

侵入小鼠皮肤不同虫龄的日本血吸虫童虫对吡喹酮的敏感性及虫的一些体表特性的观察

肖树华、乐文菊、梅静艳 (中国预防医学科学院寄生虫病研究所¹, 上海 200025)

提要 吡喹酮对钻入小鼠皮肤的3 h血吸虫童虫有杀灭作用, 对6-72 h童虫的效果差或无效。在3 h童虫

中, 其体表抗原显露的占86.4%, 24和48 h童虫的分别占55.2%和58.7%, 而72 h童虫则仅占3.9%。将3 h, 24 h或72 h的童虫注入含中性白细胞或巨噬细胞的小鼠腹腔内时, 吡喹酮仅可使这2种细胞对3 h童虫体表的附着明显增加。

1985年8月23日收稿 1986年12月6日修回

¹ 世界卫生组织疟疾、血吸虫病、丝虫病合作中心

关键词 日本血吸虫童虫, 吡喹酮, 表面抗原, 嗜中性白细胞, 巨噬细胞

前文⁽¹⁾报道小鼠 ig 吡喹酮后, 药物自皮肤排泌是预防血吸虫尾蚴感染的主要原因, 同时吡喹酮还可使宿主皮肤的白细胞数增多和促进肥大细胞脱粒, 这可能在杀灭侵入皮肤的童虫中起重要作用⁽²⁾。体内试验指出⁽³⁾, 吡喹酮仅对刚侵入小鼠皮肤 3 h 前后的童虫有效, 对虫龄为 3-21 d 的童虫则效果不明显。本文系进一步探讨吡喹酮对侵入小鼠皮肤后不同时间的童虫的作用, 并对它们体表的特性作了初步观察。

方 法

疗效试验 取 18-22 g 的正常小鼠, 每鼠自腹部皮肤接种日本血吸虫尾蚴 48-52 条, 并于感染后 3, 6, 12, 24, 48 及 72 h (童虫虫龄分别以 T₃, T₆, T₁₂, T₂₄, T₄₈ 和 T₇₂ 表示) 1 次 ig 溶于 PEG 400 的吡喹酮 400-600 mg/kg。受治动物于治毕后 4 wk 解剖, 根据残存虫数评价疗效。另取小鼠自腹部皮肤感染约 300 条尾蚴, 3 h 后每鼠 1 次 ig 上述剂量的吡喹酮, 并于给药后 0.5, 2, 24 及 72 h 各剖杀 2-3 鼠, 切取感染部位的皮肤, 按前文⁽¹⁾方法收集童虫, 观察虫的活动和体表受损情况。

体外培养试验 自上述感染小鼠皮肤收集 T₃, T₂₄ 和 T₄₈ 童虫, 以及从肺脏收集 T₇₂ 童虫, 并培养在含 20% 小牛血清的亨氏盐平衡溶液 (HBS) 或 RPMI 1640 中, 培养温度为 37℃。待虫体活动稳定后加入吡喹酮, 终浓度为 0.005-30 μg/ml, 并于 1-24 h 内在倒置显微镜下进行观察。

童虫体表抗原的检测 按前文⁽⁴⁾方法, 用间接荧光抗体技术检测童虫的体表抗原。

细胞对童虫体表的附着试验 取 24-28 g 正常♀小鼠, ip 1% 糖原液 2 ml 或 10% 豚-豚液 2 ml, 前者刺激产生中性白细胞, 后者则激活腹腔内的巨噬细胞^(5,6), 16-20 h 后, 将 T₃, T₂₄ 或 T₇₂ 童虫分别注入上述小鼠腹腔内, 再经

2-24 h 后, 将含肝素 5 μg/ml 的 HBS 注入腹腔, 将童虫吸出, 待其自然沉淀后, 取虫观察其体表附着的细胞数。

结 果

对不同虫龄童虫的疗效 小鼠于感染血吸虫尾蚴后不同时间 1 次 ig 吡喹酮 400-600 mg/kg 治疗时, 疗效以 T₃ 童虫组较佳。T₆ 及 T₁₂ 童虫组的疗效较逊于 T₃ 童虫组, 除 1 次试验外, 其余 2 次试验的 T₆ 及 T₁₂ 童虫组的每鼠平均虫数均显著地多于 T₃ 童虫组。T₂₄ 及 T₄₈ 童虫组的疗效则进一步降低, 而 T₇₂ 童虫组的则更差, 甚至无效 (表 1)。

Tab 1. Effect of praziquantel on schistosomula at various ages in mice.

Dose (mg/kg)	Worm age (h)	Mice autopsied	Worms/mouse $\bar{x} \pm SD$	Worm reduction rate (%)
0		20	17.7 ± 8.7	
400	3†	11	4.2 ± 4.5	76.3
	6	19	7.9 ± 6.2*	55.4
	12	20	9.0 ± 7.3**	49.2
	24	22	10.5 ± 8.5**	40.7
	48	21	9.6 ± 6.7**	45.8
	72	14	13.2 ± 5.1***	25.4
0		14	32.6 ± 6.2	
400	3†	20	12.4 ± 5.3	62.0
	12	16	21.0 ± 8.1***	35.5
	24	14	24.4 ± 6.9***	25.2
	48	14	27.8 ± 7.9***	14.8
	72	14	25.4 ± 7.3***	22.0
0		12	8.4 ± 4.5	74.2
600	12	12	22.8 ± 8.4***	30.0
	24	10	22.4 ± 7.5***	31.3
	48	14	25.4 ± 7.3***	22.0
	72	14	25.4 ± 7.3***	22.0
0		13	26.1 ± 8.7	
400	3†	24	10.2 ± 5.0	61.0
	6	18	14.3 ± 5.1**	45.2
	12	18	14.6 ± 8.5**	44.1
	24	21	21.2 ± 9.0***	19.9
	48	7	21.4 ± 3.5***	18.0
	72	9	24.1 ± 7.8***	7.3

*p > 0.05, **p < 0.05, ***p < 0.01 as compared with corresponding 3 h old group.

† The average worm number of each 3 h old group was significantly less than that of its corresponding control group.

对 T₃ 童虫的作用 侵入小鼠皮肤的 T₃ 童虫经吡喹酮 400 mg/kg 作用 0.5 h 后, 12.5% 的童虫与对照组的相仿, 可作协调的前、后端伸缩活动; 48.8% 的童虫示有明显的挛缩, 一般前端可作一些伸缩活动, 后端粗大、钝圆, 活动受抑制; 有的童虫仅有微弱摆动。同时, 部分虫的前、后端或两侧体表可查见 1 或数个大小不等的泡状物。滴加美蓝时, 这些童虫的不同部位示有轻至中度的蓝色。此外, 尚有 38.7% 的童虫为挛缩呈梨形和美兰浓染的不动死虫。在相应对照组中, 活虫占 84.4%, 死虫占 15.6%。经吡喹酮作用 2-24 h 后, 自皮肤检出的活童虫数与受损童虫数迅速减少, 分别占总虫数的 1.8 和 15%, 而死虫则增至 83.2%。相应对照组的活童虫数所占的百分比均较给药组的为多, 而死虫则较低。小鼠于服药后 72 h, 自对照组皮肤检获的童虫数明显减少, 残留在皮肤内的童虫大部分已死亡或受损, 活虫仅占 23.7%。同时, 自服吡喹酮组皮肤检获的童虫数仍较多, 但活虫仅占 0.3%。吡喹酮的剂量为 600 mg/kg 的结果与上述的相仿(表 2)。

Tab 2. Effect of praziquantel on 3-hour-old schistosomula in mouse skin. $\bar{x} \pm SD$

Dose mg/kg	h after medication	n	Worm status (%)			Total worms/mouse
			alive	damaged	died	
0		8	84.4	0	15.6	47±16
400	0.5	7	12.5	48.8	38.7	61±12
0		8	75.8	0	24.2	51±24
400	2	8	5.3	33.8	60.9	57±31
0		7	52.3	0	47.7	50±11
400	24	8	1.8	15.0	83.2	62±15
0		7	23.7	4.3	72.0	9±4
400	72	8	0.3	17.6	82.1	34±11
0		8	74.6	0	25.4	35±18
600	0.5	8	1.1	65.9	33.0	47±11
0		7	77.9	0.5	21.6	66±17
600	2	8	0	36.7	63.3	49±14
0		8	66.7	0	33.3	66±13
600	24	8	0.9	28.3	70.8	42±15
0		7	23.7	4.3	72.0	9±4
600	72	8	1.2	17.1	81.7	35±13

不同虫龄童虫对吡喹酮的敏感性

1. 在含 20% 小牛血清-HBS 中, T₃, T₆, T₂₄ 和 T₄₈ 童虫与吡喹酮 0.005-0.01 μg/ml 作用后均示有活动兴奋, 特别是虫的前端伸缩频繁, 后端稍有挛缩, 活动幅度小。药物浓度为 0.1-30 μg/ml 时, 不同虫龄童虫均立即挛缩呈梨形, 随即前端突出, 频繁伸缩, 后端钝圆, 活动受限制。吡喹酮作用 24 h, 0.1 μg/ml 以下各组童虫仍有不同程度的活动兴奋, 而 1-30 μg/ml 组的童虫活动则减弱, 有的已伸长或呈轻度节状收缩。

2. 在含 20% 小牛血清-RPMI 1640 中, T₃ 童虫经吡喹酮 1 μg/ml 作用 1, 4 及 24 h 后, 其皮层受损虫数所占的百分比随作用时间的延长而增加, 与各相应对照组的差别均显著。T₂₄ 及 T₇₂ 童虫经相同浓度的吡喹酮作用 1-4 h, 无或仅有少量虫的皮层受损, 与 T₃ 童虫相应

Tab 3. Praziquantel-induced tegument damage to schistosomula at different ages *in vitro*. $\bar{x} \pm SD$

Worm age (h)	Concentration (μg/ml)	Exposure time (h)	Worms examined	Worm with tegument damage (%)†	
3	0	1	18-50	4.9±3.8	
		4	30-50	18.0±9.1	
	0	24	30-50	20.3±7.8	
		1	1	40-50	27.5±7.3***
	1	4	40-50	43.0±5.7***	
		24	40-50	82.2±4.1***	
24	0	1	26-44	3.3±1.9	
		4	32-55	3.4±0.9	
	0	24	32-55	8.6±4.1	
		1	1	26-47	5.7±2.8*
	1	4	30-54	5.0±2.9*	
		24	30-54	51.8±18.1***	
	72	0	1	50	0
			4	50	0
0		24	50	3.2±2.3	
		1	1	50	0
1		4	50	6.8±2.3	
		24	50	76.0±13.0***	

† each value represents mean of 5 groups.

*p>0.05; ***p<0.01 as compared with corresponding control group.

组的差别显著, $p < 0.01$; 药物作用 24 h 后, 童虫皮层受损的百分比为 51.8 ± 18.1 和 76 ± 13 , 低于 T_3 童虫相应组的 82.2 ± 4.1 , 但统计学上的差别不显著, $p > 0.05$ (表 3)。吡喹酮的浓度为 $10 \mu\text{g/ml}$ 时, 结果与上述相仿。

不同虫龄童虫体表抗原显露的情况 用间接荧光抗体检测 T_3 , T_{24} , T_{48} 和 T_{72} 童虫的体表抗原的结果表明, 反应血清为正常兔血清时, 各期虫龄童虫体表抗原显露的虫数占总虫数的 $0.9-26.2\%$; 反应血清为感染 200 条血吸虫尾蚴达 60 d 的病兔血清时, T_3 童虫体表抗原显露的虫数占 86.4% , T_{24} 及 T_{48} 的为 $55.2-58.7\%$, 而 T_{72} 童虫的则仅为 3.9% (表 4)。

Tab 4. Exposure of surface antigens of schistosomula of different ages by indirect fluorescent antibody technique

Worm age(h)	Serum	No. of worms with surface antigens(%)		Total worm examined
		-	+	
3	NRS	73.8	26.2	126
	IRS	13.6	86.4	228
24	NRS	91.4	8.6	292
	IRS	44.8	55.2	386
48	NRS	77.4	22.6	162
	IRS	41.3	58.7	252
72	NRS	99.1	0.9	574
	IRS	96.1	3.9	532

NRS: Normal rabbit serum

IRS: Serum from rabbit infected with 200 cercariae for 60 d

中性白细胞(Neu)或巨噬细胞(Mac)对童虫体表的附着

1. T_3 童虫注入含 Neu 的小鼠腹腔内 2 h, 在 137 条童虫体表附着的 Neu 为 26 ± 19 个, 其中仅 1 条童虫的体表无细胞附着; 若将 T_{24} 童虫注入含 Neu 的小鼠腹腔内 2 h, 则在 150 条童虫体表附着的 Neu 为 7 ± 7 个, 其中 68 条童虫体表无细胞附着。当虫龄为 T_{72} 时, 在受检的童虫中, 有 1097 条虫的体表无细胞附着, 另有 26 条虫的体表有 6 ± 7 个 Neu 附着。若将上述不同虫龄的童虫注入含激活的 Mac 的小鼠腹腔时, Mac 在童虫体表附着的情况与上述的相仿, 但附着的细胞数较少(表 5)。

2. 将 T_3 童虫注入上述含 Neu 的小鼠腹腔的同时, 给动物 ig 1 次吡喹酮 400 mg/kg , 2 h 后自腹腔收集童虫观察。结果, 在 74 条 T_3 童虫中, 44 条虫的整个体表为许多 Neu 附着, 无法计数; 另 30 条童虫的体表附着 32 ± 20 个 Neu。在相应对照组的 109 条童虫中, 未见有成堆 Neu 附着体表的童虫, 虫的 Neu 附着数为 20 ± 17 个。若用 T_{24} 观察, 则在服药组的 118 条童虫中, 53 条无 Neu 附着, 其余 65 条童虫的体表附着 13 ± 14 个 Neu, 在相应的对照组中, 童虫体表无 Neu 附着的为 86 条, 另 24 条则有 7 ± 6 个 Neu 附着。若童虫为 T_{72} , 则在受检的服药组和相应对照组的 161 条和 181 条童虫中, 均未见有 Neu 附着。

Tab 5. Attachment of neutrophils and macrophages onto surface of schistosomula injected into peritoneal cavity of mouse.

Cells	Worm age (h)	Worms attached by cells (%)		Cells attached onto worm surface $\bar{x} \pm \text{SD}$
		-	+	
Neutrophils ¹⁾	3	1(0.7)	136(99.3)	26 ± 19
	24	68(45.3)	82(54.7)	$7 \pm 7^{***}$
	72	1095(97.7)	26(2.3)	$6 \pm 7^{***}$
Macrophages ²⁾	3	4(32.0)	120(96.8)	17 ± 18
	24	109(59.6)	74(40.4)	$2.1 \pm 1.7^{***}$
	72	1175(98.2)	21(1.8)	$5 \pm 5^{***}$

¹⁾ Mice were injected with 1% glycogen 2 ml for 16-20 h.

²⁾ Mice were injected with 10% proteose-peptone 2 ml for 16-20 h.

*** $p < 0.01$ as compared with 3-h group.

讨 论

吡喹酮对虫龄为 2-3 h 的童虫有较好的疗效, 而对 3 d 以上虫龄的童虫则相反⁽³⁾。本文试验的结果进一步说明, 吡喹酮对侵入宿主皮肤的童虫的杀灭作用, 随虫龄的增长而迅速降低, 虫龄达 1 d 以上时即无明显疗效。体外观察结果表明, 吡喹酮引起不同虫龄童虫活动兴奋与挛缩所需的浓度相仿, 但 T_3 童虫经吡喹酮作用后其皮层受损远较 T_{24} 和 T_{72} 童虫的迅速和严重。由于在感染后 48 h 内, 相当一部分童虫仍停留在皮肤内, 宿主服药后它们受到吡喹酮作用的情况是相同的, 故此对吡喹酮敏感性的不同, 反映了不同虫龄童虫的内在抗力有所不同。

为了探讨不同虫龄童虫对吡喹酮敏感性不同的原因, 我们对这些虫龄的童虫体表的特性作了初步观察。结果表明, 侵入皮肤的 T_3 童虫的体表抗原, 除少数外均显露, T_{24} 、 T_{48} 的则减少近一半, 至移行至肺的 T_{72} 童虫, 则绝大部分的体表抗原已不显露。鉴于在我们的试验中, 小鼠系初次感染, 不存在抗血吸虫抗体, 亦即不会产生特异性的免疫反应。但童虫体表抗原的显露, 是否可能与虫经吡喹酮损害后, 易于受到吡喹酮引起的宿主非特异性免疫力增强的作用^(2,7)而死亡, 是值得进一步探讨的。

进一步将不同虫龄的童虫注入含中性白细胞和激活的巨噬细胞的小鼠腹腔内, 两种细胞附着童虫体表的多少与上述童虫体表抗原显露的情况相一致; 同时, 经吡喹酮作用后, T_3 童

虫体表附着的细胞数增加, 而其余 2 种虫龄的童虫则否。组织病理学观察的结果指出, 在小鼠皮肤内, T_3 童虫经吡喹酮作用后, 受损童虫周围的炎细胞反应明显, 肥大细胞脱粒增加, 白细胞附着、侵入和死虫的出现较早, 而皮肤的 T_{24} 童虫经吡喹酮作用后虽亦受损, 但虫周的细胞反应较轻, 死虫亦较少⁽⁸⁾。这说明, 不同虫龄童虫体表性质的差异, 可能与这些童虫对吡喹酮敏感与否有关。

参 考 文 献

- 1 肖树华、乐文菊、梅静艳。吡喹酮预防小鼠感染日本血吸虫尾蚴的分析。药学学报 1985; 20: 641
- 2 肖树华、杨元清、张荣泉、张超威。小鼠预服吡喹酮对侵入皮肤的血吸虫童虫的影响及宿主皮肤组织的细胞反应。中国药理学报 1986; 7: 358
- 3 乐文菊、尤纪青、梅静艳。吡喹酮预防动物日本血吸虫病的作用。同上 1985; 6: 186
- 4 肖树华、薛海筹、郭惠芳、杨惠中、邵葆若。感染小鼠用吡喹酮治疗后其体内血吸虫体表抗原的显露。上海免疫学杂志 1981; 1 (6): 9
- 5 Dean DA, Wistar DR, Chen P. Immune response of guinea pigs to *Schistosoma mansoni* I. *In vitro* effects of antibody and neutrophils and macrophages on schistosomula. *Am J Trop Med Hyg* 1975; 24: 74
- 6 Perez H, Terry RJ. The killing of adult *Schistosoma mansoni in vitro* in the presence of antisera to host antigenic determinants and peritoneal cells. *Int J Parasitol* 1973; 3: 499
- 7 肖树华、吴公贵、薛海筹, 等。吡喹酮对小鼠感染日本血吸虫尾蚴后早期免疫功能的影响。中国药理学报 1987; 8: 60
- 8 肖树华、杨元清、杨惠中。吡喹酮对钻入皮肤不同虫龄的日本血吸虫童虫的组织形态学的观察。寄生虫学与寄生虫病杂志 1987; 5(4): 待发表

Susceptibility of schistosomula at various ages to praziquantel during invasion in mouse skin and observations on certain characteristics of schistosomula surface

XIAO Shu-Hua, YUE Wen-Ju, MEI Jing-Yan

(Institute of Parasitic Diseases, Chinese Academy of Preventive Medicine¹, Shanghai 200025)

ABSTRACT Praziquantel possessed a noticeable effect *in vivo* against 3-h old schistosomula in the mouse skin, but less so or even not at all on 6-48-h (skin stage) and 72-h (lung stage) old schistosomula. The susceptibility of 3-72 h old schistosomula to praziquantel *in vitro* was the same in stimulation of worm activity and contraction induced by praziquantel. While in 3-h old schistosomula the drug-induced tegument damage was more severe than that in 24-h and 72-h old schistosomula. In 3-h old schistosomula 86.4% of the worms would have their surface antigen exposed evidence by indirect fluorescent antibody technique, while in 24-48-h old or 72-h old schistosomula 55.2-58.7% or

only 3.9% of the worms showed the exposure of surface antigen. When 3-h old schistosomula were inoculated into the peritoneal cavity of mouse containing neutrophils or macrophages, the worm surface was quickly attached by either kind of cells. No or only few neutrophils or macrophages adhered on the worm surface when 24- and 72-h old schistosomula were tested.

KEY WORDS *Schistosoma japonicum* schistosomula; praziquantel; surface antigens; neutrophils; macrophages

¹ WHO Collaborating Center for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis.