

文章编号:1000-7423(2011)-01-0010-06

【论著】

7种抗蠕虫药物的体外抗华支睾吸虫作用

徐莉莉, 薛剑, 张永年, 强慧琴, 肖树华*

【摘要】 目的 观察吡喹酮、三苯双脒、左旋咪唑、蒿甲醚、青蒿琥酯、阿苯达唑和甲苯达唑体外对华支睾吸虫成虫的作用。方法 70 只大鼠于感染华支睾吸虫囊蚴 (50~100 个/只) 5~7 周后解剖, 从胆总管内采集华支睾吸虫成虫, 亨氏盐平衡溶液培养。取 24 孔培养板, 每孔放置华支睾吸虫 3~4 条, 加入不同浓度的上述药物, 于药物处理后 1、4、24、48 和 72 h, 在倒置显微镜下观察成虫的活动和形态变化。结果 吡喹酮可迅速减弱华支睾吸虫的活动, 使口吸盘丧失吸附皿壁能力, 虫体蜷缩、皮层出现空泡。吡喹酮对华支睾吸虫的最低致死浓度为 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 。三苯双脒 0.5、1 和 10 $\mu\text{g/ml}$ 组虫体接触药物后迅速麻痹伸直呈松弛状。三苯双脒对华支睾吸虫的最低致死浓度为 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 。左旋咪唑 10 和 20 $\mu\text{g/ml}$ 组华支睾吸虫的活动经药物作用后逐渐减弱, 虫体松弛, 但 48 h 后, 大部分虫体和口吸盘明显恢复活动。左旋咪唑的浓度高达 50 $\mu\text{g/ml}$ 时, 虫体立即伸直麻痹, 其表现与三苯双脒组相仿。蒿甲醚和青蒿琥酯 10 $\mu\text{g/ml}$ 和 50 $\mu\text{g/ml}$ 组虫体和口吸盘的活动减弱, 虫体收缩, 继而松弛, 体表出现空泡, 培养 72 h 后两组均有半数以上虫体死亡。阿苯达唑和甲苯达唑 10 $\mu\text{g/ml}$ 和 50 $\mu\text{g/ml}$ 组华支睾吸虫除口吸盘在培养的 24 h 内呈兴奋的伸缩活动外, 未见其他变化, 培养 72 h 内无虫死亡。结论 吡喹酮和三苯双脒对体外培养的华支睾吸虫具有很强的杀死作用; 左旋咪唑对华支睾吸虫最低致死浓度为三苯双脒的 50 倍; 较高浓度的蒿甲醚和青蒿琥酯有较缓慢抑制虫体活动的作用, 并可杀死部分成虫; 较高浓度的阿苯达唑和甲苯达唑无杀虫作用, 仅见口吸盘兴奋。

【关键词】 华支睾吸虫; 体外培养; 吡喹酮; 三苯双脒; 左旋咪唑; 青蒿琥酯; 蒿甲醚; 阿苯达唑; 甲苯达唑

中图分类号: R383.22

文献标识码: A

In Vitro Effect of Seven Anthelmintic Agents against Adult *Clonorchis sinensis*

XU Li-li, XUE Jian, ZHANG Yong-nian, QIANG Hui-Qin, XIAO Shu-hua*

(National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention; Key Laboratory of Parasite and Vector Biology, MOH; WHO Collaborating Center for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China)

【Abstract】 Objective To observe the in vitro effect of praziquantel, tribendimidine, levamisole, artemether, artesunate, albendazole and mebendazole against adult *Clonorchis sinensis*. Methods Seventy rats infected with 50-100 *C. sinensis* metacercariae for 5-7 weeks were euthanized, and adult *C. sinensis* were collected from the common bile duct. Three to four worms were placed in each well of a 24-well falcon plate, and treated by Hanks' balanced salt solution-20% calf serum containing aforementioned drugs at various concentrations. The motor activity and morphology change of the worms were observed under an inverted microscope at 4, 24, 48 and 72 h post treatment. Results Praziquantel could reduce the motor activity of the worms rapidly which resulted in detachment of oral sucker from the well wall, curl of the worm body and emergence of vacuoles from the tegument. The minimal concentration of praziquantel to kill adult *C. sinensis* was 0.1 $\mu\text{g/ml}$. After adult *C. sinensis* exposed to tribendimidine at concentrations of 0.5, 1 and 10 $\mu\text{g/ml}$, they revealed in paralysis, looseness and stretch of the worm body rapidly or immediately. The minimal concentration of tribendimidine to kill adult worms was 0.05 $\mu\text{g/ml}$. When worms exposed to levamisole at 10 and 20 $\mu\text{g/ml}$, there was a gradual decrease in the worm's motor activity accompanied by looseness of the worm body. But 48 h post exposure, most worms showed apparently recovery of motor activity. In a higher levamisole concentration of 50 $\mu\text{g/ml}$, all worms revealed in stretch and paralysis which was similar to that induced by tribendimidine. When adult *C. sinensis* were exposed to artemether or artesunate 10 and 50 $\mu\text{g/ml}$, the motor activity of worm body and oral sucker reduced which accompanied by worm contraction, then followed by looseness of the worm body and emergence of vacuoles along the tegument. At 72 h post exposure, the worm mortalities induced by the two concentrations of the two drugs were about half, respectively. In adult

作者单位: 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 上海 200025

* 通讯作者, E-mail: shxiao4@hotmail.com

C. sinensis exposed to albendazole and mebendazole at concentrations of 10 and 50 $\mu\text{g/ml}$, only stimulation of motor activity of oral sucker was seen which revealed in vigorous contraction within 24 h post exposure. During 72 h observation period, no any other changes in worm activity and morphology were seen. Conclusion Praziquantel and tribendimidine exhibit strong in vitro killing effect on adult *C. sinensis*. The minimal concentration of levamisole used to kill adult worm is 50 times higher than that of tribendimidine. The higher concentrations of artemether and artesunate show slower action to reduce the worm activity and kill part of the worms. Higher concentrations of albendazole and mebendazole exhibit no killing effect on *C. sinensis*, besides stimulating the motor activity of worm oral sucker.

【Key words】 Clonorchis sinensi; In vitro culture; Praziquantel; Tribendimidine; Levamisole; Artemether; Artesunate; Albendazole; Mebendazole

* Corresponding author, E-mail: shxiao4@hotmail.com

根据第二次全国人体寄生虫病分布调查的估算,我国华支睾吸虫感染人数达 1249 万^[1],华支睾吸虫病已成为亟待加强防治的重要寄生虫病之一。目前,用于治疗华支睾吸虫感染的药物主要是吡喹酮,根据世界卫生组织推荐的适宜剂量疗程是 25 mg/kg, 3 次/d, 连服 2 d^[2]。该疗法虽有较好的疗效,但在大规模群体治疗中应用有一定难度。因此,需继续寻求新的抗华支睾吸虫药物^[3]。

20 世纪 80 年代初曾报道蒿甲醚多剂给药对感染华支睾吸虫的大鼠有效^[4],近年来通过一系列动物实验发现,顿服单剂三苯双脒、蒿甲醚、青蒿琥酯、阿苯达唑和甲苯达唑均有很好的抗华支睾吸虫作用^[5,6],特别是三苯双脒不仅有抗华支睾吸虫成虫的作用,对童虫亦有很好的杀伤作用。同时,用感染华支睾吸虫的大鼠和仓鼠进行比较试验,证实三苯双脒的疗效优于吡喹酮^[7]。此外,据报道阿苯达唑和甲苯达唑治愈感染华支睾吸虫大鼠的剂量,较吡喹酮约小 1/2 以上^[6]。为进一步了解不同类型药物抗华支睾吸虫的作用,本研究应用吡喹酮、三苯双脒、左旋咪唑、蒿甲醚、青蒿琥酯、阿苯达唑和甲苯达唑对体外培养的华支睾吸虫的疗效进行观察。

材料与方 法

1 华支睾吸虫来源

自广西横县华支睾吸虫病流行区捕捉感染华支睾吸虫囊蚴的麦穗鱼,取鱼肉,按文献^[7]方法分离华支睾吸虫囊蚴,镜下计数,移至小管中备用。

2 实验动物

70 只雄性 SD 大鼠,清洁级,体重 80~100 g,购自中国科学院上海实验动物中心。每鼠口服感染华支睾吸虫囊蚴 50~100 个。试验期间大鼠可自由饮水取食。

3 药品来源及其溶液配制

3.1 药品 吡喹酮购自上海第六制药厂(PZQ,批号为 041106),三苯双脒由山东新华制药股份有限公司提供(TBD,批号为 051102),左旋咪唑为西南药业股份有限公司产品(LM,批号为 66040003),青蒿琥酯和蒿甲醚分别由桂林制药股份有限公司(AS,批号 021205)和昆明制药股份有限公司(AM,批号为 20001016)赠予,阿苯达唑和甲苯达唑购自陕西汉江药业集团有限公司(Alb 和 Meb,批号分别为 041001 和 0702022-710)。

3.2 浓度梯度 根据预试验,蒿甲醚、青蒿琥酯、阿苯达唑和甲苯达唑药物浓度梯度为 1、10、20 和 50 $\mu\text{g/ml}$,吡喹酮、三苯双脒和左旋咪唑为 0.05、0.1 和 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 。

3.3 药物溶液配制

3.3.1 蒿甲醚、青蒿琥酯和吡喹酮 将 1 mg 药物溶于 0.6 ml 二甲基亚砜(DMSO)中,待溶解后,在搅拌下滴加亨氏盐平衡溶液(HBSS) 0.4 ml,则药物浓度为 1 mg/ml,而溶剂 DMSO 的浓度为 60%,即为各药的储备液,根据试验需要用 HBSS 将储备液稀释至不同浓度,以 3% DMSO 为溶剂对照。

3.3.2 左旋咪唑 取盐酸左旋咪唑 1 片(25 mg/片,每片含左旋咪唑基质 21.2 mg),将其磨研成细粉,然后加入 HBSS 21.1 ml,使盐酸左旋咪唑溶解,离心后取上清备用,则左旋咪唑储备液的浓度为 1 mg/ml。

3.3.3 三苯双脒、阿苯达唑和甲苯达唑 取三苯双脒 1 mg,溶于 1 ml 二甲基甲酰胺(DMF)中,药物储备液浓度为 1 mg/ml,以 1% DMF 为溶剂对照。取阿苯达唑和甲苯达唑 2 mg,各溶于 1 ml 的 DMF 中,则此药物储备液的浓度为 2 mg/ml,以 2.5% DMF 为溶剂对照。

4 华支睾吸虫成虫的采集和体外试验

大鼠感染华支睾吸虫囊蚴 5~7 周后吸入 CO_2 处死,剖腹,胆总管挑取华支睾吸虫成虫,置于含无菌生理盐水的小培养皿中,用无菌生理盐水洗涤 4~5

次, 备用。华支睾吸虫的培养液为含 20% 小牛血清的 HBSS (含 0.4% 葡萄糖, 青霉素和链霉素各 100 U/ml, 二性霉素 B 0.125 μg/ml)。用 24 孔板培养华支睾吸虫, 每孔加入培养液 1.9~2.0 ml, 华支睾吸虫成虫 3~4 条, 置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱内培养 1~2 h, 待虫体活动正常后加入药液, 各药所用的终浓度按总容量 2.0 ml 计算。试验重复进行 3~5 次。上述各培养孔于加药后 1、4、24、48 和 72 h, 置于倒置显微镜 (CK×41, 日本 Olympus 公司) 下观察成虫的活动情况, 以及虫的皮层和内部结构的变化。若虫体在高倍镜下持续观察 2 min 无活动, 则判定为死亡。

结 果

1 吡喹酮抗华支睾吸虫的情况

用含 0.6% DMSO 的 HBSS-20% 小牛血清培养 3 d 的虫体活动和形态与培养在无溶剂培养液对照组的相似。吡喹酮 0.05 μg/ml 组的华支睾吸虫活动与溶剂对照组的相仿。培养 24 h 后, 部分成虫活动减慢, 稍有卷缩, 口吸盘可伸缩自如, 但均未能吸附皿壁, 至 72 h 后, 存活 9 条虫。

吡喹酮 0.1、0.5 和 1 μg/ml 组, 成虫接触药液后立即强烈收缩、卷缩, 虫体明显缩小, 活动缓慢, 而口吸盘的活动则迅速减弱和消失, 并从吸附的皿壁上脱落。虫体在强烈收缩持续约 1 min 后即见缓慢松弛, 但未能恢复明显活动。

吡喹酮 10 μg/ml 组, 接触药液后虫体立即蜷缩, 口吸盘和体部均无活动, 并维持较长时间, 培养 1 h 后,

虫的体表出现大小不一的圆形透明空泡, 散在分布。

吡喹酮 0.1 μg/ml 组, 10 条成虫经培养 24 h 后, 有 5 条虫死亡, 72 h 后, 累计死亡虫数为 7 条, 存活的 3 条虫明显缩小, 虫体活动缓慢, 体表部分空泡破裂, 口吸盘仅偶有微缩。0.5、1 和 10 μg/ml 吡喹酮组中的 9、13 和 13 条成虫培养 4 h 后分别有 4、5 和 9 条虫死亡; 72 h 后, 3 组虫全部死亡 (表 1), 死虫内部结构模糊, 体表有破溃。

2 三苯双脒和左旋咪唑抗华支睾吸虫的情况

用含 1% DMF 的 HBSS-20% 小牛血清培养 3 d 的华支睾吸虫的活动和形态与培养在不含溶剂的培养液对照组的虫相仿。

三苯双脒 0.05 μg/ml 组培养约 1 h 后, 虫体活动逐渐减慢, 口吸盘丧失吸附能力从皿壁上脱落, 但仍可缓慢伸缩, 虫体松弛伸直和微动。培养 24 h 后, 8 条虫中有 3 条死亡, 其余虫体活动微弱, 呈伸直状; 培养 48 h 后, 余 5 条虫亦全部死亡。未见死亡虫体体表有明显损害, 但肠管膨大。

三苯双脒 0.1 μg/ml 和 0.5 μg/ml 组的虫体接触药液后, 迅速伸直、麻痹不动或偶有微动, 1 h 后即有虫死亡, 4 h 后多数虫已死亡 (表 1)。

在三苯双脒较高浓度 1 μg/ml 和 10 μg/ml 组的华支睾吸虫接触药液后, 立即麻痹不动, 肠管膨大, 培养 1 h 时, 全部虫被判定为死亡。

左旋咪唑各组虫体形态与活动均与对照组相似。药物浓度增至 10 μg/ml 和 20 μg/ml, 培养 1 h 后, 两

表 1 三苯双脒、吡喹酮和左旋咪唑体外抗华支睾吸虫作用
Table 1 In vitro effect of tribendimidine (TBD), praziquantel (PZQ) and levamisole (LM) against *Clonorchis sinensis*

组别 Group	试验虫数 No. worms	死亡虫数 No. dead worms				
		1 h	4 h	24 h	48 h	72 h
对照 Control	20	0	0	0	0	0
二甲基亚砜 DMSO 3%	8	0	0	0	0	0
二甲基甲酰胺 DMF 1%	11	0	0	0	0	0
吡喹酮 PZQ	0.05 μg/ml	10	0	0	1	1
	0.1 μg/ml	10	0	5	7	7
	0.5 μg/ml	9	0	4	9	9
	1 μg/ml	13	0	5	11	13
	10 μg/ml	13	1	9	13	13
三苯双脒 TBD	0.05 μg/ml	8	0	0	3	8
	0.1 μg/ml	9	4	8	8	9
	0.5 μg/ml	13	2	13	13	13
	1 μg/ml	13	13	13	13	13
	10 μg/ml	13	13	13	13	13
左旋咪唑 LM	0.05 μg/ml	9	0	0	0	0
	0.1 μg/ml	9	0	0	0	0
	0.5 μg/ml	9	0	0	0	0
	1 μg/ml	21	0	0	0	0
	10 μg/ml	22	0	0	0	1
	20 μg/ml	10	0	0	0	1
	50 μg/ml	8	8	8	8	8

组虫的活力逐渐减弱, 吸附皿壁的口吸盘脱落, 虫体松弛, 活动缓慢, 继而伸直不动, 呈麻痹状态, 或仅偶有极微弱的摆动, 并维持较长时间, 培养 48 h 后, 部分麻痹的成虫逐渐恢复活动, 口吸盘出现缓慢伸缩, 72 h 后, 在该两种浓度下受试的 22 条和 10 条虫中, 除各有 1 条虫死亡外, 其余虫均有明显活动, 但口吸盘不能吸附皿壁。华支睾吸虫在左旋咪唑 50 $\mu\text{g/ml}$ 高浓度中立即伸直麻痹, 培养 1 h 后, 8 条虫均判定死亡, 观察至 72 h, 除肠管膨大未见其他变化。

3 蒿甲醚和青蒿琥酯抗华支睾吸虫的情况

在含 3% DMSO 的 HBSS-20% 小牛血清中的华支睾吸虫活动如常, 与不含溶剂的培养液对照组的虫相仿。

蒿甲醚或青蒿琥酯 1 $\mu\text{g/ml}$ 两组未见虫体活动异常。当其浓度增至 10 $\mu\text{g/ml}$ 时两组虫体活动减慢, 继而虫体收缩, 约 1 min 后, 虫的体部缓慢松弛, 但未能恢复至原状, 并持续呈轻度收缩, 其中有部分虫体从吸附的皿壁脱落, 但口吸盘仍有一些伸缩活动, 培养 1~3 d 后绝大部分虫的口吸盘除有缓慢的缩动外, 皆不能吸着皿壁, 口吸盘处呈青灰色, 皮层有空泡出现, 虫体浑浊, 内部结构模糊。

两药 50 $\mu\text{g/ml}$ 组, 接触药物后成虫立即强烈收缩, 活动明显抑制, 培养 24 h 后, 虫体后部因强烈挛缩而增宽使虫体呈三角形, 口吸盘皆不能吸着皿壁, 仅偶见有微弱缩动。未见虫的内部结构有明显变化, 但在整个虫体体表有空泡形成, 空泡壁薄, 呈透明状, 大小不一。培养 48 h 和 72 h 后, 有些空泡破裂, 但少数空泡增大, 同时在虫体周围有絮状沉淀物, 可能是破裂空泡的受损皮层碎屑。

两药 10 $\mu\text{g/ml}$ 组, 培养 24 h 后, 虽然虫的活动和形态均有变化, 但未见死亡。培养 48 h 后, 两组分别有 5 和 6 条虫死亡, 培养 72 h 后各组有近半数的虫死亡。当药物浓度增至 50 $\mu\text{g/ml}$, 培养 24 h 后, 各组的 20 条虫中各有 4 和 6 条虫死亡; 培养 72 h 后, 死亡虫数分别增至 12 和 15 条(表 2)。

表 2 蒿甲醚和青蒿琥酯体外抗华支睾吸虫的作用

Table 2 In vitro effect of artemether (AM) and artesunate (AS) against *Clonorchis sinensis*

组别 Group	试验虫数 No. worms	死亡虫数 No. dead worms		
		24 h	48 h	72 h
对照 Control	26	0	0	0
二甲基亚砷 DMSO 3%	20	0	0	0
蒿甲醚 AM	1 $\mu\text{g/ml}$	11	0	0
	10 $\mu\text{g/ml}$	19	0	5
	50 $\mu\text{g/ml}$	20	4	9
青蒿琥酯 AS	1 $\mu\text{g/ml}$	12	0	0
	10 $\mu\text{g/ml}$	20	2	6
	50 $\mu\text{g/ml}$	20	6	10

4 甲苯达唑和阿苯达唑抗华支睾吸虫的情况

含 2.5% DMF 的 HBSS-20% 小牛血清中培养 3 d, 华支睾吸虫的活动与对照组相仿。

甲苯达唑和阿苯达唑对体外培养的华支睾吸虫的作用相似, 阿苯达唑和甲苯达唑 1 $\mu\text{g/ml}$ 和 10 $\mu\text{g/ml}$ 组培养 1 h 后, 口吸盘皆从吸附的皿壁上脱落, 且口吸盘频繁伸长及左右急速摆动, 呈兴奋状, 但虫体活动未见明显异常; 培养 24 h 后, 口吸盘兴奋活动明显减弱或消失, 有的表现为伸缩活动明显减少, 经培养 72 h 后, 除虫体和口吸盘的活动有所减弱外, 未见虫体形态有明显变化。甲苯达唑和阿苯达唑的浓度高达 50 $\mu\text{g/ml}$ 时, 对华支睾吸虫的作用与 10 $\mu\text{g/ml}$ 组的相似, 但对口吸盘和体部均有兴奋作用, 部分虫体明显伸长, 持续长达 72 h, 但均未死亡(表 3)。

讨 论

吡喹酮是目前惟一用于治疗华支睾吸虫病的药物。有研究报道, 体外试验的华支睾吸虫成虫与吡喹酮 1~100 $\mu\text{g/ml}$ 接触均迅速丧失活动能力, 浓度低至 0.01 $\mu\text{g/ml}$, 则在 24 h 后仅有微弱活动, 浓度为 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 则可引起虫体收缩和死亡^[9,10], 这与本研究的结果相仿。0.05 $\mu\text{g/ml}$ 吡喹酮对华支睾吸虫成虫无致死作用, 其最低有效浓度为 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 。已知 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 吡喹酮即可引起血吸虫活动减弱和虫体挛缩^[11], 浓度增

表 3 甲苯达唑和阿苯达唑体外抗华支睾吸虫的作用

Table 3 The in vitro effect of albendazole (Alb) and mebendazole (Meb) against *Clonorchis sinensis*

组别 Group	试验虫数 No. worms	兴奋的虫数 No. exciting worms				
		1 h	4 h	24 h	48 h	72 h
对照 Control	12	0	0	0	0	0
二甲基甲酰胺 DMF(2.5%)	12	0	0	0	0	0
甲苯达唑 Meb	1 $\mu\text{g/ml}$	12	5	3	3	0
	10 $\mu\text{g/ml}$	13	7	7	6	1
	50 $\mu\text{g/ml}$	12	12	9	8	6
阿苯达唑 Alb	1 $\mu\text{g/ml}$	13	6	4	2	0
	10 $\mu\text{g/ml}$	13	9	8	8	3
	50 $\mu\text{g/ml}$	12	12	11	9	7

至 0.1~10 $\mu\text{g/ml}$ 则可出现皮层空泡变化和死亡^[12]。然而吡喹酮对华支睾吸虫活动无明显兴奋和强烈挛缩虫体的作用, 出现皮层空泡损害亦较缓慢, 表明吡喹酮对两种吸虫的作用有差异。

吡喹酮体外抗华支睾吸虫的有效浓度与抗血吸虫的相仿, 但临床顿服吡喹酮 40 mg/kg 治疗血吸虫病即有较好的疗效, 而用以治疗华支睾吸虫感染的则为每次 25 mg/kg, 3 次/d, 连服 2 d, 总剂量 (150 mg/kg) 约为治疗血吸虫病的 4 倍。这可能是口服吡喹酮自肠道吸收通过肝脏的首过效应强, 以致胆汁的药物浓度较血浆的明显为低^[13], 而寄居在肠系膜静脉的血吸虫则可直接受到自肠道吸收的较高浓度吡喹酮的作用。

三苯双脒是我国研制的氨基苯脒类新药, 已用于抗肠道线虫, 特别是蛔虫和钩虫感染。其后在动物试验中发现三苯双脒具有抗多种吸虫, 特别是抗华支睾吸虫的作用, 而且单剂顿服对感染华支睾吸虫的大鼠和仓鼠的疗效优于吡喹酮^[5,7,14,15]。通过秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 的三苯双脒抗性株的遗传学、分子生物学和药物交叉抗性的试验研究, 证明三苯双脒与左旋咪唑和噻嘧啶同属 L-亚型烟碱样胆碱受体激动剂^[8], 故 1 $\mu\text{g/ml}$ 三苯双脒作用华支睾吸虫, 迅即伸直麻痹不动, 即使浓度低至 0.05 $\mu\text{g/ml}$, 虫体的活力亦逐渐减弱, 甚至麻痹、死亡, 表明三苯双脒的体外杀虫作用较吡喹酮为强。体外试验华支睾吸虫经三苯双脒作用后, 在光镜下, 除肠管扩大外, 未见其他形态学的变化。但在三苯双脒治疗感染华支睾吸虫大鼠试验中, 用扫描电镜观察则示虫体的皮层, 口、腹吸盘皆明显受损^[16], 同时, 感染大鼠用三苯双脒治疗后 4~8 h 即不易在胆总管内查获虫体, 这可能是麻痹的虫体不能吸附在胆管壁并随胆汁进入十二指肠。业已证明, 人口服三苯双脒自肠道吸收时已代谢为氨脒和乙酰氨脒^[17,18], 其中前者的体外抗华支睾吸虫的作用与三苯双脒相仿, 后者则明显减低。然而三苯双脒、氨脒和乙酰氨脒三者的体内试验的疗效均相似, 表明三苯双脒治疗华支睾吸虫感染, 主要是其代谢物起作用^[9]。

鉴于左旋咪唑作用机制与三苯双脒相同, 也进行了体外抗华支睾吸虫的观察。结果表明, 左旋咪唑立即麻痹和致华支睾吸虫死亡的浓度为 50 $\mu\text{g/ml}$, 是三苯双脒的 50 倍, 浓度为 10~20 $\mu\text{g/ml}$ 时虽可使虫的活动减弱, 但在培养的 3 d 内明显恢复。因此, 三苯双脒和左旋咪唑抗秀丽隐杆线虫的机制相仿, 可能是秀丽隐杆线虫的 nAChR 受体对上述两种药物的敏感性相仿, 而华支睾吸虫的相应受体对左旋咪唑不敏感可能是体外试验中两种药物作用差异的主要原因^[8]。

近年来的研究表明, 感染华支睾吸虫的大鼠顿服

青蒿素衍生物蒿甲醚和青蒿琥酯的剂量低至 37.5 mg/kg 即有高效^[5]。蒿甲醚体内治疗试验中, 华支睾吸虫扫描电镜观察, 其皮层和吸盘均明显受损害^[16]。但在体外试验中, 该两种药物 1 $\mu\text{g/ml}$ 对华支睾吸虫并无明显作用, 浓度增至 10 $\mu\text{g/ml}$ 始见虫的活动减弱, 虫体呈轻度收缩状, 而浓度达 50 $\mu\text{g/ml}$ 时, 虽虫体部呈强烈收缩和体表有空泡变化, 但在培养观察期间仅约半数虫死亡, 这与体内治疗试验的高效结果有很大差距。已知大鼠口服蒿甲醚和青蒿琥酯的生物利用度仅为 19%~35%^[20], 故口服给予此两种药物的小剂量难以达到和维持上述体外对华支睾吸虫有明显作用的药物浓度, 同时, 本研究观察到它们的代谢物双氢青蒿素的抗虫作用与上述相仿; 再则蒿甲醚和青蒿琥酯转换为双氢青蒿素的百分率不同, 分别为 3.7%~12.4% 和 25.3%~72.2%^[20], 排除了双氢青蒿素起主要治疗作用的可能性。一般认为, 疟原虫和血吸虫均需摄取红细胞, 消化血红蛋白, 产生血色素, 故蒿甲醚抗疟原虫和血吸虫具有相同的作用机制, 即蒿甲醚的内过氧桥可被血红素的 Fe^{2+} 所断裂, 释放自由基, 从而引发一系列生化反应, 使虫体受损而死亡^[21,22]。与疟原虫、血吸虫不同, 华支睾吸虫寄生在胆管系统内, 并不摄取红细胞, 因此蒿甲醚和青蒿琥酯抗华支睾吸虫与抗血吸虫、抗疟原虫的作用机制是否不同, 或除双氢青蒿素外, 是否还有其他代谢物起作用, 尚待阐明。

20 世纪 80 年代, 国内即有报道阿苯达唑治疗华支睾吸虫病有效^[23], 其后通过进一步的临床试验, 认为阿苯达唑的 7 d 长疗程有效, 而 3 d 疗程的效果差^[24], 但亦有认为较好的疗效亦见于阿苯达唑的大剂量短疗程^[25]; 再则, 在动物实验方面亦认为阿苯达唑对大鼠和犬的华支睾吸虫感染有效^[24], 至 2005 年又用大鼠测定了吡喹酮、阿苯达唑和另一抗肠道线虫的苯并咪唑类药物甲苯达唑对华支睾吸虫感染的治愈剂量, 指出后两种药物的顿服治愈剂量均为 150 mg/kg, 较吡喹酮的 375 mg/kg 少 1/2 以上^[6]。但本研究阿苯达唑和甲苯达唑体外试验结果显示, 仅在浓度 1 $\mu\text{g/ml}$ 时, 华支睾吸虫才发生口吸盘活动兴奋, 频繁伸缩, 即使两种药物的浓度增至 50 $\mu\text{g/ml}$, 除口吸盘的活动兴奋持续较长时间外, 未见其他异常, 在观察期间内亦无虫死亡。迄今认为苯并咪唑类药物系作用于微管蛋白, 抑制虫对葡萄糖的摄取和抑制延胡索酸还原酶, 阻止三磷酸腺苷的产生有关^[26], 这是否也适用于其抗吸虫的作用尚不清楚, 但扫描电镜观察结果表明, 感染华支睾吸虫大鼠用阿苯达唑治疗后 24 h, 虫的皮层始见有损害^[27]。据此推断, 阿苯达唑起治疗作用, 可能是虫体兴奋使口吸盘因不能吸附胆管壁, 随

胆汁排出胆管, 或摄入的药物在虫体内缓慢代谢为对虫体有损害作用的代谢物。

志谢 感谢国家科技重大专项项目 2009ZX10004-302 基于功能基因组的重要寄生虫防治基础科研支撑平台给与的帮助, 特致谢忱。

参 考 文 献

- [1] Coordinating Office of the National Survey on the Important Human Parasitic Diseases. A national survey on current status of the important parasitic diseases in human population[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2005, 23(5 Suppl): 332-339. (in Chinese)
(全国人体重要寄生虫病现状调查办公室. 全国人体重要寄生虫病现状调查报告[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23(5 增刊): 332-339.)
- [2] WHO Study Group on the Control of Foodborne Trematode Infections. Control of foodborne trematode infections. Report of a WHO study group[R]. Geneva: World Health Organization, 1995: 1-157.
- [3] Xiao SH, Xue J, Wu ZX. Experimental study progress on tribendimidine, artemether and artesunate against *Clonorchis sinensis* and other trematodes[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2009, 27(1): 65-69. (in Chinese)
(肖树华, 薛剑, 吴中兴. 三苯双脒、青蒿琥酯和蒿甲醚抗华支睾吸虫及其他吸虫的实验研究进展[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2009, 27(1): 65-69.)
- [4] Chen RX, Qu ZQ, Zeng MA, et al. Effects of qinghaosu and its derivatives on *Clonorchis sinensis* in rats[J]. Chin Pharm Bull, 1983, 18(10): 410-411. (in Chinese)
(陈荣信, 屈振麒, 曾明安, 等. 青蒿素及其衍生物驱大鼠华支睾吸虫的观察[J]. 药学通报, 1983, 18(10): 410-411.)
- [5] Xiao SH, Xue J, Tanner M, et al. Artemether, artesunate, praziquantel and tribendimidine administered singly at different dosages against *Clonorchis sinensis*: A comparative in vivo study[J]. Acta Trop, 2008, 106(1): 54-59.
- [6] Fan PC, Wu CC, Huang P, et al. Determination of the minimum effective dosages of praziquantel, albendazole and mebendazole against *Clonorchis sinensis* infection in rats[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2005, 21(10): 448-451.
- [7] Xue J, Xu LL, Qiang HQ, et al. The effect of tribendimidine, artesunate and praziquantel on golden hamster infected with *Clonorchis sinensis*[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2009, 27(3): 215-218. (in Chinese)
(薛剑, 徐莉莉, 强慧琴, 等. 三苯双脒、青蒿琥酯和吡喹酮治疗感染华支睾吸虫金色仓鼠的疗效观察[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2009, 27(3): 215-218.)
- [8] Hu Y, Xiao SH, Aroian R. The new anthelmintic tribendimidine is an L-type (levamisole and pyrantel) nicotinic acetylcholine receptor agonist[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2009, 3(8): e499.
- [9] Rim HJ, Jo SW, Joo KH, et al. In vitro activities of various drugs against adult worms of *Clonorchis sinensis*[J]. Kisaengchung-hak Chapchi, 1980, 18(2): 185-191.
- [10] 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*[J]. Arzneimittelforschung, 1983, 33(1): 91-98.
- [11] Xiao SH, Shao BR, Xu RQ. The in vitro effect of "Pyquiton" on *Schistosoma japonicum*[J]. Acta Pharma Sin, 1980, 15(2): 105-107. (in Chinese)
(肖树华, 邵葆若, 徐月琴. 吡喹酮对体外培养的日本血吸虫的作用[J]. 药学报, 1980, 15(2): 105-107.)
- [12] You JQ, Xiao SH, Yue WJ. Effect of praziquantel in vitro on different developmental stages of *Schistosoma japonicum*[J]. Acta Pharmacol Sin, 1986, 7(1): 82-84. (in Chinese)
(尤纪青, 肖树华, 乐文菊. 体外不同发育期的日本血吸虫对吡喹酮的敏感性[J]. 中国药理学报, 1986, 7(1): 82-84.)
- [13] Huang Y, Quan YZ, Tu ZG. The pharmaceuticals and biliary excretion of praziquantel in rats by different route of administration [J]. Acta Pharmacol Sin, 1991, 7(3): 206-209. (in Chinese)
(黄永, 全钰珠, 涂植光. 吡喹酮不同途径给药在大鼠体内药代动力学及自胆汁中的排泄[J]. 中国药理学报, 1991, 7(3): 206-209.)
- [14] Xiao SH, Wu HM, Tanner M, et al. Tribendimidine: a promising, safe and broad-spectrum anthelmintic agent from China[J]. Acta Trop, 2005, 94(1): 1-14.
- [15] Xiao SH. Further clinical observation on tribendimidine against intestinal helminth infection and the new progress in laboratory study[J]. Inter J Med Parasit Dis, 2009, 36(4): 194-200. (in Chinese)
(肖树华. 三苯双脒抗肠道蠕虫感染的进一步临床观察和实验研究的新进展[J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2009, 36(4): 194-200.)
- [16] Xiao SH, Keiser J, Xue J, et al. Effect of single-dose oral artemether and tribendimidine on the tegument of adult *Clonorchis sinensis* in rats[J]. Parasitol Res, 2008, 104(3): 533-541.
- [17] Yuan GY, Wang BJ, Wei CM, et al. LC-MS determination of p-(1-dimethyl-aminoethylimino)aniline: a metabolite of tribendimidine in human plasma[J]. Chromatographia, 2008, 68(12): 139-142.
- [18] Yuan GY, Wei CM, Wang BJ, et al. Metabolism and excretion of tribendimidine in healthy human volunteers[J]. Chin J New Drugs Clin Rem, 2008, 27(9): 667-670. (in Chinese)
(袁桂艳, 魏春敏, 王本杰, 等. 人尿液三苯双脒代谢物浓度测定及其排泄动力学研究[J]. 中国新药与临床杂志, 2008, 27(9): 667-670.)
- [19] Xiao SH, Xue J, Xu LL, et al. The in vitro and in vivo effect of tribendimidine and its metabolites against *Clonorchis sinensis* [J]. Parasitol Res, 2009, 105(6): 1497-507.
- [20] Li QG, Peggins JO, Fleckenstein LL, et al. The pharmacokinetics and bioavailability of dihydroartemisinin, artemether, artesunic acid and arteminic acid in rats[J]. Pharm Pharmacol, 1998, 50(2): 173-182.
- [21] Meshnick SR. The mode of action of antimalarial endoperoxides [J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1994, 88(Suppl 11): 31-32.
- [22] Xiao SH, Wu YL, Tanner M, et al. Schistosoma japonicum: in vitro effects of artemether combined with haem in depend on cultivation media and appraisal of artemether products appearing in the media[J]. Parasitol Res, 2003, 89(6): 459-466.
- [23] Cao WJ, Zhong HL, Feng ML. Treatment of clonorchiasis sinensis with albendazole: 50 cases[J]. Chin Intern Med J, 1985, 24(6): 353-354.
(曹维霖, 钟惠澜, 冯曼玲. 丙硫咪唑治疗华支睾吸虫病 50 例观察[J]. 中华内科杂志, 1985, 24(6): 353-354.)
- [24] Liu YH, Wang XG, Gao P, et al. Experimental and clinical trial of albendazole in the treatment of clonorchiasis sinensis[J]. Chin Med J (Engl), 1991, 104(1): 27-31.
- [25] Liu YS, Wu YM, Du WP, et al. Comparison on the efficacy of albendazole and praziquantel against clonorchiasis[J]. Chin J Infect Dis, 1994, 12(2): 117-118. (in Chinese)
(刘宜升, 吴云明, 杜文平, 等. 阿苯达唑和吡喹酮治疗华支睾吸虫感染的比较[J]. 中华传染病杂志, 1994, 12(2): 117-118.)
- [26] Gao XJ, Li QZ. Research advance of mechanism of action of benzimidazole carbamate drugs on helminthes [J]. J Northeast Agr Univ, 2004, 35(4): 492-495. (in Chinese)
(高学军, 李庆章. 苯并咪唑氨基甲酸酯类抗蠕虫药物作用机理研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2004, 35(4): 492-495.)
- [27] Tang YH, Xiao XC, Liang XH, et al. Scanning electron microscopic observation on the effects of pyquiton and albendazole on the tegument of *Clonorchis sinensis*[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 1988, 6(2): 123-125. (in Chinese)
(唐永煌, 肖锡昌, 梁小虹, 等. 吡喹酮、阿苯达唑对华支睾吸虫体表作用的扫描电镜观察 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病志, 1988, 6(2): 123-125.)

(收稿日期: 2010-09-02 编辑: 衣凤芸)