

## 甲苯达唑对细粒棘球绦虫蚴囊壁的葡萄糖、糖原、乳酸和乳酸脱氢酶的影响<sup>1</sup>

肖树华, 冯建军, 郭惠芳, 焦佩英, 姚民一, 柴君杰<sup>2</sup>

R 978.6

(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)

**Effects of mebendazole on glucose, glycogen, lactic acid, and lactate dehydrogenase in *Echinococcus granulosus* cyst wall<sup>1</sup>**

XIAO Shu-Hua, FENG Jian-Jun, GUO Hui-Fang, JIAO Pei-Ying, YAO Min-Yi, CHAI Jun-Jie<sup>2</sup> (*Institute of Parasitic Diseases, Chinese Academy of Preventive Medicine; WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China*)

**ABSTRACT** The glucose, glycogen, and lactic acid contents in *Echinococcus granulosus* cyst wall were  $3570 \pm 623$ ,  $1276 \pm 126$ , and  $267 \pm 29 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ , respectively. The lactate dehydrogenase (LDH) activity in the cyst wall was  $4307 \pm 297 \text{ U} / (\text{min} \cdot \text{mg protein})$ . When infected mice were treated ig with mebendazole (Meb) 25 or  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  for 7-14 d, the glucose and glycogen contents in the cyst wall decreased markedly. No apparent changes in lactic acid and LDH activity were seen. The results suggested that Meb had no effect on glycolysis of the cyst wall. But it exhibited an inhibitory effect on the transport of exogenous glucose from the host to the cyst wall, which might further promote the decomposition of endogenous glycogen for energy supply and resulted in a decrease of endogenous glycogen content in the cyst wall.

**KEY WORDS** *Echinococcus*; mebendazole; glucose; glycogen; lactic acid; lactate dehydrogenase

**摘要** 感染 11-12 个月的小鼠细粒棘球绦虫囊壁含葡萄糖、糖原和乳酸的量各为  $3570 \pm 623$ 、 $1276 \pm 126$  和  $267 \pm 29 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。乳酸脱氢酶的活力为  $4307 \pm 297$

Received 1991-08-28

Accepted 1992-06-12

<sup>1</sup> Project supported by the National Natural Science Foundation of China, No 39070759

<sup>2</sup> Xijiang Institute for Endemic Disease Control and Research, Urumqi 830002, China.

$\text{U} / (\text{min} \cdot \text{mg protein})$ 。感染小鼠 ig Meb 25 或  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 连给 7-14 d, 囊壁的葡萄糖和糖原含量明显减少, 而乳酸和乳酸脱氢酶则无明显影响。

**关键词** 棘球属; 甲苯达唑; 葡萄糖; 糖原; 乳酸; 乳酸脱氢酶

前文指出, 感染继发性细粒棘球绦虫的小鼠用甲苯达唑(mebendazole, Meb)治疗后, 囊壁的糖原含量明显减少<sup>(1)</sup>。进一步的研究结果表明, 经 Meb 治疗后, 感染小鼠体内的细粒棘球绦虫摄入  $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ 葡萄糖的量明显减少, 但对  $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ 葡萄糖掺入囊壁糖原的量则无明显影响<sup>(2)</sup>。本文进一步观察感染小鼠用 Meb 治疗后细粒棘球绦虫囊壁糖代谢可能受影响的环节。

### MATERIALS AND METHODS

**虫源** 采集细粒棘球绦虫原头节及接种前的处置方法同前文<sup>(1)</sup>。

**动物** 取体重为  $20 \pm 2 \text{ g}$  NIH 雌性小鼠, 每鼠自腹腔接种原头节 2000 只, 11-12 个月 after 分组 ig Meb。

**药物试剂** Meb 由上海医药工业研究院合成, 赠给。作体内试验时, 将 Meb 混悬于 1% 西黄蓍胶中, 浓度为  $2.5$  或  $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。作体外试验时, 将 Meb  $5 \text{ mg}$  溶于  $3.5 \text{ ml}$  的二甲基甲酰胺(DMF), 随即加入  $1.5 \text{ ml}$  的重蒸馏水, 然后根据试验要求, 用 50% DMF 水溶液作进一步稀释。Coomassie brilliant blue G-25 为 Fluka 产品, 牛血清蛋白为 Sigma 产品。其它试剂, 如葱酮, 乳酸锌, 乳酸钠, 硫酸铁, 氢氧化钙, 磷酸和甘氨酸等均为市售 AR。辅酶 I (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD) 的纯度大

于 90% (上海生物化学试剂商店), 藜芦素为 Sigma 产品。

**体内试验** 小鼠于感染后 11-12 个月 ig Meb, 剂量为 25 或 50  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 连给 7-14 d, 停药次日, 取 3-4 只小鼠断颈处死, 迅速剖开腹腔, 仔细剥离外囊, 分别挑取充有囊液的内囊(充盈囊)和因受药物作用较重, 囊液丧失而塌陷的内囊(瘪囊)。前者于去除囊液后与后者分别放置在冰浴上, 经滤纸吸干后称重(100-200 mg 左右), 并取单个囊放置在容量为 5 ml 的匀浆器内, 加入重蒸馏水 4 ml, 在冰浴中磨碎成匀浆备用。

**葡萄糖和糖原的测定** 囊壁的葡萄糖及糖原含量的测定均按前文方法<sup>(1)</sup>, 但测定葡萄糖时, 系取上述囊壁匀浆 0.5 ml, 离心(1000× g) 10 min 后, 取上清液 0.2 ml, 加入蒽酮试剂, 在沸水浴中加热 10 min, 冷却后在 650 nm 处测定吸收率。

**乳酸的测定** 用改进的乳酸与藜芦结合的比色法<sup>(3)</sup>测定, 即取上述囊壁匀浆 1 ml, 加入 20%  $\text{CuSO}_4$  0.4 ml, 重蒸馏水 0.6 ml 和  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  0.2 g, 经充分摇匀后, 离心(1000× g, 10 min), 吸取上清液 1 ml, 加入含 Fe 试剂 5 ml, 在沸水浴中加热 5 min, 冷却后加入 0.2% 藜芦素 0.1 ml, 摇匀, 在 37℃ 水浴中放置 20 min 后, 于 480 nm 处测定吸收率, 根据标准曲线计算乳酸含量。

**乳酸脱氢酶(LDH)活力测定** 用紫外分光光度法测定 340 nm 处 NADH 吸收值变化的方法<sup>(4)</sup>, 测定囊壁的 LDH。酶反应液于试验前配制, 即在 180 ml  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的甘氨酸缓冲液(pH 10)中, 加入乳酸钠 ( $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 10 ml, NAD ( $2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 10 ml, 并放置在 37℃ 中预温, 试验时吸取酶反应液 2.5 ml, 移置石英比色杯(光程 1 cm)中, 测定其在 340 nm 处的吸收率, 随即加入在 37℃ 中预温 20 min 的囊壁匀浆液 10  $\mu\text{l}$ , 混匀 1 min 后, 再次测定 340 nm 处的吸收率。LDH 活力以 37℃ 时, 所形成的 NADH 以  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} / \text{mg protein}$  表示, 即:  $\text{LDH} = 2.51 \times \Delta A / 6.22 \times 10^{-3} \times \text{mg P}$ 。式中的  $\Delta A$  为 2 次测定的吸收率差值, 2.51 为反应的总体积,  $6.22 \times 10^{-3}$  为 NADH 的  $\mu\text{mol}$  吸收系数, P 为蛋白质。

**蛋白质测定** 用蛋白质与 Coomassie brilliant blue G-25 结合呈蓝色反应法<sup>(5)</sup>测定, 即取上述囊壁匀浆 0.1 ml, 加入染料试剂后, 在 2 min 至 1 h 内, 用分光光度计在 595 nm 处测定吸收率, 根据标准曲线计算蛋白质含量。

## RESULTS

**葡萄糖的测定** 对照囊壁含有较高的葡萄糖, 介于  $2982 \pm 1294$ - $4449 \pm 1338 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ , 平均为  $3570 \pm 623 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。感染小鼠 ig Meb 25 或 50  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 连续 7-14 d, 各组瘪囊的葡萄糖含量均明显低于对照组, 而充盈囊的, 除 25  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  14 d 组外, 均与相应对照组的相仿, 但其平均值高于瘪囊组的 (Tab 1)。

**糖原的测定** 感染 11-12 个月的细粒棘球蚴囊壁的糖原含量较葡萄糖的为少, 介于  $1191 \pm 456$ - $1444 \pm 688 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ , 平均为  $1276 \pm 126 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。用 Meb ig 治疗感染鼠, 剂量为 25 或 50  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 连给 7-14 d, 各组瘪囊的糖原含量均明显少于相应对照组的, 减少率为 42.2-48.2%。充盈囊壁的糖原含量亦有不同程度的减少, 但与相应对照组差别不显著, 而明显高于相应瘪囊组 (Tab 1)。

**乳酸与 LDH 的测定** 感染 11-12 个月的囊壁乳酸含量介于  $237 \pm 109$ - $294 \pm 128 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  之间, 平均为  $267 \pm 29 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。感染小鼠 ig Meb 25 或 50  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 连给 7-14 d, 各组瘪囊的乳酸含量较相应对照组的增加 110-165%, 均显著地高于各相应对照组。充盈囊的乳酸含量, 除 1 组的显著高于对照组外, 余 2 组的与相应对照组的相近 (Tab 1)。细粒棘球蚴囊的 LDH 活力较稳定, 介于  $3969 \pm 1163$ - $4524 \pm 1587 \text{ U} / (\text{min} \cdot \text{mg 蛋白质})$  平均为  $4307 \pm 297 \text{ U} / (\text{min} \cdot \text{mg 蛋白质})$ 。感染小鼠 ig Meb 25 或 50  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 连给 7-14 d, 各瘪囊组的 LDH 活力与相应对照组的相仿, 而充盈囊组的则有所增加, 其中有

**Tab 1. Effect of mebendazole on glucose, glycogen, lactic acid and lactate dehydrogenase in *Echinococcus granulosus* cyst wall harbored in mice 24 h after last dose of each treatment course.  $\bar{x} \pm s$ . \* $P > 0.05$ , \*\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.01$  vs corresponding control group.**

Mebendazole / mg · kg <sup>-1</sup> · d <sup>-1</sup> × d	Status of cysts	Glucose / μg · g <sup>-1</sup>	Glycogen / μg · g <sup>-1</sup>	Lactic acid / μg · g <sup>-1</sup>	Lactate dehydrogenase / U / (min · mg protein)
Control 25 × 7		4 449 ± 1 338 (30)	1 301 ± 736 (30)	Not done	Not done
	Collapse	3 140 ± 957 (30)***	752 ± 328 (30)***	Not done	Not done
	Full	3 868 ± 1 207 (30)*	1 124 ± 521 (30)*	Not done	Not done
Control 25 × 14		3 466 ± 1 031 (28)	1 444 ± 688 (30)	294 ± 128 (28)	4 524 ± 1 587 (28)
	Collapse	2 245 ± 826 (24)***	748 ± 357 (23)***	670 ± 204 (24)***	4 411 ± 1 739 (24)*
	Full	2 665 ± 1 139 (26)***	1 127 ± 503 (26)**	260 ± 142 (26)*	5 722 ± 2 344 (26)**
Control 50 × 7		2 982 ± 1 294 (30)	1 168 ± 431 (30)	237 ± 109 (30)	4 428 ± 1 934 (30)
	Collapse	1 867 ± 1 176 (30)***	647 ± 283 (30)***	499 ± 194 (30)***	5 138 ± 1 883 (30)*
	Full	2 569 ± 1 413 (30)*	1 044 ± 430 (30)	364 ± 217 (30)**	6 864 ± 2 924 (30)**
Control 50 × 10		3 382 ± 919 (30)	1 191 ± 456 (30)	269 ± 122 (30)	3 969 ± 1 163 (30)
	Collapse	2 025 ± 573 (30)***	682 ± 192 (30)***	714 ± 189 (30)***	3 741 ± 1 258 (30)*
	Full	2 978 ± 763 (30)*	1 278 ± 478 (30)*	258 ± 132 (30)*	4 148 ± 1 432 (30)*

Number of cysts in parentheses.

的明显高于对照组的(Tab 1)。在另一体外试验中, 将溶解于 DMF 的 Meb 加至囊壁匀浆中, 浓度为 1 或 5 μg · ml<sup>-1</sup> 时, 两者的 LDH 为 1243 ± 680 U / mg 蛋白质 (n=20) 和 1278 ± 700 U / mg 蛋白质 (n=20), 与加入相应量 DMF 对照组的 1245 ± 869 U / mg 蛋白质 (n=20) 相仿。

**DISCUSSION**

感染小鼠用 Meb 治疗后, 其体内的囊因受到药物作用的程度不同, 有的囊液已丧失而成为瘪囊, 而有的囊液则无明显的影响, 或有不同程度的减少, 统称为充盈囊。这种瘪囊在我们所用的 Meb 剂量治疗 7 d 时约占 20-30%, 14 d 时则约占 40-50%, 对照组鲜有瘪囊查见。病理观察表明, 瘪囊生发层的病变一般较重, 充盈囊的生发层亦示有不同程度的变化。为了比较观察, 我们在本项研究中将瘪囊与充盈囊分别检测。

瘪囊的葡萄糖和糖原的含量均明显减少,

而充盈囊的则减少不明显, 这可能是因瘪囊受损较重, 维持囊壁的渗透平衡失调, 导致囊液外流, 使渗入与转运至囊壁的外源性葡萄糖受抑制, 这不仅促使囊壁的葡萄糖含量减少, 而且还可能促使囊壁内源糖原的分解, 以提供所需的能量, 从而使囊壁糖原含量亦明显减少。

对囊壁的 LDH 和乳酸含量测定的结果表明, 尽管瘪囊的葡萄糖和糖原的含量明显减少, 但其 LDH 活力未受明显影响, 而乳酸含量却有明显的积聚, 这可能是在瘪囊中作为容纳代谢产物的囊液已丧失, 在酵解过程中产生的乳酸即在囊壁中积聚。相反, 在充盈囊中, 囊壁产生的乳酸可排泄或释放至囊液中。由于在本项试验中未测定囊液内乳酸量, 故这一推测有待今后进一步证实。鉴于在体外将 Meb 直接加至囊壁匀浆中对 LDH 活力无明显影响, 根据上述试验结果, 我们认为 Meb 并不影响细粒棘球蚴的糖酵解, 主要是抑制外源性葡萄糖转运至囊壁中, 其作用环节有待研究。

REFERENCES

- 1 Xiao SH, Yang YQ, Guo HF, Zhang CW, Jiao PY, You JQ. Effects 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, Guo HF, Feng JJ, Jiao PY, Sun HL *et al*. Effects of mebendazole on glucose uptake of *Echinococcus granulosus* cysts. *Acta Pharmacol Sin* 1992; 13 : 473-7.
- 3 Huang TY, Chu CH. *In vitro* studies on glycolysis of *Schistosoma japonicum*. *Acta Biochim Sin* 1959; 2 : 102-10.
- 4 Everse J, Kaplan NO. Lactate dehydrogenase: Structure and function. In: Meister A, editor. *Advances in Enzymology*; vol 37. NY: Wiley, 1973. 61-133.
- 5 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72 : 248-54.

45-49

(8)

BIBLID: ISSN 0253-9756 中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1993 Jan; 14 (1) : 45-49

二氢石蒜碱的降压作用

陈必义、杜佐华<sup>1</sup>、曾繁典<sup>1</sup>、胡崇家<sup>1</sup>、马广恩<sup>2</sup>、洪山海<sup>2</sup>  
(昆明医学院药理教研室, 昆明 650031, 中国)

R 972.4

Hypotensive effect of dihydrolycorine

CHEN Bi-Yi, DU Zuo-Hua<sup>1</sup>, ZENG Fan-Dian<sup>1</sup>, HU Chong-Jia<sup>1</sup>, MA Guang-En<sup>2</sup>, HONG Shan-Hai<sup>2</sup> (*Department of Pharmacology, Kunming Medical College, Kunming 650031, China*)

**ABSTRACT** Dihydrolycorine-HCl(DL) is a derivative of lycorine, an alkaloid isolated from *Lycoris radiata* Herb. DL iv 20, 40, and 80 mg · kg<sup>-1</sup> lowered the mean arterial pressure in pentobarbitone-anesthetized normotensive rats, cats, and conscious rats either normotensive or renovascular hypertensive. In pithed rats DL depressed the hypertensive effect of reaction to electric stimulation to the T<sub>7-9</sub> segments of spinal cord. DL also depressed the hypertensive effect of phenylephrine. In rabbit aorta ring and rat anococcygeus muscle, DL antagonized the contractile effect of methoxamine, with pA<sub>2</sub> values of 5.93 and 6.35, respectively.

These results suggest that DL can block α<sub>1</sub>-adrenoceptors.

**KEY WORDS** dihydrolycorine; blood pressure; renovascular hypertension; thoracic aorta

**摘要** 二氢石蒜碱盐酸盐(DL) 20, 40, 80 mg · kg<sup>-1</sup> iv 能降低麻醉及清醒正常血压大鼠、麻醉猫和清醒肾血管性高血压大鼠的血压, 并抑制电刺激大鼠脊髓 T<sub>7-9</sub> 节段引起的升压反应, DL 抑制苯福林增高毁脊髓大鼠血压的作用。在兔主动脉和大鼠肛尾肌, DL 拮抗甲氧明 pA<sub>2</sub> 值分别为 5.93 和 6.35。结果提示 DL 能选择性阻断 α<sub>1</sub>-肾上腺素受体。

**关键词** 二氢石蒜碱; 血压; 肾血管性高血压; 胸主动脉

石蒜科石蒜属植物石蒜中所得石蒜碱(lycorine)经接触氢化而成二氢石蒜碱(dihydrolycorine), 为吡咯哌啡里啉(pyrrophenanthridine)衍生物。石蒜碱有降压作用<sup>(1)</sup>, 但是二氢石蒜碱有无降压作用则未见报道。本文研究其对不同生理和病理状态的动物血压的影响及降压机制。

Received 1990-11-26 Accepted 1992-06-10

<sup>1</sup> Tongji Medical University, Wuhan 430030, China

<sup>2</sup> Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China