

X线照射泡球蚴原头节的体外实验研究

包永星¹, 毛睿¹, 齐洪志¹, 张月芬¹, 倪雅琼¹, 谢增如¹, 阿孜古丽·吐尔逊², 温浩^{2*}

【摘要】 目的 探讨 X 线对体外培养的泡球蚴原头节的杀伤作用。方法 无菌采集子午沙鼠体内的泡球蚴中含原头节的囊液, 将其加入 RPMI 1640 培养液中培养。原头节体外培养 3 d 后分装至培养瓶中, 每组 10 瓶, 每瓶约含 10 000 个原头节, 设空白对照组、低剂量组(15 Gy 和 30 Gy)、中剂量组(45 Gy 和 60 Gy)、高剂量组(75 Gy 和 90 Gy)、阿苯达唑组(2 500 ng/ml)、45 Gy X 线+2 500 ng/ml 阿苯达唑组和 75 Gy X 线+2 500 ng/ml 阿苯达唑组。X 线照射剂量率为 200 cGy/min, 源皮距为 100 cm。体外培养第 4 天开始照射, 每组共照射 3 次, 每次间隔 1 d。首次照射后第 1 天开始每天取原头节培养液, 0.1%伊红染色, 光镜下计数每 100 个原头节中着色原头节数目, 每组计算 300 个原头节的平均死亡率, 直至实验组原头节全部死亡为止。同时光镜下观察经 X 线照射后原头节的变化。结果 不同放射剂量组的原头节死亡率与空白对照组间的差异均有统计学意义($P<0.05$)。阿苯达唑组原头节死亡率与放射线联合阿苯达唑组间的差异均有统计学意义($P<0.05$), 且显著高于空白对照组($P<0.05$)。其中, X 线联合阿苯达唑组与单用 X 线组原头节死亡率间的差异有统计学意义($P<0.05$)。X 线照射前原头节饱满、轮廓清晰、结构完整, X 线照射后的原头节多呈外翻型, 原头节顶突上的小钩排列紊乱, 部分脱落, 吸盘突起变形, 结构塌陷, 死亡。结论 X 线可在体外杀伤泡球蚴原头节。

【关键词】 多房棘球蚴; 原头节; X 线; 阿苯达唑; 体外实验

中图分类号: R383.33

文献标识码: A

X-ray Irradiation against *Echinococcus multilocularis* Protoscoleces *in vitro*

BAO Yong-xing¹, MAO Rui¹, QI Hong-zhi¹, ZHANG Yue-fen¹,
NI Ya-qiong¹, XIE Zeng-ru¹, Aziguli Tursun², WEN Hao^{2*}

(1 Cancer Center of the First Teaching Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China;
2 Clinical Institute of Hydatid Disease, the First Teaching Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

【Abstract】 **Objective** To explore the effect of X-ray irradiation on *Echinococcus multilocularis* protoscoleces *in vitro*. **Methods** *Echinococcus multilocularis* protoscoleces were collected from cysts of infected *Meriones meridianus* and then cultured in RPMI 1640 medium. Protoscoleces were subpackaged into culture flasks at a density of about 10^4 per flask after culture for 3 days. Each group has 10 culture flasks. There were seven groups named as blank control group, low dose group (15 Gy and 30 Gy), medium dose group (45 Gy and 60 Gy), high dose group(75 Gy and 90 Gy), albendazole group (2 500 ng/ml), 45 Gy X-ray+2 500 ng/ml albendazole group, and 75 Gy X-ray +2 500 ng/ml albendazole group. Protoscoleces received three radiations on every other day with a source-skin distance of 100 cm and at a dose rate of 200 cGy/min after 3 days in culture. At each day after irradiation, protoscoleces were counted by light microscope with 0.1% eosin staining, and calculated mortality rate (per 100 protoscoleces) until all the parasites in experimental groups died. At the same time, the morphological changes of protoscoleces were observed. **Results** There were significant differences in protoscolex mortality between X-ray groups and blank control group ($P<0.05$), between X-ray+albendazole groups and albendazole group ($P<0.05$). Protoscolex mortality in albendazole group were higher than that of blank control group($P<0.05$). Significant difference were also found in protoscolex mortality between albendazole combined with radiation and radiation only ($P<0.05$). Before radiation, protoscoleces was normal with complete structure. After radiation, the parasites were mostly valgus type protoscoleces with disordered rostellar hooks and deformed acetabulum, and finally died. **Conclusion** X-ray can kill *Echinococcus multilocularis* protoscoleces *in vitro*.

基金项目: 国家自然科学基金(No. 81060150); 新疆维吾尔自治区包虫病基础医学重点实验室开放课题项目(No. XJDX0202-2005-01)

作者单位: 1 新疆医科大学第一附属医院肿瘤中心, 乌鲁木齐 830054;

2 新疆医科大学第一附属医院新疆包虫病临床研究所, 乌鲁木齐 830054

* 通讯作者, E-mail: dr.wenhao@163.com

[Key words] *Echinococcus multilocularis*; Protoscolex; X ray; Albendazole; *In vitro*

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81060150) and a Fund for the Key Laboratory of Echinococcosis in Xinjiang Uygur Autonomous Region (No. XJDX0202-2005-01)

* Corresponding author, E-mail: dr.wenhao@163.com

棘球蚴病是棘球绦虫幼虫寄生于人体和家畜体内引起的一种人兽共患寄生虫病,新疆棘球蚴病感染率居全国之首。泡球蚴病属棘球蚴病的一种,其生物学特性与肿瘤相似,可发生于肝脏、脑部、肺和骨骼等部位,且容易转移扩散,故有“虫癌”之称。泡球蚴病以外科手术治疗为主,但泡球蚴中的原头节不易清除干净,术后复发率高,并发症多(8.8%~65.8%)^[1,2],患者常遭受多次手术的痛苦^[3]。目前泡球蚴病的主要治疗药物——阿苯达唑(albendazole, ABZ)存在口服吸收差、难以透过泡球蚴囊壁和病灶局部药物浓度低等问题,影响疗效,据统计其对泡球蚴病的治愈率仅为 30%^[4]。放射治疗是抗肿瘤治疗的重要手段之一,约 65%~75%的恶性肿瘤需使用放射治疗,同时放射治疗对部分良性病的疗效也获得了肯定^[5]。本研究采用 X 线对泡球蚴原头节进行体外照射,观察其对原头节的杀伤作用,为治疗泡球蚴病提供实验基础和新的治疗思路。

材料与方 法

1 材 料

1.1 实验动物和仪器 腹腔感染泡球蚴的子午沙鼠由新疆医科大学动物饲养中心提供,许可证号为 XJZZQ(XK)200301。显微镜/采图系统(Leica DM3000)为德国徕卡公司产品,直线加速器 6MV-X 线(2300C/D)为美国瓦里安公司产品。

1.2 主要试剂 小牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司, RPMI 1640 培养基购自美国 GIBCO 公司,青霉素、链霉素购自南京生兴生物技术有限公司。阿苯达唑脂质体(10 mg/ml)(批号为 090420)由新疆维吾尔自治区包虫病临床研究所药剂研究室制备,用 0.9%生理盐水稀释至 2 500 ng/ml,备用。

2 方 法

2.1 泡球蚴原头节的体外培养 从感染泡球蚴的子午沙鼠的泡球蚴囊中,无菌采集含原头节的囊液,加入青霉素和链霉素各 500 U/L,置 4 ℃沉淀 1~3 h。用 0.9%生理盐水(含 0.8×10^3 U/ml 青霉素和 0.001 g/ml 链霉素)清洗 3~5 次,活原头节占 95%以上,培养液为含 15%小牛血清的 RPMI 1640 培养基(含 2%青霉素和链霉素, pH 7.2~7.4)。置 37 ℃, 5% CO₂ 孵箱内培养。

2.2 实验分组 泡球蚴原头节体外培养 3 d 后分装至培养瓶中,每组 10 瓶,每瓶约含 10 000 个原头节。根据 X 线的有效剂量设为低、中、高剂量组。各剂量组又分为 2 个剂量组,为保证样本量,2 组合并统计。分别为空白对照组、低剂量组(15 Gy 和 30 Gy)、中剂量组(45 Gy 和 60 Gy)、高剂量组(75 Gy 和 90 Gy)、2 500 ng/ml 阿苯达唑脂质体对照组、45 Gy X 线+2 500 ng/ml 阿苯达唑脂质体组和 75 Gy X 线+2 500 ng/ml 阿苯达唑脂质体组。X 线照射剂量率为 200 cGy/min,源皮距为 100 cm。体外培养第 4 天开始照射,每组共照射 3 次,每次间隔 1 d。

首次 X 线照射后第 1 天开始,每天取 1 滴原头节培养液,用 0.1%伊红染色 5 min,在普通光镜下观察。判断原则:死亡原头节红染着色,伴有结构破坏且无活动性;活头节则拒染,不着色且有活动性。计数每 100 个原头节中着色原头节数目,以着色者占观察原头节的比例为原头节的死亡率,共计数 300 个,计算平均死亡率。每天计数 1 次,至实验组原头节全部死亡为止。同时观察原头节的变化。实验过程中不更换培养基。

3 统计 学 分 析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。将原头节死亡率进行平方根反正弦变换,再将其转变为角度值。采用重复测量资料的单变量方差分析法,符合球形性检验,在组内和组间进行两两比较。

结 果

1 不同剂量 X 线组原头节的死亡率

不同 X 线剂量组原头节死亡率与对照组间的差别有统计学意义($P < 0.05$),不同 X 线剂量组之间的差异无统计学意义($P > 0.05$)(表 1)。

2 阿苯达唑组与联合 X 线组原头节的死亡率

单用阿苯达唑组与 X 线联合阿苯达唑组原头节死亡率间的差异有统计学意义($P < 0.05$),且 45 Gy+阿苯达唑组与单用阿苯达唑组和单用 45 Gy X 线照射组原头节死亡率间的差异有统计学意义($P < 0.05$)。75 Gy+阿苯达唑组与单用阿苯达唑组和单用 75 Gy X 线照射组原头节死亡率间的差异均有统计学意义($P < 0.05$)(表 2)。

表 1 不同剂量 X 线组首次照射后 1~5 d 原头节死亡率
Table 1 Protoscolex mortality of X-ray groups with different doses at 1-5 d after the first irradiation

组别 Group	原头节死亡率/% Protoscolex mortality/%				
	d1	d2	d3	d4	d5
空白对照组 Blank control	22.3±4.0	30.0±2.0	44.0±4.6	56.0±4.0	75.0±5.0
低剂量组 (15 Gy 和 30 Gy)* Low dose (15 Gy and 30 Gy)*	42.5±4.6	57.8±5.8	63.3±4.9	79.8±3.3	100.0±0.0
中剂量组 (45 Gy 和 60Gy)* Medium dose (45Gy and 60Gy)*	47.8±4.4	58.3±6.5	66.2±10.5	74.8±8.9	100.0±0.0
高剂量组 (75 Gy 和 90 Gy)* High dose(75 Gy and 90 Gy)*	47.0±6.4	58.5±8.5	68.5±6.9	78.7±4.7	100.0±0.0

注: 与空白对照组相比, * P<0.05。 Note: vs blank control group, * P<0.05.

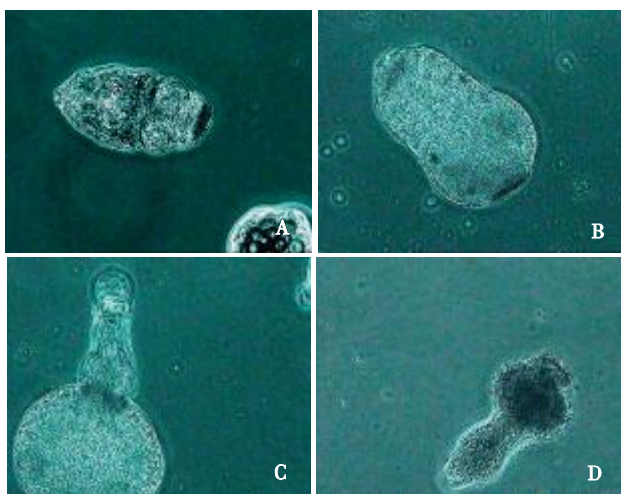
表 2 各组首次照射后 1~5 d 原头节死亡率
Table 2 Protoscolex mortality of different groups at 1-5 d after the first irradiation

组别 Group	原头节死亡率/% Protoscolex mortality/%				
	d1	d2	d3	d4	d5
空白对照组 Blank control	22.3±4.0	30.0±2.0	44.0±4.6	56.0±4.0	75.0±5.0
阿苯达唑组 ^a ABZ ^a	31.3±4.2	45.7±4.0	82.0±10.8	99.3±1.2	100.0±0.0
45 Gy X 线+阿苯达唑组 ^{bc} 45 Gy X-ray+ABZ ^{bc}	54.7±3.5	61.3±1.5	81.0±3.6	98.3±2.9	100.0±0.0
75 Gy X 线+阿苯达唑组 ^{bc} 75 Gy X-ray+ABZ ^{bc}	48.0±4.0	67.7±2.5	86.7±3.5	99.7±0.6	100.0±0.0
45 Gy X 线组 ^{ab} 45 Gy X-ray ^{ab}	48.3±2.5	60.0±2.0	62.0±11.5	73.7±7.1	100.0±0.0
75 Gy X 线组 ^{ab} 75 Gy X-ray ^{ab}	47.7±8.7	60.7±12.9	66.7±9.7	81.7±3.5	100.0±0.0

注: 与对照组比较, a P<0.05; 与阿苯达唑组比较, b P<0.05; 与 45 Gy X 线组比较, c P<0.05; 与 75 Gy X 线组比较, e P<0.05。
Note: vs control group, a P<0.05; vs ABZ group, b P<0.05; vs 45 Gy X-ray group, c P<0.05; vs 75 Gy X-ray group, e P<0.05.

3 X 线照射处理后原头节形态变化

观察发现, X 线照射前原头节饱满, 轮廓清晰, 结构完整 (图 1 A), 而 X 线照射后的原头节多呈外翻型, 原头节顶突上的小钩排列紊乱, 部分脱落, 吸盘突起变形, 结构塌陷, 死亡 (图 1 B、C、D)。X 线照射后原头节生长被抑制, 随着作用时间的延长, 可见原头节逐渐皱缩, 塌陷、崩解, 结构消失。



A: X 线照射前; B: 首次照射后第 4 天; C: 首次照射后第 6 天; D: 首次照射后第 8 天。
A: Before irradiation; B: On the 4th day after the first irradiation; C: On the 6th day after the first irradiation; D: On the 8th day after the first irradiation.

图 1 首次 X 线照射后不同时间泡球蚴原头节的形态变化 (×400)

Fig.1 Morphological changes of *Echinococcus multilocularis* protoscolexes at different time after the first irradiation (×400)

讨 论

X 线治疗恶性肿瘤的原理是利用医用加速器产生的高能 X 线穿过组织时, 在其轨迹上将能量传送到组织细胞, 通过直接作用或自由基的间接作用, 使 DNA 的结构发生改变, 产生 DNA 单链、双链的断裂, 导致受照组织细胞的变性与死亡。约 65%~75% 的恶性肿瘤在治疗中需使用放射治疗, 还有一些良性疾病的治疗, 如瘢痕瘤和血管瘤等^[5]。关于寄生虫病放射治疗的研究报道较少, Park 等^[6]将经 Gamma 射线(5~50 Gy)照射的华支睾吸虫囊蚴接种小鼠, 与未照射组比较, 照射组成虫的成活率随着照射剂量的增加而减少。在给 50 Gy 照射囊蚴后无成虫在小鼠体内存活。

本实验根据放射线对恶性肿瘤的有效根治剂量 (>70 Gy) 和良性肿瘤的有效治疗剂量 (15 Gy~40 Gy), 设立低剂量组 (15 Gy 和 30 Gy)、中剂量组 (45 Gy 和 60 Gy) 和高剂量组 (75 Gy 和 90 Gy), 从照射后第 1 天开始观察原头节死亡率, 发现这 3 组的抗原头节作用与对照组比较, 差异均有统计学意义, 说明放射线有体外杀伤泡球蚴原头节的作用。不同 X 线剂量组之间的差异均无统计学意义 (P>0.05), 但可以看出随着放射剂量的增加, 原头节死亡率有上升的趋势。光镜下见受照射的泡球蚴原头节的囊泡塌陷、破裂, 生发层坏死、脱落, 原头节明显变形、崩解。与王欣等^[7]体外试验研究发现 6MV-X 线对大鼠棘球蚴囊有一定破坏作用, 且在一定范围内存在量效关系结果一

致。说明 X 线对棘球蚴原头节具有杀伤作用。

近 40 年来对肿瘤的综合治疗已经取代传统的单一治疗, 而且在相当多的肿瘤中提高了治愈率^[8]。阿苯达唑是 WHO 棘球蚴病指导纲要推荐的抗棘球蚴病首选药物之一, 口服吸收, 作用于全身, 类似于肿瘤的全身化疗。借鉴肿瘤的综合治疗原则全身化疗联合局部放疗的方法治疗泡球蚴病, 本实验将体外培养的原头节加入阿苯达唑后再分别给予 45 Gy 和 75 Gy 的 X 线照射。结果显示单用阿苯达唑组与对照组原头节死亡率间的差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 与鲍佳春等^[9]认为阿苯达唑对棘球蚴病有效的观点相符。且本实验结果提示, 联合 X 线和阿苯达唑较单用阿苯达唑更早地发挥杀伤效应, 而较单用 X 线对体外泡球蚴原头节杀伤作用更强。

不同 X 线剂量组每天泡球蚴原头节的死亡率呈递增趋势, 符合电离辐射照射生物系统后的效应时间规律, 一般经过物理阶段、化学阶段和生物阶段^[5]。今后将在放射生物学的基础上继续探索 X 线对泡球蚴的有效分割剂量和最低杀伤剂量。

体外试验因其简单易行、耗费低、时间短和见效快等特点, 成为初步筛选新的治疗方法的有效手段。但因 X 线的体内作用过程较为复杂, 还需动物试验的进一步验证。综上所述, 本实验初步证实 X 线对体外培养泡球蚴原头节有杀伤作用, 作为泡球蚴病治疗的新方法, 具有探索价值。

参 考 文 献

[1] Abu-Eshy SA. Clinical characteristics, diagnosis and surgical ma-

agement of hydatid cysts[J]. West Afr J Med, 2006, 25(2): 144-152.

[2] Beyrouti MI, Beyrouti R, Bouassida M, et al. Hydatid cysts of the spigelian lobe (segment I) of the liver: clinical and therapeutic particularities [J]. Presse Med, 2007, 36(12 Pt1): 1732-1737.

[3] Zhang HW, Peng XY, Zhang SJ, et al. Albendazole in combination with artesunate to prevent the recurrence of cystic echinococcosis in mice[J]. Chin J Pathogen Biol, 2010, 5(5): 368-372. (in Chinese)

(张宏伟, 彭心宇, 张示杰, 等. 青蒿琥酯联合阿苯达唑预防小鼠囊型包虫病术后复发的研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2010, 5(5): 368-372.)

[4] Li HT, Ke S, Wen H, et al. Clinical observation of efficacy on liposomal albendazole on *Echinococcus* infections in 66 cases[J]. Endem Dis Bull, 2004, 19(1): 16-19. (in Chinese)

(李海涛, 柯山, 温浩, 等. 阿苯达唑脂质体治疗 66 例人体包虫病的疗效观察[J]. 地方病通报, 2004, 19(1): 16-19.)

[5] Yin WB, Yu ZH, Xu GZ. Radiation Oncology[M]. 4th ed. Beijing: Peking Union Medical College Press, 2008; 2, 226-227. (in Chinese)

(殷蔚伯, 余子豪, 徐国镇. 肿瘤放射治疗学[M]. 第 4 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2008; 2, 226-227.)

[6] Park GM, Yong TS. Effects of gamma-irradiation on the infectivity and chromosome aberration of *Clonorchis sinensis*[J]. Korean J Parasitol, 2003, 41(1): 41-45.

[7] Wang X, Wang XH, Bao GS, et al. The experimental study on the radiotherapy of echinococcosis[J]. Chin J Zoonoses, 2009, 25(7): 653-656. (in Chinese)

(王欣, 王小虎, 包根书, 等. 放射线治疗包虫病的实验研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(7): 653-656.)

[8] Sun Y. Manual of Medical Oncology[M]. 5th ed. People's Medical Publishing House, 2007: 23-24. (in Chinese)

(孙燕. 临床肿瘤内科手册[M]. 第 5 版. 人民卫生出版社, 2007: 23-24.)

[9] Bao JC, Yuan FL, Lu WG. Advances in treatment of echinococcosis[J]. Chin J Schisto Control, 2010, 22(2): 197-199. (in Chinese)

(鲍佳春, 袁凤来, 陆伟国. 包虫病治疗进展[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2010, 22(2): 197-199.)

(收稿日期: 2010-12-13 编辑: 张争艳)

文章编号: 1000-7423(2011)-03-0211-04

【信息报道】

加强中国华支睾吸虫病研究

钱门宝¹, 周晓农^{1*}, 方悦怡², 梁松³, 陈颖丹¹

【提要】 肝吸虫是华支睾吸虫、麝猫后睾吸虫和猫后睾吸虫等几种食源性吸虫的统称。肝吸虫国际会议于 2011 年 3 月 7~8 日在泰国 Khon Kaen 召开, 会议展示了当前全球肝吸虫病的研究和防控现状。本文根据该次会议的内容, 结合中国当前华支睾吸虫病研究现状和防治需求, 探讨未来我国应优先开展研究的领域。

【关键词】 肝吸虫; 华支睾吸虫; 麝猫后睾吸虫; 猫后睾吸虫; 国际会议

中图分类号: R383.2 文献标识码: A

基金项目: 国家传染病重大专项 (No. 2008ZX10004-011)

作者单位: 1 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, 上海 200025;

2 广东省疾病预防控制中心, 广州 510300; 3 俄亥俄州立大学, 哥伦布 43210

* 通讯作者, E-mail: ipdzhouxn@sh163.net