  $\mu\text{M}$  G418、80  $\mu\text{M}$  Paromomycin 與 320  $\mu\text{M}$  Neomycin 來處理痢疾阿米巴，並於不同時間點收取蟲體，計算剩餘蟲量，來分析藥物對於痢疾阿米巴之細胞毒性與藥物時效（圖九、圖十）。

從 Gentamicin 與 G418 之細胞毒性試驗的結果，發現 Gentamicin 在 20 小時內對於痢疾阿米巴有輕微的抑制，之後會克服抑制，蟲量會隨著時間而繼續成長（圖八）；而 G418 則會使阿米巴蟲數隨著藥物處理時間加長而逐漸減少，在處理 16 小時後蟲數大幅減少，剩餘蟲量為對照組的 15.8%，在 24 小時後，剩餘蟲量僅為 8.3% 之蟲量（圖九）。

而在 Paromomycin 與 Neomycin 之細胞毒性試驗中，可發現隨著 Paromomycin 藥物處理時間加長，痢疾阿米巴蟲數會逐漸減少，16 小時後剩餘蟲量約為對照組的一半，24 小時之後剩餘蟲量僅為 27.8%（圖九）。而痢疾阿米巴生長則幾乎不受 Neomycin 影響；蟲數甚至會隨著時

間加長而增加 (圖十)。

### **Paromomycin 誘導痢疾阿米巴之細胞壞死 (necrosis)**

為進一步探討 Paromomycin 之作用機轉，先以顯微鏡觀察痢疾阿米巴受 Paromomycin 處理後之形態學差異。結果顯示在 80  $\mu$ M 藥物濃度處理下，阿米巴活動體 (trophozoite) 會隨著處理時間增長而逐漸縮成圓球形，慢慢剝離試管而懸浮，同時蟲體會逐漸破損壞死 (圖十一)。

另一方面，我們也萃取 80  $\mu$ M Paromomycin 處理 24 小時的阿米巴蟲體 DNA，進行蟲體 DNA 斷裂分析 (DNA fragmentation test)。結果發現經 Paromomycin 處理之蟲體 DNA 呈現出拖尾模糊 (smear) 的現象，與細胞凋亡時會出現的梯狀 DNA 斷裂不同 (圖十二)。再以螢光標識的 Annexin-V 當作探針，觀察阿米巴細胞膜內側的磷脂質絲胺酸 (phosphatidylserine, PS) 是否有翻轉到細胞膜外側表面的細胞凋亡現象，若發生細胞膜外表面的磷脂質絲胺酸上升，則為細胞凋亡早期表徵。結果發現 Paromomycin 並不會誘導蟲體細胞膜外表面的磷脂質絲胺酸上升，並非進行細胞凋亡途徑 (圖十三)，但因細胞壞死 (necrosis) 途徑目前並無好的檢測標的，Paromomycin 是否誘導蟲體進行細胞壞死需再進一步研究。

## 討論

建立臨床檢體的阿米巴蟲株分離技術，可取得並保存特有病徵及表現之臨床蟲株，針對各致病力與藥物耐受性強弱進行研究，並將不同的蟲株分別建立基因表達資料庫。本研究已由兩位不同的印尼籍勞工無症狀病患檢體中分離培養出 2 株 6 tRNA STR 基因型別不同之蟲株 TCDC-1198 及 TCDC-1446，前者為 *AIG1* 基因 PCR(+)而後者為 PCR(-) (圖一、圖二)，*AIG1* 基因已被許多學者認為是重要的致病因子 [25,26]。我們也將與日本國立感染症研究所 (NIID)合作進行 microarray 及全基因定序分析蟲株間基因的差異，以了解造成毒力與致病性差異的原因。分析 Paromomycin 低劑量 (20  $\mu$ M)和長時間 (24 或 48 小時) 對痢疾阿米巴的處理，可以此了解阿米巴標準株與臨床分離株藥物耐受性之差異，結果顯示 2 株臨床分離株皆較具標準株有較高的藥物耐受性 (圖三、圖四)，在與 Paromomycin 或 metronidazole 等藥物長期培養下，臨床分離蟲株會提高藥物耐受性，具發展抗藥性蟲株之潛力，而標準株 HM1 則非常敏感無法存活。由於標準株 HM1 培養出來已逾 30 年，是因為體內某些抗藥相關的基因漏失或是因為這些藥物已使用 30 年，造成現代臨床分離蟲株對藥物較有耐受性，還需進一步研究，我們後續將進行 transcriptome 及 proteome 的分析以找出蟲株可能的抗藥機轉。同時，台灣目前治療痢疾阿

米巴之第一線用藥 Metronidazole，已於 2011 年被美國國家衛生研究院列為致癌物質 [21]，只能有限度的使用，使得原本可用不多的抗阿米巴藥物雪上加霜，此公告也提醒我們未來對痢疾阿米巴用藥的使用必須更為謹慎，須了解現有藥物的抗蟲機轉與可能的蟲體抗藥機轉，以找出方法避免抗藥性發生，未來更需積極尋找或開發新的替代藥物，否則當臨床上逐漸出現高藥物耐受性蟲株時，將會面臨無藥可用的窘境，並對於阿米巴痢疾防治會出現嚴峻的挑戰。

對於胺基醣甘類藥物結構與抗蟲活性的研究，我們發現在環烷團基結構上帶有 6' 羥基時 (如圖五及圖六紅框所示)，對於痢疾阿米巴才会有較好的抗蟲活性。根據 Recht *et al.* 1999 年胺基醣甘類藥物結構在原核生物與真核生物中對於 rRNA 序列結合的影響的研究，發現 16S rRNA 的第 1408 序列位置若為鳥嘌呤核苷 (guanosine)，只會與帶有 6' 羥基的胺基醣甘類藥物(如 G418 與 Paromomycin)結合，抑制蛋白合成，進而具有抗菌活性 [29]。若 1408 序列位置為細菌常見的腺嘌呤核苷 (Adenosine)則不會與帶有 6' 羥基結構的藥物結合。我們的實驗結果亦顯示帶有 6' 羥基結構的胺基醣甘類藥物才會對痢疾阿米巴具有顯著的抗蟲活性，可能與其 18S RNA 或 mitochondria 16S rRNA 的相對位置亦為鳥嘌呤核苷有關。這或許可提供我們開發痢疾阿米巴替代藥物的新方向，對一些藥物的重要官

能基進行修飾，即可改變藥物對於痢疾阿米巴之抗蟲活性，結果將會對痢疾阿米巴之治療上帶來一線曙光。

在藥物分子作用機制的部分，我們發現 Paromomycin 的藥物作用機制可能誘導痢疾阿米巴走向細胞壞死 (Necrosis) 途徑。我們分別利用形態學分析、蟲體 DNA fragmentation 現象及 Annexin-V 螢光探針之磷脂質絲胺酸翻轉分析，進行細胞死亡情形的探討。結果發現痢疾阿米巴在經由 Paromomycin 藥物的處理過後，其細胞的死亡狀態較類似細胞壞死現象。Paromomycin 驅使細胞壞死現象與同樣是胺基糖苷類藥物的 G418 誘導細胞走向細胞凋亡的作用不同。若能詳細了解藥物作用的位置與影響之標的蛋白質，將能比較出藥物結構與抗蟲機轉之間的相關性，以利於藥物發展。

## 結論與建議

本研究已建立痢疾阿米巴臨床蟲株分離技術，可保存特有病徵及遺傳特性之臨床蟲株，進行致病力與藥物耐受性研究。並發現臨床蟲株確實比標準蟲株具有較高之藥物耐受性，再第一線用藥 Metronidazole 已被列為可能致癌物質的情況下，未來治療用藥的使用必須更謹慎，並需及早積極尋找及開發新的替代用藥。

### 本研究實驗證實：

- 一、 胺基醣甘類藥物環烷團基的 6' 羥基結構可影響其抗蟲活性。
- 二、 Paramomycin 可能藥物機轉為誘導痢疾阿米巴經細胞壞死途徑而死亡，與 G418 走細胞凋亡的途徑，作用機制不同。

但以上結果仍需再加研究證實其訊息傳遞路徑，若能全盤了解藥物之分子機轉，則可能對於新藥開發以及蟲株抗藥性機轉的了解有極大的幫助。

## 計畫重要研究成果及具體建議

### 1.計畫之新發現或新發明

- 發現臨床蟲株確實比標準蟲株具有較高之藥物耐受性。
- 證實胺基醣甘類藥物帶有 6' 羥基時，具有較顯著的抗蟲活性。
- Paramomycin 可能藥物機轉為誘導痢疾阿米巴經細胞壞死途徑而死亡，與 G418 走細胞凋亡的途徑，作用機制不同。

### 2.計畫對民眾具教育宣導之成果

阿米巴痢疾病患需正確診斷，謹慎給藥，確實治療，以避免 Metronidazole 過度使用及造成抗藥性發生。

### 3.計畫對醫藥衛生政策之具體建議

醫院及病患需落實藥物治療的療程，確實給藥濃度，以避免治療不全而引發未來抗藥性產生的問題。

## 重要參考文獻

1. Stanley SL, Jr. Amoebiasis. *Lancet*. Mar 22 2003;361(9362):1025-1034.
2. Walsh JA. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis*. Mar-Apr 1986;8(2):228-238.
3. Dimond LS, Clark CG. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J Eukaryot Microbiol*. May-Jun 1993;40(3):340-344.
4. Anonymous. WHO/PAHO/UNESCO report. A consultation with experts on amoebiasis. Mexico City, Mexico 28-29 January, 1997. *Epidemiol Bull*. Mar 1997;18(1):13-14.
5. Ravid JI: Amebiasis. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 1453-1466
6. 翁秀貞、鄭美英、劉國輝等：台灣某精神醫院寄生蟲罹患狀況調查—特別著重於痢疾阿米巴之檢查。疫情報導，民國84年；第11卷第7期：179-183 頁。
7. 趙黛瑜、吳炳輝、陳國東：省立某教養院痢疾阿米巴感染之研究。疫情報導，民國86年；第13卷第5期：135-144 頁。
8. 江大雄、張國慧：某啟智教養院阿米巴痢疾爆發流行事件之研究。公共衛生，民國89年；第二十六卷第4期：261-270 頁。
9. 鄧洪音<sup>1</sup>、蕭偉宏。台灣某啟智教養院內腸道痢疾阿米巴致病性種別分析及流行病學研究。疫情報導，民國94年；第21卷第1期：1-19 頁。
10. Hung C-C, Deng, H-Y., Hsiao, W.-H., Hsieh, S.-H., Hsiao, C.-F., Chen, M.-Y., Chang, S.-C., Su, K.-E. 2005. Invasive amebiasis is an emerging parasitic disease in patients with human immunodeficiency virus type 1 infection in Taiwan. *Arch. Intern. Med*. 165(4):409-15.
11. Sargeant PG, Williams JE, Grene JD. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1978;72(5):519-521.
12. Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1978;72(4):431-432.
13. Ylvisaker, J. T. & McDonald, G. B. Sexually acquired amebic colitis and liver abscess. *West J Med* 132, 153-157 (1980).
14. Ali, I. K., Zaki, M. & Clark, C. G. Use of PCR amplification of tRNA gene-linked short tandem repeats for genotyping *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol* 43, 5842-5847 (2005).
15. Scheld, W. M., Craig, W. A. & Hughes, J. M. *Emerging infections 5*. (ASM Press, 2001).
16. Bansal, D., N. Malla and R.C. Mahajan Drug resistance in amoebiasis. *Indian J Med Res*

2006. 123:115-118.

17. Crowell AL, Sanders-Lewis KA, Secor WE: In vitro metronidazole and tinidazole activities against metronidazole-resistant strains of *Trichomonas vaginalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:1407–1409

18. Bendesky A, Menendez D, Ostrosky-Wegman P: Is metronidazole carcinogenic? *Mutat Res* 2002; 511:133–144

19. Sadowska A, Kędra B, Cepowicz D, Rodziewicz L, Fiedorowicz A, Prokopiuk S, Miltyk W, Car H: Increased concentration of metronidazole and its hydroxy metabolite in colon cancer in women. *Pharmacol Rep.* 2012;64(5):1276-80.

20. World Health Organization, WHO Pharm Newslett, 1998, 3/4, 15.

21. Report on Carcinogens, Twelfth Edition (2011); <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/twelfth/profiles/Metronidazole>

22. Davidson RN, den Boer M, Ritmeijer K: Paromomycin. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009 Jul;103(7):653-60.

23. Villalba JD, Gómez C, Medel O, Sánchez V, Carrero JC, Shibayama M, Ishiwara DG: Programmed cell death in *Entamoeba histolytica* induced by the aminoglycoside G418. *Microbiology.* 2007 Nov;153(Pt 11):3852-63.

24. Espinosa A, Socha AM, Ryke E, Rowley DC: Antiamoebic properties of the actinomycete metabolites echinomycin A and tirandamycin A. *Parasitol Res.* 2012 Dec;111(6):2473-7.

25. Gilchrist CA, Houpt E, Trapaidze N, Fei Z, Crasta O, Asgharpour A, Evans C, Martino-Catt S, Baba DJ, Stroup S, Hamano S, Ehrenkauf G, Okada M, Singh U, Nozaki T, Mann BJ, Petri WA Jr: Impact of intestinal colonization and invasion on the *Entamoeba histolytica* transcriptome. *Mol Biochem Parasitol.* 2006 Jun;147(2):163-76.

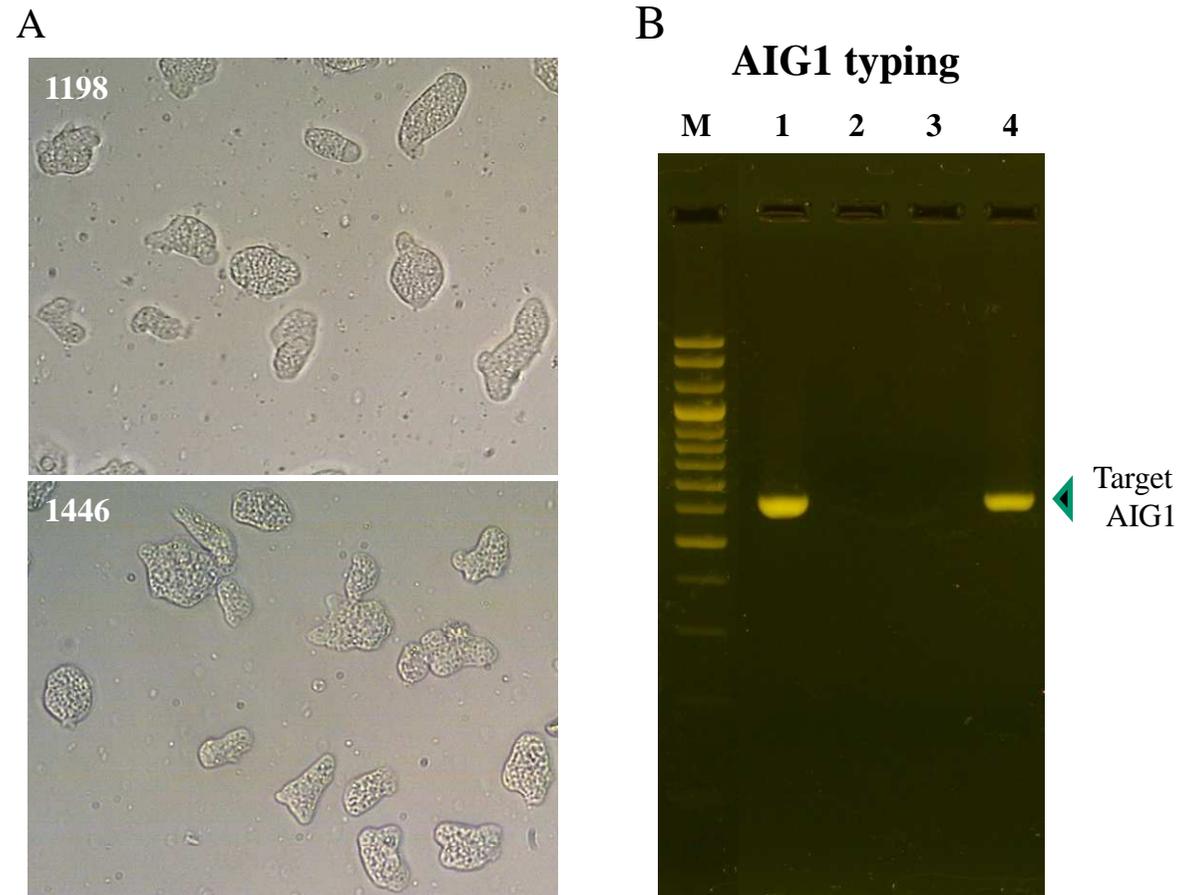
26. Biller L, Davis PH, Tillack M, Matthiesen J, Lotter H, Stanley SL Jr, Tannich E, Bruchhaus I: Differences in the transcriptome signatures of two genetically related *Entamoeba histolytica* cell lines derived from the same isolate with different pathogenic properties. *BMC Genomics.* 2010 Jan 26;11:63.

27. Kikuchi T, Koga M, Shimizu S, Miura T, Maruyama H, Kimura M: Efficacy and safety of paromomycin for treating amebiasis in Japan. *Parasitol Int.* 2013 Dec;62(6):497-501.

28. Debnath A, Parsonage D, Andrade RM, He C, Cobo ER, Hirata K, Chen S, García-Rivera G, Orozco E, Martínez MB, Gunatilleke SS, Barrios AM, Arkin MR, Poole LB, McKerrow JH, Reed SL: A high-throughput drug screen for *Entamoeba histolytica* identifies a new lead and target. *Nat Med.* 2012 Jun;18(6):956-60.

29. Recht MI, Douthwaite S, Puglisi JD: Basis for prokaryotic specificity of action of aminoglycoside antibiotics. *EMBO J.* 1999 Jun 1;18(11):3133-8.

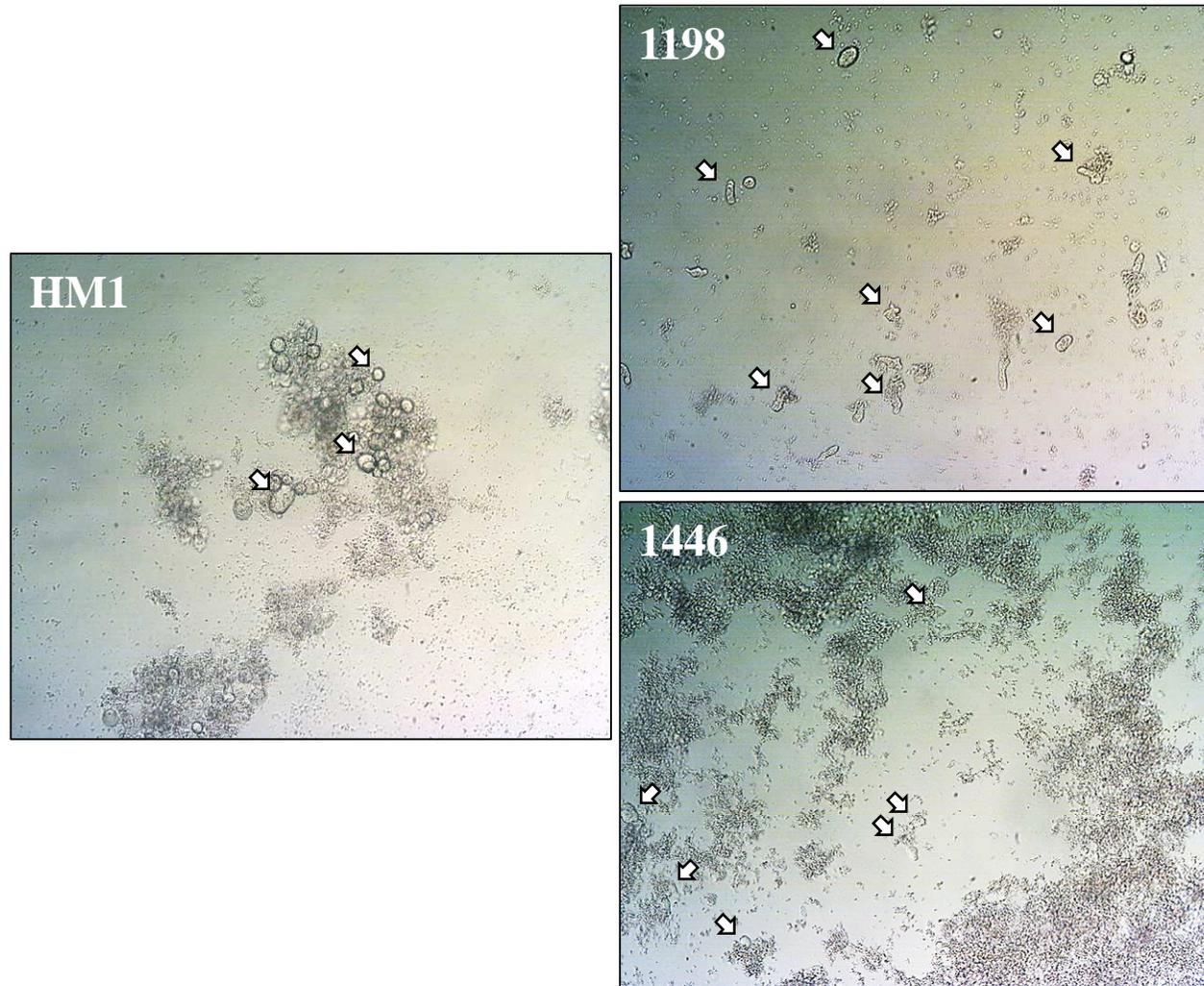
# 圖一、痢疾阿米巴臨床分離株與 *AIG1* 致病基因分析



圖一 A：上圖為 TCDC-1198 臨床分離株之活動體形態；下圖為 TCDC-1446 臨床分離株之活動體形態。圖一 B： 1：HM1 標準株、2：陰性對照組、3；TCDC-1446 臨床分離株、4：TCDC-1198 臨床分離株。

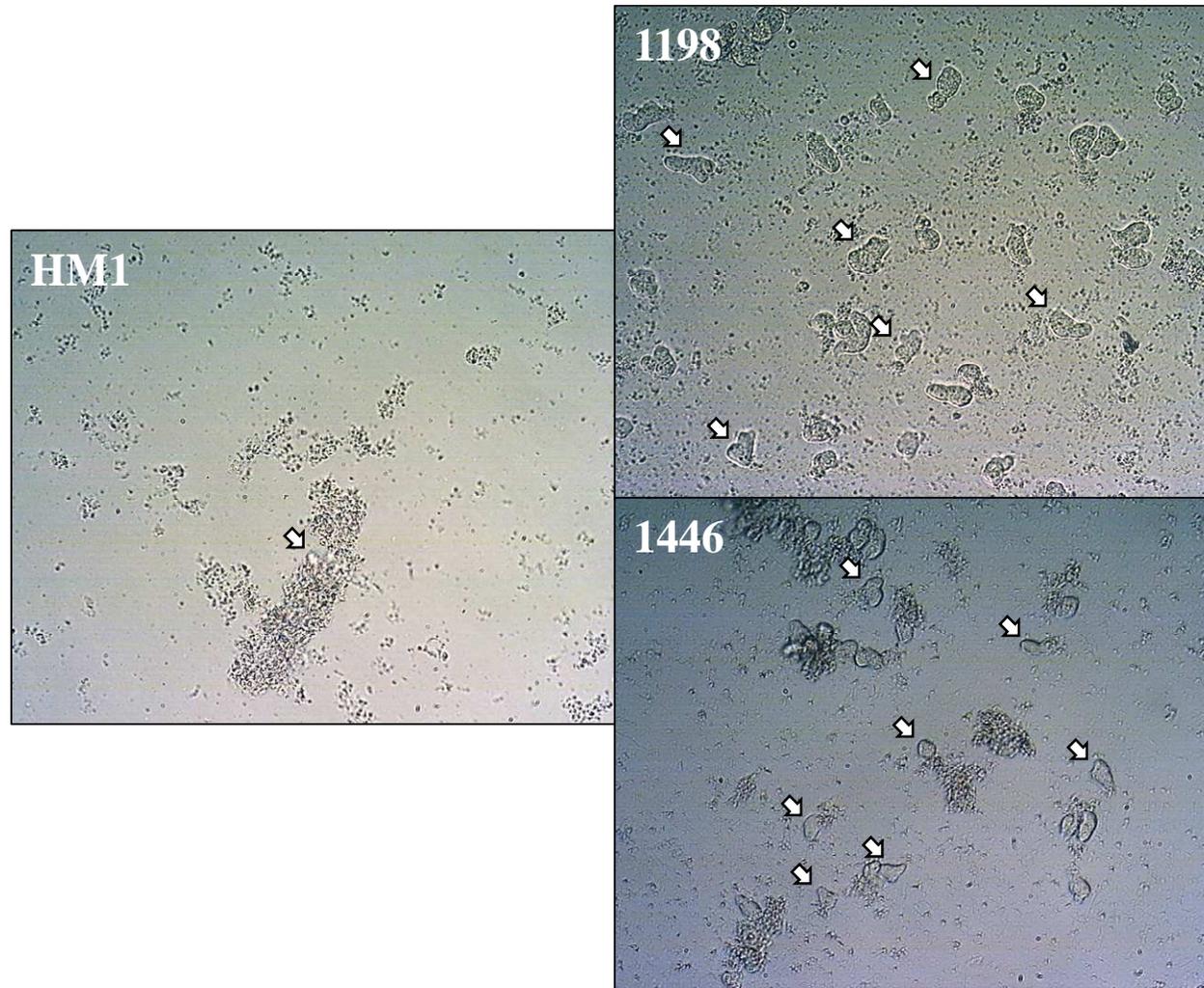


圖三、以明視野觀察低劑量 Paromomycin 對標準蟲株與臨床蟲株處理後之型態



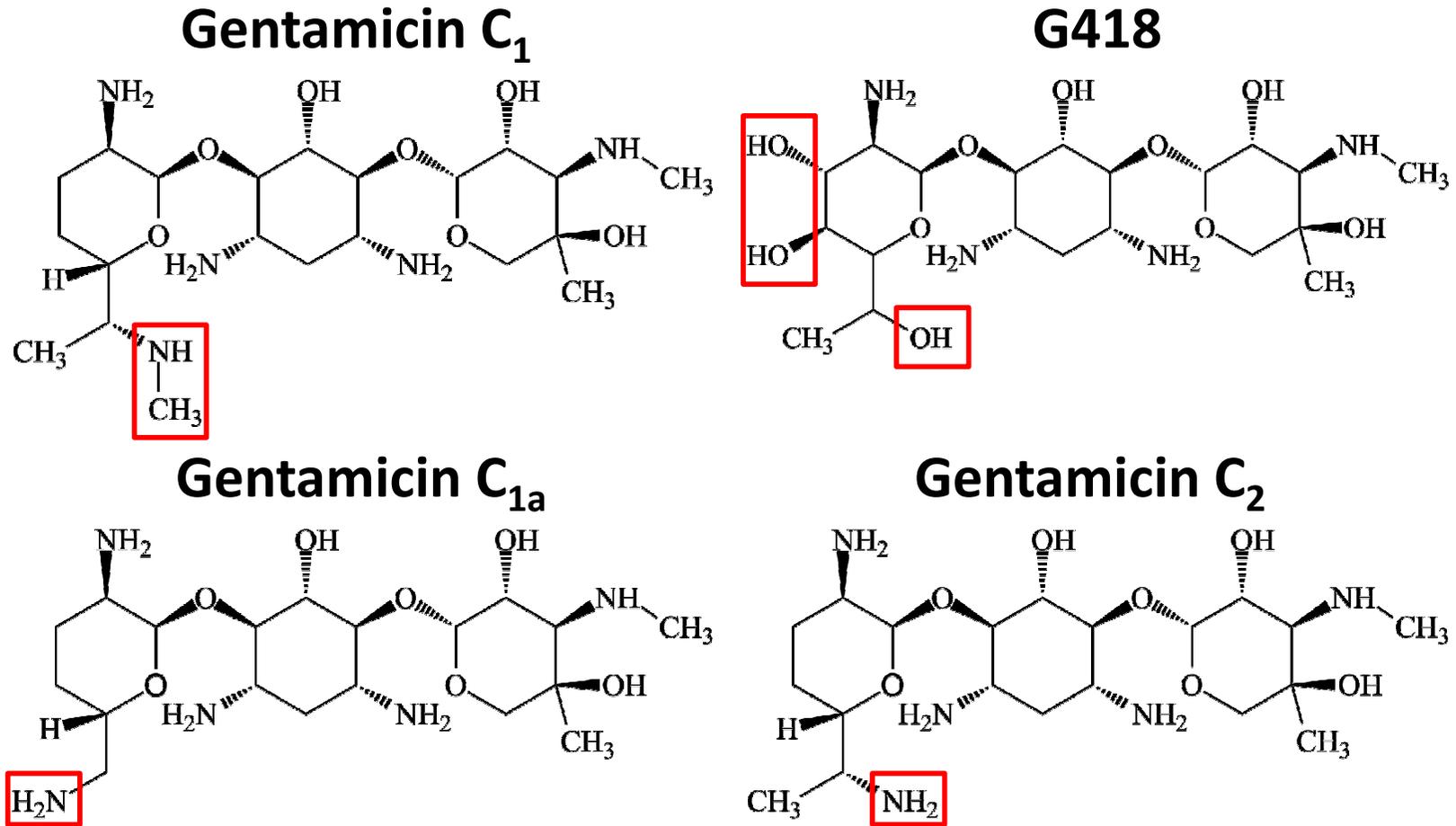
以 20  $\mu$ M Paromomycin 分別對標準蟲株 HM1 與臨床蟲株 TCDC-1198、TCDC-1446 處理 24 小時。100X 明視野。

圖四、以明視野觀察低劑量 Paromomycin 對標準蟲株與臨床蟲株處理後之型態



以 20  $\mu$ M Paromomycin 分別對標準蟲株 HM1 與臨床蟲株 TCDC-1198、TCDC-1446 處理 48 小時。200X 明視野。

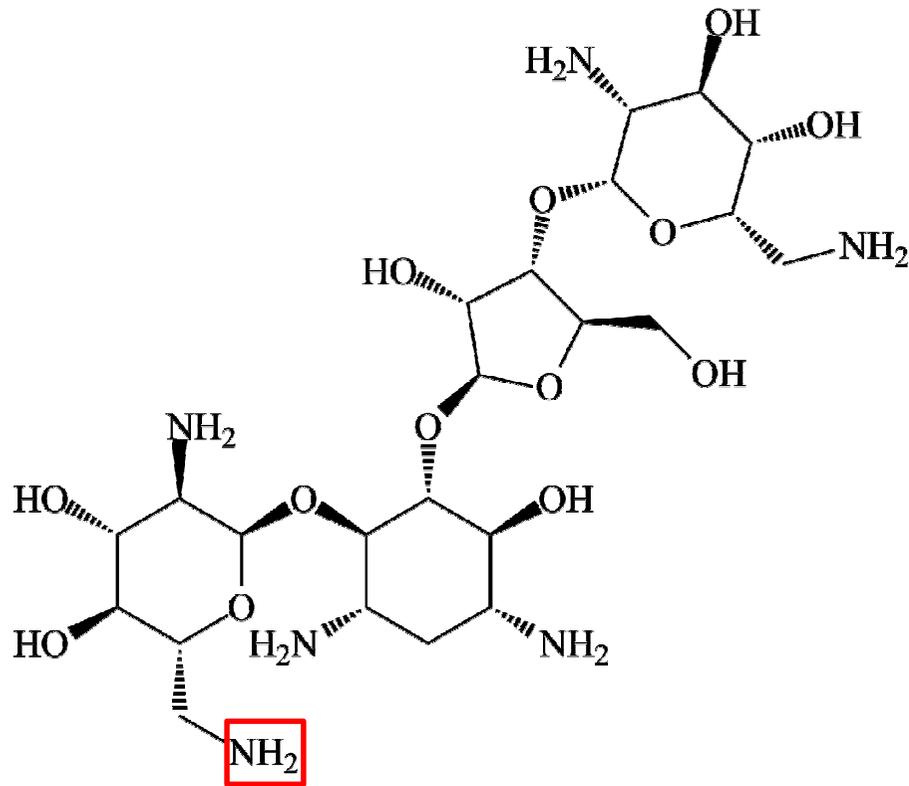
圖五、Gentamicin 與 G418 藥物分子結構



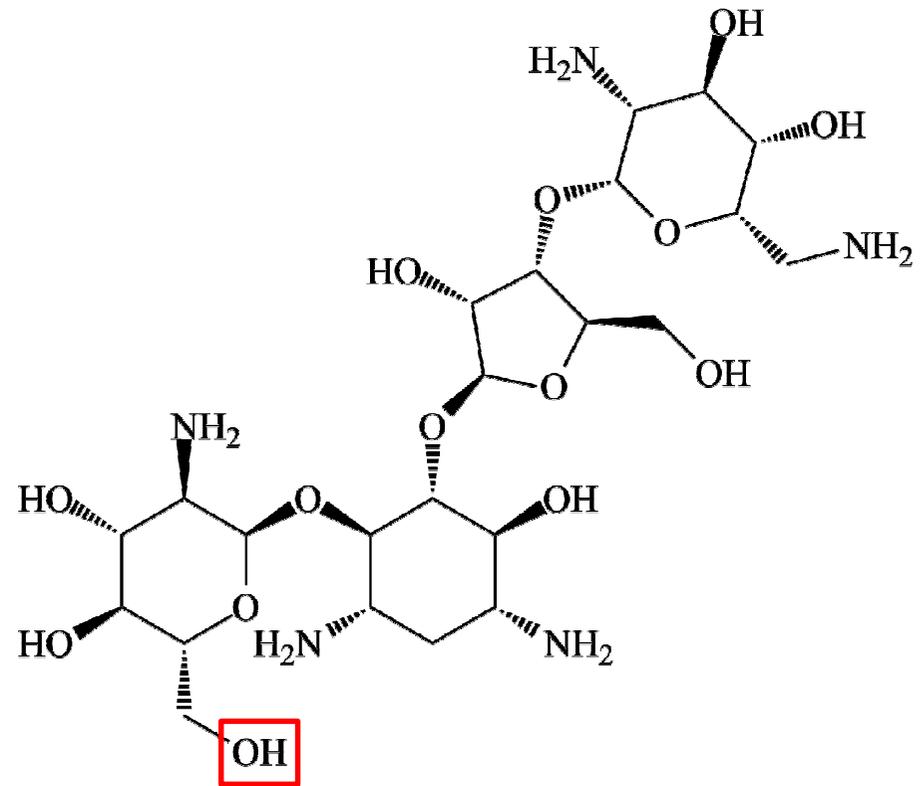
Gentamicin 抗生素中含有三種主要的藥物分子，分別為 C<sub>1</sub>、C<sub>1a</sub> 與 C<sub>2</sub>。Gentamicin 與 G418 在分子結構上之差異僅為方框中所顯示之官能基，而其餘結構皆為相同。

圖六、Neomycin 與 Paromomycin 藥物分子結構

### Neomycin

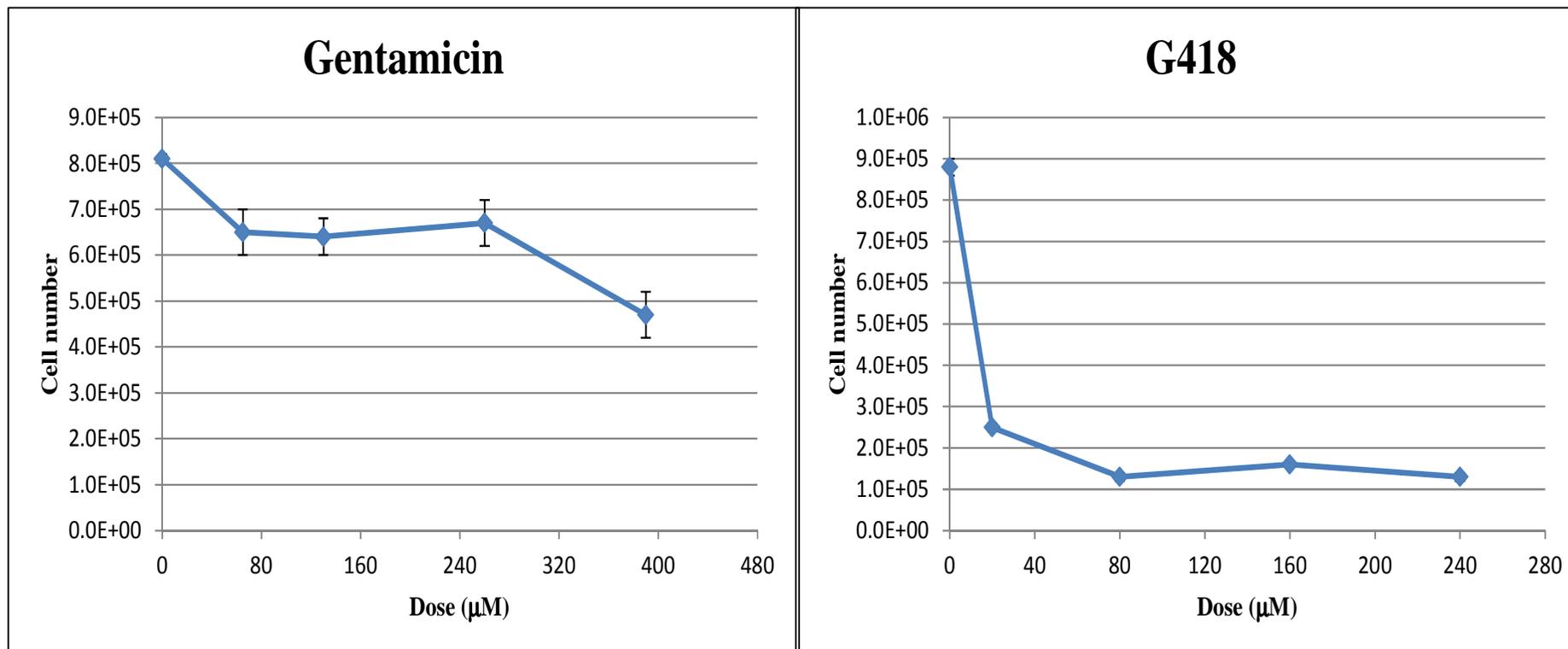


### Paromomycin



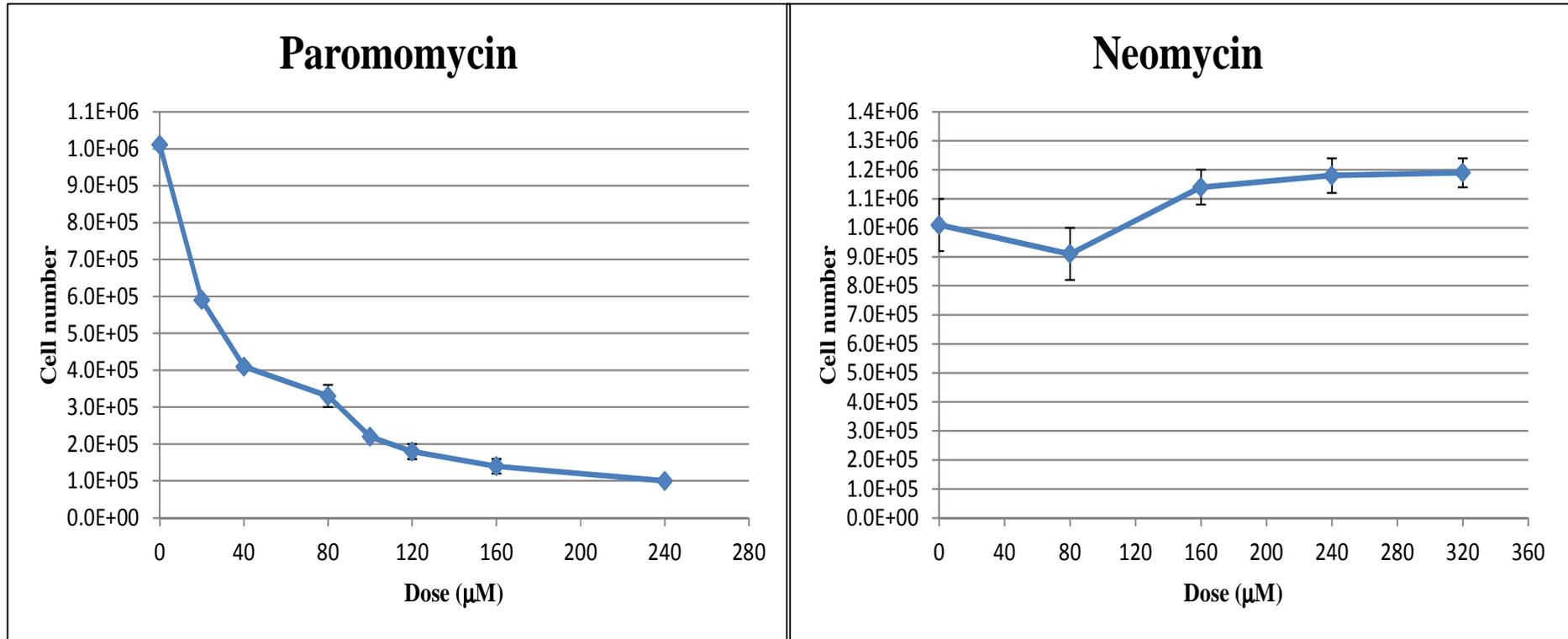
Neomycin 與 Paromomycin 在分子結構上之差異僅為方框中所顯示之官能基，而其餘結構皆為相同。

圖七、痢疾阿米巴對 Gentamicin 與 G418 藥物濃度之敏感試驗



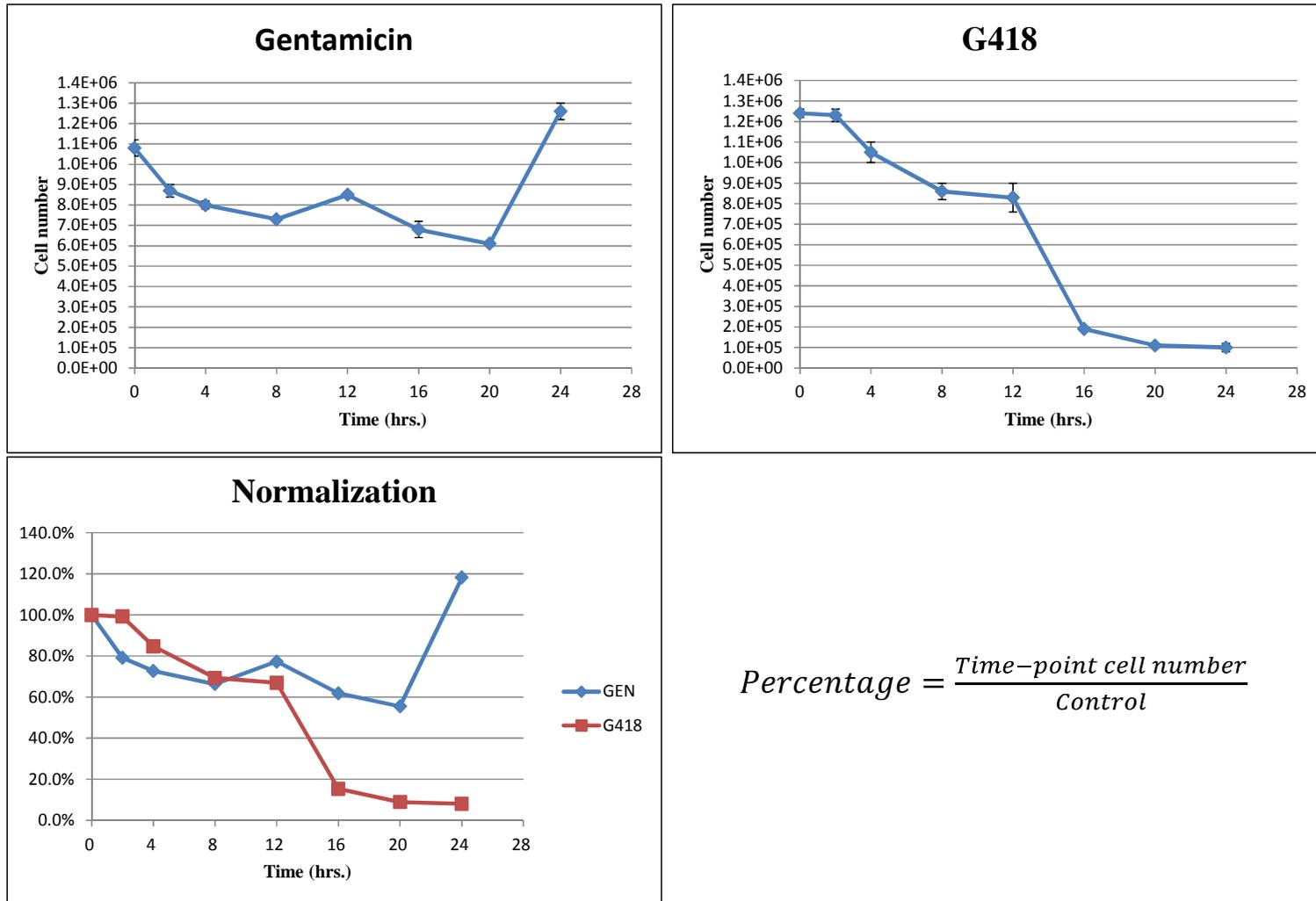
於實驗前 24 小時，將  $5 \times 10^5$  的標準蟲株 HM1 貼附於培養管，並加入 100 nM 之 Nocodazole。進行藥物實驗前，先換置新的培養液，之後分別加入依圖所示之藥物濃度，並培養 16 小時後進行細胞計數。

圖八、痢疾阿米巴對 Paromomycin 與 Neomycin 藥物濃度之敏感試驗



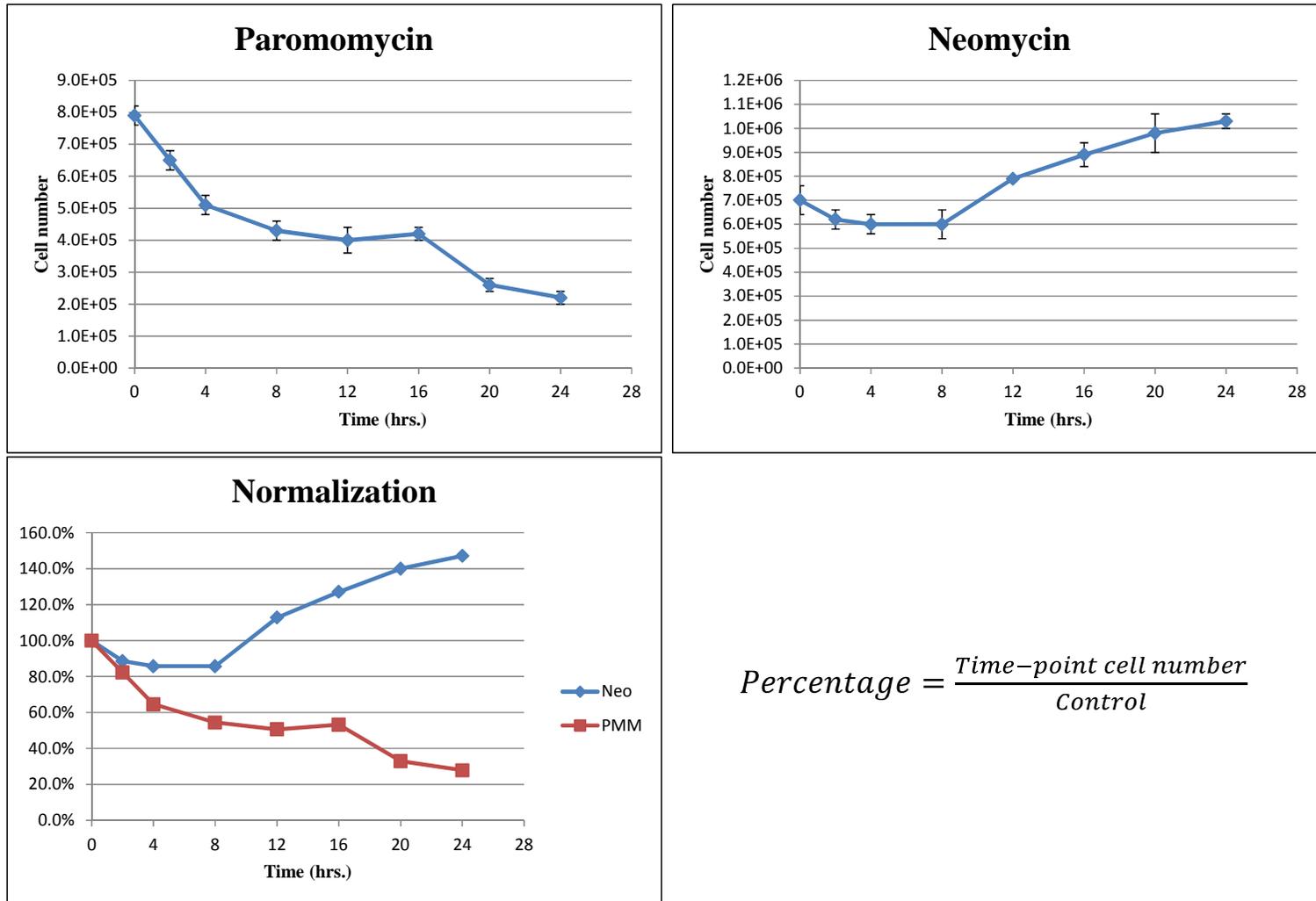
於實驗前 24 小時，將  $5 \times 10^5$  的標準蟲株 HM1 貼附於培養管，並加入 100 nM 之 Nocodazole。進行藥物實驗前，先換置新的培養液，之後分別加入依圖所示之藥物濃度，並培養 16 小時後進行細胞計數。

圖九、Gentamicin 與 G418 對痢疾阿米巴細胞毒性之時序試驗



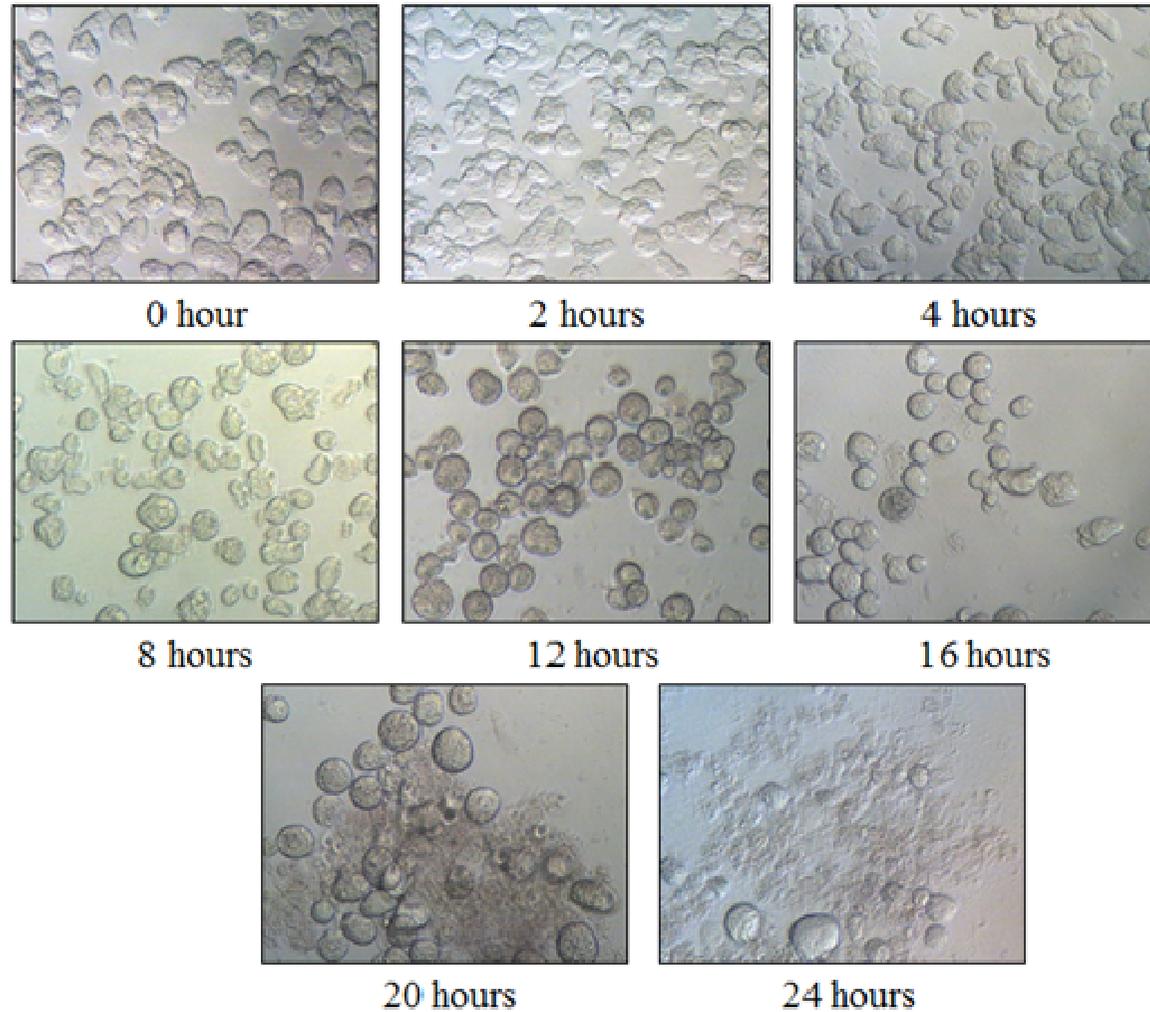
貼附  $5 \times 10^5$  之 HM1 標準株於培養管中，再加入 130  $\mu\text{M}$  Gentamicin 或 80  $\mu\text{M}$  G418，培養至時間點後，進行計數分析。

圖十、Paromomycin 與 Neomycin 對痢疾阿米巴細胞毒性之時序試驗



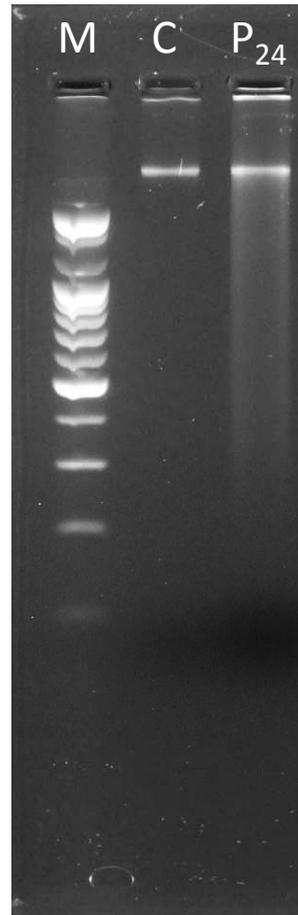
貼附  $5 \times 10^5$  之 HM1 標準株於培養管中，再加入  $80 \mu\text{M}$  Paromomycin 或  $320 \mu\text{M}$  Neomycin，培養至時間點後，進行計數分析。

圖十一、痢疾阿米巴蟲經 80  $\mu$ M Paromomycin 處理後隨時間之型態學變化



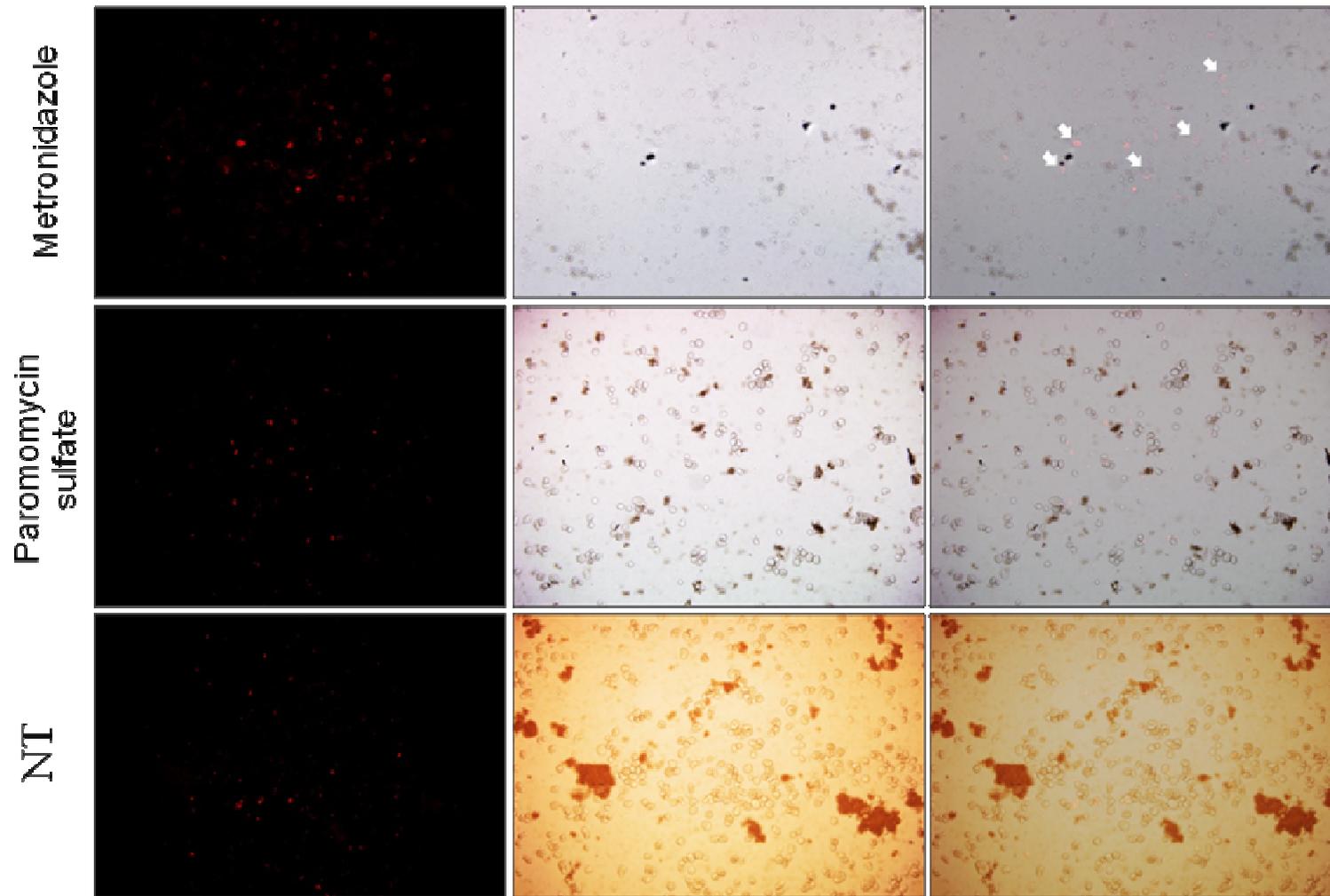
貼附  $5 \times 10^5$  之 HM1 標準株於培養管中，再加入 80  $\mu$ M Paromomycin，培養至時間點後，進行顯微照相系統拍照記錄。

圖十二、痢疾阿米巴蟲經 80  $\mu$ M Paromomycin 處理後蟲體 DNA 變化



貼附  $5 \times 10^5$  之 HM1 標準株於培養管中，再加入 80  $\mu$ M Paromomycin，培養至 24 小時後，進行蟲體 DNA 萃取。

圖十三、以 Annexin-V-Alexa 568 探針觀察細胞凋亡情形



利用已標幟熒光的 Annexin-V 探針，去觀察細胞表面的磷脂質絲胺酸 (phosphatidylserine, PS) 表現。