

抗血吸虫药物与日本血吸虫雄虫体表乙酰胆碱酯酶¹

王根法、郑洪、黄左钱 (中国预防医学科学院寄生虫病研究所², 上海 200025)

提要 为观察药物对日本血吸虫体表 AChE 及 Na⁺、K⁺ 的影响, 将 40 条♂虫分别与敌百虫、硫胺素、尼立达唑及呋喃烯唑作用 1 h 后, 用 Triton 制备虫体表, 并用比色法测定 AChE 及火焰光度法测定 Na⁺ 及 K⁺。敌百虫、硫胺素分别抑制酶活力 90% 和 50%。这两个药物都可增加虫体表内 Na⁺, 仅敌百虫提高 K⁺ 约 30%。尼立达唑、呋喃烯唑都无此作用。

关键词 敌百虫; 硫胺素; 尼立达唑; 呋喃烯唑; 5-乙酰氨基-3-[2-(5-硝基-2-呋喃)乙烯]-1,2,4-噁二唑; 日本血吸虫体表; 乙酰胆碱酯酶; 钠离子; 钾离子

血吸虫的乙酰胆碱酯酶 (AChE) 受药物作用时被认为是虫的口腹吸盘肌肉麻痹不能吸附于宿主血管壁而被动移入肝内⁽¹⁾。若血吸虫的 AChE 具有别的功能时则有助于阐明抗血吸虫药物的作用机理。乙酰胆碱 (ACh) 可改变神经细胞膜对离子的通透性。为了解虫的 AChE 是否与离子转运也有联系, 本文观察了敌百虫、硫胺素、尼立达唑及呋喃烯唑对血吸虫体表 AChE 和 Na⁺, K⁺ 的影响。

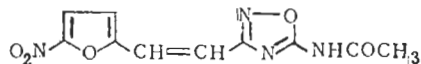
1985年8月23日收稿 1986年4月8日修回

¹ 本项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部分支持

² 世界卫生组织疟疾、血吸虫病、丝虫病合作中心

材料与 方法

酶反应底物为乙酰硫代胆碱, 二硫双硝基苯甲酸 (DTNB) 为 Sigma 厂产品。敌百虫由上海医药工业研究院供应。尼立达唑为 CIBA 药厂产品。呋喃烯唑 (fuvinazole), 化学名为 5-乙酰氨基-3-[2-(5-硝基-2-呋喃)乙烯]-1,2,4-噁二唑, 为我所胡玉琴合成的抗血吸虫药。



Fuvinazole

从感染兔中取出虫龄为 31-36 d 的成对血吸虫, 分离虫, 用 Triton 法⁽²⁾分离出♂虫体表作为实验样品。

♂虫由于含有药物的 37℃ Bueding 液中培育 1 h 后用 250 mmol/L 等渗蔗糖液洗 3 次以除去药液与培养液, 将实验用♂虫加入含 0.2% Triton X-100 pH 为 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液 1 ml, 在 Vortex 上振荡 20 s, 分离出的体表, 与 1.5 mmol/L 底物反应, 用比色法⁽³⁾测定虫体表的 AChE 活力 (μmol/h)/mg 蛋白, 并照文献⁽⁴⁾测定蛋白质。

血吸虫于 37℃ 含有药物的 Bueding 液中培育后用 Triton 法分离体表, 在 4500×g 离心 15 min, 取出上清液, 用火焰光度计测定其中 Na⁺, K⁺ 含量, 同时以未经药物作用过的血吸虫体表为对照。

结 果

血吸虫体表 AChE 活力 40 条 ♂ 虫体表与乙酰硫代胆碱反应在 30 至 90 min 内呈直线关系。反应液内加入 4 mmol/L MgCl₂ 或 7.2 CaCl₂ 以及不加离子与 ♂ 虫体表作用, 测得 AChE 活力分别为 26.3, 60.3 及 23.7 (μmol/h)/mg 蛋白。Mg²⁺ 并不影响 ♂ 虫体表 AChE 而 Ca²⁺ 则能提高酶活力, 高于对照约 2.5 倍。

当反应液内含有 7.2 mmol/L Ca²⁺ 时, 可使敌百虫完全抑制的血吸虫体表 AChE 保存 6.3 (μmol/h)/mg 蛋白的酶活力, 约占对照组的 25%。但去体表虫匀浆的 AChE 活力并不受 Ca²⁺ 的影响而增高。

抗血吸虫药物对血吸虫 ♂ 虫体表 AChE 的影响 40 条血吸虫 ♂ 虫在含有 30 μmol/L 敌百虫的 Bueding 液内培育 1 h 后, 未测得虫体表的 AChE 活力。

血吸虫 ♂ 虫与敌百虫培育 1 h 后不经脱膜, 直接与反应基质作用测得 AChE 活力为 12.9 (μmol/h)/mg 蛋白, 而未经敌百虫作用的对照组虫的酶活力则为 33.5 (μmol/h)/mg 蛋白。

从口服敌百虫 200 mg/kg 后 24 h 的感染兔中, 取出的血吸虫体表 AChE 活力比对照组的低 35%。

血吸虫 ♂ 虫与 0.16 mmol/L 硫胺素作用 1 h 后虫体表的 AChE 活力为 8.4 (μmol/h)/mg 蛋白, 而对照组的为 16.8 (μmol/h)/mg 蛋白。

20 μmol/L 尼立达唑及 16 μmol/L 咪喃烯唑与血吸虫作用后, 虫体表 AChE 活力分别为 16.3 及 14.9 (μmol/h)/mg 蛋白, 与对照组 16.8 及 17.0 (μmol/h)/mg 蛋白相比较, 无显著差异。

Tab 1. Na⁺ and K⁺ contents (mmol/L) of the tegument of *Schistosoma japonicum* exposed to drugs *in vitro*. $\bar{x} \pm SD$. * $p > 0.05$, *** $p < 0.01$ as compared with control. Number of samples in the parentheses.

	Na ⁺	K ⁺
Control	0.48 ± 0.13 (13)	0.12 ± 0.03 (13)
Trichlorfon	0.77 ± 0.30*** (10)	0.17 ± 0.04*** (10)
Thiamine	0.79 ± 0.19*** (7)	0.12 ± 0.02* (7)
Niridazole	0.50 ± 0.14* (8)	0.12 ± 0.04* (9)
Furvinazole	0.51 ± 0.18* (12)	0.12 ± 0.02* (12)

抗血吸虫药物对虫 Na⁺ 和 K⁺ 的影响 敌百虫作用过的血吸虫体表内 Na⁺ 含量为 0.77 mmol/L, 比对照组虫的含量高, 同时敌百虫也能增加虫体表内 K⁺。硫胺素虽能增加虫体表内 Na⁺ 但并不改变虫体表内 K⁺ 含量, 见表 1。尼立达唑和咪喃烯唑则既不增加虫体表内 Na⁺ 也不改变虫体表 K⁺ 的含量。

血吸虫释放 AChE 的试验 40 条 ♂ 虫在 Bueding 液内培育 1 h 可在培养液内测到 AChE, 其活力以每 40 条 ♂ 虫计算为 19.6 μmol/h。若每 15 min 调换一次血吸虫的培养液, 连续 3 次分别测出其中 AChE 的活力为 15.6, 15.1 及 16.4 μmol/h。

敌百虫作用血吸虫 30 min, 在培养液内的 AChE 活力与对照组相比由 19 μmol 减至 1.0 μmol, 此时将虫放于无药的培养液内 30 min 其 AChE 活力增加至 3.6 μmol。尼立达唑并不改变培养液内 AChE 活力。

讨 论

敌百虫治疗日本血吸虫有一定的疗效且能抑制血吸虫的 AChE, 而对血吸虫无治疗作用的硫胺素也具有抑制血吸虫体表的 AChE 活力。相反, 尼立达唑、咪喃烯唑有杀虫作用而不抑制此酶, 可见 AChE 可能并不是虫致命的关键酶。

ACh 可影响哺乳动物神经细胞膜的通透性, 在血吸虫这方面的研究未见报道, 本实验表明敌百虫可使血吸虫体表内 Na⁺ 含量明显升高, 抑制 AChE 活力的硫胺素也产生相同的

参 考 文 献

现象。而尼立达唑与呋喃烯唑既 不抑制 AChE 也不改变体表内 Na^+ 含量, 这些结果显示了血吸虫的 AChE 活力减少与血吸虫体表 Na^+ 含量之间可能有着联系, 但尚需进一步研究。敌百虫除能增加虫体表内 Na^+ 含量外尚可见到虫体表内 K^+ 含量也高于对照组, 这结果与黄左钺等⁽⁵⁾的报道相似。但与 AChE 活力间未发现有一致性联系。

敌百虫和 Ca^{2+} 合用时可以使虫体表保存部分 AChE 活力, 这一结果使人想到利用 Ca^{2+} 以减低或缓解敌百虫引起抑制 AChE 的副作用, 但 Ca^{2+} 对小鼠血浆 AChE 活力并无加强作用。

线虫在培养液内可释放 AChE⁽⁶⁾, 然尚未见血吸虫释放此酶的报道。本实验表明血吸虫有规则持续地释放 AChE, 此释放出的 AChE 在宿主体内也可能成为一种抗原性物质。

Acta Pharmacologica Sinica 1986 Nov, 7 (6) : 567-569

Schistosomicides and acetylcholinesterase in the tegument of male *Schistosoma japonicum*¹

WANG Gen-fa, ZHENG Hong, HUANG Zuo-yue

(Inst Parasitic Diseases, Chinese Academy of Preventive Medicine, Shanghai 200025)

ABSTRACT To observe the influence of some drugs on the AChE and Na^+ , K^+ in the tegument of *Schistosoma japonicum*, we incubated 40 ♂ at 37°C for 1 h in the Bueding medium containing 30 $\mu\text{mol/L}$ trichlorfon, 0.16 mmol/L thiamine, 20 $\mu\text{mol/L}$ niridazole and 16 $\mu\text{mol/L}$ fuviazole (5-acetylamide-3-[2-(5-nitro-2-furyl)vinyl]1,2,4-oxadiazole, synthesized by HU Yu-qin of our Institute). The worm tegument was then prepared by Triton method. The activity of AChE was determined by colorimetric method and the concentrations of Na^+ and K^+ were determined by flame photometry. Trichlorfon and thiamine inhibited respectively 90% and 50% activity of AChE in the worm tegument. These 2 drugs increased Na^+ contents of the worm

- 1 Saz HJ, Bueding E. Relationships between anthelmintic effects and biochemical and physiological mechanisms. *Pharmacol Rev* 1966; 18 : 871
- 2 Oaks JA, Cain CD, Mower DA, Raj RK. Disruption and removal of the tegument from *Schistosoma mansoni* with Triton X-100. *J Parasitol* 1981; 67 : 761
- 3 Ellman GL, Courtney KD, Audres V Jr, Featherstone RM. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7 : 88
- 4 Mather IH, Tamplin CB. A method for the determination of protein in the presence of Triton X-100. *Anal Biochem* 1979; 93 : 139
- 5 黄左钺、陈国忠、郑洪、周依燕. 几种抗血吸虫药物对日本血吸虫雄虫体表液内 K^+ , Na^+ , H^+ 转递的影响. *生物物理学报* 1985; 1 : 167
- 6 Yeates RA. Lipases and esterases. In: Barrett J, ed. *Biochemistry of parasitic helminths*. London: Macmillan, 1981 : 152-3

tegument. The K^+ in the worm tegument treated with trichlorfon was about 30% higher than that of the control group. The AChE, Na^+ and K^+ of worm tegument were not affected by niridazole and fuviazole. Ca^{2+} increased the activity of tegumental AChE. The inhibitory effect of trichlorfon on the worm AChE was decreased in the presence of Ca^{2+} . Forty ♂ released 19.6($\mu\text{mol/h}$)/mg protein into the medium during incubation.

KEY WORDS trichlorfon; thiamine; niridazole; fuviazole; (5-acetylamide-3-[2-(5-nitro-2-furyl)vinyl]1,2,4-oxadiazole); acetylcholinesterase; Na^+ ; K^+ ; *Schistosoma japonicum* tegument

¹ Partial financial support was received from UNDP/World Bank/WHO TDR