

在免疫血清内中性白细胞对吡喹酮损害的日本血吸虫体表的附着

肖树华、郭惠芳、薛海筹、袁丽妹 (中国预防医学中心寄生虫病研究所¹, 上海 200025)

张荣泉 (上海市卫生局测试中心, 上海 200031)

提要 在感染兔血清或兔抗成虫冻融的体表渗出物的血清与补体和中性白细胞组成的培养系统(IS-CHN或ASE-CHN)中, 日本血吸虫经吡喹酮作用后, 中性白细胞可附着于受损的虫体体表, 且加重皮层的损害, 并在24 h内出现死亡。用正常兔血清组成的上述培养系统(NS-CHN)作试验时, 则无或仅有少量中性白细胞附着于受损的虫体体表。

关键词 吡喹酮; 日本血吸虫; 免疫血清; 嗜中性白细胞; 扫描电镜

前文⁽¹⁻³⁾指出, 日本血吸虫的皮层是吡喹酮的主要作用靶, 即经吡喹酮作用后虫的皮层迅速被损害, 随之虫的体表抗原显露⁽⁴⁾, 从而使虫易于受到宿主的免疫攻击。免疫血清可加重吡喹酮对虫的皮层损害⁽⁵⁾; 在体内试验中则观察到虫经吡喹酮作用后白细胞迅速附着于虫的体表⁽³⁾。为了解在吡喹酮杀虫过程中宿主免疫反应参与的情况, 乃建立了体外培养系统, 观察中性白细胞附着于受吡喹酮损害的血吸虫体表的作用。

方 法

吡喹酮 吡喹酮由本所合成, 溶于聚乙二醇(PEG 400)中⁽⁵⁾。

血清 正常兔血清(NS)取自正常家兔; 感染兔血清(IS)取自感染1500-2000条血吸虫尾蚴达42-49 d的兔; 兔抗血吸虫成虫冻融的体表渗出物的血清(ASE)取自用血吸虫成虫冻融的体表渗出物免疫的兔, 当血清抗体滴度达1:6400时取血; 补体取正常豚鼠血清。除补

体外, 其余血清均于临用前置56℃水浴中30 min 灭活。

中性白细胞(Neu) 按文献⁽⁶⁾法, 取体重约30 g的♀小鼠, ip含1%糖原的PBS悬液2 ml, 16-20 h后ip 5 ml Hanks盐平衡溶液(HBS), 内含青、链霉素各100 u、两性霉素B 25 μg/ml和肝素6 u/ml, 然后轻轻柔摸腹部, 随即抽取腹腔液约4 ml经1000 rpm离心10 min后移去上清液, 用无肝素的PBS洗涤2次后作细胞计数。用此法获得的腹腔细胞中, 中性白细胞占86.4±5.9%。

血吸虫的体外培养

1. 虫源 取18-22 g的正常小鼠, 每鼠感染100-200条日本血吸虫尾蚴, 5-6周后将鼠断颈, 用冰冷的HBS灌注肠系膜静脉, 收集抱血吸虫。

2. 培养系统及培养方法 取NS, IS或ASE各1 ml, 加补体0.1 ml, HBS 0.8 ml和Neu(2×10^6)悬液0.1 ml。这些培养系统分别以NS-CHN, IS-CHN和ASE-CHN表示。取上述各系统的培养液2 ml, 盛于2.5 ml的改良卡氏瓶中, 将血吸虫置于10%小牛血清-HBS中, 在含5%CO₂的37℃中培养0.5 h后加入吡喹酮0.1-30 μg/ml, 并于培养不同时间后, 将虫挑至上述卡氏瓶中, 每瓶培养虫4-5对。在有些试验中, 血吸虫系直接培养在含有吡喹酮的不同培养系统中。

3. Neu附着虫体体表的评分标准 上述血吸虫于培养结束时将HBS注满卡氏瓶, 然后倒置在盛有HBS的凹孔中, 虫体迅速逸散至凹孔的HBS中, 用HBS洗涤2次后按下列标准评分: 0 = 虫体表无Neu附着; 2 = 虫体

1985年2月4日收稿 1985年5月11日修回

¹ 世界卫生组织疟疾、血吸虫病、丝虫病合作中心。本研究得到联合国开发计划署/世界银行/世界卫生组织热带病研究培训特别规划的部分支持。

表有 1-50 个 Neu 附着; 4 = 虫体表有 51-100 个 Neu 附着; 8 = 虫体表有 100 个以上的 Neu 附着。

扫描电镜观察 取上述体外培养的部分♀、♂虫, 按前文⁽²⁾方法制备扫描电镜标本, 用 H-300 型电子显微镜作扫描电镜观察。

结 果

血吸虫经吡喹酮作用不同时间后 Neu 附着虫体表的情况 血吸虫在含吡喹酮 1 μg/ml 的 ASE-CHN 中培养 2-16 h 后, Neu 附着于受损的♂虫体表的程度评分, 随药物作用时间的

增加而递增, 而♀虫的则不明显(表 1)。

血吸虫经不同浓度的吡喹酮作用后 Neu 附着情况 血吸虫经不同浓度的吡喹酮作用 4 h 后移置 IS-CHN 培养 20 h, 吡喹酮 0.1 μg/ml 组的♀、♂虫完全恢复正常。吡喹酮的浓度为 0.2 μg/ml 时, 部分♂虫局部有明显皮损, 并有细絮粒状物沉积, Neu 的附着程度评分为 2.6; ♀虫的体表未见有明显损害。当吡喹酮浓度增至 0.5-1 μg/ml 时, 大部分♂虫有皮损和膜状包被, Neu 附着的程度评分增至 4.4-5.2; 一些♀虫的局部体表, 特别是卵巢以下的体表亦有轻度皮损和少量 Neu 附着(表 1)。

Tab 1. Attachmant of neutrophils on tegument of schistosomes exposed to praziquantel

Culture system	Drug (μg/ml)	Duration (h)	Worms		Score of attachment ($\bar{x} \pm SD$)	
			♂	♀	♂	♀
NS-CHN	1	16	10	6	1.0±1.7	0
ASE-CHN	1	2	10	6	3.2±1.9	0
		4	10	6	4.2±3.6	5.3±3.0
		8	10	6	6.2±2.4	3.0±3.0
		16	10	6	7.6±1.3	5.7±2.7
NS-CHN	1	4*	10	6	0	0
IS-CHN	0.1		10	6	0	0
			10	6	2.6±3.3	0
			10	6	5.2±3.0	1.7±2.0
			10	6	5.4±2.8	1.0±1.1
NS-CHN	1	20	10	9	0.2±0.6	0
ASE-CHN	0.1		5	5	2.4±3.6	2.0±3.5
			10	6	5.4±3.5	5.3±4.1
			10	10	8.0	5.6±2.1
NS-CHN	30‡	2	16	16	0.5±1.2	0.3±0.7
IS-CHN†			16	16	1.1±1.5	0.5±1.2
IS-CHN			16	16	4.1±2.8	1.8±1.6
NS-CHN		20	26	26	0.4±1.1	0.2±0.8
IS-CHN†			26	26	3.7±3.3	0.7±1.9
IS-CHN			26	26	5.5±2.5	2.0±2.5
NS-CHN	1§	2	16	16	1.9±1.7	0.9±1.5
IS-CHN†			16	16	1.5±1.4	1.1±1.5
IS-CHN			16	16	5.3±2.4	2.9±3.3
NS-CHN		20	26	26	1.2±2.1	0.9±2.3
IS-CHN†			26	26	4.8±3.1	1.2±2.1
IS-CHN			26	26	7.9±0.9	3.3±2.3

*) Worms were exposed to praziquantel for 4 h, then transferred to NS-CHN or IS-CHN system for another 20 h. †) Without complement. ‡) Worms were exposed to praziquantel for 4 h, then transferred to different culture system for another 2 to 20 h. §) Praziquantel was added to the culture systems.

若血吸虫置于含吡喹酮的 ASE-CHN 中培养 20 h, 则♂虫体表的 Neu 附着程度评分由吡喹酮 0.1 µg/ml 组的 2.4 增至 1 µg/ml 组的 8; ♀虫体表受损的程度和范围随吡喹酮浓度的增加而加重和扩大, Neu 的附着程度评分亦相应增加(表 1)。

IS 与 ASE 对 Neu 附着的影响 在建立体外培养系统观察 Neu 对吡喹酮损害的血吸虫体表附着情况时, 同时应用了 IS 和 ASE, 因结果相仿, 故统述之。

血吸虫先经吡喹酮 30 µg/ml 作用 1 或 4 h, 然后移置 IS-CHN 或 ASE-CHN 中, 并于培养 16-20 h 后观察。结果, 药物作用 1 h 的♂虫移置上述培养系统时, 部分虫的受损体表有明显恢复; 部分虫的局部、大部或腹吸盘以下的整个体表有膜状包被或细絮粒状物沉积, 其上有少量或大量 Neu 附着。药物作用 1 h 后的♀虫, 仅少数的局部皮层有轻度损害, 并有少量 Neu 附着。若♂虫于吡喹酮作用 4 h 后移置 IS-CHN 或 ASE-CHN 时, 大部虫示有中度或严重的皮损, 并有散在的或大量的 Neu 附着(图 1 A, 见铜版图 2)。♀虫的体表变化较轻, Neu 附着亦较少。

血吸虫置于含吡喹酮 1 µg/ml 的 IS-CHN

或 ASE-CHN 中培养时, 全部♂虫的皮损严重, 有大量 Neu 附着体表, 且大部分虫已不动。♀虫的体表亦有严重损害, 并有较多的 Neu 附着于卵巢以下的体表。

血吸虫♀、♂虫经吡喹酮 30 µg/ml 作用 1-4 h 后移置 NS-CHN 中培养 16-20 h, 部分虫的受损体表有明显恢复, 部分虫则仍有不同程度的皮层损害, 但很少有膜状包被; 少数虫可查见有一些 Neu 附着。将虫持续培养在含吡喹酮 1 µg/ml 的 NS-CHN 中 16-20 h, ♂虫体表受损严重, 有的整个体表布满许多巨大的泡状物(图 1 B, 见铜版图 2), 有的已破裂, 除少数外未见有 Neu 附着。♀虫亦有较重的皮损, 但很少有 Neu 附着。

Neu 对吡喹酮杀虫作用的影响 在 NS-CHN 中, 血吸虫经吡喹酮 0.2-1 µg/ml 作用 24 h 后, 虫的活动明显减弱。48 h 后, 1 µg/ml 组有 35-45% 的♀、♂虫已死亡。若血吸虫在 ASE-CHN 中培养 24 h, 则吡喹酮 1 µg/ml 组中即有 25-35% 的♀、♂虫死亡, 其余 2 组与相应对照组相仿; 培养 48 h 后则 1 µg/ml 组的虫全部死亡, 其余 2 组虫亦有近 1/3-1/2 虫死亡, 残留虫仅有微弱活动(表 2)。

Tab 2. Effect of praziquantel on worm activity. -) no motor activity; ±) very feeble motion in oral sucker or the posterior end; +) slight motor activity without peristaltic movement; ++) moderate activity with peristaltic movement; +++) normal activity of the worm, the acetabulum adhering to the dish

Culture system	Drug (µg/ml)	Worms	Worm activity after 24 h					Worm activity after 48 h				
			-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++
NS-CHN	0	20♂					20				10	10
		20♀					20				10	10
	0.1	10			3	7		1	6	3		
		10				10		2	5	3		
	0.2	10		10				1	9			
		10		10				1	9			
1	20		20				9	11				
	20		20				7	13				
ASE-CHN	0	20					20				10	10
		20					20				10	10
	0.1	10			3	7		4	6			
		10			4	6		3	7			
	0.2	10		10				6	4			
		10		10				5	5			
	1	20	7	13				20				
		20	5	15				20				

补体对 Neu 附着的影响 血吸虫经吡喹酮 30 $\mu\text{g/ml}$ 作用 4 h 后分别移置 NS-CHN、IS-CHN 或无补体的 IS-CHN 中培养 20 h, Neu 附着于虫体体表的程度评分以 IS-CHN 组较高, 无补体的 IS-CHN 组的明显减低, 但仍较 NS-CHN 组的为高(表 1)。若血吸虫培养在含吡喹酮 1 $\mu\text{g/ml}$ 的上述 3 种培养系统中, 并于培养 2 h 后观察时, 各组的 Neu 附着程度与上述的相仿(表 1)。

经吡喹酮治疗后的宿主血吸虫移置体外培养时 Neu 附着情况 取感染血吸虫尾蚴达 4-5 wk 的小鼠, 一次 ig 吡喹酮, 给药后 1-6 h 取虫, 分别培养于 NS-CHN 或 IS-CHN 中, 培养 20 h 后观察。结果, 感染小鼠一次 ig 吡喹酮 100 mg/kg 后 1-6 h 取虫培养于 IS-CHN 中时, Neu 附着于虫体表的程度评分随给药时间的延长而增加, 除个别组外, 皆较 NS-CHN 相应对照组的为高(表 3)。吡喹酮的剂量增至 300 mg/kg, 给药后 1-6 h 取虫培养于 IS-CHN 中时, σ 除少数外, 皆有严重的膜包被和大量 Neu 附着, 其评分较 NS-CHN 相应对照组的为高(表 3)。

扫描电镜观察 血吸虫在含吡喹酮 1 $\mu\text{g/ml}$ 的 NS-CHN 中培养 2 h 后, σ 虫体表肿胀、局部融合(图 2 A 见铜版图 3)或有破溃; 感觉器因褶嵴肿胀而凹陷于体表, 感觉纤毛脱落, 并有泡状物形成。♀ 虫皮层的损害较轻。若将虫培养 20 h, 则有的 σ 因泡状物破裂形成许多洞穴(图 2 B, 见铜版图 3); 有的肿胀褶嵴进一步融合、破溃或剥落。♀ 虫亦有类似变化。血吸虫在含吡喹酮 1 $\mu\text{g/ml}$ 的 IS-CHN 或 ASE-CHN 中培养 2-20 h, 虫的皮层损害较培养在 NS-CHN 的为重, 其体表普遍肿胀、融合、糜烂破溃、剥落和大量泡状物形成; 或虫体体表形貌呈网眼状, 感觉器亦明显肿大、变形和破溃, 甚或皮层的结构消失, 并在受损的 ♀、 σ 虫体表查见有 Neu 附着(图 2 C-H, 见铜版图 3)。血吸虫经吡喹酮 30 $\mu\text{g/ml}$ 作用 4 h 后移置 NS-CHN 中培养 20 h 后, 有的 σ 虫体表损害有不同程度恢复, 有的则仍示有明显肿胀、泡状物形成和破裂(图 3 A, 见后面铜版图 2), 或感觉器肿大、变形与感觉纤毛脱落, 但 ♀ 虫体表则有明显恢复(图 3 B, 见铜版图 2)。若将虫移置 IS-CHN 或 ASE-CHN 中时,

Tab 3. Attachment of neutrophils on tegument of schistosomes perfused out from infected mice after treatment of praziquantel and transferred to culture system *in vitro*

Culture system	Drug (mg/kg)	Duration (h)	Score of attachment ($\bar{x} \pm \text{SD}$)			
			10 σ	10♀		
NS-CHN	100	1	0.6 \pm 1.4	0		
		2	1.4 \pm 1.6	0.4 \pm 0.8		
		4	0.6 \pm 1.4	2.4 \pm 2.8		
		6	1.2 \pm 2.7	1.0 \pm 1.7		
IS-CHN	100	1	4.2 \pm 4.0	2.2 \pm 3.3		
		2	3.6 \pm 3.9	2.2 \pm 2.7		
		4	5.4 \pm 2.8	3.4 \pm 3.5		
		6	7.2 \pm 2.5	3.8 \pm 3.7		
NS-CHN	300	1	0	0		
		2	0.4 \pm 1.3	0.6 \pm 1.4		
		4	1.4 \pm 1.7	0.8 \pm 1.4		
		6	2.4 \pm 2.1	1.0 \pm 1.4		
		IS-CHN	300	1	8.0	3.4 \pm 2.1
				2	8.0	3.2 \pm 2.9
				4	7.2 \pm 1.7	4.4 \pm 2.6
				6	8.0	4.0 \pm 2.3

则虫的体表除少数外未见有明显恢复,并有 Neu 附着(图 3 C, 见铜版图 2)。

讨 论

应用 IS-CHN 或 ASE-CHN 系统观察表明,血吸虫的皮层经吡喹酮损害后,Neu 可迅速附着其上。这些系统的作用特点可归纳为:1) Neu 直接或通过免疫血清与受损的虫体表面形成的膜状包被介导附着于虫的体表;2) Neu 的附着加重对虫的损害,使部分虫在 24 h 内死亡;3) 血吸虫经吡喹酮作用后,♀虫迅速自♂虫的抱雌沟脱出,其接触药物的情况与♂虫相同,但其皮层的损害则较♂虫的为轻,而 Neu 附着♀虫的部位以卵巢下的体表较常见;4) Neu 附着于虫的受损体表不完全依赖于补体的存在及 5) 在 IS-CHN 或 ASE-CHN 中,虫经吡喹酮作用后,虫的皮层损害加重。由此可见,附着于虫体表的 Neu 可能对虫具有细胞毒作用。

一般认为,在补体和/或抗血吸虫抗体存在的情况下,对曼氏血吸虫童虫具有最强杀伤作

用的效应细胞为嗜酸性白细胞⁽⁷⁾;小鼠体内的曼氏血吸虫成虫经吡喹酮作用后,聚集在死虫周围的细胞亦以嗜酸性白细胞为主⁽⁸⁾。但用日本血吸虫观察时,死虫周围的细胞主要是 Neu,至死虫脓肿形成时才以嗜酸性白细胞为主。

参 考 文 献

- 1 肖树华、杨元清、舒永生、王祖武. 动物学报 1981; 27: 305
- 2 肖树华、戴志强、张荣泉、薛海筹、邵葆若. 药学报 1982; 17: 498
- 3 肖树华、杨元清、杨惠中、郭惠芳、邵葆若. 同上 1983; 18: 241
- 4 肖树华、薛海筹、郭惠芳、杨惠中、邵葆若. 上海免疫学杂志 1981; 1(6): 9
- 5 肖树华、郭惠芳、薛海筹、裘丽姝、张荣泉. 药学报 1985; 20: 10
- 6 Dean DA, Wistar DR, Chen P. *Am J Trop Med Hyg* 1975; 24: 74
- 7 McLaren DJ, Smithers SR. Immunity to schistosomiasis *in vitro* versus *in vivo* models. In: Owen DG, ed. *Animal models in parasitology*. 1st ed. London: Macmillan, 1982: 155-69
- 8 Mehlhorn H, Becker B, Andrews P, Thomas H, Frenkel JK. *Arzneim Forsch* 1981; 31: 544

Acta Pharmacologica Sinica 1986 Mar; 7 (2): 165-170

Attachment of mouse neutrophils *in vitro* on praziquantel-damaged surface of adult *Schistosoma japonicum* in the presence of immune sera

XIAO Shu-hua, GUO Hui-fang, XUE Hai-chou, QIU Li-shu

(*Inst Parasitic Diseases, China National Centre for Preventive Medicine*¹, Shanghai 200025)

ZHANG Rong-quan

(*Measurement Centre of Shanghai Public Health Bureau, Shanghai 200031*)

ABSTRACT Attachment of mouse neutrophils (Neu) *in vitro* on praziquantel-damaged surface of adult *Schistosoma japonicum* in the presence of 3 culture

systems (NS-CHN, IS-CHN or ASE-CHN), consisting of 1) normal rabbit serum (NS), infected rabbit serum (IS) or rabbit antisera to freeze-thawed tegument exudates

of adult worms (ASE); 2) glycogen-activated mouse peritoneal Neu (N); 3) guinea pig serum served as complement (C) and 4) Hanks' balanced salt solution (H), were studied. When male and female worms were maintained in IS-CHN or ASE-CHN containing praziquantel 1 µg/ml for 2-20 h, or the worms were exposed to the drug 30 µg/ml for 4 h then transferred to the culture system, Neu adhered to the damaged surface of the worms were seen. The attachment of Neu accentuated the tegument injury and resulted in worm death within

24 h. If immune serum was replaced by normal rabbit serum, no such phenomenon was seen. These results were confirmed by scanning electron microscopy.

KEY WORDS praziquantel; *Schistosoma japonicum*; immune sera; neutrophils; scanning electron microscopy

¹ WHO Collaboration Center for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis.

Partial financial support was received from UNDP/World Bank/WHO TDR

* * * * *

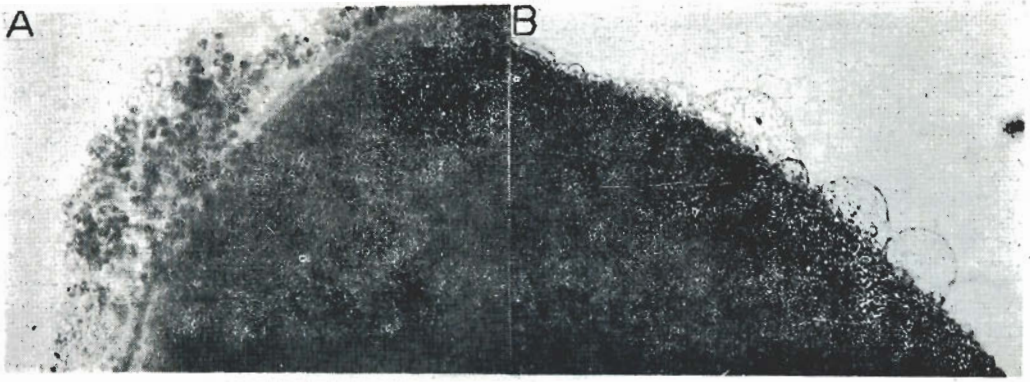


Fig 1. Attachment of neutrophils (Neu) on ♂ schistosomes exposed to praziquantel. A.) worm exposed to praziquantel 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in ASE-CHN for 20 h, showing damaged tegument covered with membrane-like material containing numerous Neu, $\times 400$; B) worm exposed to praziquantel 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in NS-CHN for 20 h, showing numerous large vesicles along the tegument, $\times 400$.

(See p 167)

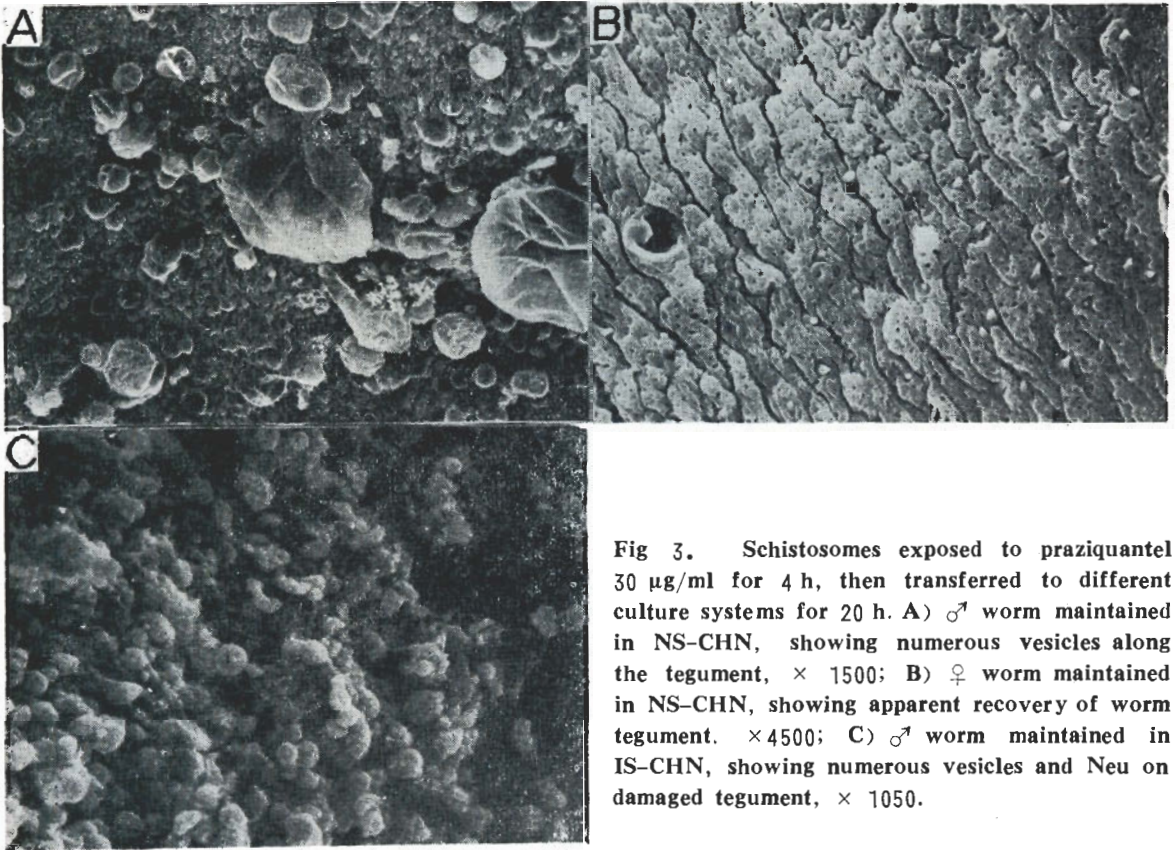


Fig 3. Schistosomes exposed to praziquantel 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 4 h, then transferred to different culture systems for 20 h. A) ♂ worm maintained in NS-CHN, showing numerous vesicles along the tegument, $\times 1500$; B) ♀ worm maintained in NS-CHN, showing apparent recovery of worm tegument. $\times 4500$; C) ♂ worm maintained in IS-CHN, showing numerous vesicles and Neu on damaged tegument, $\times 1050$.

(See p 168,169)

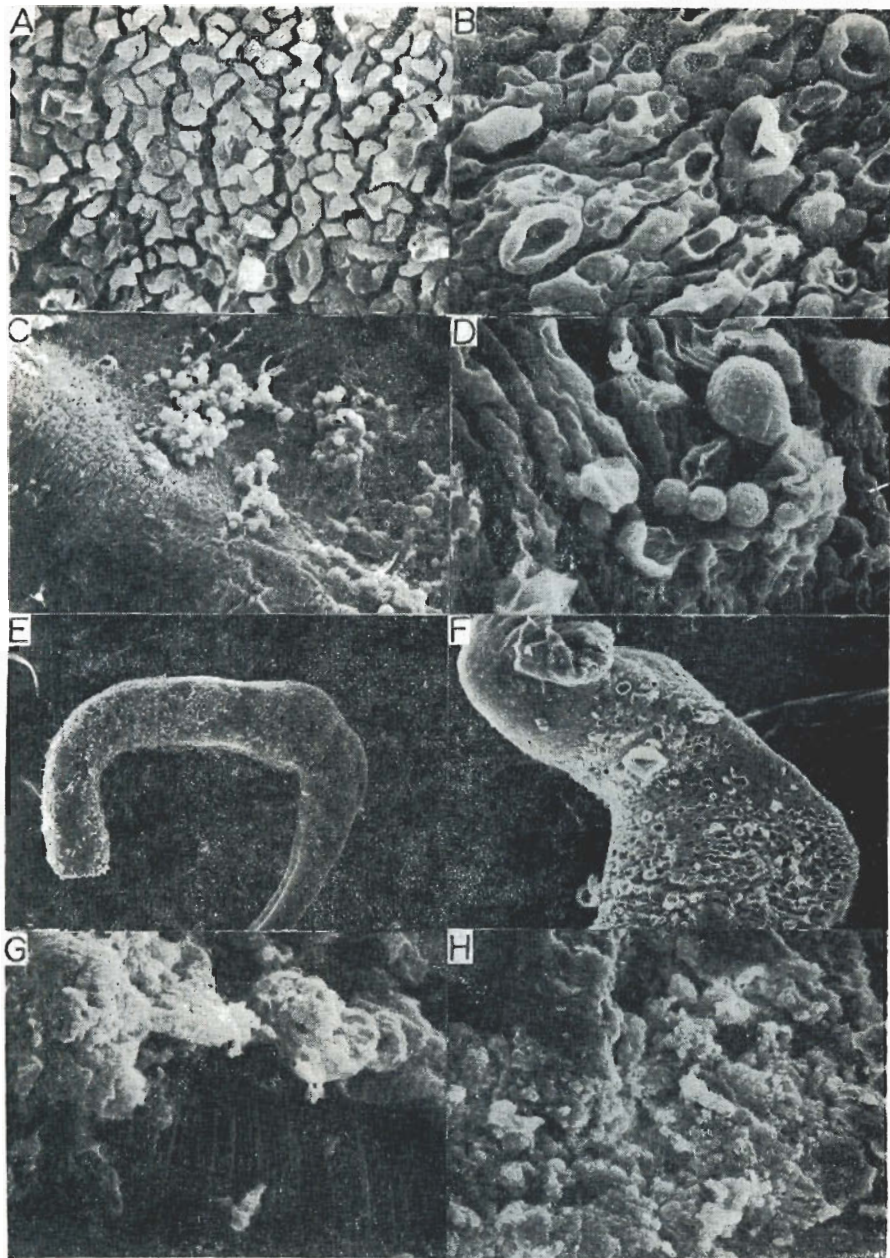


Fig 2. Schistosomes exposed to praziquantel 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 2-20 h. A) σ^7 worm maintained in NS-CHN for 2 h, showing mild swelling and fusion of tegument ridges, and deformation of sensory structure, $\times 3000$; B) σ^7 worm maintained in NS-CHN for 20 h, showing hole-like appearance in tegument surface, swelling and deformation of sensory structure, $\times 4500$; C) f worm maintained in IS-CHN for 2 h, showing attachment of numerous Neu on damaged tegument $\times 750$; D) σ^7 worm maintained in ASE-CHN for 2 h, showing Neu adhered to damaged tegument, $\times 3000$; E) f worm maintained in IS-CHN for 20 h, showing Neu adhered to posterior part of the worm, $\times 105$; F) σ^7 worm maintained in ASE-CHN for 20 h, showing swelling of ridges and network-like appearance of worm surface, $\times 300$; G) σ^7 worm maintained in ASE-CHN for 20 h, showing extensive peeling of worm tegument, $\times 1500$; H) σ^7 worm maintained in ASE-CHN for 20 h, showing replacement of tegument structure by granular and mass materials, $\times 750$.

(See p 168)