

文章编号:1000-7423(2004)-01-0020-04

青蒿琥酯预防曼氏血吸虫病的实验研究

陆绍红¹ 严晓岚¹ 李思温¹ 吴玲娟¹ 石君帆¹ 刘旭²
严啸华² 杨明瑾¹ 漏磊君¹ 熊谷贵³ 闻礼永¹ 太田伸生³

【摘要】 目的 研究青蒿琥酯对小鼠曼氏血吸虫病的预防作用及优化给药方案。方法 小鼠尾部接触感染曼氏血吸虫尾蚴后口服青蒿琥酯,灌注法收集计数虫体数和雌虫数,镜检计数肝脏和肠的虫卵,统计减虫率、减雌率和平均产卵量,分析青蒿琥酯不同给药时间、剂量、疗程的预防效果。结果 青蒿琥酯预防小鼠曼氏血吸虫病的最佳剂量为 300 mg/kg, 14、21 d 童虫对药物最为敏感,减虫率分别为 84% 和 93%。小鼠感染 14 d 后每周口服 1 次青蒿琥酯 300 mg/kg, 连续 4 wk, 减虫率达 99%; 感染 14 或 21 d 后每 2 wk 口服 1 次青蒿琥酯 300 mg/kg, 连续 4 wk, 减虫率达 97% 或 96%。各服药组平均产卵量与对照组差异具有显著性意义。结论 青蒿琥酯可杀灭曼氏血吸虫童虫,影响雌虫发育产卵,有效预防曼氏血吸虫病。建议应用青蒿琥酯预防曼氏血吸虫病的给药方案为感染 14 或 21 d 后首服,每 1 或 2 周服用 1 次。

【关键词】 青蒿琥酯; 曼氏血吸虫病; 药物预防;

中图分类号: R532.2

文献标识码: A

Prophylactic Effect of Artesunate against Experimental Infection of *Schistosoma mansoni*

LU Shao-hong, YAN Xiao-lan, LI Si-wen, WU Ling-juan, SHI Jun-fan, LIU Xu, YAN Xiao-hua, YANG Ming-jin, LOU Lei-jun, Takashi Kumagai, WEN Li-yong, Nobuo Ohta

(Institute of Parasitic Diseases, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

【Abstract】 Objective To study the prophylactic effect of artesunate against the infection of *Schistosoma mansoni* in mice and its optimal scheme for preventing schistosomiasis mansoni. **Methods** BALB/c mice were infected by tail dipping method with *S. mansoni* cercariae. Mice were administered orally with artesunate at different developmental stage of the parasite, with different regimens. The reduction rates of total and female worms, the number of eggs in the liver and intestine, and the fecundity were calculated and treated statistically. **Results** The optimal dosage of artesunate to prevent murine schistosomiasis was 300 mg/kg. The parasite was found to be especially susceptible to artesunate in its schistosomula stage of 14 and 21 d after infection, resulting in worm reduction rate of 84% and 93% respectively compared with control. High protection was reached with worm reduction rate of 99% by the regimens of 300 mg/kg once a week for 4 consecutive weeks beginning 14 d after infection. The fecundity was significantly suppressed, suggesting that the drug inhibited sexual maturation of female worms. The effective protection could also be gained with prolonged interval time of two weeks with worm reduction rate of 97% and 96% beginning 14 or 21 d after infection. **Conclusion** Artesunate kills schistosomula and reduces the fecundity of females effectively, the infected mice do not develop schistosomiasis mansoni when treated with artesunate. It's proposed that an optimal scheme for field use be the first administration 14 or 21 days after infection with 1 or 2 weeks interval.

【Key words】 artesunate; schistosomiasis mansoni; chemoprophylaxis

Supported by WHO(No. MVP/1.2/001/01.03.01.FE)

血吸虫病流行于 76 个国家,感染人数达 2 亿,目前仍是严重危害人类健康的疾病。主要人体血吸虫中曼氏血吸虫流行于非洲、南美等 55 个国家,感染人数约 8 300 万^[1]。吡喹酮是目前唯一高效、低毒的治

疗血吸虫病药物,但吡喹酮的广泛、频繁使用可能会导致耐药性的产生。最近实验和临床研究报道了血吸虫对吡喹酮的不敏感性^[2,3]。血吸虫疫苗研究虽然已取得进展,但短期内不可能提供应用性疫苗。因此研究预防和早期治疗血吸虫病新药很有必要。青蒿琥酯(二氢青蒿素-10- α -琥珀酸单酯)是青蒿素的衍生物。1986 年首次发明并用于治疗疟疾。口服 LD_{50} 为 1 011 ~ 1 258 mg/kg,低毒,无致突变作用。李思温等^[4]首

基金项目: WHO 合作研究项目(No. MVP/1.2/001/01.03.01.FE)

作者单位: 1 浙江省医学科学院寄生虫病研究所,杭州 310013;

2 桂林南药股份有限公司,桂林 541003;

3 日本名古屋市立大学医学部,名古屋 467-8601

次发现青蒿琥酯能杀灭日本血吸虫童虫, 具有预防作用。小鼠、兔和犬感染日本血吸虫后 7 d 口服青蒿琥酯 300 mg/kg、20~40 mg/kg 和 30 mg/kg, 每周 1 次、连服 4 次, 减虫率 (WRR) 达 77.5%~99.5%, 有效地减少虫体及其产卵对肝脏造成的损害^[5]。现场应用青蒿琥酯, 在中、轻度流行区保护率为 83.9%~100%, 重度流行区保护率为 68.2%^[6]。至今在我国已有 20 万人服用青蒿琥酯预防日本血吸虫病, 保护率达 95%, 未发现严重毒副作用。为进一步探讨青蒿琥酯对曼氏血吸虫的作用, 作者进行了小鼠曼氏血吸虫病的实验研究。

材料与方 法

1 血吸虫尾蚴及动物感染

BALB/c 雌性小鼠, 体重约 20 g (日本筑波大学实验动物中心提供)。阳性光滑双脐螺光照 3~5 h 逸出波多黎各株曼氏血吸虫尾蚴。每鼠经尾部接触感染尾蚴 200 条。

2 药 物

青蒿琥酯粉剂由广西桂林南药股份有限公司提供 (批号 021205)。用前以 1% 羧甲基纤维素钠配成混悬液, 灌服。

3 给 药 方 案

第 1~6 组, 观察曼氏血吸虫对药物最敏感的虫龄期。小鼠分别于感染后 7~8、14~15、21~22、28~29、35~36 d 灌服青蒿琥酯, 剂量为 300 mg/kg。第 7~10 组, 观察青蒿琥酯不同剂量的预防效果。小

鼠分别于感染后 14 d 开始灌服青蒿琥酯, 剂量分别为 100, 300 和 500 mg/kg, 每周灌服 1 次, 共 4 次。第 11~18 组, 观察不同疗程的预防效果。小鼠分别于感染后 7、14、21 d 首服青蒿琥酯, 间隔 2 或 3 wk, 重复灌服 3 或 4 次, 剂量为 300 mg/kg。各组实验鼠均为 7 只。第 6、10、18 组为对照组, 灌服 1% 羧甲基纤维素钠。

4 效果考核

服药组小鼠根据给药时间不同分别于停药 2~6 wk 后、对照组小鼠在感染后 50 d (第 6、10 组) 和 77 d (第 18 组) 剖杀, 灌注法收集计数虫体数和雌虫数, 统计平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$), 计算减虫率和减雌率。解剖小鼠取肝脏和肠, 分别用 4% KOH 37℃ 消化过夜, 显微镜计数虫卵。计算平均产卵量。用 *t* 检验法进行分析。

结 果

1 药物敏感性试验

不同龄期曼氏血吸虫对青蒿琥酯的敏感性试验, 参考文献 [5], 青蒿琥酯剂量为 300 mg/kg。感染鼠连续服药 2 d, 给药时间涵盖曼氏血吸虫 7~36 d 发育期。结果显示, 14~21 d 虫体对药物最为敏感, 减虫率为 84%~93%、减雌率为 86%~94%。除 7~8 d 组外, 各组平均产卵量与对照组比较, 差异均有非常显著性意义 ($P < 0.01$), 其中, 21~22 d 给药, 平均产卵量最低 (60 个/条雌虫), 与 7~8 及 14~15 d 组比较, 差异具有非常显著性意义 ($P < 0.01$) (表 1)。

表 1 300 mg/kg 青蒿琥酯对不同虫龄曼氏血吸虫的作用 (样本数 = 7)
Table 1 Effect of artesunate on different developmental stages of *S. mansoni* at the dosage of 300 mg/kg (No. samples = 7)

组别 Group	给药时间 Time for administration (d)	平均虫数 Average no. worms ($\bar{x} \pm s$)	减虫率 WRR (%)	平均雌虫数 No. females ($\bar{x} \pm s$)	减雌率 FWRR (%)	肠平均虫卵数 (卵/鼠) No. eggs in intestine (/mouse)	肝脏平均虫卵数 (卵/鼠) No. eggs in liver (/mouse)	平均产卵量 (卵/雌虫) Fecundity (No. eggs/♀)
1	7~8	39.6±12.8 ^{ab**}	41	17.0±7.0 ^{ab**}	48	7 442	27 055	2 029 ^{b**}
2	14~15	11.0±5.5 ^{ab**}	84	4.6±3.0 ^{**}	86	557	2 000	581 ^{ab**}
3	21~22	4.6±1.6 ^{**}	93	1.9±1.2 ^{**}	94	114	0	60 ^{**}
4	28~29	18.0±8.2 ^{ab**}	73	9.1±4.3 ^{ab**}	72	71	1 481	171 ^{**}
5	35~36	32.9±18.5 ^{ab**}	51	15.7±8.9 ^{ab**}	52	129	2 449	164 ^{**}
6	对照组 Control	67.0±21.9		32.7±10.7		19 929	79 889	3 053

注: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ a 1、2、3、4、5 组与 6 组比较 b 1、2、4、5 组与 3 组比较
Note: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ a 1, 2, 3, 4, 5 vs 6 b 1, 2, 4, 5 vs 3 WRR: Worm reduction rate FWRR: Female worm reduction rate

2 有效剂量的选择

青蒿琥酯不同剂量对小鼠曼氏血吸虫的作用, 给药方法为感染后 14 d 首服, 每周 1 次, 连续 4 wk。100、300 和 500 mg/kg 等 3 个不同剂量组的减虫率和减雌率与对照组差异均有非常显著性意义 ($P < 0.01$)。其中 100 mg/kg 组减虫率 (92%)、减雌率 (90%) 与 300 mg/kg 组 (均为 99%) 比较, 其差异具有显著性意义 ($P < 0.05$)。300 与 500 mg/kg 组

(减虫率 99%、减雌率 98%) 间差异无显著性意义。平均产卵量, 100 mg/kg 组与对照组差异具有非常显著性意义 ($P < 0.01$), 与 300 和 500 mg/kg 组之间差异也具有显著性意义 ($P < 0.05$)。300 和 500 mg/kg 组肠和肝脏均未查到虫卵 (表 2)。为避免高剂量可能带来的潜在毒性, 因此选择 300 mg/kg 作为最佳剂量。

表 2 青蒿琥酯不同剂量对小鼠曼氏血吸虫的作用 (样本数 = 7)
Table 2 Effect of artesunate on *S. mansoni* infection in mice at different dosages (No. samples = 7)

组别 Group	剂量 Dosage (mg/kg)	平均虫数 No. worms ($\bar{x} \pm s$)	减虫率 WRR (%)	平均雌虫数 No. females ($\bar{x} \pm s$)	减雌率 FWRR (%)	肠平均虫卵数/鼠 No. eggs in intestine /mouse	肝脏平均虫卵数/鼠 No. eggs in liver /mouse	平均产卵量 (卵数/雌虫) Fecundity (No. eggs/♀)
7	100	5.6 ± 3.9 ^{a*}	92	3.4 ± 2.3 ^{a*}	90	262	960	359 ^{a*}
8	300	0.9 ± 1.6 ^{a*}	99	0.4 ± 0.8 ^{a*}	99	0	0	0 ^{a*}
9	500	0.9 ± 1.1 ^{a*}	99	0.6 ± 0.8 ^{a*}	98	0	0	0 ^{a*}
10	对照组 Control	68.0 ± 9.1		35.2 ± 4.0		20 360	68 284	2 518

注: 给药方案均为感染后 14 d 首服, 每周 1 次, 连续 4 wk * $P < 0.05$ $P < 0.01$ a 7、8、9 组与 10 组比较 b 7 组与 8 组比较
Note: Regimens: once a week beginning 14 d after infection for 4 consecutive wk * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ a 7, 8, 9 vs 10 b 7 vs 8 WRR: Worm reduction rate FWRR: Female worm reduction rate

3 最佳疗程

青蒿琥酯不同疗程预防小鼠曼氏血吸虫病的结果如表 3。感染后 7、14 或 21 d 开始给药, 间隔时间和重复次数不同, 结果显示不同疗程组减虫率为 67% ~ 97%, 减雌率为 50% ~ 95%。不同疗程组的平均产卵量与对照组比较其差异均有非常显著性意义 ($P <$

0.01)。比较各疗程组的预防效果, 感染后 14 和 21 d 首次服药, 之后间隔 2 wk 服药 1 次, 共 4 次, 显示对小鼠有较好的保护效果, 减虫率分别达 97%、96%, 减雌率分别为 95%、92%。11 组实验结果表明, 感染后 7 d 开始服药不能提高疗效, 减虫率和减雌率均显著低于 14 d 给药组。

表 3 300 mg/kg 青蒿琥酯不同疗程对小鼠曼氏血吸虫的作用 (样本数 = 7)
Table 3 Effect of artesunate on *S. mansoni* infection at the dosage of 300 mg/kg with different timing (No. samples = 7)

组别 Group	疗程 Time for administration (d)	平均虫数 No. worms ($\bar{x} \pm s$)	减虫率 WRR (%)	平均雌虫数 No. females ($\bar{x} \pm s$)	减雌率 FWRR (%)	肠平均虫卵数/鼠 No. eggs in intestine /mouse	肝脏平均虫卵数/鼠 No. eggs in liver /mouse	平均产卵量 (产卵数/雌虫) Fecundity (No. eggs/♀)
11	7, 21, 35, 49	6.0 ± 2.4 ^{a*}	77	3.0 ± 1.3 ^{a*}	53	450	2 212	887 ^{a*}
12	14, 28, 42, 56	0.7 ± 0.9 ^{a*}	97	0.3 ± 0.5 ^{a*}	95	0	81	270 ^{a*}
13	14, 28, 42	3.2 ± 3.6 ^{a*}	88	1.7 ± 1.8 ^{a*}	73	17	745	448 ^{a*}
14	14, 35, 56	4.2 ± 2.6 ^{a*}	84	2.3 ± 1.9 ^{a*}	63	67	290	155 ^{a*}
15	21, 35, 49, 63	1.0 ± 1.7 ^{a*}	96	0.5 ± 0.8 ^{a*}	92	17	325	684 ^{a*}
16	21, 35, 49	4.8 ± 2.9 ^{a*}	82	2.2 ± 1.5 ^{a*}	66	150	1 394	702 ^{a*}
17	21, 42, 63	8.5 ± 4.2 ^{a*}	67	3.2 ± 1.9 ^{a*}	50	267	4 151	1 339 ^{a*}
18	对照组 Control	24.8 ± 11.2		6.3 ± 2.7		3 143	24 887	4 449

注: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ a 11~17 组与 18 组比较 b 11、13、14、16、17 组与 12 组比较
Note: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ a 11-17 vs 18 b 11, 13, 14, 16, 17 vs 12 WRR: Worm reduction rate FWRR: Female worm reduction rate

讨 论

应用青蒿琥酯预防小鼠曼氏血吸虫病的实验结果表明,雌虫的平均产卵量明显下降,提示青蒿琥酯能干扰雌虫的成熟产卵。Amiro 等^[7]报道,雌虫产卵与宿主的免疫反应有关。周平等^[8]报道,青蒿琥酯对小鼠具有一定的免疫抑制作用,能减少 IL-2 的产生。这种对机体免疫反应的抑制作用是否能干扰虫体性成熟,尚待研究。青蒿琥酯的抗产卵作用使虫卵减少,减轻虫卵形成的肉芽肿对肝脏的损害,同时降低了疾病的传播扩散能力。

实验研究表明,14~21 d 的曼氏血吸虫对青蒿琥酯最为敏感,减虫率达 83%~93%,是杀灭虫体的最佳首次服药时间,这与青蒿素另一衍生物蒿甲醚的实验结果一致^[9]。日本血吸虫对青蒿琥酯的敏感期为感染后 6~9 d^[10],曼氏血吸虫敏感期延迟了 1~2 wk,这与在宿主体内曼氏血吸虫发育和成熟时间比日本血吸虫延长 1 wk 的结果较为一致。青蒿琥酯对这两种血吸虫童虫均有杀灭作用,因此能有效预防曼氏和日本血吸虫病。

青蒿琥酯预防小鼠曼氏血吸虫病,最佳剂量为 300 mg/kg,与预防日本血吸虫病最佳剂量一致^[5]。但其预防日本血吸虫病的最佳方案是在感染后 7 d 首次服药,间隔 7 d 重复给药。而预防曼氏血吸虫病则需在感染后 14~21 d 给药,间隔 1~2 wk,若感染后 7 d 首服,不能有效提高预防效果。感染 14 d 开始服药、间隔 1 wk 连服 4 次的方案几乎具有完全的保护力,因此建议现场应用青蒿琥酯预防曼氏血吸虫病时适当参考此方案,较长期接触疫水也可采用间隔 2 wk 给药的预防方案。

在塞内加尔已有应用青蒿琥酯及其与吡喹酮合并用药预防和治疗曼氏血吸虫病的初步报道,合并用药 5 wk 能显著提高治愈率^[11,12]。青蒿素类药物是治疗疟疾的特效药物,尽管青蒿琥酯在人体内消除半衰期仅为 40 min,不易产生耐药性,但在疟疾和血吸虫病共同流行区仍要慎重使用,以免产生对疟原虫的耐药性。

青蒿琥酯作用机制目前不十分明确,有研究显示

青蒿素类药物与虫体摄取吸收的铁红蛋白结合,通过产生铁依赖的自由基而杀伤寄生虫^[13]。铁离子是药物发挥作用的一个重要因素。Mansour 等^[14]研究表明慢性曼氏血吸虫病往往会导致患者铁缺乏,因此有必要深入研究青蒿琥酯对铁缺乏患者的预防效果。

致谢 桂林南药股份有限公司提供药物和赞助,特此感谢。

参 考 文 献

- [1] Utzinger J, Xiao SH, Keiser J, *et al.* Current progress in the development and use of artemether for chemoprophylaxis of major human schistosome parasites[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2001,8:1841-1859.
- [2] Ismail MM, Taha SA, Farghaly AM, *et al.* Laboratory induced resistance to praziquantel in experimental schistosomiasis[J]. *J Egypt Soc Parasitol*, 1994,24:685-695.
- [3] Liang YS, Coles GC, Doenhoff MJ. Detection of praziquantel resistance in schistosomes[J]. *Trop Med Int Hlth*, 2000,5:72.
- [4] Li SW, Wu LJ, Liu ZD, *et al.* Studies on prophylactic effect of artesunate on schistosomiasis japonicum[J]. *Chin Med J*, 1996,109:848-850.
- [5] 吴玲娟,徐潘生,宣尧仙,等.口服青蒿琥酯早期治疗预防日本血吸虫病的实验研究[J].*中国血吸虫病防治杂志*,1995,7:129-133.
- [6] 张绍基,林丹丹,刘跃民,等.青蒿琥酯预防日本血吸虫病临床试验[J].*现代诊断与治疗*,2000,11:68-72.
- [7] Amiro P, Locksley RM, Parslow TG, *et al.* Tumor necrosis factor α resolves granulomas and induces parasite egg laying in *Schistosoma*-infected SCID mice[J]. *Nature*, 1992,356:604-607.
- [8] 周平,高玉祥.青蒿琥酯对小鼠免疫功能的影响[J].*蚌埠医学院学报*,1996,21:5-6.
- [9] Xiao SH, Choller J, Weiss NA, *et al.* Preventive effect of artemether in experimental animals infected with *Schistosoma mansoni*[J]. *Parasitol Int*, 2000,49:19-24.
- [10] 吴玲娟,郭尧,徐潘生,等.青蒿琥酯对家兔血吸虫病优化方案的探讨.*中国血吸虫病防治杂志*,1999,11:217-219.
- [11] De Clercq D, Vercruyse J, Verle P, *et al.* What is the effect of combining artesunate and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infections? [J]. *Trop Med Int Hlth*, 2000,5:744-746.
- [12] De Clercq D, Vercruyse J, Verle P, *et al.* Efficacy of artesunate against *Schistosoma mansoni* infections in Richard Toll, Senegal[J]. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 2000,94:90-91.
- [13] Krungkrai SR, Yuthavong Y. The antimalarial action on *Plasmodium falciparum* of Qinghaosu and artesunate in combination with agents which modulate oxidant stress[J]. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 1987,81:710-714.
- [14] Mansour MM, Francis WM, Farid Z. Prevalence of latent iron deficiency in patients with chronic *S. mansoni* infection[J]. *Trop Geogr Med*, 1985,37:124-128.

(收稿日期:2003-09-18 编辑:富秀兰)