

左旋、右旋和消旋吡喹酮对华支睾吸虫作用的光镜和电镜观察¹

钱明心、刘约翰、官 兰²、王小根 (重庆医科大学血吸虫病研究室, 重庆 630041)

提要 用光镜、扫描和透射电镜, 对比观察左旋、右旋和消旋吡喹酮对体外培养和体内治疗后华支睾吸虫的影响, 发现左旋和消旋吡喹酮对虫体皮层有直接的严重损伤, 而右旋吡喹酮则无。表明吡喹酮的旋光异构体在杀虫作用上具有立体选择性, 其杀虫作用机理可能与虫体膜结构的受体反应有关。

关键词 dl-吡喹酮; 对映体; d-吡喹酮; l-吡喹酮; 立体选择性; 华支睾吸虫; 扫描电子显微镜检查

吡喹酮是当前治疗日本血吸虫病、华支睾吸虫病和肺吸虫病的首选药物。它是由等量左旋体和右旋体组成的外消旋体, 其主要有效成份为左旋吡喹酮, 而右旋吡喹酮几乎无效^(1,2)。左旋吡喹酮对大鼠体内华支睾吸虫超微结构有明显损害⁽³⁾。本文通过体内、外试验, 从形态学进一步对比观察吡喹酮及其旋光异构体对华支睾吸虫的作用。

材 料 和 方 法

左旋和右旋吡喹酮由本校化学教研室拆分

1987年7月21日收稿 1988年4月12日接受

¹中国科学院科学基金资助课题 No 852813

²现在天津医学院二院内科, 天津 300211

合成, 经紫外, 红外, 质谱和核磁共振检测, 两者一致, 其比旋度分别为 $-146^{\circ} \sim -150^{\circ}$ 和 $+146^{\circ} \sim +150^{\circ}$, 并经重庆市药检所检定。吡嗪酮由上海第六制药厂提供。以上 3 药均为白色结晶粉末, 分别用聚乙二醇 400(PEG-400) 配成 4% 溶液。

Sprague-Dawley 大鼠, 本校动物房繁殖, 体重 $170 \pm SD$ 14 g, ♀♂不拘。每鼠经口感染 30 个华支睾吸虫囊蚴, 5-6 wk 后粪检华支睾吸虫虫卵均为阳性。

体内试验 分别用吡嗪酮及其左、右旋体, 按 300 mg/kg 一次 ig 治疗感染大鼠, 空白对照组仅用等容量 PEG-400 ig。给药后 36 h 解剖, 迅速收集胆管内成虫, 用 0.9% 生理盐水洗涤 3 次后, 分别作以下处理:

1. 光镜 各组取 11-18 条虫体, 置生理盐水中, 立即观察 5 min 内虫体形态及活动情况; 另取部分虫体用酸性卡红染色, 做封片标本, 每组 4-10 条, 观察虫体体表与内部结构的变化。以上均采用单盲法观察, 力求客观判断。

2. 扫描电镜 按前文方法⁽³⁾制备标本, 用 AMRAY 1000 B 型扫描电镜观察。

3. 透射电镜 按前文方法⁽³⁾制备标本, 用日立 H-300 透射电镜观察。

体外试验 无菌操作下, 自大鼠胆管内取出华支睾吸虫成虫, 置于含青、链霉素各 100 IU/ml 的 0.5% 葡萄糖台氏液中, 37℃ 下培养过夜。次日在解剖镜下选取吸游活跃, 完整无损的虫体, 分别放置含左旋和右旋吡嗪酮 0.1 和 1 μg/ml, 以及含吡嗪酮 0.1 μg/ml 的卡氏培养瓶内, 每瓶 1-2 条, 每个药物浓度组为 10 条, 另设不含药物的对照组。于虫体接触药液后即刻及 1, 2, 4, 8 h, 在解剖镜下用单盲法观察并纪录各组虫体形态和活动情况, 8 h 后将虫体移入无药培养液中, 继续观察 2 h。

结 果

体内试验

1. 对照组 所有虫体 (11 条) 均蠕动着

游, 体态自然, 体表完整光滑。睾丸、子宫、卵巢和肠管等内部结构清晰可辨。用普通光镜观察虫体染色标本, 体表皱褶清楚 (图 1-A, 见铜版图 3), 睾丸排列整齐, 分支粗大, 浓染。子宫、卵巢着色较深 (图 2-A, 见铜版图 3)。

扫描电镜下, 虫体体表由规则的横行嵴环绕 (低倍), 密布大量光滑完整的马铃薯样结节 (高倍), 偶可见指状或树状突起 (图 3-A, 见铜版图 3)。透射电镜可见体表皮层为许多排列不规则的绒毛样突起, 其内的基质中含一定数量的线粒体和分泌小体, 其下为完整的基底膜和透亮的纤维层, 环肌和纵肌依次排列于下层 (图 4-A, 见铜版图 4)。深部实质中为表皮细胞胞体, 与皮层基质有管道相通。

2. 吡嗪酮组 所有虫体 (16 条) 挛缩扭曲, 呈僵直态, 但口、腹吸盘仍微动, 有 3 条分别在虫体头、中和尾部出现泡状物。光镜下可见染色标本的体表皱褶减少, 出现多个透明小泡 (图 1-B)。睾丸分支末端模糊不清, 有不同程度的空白区域。扫描电镜见体表结节粘连变平, 融合后大片剥落 (图 2-B)。有的虫体皮层出现数个 1 μm 大小的火山口样破溃。透射电镜见绒毛样突起融合增宽, 分泌小体数量减少, 沿基底膜上出现成串空泡, 环、纵肌呈灶性溶解, 合胞体胞浆中线粒体肿胀, 可见髓鞘样结构 (图 4-B,)。

3. 左旋吡嗪酮组 全部虫体 (15 条) 均明显挛缩, 僵直不动; 其中 5 条体表可见明显大泡以及溃破糜烂面, 内部结构模糊不清, 偶见囊状结构。光镜下染色标本体表皱褶几近消失, 代之以大小不一的透亮小泡及破溃面 (图 1-C)。睾丸分支变细, 着色淡染 (图 2-B)。

扫描电镜见体表结节肿胀, 粘连融合, 呈斑片状糜烂剥脱和火山口样溃破, 裸露出下层网状支架样结构 (图 5, 见铜版图 4)。

透射电镜下绒毛样突起变得低平, 基质中线粒体肿胀, 分泌小体数量减少, 部分基底膜溶解、断裂。沿基底膜上出现成串空泡, 融合

后形成狭长透亮区带；肌膜和肌纤维局部溶解，模糊不清(图4-C)。

表皮细胞核膜亦见灶性溶解，异染色质浓集靠边，胞浆内出现髓鞘样结构和残余体。

4. 右旋吡喹酮组 用相同剂量 ig 感染大鼠，观察虫体数量基本相同。在光镜、扫描和透射电镜下，均未见到在吡喹酮和左旋吡喹酮组所见的变化，虫体的活动，形态和超微结构与对照组相仿。

体外试验 对照组所有华支睾吸虫成虫活动自然，口、腹吸盘吸附良好，体表完整，睾丸、子宫和卵巢等结构非常清晰。8-10 h 后，未见虫体明显变化。右旋吡喹酮浓度分别为 0.1 和 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的二组中，所有虫体于接触药液的最初 5 min 以及 8 h 内，其活动和形态与对照组相同，移换入无药培养液后，亦无显著改变。

左旋吡喹酮和吡喹酮组虫体，在接触 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含药培养液后，频频翻滚摆动，口、腹吸盘失去吸着；3 min 后，大多数虫体活动减弱，挛缩卷曲成团；2-8 h 内，该两组虫体均呈不自然扭曲，仔细观察尚可见每组各有 7-8 条虫体口腹吸盘或尾部微动，其余皆不动。在左旋吡喹酮 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度下，虫体接触药液后迅即频繁翻滚扭动；30 s 内，有 8 条活动明显减少，3 min 后全部虫体都不动，持续呈挛缩卷曲或僵直状态。8 h 后，当把以上各组虫体移入无药培养液时，原先挛缩或僵直不动的虫体有少数开始缓慢松弛，活动渐多。

讨 论

已经阐明，吡喹酮对虫体的主要作用方式是引起皮层严重损害和肌肉强烈挛缩^(2,4-6)。本文结果表明，左旋吡喹酮和吡喹酮一样，对虫体的活动和形态均有迅速而明显的影响。并且在透射电镜下，该两药物组均见皮层基底膜上有多个空泡形成和融合，使皮层和深部基质层分离，这可能是光镜和扫描电镜下所见皮层损害的重要病变基础。

由于观察方法的限制，本实验尚难对左旋吡喹酮和吡喹酮的差别进行定量比较。但是，体内、外试验均明确显示，左旋吡喹酮对华支睾吸虫有较强的抗虫活性，而右旋吡喹酮对虫体无明显影响，此与我们用大鼠实验性治疗的结果(待发表资料)甚为一致。从而证明，吡喹酮对华支睾吸虫的杀虫作用具有光学异构体的立体选择性，左旋吡喹酮是吡喹酮抗华支睾吸虫的主要有效成份。

在吡喹酮的吡嗪异喹啉环系结构中，4 位上的羰基为其主要抗虫活性基团⁽⁷⁾。左、右旋吡喹酮的分子结构与吡喹酮相同，但其立体构型却不一样，因此可用作探讨吡喹酮构效关系和杀虫机理的实验探针。我们在体内外试验中观察到，虫体接触左旋吡喹酮和吡喹酮后反应迅速而强烈，尤以体表皮层及其细胞膜结构的损害较为明显，提示这些部位是药物原发作用的靶标。由于吡喹酮能与膜的脂质成分反应，并促进 Ca^{2+} 内流⁽²⁾，因而推测，左旋和右旋吡喹酮呈现截然不同的杀虫活性可能与虫体膜结构上的受体识别^(8,9)有关，我室最近用 X 光衍射法测定左旋吡喹酮立体结构的结果(待发表资料)也支持这一点。

致谢 本校寄生虫教研室舒群技师协助制作光镜染色标本，第三军医大学电镜室制备电镜样品。

参 考 文 献

- 1 Liu YH, Qian MX, Wang XG, *et al.* Comparative efficacy of praziquantel and its optic isomers in experimental therapy of schistosomiasis japonica in rabbits. *Chin Med J* 1986; 99 : 935
- 2 Andrews P. Praziquantel : mechanisms of antischistosomal activity. *Pharmacol Ther* 1985; 29 : 129
- 3 钱明心、刘约翰、官 兰、王小根。左旋吡喹酮对体内华支睾吸虫作用的超微结构研究，重庆医科大学学报 1988; 13 : 6
- 4 Mehlhorn H, Kojima S, Rim HJ, *et al.* Ultrastructural investigations on the effects of

- praziquantel on human trematodes from Asia: *Clonorchis sinensis*, *Metagonimus yokogawai*, *Opisthorchis viverrini*, *Paragonimus westermani* and *Schistosoma japonicum*. *Drug Res* 1983; 33 : 91
- 5 李秉正、刘铁聪、邓立军、高俊峰、赵雅元、赵燕妮。吡喹酮对华支睾吸虫的皮层、表皮细胞和肌肉影响的超微结构观察。《寄生虫学与寄生虫病杂志》1984; 2 : 200
- 6 李秉正、刘铁聪、邓立军、李忠勤、赵亚媛。吡喹酮对华支睾吸虫皮层表面影响的扫描电镜观察。《中国医科大学学报》1984; 13 (6) : 56
- 7 Andrews P, Thomas H, Pohlke R, Seubert J. Praziquantel. *Med Res Rev* 1983; 3 : 147
- 8 Ariens EJ. Stereochemistry: A source of problems in medicinal chemistry. *Ibid* 1986; 6 : 451
- 9 James DM, Gilles HM. *Human antiparasitic drugs : pharmacology and usage*. 1st ed. NY : Wiley, 1985 : 14-21

Acta Pharmacologica Sinica 1988 Sep; 9 (5) : 457-460

Light and electron microscopic studies on the effects of *l*-, *d*- and *dl*-praziquantel on *Clonorchis sinensis*

QIAN Ming-Xin, LIU Yue-Han, GUAN Lan, WANG Xiao-Gen

(Research Laboratory of Schistosomiasis, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 630041)

ABSTRACT The effects of *l*-, *d*- and *dl*-praziquantel on the fine structures of *Clonorchis sinensis* were compared using light microscopy and scanning and transmission electron microscopy. For the *in vivo* study, adult worms were collected from the biliary system of infected rats that had been treated 36 h previously with each compound at a single dose of 300 mg/kg. For the *in vitro* study, the liver flukes recovered from the infected rats were incubated for 8-10 h at 37°C in Tyrode's medium containing *l*- and *d*-praziquantel at 0.1 and 1 µg/ml, respectively. The results showed that both *l*- and *dl*-praziquantel caused strong muscular

contraction and rapid and intensive changes in the tegumental surface and the membrane structures of the worms, whereas *d*-praziquantel did not. It is concluded that there is a stereoselective effect between praziquantel enantiomers on *C sinensis*, and that the anthelmintic activity is mainly attributable to the *l*-isomer. Its mechanism is most likely related to a stereospecific receptor reaction with membrane structures.

KEY WORDS *dl*-praziquantel; enantiomorph; *l*-praziquantel; *d*-praziquantel; stereoselectivity; *Clonorchis sinensis*; scanning electron microscopy

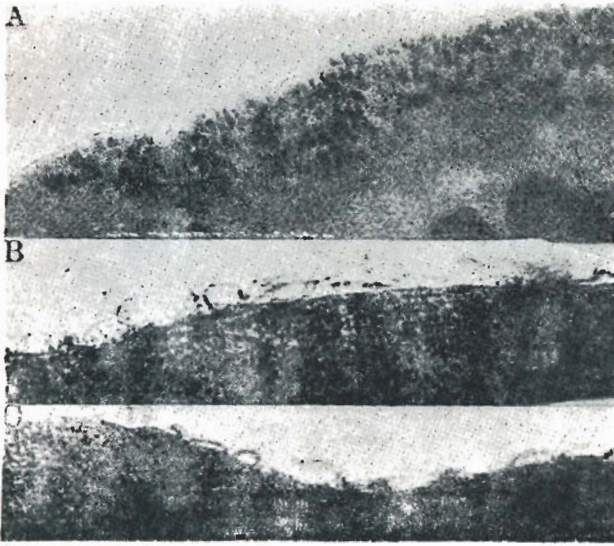


Fig 1. Body surface of *Clonorchis sinensis* (acid carmine stain), $\times 66$. A) Untreated, B) 36 h after ig *dl*-praziquantel 300 mg/kg, showing numerous vesicles; C) 36 h after ig *l*-praziquantel 300 mg/kg, showing numerous vesicles.
(See p 458)

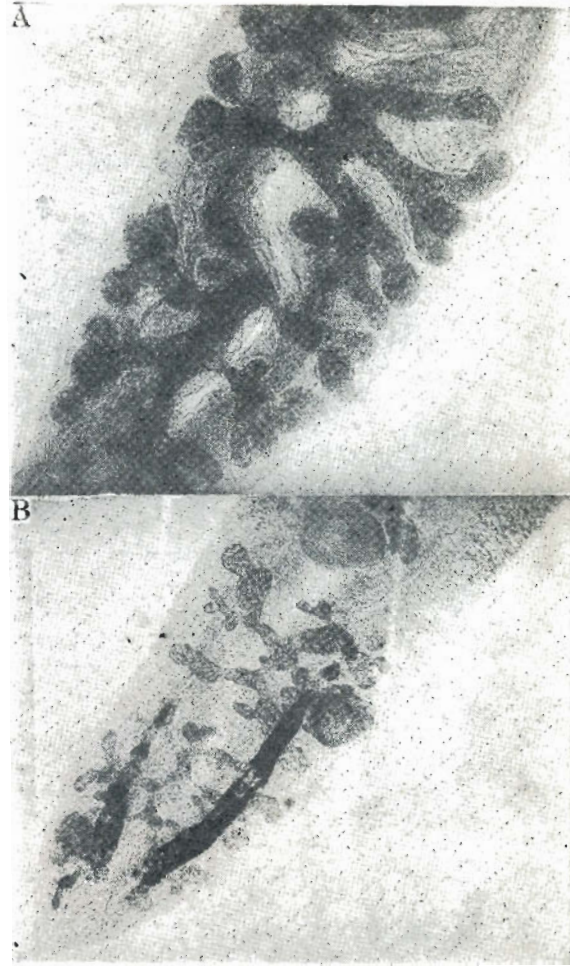


Fig 2. Testes of *Clonorchis sinensis* (acid carmine stain), $\times 13.2$. A) Untreated, B) 36 h after ig *l*-praziquantel 300 mg/kg, the testes considerably shrunk.
(See p 458)

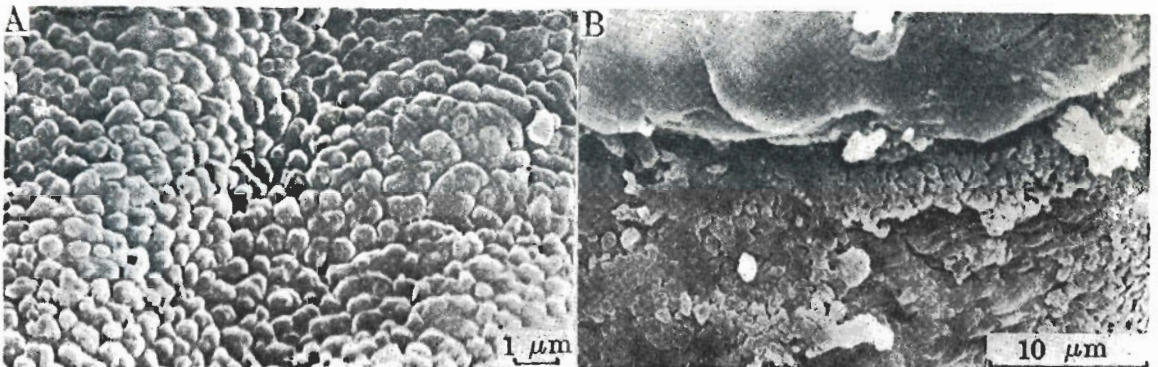


Fig 3. Scanning electron micrograph of tegumental surface of *Clonorchis sinensis*. A) Close and numerous potato-like knobs in an untreated worm, $\times 7000$; B) 36 h after ig *dl*-praziquantel 300 mg/kg, showing the knobs flattened, fused to form large patches and peeled off, $\times 3500$.
(See p 458)

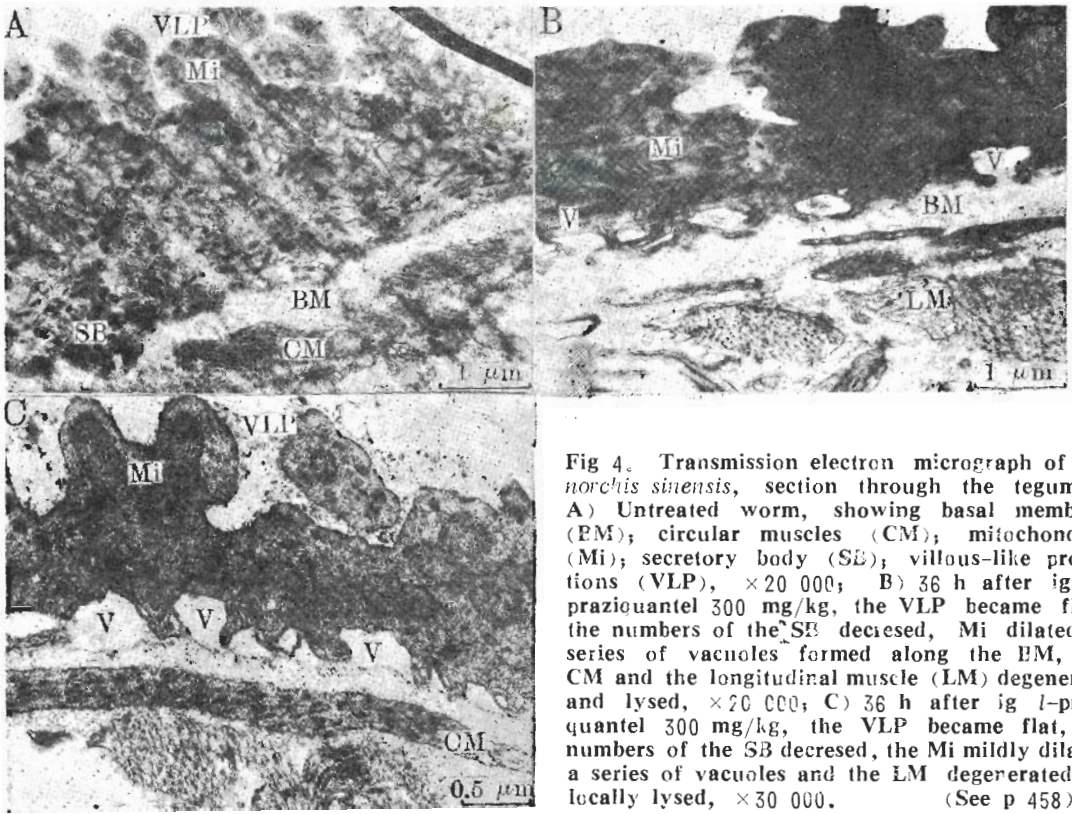


Fig 4. Transmission electron micrograph of *Clonorchis sinensis*, section through the tegument, A) Untreated worm, showing basal membrane (EM); circular muscles (CM); mitochondrion (Mi); secretory body (SE); villous-like projections (VLP), $\times 20\ 000$; B) 36 h after ig *d*-praziquantel 300 mg/kg, the VLP became flat, the numbers of the SB decreased, Mi dilated, a series of vacuoles formed along the EM, the CM and the longitudinal muscle (LM) degenerated and lysed, $\times 20\ 000$; C) 36 h after ig *l*-praziquantel 300 mg/kg, the VLP became flat, the numbers of the SB decreased, the Mi mildly dilated, a series of vacuoles and the LM degenerated and locally lysed, $\times 30\ 000$. (See p 458)

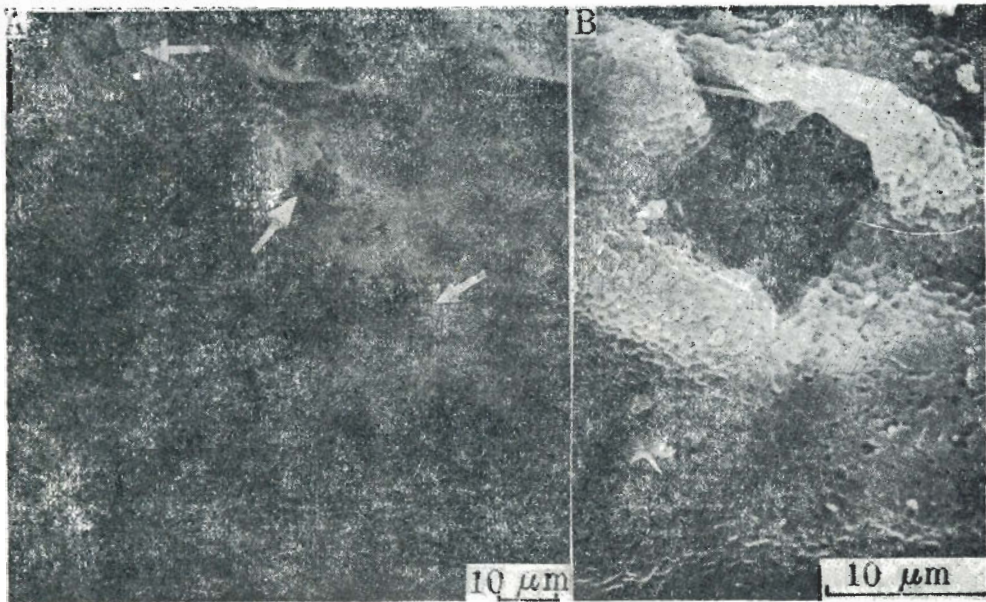


Fig 5. Scanning electron micrograph of tegumental surface of *Clonorchis sinensis*, 36 h after ig *l*-praziquantel 300 mg/kg. A) Several holes and erosion on the tegument (white arrow), and surrounding parts less affected, $\times 700$; B) Crater-like lesion and exposure of the subtegumental network. The knobs around the lesion flattened and fused, $\times 2000$. (See p 458)