

## 吡喹酮在体外对中性白细胞附着与杀死血吸虫童虫的观察

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<sup>1</sup>, 上海 200025)

**提要** 在含正常血清、补体和中性白细胞的体外培养系统(NSCN)中, 吡喹酮可促使中性白细胞对 3-h 童虫的附着, 并杀死部分童虫, 但对 24-h 童虫的作用差, 而对 72-h 童虫则无明显作用。用兔免疫血清取代正常血清的 ISCN 观察, 结果相仿。初步认为, 在 NSCN 中, 补体可能起重要作用, 而在 ISCN 中起重要作用的可能是特异性抗体。

**关键词** 日本血吸虫童虫; 吡喹酮; 嗜中性白细胞; 正常血清; 免疫血清; 补体成分

吡喹酮对侵入小鼠皮肤 3 h 的血吸虫童虫具有杀灭作用, 表现为多核白细胞包围、附着与侵入体表受损的童虫<sup>(1,2)</sup>; 童虫周围的脱粒与崩裂的肥大细胞数明显增加。但吡喹酮对虫龄为 24-72 h 的血吸虫童虫的疗效明显降低, 甚至无效<sup>(3)</sup>。进一步观察的结果表明, 感染血吸虫尾蚴达 3 h 的小鼠一次给予吡喹酮后 2-72 h, 其腹腔巨噬细胞的吞噬功能明显增加<sup>(4)</sup>, 提示在吡喹酮杀死 3 h 童虫的过程中, 除药物的直接作用外, 宿主的非特异性免疫作用可能参与杀虫过程。本文系观察在正常与免疫血清中, 吡喹酮对中性白细胞附着与杀死不同虫龄血吸虫童虫的作用。

## 方 法

取 22-25 g 的雌性小鼠, 于经皮肤感染日本血吸虫尾蚴后不同时间剖杀, 收集皮肤内 3-h 和 24-h 童虫, 及肺内的 72-h 童虫<sup>(5,6)</sup>, 并放置在 RPMI 1640 培养液中备用。另取感染 300-400 条尾蚴达 3-h 的小鼠 1 次 ig 吡喹酮 200 或 600 mg/kg, 1 h 后自感染部位的皮肤收集童虫。

吡喹酮溶解于聚乙二醇 (PEG 400) 中, 用

生理盐水稀释至所需浓度。

体重为  $27 \pm 2$  g 的雌性小鼠, ip 2% 糖原液 2 ml, 16-24 h 后按前文<sup>(7)</sup>方法取腹腔液收集中性白细胞, 经用 RPMI 1640 洗涤 3 次后备用。

**血清** 正常血清: 取正常小鼠, 用摘眼球法取血, 离心后分离血清, 56℃ 灭活 30 min。补体: 试验前取小鼠血分离血清作补体用。免疫血清: 兔用血吸虫匀浆免疫后, 待抗体滴度达 1:640 时取血分离血清, 或兔感染 1500-2000 条尾蚴达 7 wk 后, 抗体滴度亦达 1:640 时取血分离血清。

**培养系统** 取 96 孔凹板, 将上述各成分加至凹孔中, 其中童虫悬液 70  $\mu$ l (含虫约 40-80 条), 中性白细胞悬液 80  $\mu$ l (细胞数按 5000/虫计算), 灭活的正常血清或免疫血清 65  $\mu$ l, 新鲜小鼠血清 25  $\mu$ l 和吡喹酮 10  $\mu$ l (终浓度为 1 或 10  $\mu$ g/ml), 除少数外, 每组测试 9-12 孔, 放在 37℃ 的 5% CO<sub>2</sub> 内培养。加药后 48 h 将培养板放在有保温装置的倒置显微镜上, 评价中性白细胞附着虫体体表的程度: - 童虫体表无中性白细胞附着; + 童虫体表有 5-20 个中性白细胞附着; ++ 童虫体表有 20 个以上的中性白细胞附着, 或整个虫的体表为细胞所覆盖。此外, 童虫无活动、肿大、结构模糊或发黑者皆判断为死虫, 经美兰染色皆浓染。

## 结 果

## 体外试验

1. 3-h 童虫 3-h 童虫在含正常小鼠血清、补体和中性白细胞系统(NSCN)中, 经吡喹酮 1 及 10  $\mu$ g/ml 作用 48 h 后, 无中性白细胞(以下简称细胞)附着和附着 ++ 细胞的童虫 % 分别较对照组的明显减少和增加, 在无补体的上述

Tab 1. Attachment of neutrophils on 3-h old ( $T_3$ ), 24-h old ( $T_{24}$ ) and 72-h old ( $T_{72}$ ) schistosomula exposed to praziquantel in various culture systems for 48 h.  $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=7-13$ ; \* $p>0.05$ , \*\* $p<0.05$ , \*\*\* $p<0.01$  vs the corresponding control group.

Culture system	Concn ( $\mu\text{g/ml}$ )	Degree of attachment of neutrophils on schistosomula surface (%)								
		-			+			++		
		$T_3$	$T_{24}$	$T_{72}$	$T_3$	$T_{24}$	$T_{72}$	$T_3$	$T_{24}$	$T_{72}$
NSCN	0	69 $\pm$ 13	82 $\pm$ 15	99.7 $\pm$ 0.9	0	18 $\pm$ 15	0	31 $\pm$ 13	0	0.3 $\pm$ 0.8
	1	46 $\pm$ 12***	71 $\pm$ 13*	98 $\pm$ 4*	1.1 $\pm$ 1.3**	12 $\pm$ 10*	2 $\pm$ 4*	53 $\pm$ 12***	17 $\pm$ 22**	0*
	10	34 $\pm$ 6***	66 $\pm$ 4***	98 $\pm$ 3*	2 $\pm$ 4*	11 $\pm$ 9*	2.1 $\pm$ 2.9**	64 $\pm$ 7***	24 $\pm$ 21***	0*
NSN	0	74 $\pm$ 11	81 $\pm$ 11	99.9 $\pm$ 0.3	2 $\pm$ 2	18 $\pm$ 12	0	25 $\pm$ 10	0.9 $\pm$ 1.4	0.1 $\pm$ 0.3
	1	64 $\pm$ 11**	75 $\pm$ 2*	95 $\pm$ 6**	2 $\pm$ 3*	14 $\pm$ 9*	5 $\pm$ 6**	34 $\pm$ 13*	11 $\pm$ 10***	0.5 $\pm$ 0.8*
	10	55 $\pm$ 9***	76 $\pm$ 12*	96 $\pm$ 5**	4 $\pm$ 4*	11 $\pm$ 5*	4 $\pm$ 5**	41 $\pm$ 8***	13 $\pm$ 15**	0*
ISCN	0	57 $\pm$ 6	52 $\pm$ 8	100	5 $\pm$ 6	11 $\pm$ 9	0	38 $\pm$ 10	37 $\pm$ 10	0
	1	32 $\pm$ 7***	45 $\pm$ 6**	83 $\pm$ 19**	8 $\pm$ 5*	7 $\pm$ 3*	17 $\pm$ 18***	61 $\pm$ 11***	48 $\pm$ 5***	0.8 $\pm$ 1.4*
	10	22 $\pm$ 7***	21 $\pm$ 11***	78 $\pm$ 24***	3 $\pm$ 4*	19 $\pm$ 11*	21 $\pm$ 22***	75 $\pm$ 9***	60 $\pm$ 8***	1.8 $\pm$ 1.9*
ISN	0	67 $\pm$ 5	53 $\pm$ 7	100	12 $\pm$ 15	33 $\pm$ 23	0	22 $\pm$ 15	15 $\pm$ 18	0
	1	39 $\pm$ 8***	42 $\pm$ 4***	93 $\pm$ 8**	56 $\pm$ 11***	42 $\pm$ 20*	6 $\pm$ 7**	5 $\pm$ 9***	16 $\pm$ 22*	0.5 $\pm$ 1.0*
	10	35 $\pm$ 10***	30 $\pm$ 7***	95 $\pm$ 6**	25 $\pm$ 32*	62 $\pm$ 15***	4 $\pm$ 5**	40 $\pm$ 24*	9 $\pm$ 12*	0.7 $\pm$ 1.0*

Tab 2. Mortality and status of 3-h old ( $T_3$ ) and 24-h old ( $T_{24}$ ) schistosomula exposed to praziquantel in various culture systems for 48 h.  $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=7-13$ ; \* $p>0.05$ , \*\* $p<0.05$ , \*\*\* $p<0.01$  vs corresponding control group.

Culture system	Concn ( $\mu\text{g/ml}$ )	Average worm number		Mortality of worm (%)		Status of worm covered with cells (%)			
						Alive		Death	
		$T_3$	$T_{24}$	$T_3$	$T_{24}$	$T_3$	$T_{24}$	$T_3$	$T_{24}$
NSCN	0	51 $\pm$ 15	76 $\pm$ 16	20 $\pm$ 5	7 $\pm$ 6	0.6 $\pm$ 1.3	15 $\pm$ 14	17 $\pm$ 3	7 $\pm$ 6
	1	51 $\pm$ 11	73 $\pm$ 8	33 $\pm$ 7***	16 $\pm$ 9**	4 $\pm$ 4	14 $\pm$ 5	31 $\pm$ 7***	16 $\pm$ 9**
	10	58 $\pm$ 7	68 $\pm$ 16	49 $\pm$ 19***	26 $\pm$ 13***	0	10 $\pm$ 4	31 $\pm$ 8***	26 $\pm$ 13***
NSC	0	49 $\pm$ 7	73 $\pm$ 9	14 $\pm$ 4	4 $\pm$ 2	3 $\pm$ 4	13 $\pm$ 7	19 $\pm$ 10	4.3 $\pm$ 2.1
	1	50 $\pm$ 10	67 $\pm$ 10	38 $\pm$ 10***	12 $\pm$ 4***	0.8 $\pm$ 1.3	13 $\pm$ 7	18 $\pm$ 6*	12 $\pm$ 4***
	10	48 $\pm$ 11	65 $\pm$ 10	34 $\pm$ 12***	13 $\pm$ 5***	3.1 $\pm$ 2.2	13 $\pm$ 7	24 $\pm$ 8*	12 $\pm$ 5***
ISCN	0	56 $\pm$ 6	71 $\pm$ 14	60 $\pm$ 11	35 $\pm$ 14	7 $\pm$ 10	4 $\pm$ 4	57 $\pm$ 13	35 $\pm$ 14
	1	56 $\pm$ 7	72 $\pm$ 20	81 $\pm$ 11***	51 $\pm$ 7***	2 $\pm$ 4	3 $\pm$ 3	75 $\pm$ 19**	50 $\pm$ 8**
	10	55 $\pm$ 10	71 $\pm$ 11	77 $\pm$ 5***	72 $\pm$ 13***	8 $\pm$ 8	4 $\pm$ 3	73 $\pm$ 8***	72 $\pm$ 14***
ISN	0	52 $\pm$ 9	66 $\pm$ 15	32 $\pm$ 8	28 $\pm$ 11	1.5 $\pm$ 2.3	9 $\pm$ 8	30 $\pm$ 11	28 $\pm$ 11
	1	47 $\pm$ 18	61 $\pm$ 15	63 $\pm$ 18***	46 $\pm$ 9***	1.1 $\pm$ 2.0	6 $\pm$ 6	56 $\pm$ 28**	46 $\pm$ 9***
	10	46 $\pm$ 18	63 $\pm$ 10	74 $\pm$ 18***	56 $\pm$ 12***	1.1 $\pm$ 2.3	6 $\pm$ 3	67 $\pm$ 27***	56 $\pm$ 12***

培养系统(NSN)中,吡喹酮 1  $\mu\text{g/ml}$  组的无细胞附着与附着++细胞的童虫%与对照组相仿,而 10  $\mu\text{g/ml}$  组的则较对照组的分别明显减少和增加。在含免疫血清、补体和中性白细胞系统(ISCN)中,童虫经吡喹酮作用 48 h 的结果与上述 NSCN 的相似。在无补体的 ISN 中,童虫经吡喹酮作用后,无细胞附着的童虫%明显降低;吡喹酮 1  $\mu\text{g/ml}$  组的附着+细胞

的童虫%较对照组的显著为高,而 10  $\mu\text{g/ml}$  组的则与对照组的相仿。同时附着++细胞的童虫%亦与对照组的无明显差别(表 1)。

在 NSCN 和 NSN 中,3-h 童虫经吡喹酮 1 及 10  $\mu\text{g/ml}$  作用 48 h 后,童虫的死亡率较对照组的明显增加,但在 NSN 中,吡喹酮 10  $\mu\text{g/ml}$  组的童虫死亡率较 NSCN 相应组的明显降低。3-h 童虫在 ISCN 和 ISN 中培养 48 h 后有

较高的死亡率,经吡喹酮作用后,童虫的死亡率明显增加。此外,NSCN和NSN与ISCN和ISN相比较时,含免疫血清各组童虫的死亡率均较正常血清相应组的显著为高(表2)。

在NSCN中经吡喹酮作用后,有细胞附着的3-h童虫死亡率较对照组的明显增加,在NSN中的则否。在ISCN和ISN中,吡喹酮组的有细胞附着的童虫死亡率均较对照组的明显增加。此外,在上述各系统中,无细胞附着的童虫死亡率,除少数外,一般均低于10%(表2)。

2. 24-h童虫 24-h童虫在NSCN中经吡喹酮作用48h后,10 $\mu$ g/ml组的无细胞附着和附着++细胞的童虫%分别较对照组的明显减少和增加,而1 $\mu$ g/ml组仅附着++细胞的童虫%有明显增加。在NSN中经吡喹酮作用后,无细胞附着的童虫%与对照组的相仿,而附着++细胞的童虫%则明显增加,但增加的幅度甚小。在ISCN中经吡喹酮作用后,无细胞附着和附着++细胞的童虫%分别较对照组的明显减少和增加。在ISN中,吡喹酮组的无细胞附着的童虫%明显减少,但附着++细胞的

童虫%未见明显增加。此外,NSCN和NSN与ISCN和ISN相比较时,前二者无细胞附着的童虫%均较后两者的显著为高(表1)。

24-h童虫在NSCN和NSN中经吡喹酮作用后,其死亡率较对照组的明显增加,但增加的幅度较小。在ISCN和ISN中,吡喹酮组的童虫死亡率均较相应对照组的为高(表2)。在NSCN和NSN中,24-h童虫经吡喹酮作用后,有细胞附着的童虫死亡率明显增加,但增加的幅度小。用ISCN和ISN试验的结果相仿,但童虫死亡率增加的幅度较大,且均较NSCN和NSN的相应组显著为高。在上述4种培养系统中,除个别组外,无细胞附着的童虫皆为活虫(表2)。

3. 72-h童虫 在NSCN和NSN中,72-h童虫经吡喹酮作用48h后,仅NSN的2组的无细胞附着的童虫%较对照组的明显减少,但减少的幅度甚小。经吡喹酮作用后,ISCN和ISN各组的无细胞附着的童虫%均较相应对照组的明显减少,但ISN各组减少的幅度小,在上述4种培养系统中,72-h童虫经吡喹酮作用后,无或仅有1.8%的童虫附着++细胞,

Tab 3. Attachment of neutrophils on 3-h old schistosomula and mortality of the worm, previously harbored in mice 1 h after an intragastric dosage of praziquantel, in various culture systems for 48 h.  $\bar{x} \pm SD$ , n = 9 - 10; \*p > 0.05, \*\*p < 0.05, \*\*\*p < 0.01 vs corresponding control group.

Culture system	Praziquantel (mg/kg)	Average worm number	Degree of attachment of neutrophils on schistosomula surface (%)			Mortality of worm (%)
			-	+	++	
NSCN	0	35 ± 11	64 ± 14	14 ± 8	22 ± 9	32 ± 12
	200	56 ± 25	69 ± 9*	14 ± 6*	17 ± 8*	26 ± 10*
	600	38 ± 13	38 ± 4***	13 ± 6*	49 ± 4***	47 ± 12**
NSN	0	30 ± 12	66 ± 9	16 ± 10	19 ± 7	30 ± 8
	200	41 ± 26	77 ± 7***	18 ± 10*	5.1 ± 2.8***	10 ± 5***
	600	26 ± 9	48 ± 18**	24 ± 9*	28 ± 13*	27 ± 13*
ISCN	0	38 ± 12	49 ± 14	18 ± 7	33 ± 12	46 ± 14
	200	69 ± 20	55 ± 11*	17.2 ± 2.4*	28 ± 10*	42 ± 12*
	600	45 ± 14	28 ± 10***	13 ± 6*	59 ± 8***	65 ± 11***
ISN	0	21 ± 8	65 ± 9	23 ± 12	12 ± 6	33 ± 7
	200	47 ± 11	68 ± 9*	29 ± 10*	3 ± 3***	28 ± 10*
	600	27 ± 9	48 ± 15***	37 ± 14*	19 ± 14*	40 ± 13*

但 ISCN 的吡喹酮组附着 + 细胞的童虫 % 较对照组的明显增加(表 1)。

在 NSCN 和 NSN 中, 对照组的童虫死亡率为  $0.1 \pm 0.3 - 0.3 \pm 0.9\%$  ( $n = 10$ ), 吡喹酮 1 及  $10 \mu\text{g/ml}$  组的则分别为  $0.5 \pm 0.1 - 2 \pm 4$  ( $n = 10$ ) 和  $0 - 0.4 \pm 0.8\%$  ( $n = 10$ )。在 ISCN 和 ISN 中, 对照组的童虫死亡率为 0 ( $n = 7 - 13$ ), 吡喹酮 1 及  $10 \mu\text{g/ml}$  组的则分别为  $4.0 \pm 2.3 - 5.5 \pm 1.9$  ( $n = 10$ ) 和  $1.1 \pm 1.6 - 1.5 \pm 2.4\%$  ( $n = 10$ )。

### 体内试验

感染血吸虫尾蚴达 3 h 的小鼠 1 次 ig 吡喹酮 200 或 600 mg/kg, 1 h 后取童虫观察。结果, 在 NSCN 和 NSN 中, 吡喹酮 600 mg/kg 组的无细胞附着和附着 + + 细胞的童虫 % 分别较对照组的明显减少和增加, 而 200 mg/kg 的则与对照组的无明显差别, ISCN 观察的结果与 NSCN 的相仿; 在 ISN 中, 600 mg/kg 组的无细胞附着的童虫 % 亦较对照组的明显为低, 但附着 + 和 + + 细胞的童虫 % 无明显增加(表 3)。

在 NSCN 中, 吡喹酮 600 mg/kg 组的童虫死亡率较对照组的显著为高, 而 200 mg/kg 组的则与对照组相仿, 在 NSN 中 2 组吡喹酮的童虫死亡率均与对照组的相似。用 ISCN 和 ISN 观察时, 结果与上述相仿(表 3)。

### 讨 论

前文<sup>(7)</sup>指出, 吡喹酮具有增强感染血吸虫尾蚴的小鼠的非特异性免疫功能, 并认为这种非特异性免疫功能的增强可能参与吡喹酮的杀童虫过程。本文观察的结果表明, 在含正常血清的 NSCN 和免疫血清的 ISCN 中, 吡喹酮可促使中性白细胞对 3-h 童虫的附着和童虫死亡率的增加, 但在相同条件下, 白细胞附着 24 h 童虫的百分比和童虫的死亡率均低于 3-h 童虫组的, 而 72-h 童虫组的则更低。说明不同虫

龄的童虫对所用的免疫系统的反应有明显的不同。

由于在无补体的 NSN 中, 对照的 3-h 和 24-h 童虫, 或经吡喹酮作用的童虫, 其附着 + + 细胞的童虫百分比和童虫死亡率, 均较含补体的 NSCN 相应组显著为低, 提示在 NSCN 中, 除吡喹酮的作用因素外, 补体可能起重要作用。另一方面, 在 ISCN 中, 3-h 童虫和 24-h 童虫各组的附着 + + 细胞的童虫百分比和童虫死亡率均较 NSCN 各相应组的为高。在无补体的 ISN 中, 虽然细胞附着童虫的百分比与 NSCN 各相应组的相仿, 而童虫的死亡率则高于 NSCN 各相应组的, 但与 ISCN 相比时, 除个别组外, 各相应组间的差别不明显, 表明在含免疫血清的 ISCN 中, 起主要作用的是特异性抗体, 而吡喹酮可加强此种作用。

### 参 考 文 献

- 1 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. 中国药理学报 1985; 6: 186
- 2 肖树华、杨元清、杨惠中、张超威. 吡喹酮对侵入小鼠皮肤内的日本血吸虫童虫的作用. 寄生虫学与寄生虫病杂志 1988; 6: 待发表
- 3 肖树华、乐文菊、梅静艳. 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其一些体表特性的观察. 中国药理学报 1987; 8: 261
- 4 肖树华、吴公贵、薛海筹、郭惠芳、宋光承、裘丽姝. 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. 同上 1987; 8: 60
- 5 Clegg JA, Smithers SR. Death of schistosome cercariae during penetration of the skin II. Penetration of mammalian skin by *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 1968; 58: 111
- 6 Lewis FA, Colley DG. Modification of the lung recovery for schistosomula and correlation with worm burdens in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol* 1977; 63: 413
- 7 肖树华、郭惠芳、薛海筹、裘丽姝、张荣泉. 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. 中国药理学报 1986; 7: 165

*Acta Pharmacologica Sinica* 1987 Nov; 8 (6) : 547-551

## Effects of praziquantel *in vitro* on adherence of neutrophils to schistosomula and killing of the worms

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

(*Institute of Parasitic Diseases, Chinese Academy of Preventive Medicine<sup>1</sup>, Shanghai 200025*)

**ABSTRACT** When 3-h old schistosomula maintained in a culture system containing normal serum, complement and neutrophils (NSCN) were exposed to praziquantel, numerous neutrophils attached to the worm surface and part of the worms were killed. Less or much less effects of praziquantel on 24- and 72-h old schistosomula maintained in NSCN were observed. The same is true when normal serum in NSCN was replaced by immune serum (ISCN). Preliminary results suggest that in NSCN, complement

may play an essential role, while in ISCN the most important element which exhibited a major role may be ascribed to specific antibody.

**KEY WORDS** *Schistosoma japonicum* schistosomula; praziquantel; neutrophils; normal serum; immune serum; complement

<sup>1</sup>WHO Collaborating Center for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis