

内药物聚积增加, 细胞毒性增强⁽⁵⁻⁷⁾. 我们的初步实验也证明 Ver 与 Har 合用时 Ver 可以使^[3H]Har 在 HL-60 细胞内滞留增加(未发表材料). Ver 增强 Har 对 HL-60 细胞的毒性是否也是通过抑制细胞内药物的外排, 增加药物聚积来实现的, 尚待证实.

REFERENCES

1 Cooperation Study Group of Harringtonine. Preliminary clinical evaluation of harringtonines therapy on acute leukemia. *Zhonghua Yixue Zazhi* 1975; 10 : 712-5.

2 Zhang YJ, Yu H, Luo XY, Zheng YX, Li WJ, Lui XL *et al.* Toxicological studies of harringtonine and homoharringtonine. *Acta Pharm Sin* 1979; 14 : 135-40.

3 Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y. Potentiation of vincristine and adriamycin effects in human hemopoietic tumor cell lines by calcium antagonists

and calmodulin inhibitors. *Cancer Res* 1983; 43 : 2267-72.

4 He NG, Zhang HQ, Wang RH, Yang XL, Xue SB. Enhancement of antitumor activity of bleomycin A5 in mouse sarcoma 180 cells *in vitro* and *in vivo* by verapamil. *Acta Pharmacol Sin* 1990; 11 : 381-4.

5 Riordan JR, Ling V. Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of Chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine permeability. *J Biol Chem* 1979; 254 : 12701-5.

6 Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia *in vivo* and *in vitro* through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res* 1981; 41 : 1967-72.

7 Chatterjee M, Robson CN, Harris AL. Reversal of multidrug resistance by verapamil and modulation by α_1 -acid glycoprotein in wild-type and multidrug-resistant Chinese hamster ovary cell lines. *Cancer Res* 1990; 50 : 2818-22

BIBLID: ISSN 0253-9756 中国药理学报 Acta Pharmacologica Sinica 1992 Sep; 13 (5) : 473-477

(27) 473-477

甲苯达唑对细粒棘球蚴囊摄入葡萄糖的影响¹

甲苯达唑, 葡萄糖
细粒棘球蚴幼囊

肖树华, 尤纪青, 郭惠芳, 冯建军, 孙惠良, 焦佩英, 姚民一, 柴君杰²

(中国预防医学科学院寄生虫病研究所, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 上海 200025, 中国)

Effect of mebendazole on glucose uptake of *Echinococcus granulosus* cysts¹

XIAO Shu-Hua, YOU Ji-Qing, GUO Hui-Fang, FENG Jian-Jun, SUN Hui-Liang, JIAO Pei-Ying, YAO Min-Yi, CHAI Jun-Jie²
(Institute of Parasitic Diseases, Chinese Academy of Preventive Medicine; WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariases, Shanghai 200025, China)

ABSTRACT Mice infected with secondary cysts of

Echinococcus granulosus were treated ig with mebendazole (Meb) 25 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ for 7-14 d. At 24 h after the last dose the endocysts in the treated mice were removed out for *in vitro* cultivation and exposed to [U-¹⁴C]glucose 11.1 kBq · ml⁻¹ for 2 min, no apparent difference in radioactivity content in the cyst walls between the treated and control groups was observed.

When [U-¹⁴C]glucose was given iv to the infected mice 24 h after they had been treated ig with Meb 25 mg · kg⁻¹ or 50 mg · kg⁻¹ daily for 14 d, the radioactivity content in the cyst wall and cyst fluid decreased significantly as compared to the corresponding control group. Nevertheless, no apparent change in the incorporation of radioactivity into the endogenous glycogen of the parasites was observed, although the glycogen in the cyst wall decreased markedly.

Received 1991-08-23 Accepted 1992-04-14

¹ Project supported by the National Natural Science Foundation of China, No 39070759.

² Xinjiang Institute for Endemic Disease Control and Research, Urumqi 830002, China.

KEY WORDS *Echinococcus*; glucose; glycogen; mebendazole; carbon radioisotopes

摘要 感染细粒棘球蚴的小鼠, 于 ig 甲苯达唑(Meb) $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 14 \text{ d}$ 后 24 h 取囊, 用含 $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ 葡萄糖的培养液培养, 未见囊壁的放射性含量有明显变化。感染小鼠于 ig Meb $25-50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 14 \text{ d}$ 后 24 h iv $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ 葡萄糖, 囊壁和囊液的 ^{14}C 含量明显减少, 糖原含量亦减少, 但 ^{14}C 掺入囊壁糖原的量无明显变化。

关键词 棘球属; 葡萄糖; 糖原; 甲苯达唑; 碳放射性同位素

前文报道苯并达唑类的甲苯达唑(Meb)和阿苯达唑及其有效代谢物阿苯达唑亚砷, 对小鼠的继发性细粒棘球蚴的糖原含量有明显影响, 且以 Meb 的作用较强^[1,2]。本文系观察 Meb 对小鼠继发性细粒棘球蚴摄入葡萄糖及其掺入虫体糖原的影响。

MATERIALS AND METHODS

药物 Meb 系上海医药工业研究院合成, 赠给, 临用前用 5% 淀粉液将 Meb 配制成混悬液, 浓度为 2.5 或 $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。D- $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ 葡萄糖 ($[\text{U}-^{14}\text{C}]$ Glu) 由中国医学科学院放射医学研究所标记合成, 放射性活度为 $2.8 \text{ GBq} \cdot \text{mol}^{-1}$, 放化纯 98%。α-甲基葡萄糖苷和根皮苷(phloridzin)分别为上海试剂二厂和意大利 Carl Roth 产品。

虫源 用无菌法自新疆自然感染的绵羊细粒棘球蚴囊中采集含原头节的囊液, 加入青霉素、链霉素各 $500 \text{ IU} \cdot \text{ml}^{-1}$ 和两性霉素 B $0.25 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 后, 置 4°C 保存, 在 7-10 d 内用以接种, 接种前先吸去囊液, 用含上述浓度抗菌素的亨氏盐平衡溶液(Hank's balanced salt solution, HBSS)将原头节洗涤 5-8 次, 当活原头节占 95% 以上时即可用以接种, 每鼠由腹腔注入原头节 2000 只。

^{14}C 放射性的测定 ^{14}C 放射性强度的测定用 Beckman LS-7500 型液体闪烁计数仪, 体外试验的囊液和囊组织的 70% 乙醇提取液于加入闪烁液后直接测定^[3]。体内试验的血液及囊组织则先按常规消

化^[4], 然后加入闪烁液计数。

体外摄入 ^{14}C 小鼠于感染后 12-14 个月, 以 5-7 只小鼠为一组, ig Meb $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 连给 7 及 14 d, 停药次日, 用摘除眼球放血法处死小鼠, 迅速剖开腹腔, 仔细剥取完整的不含外囊组织的细粒棘球蚴内囊, 直径为 3-8 mm, 放置在冰冷的 HBSS 中, 试验时取囊 1 只, 放置在盛有含葡萄糖 $0.2-5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HBSS 1.99 ml 试管中, 在 37°C 水浴中预温 10-30 min, 然后加入 $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ Glu $10 \mu\text{l}$, 终浓度为 $11.1 \text{ kBq} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。培养 2 min 后, 迅速吸去培养液, 用冰冷的 HBSS 将囊洗涤 3 次, 每次约 10 ml, 然后将囊剪破, 用滤纸吸干囊液后称重, 并放置在盛有 70% 乙醇 1 ml 的试管中提取过夜, 次日吸取 70% 乙醇提取液 0.8 ml 测定 ^{14}C 含量^[3]。在少数试验中, 先称取完整囊的湿重, 然后吸取囊液, 经用滤纸吸干后称取囊壁重, 囊壁的 ^{14}C 的测定同上述, 囊液吸取 $20 \mu\text{l}$ 测定 ^{14}C 含量, 每次每组用囊 3 只, 并取未经治疗的同批感染小鼠的囊作为对照, 每组试验重复 2-3 次。

体内摄入 ^{14}C 小鼠于感染 10-12 个月后分组 ig Meb 25 或 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 连给 3-14 d, 停药次日, 自小鼠的尾静脉 iv $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ Glu $185 \text{ kBq} / \text{鼠}$, 并于注射后 0.25, 1 及 4 h 用摘除眼球法取血, 肝素抗凝, 吸取 $10 \mu\text{l}$ 3 份, 消化后测定 ^{14}C 含量, 与此同时剖取细粒棘球蚴内囊, 先吸取囊液 $10-20 \mu\text{l}$ 作 ^{14}C 含量测定, 然后用生理盐水将囊壁洗涤 2 次, 经滤纸吸干后称重消化, 测定 ^{14}C 含量, 另取未经 Meb 治疗的同批感染小鼠, 自尾静脉 iv $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ Glu 后, 取内囊作对照。

^{14}C 掺入虫体糖原的测定 上述治疗小鼠于尾静脉 iv $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ Glu 后 1 及 4 h, 剖取细粒棘球蚴囊, 经吸取囊液和滤纸吸干后称重, 然后加入 30% KOH 1 ml, 在沸水浴中将囊组织消化, 再加入 95% 乙醇 2 ml, 混匀后置 4°C 冰箱过夜, 次日离心 ($1000 \times g$, 30 min), 吸取上清液备用, 沉淀的糖原用重蒸馏水 1 ml 溶解, 取上清液及糖原液各 0.2 ml, 于加入闪烁液后测定 ^{14}C 含量, 然后计算糖原液的 dpm 在糖原液的 dpm + 上清液的 dpm 总和中所占%, 即为 ^{14}C 掺入囊壁糖原的量, 另取上述糖原液 0.5 ml, 用蒽酮试剂法

测定糖原含量⁽⁵⁾。在各次试验中均用未经 Meb 治疗的同批小鼠的囊作对照。

RESULTS

体外摄入¹⁴C 细粒棘球蚴囊在含不同浓度葡萄糖的 HBSS 中培养时, 未见囊壁的¹⁴C 含量随培养液中葡萄糖浓度的增高而递增, 各组间的¹⁴C 含量差别均不显著(Tab 1)。囊壁与囊液中的¹⁴C 含量测定表明, 当上述囊培养 2 min 后, 囊液的¹⁴C 含量仅为相应囊壁的 1.8-3.2% (Tab 1)。在上述 HBSS 中加入根皮苷 0.5 mmol · L⁻¹, 然后将囊置入, 在 37℃ 中培养 30 min, 再加入上述[U-¹⁴C]Glu, 观察培养 2 min 后的囊壁¹⁴C 含量, 结果未见根皮苷对细粒棘球蚴囊摄入¹⁴C 有明显影响(Tab 2)。按上述方法用 α-甲基葡萄糖 0.5 mmol · L⁻¹ 时, 结果与根皮苷组的相仿。

Tab 1. Radioactivity in *Echinococcus granulosus* cyst maintained in HBSS containing glucose and [U-¹⁴C] glucose (11.1 kBq · ml⁻¹) for 2 min. $\bar{x} \pm s$, * $P > 0.05$ vs glucose 5 mmol · L⁻¹ group.

Glucose / mmol · L ⁻¹	Cyst	10 ⁻³ × Radioactivity / dpm · g ⁻¹	
		Cyst wall	Cyst fluid
0.2	15	170 ± 105*	not done
0.5	14	159 ± 124*	not done
1	13	163 ± 73*	not done
2	15	162 ± 73*	no done
3	14	174 ± 100*	not done
4	14	158 ± 63*	not done
5	13	184 ± 27*	not done
1	7	144 ± 34*	2.6 ± 2.5*
2	9	165 ± 72*	5.3 ± 6.3*
3	7	146 ± 31*	3.1 ± 3.3*
4	8	142 ± 58*	4.0 ± 3.3*
5	6	132 ± 19	3.0 ± 2.4

感染小鼠 ig Meb 25 mg · kg⁻¹ · d⁻¹, 连给 7-14 d 后次日, 剖取细粒棘球蚴囊作体外摄入¹⁴C 的观察, 未见其摄入的¹⁴C 含量与相应对照组的有明显差异(Tab 3)。

体内摄入¹⁴C 感染小鼠 ig Meb 25 mg

Tab 2. Effect of phloridzin on radioactivity in *Echinococcus granulosus* cysts previously maintained in HBSS containing phloridzin 0.5 mmol · L⁻¹ for 30 min before exposure to [U-¹⁴C]glucose (11.1 kBq · ml⁻¹) for 2 min. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$, * $P > 0.05$ vs corresponding control group.

Glucose / mmol · L ⁻¹	Phloridzin	10 ⁻³ × Radioactivity / dpm · g ⁻¹
1	-	178 ± 41
1	+	134 ± 77*
2	-	144 ± 16
2	+	135 ± 6*
3	-	141 ± 13
3	+	139 ± 36*
4	-	111 ± 49
4	+	104 ± 61*
5	-	138 ± 18
5	+	147 ± 12*

· kg⁻¹ · d⁻¹, 连给 14 d 后次日, 由尾静脉 iv [U-¹⁴C]Glu 185 kBq / 鼠后 0.25, 1 及 4 h, 囊壁的¹⁴C 量(以测得的囊壁[U-¹⁴C]Glu 与相应血浆的¹⁴C 含量的%表示)均明显低于相应未治疗对照组的。囊液的¹⁴C 含量在最初的 0.25 h 内与相应对照组的相仿, 1 及 4 h 后则明显低于相应对照组的(Tab 4)。Meb 的剂量增至 50 mg · kg⁻¹ · d⁻¹, 连给 3 d, 囊液的 [U-¹⁴C]Glu 与相应对照组的相仿, 但囊壁 0.25 及 1 h 组的¹⁴C 含量则明显低于相应对照组的。当疗程延长至 14 d, 结果与 25 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 组的相仿(Tab 4)。

¹⁴C 掺入虫体糖原的量 感染小鼠 ig Meb 25 mg · kg⁻¹ · d⁻¹, 连给 7 d 后次日 iv 上述剂量的[U-¹⁴C]Glu, 1 及 4 h 后, ¹⁴C 掺入囊壁糖原的量与相应对照组的相似。疗程增至 14 d, ¹⁴C 掺入囊壁糖原的量仅 1 h 组与相应对照组差别显著(Tab 5)。Meb 的剂量增至 50 mg · kg⁻¹ · d⁻¹, 连给 7 d, 未见¹⁴C 掺入囊壁糖原的量有明显变化。用同一囊测定囊壁的糖原含量, 则上述各剂量疗程组的糖原含量均明显少于各相应对照组(Tab 6)。

Tab 3. Radioactivity in *Echinococcus granulosus* cyst, previously harbored in infected mice and treated with mebendazole (Meb) 25 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ for 7-14 d, in the HBSS containing [U-¹⁴C]glucose 11.1 kBq · ml⁻¹ for 2 min. $\bar{x} \pm s$, **P* > 0.05 vs corresponding control group.

Glucose / mmol · L ⁻¹	Meb treatment 7 d	14 d	Cyst	10 ⁻³ × Radioactivity / Cyst wall
0.2	-		9	160 ± 126
0.2	+		8	182 ± 74*
0.5	-		9	180 ± 136
0.5	+		7	195 ± 102*
1	-		7	125 ± 59
1	+		9	198 ± 111*
2	-		9	140 ± 76
2	+		7	138 ± 102*
3	-		9	142 ± 108
3	+		9	164 ± 101*
4	-		7	136 ± 50
4	+		8	179 ± 38*
5	-		8	184 ± 76
5	+		8	163 ± 101*
0.2		-	9	226 ± 97
0.2		+	9	198 ± 126*
0.5		-	8	200 ± 142
0.5		+	9	183 ± 64*
1		-	8	179 ± 102
1		+	8	152 ± 87*
2		-	9	173 ± 59
2		+	9	191 ± 76*
3		-	9	178 ± 76
3		+	8	236 ± 58*
4		-	9	171 ± 72
4		+	8	214 ± 48*
5		-	8	238 ± 54
5		+	9	171 ± 64*

DISCUSSION

本文主要是观察 Meb 对细粒棘球蚴摄入葡萄糖及其掺入囊壁糖原量的影响, 由于进入宿主体内和囊壁的葡萄糖均可迅速被代谢, 因此, 我们所测得的放射性, 除糖原部份为 [U-¹⁴C]Glu 外, 其余部份尚包含有葡萄糖的代谢物。

初步试验结果表明, 细粒棘球蚴内囊在体外摄入 ¹⁴C 并不依赖于培养液中的葡萄糖浓

Tab 4. Radioactivity in *Echinococcus granulosus* cysts harbored in mice injected iv with [U-¹⁴C]glucose 185 kBq / mouse 1 d after cessation of treatment with mebendazole. Number of samples in parentheses; $\bar{x} \pm s$, **P* > 0.05, ***P* < 0.05, ****P* < 0.01 vs corresponding control group.

Mebendazole / mg · kg ⁻¹ · d ⁻¹ × d	Time after iv [U- ¹⁴ C] glucose / h	¹⁴ C in cyst wall or cyst fluid / ¹⁴ C in plasma, %	
		Cyst wall	Cyst fluid
25 × 14	0.25	19 ± 9 (34)**	3.4 ± 2.7 (29)*
	1	39 ± 13 (27)**	13 ± 8 (29)***
	4	22 ± 6 (15)***	29 ± 13 (15)***
Control	0.25	28 ± 19 (34)	4 ± 4 (26)
	1	55 ± 28 (20)	21 ± 9 (20)
	4	38 ± 9 (15)	61 ± 20 (15)
50 × 3	0.25	23 ± 12 (23)**	11 ± 6 (8)*
	1	29 ± 14 (33)**	20 ± 6 (27)*
	4	37 ± 21 (35)*	67 ± 25 (29)*
Control	0.25	32 ± 15 (22)	10 ± 6 (13)
	1	38 ± 13 (33)	22 ± 14 (25)
	4	41 ± 37 (27)	63 ± 40 (27)
50 × 14	0.25	16 ± 9 (44)***	7 ± 9 (5)*
	1	36 ± 17 (70)***	16 ± 9 (38)***
	4	39 ± 13 (30)***	76 ± 12 (3)***
Control	0.25	38 ± 19 (36)	9 ± 8 (31)
	1	62 ± 32 (33)	35 ± 17 (22)
	4	58 ± 22 (33)	103 ± 56 (18)

Tab 5. Incorporation of [U-¹⁴C]glucose into glycogen of *Echinococcus granulosus* cysts harbored in mice injected iv with [U-¹⁴C]glucose 185 kBq / mouse 1 d after cessation of treatment with mebendazole. $\bar{x} \pm s$, **P* > 0.05, ***P* < 0.05, vs corresponding control group.

Mebendazole / mg · kg ⁻¹ · d ⁻¹ × d	Time after iv [U- ¹⁴ C] glucose / h	Cysts	Incorporation of ¹⁴ C into glycogen of cyst wall, %
Control	1	71	4.9 ± 2.5
25 × 7	1	22	5.9 ± 3.1*
25 × 14	1	38	3.4 ± 2.0*
50 × 7	1	31	5.2 ± 2.5*
Control	4	54	5.3 ± 4.6
25 × 7	4	16	7.7 ± 3.4*
25 × 14	4	29	4.2 ± 2.0*
50 × 7	4	23	6.5 ± 3.9*

度, 而具有抑制生物膜主动转运葡萄糖的根皮

Tab 6. Glycogen content of *Echinococcus granulosus* cysts harbored in mice treated ig with mebendazole. $\bar{x} \pm s$, *** $P < 0.01$, vs corresponding control group.

Mebendazole / mg · kg ⁻¹ · d ⁻¹ × d	Cysts	Glycogen in cyst wall / μg · g ⁻¹	Glycogen reduction rate / %
Control	40	1022 ± 476	
25 × 7	37	738 ± 329***	37.8
Control	57	937 ± 485	
25 × 14	68	629 ± 360***	42.9
Control	37	1113 ± 581	
50 × 7	56	749 ± 277***	42.7

苷和 α-甲基葡萄糖苷, 对囊摄入 ¹⁴C 无明显影响, 提示细粒棘球蚴内囊对葡萄糖的摄入机制可能与一些绦虫的皮层有所不同⁽³⁾, 可能主要是通过简单扩散作用进入囊壁。宿主体内的细粒棘球蚴囊经 Meb 治疗后移至体外培养时, 未观察到囊对 ¹⁴C 的摄入受到明显影响, 但用体内方法试验时, 则 Meb 不仅明显抑制囊壁对 ¹⁴C 的摄入, 而且进入囊液的 ¹⁴C 亦明显减少, 与用 Meb 治疗时, 囊壁的葡萄糖含量明显减少相一致。这种体外与体内囊试验结果的差异可能与实验条件不同有关, 前者系将内囊浸没于培养液中, 而后者的内囊则系通过血循环, 经由外囊与宿主进行物质交换。同时又由于外囊与内囊间无任何血管或淋巴管的联系, 而外囊又仅在其外侧具有丰富的毛细血管⁽⁶⁾, 显然, 这些毛细血管在制约内囊与宿主的物质交换中可能起重要作用, 故其受损必将影响内囊的营养与存活, 但在抗包虫药物的研究中往往忽略了从整体角度来看待外囊所起的作用。事实上, 在用 Meb 治疗时, 我们曾观察到外囊外侧的毛细血管有广泛的扩张和炎

细胞浸润, 但这些变化在化疗中所起的作用, 则尚未被重视和研究。

经 Meb 治疗后, ¹⁴C 掺入细粒棘球蚴囊糖原的量无明显影响, 但糖原的含量则明显减少, 提示 Meb 可能并不影响糖原的合成, 只是因影响囊对葡萄糖的摄入, 耗用了虫的内源性糖原, 使囊壁的糖原含量明显减少。至于 Meb 影响囊对葡萄糖摄入的环节, 尚有待研究。

REFERENCES

- 1 Xiao SH, Yang YQ, Guo HF, Zhang CW, Jiao PY, You JQ, *et al.* Effect of mebendazole, albendazole and albendazole sulfoxide on glycogen contents of *Echinococcus granulosus* cysts in infected mice. *Acta Pharmacol Sin* 1990; 11: 546-9.
- 2 Xiao SH, You JQ, Jiao PY, Guo HF, Huang LX, Chai JJ, *et al.* Studies on the effect of mebendazole, albendazole and its metabolites in an experimental therapy of mice infected with secondary cysts of *Echinococcus granulosus*. *Endemic Dis Bull* 1990; 5 (3): 11-6.
- 3 McCracken RO, Lumsden RD. Structure and function of parasite surface membrane I. Mechanism of phloridzin inhibition of hexose transport by the cestode *Hymenolepis diminuta*. *Comp Biochem Physiol* 1975; 50 B: 153-7.
- 4 Xiao SH, Yu YG, Wang CY, Jiao PY, Yuan XJ, Liang YY. The uptake and distribution of ³H-pyquiton in *Schistosoma japonicum*. *Acta Pharm Sin* 1981; 16: 486-93.
- 5 Tao IH, Ma LJ, Lin KH, Wu K. Chemical determination of the glycogen content of *Schistosoma japonica*. *Acta Biochim Sin* 1958; 1: 218-23.
- 6 Yang YQ, Yang HZ, Chai JJ, Jiao W. Observation on the histology and histochemistry of *Echinococcus granulosus*. *Endemic Dis Bull* 1987; 2 (4): 36-9.