

蒿甲醚对日本血吸虫核苷摄入和核酸含量的影响*

翟自立 梅静艳 尤纪青 姚民一 肖树华

中国预防医学科学院寄生虫病研究所 ** 上海 200025

提要 目的: 观察蒿甲醚 (Art) 对日本血吸虫核苷摄入和核酸含量的影响。**方法:** 感染小鼠 1 次灌服 (ig) Art 300 mg/kg 后 24 h 或 48 h, 分别测定雌虫 ()、雄虫 () 的 RNA 和 DNA 含量。另取经 Art 作用 24 h 后的 及 虫体, 作体外培养 2 h 或 4 h, 测定虫体对³H 腺苷、[5-³H] 尿苷和 [甲基-³H] 胸苷的摄入量以及上述³H 标记核苷摄入虫体核酸的量。**结果:** 经 Art 体内作用 48 h 后, 血吸虫 虫的 RNA 和 DNA 含量分别较对照组减少 51.6% 和 23.5%, 差异均显著, 而 虫 RNA 含量减少 42.4%。 及 虫体经 Art 作用后移置体外培养 2 h 或 4 h, 虫对 3 种³H 标记核苷的摄入量均较对照组的明显为少, 减少率达 35.2%~50.1%。体外培养 2 h, [甲基-³H] 胸苷掺入 虫 DNA 的量较对照组减少 71.4%, 培养 4 h 后, [³H] 腺苷掺入 虫 RNA 和 DNA 的量较对照组减少 65.2% 与 50.0%。**结论:** Art 对日本血吸虫, 尤其是 虫的核酸代谢有抑制作用。

关键词 日本血吸虫 核酸 ³H 标记核苷 蒿甲醚

蒿甲醚 (Art) 系新类型抗疟药青蒿素的衍生物^[1]。近年来, 经过一系列的实验研究, 观察到 Art 对不同发育期日本血吸虫, 特别是 5 d~14 d 童虫有较强的杀灭作用^[2]; 并经过现场观察^[3,4], 将其发展为预防日本血吸虫病的药物。对 Art 抗血吸虫作用机制的研究结果表明, Art 可明显减少虫体的糖原和蛋白质含量^[5,6], 而且抑制虫体糖酵解的酶^[7], 从而影响虫的能量代谢。由于血吸虫每天产卵需要大量蛋白质, 而经 Art 作用后, 虫产卵迅速被抑制, 同时组织化学观察示 虫实质组织及卵黄细胞的 RNA 含量明显减少或消失^[8], 提示 Art 引起血吸虫蛋白质含量的减少可能与抑制核酸尤其是 RNA 代谢有关。本文报道 Art 对日本血吸虫核苷摄入和核酸含量的影响。

材料与方法

虫源

日本血吸虫尾蚴 (安徽株) 自人工感染的钉螺逸出, 由本所媒介生物学与防制研究室提供。

药物与试剂

Art 由昆明制药股份有限公司提供, 临用前用 1% 西黄蓍胶配制成混悬液, 浓度为 30 g/L。实验所用 DNA 和牛血清白蛋白购自 Sigma 公司, 酵母 RNA 购自上海丽珠东风生物技术有限公司, 考马斯亮蓝 G-250 购自 Fluka 公司, [³H] 腺苷 (5.55 × 10⁵ GBq/mol)、[5-³H] 尿苷 (7.77 × 10⁵ GBq/mol) 和 [甲基-³H] 胸苷 (8.14 × 10⁵ GBq/mol) 的放射和化学纯度均 > 95%, 皆购自中国科学院上海原子核研究所。

小鼠

昆明系小鼠, 兼用, 体重 20 ± 2 g, 由

本所实验动物室提供。每只小鼠自腹部剃毛皮肤接种血吸虫尾蚴 80 条~100 条后 28 d~35 d, 1 次 ig Art 300 mg/kg, 并于给药后 24 h 或 48 h, 剖杀小鼠, 收集虫体。同时设有同批感染未治疗小鼠作对照。

RNA、DNA 及蛋白质测定

取 虫各 30 条, 置于含 1 ml 冰冷重蒸水的匀浆器内, 在冰浴中磨成匀浆, 然后提取虫的 RNA 和 DNA^[9], 并分别采用地衣酚法和二苯胺法, 用 752 C 紫外可见分光光度计在 660 nm 及 610 nm 处测定 OD 值, 根据标准曲线计算 RNA 和 DNA 含量。另取虫匀浆 40 μl, 采用考马斯亮蓝显色法测定蛋白质含量^[5]。

体外培养

培养液为亨氏盐平衡溶液 (HBSS), 含 10% 小牛血清、青霉素和链霉素各 5 × 10⁵ IU/L、两性霉素 B 0.25 mg/L 以及 0.3% 葡萄糖。取经 Art 作用 24 h 后的 虫各 10 条或 30 条, 分别置于盛有 1.9 ml 培养液的培养皿内和 3.8 ml 培养液的卡氏瓶内, 在含 5% CO₂ 的 37 °C 恒温箱中培养 15 min~20 min 后, 加入³H 标记核苷应用液 0.1 ml 或 0.2 ml。除体外培养 2 h, 观察 [5-³H] 尿苷和 [甲基-³H] 胸苷掺入核酸的终浓度为 37 MBq/L 外, 其余各组³H 标记核苷的终浓度均为 74 MBq/L。血吸虫在上述恒温箱中培养 2 h 或 4 h 后, 立即将培养液吸去, 用冰冷的 HBSS 洗涤虫 3 次, 然后加入甲酸、双氧水和正辛醇, 80 °C 温育消化 30 min~45 min, 待冷却后加入闪烁液 10 ml 溶解, 用

* 国家自然科学基金资助项目 No. 39670662

** 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心

Beckman Ls 7500 型液体闪烁计数器测定³H量^[6]。在进行³H标记核苷掺入核酸试验时,提取虫的 RNA 和 DNA 后,测定 RNA 和 DNA 中的³H量。

统计处理

所有实验数据用 t 检验作统计分析比较。

结 果

1 Art 对日本血吸虫核酸和蛋白质含量的影响

表 1 感染小鼠 1 次 ig Art 300 mg/kg 后其体内日本血吸虫的核酸和蛋白质含量变化

Table 1 Changes in RNA, DNA and protein content of *Schistosoma japonicum*, harbored in mice treated ig with artemether (Art) 300 mg/kg

组别 Group	治疗后时间 Time after medication (h)	血吸虫性别 Sex of schistosome	RNA		DNA		蛋白质 Protein	
			μg/条 μg/worm	减少率(%) Reduction rate(%)	μg/条 μg/worm	减少率(%) Reduction rate(%)	μg/条 μg/worm	减少率(%) Reduction rate(%)
蒿甲醚	24		4.5 ± 0.5 ^c	26.2	3.0 ± 0.4 ^b	9.1	30.7 ± 3.1 ^c	29.3
Art	24		2.4 ± 0.2 ^c	29.4	2.1 ± 0.5 ^a	-	44.5 ± 4.2 ^c	11.5
对照	24		6.1 ± 0.6		3.3 ± 0.5		43.4 ± 4.2	
Control	24		3.4 ± 0.3		2.0 ± 0.2		50.3 ± 4.6	
蒿甲醚	48		3.0 ± 0.5 ^c	51.6	2.6 ± 0.7 ^c	23.5	23.4 ± 2.9 ^c	48.7
Art	48		1.9 ± 0.1 ^c	42.4	1.7 ± 0.7 ^a	15.0	41.2 ± 3.3 ^c	26.4
对照	48		6.2 ± 0.5		3.4 ± 0.7		45.6 ± 3.9	
Control	48		3.3 ± 0.2		2.0 ± 0.5		56.0 ± 3.5	

$\bar{x} \pm SD, n = 22 \sim 24$, 每个样本含 30 条 或 虫; 与对照组比较, a: $P > 0.05$, b: $P < 0.05$, c: $P < 0.01$
The sample number was from 22 to 24, each sample contained 30 or worms; a: $P > 0.05$, b: $P < 0.05$, c: $P < 0.01$ vs the control

2 Art 对日本血吸虫摄入³H标记核苷量的影响

感染小鼠 1 次 ig Art 300 mg/kg 后 24 h, 取 虫置于含 [³H] 腺苷、[5-³H] 尿苷或 [甲基-³H] 胸苷的培养液内培养 2 h, 虫对上述 3 种³H 标记核苷的摄入量均较对照组的明显为少, 减少率分别达 50.1%、45.4% 和 40.6%; 虫对 [甲基-³H] 胸苷的摄入量较对照组的亦有明显减少, 但对 [³H] 腺苷和 [5-³H] 尿苷的摄入量则较对照组的明显增加, 增加率为 65.2% 和 33.9%。体外培养 4 h, 虫对 3 种³H 标记核苷的摄入量仍较对照组的明显减少, 而 虫对 3 种³H 标记核苷

感染小鼠 1 次 ig Art 300 mg/kg 后 24 h, 虫的 RNA 和蛋白质含量均较相对应对照组的明显为少, RNA 减少率为 26.2% 和 29.4%, 蛋白质减少率为 29.3% 和 11.5%; 虫的 DNA 含量与对照组相比, 亦有明显减少。给药后 48 h, 虫的 RNA 和蛋白质含量以及 虫的 DNA 含量与对照组相比均进一步降低, 虫的 DNA 含量虽较对照组的为少, 但差别不明显 (表 1)。

的摄入量则与对照组的相似。

3 Art 对³H标记核苷掺入日本血吸虫核酸量的影响

感染小鼠 1 次 ig Art 300 mg/kg 后 24 h, 取虫体置于含 [³H] 腺苷的培养液内培养 2 h, [³H] 腺苷掺入 虫的 RNA 和 DNA 的量均较相对应对照组的有所减少, 但差异皆不显著。若将上述血吸虫培养 4 h, [³H] 腺苷掺入 虫的 RNA 和 DNA 的量均进一步减少, 且与相对应对照组的差异显著, 但 [³H] 腺苷掺入 虫 RNA 及 DNA 的量则与对照组的相似 (表 2)。

表 2 感染小鼠体内经 Art 300 mg/kg 作用 24 h 的血吸虫移置体外培养, [³H] 腺苷掺入虫体核酸量测定

Table 2 The in vitro incorporation of [³H]adenosine into nucleic acid of schistosomes collected from mice treated ig with artemether (Art) 300 mg/kg for 24 h

组别 Group	培养时间 Time of incubation (h)	血吸虫性别 Sex of schistosomes	RNA		DNA	
			Bq/条 Bq/worm	减少率(%) Reduction rate(%)	Bq/条 Bq/worm	减少率(%) Reduction rate(%)
蒿甲醚	2		1.9 ± 0.7 ^a	24.0	0.5 ± 0.2 ^a	16.7
Art	2		2.1 ± 0.7 ^a	4.5	0.5 ± 0.2 ^a	28.6
对照	2		2.5 ± 1.2		0.6 ± 0.3	
Control	2		2.2 ± 0.7		0.7 ± 0.2	
蒿甲醚	4		2.3 ± 1.3 ^c	65.2	0.4 ± 0.2 ^c	50.0
Art	4		6.2 ± 3.3 ^a	35.4	1.1 ± 0.6 ^a	15.4
对照	4		6.6 ± 4.5		0.8 ± 0.3	
Control	4		9.6 ± 7.3		1.3 ± 0.5	

$\bar{x} \pm SD, n = 12 \sim 15$, 每个样本含 30 条 或 虫; 与对照组比较, a: $P > 0.05$, b: $P < 0.05$, c: $P < 0.01$
The sample number was 12 to 15, each sample contained 30 or worms; a: $P > 0.05$, b: $P < 0.05$, c: $P < 0.01$ vs the control

取上述、虫置于含 $[5-^3\text{H}]$ 尿苷的培养液内培养2 h或4 h, $[5-^3\text{H}]$ 尿苷掺入虫RNA的量与对照组相仿,而掺入虫RNA的量虽有所增加,但差异不显著。若将、虫置于含 $[\text{甲基}-^3\text{H}]$ 胸苷的培养液内培养2 h, $[\text{甲基}-^3\text{H}]$ 胸苷掺入虫DNA的量则较对照组的明显为少,减少率达71.4%,而培养4 h后,则 $[\text{甲基}-^3\text{H}]$ 胸苷掺入虫DNA的量则较对照组仅减少26.9%,差别不显著。在上述时间内, $[\text{甲基}-^3\text{H}]$ 胸苷掺入虫DNA的量未见明显变化。

讨 论

本实验证明,经治疗量的Art作用48 h后,在或虫体的蛋白质含量减少的同时,其RNA含量亦明显减少,后者减少的程度高于前者,因而虫的蛋白质含量的减少可能与其RNA代谢受干扰密切相关。

由于Art对体外培养的血吸虫无明显直接作用^[10],我们从受治小鼠体内取虫体作体外培养以观察虫体对3种 ^3H 标记核苷的摄入量。实验结果表明,在体外,经Art治疗量作用后的虫对3种核苷的摄入量均明显减少,这可能与虫经Art作用后,其皮层严重受损有关^[8,11]。Senft等报道,血吸虫合成核酸所需的嘧啶碱基既能自身合成,又可从宿主获取,而所需的嘌呤碱基则必须依赖宿主提供^[12,13]。由于外源性的嘧啶核苷和嘌呤核苷主要通过简单扩散和易化扩散,经虫的皮层进入虫体内^[14,15],一旦血吸虫虫经Art作用后,皮层严重受损,即可明显影响虫体摄入外源性核苷。将体内经Art作用的虫移置体外培养时,仅见对 $[\text{甲基}-^3\text{H}]$ 胸苷的摄入有短时间的抑制,而对 $[^3\text{H}]$ 腺苷和 $[5-^3\text{H}]$ 尿苷的摄入则先有短时间的增加,继而恢复正常,这可能与在相同剂量下,虫的皮层受损较轻有关^[8,11]。实验结果表明,血吸虫虫对Art的敏感性远高于虫,主要表现为虫的减虫率高于虫^[16]、虫出现死亡的时间较虫为早,以及受治鼠体内有些虫的体表和实质组织未见有明显变化^[8]。因此,经Art作用后,虫与虫对3种核苷的摄入有所不同,亦反映了它们对Art敏感性的差异。

^3H 标记核苷掺入血吸虫核酸量的观察结果表明,在体内经Art作用的虫移置体外培养时,未见对其合成核酸有明显影响。由于感染小鼠体内的血吸虫虫经Art作用后,其RNA含量明显减少,

提示将此虫移置体外培养期间,其核酸代谢可得到恢复。与之相反,将Art作用后虫移置体外培养时,摄入的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入虫的RNA和DNA则被持续抑制,对 $[\text{甲基}-^3\text{H}]$ 胸苷掺入虫的DNA虽有抑制作用,但恢复较快,而对 $[5-^3\text{H}]$ 尿苷掺入虫的RNA则无影响,表明Art抑制 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入虫核酸的作用具有一定的特异性。由于血吸虫摄入腺苷后,主要通过腺苷脱氨酶、次黄苷磷酸化酶和鸟嘌呤/次黄嘌呤磷酸核糖转移酶等多酶系统催化^[17],将其转变成AMP,进而被磷酸化为ADP及ATP后,参与虫的核酸合成,因此,Art可能通过抑制这些酶的活性,从而干扰腺苷的掺入,抑制虫体的核酸合成。

参 考 文 献

- 1 李英,虞佩琳,陈一心,等. 青蒿素衍生物的合成. 科学通报 1979;24:667
- 2 Xiao SH, You JQ, Yang YQ, et al. Experimental studies on early treatment of schistosomal infection with artemether. Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth 1995;26:306
- 3 肖树华,石中谷,卓尚炯,等. 蒿甲醚预防日本血吸虫感染的现场观察. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 1995;13:170
- 4 肖树华,王家龙,王存志,等. 在云南大理血吸虫病流行区用蒿甲醚预防血吸虫感染的观察. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 1996;14:11
- 5 尤纪青,郭惠芳,梅静艳,等. 蒿甲醚对日本血吸虫糖原、蛋白质、碱性磷酸酶和酸性磷酸酶的影响. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 1994;12:275
- 6 Xiao SH, You JQ, Mei JY, et al. Effect of artemether on glucose uptake and glycogen content in *Schistosoma japonicum*. Acta Pharmacol Sin 1997;18:363
- 7 Xiao SH, You JQ, Guo HF, et al. Effect of artemether on hexokinase, glucose phosphate isomerase and phosphofructokinase of *Schistosoma japonicum* harbored in mice. Chin J Parasitol Parasit Dis 1998;16:25
- 8 吴莉菊,杨惠中,杨元清. 蒿甲醚对日本血吸虫及宿主肝脏作用的组织学及组织化学观察. 药理学报 1983;18:7
- 9 沈美玲,陈瑞婷,胥彬. 抗肿瘤药物的研究. 放疗菌素K对Ehrlich腹水瘤细胞核酸含量及P32掺入的影响. 生物化学与生物物理学报 1962;2:218
- 10 尤纪青,梅静艳,肖树华. 蒿甲醚抗日本血吸虫的作用. 中国药理学报 1992;13:280
- 11 Xiao SH, Shen BQ, Horner J, et al. Tegument changes of *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni* in mice treated with artemether. Acta Pharmacol Sin 1996;17:535
- 12 Senft AW, Miech RP, Brown PR, et al. Purine metabolism in *Schistosoma mansoni*. Int J Parasitol 1972;2:249
- 13 黄左钺,常惠玲,周依燕,等. 日本血吸虫嘧啶合成代谢及其抑制的研究. 寄生虫学与寄生虫病杂志 1983;1:158
- 14 Levy MG, Read CP. Purine and pyrimidine transport in *Schistosoma mansoni*. J Parasitol 1975;61:627
- 15 Levy MG, Read CP. Relation of tegumentary phosphohydrolase to purine and pyrimidine transport in *Schistosoma mansoni*. J Parasitol 1975;61:648
- 16 乐文菊,尤纪青,杨元清,等. 蒿甲醚治疗动物血吸虫病的实验研究. 药理学报 1982;17:187
- 17 Senft AW, Senft DG, Miech RP. Pathways of nucleotide metabolism in *Schistosoma mansoni* - disposition of adenosine by whole worms. Biochem Pharmacol 1973;22:437

1998年4月17日收稿 1999年10月18日修回

(编辑:庄兆农)

EFFECT OF ARTEMETHER ON NUCLEOSIDE UPTAKE AND NUCLEIC ACID CONTENT IN SCHISTOSOMA JAPONICUM *

ZHAI Zili, MEI Jingyan, YOU Jiqing, YAO Minyi, XIAO Shuhua

*Institute of Parasitic Diseases, Chinese Academy of Preventive Medicine ***, Shanghai 200025

ABSTRACT

AIM: To observe the effect of artemether (Art) on nucleoside uptake and nucleic acid content in *Schistosoma japonicum*. **METHODS:** RNA and DNA contents of both male and female worms harbored in mice treated intragastrically (ig) with Art 300 mg/kg for 24 h or 48 h were determined, respectively. After *in vivo* drug treatment, the schistosomes recovered were *in vitro* maintained in drug-free medium containing [³H]adenosine, [^{5-³H}]uridine or [methyl-³H]thymidine at a final concentration of 37 MBq/L or 74 MBq/L for 2 h or 4 h, the tritiated nucleoside uptake and incorporation into nucleic acid of schistosomes were measured. **RESULTS:** The RNA and DNA contents of female worms recovered from the host 48 h after dosing were markedly decreased by 51.6% and 23.5%, respectively, while the RNA content of male worms showed 42.4% reduction. When the above-mentioned schistosomes were *in vitro* exposed to the tritiated nucleoside for 2 h or 4 h, apparent decrease in tritiated nucleoside uptake with reduction rates of 35.2%~50.1% was seen in female worms. The incorporation of [methyl-³H]thymidine into the female worm DNA 2 h after incubation was reduced by 71.4% while the incorporation of [³H]adenosine into the female worm RNA and DNA 4 h after incubation was reduced by 65.2% and 50.0%, respectively. **CONCLUSION:** Art exhibited an apparent effect on the nucleic acid metabolism in schistosomes, especially in female worms.

Key words: *Schistosoma japonicum*, nucleic acid, tritiated nucleoside, artemether

* Supported by the National Natural Science Foundation of China No. 39670662

** WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis

男婴尿路阴道毛滴虫感染一例

广西都安瑶族自治县人民医院 都安 530700 韦仁杰 韦立功

患儿,男性,11个月。因发热5 d入院。5 d来,患儿无鼻塞或咳嗽。母乳喂养,生长发育尚可。既往病史无特殊。体温39,贫血貌,皮肤及粘膜苍白。咽稍充血,心肺正常,肝右肋下3 cm,脾左肋下6 cm,外生殖器无异常。血检:Hb 54 g/L, RBC $2.22 \times 10^{12}/L$, WBC $30.0 \times 10^9/L$, N 0.40, L 0.57,红细胞形态大小不均,可见较多靶形红细胞, Hb A₂ 5.7%。拟诊为地中海贫血,上呼吸道感染。先后使用氨苄青霉素、红霉素及庆大霉素抗感染。5 d后咽充血消失, WBC下降,但体温仍持续不退。经连续2 d尿常规检查均发现活动的阴道毛滴虫,遂诊断为尿路阴道毛滴虫感染,改用5%灭滴灵治疗,剂量为每日5 ml/kg,静脉滴注,连续5

d。用药2 d后体温降至正常,复查尿阴道毛滴虫转阴。再经输血治疗后出院。

阴道毛滴虫多见于成年女性阴道和尿道感染,男性尤其幼小男婴阴道毛滴虫尿路感染临床少见。阴道毛滴虫感染可无症状或症状轻微。本例有持续发热表现,经灭滴灵治疗后体温迅速恢复正常,阴道毛滴虫转阴,诊断为尿路阴道毛滴虫感染成立。表明发热可能是由于小儿阴道毛滴虫尿道感染所致。因此,当小儿持续发热,经多种抗生素治疗无效时,应考虑寄生虫感染的可能。

1999年6月23日收稿 1999年8月27日修回

(编辑:任燕芬)