

## 吡喹酮对日本血吸虫尾蚴和钻入小鼠皮肤童虫超微结构的影响

肖树华、杨元清、沈炳贵、许东辉、杨惠中、梅静艳、乐文菊

(中国预防医学科学院寄生虫病研究所<sup>1</sup>, 上海 200025)

**提要** 在水中经吡喹酮 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  作用 0.5-2 h, 尾蚴皮层外糖萼明显减少或消失; 基质稀疏、模糊、多膜囊减少; 肌层肿胀、溶解及线粒体肿大、变性。4 h 后,

体内组织广泛溶解并形成空泡。在生理盐水中, 则无明显影响。感染尾蚴 3 h 后 1 次 ig 吡喹酮 600 mg/kg 后 0.5-24 h, 童虫皮层、肌层和实质组织的超微结构亦有明显变化。

1986年12月13日收稿 1987年11月12日接受

<sup>1</sup> 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心。

**关键词** 日本血吸虫尾蚴; 日本血吸虫童虫; 吡喹酮; 电子显微镜检查

前文<sup>(1)</sup>指出, 在水中日本血吸虫尾蚴与吡喹酮接触后迅速脱尾, 尾蚴体肿大而死亡, 但在生理盐水中吡喹酮对尾蚴无明显作用。另一方面, 不同发育期的血吸虫对吡喹酮敏感性的观察结果指出, 钻入小鼠皮肤的3 h童虫经吡喹酮作用后亦迅即引起虫的皮层损害、炎细胞包围和浸润<sup>(2)</sup>。本文系在以往工作基础上进一步观察吡喹酮对去氯水和生理盐水中尾蚴以及小鼠皮肤内3 h童虫作用的组织学及超微结构变化, 并初步分析、探讨吡喹酮的杀虫机理。

## 方 法

吡喹酮由本所合成, 体外试验用的吡喹酮系用聚乙二醇(PEG 400)溶解, 再用生理盐水稀释至0.1 mg/ml; 体内试验系用吡喹酮的PEG溶液, 浓度为60 mg/ml。

**血吸虫尾蚴** 由本所饲养的针螺逸出尾蚴供作试验。将尾蚴挑入盛有去氯水或生理盐水10 ml的离心管中, 然后加入吡喹酮, 终浓度为1 μg/ml。将与药物作用的尾蚴置于室温(30℃)中, 0.5-4 h后离心500 × g 3-5 min, 去上清液, 将浓集尾蚴用10%中性福尔马林固定, 按常规作切片后, 用光学显微镜观察尾蚴的形态学变化, 另一部分则用2.5%戊二醛固定, 作透射电镜观察。

**血吸虫童虫** 取18-22 g的小鼠, 每鼠自皮肤感染约500条血吸虫尾蚴, 3 h后1次ig吡喹酮600 mg/kg, 给药后不同时间解剖2只小鼠, 切取感染部位的皮肤1 × 1 mm<sup>2</sup>, 用2.5%戊二醛固定。

**透射电镜观察** 上述尾蚴和童虫在2.5%戊二醛固定2 h后, 用磷酸缓冲液(pH 7.4)清洗3次, 再用1%锇酸固定1-2 h, 然后再用磷酸缓冲液(pH 7.4)清洗3次, 经逐级酒精脱水后, 移置丙酮中, 用618树脂包埋。取上述处理标本作超薄切片, 用乙酸铀和枸橼酸铅双重染色, 并用JEM-100 B型透射电镜观察。

## 结 果

### 血吸虫尾蚴

1. 光学显微镜观察 正常尾蚴的体壁由皮层及肌层组成。皮层无细胞核, 为同质均匀的伊红着色组织。尾蚴的口腔呈漏斗状, 腔壁及食道均为肌性结构, 无胞核。肠管与食道连接, 由单层扁平上皮构成; 嗜酸性腺体呈红染, 嗜碱性腺体呈蓝染, 腺管均为肌性结构; 神经中枢位于口吸盘之后, 由许多核染色质致密的圆形细胞所组成。腹吸盘后方有一团生殖基细胞, 核较大。虫体的实质组织分布着核大小较为一致, 和染色质致密均匀的实质细胞。实质细胞的数量以体部的前及后部的1/3处较多(图1 A 见铜版图1, 以下各图同)。

尾蚴与含去氯水的吡喹酮1 μg/ml接触10 min后, 其体部及尾干的皮层即出现肿胀、模糊, 并有大小不等的空泡形成或空泡破裂(图1 B)。经药物作用30 min后, 除上述变化外, 尾叉部的皮层亦出现上述变化。药物作用1 h后, 尾蚴体表的空泡大部分融合成巨大空泡, 有的皮层完全破裂脱落而显露肌层, 少数尾蚴则崩裂死亡(图1 C)。药物作用4 h后, 尾蚴普遍变性和解体, 并出现许多结构明显破坏的尾蚴。

尾蚴经上述吡喹酮作用10 min后, 其体内部分实质细胞结构即见模糊, 作用30 min后, 变化加重, 至2 h后, 尾蚴体内的实质细胞核出现崩裂变化, 可查见许多不规则的核碎屑(图1 D)。4 h后, 尾蚴体的实质细胞大部分均有破裂的组织学损害。此外, 尾蚴经吡喹酮作用2 h后, 其肠管示有不同程度扩大, 或出现囊样结构, 同时大部分尾蚴的钻穿腺的结构模糊。

2. 透射电镜观察 日本血吸虫尾蚴的皮层低平菲薄, 皮层的基质较致密, 其内有一些多膜囊; 基质内侧为基底膜, 将皮层与肌层分隔, 并有棘自基底膜伸出皮层, 遍及整个体表; 皮层的外侧由许多糖颗粒形成的糖萼<sup>(3)</sup>

(图 2 A 见铜版图 2, 以下各图同). 合体细胞位于肌层下, 除细胞核外, 含有丰富的粗面内质网和线粒体; 尾蚴体的后部为钻腺. 此外尚查见开口于皮层的感觉乳头.

在去氯水中, 尾蚴经吡喹酮  $1 \mu\text{g/ml}$  作用  $0.5 \text{ h}$  后, 其皮层外的糖萼普遍明显减少, 或有的局部几乎完全消失; 皮层基质有的模糊、稀疏、形成空泡或部分缺失, 多膜囊普遍减少(图 2 B), 但有的局部仍可见有较多的多膜囊; 肌层肿胀、模糊或局部有自溶现象, 肌层内的线粒体部分无明显变化, 部分有轻度肿大; 实质细胞内的线粒体亦有轻度变化.  $2 \text{ h}$  后, 皮层普遍增宽, 基质稀疏、模糊, 肌层明显肿胀, 并有明显的自溶, 线粒体亦普遍肿大(图 2 C).  $4 \text{ h}$  后, 有的尾蚴体的体表崩裂、尾蚴体肿大, 内部结构广泛自溶, 此时, 皮层外的糖萼仅余残迹, 皮层结构模糊不清(图 2 D).

尾蚴在生理盐水中经吡喹酮  $1 \mu\text{g/ml}$  作用  $4 \text{ h}$  后, 除体表的糖萼明显减少或消失外, 未见其皮层、肌层和实质细胞的超微结构有任何明显变化.

### 血吸虫童虫

吡喹酮对虫龄为  $3 \text{ h}$  的血吸虫童虫作用的光学显微镜观察见前文<sup>(2)</sup>. 本文系观察经吡喹酮作用后童虫组织超微结构的变化.  $3 \text{ h}$  童虫的整个皮层亦较菲薄, 皮层胞质稍有突起, 其基质内有多膜囊、空泡和线粒体等结构, 皮层外无糖萼; 皮层内侧为基底膜, 体棘的起始部在基底膜上, 并向上伸出皮层; 基底膜下为环肌和纵肌, 肌层下的一些实质细胞内含有较多的线粒体和微管(图 2 E).

感染尾蚴  $3 \text{ h}$  的小鼠 1 次  $\text{ig}$  吡喹酮  $600 \text{ mg/kg}$  后  $0.5 \text{ h}$  其皮肤内的部分童虫的皮层下间隙, 因肿胀而消失, 或皮层基质内的多膜囊减少; 肌层有的示明显肿胀, 甚或局部溶解, 有的则无明显变化; 肌层下的实质组织细胞除线粒体有浓缩、轻度肿胀和空泡变化外, 有的出现胞质溶解(图 2 F)  $1 \text{ h}$  后, 除上述变化外, 皮层基质内的多膜囊和空泡明显减少; 肌层肿胀

明显, 肌层下的一些实质细胞的线粒体普遍示有变性.  $4 \text{ h}$  后, 大部分童虫的皮层基质模糊, 局部基质内的多膜囊几乎完全消失, 并出现较大的空泡(图 2 G), 甚或因空泡破裂, 使皮层缺损(图 2 H); 肌层的变化与  $1 \text{ h}$  组的相仿, 但线粒体变化较重, 有的内部结构模糊不清.  $24 \text{ h}$  后, 有的整个虫体内部结构不清, 实质组织内亦查见含残余体的巨大空泡, 而肌层的肿胀则更为明显.

## 讨 论

前文指出, 血吸虫尾蚴在水中对吡喹酮的敏感性至少比成虫在血清-盐平衡溶液中大 600 倍, 同时, 尾蚴经吡喹酮作用后, 最先脱尾, 继而肿大死亡<sup>(1)</sup>. 组织学的观察结果说明, 吡喹酮能迅速地损害尾蚴的皮层, 引起虫体肿大和实质细胞的广泛破坏和崩解, 而超微结构最先出现的明显变化之一是糖萼的明显减少或消失. 由于糖萼除系形成尾蚴膜反应的主要物质外, 还有使尾蚴适应水环境的作用<sup>(3)</sup>; 同时又由于血吸虫尾蚴经吡喹酮脱尾后移置等渗的盐平衡液-血清中培养时, 虫体不仅存活, 且可转变为童虫<sup>(4)</sup>, 故推测吡喹酮破坏尾蚴的糖萼, 使尾蚴不能适应非等渗的水环境, 并导致含有药物的水渗入虫体而引起皮层、肌肉和实质组织细胞的广泛肿胀、破坏和溶解, 这可能是经吡喹酮作用后尾蚴迅速死亡的主要原因.

血吸虫尾蚴钻入宿主皮肤后, 其皮层结构和生理特性均发生明显变化<sup>(5,6)</sup>, 并已具备童虫的特征<sup>(3)</sup>. 体内试验结果表明, 吡喹酮仅对此期童虫有明显的杀灭作用<sup>(7)</sup>. 组织学观察发现, 吡喹酮可损害  $3 \text{ h}$  童虫的皮层, 形成空泡变化和肿胀<sup>(2)</sup>, 而超微结构则示皮层基质模糊、空泡变化和肌层以及实质组织细胞的广泛破坏. 由于在虫的皮层受损的同时, 宿主的细胞迅速包围、附着和钻入虫体内<sup>(2)</sup>, 同时在体外培养的  $3 \text{ h}$  童虫经吡喹酮作用后, 中性粒细胞可迅速附着于受损的皮层上, 并使虫体死亡<sup>(8)</sup>, 提示在宿主体内, 除药物对虫的直接作用

外, 宿主因素的参与是使童虫死亡的重要原因之一。

### 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、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. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 1988; 6 : 63
- 3 Stirewalt MA. *Schistosoma mansoni*: Cercaria to schistosomule. In: Dawes B, ed. *Advances in parasitology*; vol 12. London: Academic Press, 1974 : 115-82
- 4 肖树华、薛海筹、乐文菊、裘丽姝. 日本血吸虫尾蚴经吡喹酮作用后转变为童虫的观察. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 1987; 5 : 133
- 5 Stirewalt MA. Cercaria vs. schistosomule (*Schistosoma mansoni*) : Absence of the pericercarial envelope *in vivo* and the early physiological and histological metamorphosis of the parasite. *Exp Parasitol* 1963; 13 : 395
- 6 Hockley DJ, McLaren DJ. *Schistosoma mansoni*: Changes in the outer membrane of the tegument during development from cercaria to adult worm. *Int J Parasitol* 1973; 3 : 13
- 7 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
- 8 肖树华、乐文菊、梅静艳. 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. 同上 1987; 8 : 547

*Acta Pharmacologica Sinica* 1988 Jul, 9 (4) : 360-363

## Effect of praziquantel on ultrastructure of *Schistosoma japonicum* cercariae and schistosomula within mouse skin

XIAO Shu-Hua, YANG Yuan-Qing, SHEN Bing-Gui, XU Dong-Hui, YANG Hui-Zhong, MEI Jing-Yan, YUE Wen-Ju

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

**ABSTRACT** When *Schistosoma japonicum* cercariae were exposed to praziquantel 1 $\mu$ g/ml in dechlorinated water for 0.5-2 h, the glycocalyx in the outer surface of tegument decreased markedly or even disappeared, and the matrix of tegument became sparse and indistinct with a decrease in membranous vesicles. Meanwhile, the muscle layer beneath the tegument exhibited swelling or lysis, and the mitochondria distributed in the muscle and parenchymal cells showed swelling and degeneration. After 4 h, an extensive lysis of cercariae tissues which resulted in the formation of numerous vacuoles with varying sizes could be seen. No apparent alteration in the ultrastructure

of cercariae exposed to praziquantel in normal saline was observed. The ultrastructural changes of schistosomula within mouse skin in worm tegument, muscle and parenchymal tissues were similar to those mentioned above 0.5-24 h after ig praziquantel 600 mg/kg to mice infected with cercariae for 3 h.

**KEY WORDS** *Schistosoma japonicum* cercariae; *Schistosoma japonicum* schistosomula; praziquantel; electron microscopy

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

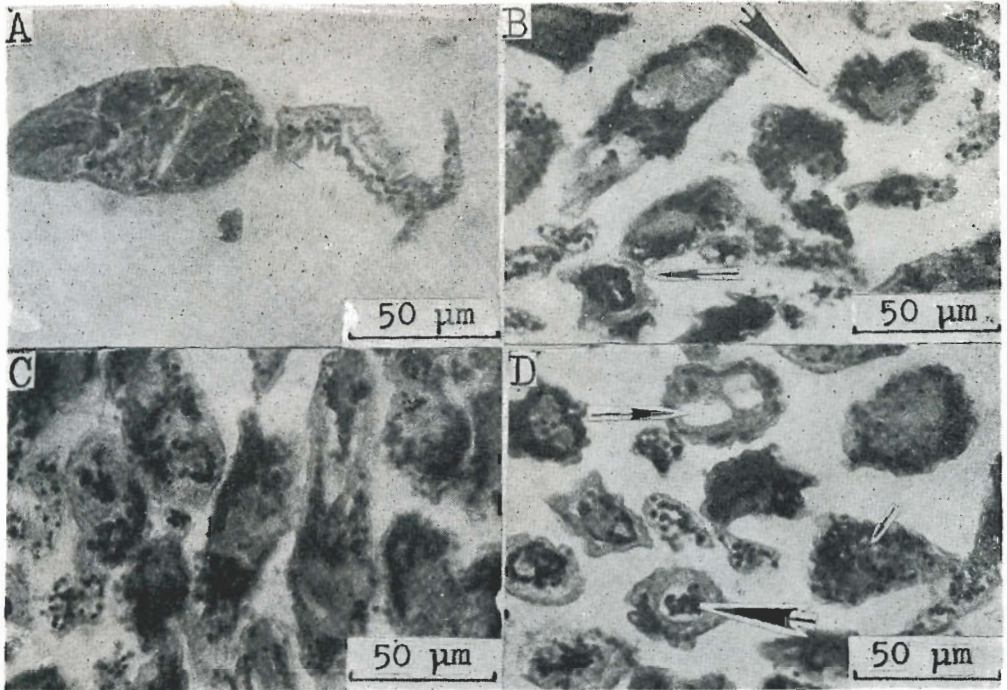


Fig 1. Light microscopy of cercariae exposed to praziquantel  $1 \mu\text{g/ml}$  in dechlorinated water for 10 min to 4 h.  $\times 400$ . A) Control, showing normal structure of cercariae; B) 10 min after exposure, showing vesicle formation on tegument of cercarial body (medium arrow) and tail (small arrow); C) 1 h after exposure, showing necrosis and disintegration of some cercariae; D) 2h after exposure, showing vesicle formation on tegument, sparse distribution of parenchymal cells accompanied by collapse of nuclear (small arrow), large vacuole appeared in parenchymal tissues of cercariae (medium arrow) and distension of intestine filled with numerous epithelial cells (large arrow). (See p 361)

Fig 2. Transmission electron microscopy of *Schistosoma japonicum*.  $\times 20\ 000$ . G = glycocalyx; M = muscle; Mi = mitochondria; Mv = membranous vesicle; S = spine; T = tegument; V = vacuole. A-D) Cercariae exposed to praziquantel  $1 \mu\text{g/ml}$  in dechlorinated water for 0.5-4 h. A) Control, showing normal tegument (T), spine (S), glycocalyx (G), muscle (M) and mitochondria (Mi); B) 0.5 h after exposure, showing markedly decrease in glycocalyx and indistinction of matrix in tegument, swelling of muscle and degeneration of mitochondria in muscle; C) 2 h after exposure, showing sparse matrix in tegument with disappearance of membranous vesicles; D) 4 h after exposure, showing severe swelling and lysis of muscle and parenchymal tissues resulting in the formation of vacuoles (V) with different sizes.

E-H) Schistosomulum in mouse skin treated orally with praziquantel 600 mg/kg. E) Control, showing normal T, S, Mv (membranous vesicle), M and Mi; F) 0.5 h after treatment, showing indistinction of matrix in tegument with decrease in membranous vesicles and degeneration of some mitochondria;

G) 4 h after treatment, showing formation of large vacuole and apparent degeneration of mitochondria; H) 4 h after treatment, showing disruption of a vacuole in tegument and swelling of muscle.

Fig 2 on Plate 2.

(See p 362)

